



L-亮氨酸分批发酵稳定性探讨

李彤 黄和容

(中国科学院微生物研究所)

氨基酸发酵过程中出现高产菌株性能不稳定的问题已非个别,引起国外研究者的广泛关注^[1-3],但国内尚未见此报道。最近我们以一株 *Corynebacterium crenatum* 产亮氨酸的突变株进行亮氨酸分批发酵动力学研究,出现了试验很不稳定的现象。为探讨此问题,我们对分批发酵 24 小时的培养物进行平板分离,比较菌落形态、镜检、生长速度以及产酸能力等。并从分批发酵 70 小时的培养物中分离筛选到 B₂₀₋₁ 菌株,产酸达 15 mg/ml 以上,对其遗传特性和产酸稳定性进行考察,结果简报如下。

材料与方 法

1. 培养基

① 平板分离培养基:普通肉汁胨加 0.3% 酵母膏和 2% 葡萄糖的固体培养基。

② 基础培养基(%):葡萄糖 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.15, KH₂PO₄ 0.1, K₂HPO₄ 0.3, MgSO₄ · 7H₂O 0.01, MnSO₄ · 4H₂O 0.001, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, VB₁ 10 μg, 生物素 3 μg, pH 7.0 精制洋菜 2.0。

③ 发酵培养基(%):葡萄糖 12, (NH₄)₂SO₄ 3.0, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.04, 玉米浆 2.0, 豆饼水解液 1.5 pH 7.0, CaCO₃ 3.0。

2. 氨基酸缺陷型与结构类似物敏感性检测

采用生长图谱法。

3. 亮氨酸摇瓶发酵:接一环斜面培养物于装有 15 ml 发酵培养基的 250 ml 三角瓶中,旋转式摇床上 30℃ 培养 82 小时,取上清液纸上层析分离比色定量^[4]。

结果与讨论

1. 以 2.6L 小型发酵罐 24 小时培养物进行平板分离, 30℃ 培养 24 小时,平板上出现大小悬殊的两种菌落。A 型大菌落呈圆形,中心隆起,直径 ≈ 1 mm; B 型小菌落仅呈针尖状亮点。镜检下两型细胞形态很难区别。继续培养至 48 小时, A 型菌落直径达 1.5—2 mm 以上, B 型菌落尚为 0.5 mm。B 型菌落即使培养至 5 天,其最大的直径不过 2 mm 左右,颜色、形态与 A 型同,而 A 型菌落则可达 5 mm。

2. 各型菌落各挑取 20 株进行亮氨酸摇瓶发酵。A 型菌株不产亮氨酸而产缬氨酸,其代表株 A-10 产缬氨酸量为 10 mg/ml。B 型菌株则产亮氨酸,不产缬氨酸,其代表株 B-12 产亮氨酸量为 10 mg/ml。将 A-10 和 B-12 各取一环接种,混合培养,结果菌体生长快浓度
(下转第 91 页)

产 L-亮氨酸突变株系本所张素珍副研究员赠给,特此致谢。

(上接第96页)

高,生长吸光度($\times 10$)达1.3以上,仅产少量亮氨酸,主产缬氨酸。由于分批发酵过程中出现菌种自然分化现象而影响产酸结果,这种发酵不稳定情况与 Azuma^[2]报道类似。

3. 为了获得发酵稳定性好的产酸菌株,我们从分批发酵罐中取接近发酵终点的培养液,分离一批菌株并进行摇瓶产酸筛选。代表株 B₂₀₋₁ 产酸可达 15—20 mg/ml, 24 小时平板培养为针尖状小菌落, 经过一年分批发酵试验研究, 未出现试验波动现象。该菌发酵稳定性究竟如何, 尚需在以后连续培养研究中进行考核^[3,5]。

4. 确定 B₂₀₋₁ 的遗传标记为 Pro⁻、2-TA⁺、N-Leu⁺、N-Val⁺、LeuHx⁺、DL-N-LeuHx⁺。

5. B₂₀₋₁ 菌株系脯氨酸缺陷型。除给与脯氨酸外若补充天冬素则更促进生长。为了便于进行分批发酵动力学研究, 将发酵基质中的玉米浆改用 VB₁ 和生物素, 豆饼水解液减至 0.4% 而添加 100 μ g/ml 脯氨酸。

与亮氨酸生物合成无直接关联的脯氨酸, 其缺陷型能积累亮氨酸, 此种情况尚未见报道。

参 考 文 献

1. Takagi T et al.: *J. Biochem.*, **99**:357, 1986.
2. Azuma T et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**:3245, 1987.
3. Azuma T et al.: *J. Ferment. Technol.*, **66**:(3): 279, 1988.
4. 潘家秀等:《蛋白质化学研究技术》, 科学出版社, P246, 1962。
5. Azuma T et al.: *J. Ferment. Technol.*, **66**: No. 3, 285, 1988.