

微生物发酵合成 L-缬氨酸-¹⁵N

刁新民 周俊贤 徐大钢

(化学工业部上海化工研究院, 上海 200062)

王秀岭 黄和容

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 采用含有稳定同位素¹⁵N-硫酸铵为主要氮源的专用发酵培养液配方和相应的工艺条件, 在国内首次用微生物直接发酵研制成 L-缬氨酸-¹⁵N 高丰度精制产品。产品¹⁵N 丰度 97.68%, 反比原料¹⁵N-硫酸铵丰度下降 0.53%, L-缬氨酸-¹⁵N 产酸率最高达 4% 以上(未校正)。每克¹⁵N-硫酸铵可得到 1 克以上的 L-缬氨酸-¹⁵N(分析值)。提取精制收率平均为 80—90%(单程), 最高达到 95% 以上(二次提取)。实际每克¹⁵N-硫酸铵可得 0.6 克左右的 L-缬氨酸-¹⁵N 精制产品。

关键词 L-缬氨酸-¹⁵N, 生物合成, 北京棒状杆菌, 分支链氨基酸

L-缬氨酸是人体 8 种必需氨基酸之一, 属于支链氨基酸。支链氨基酸在食物蛋白总量中占 50%; 在成人、儿童与婴儿的肌肉蛋白(每日需要量)中, 分别占 40%、41% 与 45%。近年来, L-缬氨酸等支链氨基酸在医学研究

和治疗中的作用, 日益受到重视^[1]。它们在血脑屏障、肝昏迷、慢性肝硬化以及肾功能衰竭的治疗; 先天性代谢缺陷病的膳食治疗, 败

血症以及术后糖尿病患者的治疗；作为加快外科创伤愈合的药物，肿瘤患者的营养支持治疗中等应用日益广泛^[2,3]。最近，国外报道¹⁵N-标记的支链氨基酸作为示踪剂而普遍应用于上述领域^[4]。本文采用微生物直接发酵方法，研制成L-缬氨酸-¹⁵N高丰度精制产品，填补了国内空白。经多次正交和条件试验，得到以¹⁵N-硫酸铵为主要氮源的发酵培养液配方以及较佳的发酵工艺条件。经多次提取精制条件试验，获得了适合L-缬氨酸-¹⁵N克数级规模的稳定操作的工艺条件。提取精制得率平均达80—90%（单程），最高95%以上（二次提取），达到或超过国内外最新文献报道的水平^[5-8]。现将研制结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinese*) 多重抗性突变株 125 (Ile^r, α-AB^r, α-TA^r, NL^r, NV^r)^[1]。

1.2 培养基

¹⁵N 发酵培养液 (%)：葡萄糖 14—15，¹⁵N-硫酸铵 1.75—2.5，K₂HPO₄ 0.15，MgSO₄ · 7H₂O 0.05，FeSO₄ · 7H₂O 0.002，MnSO₄ ·

4H₂O 0.002，异亮氨酸 0.001，CaCO₃ 3，另加生物素 5μg 和 VB₁ 10μg，pH7.0—7.2。

1.3 发酵培养方法

125 菌经斜面活化后接种到¹⁵N 发酵培养液，30℃ 下振荡培养 88 小时，发酵液合并，加草酸调 pH 2.0—2.5，离心取上清液，再提取精制。

1.4 提取精制

以 732 树脂从发酵液中提取¹⁵N-缬氨酸粗品，粗品再经 732 树脂吸附，NH₄Cl 洗脱分离得到¹⁵N-缬氨酸单斑，去除 NH₄Cl，除氨，脱色，重结晶得到¹⁵N-缬氨酸精制产品。

1.5 分析方法

L-缬氨酸定量：用纸上层析分离，茚三酮显色后定量测定^[9]。

¹⁵N 丰度测定：用 Kzeldahl 法转换后，用 MAT-271 型质谱仪测定。

2 结果和讨论

2.1 以硫酸铵为氮源发酵条件试验

2.1.1 按正交试验 L₉ (3³)，综合葡萄糖、硫酸铵、生物素对发酵的影响，结果见表 1。考察的三因素中以硫酸铵的影响最为显著，为此结合通气量和发酵周期进一步试验。

表 1 葡萄糖、硫酸铵、生物素的影响

| 因素 | 水平 | \bar{K}_1 | \bar{K}_2 | \bar{K}_3 | R | 因素主次 | 好水平 |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|------|-------|
| 葡萄糖 (%) | 10, 12, 14 | 0.63 | 0.67 | 0.78 | 0.15 | 2 | 14 |
| 硫酸铵 (%) | 2, 2.5, 3 | 0.76 | 0.75 | 0.60 | 0.16 | 1 | 2—2.5 |
| 生物素 (r/de) | 5, 8, 10 | 0.74 | 0.70 | 0.63 | 0.11 | 3 | 5 |

注：基础成分见 1.2 中介绍， $\bar{K}_1, \bar{K}_2, \bar{K}_3$ 值以 [g 缬氨酸/g 硫酸铵] 表示。

2.1.2 按正交试验 L₉ (3³) 综合葡萄糖、硫酸铵、装液量、发酵时间对发酵的影响。结果见

表 2。结果表明发酵时间影响较大，发酵时间以 88 小时为宜。

表 2 葡萄糖、硫酸铵、装液量、发酵时间的影响

| 因素 | 水平 | \bar{K}_1 | \bar{K}_2 | \bar{K}_3 | R | 因素主次 | 好水平 |
|----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------|------|----------|
| 葡萄糖 (%) | 12, 14, 16 | 0.62 | 0.63 | 0.62 | 0.010 | 4 | 14 |
| 硫酸铵 (%) | 1.5, 1.75, 2.0 | 0.75 | 0.66 | 0.63 | 0.090 | 2 | 1.75—2.0 |
| 装液量 (ml/500ml) | 20, 25, 30 | 0.67 | 0.60 | 0.60 | 0.070 | 3 | 20 |
| 发酵时间 (小时) | 64, 72, 88 | 0.62 | 0.57 | 0.67 | 0.100 | 1 | 88 |

注：基础成分见材料和方法 1.2。 $\bar{K}_1, \bar{K}_2, \bar{K}_3$ 值以 (g 缬氨酸/g 硫酸铵) 表示。

2.1.3 硫酸铵对发酵的影响结果列于表3。结果表明,以2%硫酸铵用量即能获得较好结果。

表3 硫酸铵浓度的影响

| 硫酸铵 (%) | 1.5 | 2.0 | 2.5 |
|-------------|------|------|------|
| g 缬氨酸/g 硫酸铵 | 0.73 | 0.83 | 0.84 |

注:除硫酸铵外,其他成分见材料和方法1.2。

2.2 L-缬氨酸-¹⁵N 低丰度发酵试验

表4 L-缬氨酸-¹⁵N 低丰度发酵

| 编号 | 葡萄糖 | ¹⁵ N-硫酸铵 (%) | 发酵时间 (h) | 产酸% (校正) | gL-缬氨酸- ¹⁵ N/g ¹⁵ N 硫酸铵* |
|----|-----|-------------------------|------------|---------------|--|
| 1 | 14 | 3.0 | 71 | 2.1 | 0.70 |
| 2 | 15 | 2.0 | 66 | 2.1 | 1.1 |
| 3 | 14 | 2.5 | 66, 89, 97 | 2.6, 2.9, 2.8 | 1.0, 1.2, 1.1 |

注:基础成分见材料和方法1.2。 ¹⁵N 专用发酵培养液成分见材料和方法1.2。 * L-缬氨酸-¹⁵N 克数是分析结果。

在L-缬氨酸-¹⁵N 整个研制过程中,以这三次L-缬氨酸-¹⁵N-低丰度试验进行较正常。因此,整个产酸水平较高。如发酵89小时产酸达到4%以上(未校正),和国内外文献报道的最高产酸率相符合^[1,5]。经过校正计算发酵后体积的减少,扣除菌体和CaCO₃等固体杂质体积后,产酸仍达2.9%水平,每克¹⁵N-硫酸铵可

高丰度¹⁵N-硫酸铵价格昂贵,故必须进行几次低丰度试验。另外,通过得到的低丰度L-缬氨酸-¹⁵N 产品进行¹⁵N 丰度测定,证实和原料低丰度¹⁵N-硫酸铵丰度之间的下降值是否在容许的范围内。如原料¹⁵N-硫酸铵丰度为10.03% (亦就是¹⁵N-硫酸铵分子内二个N中¹⁵N 元素与普通¹⁴N 元素以及¹⁵N 元素之和的比值为10.03%)得到的L-缬氨酸-¹⁵N 低丰度产品的丰度为9.871%, ¹⁵N 丰度下降在1.585%范围内,低于容许的下降值3—5%以内。

得到1克以上L-缬氨酸-¹⁵N(分析值)。低丰度¹⁵N-硫酸铵最佳用量2—2.5%,最佳发酵时间89小时等的试验结果,都和用普通硫酸铵的正交试验结果相符合。

2.3 L-缬氨酸-¹⁵N 高丰度发酵试验

试验结果表明(表5):

表5 L-缬氨酸-¹⁵N 高丰度发酵

| 编号 | ¹⁵ N-硫酸铵 (%) | ¹⁵ N-硫酸铵丰度 (%) | 发酵时间 (h) | 产酸% (校正) | gL-缬氨酸- ¹⁵ N/*g- ¹⁵ N-硫酸铵 | 产品L-缬氨酸- ¹⁵ N 丰度 (%) |
|-------|-------------------------|---------------------------|----------|----------|---|---------------------------------|
| No. 1 | 2.0 | 98.20 | 74 | 1.56 | 0.78 | 97.68 |
| No. 2 | 2.0 | 98.20 | 90 | 1.71 | 0.86 | 97.68 |

注:葡萄糖15%,其他成分同1.2中介绍 * 分析值

2.3.1 L-缬氨酸-¹⁵N 高丰度发酵时间90小时的产酸率比74小时高,这和正交试验以及低丰度发酵试验结果相符合。

2.3.2 L-缬氨酸-¹⁵N 高丰度产品的¹⁵N 丰度97.68%,仅比高丰度原料¹⁵N-硫酸铵丰度98.20%下降了0.53%,已达到国外报道的

0.4—1%水平^[4,11]。

2.4 L-缬氨酸-¹⁵N 产品提取精制

从表6的结果可知,提取精制工艺的得率已达到或超过国内外最新报道的水平^[5—6]。获得了适合L-缬氨酸-¹⁵N 产品克数级规模的稳定操作的提取精制工艺条件。

表6 L-缬氨酸-¹⁵N 产品提取精制

| 编号 | 硫酸 (%) | 硫酸批投 料量 (g) | 粗品 ¹⁾ (g) | L-缬氨酸 精制品 (g) | gL-缬氨酸/g ⁴⁾ 硫酸 | 提取精制得率 (%) |
|------|-----------|----------------|-------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| V-31 | 2.5 | 5.0 | 3.50 ²⁾ | 2.10+0.97 | 0.61 | 95.5 ³⁾ |
| V-32 | 2.0 | 3.6 | 2.12 | 1.77 | 0.49 | >80 |
| V-33 | 2.0 | 2.4 | 1.66 | 1.50 | 0.63 | >90 |
| V-34 | 1.75 | 2.1 | 1.20 | 1.10 | 0.52 | >90 |
| 高丰度 | 2.0 | 1.4 | 9.63 | 6.83 ³⁾ | 0.49 | >80 |

- 1) L-缬氨酸精制得率按 L-缬氨酸发酵液中得到的粗品为基础进行计算。粗品中包括 L-亮氨酸, L-丙氨酸, L-缬氨酸等混合氨基酸, 因此按粗品计算提取精制得率时, 使得率数据偏低。
- 2) 3.5 克粗品中, 经定量分析, 含 L-缬氨酸 91.5%。
- 3) L-缬氨酸-¹⁵N 高丰度精制产品除 6.8 克外, 还有 2.6 克双斑混合产品, 主要含有 L-缬氨酸-¹⁵N 和 L-丙氨酸-¹⁵N。如果把这份混合产品再进一步分离, 还能使高丰度提取精制得率提高。
- 4) L-缬氨酸克数和前面不同, 此处为实际得到的 L-缬氨酸精制产品克数。
- 5) V-31 是经二次提取精制后得到的得率。

微生物发酵合成 L-缬氨酸-¹⁵N 和一般发酵生产 L-缬氨酸方法有很大差异。在 L-缬氨酸-¹⁵N 研制过程中, 由于¹⁵N 硫酸的价格比其他试剂贵重得多, 因此要尽量减少¹⁵N-硫酸的消耗, 以提高¹⁵N 的利用率, 甚至不惜以降低产酸率作为代价^[11]。为此, 本文引进了 [克缬氨酸/克硫酸] 的指标来衡量¹⁵N 利用率的水平。其次, 要极严格地控制一切天然氮源物质的加入, 以防止产品¹⁵N 丰度的下降。试验证实: 若按一般发酵液配方, 不控制天然氮源的加入, 发酵结果使产品¹⁵N 丰度比原料¹⁵N 丰度下降达 60%左右。上述三个要求是相互矛盾又相互制约, 大大增加了研制 L-缬氨酸-¹⁵N 工作上的技术难度和工作量。

整个微生物发酵合成 L-缬氨酸-¹⁵N 试验结果说明:

a. 影响发酵的关键因素是硫酸的用量。在一定范围内硫酸用量越高, 产酸率也越高, 但对于本文的主要研制目标(克缬氨酸/克硫酸)来说, 并不一定有利。硫酸的合适用量在 1.75—2.5% 范围内。

b. 葡萄糖作为碳源应维持在 14—15% 左右。

c. 生物素用量和已报道的结果相同^[1]。

d. 装液量以 500ml 摇瓶内装 20ml 发酵液为宜。

由此得出葡萄糖 14—15%, 硫酸 1.75—2.5%, 装液量 20ml/500ml 摇瓶, 发酵时间 88 小时等较为适宜的发酵条件。上述发酵条件已为三次低丰度和二次高丰度 L-缬氨酸-¹⁵N 的发酵结果所证实。

参 考 文 献

- [1] 王秀岭, 屈明波, 黄和容. 微生物学通报, 1990, 17(5): 276—279.
- [2] 谢保源等. 氨基酸杂志, 1984, 1: 72.
- [3] 郭长江等. 氨基酸杂志, 1989, 2: 24—25.
- [4] Zvie Kahana *et al.* Anal Biochem, 1988, 174: 374—380.
- [5] Azizyyan A G *et al.* Method of producing L-valine Gb. 1988, 2, 199, 323.
- [6] 蔡洪年等. 氨基酸杂志, 1986, 31(3): 8—9.
- [7] 蔡洪年. 氨基酸杂志, 1990, 48(4): 14—18.
- [8] 汤家芳等. 氨基酸杂志, 1992, 53(1): 1—3.
- [9] 潘家秀等. 蛋白质分析技术. 北京: 科学出版社, 1962, 27—28, 79—81.
- [10] 中国科学院微生物研究所. 微生物学报, 1975, 15(4): 325—329.
- [11] Irving C S *et al.* Anal Biochem, 1983, 131: 93—98.