

福建甘蔗废糖蜜生物合成L-赖氨酸的研究

林文奎 王连阳 刘幸 叶锦婷 陈碧娥 陈惠端 余俊生

(化学化工系·)

本文研究了以福建甘蔗糖蜜为原料生物合成L-赖氨酸。探索福建甘蔗糖蜜的化学成分、发酵培养基组成和培养条件对L-赖氨酸积累的影响,并进行扩大试验。结果表明:糖蜜比淀粉作为发酵培养基的碳源,其L-赖氨酸的产酸率较高。从扩大试验获得的精制品含L-赖氨酸98.9%。说明福建甘蔗糖蜜完全可以利用为碳源生产L-赖氨酸。本研究为福建糖蜜的利用开辟一条新的途径。

前 言

L-赖氨酸是人体必需氨基酸,人和动物自身不能合成,为了维持生命及生长,必须外界供给。粮食作物中,L-赖氨酸含量极少,如添加了L-赖氨酸,就可以充分改善其蛋白质的性质而平衡了主要氨基酸的分配状态^[1]。L-赖氨酸已广泛应用于食品(尤其是婴儿食品)强化剂,动物饲料添加剂和医疗上配制复合氨基酸注射液等方面^[2,3],可以治疗多种疾病,疗效显著。

除谷氨酸外,L-赖氨酸是目前用发酵法大规模生产的唯一氨基酸^[4]。1978年,世界年产L-赖氨酸达三万吨。我国北京微生物所和上海工微所,先后进行了赖氨酸生产菌的筛选诱变研究,取得了较好结果^[5,2]。上海、江苏等地方已用淀粉水介糖为主要原料,小规模生产L-赖氨酸^[6,6]。但因产酸率低,成本较高,影响了扩大生产。广西轻工研究所曾用糖蜜为主要原料,在高糖浓度和高通气量下,获得了较高的产酸率。最近台湾糖业公司^[1]已在中型设备中,用糖蜜发酵法生产了L-赖氨酸。日本和苏联已先后在大型和中型发酵罐中用糖蜜为主要原料,生产L-赖氨酸^[7]。但未见其详细的技术报告。

L-赖氨酸的生物合成,早期用二步发酵法^[8]。现在大多数从谷氨酸棒状杆菌(*Cory-*

• 协作单位:泉州味精厂、泉州第二制药厂。

neba cterium glutamicum) 或者黄色短杆菌 (Brevibacterium flavum) 出发, 经过诱变选育, 获得高丝氨酸缺陷型突变株。这种突变株能直接从糖质原料发酵, 以合成 L-赖氨酸。由于突变株高丝氨酸脱氢酶缺损^[8, 4], 限制了苏氨酸和蛋氨酸的合成。因此葡萄糖经酵解途径和三羧酸循环途径形成中间产物——天冬氨酸^[7]。后者经由天冬氨酸激酶等一系列酶催化反应而朝向合成赖氨酸的途径。以这种突变株进行发酵时, 培养基组份中, 高丝氨酸 (或者苏氨酸和蛋氨酸) 必须控制在其生长的亚适量, 才能既满足菌体生长的要求又解除苏氨酸和赖氨酸对天冬氨酸激酶的协同反馈抑制, 从而使中间产物天冬氨酸一半醛, 经赖氨酸合成途径, 生成 L-赖氨酸 (见图 1)。

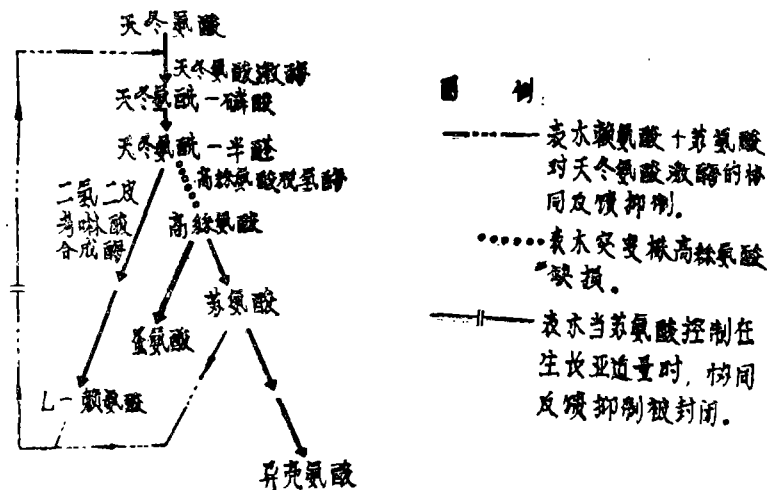


图 1 谷氨酸棒状杆菌的赖氨酸生物合成调节机制

福建是我国重要的甘蔗产区, 糖蜜是制糖工业的付产物。甘蔗糖蜜约占原料甘蔗的 2.5~3%, 甜菜糖蜜为甜菜的 3~4%。目前世界糖蜜年产量约 3000 万吨^[9], 我国产量约一万吨, 福建省约 15~20 万吨。省内除了用来生产酒精、丙酮、丁醇、柠檬酸等产品外, 还有大量糖蜜迫切需要综合利用。

糖蜜是发酵制取谷氨酸、赖氨酸的优良原料, 国外早已大量使用。因此我们进行了糖蜜发酵制取赖氨酸的试验。在制取赖氨酸的研究过程要配制不同配比的供试培养基, 必须掌握所用原料糖蜜的组份含量。由于福建的糖蜜还未见有分析数据的报导, 且不同产地、不同工艺过程, 其组份也有差异。为此, 我们分析了仙游糖厂甘蔗糖蜜 (亚硫酸盐法)、南安大盈糖厂甘蔗糖蜜 (亚硫酸盐法)、泉州糖厂甘蔗糖蜜 (亚硫酸盐法) 和漳州糖厂甘蔗糖蜜 (碳酸盐法)。所得结果作为配制培养基的依据。现将分析结果列表如下 (见表 1)。

在测定糖蜜化学组成的基础上, 我们摸索赖氨酸发酵培养基的组成及条件对赖氨酸积累的影响。并在摇瓶实验的基础上进行扩大试验。本文就实验结果作如下汇报。

表 1

分析项目	糖蜜来源	仙游糖厂 糖 蜜	南安大盈糖厂 糖 蜜	泉州糖厂 糖 蜜	漳州糖厂 糖 蜜	备 注
总 糖 %		60	55	52.5	66	改良斐林氏法
总 氮 %		0.93	0.92	0.95	0.95	凯氏定氮法
生物素微克/公斤		/	/	2500	3800	微生物培养法
胶 体 %		6.78	6.40	7.64	4.69	糖蜜总胶体测定法
灰 份 %		8.88	10.20	9.23	9.94	重 量 法
CaO %		1.52	1.41	0.93	1.85	容 量 法
MgO %		0.77	0.64	1.38	1.35	容 量 法
P ₂ O ₅ %		0.095	0.093	0.085	0.066	比 色 法
Fe ₂ O ₃ %		0.025	0.044	0.044	微 量	容 量 法
Al ₂ O ₃ %		0.023	0.012	0.012	微 量	容 量 法
K ₂ O %		2.91	2.31	2.14	2.42	容 量 法
SiO ₂ +酸石溶物		0.25	0.27	1.32—2.97	0.57—0.94	重 量 法

实 验 方 法

1、供试菌种 中国科学院微生物研究所的北京棒状杆菌AS 1.563。

2、原材料

(1)糖蜜：取自甘蔗糖厂的糖蜜，需经简单预处理。即视其浓度，加适量水稀释并加热至80℃左右，剧烈搅匀，尔后静置让其自然沉降。上层液体则为供试原料。

(2)豆饼水介液：按豆饼：水：盐酸（比重1.18）= 1 : 1.8 : 1.5的重量比，配制豆饼盐酸混合液，加热至沸腾状态，保温水解16小时，滤去残渣，则得滤液。

(3)淀粉水介糖：泉州味精厂提供。

(4)玉米浆：华北制药厂供应。

3、培养基

(1)斜面培养基：葡萄糖2%；蛋白胨1%；酵母膏0.5%；氯化钠0.25%；琼脂2.5%；pH7.2。消毒：1 Kg/cm²蒸汽20分钟。

(2)一级种子培养基：葡萄糖2%；豆饼水介液1.5%；玉米浆1%；(NH₄)₂SO₄ 0.4%；K₂HPO₄ 0.1%；MgSO₄·7H₂O 0.04%；CaCO₃ 1.0%；pH 7.0。
消毒：1公斤/厘米²蒸汽15分钟。

(3)发酵基础培养基^[注1]：糖蜜12%（以含全糖计）豆饼水介液1%；(NH₄)₂SO₄ 2.5%；K₂HPO₄ 0.1%；MgSO₄·7H₂O 0.04%；CaCO₃ 1.5%；pH7.0。
消毒：1公斤/厘米²，蒸汽，15分钟。

注1：以上培养基均用自来水配制，PH调好后，才加入CaCO₃（下同）。

4、发酵条件

摇瓶装液量为容器的4%，接种量为10%。摇床振幅为76厘米，频率96次/分。培养温度31℃，发酵时间72小时。

5、分析方法

(1)糖的测定：改良的斐林氏法。

(2) 菌体浓度的测定：取发酵液 1 毫升加 1 N Hcl 9 毫升，用 581 型分光光度计（波长 650 毫微米），测定其光密度（O、D）。

L-赖氨酸测定: 酶法(尸胺杆菌酶)或比色法。

实验结果

1、甘蔗糖蜜与淀粉水解糖分别为培养基的碳源 *L*-赖氨酸产率的变化。实验结果列于表2。

表 2 淀粉水介糖与甘蔗糖蜜为培养基的对照

原 料	含糖 浓 度	实 验 结 果〔注3〕			
		PH	O.D	残 糖 %	L-赖氨酸
淀 粉 水 介 糖	12%	6.4	0.32	1.14	3.23
糖 蜜〔注2〕	12%	7.5	1.0	1.5	3.72

注2：仙游糖蜜未经预处理。

注 3: 实验结果系取三次实验数据的平均值。

培养基：豆饼水解液0.6%， K_2HPO_4 0.08%，其他同发酵基础培养基一样。

从表 2 可见, 甘蔗糖蜜作为发酵培养基的主要原料比淀粉水解糖好。前者比后者有较高的 L-赖氨酸积累。

2、 K_2HPO_4 添加量不同对L-赖氨酸产率的影响 实验结果列于表3。

表 3 K_2HPO_4 对 L-赖氨酸积累的影响^[4]

K ₂ HPO ₄	PH		O.D.		残 糖 %		L-赖氨酸%	
(重量%)	泉州糖蜜	仙游糖蜜	泉州糖蜜	仙游糖蜜	泉州糖蜜	仙游糖蜜	泉州糖蜜	仙游糖蜜
0	7.5	7.3	0.90	0.77	1.8	1.7	2.14	1.69
0.02	7.5	7.2	0.95	0.89	2.4	2.1	2.35	1.68
0.04	7.4	7.2	0.95	0.84	1.7	1.9	2.35	2.01
0.06	7.1	7.3	0.85	0.90	2.3	2.5	2.35	2.14
0.08	7.1	7.4	0.90	0.83	1.7	2.0	2.58	1.98
0.10	6.4	7.4	1.50	0.76	1.8	1.7	2.72	1.68
0.12	6.4		1.50		1.6		2.93	

注 4: 表 3 中仙游糖蜜未经预处理。

培养基: 除 K_2HPO_4 添加量改变外, 其他组份同发酵基础培养基。

从初步的实验结果可以看到, K_2HPO_4 添加量有不同程度的影响, 仙游糖蜜培养基中 K_2HPO_4 添加量较少时, 得到较高的L-赖氨酸产率, 随着添加量再增加, L-赖氨酸产率下降。泉州糖蜜的培养基则需较高 K_2HPO_4 添加量。这可能与不同来源的糖蜜所含化学组成不同有关联。

3、豆饼水介液添加量的影响

表 4 豆饼水介液添加量对L-赖氨酸产酸的影响

豆饼水介液 (重量%)	实 验 结 果			
	PH	O.D.	残糖%	L-赖氨酸%
0.30	6.8	1.10	2.5	2.75
0.60	6.7	0.97	1.6	2.85
0.80	7.3	0.97	1.7	2.55
1.00	7.2	0.91	1.5	2.45
1.20	7.4	0.85	1.2	2.20

培养基: 除豆饼水介液添加量改变外, 其他组份同发酵基础培养基一样。

由表4数据知道, 豆饼水介液以0.6%的添加量对L-赖氨酸的积累有利。

4、培养基含糖量不同对L-赖氨酸产率的影响 实验结果见表5。

表 5 糖添加量不同的影响

培养基〔注5〕 含糖量(%)	实 验 结 果			
	PH	O.D.	残糖%	L-赖氨酸%
10	7.5	0.78	1.1	2.34
12	7.2	0.87	1.5	2.45
13	6.8	0.96	1.7	2.35

注5: 三种含糖量不同的培养基均以泉州糖蜜配制, 其他组份同发酵基础培养基一样。

从上述实验数据可见, 糖蜜添加量以12%为宜。文献^[10]上曾报导, 含糖量超过12%不利于赖氨酸发酵。但糖蜜来源不同或批号不同, 其总糖含量都有些变化, 需根据总糖分析数据, 进行配比。

5、通气量不同对L-赖氨酸积累的影响

以改变摇瓶装液表示通气量不同。即在500毫升三角瓶中放入不等量的培养液, 在相同条件下作对比实验。实验结果见表6

表6 摇瓶装液量对L-赖氨酸积累的影响

培养液(毫升)	PH	O.D.	残糖 %	L-赖氨酸%
15	6.4	1.35	3.1	2.98
20	7.2	1.22	3.0	2.70
25	7.2	1.10	2.3	2.38
30	7.2	1.10	2.3	2.36

从初步结果看, 装培养液为15毫升的摇瓶, L-赖氨酸产率最高(通气量最大)。这说明了在赖氨酸发酵中, 提高通气强度, 有利于L-赖氨酸的积累^[10]。

6、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量不同对L-赖氨酸积累的影响 无机氮源对赖氨酸产生菌的生长代谢影响很大。据报导^[11], 发酵液中硫酸铵含量在1.5~6.0克/毫升时, 菌体生长迅速而赖氨酸积累减少。因此考察一下在我们的条件下, 硫酸氨添加量的影响。结果列于表7。

表7 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量对 L-赖氨酸积累的影响

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量(%)	实 验 结 果			
	PH	O.D.	残糖 %	L-赖氨酸%
0.5	6.4	0.8	7.2	0.69
1.5	6.4	0.98	3.5	1.93
2.5	7.0	1.03	2.8	2.66
3.5	7.2	1.06	2.3	2.74
4.5	7.2	1.03	2.5	2.59

培养基除 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 量改变外, 其他同发酵基础培养基一样。

从实验结果表明, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量以2.5~3.5%左右为宜。

7、综合实验

综合上述实验, 采用较好结果的数据, 并用来源不同的糖蜜培养基同葡萄糖培养基作如下对比实验。结果见表8。

表8 不同来源的糖蜜与葡萄糖对比实验的结果

糖	PH	O.D.	残糖(%)	L-赖氨酸(%)
葡 萄 糖	6.4(6.0) ^[注6]	0.44(0.38)	5.4(6.4)	3.23(3.17)
泉州糖蜜(预处理)	7.4(6.4)	1.20(1.10)	2.6(2.8)	4.30(3.54)
泉州糖蜜(未预处理)	7.0(7.2)	1.25(1.10)	2.4(2.8)	3.97(4.13)
仙游糖蜜(未预处理)	7.0(7.0)	0.87(0.89)	1.8(1.8)	3.72(3.40)

注6: 括号中数据系 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量为3.5%, 没有括号的数据系 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量为2.5%。

由上可见,无论是糖蜜来源不同,或是 $(NH_4)_2SO_4$ 添加量不同,葡萄糖为培养基的实验结果都比糖蜜为培养基差。因此能够肯定,糖蜜不仅完全可以代替葡萄糖作为赖氨酸发酵培养基,而且效果更好。

8、扩大实验

在小试验的基础上,我们进行了十七批扩大实验。

设备 300立升通用式不锈钢发酵罐。搅拌器为二档六直叶涡轮式,定容210立升。

培养基 甘蔗糖蜜12%,豆饼水介液1.5%; K_2HPO_4 0.1%; $(NH_4)_2SO_4$ 3.0%;硫酸镁0.04%;尿素0.4%; PH 7.0。

发酵条件 温度:32~33℃,压力:1公斤/厘米²,通气量:1:0.33(中、后期略高),搅拌器转速:240转/分。在培养过程中流加尿素以控制 pH ,并在中后期适当补加少量糖蜜。

实验结果 最高L-赖氨酸产率为3.04%,其发酵过程典型的数据见图2。

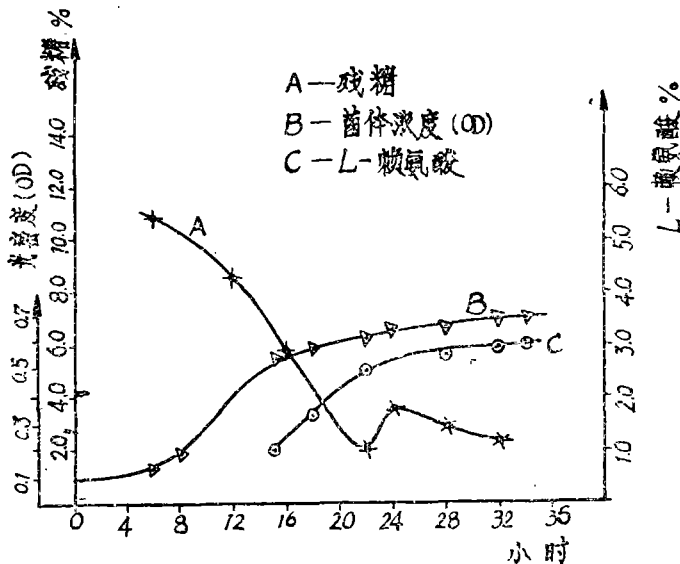


图2: 在300立升扩大试验中,残糖浓度、菌体浓度与赖氨酸积累的变化

讨 论

1、用甘蔗糖蜜为原料进行赖氨酸发酵比用淀粉为原料有很大的优越性。以淀粉为原料必须先把淀粉水介成葡萄糖,需要一整套糖化设备;而甘蔗糖蜜仅需简单预处理,即可投料。甘蔗糖蜜含有丰富的生物素,是赖氨酸发酵的优良原料^[12]。如泉州糖蜜含生物素为2500微克/公斤(见表1)。淀粉不含生物素,必须加入贵缺的玉米浆(一般含生物素为180微克/升)等辅料。在同一菌种同一试验条件下,甘蔗糖蜜培养基比葡萄糖培养基的L-赖氨酸产率较高(参看表8)。

用甘蔗糖蜜为原料不仅可以节约粮食,大大降低成本,而且可为我省丰富又价廉的糖蜜综合利用开辟一条新的途径。

2、用甘蔗糖蜜作为赖氨酸发酵培养基不影响产品质量。甘蔗糖蜜发酵液含较多色素,颜色较深,但发酵液经离子交换树脂提取分离并适当控制赖氨酸盐酸盐的浓缩、结晶及精制条件,完全可以获得无色针状结晶。从扩大实验得到的精制品,L-赖氨酸含量达98.9%。

3、糖蜜的化学组成因产地而异。糖蜜是多种成份的混合物,随甘蔗产地及制糖方法不同,其化学组成有些被动。如我们对福建四个糖厂糖蜜所作的分析,来源不同的糖蜜,基本组份一样,但其含量略有变化。因此,作为培养基原料,务必参照其主要组份的含量而考虑培养基相应组份的添加量,则可以得到基本上一样的收益。

4、在扩大实验中,尽管设备条件较差,操作方法又不尽一致,但L-赖氨酸最高产率已达3.04%。如改善设备并制定统一的操作工艺规程,进一步扩大试验可获得更好的结果。

L-赖氨酸是一个很有实用意义的重要氨基酸。随着我国“四化”建设的进行,全国人民生活水平的提高,对L-赖氨酸的需要量将日益增大。我们深信,由甘蔗糖蜜为原料,生物合成L-赖氨酸不久将在我省开花结果。

以上是我们初步的实验结果和浅见。谬误之处可能不少。请予以指正。

参 考 文 献

- 1、王纯盗:福建省科技参考资料 1980. 9. 1.
- 2、上海工微所:L-赖氨酸发酵的研究 1980(内部资料)
- 3、日本公开特许公报、昭53—6436.
- 4、Daniel I. C. Wang et al "Fermentation and Enzyme Technology" (1979)
- 5、常州味精厂等:微生物学通报 1980. 1. 20.
- 6、上海味精厂:L-赖氨酸生产(1978. 4)(内部资料)
- 7、J. Shvinka, et al, Biotech and Bioeng. 17. 897 (1980)
- 8、Aiba, S, Biochemical Engineering (1964)
- 9、无锡轻工学院,“糖蜜酒精生产工艺学”18—20页 1979.
- 10、П. С. КУЧЕВА, Н. М. КДЮЕВА; ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ 5. 5 556 (1969)
- 11、陈驹声,近代工业微生物学 上册 (1979)