

## 影响L-脯氨酸生物合成因素的研究

顾兆姝\* 胡章助

(华东化工学院生化工程研究所, 上海 200237)

L-脯氨酸在医药、农业、化工及食品等方面有着广泛的用途。L-脯氨酸的生产方法,以生物合成法为好,但国内由于产酸水平不高,至今尚未形成一定的生产规模。

本文以嗜乙酰乙酸棒杆菌 TS31 为出发菌株,经亚硝基胍和硫酸二乙酯逐级诱变获得突变株 No.45,研究了该菌株生物合成 L-脯氨酸的几种影响因素。在含 16% 葡萄糖、添加 5% 工业谷氨酸的培养基中,摇瓶培养 72 小时,平均产 L-脯氨酸 5.3%,对糖的转化率达 33% 以上,达到国内先进水平,为 L-脯氨酸生物合成投入工业化生产提供了条件。原养型菌株产 L-脯氨酸达到上述水平尚未见报道。本报道为国家七·五重点科技攻关项目的菌种及生理研究部分的工作。

### 材料和 方法

#### (一) 菌种

嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoxidophilum*)TS31(由 ATCC13870 诱变得到);突变株 No.45。

#### (二) 培养基和培养条件

1. 斜面培养基(%): 蛋白胨 1.0, 牛肉膏 1.0, 酵母膏 0.3, 氯化钠 0.3, 玉米浆 1.5, 葡萄糖 1.0, 琼脂 2.0, pH7.2。灭菌 117℃, 20min。斜面接种后置 30℃ 培养 24 小时。于 0—4℃ 保存备用。

2. 种子培养基(%): 葡萄糖 3.0, 玉米浆 1.5, 磷酸氢二钾 0.15, 硫酸铵 1.0, 硫酸镁 0.05, pH7.2。灭菌 117℃, 20min。

3. 发酵培养基(%): 葡萄糖 12, 玉米浆 1.5—2.0, 硫酸铵 2.5, 磷酸氢二钾 0.15, 硫酸镁 0.05, 硫酸锰 0.001, 硫酸锌 0.001, 生物素 100μg/L, 硫酸素盐酸盐 100μg/L, 碳酸钙 3,

谷氨酸钠 3.0(分消)。pH7.2。灭菌 115℃, 12—15min。30℃ 培养, 234 r/min。

#### (三) 分析方法

1. 菌体生长量的测定: 用盐酸除去培养液中的碳酸钙, 稀释, 用 721 型分光光度计在 660nm 处测定光密度值。

2. L-脯氨酸测定: 纸层析定性测定, 用吡啶显色法<sup>[1]</sup>; 定量测定, 用 Chinard 比色法<sup>[2]</sup>。

3. 培养液还原糖测定: 弗林氏快速法<sup>[3]</sup>。

4. L-谷氨酸测定: Warburg 氏微量呼吸检压仪<sup>[3]</sup>。

### 结果和 讨论

#### (一) 实验结果

1. 最佳培养基的确定: 采用正交试验方法, 获得主要培养基组份如下(%): 谷氨酸钠 4、葡萄糖 14, 玉米浆 2, 磷酸氢二钾 0.2, 生物素 50μg/L。

2. 发酵产物定性分析: 发酵液用 DIONEX D-600 氨基酸分析仪定性分析的结果表明: No.45 菌株发酵液中积累的产物主要是脯氨酸, 其他氨基酸含量极少。由于 L-脯氨酸是在水中溶解度最大的一种氨基酸, 故发酵液纯度高、产品易提纯对工业生产来说具有重要意义。

3. 菌种稳定性试验: 对 No.45 突变株, 连续移接斜面 10 次, 然后分别接入摇瓶发酵, 脯氨酸的产酸率为 4.3—4.5%, 证明其稳定性是相当可靠的。

4. 生物素对 L-脯氨酸生物合成的影响: 生物素试验结果(图 1) 表明: 当生物素浓度为 50μg/L 时, L-脯氨酸生物合成最好。生物素的作用机制是控制细胞膜组成, 从而影响其渗透

本文于 1992 年 1 月 7 日收到。

\* 现在中国科学院上海植物生理研究所工作。



30 $\mu$ g/L, 24小时补糖4%、补生物素70 $\mu$ g/L) 谷氨酸转化对L-脯氨酸生物合成的影响(图2)。

为降低成本, 以利于L-脯氨酸生物合成投入工业化生产, 以廉价的工业粗制谷氨酸代替精制谷氨酸钠(含量99%以上)作为前体物添加到培养基中, 结果表明对促进L-脯氨酸生物合成的效果仍然稳定。

6. 硫酸铵浓度对L-脯氨酸生物合成的影响: 试验表明, 硫酸铵浓度为2.5—3.0%时对L-脯氨酸的生物合成最有利(图3)。

7. 产物抑制试验: L-脯氨酸的生物合成中, 是否存在产物抑制作用? 通过添加产物脯

氨酸来考察抑制现象, 得到如图4所示的结果。当脯氨酸添加量高达11%时, 仍能净产酸1.22%。今后可以从筛选L-脯氨酸结构类似物的抗性株着手, 增加其遗传标记, 或直接筛选对L-脯氨酸的抗性株, 以进一步解除产物抑制作用, 提高产酸水平。

8. 摇瓶发酵: 当一次投糖改为初糖8%、24小时补糖8%, 初始谷氨酸钠添加5%, 其余组份均采用最佳配比时(500ml三角瓶初始装液量30ml, 补加蒸发水, 恢复原定容积计), L-脯氨酸产量可达5.4%(图5), 对糖的转化率可达33.8%。

### 参 考 文 献

- [1] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 24, 科学出版社, 北京, 1973。  
 [2] Chinard, F.P.: *J. Biol. Chem.*, 199:91—95, 1952。  
 [3] 天津轻工业学院等编: 工业发酵分析, pp.16—17, 106—118, 1980。  
 [4] Nakanishi, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 65(2):139—144, 1987。

## Study on the Factors Effecting L-proline Biosynthesis

Gu Zhaoshu Hu Zhangzhu

(Institute of Biochemical Engineering, East China University of Chemical Technology, Shanghai 200237)

A stable mutant strain No.45 was selected from *Corynebacterium acetoacidophilum* TS31 originally derived from ATCC13870. The factors effecting the biosynthesis of L-proline were studied. With 16% of glucose and 5% of raw glutamate, on average yield of 53g/L L-proline was accumulated by No.45 strain on a rotary shaker in 72h of cultivation. The rate of conversion from glucose reached 33%.

**Key words** L-proline; biosynthesis; *Corynebacterium acetoacidophilum* TS31