

L-苏氨酸发酵法工业生产的研究

张炳荣 檀耀辉 房峻

(无锡轻工业学院)

梁是森 吴维伦 胡制

(鹰潭市生物化学制品厂)

摘要 采用乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) ZT-1株进行500l和6000l罐L-苏氨酸发酵扩大试验,在以工业葡萄糖、硫酸铵为主原料的培养基中发酵,可产20g/l以上的L-苏氨酸,最高达到24.8g/l。发酵液经离子交换法提取和结晶法精制,获得符合国内外药典标准的医药级产品,收率可达40%以上。现已实现工业化批量生产。

主题词 L-苏氨酸; 发酵

前文^[1]报道了以乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) XQ5121为出发菌,经多次诱变处理和分离筛选获得一株L-苏氨酸优良生产菌ZT-1株(AHV^rAEC^rSAM^s),可在适宜的摇瓶发酵条件下积累16g/l的L-苏氨酸。

在此工作的基础上,我们对ZT-1株进行了多次分离纯化和工艺条件改良,使摇瓶产率提高到20—25g/l。进而进行了500l和6000l罐发酵扩大试验,成功地实现了L-苏氨酸发酵生产的工业化。

1 材料与方 法

1.1 供试菌种

乳糖发酵短杆菌ZT-1株(AHV^rAEC^rSAM^s)。

1.2 培养基组成(%)

1.2.1 斜面培养基 葡萄糖0.5, 牛肉膏1.0, 蛋白胨1.0, NaCl0.5, 琼脂2.0, pH7.0。

1.2.2 种子培养基 葡萄糖2.5, 硫酸铵0.5, 玉米浆4.0, KH₂PO₄0.1, MgSO₄0.05, CaCO₃1.0, pH7.0。

1.2.3 发酵培养基 葡萄糖12—14, 硫酸铵3.5, 玉米浆3.0, KH₂PO₄0.1, MgSO₄0.1, CaCO₃2.0, pH7.0。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体生长(OD₅₆₂) 吸取0.2ml样品菌液到5ml0.25mol/lHCl溶液中, 摇匀, 采用721分光光度计、1cm光程、562nm下测定OD值。

1.3.2 pH 采用精密pH计测定。

1.3.3 葡萄糖 斐林试剂滴定法测定。

1.3.4 L-苏氨酸 纸上层析、剪纸比色法^[2]及氨基酸自动分析仪测定。

2 结果

2.1 500l及6000l罐发酵试验

2.1.1 发酵工艺流程 以6000l罐为例，其发酵工艺流程如图1所示。当采用500l罐作发酵试验时，则直接采用摇瓶种子接种而没有种子罐培养过程。

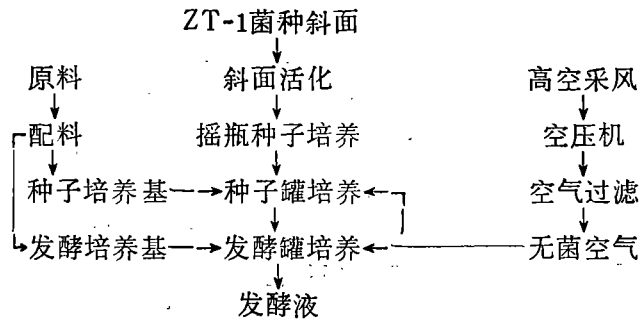


图1 6000l罐L-苏氨酸发酵工艺流程

2.1.2 发酵结果 采用ZT-1株作为L-苏氨酸生产菌，在500l和6000l罐上进行L-苏氨酸发酵连续稳产试验，均取得产酸率20g/l以上的成绩，最高曾达24.8g/l(表1、图2)。

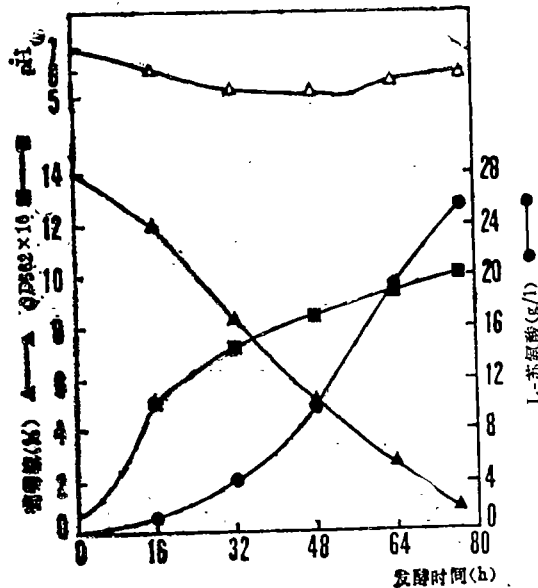


图2 6000l罐L-苏氨酸发酵过程

定容:4500l 接种量:6.7% 温度:31±1℃ 通风量:0.1—0.2V/V/M 搅拌:190r/min

表1 500l罐L-苏氨酸发酵结果

试验批号	总糖 (%)	周期(h)	产酸 (g/l)
1	12.5	81	23
2	13.0	84	22
3	12.6	85	22
4	11.5	66.5	20

定容:300l 接种量:0.8% 温度:31±1℃ 通风量:0.2—0.6V/V/M 搅拌:250r/min

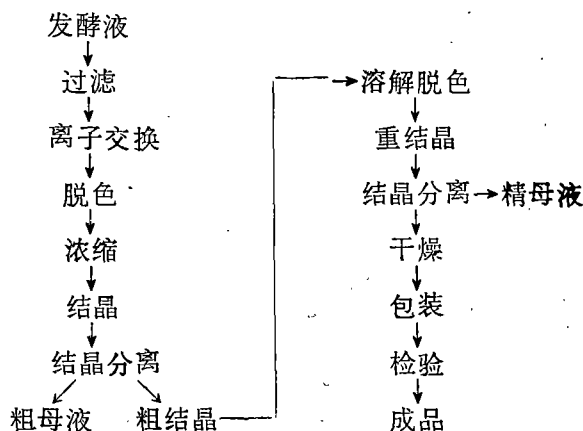


图3 L-苏氨酸提取精制流程

表2 成品质量检验结果

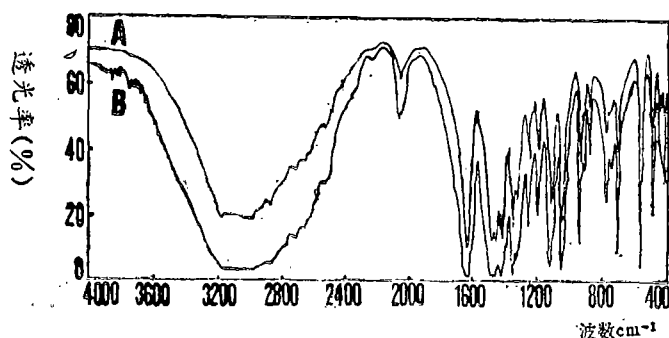
项 目	药 典 标 准			成品实测值 (No.89-05-28)
	中国上海市药品 标准(1980)	日本药局方 (1986)	美国药典 (1985)	
溶状	无色透明, C=5%,水	无色透明, C=5%,水	无色透明, C=5%,水	无色透明, C=5%,水
pH	约为6, C=1%	约为6, C=1%	5.0—6.5, C=5%	5.35, C=5%
含量	>98.5%	>98.5%	98.5—101.5%	99.66%
$[\alpha]_D^{25}$	-26.0—-29.0° C=6%,水	-26.0—-29.0° C=6%,水	-26.7—-29.1° C=6%,水	-28.23° C=6%,水
氯化物	≤0.02%	≤0.021%	≤0.05%	<0.02%
硫酸盐	≤0.03%	≤0.028%	≤0.03%	<0.028%
铵 盐	≤0.02%	≤0.02%		<0.02%
重金属	≤20ppm	≤20ppm	≤15ppm	<20ppm
铁	≤30ppm		≤30ppm	<10ppm
砷	≤2ppm	≤2ppm	≤1.5ppm	<1ppm
其它氨基酸	10μgPPC无	10μgPPC无		10μgPPC无
干燥失重	≤0.20%	≤0.20%	≤0.20%	<0.20%
灼烧残渣	≤0.10%	≤0.10%	≤0.40%	<0.10%

2.2 L-苏氨酸提取与精制

为从发酵液中获得成品L-苏氨酸,采用了图3所示的工艺流程进行提取与精制,总收率可达40%以上。

2.3 成品质量

鹰潭市药检所及国内数家氨基酸输液生产厂的检验结果表明,采用本法提取的L-苏氨酸成品完全符合国内外药用氨基酸质量标准(表2),且其红外光谱图与进口标准品一致(图4)。



A:L-苏氨酸标准品(BDH进口分装) B:L-苏氨酸成品

图4 L-苏氨酸红外光谱

3 讨论

L-苏氨酸作为人和动物体8种必需氨基酸之一,在食品、饲料和医药上有着极其重要的用途和广阔的应用前景,然而限于价格因素至今仍主要用于配制复合氨基酸输液。在我国,它是实现药用氨基酸配套的关键一环。经过艰苦的努力,我们在国内率先实现了L-苏氨酸发酵生产的工业化。鉴于工业生产的特点,需要多种技术乃至企业配合,还有许多问题等待解决,以使L-苏氨酸发酵生产提高到更高的水平。

参 考 文 献

- 1 檀耀辉,张炳荣.生物工程学报,1986;2(2):56
- 2 张炳荣,周群,檀耀辉.发酵科技通讯,1985;14(3,4):139

The Studies of L-Threonine Industrial Production in Fermentation

Zhang Bingrong Tan Yaohui Fang Jun Liang Shisen Wu Weilun Hu Zhi
(Wuxi Inst. of Light Ind.) (Yingtian City Biochem. Products Plant)

Abstract L-Threonine enlarge-up fermentative experiment processes on a scale of 500 l and 6000 l tanks using *Brevibacterium lactofermentum* ZT-1 strain. It can accumulate L-threonine above 20g/l, the maximum up to 24.8 g/l in the medium containing industrial glucose and ammonium sulfate as main raw material. The medical qualified products in line with home and broad pharmacopoeia can be obtained from fermentative liquid by means of the abstracting of ion exchanging and refining of crystallization and its yield is over 40%. Now industrializing production has been realized.

Subjectwords L-Threonine; Fermentation