

## $^{15}\text{N}$ 标记 *L*-亮氨酸

张 亮, 杜晓宁, 李良君, 李 杰

(上海化工研究院 上海稳定同位素工程技术研究中心, 上海 200062)

**摘要:** 采用生物发酵法制备 $^{15}\text{N}$  标记的 *L*-亮氨酸。以实验室选育获得的突变株黄色短杆菌 TLU53-8 为出发菌株, 研究适用于 $^{15}\text{N}$  标记 *L*-亮氨酸生产的实验配方、发酵工艺、提纯工艺。结果表明, 菌株发酵产酸量 > 18 g/L。产品中 $^{15}\text{N}$  同位素丰度 > 98%,  $^{15}\text{N}$  纯度 > 99%。此工艺适用于制备高品质 $^{15}\text{N}$  标记 *L*-亮氨酸, 具有较高的经济价值。

**关键词:**  $^{15}\text{N}$ ; *L*-亮氨酸; 标记

**中图分类号:** R817-33; TQ126.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1000-7512(2010)01-0034-05

## Labeling of *L*-leucine With $^{15}\text{N}$

ZHANG Liang, DU Xiao-ning, LI Liang-jun, LI Jie

(Shanghai Research Institute of Chemical Industry, Shanghai 200062, China)

**Abstract:**  $^{15}\text{N}$ -*L*-leucine was prepared by fermentation on the basis of high-yielding strain TLU53-8 bred by breeding prescription, fermentation condition and purification of  $^{15}\text{N}$ -*L*-leucine were studied. The results showed that  $^{15}\text{N}$ -*L*-leucine can be produced with more than 18 g/L. The  $^{15}\text{N}$  enrichment of  $^{15}\text{N}$ -*L*-leucine was more than 98%, and the product purity was more than 99%. The results demonstrated that the technique was suitable for producing high quality  $^{15}\text{N}$ -*L*-leucine.

**Key words:**  $^{15}\text{N}$ ; *L*-leucine; labeling

稳定性同位素 $^{15}\text{N}$  示踪技术, 在研究多肽和蛋白质结构测序与合成、氨基酸和蛋白质在生物体内的代谢机理、药物动力学机理等方面有着不可替代的作用<sup>[1]</sup>。其中, $^{15}\text{N}$  标记 *L*-亮氨酸作为示踪剂, 已被广泛应用于医学、生物、化工等行业<sup>[2]</sup>。发酵法制备 *L*-亮氨酸的技术已经比较成熟。Tsuchida 等<sup>[3]</sup> 采用亚硝基胍(NTG) 诱变等

方法处理乳糖发酵短杆菌 2256, 最终选出一株 *L*-亮氨酸高产菌(34 号菌,  $\text{Ile}^- + 2\text{-TA}^+ + \beta\text{-HL}^+$ ), 可在 13% 葡萄糖培养基中积累 *L*-亮氨酸达 34 g/L。张素鑫等<sup>[4]</sup> 选育出钝齿棒杆菌 *L*-421 可产 *L*-亮氨酸达 20 g/L。但是, 现有发酵技术由于其含有丰富的天然有机氮源营养, 不适用于生产高丰度的 $^{15}\text{N}$  标记 *L*-亮氨酸, 因此, 需

收稿日期: 2009-06-10; 修回日期: 2009-10-12

基金项目: 上海市科委资助项目(07dz51015)

作者简介: 张亮(1979—), 男, 江苏省吴江市人, 工程师, 生物化工专业

通讯作者: 李良君, 教授, Email: li-liangjun@163.com

要对菌种进行驯化,并研究特殊培养技术,使其适应于低有机氮源营养环境并能高水平产酸,从而提高<sup>15</sup>N 同位素的利用率,保证产品的高品质。本研究拟探索适用于<sup>15</sup>N 标记 L-亮氨酸生产的实验配方、发酵工艺、提纯工艺,以制备高品质<sup>15</sup>N 标记 L-亮氨酸,提高其经济效益。

## 1 主要实验材料

### 1.1 主要仪器

SCS-24 型巡回式自动摇瓶机:上海市离心机械研究所;LRH-250A 型生化培养箱:广东省医疗器械厂;LS-B50L 型高压蒸汽灭菌锅:上海医用核子仪器厂;756MC 型紫外-可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司;SBA40C 型生物传感仪:山东省科学院生物研究所;ALPHA1-2 LD 型冻干机:德国 CHRIST 公司;同位素质谱计:美国 Thermos 公司。

### 1.2 主要试剂

<sup>15</sup>N-硫酸铵、<sup>15</sup>N-尿素:上海化工研究院生产;732H<sup>+</sup> 型阳离子交换树脂:上海树脂厂提供;AS1.542 诱变株:中国科学院微生物研究所提供。

## 2 实验方法

### 2.1 菌种驯化与保存

以 AS1.542 诱变株为出发菌,驯化培养得到黄色短杆菌 TLU53-8,带有 5 种遗传标记:Met<sup>-</sup>、Ile<sup>-</sup>、SGr<sup>-</sup>、a-AB<sup>r</sup>、β-HL<sup>r</sup>,冻干保存。

### 2.2 培养基配方

活化斜面培养基:葡萄糖 1 g/L,蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 10 g/L,酵母膏 5 g/L,NaCl 2.5 g/L,琼脂条 20 g/L,pH7.0~7.2。

种子培养基:葡萄糖 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、NaCl 2.5 g/L、pH 7.0~7.2。

最佳发酵培养基(针对丰度实验):葡萄糖 100 g/L、<sup>15</sup>N-尿素 2 g/L、<sup>15</sup>N-硫酸铵 20 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L、FeSO<sub>4</sub> 0.02 g/L、MnSO<sub>4</sub> 0.02 g/L、生物素 0.000 3 g/L、VB<sub>1</sub> 0.000 3 g/L、蛋白胨 1 g/L、高丰度菌体水解液 10 g/L、pH7.0~7.2。

### 2.3 摇瓶发酵工艺

斜面活化培养:将黄色短杆菌 TLU53-8 置恒温培养箱中,30 ℃ 恒温培养 20~24 h。

斜面二次活化培养:取一环培养 20~24 h

的 TLU53-8 菌转接到活化斜面培养基。

种子液培养:取一环活化后的 TLU53-8 菌体接入装有 25 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,九层纱布封口,30 ℃ 下置于巡回式摇瓶柜,200 r/min 培养 15 h。

摇瓶发酵培养:用移液枪取 3 mL 上述培养好的种子液接入装有 20 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,九层纱布封口,28 ℃ 下置于巡回式摇瓶柜,220 r/min 开始培养,中间检测残糖,残糖<1%时,停止发酵反应,一般需 78~90 h。

### 2.4 提取方法

采用离子交换法分离产品<sup>[5]</sup>。发酵液经除菌和除蛋白预处理,用草酸调 pH 至 3~4,过 732 氢型树脂柱,水洗至中性,分别用 0.05、0.10 和 0.20 mol/L 的氯化铵进行梯度洗脱,去除发酵液中的杂酸;将收集到的亮氨酸单斑溶液浓缩,再次过 732 氢型树脂柱,水洗至中性后,用氨水洗脱。氨水洗脱液经浓缩、赶氨、活性炭脱色后,无水乙醇结晶过夜;将晶体滤出,烘干,可得纯白色晶体。通过氯化铵、氨水两步洗脱法进行提纯,总提取收率达 80%。得到的<sup>15</sup>N 标记 L-亮氨酸纯度>99%,<sup>15</sup>N 丰度>98%。

### 2.5 分析方法

发酵液产酸测定:采用氨基酸自动分析仪。

菌体光密度测定:菌体稀释 20 倍,采用 756MC 分光光度计在 620 nm 处测定光密度。

葡萄糖测定:采用 SBA-40A 型葡萄糖-谷氨酸分析仪测定。

L-亮氨酸纯度测定:采用凯氏定氮法测定。

<sup>15</sup>N 丰度测定:采用同位素质谱测定。

pH 的测定:采用 6.4~8.0 精密试纸测定。

## 3 结果与讨论

### 3.1 温度对发酵的影响

发酵前期菌体的生长对温度敏感,发酵中后期温度对菌体产酸影响较大。由种子培养温度实验可知,TLU53-8 菌株的最佳生长温度为 28 ℃。因此,发酵实验选取 24、26、28、30、32、34 ℃ 进行,结果示于图 1。由图 1 可知,在 28~30 ℃ 时,吸光度较高,表明菌体生长好,菌体浓度大,L-亮氨酸产量较高,28 ℃ 发酵产酸达到实验最大值 23.53 g/L。温度太低菌体生长缓慢,难以完成对原料的转化;温度太高,菌体易衰老、

后劲不足,不利于产酸。基于以上考虑,*L*-亮氨酸发酵温度控制在 28 ℃ 为宜,最高不宜超过 30 ℃。

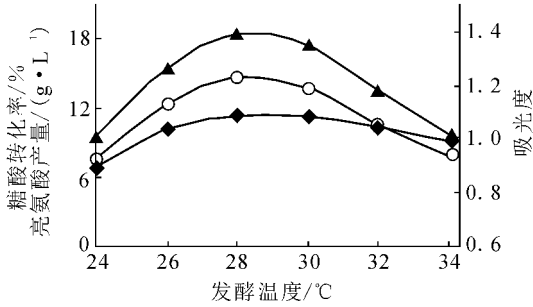


图 1 温度对 *L*-亮氨酸发酵的影响

▲——*L*-亮氨酸;○——糖酸转化率;  
◆——吸光度

### 3.2 pH 对发酵的影响

对摇瓶分批发酵而言,欲控制全发酵过程始终维持某一恒定的 pH 十分困难。添加一定量的碳酸钙可以使 pH 不致于剧烈下降,以防止发酵液酸度过大。培养基的组成和配制时初始 pH 不同,在灭菌过程中 pH 降低的程度也不同。因此,在接种前用灭菌的 5 mol/L NaOH 溶液重调 pH,并在发酵过程每隔 4 h 调 pH 至所需值 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,误差范围±0.1,并在所调的各 pH 处测定糖酸转化率和亮氨酸产量。实验在同一摇床上进行,发酵 72 h 结束,结果示于图 2。由图 2 得知,发酵过程控制 pH 7.0 有利于菌体生长和发酵产酸。pH 对发酵前期的菌体生长和中后期发酵产酸影响较大。pH 7.0 时菌体生长较快,发酵结束时,*L*-亮氨酸产量可达 18.65 g/L。pH 过低或过高,菌体生长缓慢,培养基 pH 长时间偏高或偏低,会使代谢途径上的酶偏离最适酶活力状态,导致菌体生长不佳,代谢产酸减少。

### 3.3 优化条件与初始条件的摇瓶分批发酵比较

综合考虑培养基组成、装液量、种龄和接种量等因素对 TLU53-8 菌株发酵产酸的影响。对发酵条件进行优化,优化前后的参数列于表 1。采用表 1 中所列优化条件与初始条件,分别同时进行 5 瓶平行的分批发酵实验。取样分析 *L*-亮氨酸产量、残糖量,残糖量降至约 5 g/L 即结束发酵。测残液量,计算 *L*-亮氨酸得率、糖酸转化

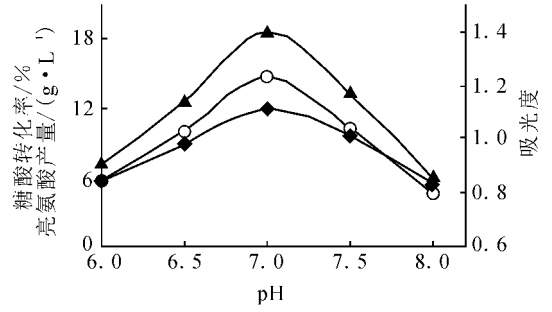


图 2 pH 对 *L*-亮氨酸发酵的影响

▲——*L*-亮氨酸产量;○——糖酸转化率;◆——吸光度

率,结果列于表 2。由表 2 可知,优化条件与初始条件相比较,*L*-亮氨酸产量、*L*-亮氨酸产率、糖酸转化率分别提高了 19.25%、27.81%、28.00%。

表 1 *L*-亮氨酸摇瓶分批发酵条件( $n=5$ )

成份	初始条件 <sup>[6]</sup>		优化条件	
	种子培养基	发酵培养基	种子培养基	发酵培养基
葡萄糖含量/(g·L <sup>-1</sup> )	25	120	30	100
玉米浆/(mL·L <sup>-1</sup> )	20	10	20	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	0	30	0	20
尿素/(g·L <sup>-1</sup> )	2	0	2	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	1.0	1.0	1.0	2.0
MgSO <sub>4</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	0.4	0.4	0.5	0.5
MnSO <sub>4</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	0.01	0.01	0.01	0.02
Glu/(g·L <sup>-1</sup> )	0	0	0	0.4
Met/(g·L <sup>-1</sup> )	0.1	0.3	0.05	0.5
Ile/(g·L <sup>-1</sup> )	0	50	0	50
VB <sub>1</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	300	300	300	300
VH/(μg·L <sup>-1</sup> )	100	50	100	50
CaCO <sub>3</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	0	20	0	30
pH	7.0	7.0	7.0	7.0
装液量/mL	20	25	20	25
接种量/%	/	10	/	3
培养温度/℃	30	28	30	28
培养时间/h	30	72	24	90
摇床振次/(r·min <sup>-1</sup> )	180	200	200	220

表 2 优化条件与初始条件的摇瓶分批发酵实验结果比较

发酵条件及结果	初始条件	优化条件	
		优化条件	比初始条件提高率/%
实测初糖浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	118	100	
残糖浓度/g·L <sup>-1</sup>	6	5	
发酵时间/h	82	90	
L-亮氨酸产量均值/(g·L <sup>-1</sup> )(n=5)	18.54	22.11	19.25
L-亮氨酸计率/%	14.38	18.38	27.81
糖酸转化率/%	14.95	19.15	28.00

### 3.4 菌体水解液添加量的确定

通过低丰度实验可知:采取常规发酵中添加玉米浆的方法很难做到既保证丰度不被稀释,又能保证产酸水平。主要原因是玉米浆中含有的大量有机氮物质(天然丰度)会通过细胞代谢,稀释终产品丰度。因此实验中采取用高丰度菌体水解液代替玉米浆的方法来解决以上问题。实验结果显示,在保证产品产酸量的条件下,终产品丰度稀释很少,完全能符合产品要求。

高丰度菌体水解液的制备:离心收集高丰度发酵产生的菌泥,用 3 mol/L 的硫酸对菌泥进行酸水解 40 h,得到高丰度的菌体水解液。经过质谱分析,此菌体水解液<sup>15</sup>N 丰度为 97.6%。通过多次发酵实验,此菌体水解液能代替发酵过程所使用的玉米浆,且终产品丰度几乎不稀释。在相同的发酵培养基下(其中原料<sup>15</sup>N-硫酸铵同位素丰度 99.9%,原料<sup>15</sup>N-尿素同位素丰度 99.9%),对高丰度菌体水解液添加量做梯度实验,分析不同高丰度菌体水解液添加量对发酵产酸、产品<sup>15</sup>N 丰度的影响,结果示于图 3。由图 3 可知,添加自制高丰度菌体水解液,可以有效防止产品丰度的稀释,尤其是添加 10 g/L 菌体水解液对菌体产酸及丰度最佳。

### 3.5 生物素含量确定

为进一步减轻培养基中有机氮营养源对<sup>15</sup>N 丰度的影响,所用的种子和发酵培养基中的蛋白胨含量相对较低,为保证菌体生长良好,可通过添加高生物素实现强制发酵。

发酵使用筛选培养基配方为:菌体水解液 10 g/L、VB<sub>1</sub> 200 μg/L,改变生物素含量做梯度实验,其它配方同 2.2 节中的发酵培养基,结果

示于图 4。由图 4 可知,添加高生物素对生长有明显的促进作用,控制 1 000 μg/L 对产酸最为有利。

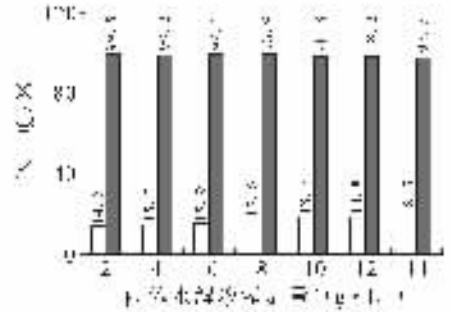


图 3 菌体水解液添加量

对发酵产酸、产品丰度影响

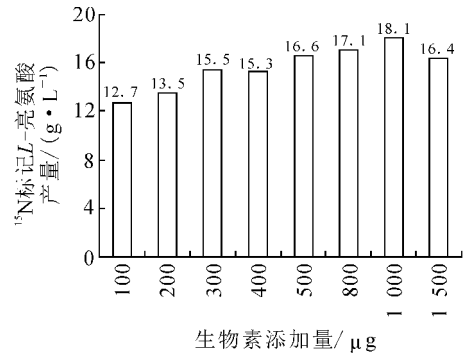
□——产酸量(g·L<sup>-1</sup>); ■——产品丰度(%)

图 4 生物素含量对发酵产酸量的影响

### 3.6 <sup>15</sup>N 原料及<sup>15</sup>N 副产物的回收

发酵过程完毕后,发酵液中含有大量未反应完的<sup>15</sup>N 无机盐、<sup>15</sup>N-杂酸以及<sup>15</sup>N 菌泥。根据工艺特性将回收分为两个阶段:发酵阶段回收及分离提取阶段回收。

发酵阶段主要回收<sup>15</sup>N 菌泥。向菌泥中加入 NaOH,在 200 °C 下水解 2 h,待菌泥中<sup>15</sup>N 有机物变为<sup>15</sup>N-氨气时,用硫酸吸收,最后变为<sup>15</sup>N-硫酸铵。分离提取阶段主要回收<sup>15</sup>N 无机盐、<sup>15</sup>N-杂酸。离子交换法分离氨基酸过程中会产生带有<sup>15</sup>N 无机盐、<sup>15</sup>N-杂酸的水洗液和洗脱液,将其合并起来,减压浓缩,再加入 NaOH,于 200 °C 下水解,用硫酸吸收。计算<sup>15</sup>N 回收率。由于<sup>15</sup>N 原料价格昂贵,因此需要将未反应的<sup>15</sup>N 原料及<sup>15</sup>N 副产物进行回收,结果列于表 3。由表 3 可见,用此工艺制备<sup>15</sup>N-L-亮氨酸,<sup>15</sup>N 回收率约为 76%,可大大节约<sup>15</sup>N 原料成本。

### 3.7 同位素<sup>15</sup>N 丰度实验

#### 3.7.1 低丰度实验

考察针对 TLU53-8 菌种的发酵配方和发酵工艺对<sup>15</sup>N 标记 *L*-亮氨酸的生产实用性,需要进一步进行低丰度<sup>15</sup>N 实验,验证丰度下降规律和产酸水平。将 TLU53-8 菌株从斜面接种于种子培养液中,28 ℃ 摇床培养 24 h,之后接入发酵培养基中(250 mL 三角瓶,装量 25 mL),30 ℃、220 r/min 于巡回式摇床上培养约 72 h,直到发酵终止,计算平均产酸量。将上述发酵液合并处理,提取得到<sup>15</sup>N 标记 *L*-亮氨酸白色晶体,分析

提取收率。采用同位素质谱计分析原料<sup>15</sup>N-硫酸铵同位素丰度,原料<sup>15</sup>N-尿素同位素丰度,产品<sup>15</sup>N 标记 *L*-亮氨酸丰度;采用高效液相色谱分析产品纯度。

结果表明,发酵平均产酸为 22 g/L。<sup>15</sup>N-*L*-亮氨酸提取收率为 70.49%。经质谱分析:原料<sup>15</sup>N-硫酸铵同位素丰度为 10.22%,原料<sup>15</sup>N-尿素同位素丰度为 10.26%,产品<sup>15</sup>N-*L*-亮氨酸丰度为 9.82%,产品纯度经高效液相色谱分析为 99.7%。

表 3 <sup>15</sup>N 回收率实验结果

实验序号	加入 <sup>15</sup> N-硫酸铵/g	加入 <sup>15</sup> N-尿素/g	<sup>15</sup> N- <i>L</i> -亮氨酸/g	回收的 <sup>15</sup> N-硫酸铵/g	<sup>15</sup> N 回收率/%
1	2	0.2	0.45	1.46	71.22
2	4	0.4	0.92	3.13	75.32
3	6	0.6	1.41	4.96	76.95
4	8	0.8	1.87	6.38	76.59
5	10	1.0	2.32	7.88	75.86

注:假设蛋白胨及生物素中的天然丰度氮忽略不计

#### 3.7.2 高丰度实验

所用实验条件和处理方法与低丰度实验相同。

结果显示,<sup>15</sup>N 标记 *L*-亮氨酸提取收率为 68.22%。经质谱分析:原料<sup>15</sup>N-硫酸铵同位素丰度 99.9%,原料<sup>15</sup>N-尿素同位素丰度 99.9%,产品<sup>15</sup>N 标记 *L*-亮氨酸丰度 98.41%,产品纯度经高效液相色谱分析为 99.70%。此结果表明:黄色短杆菌 TLU53-8 在最佳工艺条件下,可发酵得到高品质<sup>15</sup>N-*L*-亮氨酸。

## 4 结 语

本研究以选育获得的突变株黄色短杆菌 TLU53-8(带有 5 种遗传标记:Met<sup>-</sup>、Ile<sup>-</sup>、SG<sup>+</sup>、a-AB<sup>r</sup>、β-HL<sup>r</sup>)出发,研究了适用于<sup>15</sup>N 标记 *L*-亮氨酸生产的实验配方、发酵工艺以及提取工艺,通过低丰度和高丰度实验进一步确认选育的 TLU53-8 菌株可应用于<sup>15</sup>N 标记 *L*-亮氨酸的生产,发酵产酸>18 g/L,产品<sup>15</sup>N 丰度>98%,纯度>99%。优化后的工艺适用于制备高品质<sup>15</sup>N 标记 *L*-亮氨酸。在不受氮源限制的普通发酵过程中,此菌株产酸能达 25 g/L。

采取用高丰度菌体水解液代替玉米浆的方

法能解决丰度稀释问题,且能够保证产酸水平>18 g/L。此法具有通用性,其他同位素标记氨基酸的生产也可借鉴此法。

对发酵及分离提取过程中产生的未反应完的<sup>15</sup>N 原料及<sup>15</sup>N 副产物的回收,可大幅节约<sup>15</sup>N 原料成本。

#### 参考文献:

- [1] 张炜明. 稳定核素的应用[M]. 北京:科技出版社, 1983:67-203.
- [2] 刘占峰,岳海艳,袁其朋,等. 同位素标记氨基酸的应用研究进展[J]. 核技术,2004,27(9):681-686.
- [3] Tsuchida T, Momose H. Improvement of an *L*-leucine-producing mutant of *brevibacterium lactofermentum* 2256 by genetically desensitizing It to α-acetohydroxy acid synthetase[J]. Appl Environ Microbiol, 1986, 51(5): 1 024-1 026.
- [4] 张素鑫,宛兰翠. 产 *L*-白氨酸突变株的选育及发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 1979, 19(2): 180-186.
- [5] 金妙仁,王水英. *L*-亮氨酸精制纯化技术研究[J]. 发酵科技通讯,2003,10(4):12-13.
- [6] 周德庆. 微生物教程[M]. 北京:高等教育出版社, 1997:99-141.