

L-异亮氨酸的发酵条件

张伟国

陈 坚

伦世仪

(无锡轻工大学中央研究所, 无锡 214036)

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 从黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) ATCC14067出发, 选育获得一株L-异亮氨酸高产菌ZQ-4。试验结果证明, 生物素是ZQ-4菌株唯一必需生长因子, 生物素或玉米浆用量分别为50 $\mu\text{g/L}$ 和20 mL/L 时可得到较高的产酸率。为了获得较高的L-异亮氨酸积累量, 培养基中葡萄糖质量浓度为140 g/L, 硫酸铵用量为40 g/L 时较为适宜; 以适当的摇瓶装液量改善通风状况可明显提高产酸率。在适宜的发酵条件下, ZQ-4经摇瓶发酵培养3 d, L-异亮氨酸积累量可达28 ~30 g/L。

关键词 L-异亮氨酸; 生物素; 发酵; 黄色短杆菌

分类号 TQ 922

0 前 言

前文[1]报道了以黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) ATCC14067为出发菌株, 经化学和物理诱变处理, α -氨基- β -羟基戊酸(AHV)、S-2-氨基乙基-L-半胱氨酸(AEC)、磺胺胍(SG)、乙硫氨酸(Eth)、 α -氨基丁酸(α -AB)、异亮氨酸氧肟酸(IleHx)等氨基酸结构类似物及琥珀酸为唯一碳源平板定向筛选, 成功地选育到一株L-异亮氨酸高产菌ZQ-4(AHV^rAEC^rSuc^rSG^rEth^r α -AB^rIleHx^r), 解除了出发菌株固有的反馈调节作用, 可在发酵液中积累L-异亮氨酸28~30 g/L。现报道L-异亮氨酸的摇瓶发酵条件。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

L-异亮氨酸产生菌ZQ-4(AHV^rAEC^rSuc^rSG^rEth^r α -AB^rIleHx^r)。

1.2 培养基(%)

1.2.1 完全培养基 葡萄糖 5; 牛肉膏 10; 蛋白胨 10; NaCl 5; 琼脂条 25。

1.2.2 基础培养基 葡萄糖 20; (NH₄)₂SO₄ 1.5; KH₂PO₄ 1; K₂HPO₄ 3; MgSO₄·7H₂O 0.1; MnSO₄·4H₂O 0.01; FeSO₄·7H₂O 0.01; 尿素 1.5; 琼脂粉 20。VH 0~200 $\mu\text{g/L}$; VB1·HCl 100 $\mu\text{g/L}$ 。

1.2.3 种子培养基 葡萄糖 25; (NH₄)₂SO₄ 5; KH₂PO₄ 1; MgSO₄·7H₂O 0.5; 玉米浆 40;

CaCO₃ 10.

1.2.4 发酵培养基 见实验结果部分2.1.2.

完全、基础和种子培养基均以 20% 的 NaOH 调 pH 至7.0, 以0.1 MPa 灭菌20 min. 发酵培养基以 20% 的 NaOH 调 pH 至7.0, 以0.07 MPa 灭菌8 min.

1.3 发酵试验

接种后置于往复摇床(振次98~100次/min, 振幅9 cm), (31±1) °C下培养72 h.

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生长分析 吸取0.2 mL 样品菌液到5 mL 的0.25 mol/L HCl 溶液中, 摇匀, 采用721分光光度计, 1 cm 光程562 nm 测定 OD 值.

1.4.2 pH 值测定 用精密 pH 试纸和酸度计测定.

1.4.3 葡萄糖测定 菲林试剂滴定法^[2].

1.4.4 L-异亮氨酸分析 以纸上层析法、比色定量法^[3]及氨基酸自动分析仪测定.

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 生物素对L-异亮氨酸发酵的影响 突变株 ZQ-4的出发菌株是谷氨酸产生菌黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) ATCC14067, 它要求生物素作为生长因子. 用基础培养基进行发酵试验, 结果表明, 当缺少生物素时, ZQ-4的生长明显受到影响, 生物素添加量为50 μg/L, 则可获得较高的 L-异亮氨酸积累(图1). 该菌株对生物素的营养要求, 也可以用含有丰富生物素的玉米浆来代替和满足. 试验结果表明, 适当的玉米浆用量(20 mL/L) 有助于提高 L-异亮氨酸的产量(图2)。

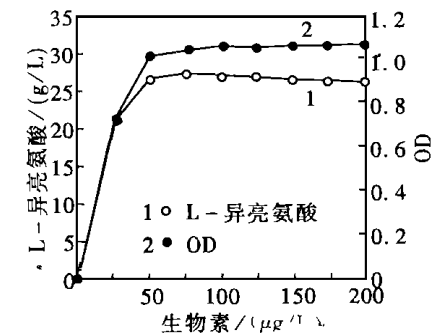


图1 生物素用量对 L-异亮氨酸发酵的影响

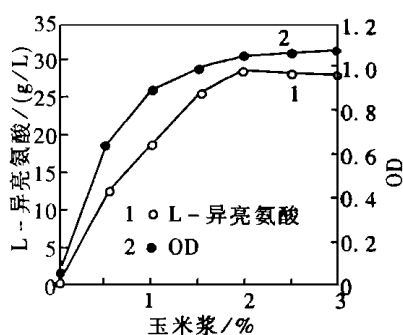


图2 玉米浆用量对 L-异亮氨酸发酵的影响

2.1.2 氮源对L-异亮氨酸发酵的影响 氨基酸发酵不同于其它类型的发酵, 发酵培养基中必须含有较高浓度的氮源, 以满足菌体生长和氨基酸合成的需要. 氮源不足势必导致 L-异亮氨酸积累量的下降. 摇瓶发酵时由于流加尿素或氨水很困难, 故一般采用的氮源为硫酸铵, 但因其 NH₄⁺ 消耗而引起发酵液 pH 值严重下降, 必须添加相应的 CaCO₃ 来中和, 以维持发酵过程中一定的 pH 值. 所以, 笔者试验分析了发酵培养基中不同硫酸铵和 CaCO₃ 用量对产酸的影响(图3). 结果表明, 硫酸铵的最适用量为40%, CaCO₃ 用量以硫酸铵与 CaCO₃ 等摩尔(质量之比5:4)来添加.

2.1.3 葡萄糖质量浓度对L-异亮氨酸发酵的影响 由于培养基灭菌时, 较高质量浓度的

葡萄糖易被破坏生成有害物质, 另外高质量浓度葡萄糖对菌体生长起抑制作用, 因此通常较高质量浓度葡萄糖的一次投糖发酵不能获得较高的糖酸转化率。试验结果表明, ZQ-4菌株在一次投糖的摇瓶发酵中, 葡萄糖质量浓度由14 g/dL 提高到18 g/dL, 其转化率由20.7% 下降至12.5% (图4), 综合考虑产酸率和糖酸转化率, 初糖质量浓度14 g/dL 较为适宜。若进一步提高总糖质量浓度, 则采用流加糖的方式进行, 可望获得更高的产酸率和转化率。

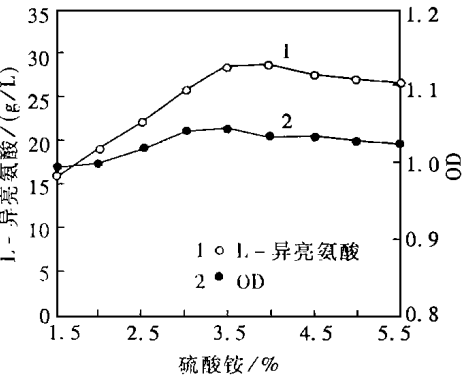


图3 硫酸铵用量对 L-异亮氨酸发酵的影响

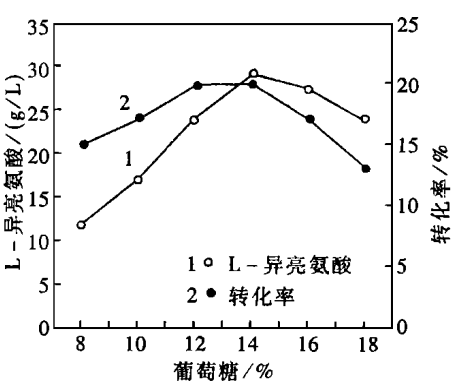
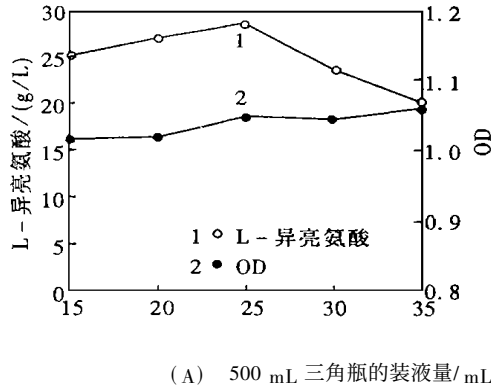
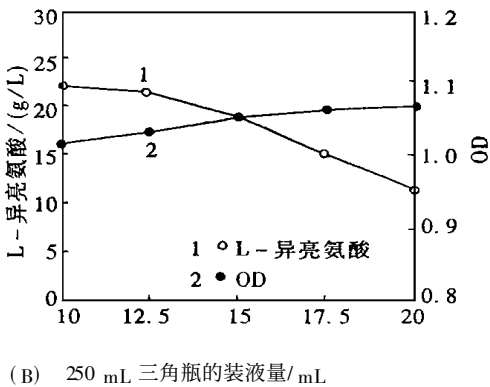


图4 葡萄糖浓度对 L-异亮氨酸发酵的影响

2.1.4 摇瓶通风状况对 L-异亮氨酸发酵的影响 L-异亮氨酸属天门冬氨酸族氨基酸, 在其发酵过程中供氧充足是必要的。笔者在250 mL 和500 mL 容量三角瓶中装入不同体积的发酵培养基进行发酵试验, 考察通风状况对其发酵产酸的影响, 结果(图5)表明, 500 mL 三角瓶装液量为25 mL 时可得到较高的 L-异亮氨酸产量, 这说明较强的通风可改善菌株对葡萄糖生物合成 L-异亮氨酸的效率。比较图5(A) 与(B) 可看出, 500 mL 三角瓶25 mL 装液量的产酸率要明显高于250 mL 三角瓶10~12.5 mL 装液量的产酸率, 其原因主要是由于500 mL 三角瓶的瓶底大, 往复振荡时液体易于翻滚而提高与氧气的接触, 故溶氧水平高, 从而导致产酸高。另需补充说明: 由于固定了摇床转速, 对于500 mL 三角瓶而言, 若低于25 mL 装液量, 由于通风过量, 发酵初期菌体生长受到抑制, 故反而产酸较低。



(A) 500 mL 三角瓶的装液量/mL



(B) 250 mL 三角瓶的装液量/mL

图5 装液量对 L-异亮氨酸发酵的影响

2.1.5 L-异亮氨酸摇瓶发酵最佳培养条件 综合考虑培养基、装液量、种龄和接种量等对 ZQ-4菌株 L-异亮氨酸发酵的影响, 得到摇瓶发酵最佳条件, 列于表1。

表1 L-异亮氨酸摇瓶发酵最佳条件

成份与条件	种子培养基	发酵培养基	成份与条件	种子培养基	发酵培养基
葡萄糖 / (g/L)	25	140	pH 值	7.0	7.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ / (g/L)	5	40	装液量 / mL	80	25
玉米浆 / (mL/L)	40	20	接种量 / %	/	4
KH ₂ PO ₄ / (g/L)	1	1	温度 / °C	31	31
MgSO ₄ / (g/L)	0.5	0.5	培养时间 / h	12	72
CaCO ₃ / (g/L)	10	32	摇床振次 / (次/min)	80	100

注: 500 mL 三角瓶

2.2 讨 论

由于笔者采用多种相关的氨基酸结构类似物和琥珀酸为唯一碳源平板, 而不采用筛选营养缺陷型菌株的方法来选育 L-异亮氨酸产生菌, 使得选育获得的 L-异亮氨酸高产菌 ZQ-4除了带有原出发菌——黄色短杆菌 ATCC14067本身具有的生物素缺陷型标记外, 不再带有其它任何营养缺陷型标记。因此 ZQ-4菌株对发酵培养基中的营养成分控制要求不高, 其配方比较粗放, 完全可以采用玉米浆来代替所需生物素, 而且产酸非常稳定, 适合于工业生产的要求。本研究由于摇瓶的条件限制, 只进行了传统的分批发酵, 碳源为工业葡萄糖, 氮源为硫酸铵。今后将在小型自控发酵罐上进行补料(葡萄糖) 分批发酵和连续流加氨水控制 pH 及补充氮源试验, 以完善工艺参数, 为工业规模的稳产高产打下坚实的基础。

参 考 文 献

1 张伟国. L-异亮氨酸产生菌的选育. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(3): 1~5
2 无锡轻工业学院等. 工业发酵分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1980. 16~17
3 潘家秀. 蛋白质化学研究技术. 北京: 科学出版社, 1962. 62~63

Studies on the Fermentation of L-Isoleucine

Zhang Weiguo Chen Jian Lun Shiyi
(Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract Studies on the fermentation of L-isoleucine were carried out by using a L-isoleucine-producing strain ZQ-4 (AHV^rAEC^rSuc^gSG^rEth^rα-AB^rIleHx^r) with shaking flask. The results showed that biotin was the only essential growing factor, as its father strain *Brevibacterium flavum* ATCC14067. A certain amount of oxygen-supplying was an important factor. Shaken at 31°Cfor 3 days, the amount reached 28~30 g/L in the medium containing 140 g/L glucose, 40 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄•7H₂O, 20 mL/L corn steep liquor, and 32 g/L CaCO₃.

Key words L-isoleucine; biotin; fermentation; *Brevibacterium flavum*

(责任编辑: 秦和平)