

文章编号: 1009-038X(2001)05-0538-02

供氧对 L-异亮氨酸分批发酵的影响

张伟国, 陈坚, 伦世仪

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对黄色短杆菌 L-异亮氨酸高产菌 XQ-4 (AHV^r AEC^r Suc⁸ SG^r Eth^r α -AB^r IleHx^r) 分批发酵供氧需求进行了研究. 在 2 L 台式发酵罐中进行分批发酵, 当体积传氧系数 (K_{la}) 为 385 h⁻¹ 左右时, 供氧比较适宜, 在 138 g/L 的葡萄糖溶液中可产生 23.5 g/L L-异亮氨酸.

关键词: L-异亮氨酸; 体积传氧系数; 分批发酵; 黄色短杆菌

中图分类号: TQ 922

文献标识码: A

The Effect of Dissolving Oxygen on L-Isoleucine Batch Fermentation

ZHANG Wei-guo, CHEN Jian, LUN Shi-yi

(School of biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effect of dissolving oxygen on batch fermentation by *Brevibacterium flavum* L-isoleucine producer XQ-4 (AHV^r AEC^r Suc⁸ SG^r Eth^r α -AB^r IleHx^r) was carried out. When K_{la} was 385 h⁻¹, the dissolving oxygen was suitable in 2 L fermentor. L-isoleucine at the value of 23.5 g/L was accumulated in medium containing 138 g/L glucose.

Key words: L-Isoleucine; K_{la}; batch fermentation; *Brevibacterium flavum*

L-异亮氨酸系必需氨基酸之一, 是配制复合氨基酸输液和其它治疗药物的主要原料. 在氨基酸发酵中, 溶氧对氨基酸的积累具有很大影响, 必须控制溶氧在合适程度上. 供氧控制的主要目的是控制代谢途径, 增加目的氨基酸的积累, 减少其它氨基酸的产生. L-异亮氨酸属于门冬氨酸族氨基酸, 在供氧充足的条件下能大量产酸, 在供氧不足的情况下产酸将下降. 在发酵罐放大的研究中, K_{la} 值 (体积氧传递系数) 是一个十分重要的参数. 因此, 在小型发酵罐中研究溶氧水平对 L-异亮氨酸分批发酵的影响, 寻求最适的 K_{la} 值, 对发酵罐比例放大是很有价值的.

1 材料与方 法

1.1 供试菌种

L-异亮氨酸高产菌 XQ-4 (AHV^r AEC^r Suc⁸ SG^r Eth^r α -AB^r IleHx^r)^[1].

1.2 培养基组成

斜面培养基 (g/L): 葡萄糖 5, 牛肉膏 10, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20.

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 25, (NH₄)₂SO₄ 5, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 10, 玉米浆 40 mL/L.

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 138, (NH₄)₂SO₄ 35, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, 玉米浆 20 mL/L.

收稿日期: 2001-03-02; 修订日期: 2001-09-03.

作者简介: 张伟国 (1963-), 男, 江苏张家港人, 工学博士, 副研究员.

1.3 培养条件

斜面活化 24 h, 种子在 31 ± 1 °C 下振荡培养 12 ~ 13 h. 2.5 L 发酵罐中装液量为 1.2 L, 接种量为 10%, 温度控制在 $31 \sim 32$ °C, 通风比 1:1 ~ 1:3, 流加氨水控制 pH 值, 搅拌转速根据要求而定.

1.4 分析方法

菌体浓度: 吸取 0.2 mL 菌液到 5 mL 0.25 mol/L HCl 溶液中, 摇匀, 用分光光度计, 测定 OD 值. 根据吸光度 - 菌体干重曲线, 计算菌体浓度.

还原糖: 非林试剂滴定法^[2].

L-异亮氨酸: 纸上层析法、比色定量法^[3]及氨基酸自动分析仪测定.

Kla: 亚硫酸盐氧化法^[4].

1.5 发酵设备

2 L 台式全自动发酵罐 瑞士 INFOR 公司产品.

2 结果与讨论

2.1 溶氧对发酵的影响

在 L-异亮氨酸发酵过程中, 前期主要为菌体生长阶段, 需要一定量氧参与, 若氧的供应受到限制, 就会影响菌体的生长, 进而影响到最终的 L-异亮氨酸产量; 在 L-异亮氨酸合成阶段, 氧也是必不可少的底物之一, 供氧的限制会严重影响 L-异亮氨酸的合成.

2.1.1 搅拌转速与 Kla 值的关系

在发酵罐放大的研究中, Kla 值(体积氧气传递系数)是一个十分重要的参数, 在小型发酵罐中研究溶氧水平对发酵的影响, 寻求最适的 Kla 值不仅是发酵工艺研究的关键之一, 也是发酵罐放大研究的重要基础.

采用亚硫酸盐法测定在一定通气量条件下搅拌转速与 Kla 值之间的关系, 其结果如图 1 所示. 从图中可以看出, 当通气量一定时, Kla 值随着搅拌转速的提高而迅速增加.

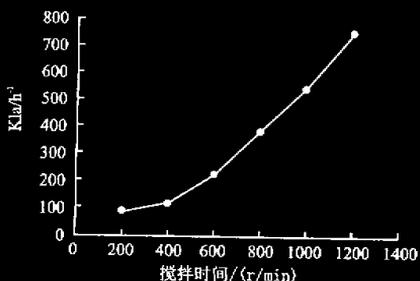


图 1 搅拌转速与 Kla 的关系曲线

Fig. 1 Relationship curve of stirring speed and Kla

2.1.2 Kla 值与反应器中溶氧的关系 在 L-异亮氨酸发酵过程中, Kla 值与发酵罐中溶氧(DO)的关系如图 2 所示. 当 $Kla < 548$ h⁻¹ 时, 发酵罐中的溶氧在 0 ~ 24 h 内下降很快, 此间菌体大量生成; 32 h 时溶氧已达到最低, 以后较长一段时间内发酵液中的溶氧都处于这个水平; 当 Kla 值为 548 h⁻¹ 时, 在发酵结束时溶氧稍有反弹; 而当 Kla 为 746 h⁻¹ 时, 发酵初期(0 ~ 24 h)溶氧下降较快, 40 h 时发酵液中溶氧最低, 随后发酵液中的溶氧开始升高, 发酵结束时上升到 43%.

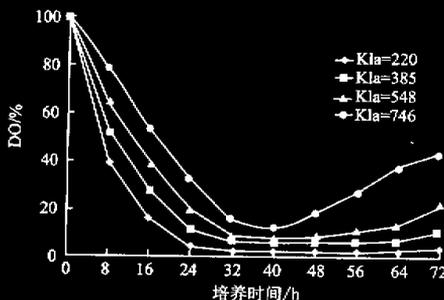


图 2 不同 Kla 值时发酵罐中溶氧的变化

Fig. 2 Change of DO of different Kla in fermentor

2.1.3 不同 Kla 值发酵时菌体生长曲线 图 3 为发酵过程中菌体生长曲线, 在不同的 Kla 值时(Kla 值很小时除外), 菌体的生长量均能达到基本相同的饱和值, 但菌体的生长速率不同. 当 $Kla = 358$ h⁻¹ 时, 菌体的比生长速率最大; 而过高的 Kla 值反而对菌体的生长有抑制作用.

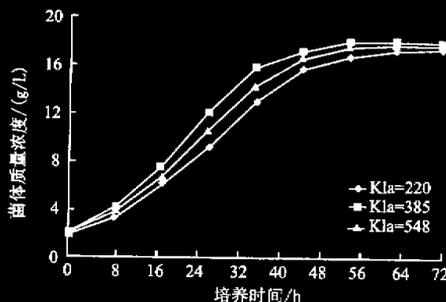


图 3 不同 Kla 值时菌体生长曲线

Fig. 3 Growth curve of cell of different Kla

2.1.4 Kla 值对发酵产酸的影响 试验中通过改变搅拌转速控制不同的 Kla 值, 从而达到控制发酵中的溶氧水平. 发现过高或过低的溶氧对发酵均不利; 当溶氧较低时($Kla = 220$ h⁻¹)对发酵尤为不利, 表现为产酸水平降低和发酵时间延长; 将 Kla 值控制在 385 ~ 548 h⁻¹ 之间时, 发酵结果较好, 试验结果

(下转第 542 页)

(上接第 539 页)

见表 1. 发酵前期(0~16 h), K_{la} 均为 220 h^{-1} .

表 1 不同 K_{la} 值对发酵产酸的影响

Tab.1 Effect of different K_{la} on fermentation

K_{la} 值/ h^{-1}	初糖 质量 浓度/ (g/L)	发酵 时间/ h	菌浓/ (g/L)	残糖 质量 浓度/ (g/L)	L-异亮 氨酸质 量浓度/ (g/L)
220	137.4	82	16.9	9	17.1
358	137.7	72	17.7	7	23.5
548	138.1	73	17.2	8	22.7

2.2 L-异亮氨酸分批发酵进程曲线

从图 4 可看出, 0~12 h 为菌体生长延滞期, 此时菌体耗糖速率较慢, 主要用于长菌, 基本不产酸; 13~32 h 为菌体对数生长期, 此时单位细胞的生长速率达到并保持最大值, 耗糖速率明显加快, 并开始产 L-异亮氨酸; 33~40 h 为菌体减速生长, 41~

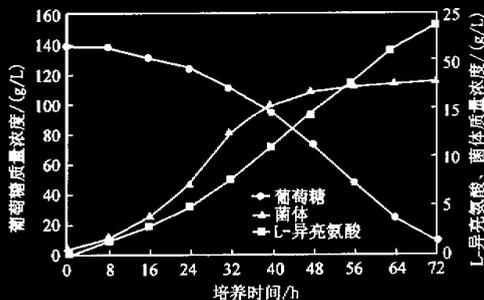


图 4 L-异亮氨酸发酵进程曲线

Fig.4 Time curve of L-isoleucine fermentation

64 h 进入菌体稳态生长, 此间耗糖速率较快, L-异亮氨酸大量合成; 65~72 h 为菌体衰减生长, 此间耗糖速率减慢, 直至分批发酵结束. 由此可认为 L-异亮氨酸发酵属于部分偶联型发酵.

参考文献:

- [1] 张伟国. L-异亮氨酸产生菌选育的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(3): 1~5.
- [2] 无锡轻工业学院编. 工业发酵分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1980.
- [3] 潘家秀. 蛋白质化学研究技术[M]. 北京: 科学出版社, 1962.
- [4] 俞俊棠, 唐孝宣主编. 生物工艺学[M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1992.

(责任编辑: 朱明)