

维生素对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 产 L-色氨酸的影响

娄秀平¹, 沈健增², 蔡宇杰^{*1}, 廖祥儒¹, 张大兵²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏汉邦科技有限公司, 江苏 淮安 223001)

摘要: 研究了 9 种维生素对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长及其发酵产 L-色氨酸产量的影响, 并对发酵培养基中的维生素浓度进行了优化。结果表明, 低浓度肌醇和叶酸可显著促进大肠杆菌的生长及 L-色氨酸的合成, 叶酸和肌醇的最适添加量分别为 0.000 2 mg/L 和 0.2 mg/L; 较高浓度的生物素可以明显促进菌体生长及色氨酸的合成, 其最适添加量为 0.12 mg/L; 较低浓度 VB₆ 的添加严重抑制色氨酸的合成, 当其质量浓度增至 0.8 mg/L 时, 菌体浓度和色氨酸的产量均较对照有显著的提高, 分别提高 11.8% 和 27.2%。添加 VB₅ 可略微提高色氨酸的产量, 最优质量浓度为 0.4 mg/L。添加 VB₁、VB₂、VB₃ 和 VC 虽然对菌体的生长均有较强的促进作用, 但对于色氨酸合成却有不同程度的抑制作用。

关键词: 维生素; 大肠杆菌 *Escherichia coli*. JN8; L-色氨酸

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)09—0921—06

Effect of Vitamins on Production of L-Tryptophan in *Escherichia coli*.JN8

LOU Xiu-ping¹, SHEN Jian-zeng², CAI Yu-jie^{*1}, LIAO Xiang-ru, ZHANG Da-bing²

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Hanbon Science & Technology Co.Ltd, Huai'an 223001, China)

Abstract: In this manuscript, the effect of 9 kinds of vitamins on overproduction of L-tryptophan and cell growth were studied and the concentration of vitamins in culture medium was also optimized. The results showed that the cell growth and the synthesis of L-tryptophan were both promoted strongly with the addition of low concentration of inositol and folic acid. Their optimum concentrations were 0.000 2 mg/L, 0.2 mg/L, respectively. Adding higher concentration of biotin can significantly promote cell growth and the synthesis of L-tryptophan, the optimum dosage was 0.12 mg/L. The synthesis of L-tryptophan was inhibited severely by adding lower concentration of VB₆, when the optimal added concentration was 0.8 mg/L, cell concentration and L-tryptophan production have been significantly improved by 11.8% and 27.2% compared with the control,

收稿日期: 2013-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(21275066); 江苏省科技创新与成果转化项目项目(重大科技支撑与自主创新专项 BY2010117)。

* 通信作者: 蔡宇杰(1973—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物工程方面的研究。

E-mail: yu_jie_cai@yahoo.com.cn

respectively. Adding VB₅ may slightly improve the yield of the L-tryptophan, the optimal concentration was 0.4 mg/L. Although, adding VB₁, VB₂, VB₃ and VC, cell growth was improved strongly, the synthesis of L-tryptophan were inhibited by different degrees.

Keywords: vitamin, *Escherichia coli*.JN8, L-tryptophan

色氨酸是一种重要的氨基酸,对于人类和动物的生长发育、新陈代谢有着重要的生理作用,参与多种生物物质合成并广泛应用于食品、动物饲料、医药工业^[1]。

长久以来,色氨酸都是在氨基酸生产中产业化难度较大的一种氨基酸。色氨酸的生产方法主要有:化学合成法、蛋白水解法、微生物法。微生物法大体上又可以分为直接发酵法、微生物转化法和酶法。直接发酵法是以葡萄糖、甘蔗糖蜜等廉价原料为碳源,利用优良的色氨酸产生菌来生产色氨酸^[2-4]。在色氨酸的生物发酵中,大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌是主要的生产菌。近几年来,由于在生产中有缩短生产周期、减少设备投资、降低成本、提高生产效率等优点,大肠杆菌高密度发酵生产色氨酸得到国内外的广泛关注。目前大肠杆菌生产色氨酸最大可达到 54.6 g/L^[5]。

维生素是细胞生长和代谢所必需的物质,在 L-色氨酸的合成及降解途径中,很多维生素作为辅因子直接参与调控 L-色氨酸的代谢过程。因此,研究维生素对色氨酸生产的影响有着重要的意义。作者选择在全合成培养基中,考察可能与 L-色氨酸代谢密切相关的 9 种维生素对大肠杆菌合成 L-色氨酸的影响,通过比较不同维生素对菌体细胞生长、L-色氨酸的积累的影响,确定了这 9 种维生素的最优用量^[6]。

1 材料与方法

1.1 菌种

大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 由作者所在实验室保存。

1.2 培养基

保藏培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,琼脂 20,四环素 0.01;pH 7.0~7.2,于 121 °C 湿热灭菌 30 min。

种子培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,四环素 0.01;pH 7.0~7.2,于 121 °C 湿热

灭菌 30 min。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 20, (NH₄)₂SO₄ 11.5, KH₂PO₄ 6, MgSO₄·7H₂O 2, FeSO₄·7H₂O 0.25;于 115 °C 湿热灭菌 20 min。

各种维生素配制成浓缩液,用 0.22 μm 的无菌滤膜过滤除菌,在 -20 °C 下保存,临用前置于室温使其融化,于接种的同时添加到摇瓶培养基中。添加生物素使其在培养基中终质量浓度分别为 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15 mg/L;叶酸在培养基的终质量浓度分别为 0.000 2, 0.000 4, 0.000 6, 0.000 8, 0.001 0 mg/L;VB₂(核黄素)在培养基的终质量浓度为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/L;肌醇、VB₁(硫胺素)、VB₃(烟酸)、VB₅(泛酸)、VB₆(吡哆醇)、VC(抗坏血酸)在培养基中的终质量浓度均分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/L;对照则不添加任何维生素。

1.3 方法

1.3.1 种子制备 从甘油管中取菌,在种子培养基斜面或平板划线,33 °C 培养 12~15 h。种子培养基 30 mL 置于 250 mL 的三角瓶中,接入新鲜斜面菌种一环,33 °C、250~300 r/min 培养 9 h。

1.3.2 摇瓶培养 种子液以 10%体积分数的接种量接入发酵培养基中,摇瓶发酵装液量为 30 mL (250 mL 的三角瓶),33 °C、250 r/min 培养 24 h。

1.3.3 菌悬液 OD 值的测定 发酵液用蒸馏水稀释 50 倍数,于紫外可见光分光光度计上测 600 nm 处的吸光光度。

1.3.4 色氨酸总量的测定 发酵液中色氨酸总量按照文献^[7]所述方法测定。

2 结果与讨论

2.1 肌醇和叶酸的添加浓度对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

如图 1 所示,当肌醇质量浓度为 0.2 mg/L 时菌体浓度和 L-色氨酸含量均达到最大值,与对照相比分别提高了 16.8%和 14%。随着肌醇质量浓度的增

加,L-色氨酸含量减少,但是与对照相比菌体浓度仍有所提高。这说明低质量浓度的肌醇促进 L-色氨酸合成,而添加不同质量浓度的肌醇均有利于菌体的生长。当叶酸为 0.000 2 mg/L 时菌体浓度和 L-色氨酸含量达到最大值,与对照相比分别提高了 16.8%和 26.4%。叶酸的活性辅酶形式四氢叶酸(THF)是一碳循环中的辅酶与底物,并随碳循环参与核酸代谢、氨基酸的合成^[3-4],是影响微生物生长代谢的重要物质。但是随着叶酸质量浓度的增加,菌体浓度和色氨酸含量均出现明显的降低趋势,L-色氨酸的含量低于对照,而菌体浓度较对照仍有所提高。这同样说明低质量浓度的叶酸促进色氨酸合成,而添加不同质量浓度的叶酸均有利于菌体的生长。

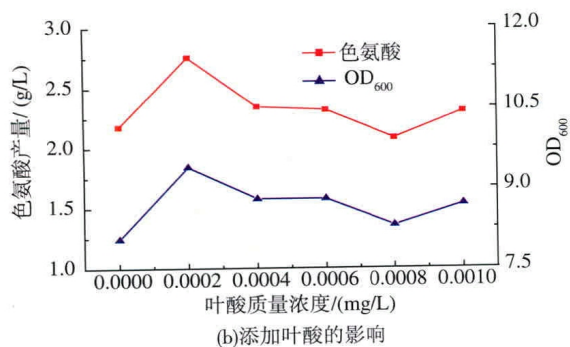
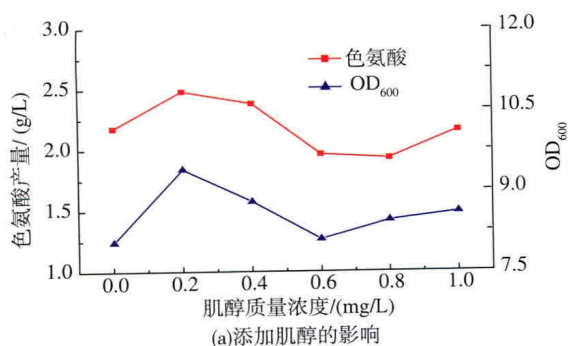


图1 肌醇和叶酸质量浓度对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

Fig. 1 Effect of concentration of Inositol and Folic acid on the growth of *Escherichia coli*.JN8 and L-tryptophan production

2.2 生物素的添加浓度对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

如图2所示,当生物素的质量浓度小于 0.12 mg/L 时,随着生物素的质量浓度升高,菌体浓度及色氨酸的含量均有所升高。当生物素质量浓度为 0.12 mg/L

时,菌体浓度和色氨酸的产量达到最大,分别比对照提高了 24.2%和 30.4%。可能是生物素改变了细胞膜的成分及通透性^[4,8],让更多色氨酸分泌到胞外,减少了反馈抑制,从而提高了发酵液中的色氨酸含量。尽管当质量浓度为 0.15 mg/L 时,色氨酸的产量低于对照水平,但是菌体浓度较对照仍有 9.3%的提高。这与吴琳^[9]等研究增加生物素浓度,菌体生长得到改善的实验结果相同。所以,适量添加生物素对菌体生长和色氨酸的合成均有明显的促进作用。

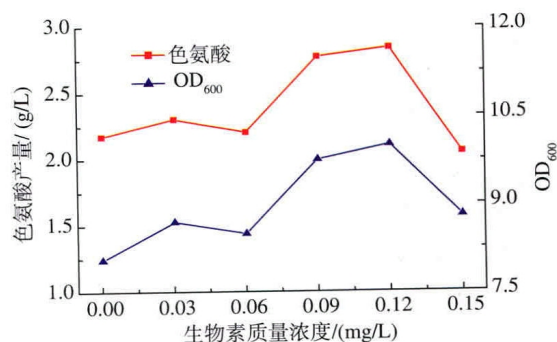


图2 生物素质量浓度对 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

Fig. 2 Effect of the Biotin concentration on the growth of *Escherichia coli*.JN8 and L-tryptophan production

2.3 VB₆ 的添加浓度对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

在 VB₆ 质量浓度较低时,L-色氨酸的合成受到明显的抑制,而菌体的生长几乎不受影响。如图3所示,当 VB₆ 质量浓度为 0.8 mg/L 时,菌体浓度和色氨酸的产量均较对照有着显著的提高,分别提高 11.8%和 27.2%。随着添加浓度进一步提高,色氨酸的产量再次受到抑制,而较高质量浓度 VB₆ 的添加促进菌体生长。这可能是添加 VB₆ 在促进 L-色氨酸的合成同时也促进 L-色氨酸的分解。VB₆ 在细胞内主要以磷酸酯形式存在,磷酸吡哆醛(PLP)和磷酸吡哆胺是其活性形式,是氨基酸代谢中多种酶的辅酶^[4]。其中 PLP 参加催化涉及氨基酸的各种反应。何俊峰^[10]研究指出 VB₆ 参与胞内一些转氨、脱氨、转硫反应并参与氨基酸的脱羧基反应。

2.4 VB₅ 的添加浓度对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

如图4所示,随着 VB₅ 质量浓度的升高,色氨酸的产量呈先升高后降低趋势,当质量浓度为 0.4 mg/L

时,色氨酸的产量达到最大值,较对照提高 14.3%。当质量浓度为 0.8 mg/L 时,菌体浓度达到最大,较对照提高 10.6%。可能是 VB₅(泛酸)的主要活性形式辅酶 A (CoA)在细胞内主要起传递酰基的作用,是各种酰化反应中的辅酶,参与糖代谢及氨基酸代谢^[4,11]。所以,VB₅的添加可以明显地促进菌体的生长,并有利于 L-色氨酸的合成。

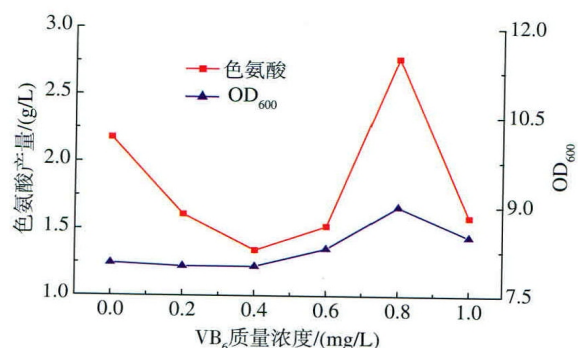


图 3 VB₆ 质量浓度对 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

Fig. 3 Effect of VB₆ concentration on the growth of *Escherichia coli*.JN8 and L-tryptophan production

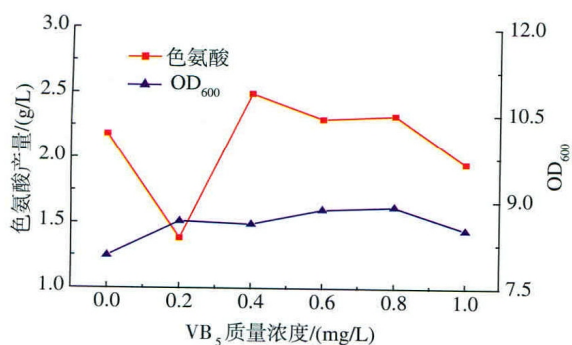


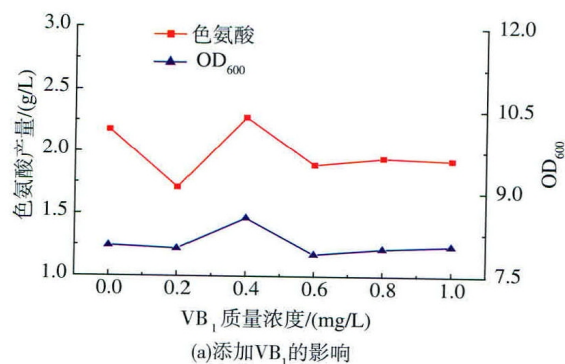
图 4 VB₅ 质量浓度对 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

Fig. 4 Effect of VB₅ concentration on the growth of *Escherichia coli*.JN8 and L-tryptophan production

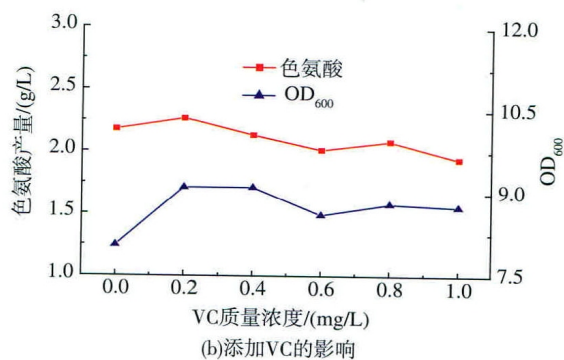
2.5 VB₁ 和 VC 对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

VB₁(硫胺素)与糖代谢密切相关,VC(抗坏血酸)在胞内氧化还原反应中起递氢体的作用^[10-12],这两种维生素含量的变化可能对 L-色氨酸代谢起到微妙的作用。如图 5 所示,仅当 VB₁ 质量浓度为 0.4 mg/L 时,菌体浓度和 L-色氨酸的产量较对照均有所提高。其余质量浓度下色氨酸的合成均受到明

显抑制,VB₁ 对菌体的生长作用不明显。VC 质量浓度为 0.2 mg/L 时,L-色氨酸的产量为最大值,而在 VC 的各个添加浓度下,菌体浓度均明显高于对照水平。这说明 VC 的添加有利于菌体生长但却抑制色氨酸合成。



(a)添加VB₁的影响



(b)添加VC的影响

图 5 VB₁ 及 VC 对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

Fig. 5 Effect of VB₁ and VC on the growth of *Escherichia coli*.JN8 and L-tryptophan production

2.6 VB₂ 和 VB₃ 对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

VB₂(核黄素)是蛋白质、糖、脂肪酸代谢和能量利用与组成所必需的物质。VB₃(烟酸)在胞内转变为烟酰胺,后者是辅酶 I 和辅酶 II 的组成部分,参与胞内的生物氧化过程^[11]。这两种维生素的添加可能对氨基酸的合成有一定的影响。如图 6 所示,当 VB₂ 和 VB₃ 质量浓度均为 0.4 mg/L 时,L-色氨酸的产量达到最大,但是都略微低于对照水平。随着添加浓度的增加,两种维生素均抑制 L-色氨酸的合成。当 VB₂ 和 VB₃ 质量浓度分别为 0.6 mg/L 和 0.8mg/L 时,菌体浓度最大。但是 VB₂ 在各个添加浓度下,菌体浓度均明显高于对照水平。这说明 VB₂ 和 VB₃ 的添加抑制大肠杆菌色氨酸的合成。

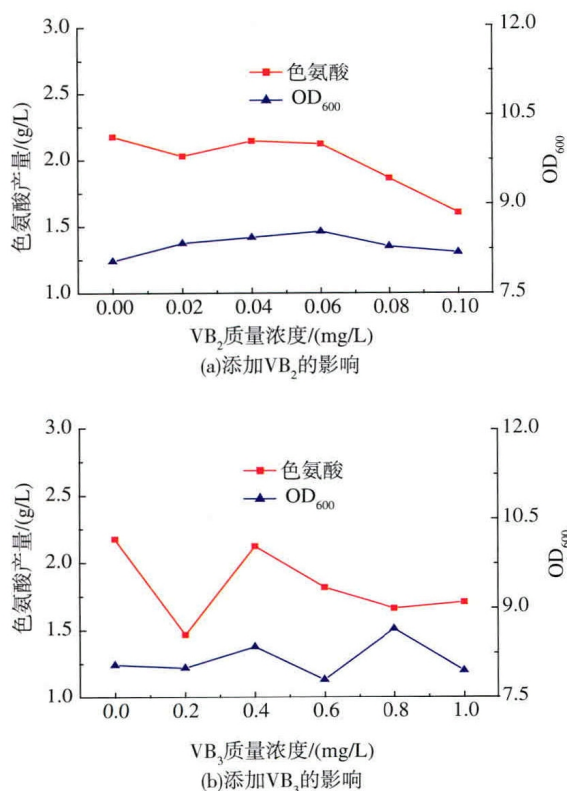


图 6 VB₂ 和 VB₃ 对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响

Fig. 6 Effect of VB₂ and VB₃ on the growth of *Escherichia coli*.JN8 and L-tryptophan production

3 结 语

采用单因素法研究了肌醇、叶酸、生物素、VB₁、VB₂、VB₃、VB₅、VB₆ 和 VC 对大肠杆菌 *Escherichia coli*.JN8 生长和 L-色氨酸产量的影响。研究结果显示,低质量浓度的肌醇(0.2 mg/L)和叶酸(0.000 2 mg/L)可显著促进菌体生长及 L-色氨酸的合成,随着两种维生素质量浓度的增加 L-色氨酸的合成受到不同程度的抑制作用,而菌体的浓度虽然呈下降趋势但菌体的生长仍然受到促进作用;添加较高质量浓度(0.09~0.12 mg/L)的生物素可以明显促进菌体生长及 L-色氨酸的合成;仅在质量浓度为 0.8 mg/L 时,VB₆ 对菌体生长及 L-色氨酸的合成有显著的促进作用,其余质量浓度下 L-色氨酸的合成均受到严重的抑制作用;尽管不同质量浓度的 VB₁、VB₂、VB₃ 和 VC 的添加对菌体的生长均有较强的促进作用,但对于 L-色氨酸合成却有不同程度的抑制作用。可能这些维生素作为辅因子不仅参与了 L-色氨酸的合成过程,还参与了 L-色氨酸的降解过程。同样不同质量浓度的 VB₅ 对菌体的生长有明显促进作用,而仅在 0.4~0.8 mg/L 质量浓度下对色氨酸的合成有较微弱的促进作用。

近年来,随着对 L-色氨酸研究的不断深入,L-色氨酸不仅得到广泛的应用并且对其需求越来越大,目前的产量远不足以满足需求。所以如何提高 L-色氨酸的产量将成为后续研究的重点。

参考文献:

- [1] 陈宁,孙涛,张克旭. L-色氨酸高产菌的选育及其发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业,1997,23(5):10-15.
CHEN Ning,SUN Tao,ZHANG Ke-xu. The breeding of L-Tryptophan highly producing strains and studies on its fermentation conditions[J]. *Food and Fermentation Industries*,1997,23(5):10-15.(in Chinese)
- [2] 赵志军,陈晟,吴丹,等. 微生物发酵法生产 L-色氨酸的代谢工程研究[J]. 中国生物工程杂志,2011,31(6):135-141.
ZHAO Zhi-jun,CHEN Sheng,WU Dan,et al. Metabolic engineering of L-tryptophan via microbiological fermentation [J]. *China Biotechnology*,2011,31(6):135-141.(in Chinese)
- [3] 张晓娟,窦文芳,许泓瑜,等. 维生素对谷氨酸棒杆菌 SYPS-062 直接发酵合成 L-丝氨酸的影响[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(5):50-55.
ZHANG Xiao-juan,DOU Wen-fang,Xu Hong-yu,et al. Effects of vitamins on the direct fermentative production of L-serine in *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062[J]. *China Biotechnology*,2007,27(5):50-55.(in Chinese)
- [4] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 第 3 版. 北京:高等教育出版社,2002:440-464.
- [5] ZHAO Zhi-jun,CHEN Sheng,WU Dan,et al. Effect of gene knockouts of l-tryptophan uptake system on the production of l-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. *Process Biochemistry*,2012,47:340-344.
- [6] 刘文波,柴同杰. 大肠杆菌高密度发酵研究[J]. 动物科学与动物医学,2001,18(1):27-29.
LIU Wen-bo,CHAI Tong-jie. High cell density fermentation of *Escherichia coli* [J]. *Animal Science & Veterinary Medicine*,

- 2001, 18(1):27-29. (in Chinese)
- [7] 王建, 陈宁, 徐咏全, 等. 发酵液中色氨酸含量的快速测定[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 123-125.
WANG Jian, CHEN Ning, XU Yong-quan, et al. Quick determination of L-Tryptophan in fermented broth [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2004, 30(2): 123-125. (in Chinese)
- [8] 杨毅, 章志兰, 姜绪林, 等. 生物素和 VB₁ 在谷氨酸棒杆菌过量合成缬氨酸中的作用[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(7): 57-60.
YANG Yi, ZHANG Zhi-lan, JIANG Xu-lin, et al. Effects of D-Biotin and VB₁ factors on the biosynthesis of valine in a valine producer *Corynebacterium glutamicum* AATV341 [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24 (7): 57-60. (in Chinese)
- [9] 吴琳, 李志敏, 叶勤. 基本培养基中芳香族氨基酸和维生素对 D-核糖生产的影响[J]. 华东理工大学学报, 2009, 35(5): 707-712.
WU Lin, LI Zhi-min, YE Qin. Effect of aromatic amino acids and vitamins on D-Ribose production and optimization of minimal medium[J]. **Journal of East China University of Science and Technology**, 2009, 35(5): 707-712. (in Chinese)
- [10] 何俊峰. L-组氨酸产生菌的选育及其发酵条件优化[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [11] 王宝贝, 凌雪萍, 郑宗宇, 等. 维生素对红法夫酵母产虾青素的影响[J]. 厦门大学学报, 2011, 50(1): 111-116.
WANG Bao-bei, LING Xue-ping, ZHENG Zong-yu, et al. Effect of vitamins on astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma*[J]. **Journal of Xiamen University**, 2011, 50(1): 111-116. (in Chinese)
- [12] 杨海军. L-色氨酸发酵条件的优化及其发酵动力学分析[D]. 天津: 天津科技大学, 2004.

会 议 信 息

会议名称(中文): 2013 国际生物质能源与化工会议

会议名称(英文): International Conference on Biomass Energy and Chemicals (ICBEC 2013)

所属学科: 化学生物学, 生物技术与生物工程, 再生能源技术与工程

开始日期: 2013-10-14

结束日期: 2013-10-17

所在城市: 江苏省 南京市

主办单位: 中国林业科学研究院林产化学工业研究所、南京林业大学、江苏省化学化工学会

联系人: Professor Fei Wang

联系电话: +86-25-85427649

传真: +86-25-85427649

E-MAIL: hgwf@njfu.edu.cn

会议网站: <http://icbec2013.njfu.edu.cn/index.asp>

会议名称(中文): 生物防治产业年会

开始日期: 2013-10-11

结束日期: 2013-10-13

所在城市: 湖北省 武汉市

主办单位: “中国生物农药与生物防治产业技术创新战略联盟”理事会、国家生物农药工程技术研究中心、中国植保学会生物防治专业委员会

全文截稿日期: 2013-09-20

联系人: 蒋细良博士

联系电话: 010-82106381

E-MAIL: jiangxiliang@caas.cn

会议网站: http://www.ippeaas.cn/Html/2013_07_25/2585_2710_2013_07_25_73389.html