第 18卷第 2期
1999年 6月

无锡轻工大学学报
Journal of Wuxi University of Light Industry

Vol. 18, No. 2
Jun., 1999

文章编号: 1001-7453(1999)02-0001-06

赖氨酸摇瓶发酵条件的优化

尹洪波,陈　坚,堵国成,伦世仪
(无锡轻工大学生物工程学院,江苏无锡 214036)

摘要: 针对赖氨酸发酵的工业化要求,以黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)WSH L1为产生菌进行了摇瓶条件下的赖氨酸发酵条件研究.通过正交实验得到了较佳氮源配比;经在发酵过程中添加几种氮源的试验,发现发酵中后期添加适量有机氮源有利于发酵;考察不同初始硫酸铵和葡萄糖浓度对发酵的影响,确定了适合工业生产的浓度范围;采用分批补料培养方式,最终赖氨酸盐酸盐质量浓度为 85.5 g/L

关　键　词: 赖氨酸;摇瓶发酵;黄色短杆菌
中图分类号: TQ922.3　　文献标识码: A

随着我国饲料工业的发展,赖氨酸的需求量日益增加,预计 2000年国内仅饲料添加剂用赖氨酸需求就在 50 000 t以上,而 1997年全国赖氨酸生产能力不过 20 000 t.国内现有 3家较大的赖氨酸生产企业,其中只有一家是拥有自己的菌种和技术的国内企业,主要以糖蜜为生产原料.因此,迅速发展我国自己的赖氨酸工业意义重大.也正因此,国家从"六五"到"九五"期间均设立了发酵法生产赖氨酸的科技攻关项目.目前,赖氨酸的工业化生产已成为国内投资者的兴趣之一.本学院从 20世纪 80年代初就开始了赖氨酸生产菌株、发酵工艺和后提取技术方面的研究工作.近来,作者所在研究室以工业化为目标,进行了从实验室规模到工业生产规模的赖氨酸发酵工艺的系统研究.

本文主要介绍摇瓶发酵的部分工作.

1　材料与方法

1.1　菌种

黄色短杆菌(*Brevibacteriun flavum*)WSH-L1(本研究室保藏号),营养缺陷类型: Met^-, Thr^-.

1.2　培养基

1.2.1　斜面培养基(g/L)　蛋白胨 10,牛肉膏 10,NaCl 5,葡萄糖 5,琼脂 20;pH 7.0.

1.2.2　种子培养基(g/L)　淀粉水解糖 30,玉米浆 15,胱氨酸母液 40,硫酸铵 10,磷酸氢二

收稿日期: 1998-09-02;修订日期: 1999-03-02
基金项目: 国家"九五"攻关项目(96-009-01-01)
作者简介: 尹洪波(1975年 2月生),男,浙江嵊州人,硕士研究生.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://ww

钾 1,硫酸镁 0.5,碳酸钙 10; pH 7.0.

1.2.3 发酵培养基(g/L) 淀粉水解糖 150~180,玉米浆 15,糖蜜 20,胱氨酸母液 25,硫酸铵 55,磷酸氢二钾 1,硫酸镁 0.5,碳酸钙 45; pH 7.0.

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养法 接一环斜面种子于装有 200 mL种子培养液的 1 000 mL容量三角瓶中,置于往复式摇床上振荡培养,频率为 90 r/min,振幅 78 mm,温度 30℃,培养时间 16 h.

1.3.2 摇瓶发酵法 接种量为 10%,500 mL的三角瓶装液量为 30 mL,于往复式摇床上振荡培养,频率为 115 r/min,振幅 78 mm,温度 30℃.

1.4 测定方法

1.4.1 赖氨酸盐酸盐含量的测定 酸性茚三酮法[1].

1.4.2 葡萄糖浓度的测定 3,5-二硝基水杨酸法[2].

1.4.3 硫酸铵浓度的测定 修正的 Berthelot反应法[3]

1.4.4 菌体生长量(O.D.$_{620}$)的测定 1 mL发酵液加 5 mL 1 mol/L的 HCl溶液除碳酸钙,定容至 25 mL,摇匀后于 620 nm处比色.

2 结果与讨论

2.1 供氧条件对赖氨酸发酵的影响

赖氨酸是天冬氨酸族氨基酸,其前体草酰乙酸主要由对氧浓度要求较高的 TCA循环和磷酸烯醇丙酮酸羧化反应提供.充分供氧,可使菌体呼吸充足,将有利于提高耗糖和产酸速率,而摇瓶发酵过程的供氧主要取决于振荡频率和装液量,为此作者进行了不同装液量及分阶段控制振荡频率下的赖氨酸发酵试验,结果见表 1.

表 1 不同装液量和振荡频率对赖氨酸发酵的影响

装液量/mL	赖氨酸盐酸盐/(g/L)	振荡频率/(r/min)	赖氨酸盐酸盐/(g/L)
20	50	95	21
30	51	115	51
40	49	先 95后 115	32
50	47	先 115后 95	46

注: 发酵时间 48 h,以 24 h为界分前后期

从表 1可见,装液量对发酵结果影响不明显,可采用 30 ml的装液量;而振荡频率对发酵结果影响显著,全程频率为 115 r/min时的产酸要高于全程采用 95 r/min和只有前期或后期采用 115 r/min时的产酸,因此,可认为赖氨酸发酵从前期到中后期都有很高的氧需求.

2.2 初始氮源质量浓度配比优化试验

赖氨酸产生菌作为代谢调控育种的一个典范,一般都被人为地加上了许多遗传标记.为解除某些氨基酸对赖氨酸合成途径某些酶的反馈抑制或减少杂酸的生成量,以提高产酸和转化率,赖氨酸产生菌常有几种氨基酸的合成途径被切断,成为氨基酸缺陷型.而菌种所缺陷的氨基酸在赖氨酸发酵过程中,一方面必须由培养基提供以保证菌体的正常生长,另一方面,又必须严格控制所提供的量,否则会因浓度过高而减少赖氨酸的合成.本研究采用来源丰富、价格便宜的胱氨酸母液和玉米浆作为有机氮源,提供赖氨酸发酵所需的氨基酸,并采用硫酸铵作为赖氨酸合成的主要无机氮源.为求得较为合理的氮源配比,作者进行了以产酸质量浓度和赖氨酸对葡萄糖转化率为目标的三因素三水平正交试验,结果见表 2.

从发酵结果的极差分析可发现,3种氮源质量浓度对产酸和转化率都有很大的影响,其中硫酸铵对产酸和转化率均有显著的影响,胱氨酸母液主要影响赖氨酸的产酸水平,玉米浆

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://ww

则主要影响赖氨酸对葡萄糖的转化率.从表 2所列数据可以得出 3种氮源的最佳组合: 硫酸铵质量浓度为 55 g/L,玉米浆质量浓度为 15 g/L,胱氨酸母液质量浓度为 25 g/L.

表 2 赖氨酸发酵正交试验结果

试验号	硫酸铵 质量浓度 /(g/L)	玉米浆 质量浓度 /(g/L)	胱氨酸母液 质量浓度 /(g/L)	赖氨酸盐酸盐 质量浓度 /(g/L)	耗糖转化率 / %
1	45	10	15	47.7	26.44
2	55	15	20	69.4	37.64
3	65	20	25	55.9	30.91
4	45	15	25	68.0	36.83
5	55	20	20	64.6	35.09
6	65	10	15	60.9	33.07
7	45	20	20	49.5	29.06
8	55	10	25	66.4	35.97
9	65	15	15	52.8	29.06
K1	5.51(30.78)	5.83(31.83)	5.50(30.19)		
K2	6.68(36.23)	6.34(34.51)	5.99(33.26)		
K3	5.65(31.00)	5.67(31.69)	6.34(34.57)		
极差	1.17(5.45)	0.67(2.82)	0.84(4.38)		

图 1所示为氮源质量浓度优化前后的发酵过程曲线.采用优化配方后,菌体生长速度、耗糖速度和产酸速度以及转化率均明显提高.

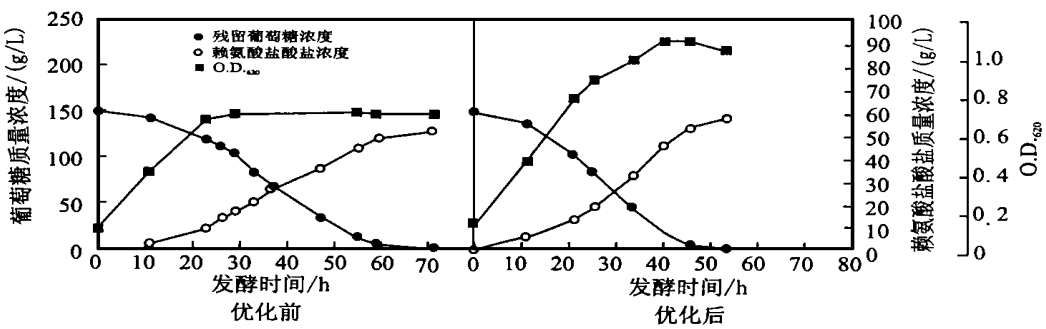


图 1 培养基优化前后摇瓶发酵过程曲线的比较

因此,在实际生产中保持氮源质量浓度与成分稳定及严格其配比显得极为重要.

2.3 发酵中后期添加氮源对发酵的影响

与谷氨酸发酵相似,赖氨酸的工业生产中也可补加尿素或氨来控制 pH,使其稳定在一定范围并提供氮源.为此,作者进行了补尿素试验.

另外,在以前的实验中发现,发酵后期即使在糖质量浓度较高(> 20 g/L)的情况下,也有耗糖和产酸速度减慢 pH上升的现象.这可能是因为营养物特别是某些氨基酸的匮乏造成菌体活力下降甚至自溶,所以又进行了添加有机氮源的试验.

表 3 氮源添加物对发酵的影响

添加物	添加量 /(g/L)			终了 pH	赖氨酸盐酸盐 质量浓度 /(g/L)
	35 h	45 h	55 h		
尿素	3.5	3.5	3.5	7.5	34.7
	/	5	5	7.4	35.9
有机氮源	/	4	4	6.2	65.1
	/	/	8	6.2	64.0
对照	/	/	/	7.8	62.9

注: 1有机氮源为胱氨酸母液加玉米浆(加量以胱氨酸母液计);
2添加尿素试验中,初始硫酸铵质量分数为 4%.

氮源添加试验结果见表 3.可以看出,添加少量尿素也会严重影响产酸,据分析可能是本菌株脲酶活性低

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://ww

的缘故,但需进一步验证.而补入少量有机氮源能使产酸略有提高,且发酵结束时 pH不上升,这可能是有机氮的补入使菌体活力增强的结果.因此,在发酵中后期补入适量有机氮源可延长产酸期,从而提高产酸质量浓度和生产强度.

2.4 初始硫酸铵质量浓度对前期发酵的影响

上述正交试验结果显示,摇瓶发酵时因不流加硫酸铵,初始硫酸铵质量浓度以 55 g/L为佳,但在实际生产中一般以补加氨水代替碳酸钙来控制 pH,而补氨水的过程又是提供氮源的过程,因此,罐发酵时可适当降低初始硫酸铵质量浓度;另外,发酵液中残余铵离子浓度过高会严重影响赖氨酸的离交效率[4].所以,对罐发酵初始硫酸铵质量浓度应该重新选择.

图 2所示为几种初始硫酸铵质量浓度下的前期发酵过程.随着初始硫酸铵质量浓度的增加,菌体生长速度明显加快. 12 h时产酸随初始硫酸铵质量浓度的增加略有降低.随后,由于硫酸铵的消耗,初始硫酸铵质量浓度为 18 g/L和 28 g/L的发酵,分别在 12 h和 16 h后,硫酸铵质量浓度降低至 10 g/L左右,产酸速度随之减慢;而初始硫酸铵质量浓度为 38 g/L和 48 g/L时,因仍维持较高硫酸铵质量浓度,产酸逐渐加快.其中初始硫酸铵质量浓度为 38 g/L时, 16 h后产酸增加最快,此时硫酸铵质量浓度为 20 g/L左右;初始硫酸铵质量浓度为 48 g/L时, 16 h后硫酸铵质量浓度为 30~ 35 g/L,产酸增加慢于前者.

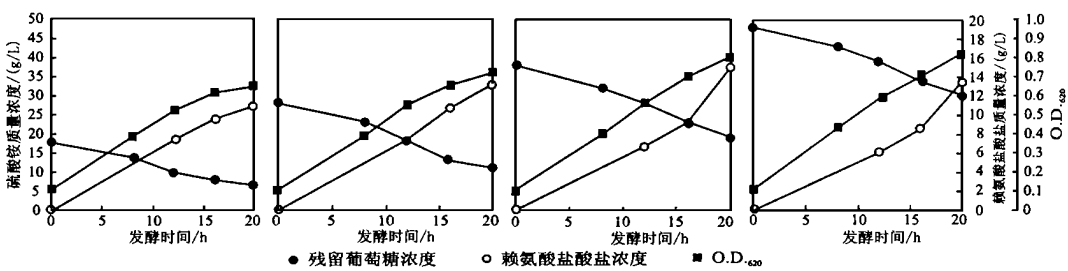


图 **2** 不同初始硫酸铵质量浓度下发酵前期过程曲线

从表 4得到,初始硫酸铵质量浓度为 28 g/L和 38 g/L时, 12~ 16 h后硫酸铵质量浓度为 10~ 30 g/L,产物对耗糖转化率较高.

通过对图 2和表 4的分析可以发现: 1) 硫酸铵为菌体生长的限制因素,较高的硫酸铵质量浓度有利于菌体生长; 2) 20 g/L左右的硫酸铵质量浓度最适合产物合成,高于 30 g/L或低于 10 g/L时分别抑制或限制产物合成. 3) 20 g/L左右的硫酸铵质量浓度下产物对耗糖转化率最高.

表 **4** 硫酸铵质量浓度对产物耗糖转化率的影响

初始硫酸铵质量浓度 /(g/L)	12~ 20 h硫酸铵质量浓度范围 /(g/L)	12~ 20 h产酸对耗糖转化率 /%
18	10~ 5	17.1
28	18~ 11	24.0
38	28~ 18	24.9
48	40~ 30	23.4

在 2.5 L罐发酵中发现, 12 h后, pH值开始快速下降,发酵液中铵离子浓度通过氨水的加入不断得到补充.另外,在发酵过程中还可采取流加硫酸铵的措施补充铵离子.因此,初始硫酸铵质量浓度的选择主要影响前期发酵.综合考虑硫酸铵质量浓度对菌体生长、产酸及转化率的影响,罐发酵时采用 25~ 30 g/L的初始硫酸铵质量浓度较合适.

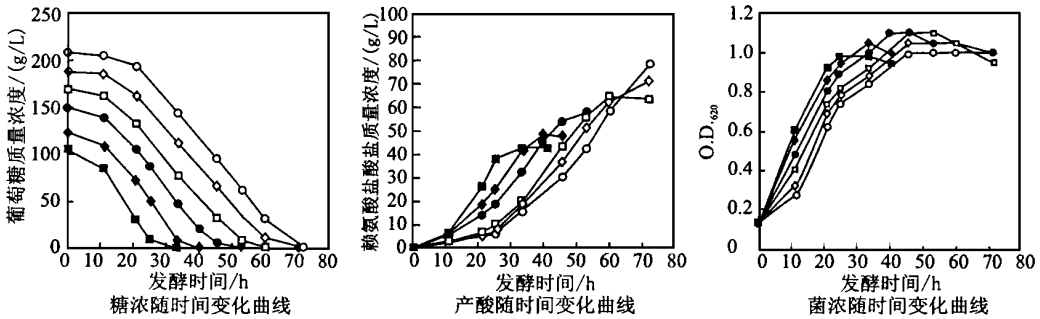
2.5 初糖浓度对发酵的影响

赖氨酸发酵的耗糖量很大,如采用一次投糖,势必造成初糖质量浓度过高,导致菌体生长适应期延长和转化率下降,故工业生产中常采用补糖发酵法.如果将初糖质量浓度定得太

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://ww

低,虽可加快菌体的生长,但由于需大量补加糖液,在工业生产上会带来许多不便.

为了解本赖氨酸生产菌的耐高糖性,并为工业生产上初糖质量浓度的选择提供参考,考察了不同初糖质量浓度对菌体生长、产酸和转化率的影响,发酵结果如图 3和表 5所示.



○为208 g/L,◇为170 g/L,□为188 g/L,●为150 g/L,■为124 g/L,◆为105 g/L (初始葡萄糖质量浓度)时的曲线

图 3 不同初糖质量浓度下的发酵过程曲线

从图 3可见,本菌株耐高糖性较好,在初糖质量浓度为 208 g/L时,发酵 72 h,糖已耗完,产酸达到 7.8 g/L,但发酵初期的菌体生长和产酸速率明显低于初糖质量浓度较低时的情况,在 25 h时 208 g/L、150 g/L、105 g/L的初糖质量浓度所对应的菌体光密度和产物质量浓度分别为 0.6、0.88、0.96和 5 g/L、18 g/L、38 g/L.另外,在考察的初糖质量浓度范围内,最终赖氨酸对糖的转化率随初糖质量浓度的提高而降低,见表 5.

表 5 不同初糖浓度下的赖氨酸耗糖转化率的比较

初糖质量浓度/(g/L)	208	188	170	150	124	105
转化率/%	37.6	37.7	38.2	38.6	39.2	40.9

参考各初糖质量浓度下的发酵情况,经计算可确定合适的初糖质量浓度范围.

假定须达到 90 g/L的最终产酸质量浓度,按 38% 的转化率计,需投总糖 250 g/L左右,由糖的物料平衡可得(1)式,则补糖体积 V_x 可由(2)式得到.

$$d \cdot V_0 + 450 \cdot V_x = 250 \cdot (V_0 + V_x) \quad (1)$$

$$V_x = \frac{0.25 - d}{0.2} V_0 \quad (2)$$

d、V_0、V_x 分别为发酵液初糖质量浓度、初始体积和补糖体积,450为补糖液的质量浓度(g/L).

如取 d= 100 g/L,则补糖体积 V_x = 0.75 V_0,即使得体积增大 0.75倍,这是一般机械搅拌发酵罐所不能允许的,而且也使初始营养物配比失去意义;

如取 d= 150 g/L,则 V_x = 0.50 V_0,增加 50% 的体积也是比较高的;

如取 d= 180 g/L,则 V_x = 0.35 V_0,由图 3中初糖质量浓度为 174 g/L时的耗糖曲线看,50 h糖质量浓度已接近零,再补入 35% 体积的糖液是可以消耗的.

如取 d> 200 g/L,则 V_x < 0.25 V_0,但高糖发酵会导致转化率降低.

通过计算分析,作者认为工业生产上如采用流加培养模式,以产酸 90 g/L左右为目标,初糖质量浓度取 150~180 g/L较适宜.表 6为补糖试验结果,表明补糖有利于提高产酸.

表 6 摇瓶补糖试验结果

初糖质量浓度/(g/L)	补糖量/(g/L)			发酵时间/h	赖氨酸盐酸盐质量浓度/(g/L)
	45 h	50 h	55 h		
180	20	20	20	72	85.5

补糖浓度 450 g/L,补糖量以初始体积计

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www

3 结　　语

与罐发酵相比,摇瓶培养时,发酵过程溶氧、pH值难以控制在最佳状态,且只能采取间歇补糖,而在罐上进行流加发酵可以有更好的结果.作者所在研究室在 2.5 L台式罐和工厂 75 m^3大罐发酵的初步研究中,赖氨酸盐酸盐浓度已分别达到 105 g/L和 80 g/L.

参考文献:

[1] 石渡昭男.赖氨酸发酵 [P].日本特许公报, 50(874), 1975-01-12

[2] 北京大学生物系生物化学教研室.生物化学实验指导 [M].北京: 高等教育出版社, 1989

[3] STEINBUCHEL A, SCHLEGEL H G. Excretion of pyrurate by mutants of Alcaligenes eutrophus, which are impaired in the accunulation of poly(β-hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1989, 31: 168~175

[4] 石慧东.离子交换法提取 L赖氨酸的研究 [D].无锡: 无锡轻工大学, 1994.

Optimization of Shake-flask Culture Conditions of L-lysine Fermentation

YIN Hong-bo, CHEN Jian, DU Guo-cheng, LUN Shi-yi

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract Shake-flask culture conditions of L- lysine fermentation were studied with a mutant of Brevibacterium flavum, aimed at industrial production of L-lysine. The optimal concentrations of initial nitrogen sources were obtained by orthogonal experiments. Appropriate feeding of organic nitrogen sources was favorable for fermentation. The initial $(NH_4)_2SO_4$ and glucose concentrations suitable for fermentor production ranged from 25~30 g/L and 150~180 g/L respectively. 85.5 g/L of Lys·HCl concentration was obtained under fed-batch culture.

Key words L-lysine; shake-flask culture; *Brevibacterium flavum*

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://ww