

文章编号:1673-1689(2011)06-0924-05

L-赖氨酸高产菌发酵的研究

周勇¹, 满云¹, 张伟国^{*2}

(1. 中粮生物化学(安徽)股份有限公司, 安徽 蚌埠 233010; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在摇瓶条件下对赖氨酸发酵的供氧、初糖浓度等进行了研究, 并对氮源硫酸铵、营养因素玉米浆和 L-苏氨酸进行了响应面分析试验, 得到最优的摇瓶发酵条件。在此基础上, 进行了 7 L 自控发酵罐赖氨酸发酵试验。研究结果表明, 在 7 L 发酵罐中发酵 64 h 左右, 积累赖氨酸盐酸盐可达 161 g/L, 糖酸转化率 58.3%。

关键词: L-赖氨酸; 发酵; 黄色短杆菌

中图分类号: Q 933

文献标识码: A

Study on Fermentation of L-Lysine Hyper-Producer

ZHOU Yong¹, MAN Yun¹, ZHANG Wei-guo^{*2}

(1. Anhui BBKA Biochemical Co., Bengbu 233010, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The supply of oxygen, nitrogen sources and different initial glucose concentrations were studied for L-Lysine fermentation in shaking culture, and then, L-lysine fermentation was performed in 7 L fermentor. L-lysine · HCl and conversion efficiency reached 161 g/L and 58.3% respectively in 7 L fermentor after 64 h.

Key words: L-Lysine, fermentation, *Brevibacterium flavum*

L-赖氨酸是人体和动物所不能合成的 8 种必需氨基酸中最重要的一种。目前, 90% 以上的 L-赖氨酸产品用于饲料工业, 如豆粕中添加适量的 L-赖氨酸, 可以大大提高蛋白质的利用率, 促进禽畜生长。由于国内饲料工业惊人的发展速度, L-赖氨酸的市场需求与日俱增^[1]。目前, 国内外赖氨酸生产均采用发酵法生产, 常规育种技术从谷氨酸产生菌选育的菌种产酸率约 13%~15%, 发酵周期约 64

h; 用基因工程技术从大肠杆菌改造所得的菌种产酸率 15~18%, 发酵周期 40~50 h^[2-11]。国外主要由日本味之素、韩国希杰、美国 ADM 等厂家, 国内主要生产厂家有吉林大成、安徽丰原等。尽管我国赖氨酸产量已稳居世界第一, 但赖氨酸产生菌和技术基本上被日本味之素、韩国希杰等垄断。因此, 很有必要选育拥有自主知识产权的 L-赖氨酸高产菌, 并采用先进的补料分批发酵工艺提高产酸率和

收稿日期: 2010-12-28

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA020301)。

作者简介: 周勇 (1975—), 男, 湖北宜昌人, 工程硕士, 工程师。Email: zy197579@163.com。

* 通信作者: 张伟国 (1963—), 男, 江苏张家港人, 工学博士, 教授。主要从事发酵工程研究。Email: zhangwg168@126.com

糖酸转化率,使我国的赖氨酸工业具有国际竞争力^[2,12]。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

L-赖氨酸高产菌 XQ-9 (AEC^{hr} Suc^g Thr⁻ SG^{hr})^[13],由黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) ATCC14067 选育而来。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基(g/L) 葡萄糖 5,牛肉膏 10,蛋白胨 10,NaCl 5,琼脂条 20。

1.2.2 摇瓶种子培养基(g/L) 葡萄糖 25,(NH₄)₂SO₄ 5,KH₂PO₄ 1,MgSO₄·7H₂O 0.5,玉米浆 35~40,CaCO₃ 10。

1.2.3 摇瓶发酵培养基(g/L) 葡萄糖 120~200,(NH₄)₂SO₄ 40~60,KH₂PO₄ 1,MgSO₄·7H₂O 0.5,玉米浆 5~15,L-苏氨酸 0.2~0.6,CaCO₃ 40。

完全和种子培养基均以 200 g/L NaOH 调 pH 值至 7.0~7.2,0.1 MPa 压力下灭菌 20 min。发酵培养基以 200 g/L NaOH 调至 pH 值 7.0~7.2,0.07 MPa 压力下灭菌 8 min。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面、平板培养方法 恒温箱温度(31±1)℃,培养 24 h。

1.3.2 摇瓶培养方法 摇床为往复摇床,振次(100±2)次/min,振幅 8 cm,温度(31±1)℃,种子装液量 500 mL 三角瓶 100 mL,种子培养 12 h;发酵装液量 500 mL 三角瓶 25 mL,发酵培养 72 h。

1.3.3 7 L 发酵罐培养方法 初始装液量为 3.6 L,接种量 10%,初糖约为 120~125 g/L,通气量为 2~3 L/min,搅拌转速 280~500 r/min,以维持相对溶氧在 30%以上,发酵温度 31℃,流加 25%浓氨水以控制 pH 值在 6.7~6.8,中间每隔 2~4 h 检测残糖浓度,当残糖降至 25 g/L 时流加 700 g/L 的葡萄糖,维持残糖在 25~30 g/L,发酵结束前 4~6 h 停止流加糖液,整个发酵时间约为 64 h。

1.4 分析方法

1.4.1 pH 值 用精密 pH 试纸和酸度计测定。

1.4.2 菌体生长 吸取样品菌液 0.2 mL 到 0.25 mol/L HCl 5 mL 溶液中,摇匀后测定 A_{562nm} 值。

1.4.3 葡萄糖 采用 SBA-40C 生物传感分析仪测定。

1.4.4 L-赖氨酸 纸上层析法、酸性茚三酮法^[14]和氨基酸自动分析仪。

2 结果与讨论

2.1 L-赖氨酸摇瓶发酵研究

2.1.1 供氧对 L-赖氨酸发酵的影响 L-赖氨酸属于天门冬氨酸族氨基酸,其前体草酰乙酸主要由对氧浓度要求较高的 TCA 循环和磷酸烯醇式丙酮酸羧化反应提供。充分供氧,可使菌体呼吸充足,可能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,为此进行了固定振荡频率(往复摇床 98~100 次/min)条件下不同装液量的 L-赖氨酸摇瓶发酵试验,结果见表 1。

表 1 不同装液量对 L-赖氨酸发酵的影响

Tab. 1 Effect of medium volume on L-lysine fermentation

装液体积量/mL	L-赖氨酸·HCl / (g/L)
20	85
25	97
30	81
35	75

从表 1 中可看出,装液量对发酵产酸有一定影响,当装液量为 25 mL 时,产酸最高。从表 2 中可看出,L-赖氨酸产生菌 XQ-9 具有较好的耐高糖特性,当初糖浓度为 180 g/L 时,发酵 72 h,产酸可达 97 g/L,糖酸转化率为 53.8%。

2.1.2 初糖浓度对产酸及糖酸转化率的影响 L-赖氨酸发酵的耗糖量很大,如采用一次投糖,势必造成初糖过高而导致菌体生长适应期延长和糖酸转化率下降,故生产上常采用流加糖发酵法。如果将初糖浓度太低,虽可加快菌体前期生长速度,但由于需要大量补加糖液,补加糖液浓度也必须较高,这样在生产上会带来许多麻烦。

为了了解赖氨酸产生菌 XQ-9 的耐高糖特性,并给生产上选择初糖浓度提供参考,有必要考察不同初糖浓度对菌体生长、产酸和糖酸转化率的影响。不同初糖浓度下的发酵结果见表 2。

表 2 不同初糖质量浓度下的 L-赖氨酸发酵结果

Tab. 2 Result of Glucose concentration on the production of

L-lysine

初糖/ (g/L)	发酵 时间/h	残糖/ (g/L)	L-赖氨酸·HCl/ (g/L)	转化 率/%
120	52	3	61	50.8
140	60	5	72	51.4
160	65	5	83	51.9
180	72	7	99	55.0
200	82	8	105	52.5

2.1.3 氮源等营养物质对 L-赖氨酸摇瓶的正交试验 摇瓶发酵采用硫酸铵为赖氨酸发酵的无机氮源;来源丰富、价格便宜的玉米浆作为赖氨酸发酵所需的氨基酸和生长因子;因赖氨酸高产菌为苏氨酸缺陷型,故在培养基中添加少量的 L-苏氨酸。采用硫酸铵、玉米浆和苏氨酸三因素做响应面实验,以 L-赖氨酸·HCl 产量为响应值,实验设计的因素及水平见表 3。

表 3 因素及水平表

Tab. 3 List of factors and levers

水平	因素		
	X_1 /L-苏氨酸/ (g/L)	X_2 /硫酸铵/ (g/L)	X_3 /玉米浆/ (g/L)
-1	0.5	50	8
0	0.6	60	10
1	0.7	70	12

用软件 Design expert 7.1 进行实验设计,共进行 17 次实验。17 个实验点可分为两类:一类是析因点,即自变量取值在 X_1 、 X_2 和 X_3 所构成的 3 维顶点,共有 12 个析因点;一类是零点,为响应面区域的中心点,零点实验重复 5 次,用于估计实验误差,实验结果见表 4。

表 4 响应面实验设计及实验结果

Tab. 4 Experimental design and results of response surface

实验号	L-苏氨酸 (X_1)	硫酸铵 (X_2)	玉米浆 (X_3)	L-赖氨酸·HCl/ (g/L)
1	0	-1	1	87.9
2	0	1	1	80.6
3	-1	1	0	55.1
4	1	-1	0	73.8
5	0	0	0	102.9
6	0	-1	-1	90.5
7	-1	-1	0	80.5
8	0	0	0	102.5
9	0	0	0	103.1
10	0	0	0	103.9
11	1	1	0	70.5
12	0	1	-1	65.0
13	-1	0	1	82.2
14	-1	0	-1	79.6
15	0	0	0	102.1
16	1	0	1	87.4
17	1	0	-1	79.6

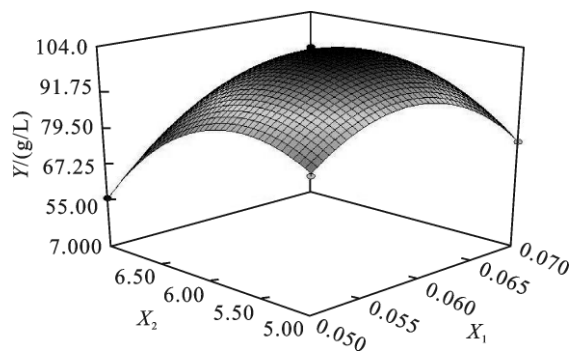
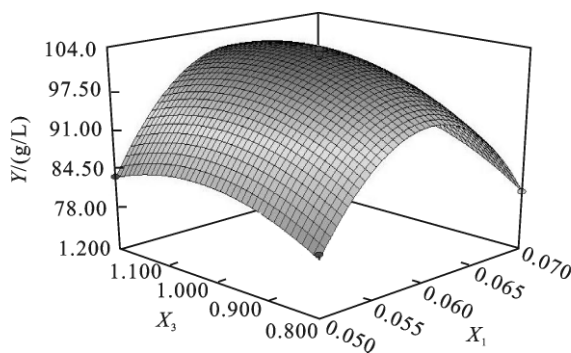
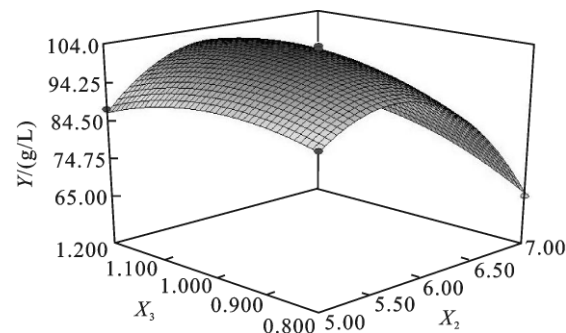
图 1 L-苏氨酸(X_1)及硫酸铵(X_2)对 L-赖氨酸发酵影响的响应面图Fig. 1 Response surface plot of L-threonine and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on L-lysine fermentation图 2 L-苏氨酸(X_1)与玉米浆(X_3)对 L-赖氨酸发酵影响的响应面图

Fig. 2 Response surface plot of L-threonine and corn steep liquor on L-lysine fermentation

图 3 硫酸铵(X_2)与玉米浆(X_3)对 L-赖氨酸发酵影响的响应面图Fig. 3 Response surface plot of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and corn steep liquor on L-lysine fermentation

根据上述实验结果,以 L-赖氨酸·HCl 的产量 Y 为响应值,利用 Design Expert 7.1 软件对表 4 进行二次多元回归方程拟合,得到 Y 值对 3 个自变量 X_1 、 X_2 和 X_3 的二次多项回归方程: $Y = 102.9 + 1.74X_1(7.69X_2 + 2.93X_3 + 5.53X_1X_2 + 1.30X_1X_3 + 4.55X_2X_3)(15.86X_1^2 + 17.06X_2^2 + 4.84X_3^2)$ 。回归分析表明:大于 F 值的概率($Pr > F$)小于 0.000 1,说明回归方程的显著性极高;该方程决定系数 $R^2 =$

0.998 1,说明方程的拟合度较高,可用于分析和预测 L-赖氨酸·HCl 产量。本设计实验中 CV = 1.12%,较低,说明该实验操作可信。

通过以上响应面分析得到苏氨酸、硫酸铵和玉米浆三因素的最佳质量浓度分别为 0.63、60 和 10.5 g/L,在此最佳浓度进行摇瓶发酵 72 h,产 L-赖氨酸·HCl 可达 104 g/L,糖酸转化率为 57.3%。

2.2 7 L 发酵罐 L-赖氨酸发酵试验

在 L-赖氨酸摇瓶发酵成功的基础上,进行了 7 L 实验室发酵罐一系列 L-赖氨酸发酵试验。初始装液量为 3.6 L,初糖浓度约为 120~125 g/L(比摇瓶发酵初糖要低,这样有利于长菌和缩短发酵周期),接种量 10%,通气量为 2~3 L/min,搅拌转速 280~500 r/min,以维持相对溶氧百分浓度在 30%以上,发酵温度 31℃,流加 25%的氨水以控制 pH 在 6.7 左右,中间每隔 2~4 h 检测残糖浓度,并流加 700 g/L 的葡萄糖,维持残糖浓度在 25~30 g/L,发酵结束前 4~6 h,停止流加糖液,当残糖

降至 5~8 g/L 时,即发酵结束,整个发酵周期约 64 h。发酵结束时产酸率 161g/L,糖酸转化率 58.3%,达到国内外常规选育 L-赖氨酸产生菌发酵的较高水平,为今后工业生产奠定了基础。在此条件下的发酵过程曲线如图 4 所示。

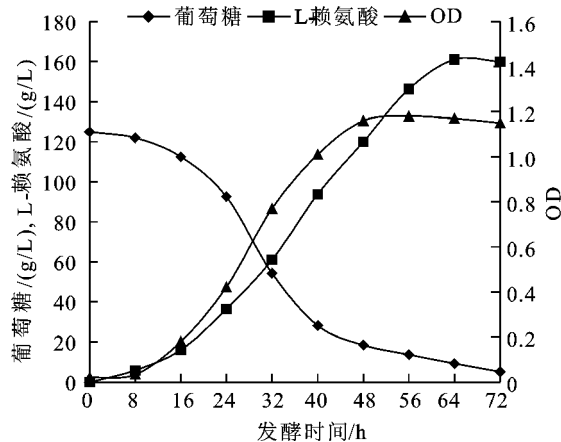


图4 L-赖氨酸发酵进程曲线

Fig. 4 Time course of L-lysine fermentation in 7 L fermentor

参考文献(References):

- [1] 长春大成集团. 赖氨酸和苏氨酸国内外市场状况[J]. 饲料广角, 2006, 7: 24-25.
Changchun Dacheng group. Domestic and overseas status on Lysine and Threonine[J]. *Feed China*, 2006, 7:24-25. (in Chinese)
- [2] 刘晓飞, 高学军, 刘营, 等. 微生物产赖氨酸的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(1): 157-160.
LIU Xiaofei, GAO Xuejun, LIU Ying. Research progress on microbial production of lysine[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41(1): 157-160. (in Chinese)
- [3] Maija Ruklisha, Longina Paegle. fluxes and L-lysine synthesis by *Corynebacterium glutamicum* in relation to cellular total reducing activity[J]. *Process Biochemistry*, 2001, 36: 1233-1240.
- [4] Abdul Haleem Shah, Abdul Hameed. Optimization of culture conditions for L-Lysine fermentation by *corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Biological Sciences*, 2002, 2(3):151-157.
- [5] Theodora Tryfona, Mark T. Bustard. Fermentative production of lysine by *corynebacterium glutamicum*; transmembrane transport and metabolic flux analysis[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 499-508.
- [6] Georg Sindelar & Volker F. Wendisch. Improving lysine production by *corynebacterium glutamicum* through DNA microarray-based identification of novel target genes[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76: 677-689.
- [7] Mikiro Hayashi, Hiroshi Mizoguchi, Junko Ohnishi. A leuC mutation leading to increased L-lysine production and re-independent global expression changes in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72:783-789.
- [8] Masato Ikeda, Junko Ohnishi, Mikiro Hayashi. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33: 610-615.
- [9] yvind M Jakobsen, Trygve Brautaset, Kristin F. Degnes. Overexpression of wild-type aspartokinase increases L-Lysine production in the thermotolerant methylotrophic *Bacterium Bacillus methanolicus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(3): 652-661.
- [10] Mladen V. Tzvetkov, Wolfgang Liebl. Phytate utilization by genetically engineered lysine- producing *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Biotechnology*, 134:211-217.
- [11] Guifre Torruella, Hiroshi Suga, Marta Riutort. The evolutionary history of lysine biosynthesis pathways within eukaryotes[J]. *J Mol Evol*, 2009, 69: 240-248.
- [12] 曾兆国, 李承钰, 陈永辉. 赖氨酸发酵过程中不同氮源的代谢作用研究[J]. 饲料工业, 2010, 31(6): 34-35.
ZENG zhao-guo, LI cheng-yu, CHEN yong-hui. Study on metabolic action of different nitrogen source in lysine fermentation[J]. *Feed Industry*, 2010, 31(6):34-35. (in Chinese)
- [13] 陈银芳, 张卫国. L-赖氨酸高产菌的选育及发酵培养基的优化[J]. 生物技术, 2009, 19(4): 36-40.
CHEN Yin-fang, ZHANG Wei-guo. Breeding of L-lysine producing mutant and studying under fermentation conditions [J]. *Biotechnology*, 2009, 19(4):36-40. (in Chinese)
- [14] 潘家秀. 蛋白质化学研究技术[M]. 北京: 科学出版社, 1962.