

大肠杆菌发酵产 L-色氨酸 培养基及补料优化

朱晓雯¹, 王泽建¹, 黎亮¹, 吴杰群², 庄英萍^{1,*}

(1. 华东理工大学, 生物反应器工程国家重点实验室, 国家生化工程技术研究中心, 上海 200237;

2. 浙江工业大学生物工程学院, 浙江杭州 310014)

摘要: 为了进一步提高优化大肠杆菌发酵产 L-色氨酸的产量, 采用响应面法优化了原初始发酵培养基组合成分, 建立了乙酸铵-玉米浆补料模式。结果表明优化后培养基组合: 0.12% 硫酸铵、0.7% 磷酸二氢钾、0.15% 一水柠檬酸、0.28% 七水硫酸镁、0.05% 酵母粉、0.810 0.39% 乙酸铵、0.3% 玉米浆。5 L 罐的培养验证表明, 玉米浆和乙酸铵是影响 L-色氨酸产量的主要成分因素, 优化后 L-色氨酸产量提高了 35.4%, 发酵结束达到 24.53 g/L, 单位菌体 L-色氨酸产量提高了 19.8%, 达到 0.272 g/OD, 糖酸转化率提高了 27%, 为 L-色氨酸发酵提供一定的参考。

关键词: 大肠杆菌, L-色氨酸, 发酵, 培养基优化, 补料工艺

Optimization of Medium and Feeding Process for L-Tryptophan Production Fermented by *Escherichia coli*

ZHU Xiao-wen¹, WANG Ze-jian¹, LI Liang¹, WU Jie-Qun², ZHUANG Ying-ping^{1,*}

(1. National Engineering Research Center for Biotechnology, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering,
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. College of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: In order to further increase the production of L-tryptophan fermented by *Escherichia coli*, response surface methodology design were used to optimize the composition of original fermentation medium. Based on the conditions, the feeding mode of ammonium acetate-corn syrup was established. The results showed that the combination of optimized medium were as follows: 0.12% ammonium sulfate, 0.7% potassium dihydrogen phosphate, 0.15% citric acid monohydrate, 0.28% magnesium sulfate heptahydrate, 0.05% yeast powder 0810, 0.39% ammonium acetate, 0.3% corn syrup. The validation culture in 5 L tank showed that corn syrup and ammonium acetate were the main factors affecting the production of L-tryptophan. After optimization, the yield of L-tryptophan increased by 35.4%, reaching 24.53 g/L at the end of fermentation. The yield of L-tryptophan in per unit cell increased by 19.8%, reaching 0.272 g/OD. The conversion rate of glucose was increased by 27%. And it would provide some reference for L-tryptophan fermentation.

Key words: *Escherichia coli*; L-tryptophan; fermentation; medium optimization; feeding process

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)02-0146-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.024

引文格式: 朱晓雯, 王泽建, 黎亮, 等. 大肠杆菌发酵产 L-色氨酸培养基及补料优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 146-153.

色氨酸是一种重要的芳香族氨基酸, 具有独特的吲哚侧链^[1], 含有三种异构体, 分别是 L-型、D-型、DL-型, 较常见且研究最多的是 L-色氨酸。L-色氨酸对人类和动物而言属于八大必需氨基酸中的第二必需氨基酸, 在神经系统活动中起着重要的调节作用, 广泛应用于医药、食品和动物饲料添加剂的制作加工业^[2], 主要用于食品添加剂。此外, 因其与金属离子可以发生螯合作用, 具有抗氧化活性, 可

作为食品防腐剂和保鲜剂^[3]。所以对于提升色氨酸产能水平的探索意义重大。

L-色氨酸可通过生物转化、酶法和微生物发酵等途径得到^[4], 利用大肠杆菌或谷氨酸棒状杆菌发酵生产是目前使用最多的、综合效益较高的方法^[5]。日本协和发酵利用基因工程重组菌生产放大后 L-色氨酸最高产量达到 66 g/L, 为目前行业报道的最高发酵水平, 国内企业的 L-色氨酸发酵产酸水平为

收稿日期: 2019-04-30

作者简介: 朱晓雯(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 发酵过程优化, E-mail: zhuchexiaowen@126.com。

* 通讯作者: 庄英萍(1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 发酵调控, E-mail: ypzhuang@ecust.edu.cn。

25 g/L左右^[6]。据近十年的数据统计,全球色氨酸的年需求量达到5万吨,产量只有1万吨左右,色氨酸的产量基本是供不应求的状态^[7]。色氨酸发酵生产的理论得率为0.227 g/g Glu^[8],这一最大产量表明,理论上葡萄糖中不超过36.7%的碳可以转化为L-色氨酸,其余的碳则被生物量增长和细胞呼吸等其他活动所消耗,因此,利用发酵工艺生产L-色氨酸,底物利用效率较低,这直接降低了潜在的工艺盈利能力^[9]。除了菌株的选择,培养基的成分对发酵法生产而言至关重要,培养基的成分及配比合适与否,对微生物的生长,发酵产品的生物合成、提取,甚至最后对成品的产量、质量都会产生相当大的影响。

本文对重组大肠杆菌发酵产L-色氨酸初始发酵培养基开展了基础研究,在单因素优化筛选的基础上,采用一系列统计学实验设计方法找到影响发酵的关键培养基组分,得到了该菌株优化后的初始发酵培养基组合,提升了单位菌体L-色氨酸的比合成速率。为进一步优化色氨酸的合成效率、转化率提供了数据基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌 浙江工业大学微生物菌种保藏室提供;葡萄糖、硫酸铵、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、一水柠檬酸、七水硫酸镁、酵母粉、氯化钠、蛋白胨、琼脂粉、乙酸铵、玉米浆、氢氧化钠等 均为分析纯,凌峰化学试剂有限公司;L-色氨酸 优级纯,国药集团化学试剂有限公司。

UV-2012PC 型紫外可见分光光度计 美国 Unico 公司;TDL-80-2B 离心机 上海安亭科学仪器厂;BSA224S-CW 电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;DHP-9012 电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公司;ZHWY-3212 摇床 上海志诚仪器仪表有限公司;5 L 发酵罐 上海国强生化工程装备有限公司;SBA-40E 生物传感分析仪 山东省科学院生物研究所;DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱 上海华连医疗器械有限公司;DK-S22 型电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司;YXQ-LS-SII 立式压力蒸汽灭菌锅 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;AGILENT 1100 series 高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配方 种子平板活化培养基:1% 蛋白胨,0.5% 酵母提取物,1% 氯化钠,2% 琼脂粉,pH7.0。

种子摇瓶培养基:3% 葡萄糖,0.5% 硫酸铵,2.4% 磷酸氢二钾,0.96% 磷酸二氢钾,1.52% 酵母提取物,0.1% 七水硫酸镁,pH7.0。

初始发酵培养基:0.5% 葡萄糖,0.22% 硫酸铵,1.05% 磷酸二氢钾,0.28% 一水柠檬酸,0.28% 七水硫酸镁,0.2% 酵母提取物,pH6.5。

微量元素:1% 七水合硫酸亚铁,0.28% 无水亚硫酸钠,0.063% 一水合硫酸锰,0.074% 七水合硫酸锌,0.008% 五水硫酸铜,0.04% 六水氯化钴,用于发酵培养。

1.2.2 菌种培养方法

1.2.2.1 菌种活化 在无菌条件下,将甘油保种管内菌接至四环素(40 mg/L)抗性的 LB 固体培养基,37 ℃,培养 16 h。

1.2.2.2 种子培养 用接种环刮取一环新鲜的菌落接至 500 mL 圆底三角瓶中,装液量 100 mL,四环素工作浓度为 40 mg/L,8 层纱布封口,置巡回式摇床上,220 r/min,35 ℃ 振荡培养 12 h。

1.2.2.3 摇瓶发酵 500 mL 圆底三角瓶中装液量 50 mL,发酵摇瓶在灭菌前需额外加入碳酸钙 0.5 g/L 用于短暂维持 pH 的稳定。接种量 8% (V/V),8 层纱布封口,置巡回式摇床上,220 r/min,35 ℃ 振荡培养 36 h。

1.2.2.4 5 L 罐发酵 标定 pH 电极,用饱和亚硫酸钠溶液标定溶氧 0%。5 L 发酵罐装液量为 2.5 L,接种前温度降至 35 ℃,搅拌 500 r/min,通气量为 3 L/min,定溶氧 100%。接种量为 8% (V/V),整个过程中流加 25% 氨水控制 pH(6.5),流加泡敌消泡,调整转速控制溶氧 20% 以上。当初始发酵培养基中的葡萄糖耗尽,开始流加质量浓度为 65% 的葡萄糖,起始流加速度 1 g/L,溶氧持续回升,则增加补糖量,控制残糖浓度 0.01 g/L 左右。

1.2.3 培养基成分单因素实验

1.2.3.1 碳源 在前述初始发酵培养基基础上,只改变碳源种类,考察四种不同的常见碳源(葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和乳糖)对重组大肠杆菌代谢的影响。以加入等碳元素含量(葡萄糖 0.5%)的原则进行摇瓶试验,分析不同碳源对菌体生物量、残糖含量、pH 及 L-色氨酸产量的影响。

1.2.3.2 无机氮源 在前述初始发酵培养基基础上,只改变无机氮源种类,考察四种不同无机氮源(硫酸铵、硝酸铵、氯化铵和乙酸铵)对重组大肠杆菌代谢的影响。以加入等氮元素含量(硫酸铵 0.22%)的原则进行摇瓶试验,分析不同的无机氮源对单位菌体 L-色氨酸产量、菌体生物量及 L-色氨酸合成产量的影响。

1.2.3.3 有机氮源 在前述初始发酵培养基基础上,只改变有机氮源种类,考察八种不同有机氮源(玉米浆、混合蛋白、酵母粉 0810、牛肉膏、酵母粉 0835、蛋白胨、酵母粉 0815、酵母粉 0805)对重组大肠杆菌代谢的影响。以加入等干物质含量 0.2% 为原则配制,分析其对单位菌体 L-色氨酸产量、菌体生物量及 L-色氨酸发酵产量的影响。

1.2.4 Plackett-Burman (PB) 实验设计 通过采用 PB 实验设计,以单位菌体 L-色氨酸产量和 L-色氨酸产量为响应指标,筛选 L-色氨酸合成过程中培养基中关键影响成分,选择培养基成分中的八种重要组分进行系统筛选评估。组分包括:硫酸铵、乙酸铵、玉米浆、酵母粉、一水柠檬酸、七水硫酸镁、磷酸二氢钾、微量元素,每个因素分高低两个水平,因素水平设计见表 1。

1.2.5 响应面试验设计 采用 Central-Composite Design (CCD) 试验设计,以 L-色氨酸产量为响应指标,对 PB 实验筛选出来的三个相对重要影响因素进

表2 Central-Composite Design 试验因素与水平

Table 2 Factors and levels based on central-composite design

因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
X ₁ 酵母粉 0810(g/L)	0.16	0.50	1.00	1.50	1.84
X ₂ 乙酸铵(g/L)	0.68	1.50	2.70	3.90	4.72
X ₃ 玉米浆(g/L)	1.64	3.00	5.00	7.00	8.36

表1 Plackett-Burman 设计的因子和水平

Table 1 Factors and levels designed in Plackett-Burman

因素	1	-1
A 硫酸铵(g/L)	2.4	1.2
B 乙酸铵(g/L)	2.7	1.5
C 玉米浆(g/L)	5.0	2.0
D 酵母粉 0810(g/L)	2.4	0.8
E 一水柠檬酸(g/L)	4.0	1.5
F 七水硫酸镁(g/L)	4.0	1.5
G 磷酸二氢钾(g/L)	13.0	7.0
H 微量元素(mL/L)	14.0	6.0

行响应面试验分析, CCD 试验设计因素水平参见表2。

1.2.6 种龄对发酵的影响 考察不同种龄对应的种子对优化前后培养基发酵的影响,选择种龄 10、12、14 h 时接入发酵摇瓶进行发酵培养,找到最优的移种状态。

1.2.7 乙酸铵和玉米浆间歇流加培养工艺设计 实验分成四组:原始培养基组、优化培养基组、流加乙酸铵组、流加乙酸铵和玉米浆组。其中流加乙酸铵组:将培养基中的成分“乙酸铵”单独配制,9.75 g 乙酸铵定容至 200 mL,采用补料间歇流加的方式于 36 h 补入发酵罐,乙酸铵液补率 8 g/L·h;流加乙酸铵和玉米浆组:将培养基中的成分“玉米浆”和“乙酸铵”分别单独配制,7.5 g 玉米浆液定容至 50 mL,9.75 g 乙酸铵定容至 150 mL,分别于 24、36 h 间歇流加补入发酵液中,玉米浆液补率 2 g/L·h,乙酸铵液补率 6 g/L·h。

1.2.8 指标测定方法

1.2.8.1 菌体生物量测定 发酵液稀释至适当倍数于分光光度计上测定 OD₆₀₀。

1.2.8.2 残糖浓度测定 对于非还原性的双糖采用酸水解法使其降解成还原性单糖后,采用 DNS 法^[10]和 SBA-40E 生物传感分析仪测定。得到标准曲线 $y = 1.3613x + 0.0461$, $R^2 = 0.9984$ 。

1.2.8.3 L-色氨酸含量测定 采用对二甲氨基苯甲醛比色测定法^[11]。其中标准曲线为 $y = 207.97x + 5.8789$, $R^2 = 0.9994$ 。

1.2.8.4 乙酸测定 采用 HPLC 法测定^[12]。

1.2.8.5 单位菌体 L-色氨酸产量计算 单位菌体 L-色氨酸产量 = 单位体积培养液中 L-色氨酸含量/菌体浓度 OD₆₀₀

1.3 数据处理

所有实验均重复三次。利用 Origin 2016 软件进行数据作图分析。使用软件 Design Expert 7.0 进行因素显著性分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 不同碳源对重组菌株发酵的影响 不同碳源对重组大肠杆菌发酵色氨酸的结果见图 1。发酵结束时,葡萄糖为碳源的情况下菌体浓度最高,OD₆₀₀ 是其他组的 1.5~2 倍。L-色氨酸的合成量也最大,是其他组的 2~4 倍。根据图 1 的残糖及 pH 对比,蔗糖和乳糖组残糖和 pH 较高,说明该菌株对蔗糖和乳糖的利用度较差,这可能与该菌种分解蔗糖和乳糖的酶系活力低有关^[13]。所以选择葡萄糖作为后续实验使用的碳源。

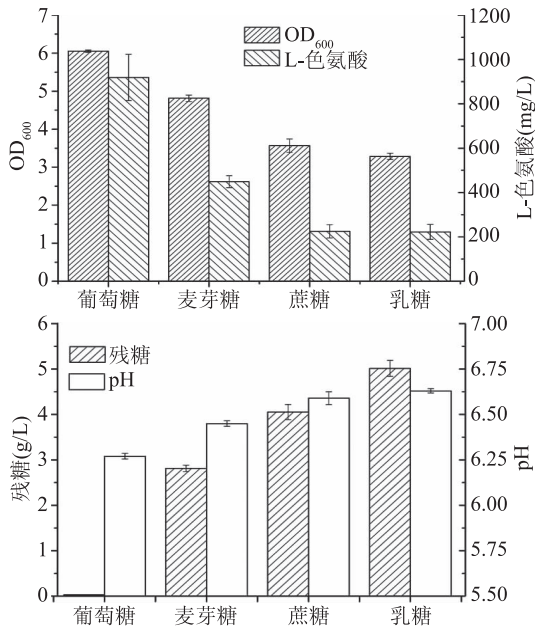


图1 不同碳源对 L-色氨酸发酵的影响

Fig.1 Effects of different carbon sources on L-tryptophan fermentation

2.1.2 不同无机氮源对重组菌株发酵的影响 不同无机氮源对重组大肠杆菌发酵色氨酸的结果见图 2。如图 2a,氯化铵为氮源的条件下,菌体 OD₆₀₀ 值略高于其它氮源,L-色氨酸的产量也同比高于硫酸铵和硝酸铵为氮源的发酵组,硫酸铵组单位菌体产量略高于氯化铵和硝酸铵组。乙酸铵为氮源时,菌体的浓度比硫酸铵和硝酸铵为氮源的发酵组低,但 L-色氨酸的生成量达到了 1118 mg/L,与其它三种无机氮源相比,提升了 21% 以上。尤其是以乙酸铵为氮源时单位菌体的 L-色氨酸合成量最高达到了 175 mg/OD,与其它三种无机氮源相比整体提升了 30% 以上(图 2b)。可见乙酸铵虽然对菌的生长有一定抑制作用,但是对单位菌体的产量提升有很大的效用。可能是

乙酸铵中除含有与硫酸铵等量的氮元素外,其还含有两个碳原子,在葡萄糖耗尽缺乏碳源时,乙醛酸通路被激活,菌体会利用乙酸进行合成代谢,替代 TCA 循环的部分代谢途径,使菌体更高效地利用碳源,而导致乙酸铵组效果比硫酸铵组效果好,但是在其他文献中乙酸对菌体生长和色氨酸合成均不利^[14-15]。鉴于乙酸铵这种物质成分的特殊性,选择硫酸铵和乙酸铵进行后续的显著因素筛选试验。

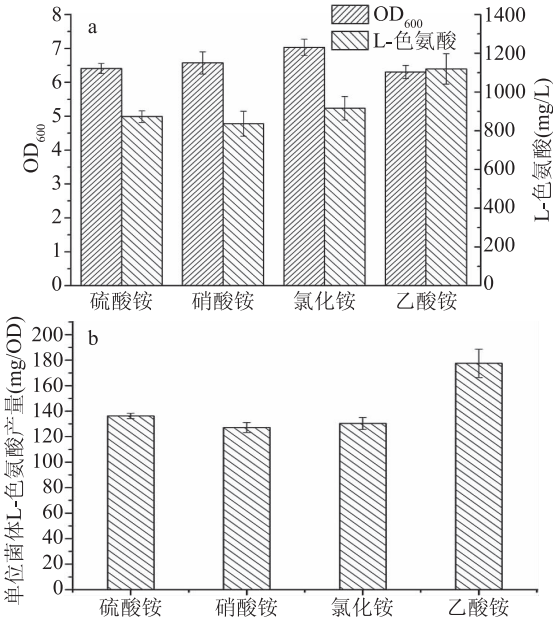


图2 不同无机氮源对 L-色氨酸发酵的影响
Fig.2 Effects of different inorganic nitrogen sources on L-tryptophan fermentation

2.1.3 不同有机氮源对重组菌株发酵的影响 不同有机氮源对重组菌株发酵的影响见图 3。如图 3a,酵母粉 0810 最有利于菌的生长,玉米浆组菌浓度最低,低于最高组的 30% 左右,且有文献报道称玉米浆一般含 10% 左右的乳酸,且玉米浆的利用会促进大肠杆菌对乙酸的积累^[16],可能都会对菌的生长有一定抑制作用。但是由 L-色氨酸的合成来看,图 3a 中玉米浆氮源组的 L-色氨酸产量最高达到了

1223 mg/L,其次是混合蛋白、酵母粉 0810。根据单位菌体产量的统计结果可知,玉米浆组的单位菌体产量最高达到了 292 mg/OD,远高于混合蛋白组的 260 mg/OD,比其他氮源组(131~166 mg/OD)相比提升了 76% 以上。后续选择玉米浆和酵母粉 0810 进行显著性因素分析试验。

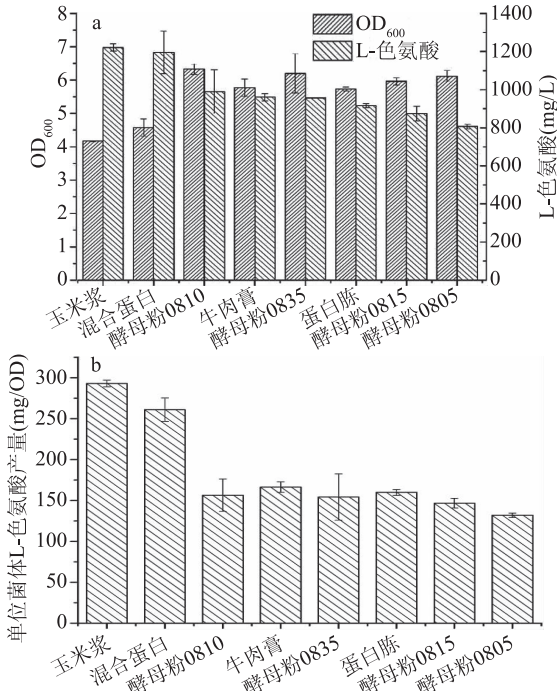


图3 不同有机氮源对 L-色氨酸发酵的影响
Fig.3 Effects of different organic nitrogen sources on L-tryptophan fermentation

2.2 PB 实验结果与分析

以单位菌体 L-色氨酸产量和 L-色氨酸产量为评价指标,12 组矩阵因素水平组合结果见表 3。以单位菌体 L-色氨酸产量(表 4)和 L-色氨酸产量(表 5)为响应值的方差分析结果显示,乙酸铵和酵母粉对单位菌体 L-色氨酸生物合成影响极显著 ($P < 0.01$),而对于 L-色氨酸产量的影响,表 5 的模型不

表3 Plackett-Burman 试验设计及结果
Table 3 Design and results of Plackett-Burman experiments

实验号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	单位菌体 L-色氨酸 产量 (mg/OD)	L-色氨酸 (mg/L)
1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	256.48 ± 3.42	1369.62 ± 50.70
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	276.61 ± 13.47	1290.38 ± 96.06
3	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	225.17 ± 20.93	1262.08 ± 93.39
4	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	228.84 ± 14.19	1192.26 ± 26.28
5	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	250.42 ± 4.62	1334.72 ± 60.04
6	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	147.72 ± 6.26	1116.79 ± 64.04
7	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	175.28 ± 3.07	1236.60 ± 9.34
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	193.55 ± 7.60	1342.26 ± 78.72
9	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	144.63 ± 8.63	1029.06 ± 17.34
10	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	148.87 ± 1.46	1030.94 ± 12.01
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	217.90 ± 8.78	1096.04 ± 13.34
12	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	173.16 ± 4.79	1128.11 ± 77.71

表4 单位菌体 L-色氨酸产量的 Plackett-Burman 设计方差分析

Table 4 Results of Plackett-Burman design ANOVA analysis of the production of L-tryptophan in per unit cell

方差分析	回归系数	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型		22752.92	8	2844.11	28.82	0.0093	**
A	0.70	5.84	1	5.84	0.06	0.8235	
B	17.70	3758.42	1	3758.42	38.09	0.0086	**
C	-0.22	0.60	1	0.60	6.11×10^{-3}	0.9426	
D	-39.35	18581.86	1	18581.86	188.30	0.0008	**
E	-2.63	82.74	1	82.74	0.84	0.4274	
F	1.80	38.99	1	38.99	0.40	0.5742	
G	-2.30	63.71	1	63.71	0.65	0.4805	
H	4.29	220.76	1	220.76	2.24	0.2316	
残差		296.05	3	98.68			
矫正总和		23048.97	11				

注：* 表示显著 ($P < 0.05$)；** 表示极显著 ($P < 0.01$)；表 5、表 7 同。

表5 L-色氨酸产量的 Plackett-Burman 设计方差分析

Table 5 Results of Plackett-Burman design ANOVA analysis of the production of L-tryptophan

方差分析	回归系数	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型		1.43×10^5	8	17860.45	2.92	0.2042	
A	-2.44	71.27	1	71.27	0.01	0.9208	
B	81.21	79142.12	1	79142.12	12.95	0.0368	*
C	40.02	19215.10	1	19215.10	3.15	0.1743	
D	-55.11	36445.43	1	36445.43	5.97	0.0923	
E	0.55	3.63	1	3.63	5.95×10^{-4}	0.9821	
F	15.33	2820.18	1	2820.18	0.46	0.5456	
G	-7.00	587.47	1	587.47	0.10	0.7768	
H	19.58	4598.39	1	4598.39	0.75	0.4495	
残差		18328.81	3	6109.60			
矫正总和		1.61×10^5	11				

显著,但在一定程度上可反映出,相对于 PB 中的其他因素而言,除乙酸铵外,酵母粉 0810 是影响最大的一个因子,其次是玉米浆,且由以上单因素实验中不同有机氮源对 L-色氨酸合成影响可知,玉米浆对 L-色氨酸产量的提升也有一定正向调节作用,试验选择乙酸铵、酵母粉 0810、玉米浆进行后续 CCD 考察。本实验中最高发酵单位达到了 1369 mg/L,最高单位菌体 L-色氨酸产量达到了 276 mg/OD,可见这些组分的交互搭配对于提升 L-色氨酸产量和产率是至关重要的。

2.3 响应面实验结果与分析

应用响应面回归分析对结果进行优化,共进行了 20 组试验,优化设计结果见表 6,对实验数据进行多元二次回归拟合,得到回归方程: $R = 1247.21 - 36.01X_1 + 90.04X_2 - 15.48X_3 + 19.71X_1X_2 + 14.42X_1X_3 - 8.89X_2X_3 + 4.66X_1^2 - 4.35X_2^2 + 6.87X_3^2$,各因素方差分析结果见表 7,该模型模拟的回归方程显著 ($P = 0.0018 < 0.05$),说明方程对试验拟合较好。模型失拟项 ($P = 0.5792 > 0.05$) 不显著,说明该模型能很好地对响应值进行分析和预测。决定系数 $R^2 = 0.8752$,说明 87.52% 色氨酸含量变化可由此方程解释,较好反映了各因素与响应值之间的真实关系。校正决定系数 $R^2_{adj} = 0.7628$,表明响应值的变化有 76.28% 来源于所选自变量的变化。CV(R 的变异系数)反映实验

表6 Central-Composite Design 试验设计及结果

Table 6 Design and results of central-composite design experiments

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	L-色氨酸(mg/L)
1	-1	1	-1	1422.12 ± 38.07
2	1.682	0	0	1209.62 ± 4.08
3	0	0	0	1170.19 ± 32.64
4	1	1	1	1294.23 ± 28.56
5	1	-1	1	1087.50 ± 8.16
6	0	1.682	0	1392.31 ± 69.35
7	0	0	0	1226.92 ± 85.67
8	0	0	0	1251.92 ± 80.23
9	0	0	1.682	1295.19 ± 16.32
10	0	-1.682	0	1086.54 ± 42.15
11	1	1	-1	1350.00 ± 42.15
12	1	-1	-1	1120.19 ± 81.59
13	0	0	0	1244.23 ± 34.00
14	-1	-1	-1	1258.65 ± 13.60
15	-1	-1	1	1180.77 ± 69.35
16	0	0	-1.682	1247.12 ± 35.36
17	-1	1	1	1296.15 ± 39.43
18	-1.682	0	0	1320.19 ± 108.79
19	0	0	0	1295.19 ± 40.79
20	0	0	0	1293.27 ± 19.04

表7 Central-Composite Design 设计方差分析
Table 7 Results of Central-Composite Design ANOVA analysis

方差分析	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.38 × 10 ⁵	9	15381.54	7.79	0.0018	**
X ₁	17705.76	1	17705.76	8.97	0.0135	*
X ₂	1.11 × 10 ⁵	1	1.11 × 10 ⁵	56.07	<0.0001	**
X ₃	3273.96	1	3273.96	1.66	0.2268	
X ₁ X ₂	3108.36	1	3108.36	1.57	0.2381	
X ₁ X ₃	1664.20	1	1664.20	0.84	0.3802	
X ₂ X ₃	632.86	1	632.86	0.32	0.5838	
X ₁ ²	312.87	1	312.87	0.16	0.6989	
X ₂ ²	272.62	1	272.62	0.14	0.7180	
X ₃ ²	679.99	1	679.99	0.34	0.5703	
残差	19744.04	10	1974.40			
失拟项	8946.30	5	1789.26	0.83	0.5792	
纯误差	10797.74	5	2159.55			
总离差	1.58 × 10 ⁵	19				

表8 优化前后培养基摇瓶发酵参数
Table 8 Fermentation parameters of original and optimized medium in shake flasks

	36 h-pH	残糖 (g/L)	OD ₆₀₀	L-色氨酸产量 (mg/L)	单位菌体 L-色氨酸产量 (mg/OD)
原始培养基	6.47	0.03	6.63	746.23	112.55
优化培养基	7.26	0.04	5.34	1451.30	271.61

表9 不同培养时间种子液培养结果参数对比
Table 9 Comparison of parameters for different culture time of seeds

种龄(h)	OD ₆₀₀	残糖(g/L)	pH	乙酸(g/L)
10	0.25 ± 0.02	21.40 ± 0.28	6.70 ± 0.001	0.75 ± 0.04
12	3.37 ± 0.47	20.00 ± 0.41	6.44 ± 0.22	1.20 ± 0.13
14	6.75 ± 0.01	15.50 ± 0.42	5.79 ± 0.05	3.66 ± 0.15

的精确度,CV 值越低,实验的可靠性越高,本实验中 CV = 3.55% ,较低,说明实验操作可行^[17]。从 F 值的大小可以推断得出试验选取的三个因素对色氨酸产量的影响排序为乙酸铵 > 酵母粉 0810 > 玉米浆。由于 CCD 试验选取的因素是三种氮源,它们之间各种成分配比的内部作用机制较复杂,对实验结果影响的交互作用关系并不显著。

2.4 摇瓶发酵验证

各成分最优配比为酵母粉 0810 0.5 g/L、乙酸铵 3.9 g/L、玉米浆 3 g/L 时,对应的响应值最大,L-色氨酸预测值可达 1432 mg/L。

为了验证模型的准确性,在预测最佳培养基配方条件下进行大肠杆菌发酵产 L-色氨酸重复实验 3 次,优化后的培养基摇瓶发酵验证结果见表 8,优化培养基发酵 L-色氨酸产量达到了 1451.30 mg/L,与模型预测的值非常接近。与优化前的培养基发酵色氨酸产量(746.23 mg/L)相比提高了 94.5%。但是优化后的培养基发酵菌体浓度 OD₆₀₀ 较低,说明此培养基中的某些成分对菌的生长有一定抑制作用,但是单位菌体 L-色氨酸产量提高了 140%,说明优化培养基是有利于产物合成的。综合 PB 和 CCD 实验结果,优化后培养基组合:0.12% 硫酸铵、0.7% 磷酸二

氢钾、0.15% 一水柠檬酸、0.28% 七水硫酸镁、0.05% 酵母粉 0810、0.39% 乙酸铵、0.3% 玉米浆。

2.5 不同种龄对发酵的影响

不同种龄种子的培养结果见表 9,随着培养时间的延长,菌体浓度 OD₆₀₀ 逐渐上升。10 h 后种子进入快速生长期,培养 14 h 的种子液酸味较重,乙酸含量检测结果显示种子液已经开始积累代谢副产物乙酸,这可能是菌体浓度高的情况下氧限制引起的^[18]。

不同种龄的种子接种发酵摇瓶培养结果见图 4。如图 4b 原始培养基中,随着种龄增长,单位菌体 L-色氨酸产量略有提高,菌体浓度略有上升(图 4a),所以 L-色氨酸产量也逐步上升(图 4c)。优化培养基中 12 h 种龄的种子对应的发酵液菌体浓度最高(图 4a),L-色氨酸的产量也高于 10 和 14 h 种龄的种子对应的发酵产量,达到了 1293 mg/L(图 4c),对应的单位菌体 L-色氨酸产量达到了 238 mg/OD(图 4b)。14 h 种龄的种子对应的发酵无论是菌体浓度,还是 L-色氨酸产量都明显低于其他种龄对应的状态。发酵摇瓶的菌体浓度比 12 h 种龄的对应的发酵少了 35% 以上,OD₆₀₀ 只有 3.3 左右,这可能与种子培养时间过长菌体活力下降有关,同时接入发酵瓶后乙酸等副产物可能会抑制了菌的生长^[19]。

相对于原始培养基,优化后培养基 L-色氨酸产量有较大提升,但是菌浓略有下降。不同种龄对优化培养基发酵结果影响很大,种龄 12 h 发酵 L-色氨酸产量最高,菌体生长代谢较旺盛,综合考量选择 12 h 种龄接入发酵更有利于菌体合成。

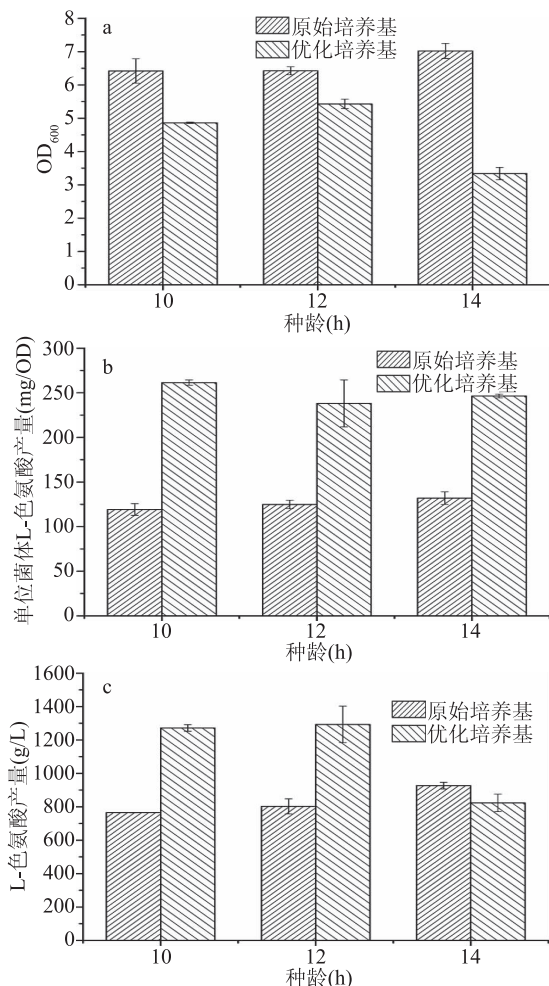


图4 种龄对发酵的影响

Fig.4 Effects of seed age on fermentation

2.6 5 L 发酵罐补料分批培养

将优化培养基与原始培养基在 5 L 罐上进行补料分批培养的放大对比验证,结果见图 5。各发酵参数对比见表 10。

由图 5a 可知,使用优化后培养基在 5 L 罐上发酵菌体的延滞期较长,其整体生长进度延滞了 24 h 左右。优化后培养基菌体的延滞期较长主要与培养基成分乙酸铵有关,乙酸对菌体的生长有抑制作用^[14],由于前期高浓度乙酸的存在使得延滞期较长。菌体在缓慢利用完基础培养基中葡萄糖后,会启动乙醛酸支路^[20],开始消耗发酵液中的乙酸,且大肠杆菌在外源乙酸的存在下会倾向于避免自身乙酸的生成,对发酵后期的产物合成速率较高有一定帮助^[21-22]。

将成分“乙酸铵”改成中后期流加控制,待菌体浓度增长到一定程度,采用间歇流加方式将乙酸铵补入发酵液,由图 5c 可知,流加乙酸铵组发酵液中乙酸含量在 36 h 后逐渐上升,菌体的生长速率开始减缓(图 5a),与优化培养基组相比,采用流加的方

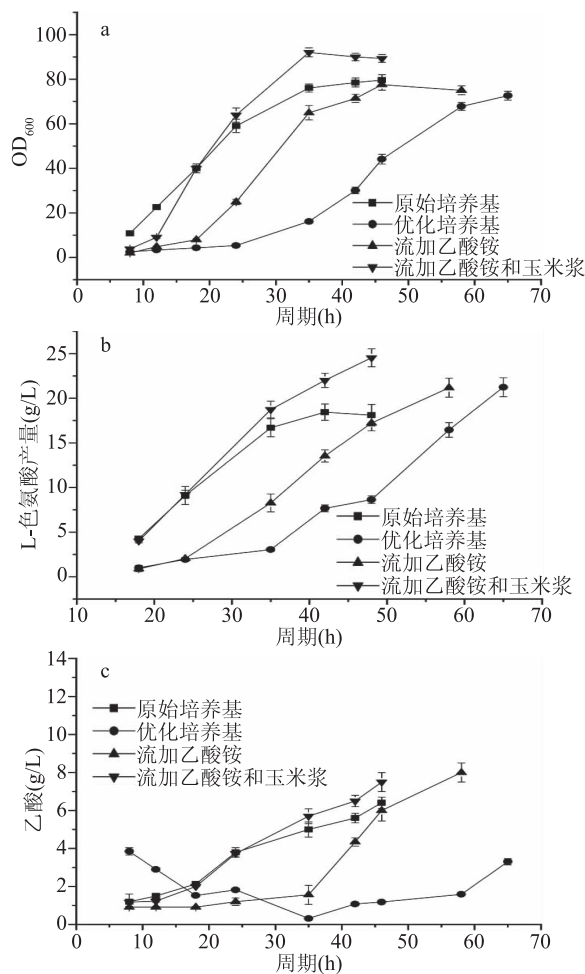


图5 初始培养基与优化培养基 5 L 罐发酵参数对比

Fig.5 Comparison of fermentation parameters between initial medium and optimized medium in 5 L tank

式使菌的生长延滞期缩短,L-色氨酸产量随着菌体浓度的快速升高有较大提高(图 5b),发酵结束时,流加乙酸铵组 L-色氨酸产量比原始培养基组提高了 17% 左右,且在发酵后期 L-色氨酸合成速率和单位菌体 L-色氨酸产量明显高于原始培养基组,单位菌体的 L-色氨酸产量达到了 282 mg/OD。说明乙酸铵的合理补加是有利于 L-色氨酸的合成,且采用乙酸铵流加的方式大大改善了高浓度乙酸铵造成的菌体延滞期长的问题。

菌的延滞期相对于对照(原始培养基组)较长,除了与原始培养基中乙酸含量高有关,与有机氮源玉米浆的量也有很大的关系,单因素实验结果显示玉米浆添加组菌体生长量最低,说明玉米浆对前期菌体的生长的确是有抑制作用的,因此实施乙酸铵和玉米浆单独流加工艺,发酵培养 24 h 后开始流加玉米浆,发酵 36 h 时开始流加乙酸铵。表 10 结果表明,这种方法能够大大缩短菌体生长的延滞期。在发酵中后期,流加乙酸铵和玉米浆组依然能够维持菌体浓度较高的比生长速率,由色氨酸产量曲线变化斜率可知,L-色氨酸合成速率也明显提升,玉米浆和乙酸铵相结合的氮源补加方式使得发酵 L-色氨酸产量提高了 35%,糖酸转化率最高达到了 14.25%,比原始培养基组(11.26%)提高了 27%。说明采用

表 10 初始培养基与优化培养基 5 L 罐发酵参数
Table 10 Fermentation parameters of initial medium and optimized medium in 5 L tank

批号	周期 (h)	耗糖量 (g)	糖酸转化率 (%)	25% 氨水 消耗量(g)	L-色氨酸 产量(g/L)	L-色氨酸总 产量(g)	单位菌体 L-色氨酸 产量(m/OD)
原始培养基	48	541.97	11.26	213	18.10	61.02	227
优化培养基	65	483.60	13.48	170	21.23	65.20	292
流加乙酸铵	60	431.54	12.47	153	21.18	53.82	282
流加乙酸铵和玉米浆	48	619.97	14.25	211	24.53	88.37	272

这种分批补料的方式可以进一步优化发酵过程,提升了发酵效能。

3 结论

本实验利用一系列统计学实验设计方法优化了大肠杆菌产 L-色氨酸原初始发酵培养基组合成分,以及对移种时间进行选择,从而提高了 L-色氨酸的合成量,并最终在 5 L 发酵罐上进行验证,针对在罐上放大出现的延滞期长的问题,本文提出了一种新型的补料优化模式,实施了乙酸铵和玉米浆流加控制工艺。这种方法能够大大缩短菌体生长的延滞期,在发酵中后期,依然能够维持较高的比生长速率,色氨酸合成速率也明显提升,玉米浆和乙酸铵相结合的氮源补加方式能促使 L-色氨酸产量提高 35%,糖酸转化率最高达到 14.25%,比原始培养基组提高了 27%,优化效果显著,为菌体合成 L-色氨酸培养基开发、补料工艺研究提供一定参考。本文使用低成本的有机氮源玉米浆部分代替酵母粉,以及发现乙酸铵对大肠杆菌发酵产 L-色氨酸产量提升的特殊作用,目前这只在利用微生物转化法生产 L-色氨酸中简单提及,这对进一步提升 L-色氨酸产量的探索具有一定研究意义,未来可以从基因分子层面、胞内代谢流变化角度进一步研究以解释这种调控作用,后续应进一步探索补氮条件,对精准流加稀释后的有机氮源如玉米浆等采取进一步优化,可能会有新的成效,为实现更精确的补氮控制模式奠定基础。

参考文献

[1] Chen X, Jin Z W, Li X, et al. Effect of yeast extract on L-tryptophan production in batch culture of *Escherichia coli* [J]. Advanced Materials Research, 2013, 807: 2009-2013.
[2] 左祖楨. 大肠杆菌色氨酸高产菌株的构建[D]. 福州: 福建师范大学, 2010.
[3] 苏毅. 发酵法生产 L-色氨酸工艺优化[D]. 天津: 天津科技大学, 2014.
[4] 陈荣庆, 刘伟, 皮雄娥, 等. L-色氨酸的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(14): 4438-4440.
[5] 李阳. 直接发酵法生产 L-色氨酸的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2009.
[6] 张新武, 杨晓明, 廉娜娜, 等. L-色氨酸营养缺陷型高产菌株的发酵工艺研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(12): 4056-4062.
[7] 闻亚红, 刘杰, 黄建民. 微生物发酵法生产 L-色氨酸的研究进展[J]. 科技风, 2014(2): 10-11.
[8] Berry A. Improving production of aromatic compounds in

Escherichia coli by metabolic engineering [J]. Trends in Biotechnology, 1996, 14(7): 250-256.
[9] Jing K, Tang Y, Yao C, et al. Overproduction of L-tryptophan via simultaneous feed of glucose and anthranilic acid from recombinant *E. coli* W3110: Kinetic modelling and process scale-up: Control and scale-up of tryptophan production [J]. Biotechnology & Bioengineering, 2017, 115(7): 1-11.
[10] Zhang Q, Sun J, Wang Z, et al. Kinetic analysis of curdlan production by *Alcaligenes faecalis* with maltose, sucrose, glucose and fructose as carbon sources [J]. Bioresource Technology, 2018, 259: 319-324.
[11] 王健, 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): 53-53.
[12] 张琴. 粪产碱杆菌在不同碳源下发酵生产凝胶多糖的动力学研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2018.
[13] 王东阳, 蔡传康, 闫汝东, 等. 正交试验优化 L-色氨酸发酵培养基的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 1910-1911.
[14] 程立坤, 黄静, 秦永锋, 等. 代谢副产物乙酸对 L-色氨酸发酵的影响[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 166-173.
[15] Xu Q, Fang B, Ning C, et al. Removing the by-products acetic acid and NH_4^+ from the l-tryptophan broth by vacuum thin film evaporation during l-tryptophan production [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2018, 33: 46-51.
[16] 黄静, 史建明, 霍文婷, 等. 氮源对 L-色氨酸发酵的影响[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(5): 21-25.
[17] 王昊鹏, 吴黎明, 赵柳微, 等. 烟曲霉素发酵条件的初步优化及其扩大培养[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(3): 14-19.
[18] Zhao C, Cheng L, Xu Q, et al. Improvement of the production of L-tryptophan in *Escherichia coli* by application of a dissolved oxygen stage control strategy [J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(2): 843-854.
[19] Cheng L K, Wang J, Xu Q Y, et al. Strategy for pH control and pH feedback-controlled substrate feeding for high-level production of L-tryptophan by *Escherichia coli* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2013, 29(5): 883-890.
[20] Walsh K, Jr K D. Branch point control by the phosphorylation state of isocitrate dehydrogenase: A quantitative examination of fluxes during a regulatory transition [J]. Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(14): 8430-8437.
[21] Polen T, Rittmann D, Wendisch V F, et al. DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1759-74.
[22] 张艳军, 张萍华, 周灿, 等. 不同浓度外源乙酸钠对耐乙酸大肠埃希菌 DA19 代谢和关键酶酶活的影响[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(5): 15-20.