

L-色氨酸中试生产研究

王东阳^{1,2}, 蔡传康², 闫汝东², 冯志彬², 张 华²

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222;
2. 济宁高新区协合生物工程研究所, 山东 济宁 272000)

摘要: 为提高 L-色氨酸发酵水平, 在 100L 发酵罐上考察了不同操作条件对大肠杆菌发酵生产 L-色氨酸的影响。结果表明不同操作条件对 L-色氨酸发酵有显著影响。残糖浓度、补料方式、柠檬酸钠添加质量分数、接种量及溶氧量分别控制在 5 g/L、溶氧控制脉冲补料、2 g/L、5% 及 10% ~ 15% 时, 发酵效果最好, 在 1 m³ 罐上进行验证实验, L-色氨酸产量稳定在 40 g/L 左右。

关键词: L-色氨酸; 柠檬酸钠; 溶氧; 补料分批发酵

中图分类号: TQ922

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2011)03-0073-04

Pilot-scale study on L-tryptophan fermentation

WANG Dong-yang^{1,2}, CAI Chuan-kang², YAN Ru-dong², FENG Zhi-bin², ZHANG Hua²

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China;

2. Jining Xiehe Institute of Biotechnology, Jining 272000, China)

Abstract: In order to enhance the level of L-tryptophan fermentation, the effects of operation conditions on L-tryptophan fed-batch fermentation by *E. coli* TRJH0709 in a 100L stirred fermenter are investigated. The results show that the operation conditions have significant effects on L-tryptophan fermentation. The optimal production of L-tryptophan is obtained when residual sugar mass concentration is 5 g/L, DO-control pulse fed-batch is adopted, sodium citrate mass concentration is 2 g/L, inoculum size is 5% and DO content is 10% - 15%. Using a 1 m³ stirred fermenter to verify these experiment results, under the optimal condition, L-tryptophan production is stabilized at 40 g/L.

Key words: L-tryptophan; sodium citrate; dissolved oxygen; fed-batch fermentation

色氨酸是人体内的必需氨基酸之一, 还是血清素的前体, 对人和动物的生长发育、新陈代谢起重要的作用, 广泛应用于医药、食品和饲料行业, 其工业化生产方法越来越为研究人员所重视^[1]。早期的 L-色氨酸生产方法主要依靠化学合成和蛋白质水解, 但这些方法由于材料来源有限、周期长、工艺复杂、杂质多等缺点在 20 世纪 90 年代逐渐被淘汰, 随着对微生物法生产色氨酸的研究深入及基因工程的介入, 微生物法已成为目前 L-色氨酸生产的主要方法^[2-5]。目前, 国内 L-色氨酸生产工艺研究开展较晚, 产率较低, 限制了 L-色氨酸的工业化生产, 本文中采用大肠杆菌的基因工程菌为研究材料, 在合作单位研究的基础上对 L-色氨酸发酵的一些关键控制点进行优化, 并采用 1 m³ 发酵罐进行中试放大研究, 确定了 L-色氨酸的最佳生产工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种 TRJH0709, 天津科技大学代谢控制发酵研究室提供。

种子培养基(质量浓度): 葡萄糖 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 10 g/L, 柠檬酸钠 0.5 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ 5 g/L, FeSO₄·7H₂O 15 mg/L, V_{B1} 100 μg/L, 四环素 25 mg/L, pH 7.0 ~ 7.2。

发酵培养基(质量浓度): 葡萄糖 50 g/L, 酵母浸粉 1 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄ 5 g/L, 柠檬酸钠 2 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.1 g/L, (NH₄)₂SO₄ 4 g/L, pH 7.0 ~ 7.2。

1.2 培养方法

摇瓶种子培养: 将一支生长良好的活化斜面菌苔转入装有 400 mL 种子培养基的 5 L 三角瓶中, 9 层纱布封口, 置巡回式摇床(200 r/min)上, 32℃ 振荡培养至对数生长中后期。

种子罐培养: 将摇瓶种子按 2% 接种量接入种子罐, 初始转速为 180 r/min, 温度为 32℃, 自动流加氨水控制 pH 在 7.0, 培养至对数生长中后期。

发酵罐培养: 按一定接种量将种子罐中培养成熟的种子接入发酵罐(100 L 或 1 m³ 规格), 初始转速为 120 r/min, 温度为 32℃, 自动流加液氨控制 pH 在 7.0, 流加 800 g/L 的葡萄糖控制残糖质量浓度在

10 g/L。

1.3 分析方法

菌体干重:10 mL 发酵液于 10 000 r/min 下离心 20 min,洗涤后将菌体 105℃ 烘干至恒重,分析天平称重^[6]。

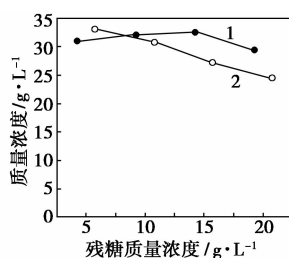
还原糖黏度:用生物传感器 SBA-40C 测定。

L-色氨酸含量:采用高效液相色谱分析系统测定。色谱分离条件:Agilent C18(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm),流动相 $V(0.03\% \text{ KH}_2\text{PO}_4 \text{ 溶液}):V(\text{甲醇})=90:10$,流速 1 mL/min,检测波长 278 nm^[6]。

2 结果与讨论

2.1 残糖浓度对 *L*-色氨酸发酵的影响

发酵培养基初糖质量浓度控制为 50 g/L,在葡萄糖质量浓度降至 20、15、10 g/L 及 5 g/L 时流加质量浓度 800 g/L 葡萄糖液并维持相应浓度,在 100 L 发酵罐上进行补料分批发酵,考察残糖浓度对 *L*-色氨酸发酵的影响,结果如图 1 所示。



1—生物量;2—*L*-色氨酸

图 1 残糖浓度对 *L*-色氨酸发酵的影响

由图 1 可知,残糖质量浓度维持在 10~15 g/L 时生物量最大,20 g/L 时生物量最小,这说明残糖浓度维持在 10~15 g/L 时有利于菌体生长,高于此浓度菌体生长受到抑制,低于此浓度菌体处于半饥饿状态,生长受限;*L*-色氨酸产量随残糖浓度的降低而递增,说明低残糖浓度有利于 *L*-色氨酸的合成,这主要是因为 *L*-色氨酸的生产菌为大肠杆菌构建的基因工程菌,对葡萄糖浓度较为敏感,当葡萄糖浓度略偏高时(10~15 g/L),虽然有利于菌体生长,但会在发酵液中积累乙酸,影响质粒的稳定性,增加丢失质粒菌株所占比率^[6],菌体量高但 *L*-色氨酸产量偏低,继续提高葡萄糖质量浓度(>20 g/L),菌体生长也收抑制,进一步降低了 *L*-色氨酸的产量,故应选择 5 g/L 为 *L*-色氨酸发酵控制的残糖质量浓度。

2.2 补料方式对 *L*-色氨酸发酵的影响

维持残糖质量浓度为 5 g/L,采用 A、B、C 及 D

4 种方式补料,在 100 L 发酵罐上进行补料分批发酵,考察补料方式对 *L*-色氨酸发酵的影响,结果如表 1 所示。

表 1 补料方式对 *L*-色氨酸发酵的影响

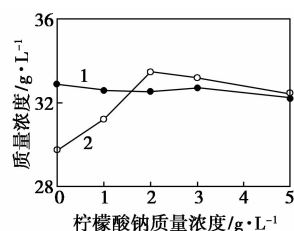
补料方式	生物量/g·L ⁻¹	<i>L</i> -色氨酸质量浓度/g·L ⁻¹
A	25.0	20.4
B	30.3	27.0
C	32.5	30.9
D	35.2	32.1

方式 A:发酵 10 h 左右当初糖质量浓度降至 5 g/L 时开始补料,每 5 h 补料一次;方式 B:发酵 10 h 左右当初糖质量浓度降至 5 g/L 时开始补料,每 2 h 补料一次;方式 C:发酵 10 h 左右当初糖质量浓度降至 5 g/L 时开始补料,每 1 h 补料一次;方式 D:溶氧控制的葡萄糖脉冲流加^[7]。

由表 1 可知,采用方式 D 补料效果最好,这主要是因为葡萄糖质量浓度 5 g/L 的情况下,菌体细胞处于亚饥饿状态,生长速率受限,当有葡萄糖补入时,生产菌的比摄糖速率增加,比摄氧速率也随之增加,溶氧值相应降低,补料过后,随葡萄糖浓度的降低,生产菌的比摄糖率下降,溶氧值升高,根据溶氧值变化进行补料可以保持在整个发酵过程中残糖质量浓度恒定处于较低水平(5 g/L 左右),满足菌体生长及产酸需要又不过量,有效防止乙酸等副产物积累造成的代谢异常,其他 3 种方式的补料,葡萄糖浓度波动较大,葡萄糖刚补入时发酵液糖浓度暂时性过高,如方式 A 补料后残糖质量浓度达到 30 g/L 以上,下一个补料周期开始前浓度过低,甚至出现葡萄糖饥饿现象,影响了 *L*-色氨酸的合成。

2.3 柠檬酸钠对 *L*-色氨酸发酵的影响

连续培养时柠檬酸钠和葡萄糖联合代谢会阻遏有机酸副产物的生成,抑制丙酮酸激酶的活性,减弱糖酵解途径^[8],有利于 *L*-色氨酸的合成,在发酵培养基中分别加入质量浓度 0、1、2、3 g/L 及 5 g/L 的柠檬酸钠,在 100 L 发酵罐上进行补料分批发酵,



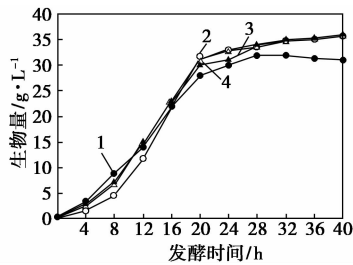
1—生物量;2—*L*-色氨酸

图 2 柠檬酸钠对 *L*-色氨酸发酵的影响

考察柠檬酸钠对 *L*-色氨酸发酵的影响,结果表明(图2)柠檬酸钠对菌体生物量的合成影响不明显,但对 *L*-色氨酸的合成有一定的促进作用,当柠檬酸钠添加量为 2 g/L 时, *L*-色氨酸产量最高。

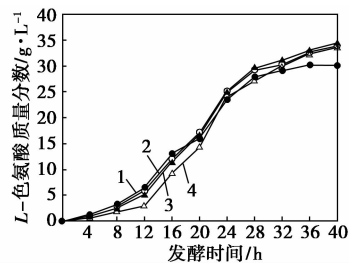
2.4 接种量对 *L*-色氨酸发酵的影响

接种量是种子质量的重要指标之一,对产物合成有较大影响。本实验分别采用 2%、5%、10% 及 15% (质量分数,下同) 的种量接种在 100 L 发酵罐上进行补料分批发酵,结果如图 3、图 4 所示。



接种量质量分数/%:1—15;2—5;3—10;4—2

图3 接种量对生物量的影响



接种量质量分数/%:1—15;2—10;3—5;4—2

图4 接种量对 *L*-色氨酸产量的影响

由图 3 可知,在菌体对数生长期的前期(2 ~ 8 h),接种量与菌体生成量成正比,15% 种量菌体增殖速度远高于 2% 接种量,且较早进入对数生长期,结合图 4, *L*-色氨酸的合成时间也早于其他接种量,这说明较大的接种量可以带入较多的水解酶类,有利于基质的利用,提前进入产物合成期;进入稳定期后,2% ~ 10% 的种量对应的生物量基本一致,15% 的种量生物量最低,在 28 h 甚至提前进入菌体衰亡期, *L*-色氨酸合成基本终止,这主要是较大的种量造成菌种前期生长过快,环境条件恶化,特别是溶氧供需矛盾的恶化造成菌体提前衰老自溶,且前期过快的生长速度容易造成菌种质粒的分离性丢失,发酵 40 h 时 5% 接种量 *L*-色氨酸产量最高,质量浓度达到 34.4 g/L,其次分别为 10% 种量、2% 种量和 15% 种量,其中 10% 种量 *L*-色氨酸产量和 5% 产量接近,从节约成本和产量最大化的角度考虑,选择 5% 种量为 *L*-色氨酸发酵的最佳接种量。

2.5 溶氧对 *L*-色氨酸发酵的影响

在 *L*-色氨酸发酵过程中分别维持 5%、10%、20% 及 30% 的溶氧,发酵结束后测定 *L*-色氨酸产量及菌体生物量,结果如图 5 所示。

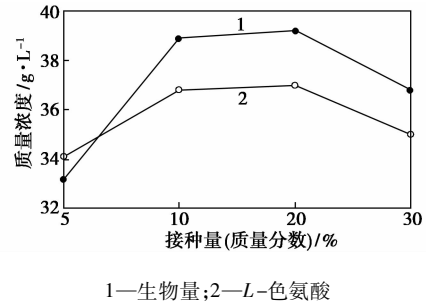


图5 接种量对 *L*-色氨酸发酵的影响

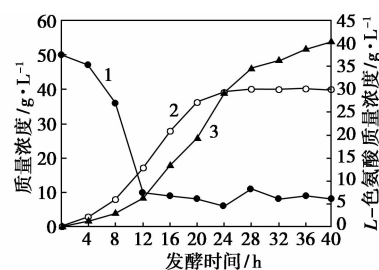
由图 5 可知,10% ~ 20% 的溶氧 *L*-色氨酸产量及生物量均较高,较低或较高的溶氧均不利于 *L*-色氨酸的合成,这主要是因为 *L*-色氨酸生产菌为好氧菌,较低的溶氧不利于菌体生长进而影响产物合成,而且在低溶氧条件下容易积累有机酸,影响质粒的稳定性;但过高的溶氧容易形成新生氧、超氧化物基、过氧化物基或羟基自由基,破坏细胞组分和带巯基酶的活性^[9],并且过高的溶氧必然伴随高速搅拌及通风带来的剪切力对菌体细胞的伤害,影响 *L*-色氨酸的合成。故 10% ~ 20% 为 *L*-色氨酸发酵的溶氧范围。

2.6 验证实验

采用优化实验结果,在 1 m³ 罐上进行 4 批发酵实验,结果如表 2 所示,发酵周期控制在 40 h 内, *L*-色氨酸质量浓度稳定在 40 g/L 左右,选取第 3 批发酵实验数据绘制过程曲线,结果如图 6 所示,3 h 后

表 2 1 m³ 发酵罐验证实验

发酵批次	生物量/g·L ⁻¹	<i>L</i> -色氨酸质量浓度/g·L ⁻¹	发酵周期/h
1	36.0	38.9	38
2	38.3	40.2	40
3	39.7	40.5	40
4	38.0	39.4	39



1—葡萄糖;2—生物量;3—*L*-色氨酸

图6 发酵过程曲线

菌体进入对数生长期,菌体迅速增殖,葡萄糖消耗速度加快,*L*-色氨酸在 8 h 后以较高的比生产率合成,28 h 后合成速度放慢,40 h 左右达到最大产量,继续培养有退酸现象,故以 40 h 作为发酵终点。

3 结语

碳源是发酵培养基的重要组分,维持其浓度对发酵效果影响极大,本研究首先确定了发酵过程中碳源的维持浓度,并进一步探讨了碳源补料方式对发酵的影响,发现采用溶氧控制的补料方式,*L*-色氨酸产量最高,这也说明了低糖浓度对基因工程菌质粒稳定性的重要意义;由于柠檬酸钠和葡萄糖联合代谢会阻遏有机酸副产物的生成,抑制丙酮酸激酶的活性减弱糖酵解途径,强化 HMP 途径,有利于 *L*-色氨酸的合成,故在试验中探讨了柠檬酸钠浓度对 *L*-色氨酸发酵的影响,发现质量浓度 2 g/L 的柠檬酸钠有利于 *L*-色氨酸合成,这也和合作单位前期的研究工作一致;接种量也是微生物发酵控制的重要指标,直接影响发酵效果和生产成本,试验中发现 5% ~ 10% 的接种量发酵效果最高,本着控制生产成本的原则,选择 5% 种量为发酵接种量;基因工程菌一般对氧气需求较高,在低溶氧条件下容易产生乙酸等副产物,最后研究了溶氧对 *L*-色氨酸发酵的影响,确定发酵过程中维持 10% ~ 15% 的溶氧即可满

足 *L*-色氨酸生产菌的需要;采用上述优化条件在容积 11 m³ 罐上进行 4 批发酵实验,*L*-色氨酸质量浓度基本稳定在 40 g/L 左右,发酵周期控制在 40 h 内,取得较好的实验效果,为后面的工业化生产提供了参考依据。

参考文献

- [1] 赵春光,程立坤,徐庆阳,等.微生物法生产 *L*-色氨酸的研究进展[J].发酵科技通讯,2008,37(4):34-36.
- [2] 杨会琴.*L*-色氨酸生物技术研究进展[J].食品科学,2007,28(7):630-632.
- [3] 王健,张蓓,张克旭.*L*-色氨酸产生菌的途经分析[J].无锡轻工大学学报,2003,22(5):15-18.
- [4] 陈俊峰,苏丽娜,王璋,等.从土壤中分离 *L*-色氨酸生产菌株及其高产诱变选育的研究[J].食品与发酵工业,2007,33(7):37-41.
- [5] Charles Yanofsky. Using studies on tryptophan metabolism to answer basic biological questions[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 13:10858-10878.
- [6] 赵春光,谢希贤,程立坤,等.温度对大肠杆菌 *L*-色氨酸发酵过程的影响[J].生物技术通讯,2009,20(4):534-537.
- [7] 郑志永,姚善涇.应用溶氧反馈控制高密度培养大肠杆菌过程中乙酸的产生[J].高校化学工程学报,2006,20(2):233-238.
- [8] 刘新星,陈双喜,储炬.柠檬酸钠对枯草杆菌生长代谢及肌昔积累的影响[J].微生物学报,2004,44(5):627-630.
- [9] 储炬,李友荣.现代工业发酵调控学[M].北京:化学工业出版社,2002. ■

建材工业发展迎来重大转型期

建材行业作为涂料、塑料异型材、阻燃剂、保温材料、防水材料等一系列化工产品重要的应用领域,两者唇齿相依的关系正在日益深化,相互渗透、融合的范围也在快速延展。展望“十二五”,以节能环保等理念为主导的新型化学建材将大行其道,专家认为,化工行业必须顺应这一潮流,为绿色环保建材产业的发展提供支撑,同时在不断扩大的建材新需求、新领域中获得更大的施展空间。

2010年,建材工业销售产值(现价)为3.6万亿元,同比增长33.37%。其中,水泥制造业7475亿元,同比增长25.9%;玻璃及制品业为4972.73亿元,增长35.91%。总体来讲,在宏观经济向好趋势的带动下,尤其是2010年中央抓住当前农村建房快速增长和建筑材料供给充裕的时机,采取有效措施推动“建材下乡”,建材工业生产及主要产品产量较快增长,出口额超过金融危机暴发前水平,销售收入增幅较大,经济效益稳步提升。在各种利好因素的带动下,作为建材行业上游,化工行业内的纯碱、石膏块等传统产品搭上了建材行业这个高速扩张的快车。

迈入“十二五”,建材行业对上游化工产品的市场需求不仅体现在数量上,还将更加强调产品升级和多元化。目前,工业和信息化部已经明确了建材行业“十二五”规划的总体思路,建材行业将着力推进产品深加工,积极发展节能环保新型建材,支持企业以质量、品种等为重点,进行技术改造升级。工信部原材料司相关负责人表示,我国建材工业发展的重大转型期已经到来,具体体现在:从传统产业到新兴产业发展的转变、从分散发展到集中发展的转变、从材

料制造到制品制造转变、从高碳生产方式到低碳生产方式的转变、从低端制造到高端制造转变等。

有专家预测,“十二五”期间,水泥、平板玻璃、陶瓷、烧结墙体材料等建材基础原材料将难以获得更大的市场发展空间。相比之下,住房消费升级、建筑工业化的推进、新兴产业的发展将成为节能环保建材工业发展的新亮点。这一重要转变直接的影响是,上游化工产品将以更多的触角、更活跃的角色参与其中,既推动、也分享建材工业升级转变的进程。

涂料是建筑的外衣,据了解,2010年国内建筑涂料总产量是351.9万吨,占涂料总产量的36.4%。“十二五”期间,建筑涂料的应用将不再仅仅体现在简单的装饰防护上,而是会更加凸显出功能性。有业内人士认为,涂料生产商应从以下几个方面来提升我国建筑涂料的品质:一是提高建筑涂料的性能,二是增加建筑涂料的功能,三是涂料装饰艺术化,四是最为重要的降低VOC排放量。徐京生也认为,防火涂料、防水涂料、粉末涂料等新型特种涂料“十二五”期间将得到更大的市场空间。

塑料建材已经成为家庭时尚元素的风向标,今后塑料塑料将越来越受到消费者的青睐,可望成为新的消费热点和新的经济增长点。随着塑料建材的品种逐步系列化、配套化和标准化,以及环保节能的要求提高、推广应用的力度加大,各种塑料建材如塑料管、门窗、高分子防水材料、装饰装修材料、保温材料及其他塑料建材的需求将有较大幅度增加。(孔凡涛)