

基因工程菌发酵生产 *l*-苯丙氨酸工艺优化

范代娣, 原 龙, 米 钰, 李万华

(西北大学 化学工程学系, 陕西 西安 710069)

摘要:对重组 *l*-苯丙氨酸工程菌 *E. coli* HB101. 1 发酵过程中的营养物质消耗及产物 *l*-苯丙氨酸的积累进行实验分析。得出:*l*-苯丙氨酸在培养温度为 38.5℃, pH 为 7.0~7.5, 溶氧控制在 20%, 含糖量控制在 1.5%, 酪氨酸添加量为 1.0~1.2 g/L 时, 产酸量最大, 为工艺优化控制提供了有用的基础数据。

关键词:重组菌; *l*-苯丙氨酸; 发酵

中图分类号:Q815 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2002)01-0033-03

l-苯丙氨酸(*l*-phe)是人和动物体内不能合成的 8 种氨基酸之一, 人们称其为必须氨基酸。*l*-phe 在生物体内是转化成 *l*-酪氨酸的原料, 因而 *l*-phe 成为一些氨基酸输液和氨基酸饮膳所必须的成分。而且, *l*-phe 是合成药物麦角胺、抗生物质和维生素 B₆ 的重要原料。同时, *l*-phe 也是合成一些抗癌药物的中间体^[1]。在食品工业中, *l*-phe 最主要的用途是合成二肽甜味剂, 俗称蛋白糖。基于 *l*-phe 广泛的应用前景, 近年来 *l*-phe 成为氨基酸行业单品中产量增长最快的一种。目前, *l*-phe 的生产方法有酶法、发酵法等。直接发酵法具有可利用廉价原料直接生产 *l*-phe 的优点, 发酵法生产 *l*-phe, 国外报道产酸率为 2.8%, *l*-phe 在我国还未实现规模生产^[2]。本实验对构建的重组 *l*-phe 基因工程菌 *E. coli* HB101. 1 进行发酵实验, 研究了其发酵工艺条件及营养物质的流加对产物 *l*-phe 积累的影响。

1 实验材料与方法

1.1 发酵用菌株

基因重组工程菌 *E. coli* HB101. 1。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 蛋白胨 1%; 氯化钠 1%; 酵母粉 0.5%; 葡萄糖 2%; 调 pH=7.5; 抗菌素 Km(硫酸卡那霉素)。

1.2.2 发酵培养基 Na₂HPO₄ · 12H₂O 20 g/L; Na-citrate 6 g/L; Na-glutamate 0.4 g/L; 酪氨酸 0.6 g/L; 葡萄糖 20 g/L; Km 40 mg/L。

1.2.3 补料培养基 CaCl₂ · 2H₂O 0.6 g/L; 酪氨酸 500 mg/L; 葡萄糖 500 g/L; MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L; V_{B1} 500 mg/L; 氨水 28%。

1.3 培养方法

1.3.1 摇瓶培养 250 mL 锥形瓶内装 LB 培养基 25 mL, 接种菌种斜面后, 于旋转摇床上, 在 37℃ 培养 12 h。

1.3.2 深层培养 在 2 L 自控发酵罐(美国进口)中装入 1 L 发酵培养基。灭菌后接入 5% 的摇瓶种子。通气量为 1 000 L/L · min 时, 于 38.5℃ 下搅拌培养。搅拌转速根据溶氧(DO)调节; 使用 28% 的氨水调节 pH=7.0±0.2; 采用流加葡萄糖工艺补料, 补料速率由测定葡萄糖来控制。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体浓度 通过测定培养液或其稀释液在波长 660 nm 处的吸光度 OD₆₆₀ 确定菌体浓度。一个 OD₆₆₀ 单位相当于 0.267 g/L(菌体干重)。当 OD₆₆₀ < 0.3 时, 有良好的线性关系。

1.4.2 残糖浓度 用费林试剂法测定^[3]。

1.4.3 发酵液中 *l*-phe 浓度分析 用荧光法进行测定^[4]。

收稿日期: 2000-05-24

基金项目: 陕西省教委重点科研项目(96JZK08)

作者简介: 范代娣(1966-), 女, 陕西蒲城人, 西北大学教授、博士生导师, 从事生物化工研究。

2 结果与讨论

2.1 生长因子对苯丙氨酸积累的影响

通过添加不同浓度的酪氨酸,实验由图 1 示出:随着酪氨酸添加量的增加,产酸率提高,从发酵成本

和产酸率两方面分析,得出酪氨酸的最适添加量为 1.0~1.2 g/L,既可得高产酸率 3.68%,又可使成本不致过高。

2.2 工艺与代谢副产物乙酸对苯丙氨酸的影响

通过对发酵工艺条件优化,实验得出:当发酵温度控制在 38~39℃,溶解氧(DO)控制在 20%,在整

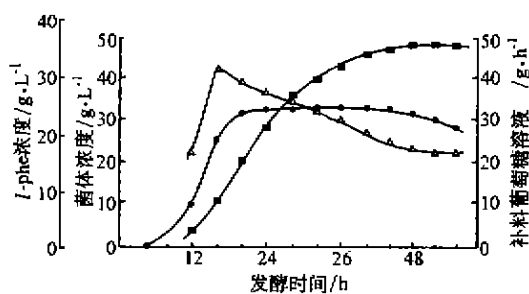


图 1(a) 添加 0.4g 酪氨酸时的发酵情况

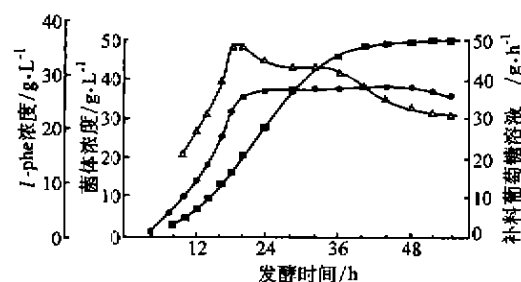


图 1(b) 添加 0.8g 酪氨酸时的发酵情况

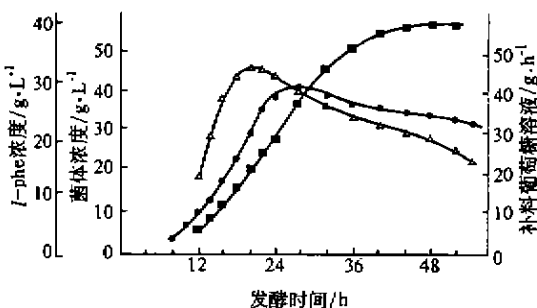


图 1(c) 添加 1.2g 酪氨酸时的发酵情况

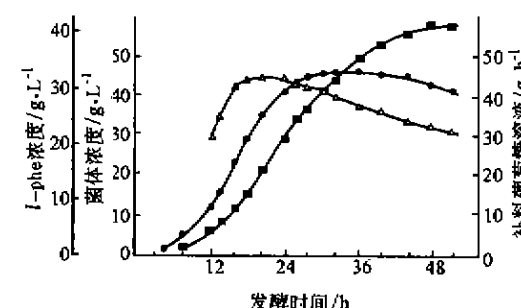


图 1(d) 添加 1.6g 酪氨酸时的发酵情况

—●— 菌体浓度/g·L⁻¹ —▲— 补料葡萄糖溶液/g·h⁻¹ —■— l-phe浓度/g·L⁻¹

图 1 生长因子添加量对发酵的影响

Fig. 1 The effect of the concentration of growth factor on the production of *l*-phenylalanine and biomass

个实验过程中葡萄糖浓度维持在 1.5%,既有利于苯丙氨酸的积累,又能有效抑制乙酸的产生,苯丙氨酸的浓度可达到 3.86%,结果见图 2。

3 结论

1) 获得了 *l*-phe 发酵的优化工艺参数为:搅拌转速 450 r/min,发酵温度为 38.5℃,DO 控制在 20%,发酵液 pH 值为 7.0,糖浓度控制在 1.5%,酪氨酸添加量为 1.0~1.2 g/L。另外,分析了上述工艺条件对菌体细胞生长和 *l*-phe 积累的影响。

2) 溶氧控制的葡萄糖流加补料和酪氨酸分批补料双重调控可以有效地控制菌体比生长速度,减少乙酸产生,提高菌体浓度和 *l*-phe 浓度。

3) 经十几批发酵条件的摸索和 5 批稳定发酵,该菌种重组质粒稳定,重复性好,平均产酸量 36.8 g/L。

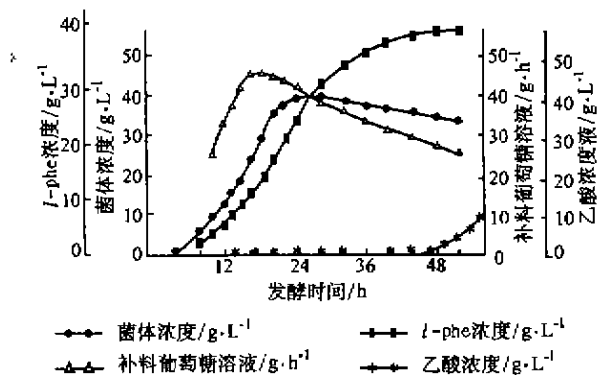


图 2 有害代谢产物乙酸得到控制后的发酵结果

Fig. 2 The effect of the concentration of acetic acid in broth on the production of *l*-phenylalanine

参考文献:

- [1] 林 锐. *l*-苯丙氨酸研究现状[J]. 微生物通讯, 1992, 26(2): 15-18.
 [2] 范代娣, 李万华, 张小燕, 等. 732H⁺ 离子树脂在 *l*-苯丙氨酸发酵纯化中的应用[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2000, 30(4): 135-137.
 [3] 张龙翔. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981.
 [4] 范长胜. 荧光法测定发酵液中的苯丙氨酸含量[J]. 氨基酸杂志, 1989, 30(2): 31-34.

(编辑 姚 远)

Recombinant *E. coli*. fermentation for the formation of *l*-phenylalanine

FAN Dai-di, YUAN Long, MI Yu, LI Wan-hua

(Department of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The fermentation technical and engineering parameters, substrate consumption and the formation of *l*-phenylalanine during the process of fermentation were studied, it was shown that *l*-phenylalanine has a peak formation when cultivation temperature was controlled at 38.5°C, pH value around 7.0~7.5, DO controlled at 20% and glucose concentration controlled 1.5%.

Key words: recombinant *E. coli*; fermentation; *l*-phenylalanine

(上接第 32 页)

- [6] 沈洪权, 顾其民, 李永唐. 基础生物化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 76.
 [7] LINKE W F. Solubilities of Inorg. and Metal-org. Compounds[M]. Washington: American Chemical Society, 1965, 605.
 [8] 陈运生. 物理化学分析. 第 1 版[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987.
 [9] CHAKROVORT A, COTTON F A. Stability constants and structures of some metal complexes with imidazole derivatives[J]. J Phys Chem, 1963, 67: 2 878-2 879.
 [10] 刘祁涛, 田吉坤, 张 锋, 等. 锌(II)-芳香碱-氨基酸三元配合物中的配体间疏水缔合作用[J]. 化学学报, 1994, 52(11): 1 100-1 105.
 [11] CHILDS C W, PERRIN D D. Equilibria in solutions which metal ion and an amino-acid[J]. J Chem Soc A, 1969, 7: 1 039-1 044.
 [12] HALLMAN P S, PEMIN D D, ANN E. The computed distribution of copper (II) and zinc (II) ions among seventeen amino acids present in human blood plasma[J]. J Biochem, 1971, 121: 549-552.

(编辑 张银玲)

Phase chemical study on coordination behavior of zinc acetate with L- α -amino acids

GUO Li-juan, ZHANG Feng-xing, TANG Xiao-qing, GAO Sheng-li

(Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The solubility properties of Zn(OAc)₂-Thr/Val/Leu/Try-H₂O systems at 25 °C in the whole concentration range have been investigated by semimicro phase equilibrium method and corresponding equilibrium diagrams and refractive index diagrams are constructed. The phase diagram indicates that new complex is not formed, which may be explained by salting out or in effect results in the increment of the solubility of the complex.

Key words: L- α -amino acid; zinc acetate; phase equilibrium; solubility diagram; ternary system