

氨基葡萄糖发酵条件研究

尚海涛

(安徽丰原发酵技术工程研究有限公司, 安徽 蚌埠 233010)

摘要: 对基因工程菌 JZ2316 发酵的接种量、pH 及诱导剂 IPTG 添加时间等条件进行了研究。结果表明, 该菌株的最佳发酵条件为: 培养基组成为葡萄糖 0.500 0 g/L、磷酸二氢钾 0.667 0 g/L、一水柠檬酸 0.355 0 g/L、七水硫酸镁 0.250 0 g/L、二水氯化钙 0.002 5 g/L、消泡剂 0.025 0 g/L、微量元素母液 (包括七水硫酸铁 5.00 g/L、硼酸 0.10 g/L、六水氯化钴 0.10 g/L、一水硫酸锰 0.33 g/L、七水硫酸锌 3.80 g/L、二水钼酸钠 0.10 g/L、硫酸钴 0.10 g/L) 0.010 0 g/L, 流加糖为 60% 葡萄糖 (质量体积比), pH 为 6.9, 接种量为 10%, 发酵 OD_{600nm} 达到 28 添加诱导剂。

关键词: 氨基葡萄糖; 基因工程菌; 发酵条件

中图分类号: TQ929 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)01-0040-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2017.01.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2017.01.012)

Study on Fermentation Conditions of Glucosamine

SHANG Haitao

(Anhui BBCC Group Co., Ltd., Bengbu Anhui 233010, China)

Abstract: The genetically engineered bacterium JZ2316 was one glucosamine fermentation producing strain. The culture conditions such as inoculum size, pH and addition time of inducer were studied to confirm the optimal fermentation conditions. The results showed that the optimal fermentation medium was glucose 0.500 0 g/L, KH₂PO₄ 0.667 0 g/L, C₆H₈O₇·H₂O 0.355 0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.250 0 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.002 5 g/L, defoamer 0.025 0 g/L, microelements mother solution 0.010 0 g/L. The optimum fermentation conditions of glucosamine were 60% (m/v) amount of glucose, pH 6.9, adding inducer when the absorbance at 600 nm reached to 28.

Key words: Glucosamine; Genetically engineered bacterium; Fermentation conditions

氨基葡萄糖是葡萄糖的一个羟基被一个氨基取代的化合物, 分子式为 C₆H₁₃O₅N, 广泛存在于

收稿日期: 2016-11-10

作者简介: 尚海涛(1975—), 男, 安徽蚌埠人, 高级工程师, 主要从事生物工程研究工作。E-mail: shtbbca@163.com.

3 小结

试验结果表明, 在崆峒区旱塬区宽幅精播条件下, 参试冬小麦品种生育期差异不显著, 均可正常成熟。折合产量以宁麦 9 号最高, 为 7 100.0 kg/hm², 较对照品种平凉 44 号增产 1 138.9 kg/hm², 增产率 19.11%; 宁麦 5 号折合产量 6 994.4 kg/hm², 较对照品种平凉 44 号增产 1 033.3 kg/hm², 增产率 17.33%; 平凉 45 号折合产量 6 350.0 kg/hm², 较平凉 44 号增产 6.52%; 陇原 034 折合产量 6 338.9 kg/hm², 较平凉 44 号增产 6.4%。综合分析产量及抗性等因素, 宁麦 9 号、宁麦 5 号、陇原 034、平凉 45 号可作为当地旱塬宽幅精播栽

培的主推品种。

参考文献:

- [1] 王德刚. 小麦宽幅匀播技术要点及注意事项[J]. 现代农业科技, 2015(18): 64; 68.
- [2] 石玉章. 旱地冬小麦宽幅匀播栽培播量试验[J]. 甘肃农业科技, 2016(5): 19-20.
- [3] 郝青, 关世杰, 李钰, 等. 崇信县胡麻宽幅匀播栽培技术[J]. 甘肃农业科技, 2015(6): 53-54.
- [4] 刘广才, 陈翠贤, 张廷龙, 等. 甘肃省小麦宽幅精播栽培技术规程[J]. 甘肃农业科技, 2013(11): 67-68.
- [5] 杨文雄. 甘肃小麦生产技术指导 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009.

(本文责编: 陈 伟)

自然界中,通常以N-乙酰基衍生物(如甲壳素)或以N-硫酸酯和N-乙酰-3-O-乳酸醚(胞壁酸)形式存在于微生物、动物来源的多糖和结合多糖中^[1-2]。氨基葡萄糖是形成软骨细胞的重要营养素,是健康关节软骨的天然组织成分^[3-5]。美国、欧洲和日本的大量医学研究表明,氨基葡萄糖可以帮助修复和维护软骨,并能刺激软骨细胞的生长^[2,4,6]。我们对氨基葡萄糖生产菌株JZ2316(菌株JZ2316为可生产氨基葡萄糖菌株)的发酵条件(发酵接种量、pH及诱导剂IPTG添加时间等)进行了探讨,以明确JZ2316菌株的最佳发酵条件,旨为相关科学研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 供试菌株为基因工程菌JZ2316,由安徽丰原发酵技术工程研究有限公司购买筛选获得。

1.1.2 培养基 ①菌种培养基。葡萄糖 2.000 g/L、磷酸二氢钾 0.600 g/L、三水磷酸二氢钾 3.145 g/L、二水柠檬酸钠 0.100 g/L、硫酸铵 1.000 g/L、七水硫酸镁 0.060 g/L、二水氯化钙 0.003 g/L、微量元素母液(包括七水硫酸铁 5.00 g/L、硼酸 0.10 g/L、六水氯化钴 0.10 g/L、一水硫酸锰 0.33 g/L、七水硫酸锌 3.80 g/L、二水钼酸钠 0.10 g/L、硫酸钴 0.10 g/L)0.010 g/L,氢氧化钠调pH 7.2左右,混匀后于0.1 MPa灭菌20 min。②发酵培养基。葡萄糖 0.500 0 g/L、磷酸二氢钾 0.667 0 g/L、一水柠檬酸 0.355 0 g/L、七水硫酸镁 0.250 0 g/L、二水氯化钙 0.002 5 g/L、消泡剂 0.025 0 g/L、微量元素母液 0.010 0 g/L、pH 6.8~7.0。底糖单独0.1 MPa灭菌20 min,其他加水混匀后0.1 MPa灭菌30 min;流加糖为浓度60%的葡萄糖(质量体积比),流加糖0.1 MPa灭菌20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种培养 从生长良好的基因工程菌JZ2316的活化培养基斜面刮一满环JZ2316菌苔,转入装有100 mL种子培养基的无挡板三角瓶中(容量500 mL),用9层纱布封口,置于巡回式摇床上振荡培养。待种子生长合格通过火圈,直接接种至30 L自动控制发酵罐中,装液量10 L,温

度自控37℃,罐压0.03 MPa,搅拌转速300 r/min,风量10 L/min,进一步扩大培养。

1.2.2 50 L罐发酵 将菌种液通过火圈直接接种至50 L自动控制发酵罐中,装液量22 L,温度自控37℃,自动流加氨水控制pH,起始通风量为22 L/min,流加“泡敌”消泡,通过流加葡萄糖、控制不同的搅拌转速及通风量来实现不同的溶氧,发酵过程中控制溶氧30%(±5%)。溶氧为相对溶氧水平,即将培养基未接种时的饱和溶氧设定为100%,发酵过程显示的溶氧水平为相对于饱和溶氧的分数。

1.2.3 菌种接种量对发酵效果的影响 为了确定菌株JZ2316色氨酸发酵最佳种子接种量,进行了不同接种量的发酵试验。根据发酵试验的常用接种浓度分别试验了6%、7%、10%、13%、16% 5个不同的接种浓度,根据种子的生长条件,发酵在pH 6.9、溶氧30%(±5%)(按常规溶氧控制条件)、发酵OD_{600nm}达到28添加诱导剂条件下进行,重复3次试验,以48 h产酸求平均值计算各接种浓度的产酸量,确定最佳的接种浓度。

1.2.4 菌液pH对发酵效果的影响 根据色氨酸发酵菌株JZ2316的生长pH,进行了不同pH发酵试验。由于菌株JZ2316的生长pH为6.9,因此选择6.3、6.5、6.7、6.9、7.1、7.3、7.5等7个不同pH进行试验。根据种子的生长条件,发酵在接种量10%、溶氧30%(±5%)(按常规溶氧控制条件)、发酵OD_{600nm}达到28添加诱导剂的条件下进行,重复3次试验,以48 h产酸求平均值计算各pH值下的产酸量,确定最佳的发酵pH。

1.2.5 诱导剂对发酵效果的影响 根据发酵菌株JZ2316的诱导控制条件,进行了不同阶段添加诱导剂发酵试验。由于菌株JZ2316的诱导剂添加阶段为OD_{600nm}达到28(一般9~10 h),一次性加入IPTG(诱导剂IPTG过滤除菌,溶解在100 mL无菌水中,终浓度0.07 mmol/L,以种后体积22 L计)。因此选择在18、21、25、28、31、34、37 7个不同的发酵OD_{600nm}进行添加诱导剂发酵试验。根据种子的生长条件,发酵在pH 6.9、接种量10%、溶氧30%(±5%)(按常规溶氧控制条件)条件下进行,重复3次试验,以48 h平均产酸确定最佳的

发酵诱导剂添加阶段。

1.2.6 分析方法 使用分光光度计测定 600 nm 波长下的吸光度, 确定菌体浓度; 使用 pH 计测定 pH; 采用 SBA-40C 型生物传感分析仪测定残糖含量; 采用液相色谱测定氨基葡萄糖含量。

2 结果与分析

2.1 菌株接种量对发酵效果的影响

菌种发酵中, 如菌株接种量太少, 菌体增长缓慢, 培养时间长, 使发酵周期延长, 同时会降低菌种活力, 不利于得到较高的产氨基葡萄糖水平; 接种量过大, 虽然缩短了长菌的时间, 但会因菌数增长过快和随接种而移入过多的代谢废物, 菌种容易衰老, 不利于得到较高的产酸水平; 适宜的接种量既能保证合理缩短发酵周期, 又能得到较高的发酵产酸水平。由图 1 可以看出, 当菌株 JZ2316 接种量为 10% 时, 氨基葡萄糖浓度最大, 达到 76.52 g/L, 即菌株 JZ2316 的产氨基葡萄糖量达到最大, 因此菌株 JZ2316 发酵的最佳接种量为 10%。

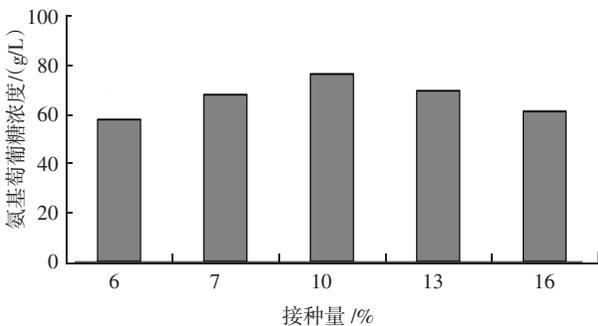


图 1 菌种接种量对氨基葡萄糖产量的影响

2.2 菌液 pH 对发酵效果的影响

菌种发酵过程中较高或较低 pH 均会抑制菌体的生长, 使菌体生长缓慢, 延长发酵周期, 降低

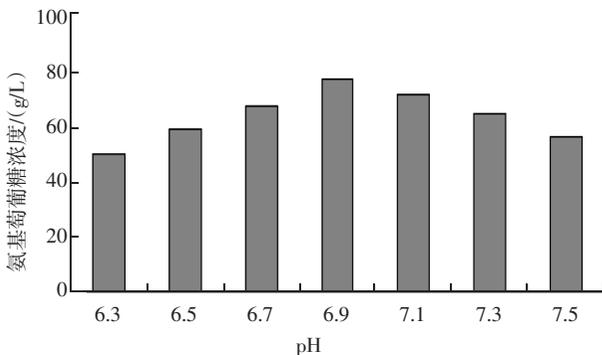


图 2 发酵 pH 对氨基葡萄糖产量的影响

色氨酸产量。由图 2 可以看出, 当发酵 pH 为 6.9 时, 菌株发酵效果最好, 氨基葡萄糖浓度最高, 达到 75.78 g/L, 即菌株 JZ2316 的产氨基葡萄糖量达到最大。因此, 确定菌株 JZ2316 发酵的最佳 pH 为 6.9。

2.3 发酵诱导剂添加阶段对发酵效果的影响

诱导剂对发酵的影响主要表现在发酵前期影响菌体的生长和在发酵中后期影响菌体产氨基葡萄糖。诱导剂添加阶段适宜, 菌体生长好, 菌体量大, 氨基葡萄糖产量高, 转化率也高。诱导剂添加过早, 菌体生长较慢, 对原料的转化效率低。诱导剂添加过迟, 菌体 OD 值偏大, 转化率低, 菌体衰老, 不利于氨基葡萄糖的积累。由图 3 可以看出, 当发酵诱导剂添加阶段为 OD_{600 nm} 达到 28 时, 发酵液中氨基葡萄糖浓度最高, 达到 77.18 g/L, 即菌株 JZ2316 的产氨基葡萄糖量达到最大。表明菌株 JZ2316 发酵的最适诱导剂添加阶段为 OD_{600 nm} 达到 28。

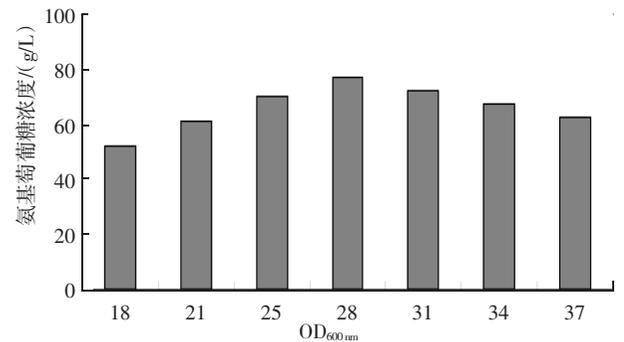


图 3 发酵诱导剂添加阶段对氨基葡萄糖产量的影响

3 小结

试验结果表明, 菌株 JZ2316 最佳发酵条件为: 培养基组成为葡萄糖 0.500 0 g/L、磷酸二氢钾 0.667 0 g/L、一水柠檬酸 0.355 0 g/L、七水硫酸镁 0.250 0 g/L、二水氯化钙 0.002 5 g/L、消泡剂 0.025 0 g/L、微量元素母液 (包括七水硫酸铁 5.00 g/L、硼酸 0.10 g/L、六水氯化钴 0.10 g/L、一水硫酸锰 0.33 g/L、七水硫酸锌 3.80 g/L、二水钼酸钠 0.10 g/L, 硫酸钴 0.10 g/L) 0.010 0 g/L, 流加糖为浓度 (质量体积比) 60% 的葡萄糖, pH 为 6.9, 接种量为 10%, 发酵 OD_{600 nm} 达到 28 添加诱导剂。

参考文献:

- [1] 刘佃磊, 李丕武, 李瑞瑞, 等. 高产氨基葡萄糖基因

白菜型冬油菜新品种天油12号选育报告

张建学, 张亚宏, 雷建明, 王亚宏, 张岩, 裴国平, 范提平
(甘肃省天水市农业科学研究所, 甘肃 天水 741001)

摘要: 高油丰产白菜型冬油菜新品种天油12号是天水市农业科学研究所自育不育系05-329A为母本, 以恢复系05-334为父本配制的白菜型冬油菜三系杂交种。在2010—2012年甘肃省冬油菜山旱地区区域试验中, 2 a 11点(次)平均折合产量2 391.00 kg/hm², 比对照品种天油4号(平均产量2 168.25 kg/hm²)增产10.27%。该品种田间表现生长优势强, 抗寒耐旱, 高产稳产; 籽粒芥酸含量为46.3%, 硫苷含量为179.63 μmol/g, 含油率为45.34%。适宜于甘肃省中东部干旱、半干旱、二阴山区及同类型生态区域大面积推广种植, 也可在山西、河北、辽宁、内蒙古等地类似生态区域示范种植。

关键词: 白菜型冬油菜; 三系杂交种; 天油12号; 新品种; 高油; 选育

中图分类号: S565.4 文献标志码: A 文章编号: 1001-1463(2017)01-0043-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2017.01.013

Report on New-bred Winter Rapeseed Cultivar Tianyou2 (*Brassica rapa* L.)

ZHANG Jianxue, ZHANG Yahong, LEI Jianming, WANG Yahong, ZHANG yan, PING Guoping, FAN Tiping
(Tianshui Agricultural Science Research Institute, Tianshui Gansu 741001, China)

Abstract: Tianyou 12 is a newly bred Winter rapeseed (*Brassica rapa* L.) three line hybrids cultivar with high-oil and high-yield by parental combination of sterile sterile line 05-329A with restore line 05-334 by Tianshui Agricultural Science Research Institute. In 2010—2012, the average yield is 2 391 kg/hm², which is 10.27% higher that of the check Tianyou 4 in the regional test of Dryland in Gansu province. The result shows that the cultivar has a strong growth superiority, cold resistance and drought tolerance, high yield and stable yield. The grain of erucic acid content is 46.3%, the glucosinolate content is 179.63 mol/g, the oil rate is 45.34%. It is suitable to be grown in arid, semi-arid, semi-arid mountain region and in the middle and eastern part of Gansu province with similar ecological region. It can also be planted in similar ecological regions such as Shanxi, Hebei, Liaoning and Inner Mongolia.

Key words: Winter rapeseed (*Brassica rapa* L.); Three line hybrid; Tianyou 12; New cultivar; High-oil; Breeding

油菜是我国最主要油料作物之一, 同时我国也是世界最大的油菜生产国^[1], 2012—2013年全国油菜播种面积为0.077亿hm², 总产量达1 350万t, 油菜也是继稻、麦、玉米、大豆之后

收稿日期: 2016-06-21; 修订日期: 2016-08-25

基金项目: 天水市科技支撑项目“白菜型冬油菜高含油量种质选育研究”。

作者简介: 张建学(1976—), 男, 甘肃天水人, 副研究员, 主要从事冬油菜育种与栽培工作。联系电话: (0)13993858121。E-mail: zhjx658121@163.com。

工程菌的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(3): 36-41.

[2] 陈欣. 代谢工程改造大肠杆菌发酵生产氨基葡萄糖及过程优化与控制[D]. 无锡: 江南大学, 2012.

[3] 梁芳. 氨基葡萄糖的发酵中试放大和提取工艺研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.

[4] 王升, 李丕武, 刘佃磊, 等. 利用发酵法生产氨基

葡萄糖的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(1): 68-74.

[5] 刘佃磊. 产氨基葡萄糖工程菌的构建与发酵条件优化[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2014.

[6] 张荣岭. 微生物发酵法生产氨基己糖的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2013.

(本文责编: 郑丹丹)