

L-色氨酸生产菌株 TPO1 发酵条件研究

李维理

(安徽丰原发酵技术工程研究有限公司, 安徽 蚌埠 233010)

摘要: 对L-色氨酸生产基因工程菌 TPO1 发酵的接种量、发酵温度和溶氧等条件进行了研究。结果表明, 该菌株的最佳发酵条件初始培养基组成为葡萄糖 30 g/L、硫酸铵 40 g/L、酪氨酸 0.2 g/L、玉米浆 25 mL/L、磷酸氢二钾 10 g/L、磷酸二氢钾 5 g/L、七水硫酸镁 2 g/L、硫酸钠 0.002 g/L、七水硫酸亚铁 0.01 g/L、维生素 B₁ 100 μg/L、维生素 H 50 μg/L, 流加糖为浓度 70% 的葡萄糖(质量体积比), pH 为 7.0, 温度为 37 °C, 接种量为 10%, 溶氧控制在 20%~30%。

关键词: L-色氨酸; 基因工程菌; 发酵优化

中图分类号: TQ922 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)07-0057-04
[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2017.07.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2017.07.014)

Study on Fermentation Conditions of L-tryptophan

LI Weili

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

Abstract: The genetically engineered bacterium TPO1 was one L-tryptophan fermentation producing strain. The culture conditions such as inoculum size, temperature and dissolved oxygen were studied to confirm the optimal fermentation conditions. The results showed that the optimal fermentation medium was glucose 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 40 g/L, tyrosine 0.2 g/L, corn steep liquor 25 mL/L, K₂HPO₄ 10 g/L, KH₂PO₄ 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 2 g/L, Na₂SO₄ 0.002 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L, vitamin B₁ 100 μg/L, vitamin H 50 μg/L. The optimum fermentation conditions of L-tryptophan were 70% (m/v) amount of glucose, pH 7.0, fermentation temperature 37 °C, inoculum size 10% and dissolved oxygen 20%~30%.

Key words: L-tryptophan; Genetically engineered bacterium; Fermentation optimization

L-色氨酸是人体和动物生命活动所需的 8 种必需氨基酸之一, 以游离态或结合态存在于生物体中^[1-3], 对人和动物的生长发育、新陈代谢起着非常重要的作用, 被称为第二必需氨基酸, 广泛

应用于医药、食品和饲料等行业^[4-5]。Eiteman 等根据代谢控制发酵原理对 L-色氨酸发酵进行了研究^[6-8]。笔者对 L-色氨酸生产菌株 TPO1 的发酵条件(发酵接种量、发酵温度及溶氧控制等)进行

收稿日期: 2017-05-10

作者简介: 李维理(1981—), 男, 安徽蚌埠人, 工程师, 从事生物发酵工程方面的研究。E-mail: 2713519131@qq.com。

普通尿素平均提高 10.4%, 增产率为 97.4%, 与等氮量尿素相比平均增产粮食 7.5%, 棉花 13.3%, 油菜 8.0%。与等质量普通尿素相比, 不仅能显著增产, 而且还可节省尿素用量 15%~25%。连续使用腐植酸尿素后, 土壤有机质比使用尿素高, 土壤容重比使用尿素低, 能培肥土壤, 增强农业发展后劲^[8]。

参考文献:

- [1] 李庆逵, 朱兆良, 于天仁. 中国农业持续发展中的肥料问题[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1998.
- [2] 张福锁, 王激清, 张卫峰, 等. 中国主要粮食作物肥料利用率现状与提高途径[J]. 土壤学报, 2008, 45(5): 915-924.
- [3] 赵秉强, 张福锁, 廖宗文, 等. 我国新型肥料发展战

略研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(5): 536-545.

- [4] 赵强. 不同肥料处理对旱区玉米的影响[J]. 甘肃农业科技, 2016(4): 49-52.
- [5] 杨新强, 包兴国, 杨文玉, 等. 缓释包衣尿素对保护性耕作玉米的影响[J]. 甘肃农业科技, 2014(10): 23-25.
- [6] 孙克刚, 郭跃升, 李玉顺, 等. 控失尿素在夏玉米上的应用效果研究[J]. 磷肥与复肥, 2015, 30(1): 51-52.
- [7] 刘曙光, 齐林锁. 心连心控失尿素在水稻上应用效果[J]. 现代化农业, 2016(4): 52.
- [8] 江家铭. 新型尿素产品的研制开发与应用概况[J]. 氮肥技术, 2012, 33(3): 32-37.

(本文责编: 陈伟)

了试验,以期明确 TP01 菌株的最佳发酵条件,为相关科学研究提供参考。

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 TP01。

1.1.2 培养基 菌种培养基:葡萄糖 30 g/L、硫酸铵 5 g/L、蛋白胨 4 g/L、酵母粉 2 g/L、磷酸氢二钾 1 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、七水硫酸镁 0.5 g/L,混匀后于 0.1 MPa 灭菌 20 min, pH 6.8~7.0。发酵培养基:葡萄糖 30 g/L、硫酸铵 40 g/L、酪氨酸 0.2 g/L、玉米浆 25 mL/L、磷酸氢二钾 10 g/L、磷酸二氢钾 5 g/L、七水硫酸镁 2 g/L、硫酸钠 0.002 g/L、七水硫酸亚铁 0.01 g/L、维生素 B1 100 μg/L、维生素 H 50 μg/L,流加糖为浓度 70%的葡萄糖(质量体积比)。

1.2 菌种培养

从生长良好的基因工程菌 TP01 活化培养基斜面刮满环菌苔,转入装有 100 mL 种子培养基的无挡板三角瓶(容量 500 mL)中,用 8 层纱布封口,置于巡回式摇床上振荡培养。

1.3 5 L 罐发酵

将菌种液通过火圈直接接种至 5 L 自动控制发酵罐中,装液量 3 L,温度自控,自动流加氨水控制 pH,起始通风量为 80 L/h,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。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。

1.3.1 菌种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酸水平;菌株接种量过大,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。为了确定菌株 TP01 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 5%接种量、7%接种量、10%接种量、12%接种量、15%接种量 5 个不同的接种浓度,根据种子的生长条件,发酵在 pH 7.0、37 ℃、溶氧 30% ± 5% (按常规溶氧控制条件)条件下进行,重复 3 批试验,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。

1.3.2 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,降低色氨酸产量。根据色氨酸发酵菌株 TP01 的生长 pH,进行了不同 pH 发酵试验。由于菌株 TP01 的生长 pH 为 7.0,因此选择 pH 6.6、6.8、7.0、7.2、7.5 等 5 个不同 pH 进行试验,根据种子的生长条件,发酵在 37 ℃、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 批试验,以 48 h 产酸求平均值计算各 pH 的产酸量,确定最佳的发酵 pH。

1.3.3 温度对发酵效果的影响 温度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酸。温度适宜,菌体生长好,菌体量大,L-色氨酸产量高,糖酸转化率也高。温度偏低,菌体生长较慢,对原料的转化效率低。温度偏高,菌体易衰老,不利于 L-色氨酸的积累。根据色氨酸发酵菌株 TP01 的生长温度,进行了不同温度发酵试验。由于菌株 TP01 的生长温度为 37 ℃,因此选择 33、35、36、37、39 ℃等 5 个不同的温度进行发酵试验,根据种子的生长条件,发酵在 pH 7.0、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 批试验,以 48 h 产酸求平均值计算各温度下的产酸量,确定最佳的发酵温度。

1.3.4 不同溶氧水平对发酵效果的影响 发酵过程中,通过流加 70%葡萄糖(质量体积比)、控制不同的搅拌转速及通风量来实现不同的溶氧。将溶氧分别控制在 10% ~ 20%、20% ~ 30%和 30% ~ 40% 3 个水平进行发酵试验,发酵在 pH 7.0、37 ℃、接种量 10%条件下进行,重复 3 批试验,以 48 h 为发酵终点,每 4 h 采集 1 次数据,采用发酵液吸光度和产酸量来评价不同的溶氧控制条件的优劣,确定最佳的发酵溶氧浓度控制。

1.4 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;采用液相色谱测定 L-色氨酸含量^[9]。

2 结果与分析

2.1 菌株接种量对发酵效果的影响

由图 1 可以看出,当菌株 TP01 接种量为 10%

时, L-色氨酸浓度最大, 达到 25.8 g/L, 即菌株 TP01 的产酸量达到最大, 因此菌株 TP01 发酵的最佳接种量为 10%。

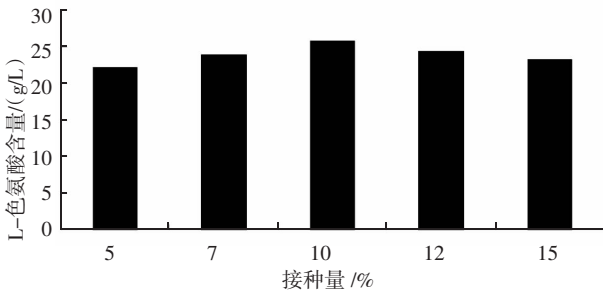


图1 菌种接种量对 L-色氨酸产量的影响

2.2 菌液 pH 对发酵效果的影响

由图 2 可以看出, 当发酵 pH 为 7.0 时, 菌株 TP01 发酵效果最好, L-色氨酸浓度最高, 达到 26.3 g/L, 即菌株 TP01 的产酸量达到最大。因此, 确定菌株 TP01 发酵的最佳 pH 为 7.0。

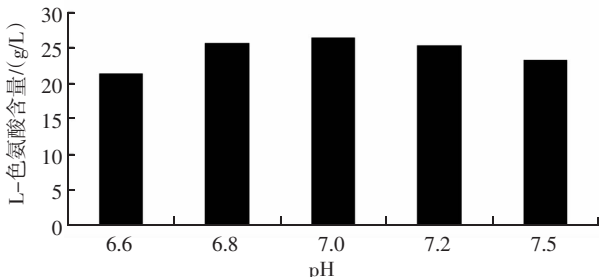


图2 发酵 pH 对 L-色氨酸产量的影响

2.3 发酵温度对发酵效果的影响

由图 3 可以看出, 当发酵温度为 37 °C 时, 发酵液中 L-色氨酸含量最高, 达到 25.6 g/L, 即菌株 TP01 的产酸量达到最大, 表明菌株 TP01 发酵的最适温度为 37 °C。

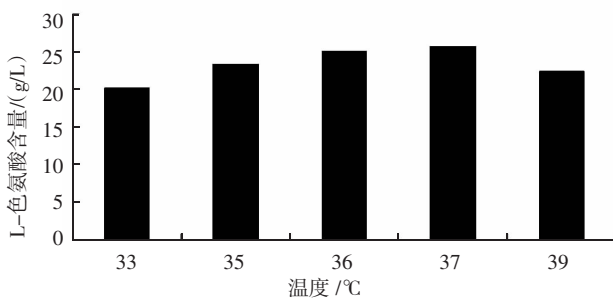


图3 发酵温度对 L-色氨酸产量的影响

2.4 溶氧浓度对发酵效果的影响

在不同的溶氧水平下, 菌体的生长量都能达到一个相近的饱和值, 但菌体的生长速率存在差异。由图 4 和图 5 可以看出, 当溶氧控制在 20%~30%

水平时, 菌体生长最快, 发酵产酸量也高, 发酵液中 L-色氨酸含量也相应最高; 当溶氧控制在 30%~40% 水平时, 菌体生长速度有所降低, 产酸量也较低; 当溶氧浓度控制在 10%~20% 水平时, 菌体生长较为缓慢, 产酸量最低, L-色氨酸含量也相应最低。可见溶氧浓度偏低或偏高对于发酵产酸都是不利的, 特别是溶氧浓度偏低时不但对菌体的生长不利, 也不利于发酵产酸。因此, 菌株 TP01 发酵过程中溶氧浓度应控制在 20%~30%。

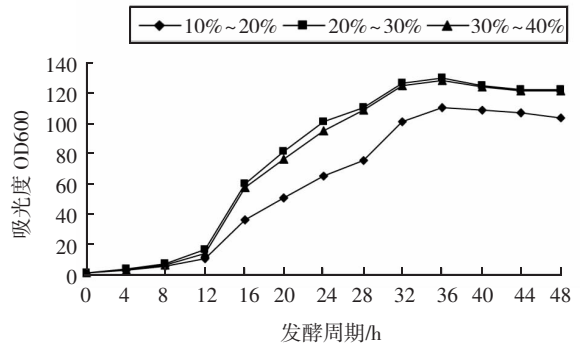


图4 溶氧浓度对发酵液菌浓的影响

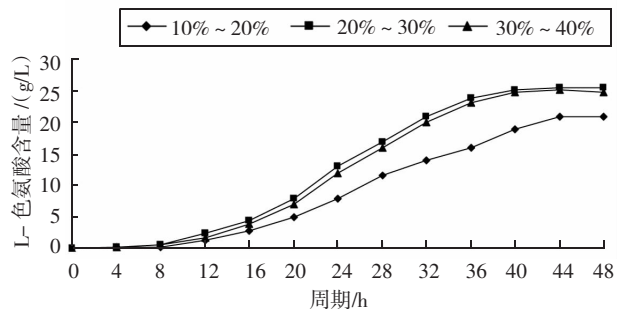


图5 溶氧浓度对 L-色氨酸产量的影响

3 小结

研究表明, 菌株 TP01 最佳发酵条件的培养基组成为葡萄糖 30 g/L、硫酸铵 40 g/L、酪氨酸 0.2 g/L、玉米浆 25 mL/L、磷酸氢二钾 10 g/L、磷酸二氢钾 5 g/L、七水硫酸镁 2 g/L、硫酸钠 0.002 g/L、七水硫酸亚铁 0.01 g/L、维生素 B₁ 100 μg/L、维生素 H 50 μg/L, 流加糖为浓度 70% 葡萄糖(质量体积比); 发酵 pH 为 7.0, 发酵温度 37 °C, 接种量为 10%, 溶氧控制在 20%~30%。

参考文献:

- [1] 杨 炜, 王伟刚, 田海英, 等. 重组大肠杆菌菌高表达高密度发酵研究[J]. 生物技术, 2006, 16(3): 83-86.
- [2] 周小苹, 杨海军. L-色氨酸 5L 罐发酵条件的研究[J]. 农产品加工, 2005(8): 51-53.
- [3] 黄 静, 史建明, 霍文婷, 等. 氮源对 L-色氨酸发酵

基施氮量对旱作区春油菜生长发育的影响

王毅, 董云, 靳丰蔚, 庞进平, 徐一涌

(甘肃省农业科学院作物研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 在半干旱区研究了基施氮肥量对春油菜生长发育的影响。结果表明, 基施氮肥后, 春油菜物候期及生育期随着施氮量的增加均出现推迟的趋势。苗期至现蕾期, 干物质累积量缓慢, 施氮量影响不大。抽薹期至成熟期, 干物质累积量较快, 低施氮量(90~210 kg/hm²)范围内油菜全株干物质重随施氮量增加而增大, 而高施氮量(240~270 kg/hm²)下油菜全株干物质重量随一次性施氮量增加而减小。株高、分枝部位、分枝数均随基施氮量增加而增加。全株有效结角数、角粒数、角果长度、千粒重、单株产量随施氮量增加均呈先增后减趋势。基施氮量 210 kg/hm² 时各经济性状指标表现最好, 产量最高, 达 2 013.43 kg/hm²。

关键词: 春油菜; 基施氮量; 生长发育; 影响; 旱作区

中图分类号: S565.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-1463(2017)07-0060-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2017.07.015

Effect of Single Basal Application of Nitrogen Fertilizer Amount on Growth of Spring-planted Rapeseed in Dry Area

WANG Yi, DONG Yun, JIN Fengwei, PANG Jinping, XU Yiyong

(Institute of Crops, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Through studying on single basal application of nitrogen in spring-planted rapeseed in dry area, the results show that with the increase of single basal nitrogen fertilizer, squaring and bolting and fist flowering, full flowering and maturity are delayed, the whole growth period delays 3~5 days. The dry matter accumulation of different treatments is different in growth stages. From seedling to the bolting stage, with the increase of single base nitrogen, dry matter accumulation increases. The dry matter accumulation increase with the increasing of single nitrogen application in the range of low nitrogen(90~210 kg/hm²). While in the range of high nitrogen application (240~270 kg/hm²), the dry matter accumulation of whole plant decreases with the increasing of nitrogen application. The plant height, the number of branches and branches site increase with the increasing of nitrogen application. Whole plant effective pod number, grain number, pod length, 1 000 seeds weight, yield per plant with single nitrogen increasing firstly increase and then decrease, application of N210 nitrogen shows the highest in the economic characters. The grain yield of rapeseed increases firstly and then decreases with the increasing of single nitrogen application. The economic characters showed the best performance when the basal nitrogen amount is 210 kg/hm², and the yield is the highest, reaching 2 013.43 kg/hm².

Key words: Spring-planted rapeseed; Single basal nitrogen application; Growth period; Effect; Dry area

油菜是我国重要的油料作物之一, 同时也是发展能源农业的优良作物, 以及大宗饲用蛋白的潜在

收稿日期: 2017-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260334); 甘肃省自然科学基金资助项目(1308RJZA205); 甘肃省农科院创新专项(2013GAAS16); 甘肃省农科院中青年基金(2015GAAS34)。

作者简介: 王毅(1979—), 男, 甘肃兰州人, 助理研究员, 硕士, 主要从事油菜遗传育种研究。联系电话: (0)15593199385。E-mail: tim2004_6@163.com。

- 的影响[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(5): 21-25.
- [4] 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.
- [5] 程立坤, 黄静, 秦永锋. 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.
- [6] EITEMAN MA, ALTMAN E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations [J]. Trends in Biotechnology, 2008, 24(11): 530-536.
- [7] 涂桂云, 李敏. 基因工程菌高密度发酵工艺研究进展[J]. 工业微生物, 2004, 34(3): 49-52.
- [8] SHIHO I, SUGIMOTO S, KAWAMURA K. Production of L-tryptophan by sulfonamide-resistant mutants [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1984, 48(8): 2073-2080.
- [9] 童群义, 陈坚. 分批培养时 pH 和温度对重组大肠杆菌生产谷胱甘肽合成酶系的影响[J]. 工业微生物, 2001, 31(4): 17-21.

(本文责编: 郑丹丹)