

L-异亮氨酸发酵工艺条件的研究

浦军平 陈 刚 王开国

(江苏亚太氨基酸有限公司, 张家港市 215600)

摘 要 研究了 L-异亮氨酸产生菌 Apsm533128(*Brevibacterium flavum*)菌体的生长规律。讨论了葡萄糖、玉米浆的浓度对 L-异亮氨酸的积累的影响,并且在 30 t 发酵罐上进行发酵工艺条件的研究,通过对通气量、温度、pH 值等外环境发酵条件的控制,在 30 t 发酵罐工业化大生产中, L-异亮氨酸发酵产酸率达 2.3~2.5%。并对其发酵动力学进行了初步的研究。

关键词 L-异亮氨酸发酵,碳源浓度,玉米浆浓度,外界发酵条件,发酵动力学

L-异亮氨酸属中性氨基酸,与 L-缬氨酸、L-亮氨酸统称为支链氨基酸,作为氨基酸原料药中的一种,主要用于复合氨基酸输液、三支链氨基酸输液、氨基酸口服液等,用于治疗肝病、肝昏迷、体弱乏力等疾病,是比较昂贵的氨基酸原料药之一^[1]。目前,国内外大批量生产 L-异亮氨酸均采用微生物发酵法^[2~5],国外生产国主要是日本,产酸达 3%~4%^[6]。20 世纪 90 年代以后,科学家们对黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)进行了诱变育种^[7~9]。国内报道工业化大生产的发酵条件的不多,有的文献报道的仅是实验室的自控罐的发酵条件^[10,11]。本文主要研究了培养基中的 2 个主要因素——葡萄糖浓度和玉米浆浓度对发酵产酸的影响,以及外界条件如通气比、温度及 pH 值的控制,在合适的条件下,30 t 发酵罐工业化大生产 L-异亮氨酸产酸率达 2.3%~2.5%,酸糖转化率达 15%~16%,在国内处于领先水平。并对 L-异亮氨酸发酵过程中的发酵动力学进行了初步的研究,对工业化大生产具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 菌 种

L-异亮氨酸产生菌 Apsm533128(*Brevibacterium flavum*)

1.2 发酵原料

葡萄糖(液体),含糖量>55%,DE 值>97%,浙江海宁葡萄糖厂;工业 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,含量>98%,上海宝钢集团;玉米浆,固形物含量>40%,江苏宝应米厂; KH_2PO_4 ,含量>98%,常熟振兴化工厂; MgSO_4 ,含量>98%,上海硫酸镁厂;轻质碱 CaCO_3 ,pH7.0~8.0,无锡北山碳酸钙厂;液氨,华源化工有

限公司。

1.3 发酵主要设备

1 m³ 种子罐,30 m³ 发酵罐。

1.4 培养基配方

1.4.1 斜面培养基配方(g/L)

葡萄糖 5.0,NaCl 5.0,牛肉膏 10.0,蛋白胨 10.0,琼脂 20.0,pH 6.8~7.2,消毒条件 121℃,30 min。

1.4.2 种子培养基配方(g/L)

葡萄糖 50.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20.0,玉米浆 25.0, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 0.6,轻质 CaCO_3 8.0,pH 6.8~7.2,消毒条件,121℃,30 min。

1.4.3 发酵培养基配方(g/L)

葡萄糖 150.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20.0,玉米浆 15.0, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 0.6,pH 6.8~7.2,消毒条件 110~112℃,30 min。

1.5 测定方法

1.5.1 葡萄糖测定方法

3,5-二硝基水杨酸法^[12]。

1.5.2 pH 值测定方法

pH 值测定仪或精密 pH 试纸。

1.5.3 菌体浊度测定方法

取 0.2 mL 发酵液,加入 4.8 mL 0.25 mol/L 的稀盐酸,在 721 分光光度计上于 562 nm 波长下测定其吸光值。

1.5.4 L-异亮氨酸测定方法

采用纸上层析法^[13]:用微量进样器在(5×10) cm 的新华 1 号滤纸上点样 2 μL,放在层吸液 V(正丁醇):V(冰乙酸):V(H_2O)=5:2:2 中展开 5 h,60℃烘干,用 0.05% 茚三酮-丙酮溶液喷雾,60℃烘干显色,剪下斑点,溶于 5 mL 的 CuSO_4 和 75%(V/V)

V)酒精溶液中静置 2 h,在 722 分光光度计上于 520 nm 波长下测定其吸光值(OD 值)。L-异亮氨酸含量测定计算公式如下:

L-异亮氨酸含量=(发酵液 OD 值/1% 标准溶液 OD 值)×100%

1.6 L-异亮氨酸发酵工艺流程

斜面 Apsm533128→活化→新鲜斜面→摇瓶培养→种子罐培养→发酵罐培养

斜面活化条件:30~31℃,24 h;摇瓶种子培养条件:30~31℃,16 h;种子罐培养条件:30~31℃;24 h。

2 结果与讨论

2.1 Apsm533128 菌的生长曲线

我们把对数生长期摇瓶种子接入种子罐内,而把平衡期的种子罐内的种子接入发酵罐内^[14]。图 1、图 2 分别是摇瓶种子和种子罐内种子的生长曲线。

从图 1 中看出,摇瓶种子在生长至 12~16 h 正式进入对数期,种子罐内菌体在生长至 12 h 开始进入对数期,24 h 开始进入平衡期。因此,我们得出摇瓶种子菌龄为 16 h,种子罐菌种生长时间为 24 h。

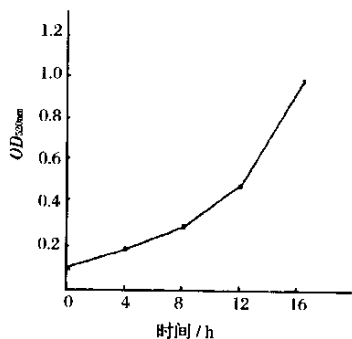


图 1 摇瓶种子生长曲线图

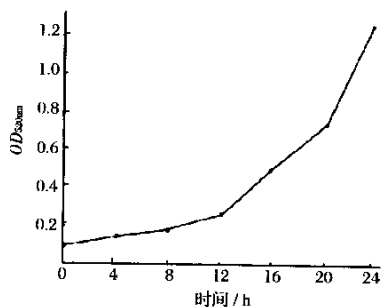


图 2 种子罐种子生长曲线图

2.2 糖浓度对 L-异亮氨酸产酸的影响

表 1 是各种不同的初糖对 L-异亮氨酸发酵产酸率、转化率、发酵周期的影响。

表 1 不同的初糖对 L-异亮氨酸发酵产酸的影响

初糖浓度 /%	总糖浓度 /%	流加糖 浓度/%	产酸率 /%	转化率 /%	周 期 /h
10.1	15.3	5.2	1.93	12.61	64
12.3	16.0	3.7	2.13	13.31	70
14.0	16.3	2.3	2.21	13.55	70
14.8	16.5	1.7	2.33	14.12	70
15.3	16.1	0.8	2.49	15.46	72
15.8	15.8	-	2.48	15.69	72
16.0	16.0	-	2.40	15.00	76
17.1	17.1	-	2.21	12.93	80

从表 1 中可知,L-异亮氨酸发酵初糖浓度控制在 15%~16%之间,根据菌种的活力及耗糖产酸情况,适当地补加 1%的糖可获得高产酸和高转化率;糖浓度低,菌体生长速度快,周期短,糖耗、产酸和转化率偏低,而初糖浓度>16%时,菌生长速度慢,周期长,耗糖、产酸速度偏慢,初糖浓度>17%时,此现象尤其明显,产酸和转化率均偏低。

2.3 玉米浆浓度对 L-异亮氨酸发酵产酸的影响

玉米浆含有丰富的生物素(V_H)及其他一些营养因子,还是最重要的原辅材料^[15,16]。发酵培养基中玉米浆添加量是根据实验室中摇瓶添加量而定的,且因其产地不同而不同。图 3 是江苏宝应米厂提供的以玉米浆做实验的结果。

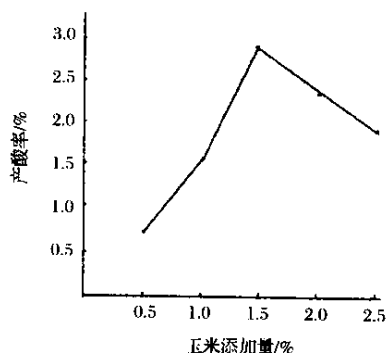


图 3 不同玉米浆添加量对发酵产酸的影响

从图 3 得出,该玉米浆在添加量为 1.5%时,L-异亮氨酸产酸最佳。根据我们 10 年的生产经验,建议使用固定的 2~3 家玉米浆供应商提供的产品,不应经常更换玉米浆生产厂家,以防造成生产的不稳定性。另建议每批次玉米浆进厂都必须做摇瓶发酵小试,以最后确定玉米浆在发酵培养基本中的最佳添加量。

2.4 通气量对 L-异亮氨酸发酵产酸的影响

在氨基酸发酵过程中,都要通入大量的空气。在 L-异亮氨酸发酵过程中,菌在呼吸量充足的情况下产酸最高;在氧供应不足的情况下,产酸略有降低。氧不足,产酸受到轻微抑制^[17]。我们通过在 30 L 罐上试验,确定其产酸时的最佳通气比。

表 2 不同通气比对 L-异亮氨酸发酵的影响

通气比	产酸率/%	转化率/%	周 期/h
1:0.05	1.83	10.38	72
1:0.075	1.99	11.32	72
1:0.10	2.13	12.38	72
1:0.125	2.38	15.10	72
1:0.15	2.41	15.38	72
1:0.175	2.33	15.00	72
1:0.20	2.00	12.18	76
1:0.225	2.00	12.03	76

从表 2 中得出, L-异亮氨酸发酵产酸最合适通气比为 0.125 ~ 0.175 之间,此时发酵产酸高,转化率高。

2.5 温度控制对 L-异亮氨酸发酵产酸的影响

曾经有文献报道过温度控制模式^[18]。根据我们几年来的试验与生产实践,温度控制与文献报道有所差别。在实际的工业化生产中,主要在发酵中后期观察菌体耗糖情况,从而决定发酵的温度控制。

Apsm533128 菌前期最佳生长温度为 30 ~ 31℃,超过 33℃,菌体迅速老化,超过 35℃,菌体基本丧失生产 L-异亮氨酸的能力,而此时菌体会分泌大量的杂酸。随着对数生长期的来临,耗糖速度加快。一般 16 h 以后,就需观察发酵罐内菌体每 4 h 的耗糖情况。我们一般控制每个周期(4 h 为一周期)耗 1% ~ 1.2% 的葡萄糖。如果每个周期耗糖 > 1%,则温度降低 0.5℃; > 1.2%,则温度降低 1℃; > 1.5%,则温度降低 2℃。通过我们观察和实践,效果相当好。这样控制耗糖,主要还是控制酸糖转化率。发酵至 48 h 后,如果低温控制,耗糖、产酸均会变慢,发酵周期会延长,实际生产中我们此时仍然根据耗糖情况控制温度,但与前面正好相反。如果每个周期耗糖 < 1%,则温度上升 0.5℃; < 0.8%,则温度上升 1℃。这样会获得最佳产酸、最佳酸糖转化率和合适的周期。按照这样的温控模式,副生杂酸也少。这可能是菌体活力最旺盛的时候, L-异亮氨酸的酶活力最强。温度控制偏高时,由于不同代谢途径的酶系发生变化而导致代谢流发生变化,从而导致部分糖转化成为杂酸。图 4 是 L-异亮氨酸温控与耗糖曲线模式图。

2.6 pH 值对发酵产酸的影响

通过流加液氨来维持发酵过程中的 pH 值,这样可同时补充发酵过程中所需的氮源。前期控制在 6.4 ~ 6.6,中后期控制在 6.7 ~ 6.9,中后期高 pH 值的原因是此阶段抑制菌体的生长,并且补充充足的氮源。在使用 Apsm533128 菌进行 L-异亮氨酸发酵时, pH 值不能超过 7.0,特别是在流加尿素时,超过 7.0 以上, pH 值一般降不下来,直接会影响发酵产酸的水平。

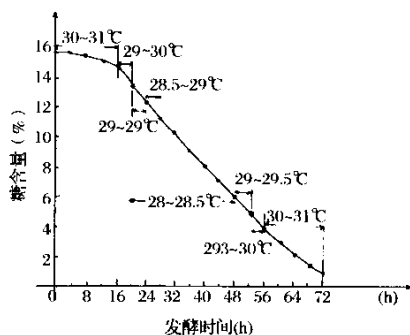


图 4 L-异亮氨酸温控与耗糖曲线模式图

1 温度范围 30 ~ 31℃; 2-29 ~ 30℃; 3-29 ~ 29.5℃; 4-28.5 ~ 29℃; 5-28 ~ 28.5℃; 6-29.5 ~ 30℃

2.7 L-异亮氨酸发酵动力学的初步研究

以上我们对 L-异亮氨酸发酵过程中的内环境和外界环境条件进行了讨论,结合发酵过程中的数据对 L-异亮氨酸发酵动力学进行了初步研究,对菌种的产酸过程作了一个动态分析,以便在工业化大生产过程中对菌种的产酸能力更好地掌握。表 3 是研究 L-异亮氨酸发酵动力学的一些数据。其中:

OD_{562nm} : 菌体浓度(菌体生长数量的量化值);
 S : 葡萄糖质量浓度, g/L; I : 发酵液中 L-异亮氨酸的质量浓度, g/L; t : 发酵时间, h。

并以 Δt , ΔOD_{562nm} , ΔS , ΔI 计算出 $(\Delta OD_{562nm}/\Delta t)$ 长菌速度, $(\Delta S/\Delta t)$ 耗糖速度, $(\Delta I/\Delta t)$ 产酸速度, $(\Delta I/\Delta S)$ 酸糖转化率, 和比菌生长速率 $(1/OD_{562nm}) \times (\Delta OD/\Delta t)$, 比耗糖速率 $(1/OD_{562nm}) \times (\Delta S/\Delta t)$ 及比产酸速率 $(1/OD_{562nm}) \times (\Delta I/\Delta t)$ 。

从表 3 中可以看出,在 24 ~ 48 h 之间,菌体的活性最强,这从耗糖速率、产酸速率也可以看出,在这段时间内的数值最高。因此,控制好 24 ~ 48 h 之间的工艺条件是发酵高产酸的关键;从长菌阶段来看,8 ~ 32 h 是长菌的高峰期,从 16 h 则进入对数生长

期,这从长菌速率中可以看出。控制这段时间内的长菌速率是整个发酵周期的基础,从而防止菌种在这阶段“未老先衰”,而要提高转化率,则必须从16 h后开始控制其耗糖速率,这就需要温度来调节。从

16 h至48 h把耗糖速率控制住,也就获得了高产酸高转化率。因此,研究L-异亮氨酸的发酵动力学,对工业化大生产有着极其重要的指导意义。

表3 L-异亮氨酸发酵动力学研究数据表

项 目	时间/h									
	0	8	16	24	32	40	48	56	64	72
Δt	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8
OD_{562nm}	0.03	0.05	0.20	0.45	0.91	1.15	1.20	1.25	1.25	1.25
S	158.0	156.0	146.0	125.0	99.0	75.0	48.0	28.0	12.0	3.5
I	0	0	1.2	5.3	9.5	14.0	19.1	22.5	24.1	24.8
ΔOD_{562nm}		0.02	0.15	0.25	0.46	0.14	0.05	0.05	0	0
ΔS		2.0	10.0	21.0	26.0	24.0	27.0	20.0	16.0	9.5
ΔI		0	1.20	4.10	4.20	4.50	4.90	3.40	1.60	9.5
长菌速度		0.0025	0.0187	0.0312	0.0575	0.0175	0.0062	0.0062	0	0
耗糖速度		0.25	1.25	2.6625	3.25	3.00	3.375	2.50	2.0	1.1875
产酸速度		0	0.15	0.5125	0.525	0.5625	0.6125	0.425	0.20	0.0875
酸糖转化率		0	0.12	0.1952	0.1615	0.1875	0.1815	0.17	0.10	0.0739
比菌生长速率		0.05	0.0938	0.0694	0.0632	0.0152	0.0052	0.0050	0	0
比耗糖速率		5.0	6.25	5.83	3.57	2.61	2.81	2.00	1.60	0.95
比产酸速率		0	0.75	1.14	0.58	0.49	0.51	0.34	0.16	0.07

3 结 论

(1)本文系统地研究了Apsm533128(*Brevibacterium flavum*)菌发酵生产L-异亮氨酸的工艺条件及动力学。确定了合适的葡萄糖和玉米浆浓度,找出了发酵过程中合适的通气比以及合适的pH值控制,提出了温度控制的新观点和新的控制模式,找出了最佳产酸和最高酸糖转化率的控制模式。对L-异亮氨酸工业化大生产具有重要的意义。

(2)提出了温度控制和耗糖之间的关系,从而找出了提高酸糖转化率的最佳方式。

(3)在合适的条件下,Apsm533128菌产酸高,副生杂酸少,L-异亮氨酸产酸率达2.3%~2.5%,酸糖转化率达15%~16%,在国内处于领先水平。

参 考 文 献

- 1 张伟国,钱和.氨基酸生产技术及其应用.北京:中国轻工业出版社,1997. 252~257
- 2 李玲阁.氨基酸杂志论文集,C1982 47
- 3 唐天任.微生物学报,1978(1):45~51

- 4 浦军平.大连轻工业学院学报,1999,18(4):298~301
- 5 浦军平,郭永复.大连轻工业学院学报,1998,17(3):68~70
- 6 冯容宝.发酵科技通信,2000(29):1~4
- 7 张磊.生物工程学报,1993(2):175~180
- 8 张伟国.发酵科技通讯,1996(1):1~5
- 9 浦军平.大连轻工业学院学报,2000,19(2):121~123
- 10 刘党生.沈阳药学院学报,1987,10(3):194~197
- 11 郑英美,陈坚等.无锡轻工业大学学报,1999,18(6):82~86
- 12 石渡昭男.日本特许公报,1975(20):874
- 13 北京大学生物系生物化学教研室.生物化学实验指导.北京:北京高等教育出版社,1990. 96~99
- 14 天津轻工业学院等.微生物学.北京:北京工业出版社,1982. 156~160
- 15 于信令.味精工业手册.北京:中国轻工业出版社,1995. 41~84
- 16 张克旭.氨基酸发酵工艺学.北京:中国轻工业出版社,1992. 127~129
- 17 张克旭.氨基酸发酵工艺学.北京:中国轻工业出版社,1992. 583~586
- 18 许正宏等.食品与发酵工业,2002,28(5):14~17