

L-鸟氨酸发酵用培养基的改进研究

蔡 恒, 陆 彬, 万红贵, 朱庆平, 王 涛

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京, 210009)

摘 要 利用价格低廉的废酵母制作酵母水解液替代酵母浸膏做有机氮源, 加入丁二酸做调控物对产 L-鸟氨酸的谷氨酸棒杆菌进行发酵培养。结果表明, 使用废酵母作为有机氮源后, L-鸟氨酸的产量增加了 26.4%。加入 1.0% 的丁二酸, L-鸟氨酸的产量提高了 10.4%。

关键词 谷氨酸棒杆菌, L-鸟氨酸, 培养基

L-鸟氨酸(L-ornithine)作为尿素循环的中间代谢产物, 对氨态氮的排出及解除氨中毒有重要的作用。随着研究的深入, L-鸟氨酸现已广泛应用于功能性饮料、减肥保健产品及护肝抗癌药品等诸多领域^[1~4]。目前, 国内外有不少厂家利用发酵法和转化法生产 L-鸟氨酸, 市场竞争日益激烈, 如何降低成本, 提高产量成为很多研究者和生产者所关注的焦点。人们先后从菌种的改良构建, 工艺条件的优化, 发酵方式的选择等方面进行了探索, 并取得了良好的成效^[5~8]。关于 L-鸟氨酸发酵, 目前尚未看到从培养基的改进着手来降低成本和提高发酵水平的报道。笔者利用廉价酵母水解液代替酵母浸膏作为有机氮源, 并通过在发酵液里添加调控物来提高 L-鸟氨酸发酵水平, 取得了良好的效果。

1 材料与方法

1.1 菌种

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*), 南京工业大学微生物保藏室保存。

1.2 培养基

保藏培养基(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, NaCl 5, 琼脂 20, pH 7.0~7.2。

活化培养基(g/L): 葡萄糖 1, 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, NaCl 5, 琼脂 20, pH 7.0~7.2。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 25, 玉米浆 10, 酵母浸膏 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5, KH_2PO_4 1, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 7.6~7.8, 0.1 MPa 灭菌 10 min。

初始发酵培养基(g/L): 葡萄糖 90(单独灭菌), 酵母浸膏 30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5.98, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 22.38 mg/L, pH 7.6~7.8, 0.1 MPa, 灭菌 10 min。

1.3 培养方法

种子培养: 接 1 环生长良好的斜面种子至装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中, 置于旋转式摇床上, 200 r/min, 30℃ 振荡培养 10h。

摇瓶发酵培养: 将种子培养液接入装有 30 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 接种量为 3.3%, 置于旋转式摇床, 200 r/min, 30℃ 振荡培养 72h。

5L 发酵罐发酵培养: 用江苏绿环 XWB-5L 生化反应器, 装液量为 3L, 接种量为 3.3%。设置 pH 6.8、温度 30℃、转速 500r/min。发酵时间约 65h。

酵母水解液的制备: 选择了 3 种水解酵母的方法: (1) 自溶法^[9]; (2) 盐酸水解法^[10]; (3) 硫酸水解法。

水解之后用 NaOH 将 pH 调到 7.6, 制得含酵母干物质为 20% 的酵母水解液。

1.4 分析方法

发酵液中残糖测定: 采用 SBA-40 系列生物传感分析仪测定。

生物量测定: 将发酵液稀释 50 倍, 在波长 660 nm 处用 752 型分光光度计测定。

pH 值测定: 用 pH S-3C 型精密 pH 计测定。

L-鸟氨酸含量的测定: 采用反相高效液相色谱 (Alltech 4.6 mm × 250 mm) 和蒸发光散射检测器 (Alltech ELSD 2000) 进行分离和测定。

2 结果与讨论

2.1 不同酵母水解液对 L-鸟氨酸发酵的影响

用 NaOH 调酵母水解液 pH 至 7.6, 在发酵培养基里分别用酵母水解液 50 g/L 取代酵母浸膏进行发

第一作者: 博士(万红贵研究员为通讯作者)。

收稿日期: 2007-04-25

酵实验,结果如表1所示。

表1 不同酵母水解液对产L-鸟氨酸发酵的影响

指 标	初始发酵培养基	酵母水解方法		
		自溶法	盐酸水解法	硫酸水解法
L-鸟氨酸/g·L ⁻¹	31.32	12.12	27.34	30.23
OD 值	0.670	0.184	0.634	0.646
残糖/g·L ⁻¹	0	35	0	0

从表1可以看出,采用硫酸水解方法制得的酵母水解液最适宜L-鸟氨酸的发酵。在含酵母水解液50g/L时,其产酸接近初始发酵培养基的水平。盐酸水解法次之,自溶法最差。与酸水解法相比,自溶法

酵母水解得不彻底,很多养分没能释放出来,故发酵结束后,菌体含量较低,残糖高,产酸也较低。而使用酸水解法制备水解液时,由于用NaOH调pH,在酸水解发酵液中会含有大量的Cl⁻和SO₄²⁻,正如优化无机氮源时,(NH₄)₂SO₄优于NH₄Cl的原因一样,Cl⁻对产酸有影响^[7]。由于硫酸价格较低,用量少,产酸高,故在以后的实验中采用硫酸水解酵母的方法制取水解液,取代发酵培养基中的酵母浸膏。

2.2 不同酵母水解液含量对L-鸟氨酸发酵的影响

用不同量的酵母水解液取代发酵培养基中的酵母浸膏进行发酵,实验结果如表2所示。

表2 不同酵母水解液含量对L-鸟氨酸发酵的影响

指 标	初始发酵培养基	酵母水解液含量/g·L ⁻¹				
		33.0	50.0	67.0	84.0	101.0
L-鸟氨酸/g·L ⁻¹	30.94	19.09	30.53	37.47	29.93	26.87
OD 值	0.684	0.389	0.627	0.668	0.794	0.904
残糖/g·L ⁻¹	0	19	0	0	0	0

从表2可以看出,OD值是随酵母水解液的增加而递增,但是其产酸水平却是呈抛物线形式变化的。当发酵培养基中含硫酸酵母水解液为67.0g/L,即含酵母干物质13.4g/L时,L-鸟氨酸产量最高,为37.47g/L,超过了初始发酵培养基的水平,说明用自制酵母水解液取代发酵培养基中的酵母浸膏是成功的。至于产量高于初始发酵培养基的含量,可能是因为酵母水解成水解液之后,没有经过较多的后续处理,直接当作有机氮源使用,其营养成分比经过后续处理的酵母浸膏丰富所致。

2.3 调节pH的方式对L-鸟氨酸发酵的影响

酵母水解液的pH值较低,要用较多的碱性物质调节。实验中分别采用了CaO、NaOH、NH₃·H₂O对酵母水解液回调pH至7.6。结果如表3所示。

表3 调节pH的方式对L-鸟氨酸发酵的影响

指 标	初始发酵培养基	pH调节方式		
		CaO	NaOH	氨水
L-鸟氨酸/g·L ⁻¹	31.07	35.56	37.12	39.26
OD 值	0.661	0.637	0.671	0.676
残糖/g·L ⁻¹	0	0	0	0

从表3中可以看出,用氨水回调pH得到的L-鸟氨酸含量最高,为39.26g/L。这可能是由于用其他2种物质回调pH,带来了大量的Na⁺和Ca²⁺,较多的Na⁺会对Na、K-ATP酶系统造成影响,而ATP水解直接偶联鸟氨酸的运输^[11]。另一方面,虽然大量的Ca²⁺与SO₄²⁻反应生成CaSO₄,但由于CaSO₄

微溶于水,游离出的Ca²⁺可以和磷酸盐和磷酸氢盐反应生成沉淀,在中性和碱性条件下尤为如此,这样就会引起磷酸盐的降低。

2.4 丁二酸在5L罐中对L-鸟氨酸发酵的调控实验

丁二酸是三羧酸循环的中间代谢物,它对乙醛酸循环途径中的异柠檬酸裂解酶有抑制作用^[12]。由于四碳二羧酸是由CO₂的固定反应和乙醛酸循环所提供,添加丁二酸减弱乙醛酸循环,增加CO₂固定反应所占的比例,即增加了对CO₂的利用。这样便有可能提高L-鸟氨酸的产率。

在摇瓶中添加丁二酸,研究它对L-鸟氨酸发酵的调控试验,结果不理想,发现L-鸟氨酸的含量偏低,终点pH很高,可达到7.8~8.1,高于正常发酵终点pH 6.6~6.8。考虑到可能是随着丁二酸的消耗,培养基的pH发生了较大的变化,导致了发酵实验的失败。于是按照1.3的培养方法在5L的发酵罐中进行实验。结果表4所示。

表4 丁二酸的添加量与L-鸟氨酸产量的关系

丁二酸添加量/g·L ⁻¹	0	5	10	15
L-鸟氨酸产量/g·L ⁻¹	39.23	40.96	43.31	43.73

从表4的结果可以看出,在发酵培养基中添加丁二酸有助于提高L-鸟氨酸的含量,10g/L的添加量较为合适。

3 结 论

以硫酸水解法制得的酵母水解液较适于用作L-

鸟氨酸发酵培养基中酵母膏的替代有机氮源。当使用氨水回调 pH 的酵母水解液(加量为 67g/L)作为有机氮源时, L-鸟氨酸的产量达到 39.26g/L, 产率提高了 26.4%。加入 1.0% 的丁二酸, L-鸟氨酸产量又提高 10.4%。改进后的 L-鸟氨酸发酵培养基, 降低了生产成本, 提高了发酵产率, 适宜于工业化生产。

参 考 文 献

- 董文明, 焦凌梅, 谷大海. 功能饮料的发展[J]. 农村实用工程技术, 2005, (3): 52~53
- 胡学智. 具有广泛保健功能的 L-鸟氨酸[J]. 食品工业, 2006, (1): 48
- 洪 艳, 杨正兵, 王玉芳. 门冬氨酸鸟氨酸治疗亚临床肝性脑病的临床对照研究[J]. 华西医学, 2003, 18(4): 509~510
- 史建军, 邵汛帆, 陈冬平, 等. 门冬氨酸鸟氨酸在恶性淋巴瘤伴乙肝病病毒感染化疗中的保护作用[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(1): 57~58
- Tsuchida, Takayasu, Uchibori, et al. Process and microorganism for producing L-ornithine by *Corynebacterium*, *Brevibacterium* or *Athrobacter* [P]. US 5,188947. 1993
- 刘爱福. L-鸟氨酸的制备方法[P]. CN 1594282A, 2005
- 万红贵, 叶 慧, 陆 彬, 等. L-鸟氨酸发酵培养基的中心复合优化[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 37~40
- Hong-Woen Lee, Sun-Jun Yoon, Hyung-Wook, et al. Effects of Mixing on Fed-Batch Fermentation of L-Ornithine[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(06): 539~544
- 陶玉贵, 姚宏平, 余凤琳, 等. 利用啤酒酵母水解液酿造营养酱油[J]. 安徽机电学院学报, 2001, 16(3): 39~44
- 韦 萍, 陈育如, 张赣道, 等. 发酵母水解制备复合氨基酸调味液[J]. 江苏化工, 1997, 25: 33~35
- 沈 萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 93~94
- Wendisch V F, Spies M, Reinscheid D J, et al. Rdgulation of acetate metabolism in *Coryne bacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitratelase and malate synthase genes. Arch[J]. Microbiol, 1997, 168: 262~269

Improvement of the Medium for L-ornithine Fermentation

Cai Heng, Lu Bin, Wan Honggui, Zhu Qingping, Wang Tao

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT The fermentation of L-ornithine by *Corynebacterium glutamicum* was studied by using the low cost organic nitrogen source of yeast hydrolysate instead of the original yeast extract and adding the succinic acid to the medium as the control agent. The results suggested that the yield of L-ornithine was increased 26.4% by using yeast hydrolysate as organic nitrogen source and 10.4% by adding 1.0% succinic acid.

Key words *Corynebacterium glutamicum*, L-ornithine, medium

信
息
窗

德国科学家研发出超低脂肪香肠

德国研究人员研发出一种超低脂肪含量的香肠, 这种香肠的脂肪含量从通常的 25%~40% 降低到 2%, 是肉类脂肪低含量的极限。这种超低脂肪香肠由德国巴伐利亚州明德海姆肉商与德国著名的夫琅禾费研究所共同研发, 研究成果一经推出立即引起了世界各国科学家的兴趣。

这种香肠看上去、闻起来跟普通香肠别无二致, 吃起来味道和意大利的沙拉密香肠非常相似, 但手感较软。发明这一低脂香肠是受客户的启发, 由于越来越多的女性顾客经常抱怨香肠的脂肪含量太高, 于是决心来一次彻底的“香肠革命”。

虽然现在市场上已有脂肪含量较低的香肠片, 但是大部分低脂香肠的脂肪含量仍在 10%~20% 之间。降低香肠脂肪含量的做法一般是添加家禽肉, 但此种香肠是利用天然的猪肉及牛肉制作低脂香肠。并对肉类进行了细致的纤维分解, 除去肉类本身的肥肉、肉皮或软骨, 取而代之的是水。

德国促进健康与饮食研究中心的营养专家认为, 超低脂肪香肠新技术开创了一个新纪元。但低脂香肠仍存在一个缺陷, 那就是不能暴露在空气中, 因为香肠中的水分在高温下容易蒸发, 这意味着这种低脂香肠比普通香肠脱水速度更快。