

L-亮氨酸发酵培养基及基本发酵条件的优化

常珠侠

(安徽丰原发酵技术工程研究有限公司, 安徽 蚌埠 233010)

摘要: 以黄色短杆菌 FY-18 为出发菌株, 利用摇瓶发酵生产 L-亮氨酸, 并利用正交试验和单因素试验分别对其发酵培养基和基本发酵条件进行研究, 从而优选出最佳培养基组分和培养条件参数。结果表明, L-亮氨酸发酵培养基的最适配比为: 葡萄糖 160 g/L、豆粕水解液 20 g/L、玉米浆 20 g/L、毛发粉 15 g/L、硫酸铵 70 g/L; 其发酵最佳培养条件为: 初始 pH 7.2, 培养温度 32 ℃, 发酵接种量为 10%。在上述最佳条件下摇瓶中发酵的产酸量为 22.5 g/L。

关键词: L-亮氨酸; 菌种; 发酵; 正交试验

中图分类号: TQ922 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)04-0007-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.04.003

Optimization of Medium Components and Cultural Conditions of L-leucine

CHANG Zhu-xia

(Anhui BBFA Fermentation Technology Engineering Research Co., Ltd., Bengbu Anhui 233010, China)

Abstract: *Brevibacterium flavum* FY-18 was used as original strain to produce L-leucine by shaking flask fermentation. The orthogonal experiments and single factor experiments were adopted to optimize the fermentation culture medium and conditions of L-leucine. The results indicated that the optimized compositions of medium were 160 g/L glucose, 20 g/L soybean meal hydrolysate, 20 g/L corn steep liquor, 15 g/L hair powder and 70 g/L ammonium sulfate, and the fermentation conditions were initial pH at 7.2, 32 ℃ and inoculum 10%. Under the optimized fermentation conditions the production of L-leucine was up to 22.5 g/L.

Key words: L-leucine; Strain; Fermentation; Orthogonal Experiment

氨基酸是构成蛋白质的基本单位, 是生物体内不可缺少的营养成分, 在生物体内具有特殊的生理功能, 参与细胞中多种化合物的合成代谢。

L-亮氨酸是常见的 18 种氨基酸之一, 也是人体 8 种必需氨基酸之一, 于 1819 年由 Proust 首先从奶酪中分离得到, 后来 Braconnot 从肌肉与羊毛的酸

收稿日期: 2015-02-11

作者简介: 常珠侠(1962—), 女, 安徽蚌埠人, 高级工程师, 主要从事生物工程技术研究。联系电话: (0)18055263388。E-mail: changzhuxia6209@163.com

5 栽培技术要点

种植前精耕细作、施足底肥, 灌足冬水保墒。种植时避免重茬。春季地表解冻后、气温在 1 ℃ 以上时可以播种, 通常播前结合整地施腐熟农家肥 45 000 ~ 60 000 kg/hm²、尿素或硫酸铵复合肥 150 ~ 300 kg/hm²、磷酸二铵 300 kg/hm² 做种肥。播量沿黄灌区以 570 万 ~ 630 万粒 /hm² 为宜, 高寒阴湿区和二阴地区以 525 万 ~ 570 万粒 /hm² 为宜。在水肥较高的地区种植时要注意氮、磷合理配比, 适当加大磷肥用量。有灌溉条件的地区要灌好拔节水、扬花水、灌浆水, 适时追肥 (以尿素 75 ~ 150 kg/hm² 为宜), 及时防治田间病虫害及防除杂草; 结合中期灌水及时追肥。7 月上中旬左右蜡黄时适时收获。

参考文献:

- [1] 杨随庄, 杨晓燕, 张华瑜. 优质丰产抗病春小麦新品种陇春 21 选育报告[J]. 甘肃农业科技, 2001(6): 12-13.
- [2] 李景琦, 王成社, 杨进荣, 等. 优质丰产抗病花培新品种陕农 28 选育报告[J]. 甘肃农业科技, 2003(2): 10-11.
- [3] 康明辉, 海燕. 高产多抗小麦新品种花培 1 号的选育[J]. 河南农业科学, 2007(8): 34-35.
- [4] 王兴荣, 祁旭升, 苟作旺, 等. 春小麦新品种陇春 28 号选育报告[J]. 甘肃农业科技, 2011(3): 3-4.
- [5] 王 炜, 杨随庄, 叶春雷, 等. 花培春小麦新品种陇春 31 号选育报告[J]. 甘肃农业科技, 2014(2): 3-5.

(本文责编: 陈 伟)

水解物中得到其结晶。

L-亮氨酸在医药、食品、饲料、化妆品等行业具有重要用途。由于 L-亮氨酸和 L-异亮氨酸、L-缬氨酸的分子结构中都含有一个甲基侧链，故被称为支链氨基酸^[1-2]。在医药行业，L-亮氨酸主要用于复合结晶氨基酸静脉注射液，可维持危重病人的营养需求。L-亮氨酸还可用于合成具有抗癌、抗病毒、抑制细菌生长等生物活性的 L-亮氨酸 Schiff 碱 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 配合物。另外，选用 L-亮氨酸作为氨基酸部分的 N-稀有脂肪酰基-L-亮氨酸具有较高抗菌活性^[1]。还有学者发现，亮氨酸的添加可抑制败血症引起的骨骼肌蛋白质合成减少，从而缓解其带来的体重下降等负面效应。L-亮氨酸可用于诊断和治疗小儿突发性高血糖症和作为头晕治疗及营养滋补类药物。L-亮氨酸与稀土的配合物是氨基酸肥料和农药的一种，不仅能增产，防止农作物病虫害，并且能被日光和微生物降解，是目前深受人们喜爱的“绿色农药”。由 L-亮氨酸合成的多聚物是临时创伤敷料的最佳原料之一，也极具发展潜质^[3]。

由于 L-亮氨酸在多个行业均有重要应用，而目前总体状况是供不应求，故有关其生产的研究，特别是微生物发酵法生产 L-亮氨酸是未来一段时间内极为重要的研究领域。我们利用黄色短杆菌 FY-18 对发酵生产 L-亮氨酸的工艺条件进行了初步优化研究，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 黄色短杆菌 FY-18 为安徽丰原发酵技术工程研究有限公司菌种室保藏。

1.1.2 仪器设备 培英 DZ-900 振荡器（太仓市实验设备厂）；7230G 可见分光光度计（上海精密科学仪器有限公司）；高效液相色谱仪（Agilent 1200，安捷伦科技有限公司）；生物传感分析仪 SBA-40C（山东省科学院生物研究所）等。

1.1.3 培养基 种子液体摇瓶培养基（100 mL）：葡萄糖 2.00 g，磷酸氢二钾 0.50 g，硫酸镁 1.00 g，硫酸亚铁 0.02 g，硫酸铵 0.50 g，豆粕水解液 150 mg，蛋氨酸 40 mg，玉米浆 0.50 g，谷氨酸 4.00 g，琼脂粉 1.50 g。发酵液体摇瓶培养基（100 mL）：葡萄糖 10.00 g，磷酸氢二钾 0.50 g，硫酸镁 0.50 g，硫酸亚铁 0.02 g，硫酸铵 7.00 g，豆粕水解液 2.00 g，蛋氨酸 60 mg，玉米浆 2.00 g，毛发粉 1.50 g，

L-异亮氨酸 5 mg。

1.2 试验方法

1.2.1 种子固体平板培养方法 将上述种子液体摇瓶培养基添加 1.5% 琼脂粉后制得平板培养基，再用 NaOH 调 pH 至 7.0，121 °C 30 min 灭菌后，冷却至 50 °C 以下，待平板培养基凝固后涂布接种，并在恒温培养箱中 32 °C 培养 24 h，待用。

1.2.2 种子液体摇瓶培养方法 将上述种子培养基配制完成后，用 NaOH 调 pH 至 7.2，121 °C 灭菌 20 min，每只摇瓶中添加 4 g CaCO_3 （预先 150 °C 干热灭菌准备好），从固体平板上选取一接种环的菌体接入摇瓶中，装液量为 100 mL/500 mL，培养条件 31.5 °C，摇床转速 200 r/min。种子合格标准为：培养时间约 24 h，菌体 OD 值（620 nm）1.2。

1.2.3 发酵液体摇瓶培养方法 将上述发酵培养基配制完成后，用 NaOH 调 pH 至 7.2，121 °C 灭菌 20 min，每只摇瓶中添加 4 g CaCO_3 （预先 150 °C 干热灭菌准备好），从培养合格的种子液中吸取 1 mL 菌液接入摇瓶中，装液量为 100 mL/500 mL，培养条件 31.5 °C，摇床转速 300 r/min。

1.2.4 分析和测定方法^[4] ① L-亮氨酸液相测定。将发酵液做一定处理后，用高效液相色谱法定量测定发酵液中游离的 L-亮氨酸含量。② 发酵液菌体浓度测定。发酵液中菌体浓度采用菌体溶液吸光度 $A_{620\text{nm}}$ 表示。取发酵液 0.5 mL，加入 9.5 mL 0.1 mol/L 稀盐酸中和碳酸钙，混匀，分光光度计 620 nm 波长下用蒸馏水做空白进行比色，比色结果记为 $A_{620\text{nm}}$ 。③ 发酵液残糖的测定。采用生物传感分析仪进行残糖的测定。

2 结果与分析

2.1 利用正交试验对发酵培养基关键组分含量的优化

对于发酵产酸而言，种子培养基的作用主要在于培养得到较多的菌体，而发酵培养基的组成及含量对于产物的合成速度及产量有着更至关重要的影响。因此有必要对发酵培养基进行研究，通过小试试验得到的数据，并对试验结果进行整理和分析，从而优选出最佳的发酵培养基配方。

L-亮氨酸发酵培养基配方的关键组分有葡萄糖(A)、豆粕水解液(B)、玉米浆(C)、毛发粉(D)、硫酸铵(E)等^[5]。其中，葡萄糖是碳源，也是能源，所以需要优先考虑葡萄糖对发酵的影响；豆粕水解液、玉米浆、毛发粉等是有机氮源，其中

含有微生物生长所必需的部分微量元素、氨基酸、维生素等，也是发酵培养基的重要组成成分；而硫酸铵是无机氮源，这些都是发酵培养基的关键因素。通过 $L_{16}(4^5)$ 正交试验对菌株的发酵培养基的关键营养成分进行优化，其结果见表 1 和表 2。

如表 2 所示，主要亮氨酸产量指标。对其分析计算，如 $K_x = N_1 + N_2 + N_3 + N_4$ (x 为 1、2、3、4， N 即为 A、B、C、D、E)， $k_x = K_x / 4$ 。得到最优方案为 A4B3C3D3E4，即葡萄糖 160 g/L、豆粕水解液 20 g/L、玉米浆 20 g/L、毛发粉 15 g/L、硫酸铵 70 g/L。以此最优方案为发酵培养基配方的主要成分的含量为条件，得出试验结果为 22.5 g/L，即最佳产酸结果。

表 1 $L_{16}(4^5)$ 正交试验因子水平

水平	因素				
	A 葡萄糖 (g/L)	B 豆粕水解液 (g/L)	C 玉米浆 (g/L)	D 毛发粉 (g/L)	E 硫酸铵 (g/L)
1	100	10	10	5	40
2	120	15	15	10	50
3	140	20	20	15	60
4	160	25	25	20	70

表 2 $L_{16}(4^5)$ 正交试验数据及结果分析

试验号	A	B	C	D	E	L-亮氨酸 (g/L)
1	1	1	1	1	1	5.1
2	1	2	2	2	2	7.3
3	1	3	3	3	3	15.4
4	1	4	4	4	4	12.3
5	2	1	2	3	4	15.4
6	2	2	1	4	3	11.7
7	2	3	4	1	2	13.4
8	2	4	3	2	1	12.7
9	3	1	3	4	2	12.1
10	3	2	4	3	1	12.6
11	3	3	1	2	4	14.7
12	3	4	2	1	3	14.9
13	4	1	4	2	3	17.5
14	4	2	3	1	4	19.6
15	4	3	2	4	1	14.3
16	4	4	1	3	2	16.7
K_1	40.100	50.100	48.200	53.000	44.700	
K_2	53.200	51.200	51.900	52.200	49.500	
K_3	54.300	57.800	59.800	60.100	59.500	
K_4	68.100	56.600	55.800	50.400	62.000	
k_1	10.025	12.525	12.050	13.250	11.175	
k_2	13.300	12.800	12.975	13.050	12.375	
k_3	13.575	14.450	14.950	15.025	14.875	
k_4	17.025	14.150	13.950	12.600	15.500	
极差(R)	7.000	1.925	2.900	2.425	4.325	

2.2 利用单因素试验对发酵培养基基本条件的优化

生物发酵过程实际上是由众多生物化学反应所构成的综合反应过程，除了目的产物之外，还

会生成许多副产物。而影响发酵过程的几大关键因素，例如培养温度、培养基初始 pH 和种龄等控制参数的变化对发酵产物的生成速率、产量以及副产物的形成都有着显著的影响。因此，需要通过摇瓶的单因素对照试验来确定上述最佳的基本条件参数^[6]。

2.2.1 培养温度的优化 温度是影响微生物生长代谢的基本环境因素之一。微生物发酵产物的生成、菌体的生长与繁殖都与相关生物化学反应中酶的活性有着直接的关系，而酶活对温度的变化很敏感，合适的温度将有利于酶促反应，促进目的产物的产量。试验利用摇瓶培养方式进行 L-亮氨酸的发酵，考察 26 ~ 36 °C 时菌株的生长和产酸情况，从而优选出最佳的培养温度。

试验利用摇瓶进行培养发酵，除温度以外，其他的培养条件均相同，培养 30 h 后，分别对不同摇瓶的 L-亮氨酸含量进行测定并进行对照分析。由图 1 可知，32 °C 为 L-亮氨酸最佳的培养温度，30 h L-亮氨酸含量达到 23.6 g/L。而 26 °C 和 36 °C 时，L-亮氨酸含量分别为 18.3 g/L 和 15.8 g/L。可见，由于温度对菌体生长及发酵相关酶系的影响，过高或过低的温度都极大地影响 L-亮氨酸的发酵水平。

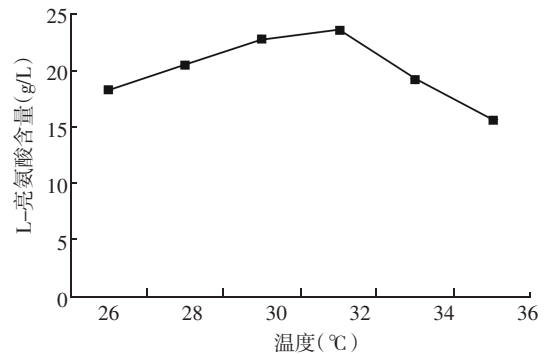


图 1 不同培养温度对 L-亮氨酸含量的影响

2.2.2 发酵接种量的优化 接种量是指移入种子液的体积和接种后培养液体积的比例。接种量的大小决定生产菌种在发酵罐中生长繁殖的速度，采用较大的接种量可以缩短发酵罐中菌株繁殖达到高峰的时间，使产物的形成提前到来，并可减少杂菌的生长机会。但接种量过大或者过小，均会影响发酵。过大会引起溶氧不足，影响产物合成，而且会过多移入代谢废物，也不经济；过小会延长培养时间，降低发酵罐的生产率。

试验利用摇瓶进行培养发酵，发酵摇瓶的接

种方式为利用无菌操作吸取同一瓶成熟的种子培养液, 然后按照不同的接种量添加入发酵摇瓶进行培养, 其他的培养条件均相同, 在培养 30 h 后, 分别对不同摇瓶的 L-亮氨酸含量进行测定并进行对照分析。如图 2 所示, 10% 为最佳的接种量, 用 10% 的接种量培养 30 h 时, L-亮氨酸的含量达到 22.5 g/L; 用 12% 的接种量时, L-亮氨酸的含量也达到 22.3 g/L。而接种量为 6% 时, L-亮氨酸的产量最低, 其次是接种量 16%。分析原因为接种量过小, 造成前期菌量少, 生长停滞期较长, 从而延长了整个发酵周期; 接种量过大时, 耗氧旺盛, 而摇瓶中往往通气条件受限, 造成溶氧过低影响发酵。

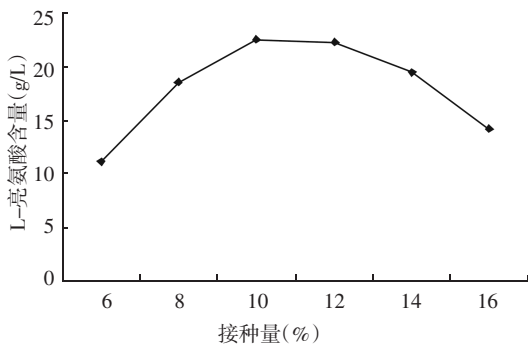


图 2 不同接种量对 L-亮氨酸含量的影响

2.2.3 初始 pH 的优化 微生物培养环境的 pH 对其生长繁殖、营养代谢都有着极大的影响, 而不同种类的微生物以及不同产物的生产菌所需要的最适 pH 都有着很大差别, 因此, 有必要对 L-亮氨酸生产菌的最适产酸 pH 进行初步研究。

试验利用摇瓶进行培养发酵, 利用酸碱试剂对发酵摇瓶的初始 pH 进行调节, 其他的培养条件均相同, 在培养 30 h 后, 分别对不同摇瓶的 L-亮氨酸含量进行测定并进行对照分析。发酵所用菌种黄色短杆菌为肠道杆菌, 一般最适生长 pH 为 7.0 左右。如图 3 所示, 在摇瓶发酵中最高产酸的初始 pH 为 7.2, 其次为 pH 7.6, L-亮氨酸含量分

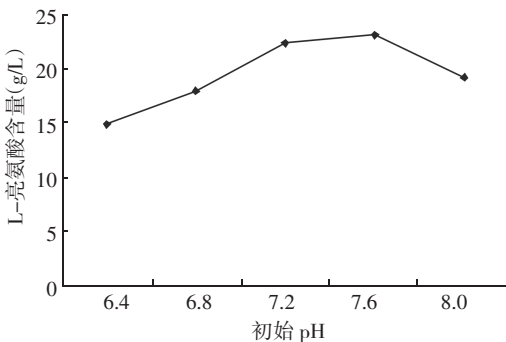


图 3 不同初始 pH 对 L-亮氨酸含量的影响

别为 22.5 g/L 和 23.2 g/L, 过高或过低的 pH 对其含量有着极大影响。考虑到摇瓶发酵不能调控 pH, 过程 pH 或因为发酵产生有机酸而不断下降, 造成中后期发酵受到抑制。因此, 在利用发酵罐进行 L-亮氨酸发酵, 且能够用碱液维持过程 pH 时, 控制 pH 为 7.2 可作为 L-亮氨酸发酵生产最佳培养条件。

3 小结与讨论

1) 利用摇瓶正交试验对发酵培养基中关键组分含量进行优化, 最终确定葡萄糖 160 g/L、豆粕水解液 20 g/L、玉米浆 20 g/L、毛发粉 15 g/L、硫酸铵 70 g/L 为发酵培养基组分最优化配方。通过摇瓶单因素对照试验, 最终确定产酸的最佳发酵基本培养条件为发酵接种量 10%, 培养温度 32 °C, 初始 pH 为 7.2。

2) 要实现 L-亮氨酸发酵的工业化生产, 还有许多研究工作要做。首先, 菌种还需要继续进行改良, 使其能耐更高的葡萄糖浓度、缩短发酵时间、提高 L-亮氨酸产量、减少杂质和杂酸的产生等。除了基本的诱变技术如紫外线诱变、化学制剂诱变等外, 体内、体外的基因重组等基因工程技术也可应用于构建性状优良的高产菌株, 例如细胞融合、转导、转化等。其次, 工业发酵的工艺参数也要进一步优化, 特别是逐级放大发酵的过程中, 大多数工艺参数都将有所变化, 要获得稳定的 L-亮氨酸产量就要不断摸索各种条件。L-亮氨酸的提取也是生产 L-亮氨酸很重要的一步工艺, 也可以从提取过程工艺条件的优化方面考虑生产的改良。

参考文献:

- [1] 中国医药集团上海化学试剂公司. 试剂手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
- [2] 伍时华, 方杰, 陈宁. L-亮氨酸高产菌的代谢控制育种[J]. 生物科技通讯, 2001, 12(3): 27-30.
- [3] 张克旭. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [4] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [5] FREUNDLICH M, BURNS RO, UMBARGER HE. Control of isoleucine, valine, and leucine biosynthesis. I. Multivalent repression [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1962, 48: 1 804-1 808.
- [6] UMBARGER HE, BROWN B. Threonine deamination in Escherichia coli. II. Evidence for two L-threonine deaminases [J]. J. Bacteriol, 1957, 73: 105-112.

(本文责编: 郑丹丹)