

重组谷氨酸棒杆菌发酵 L-苯丙氨酸培养基的优化

张传志^{1,4,5} 康振^{1,5} 堵国成^{1,3,5} 陈坚^{1,2,5} 余晓斌^{1,5*}

- (1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)
(2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)
(3. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)
(4. 食品安全与营养协同创新中心 江苏 无锡 214122)
(5. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】提高重组谷氨酸棒杆菌发酵 L-苯丙氨酸(L-phenylalanine, L-Phe)的产量。【方法】使用正交试验设计以及响应面优化法分别对种子培养基及发酵培养基进行优化,确定了重组谷氨酸棒杆菌发酵 L-Phe 的最佳种子培养基及最佳发酵培养基。【结果】重组谷氨酸棒杆菌发酵 L-Phe 最佳种子培养基(g/L): 葡萄糖 25.0, 玉米浆 25.0, 硫酸铵 15.0, 硫酸镁 1.0, 磷酸二氢钾 2.0, 尿素 2.0, pH 6.8–7.0; 最佳发酵培养基(g/L): 葡萄糖 110.0, 玉米浆 7.0, 硫酸铵 25.0, 硫酸镁 1.0, 磷酸二氢钾 1.0, 柠檬酸钠 2.0, 谷氨酸 1.0, 碳酸钙 25.0, pH 6.8–7.0; 在最佳培养基条件下 L-Phe 产量最高达到 9.14 g/L, 较优化前的 7.46 g/L 提高了 22.5%。【结论】通过正交试验和响应面分析对重组谷氨酸棒杆菌发酵 L-Phe 培养基进行优化,明显提高了 L-Phe 的产量,并确定了葡萄糖、玉米浆和硫酸铵为发酵培养基中影响 L-Phe 产量的 3 个关键因子。研究结果为 L-Phe 的发酵放大提供了依据。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, L-苯丙氨酸, 响应面优化, 正交试验

Optimization of the medium for L-phenylalanine production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*ZHANG Chuan-Zhi^{1,4,5} KANG Zhen^{1,5} DU Guo-Cheng^{1,3,5}
CHEN Jian^{1,2,5} YU Xiao-Bin^{1,5*}

- (1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)
(2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)
(3. The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)
(4. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Wuxi, Jiangsu 214122, China)
(5. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31200020); 江苏省科技支撑计划社会发展项目(No. BE2012632); 江苏省博士后基金项目(No. 1301010B)

***通讯作者:** Tel: 86-510-85918307; 信箱: zkang@jiangnan.edu.cn, xbyu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2014-04-21; **接受日期:** 2014-07-11; **优先数字出版日期(www.cnki.net):** 2014-07-30

Abstract: [Objective] In order to enhance production of L-phenylalanine (L-Phe) by recombinant *Corynebacterium glutamicum*, the composition of culture medium was optimized. **[Methods]** Using orthogonal experiment and response surface methodology, the optimal medium of seed and fermentation was obtained for the production of L-Phe by recombinant *C. glutamicum*. **[Results]** The optimal seed medium (g/L) was comprised of glucose 25.0, corn steep liquor 25.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15.0, MgSO_4 1.0, KH_2PO_4 2.0, Urea 2.0 and pH was 6.8–7.0. The optimal fermentation medium (g/L) contained glucose 110.0, corn steep liquor 7.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25.0, MgSO_4 1.0, KH_2PO_4 1.0, sodium citrate 2.0, glutamic acid 1.0, CaCO_3 25.0 and pH 6.8–7.0. Accordingly, L-Phe production (9.14 g/L) was increased by 22.5%. **[Conclusion]** The production of L-Phe was significantly increased after optimization and three key factors (glucose, corn steep liquor and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) were identified for the production of L-Phe through the orthogonal experiment and response surface analysis, which might provide a foundation for the scale-up culture in the future.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, L-phenylalanine, Response surface methodology, Orthogonal experiment

L-苯丙氨酸(L-Phenylalanine, L-Phe)是一种必需氨基酸, 人与动物自身不能合成, 必须从外界摄取。L-Phe 也是一种重要的医药和食品化学品中间体, 在医药行业中, L-Phe 是复配氨基酸输液的重要成分和氨基酸类抗癌药物苯丙氨芥、甲酰溶肉瘤素的合成原料; 在食品行业中, L-Phe 作为食品添加剂, 广泛应用于功能性食品的氨基酸平衡方面, 补充人体所需, 尤其应用于低热量、高甜度的二肽甜味剂阿斯巴甜(Aspartame)的合成, 随着阿斯巴甜的应用日益广泛, L-Phe 的市场需求量也迅速增加^[1-4]。

目前, L-Phe 的主要生产方式是微生物发酵法, 菌株主要有大肠杆菌(*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)和乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*)等^[2-3,5-8], 其中最主要的菌株是大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌^[7]。虽然大肠杆菌发酵生产 L-Phe 已达到较高的水平, 但是依然存在一些问题, 如容易感染噬菌体迫使发酵终止造成巨大的经济损失^[8-9]。近年来随着分子生物学技术的发展, 谷氨酸棒杆菌基因组测序已完成, 基因操作工具也已成熟^[5,10-12], 谷氨酸棒杆菌作为生产菌株被应用到越来越多的次级代谢产物^[13-15]及蛋白的合成^[16-18]中。另外代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产

L-Phe 已取得了明显的效果^[7,19-22]。为此作者在分析谷氨酸棒杆菌中 L-Phe 生物合成途径和代谢调控机理的基础上, 构建了一株产 L-Phe 的谷氨酸棒杆菌重组菌株并对其培养基优化, 确定了最佳种子培养基以及发酵培养基, 为进一步放大实验提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验室构建重组谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* $\Delta ptsI:: iolT2\text{-}ppgK \Delta aroP \Delta aceE \Delta ldh$ 携带 pSUTL 和 pSDDL 质粒。菌株特性: *C. glutamicum* ATCC13032 在 *pts* I 位点敲入 *iolT2\text{-}ppgK* 基因, 敲除 *aroP*, *ldh* 以及 *aceE* 基因。重组质粒特性: pSUTL (pECXK99E-Ptac-*aroF*^{Δbr}-*aroE*-Plac-*ppsA*-*tktA*) 和 pSDDL (pXMJ19-Ptac-*pheA*^{Δbr}-*aroA*-Plac-*tyrB*-*aroL*)。

1.2 培养基

1.2.1 种子活化培养基: LBG 固体(g/L): 葡萄糖 5.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 营养琼脂 15.0。

1.2.2 种子培养基(g/L): 葡萄糖 25.0, 玉米浆 17.5, 硫酸铵 5.0, 硫酸镁 0.5, 磷酸二氢钾 1.0, 尿素 2.0, 氯霉素 17 mg/L, 卡那霉素 25 mg/L, pH 6.8–7.0, 装液量 20 mL/250 mL。

1.2.3 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 100.0, 玉米浆 6.0, 硫酸铵 25.0, 硫酸镁 0.5, 磷酸二氢钾 1.0, 柠檬酸

钠 2.0, 碳酸钙 20.0, 根据需要添加抗生素: 氯霉素 17 mg/L, 卡那霉素 25 mg/L, pH 6.8–7.0, 装液量 20 mL/250 mL。

1.3 培养方法

1.3.1 菌株活化: 甘油管接种划线 LBG 平板 30 °C 培养 36 h。

1.3.2 种子培养: 接种一环 LBG 平板种子于种子培养基, 置于巡回式摇床(200 r/min)上, 30 °C 培养 18 h。

1.3.3 发酵培养: 按 10%接种量将种子培养基接入发酵培养基中, 同时加入 1.0 mmol/L IPTG 诱导质粒表达重组酶, 置于巡回式摇床(200 r/min)上, 30 °C 发酵培养 72 h。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生长测定: 取 0.2 mL 发酵液用 2.0 mol/L 盐酸稀释到合适浓度, 使用分光光度计测定, 1.0 cm 光程 600 nm 测 OD。

1.4.2 葡萄糖测定: 采用 SBA-40C 型乳酸 – 葡萄糖生物传感分析仪进行分析。

1.4.3 L-Phe 含量: 采用高效液相色谱分析仪测定^[23]。

1.5 实验设计

1.5.1 单因素试验筛选关键因素: 采用单因素试验考察种子培养基中葡萄糖、玉米浆、酵母粉、硫酸铵、硫酸镁和磷酸二氢钾以及发酵培养基中葡萄糖、玉米浆、酵母粉、硫酸铵、硫酸镁、磷酸二氢钾、柠檬酸钠和碳酸钙对谷氨酸棒杆菌产 L-Phe 的影响, 筛选出影响 L-Phe 产量的关键因素。

1.5.2 Box-Behnken 中心组合实验设计: 响应面分析法(Response surface analysis)是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法, 响应面优化法的优点: (1) 考虑了试验随机误差; (2) 响应面法将复杂的未知的函数关系在小区域内用简单的一次或二次多项式模型来拟合, 计算比较简便, 是降低开发成本、优化加工条件、提高产品质量、解决生产过程中的实际问题的一种有效方法; (3) 与正交试

验相比, 其优势是在试验条件寻优过程中, 可以连续的对试验的各个水平进行分析, 而正交试验只能对一个个孤立的试验点进行分析。

最常用的是 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 单因素试验确定了极显著的 4 个因素, 以及最大响应区域, 各因素取 3 个水平, 以(-1, 0, 1)编码进行实验分析, 使用软件 Design-Expert.V8.0.6, 对数据进行二次回归拟合, 最终根据回归方程来绘制响应面立体分析图, 得出响应面分析结果, 进而确定最优的发酵培养基。

2 结果与分析

2.1 种子培养基单因素试验

种子培养基的目的是为种子生长提供优良环境条件, 一个良好的种子培养基是保证菌体生长旺盛, 发酵产酸稳定的重要条件, 因此对种子培养基的优化至关重要。碳源是提供细胞生长所需能量以及产物合成碳骨架的来源; 氮源是提供细胞合成蛋白质、多肽、核酸等含氮物质的来源; 无机盐作为一些酶的辅基, 可以促进胞内酶活。选用单因素试验考察种子培养基中碳源: 葡萄糖; 有机氮源: 玉米浆和酵母粉; 无机氮源: 硫酸铵; 无机盐: 硫酸镁和磷酸二氢钾, 考察不同种子培养基组分对谷氨酸棒杆菌产 L-Phe 的影响, 每个因素取 5 个水平, 其他培养基组分与优化培养基成分相同, 筛选出影响 L-Phe 产量的关键因素如图 1 所示。

从图 1 发酵结果可知, 种子培养基葡萄糖浓度选择 10.0–30.0 g/L, 葡萄糖提供菌体生长的碳骨架, 随着葡萄糖浓度的升高, L-Phe 产量进一步得到提高, 最高达到 7.46±0.04 g/L, 葡萄糖浓度进一步提高 L-Phe 产量反而下降, 说明种子培养基中初始葡萄糖浓度过高可能使菌体生长过于旺盛, 产生过多的副产物, 后续接种引入到发酵培养基, 从而影响 L-Phe 的积累产生, 因此选择葡萄糖浓度为 25.0 g/L。玉米浆中存在丰富的氮元素包括多肽, 同时又能够提供多种必需的生长因子如氨基酸等, 是微生

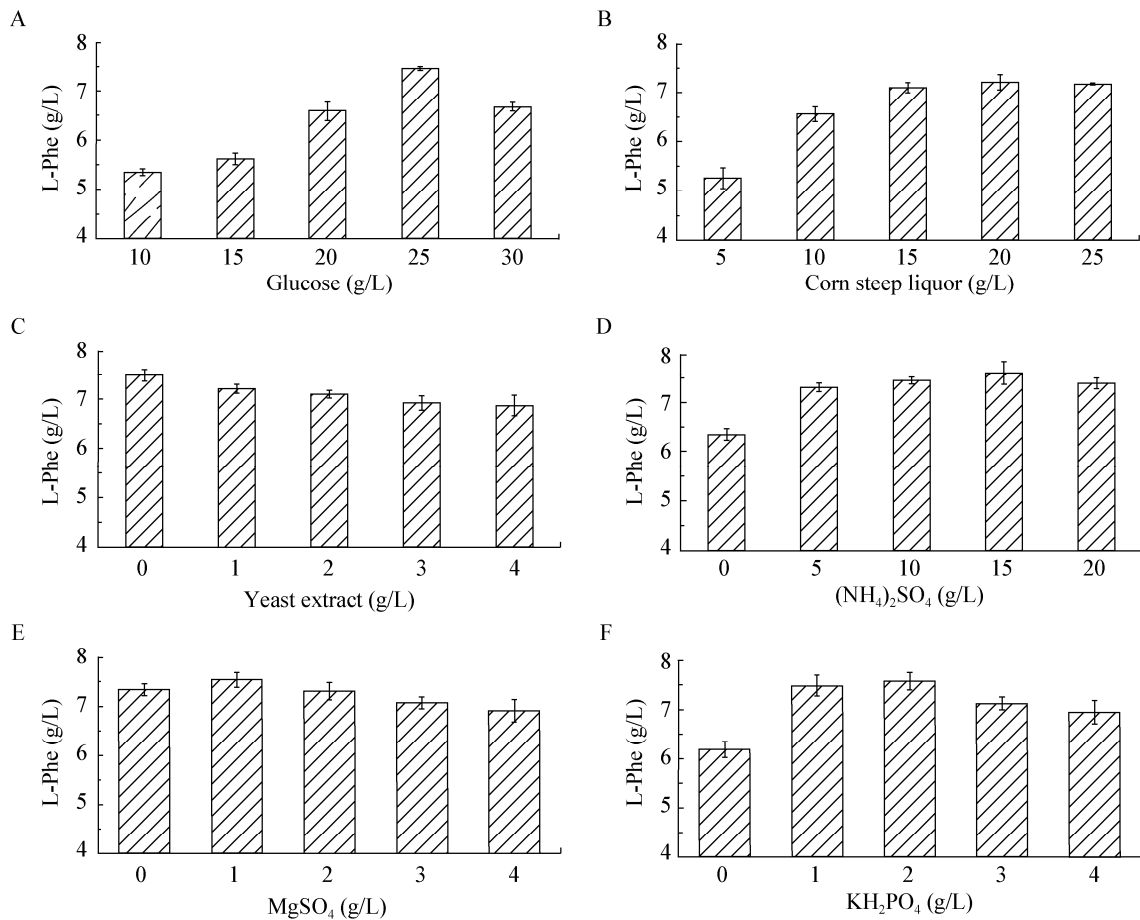


图 1 种子培养基单因素试验发酵结果

Figure 1 L-Phe production by recombinant *C. glutamicum* in the seed medium with single factor experiment

注: A: 种子培养基中不同葡萄糖浓度对 L-Phe 产量的影响; B: 种子培养基中不同玉米浆浓度对 L-Phe 产量的影响; C: 种子培养基中不同酵母粉浓度对 L-Phe 产量的影响; D: 种子培养基中不同硫酸铵浓度对 L-Phe 产量的影响; E: 种子培养基中不同硫酸镁浓度对 L-Phe 产量的影响; F: 种子培养基中不同磷酸二氢钾浓度对 L-Phe 产量的影响。

Note: A, B, C, D, E, F displayed the effect of glucose, corn steep liquor, yeast extract, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, KH₂PO₄ in seed medium on L-Phe in recombinant *C. glutamicum*, respectively.

物合成酶所必需的, 玉米浆浓度选择 5.0–25.0 g/L, 由发酵结果可知随着玉米浆浓度的增加, L-Phe 产量进一步提高, 玉米浆浓度在 20.0 g/L 时, L-Phe 浓度最高达到 7.21±0.16 g/L, 过高的玉米浆浓度对 L-Phe 的积累产生不利的影响, 因此确定最优玉米浆浓度为 20.0 g/L。酵母粉浓度考察 0–4.0 g/L, 酵母粉作为有机氮源, 提供菌体生长的氮元素及生长因子, 随着酵母粉浓度的增加, L-Phe 产量反而下降, 说明添加有机氮源酵母粉不利于 L-Phe 的积累, 因此选择不添加有机氮源酵母粉。硫酸铵浓度确定选

择 0–20.0 g/L, 硫酸铵是无机氮源能够被微生物迅速利用, 对微生物的生长极为重要, 随着硫酸铵浓度的增加 L-Phe 产量得到提高, L-Phe 产量最高达到 7.61±0.23 g/L, 进一步提高硫酸铵浓度时, L-Phe 产量反而下降, 因此硫酸铵浓度确定为 15.0 g/L。无机盐硫酸镁浓度考察 0–4.0 g/L 的添加量, 镁离子对 L-Phe 合成途径的多个酶具有激活作用, 如 L-Phe 合成途径的第一个关键酶 3-脱氧-D 阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合酶 (3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, DS 酶)、磷

酸烯醇式丙酮酸合成酶 (Phosphoenolpyruvate synthase , PpsA)、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate carboxylase, Ppc)、莽草酸激酶 (Shikimate kinaseII , AroL)、分支酸合酶 (Chorismate synthase, AroC)具有激活作用,当硫酸镁浓度在 1.0 g/L 时, L-Phe 产量最高达到 7.54±0.15 g/L, 因此选择硫酸镁为 1.0 g/L。磷酸二氢钾添加 0–4.0 g/L, 钾离子也对 L-Phe 合成途径的多个酶具有激活作用, 如 L-Phe 合成途径中中心代谢途径的磷酸烯醇丙酮酸羧化酶及 5-烯醇式莽草酸-3 磷酸合成酶 (5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase, AroA), 由发酵结果可知磷酸二氢钾添加量为 2.0 g/L 时, L-Phe 产量最高达到 7.58±0.18 g/L。通过单因素试验结果进行各因素的方差分析: 葡萄糖, 玉米浆, 酵母粉, 硫酸铵, 硫酸镁, 磷酸二氢钾各因素的方差分别为: 2.93、2.73、0.25、1.00、0.24、1.23, 各因素的方差越大对 L-Phe 产量影响波动越大, 可以确定影响 L-Phe 积累的 4 个关键因素分别为葡萄糖、玉米浆、硫酸铵和磷酸二氢钾, 并

且确定了 4 个因素的中心水平: 葡萄糖 25.0 g/L, 玉米浆 20.0 g/L, 硫酸铵 15.0 g/L, 磷酸二氢钾 2.0 g/L, 为采用正交试验进一步优化种子培养基提供依据。

2.2 种子培养基正交试验

通过单因素试验确定了种子培养基的 4 个关键影响因素: 葡萄糖、玉米浆, 硫酸铵和磷酸二氢钾, 设计种子培养基正交试验 4 因素水平表(表 1), 正交试验结果如表 2 所示。

表 1 L ₉ (3 ⁴)种子培养基正交试验因素水平表 Table 1 Factors and levels of L ₉ (3 ⁴) for seed medium by orthogonal experiment			
培养基成分 Medium (g/L)	水平 1 Level 1	水平 2 Level 2	水平 3 Level 3
葡萄糖 Glucose	20	25	30
玉米浆 Corn steep liquor	15	20	25
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	15	20
KH ₂ PO ₄	1	2	3

表 2 L ₉ (3 ⁴)正交试验方案及结果 Table 2 L ₉ (3 ⁴) Orthogonal test and results					
试验号 Test No.	因素 Factors				结果 Results
	葡萄糖 Glucose (A)	玉米浆 Corn steep liquor (B)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (C)	KH ₂ PO ₄ (D)	L-Phe (g/L)
1	1	1	1	1	6.67
2	1	2	2	2	6.93
3	1	3	3	3	6.71
4	2	1	2	3	7.13
5	2	2	3	1	7.46
6	2	3	1	2	7.64
7	3	1	3	2	6.87
8	3	2	1	3	6.96
9	3	3	2	1	7.03
K1	6.770	6.890	7.090	7.053	
K2	7.410	7.114	7.030	7.147	
K3	6.953	7.127	7.013	6.933	
R	0.640	0.237	0.077	0.214	

对正交试验结果使用“正交设计助手 II v3.1”进行 4 因素 3 水平的实验设计, 并进行数据分析, 结果见表 2。由表 2 可以看出, 种子培养基 4 种组分含量的不同对产酸有一定的影响, 培养基中营养成分物质过于丰富, 菌体生长过快, 以致发酵后劲不足; 而如果营养物质缺乏, 种子生长缓慢, 代谢活性低, 也对后续产酸产生不利的影响。由极差分析法得出各个影响因子对菌株积累 L-Phe 的影响程度极差 R 的大小顺序为 $R(A) > R(B) > R(D) > R(C)$ 即影响 L-Phe 积累的主次关系为: 葡萄糖 > 玉米浆 > 磷酸二氢钾 > 硫酸铵。

根据正交试验方差分析结果(表 3), 由 F 值可知, 考察的 4 种因素对菌株积累 L-Phe 的影响大小依次为: 葡萄糖 > 玉米浆 > 磷酸二氢钾 > 硫酸铵。结合表 3 的均值分析确定最佳培养基为 $A_2B_3C_2D_2$, 即最佳种子培养基(g/L): 葡萄糖 25.0, 玉米浆干粉 25.0, 硫酸铵 15.0, 硫酸镁 1.0, 磷酸二氢钾 2.0, 尿素 2.0, pH 6.8–7.0。为进一步确认计算结果, 按照最佳条件进行验证, 最高产量达到 8.10 ± 0.06 g/L。处于实验点较高水平, 试验结果较为理想, 较优化前的最高 7.46 ± 0.14 g/L 提高了 8.6%。

2.3 发酵培养基单因素试验确定关键因素

发酵培养基需要满足菌体生长, 繁殖的同时有利于目的代谢产物的过量积累, 因此发酵培养基的成分以及对比对菌株的生长、代谢产物的积累、以及最终产品的质量和产量都有相当大的影响。初始发酵培养基(g/L): 葡萄糖 100.0, 硫酸铵 25.0, 玉米浆 6.0, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 0.5, 碳酸钙 20.0,

pH 6.8–7.0。单因素试验确定因素水平范围, 考虑到 L-Phe 氨基供体来源于谷氨酸, 故在发酵培养基中添加不同量的谷氨酸, 考查其对 L-Phe 产量的影响。研究表明在培养基中添加柠檬酸钠能够改变一些代谢途径关键酶的活性, 可以降低糖酵解中 6-磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的活性, 从而减弱糖酵解途径, 强化磷酸戊糖途径^[24]有利于芳香族氨基酸 L-Phe 的合成。碳酸钙在发酵过程中起到稳定 pH 的作用, 为微生物发酵提供一个 pH 缓冲体系, 不至于发酵过程中 pH 变化太大, 从而对微生物代谢的酶具有稳定的作用。所以对发酵培养基进行单因素试验时, 考察培养基中葡萄糖、玉米浆、硫酸铵、硫酸镁、磷酸二氢钾、柠檬酸钠、谷氨酸和碳酸钙对谷氨酸棒杆菌产 L-Phe 的影响, 每个因素取 5 个水平, 其他培养基组分与未优化前培养基成分相同, 筛选出影响 L-Phe 产量的关键因素, 如图 2 所示。

如图 2 发酵培养基单因素结果可知, 发酵培养基初糖选择 80.0–120.0 g/L, 葡萄糖是细胞的碳源, 是细胞以及产物合成的代谢碳骨架来源, 不同葡萄糖浓度对 L-Phe 产量影响较大, 由图 2 可知过低初糖浓度不利于发酵 L-Phe 的积累, 随着葡萄糖浓度的提高, L-Phe 产量逐渐提高, 葡萄糖浓度达到 110.0 g/L 时, L-Phe 产量最高达到 8.52 ± 0.21 g/L, 随着葡萄糖浓度提高, L-Phe 产量反而下降, 说明过高的初始葡萄糖浓度对 L-Phe 的合成不利, 一方面可能是由于葡萄糖浓度过高对菌体生长产生抑制, 另一方面过高的糖浓度使得菌体代谢产生的副产物过多, 对菌体合成 L-Phe 不利, 因此选择初始

表 3 正交试验方案及分析结果
Table 3 Design and results of orthogonal experiment

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	F 值 F value
葡萄糖 Glucose (A)	0.652	2	3.112
玉米浆 Corn steep liquor (B)	0.107	2	0.511
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (C)	0.010	2	0.048
KH_2PO_4 (D)	0.069	2	0.329
误差 Deviation	0.840	8	

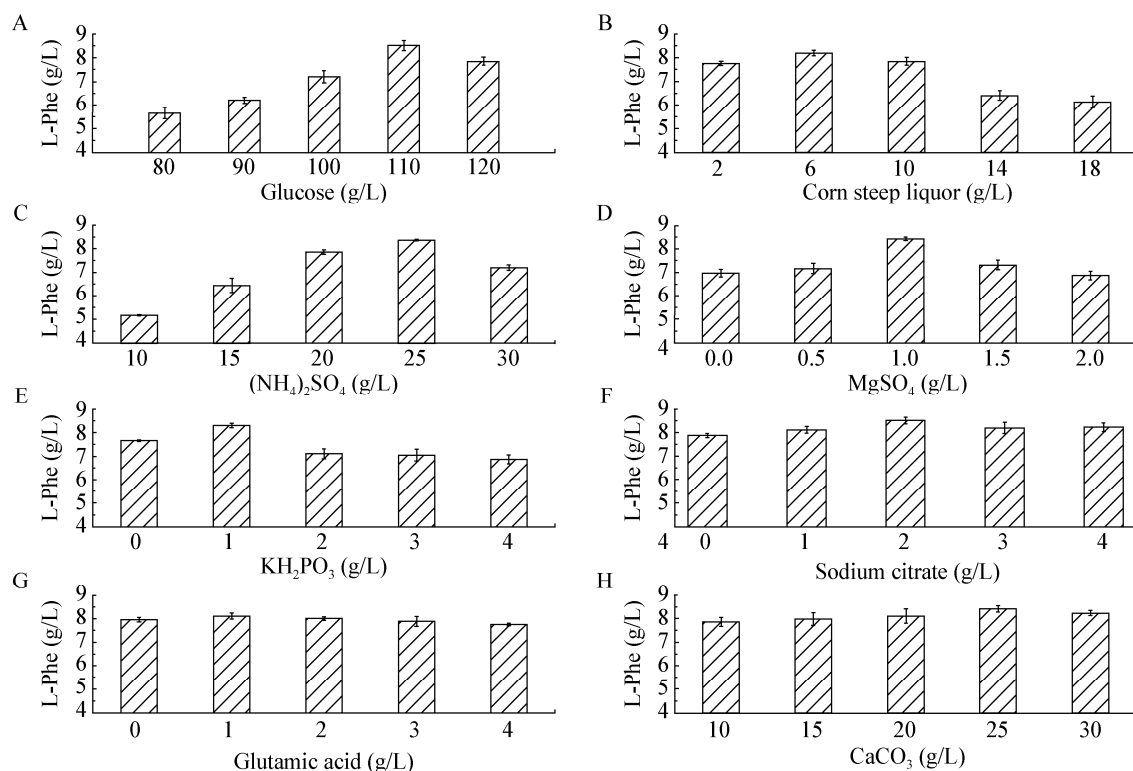


图2 发酵培养基单因素试验确定因素水平范围确定最优区域

Figure 2 Single factor experiment optimized fermentation medium for L-phenylalanine production by recombinant *C. glutamicum*

注：A：种子培养基中不同葡萄糖浓度对 L-Phe 产量的影响；B：种子培养基中不同玉米浆浓度对 L-Phe 产量的影响；C：种子培养基中不同硫酸铵浓度对 L-Phe 产量的影响；D：种子培养基中不同硫酸镁浓度对 L-Phe 产量的影响；E：种子培养基中不同磷酸二氢钾浓度对 L-Phe 产量的影响；F：种子培养基中不同柠檬酸钠浓度对 L-Phe 产量的影响；G：种子培养基中不同谷氨酸浓度对 L-Phe 产量的影响；H：种子培养基中不同碳酸钙添加量对 L-Phe 产量的影响。

Note: A, B, C, D, E, F, G and H displayed the effect of glucose, corn steep liquor, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , sodium citrate, glutamic acid and CaCO_3 in the seed medium on the production of L-Phe, respectively.

葡萄糖浓度为 110.0 g/L。玉米浆浓度选择 2.0–18.0 g/L，玉米浆是有机氮源，能够为细胞代谢提供丰富的氮元素以及生长因子，由发酵结果可知，随着玉米浆浓度的增加，L-Phe 产量先升高后降低，最高达到 8.21 ± 0.11 g/L，说明一定浓度玉米浆引入的生长因子有利于 L-Phe 的积累，过高的玉米浆浓度引入的生长因子过多，反而不利于 L-Phe 的积累，因此确定玉米浆浓度为 6.0 g/L。硫酸铵浓度确定选择 10.0–30.0 g/L，硫酸铵属于无机氮源，能够被很快地利用，随着硫酸铵浓度的增加，L-Phe 产量得到提高，最高达到 8.38 ± 0.02 g/L，硫酸铵浓度进一步提高时 L-Phe 产量反而下降，因此最佳硫

酸铵浓度选择 25.0 g/L。一定浓度的硫酸镁能够对 L-Phe 合成代谢酶起到激活作用(DS 酶, PpsA, Ppc, AroL, AroC)，硫酸镁浓度考察 0–2.0 g/L，硫酸镁浓度在 1.0 g/L 时，L-Phe 产量最高达到 8.43 ± 0.07 g/L，因此最佳硫酸镁浓度选择 1.0 g/L。钾离子也对 L-Phe 合成途径的酶 AroA 具有激活作用，考察磷酸二氢钾浓度 0–4.0 g/L，磷酸二氢钾添加量为 1.0 g/L 时，L-Phe 产量最高达到 8.31 ± 0.09 g/L，因此最佳磷酸二氢钾浓度选择 1.0 g/L。柠檬酸钠浓度的确定，考察 0–4.0 g/L 柠檬酸钠对 L-Phe 的影响，柠檬酸钠添加量在 2.0 g/L 时，L-Phe 积累量最高达到 8.52 g/L；谷氨酸浓度的确定，考察添加 0–4.0 g/L

的谷氨酸对 L-Phe 产量的影响,当添加量为 1.0 g/L 的谷氨酸时, L-Phe 最高达到 8.12 ± 0.13 g/L, 因此谷氨酸添加量选取 1.0 g/L; 考察碳酸钙添加量为 10.0–30.0 g/L, 碳酸钙添加量为 25.0 g/L 时, L-Phe 积累量最高达到 8.43 ± 0.14 g/L, 因此确定最佳碳酸钙添加量为 25.0 g/L。由单因素试验发酵结果结合各因素的方差分析, 各因素葡萄糖、玉米浆、硫酸铵、硫酸镁、磷酸二氢钾、柠檬酸钠、谷氨酸和碳酸钙的方差分别为 5.44、3.50、6.65、2.18、1.56、0.21、0.22 和 0.07。因素的方差越大说明对 L-Phe 产量影响波动越大, 因此确定影响 L-Phe 积累的 3 个关键因素为葡萄糖、玉米浆和硫酸铵, 并确定了中心水平为: 葡萄糖 110.0 g/L, 玉米浆 6.0 g/L,

硫酸铵 25.0 g/L。通过对发酵培养基单因素试验, 确定关键因素的最优水平, 为后续响应面实验提供参考。发酵培养基(g/L): 葡萄糖 110.0, 玉米浆 6.0, 硫酸铵 25.0, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 1.0, 柠檬酸钠 2.0, 谷氨酸 1.0, 碳酸钙 25.0, pH 6.8–7.0。

2.4 发酵培养基 Box-Behnken Design 实验设计

根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 在单因素试验的基础上, 确定少于 4 个因素为自变量, L-Phe 产量为响应值, 本实验以发酵单因素确定的葡萄糖、玉米浆和硫酸铵分别以 A、B、C 代表作 3 因素 3 水平的响应面分析试验, 产物 L-Phe 的浓度为 Y , 各因素的浓度分别为 X_A 、 X_B 、 X_C , 各自变量水平见表 4, 实验设计以及结果见表 5。

表 4 响应面试验 3 因素 3 水平表

Table 4 Each variable at different levels in Box-Behnken design of response surface optimization

试验设计 Experiment design	葡萄糖 Glucose (A) (g/L)	玉米浆 Corn steep liquor (B) (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (C) (g/L)
−1	100.00	4.00	20.00
0	110.00	6.00	25.00
+1	120.00	8.00	30.00

表 5 响应面 BB 实验设计表以及实验结果

Table 5 Design and result of Box-Behnken experiment of response surface optimization

试验设计序号 Experiment design number	A	B	C	实验值 Experimental value	预测值 Predicted value
1	0	1	−1	8.45	8.60
2	1	0	1	8.57	8.61
3	1	−1	0	7.69	7.80
4	−1	1	0	8.62	8.50
5	−1	0	1	7.93	8.01
6	1	1	0	8.75	8.67
7	0	1	1	8.71	8.74
8	0	−1	−1	7.70	7.67
9	−1	0	−1	8.29	8.25
10	0	−1	1	7.82	7.66
11	0	0	0	9.02	8.96
12	−1	−1	0	7.29	7.36
13	0	0	0	8.91	8.96
14	0	0	0	8.94	8.96
15	1	0	−1	8.34	8.26

利用 Design-Expert.V8.0.6 软件,对表 5 中 L-Phe 产量实验数据进行多元回归拟合,建立二次响应面回归模型,进而寻求最优响应因子水平,L-Phe 对葡萄糖、玉米浆和硫酸铵的多元二次回归方程如下,分析结果见表 6。

$$Y=-45.57+0.794\ 08\times X_A+2.008\ 13\times X_B+0.252\ 42\times X_C-3.375\times 10^{-3}\times X_A\times X_B+2.95\times 10^{-3}\times X_A\times X_C+3.50\times 10^{-3}\times X_B\times X_C-3.783\ 33\times 10^{-3}\times X_A\times X_A-0.122\ 71\times X_B\times X_B-0.011\ 833\times X_C\times X_C$$

由表 6 回归模型的方差分析和显著性检验可知,该二次模型显著($P<0.05$),失拟项大于 0.05 不

显著,经过计算分析,该模型决定系数 $R^2=0.971\ 7$ 大于 80%,说明实际值和预测值之间的相关性较好,同时 $\text{Adj } R^2=0.920\ 7$,说明有 92.07%的变异能够由该模型解释,因此认为该模型可以用来代替真实实验点对实验结果进行分析和预测。由表 6 回归系数的显著性检验可知,因素 A、B 对 L-Phe 的线性效果显著,C 对 L-Phe 线性效果不显著;因素 AB、AC、BC 之间对 L-Phe 的交互效应均不显著;因素 A、B 和 C 对 L-Phe 的曲面效应均显著,如图 3-5 所示。

表 6 L-Phe 产量回归方程方差和显著性检验					
Table 6 Analysis of variance and significance for the regression model equation of L-phenylalanine production					
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Sources of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F value	P value
模型 Model	3.858 482	9	0.428 720	19.055 640	0.002 3
A-A	0.186 050	1	0.186 050	8.269 501	0.034 8
B-B	2.030 113	1	2.030 113	90.233 910	0.000 2
C-C	0.007 813	1	0.007 813	0.347 248	0.581 3
AB	0.018 225	1	0.018 225	0.810 060	0.409 4
AC	0.087 025	1	0.087 025	3.868 064	0.106 4
BC	0.004 900	1	0.004 900	0.217 794	0.660 4
A2	0.528 503	1	0.528 503	23.490 740	0.004 7
B2	0.889 541	1	0.889 541	39.538 090	0.001 5
C2	0.323 141	1	0.323 141	14.362 890	0.012 8
残差 Residual	0.112 492	5	0.022 498		
失拟项 Lack of fit	0.106 025	3	0.035 342	10.930 410	0.085 0
纯误差 Pure error	0.006 467	2	0.003 233		
总和 Cor total	3.970 973	14			

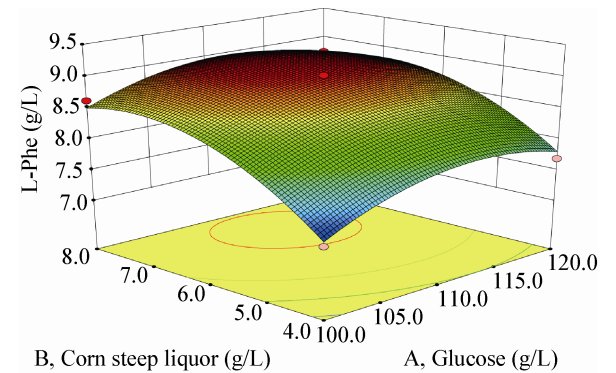


图 3 葡萄糖和玉米浆对 L-Phe 产量的响应面分析
Figure 3 Three-dimensional response surface plots for the effect of L-Phe production between glucose and corn steep liquor by recombinant *C. glutamicum*

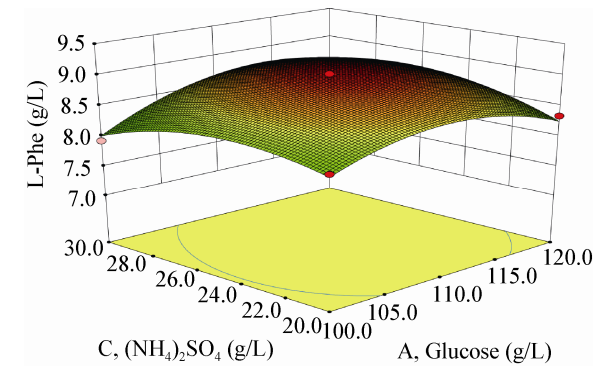


图 4 葡萄糖和硫酸铵对 L-Phe 产量的响应面分析
Figure 4 Three-dimensional response surface plots for the effect of L-Phe production between glucose and (NH₄)₂SO₄ by recombinant *C. glutamicum*

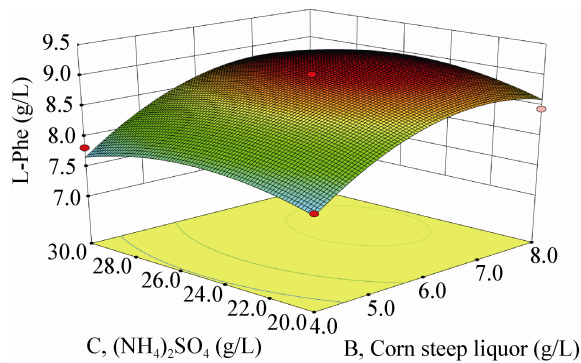


图5 玉米浆和硫酸铵对 L-Phe 产量的响应面分析

Figure 5 Three-dimensional response surface plots for the effect of L-Phe production between corn steep liquor and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ by recombinant *C. glutamicum*

2.5 最佳发酵培养基的确定

由响应面三维曲面图可知, 该模型具有最大值。用该组图可以对影响 L-Phe 合成的任何 2 种因素的交互效应进行分析和评估, 并确定最佳因素的水平范围。根据二次回归方程计算预测: 葡萄糖 108.64 g/L, 玉米浆 7.05 g/L, 硫酸铵 25.33 g/L, 考虑实际培养基的配制, 最终确定 3 个因素的水平分别为: 葡萄糖 110.0 g/L, 玉米浆 7.0 g/L, 硫酸铵 25.0 g/L。最佳发酵培养基(g/L): 葡萄糖 110.0, 玉米浆 7.0, 硫酸铵 25.0, 硫酸镁 1.0, 磷酸二氢钾 1.0, 柠檬酸钠 2.0, 谷氨酸 1.0, 碳酸钙 25.0, pH 6.8–7.0, L-Phe 最高达到 9.09 g/L。根据预测的进行设计实验验证, 发酵最终产量为 9.14 ± 0.27 g/L, 与实验预测比较接近, 进一步说明模型建立的可靠。

3 结论

通过对重组谷氨酸棒杆菌种子培养基以及发酵培养基进行优化, 最终确定了最佳种子培养基(g/L): 葡萄糖 25.0, 玉米浆干粉 25.0, 硫酸铵 15.0, 硫酸镁 1.0, 磷酸二氢钾 2.0, 尿素 2.0, pH 6.8–7.0。通过对发酵培养基单因素试验, 确定关键因素的最优水平, 为后续响应面实验提供参考。最佳发酵培养基(g/L): 葡萄糖 110.0, 玉米浆 7.0, 硫酸铵 25.0, 硫酸镁 1.0, 磷酸二氢钾 1.0, 柠檬酸钠 2.0, 谷氨酸 1.0, 碳酸钙 25.0, pH 6.8–7.0。通过对重组谷氨

酸棒杆菌种子培养基优化, L-Phe 产量由 7.46 g/L 提高到 8.10 g/L, 提高了 8.6%。进一步通过对发酵培养基进行优化, L-Phe 产量由 8.10 g/L 提高到 9.14 g/L, 提高了 12.8%。本实验通过对重组谷氨酸棒杆菌培养基的优化使 L-Phe 产量提高了 22.5%, 说明培养基组分及含量对 L-Phe 的合成有一定的影响, 同时为进一步放大实验提供了依据。

参考文献

- [1] Báez-Viveros JL, Osuna J, Hernández-Chávez G, et al. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 87(4): 516-524
- [2] Wu YQ, Jiang PH, Fan CS, et al. Co-expression of five genes in *E. coli* for L-phenylalanine in *Brevibacterium flavum*[J]. World Journal of Gastroenterology, 2003, 9(2): 342-346
- [3] Zhou HY, Liao XY, Wang TW, et al. Enhanced L-phenylalanine biosynthesis by co-expression of pheA_{fb} and aroF_{wt}[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(11): 4151-4156
- [4] Li B. Progress of synthetic technique for L-phenylalanine[J]. Food Engineering, 2009(3): 9-12 (in Chinese)
李冰. L-苯丙氨酸的合成技术研究进展[J]. 食品工程, 2009(3): 9-12
- [5] Eggeling L, Bott M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*[M]. Boca Raton: CRC Press, 2010
- [6] Shu CH, Liao CC. Optimization of L-phenylalanine production of *Corynebacterium glutamicum* under product feedback inhibition by elevated oxygen transfer rate[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 77(2): 131-141
- [7] Zhang CZ, Zhang JL, Kang Z, et al. Enhanced production of L-phenylalanine in *Corynebacterium glutamicum* due to the introduction of *Escherichia coli* wild-type gene aroH[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(6): 643-651
- [8] Zhou HY, Liao XY, Liu L, et al. Enhanced L-phenylalanine production by recombinant *Escherichia coli* BR-42 (pAP-B03) resistant to bacteriophage BP-1 via a two-stage feeding approach[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(9): 1219-1227
- [9] Tanji Y, Hattori K, Suzuki K, et al. Spontaneous deletion of a 209-kilobase-pair fragment from the *Escherichia coli* genome occurs with acquisition of resistance to an assortment of infection phages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008(74): 4256-4263
- [10] Jakoby M, Ngouoto-Nkili CE, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors[J]. Biotechnology Techniques, 1999, 13(6): 437-441
- [11] Kirchner O, Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 104(1): 287-299
- [12] Xu DQ, Tan YZ, Huan XJ, et al. Construction of a novel

- shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*, an industrial amino acid producer[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 80(1): 86-92
- [13] Takors R, Bathe B, Rieping M, et al. Systems biology for industrial strains and fermentation processes-example: amino acids[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 129(2): 181-190
- [14] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels-*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory[J]. Current Opinion in Microbiology, 2012, 23(4): 631-640
- [15] Gopinath V, Murali A, Dhar KS, et al. *Corynebacterium glutamicum* as a potent biocatalyst for the bioconversion of pentose sugars to value-added products[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(1): 95-106
- [16] Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, et al. Production of native-type *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 3011-3014
- [17] Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K, et al. Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 358-366
- [18] Date M, Itaya H, Matsui H, et al. Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(1): 66-70
- [19] Ikeda M, Katsumata R. Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(3): 781-785
- [20] Ikeda M, Ozaki A, Katsumata R. Phenylalanine production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* with the pheA gene of *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39(3): 318-323
- [21] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(6): 615-626
- [22] Zhang CZ, Kang Z, Zhang J, et al. Construction and application of novel feedback-resistant 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthases by engineering the N-terminal domain for L-phenylalanine synthesis[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 353(1): 11-18
- [23] Henderson JW, Ricker RD, Bidlingmeyer BA, et al. Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids[J]. Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent, 2000(1100): 1-10
- [24] Liu XX, Chen SX, Chu J, et al. Effect of sodium citrate on the growth metabolism and inosine accumulation by *Bacillus subtilis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(5): 627-630 (in Chinese)
刘新星, 陈双喜, 储炬, 等. 柠檬酸钠对枯草杆菌生长代谢及肌苷积累的影响[J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 627-630

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。