

代谢副产物乙酸对 L-色氨酸发酵的影响

程立坤¹ 黄静¹ 秦永锋¹ 徐庆阳¹ 谢希贤¹ 温廷益^{1,2} 陈宁^{1*}

(1. 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要: 分析了重组大肠杆菌(*E. coli* TRTH/pSV-709)发酵生产 L-色氨酸的发酵过程, 检测结果表明发酵液中有大量代谢副产物乙酸的积累。利用外源添加试验研究了乙酸对 L-色氨酸发酵的影响, 结果表明乙酸浓度高于 2 g/L 时对 L-色氨酸生产菌的生长和产酸均有抑制作用。分析了乙酸的产生机制, 并采取了调节溶氧水平、确定合适初始葡萄糖浓度、限制葡萄糖流加及控制菌体比生长速率等措施来减少乙酸的生成。在优化条件下, 乙酸含量与原工艺相比降低了 51.35%, 菌体生物量和 L-色氨酸产量分别提高了 51.07%和 46.54%, 实现了高密度发酵培养的目的。

关键词: 大肠杆菌, 乙酸, L-色氨酸, 高细胞密度培养

Effect of the Byproduct — Acetic Acid on L-Tryptophan Fermentation

CHENG Li-Kun¹ HUANG Jing¹ QIN Yong-Feng¹ XU Qing-Yang¹
XIE Xi-Xian¹ WEN Ting-Yi^{1,2} CHEN Ning^{1*}

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The process of L-Tryptophan fermentation by *E. coli* TRTH/pSV-709 was investigated, and the result showed that there was a large number of byproduct (acetic acid) in the broth. The effect of acetic acid on L-Tryptophan fermentation was studied by experiments with addition of acetic acid. The results showed that 2 g/L acetic acid could inhibit the growth of L-Tryptophan-producing bacteria and L-Tryptophan production. The mechanism of production of acetic acid was studied. Several strategies including dissolved oxygen regulation, suitable concentration of initial glucose determination, glucose-limited pulse fed-batch and the specific growth rate regulation were applied to reduce the generation of acetic acid. Under the optimal condition, the concentration of acetic acid was decreased by 51.35% compared with that under original condition. Biomass and yield of L-Tryptophan were increased by 51.07% and 46.54% respectively, which accessed high cell density cultivation.

Keywords: *E. coli*, Acetic acid, L-Tryptophan, High cell density cultivation

L-色氨酸(L-Tryptophan)的化学名称为 α -氨基- β - 吲哚基丙酸, 是人体和动物生命活动中 8 种必需氨

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项课题(No. 2008ZX09401-05); “十一五”国家科技支撑计划重点项目(No. 2008BAI63B01)

* 通讯作者: Tel: 86-22-60601251; E-mail: ningch@tust.edu.cn

收稿日期: 2009-08-07; 接受日期: 2009-11-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

氨酸之一, 对人和动物的生长发育、新陈代谢起着重要的作用, 被称为第二必需氨基酸, 广泛应用于医药、食品和饲料等方面^[1]。目前利用微生物生产 L-色氨酸的方法主要有酶法、微生物转化法和微生物发酵法^[2], 其中微生物发酵法是大规模生产 L-色氨酸的首选技术, 现常用菌株有大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌。由于大肠杆菌具有遗传特性较清楚、易培养、发酵周期短并能实现目的基因的高效表达等特性, 因而重组大肠杆菌得到广泛的应用^[3]。但是, 大肠杆菌生长时会产生乙酸, 尤其是在重组菌的高密度培养中, 乙酸的产生和积累不仅会影响菌体生长, 还会抑制产物的合成^[4]。因此, 减少发酵过程中乙酸的产生不仅有利于实现大肠杆菌的高密度培养, 而且对于提高 L-色氨酸的产量极为重要。

高细胞密度培养是一个相对概念, 重组大肠杆菌高密度培养一般是指发酵液中工程菌浓度在 50 g/L (DCW) 以上^[5]。从理论上说, 提高工程菌的发酵密度可以大幅度提高产量, 降低成本, 但是, 要达到高密度培养并非易事。限制大肠杆菌工程菌高密度培养的因素主要表现在, 培养基成分对工程菌生长的抑制、培养系统氧传递能力受限和培养过程中抑制性代谢产物的积累等方面^[6]。文中分析了抑制性代谢副产物乙酸对 L-色氨酸发酵的影响, 采取了调节溶氧水平、确定合适初始葡萄糖浓度、限制葡萄糖流加及控制菌体比生长速率等措施减少发酵过程中乙酸的生成, 使菌体生物量及 L-色氨酸产量得到显著提高。

1 材料与方法

1.1 菌种

大肠杆菌 TRTH/pSV-709 (trpEDCBA+tet^R), 天津科技大学工业微生物菌种保藏室提供。

1.2 培养基

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 15, (NH₄)₂SO₄ 10, 柠檬酸钠 0.5, MgSO₄·7H₂O 5, KH₂PO₄ 1.5, FeSO₄·7H₂O 15 mg, V_{B1} 100 mg, 四环素 50 mg, pH 7.0–7.2, 0.75 × 10⁵ Pa 灭菌 15 min。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 1, (NH₄)₂SO₄ 4, 柠檬酸钠 2, MgSO₄·7H₂O 5, KH₂PO₄ 2, FeSO₄·7H₂O 100 mg, pH 7.0–7.2, 0.75 × 10⁵ Pa 灭菌 15 min。

1.3 培养方法

种子培养: 吸取适量无菌生理盐水于 5 支活化斜面(32°C 培养 24 h)中, 将所有菌悬液接入装 2.0 L 种子培养基的 5 L 种子罐(上海保兴)中, 初始通气量 1 L/min, 搅拌转速 300–700 r/min, 通过自动流加氨水控制 pH 在 7.0, 培养温度 32°C, 以泡敌消泡; 培养 8 h 后, 按 10%接种量接入发酵培养基中。

发酵培养: 按 10%接种量将种子液接入装 2.7 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐(上海保兴)中; 初始通气量 2 L/min, 搅拌转速 500–800 r/min, 通过自动流加氨水控制 pH 在 7.0, 培养温度 32°C, 以泡敌消泡; 发酵过程中, 培养基中葡萄糖浓度降至一定值时, 将 80%葡萄糖溶液以一定的脉冲速度流加至培养基中, 以维持发酵液中葡萄糖浓度在所需的浓度范围。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生物量及菌体比生长速率 μ ^[7]: 菌体生物量以菌体干重表示, 取 10 mL 发酵液, 10000 r/min 离心 20 min, 将菌体用蒸馏水洗涤 2 次后置于真空干燥箱中 80°C 干燥至恒重, 用分析天平称重; 菌体比生长速率 μ 定义为单位质量菌体的瞬时增量, μ 根据以下公式:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt}$$

计算而得, 用 Origin 绘图软件对实验数据进行插值计算(时间间隔为 0.1 h), 再用 Excel 软件求解不同时刻的 μ 。其中 X 、 x 均为菌体量(g/L), t 为时间(h), μ 为每克菌体在 1 h 内菌体增加的质量(g), μ 的单位为 h⁻¹。

1.4.2 葡萄糖浓度: 采用 SBA-40C (山东科学院生物研究所)生物传感仪测定。

1.4.3 L-色氨酸、乙酸及 NH₄⁺浓度: L-色氨酸含量采用高效液相分析系统测定, 色谱分离条件: Agilent C18 (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), 流动相 $V_{(0.03\% \text{ KH}_2\text{PO}_4 \text{ 溶液})} : V_{\text{甲醇}} = 90:10$, 流速 1 mL/min, 检测波长 278 nm; 乙酸浓度测定采用 RP-HPLC^[8]; NH₄⁺浓度参照文献[9]进行测定。

2 结果与讨论

2.1 L-色氨酸发酵过程分析

在 5 L 自控发酵罐上进行补料分批发酵, 每隔 2 h 测定菌体生物量、L-色氨酸产量、乙酸浓度及比生长速率等参数, 结果如图 1 所示。

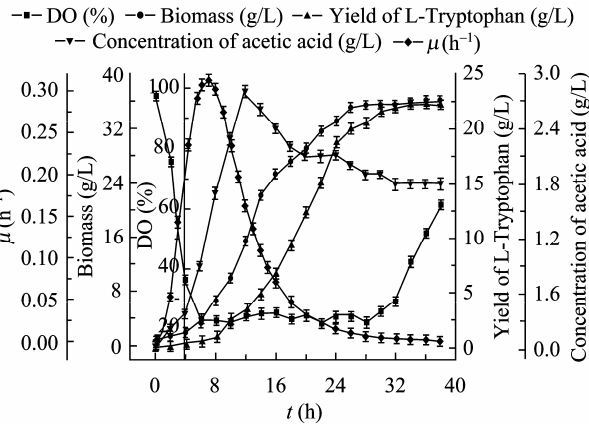


图 1 未优化条件下 L-色氨酸发酵过程曲线
Fig. 1 The curve of L-Tryptophan fermentation with original condition

由图 1 可知, L-色氨酸发酵可分为 4 个阶段, 前 6 h 为菌体生长的延滞期, 此时耗糖速率较慢, 基本不产 L-色氨酸; 6–26 h 为菌体对数生长期, 菌体增殖迅速, 产物大量合成; 26 h 以后菌体生长进入稳定期, 产物仍继续合成, 但速度减缓; 32 h 时 L-色氨酸产量达到最大值, 而后产量下降, 同时溶氧值逐步回升, 菌体进入衰亡期。乙酸大约从 2 h 时开始产生, 且随着菌体比生长速率的增大迅速积累, 在 12 h 达到最大值 2.80 g/L。12 h 后乙酸部分被菌体利用, 浓度有所下降。

据报道^[10], 在发酵过程中, 乙酸产生主要有 2 个原因, 即设备的供氧能力不足使得重组菌的呼吸受到限制和葡萄糖的摄入速率大于重组菌 TCA 循环的周转能力。这两种情况均会导致底物通过乙酰磷酸途径转化为乙酸, 且外源基因表达产生的代谢负荷会降低大肠杆菌的有氧呼吸能力, 导致重组菌

生长过程中更易积累乙酸。郑志永^[11]等报道, 将菌体的比生长速率和发酵液中葡萄糖浓度控制在一定的阈值内, 可有效减少乙酸的生成。

2.2 乙酸对 L-色氨酸发酵的影响

分别在发酵 0、16 h 后向发酵培养基中添加 1、2、3、5 g/L 的乙酸, 考察其对菌体生长和 L-色氨酸产量等参数的影响, 结果如表 1 所示。

由表 1 可知, 0、16 h 分别添加 1 g/L 乙酸与未添加相比, 菌体生物量、L-色氨酸产量差异很小。随着乙酸浓度升高, 抑制作用逐渐加强, 且 0 h 添加较 16 h 添加抑制作用强。乙酸添加量为 2 g/L 时, 0、16 h 添加分别使 L-色氨酸产量下降了 13.87% 和 8.56%, 这可能是由于发酵初期菌体浓度较低、生长较弱, 对乙酸的耐受能力较差。0 h 添加 5 g/L 的乙酸, 生物量和 L-色氨酸产量分别仅有 29.46 g/L 和 16.75 g/L, 相比对照组分别下降了 16.69% 和 25.32%, 且发酵周期延长 8 h。由以上结果可知, 乙酸浓度高于 2 g/L 时, 菌体生长及产物合成均会受到抑制。

由于外源添加乙酸将会造成发酵液 pH 下降, 需要通过自动流加氨水控制 pH 在 7.0。这将使发酵液中 NH_4^+ 增多, 而过多的 NH_4^+ 也会对发酵过程产生抑制作用^[12]。在外源添加乙酸实验的发酵过程中 NH_4^+ 的含量如图 2 所示。

由图 2 可知, 0 与 16 h 添加等量乙酸时, 引起发酵液中 NH_4^+ 的增量是相同的; 添加 1、2、3、5 g/L 乙酸时引起发酵液中 NH_4^+ 的增量分别为 0.37、0.75、1.12、1.87 g/L。为进一步明确乙酸对 L-色氨酸发酵

表 1 乙酸对 L-色氨酸发酵的影响 Table 1 Effect of acetic acid on L-Tryptophan fermentation				
乙酸添加时间 Addition time of acetic acid (h)	乙酸添加浓度 Addition concentration of acetic acid (g/L)	生物量 Biomass (g/L)	L-色氨酸 L-Tryptophan (g/L)	发酵周期 Fermentation period (h)
0	0	35.36 ± 0.42	22.43 ± 0.31	38 ± 0.5
0	1	35.27 ± 0.21	22.32 ± 0.27	39 ± 0.5
0	2	31.27 ± 0.37	19.32 ± 0.21	41 ± 1.0
0	3	30.15 ± 0.23	18.93 ± 0.19	43 ± 1.5
0	5	29.46 ± 0.33	16.75 ± 0.26	46 ± 1.5
16	1	35.32 ± 0.31	22.39 ± 0.35	38 ± 0.5
16	2	32.47 ± 0.26	20.51 ± 0.28	40 ± 1.0
16	3	31.42 ± 0.31	19.89 ± 0.26	43 ± 1.5
16	5	30.65 ± 0.27	18.59 ± 0.32	44 ± 1.5

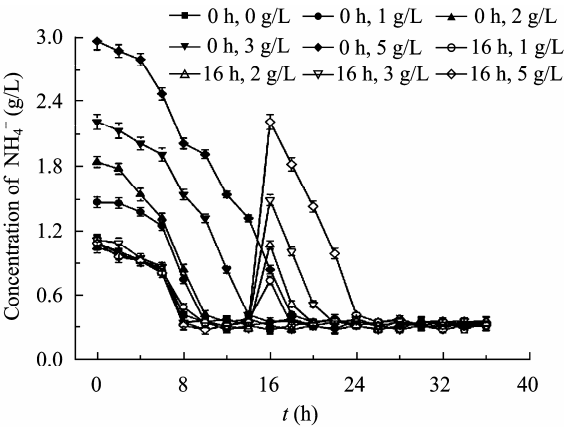


图 2 添加乙酸对发酵过程中 NH_4^+ 含量的影响
Fig. 2 Effect of acetic acid on concentration of NH_4^+ in L-Tryptophan fermentation

的影响, 则向发酵培养基中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 来考察 NH_4^+ 对 L-色氨酸的影响。添加 pH 为 7.0 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液(用 NaOH 调节 pH)使发酵培养基中 NH_4^+ 的增量与添加乙酸引起发酵液中 NH_4^+ 的增量一致, NH_4^+ 对

L-色氨酸发酵的影响如表 2 所示。

由表 2 可知, 添加与添加乙酸引起发酵液中 NH_4^+ 增量相同量的 NH_4^+ 对 L-色氨酸发酵影响均较小。表 1 与表 2 的数据表明, 乙酸对 L-色氨酸发酵影响起关键作用, 因此采取一定策略减少乙酸的生成对 L-色氨酸发酵是至关重要的。

2.3 溶氧水平对乙酸生成的影响

L-色氨酸生产菌在生长过程中, 需大量氧气参与代谢, 溶氧浓度过高或过低, 都会影响菌体生长和产物生成。氧气对好氧微生物有潜在的毒副作用, 氧浓度过高也会产生 Crabtree 效应^[13]; 过低的溶氧浓度则导致乙酸的大量生成^[14], 菌体生长受到抑制, 比生长速率下降, 甚至菌体发生自溶, 严重影响产物合成。维持一定水平的溶氧浓度, 不仅有利于菌体生长, 还有利于提高产酸水平。通过调整搅拌转速及通气量, 将 DO 分别控制为 10%、20%、30% 和 40%, 结果如图 3 所示。

表 2 NH_4^+ 对 L-色氨酸发酵的影响
Table 2 Effect of NH_4^+ on L-Tryptophan fermentation

NH_4^+ 添加时间 Addition time of NH_4^+ (h)	NH_4^+ 添加浓度 Addition concentration of NH_4^+ (g/L)	生物量 Biomass (g/L)	L-色氨酸 L-Tryptophan (g/L)	发酵周期 Fermentation period (h)
0	0	35.36 ± 0.42	22.43 ± 0.31	38 ± 0.5
0	0.37	35.27 ± 0.31	22.32 ± 0.27	38 ± 0.5
0	0.75	35.12 ± 0.36	22.29 ± 0.29	38 ± 0.5
0	1.12	35.11 ± 0.26	22.31 ± 0.19	39 ± 1.0
0	1.87	34.85 ± 0.23	22.15 ± 0.21	39 ± 1.0
16	0.37	35.32 ± 0.28	22.39 ± 0.33	38 ± 0.5
16	0.75	35.17 ± 0.18	22.29 ± 0.25	38 ± 0.5
16	1.12	35.12 ± 0.24	22.21 ± 0.21	39 ± 1.0
16	1.87	34.72 ± 0.26	22.11 ± 0.23	39 ± 1.0

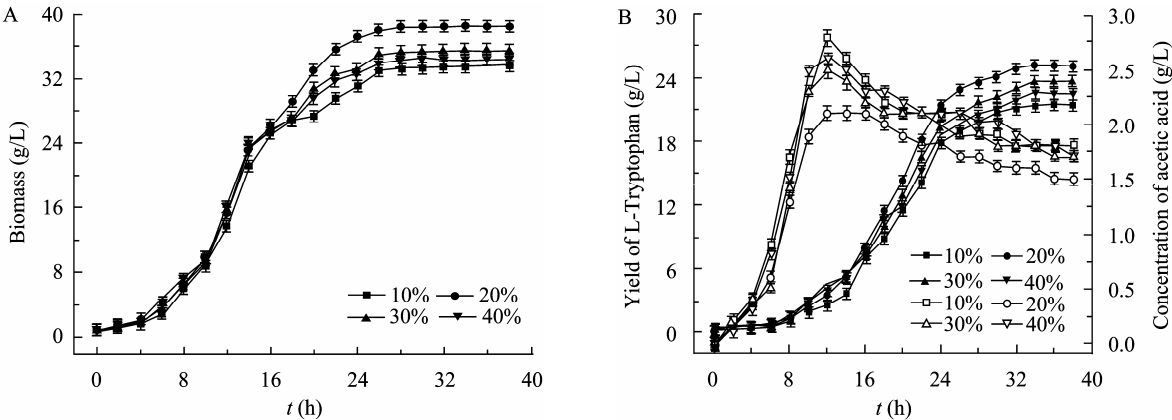


图 3 溶氧水平对生物量的影响(A)和溶氧水平对乙酸及 L-色氨酸产量的影响(B)
Fig. 3 Effect of dissolved oxygen on biomass (A) and Effect of dissolved oxygen on concentration of acetic acid and yield of L-Tryptophan (B)

注: 图 B 中实心图标为 L-色氨酸产量; 空心图标为乙酸浓度。下同。

Note: In figure B, solid icons represent yield of L-Tryptophan, hollow icons represent concentration of acetic acid. The same below.

由图 3 可知, 溶氧水平为 20% 时, 菌体生物量和 L-色氨酸产量均较高, 分别达到 38.56、25.21 g/L, 且代谢副产物乙酸浓度较低, 为 1.63 g/L; 溶氧水平为 10% 时, 乙酸含量较高, 影响菌体生物量和 L-色氨酸产量, 而 30%、40% 的溶氧水平过高, 对菌体生长和 L-色氨酸产量均不利。

2.4 控制葡萄糖浓度减少乙酸的生成

2.4.1 初始葡萄糖浓度的确定: 优化碳源是实现 L-色氨酸生产菌高密度发酵的关键因素, 葡萄糖是目前最常用的碳源物质。培养基中葡萄糖的浓度严重影响细胞的代谢方式, 糖浓度超过 50 g/L 时, 大肠杆菌的生长将会受到抑制^[15]。发酵培养基中初始葡萄糖浓度分别为 10、20、30、40 g/L, 当培养基中葡萄糖浓度降至一定值时, 通过流加 80% 葡萄糖溶液使发酵液中葡萄糖浓度维持在 5 g/L, 进行分批补料发酵, 结果如图 4 所示。

由图 4 可知, 采用 20 g/L 初始葡萄糖浓度时, L-色氨酸产量和菌体生物量均较高, 这主要是由于低浓度初糖发酵前期菌体生长较快, 产酸也较快, 但高比生长速率导致乙酸增多, 同时进入主发酵期菌体增长无力, 活力下降, 导致产酸水平低; 采用高浓度初糖发酵, 菌体前期生长受到抑制, 且“葡萄糖效应”也导致乙酸大量积累, L-色氨酸产量较低, 发酵周期明显延长。因此, 过低或过高的初糖浓度都不利于菌体产酸, 合适的初糖浓度(20 g/L)可提高产酸水平及菌体生物量。

2.4.2 葡萄糖维持浓度的确定: 当 L-色氨酸生产菌的比摄糖速率超过一定的临界值时, 即使在氧充足

条件下 *E. coli* 也会发生 Crabtree 效应而产生乙酸。控制葡萄糖的摄入速率略低于或等于 TCA 循环的周转能力, 可有效避免中间产物乙酰辅酶 A 通过乙酰磷酸途径产生乙酸^[16], 因此维持发酵过程中合适的葡萄糖浓度可有效减少乙酸产生。通过限制流加 80% 葡萄糖溶液, 分别维持发酵液中葡萄糖浓度为 2、5、10 和 15 g/L, 结果如图 5 所示。

L-色氨酸生产菌在较低葡萄糖浓度下生长速率受限, 当有葡萄糖补入时, 生产菌的比摄糖速率增加, 比摄氧速率也随之增加, 溶氧值相应降低; 补料过后, 随葡萄糖浓度的降低, 生产菌的比摄糖速率下降, 溶氧值升高。但如果葡萄糖浓度过高, L-色氨酸生产菌的摄糖速率超过 TCA 循环的周转能力时, 涌向 TCA 循环的代谢流向乙酰磷酸途径溢流而产生乙酸, 摄氧能力处于饱和状态, 同时溶氧值不会随着葡萄糖的脉冲补入而产生振荡变化^[11,17]。由图 5 可知, 维持发酵液中葡萄糖浓度为 2 g/L 时, 菌体比生长速率较小且溶氧水平较高, 乙酸生成量少, 同时溶氧水平随葡萄糖的补入呈现节律性振荡, 振幅为 5% 左右(即 $15\% \leq \text{高峰期溶氧} \leq 25\%$), 生物量和 L-色氨酸产量均最高; 葡萄糖浓度高于 10 g/L 时, L-色氨酸生产菌的比摄糖速率超过临界值, 乙酸生成量多且溶氧不随葡萄糖的补入而振荡变化, 对产物合成和菌体生物量均不利。由此可见, 维持发酵过程中 2 g/L 的葡萄糖浓度既可维持较高的溶氧水平、减少副产物乙酸的生成, 还可以根据溶氧的振荡情况对葡萄糖浓度进行预测并及时调整补料速度, 有效实现比摄糖速率低于临界值。

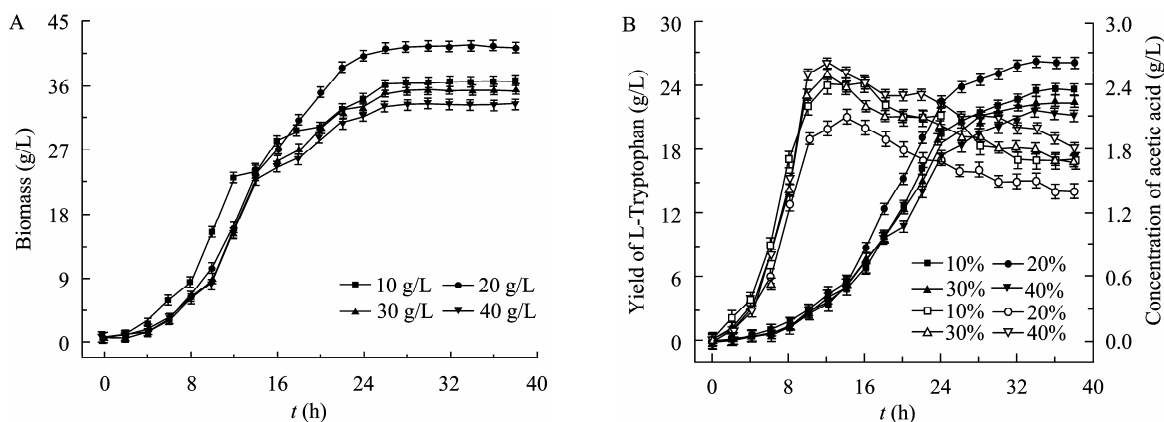


图 4 初始葡萄糖浓度对生物量的影响(A)和 B 初始葡萄糖浓度对乙酸及 L-色氨酸产量的影响(B)

Fig. 4 Effect of concentration of initial glucose on biomass (A) and Effect of concentration of initial glucose on concentration of acetic acid and yield of L-Tryptophan (B)

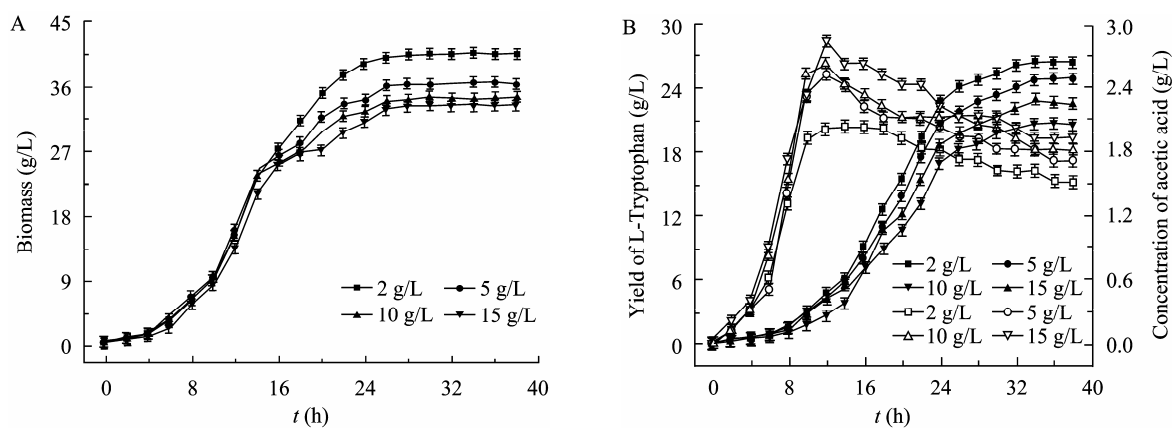


图 5 葡萄糖浓度对生物量的影响(A)和葡萄糖浓度对乙酸及 L-色氨酸产量(B)的影响
Fig. 5 Effect of concentration of glucose on biomass (A) and Effect of concentration of glucose on concentration of acetic acid and yield of L-Tryptophan (B)

2.5 比生长速率对乙酸生成的影响

分批补料培养通过控制比生长速率可避免溶氧的不足及以生长强抑制物乙酸合成为主的发酵途径的发生,因此在重组大肠杆菌高密度培养中得到广泛应用。当比生长速率 μ 超过一定限度,三羧酸循环达到饱和时,即使在供氧充足条件下,细菌体内的丙酮酸也会通过磷酸转乙酰酶/乙酸激酶(Pta-Ack)途径,生成乙酸排出体外,导致培养基中乙酸的积累;培养基中高浓度乙酸反过来会抑制细胞生长,降低比生长速率。乙酸生成的临界比生长速率是菌株特性和培养基组成的函数^[18],不同菌株有所不同。较低的 μ ,虽然产乙酸较少,但是会延长发酵周期,同时对产物合成不利,因此发酵过程应该选择合适的 μ 。采用指数补料的流加技术,限制发酵过程中葡萄糖浓度^[19],将菌体生长阶段的比生长速率分别维持在 0.1、0.2、0.3、0.4 h⁻¹,结果如表 3 所示。

由表 3 可知, μ 为 0.3 h⁻¹ 时,乙酸含量明显增加,但其生物量、L-色氨酸产量与 0.2 h⁻¹ 时相差不大; μ 为 0.1 h⁻¹ 时,乙酸含量较少,但 L-色氨酸产量较低且发酵周期明显延长; μ 为 0.4 h⁻¹ 时,由于 μ 过高导致乙酸大量积累,严重抑制了菌体生长和产物生成。据报道^[20],采用波动 μ 比恒定 μ 取得的发酵效果较好。在无人为因素控制下菌体的比生长速率是波动的,即 μ 随菌体生长逐渐增大,到对数生长期为最大,而后逐渐减少,进入稳定期后 μ 约为 0。通过调节葡萄糖的流加速率控制菌体对数生长期的 μ_{\max} 在 0.3 h⁻¹ 以下,进行分批发酵,结果如图 6 所示。

表 3 μ 对 L-色氨酸发酵的影响 Table 3 Effect of different specific growth rates on L-Tryptophan fermentation				
比生长速率 μ (h ⁻¹)	乙酸 Acetic acid (g/L)	生物量 Biomass (g/L)	L-色氨酸 L-Tryptophan (g/L)	发酵周期 Fermentation period (h)
0.1	0.41 ± 0.02	42.23 ± 0.31	25.48 ± 0.26	50 ± 1.0
0.2	0.75 ± 0.06	49.79 ± 0.37	28.97 ± 0.43	40 ± 1.0
0.3	1.70 ± 0.12	49.62 ± 0.29	28.79 ± 0.34	34 ± 0.5
0.4	4.23 ± 0.35	40.32 ± 0.35	21.42 ± 0.41	42 ± 1.0

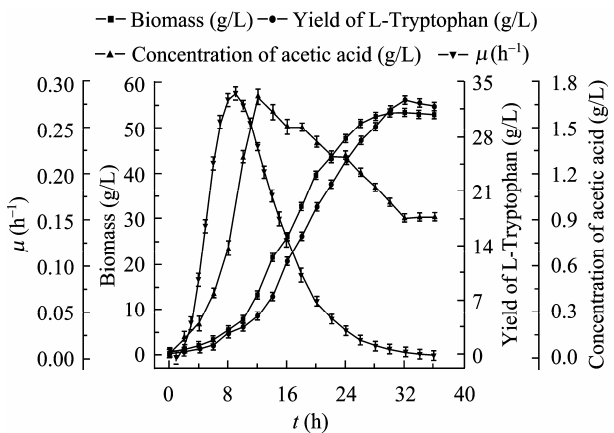


图 6 μ_{\max} 小于 0.3 h⁻¹ 时 L-色氨酸发酵过程曲线
Fig. 6 The curve of L-Tryptophan fermentation with μ_{\max} below 0.3 h⁻¹

由图 6 可知,将发酵过程中 μ_{\max} 控制在 0.3 h⁻¹ 以下时,乙酸含量为 0.90 g/L,与图 1 相比乙酸含量降低了 51.35%;菌体生物量及 L-色氨酸产量分别为 53.42 和 32.87 g/L,与图 1 相比分别提高了 51.07% 和 46.54%,且发酵周期短。结合表 3 与图 6 可知,将发酵过程中 μ_{\max} 控制在 0.3 h⁻¹ 以下时,L-色氨酸发

醇效果最佳。

3 讨论

采用高密度发酵培养技术,提高菌体的发酵密度,最终提高产物的比生产率,不仅可减少培养体积、强化下游分离提取,还可以缩短生产周期、提高设备利用率从而降低生产成本。重组大肠杆菌高密度发酵技术已在生产实践中得到了广泛应用,并取得一定成果。但是该技术在实际应用中也存在许多需要解决的问题,其中最为严重的是培养过程中菌体过早地衰老、自溶、比活性较低,这主要是由于细菌产生的有害代谢物对重组菌存在抑制作用。乙酸是大肠杆菌高密度培养过程中主要的抑制性代谢副产物。据报道^[21],Aristidou等通过对糖酵解途径的修饰,使多余的丙酮酸转化成非酸性、毒性较小的副产物 3-羟基丁酮,从而消除了乙酸的副作用,重组蛋白的表达量约提高了 220%,细胞浓度增加了 35%。

大肠杆菌在厌氧或氧气受限的条件下,会生成乙酸;供氧充分时,如果葡萄糖的摄入速率高于 TCA 循环的周转能力,也可使中间产物乙酰辅酶 A 通过乙酰磷酸途径产生乙酸。在中心代谢途径中,若碳通量超过了生物合成的需求量和细胞的产能容量时乙酸也会被合成,三羧酸循环和(或)电子传递链的饱和可能是主要原因。在通气培养条件下,当细菌的生长速率超过一定限度,三羧酸循环达到饱和时,也会导致培养基中乙酸的积累。Han^[16]认为细菌在低比生长速率条件下通过氧化代谢作用产生的能量足以满足合成和异化作用的需求,不会产生乙酸,而在高比生长速率时,大肠杆菌仅靠氧化代谢不能提供足够的能量,必须通过乙酸生成途径储备 ATP 和 NADH₂。通过分析乙酸产生机制,在供氧水平、葡萄糖浓度及比生长速率等方面采用相应的措施,以降低发酵过程中乙酸的含量。发酵结果表明,采取调节溶氧水平、选择合适的初始葡萄糖浓度、限制葡萄糖流加速度及控制菌体比生长速率等措施能有效降低发酵过程中的乙酸含量,使菌体生物量及 L-色氨酸产量得到显著提高,且实现了高密度发酵培养,这对工业化发酵生产 L-色氨酸提供了理论依据并具有一定实用价值。

参考文献

- [1] 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.发酵科技通讯,2008,37(4): 34-36.
- [2] Yanofsky C. Using studies on tryptophan metabolism to answer basic biological questions. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003(13): 10858-10878.
- [3] Hodgson J. Expression systems: a user's guide, emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. *Biotechnology*, 1993, 11(8): 887-893.
- [4] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, 14(3): 98-105.
- [5] Yee L, Blanch HW. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 1992, 10(12): 1550-1556.
- [6] 郑梦杰. 大肠杆菌工程菌的高密度培养.《国外医学》预防、诊断、治疗用生物制品分册,2001,24(4): 151-153.
- [7] 刘慧娟,华兆哲,堵国成,等.芽孢杆菌发酵生产碱性果胶酶的温度控制策略.过程工程学报,2007(4): 786-789.
- [8] Suare DC, Kilikian BV. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 2000, 35: 1051-1055.
- [9] 梁剑光,朱玲,徐正军.靛酚蓝-分光光度法测定发酵液中氨态氮含量研究.食品与发酵工业,2006,32(9): 134-137.
- [10] Majewski RA, Domach MM. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35(9): 732-738.
- [11] 郑志永,姚善泾.应用溶氧反馈控制高密度培养重组大肠杆菌过程中乙酸的产生.高校化学工程学报,2006,20(2): 233-238.
- [12] 钟根深,石炳兴,吴祖泽.重组大肠杆菌高密度培养.中国生物工程杂志,2005,增刊: 27-31.
- [13] Castan A, Nasman A, Enfors S. Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002(30): 847-854.
- [14] Phue JN, Shiloach J. Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(5/6): 353-363.
- [15] Riesenber D. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnol*, 1991, 2(3): 380-384.
- [16] Han K, Lim HC, Hong J. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 39(6): 663-771.

[17] 冯志彬, 徐庆阳, 陈宁. 代谢副产物对 L-苏氨酸发酵的影响及应对措施. 食品与发酵工业, 2007, 33(6): 32-36.

[18] McSweeney CS, Palmer B, Bunch R, *et al.* Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(7): 3075-3083.

[19] 李寅, 高海军, 陈坚. 高细胞密度发酵技术. 北京: 化学工业出版社, 2006: 206-220.

[20] Khalilzadch R, Shojaosadati SA, Bahrami A, *et al.* Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(23): 1989-1992.

[21] Aristidou AA, San KY, Bennett GN. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction. *Biotechnol Prog*, 1995, 11(4): 475-478.

2010 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第三届生物资源与环境调控学术研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	5-6 月	120	安徽合肥	李峰 010-82109561
2	曲霉和曲霉病研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5 月 15-16 日	150	天津	刘伟 010-83573056
3	第八届中日病毒学会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	7 月 4-7 日	100	黑龙江哈尔滨	张凤民 0451-86669576 钟照华 0451-86685122
4	第八届全国微生物学青年学者学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	7 月 21-24 日	150	云南昆明	李文均 0871-5033335
5	第三届全国农业微生物研究及产业化研讨会	中国微生物学会农业专业委员会	8 月	120	新疆阿拉尔	张利莉 agmicrob@mail.hzau.edu.cn
6	第二届微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8 月	150	黑龙江大庆	阮志勇 13301101231
7	第十一届全国土壤微生物学术讨论会暨第四届全国微生物肥料生产技术研究研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	9-10 月	150	湖南长沙	李俊 010-68975891
8	合成生物学学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	9-10 月	80	上海	朱春宝 021-62896804
9	2010 年全国微生物毒素与创伤感染学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	9 月 17-20 日	250	重庆	梁华平 023-68757404
10	第 11 届中日韩国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	10 月	150	四川成都	金城 64807425
11	病原进化与致病机制国际研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	10 月 22-25 日	150	江苏镇江	倪斌
12	第十三次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	10 月	500	江苏南京	蒋建东 025-84395326
13	2010 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10 月	500	安徽	王旭 010-64807200
14	首届全国芽孢杆菌研究及产业化研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	10 月	140	湖北武汉	翁锦周 bacillus@mail.hzau.edu.cn
15	第三届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	11 月	150	福建厦门	邵宗泽 micgeno@mail.hzau.edu.cn
16	第一届中国临床微生物学大会	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	11 月	500	贵州遵义	李宣霖 13976609892