

谷氨酸生产菌种选育和高产条件的优化及生物素的测定

Breeding of Glutamic Acid Producing Strains and Optimization of High Yield Conditions and Determination of Biotin

孙婧

Jing Sun

中粮生化能源(龙江)有限公司,中国·黑龙江 齐齐哈尔 161000

COFCO Biochemical Energy (Longjiang) Co. Ltd., Qiqihar, Heilongjiang, 161100, China

【摘要】谷氨酸大量存在于谷类蛋白质及动物脑中,是一种酸性氨基酸,在生物体内的蛋白质代谢过程中具有重要作用,并参与其中的许多重要化学反应。论文主要根据代谢控制发酵原理,对谷氨酸菌种的培育方法以及高产条件的优化进行深入研究,并得到了谷氨酸发酵的最优方案,对发酵培养基中生物素含量的测定方法进行了研究。

【Abstract】Glutamic acid is abundant in cereal proteins and animal brains, it is an acidic amino acid that plays an important role in the metabolism of proteins in living organisms and participates in many important chemical reactions. The paper mainly studies the cultivation method of glutamic acid bacteria and the optimization of high-yield conditions based on the principle of metabolic control fermentation, and obtains the optimal scheme of glutamic acid fermentation. The research on methods for determining the biotin content in fermentation medium is carried out.

【关键词】谷氨酸;菌种选育;生物素

【Keywords】glutamic acid; strain selection; biotin

【DOI】<https://doi.org/10.26549/gcjsygl.v2i8.1114>

1 引言

氨基酸的发展前景十分广阔,以谷氨酸为基础生产的各种产品在食品、化工、医药等行业都有广泛的应用,其需求量日益增加。由于现代微生物技术以及生物工程技术的发展,使传统粗放型的谷氨酸发酵工业转变为以发酵代谢机理为指导的新型工业,极大地促进了谷氨酸发酵工业的发展。谷氨酸生产工业结合现代先进技术,能够有效促进谷氨酸菌种的培育以及下游产品的开发。

2 谷氨酸生产菌种的培育方法

2.1 谷氨酸生物合成的代谢途径

如图1为谷氨酸发酵的代谢途径,主要包括 HMP、EMP、TCA 循环、乙醛酸循环等。

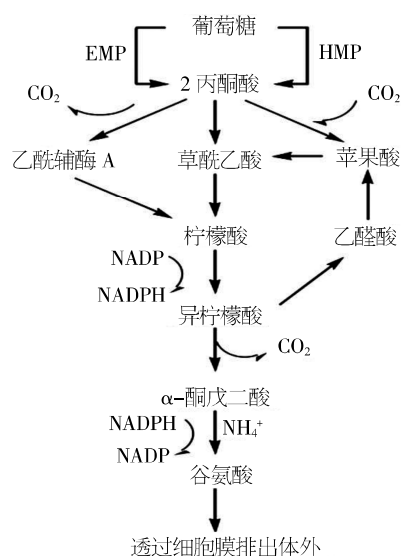


图1 谷氨酸发酵的代谢途径

2.2 谷氨酸生产菌种的特点及选育方法

谷氨酸生产所用的菌种主要有以下几点特征：①不分解利用谷氨酸；②椭圆、短杆、棒状；③不运动、革兰氏阳性、无芽孢；④生物素缺陷型；⑤CO₂固定反应强；⑥细胞膜渗透缺陷型；⑦脲酶强阳性；⑧NADPH₂进入呼吸链能力弱；⑨乙醛酸循环弱、异柠檬酸裂解酶弱、α-酮戊二酸继续氧化能力弱等。而根据以上几个特点，选育谷氨酸菌种的方法主要有：诱变育种（如图2所示）、改变或阻断代谢途径、原生质体融合育种以及构建新型基因工程菌等。钝齿棒杆菌、天津短杆菌、北京棒杆菌及其突变株等均为中国用于谷氨酸生产的主要菌种，遗传性较为稳定，且性状良好，谷氨酸的产量比较稳定。

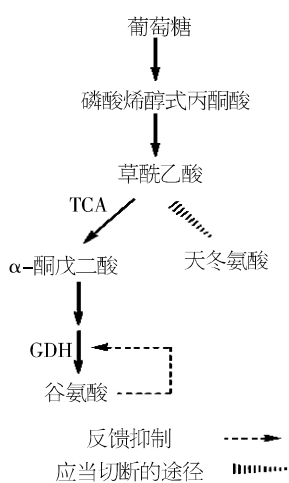


图2 谷氨酸诱变程序

3 谷氨酸的发酵条件及其优化

3.1 葡萄糖浓度

由以往实验可知，不同的葡萄糖浓度对谷氨酸发酵水平有一定的影响。图3为不同葡萄糖浓度下的谷氨酸产量，由图可知葡萄糖浓度在11%~13%之间时，其谷氨酸的产量达到最高。

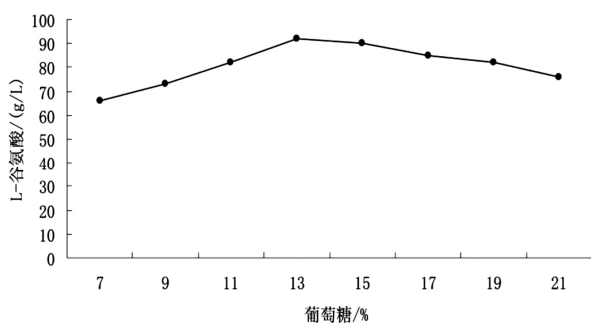


图3 葡萄糖对谷氨酸发酵的影响

3.2 尿素浓度

作为发酵的氮源，尿素可以控制谷氨酸发酵初期的pH

值。在谷氨酸发酵初期，在pH6.5~pH8.0条件下，菌体均能正常生长；当pH为7.5时，菌体生长最为旺盛。图4为尿素添加量的测定以及发酵8h后的发酵液pH值的测定结果，由图可知，随着尿素添加量的不断增加，pH值也随之提高。当pH值为6.5~8.0，尿素添加量为0.7%~0.9%时，发酵产酸达到最大值91g/L。

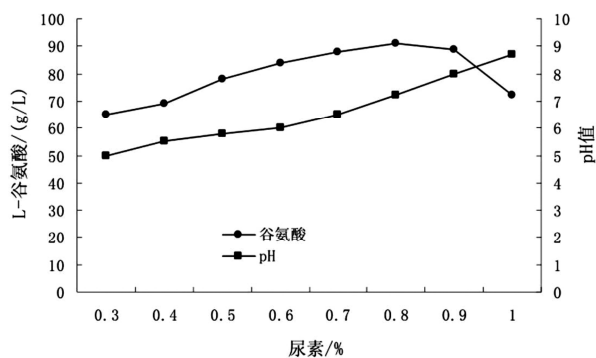


图4 尿素浓度对谷氨酸发酵的影响

3.3 KCl的含量

K⁺是许多酶的激活剂，虽然不参与细胞物质的组成，但能够促进糖代谢。适当的钾离子浓度可以使酶促反应的酶活较高，保证菌体的繁殖浓度，从而得到较高的谷氨酸产量。如图5所示，随着K⁺浓度的增高，菌体的净增值(OD)与谷氨酸产量在上升后开始下降，当K⁺浓度为0.08%左右时，其谷氨酸的产量达到最高。

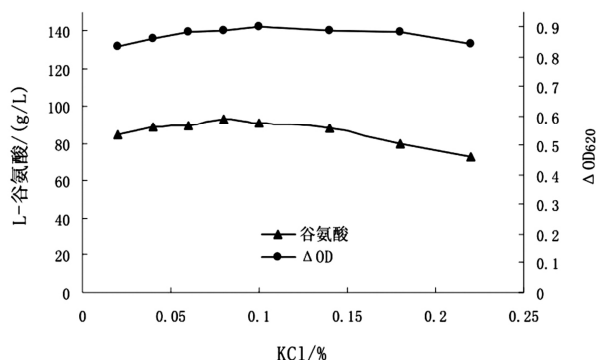


图5 KCl浓度对谷氨酸发酵的影响

3.4 Na₂HPO₄的浓度

图6为不同浓度Na₂HPO₄对谷氨酸发酵的影响，随着PO₄³⁻浓度的增高，净增值(OD)与谷氨酸含量先升高后下降，在PO₄³⁻浓度为0.09%~0.11%时，谷氨酸产量较高。由图可知，无机盐离子的浓度高低对谷氨酸产量的影响相对较小，主要是因为谷氨酸的生产原料玉米浆和糖蜜中含有一定的无机盐离子，因此，培养基中添加的无机盐离子含量的多少对发酵产酸的影响不大。

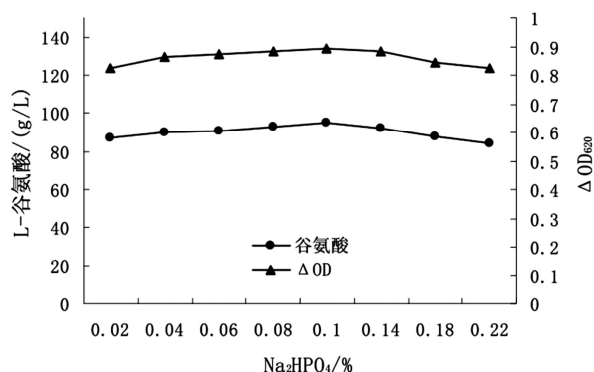


图6 Na₂HPO₄ 的浓度对谷氨酸发酵的影响

3.5 高产条件的优化

表1 正交试验方差分析表

因素	偏差平方和	F比	自由度	F临界值
葡萄糖	205.346	3.346	2	3.110
尿毒	13.634	0.311	2	3.110
KCL	8.355	0.156	2	3.110
Na ₂ HPO ₄	17.622	0.295	2	3.110
误差	244.89	—	8	—

在谷氨酸生产发酵过程中,葡萄糖含量、尿素含量、KCl和Na₂HPO₄含量对谷氨酸发酵的影响相对较大。由以上实验可得到四种影响因素的最佳浓度。在四个水平上,以谷氨酸产量(g/L)为试验指标进行L₉(3⁴)正交试验。

由表1可知,葡萄糖的浓度对谷氨酸发酵水平具有显著的影响,其次为Na₂HPO₄浓度,KCl对谷氨酸发酵水平的影响最小。在进行各影响因素的优化后,其最佳条件为葡萄糖13%、Na₂HPO₄0.09%、尿素0.8%、KCl0.07%。

4 谷氨酸发酵中生物素的测定

生物素(biotin),是B族维生素的一种,是机体许多酶的辅助因子。谷氨酸发酵的主要原料为淀粉水解糖液,有机氮源

和生物素源是玉米浆和糖蜜。通过对淀粉水解糖液、玉米浆和糖蜜中的生物素含量进行测定,并结合发酵罐的实际运行情况,对淀粉水解糖液、玉米浆和糖蜜的添加量进行及时地调整,有效控制好发酵液中生物素的浓度,促进谷氨酸发酵的稳定、顺利,从而提高谷氨酸的产量^[1]。

4.1 荧光分光光度法

荧光分光光度法反应灵敏、检测限低,具有快速、简便、用样量少等优点。但是荧光标记物容易与能产生荧光的色氨酸等检测样品中的杂质反应,从而严重干扰生物素的测定结果。另外,由于荧光容易猝灭,其测定结果重现性差、不准确,因此,对测定实验的操作要求比较严格。

4.2 微生物法

根据检测样品的特殊性,通过对多种检测方法的检测原理、适用范围以及条件的深入研究,并进行可行性比较,谷氨酸发酵中生物素含量检测方法中,最为可行的是微生物法。微生物法是利用营养缺陷型菌株细胞的生长、繁殖与环境中的某一限制性营养因子的含量之间存在关联性而建立起来的一种生物检测方法。

5 结语

L-谷氨酸作为生产量最大的氨基酸之一,通过对谷氨酸菌种的培育优化,从而提高谷氨酸产酸率和糖酸转化率,能够提高企业的经济效益。谷氨酸生产的发展方向是选育优良的谷氨酸生产菌种,以打破单一的发菌种应用生产的模式,并通过控制关键影响因素,从而使生产效益达到最优,促进中国氨基酸行业的长远发展。

参考文献

[1]王卫.γ-聚谷氨酸高产菌株的选育及培养基的优化[D].河南:河南工业大学,2016.