

文章编号 1000-5013(2001)02-199-03

# 谷氨酸生产菌培养基最优配比设计

陈 碧 娥

(华侨大学材料科学与工程学院, 泉州 362011)

**摘要** 采用均匀设计方法, 优化 *L*-谷氨酸生产菌发酵培养基的组成, 经回归分析和发酵试验, 得出最佳配方. 在此条件下, 谷氨酸的发酵指数为  $2.57 \text{ g} \cdot (\text{h} \cdot \text{L})^{-1}$ , 其转化率为 51.4%.

**关键词** 谷氨酸, 发酵培养基, 均匀设计

中图分类号 TQ 922+.1

文献标识码 A

*L*-谷氨酸能参与人体氮的代谢, 以及各种生理活动. 尽管发酵法生产谷氨酸已有悠久的历史, 但人们仍不断地致力于菌种和发酵条件的研究<sup>[1,2]</sup>, 以期提高产酸率. 国内谷氨酸的生产菌多数是生物素缺陷型菌株, 培养基的营养条件对产酸率有很大的影响. 发酵过程是一个与微生物生命活动相联系的复杂生物化学过程<sup>[3]</sup>, 影响因素较多, 且因素之间互相影响. 要利用为数不多的试验, 获得有充分代表性的试验结果, 试验的设计方法就显得十分重要. 本研究利用均匀设计的方法, 优化培养基的配方, 增加目标产物 *L*-谷氨酸的产量.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要原材料

- (1) 菌种为谷氨酸棒杆菌(Q-97), 由福建省泉州市中侨集团味精厂提供的菌种分纯而得.
- (2) 口服葡萄糖, 市售. 糖蜜、玉米浆、尿素为工业用原料. 其它试剂均为化学纯试剂.

### 1.2 培养基

- (1) 斜面培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基.
- (2) 一级种子培养基: 30 g 口服葡萄糖, 30 g 玉米浆, 1.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6 g 尿素, 0.4 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001 g  $\text{FeSO}_4$ , 0.001 g  $\text{MnSO}_2$ , 1.0 L 水, pH 值为 6.7.
- (3) 发酵培养基: 160 g 口服葡萄糖, 6 g 尿素,  $\text{NaHPO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 玉米浆等糖蜜按比例加入, 1.0 L 水, pH 值为 7.0.

### 1.3 培养条件

- (1) 一级种子: 培养温度  $34^\circ\text{C}$ , 培养时间根据 pH 值和 OD 值而定. OD 0.45, pH 值为 7.0~7.2.
- (2) 发酵培养: 接种量为 2.5%, 摇床转速为  $110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 培养温度: 在 0~12 h 时为  $34 \sim 35^\circ\text{C}$ , 在 12~28 h 时为  $36 \sim 37^\circ\text{C}$ , 28 h 至放罐时为  $38 \sim 39^\circ\text{C}$ . 培养过程中补加尿素, 控制 pH 值. 发酵终点控制为发酵液中残糖耗至 0.5% 以下, 或谷氨酸不再增加, 一般为 32 h.

1.4 分析方法

(1) 发酵液中残糖的测定: 采用 DNS 法 . (2) OD 值的测定: 稀释一定倍数后, 在波长 640 mm 处用 721 分光光度计测光密度, 光程 1 cm. (3) pH 测定: 用精密 pH 试纸测定 . (4) 谷氨酸含量测定: 采用 SAB-40 系列生物传感器双功能分析仪测定, 或采用华勃氏法测定 .

1.5 均匀设计

采用均匀设计的方法<sup>[4,5]</sup>优化发酵培养基的配方, 以发酵终点产酸作为衡量标准 . 用多元二次多项式逐步回归的方法, 根据实验数据和预定数学模型, 运用数理统计的方法进行参数估计, 建立回归方程. 推断其可信性, 由回归方程对发酵产酸进行预测 .

2 结果与讨论

2.1 均匀设计方案及实验结果

发酵培养基中, 葡萄糖浓度和初始尿素浓度为固定组成 . 主要考察  $\text{NaHPO}_4(X_2)$ ,  $\text{KCl}(X_3)$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(X_4)$  3 个组分的浓度, 以及糖蜜和玉米浆中的生物素( 也作为 1 个组分  $X_1$ ) 浓度对发酵产酸的影响 .  $X_1, X_2$  取 10 个水平,  $X_3, X_4$  采用拟水平法. 采用 4 因素 10 水平的均匀设计表  $U_{10}(10^{10})$ . 根据  $U_{10}$  的使用表选用 1, 2, 5 和 7 列, 得 4 因素的水平表, 如表 1 所示 . 表 2 为均匀设计试验方案及摇瓶发酵的谷氨酸(GA) 产量( $C$ ) .

表 1 培养基配比试验因素水平表

因 素	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$X_1/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	25.0	27.0	29.0	31.0	33.0	35.0	37.0	39.0	41.0	43.0
$X_2/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.3
$X_3/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.2	0.2	0.4	0.4	0.6	0.6	0.8	0.8	1.0	1.0
$X_4/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.6	0.6	0.8	0.8	1.0	1.0	1.2	1.2	1.4	1.4

表 2 均匀设计 试验方案及实验结果

因 素	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$X_1/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	25.0	27.0	29.0	31.0	33.0	35.0	37.0	39.0	41.0	43.0
$X_2/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1.5	1.7	1.9	2.1	2.3	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2
$X_3/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.6	1.0	0.4	1.0	0.4	0.8	0.2	0.8	0.2	0.6
$X_4/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1.2	0.8	1.4	1.0	0.6	1.4	1.0	0.6	1.2	0.8
$C/(%)$	7.4	7.6	8.0	6.8	7.1	7.7	7.4	6.1	7.0	5.9

2.2 试验数据的回归分析及方程的建立

表 3 多元二次多项式逐步回归结果

变 量	回归系数	$F$	标准回归系数
$a$	2.104	—	—
$X_1$	4.142	3.430	4.160
$X_3$	- 6.011	2.430	- 0.030
$X_1^2$	- 0.697	4.510	- 4.780
$X_3^2$	- 17.809	2.720	- 0.330
$X_4^2$	22.772	1.210	0.230

得回归方程为

$$Y = 2.104 + 4.142X_1 - 6.011X_3 - 0.697X_1^2 - 17.809X_3^2 + 22.772X_4^2.$$

回归方程的显著性检验值  $F=6.4112$ , 影响较显著. 回归方程的复相关系数  $R=0.09429$ , 剩余标准差  $S=0.3008752$ . 回归方程有参考意义. 根据二次函数求极值原理, 取  $X_1=30, X_2=1.4, X_3=0.2, X_4=1.4$ . 将优化后的配方代入方程, 预测产酸率为 8.23%, 高于实验的最高产酸率, 其糖酸转化率为 51.4%.

2.3 发酵培养基的优化

经回归分析, 优化培养基的 4 种组分均在试验水平范围内. 以优化后的培养基(1<sup>#</sup>)与原工厂使用的培养基(2<sup>#</sup>)同时进行摇瓶发酵试验, 连续三批试验结果的平均值列于表 4. 表中发酵周期为  $t$ , 转化率为  $\eta$ . 从表可看出, 优化培养基明显地提高了 Q-97 的产酸和化率.

表 4 比较原培养基与优化培养基的发酵结果

序 号	$X_1/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$X_2/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$X_3/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$X_4/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$t/\text{h}$	$C/(\%)$	$\eta/(\%)$
1 <sup>#</sup>	30	0.14	0.02	0.14	32	8.33	52.0
2 <sup>#</sup>	28	1.7	6.0	1.0	32	6.85	42.8

3 结束语

本研究采用均匀设计的方法, 由回归分析及实际试验, 可得出谷氨酸棒杆菌 Q-97 的最佳发酵培养基配方. 该培养基的营养配比有利谷氨酸的积累.

参 考 文 献

1 Kimura E, Yagoshi C. Glutamate overproduction in corynebacterium glutamicum triggered by a decrease in the level of a complex comprising DtsR and a biotin containing subunit[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem. , 1999, 63(7), 1 274 ~ 1 278

2 Delaunay S, Gourdon P. An improved temperature-triggered process for glutamate production with corynebacterium glutamicum[J]. Enzyme. Microb. Technol. , 1999, 25( 8): 762 ~ 768

3 陈碧娥, 刘祖同. 玉米粉直接发酵生产 L-乳酸钙[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 1995, 16(3): 318 ~ 322

4 方开泰. 均匀设计[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363 ~ 372

5 白新桂. 数据分析与试验优化设计[M]. 北京: 清华大学出版社, 1986. 1 ~ 10

Optimal Proportioning Design of Culture Medium  
for Corynebacterium Glutamicum Q-97

Chen Bie

( College of Mater. Sci. & Eng. , Huaqiao Univ. , 362011, Quanzhou)

**Abstract** The composition of fermentation medium for corynebacterium glutamicum Q-97 as glutamic acid producer can be optimized by adopting method of even design. The optimal prescription of fermentation medium can be obtained by way of regression analysis and fermentation test. Under these conditions, it shows a fermentation index of 2.57 g glutamic acid per liter per hour and a yield of 0.514 g glutamic acid per gram glucose.

**Keywords** glutamic acid, fermentation medium, even design