

流加培养与氧调控协同提高大肠杆菌产L-苏氨酸

王泽建¹, 银肖剑¹, 郭文慧², 吕莹², 范晓光³, 栗波¹, 梁剑光^{2*}

(1. 华东理工大学 生物工程学院, 上海 200237; 2. 常州大学 药学院 生物与食品工程学院, 江苏 常州 213164; 3. 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以实验室1株大肠杆菌为出发菌株, 首先将活化后的大肠杆菌菌液按照5%接种量接种至优化后的发酵罐培养基中进行培养, 调节控制溶解氧不低于15%, 并实时流加葡萄糖酸钠、磷酸甜菜碱和玉米浆干粉混合溶液, 控制细胞的氧消耗速率(oxygen uptake rate, OUR)为215 mmol/(L·h), 通过在线氧消耗速率控制系统、补料控制与OUR调节的作用关系, 获得最优流加补料方案: 流加25%氨水控制pH值, 调整转速和通气控制溶氧15%以上, 当溶氧开始回升时流加质量浓度为65%的葡萄糖, 起始流加速度1 g/(L·h), 控制残糖浓度不超过1.0 g/L。结果表明: L-苏氨酸产量提高了35%, 达到155 g/L。

关键词: L-苏氨酸; 氧消耗速率; 优化调控; 流加培养; 大肠杆菌

Cooperation of Fed-Batch Culture and Oxygen Regulation Increases L-Threonine Production by *Escherichia coli*

WANG Zejian¹, YIN Xiaojian¹, GUO Wenhui², LÜ Ying², FAN Xiaoguang³, LI Bo¹, LIANG Jianguang^{2*}

(1. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. School of Pharmacy & School of Biological and Food Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, China; 3. School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Escherichia coli* as the starting strain was activated and inoculated at an amount of 5% into the optimized medium in the fermenter with the dissolved oxygen no less than 15%. The mixture of sodium gluconate, betaine phosphate, and corn steep liquor powder was fed in real time, and the oxygen uptake rate (OUR) was controlled at 215 mmol/(L·h). According to the relationship of the online OUR control system and the feed control strategies with OUR regulation, the feed-batch scheme was optimized as follows: feeding 25% ammonia for the control of pH, maintaining dissolved oxygen at above 15% by agitation and aeration, feeding 65% glucose at the initial flow acceleration of 1 g/(L·h) when the dissolved oxygen increased, and keeping the residual glucose concentration not exceeding 1.0 g/L. The results showed that the L-threonine yield was increased by 35%, reaching 155 g/L.

Key words: L-threonine; oxygen uptake rate; optimizing and regulation; fed-batch culture; *Escherichia coli*

引文格式:

王泽建, 银肖剑, 郭文慧, 等. 流加培养与氧调控协同提高大肠杆菌产L-苏氨酸[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(5): 160-166.

WANG Zejian, YIN Xiaojian, GUO Wenhui, et al. Cooperation of Feed-Batch Culture and Oxygen Regulation Increases L-Threonine Production by *Escherichia coli*[J]. Food Research and Development, 2025, 46(5): 160-166.

基金项目: 高端氨基酸的生产技术攻关及产业化应用项目(CEIEC-2022-ZM02-0259)

作者简介: 王泽建(1978—), 男(汉), 教授, 博士, 研究方向: 发酵过程优化与放大。

*通信作者: 梁剑光, 男, 教授, 博士, 研究方向: 生物工程过程。

L-苏氨酸是人体和动物必需的氨基酸之一,有改善机体免疫、促进人体及禽畜生长等功能^[1-2],被广泛用于医药、食品强化剂和饲料添加剂等方面^[3]。目前,L-苏氨酸主要通过大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌等微生物发酵制备^[4]。通过对高产L-苏氨酸的大肠杆菌发酵条件优化,可有效提高L-苏氨酸产量^[5-6]。发酵法制备具有成本低、产率较高及环境污染较小等优势,促进了L-苏氨酸的规模化生产。

L-苏氨酸与人的生命健康息息相关,其作用不可小觑,无论是对人体还是对其他动物、植物、微生物,L-苏氨酸对生物体蛋白质的合成以及生命活动的正常进行有着不可替代的作用,在饲料行业、食品行业、医药行业、环保行业有着独一无二的广泛应用^[7-10]。研究和优化葡萄糖直接发酵法生产L-苏氨酸不仅对我国氨基酸生产行业的发展有积极作用,更是推动我国生物技术研究的进步与大力发展^[11-12]。L-苏氨酸的生产研究国内外差距较大,目前国内L-苏氨酸的产业化瓶颈主要是生产菌株方面生产效率低、遗传性状不稳定、产物合成相关酶系的效率低;发酵转化过程控制困难、副产物多、转化率低、能耗高、污染严重等问题^[13-14]。

本研究以实验室大肠杆菌为出发菌株,通过Plackett-Burman(PB)和中心组合优化试验,筛选出最优的发酵培养基关键组分及最佳配比方案,并研究生产菌L-苏氨酸发酵过程中生理代谢参数变化,优化发酵培养基补料与菌体氧消耗速率(oxygen uptake rate, OUR)最优控制水平,以期进一步提升L-苏氨酸产量,对L-苏氨酸工业生产工艺优化具有重要的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种

试验菌种大肠杆菌为 *Escherichia coli* Bio-59193。

1.1.2 培养基配方

固体 LB 培养基的配制:氯化钠 5 g/L、酵母粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、琼脂 15 g/L,分装在 500 mL 的三角瓶内,每瓶 200 mL,无菌膜封口,121 °C 条件下灭菌 30 min,取出降温至 55 °C 左右,倒平板。

微量元素混合液配制:硫酸铜 6.00 g/L、碘化钠 0.10 g/L、硫酸锰 4.00 g/L、生物素 0.50 g/L、钼酸钠 0.60 g/L、硼酸 0.08 g/L、氯化钴 10.00 g/L、硫酸亚铁 80.00 g/L。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计(UV-2100):尤尼柯(上海)仪器有限公司;精密电子天平(FA3103C+):上海精科天美科学仪器有限公司;霉菌培养箱(KC/HWHSJ-408L):上海申贤恒温设备厂;恒温培养摇床(Master-JX 2021R):上海世平实验设备有限公司;立式压力蒸

汽灭菌器(LDZH-150L):上海申安医疗器械厂;超净工作台(SW-CJ-2FD):苏州佳宝净化工程设备有限公司;50 L 发酵罐(BLBIo-50SJ):上海百仑生物科技有限公司;高效液相色谱仪(Nexera XR):日本岛津公司;生物传感分析仪(SBA-40E):山东省科学院生物研究所;过程质谱仪(HP-01):上海舜宇恒平有限公司;氨基酸分析仪(Agilent 1260 Infinity):美国安捷伦公司。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养

刮取新鲜的菌落接至 500 mL 锥形瓶中,装液量 100 mL,8 层纱布封口,置恒温培养摇床上,220 r/min、35 °C 振荡培养 12 h。

1.3.2 发酵培养

500 mL 锥形瓶中装液量 50 mL,发酵摇瓶在灭菌前需额外加入碳酸钙 0.5 g/L 用于短暂维持 pH 值的稳定,消泡剂 2 滴/瓶。接种量 8%,8 层纱布封口,置恒温培养摇床上,220 r/min、35 °C 振荡培养 36 h。

1.3.3 发酵罐流加培养

标定 pH 电极,用饱和亚硫酸钠溶液标定溶氧 0%。50 L 发酵罐装液量为 20 L,121 °C 灭菌 30 min,接种前温度降至 37 °C,搅拌 700 r/min,通气量为 30 L/min,标定溶氧 100%。接种量为 5%(体积比),整个过程中流加 25% 氨水控制 pH 6.5,流加消泡剂,发酵过程中调整转速控制溶氧 20% 以上。当溶氧降至最低,开始回升时流加质量浓度为 65% 的葡萄糖,起始流加速度 1 g/(L·h)。溶氧持续回升,则增加补糖量,控制残糖浓度 0.01 g/L 左右。整个发酵过程中利用过程质谱仪检测尾气,利用 Biostar 软件在线采集过程参数,包括温度、pH 值、溶氧强度(dissolved oxygen stress, DO)、转速、二氧化碳释放速率(carbon dioxide evolution rate, CER)、氧消耗速率(OUR)、呼吸商(respiratory quotient, RQ)等细胞生理参数。

1.4 试验方法

1.4.1 生物量 OD₆₀₀ 测定

发酵液原液稀释至适当倍数于分光光度计上在 600 nm 下测定 OD₆₀₀,OD₆₀₀ 为所测吸光度×稀释倍数^[15]。

1.4.2 产物 L-苏氨酸产量测定

分析条件:柱温 36 °C,流速为 1 mL/min,吸收波长 360 nm,进样量 10 μL。

衍生方法:样品放置沸水浴 10 min 除蛋白,12 000 r/min 离心 5 min 取上清液,加入衍生缓冲液 200 μL、衍生剂 300 μL、待测样品 40 μL,振荡 1 min,12 000 r/min 离心 5 min 取上清液。65 °C 避光水浴 60 min 后冷却至室温,12 000 r/min 离心 5 min 取上清液。添加缓冲溶液定容至 1.2 mL。待测样品用 0.2 μm 有机系针头过滤器过膜处理^[16],采用氨基酸分析仪的检测方法进行 L-苏氨酸产量测定。

1.4.3 残糖浓度测定

残糖浓度采用生物传感分析仪测定^[17]。将发酵液离心(4 000 r/min, 25 min)后,取上清液稀释适当倍数(B)后充分振荡混匀,吸取 25 μL 稀释液测定,得到稀释液浓度 A(mg/100 mL)。残糖浓度(C, mg/L)按下列公式计算。

$$C = A/10 \times B$$

1.4.4 Plackett-Burman(PB)单因素试验设计

根据 PB 单因素试验设计,考察磷酸甜菜碱(A)、葡萄糖酸钠(B)、磷酸氢二钠(C)、微量元素(D)、硫酸镁(E)、硫酸铵(F)、玉米浆干粉(G)、磷酸二氢钾(H)对发酵的影响,以 L-苏氨酸发酵产量为评价指标,利用 Design-Expert 8.0 软件进行分析。PB 设计因素和水平如表 1 所示。

表 1 Plackett-Burman 设计因素和水平
Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

水平	因素							
	A 磷酸甜菜碱/(g/L)	B 葡萄糖酸钠/(g/L)	C 磷酸氢二钠/(g/L)	D 微量元素/(mL/L)	E 硫酸镁/(g/L)	F 硫酸铵/(g/L)	G 玉米浆干粉/(g/L)	H 磷酸二氢钾/(g/L)
-1	0.5	1.5	5.0	1.5	2	2.0	8	2.0
1	3.0	4.0	10.0	2.5	6	5.0	25	5.0

1.4.5 中心组合试验设计(central-composite design, CCD)

在 Plackett-Burman(PB)单因素试验基础上,通过 CCD 试验设计,以 L-苏氨酸产量为指标,考察磷酸甜菜碱、葡萄糖酸钠、玉米浆干粉 3 个因素对 L-苏氨酸发酵的影响。每组设置 3 组平行。

1.5 数据处理

试验数据与方差分析均采用 Design-Expert 8.0 软

件进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 PB 单因素关键因子优化试验结果

PB 单因素试验结果见表 2。通过对表 2 结果进行方差分析,结果见表 3。

由表 3 可知,模型的 P 值为 0.010 5<0.05,模型的 F 值为 43.26,表明数据统计模型显著,得到的统计结

表 2 Plackett-Burman 设计 L-苏氨酸发酵试验结果
Table 2 Fermentation results of L-threonine by Plackett-Burman design

组号	A 磷酸甜菜碱	B 葡萄糖酸钠	C 磷酸氢二钠	D 微量元素	E 硫酸镁	F 硫酸铵	G 玉米浆干粉	H 磷酸二氢钾	L-苏氨酸产量/(g/L)
1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	4.10
2	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	4.61
3	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	3.85
4	-1	1	1	1	-1	1	1	1	4.05
5	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	4.19
6	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	4.71
7	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	4.09
8	1	1	-1	-1	1	-1	1	1	4.26
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	4.64
10	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	3.94
11	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	3.42
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.33

表 3 Plackett-Burman 设计试验方差分析
Table 3 Analysis of variance of Plackett-Burman design trial

变量	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	变量	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	6.73×10 ⁶	8	8.41×10 ⁵	43.26	0.010 5	F 硫酸铵	6.61×10 ⁵	1	36 935.48	0.43	0.450 2
A 磷酸甜菜碱	1.87×10 ⁶	1	1.87×10 ⁶	21.79	0.004 6	G 玉米浆干粉	36 935.48	1	6.61×10 ⁵	12.34	0.014 1
B 葡萄糖酸钠	3.54×10 ⁶	1	3.54×10 ⁶	18.17	0.013 0	H 磷酸二氢钾	4.23×10 ⁵	1	4.23×10 ⁵	4.92	0.062 9
C 磷酸氢二钠	72 879.51	1	72 879.51	0.85	0.209 4	残差	3.44×10 ⁵	4	86 013.4		
D 微量元素	20 382.8	1	20 382.8	0.24	0.651 9	总值	7.07×10 ⁶	12			
E 硫酸镁	96 350.11	1	96 350.11	1.12	0.084 9						

果有很高的可靠性。磷酸甜菜碱 P 值最小为 0.004 6 < 0.01, 说明对 L-苏氨酸合成影响极显著; 葡萄糖酸钠和玉米浆干粉两个因素的 P 值都小于 0.05, 是 L-苏氨酸发酵的关键影响因素。因此, 这 3 个关键因素进一步通过 CCD 试验确定最优化配比水平考察。

2.2 中心组合设计(CCD)试验结果分析

在 Plackett-Burman(PB)单因素试验基础上, 通过 CCD 设计, 以 L-苏氨酸产量为指标, 考察磷酸甜菜碱、葡萄糖酸钠、玉米浆干粉 3 个因素对 L-苏氨酸发酵的影响。每组设置 3 组平行。各因素及水平试验设计与结果见表 4。运用 Design-Expert 8.0 软件对试验数据进行方差分析, 结果见表 5。

表 4 中心组合设计及结果

Table 4 Central composite design and results

组号	A 磷酸甜菜碱/(g/L)	B 葡萄糖酸钠/(g/L)	C 玉米浆干粉/(g/L)	L-苏氨酸产量/(g/L)
1	1.0	2.0	10.0	1.784
2	3.0	2.0	10.0	2.073
3	1.0	4.0	10.0	2.455
4	3.0	4.0	10.0	2.125
5	1.0	1.0	20.0	2.050
6	3.0	1.0	20.0	2.457
7	1.0	4.0	20.0	2.939
8	3.0	4.0	20.0	2.331
9	0	3.0	15.0	2.575
10	3.8	3.0	15.0	2.574
11	2.0	0	15.0	1.135
12	2.0	5.1	15.0	2.575
13	2.0	3.0	12.0	5.700
14	2.0	3.0	23.7	1.146
15	2.0	3.0	15.0	7.198
16	2.0	3.0	15.0	7.833
17	2.0	3.0	15.0	6.923
18	2.0	3.0	15.0	7.021
19	2.0	3.0	15.0	6.565
20	2.0	3.0	15.0	6.702

表 5 中心组合设计试验方差分析

Table 5 Analysis of variance of central composite design trial

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	104.49	9	11.61	90.11	<0.000 1	***
A 磷酸甜菜碱	0.44	1	0.44	3.43	0.093 9	
B 葡萄糖酸钠	2.25	1	2.25	17.50	0.001 9	**
C 玉米浆干粉	3.45	1	3.45	26.78	0.000 4	***
AB	0.28	1	0.28	2.16	0.172 2	
AC	0.055	1	0.055	0.43	0.528 1	
BC	1.80	1	1.80	13.94	0.003 9	**
A ²	32.96	1	32.96	255.79	<0.000 1	***
B ²	41.49	1	41.49	322.00	<0.000 1	***
C ²	47.33	1	47.33	367.31	<0.000 1	***
残差	1.29	10	0.13			
失拟项	0.28	5	0.056	0.28	0.906 6	
纯误差	1.01	5	0.20			
总值	105.78	19				

注: *表示影响显著($P < 0.05$); **表示影响极显著($P < 0.01$); ***表示影响高度显著($P < 0.001$)。

由表 5 可知, 以 L-苏氨酸产量为响应值的模型决定系数 $R^2=0.987 8$, 矫正决定系数 $R^2_{Adj}=0.976 9$, $P < 0.000 1$, 模型高度显著。所有二次项的 P 值均小于 0.000 1, 说明二次项对 L-苏氨酸产物产量的影响均高度显著。交互项 BC 的 P 值为 0.003 9 < 0.01, 表明葡萄糖酸钠和玉米浆干粉的相交效应对 L-苏氨酸产量影响极显著。

2.3 响应面和等高线分析

运用 Design-Expert 8.0 软件对试验结果进行多元二次回归拟合, 得到 L-苏氨酸产量 (Y) 与各因素的回归方程: $Y=7.01-0.17A-0.35B+0.61C-0.15AB-0.085AC-0.39BC-1.23A^2-0.79B^2-2.30C^2$ 。

根据回归方程生成分析图, 考察响应面的形状。各因素的响应面如图 1 所示。

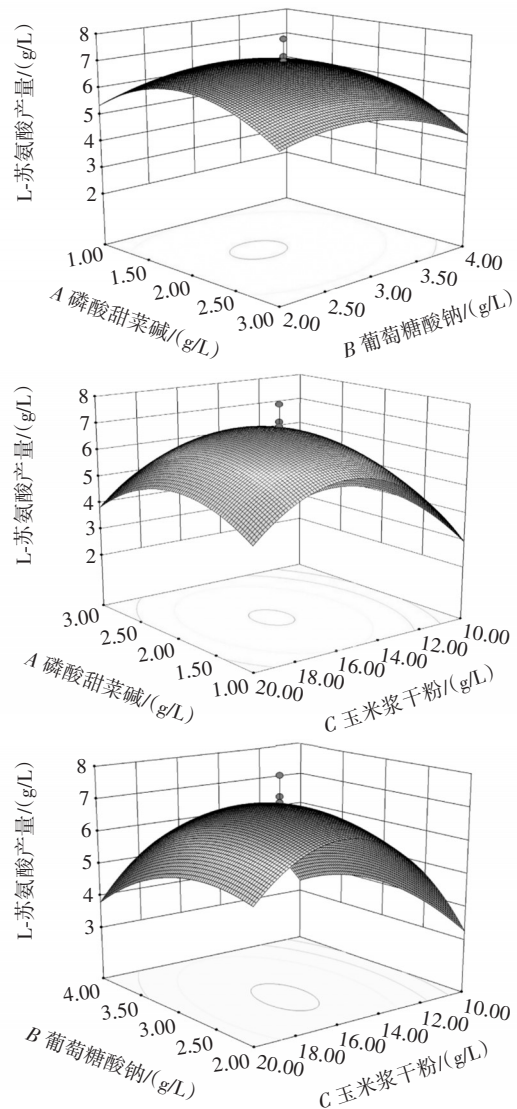


图 1 磷酸甜菜碱、葡萄糖酸钠与玉米浆干粉交互影响 L-苏氨酸产量影响的响应面

Fig.1 Response surface plots of effects of interactions between betaine phosphate, sodium gluconate, and corn steep liquor powder on L-threonine yield

由图1可知,3个响应面的等高线中心都在设定的范围内,表明在设计因素水平内存在最优设计条件。三维响应曲面呈弧形,磷酸甜菜碱、葡萄糖酸钠、玉米浆干粉添加量两两间交互作用:分别固定磷酸甜菜碱、葡萄糖酸钠、玉米浆干粉,L-苏氨酸产量随着另两个因素浓度的增大先升高后下降的趋势,曲面顶点即为L-苏氨酸产物产量最高点。对CCD的3个因素(磷酸甜菜碱、葡萄糖酸钠、玉米浆干粉)进行最优化分析,得出最优条件为磷酸甜菜碱 2.0 g/L、葡萄糖酸钠 2.8 g/L、玉米浆干粉 16.0 g/L。

经过摇瓶试验验证,在最优条件的培养基中得到L-苏氨酸产量为 7.15 g/L,证明该模型较为合理。

2.4 L-苏氨酸的批发酵 OUR 变化规律及补料时间确定

在 15 L 种子罐中,利用种子培养基培养大肠杆菌,过程中控制溶氧不低于 25%,培养 12 h,当菌体浓度 OD₆₀₀ 达到 10 以上,按照 5% 的接种量接种到装有 20 L 发酵培养基的发酵罐中。在 50 L 种子罐的发酵体系下对优化后的培养基进行大肠杆菌的发酵验证试验,发酵过程生理代谢参数如图 2 所示。

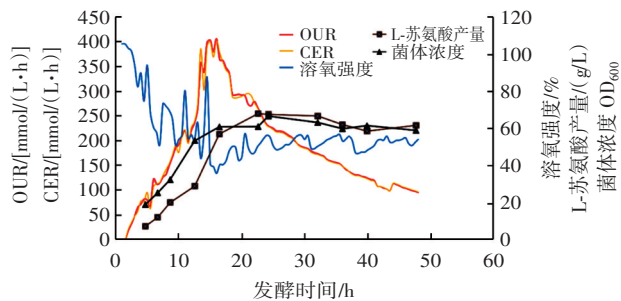


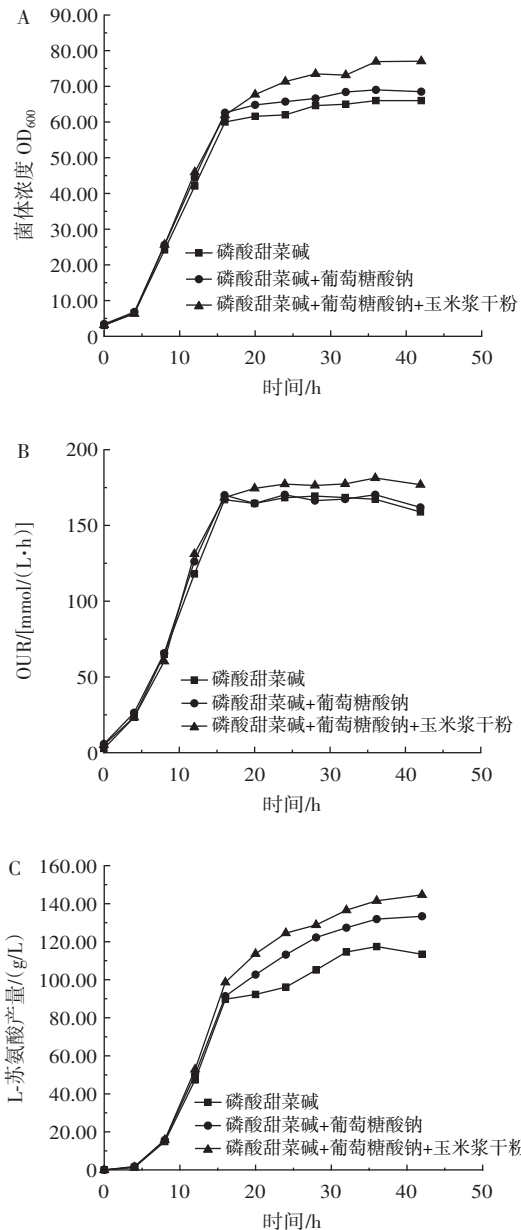
图2 大肠杆菌L-苏氨酸发酵过程生理代谢参数变化曲线

Fig.2 Curves of physiological metabolic parameters of *Escherichia coli* during fermentation for L-threonine production

由图2可知,采用培养基优化后得到的最佳配比进行配料和灭菌操作,发酵过程中通过补糖控制发酵液残糖不高于 1 g/L,过程中通过搅拌转速和通气量控制溶氧不低于 25%,结果显示,发酵过程中 16 h 前菌体生长速度较快,菌体浓度 OD₆₀₀ 达到了 75 以上,并且发酵氧消耗速率(OUR)和二氧化碳释放速率(CER)都达到了 140 mmol/(L·h)以上。发酵时间 20 h 时,离线测定 L-苏氨酸的产量达到 92 g/L。但 16 h 后 OUR 呈现快速下降趋势,此时说明菌株代谢活力降低,相应的产物增长减慢,因此,L-苏氨酸批发酵过程中 16 h 是一个关键补料时间点。

2.5 以 OUR 为指导的培养基流加控制工艺

为更好地促进 16 h 后 OUR 水平的维持,通过补加磷酸甜菜碱、葡萄糖酸钠和玉米浆干粉混合营养物的调控试验,试验结果如图 3 所示。



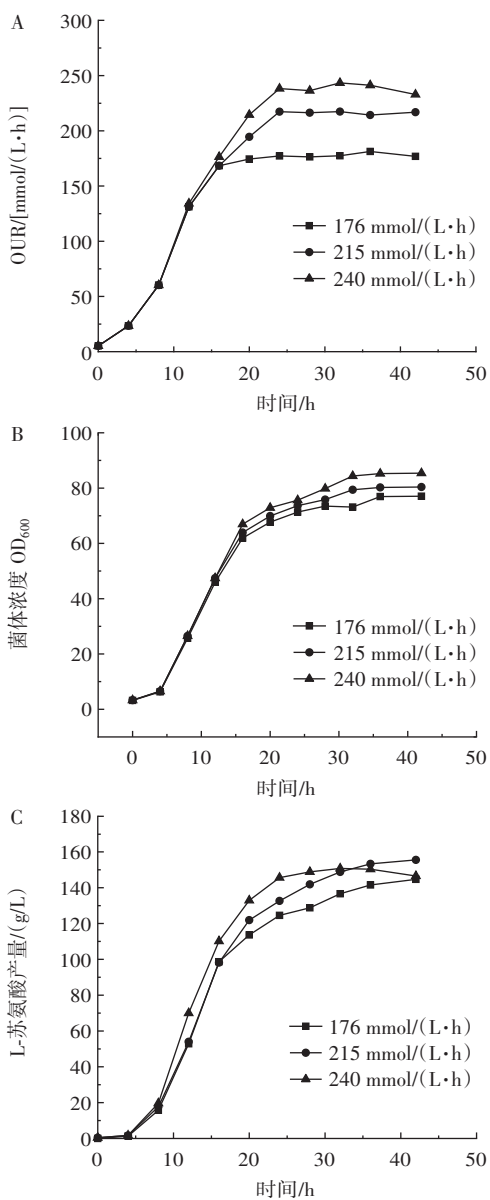
A. 菌体浓度 OD₆₀₀ 变化; B. 氧消耗速率(OUR)变化; C. L-苏氨酸产量变化。

图3 不同补料模式下L-苏氨酸发酵代谢过程变化曲线
Fig.3 Curves of the metabolic process of *E. coli* in L-threonine production by fermentation with different feeding patterns

由图3可知,补加磷酸甜菜碱试验组,发酵过程 OUR 能够较稳定地维持在一定水平,一定程度上促进了菌体浓度的增加和 L-苏氨酸的合成。在此基础上,添加葡萄糖酸钠的试验组,L-苏氨酸的合成速率明显上升。同时补加磷酸甜菜碱、葡萄糖酸钠和玉米浆干粉的情况下,OUR 能够得到很好地维持在 176 mmol/(L·h) 左右,同时菌体浓度明显提升,OD₆₀₀ 值达到 75 以上,产物 L-苏氨酸的合成速率得到了很好地维持,最高达到了 141 g/L。

2.6 不同 OUR 条件下对 L-苏氨酸发酵水平影响

营养和供氧是影响大肠杆菌发酵生产 L-苏氨酸的重要因素,在营养物质供应不受限制的情况下,氧消耗速率反映了菌体的呼吸代谢活力,影响胞内能量代谢和前体物质的供应速率。本研究通过转速和通气量调节供氧条件,维持菌体的氧消耗速率在不同水平。不同 OUR 水平控制策略下 L-苏氨酸发酵代谢过程变化曲线见图 4。



A. 氧消耗速率(OUR)变化;B. 菌体浓度 OD₆₀₀变化;C. L-苏氨酸产量变化。

图 4 不同 OUR 水平控制策略下 L-苏氨酸发酵代谢过程变化曲线
Fig.4 Curves of metabolic process in L-threonine production by fermentation with different oxygen uptake rates

由图 4A 可知,发酵 16 h 进入稳定期后,将 OUR 分别控制在 176、215 mmol/(L·h)和 240 mmol/(L·h)。由图 4B 可知,随着氧消耗速率的提升,菌体对数生长

期的时间明显延长,最终菌体浓度也呈现明显增加的趋势,但 L-苏氨酸的发酵产量的增长趋势与菌体浓度随供氧的变化趋势不同。当 OUR 控制在 215 mmol/(L·h)时,菌体浓度 OD₆₀₀最高可以达到 80,L-苏氨酸的发酵产量达到最高,为 155 g/L,高于 OUR 控制在 240 mmol/(L·h)和 176 mmol/(L·h)条件下的发酵产量(146 g/L 和 143 g/L)。维持氧消耗速率为 240 mmol/(L·h)时,虽然菌体浓度 OD₆₀₀达到了 85 以上,但 L-苏氨酸的最高发酵产量并没有提升,但葡萄糖的消耗速率和呼吸代谢明显提升,更多的葡萄糖转化为二氧化碳排出,葡萄糖合成 L-苏氨酸的转化率只能达到 58.6%,而 OUR 控制在 215 mmol/(L·h)时的糖酸转化率可以达到 60.8%。从经济角度来看,过高的 OUR 并不适合于 L-苏氨酸生产,因此,L-苏氨酸发酵过程中最优化的 OUR 可控制在 215 mmol/(L·h),可较好提高产率,指导工业化生产。

3 讨论与结论

目前国内已有关于 L-苏氨酸的发酵工艺优化的研究,可采用代谢组学分析,对产 L-苏氨酸菌株代谢路径中的流量精确计算,继续提升菌种水平^[18]。还可以通过代谢改造,如在三羧酸循环途径上的改造,过表达关键酶基因来提高前体物质的供应,比如提高前体物质草酰乙酸的供应,对四碳回补途径以及还原力供应途径改造大幅提高 L-苏氨酸的发酵水平^[19-20]。然而,对于生产菌株发酵产 L-苏氨酸的生理代谢参数不清晰,尤其是好氧发酵过程中,呼吸代谢的强度没有进行定量检测和控制,会造成发酵工艺优化难度显著增加。同时,由于不同生产菌株发酵呼吸状态也各不相同,依据氧耗氧速率(OUR)在线监控生理代谢变化状态,可及时指导发酵过程中菌体生理代谢的实时调节,在生产过程中具有较高的应用价值。

本文通过对大肠杆菌产 L-苏氨酸发酵过程中生理代谢状态的检测,找到了影响 L-苏氨酸合成的关键因素,并实施了实时流加葡萄糖酸钠、磷酸甜菜碱和玉米浆干粉混合溶液,能够很好地实现氧消耗速率的定量控制。结果表明,当控制氧消耗速率(OUR)在 215 mmol/(L·h),最高发酵水平为 155 g/L。

参考文献:

- [1] ZHAO L, LU Y, YANG J, et al. Expression regulation of multiple key genes to improve L-threonine in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 46.
- [2] 周旭波. L-苏氨酸高产菌株的选育及发酵条件优化研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(8): 991-994.
ZHOU Xubo. Screening and optimization of fermentation conditions of a high-yield L-threonine-producing strain[J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(8): 991-994.
- [3] DONG X Y, QUINN P J, WANG X Y. Metabolic engineering of

- Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(1): 11-23.
- [4] WANG S W, FANG Y, WANG Z, et al. Improving L-threonine production in *Escherichia coli* by elimination of transporters ProP and ProVWX[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 58.
- [5] BAMPIDIS V, AZIMONTI G, et al. Safety and efficacy of L-threonine produced by fermentation with *Corynebacterium glutamicum* KCCM 80117 for all animal species[J]. *EFSA Journal*, 2019, 17(2): e05602.
- [6] ZHANG L J, CAO Y L, TONG J N, et al. An Alkylpyrazine synthesis mechanism involving L-threonine-3-dehydrogenase describes the production of 2, 5-dimethylpyrazine and 2, 3, 5-trimethylpyrazine by *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(24): e01807-19.
- [7] XU J Z, RUAN H Z, YU H B, et al. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 39.
- [8] LIU J, LIU M S, SHI T, et al. CRISPR-assisted rational flux-tuning and arrayed CRISPRi screening of an L-proline exporter for L-proline hyperproduction[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 891.
- [9] JOJIMA T, NOBURYU R, SASAKI M, et al. Metabolic engineering for improved production of ethanol by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(3): 1165-1172.
- [10] GOU Y, LIU W Q, WANG J J, et al. CRISPR-Cas9 knockout of *qseB* induced asynchrony between motility and biofilm formation in *Escherichia coli*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(9): 691-702.
- [11] 董迅衍, 王小元. 微生物生产 L-苏氨酸的代谢工程研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(12): 1233-1240.
DONG Xunyan, WANG Xiaoyuan. Advances in microbial metabolic engineering to increase L-threonine production[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(12): 1233-1240.
- [12] ZHANG X M, GAO Y J, CHEN Z W, et al. High-yield production of L-serine through a novel identified exporter combined with synthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 115.
- [13] ZHAO L, ZHANG H L, WANG X Y, et al. Transcriptomic analysis of an L-threonine-producing *Escherichia coli* TWF001[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020, 67(3): 414-429.
- [14] 黄勤勤, 王慧梅, 梁玲, 等. *lysC* 定点突变及 *lysC*、*asdA* 串联表达对谷氨酸棒杆菌 L-苏氨酸积累的影响[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(2): 93-100.
HUANG Qinqin, WANG Huimei, LIANG Ling, et al. Effects of Site-directed Mutation of Gene *lysC* and co-expression of *lysC*-*asdA* Cluster on L-threonine Accumulation in *Corynebacterium glutamate*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(2): 93-100.
- [15] WENDISCH V F. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 58: 17-34.
- [16] TIETZE L, LALE R. Importance of the 5' regulatory region to bacterial synthetic biology applications[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(6): 2291-2315.
- [17] XU J Z, YU H B, CHEN X L, et al. Accelerated green process of 2, 5-dimethylpyrazine production from glucose by genetically modified *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(9): 2576-2587.
- [18] WU M Y, SUN Y, ZHU M R, et al. Molecular dynamics-based allosteric prediction method to design key residues in threonine dehydrogenase for amino-acid production[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(16): 10975-10983.
- [19] FANG Y, WANG J L, MA W J, et al. Rebalancing microbial carbon distribution for L-threonine maximization using a thermal switch system[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 33-46.
- [20] 黄金, 徐庆阳, 温廷益, 等. 不同溶氧条件下 L-苏氨酸生物合成菌株的代谢流量分析[J]. *微生物学报*, 2008, 48(8): 1056-1060.
HUANG Jin, XU Qingyang, WEN Tingyi, et al. Metabolic flux analysis of L-threonine biosynthesis strain under diverse dissolved oxygen conditions[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(8): 1056-1060.

加工编辑:张岩蔚
收稿日期:2024-03-13