

重组大肠杆菌合成 L-甲硫氨酸的发酵过程优化

牛坤, 梅子龙, 管安奇, 蔡文斌, 陈懋钦, 柳志强*, 郑裕国

浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310014

牛坤, 梅子龙, 管安奇, 蔡文斌, 陈懋钦, 柳志强, 郑裕国. 重组大肠杆菌合成 L-甲硫氨酸的发酵过程优化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 895-907.

NIU Kun, MEI Zilong, GUAN Anqi, CAI Wenbin, CHEN Maoqin, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Optimization of the fermentative production of L-methionine by engineered *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 895-907.

摘要: L-甲硫氨酸作为唯一含有硫元素的必需氨基酸, 在生物体内具有非常重要的生理和生化功能, 而微生物发酵法合成 L-甲硫氨酸因其发酵水平较低仍未达到工业化生产要求。本文在实验室前期构建的 L-甲硫氨酸高产菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) W3110ΔIJAHFEB *trc-flhY trc-malY*/PAM *glyA-22 metF* 的基础上系统优化了其发酵过程, 在优化初始葡萄糖浓度的基础上, 比较了 DO-Stat、pH-Stat、控残糖浓度和恒速补料等不同补料工艺对 L-甲硫氨酸发酵生产的影响, 发现葡萄糖的控制对发酵过程有较大影响。在上述研究的基础上, 进一步开发了最优的分批补料发酵工艺, 使 L-甲硫氨酸发酵产量提高到 31.71 g/L, 发酵时间缩短为 68 h, 是目前报道的最高产量。同时, 建立了最优分批补料工艺下的发酵动力学模型, 较好地拟合了 L-甲硫氨酸发酵生产过程, 为 L-甲硫氨酸的发酵法生产提供了一定的数据参考。

关键词: L-甲硫氨酸; 发酵法生产; 分批补料发酵; 过程优化

Optimization of the fermentative production of L-methionine by engineered *Escherichia coli*

NIU Kun, MEI Zilong, GUAN Anqi, CAI Wenbin, CHEN Maoqin, LIU Zhiqiang*, ZHENG Yuguo

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: As the only essential amino acid containing elemental sulphur, L-methionine has

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901400)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901400).

*Corresponding author. E-mail: microlu@zjut.edu.cn

Received: 2023-05-23; Accepted: 2023-08-07

important physiological and biochemical functions in living organisms. However, the fermentative production of L-methionine has not met the requirements of industrial production because of its low production level. In this paper, the fermentation process of an efficient L-methionine producing strain *E. coli* W3110Δ*IJAHFEB* *trc-fliY trc-malY/PAM glyA-22 metF* constructed previously was systematically optimized. Based on the optimal initial glucose concentration, the effects of different fed-batch fermentation processes, including DO-Stat, pH-Stat, controlling residual sugar control at different level and feeding glucose with constant rate, on L-methionine fermentation were studied. It was found that the control of glucose concentration greatly affected the fermentation process. Subsequently, an optimal fed-batch fermentation process was developed, where the L-methionine titer was increased to 31.71 g/L, the highest yield reported to date, while the fermentation time was shortened to 68 h. Meanwhile, a fermentation kinetics model under the optimal fed-batch fermentation conditions was established, which fitted well with the biosynthesis process of L-methionine. This study may facilitate further development of the fermentative production of L-methionine.

Keywords: L-methionine; fermentative production; fed-batch fermentation; process optimization

L-甲硫氨酸(L-methionine, L-Met), 又名 L-蛋氨酸, 是人和动物自身不能合成的 8 种必需氨基酸中唯一的含硫氨基酸。它参与细胞内的转甲基作用, 是蛋白质生物合成的最基本单位, 还是许多小分子物质如谷胱甘肽、s-腺苷蛋氨酸和肾上腺素等合成的前体物质, 具有重要的生理功能^[1-3]。全球 L-甲硫氨酸需求量近十几年以来一直保持着 6% 左右的年增长率, 预计未来几年仍将保持这一水平^[4], 市售 90% 以上的 L-甲硫氨酸应用于饲料添加剂行业, 因此, L-甲硫氨酸的稳定供应是全球禽肉消费市场持续增长的坚实保障。工业上生产 L-甲硫氨酸主要采用丙烯醛合成 DL-蛋氨酸的化学法生产工艺^[5-7], 其合成工艺路线长, 在其生产过程中不可避免地会使用剧毒、恶臭的氢化物和硫化物, 技术与设备要求高、投入资金巨大、混旋甲硫氨酸分离难度大, 而且还存在对环境和人类自身健康安全等方面的诸多弊端, 从而导致该行业技术壁垒高、行业集中度高, 寡头垄断市场严重。因此, 近年来国内外学者将目光转向生物发酵法合成 L-甲硫氨酸的研究, 并取得了初步进展, 而由于 L-甲硫

氨酸化学结构的特殊性及其代谢调控的复杂性, 与已实现工业化发酵生产的氨基酸相比, L-甲硫氨酸的发酵产量仍未达到工业化要求^[8-9]。

L-甲硫氨酸、L-赖氨酸、L-苏氨酸和 L-异亮氨酸同属于天冬氨酸家族氨基酸, 该族氨基酸的合成在不同微生物中基本相似^[10-13], 除了 L-甲硫氨酸外其余几种氨基酸均已实现发酵法工业化生产。微生物细胞中 L-甲硫氨酸合成途径受到严格的调控, 从自然环境中分离到能够在胞外积累 L-甲硫氨酸的野生菌株产量都很低, 同时传统的微生物育种方法在 L-甲硫氨酸选育方面进展缓慢, 而随着对甲硫氨酸合成机制的深入了解, 采用理性设计的策略, 通过代谢工程的手段去改造微生物生产 L-甲硫氨酸逐渐受到各国学者的青睐^[14-16]。L-甲硫氨酸的生物合成涉及一个典型的多模块生物合成途径, 可以分为碳骨架合成模块、一碳单位供给模块以及硫源供给模块, 几个模块之间相互关联、相互制约, 影响 L-甲硫氨酸的生物合成^[17]。

由于生物体内复杂的生物合成机制, 使得 L-甲硫氨酸的生产受到限制, 为了提高 L-甲硫氨

酸的发酵产量, 研究学者开展了包括代谢途径的重建、反馈抑制的解除、关键酶的修饰和发酵工艺的优化等方面的研究。Li 等从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 3110 出发, 首先敲除了 L-甲硫氨酸合成阻遏蛋白基因 *metJ* 以及竞争途径 L-赖氨酸、L-苏氨酸相关基因, 然后通过用 *metK84p* 取代天然启动子来减弱 *metK* 基因表达从而减少 L-甲硫氨酸生成 s-腺苷甲硫氨酸, 最后通过过表达 L-甲硫氨酸合成关键基因得到最优菌株, 其 L-甲硫氨酸产量在 15 L 发酵罐中补料分批发酵 48 h 后达到 5.62 g/L^[18]。本课题组对 L-甲硫氨酸合成细胞工厂的构建开展了大量研究工作, Huang 等通过对 L-甲硫氨酸的代谢途径进行模块化分析, 系统地探究各关键节点, 揭示了 3 个模块的关键控制节点以及代谢过程中面临的代谢阻力, 通过改造, 菌体 L-甲硫氨酸产量在 5 L 发酵罐中补料分批发酵 48 h 后达到 16.86 g/L^[19]; Niu 等用 FBA 对重组 *E. coli* W3110BL 分批发酵 L-甲硫氨酸的代谢通量进行分析, 估算了不同溶氧条件下的细胞内通量分布, 发现在 30% 溶氧水平下生产 L-甲硫氨酸的通量高于其他溶氧水平^[20]; 进一步以 *E. coli* W3110 Δ IJAHFEB/C/PAM 为底盘菌, 首先通过在基因组上原位互补 *lysA* 基因来修复 L-赖氨酸合成途径, 然后用动态调节的启动子 *P_{fliA}* 替换原位启动子, 以构建非营养缺陷型菌株。此外, 进一步修饰中心代谢途径和 L-半胱氨酸分解代谢途径, 最后, 在 5 L 生物反应器中, 在不添加外源氨基酸的情况下, L-甲硫氨酸发酵产量达到 17.74 g/L^[21]。

随着合成生物学的发展, L-甲硫氨酸的微生物细胞工厂不断被优化, 合成路径中相关抑制途径被改造, 摇瓶产量逐渐提升, 但通过发酵工艺优化调控其代谢过程鲜有报道。因此本研究在实验室前期构建的 L-甲硫氨酸高产菌株 *E. coli* W3110 Δ IJAHFEB/C *trc-fliY trc-malY*/PAM *glyA-22*

metF 的基础上^[22], 开展 L-甲硫氨酸发酵工艺优化的研究, 期望通过不同发酵工艺的比较寻找限制 L-甲硫氨酸合成的关键影响因素, 提高 L-甲硫氨酸的发酵产量, 为 L-甲硫氨酸的全发酵法工业生产奠定良好的数据基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

本研究所用菌株基因型为 *Escherichia. coli* W3110 Δ *metI* Δ *metJ* Δ *lysA* Δ *glyA* *Trc-metH* *Trc-metF* *Trc-cysE* *Trc-serB* *Trc-serC* *Trc-fliY* *Trc-GCV* *Trc-malY* *metA^{Fbr+}* *yjeH⁺* *serA^{Fbr+}* *metF⁺* *glyA⁺* (命名为 M4), 由本实验室构建并保藏^[22]。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母提取物 5。

LB 固体培养基: LB 培养基中加入 2% (质量体积分数) 的琼脂。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 10, CaCl₂·2H₂O 0.08, MgSO₄·7H₂O 5, 柠檬酸 2.50, KH₂PO₄ 2.50, K₂HPO₄·3H₂O 1.38, FeCl₃·6H₂O 0.12, (NH₄)₂SO₄ 3.30, Na₂S₂O₃ 3.95, VB₁₂ 0.01, VB₁ 0.01, L-赖氨酸 0.05, 盐溶液 SSA 2 mL/L, 盐溶液 SSB 1 mL/L。

补料培养基(g/L): 葡萄糖 500, MgSO₄·7H₂O 5, FeCl₃·6H₂O 0.06, (NH₄)₂SO₄ 33, Na₂S₂O₃ 39.50, 甜菜碱 0.50, 盐溶液 SSA 1.6 mL/L, 盐溶液 SSB 0.8 mL/L, VB₁₂ 0.01, VB₁ 0.01, L-赖氨酸 0.05, 溶剂为水。

盐溶液 SSA 组成为(g/L): ZnSO₄·7H₂O 8.50, MnCl₂·2H₂O 7.50, CuCl₂·2H₂O 0.75, CoCl₂·6H₂O 1.25, EDTA 4, 溶剂为水。

盐溶液 SSB 组成为(g/L): H₃BO₃ 3.0, Na₂MoO₄·2H₂O 2.5, 溶剂为水。

以上培养基的灭菌条件为 115 °C、30 min,

其中补料培养基葡萄糖、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 单独灭菌。 VB_{12} 、 VB_1 和 L-赖氨酸采用 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌后加入培养基中。

1.2 方法

1.2.1 种子液培养

用接种环从重组大肠杆菌 M4 甘油管中蘸取少量菌液,在具有 Kan 抗性的 LB 平板上进行划线,并放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 12–16 h;后用接种环挑取平板上饱满的单菌落,接种于具有 Kan 抗性的 10 mL LB 培养基中过夜培养;吸取 1 mL 菌液分别接种于 3 瓶装有 100 mL 含有 Kan 抗性的 LB 培养基的摇瓶中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的恒温摇床中培养 10–16 h,作为种子液。

1.2.2 5 L 发酵罐分批补料发酵

种子液以 15% 的接种量接种于装有 1.5 L 初始发酵培养基的 5 L 机械搅拌发酵罐中,设定培养温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,初始转速为 300 r/min, pH 值为 6.78,通气量为 2 vvm,用 50% (体积分数)氨水溶液调节 pH 值,溶氧通过关联转速 (300–800 r/min) 维持在 30% 左右。当发酵罐中的初始葡萄糖耗尽时,通过 5 L 机械搅拌发酵罐所配置的蠕动泵流加补料培养基来进行补料,当采用 pH-Stat 补料方式时,设置 $\text{pH}>6.82$ 时,自动通过蠕动泵进行补料;当采用 DO-Stat 补料方式时,设置 $\text{DO}>30\%$ 时,自动通过蠕动泵进行补料;当采用恒速补料方式时,设置恒定的流速,自动通过蠕动泵进行补料。每隔 4 h 取样测定生物量、残糖及 L-甲硫氨酸浓度^[23]。

1.2.3 菌体生物量的测定

菌体生长采用 OD_{600} 表示,取 1 mL 发酵液,用超纯水稀释一定倍数后,用紫外-可见分光光度计于 600 nm 处测定其吸光值,测量值乘以稀释倍数即为菌株的光密度。根据 OD_{600} 值和细胞生物量关系获得细胞生物量:细胞生物量(g/L)=

$0.4186 \times OD_{600} - 0.1935$ 。

1.2.4 残糖浓度的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸法绘制葡萄糖标准曲线。取发酵液 1 mL,12 000 r/min 离心 10 min,取发酵上清液并稀释一定倍数,使其落入标准曲线范围之内。取 500 μL 稀释后的发酵上清液,加入 500 μL DNS 试剂,混匀后在沸水浴中反应 5 min,后用冷水迅速冷却至室温,后加入 4 mL 蒸馏水,摇匀后于 540 nm 处测定吸光度,并通过葡萄糖标准曲线计算葡萄糖浓度。

1.2.5 L-甲硫氨酸浓度的测定

取 1 mL 发酵液在 12 000 r/min 条件下离心 10 min,后取上清并稀释至适当倍数后进行衍生化反应。衍生化反应为 100 μL 样品稀释液+300 μL CNBF (0.27 g CNBF/10 mL 乙腈)+500 μL 硼酸钠缓冲液(0.2 mol/L 硼酸+0.05 mol/L 硼砂, pH 为 9.0),60 $^{\circ}\text{C}$ 、600 r/min 避光反应 1 h。使用赛默飞世尔科技公司超高压液相色谱 (ultra-high pressure liquid chromatography, UPLC) 仪检测,色谱柱为 C18 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),设置参数为检测波长 260 nm,进样量 10 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.8 mL/min。液相色谱洗脱程序采用梯度洗脱,流动相 A: 纯乙腈;流动相 B: 缓冲液(蒸馏水:乙腈:三乙胺=848:150:2,乙酸调节 pH 为 4.9)^[24]。

1.2.6 副产物氨基酸和有机酸浓度的测定

发酵液副产物氨基酸采用赛卡姆(北京)科学仪器有限公司全自动氨基酸分析仪进行检测。有机酸采用赛默飞世尔科技公司超高压液相色谱仪检测,色谱柱为 Aminex[®] HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm, 0.25 μm),设置参数为检测波长 200 nm,进样量 20 μL ,柱温 60 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.6 mL/min。液相色谱洗脱程序采用恒速洗脱,流动相:8 mmol/L H_2SO_4 溶液,保留时间:20 min。

1.2.7 细胞生长动力学模型及其参数估计

微生物细胞生长动力学可由很多模型来进行描述,其中 Monod 方程及 Logistic 方程最为简单和常用。Monod 方程主要用来描述非抑制性单一底物限制情形下的细胞生长,事实上,在发酵过程中,菌体浓度的增加对自身生长也会产生抑制作用,此时细胞的生长可以用 Logistic 方程较好地描述^[25-26]。选择在最优的补料策略下,用 Logistic 方程描述菌株 M4 的生长规律,其微分方程为:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (1)$$

式中: μ_m 为 M4 的最大比生长速率, h^{-1} ; dX/dt 为 M4 的生长速率, $g/(L \cdot h)$; X 为 M4 的生物量, g/L ; t 为 M4 的发酵时间, h ; X_m 为 M4 的最大生物量, g/L 。

1.2.8 L-甲硫氨酸合成动力学模型及其参数估计

采用 Luedeking-Piret 方程^[26]描述产物生成随时间变化过程,其微分方程为:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (2)$$

式中: dP/dt 为 L-甲硫氨酸合成的速度, $g/(L \cdot h)$; P 为 L-甲硫氨酸的产量, g/L ; α 为生长偶联系数; β 为非生偶联系数。其中, $\alpha \neq 0$ 、 $\beta = 0$ 表示产物生成与细胞生长相关(生长相关型); $\alpha \neq 0$ 、 $\beta \neq 0$ 表示产物生成与细胞生长部分相关(生长部分相关型); $\alpha = 0$ 、 $\beta \neq 0$ 表示产物生成与细胞生长无关(非生长相关型)。结合公式(1)和公式(2),对 Luedeking-Piret 方程进行积分处理,得到相应的代数方程,见式(3)。

$$P = P_0 + \alpha \left(\frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - X_0 \right) + \beta \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left(\frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} \right) \quad (3)$$

式中: P_0 为 L-甲硫氨酸初始产量, g/L 。由于 L-甲硫氨酸初始含量为 0,因此 P_0 可忽略不计。

2 结果与分析

2.1 不同初糖浓度对发酵合成 L-甲硫氨酸的影响

碳源是微生物生长最重要的营养物质,但其浓度的高低会极大影响到菌体的生长代谢,当浓度过低时不能满足微生物生长的需要,使微生物生长缓慢甚至死亡裂解,也可能在菌体生长未达到最佳状态时就被迫停止生长;而当糖浓度过高时会产生底物抑制,从而阻遏菌体生长,同时过高的糖浓度会增加副产物的积累,典型的有乙酸副产物的积累会劣化发酵环境,从而影响菌体生长,另外,高糖浓度会升高发酵液的渗透压,进而影响微生物菌体的正常生长^[27]。因此,本文首先在 5 L 发酵罐中考察了不同初始葡萄糖浓度对于发酵合成 L-甲硫氨酸的影响,采用 DO-Stat 方式进行补料,发酵过程菌体生长、残糖浓度及 L-甲硫氨酸的合成情况如图 1 所示。

从图中结果可以看到,初始糖浓度对菌体生长趋势影响较小,发酵前 60 h 菌体生长过程相似,而在 15 g/L 和 20 g/L 初糖条件下,菌体对数生长期相对较长,整体发酵周期比低初糖浓度延长了 20-30 h,这对工业发酵是不利的。就 L-甲硫氨酸的合成过程而言,5 g/L 和 10 g/L 初糖浓度下的 L-甲硫氨酸的合成情况明显好于高初糖浓度,最高发酵产量为 24.26 g/L (10 g/L 初糖),此时糖酸转化率为 9.33%。综合菌体生长和产物合成过程,选择 10 g/L 的葡萄糖浓度为 M4 菌株分批补料发酵的初始糖浓度。

2.2 不同补料方式对发酵合成 L-甲硫氨酸的影响

2.2.1 pH-Stat 和 DO-Stat 补料对发酵合成 L-甲硫氨酸的影响

pH-Stat 和 DO-Stat 补料方式分别依据发酵过程中 pH 和溶氧(dissolved oxygen, DO)的变化进行补料发酵,调控过程较为简单,是常用的补

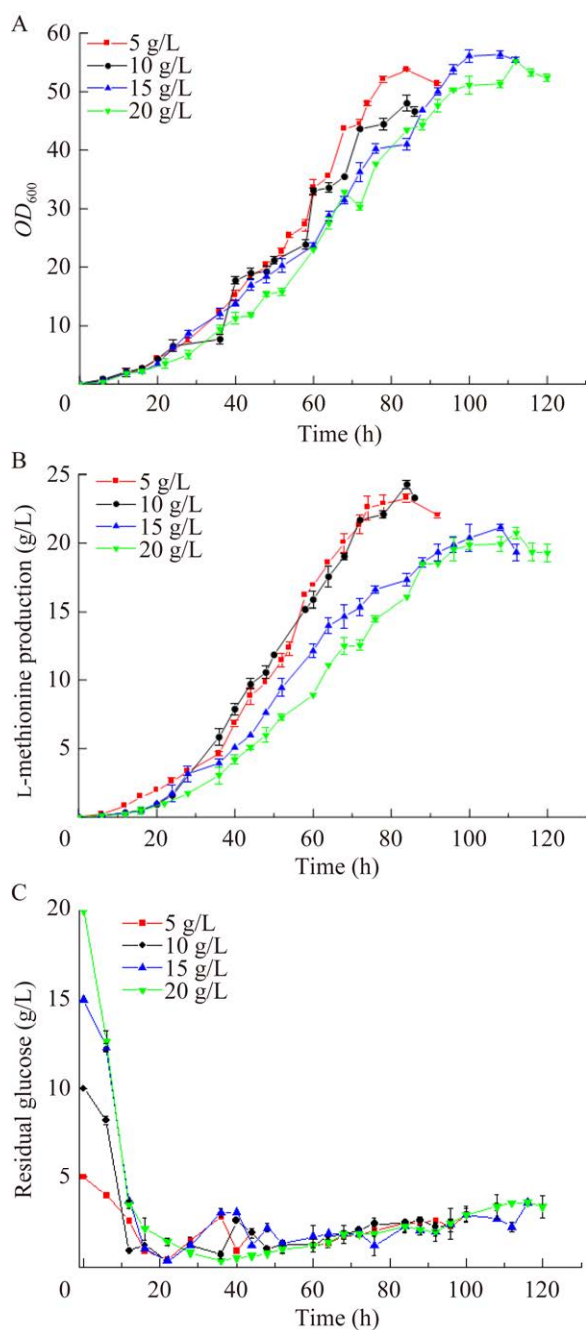


图 1 不同初糖浓度下菌体生长(A)、L-甲硫氨酸合成(B)和残余糖浓度曲线(C)

Figure 1 Fermentation process of cell growth (A), L-methionine production (B), and residual glucose (C) under different initial glucose concentrations.

料策略。因此本文进一步采用上述两种策略进行补料发酵，发酵结果如图 2 所示。由图中结果可

知，L-甲硫氨酸的发酵过程为生长偶联型，其发酵产量随菌体量的升高而不断提高，在发酵 12 h，初糖基本耗完，此时分别开启 pH-Stat 补料流加葡萄糖使 pH 稳定在 6.8 左右以及 DO-Stat 补料流加葡萄糖使溶氧稳定在 30%左右。在 pH 反馈补料策略下，发酵罐中的残余葡萄糖浓度始终维持在接近零值的水平，避免了因葡萄糖浓度过高对菌体生长产生的抑制作用，这也使得菌体量达到较高水平， OD_{600} 在 72 h 达到了 56，但该水平下的葡萄糖可能仅能满足微生物基础代谢，而对合成产物不利，在发酵 84 h，L-甲硫氨酸产量达到最高值 20.19 g/L。

与 pH-Stat 策略相比，DO 反馈补料策略下，可以满足菌体对溶氧的需求，菌体生长也较好，发酵 74 h 后 OD_{600} 达到最大值 48。同时，DO-Stat 补料策略可以使残余葡萄糖浓度维持在 2–5 g/L 的范围内，从而有利于 L-甲硫氨酸的合成，最终 L-甲硫氨酸产量在 84 h 达到了 24.26 g/L，比 pH-Stat 补料策略提高了 20.16%，糖酸转化率提高至 9.33%。

2.2.2 恒定残余葡萄糖浓度补料发酵对合成 L-甲硫氨酸的影响

综上所述两种反馈补料策略可知，pH-Stat 和 DO-Stat 反馈补料方式在发酵后期均会导致培养基中残糖浓度升高，这主要是由于该阶段菌体生长基本稳定，耗糖量降低，葡萄糖的不断流加仅用于合成产物从而导致了一定残糖的积累，而葡萄糖浓度控制在适当的水平不仅可以满足菌体生长对碳源的需求，还可以避免代谢“溢流”的发生，提高目的产物的产量，因此，残糖的调控对 L-甲硫氨酸的发酵过程较为重要。本文后续进一步考察了不同恒定残糖浓度对 L-甲硫氨酸发酵合成的影响，在发酵前期使菌体自然生长，不进行补料，当初始葡萄糖基本消耗完毕后(12 h 左右)，开始流加补料培养基；并每 4 h 进行取样，

测定发酵液中的残糖含量,并及时改变补料流加速度,使葡萄糖浓度维持在一定范围内。根据前期对 M4 菌株耗糖情况及生长环境的了解,将残糖浓度分别控制在 1–5 g/L 和 5–10 g/L 范围内,这两种恒定残余葡萄糖浓度补料方式的发酵过程如图 3 所示。

从发酵过程曲线可以看出,维持恒定残糖浓度在 1–5 g/L 和 5–10 g/L 的补料方式下,L-甲硫氨酸最终的发酵产量相差不大,但过程变化相差

较大。第一种补料方式表明在整个发酵过程中,L-甲硫氨酸的产量均在缓慢增加,在发酵 90 h 达到最大值 22.26 g/L;第二种补料方式下,L-甲硫氨酸在发酵前 48 h 快速合成,48 h 后合成速率显著降低。两种补料方式下,菌体生长情况也有较大差距,恒定残糖浓度为 1–5 g/L 补料方式的最大 OD_{600} 仅为 43.6,而 5–10 g/L 补料方式的最大 OD_{600} 却达到了 57.9;这可能是因为 1–5 g/L 残糖浓度下还是会出现类似于

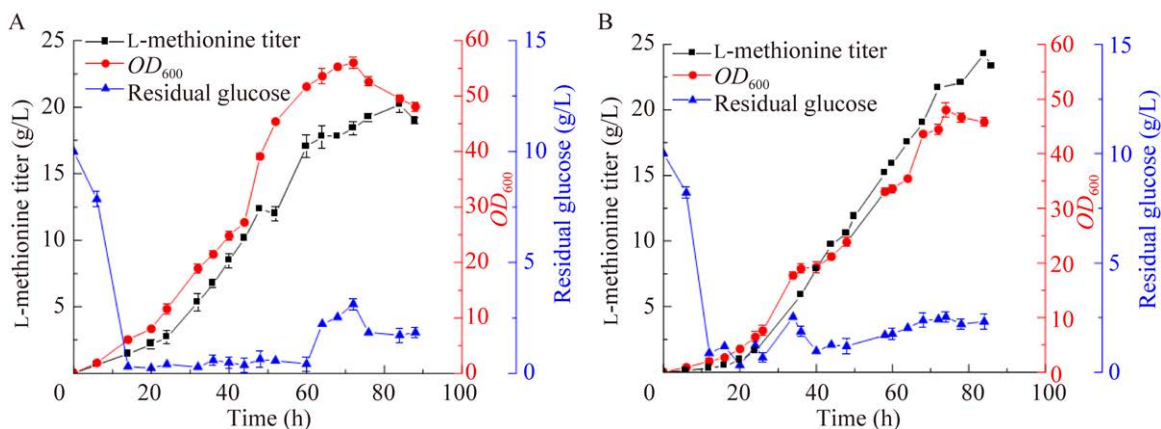


图 2 M4 菌株在 pH-Stat (A)和 DO-Stat (B)补料策略下的发酵过程曲线

Figure 2 Fermentation process of strain M4 under pH-Stat (A) and DO-Stat (B) feeding strategy.

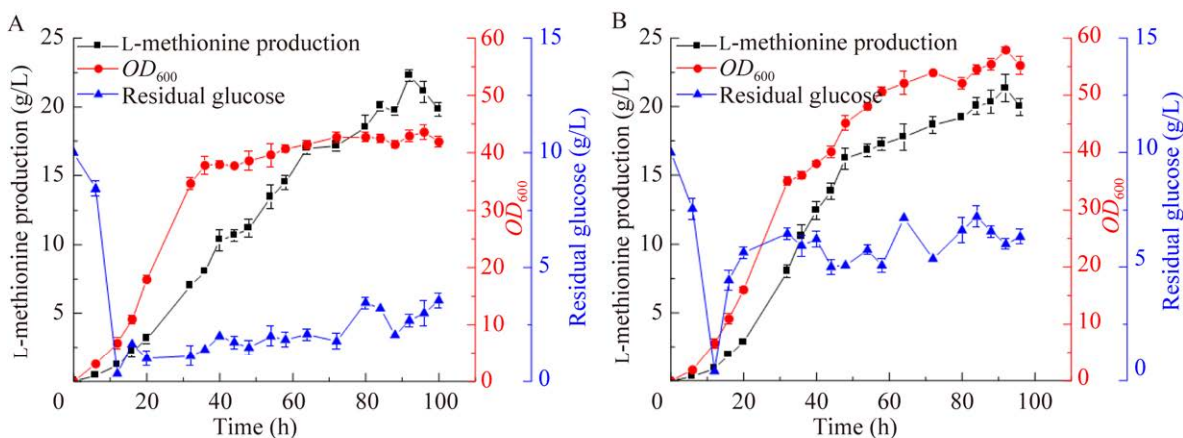


图 3 M4 菌株在 1–5 g/L (A)和 5–10 g/L (B)恒定残糖浓度下的发酵过程曲线

Figure 3 Fermentation process of strain M4 when controlling the residual glucose concentration at 1–5 g/L (A) or 5–10 g/L (B).

反馈补料的葡萄糖“半饥饿”现象；在菌体的指数生长期，菌体快速生长，对葡萄糖的需求较高，而在此阶段残糖浓度控制较为困难，导致出现葡萄糖“半饥饿”现象。同理，在菌体的衰亡期，补料培养基的流加速度也应该及时减缓，过量的葡萄糖会影响 L-甲硫氨酸的合成，增加副产物有机酸的生成。而恒定 5–10 g/L 的残糖浓度使菌体可以较好地生长，前期 L-甲硫氨酸合成速率也较高，但发酵 48 h 后随着菌体生长进入稳定期，L-甲硫氨酸的合成速率逐渐降低，最终产量为 21.32 g/L，这进一步说明了在 L-甲硫氨酸发酵过程中工艺调控的重要性。

2.2.3 恒速补料对发酵产 L-甲硫氨酸的影响

恒速补料是所有补料方式中最为简单的一种，在工业化发酵过程中也较易操作。它能在一定程度上满足菌体对营养物质的需求，但恒速补料也有明显的弊端，因为在不同的发酵阶段，菌体量、生长速率以及发酵环境的优劣会使菌体对于营养物质的需求不同，而恒速补料不能及时适应这种变化来及时作出调整，因此这对于菌体的生长代谢是极为不利的。根据反馈补料方式中 M4 菌株的耗糖速率，设置了 2.5 g/(L·h) 和 5 g/(L·h) 的恒定速度进行补料，发酵过程如图 4 所示。

从图中结果可以看出，以 5 g/(L·h) 的恒定速度进行补料时，L-甲硫氨酸产量以及最大菌体量都高于 2.5 g/(L·h) 恒速补料的情况，但相对上述几种补料方式而言，L-甲硫氨酸的产量均显著降低。对残糖数据进行分析可以发现，在以 5 g/(L·h) 速度恒速补料时，在发酵 20–60 h，残糖浓度逐步升高，最高达到了 14 g/L 左右，显然，在前期菌体生长较慢的阶段，5 g/(L·h) 的补料速度导致残糖浓度超出了此时菌体对葡萄糖的需求浓度，对菌体的生长和代谢造成了一定的影响，在发酵 60 h 以后，随着菌体量的增多，葡萄糖的消耗也增加，残糖浓度逐步下降，菌体继续生长，此时 L-甲硫氨酸的积累量也显著增加，从 60 h 的 8.50 g/L 提升至 92 h 的 17.35 g/L。而在 2.5 g/(L·h) 恒速补料方式下，前期的残糖浓度维持在一个较低且稳定的水平，说明 2.5 g/(L·h) 的补料速度跟菌体前期的耗糖速度相近，但在发酵 60 h 时，葡萄糖的流加量明显不能满足菌体生长代谢的需求，此后的残糖浓度基本都在 1 g/L 以下，而营养物质的缺失也必将对菌体的生长代谢造成负面影响，最终 L-甲硫氨酸仅为 15.94 g/L，这也是在 2.5 g/(L·h) 恒速补料方式下后期的菌体量以及产量都较低的原因。因此，上述结果可以

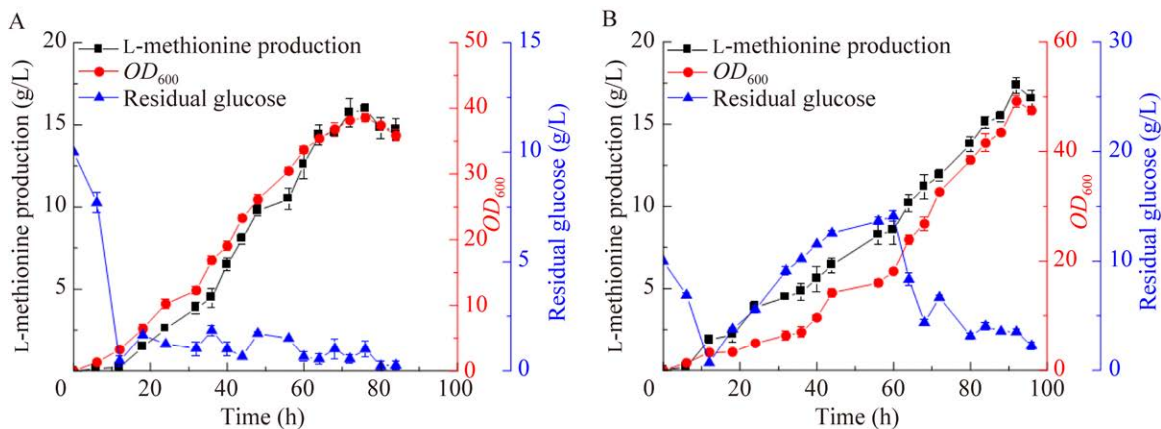


图 4 M4 菌株在 2.5 g/(L·h) (A) 和 5 g/(L·h) (B) 恒速补料速率下的发酵过程曲线

Figure 4 Fermentation process of strain M4 with a constant glucose feeding rate of 2.5 g/(L·h) (A) or 5 g/(L·h) (B).

看出恒速补料的方式并不适用于 L-甲硫氨酸的发酵补料过程。

2.3 联合调控策略下的分批补料发酵

基于上述实验的开展,对 M4 菌株 5 L 罐中发酵代谢的情况有了较为全面的了解,发现葡萄糖的调控是较为关键的因素,因此在 pH、溶氧等参数条件稳定的情况下,如何调控好发酵环境中的葡萄糖浓度是至关重要的一环。基于此本研究开发了适用于 M4 菌株发酵合成 L-甲硫氨酸的 3 种联合补料策略。在发酵前 12–24 h,菌体处于指数生长期,葡萄糖的消耗量较大,糖浓度变化幅度较大,此阶段的葡萄糖调控最为困难,人为地改变补料速度很容易造成葡萄糖的添加量过多或者不足,因此选择在此阶段采用溶氧反馈的补料策略,溶氧反馈可以提供较为稳定的发酵环境,能让关键的发酵前期菌体较好地生长。在发酵 24 h 之后,菌体生长趋于稳定,但菌体量的不断升高也会使耗糖量逐步提升,因此在该阶段选择变速补料策略,变速补料可以在菌体浓度较高的情况下加入更多营养物来促进细胞的生长,实现细胞比生长速率不断增加,有利于产物的形成。再基于前期实验对 M4 各阶段耗糖量的了解,分别设置了如表 1 所示 3 种不同联合补料策略,其发酵进程如图 5 所示。

从图 5 结果可以看出,3 种联合补料策略都取得了较好的效果,L-甲硫氨酸产量相比上述补料方式均有提升,分别达到 29.09、30.11 g/L 和 31.71 g/L。相比之下,联合补料策略 C 更优于前

表 1 联合补料策略各时间段补料方式

Table 1 The details of the combinatorial feeding strategy at different fermentation period

Feeding strategy	12–24 h	24–48 h	48–72 h	72 h-end
A	DO-Stat	10 mL/h	20 mL/h	30 mL/h
B	DO-Stat	20 mL/h	30 mL/h	40 mL/h
C	DO-Stat	15 mL/h	20 mL/h	25 mL/h

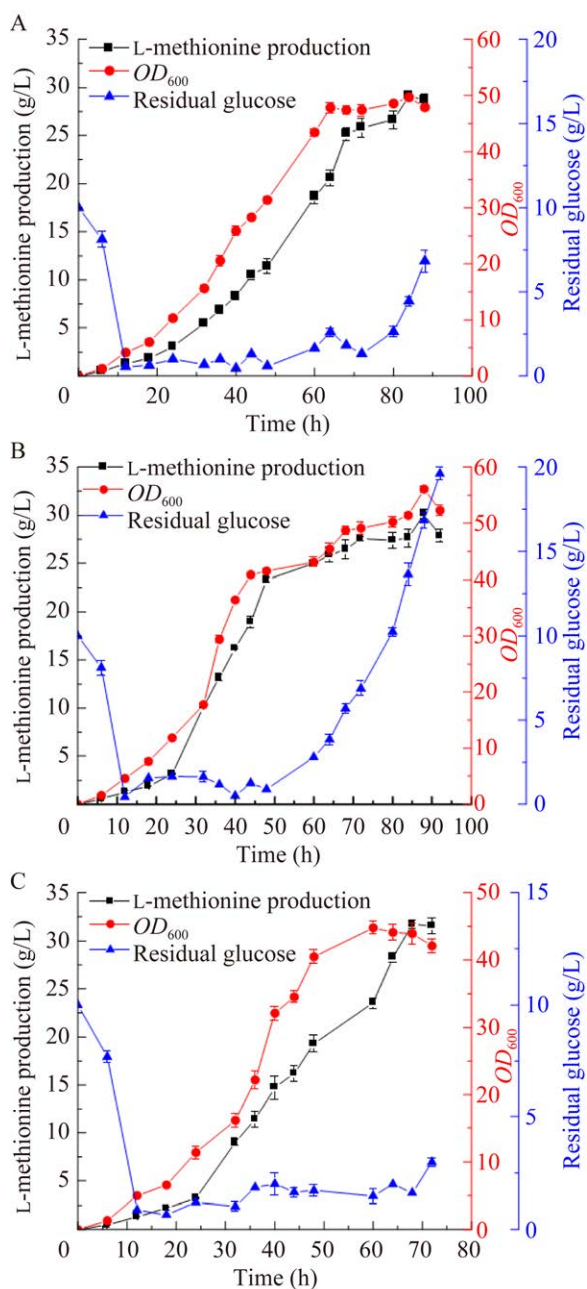


图 5 M4 菌株在不同联合补料策略下的发酵过程曲线

Figure 5 Fermentation process of strain M4 under different combinatorial feeding strategy.

2 种,虽然在该策略调控下细胞生物量低于前 2 种调控方式,但其发酵产量最高,达到 31.71 g/L。同时,3 种联合补料策略下达到最高产量的时间分别为 84、80、68 h,采用联合补料策略 C 使发酵

周期明显缩短,这在工业放大中是十分重要的。分析整个发酵过程可以发现,C策略中变速补料的流加速度更适宜M4菌种的生长代谢,从发酵过程图中的残糖数据可以看到,A策略下,发酵中期葡萄糖流加速度偏低,造成营养物质的缺失,影响了菌体的生长,B策略下,发酵中后期葡萄糖的流加速度过高,流加葡萄糖浓度明显高于菌体的葡萄糖消耗量,这会对菌体的生长代谢造成负面影响,使得后期产物的合成速率下降,以致造成发酵周期较长,但产量并没有显著提高。

进一步比较了不同补料策略下的发酵结果,由表2可知,在联合补料策略C下,单位菌体的生产能力达到1.74 g/g菌体,糖酸转化率升高至12.2%,较其他补料策略有显著提高。综上,本实验获得了较优的补料发酵策略,即在发酵0-12 h,不流加补料培养基;在发酵12 h初糖基本消耗完毕后,开始流加补料培养基;发酵12-24 h,采用溶氧反馈流加补料培养基;发酵24-48 h,以15 mL/h的恒定流速流加补料培养基;发酵48-72 h,以20 mL/h的恒定流速流加补料培养基;发酵72 h至发酵结束,以25 mL/h的恒定流速流加补料培养基。发酵结束L-甲硫氨酸在68 h的产量最高,为31.71 g/L,糖酸转化率为12.2%,相比于M4未优化前的产量18.20 g/L^[22]

提高了74.2%,是目前全发酵法合成L-甲硫氨酸所报道的最高产量。

2.4 不同补料方式的副产物比较

基于上述不同补料方式的研究,选择了DO-Stat补料、恒定1-5 g/L残余糖浓度补料和最佳联合补料策略C等3种具有代表性补料方式进行发酵副产物的测定与比较分析,以更好地了解M4菌株在不同补料方式下的生长代谢情况,并为后续的代谢工程改造实验提供思路。

主要副产物氨基酸的合成情况如图6A所示,3种补料方式下谷氨酸的积累量都较高,其中恒糖补料的谷氨酸积累量达到9.7 g/L,这说明在三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环中有大量的碳流从 α -酮戊二酸走向了生成谷氨酸的路径;同时还有少量的苏氨酸和异亮氨酸积累,异亮氨酸是苏氨酸的代谢产物,而苏氨酸作为L-甲硫氨酸生物合成的竞争代谢途径,其存在势必会对L-甲硫氨酸的产量造成影响,因此后续代谢改造过程中苏氨酸合成途径的调控是改造的重点方向。除此之外,联合补料策略C调控下还生成了一定量的亮氨酸和苯丙氨酸,这说明在丙酮酸节点处,一部分碳流合成了这2种氨基酸,反映出该调控方式下丙酮酸进入TCA循环的路径受到抑制;同时有机酸合成结果(图6B)也表明在联合

表2 不同补料策略下发酵结果比较

Table 2 Comparison of the fermentation results under different feeding strategies

Feeding strategy	Time (h)	L-Met titer (g/L)	Cell growth (g/L)	Productivity (g/g cell)	Glucose conversion rate (%)
pH-Stat	84	20.19	20.52	0.98	7.77
DO-Stat	74	24.26	19.90	1.22	9.33
1-5 g/L residual glucose	92	22.26	17.76	1.25	8.56
5-10 g/L residual glucose	92	21.33	24.04	0.89	8.20
Feeding at 2.5 g/(L·h)	76	15.94	15.96	1.00	7.97
Feeding at 5 g/(L·h)	92	17.35	20.40	0.85	6.67
Combinatory feeding strategy A	84	29.09	20.61	1.41	11.19
Combinatory feeding strategy B	80	30.11	23.29	1.29	11.58
Combinatory feeding strategy C	68	31.71	18.18	1.74	12.20

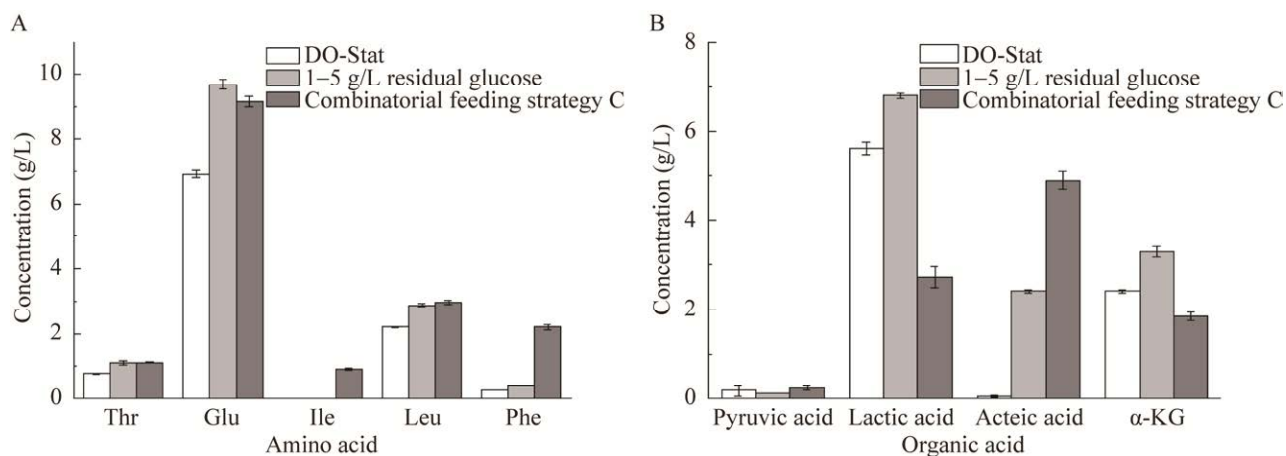


图 6 不同补料方式下副产物氨基酸(A)及有机酸(B)积累情况

Figure 6 Production of amino acids (A) and organic acids (B) under different feeding strategies.

补料策略 C 下乙酸积累量提高, 这进一步说明在该策略下进入 TCA 循环的碳流降低, 因此后续在该调控方式下可以考察由丙酮酸进入 TCA 循环通路的改造, 以提高下游 L-甲硫氨酸的合成通量。 α -酮戊二酸是 TCA 循环中一个重要的节点, 3 种补料条件下均表现出积累, 表明 TCA 循环的代谢通量未能完全流向产物合成途径, 这也可能是造成丙酮酸未能完全进入 TCA 循环的重要原因。乳酸是细菌在无氧条件下产生的, 在联合补料策略 C 条件下, 乳酸生成量降低, 这对发酵是有利的。通过比较联合补料策略 C 与其他补料策略下副产物合成的差异, 为进一步指明在该发酵条件下菌株改造的方向, 为后续菌株的进一步代谢改造提供了更为有力的数据支撑。

2.5 细胞生长动力学方程及其参数

采用 Logistic 方程对 M4 在联合补料策略 C 发酵数据进行非线性曲线拟合, 拟合曲线如图 7 所示, 从相关性系数 R^2 的结果可以看出, 该模型对于 M4 生长的模拟具有很好的适用性, M4 的细胞生长动力学 Logistic 方程为:

$$\frac{dX}{dt} = 0.13X \left(1 - \frac{X}{18.63} \right)$$

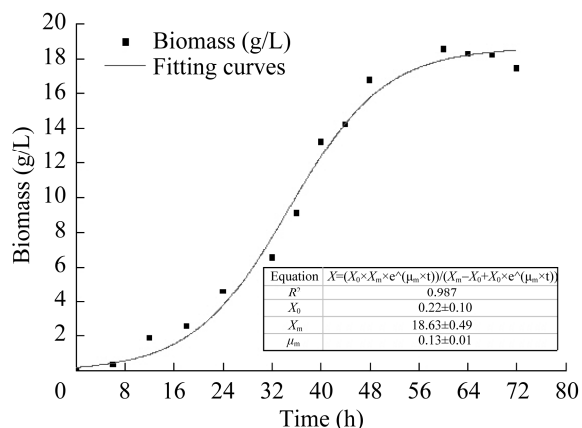


图 7 细胞生长动力学模型的实验值及理论值的拟合曲线

Figure 7 Fitting curves of the predicted values and the experimental values using the cell growth kinetics model.

2.6 L-甲硫氨酸合成动力学模型及其参数

采用 Luedeking-Piret 方程对 M4 在联合补料策略 C 发酵数据进行非线性曲线拟合, 拟合曲线如图 8 所示, L-甲硫氨酸合成动力学模型为:

$$P = P_0 + 0.79 \left(\frac{4.1e^{0.13t}}{18.41 + 0.22e^{0.13t}} - 0.22 \right) + 2.87 \ln \left(\frac{18.41 + 0.22e^{0.13t}}{18.63} \right)$$

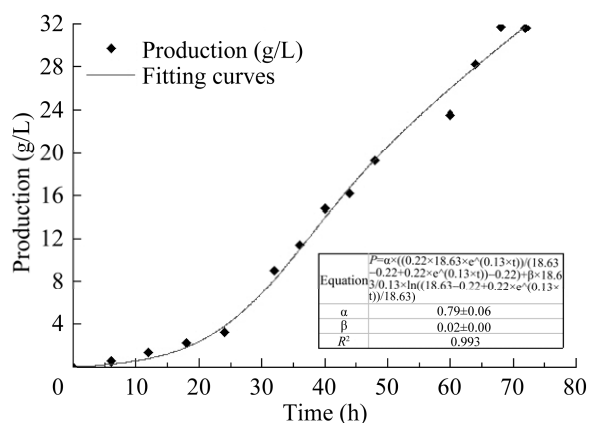


图8 L-甲硫氨酸合成动力学模型的实验值及理论值的拟合曲线

Figure 8 Fitting curves of the predicted values and the experimental values using the L-methionine synthesis kinetics model.

其中 $\alpha=0.79$, $\beta=0.02$, 说明蛋氨酸的合成与细胞生长部分相关。曲线中相关性系数 R^2 为 0.993, 表明该模型适用于 M4 合成 L-甲硫氨酸的发酵过程。

3 结论

本文以实验室前期的代谢改造菌株 M4 为出发菌株, 以葡萄糖作为切入点开展了 L-甲硫氨酸 5 L 发酵罐的分批补料培养优化。在确定培养基初始糖浓度的条件下, 依次比较了 pH 反馈补料、溶氧反馈补料、恒定残糖浓度补料和恒速补料策略的发酵情况, 对 M4 菌株的生长、糖耗和 L-甲硫氨酸合成情况进行了较为全面的了解, 并在此基础上开发了适合 M4 发酵合成 L-甲硫氨酸的新型联合补料策略。通过在发酵 12–24 h, 采用溶氧反馈流加补料培养基; 在 24–48 h, 以 15 mL/h 的恒定流速流加补料培养基; 在 48–72 h, 以 20 mL/h 的恒定流速流加补料培养基; 在 72 h 至发酵结束, 以 25 mL/h 的恒定流速流加补料培养基, 使 L-甲硫氨酸在 68 h 达到最高产量 31.71 g/L, 相比于未优化前的 18.2 g/L 提升了 74.2%, 是目

前 L-甲硫氨酸的微生物发酵法所报道的最高水平。同时, 建立了细胞生长和 L-甲硫氨酸合成的动力学模型, 模型可以较好地拟合发酵过程, 为后续为 L-甲硫氨酸的全发酵法工业生产提供了一定的借鉴和参考。

REFERENCES

- [1] BROSNAN JT, BROSNAN ME. The sulfur-containing amino acids: an overview[J]. The Journal of Nutrition, 2006, 136(6): 1636-1640.
- [2] FERLA MP, PATRICK WM. Bacterial methionine biosynthesis[J]. Microbiology, 2014, 160(8): 1571-1584.
- [3] QIN TY, HU XQ, HU JY, WANG XY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032 to produce L-methionine[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2015, 62(4): 563-573.
- [4] 赵楠. 以客户需求为导向, 诺伟司做了哪些事?[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(4): 157-162.
- [5] ZHAO N. What does Norwex do with customer needs in mind?[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2018, 54(4): 157-162 (in Chinese).
- [6] GEIGER F, HALSBERGHE B, HASSELBACH HJ, HENTSCHEL K, HUTHMACHER K, KORFER M, MANNSFELD SP, TANNER H, THEISSEN F, VANROBAEYS J, WILLIGERODT K. Process for the preparation of D,L-methionine or the salt thereof: US5990349[P]. 1999-11-23.
- [7] HSU YC, BLACKBURN TF, PELLEGRIN PF, KRANZ AH, WILLOCK JM. Continuous hydrolysis process for preparing 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or salts thereof: US6268531[P]. 2001-07-31.
- [8] TAKANO MASAHARU. Enhanced 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid composition and method of preparation: US4855495[P]. 1983-09-06.
- [9] ANAKWENZE VN, EZEMBA CC, EKWEALOR IA. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus thuringiensis* EC1 for enhanced methionine production[J]. Advances in Microbiology, 2014, 4(7): 344-352.
- [10] LEE HS, HWANG BJ. Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(5): 459-467.
- [11] KALETA C, SCHÄUBLE S, RINAS U, SCHUSTER S. Metabolic costs of amino acid and protein production in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Journal, 2013, 8(9): 1105-1114.

- [11] XU JZ, HAN M, ZHANG JL, GUO YF, ZHANG WG. Metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for the L-lysine production by increasing the flux into L-lysine biosynthetic pathway[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(9): 2165-2175.
- [12] KRÖMER JO, HEINZLE E, SCHRÖDER H, WITTMANN C. Accumulation of homolanthionine and activation of a novel pathway for isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(2): 609-618.
- [13] BECKER J, WITTMANN C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production—the heartbeat of industrial strain development[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(5): 718-726.
- [14] WILLKE T. Methionine production—a critical review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(24): 9893-9914.
- [15] KRÖMER JO, WITTMANN C, SCHRÖDER H, HEINZLE E. Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(4): 353-369.
- [16] FIGGE RM. Methionine biosynthesis in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*[M]//Amino Acid Biosynthesis-Pathways, Regulation and Metabolic Engineering. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006: 163-193.
- [17] HUANG JF, LIU ZQ, JIN LQ, TANG XL, SHEN ZY, YIN HH, ZHENG YG. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial production of L-methionine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 843-851.
- [18] LI H, WANG BS, LI YR, ZHANG L, DING ZY, GU ZH, SHI GY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for the production of l-methionine[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(1): 75-88.
- [19] HUANG JF, SHEN ZY, MAO QL, ZHANG XM, ZHANG B, WU JS, LIU ZQ, ZHENG YG. Systematic analysis of bottlenecks in a multibranch and multilevel regulated pathway: the molecular fundamentals of L-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(11): 2577-2589.
- [20] NIU K, XU YY, WU WJ, ZHOU HY, LIU ZQ, ZHENG YG. Effect of dissolved oxygen on L-methionine production from glycerol by *Escherichia coli* W3110BL using metabolic flux analysis method[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2020, 47(3): 287-297.
- [21] NIU K, FU Q, MEI ZL, GE LR, GUAN AQ, LIU ZQ, ZHENG YG. High-level production of L-methionine by dynamic deregulation of metabolism with engineered nonauxotroph *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(2): 492-501.
- [22] 柳志强, 蒋浩然, 张博, 沈臻阳, 杨辉, 郑裕国. 高产 L-甲硫氨酸的基因工程菌及其构建与应用: CN202110038518.4[P]. 2022-07-08.
- LIU ZQ, JIANG HR, ZHANG B, SHEN ZY, YANG H, ZHENG YG. Genetically engineered bacteria with high yield of L-methionine and its construction and application: CN202110038518.4[P]. 2022-07-08 (in Chinese).
- [23] 柳志强, 梅子龙, 牛坤, 周海岩, 张博, 汤晓玲, 徐建妙, 郑裕国. 一种全发酵法高产 L-甲硫氨酸的方法: CN2023102902555.X[P]. 2023-03-23.
- LIU ZQ, MEI ZL, NIU K, ZHOU HY, ZHANG B, TANG XL, XU JM, ZHENG YG. A method for producing L-methionine by total fermentation: CN2023102902555.X[P]. 2023-03-23 (in Chinese).
- [24] TANG XL, LI N, LIU YL, LI JP, ZHAO KX, LIU ZQ, ZHENG YG. Engineering *O*-succinyl-L-homoserine mercaptotransferase for efficient L-methionine biosynthesis by fermentation-enzymatic coupling route[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2023, 365(7): 1048-1057.
- [25] 卫功元, 李寅, 堵国成, 陈坚. 温度对谷胱甘肽分批发酵的影响及动力学模型[J]. *生物工程学报*, 2003, 19(3): 358-363.
- WEI GY, LI Y, DU GC, CHEN J. Kinetic models for the effect of temperature on batch glutathione fermentation by *Candida utilis*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003, 19(3): 358-363 (in Chinese).
- [26] 韦晓菊, 黎继烈, 朱晓媛. 重组大肠杆菌产青霉素酰化酶的发酵动力学研究[J]. *中国酿造*, 2014, 33(3): 32-35.
- WEI XJ, LI JL, ZHU XY. Fermentation kinetics of penicillin acylase produced by recombinant *Escherichia coli*[J]. *China Brewing*, 2014, 33(3): 32-35 (in Chinese).
- [27] 程立坤, 赵春光, 黄静, 徐庆阳, 谢希贤, 陈宁. 葡萄糖浓度对大肠杆菌发酵 L-色氨酸的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(3): 5-9.
- CHENG LK, ZHAO CG, HUANG J, XU QY, XIE XX, CHEN N. Effect of glucose concentration on L-tryptophan fermentation by *Escherichia coli*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(3): 5-9 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)