



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113897272 A

(43) 申请公布日 2022. 01. 07

(21) 申请号 202111129220.0

(22) 申请日 2021.09.26

(71) 申请人 山东润德生物科技有限公司

地址 271299 山东省泰安市新泰市开发区
润德路78号

(72) 发明人 卢健行 梁剑光 王泽建 刘长峰
师迎祥 王庆

(74) 专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所
(普通合伙企业) 37240

代理人 薛鹏喜

(51) Int. Cl.

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/04 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

B01D 35/12 (2006.01)

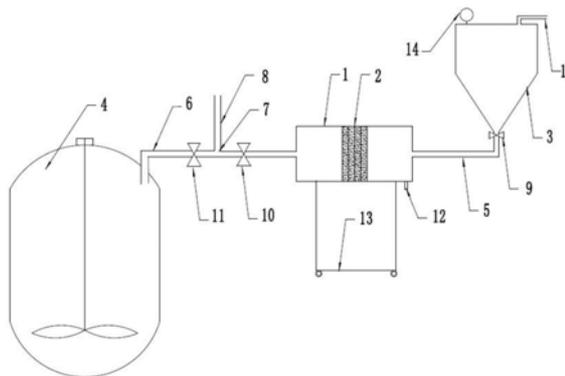
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置及其应用。包括过滤罐,过滤罐的中间纵向设有空气过滤器;过滤罐的底部设有排气排水阀门;过滤罐的一端通过第一管道与补料容器连接,过滤罐的另一端通过第二管道与发酵罐连接;第一管道上设有第一阀门;第二管道上设有蒸汽入口,第二管道通过蒸汽入口与蒸汽管道连接;第二管道上还分别设有第二阀门和第三阀门;第二阀门位于过滤罐与蒸汽入口之间,第三阀门位于蒸汽入口与发酵罐之间。本发明通过外接蒸汽将过滤罐灭菌,IPTG添加前无需单独进行灭菌,发酵无需在无菌环境中添加IPTG,为发酵诱导和生产效率提供了方便,大大减少了操作步骤和染菌几率,具有很强的实用性。



1. 一种氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置,其特征在于,包括过滤罐;所述过滤罐的中间纵向设有空气过滤器;所述过滤罐的底部设有排气排水阀门;所述过滤罐的一端通过第一管道与补料容器连接,所述过滤罐的另一端通过第二管道与发酵罐连接;所述第一管道上设有第一阀门;所述第二管道上设有蒸汽入口,所述第二管道通过蒸汽入口与蒸汽管道连接;所述第二管道上还分别设有第二阀门和第三阀门;所述第二阀门位于过滤罐与蒸汽入口之间,所述第三阀门位于蒸汽入口与发酵罐之间。

2. 根据权利要求1所述的过滤除菌装置,其特征在于,所述排气排水阀门位于过滤罐靠近第一管道的一端。

3. 根据权利要求1所述的过滤除菌装置,其特征在于,所述补料容器的顶部分别设有压力表和空气进管。

4. 根据权利要求1所述的过滤除菌装置,其特征在于,所述第一管道和第二管道分别通过螺纹与过滤罐的两端活动连接。

5. 根据权利要求1或4所述的过滤除菌装置,其特征在于,所述过滤罐的下部设有移动支架。

6. 根据权利要求1所述的过滤除菌装置,其特征在于,所述第一阀门位于补料容器的下方。

7. 根据权利要求1所述的过滤除菌装置,其特征在于,所述第二管道深入至发酵罐内部。

8. 权利要求1~7任一项所述的过滤除菌装置在补加诱导剂中的应用。

9. 权利要求1~7任一项所述的过滤除菌装置补加诱导剂的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 蒸汽灭菌:蒸汽管道内通入蒸汽,打开第一阀门、第二阀门、第三阀门和排气排水阀门,通过蒸汽对第一管道、第二管道、发酵罐和补料容器进行灭菌;灭菌完毕后关闭蒸汽,同时关闭第一阀门、第二阀门、第三阀门和排气排水阀门,冷却待用;

(2) IPTG诱导剂的制备:将IPTG添加量放入补料容器中,加入室温无菌水将IPTG溶解,同时充入无菌空气加快IPTG溶解;IPTG完全溶解后得到IPTG溶液,打开第一阀门,IPTG溶液通过第一阀门依次进入第一管道、过滤罐,并在过滤罐内过滤除菌;打开第二阀门,除菌后的IPTG溶液进入第二管道;

(3) 发酵过程中补加IPTG:将培养基接入发酵罐中并接种氨基葡萄糖菌,培养至发酵液 OD_{600nm} 值20-30,开始补加IPTG溶液;当补料容器内的压力高于发酵罐内的压力,打开第三阀门,IPTG溶解进入发酵罐中完成诱导剂的添加。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述灭菌的时间为15-40min;优选的,IPTG溶液的添加量为发酵液体积的(0.1-0.5)mmol/L。

氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及发酵技术领域,具体涉及一种过滤除菌装置及其在氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂应用。

背景技术

[0002] 氨基葡萄糖以微生物发酵为主,生产菌株有基因工程大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等微生物菌株,然而基因工程菌发酵过程中通常要在发酵过程中补加诱导剂,如IPTG,从而启动工程菌诱导表达所需产物。但是很多发酵过程中的添加物,不可以高温灭菌,如诱导剂IPTG、乳糖等,一旦高温灭菌就会导致发酵过程中诱导失败,发酵也就失败,因此在氨基葡萄糖诱导发酵过程中诱导剂在使用前需要过滤除菌。多数微生物发酵生产过程中需要进行补料,尤其是采用基因工程菌的微生物发酵,需要补加IPTG等诱导剂,这一类添加物对发酵极其重要,但又补加量很少,比如在补加IPTG过程中,一般先将IPTG在无菌室溶解后无菌过滤操作,然后无菌密封带出无菌室,再通过火焰接种方式将IPTG补加到发酵罐中,这种操作染菌风险大,操作繁琐,效率低,往往需要多人配合操作。

[0003] 因此,需要一种氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置,能够大大节省发酵车间在无菌室人工过滤的时间,也大大减少染菌的机会,保证了发酵顺利进行,提高了生产效率。

发明内容

[0004] 针对上述现有技术,本发明的目的是提供一种氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置及其应用。本发明通过外接蒸汽将过滤罐灭菌,避免补料时间上发生冲突,或补料时间把握不准确,影响发酵生产效率。IPTG添加前无需单独再进行灭菌操作,对操作环境无要求、无需在无菌环境中添加IPTG,为发酵诱导和生产效率提供了方便,大大减少了操作步骤和染菌几率,具有很强的实用性。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 本发明的第一方面,提供一种氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置,包括过滤罐,所述过滤罐的中间纵向设有空气过滤器;所述过滤罐的底部设有排气排水阀门;所述过滤罐的一端通过第一管道与补料容器连接,所述过滤罐的另一端通过第二管道与发酵罐连接;所述第一管道上设有第一阀门;所述第二管道上设有蒸汽入口,所述第二管道通过蒸汽入口与蒸汽管道连接;所述第二管道上还分别设有第二阀门和第三阀门;所述第二阀门位于过滤罐与蒸汽入口之间,所述第三阀门位于蒸汽入口与发酵罐之间。

[0007] 优选的,所述排气排水阀门位于过滤罐靠近第一管道的一端。

[0008] 优选的,所述补料容器的顶部分别设有压力表和空气进管。

[0009] 优选的,所述第一管道和第二管道分别通过螺纹与过滤罐的两端活动连接。

[0010] 优选的,所述过滤罐的下部设有移动支架。过滤罐可拆卸、移动,供多个发酵罐补加诱导剂时进行灭菌。

[0011] 优选的,所述第一阀门位于补料容器的下方。

[0012] 优选的,所述第二管道深入至发酵罐内部。

[0013] 本发明明的装置还可以并排设置若干个过滤罐,即在补料容器和发酵罐之间在设置若干个并列的过滤罐,每个过滤罐都通过独立的管道与补料容器和发酵罐连接,并通过独立的蒸汽管道进行消毒,具体设置与本发明相同。通过设置并列的过滤罐,可以在一个过滤罐添加诱导剂时,其他过滤罐进行消毒;实现过滤罐的交替使用。

[0014] 本发明的第二方面,提供过滤除菌装置在补加诱导剂中的应用。

[0015] 本发明的第三方面,提供过滤除菌装置补加诱导剂的方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 蒸汽灭菌:蒸汽管道内通入蒸汽,打开第一阀门、第二阀门、第三阀门和排气排水阀门,通过蒸汽对第一管道、第二管道、发酵罐和补料容器进行灭菌;灭菌完毕后关闭蒸汽,同时关闭第一阀门、第二阀门、第三阀门和排气排水阀门,冷却待用;

[0017] (2) IPTG诱导剂的制备:将IPTG添加量放入补料容器中,加入室温无菌水将IPTG溶解,同时充入无菌空气加快IPTG溶解;IPTG完全溶解后得到IPTG溶液,打开第一阀门,IPTG溶液通过第一阀门依次进入第一管道、过滤罐,并在过滤罐内过滤除菌;打开第二阀门,除菌后的IPTG溶液进入第二管道;

[0018] (3) 发酵过程中补加IPTG:将培养基接入发酵罐中并接种氨基葡萄糖菌,培养至发酵液 OD_{600nm} 值20-30,开始补加IPTG溶液;当补料容器内的压力高于发酵罐内的压力,打开第三阀门,IPTG溶解进入发酵罐中完成诱导剂的添加。

[0019] 优选的,所述灭菌的时间为15-40min;

[0020] 优选的,IPTG溶液的添加量为发酵液体积的(0.1-0.5)mmol/L。

[0021] 本发明的有益效果:

[0022] 本发明通过外接蒸汽将过滤罐灭菌,解决了发酵过程中不能灭菌的添加物的无菌添加。添加诱导剂前无需对诱导剂单独进行灭菌,对发酵的操作环境无要求、无需在无菌环境中添加IPTG,为发酵诱导和生产效率提供了方便,大大减少了操作步骤和染菌几率,具有很强的实用性。本发明的装置可以用于添加类似IPTG等补加物的无菌处理中,提高发酵工艺的效率。

附图说明

[0023] 图1:本发明的一种氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置结构示意图;

[0024] 其中:1.过滤罐,2.空气过滤器,3.补料容器,4.发酵罐,5.第一管道,6.第二管道,7.蒸汽入口,8.蒸汽管道,9.第一阀门,10.第二阀门,11.第三阀门,12.排气排水阀门,13.移动支架,14.压力表,15.空气进管。

具体实施方式

[0025] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0026] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本申请的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本申请的技术方案。

[0027] 本发明实施例中所用的试验材料均为本领域常规的试验材料,均可通过商业渠道购买得到。

[0028] 正如背景技术所述,现有的氨基葡萄糖发酵技术,由于所用诱导剂不能进行高温灭菌来除菌,所以补加诱导剂需要在无菌车间先对诱导剂进行灭菌处理,再补加到发酵罐中。由于发酵罐高度一般在10~20m之间,制造如此体积的无菌室较为困难,再者,发酵生产过程中,诱导剂的添加量一般较少,长管道输送会导致昂贵的诱导剂在管道残留,造成损失,并且长管道输送也会大大增加染菌风险。所以诱导剂无法在无菌环境中补加到发酵罐内,补加诱导剂的过程中以及人工将诱导剂送入、送出无菌室灭菌的过程中都难免使诱导剂再次被细菌沾染。基于此,本发明提供一种氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置及其应用,通过蒸汽对过滤罐灭菌,再使用过滤罐对诱导剂进行除菌然后加入发酵罐中,蒸汽可反复对过滤罐进行灭菌处理,使补加无菌诱导剂变得极为简单、方便,极大的提高了诱导剂的除菌效率以及发酵效率。过滤罐可拆卸、可移动、可并列安装,方便在各个发酵罐之间来回使用。本发明的装置适用于所有无法通过高温蒸汽灭菌的发酵添加物的灭菌处理,提高发酵效率。

[0029] 本发明中,氨基葡萄糖菌种制备和发酵工艺控制:

[0030] (1) 种子制备:从母种斜面(或平板)挑取生产菌到摇瓶。

[0031] (2) 氨基葡萄糖发酵工艺控制:摇瓶接种到500L种子罐扩大培养——6~10吨二级种子罐进一步扩大培养——80~100M³发酵培养,发酵过程中补糖和补加IPTG诱导剂。IPTG诱导剂添加采用本发明的过滤除菌装置。

[0032] 以下实例即对本发明装置和应用进一步说明,其他发酵过程中需补加不能高温灭菌的添加物可参照本发明装置进行。

[0033] 实施例1

[0034] 一种氨基葡萄糖发酵过程补加诱导剂的过滤除菌装置,如图1所示,包括过滤罐1,所述过滤罐1的中间纵向设有空气过滤器2;所述过滤罐1的底部设有排气排水阀门12;所述过滤罐1的一端通过第一管道5与补料容器3连接,所述过滤罐1的另一端通过第二管道6与发酵罐4连接;所述第一管道5上设有第一阀门9;所述第二管道6上设有蒸汽入口7,所述第二管道6通过蒸汽入口7与蒸汽管道8连接;所述第二管道6上还分别设有第二阀门10和第三阀门11;所述第二阀门10位于过滤罐1与蒸汽入口7之间,所述第三阀门11位于蒸汽入口7与发酵罐4之间。

[0035] 所述排气排水阀门12位于过滤罐1靠近第一管道5的一端。所述补料容器3的顶部分别设有压力表14和空气进管15。所述第一管道5和第二管道6分别通过螺纹与过滤罐1的两端活动连接。所述过滤罐1的下部设有移动支架13。所述第一阀门9位于补料容器3的下方。所述第二管道6深入至发酵罐4内部。

[0036] 实施例2

[0037] 采用实施例1的装置制备氨基葡萄糖:

[0038] 氨基葡萄糖发酵过程中,监测菌体浓度OD_{600nm},当OD值为20-30时,开始一次性添加IPTG诱导剂,具体应用操作为:

[0039] (1) 在OD_{600nm}值20之前,对本装置进行蒸汽灭菌,关闭第三阀门,打开第二阀门,排气排水阀门以及第一阀门可半开状态,将整个除菌系统及管道进行灭菌,其中包括补料

容器。(2) 灭菌时间20min。(3) 灭菌完毕后,关闭蒸汽。同时关闭第二阀门和第一阀门,关闭排气排水阀门,冷却待用。(4) IPTG补加量按照发酵液质量体积的0.25mmol/L添加。(5) 将称量好的IPTG添加量放入补料容器中,加入温开水将IPTG溶解,同时充入车间过滤空气加快IPTG溶解。(6) IPTG完全溶解后,提高补料容器内的压力,使其高于发酵罐内的压力,打开第三阀门,IPTG溶解液通过滤罐除菌后进入发酵罐中,完成诱导剂的添加。(7) 测定最终放罐时的氨基葡萄糖含量。

[0040] 通过测定实施例1的装置使用后的连续3批实验数据,并以相同的发酵工艺使用传统的诱导剂添加方法:火焰接种诱导剂方法作为对照,所得结果见表1。

[0041] 注:火焰接种诱导剂方法为:

[0042] 将在无菌室通过无菌过滤器过滤好的诱导剂用无菌容器装好,无菌容器的出口用无菌棉塞包扎好,保证拿出无菌室过程中不被污染。

[0043] 操作过程是:发酵罐内保证正压,用浸满酒精的棉花圈(圈的大小能套住发酵罐出口),点燃酒精棉塞,火焰灼烧,操作工戴好口罩,一名操作工戴防火手套将发酵罐接种口打开,另一名操作工将装有无菌的诱导剂的容器口靠近火焰将无菌容器的出口打开,快速将诱导剂倒入发酵罐中,倒完后将发酵罐接种口拧紧,将火焰圈拿掉后熄灭,操作完毕。

[0044] 表1试验结果比较

试验批次	IPTG 添加装置	氨基葡萄糖含量 (g/L)	氨基葡萄糖折纯 (吨)	总共补加纯糖 (吨)	葡萄糖转化率	发酵时间 h
第 20 批	实施例 1 的装置	133.32	8.96	16.87	53.11%	54
第 21 批	实施例 1 的装置	129.43	8.78	16.55	53.05%	53
第 22 批	实施例 1 的装置	134.87	8.93	16.67	53.57%	53
第 19 批	传统的火焰接种	127.25	7.64	17.92	42.63%	66

[0045] 从实施例2通过四批次比较试验结果数据来看,采用本发明的装置使用操作安全,无染菌顾虑,安全可靠,同时氨基葡萄糖发酵含量高于传统补加方式,尤其是葡萄糖转化率有了明显的提高。

[0046] 实施例3

[0047] 采用实施例1的装置制备氨基葡萄糖:

[0048] 氨基葡萄糖发酵过程中,监测菌体浓度 OD_{600nm} ,当 OD 值为20-30时,开始一次性添加IPTG诱导剂,具体应用操作为:

[0049] (1) 在 OD_{600nm} 值30之前,对本装置进行蒸汽灭菌,关闭第三阀门,打开第二阀门,排气排水阀门以及第一阀门可半开状态,将整个除菌系统及管道进行灭菌,其中包括补料容器。(2) 灭菌时间40min。(3) 灭菌完毕后,关闭蒸汽。同时关闭第二阀门和3,关闭排气排水阀门,冷却待用。(4) IPTG补加量按照发酵液质量体积的0.4mmol/L添加。(5) 将称量好的IPTG

添加量放入补料容器中,加入温开水将IPTG溶解,同时充入车间过滤空气加快IPTG溶解。
 (6) IPTG完全溶解后,提高补料容器内的压力,使其高于发酵罐内的压力,打开第三阀门,IPTG溶解液通过滤罐除菌后进入发酵罐中,完成诱导剂的添加。(7) 测定最终放罐时的氨基葡萄糖含量。

[0051] 通过测定实施例1的装置使用后的连续3批实验数据,并以相同的发酵工艺使用传统的诱导剂添加方法:火焰接种诱导剂方法(具体操作方法参见实施例1)作为对照,所得结果见表2。

[0052] 表2试验结果比较

试验批次	IPTG 添加装置	氨基葡萄糖含量 (g/L)	氨基葡萄糖折纯 (吨)	总共补加纯糖 (吨)	葡萄糖转化率	发酵时间 h
第 25 批	实施例 1 的装置	129.60	8.85	16.68	53.06%	52
第 26 批	实施例 1 的装置	130.18	8.82	16.57	53.23%	53
第 27 批	实施例 1 的装置	130.98	8.84	16.64	53.12%	53
第 28 批	传统的火焰接种	125.75	7.66	17.93	42.72%	65

[0054] 实施例3从四批次比较试验结果数据来看,采用本发明的装置用于IPTG补料,最终氨基葡萄糖发酵含量高于传统补加方式,尤其是葡萄糖转化率有了明显的提高。

[0055] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,对于本领域的技术人员来说,本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

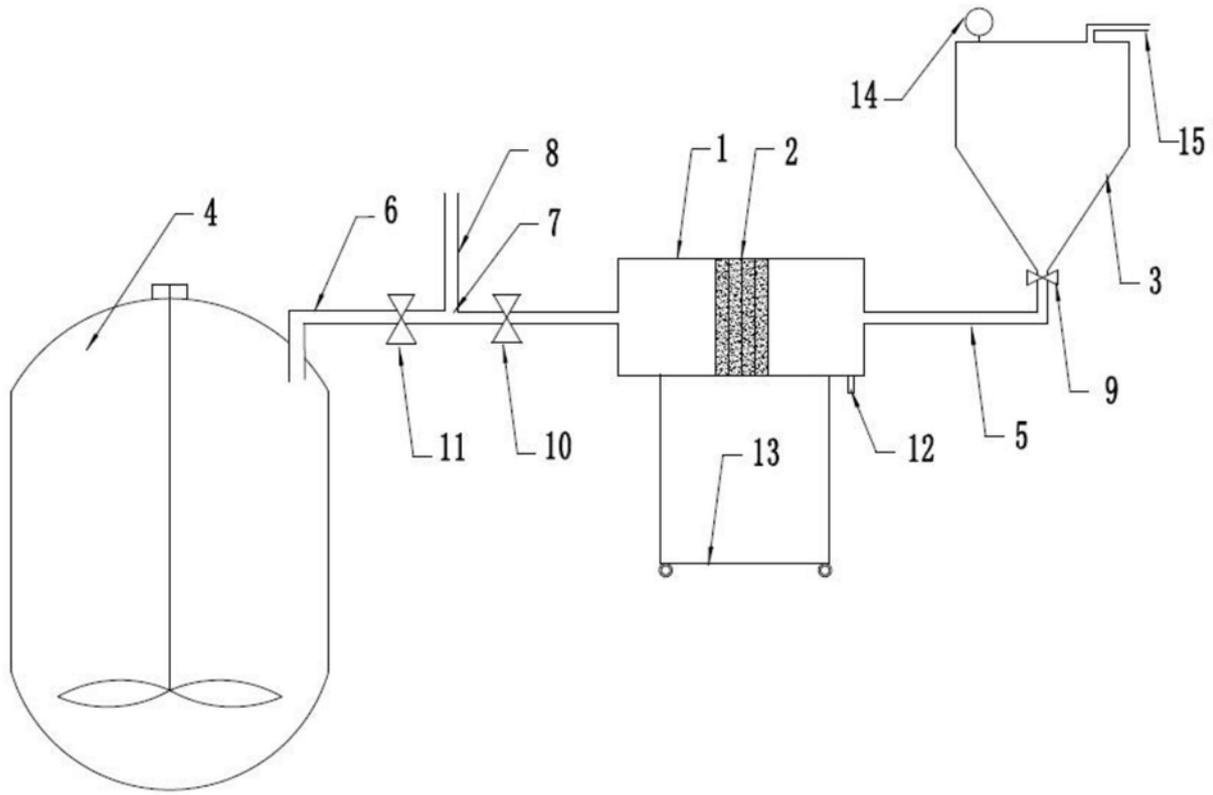


图1