



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104498552 B

(45)授权公告日 2017.12.29

(21)申请号 201510021744.6

(22)申请日 2015.01.15

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104498552 A

(43)申请公布日 2015.04.08

(73)专利权人 江南大学  
地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72)发明人 陈旭升 毛忠贵 任喜东 张建华  
张宏建 唐蕾 王珂

(74)专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务所(特殊普通合伙) 11419  
代理人 张勇

(51)Int.Cl.  
C12P 13/02(2006.01)  
C12R 1/465(2006.01)

(56)对比文件  
CN 102352386 A,2012.02.15,全文.  
JP 2005052010 A,2005.03.03,全文.  
JOHN W. FOSTER,et al..Inducible pH Homeostasis and the Acid Tolerance Response of Salmonella typhimurium.《JOURNAL OF BACTERIOLOGY》.1991,第173卷(第16期),第5129-5135页.

刘兴艳等.酿酒酵母对弱有机酸胁迫的应激机制研究进展.《食品与发酵工业》.2013,第39卷(第6期),第125-129页.

PRIHARDI KAHAR,et al..Enhancement &- Polylysine Production by Streptomyces Strain 410 Using pH Control.《JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING》.2001,第91卷(第2期),第190-194页.

Chang Joon Kim,et al..Enhancement of Kasugamycin Production by pH Shock in Batch Cultures of Streptomyces kasugaensis.《Biotechnol. Prog.》.2000,第16卷(第4期),第548-552页.

Xu-Sheng Chen,et al..Production of e-poly-L-lysine using a novel two-stage pH control strategy by Streptomyces sp. M-Z18 from glycerol.《Bioprocess Biosyst Eng》.2011,第34卷(第5期),第561-567页.

Xu-Sheng Chen,et al..Production of e-poly-L-lysine using a novel two-stage pH control strategy by Streptomyces sp. M-Z18 from glycerol.《Bioprocess Biosyst Eng》.2011,第34卷(第5期),第561-567页.

审查员 高赟

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称  
一种低pH值胁迫提高ε-聚赖氨酸产量的方法

(57)摘要  
本发明公开了一种低pH值胁迫提高ε-聚赖氨酸产量的方法,属于发酵工程技术领域。在发酵过程中引入酸性pH胁迫工艺,即人为或自发使pH降为2.5-3.0,维持12-48h之后,将pH再提高到3.5-4.5,保持稳定直到发酵结束。采用此种pH调控方法,能够显著提高ε-聚赖氨酸产生菌的比生长速率和ε-聚赖氨酸比合成速率;结合补料-分批发酵方式,ε-聚赖氨酸的产量较普通两阶

段pH调控工艺提高50%以上。本发明将低pH胁迫的方法引入ε-聚赖氨酸发酵过程中,显著提高了ε-聚赖氨酸的发酵水平。而且,此方法由于操作简单、效果显著,易于大规模工业化生产的实施。

CN 104498552 B

1. 一种低pH值胁迫提高 $\epsilon$ -聚赖氨酸产量的方法,其特征在于,在 $\epsilon$ -聚赖氨酸发酵过程前期引入酸性pH值胁迫策略;所述酸性pH值胁迫策略是使发酵液pH降为2.5-3.0,并维持12-48h,随后将pH调为3.5-4.5并保持稳定直到发酵结束。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在发酵前期人为或自发地使发酵液pH值从起始7.0下降至2.5-3.0,维持12-48h后,将pH上调至3.5-4.5,维持稳定直到发酵结束。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,在 $\epsilon$ -聚赖氨酸发酵开始后,先让发酵液pH自发下降至5.0,并控制pH在5.0直至菌体量倍增,然后人为或自然地使pH降为2.5-3.0,并维持12-48h,随后将pH调为3.5-4.5并保持稳定直到发酵结束。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,主要包括以下步骤:(1) 将 $\epsilon$ -聚赖氨酸产生菌链霉菌的种子液接种到以甘油和/或葡萄糖为碳源的发酵培养基中,通过发酵罐进行培养;(2) 当pH从起始的7.0自发下降至5.0时,通过碱溶液将pH维持在5.0-6.0,直至菌体干重倍增;(3) 在菌体量倍增后,人为或自然地使pH降至2.5-3.0,并维持12-48h,随后通过流加碱溶液将pH调为3.5-4.5并保持稳定,直到发酵结束。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,主要包括以下步骤:(1) 将保藏的 $\epsilon$ -聚赖氨酸产生菌链霉菌孢子,接种到M3G培养基中,30℃培养24h作为种子液;(2) 将种子液以8%的接种量接种到以甘油和/或葡萄糖为碳源的发酵培养基中,通过发酵罐进行培养;(3) 当pH从起始7.0自发下降至5.0时,通过蠕动泵自动添加碱溶液将pH维持在5.0-6.0,直到菌体干重倍增;(4) 在菌体量倍增后,人为或自然地使pH降为2.5-3.0,并维持12-48h,随后通过流加碱溶液将pH调为3.5-4.5并保持稳定,直到分批或补料-分批发酵结束。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,生产菌是芽孢杆菌属的 $\epsilon$ -聚赖氨酸产生菌或链霉菌属的 $\epsilon$ -PL产生菌。

7. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于, $\epsilon$ -聚赖氨酸的其他发酵条件为:发酵温度30-37℃,通气量为0.5-2vvm,搅拌转速为200-800rpm。

8. 根据权利要求4或5所述的方法,其特征在于,调节pH的所述碱溶液为2-4mol/LNaOH或12.5%-25%氨水。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述发酵是分批发酵或补料-分批发酵。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述的补料-分批发酵包括流加甘油、葡萄糖或二者混合物以及硫酸铵溶液。

## 一种低pH值胁迫提高 $\epsilon$ -聚赖氨酸产量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种低pH值胁迫提高 $\epsilon$ -聚赖氨酸产量的方法,属于发酵工程技术领域。

### 背景技术

[0002]  $\epsilon$ -聚赖氨酸( $\epsilon$ -poly-L-lysine,  $\epsilon$ -PL)是一种微生物合成分泌的L-赖氨酸同聚物,由25-35个L-赖氨酸残基通过 $\alpha$ -羧基与 $\epsilon$ -氨基的脱水缩合作用聚合而成。 $\epsilon$ -PL具有水溶性好、热稳定性高、可食用、可降解以及对人和环境无毒害等优点。另外, $\epsilon$ -PL还具有广泛的抑菌谱,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母菌和霉菌等都具有良好的抑制作用。因此, $\epsilon$ -PL作为一种优良的生物食品防腐剂,已相继被日本、韩国以及美国和欧洲等国家和地区批准其在食品加工业中使用。2014年4月,我国食品安全国家标准也批准 $\epsilon$ -PL作为食品防腐剂被允许使用。除此之外,作为一种多阳离子生物聚合物, $\epsilon$ -PL还被广泛应用于医药、环境和电子等工业领域。由此可见, $\epsilon$ -PL是一种具有多种用途的重要工业生物技术产品,具有巨大潜在商业价值。

[0003] 当前, $\epsilon$ -PL生产仅限于利用链霉菌通过液态好氧发酵技术实现。因此,选育高产菌和优化发酵过程就成为提高 $\epsilon$ -PL发酵水平的主要途径。基于菌体生长和产物合成需要不同最适pH原则,由Kahar et al.最早提出了两阶段pH值调控方法:发酵周期的前48h维持pH值 $>5.0$ (阶段I),48h后维持pH值4.0左右(阶段II),这种pH值先高后低控制方法结合碳氮源流加技术,实现*Streptomyces albulus* S410的 $\epsilon$ -PL最高产量达到48.3g/L。近年来,发明人以最高 $\epsilon$ -PL比合成速率为调控目标,提出了新的两阶段pH值调控方法:发酵前36h维持pH值3.5(阶段I),36h后维持pH值3.8(阶段II),这种pH值先低后高的调控策略,最终实现*Streptomyces* sp.M-Z18的补料-分批发酵 $\epsilon$ -PL产量达到30.11g/L。对比两个pH值调控方法可以发现,它们之间存在明显差异:(1)出发点不同,前者为菌体生长和产物合成分别提供最适pH环境,后者是为了实现产物最大比合成速率;(2)pH值控制策略不同,前者阶段I控制的pH值较阶段II高,而后者阶段I控制的pH值较阶段II低。

[0004] 尽管前面的研究工作成功的通过采用pH调控的方法提高了 $\epsilon$ -PL的产量,但是却并没有采用极端低pH环境胁迫的方法来提高 $\epsilon$ -PL产量。本发明通过极端低pH值胁迫进一步促进 $\epsilon$ -PL产量的提高。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是通过在 $\epsilon$ -PL发酵前期引入极端的酸性pH值胁迫,以提高 $\epsilon$ -PL产量。本发明在发酵前期人为或自发地使发酵液pH值从起始7.0下降至2.5—3.0,维持一段时间后,将pH上调至3.5—4.5,维持稳定直到发酵结束。

[0006] 在本发明的一种实施方式中,在 $\epsilon$ -PL发酵开始后,先让发酵液pH自发下降至5.0左右,并控制pH在5.0左右直至菌体量倍增,然后人为或自然地使pH降为2.5-3.0,并维持12-48h,随后将pH调为3.5-4.5并保持稳定直到发酵结束。

[0007] 本发明的一种实施方式主要包括以下步骤：(1) 将 $\epsilon$ -PL产生菌链霉菌的种子液接种到以甘油和/或葡萄糖为碳源的发酵培养基中,通过发酵罐进行培养；(2) 当pH从起始的7.0自发下降至5.0时,通过碱溶液将pH维持在5.0-6.0,直至菌体干重倍增；(3) 在菌体量倍增后,人为或自然地使pH降至2.5-3.0,并维持12-48h,随后通过流加碱溶液将pH调为3.5-4.5并保持稳定,直到发酵结束。

[0008] 本发明的另一种实施方式主要包括以下步骤：(1) 将保藏的 $\epsilon$ -PL产生菌链霉菌属孢子,接种到M3G培养基中,30℃培养24h作为种子液；(2) 将种子液以8%的接种量接种到以甘油和/或葡萄糖为碳源的发酵培养基中,通过发酵罐进行培养；(3) 当pH从起始7.0自发下降至5.0时,通过蠕动泵自动添加碱溶液将pH维持在5.0-6.0,直到菌体干重倍增；(4) 在菌体量倍增后,人为或自然地使pH降为2.5-3.0,并维持12-48h,随后通过流加碱溶液将pH调为3.5-4.5并保持稳定,直到分批或补料-分批发酵结束。

[0009] 在本发明的一种实施方式中,所述的 $\epsilon$ -PL生产菌还可以是芽孢杆菌属 $\epsilon$ -PL产生菌。

[0010] 在本发明的一种实施方式中, $\epsilon$ -PL的其他发酵条件为:发酵温度30-37℃,通气量为0.5-2vvm,搅拌转速为200-800rpm。

[0011] 在本发明的一种实施方式中,调节pH的所述的碱溶液为2-4mol/LNaOH或12.5%-25%氨水。

[0012] 在本发明的一种实施方式中,所述的发酵罐为搅拌式或气升式发酵罐,并且发酵罐体积不限。

[0013] 在本发明的一种实施方式中,所述发酵是分批发酵或补料-分批发酵。

[0014] 在本发明的一种实施方式中,所述的补料-分批发酵包括流加甘油、葡萄糖或二者混合物以及硫酸铵溶液。

[0015] 本发明与已有技术相比具有以下优点：

[0016] (1) 操作方式简单:仅依靠发酵过程中菌体自发或人为流加酸碱溶液进行pH值调节,便于工业推广和应用。(2) 显著提高 $\epsilon$ -PL产量:相比于普通的两阶段pH调控策略, $\epsilon$ -PL产量能够显著提高50%以上,且能够显著降低后提取成本,增加经济效益。

## 具体实施方式

[0017] 发酵培养基参见文献Culture medium containing glucose and glycerol as a mixed carbon source improves $\epsilon$ -poly-L-lysine production by *Streptomyces* sp.M-Z18.Bioprocess Biosyst Eng 2012Mar,35 (3):469-475。

[0018] 实施例1两阶段pH控制策略

[0019] 在5L发酵罐中装3.26L发酵培养基进行分批发酵,将0.24L培养24h的种子液接种到发酵培养基中,pH值调至6.8-7.5开始发酵。在发酵过程中,搅拌转速控制为200-800rpm,通气量控制为0.5-2vvm,溶氧控制在30%左右;在发酵过程中当pH自发降为5.0时,自动流加氨水或NaOH溶液将pH维持在5.0直到菌体量倍增,后使pH自发下降到4.0,并通过自动流加氨水或NaOH溶液将pH维持在设定值,直到碳源消耗完毕,发酵结束。最终,实现 $\epsilon$ -PL产量和菌体量分别为7.83和26.89g/L, $\epsilon$ -PL产率为6.12g/L/d。

[0020] 若当发酵液中残留的甘油或葡萄糖浓度降为10g/L时,自动流加灭菌后的纯甘油

或500g/L的葡萄糖溶液,使其在发酵液中的浓度控制在10g/L左右;当发酵液中 $\text{NH}_4^+$ -N浓度降到1g/L时,自动流加灭菌后的600g/L的硫酸铵溶液,使其浓度维持在1g/L。发酵192h后, $\epsilon$ -PL产量和菌体量分别为35.87和64.02g/L, $\epsilon$ -PL产率为4.48g/L/d。

[0021] 实施例2先降后升两阶段pH控制策略

[0022] 在5L发酵罐中装3.26L发酵培养基进行分批发酵,将0.24L培养24h的种子液接种到发酵培养基中,pH调到6.8-7.5开始发酵。在发酵过程中,搅拌转速控制为200-800rpm,通气量控制为0.5-2vvm,溶氧控制在30%;当发酵pH值自发降为3.5时(约20h),自动流加氨水或NaOH溶液将此pH维持稳定,直至36h,后将pH上调到3.8,并自动流加氨水或NaOH溶液将此pH维持稳定,直到碳源消耗完毕,发酵结束。最终,实现 $\epsilon$ -PL产量和菌体量分别为8.59和27.21g/L, $\epsilon$ -PL产率为6.42g/L/d。

[0023] 若当发酵液中残留的甘油或葡萄糖浓度降为10g/L时,自动流加灭菌后的纯甘油或500g/L的葡萄糖溶液,使其在发酵液中的浓度控制在10g/L左右;当发酵液中 $\text{NH}_4^+$ -N浓度降到1g/L时,自动流加灭菌后的600g/L的硫酸铵溶液,使其浓度维持在1g/L。发酵176h后, $\epsilon$ -PL产量和菌体量分别为35.24和43.05g/L, $\epsilon$ -PL产率为4.81g/L/d。

[0024] 实施例3

[0025] 在5L发酵罐中装3.26L发酵培养基进行分批发酵,将0.24L培养24h的种子液接种到发酵培养基中,pH调到6.8-7.5开始发酵。在发酵过程中,搅拌转速控制为200-800rpm,通气量控制为0.5-2vvm,溶氧控制在30%;发酵进行到20h,人为将pH降为2.5并维持12h,随后将pH上调到3.5,并自动流加氨水将pH维持在设定值,直到葡萄糖消耗完毕,发酵结束。最终,实现 $\epsilon$ -PL产量和菌体量分别为10.39和30.61g/L, $\epsilon$ -PL产率为7.12g/L/d。

[0026] 实施例4

[0027] 在5L发酵罐中装3.26L发酵培养基进行分批发酵,将0.24L培养24h的种子液接种到发酵培养基中,pH调到6.8-7.5开始发酵。在发酵过程中,搅拌转速控制为200-800rpm,通气量控制为0.5-2vvm,溶氧控制在30%;当发酵pH值自发降为5.0时,自动流加NaOH溶液将pH维持在5.0直到菌体量倍增,后人为将pH降为2.5并维持12h,随后将pH上调到3.5,并自动流加氨水将pH维持在设定值,直到葡萄糖消耗完毕,发酵结束。最终,实现 $\epsilon$ -PL产量和菌体量分别为10.21和28.36g/L, $\epsilon$ -PL产率为8.63g/L/d。

[0028] 实施例5

[0029] 在5L发酵罐中装3.26L发酵培养基进行分批发酵,将0.24L培养24h的种子液接种到发酵培养基中,pH调到6.8-7.5开始发酵。在发酵过程中,搅拌转速控制为200-800rpm,通气量控制为0.5-2vvm,溶氧控制在30%;在发酵过程中当pH自发降为5.0时,自动流加氨水将pH维持在5.0直到菌体量倍增,后使pH自发下降到3.0,并维持48h,随后将pH上调到4.5,并自动流加NaOH溶液将pH维持在设定值,直到甘油消耗完毕,发酵结束。最终,实现 $\epsilon$ -PL产量和菌体量分别为9.65和23.90g/L, $\epsilon$ -PL产率为7.94g/L/d。

[0030] 实施例6

[0031] 在5L发酵罐中装3.26L发酵培养基进行分批发酵,将0.24L培养24h的种子液接种到发酵培养基中,pH调到6.8-7.5开始发酵。在发酵过程中,搅拌转速控制为200-800rpm,通气量控制为0.5-2vvm,溶氧控制在30%;在发酵过程中当pH自发降为5.0时,自动流加氨水或NaOH溶液将pH维持在5.0直到菌体量倍增,人为将pH值降为3.0并维持24h,后将pH上调到

4.5,并自动流加氨水或NaOH溶液将pH维持在设定值。当发酵液中残留的甘油或葡萄糖浓度降为10g/L时,自动流加灭菌后的纯甘油或500g/L的葡萄糖溶液,使其在发酵液中的浓度控制在10g/L左右;当发酵液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度降到1g/L时,自动流加灭菌后的600g/L的硫酸铵溶液,使其浓度维持在1g/L。发酵192h后, $\epsilon\text{-PL}$ 产量达到54.70g/L,相比于两阶段pH控制策略分别提高52.50% (实施例1) 和55.22% (实施例2); $\epsilon\text{-PL}$ 产率为6.84g/L/d,相比于两阶段pH控制策略分别提高52.68% (实施例1) 和42.20% (实施例2)。

[0032] 虽然本发明以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。