



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113088552 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 26

(21) 申请号 202110523332.8

(22) 申请日 2021.05.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113088552 A

(43) 申请公布日 2021.07.09

(73) 专利权人 河南工业大学
地址 450001 河南省郑州市高新技术产业
开发区莲花街100号

(72) 发明人 潘龙 黄继红 张紫姗 田翠竹
董瑜琪 张文芬 惠明 孙杨
廖爱美 侯银臣

(74) 专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通
合伙) 41114
专利代理师 王霞 韩鹏程

(51) Int.Cl.

C12P 39/00 (2006.01)

C12P 13/02 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/47 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

(56) 对比文件

Xinglin Jiang等.Distribution of ϵ -
Poly-L-Lysine Synthetases in Coryneform
Bacteria Isolated from Cheese and Human
Skin.Applied and Environmental
Microbiology.2021,第87卷(第10期),摘要.

审查员 邵文博

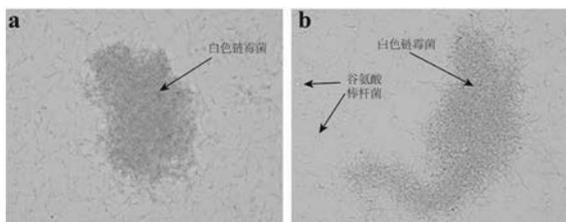
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

混菌发酵生产 ϵ -PL的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种混菌发酵生产 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL)的方法,本发明经过对多种菌种筛选后确定选用谷氨酸棒杆菌与白色链霉菌进行混菌发酵,并经过单因素优化实验确定下本发明的生产方法,达到提高 ϵ -PL产量的目的。具体的,首先将白色链霉菌接种至M3G培养基中摇床培养24h,得到白色链霉菌种子液,将白色链霉菌种子液按8%接种量接入发酵培养基(发酵初始pH为7.4)中,在其发酵的12h时接入10%培养至 $OD_{600}=2.3\sim 2.8$ 的谷氨酸棒杆菌种子液,30℃,200 r/min摇床培养60 h,得到高产量 ϵ -PL产品。本发明为发酵法高效生产 ϵ -PL提供了新思路,为混菌发酵在 ϵ -PL发酵中的应用提供了理论依据。



1. 一种混菌发酵生产 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)的方法,其特征在于:包括下述步骤:

第一步,配制培养基

a、配制用于孢子制备的BTN琼脂培养基:

葡萄糖 10g/L,蛋白胨 2g/L,酵母提取物 1g/L,琼脂 20 g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H_2SO_4 调整初始pH值为 7.5备用;

b、配制白色链霉菌种子培养基:

葡萄糖 50g/L;酵母提取物 5g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 10g/L; KH_2PO_4 1.36g/L; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.8g/L; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.5g/L; $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.04g/L; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.03g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H_2SO_4 调整初始pH值为6.8备用;

c、配制谷氨酸棒杆菌种子培养基:

氯化钠5g/L,牛肉膏10g/L,蛋白胨10g/L,葡萄糖20g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H_2SO_4 调整初始pH值为7.2备用;

d、配制 ϵ -PL发酵培养基:

葡萄糖 60 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 10 g/L,酵母提取物 10g/L, KH_2PO_4 4g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8g/L, $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.05g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H_2SO_4 调整初始pH值为7.4备用;

第二步,制备种子液

制备白色链霉菌种子液:

首先将白色链霉菌孢子粉溶解于白色链霉菌种子培养基中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养24 h,然后在超净工作台上将其涂布于BTN琼脂培养基上,置于30℃培养箱中培养5-8天,得到白色链霉菌孢子;

在超净工作台上将得到的白色链霉菌孢子接种于装有白色链霉菌种子培养基的摇瓶中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养24 h,得到白色链霉菌种子液备用;

制备谷氨酸棒杆菌种子液:

在超净工作台上将谷氨酸棒杆菌接种于装有谷氨酸棒杆菌种子培养基的摇瓶中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养至 $OD_{600}=2.3\sim 2.8$ 之间,得到谷氨酸棒杆菌种子液备用;

所述谷氨酸棒杆菌为谷氨酸棒杆菌CICC[®]10064;

第三步,混菌发酵

将制备的白色链霉菌种子液接种于装有 ϵ -PL发酵培养基的培养瓶中,发酵12h,然后将谷氨酸棒杆菌种子液接种进去,在200 r/min,30℃摇床条件下继续发酵60 h,得到成品 ϵ -PL。

2. 根据权利要求1所述的混菌发酵生产 ϵ -PL的方法,其特征在于:所述第三步混菌发酵时,白色链霉菌种子液接种量为8%;谷氨酸棒杆菌种子液接种量为10%。

混菌发酵生产 ϵ -PL的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及直链状氨基酸聚合物 ϵ -PL的发酵生产,尤其是涉及一种混菌发酵生产 ϵ -PL的方法。

背景技术

[0002] ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL)是一种由L-赖氨酸单体组成的直链状氨基酸聚合物,由于在主链上存在许多游离氨基,使其在酸性到弱碱性环境中表现出多阳离子特性。这一特性使它对大多数革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌、真菌、酵母以及一些病毒具有很强的抗菌活性。因此, ϵ -PL与乳酸链球菌素和纳他霉素并称为三大生物来源天然食品防腐剂。

[0003] 目前为止,已经报道的能够合成 ϵ -PL的菌株有链霉菌属(*Streptomyces*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)以及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),其中链霉菌属是作为工业化生产的主要菌株。在微生物发酵生产 ϵ -PL的研究中,大量的工作主要聚焦于菌种的筛选以及发酵工艺的优化。在已有的文献报道中, ϵ -PL的发酵几乎都是通过单一菌种完成的。作为发酵生产 ϵ -PL的主要生产菌株--白色链霉菌,在发酵过程中由于菌丝体较多且副产物多,造成了葡萄糖转化率低(低于7.38%),生产成本高。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对现有技术所存在的缺陷,提供一种混菌发酵生产 ϵ -PL的方法,为高效生产 ϵ -PL提供了新的思路。

[0005] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

[0006] 本发明所述的混菌发酵生产 ϵ -PL的方法,包括下述步骤:

[0007] 第一步,配制培养基

[0008] a、配制用于孢子制备的BTN琼脂培养基:

[0009] 葡萄糖 10g/L,蛋白胨 2g/L,酵母提取物 1g/L,琼脂 20 g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H_2SO_4 调整初始pH值为 7.5备用;

[0010] b、配制白色链霉菌种子培养基:

[0011] 葡萄糖 50g/L;酵母提取物 5g/L;(NH₄)₂SO₄ 10g/L;KH₂PO₄ 1.36g/L;K₂HPO₄·3H₂O 0.8g/L;MgSO₄·7 H₂O 0.5g/L;ZnSO₄·7 H₂O 0.04g/L;FeSO₄·7 H₂O 0.03g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H_2SO_4 调整初始pH值为6.8备用;

[0012] c、配制谷氨酸棒杆菌种子培养基:

[0013] 氯化钠5g/L,牛肉膏10g/L,蛋白胨10g/L,葡萄糖20g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H_2SO_4 调整初始pH值为7.2备用;

[0014] d、配制 ϵ -PL发酵培养基:

[0015] 葡萄糖 60 g/L,(NH₄)₂SO₄ 10 g/L,酵母提取物 10g/L,KH₂PO₄ 4g/L,;MgSO₄·7H₂O 0.8g/L,FeSO₄·7 H₂O 0.05g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H_2SO_4 调整初始pH值为7.4备

用;

[0016] 第二步,制备种子液

[0017] 制备白色链霉菌种子液:

[0018] 首先将白色链霉菌孢子粉溶解于白色链霉菌种子培养基中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养24 h,然后在超净工作台上将其涂布于BTN琼脂培养基上,置于30℃培养箱中培养5-8天,得到白色链霉菌孢子;

[0019] 在超净工作台上将制备的白色链霉菌孢子接种于装有白色链霉菌种子培养基的摇瓶中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养24 h,得到白色链霉菌种子液备用;

[0020] 制备谷氨酸棒杆菌种子液:

[0021] 在超净工作台上将谷氨酸棒杆菌接种于装有谷氨酸棒杆菌种子培养基的摇瓶中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养至 $OD_{600}=2.3\sim 2.8$ 之间,得到谷氨酸棒杆菌种子液备用;

[0022] 第三步,混菌发酵

[0023] 将制备的白色链霉菌种子液接种于装有 ϵ -PL发酵培养基的培养瓶中,发酵12h,然后将谷氨酸棒杆菌种子液接种进去,在200 r/min,30℃摇床条件下继续发酵60 h,得到成品 ϵ -PL。

[0024] 所述第二步混菌发酵时,白色链霉菌种子液接种量为8%;谷氨酸棒杆菌种子液接种量为10%。

[0025] 本发明的优点在于创造性的将传统采用的单一菌株发酵生产 ϵ -PL改变为采用混菌发酵生产 ϵ -PL,经检测,混菌发酵得到的 ϵ -PL产量相比于单一发酵提高75.85%,葡萄糖转化率由7.38%提高至9.16%,提高了24.12%。本发明为发酵法高效生产 ϵ -PL提供了一种新思路,为混菌发酵在 ϵ -PL发酵中的应用提供了理论依据。

附图说明

[0026] 图1是本发明混菌发酵与传统采用的单一菌株发酵的显微图像对比。

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例对本申请做更加详细的说明,以便于本领域技术人员的理解。

[0028] 实施例中所用菌种均可通过正规渠道购得,所用制剂及原材料均为市售产品,所用仪器或设备均为实验室常用仪器或设备。

[0029] 实施例1 采用白色链霉菌和谷氨酸棒杆菌混菌发酵生产 ϵ -PL(ϵ -PL)

[0030] 1、菌种

[0031] 白色链霉菌IFO 14147(CICC[®]11022)购自于中国工业微生物菌种保藏管理中心;

[0032] 谷氨酸棒杆菌CICC[®]10064购自于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

[0033] 2、配制发酵用培养基

[0034] a、配制用于孢子制备的BTN琼脂培养基:

[0035] 葡萄糖 10g/L,蛋白胨 2g/L,酵母提取物 1g/L,琼脂 20 g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H_2SO_4 调整初始pH值为 7.5备用;

[0036] b、配制白色链霉菌种子培养基(M3G):

[0037] 葡萄糖 50g/L;酵母提取物 5g/L;(NH₄)₂SO₄ 10g/L;KH₂PO₄ 1.36g/L;K₂HPO₄ ·

3H₂O 0.8g/L;MgSO₄·7 H₂O 0.5g/L;ZnSO₄·7 H₂O 0.04g/L;FeSO₄·7 H₂O 0.03g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H₂SO₄调整初始pH值为6.8备用;

[0038] c、配制谷氨酸棒杆菌种子培养基:

[0039] 氯化钠5g/L,牛肉膏10g/L,蛋白胨10g/L,葡萄糖20g/L;用1M NaOH溶液或1 M H₂SO₄调整初始pH值为7.2备用;

[0040] d、配制ε-PL发酵培养基:

[0041] 葡萄糖 60g/L,(NH₄)₂SO₄ 10g/L,酵母提取物 10g/L,KH₂PO₄ 4g/L, MgSO₄·7H₂O 0.8g/L,FeSO₄·7 H₂O 0.05g/L;用1 M NaOH溶液或1 M H₂SO₄调整初始pH值为7.4备用。

[0042] 3、制备白色链霉菌孢子

[0043] 将外购的白色链霉菌IFO 14147进行活化制备孢子,具体操作如下:用M3G培养基将安瓿管中的白色链霉菌菌粉溶解后接种于装有50mL M3G培养基的250mL摇瓶中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养24 h;然后在超净工作台上吸取100uL的培养液涂布于BTN琼脂培养基上,并置于30℃培养箱中培养5-8天,得到白色链霉菌IFO 14147孢子;

[0044] 4、制备种子液

[0045] 制备白色链霉菌种子液:在超净工作台上将制备的白色链霉菌孢子接种于装有50mL M3G培养基的250mL摇瓶中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养24 h,得到白色链霉菌种子液备用;

[0046] 制备谷氨酸棒杆菌种子液:在超净工作台上将谷氨酸棒杆菌接种于装有50 mL谷氨酸棒杆菌种子培养基的250mL摇瓶中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养至OD₆₀₀=2.3~2.8之间,得到谷氨酸棒杆菌种子液备用;

[0047] 5、混菌发酵

[0048] 将制备的白色链霉菌种子液按照8%的接种量接种于装有50mL的ε-PL发酵培养基的250mL三角瓶中,发酵12h(温度30℃);然后将OD₆₀₀=2.3~2.8的谷氨酸棒杆菌种子液按照10%的接种量接种进去(此时白色链霉菌和谷氨酸棒杆菌共同存在于ε-PL发酵培养基中),继续在200 r/min,30℃摇床条件下培养发酵60 h,发酵结束后检测发酵液中ε-PL的产量。

[0049] 实施例2 采用白色链霉菌单独发酵生产ε-PL

[0050] 作为对比,本发明将制备的白色链霉菌种子液按照8%的接种量接种于装有50mL的ε-PL发酵培养基的250mL三角瓶中,在200 r/min,30℃摇床条件下培养发酵72 h,发酵结束后检测发酵液中ε-PL的产量。

[0051] 实施例3 对实施例1和实施例2得到的ε-PL的产量进行对比

[0052] 检测方法:用0.7 mM pH 7.0磷酸钠缓冲液将发酵上清液适当稀释,取2 mL稀释液与2mL 1 mM甲基橙溶液进行反应,混合液在30℃条件下震荡反应30 min,再次4500×g离心15min。上清经上述磷酸缓冲液稀释20倍后在465 nm处测定吸光度,并参照标准曲线计算得到ε-PL浓度。

[0053] 按照上述方法,同时对实施例1和实施例2得到的ε-PL进行测定,其结果见下表1。

[0054] 表1

发酵菌种	ϵ -PL 产量 (g/L)	初始葡萄糖浓度 (g/L)	残留葡萄糖浓度 (g/L)	葡萄糖转化率%
[0055] 白色链霉菌	0.886±0.011	55	43	7.38
白色链霉菌+谷氨酸棒杆菌	1.558±0.032	55	38	9.16

[0056] 从表1得到的 ϵ -PL产量对比可以看出,采用本发明的白色链霉菌+谷氨酸棒杆菌混菌发酵,相比于单一的白色链霉菌发酵, ϵ -PL产量提高了75.85%;葡萄糖转化率提高了24.12%。

[0057] 注:产量提高%=(1.558-0.886)/0.886×100%=78.85%。

[0058] 葡萄糖转化率提高%=(9.16-7.38)/7.38×100%=24.12%。

[0059] 其显微图像对比见图1,图1中a图显示的是单一菌株发酵,b图显示的是混菌发酵,放大倍数400×。从图中可以看出,单一菌株发酵的a图中只能看到白色链霉菌的菌丝,混合菌株发酵的b图中不仅能够看到白色链霉菌菌丝,还能看到谷氨酸棒杆菌存活,说明两株菌株能够共生存在。

[0060] 实施例4 本发明发酵工艺的优化处理

[0061] 1、混合培养菌种的选择

[0062] 按本发明的发酵工艺参数,申请人将白色链霉菌分别和大肠杆菌、黄色短杆菌、谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌、乳酸杆菌进行混菌发酵,得到的 ϵ -PL产量对比如表2所示。

[0063] 表2

发酵菌种	ϵ -PL 产量 (g/L)
白色链霉菌	0.886±0.011
白色链霉菌+大肠杆菌	0.807±0.021
[0064] 白色链霉菌+黄色短杆菌	0.836±0.018
白色链霉菌+谷氨酸棒杆菌	0.976±0.013
白色链霉菌+枯草芽孢杆菌	0.825±0.016
白色链霉菌+乳酸杆菌	0.803±0.011

[0065] 从发酵结束得到的 ϵ -PL的产量对比可以看出,采用白色链霉菌+谷氨酸棒杆菌混菌发酵生产 ϵ -PL的效果最好,所得 ϵ -PL的产量最高。

[0066] 2、混合培养时间优化

[0067] 采用白色链霉菌+谷氨酸棒杆菌混菌发酵时,首先接种白色链霉菌,然后在发酵开始后的不同时间(0,12,24,36,48 h)再接种谷氨酸棒杆菌,总发酵时间保持72h(即对白色链霉菌的发酵时间进行优化),得到 ϵ -PL的产量对比如表3所示。

[0068] 表3

接种时间(h)	ϵ -PL 产量
0	0.941 \pm 0.015
12	1.183 \pm 0.022
24	1.029 \pm 0.019
36	1.024 \pm 0.016
48	0.924 \pm 0.008

[0070] 从表3中数据对比可以看出,在白色链霉菌发酵12h后接种谷氨酸棒杆菌对 ϵ -PL的产量提高最为明显。

[0071] 3、谷氨酸棒杆菌接种量优化

[0072] 采用白色链霉菌+谷氨酸棒杆菌混菌发酵时,将谷氨酸棒杆菌的接种量进行优化,其结果见表4。

[0073] 表4

接种量(%)	ϵ -PL 产量
0	0.904 \pm 0.010
4	1.003 \pm 0.011
6	1.086 \pm 0.021
8	1.136 \pm 0.018
10	1.290 \pm 0.017
12	1.207 \pm 0.014

[0075] 从表4数据可以看出,当谷氨酸棒杆菌的接种量在10%时,混菌发酵得到的 ϵ -PL产量最高。

[0076] 4、混菌发酵温度优化

[0077] 采用白色链霉菌+谷氨酸棒杆菌混菌发酵时,将混菌发酵温度进行优化,其结果见表5。

[0078] 表5

发酵温度(°C)	ϵ -PL 产量
26	0.811 \pm 0.012
28	1.177 \pm 0.023
30	1.326 \pm 0.015
32	1.217 \pm 0.012
34	0.953 \pm 0.011

[0080] 从表5数据可以看出,30°C条件下培养发酵,所得到的 ϵ -PL产量最高。

[0081] 5、混菌发酵时的发酵培养基的初始pH优化

[0082] 采用白色链霉菌+谷氨酸棒杆菌混菌发酵时,将 ϵ -PL发酵培养基的初始pH进行优化,其结果见表6。

[0083] 表6

初始 pH	ϵ -PL 产量
6.6	1.174 \pm 0.010
6.8	1.253 \pm 0.011
7.0	1.316 \pm 0.021
7.2	1.331 \pm 0.015
7.4	1.558 \pm 0.032
7.6	1.308 \pm 0.014

[0084]

[0085] 从表6数据可以看出,当 ϵ -PL发酵培养基的初始pH为7.4时,所得到的 ϵ -PL产量最高。

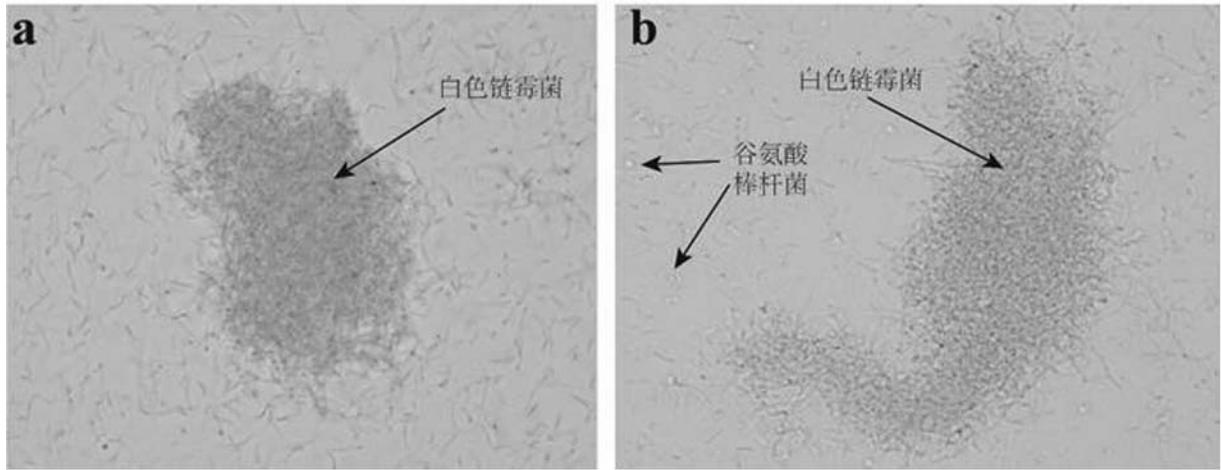


图1