

50 L 自控式发酵罐中  $\epsilon$ -聚赖氨酸发酵条件的优化黄国昌<sup>1</sup>, 熊妮<sup>2</sup>, 印培民<sup>2</sup>, 黄筱萍<sup>2</sup>

1(南昌大学生命科学院, 江西南昌, 330047) 2(江西省科学院, 江西南昌, 330029)

**摘要** 在50L自控式发酵罐上进行了 $\epsilon$ -聚赖氨酸( $\epsilon$ -PL)发酵条件的优化研究,主要考察了分批发酵和补料分批发酵过程中pH、搅拌转速对 $\epsilon$ -PL发酵和菌体生长的影响。结果表明,当控制pH在5.0以上时有利于菌体的生长,但 $\epsilon$ -PL基本不合成,甚至出现降解现象;当维持pH在4.0左右时,能促进 $\epsilon$ -PL的合成。搅拌转速为300 r/min时,有利于溶氧和传质,400 r/min时,由于剪切力过大,导致菌丝断裂, $\epsilon$ -PL产量下降。通过控制发酵中后期pH4.0和搅拌转速300 r/min的pH反馈控制自动流加补料培养,可获得最大的 $\epsilon$ -PL产量7.36 g/L,产率0.072 g/g,产量较优化前提高近10倍,产率提高2倍。

**关键词**  $\epsilon$ -聚赖氨酸( $\epsilon$ -PL), 白色链霉菌, 发酵, 补料, pH控制

由于 $\epsilon$ -聚赖氨酸( $\epsilon$ -PL)具有抑菌谱广、热稳定性高、水溶性好、安全高效等优点,被广泛用于食品保鲜,此外还在医疗卫生等领域有着广泛的用途<sup>[1,2]</sup>,是目前最具开发潜力和商业价值的生物防腐剂之一。

日本的 $\epsilon$ -聚赖氨酸已经实现了工业化生产,国内还处于实验室研究阶段。因此,对 $\epsilon$ -聚赖氨酸进行深入的研究和开发,将会带来可观的经济效益和社会效益。文中以白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)为生产菌株,在50 L自控式发酵罐中对 $\epsilon$ -聚赖氨酸的发酵条件进行了优化。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

白色链霉菌(*Streptomyces albulus* sp.),由江西省科学院生物技术有限责任公司提供。

### 1.2 培养基

(1) 平板和斜面培养基(%): 贝特纳培养基; 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.2, 酵母抽提物 0.1, Agar 1.5。用 2 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.5, 120℃, 灭菌 20 min。

(2) 种子和发酵培养基(%): 葡萄糖 5.0, 酵母抽提物 0.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.136,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.08,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.004,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.003, 用质量浓度为 24%~28%的  $\text{NH}_4\text{OH}$  调 pH 至 6.8, 120℃, 灭菌 20 min。葡萄糖与酵母膏、硫酸铵分开灭菌。

(3) 补料培养基(%): 葡萄糖 80,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  8.0, 二者分别于 120℃, 灭菌 20 min 后, 无菌条件下

混合备用。

### 1.3 培养方法

#### 1.3.1 种子液培养

一级种子液培养: 取 1 环斜面孢子种接于装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 30℃, 220 r/min 条件下摇床培养 2 d。

二级种子液培养: 将培养 2 d 后的一级种液按 5% 的接种量接入装有 25 L 培养基的 50 L 发酵罐中, 初始 pH 为 6.8, 于 30℃, 200 r/min, 通气量 1 000 L/h, 培养 1 d。

#### 1.3.2 发酵培养

批发酵: 取培养 1 d 后的二级种子液 1.25 L 接入装有 25 L 培养基的 50 L 发酵罐中, 初始 pH 为 6.8, 30℃, 250 r/min, 通气量 1200 L/h, 培养 3~5 d。

补料分批发酵: 当发酵过程中葡萄糖浓度很低时, 发酵液的 pH 值会迅速上升。因此在补料分批发酵过程中, 将无菌的葡萄糖和硫酸铵混合液接至酸泵上, 氨水接至碱泵上的方式来自动控制发酵液的 pH。在发酵的前期, 搅拌转速为 200 r/min, 让 pH 自然下降, 发酵后期搅拌转速为 300 r/min, 通气量 1200 L/h, 将 pH 控制在 4.0 左右, 培养 8~10 d。

### 1.4 分析方法

生物量测定: 干重法<sup>[3]</sup>。

残糖测定: 高效液相内标法<sup>[4]</sup>。

$\epsilon$ -聚赖氨酸测定: 参照 Itzhaki 方法<sup>[5]</sup>。

## 2 结果和讨论

### 2.1 50 L 罐中 $\epsilon$ -聚赖氨酸分批发酵动力学曲线

在不控制 pH 的条件下, 白色链霉菌发酵生产  $\epsilon$ -

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期: 2007-04-10, 改回日期 2007-06-18

PL的发酵动力学曲线如图1所示。从图1中可以看出,在发酵的前24 h,随着葡萄糖的迅速消耗和菌体的快速生长,发酵液的pH从最初的6.8降至4.0以下,葡萄糖从50.0 g/L降至30.0 g/L左右,菌体干重达到6.27 g/L,发酵48 h左右, $\epsilon$ -PL产量达到最高0.78 g/L,发酵液中的生物量达到最大为10.3 g/L。由于菌丝体浓度的迅速增加,导致发酵液粘度也随之增大,溶氧急速降低后并一直维持在较低水平,而且随着培养液中的葡萄糖的消耗,营养物质不足,在发酵60 h后菌体趋于自溶,引起培养基中氨基氮等的增加,致使发酵液pH迅速上升。因此,延长发酵时间, $\epsilon$ -PL产量也不会再增加。

## 2.2 pH对 $\epsilon$ -聚赖氨酸分批发酵生产的影响

在白色链霉菌发酵生产 $\epsilon$ -PL的过程中,pH对产率起着决定性的作用<sup>[6]</sup>。因此,在发酵过程中将发酵液的pH分别控制在3.0、4.0和5.0,结果如图2和表1所示。

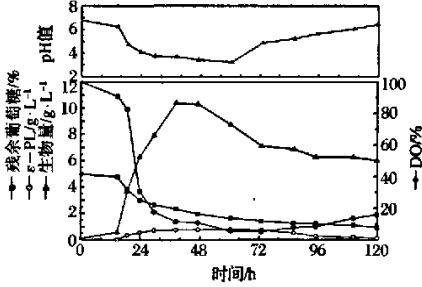


图1 50 L发酵罐中 $\epsilon$ -PL分批发酵动力学曲线

表1 不同pH条件下 $\epsilon$ -PL发酵的动力学参数

pH	$\Delta X$ /g · L <sup>-1</sup>	$\Delta P$ /g · L <sup>-1</sup>	$\Delta S$ /g · L <sup>-1</sup>	$Y_{X/S}$ /g · g <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ /g · g <sup>-1</sup>
3.0	3.63	0.84	27.8	0.131	0.030
4.0	5.79	3.05	49.5	0.117	0.062
5.0	4.05	0.38	15.3	0.265	0.025

注: $\Delta X$ —菌体生成量; $\Delta P$ —产物生成量; $\Delta S$ —底物消耗量;  
 $Y_{X/S}$ —菌体得率; $Y_{P/S}$ —产物得率。

结果表明, $\epsilon$ -PL合成的最佳pH为4.0,发酵中后期,产物积累明显,发酵结束时, $\epsilon$ -PL含量达到3.05 g/L,产物得率较其它二者最高,达到0.062 g/L,与不控制pH(最高产量为0.89 g/L,图1)相比,产量提高了近2.5倍;当pH维持在3.0时,菌体生长受到阻抑,进而引起菌体自溶,葡萄糖消耗较慢,最高 $\epsilon$ -PL产量仅为0.84 g/L左右;当pH为5.0时,葡萄糖消耗率增快,并与菌体生长速率成正比,菌体浓度迅速上升,最高菌体浓度达到了14.41 g/L,菌体得率最高,为0.265 g/L,但 $\epsilon$ -PL产量很低,表明

pH高于5.0时有利于菌体生长,而不利产物的积累,Kito M等<sup>[7]</sup>(2002)在 $\epsilon$ -PL生产菌*S. albulus*的细胞膜上发现并纯化得到一种 $\epsilon$ -PL降解酶,并证明该酶的最适pH为5.0,因此,当pH高于5.0时,该酶对 $\epsilon$ -PL有降解作用,能解除 $\epsilon$ -PL对菌体生长的抑制作用,有利于菌体生长,但 $\epsilon$ -PL降解为L-Lys,发酵后期,维持pH在4.0以下时, $\epsilon$ -PL降解酶活性受到抑制,有利于 $\epsilon$ -PL的积累。

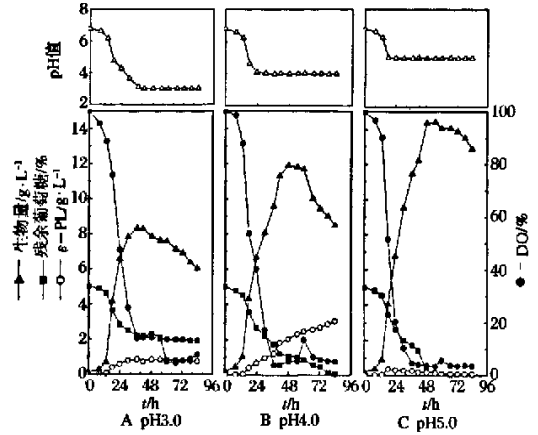


图2 pH对 $\epsilon$ -PL发酵生产的影响(30℃,

搅拌转速250 r/min)

## 2.3 搅拌转速对 $\epsilon$ -聚赖氨酸分批发酵生产的影响

分别在搅拌转速为200、300、400 r/min三个水平考察了其其对 $\epsilon$ -PL发酵的影响,结果如图3和表2所示。

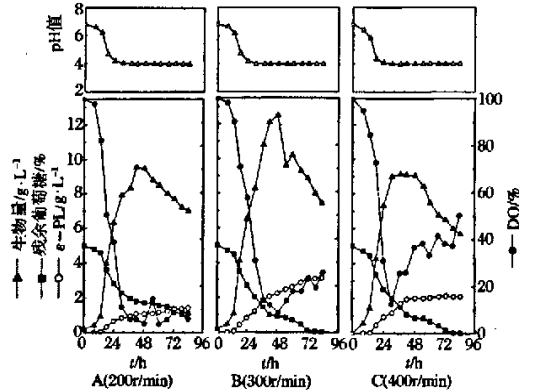


图3 搅拌转速对 $\epsilon$ -PL发酵生产的影响(30℃,pH 4.0)

表2 不同搅拌转速下发酵的动力学参数

转速 /r · min <sup>-1</sup>	$\Delta X$ /g · L <sup>-1</sup>	$\Delta P$ /g · L <sup>-1</sup>	$\Delta S$ /g · L <sup>-1</sup>	$Y_{X/S}$ /g · g <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ /g · g <sup>-1</sup>
200	7.03	1.43	38.9	0.181	0.037
300	7.44	3.15	49.4	0.151	0.064
400	6.53	2.17	47.9	0.136	0.045

在发酵前期,菌体量的增长速度在三种搅拌转速下基本相似,而在发酵后期,菌体量似乎并不完全随溶氧水平提高而增大,当搅拌转速从 200 r/min 增加至 300 r/min 时,菌体生长程度也随之提高,菌体量从 7.03 g/L 增加到 7.44 g/L, $\epsilon$ -PL 得率也从 0.037/g 提高到 0.064/g,但当搅拌转速从 300 r/min 提高到 400 r/min 时,由于剪切力对菌丝体产生损伤,菌体得率和  $\epsilon$ -PL 得率较低(见表 2)。搅拌转速为 400 r/min 时,镜检发现发酵液中有较多的短碎菌丝片段,这也证实了剪切力对菌体生长的影响。此外,在发酵前期,200 r/min 时的溶氧水平完全能满足菌体对数生长期对氧的需求,而发酵后期为了提高溶氧水平,但又不损伤菌丝,应将搅拌转速提高至 300 r/min。因此,在以后的试验中,为了节约成本,控制发酵前期搅拌转速在 200 r/min,发酵后期 300 r/min,并适当提高通气量为 1 200 L/h。

#### 2.4 pH 反馈控制变速补料培养对 $\epsilon$ -聚赖氨酸发酵生产的影响<sup>[4]</sup>

从图 2-B 和图 3 还可以看出,pH4.0 时,稳定期以后,葡萄糖浓度较低,菌体生长缓慢并进入死亡期, $\epsilon$ -PL 合成速率也随之减慢,主要原因是葡萄糖浓度太低,不足以维持细胞生长的需要,导致细胞衰老死亡, $\epsilon$ -PL 的合成也减缓。因此,采用流加葡萄糖和硫酸铵混合液的方式,使营养物质维持在一定的水平,并且保持发酵体系中的 C/N 稳定,有效地控制发酵体系中的 pH 处于一个相对稳定的状态,可以使菌体保持正常的生长水平,从而促进  $\epsilon$ -PL 的合成,提高  $\epsilon$ -PL 产量。

试验中发现,当葡萄糖浓度很低时,由于营养物质的耗尽,菌体内蛋白酶的积累和活跃,菌体趋于自溶,引起培养液中氨基氮的增加,致使 pH 上升。因此,在发酵过程中,通过自动流加葡萄糖和硫酸铵混合液来控制发酵后期的 pH,结果如图 4 和表 3 所示。通过自动流加营养物质,不仅能有效控制发酵体系的 pH 和维持培养基中的 C/N 比值,而且  $\epsilon$ -PL 从发酵起始到结束都处于积累的状态,至发酵结束时, $\epsilon$ -PL 产量达到了 7.36 g/L,相对葡萄糖消耗的产率为 0.072 g/L,产量比没有补料时提高了近 1.5 倍,产率也有所提高。此外,菌体浓度在发酵中后期也维持在适当的水平,这可能是  $\epsilon$ -PL 在发酵后期还能不断上升的一个原因。

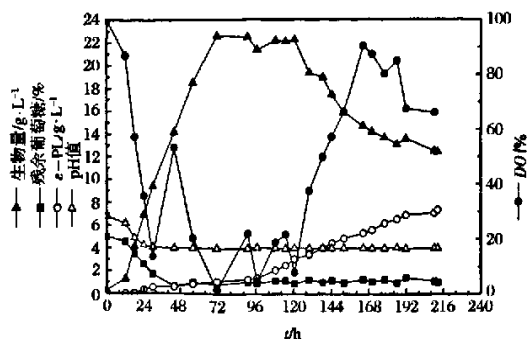


图 4 pH 反馈控制变速补料培养时  $\epsilon$ -PL 发酵曲线

表 3 pH 反馈控制变速补料培养时  $\epsilon$ -PL 发酵动力学参数

$\Delta X$ /g · L <sup>-1</sup>	$\Delta P$ /g · L <sup>-1</sup>	$\Delta S$ /g · L <sup>-1</sup>	$Y_{X/S}$ /g · g <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ /g · g <sup>-1</sup>
12.4	7.36	101.7	0.122	0.072

### 3 结 论

(1) pH 和搅拌转速对菌体的生长和  $\epsilon$ -PL 的合成具有重要的影响,发酵前期控制 pH5.0 以上,搅拌转速 200 r/min 有利于菌体生长,发酵后期控制 pH4.0,搅拌转速 300 r/min,并且通过 pH 反馈控制流加补料培养,可获得  $\epsilon$ -PL 产量 7.36 g/L,产物得率 0.072/g,菌体量 12.4 g/L。

(2) 除了 pH 对菌体生长有很大影响外,搅拌转速对菌体物生长和菌丝形态以及菌丝团的形态都有非常明显的影响,发酵后期适当提高搅拌转速可提高溶氧水平,并可获得较佳的菌丝团形态,有利于  $\epsilon$ -PL 合成。

### 参 考 文 献

- 贾士儒. 生物防腐剂—— $\epsilon$ -聚赖氨酸的研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2005, 34(3): 22~25
- Shih I L, Shen M H, Van Y T. Microbial synthesis of poly( $\epsilon$ -lysine) and its various applications [J]. Bioresource Technology, 2006, (97): 1 148~1 159
- 陈坚, 堵国成. 发酵工程实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 142~142
- 参考江西武藏野生物化工有限公司技术部资料
- Itzhaki R F. Colorimetric method for estimating poly-lysine and poly-arginine [J]. Anal Biochem, 1972, 50: 569~574
- Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement of epsilon-polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control [J]. J Biosci Bioeng, 2001, 91(2): 190~194
- Kito M, Takimoto R, Yoshida T, et al. Purification and characterization of an epsilon-poly-L-lysine-degrading en-

zyme from an epsilon-poly-L-lysine-producing strain of *Streptomyces albulus* [J]. Arch Microbial, 2002, 178(5): 325~330

8 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1995. 268~281

## Optimization of the $\epsilon$ -Poly-L-lysine Fermentation Conditions in 50 L Fermentor

Huang Guochang<sup>1</sup>, Xiong Ni<sup>2</sup>, Yin Peimin<sup>2</sup>, Huang Xiaoping<sup>2</sup>

1(College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

2(Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330029, China)

**ABSTRACT** In order to optimize the  $\epsilon$ -poly-L-lysine( $\epsilon$ -PL) fermentation conditions in a 50 L fermentor, the effects of pH and stirrer speed on the batch fermentation and fed-batch fermentation of  $\epsilon$ -PL production were studied. The results showed that the growth of cells was promoted when pH remained at 5.0, the synthesis of  $\epsilon$ -PL was inhibited, the accumulated  $\epsilon$ -PL was depolymerized, and high  $\epsilon$ -PL accumulation was achieved at pH 4.0. Under the optimal condition, controlling pH 4.0 by glucose auto-feeding and stirrer speed 350 r/min at later stage, the production of  $\epsilon$ -PL was 7.36g/L, the yield to glucose was 0.072g/g. This control and feeding strategy enhanced the production of  $\epsilon$ -PL 11 times.

**Key words**  $\epsilon$ -poly-L-lysine( $\epsilon$ -PL), *Streptomyces albulus*, fermentation, fed batch, pH control

### 政策法规标准

#### 世界各国香料香精立法和管理概况

国际上将食用香料分成天然的、天然等同的(Natural-identical)和人造香料(artificial)三类。天然香料是指完全用物理方法从动植物原料(不论这类原料处于天然状态还是经过了供人类食用的加工过和处理)中获得的具有香气和/或风味的化合物。一般来说人们将用生物工艺手段(如发酵)从天然原料(如粮食)制得的香料以及由天然原料(如糖类和氨基酸类等)经过了供人类食用的加工过程,(如烹调)所得反应产物也划入天然香料范畴。天然等同的食用香料是指从芳香原料中用化学方法离析出来的或是用化学合成法制取的香味物质,它们在化学上与供人类食用的天然产品中存在的物质相同,所谓人造食用香料是指那些尚未从供人类食用的天然产物中发现的香味物质(即其化学结构是人造的)。食用香料分类是立法的基础,必须充分理解。

食用香料品种繁多,大多天然存在于供人类消费的食品中。食品香料同系物众多。食用香料用量极低。早在1980年代初世界食品科技界就提出了消费比(Consumption Ratio,简称CR)的概念。CR是指天然等同的食用香料以天然存在于仪器中形成的消费量与同一物质作为食用香料添加物的消费量之间的比值。从现已发表的350种比较重要的天然等同香料的CR看,CR大多于1。例如2,二甲基吡嗪,它天然存在于咖啡和土豆中,由于人们食用这2种食品而消费的该化合物为7365kg/年,而作为食品添加剂而加入食品的量只有11kg/年,共CR为670。食用香料是一种自我限量的食品添加剂。由于食用香料的特殊性便引出了食用香料立法管理的特殊性。

日用香料的立法和管理比较简单。日用香料和食用香料确有一定安全问题。日用香精和食用香精的安全完全决定于原料,只要原料的安全把好关,香精的安全就有保证,因为这是一种物理混合过程。不必也不可能对无计数的香精进行安全试验或评价。对食用香料的安全考虑优先于日用香料。目前对食用香料的立法和管理主要依靠行业组织绝大多数国家政府并未插手这一工作。行业自律是对日用香料和食用香料管理的基础,只有当市场经济充分发育以后,企业真正承担安全责任时,管理才能到位。将政府的管理职能转移到行业协会是发展方向。

在我国目前的条件下,对食用香料的立法工作仍应重视,但不必事事从头做起,完全可以借鉴国外的经验,大胆引入允许使用名单,而不必从事重复的毒理学验证试验,但其先决条件是验证产品质量的合作,因为任何毒理资料都是建立在一定的产品质量基础之上的。当然对于国内外认为是新的食用香料品种,则必须严格按程序试验和审批。加强我国的标准化工作,多制订一些食用和日用香料的标准,让企业有所依据,也为检测工作创造条件。这样便可在企业(行业)自律上跨出一大步。

香料香精行业是个小行业,但已是一个全球化的行业。增强与国际组织(IOFI,IFRA,RIFM,EFFA,FEMA等)的沟通(甚至参加IOFI,IFRA,RIFM组织,但苦于没有足够的经济实力),及时了解国外立法和管理信息是搞好我国香料香精工业立法和管理的必要条件。尽管目前有这样那样的困难,但要努力创造条件去力。