

氧载体对小白链霉菌发酵生产 ϵ -聚赖氨酸的影响

薄芳芳^{1,2}, 许召贤^{1,2}, 孙朱贞^{1,2}, 曹长虹^{1,2}, 夏军^{1,2}, 徐虹^{1,2}, 冯小海^{1,2}

1 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 210009

2 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏 南京 210009

薄芳芳, 许召贤, 孙朱贞, 等. 氧载体对小白链霉菌发酵生产 ϵ -聚赖氨酸的影响. 生物工程学报, 2015, 31(3): 431–435.
Bo FF, Xu ZX, Sun ZZ, et al. Effect of oxygen-vectors on the production of ϵ -poly-L-lysine. Chin J Biotech, 2015, 31(3): 431–435.

摘 要: 为了有效改善发酵体系中的溶氧水平, 提高小白链霉菌 *Streptomyces albulus* PD-1 发酵生产 ϵ -聚赖氨酸的能力, 文中通过对氧载体的种类、最佳添加浓度以及添加时间进行筛选, 最终确定在 0 h 添加 0.5% (V/V) 的正十二烷促进 ϵ -聚赖氨酸生产效果最佳。在 5 L 发酵罐 0 h 添加 0.5% 的正十二烷进行批次补料发酵, ϵ -聚赖氨酸的产量和菌体干重分别可以达到 (30.8±0.46) g/L 和 (33.8±0.29) g/L, 较之对照组分别提高了 31.6% 和 20.7%。 ϵ -聚赖氨酸的产量和菌体干重的提高归因于 0.5% 正十二烷的添加促进发酵液中溶氧水平从 23.8% 提高到 32%, 同时发酵液中的一种主要副产物 (聚二氨基丙酸) 的含量下降 31%。实验结果表明, 正十二烷的添加可以提高 *S. albulus* PD-1 发酵液中的溶氧水平, 抑制副产物的生成, 促进 ϵ -聚赖氨酸的合成。

关键词: 正十二烷, 氧载体, ϵ -聚赖氨酸, 小白链霉菌 PD-1

Effect of oxygen-vectors on the production of ϵ -poly-L-lysine

Fangfang Bo^{1,2}, Zhaoxian Xu^{1,2}, Zhuzhen Sun^{1,2}, Changhong Cao^{1,2}, Jun Xia^{1,2}, Hong Xu^{1,2}, and Xiaohai Feng^{1,2}

1 State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing 210009, Jiangsu, China

2 College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, Jiangsu, China

Abstract: To enhance the production of ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) by improving dissolved oxygen level of the fermentation

Received: July 4, 2014; **Accepted:** October 14, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21176123), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB733603), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20113221130001), the Foundation of State Key Laboratory of Chemical Engineering Materials.

Corresponding author: Xiaohai Feng. Tel: +86-25-58139433; E-mail: fengxiaohai@njtech.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21176123), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2013CB733603), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20113221130001), 材料化学工程国家重点实验室基金资助。

网络出版时间: 2014-12-03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140354.html>

system, different oxygen-vectors were added to broth and n-dodecane was screened as the best oxygen-vector. The best amount of n-dodecane was 0.5% (V/V) and the best time was at start of the fermentation. In a fed-batch fermentation in a 5 L bioreactor, ϵ -PL concentration reached a maximum of (30.8 ± 0.46) g/L and the dry cell weight obtained was (33.8 ± 0.29) g/L, increasing by 31.6% and 20.7% compared with the control group, respectively. This improvement can be related to 0.5% n-dodecane could maintain dissolved oxygen concentration >32% of air concentration compared with 23.8% in ϵ -PL production phase, and the production of a main by-product, poly-L-diaminopropionic acid, fell by 31%. These results indicated that the dissolved oxygen level in the broth was improved by adding n-dodecane, which can inhibit the by-product production and improve the biosynthesis of ϵ -PL.

Keywords: n-dodecane, oxygen-vectors, ϵ -poly-L-lysine, *Streptomyces albulus* PD-1

ϵ -聚赖氨酸 (ϵ -poly-L-lysine, 简称 ϵ -PL) 是由人体必需氨基酸 L-赖氨酸的 ϵ -氨基与 α -羧基通过酰胺键连接而成的 L-赖氨酸同聚物^[1-2]。 ϵ -PL 有广谱的抑菌性, 是一种高效安全的食品防腐剂。此外, ϵ -PL 在化妆品、吸水树脂、药物缓释材料等方面也有广泛应用。 ϵ -PL 作为生物防腐剂已获得美国食品与药品管理局 (FDA) 批准, 并进入日本、欧洲和韩国等市场^[3-4]。中国卫计委 2014 年第 5 号文 (2014 年 4 月 29 日) 也将 ϵ -PL 批准用于食品添加剂。 ϵ -PL 主要通过微生物发酵方法得到, 本课题组在前期工作中筛选得到一株高产 ϵ -PL 的白色链霉菌菌株, 命名为 *Streptomyces albulus* PD-1, 并且在其发酵液中发现另一种聚氨基酸聚二氨基丙酸 (PDAP)^[5]。我们发现在 *S. albulus* PD-1 发酵过程中溶氧是影响 ϵ -PL 生产的关键因素之一。 ϵ -PL 合成时期发酵液粘稠, 溶氧水平较低, 菌体生长和 ϵ -PL 产量受到明显的影响。

传统提高发酵液中溶氧水平的方法有提高搅拌转速和增大通气量等, 但这会造成剪切应力过大、泡沫增多、不易控制等现象的发生。增大搅拌转速和提高通气量也会增加运行费用和设备成本^[6]。目前许多其他有效的方法被用来改善发酵中菌体对氧气需求的问题, 如将携带氧的基因血红蛋白基因克隆到目的菌株中^[7]; 向发酵液中加入分子氧底物^[8]; 菌株和藻类共培养^[9]。

利用氧载体提高发酵过程中的氧传递效率也是一种目前应用较广泛的方法。朱艳等^[10]在发酵液中添加氧载体提高了番茄红素的产量; 颜日明等^[11]添加正十二烷进行双液相发酵, 其发酵生物量和油脂产量分别提高了 25.3% 和 41.8%; 张丹等^[12]通过添加氧载体也提高了另外一种聚氨基酸 γ -聚谷氨酸的产量。为了探讨不同种类的氧载体对 *S. albulus* PD-1 生产 ϵ -PL 的影响, 本实验中选取了几种氧载体进行研究, 以期为实现 ϵ -PL 产业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

小白链霉菌 *Streptomyces albulus* PD-1, 本实验室筛选保藏。

1.1.2 培养基

培养基参照文献[13]。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶发酵

方法参照文献[5]。

1.2.2 发酵罐发酵

采用 5 L 搅拌式发酵罐 (KoBio Tech Co. Ltd., Korea)。初始装液量 2.7 L, 接种量 10%。采用两阶段 pH 控制工艺进行 ϵ -PL 批次补料发酵: 第一阶段即菌体生长阶段, 控制较高 pH 值

(约 6.0); 第二阶段即产物合成阶段, 控制较低 pH 值 (4.0)。当发酵液中葡萄糖含量低于 10 g/L 时, 通过流加补料的方式维持葡萄糖含量为 10 g/L。

1.2.3 ϵ -PL 与 PDAP 的含量检测

方法参照文献[5]。

1.2.4 菌体干重测定和发酵液中葡萄糖含量测定

方法参照文献[13]。

2 结果与讨论

2.1 溶氧水平对发酵体系的影响

在 5 L 发酵罐中进行批次不补料发酵, 维持其他条件不变, 通过改变通气量来调节发酵液中的溶氧水平, 对 *S. albulus* PD-1 发酵生产 ϵ -PL 进行研究。结果表明 ϵ -PL 的产量随着溶氧水平的提高而增加, 在 30% 的溶氧水平下达到最高产量 4.3 g/L。同时, *S. albulus* PD-1 发酵液中一种主要副产物 PDAP 的产量在较高溶氧水平时减少。

2.2 氧载体的筛选

在发酵初始阶段添加各种不同浓度的氧载体, 研究其对细胞生长和产物合成的影响。以不添加氧载体为对照, 在装液量 100 mL/1 000 mL 的三角瓶中培养 72 h, 取样测定发酵参数, 结果见表 1。

表 1 不同氧载体最适添加量对 ϵ -PL 生产的影响
Table 1 Production of ϵ -PL with optimum levels of oxygen-vectors in the medium

| Sample | Addition volume (%) | ϵ -PL (g/L) | PDAP (g/L) | DCW (g/L) |
|--------------|---------------------|----------------------|------------|-----------|
| n-Hexane | 0.5 | 0.743 | 0.032 | 5.82 |
| n-Heptane | 1.5 | 0.764 | 0.035 | 6.53 |
| n-Dodecane | 0.5 | 0.893 | 0.017 | 6.03 |
| n-Hexadecane | 0.2 | 0.719 | 0.043 | 6.45 |
| Acetic ether | 1.0 | 0.800 | 0.028 | 6.40 |
| Oleic acid | 0.2 | 0.742 | 0.029 | 6.17 |
| Control | 0.0 | 0.613 | 0.047 | 5.50 |

由表 1 可知, 不同种类的氧载体对 ϵ -PL 的产量和 *S. alubulus* PD-1 菌体干重均有显著影响, 其中添加正十二烷效果最为显著。在摇瓶发酵中添加 0.5% (V/V) 正十二烷, ϵ -PL 产量可以提高 45%。并且 *S. alubulus* PD-1 在以正十二烷作为唯一碳源的培养基中不生长, 说明菌体并不能利用正十二烷。最终从对 ϵ -PL 的促进效果以及经济性考虑, 本实验选取正十二烷为最适氧载体, 0.5% (V/V) 为最适添加比例。

2.3 正十二烷添加时间对 ϵ -PL 生产的影响

在摇瓶发酵的 0、12、24、36、48 h 时分别添加 0.5% (V/V) 的正十二烷, 根据测定 ϵ -PL 的产量, 确定氧载体的最佳添加时间。由实验数据可知, 在 0 h 添加氧载体, ϵ -PL 产量提高最多, 同时副产物 PDAP 可以较大程度被抑制。

2.4 5 L 发酵罐中添加氧载体对 ϵ -PL 生产的影响

我们在 5 L 发酵罐中添加 0.5% (V/V) 的正十二烷进行批次补料发酵, 并对 ϵ -PL 和 PDAP 产量、菌体干重和溶氧水平等参数进行考察。由图 1 可知, 添加 0.5% (V/V) 的正十二烷以后, 在 ϵ -PL 合成阶段发酵液中的溶氧水平从 23.8% 提高到 32%, 说明添加正十二烷对发酵液中溶氧不足的现象有很大的缓解作用。添加正十二烷后 ϵ -PL 产量达到 30.8 g/L, 和对照相比提高了 31.6%; 菌体干重最终达到 33.8 g/L, 和对照相比提高了 20.7%, 说明适量氧载体的添加对菌体干重和 ϵ -PL 的合成有很大的提高作用。Yamanaka 等^[14-15]在对聚赖氨酸合成酶 (PLs) 的转录表达与动力学研究中指出胞内 ATP 水平是 ϵ -PL 合成代谢的关键调控因素。发酵液中溶氧水平的提高, 会促进细胞呼吸作用的增强, 导致胞内 ATP 水平的提高, ATP 水平的提高, 不仅为细胞生产提供了能量, 而且有利于聚赖氨酸合成酶催化 L-赖氨酸合成 ϵ -PL。同时添加 0.5% (V/V) 正十二烷后, *S. albulus* PD-1 发酵液

中一种副产物 PDAP 合成受到抑制, PDAP 的产量从 4.32 g/L 降低到 2.98 g/L, 与对照相比降低 31%。副产物产量降低, 底物转化率提高, 也是添加正十二烷促进 ϵ -PL 产量提高的另外一种原因。

2.5 发酵动力学分析

细胞比生长速率和产物比合成速率是表征发酵过程的重要参数。根据比生长速率的定义, $\mu = dC_x / (C_x dt)$, 我们应用 Origin 8.0 软件, 通过曲线拟合的方法来近似计算 *S. albulus* PD-1 培养过程中的比生长速率和 ϵ -PL 比合成速率。

分析结果表明, 两种情况下细胞比生长速率和 ϵ -PL 比合成速率的变化趋势相同 (图 2), 但是添加正十二烷后, 在一定时间范围内, *S. albulus* PD-1 菌体比生长速率及 ϵ -PL 比合成速率均较对

照组大。两组菌体均在 16 h 到达最大细胞比生长速率 (图 2A), 对照组为 0.015 h^{-1} , 添加十二烷后, 达到 0.18 h^{-1} , 在 90 h 后两种情况下均趋于平衡, 此时菌体生长基本出现停滞。从 ϵ -PL 比合成速率 (图 2B) 可以看出, 对照组菌体在 100 h 达到最大 ϵ -PL 比合成速率 0.013 h^{-1} ; 添加正十二烷后, 菌体在 110 h 达到最大 ϵ -PL 比合成速率 0.018 h^{-1} , 并且在 80 h 后 ϵ -PL 比合成速率就已经大于对照组。同时, 从图中可以看出在培养过程时微生物次级代谢产物 (ϵ -PL) 的合成要落后于细胞的生长, 在细胞生长的减慢期或静止期才有次级代谢产物的大量积累。正十二烷的加入可以促进前期菌体的生长, 对后期 ϵ -PL 的合成也有很明显的提高作用。

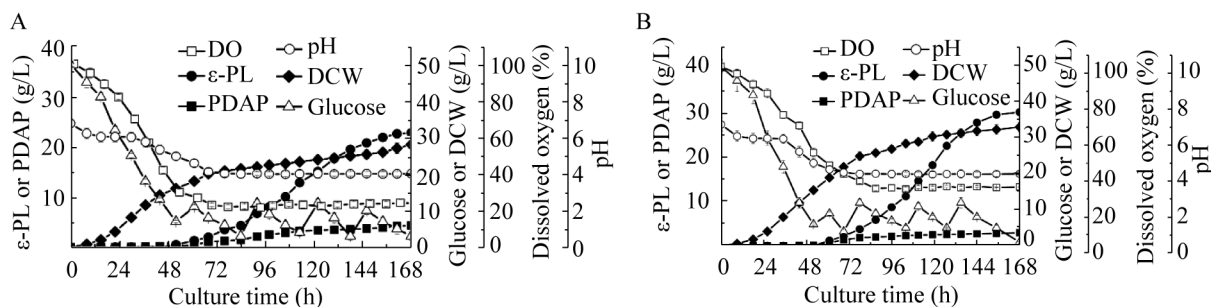


图 1 5 L 发酵罐中添加正十二烷对发酵的影响

Fig. 1 Effects of addition of n-dodecane on fermentation in a 5 L bioreactor. (A) Control. (B) With 0.5 % (V/V) n-dodecane in broth.

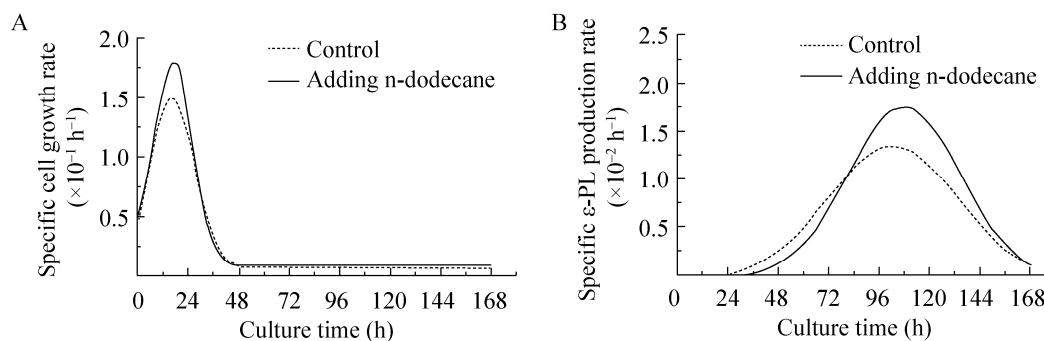


图 2 5 L 发酵罐中添加正十二烷对发酵动力学参数的影响

Fig. 2 Effects of addition of 0.5% (V/V) n-dodecane on process parameters in a 5 L bioreactor. (A) Specific cell growth rate. (B) Specific ϵ -PL production rate.

3 结论

本文将 6 种氧载体添加到 *S. albulus* PD-1 的发酵培养基中, 均对 ϵ -PL 的产量起到促进作用, 其中正十二烷的效果最好。在 5 L 发酵罐中进行批次补料发酵时, 在发酵初始时期加入 0.5% (V/V) 的正十二烷, ϵ -PL 合成时期发酵液中溶氧水平从 23.8% 提高到 32%, *S. albulus* PD-1 的 ϵ -PL 产量和生物量分别达到 30.8 g/L 和 33.8 g/L, 和对照相比分别提高了 31.6% 和 20.7%, 同时适宜的溶氧水平可以抑制主要副产物 PDAP 的生成。氧载体的加入对发酵液中的溶氧水平有很大的提高作用, 对高耗氧发酵体系的构建具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Shima S. Polylysine produced by *Streptomyces*. Agric Biol Chem, 1977, 41(9): 1807–1809.
- [2] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part III. Chemical studies. Agric Biol Chem, 1981, 45(11): 2503–2508.
- [3] Yoshida T, Nagasawa T. ϵ -Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(1): 21–26.
- [4] Shih IL, Shen MH, Van YT. Microbial synthesis of poly (ϵ -lysine) and its various applications. Bioresour Technol, 2006, 97(9): 1148–1159.
- [5] Xia J, Xu H, Feng X, et al. Poly (l-diaminopropionic acid), a novel non-proteinic amino acid oligomer co-produced with poly (ϵ -l-lysine) by *Streptomyces albulus* PD-1. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(17): 7597–7605.
- [6] Kahar P, Kobayashi K, Iwata T, et al. Production of ϵ -polylysine in an airlift bioreactor (ABR). J Biosci Bioeng, 2002, 93(3): 274–280.
- [7] Wen Y, Song Y. Effects of the expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Cinnamon streptomyces* on cell growth and the antibiotics production. Chin J Biotech, 2001, 17(1): 24–28 (in Chinese).
- [8] Li SL, Jiao P, Cao ZA. Effects of H_2O_2 addition on oxygen supply and metabolism of microorganisms. Acta Microbiol Sin, 2002, 42(1): 129–132 (in Chinese).
- [9] Adlercreutz P, Holst O, Mattiasson B. Oxygen supply to immobilized cells: 2. Studies on a coimmobilized algae-bacteria preparation with *in situ* oxygen generation. Enzyme Microb Technol, 1982, 4(6): 395–400.
- [10] Zhu Y, Yuan QP, Wang H. Enhancement of lycopene production by *Blakeslea trispora* using oxygen-vectors and surface active agents. Microbiol China, 2006, 33(1): 90–93 (in Chinese).
- [11] Yan RM, Ai ZZ, Wang Y, et al. Improving production of microbial lipids in a two-liquid phase fermentation system. Chin J Biotech, 2013, 29(4): 536–539 (in Chinese).
- [12] Zhang D, Feng XH, Li S, et al. Effects of oxygen vectors on the synthesis and molecular weight of poly (γ -glutamic acid) and the metabolic characterization of *Bacillus subtilis* NX-2. Process Biochem, 2012, 47(12): 2103–2109.
- [13] Zhang Y, Feng X, Xu H, et al. ϵ -Poly-L-lysine production by immobilized cells of *Kitasatospora* sp. MY 5-36 in repeated fed-batch cultures. Bioresour Technol, 2010, 101(14): 5523–5527.
- [14] Yamanaka K, Kito N, Imokawa Y, et al. Mechanism of ϵ -poly-l-lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an ϵ -poly-l-lysine-degrading enzyme. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(17): 5669–5675.
- [15] Yamanaka K, Maruyama C, Takagi H, et al. Epsilon-poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase. Nat Chem Biol, 2008, 4(12): 766–772.

(本文责编 郝丽芳)