



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109266709 A

(43)申请公布日 2019.01.25

(21)申请号 201710580398.4

(22)申请日 2017.07.17

(71)申请人 四川安益生物科技有限公司

地址 643000 四川省自贡市沿滩区高新工  
业园区龙乡大道9号

(72)发明人 姜均

(74)专利代理机构 北京立成智业专利代理事务  
所(普通合伙) 11310

代理人 黄剑冰

(51) Int. Cl.

C12P 21/00(2006.01)

C07K 14/315(2006.01)

C07K 1/34(2006.01)

C07K 1/30(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

乳酸链球菌素生产工艺

(57)摘要

本发明提供一种乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:具体包括一下步骤:(1)、制备乳酸乳球菌菌种;(2)、发酵;乳酸乳球菌菌种置于发酵罐内,加入葡萄糖进行发酵,得到发酵液;发酵过程中控制葡萄糖浓度;(3)、提取;A:发酵液预处理,得到滤液;B:滤液浓缩,得到浓缩滤液;C:浓缩滤液盐析,过滤得到滤渣;D:滤渣洗脱得到洗脱液;(4)洗脱液喷雾干燥,得粉状乳酸链球菌素产品。该生产工艺易操作,且得到的乳酸链球菌素产品质量好。

1. 乳酸链球菌素生产工艺,经菌种制备、发酵、提取过程,其特征在于:具体包括一下步骤:

(1)、制备乳酸乳球菌菌种;

(2)、发酵;发酵罐内加入葡萄糖进行发酵,得到发酵液;发酵过程中葡萄糖浓度控制在3~8g/L之间,PH在6.0~6.8之间;

(3)、提取;

A:发酵液预处理-发酵液用盐酸调节pH至2.5~2.7,后升温至80℃~85℃,在该条件下维持20min,然后降低温度至50℃~60℃,过滤得到滤液,控制过滤时的温度在50~60℃;

B:浓缩-滤液浓缩至固形物30~35%,得到浓缩液;

C:盐析-浓缩液降温至30~35℃;缓慢加入片碱,调节浓缩液pH至3.2~3.4,静置2h-3h;静置后的浓缩液中加入占浓缩液质量分数5%的珍珠岩,过滤,得滤渣;

D:洗脱-纯化水溶解滤渣,调pH至2.5左右,搅拌1h,进行板框过滤,收集澄清的洗脱液,该步骤进行至少一次;

(4)喷雾干燥-将步骤D得到的洗脱液中加入氯化钠使滤液固形物含量在3%-4%,后放置喷雾干燥器内进行喷雾干燥,其中控制进风温度200~220℃,出风温度80~85℃,得粉状乳酸链球菌素产品。

2.如权利要求1中所述的乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:步骤(2)中,发酵初期葡萄糖浓度控制在10g/L。

3.如权利要求1中所述的乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:步骤A中,采用陶瓷膜对发酵液进行过滤。

4.如权利要求1中所述的乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:步骤D的洗脱过程进行3次,将多次洗脱得到的洗脱液合并。

5.如权利要求1中所述的乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:步骤C中,采用板框过滤,且过滤时用珍珠岩铺板。

6.如权利要求1中所述的乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:步骤B中,加入消泡剂。

7.如权利要求1中所述的乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:步骤(1)中,取甘油管菌种用平板划线分离单菌落,于30℃培养箱培养24h左右,挑取个大单菌落接于摇瓶培养16h得到乳酸乳球菌菌种,甘油管保藏,其控制甘油浓度15~30%,放入-20℃冰箱保藏。

8.如权利要求7中所述的乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:培养乳酸乳球菌菌种是采用的种子培养基(g/L):葡萄糖6、蛋白胨6、酵母粉12、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8、NaCl 5、MgSO<sub>4</sub> 0.6,调pH7.0~7.2,121℃下灭菌20min,装液量为200mL/500mL;摇瓶发酵培养基(g/L):葡萄糖36、玉米浆干粉2、酵母粉10、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5、NaCl 4、吐温-80 1,调pH7.5;115℃下灭菌10min。

9.如权利要求1中所述的乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:步骤(2)中,采用的种子培养基(g/L):葡萄糖6、蛋白胨6、酵母粉12、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8、NaCl 5、MgSO<sub>4</sub> 0.6,调pH7.0~7.2,121℃下灭菌20min。

10.如权利要求1中所述的乳酸链球菌素生产工艺,其特征在于:步骤(2)中,发酵过程中采用的发酵培养基(g/L):葡萄糖36、玉米浆干粉2、酵母粉10、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5、NaCl 4、吐温-80 1,调pH7.5。

## 乳酸链球菌素生产工艺

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种微生物的生产工艺,特别涉及一种乳酸链球菌素的生产工艺。

### 背景技术

[0002] 乳酸链球菌素(Nisin)亦称乳酸链球菌肽或音译为尼辛,是乳酸链球菌产生的一种多肽物质,由34个氨基酸残基组成,分子量约为3500Da。由于乳酸链球菌素可抑制大多数革兰氏阳性细菌,并对芽孢杆菌的孢子有强烈的抑制作用,因此被作为食品防腐剂广泛应用于食品行业。食用后在人体的生理pH条件和 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶作用下很快水解成氨基酸,不会改变人体肠道内正常菌群以及产生如其它抗菌素所出现的抗性问题,更不会与其它抗菌素出现交叉抗性,是一种高效、无毒、安全、无副作用的天然食品防腐剂。

[0003] 目前,乳酸链球菌素的制备方法有多种,但技术人员致力于寻找一种易操作且产品质量好的制备方法。

### 发明内容

[0004] 本发明提供一种乳酸链球菌素生产工艺,目的是解决现有技术问题,提供一种易操作且产品质量好的制备方法。

[0005] 本发明解决问题采用的技术方案是:

[0006] 乳酸链球菌素生产工艺,经菌种制备、发酵、提取过程,其特征在于:具体包括一下步骤;

[0007] (1)、制备乳酸乳球菌菌种;

[0008] (2)、发酵;发酵罐内加入葡萄糖进行发酵,得到发酵液;发酵过程中葡萄糖浓度控制在3~8g/L之间,PH在6.0~6.8之间;

[0009] (3)、提取;

[0010] A:发酵液预处理-发酵液用盐酸调节pH至2.5~2.7,后升温至80℃~85℃,在该条件下维持20min,然后降低温度至50℃~60℃,过滤得到滤液,控制过滤时的温度在50~60℃;

[0011] B:浓缩-滤液浓缩至固形物30~35%,得到浓缩液;

[0012] C:盐析-浓缩液降温至30~35℃;缓慢加入片碱,调节浓缩液pH至3.2~3.4,静置2h-3h;静置后的浓缩液中加入占浓缩液质量分数5%的珍珠岩,过滤,得滤渣;

[0013] D:洗脱-纯化水溶解滤渣,调pH至2.5左右,搅拌1h,进行板框过滤,收集澄清的洗脱液,该步骤进行至少一次;

[0014] (4)喷雾干燥-将步骤D得到的洗脱液中加入氯化钠使滤液固形物含量在3%-4%,后放置喷雾干燥器内进行喷雾干燥,其中控制进风温度200~220℃,出风温度80~85℃,得粉状乳酸链球菌素产品。

[0015] 在一些具体实施例中,步骤(2)中,发酵初期葡萄糖浓度控制在10g/L。

[0016] 在一些具体实施例中,步骤A中,采用陶瓷膜对发酵液进行过滤。

- [0017] 在一些具体实施例中,步骤D的洗脱过程进行3次,将多次洗脱得到的洗脱液合并。
- [0018] 在一些具体实施例中,步骤C中,采用板框过滤,且过滤时用珍珠岩铺板。
- [0019] 在一些具体实施例中,步骤B中,浓缩时可能产生较多泡沫,因此可适量加入消泡剂。
- [0020] 在一些具体实施例中,步骤(1)菌种制备过程中,取甘油管菌种用平板划线分离单菌落,于30℃培养箱培养24h左右,挑取个大单菌落接于摇瓶培养16h左右得到乳酸乳球菌种,甘油管保藏,其控制甘油浓度15~30%,放入-20℃冰箱保藏。
- [0021] 在一些具体实施例中,菌种制备过程中采用的种子培养基(g/L):葡萄糖6、蛋白胨6、酵母粉12、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8、NaCl 5、MgSO<sub>4</sub> 0.6,调pH7.0~7.2,121℃下灭菌20min,装液量为200mL/500mL;摇瓶发酵培养基(g/L):葡萄糖36、玉米浆干粉2、酵母粉10、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5、NaCl 4、吐温-80 1,调pH7.5;115℃下灭菌10min。
- [0022] 在一些具体实施例中,步骤(2)发酵过程中,使用的种子培养基(g/L):葡萄糖6、蛋白胨6、酵母粉12、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8、NaCl 5、MgSO<sub>4</sub> 0.6,调pH7.0~7.2左右,121℃下灭菌20min。
- [0023] 在一些具体实施例中,步骤(2)发酵过程中,发酵罐中菌种发酵使用的发酵培养基(g/L):葡萄糖36、玉米浆干粉2、酵母粉10、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5、NaCl 4、吐温-80 1,调pH7.5。
- [0024] 本发明的有益效果:整个生产过程易操作,生产过程易控制,得到的乳酸链球菌素产品质量好。

### 具体实施方式

- [0025] 以下结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。
- [0026] 实施例1
- [0027] 乳酸链球菌素生产工艺,具体包括一下步骤;
- [0028] (1)、制备乳酸乳球菌菌种;
- [0029] (2)、发酵;乳酸乳球菌菌种置于发酵罐内,加入葡萄糖进行发酵,得到发酵液;发酵过程中葡萄糖浓度控制在3g/L,PH在6.0之间,且发酵初期葡萄糖浓度控制在10g/L。
- [0030] 其中菌种培养过程中使用的种子培养基(g/L):葡萄糖6、蛋白胨6、酵母粉12、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8、NaCl 5、MgSO<sub>4</sub> 0.6,调pH7.0,121℃下灭菌20min。
- [0031] 菌种发酵过程中使用的发酵培养基(g/L):葡萄糖36、玉米浆干粉2、酵母粉10、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5、NaCl 4、吐温-80 1,调pH7.5。
- [0032] (3)、提取;
- [0033] A:发酵液预处理-发酵液用盐酸调节pH至2.5~2.7,后升温至80℃~85℃,在该条件下维持20min,然后降低温度至50℃,陶瓷膜过滤得到滤液,控制过滤时的温度在50℃。
- [0034] B:浓缩-滤液浓缩至固形物30%,得到浓缩液。浓缩时可能产生较多泡沫,因此可适量加入消泡剂。
- [0035] C:盐析-浓缩液降温至35℃;缓慢加入片碱,调节浓缩液pH至3.2~3.4,静置3h;静置后的浓缩液中加入占浓缩液质量分数5%的珍珠岩,用珍珠岩铺板,经板框过滤,得滤渣。
- [0036] D:洗脱-纯化水溶解滤渣,调pH至2.5左右,搅拌1h,进行板框过滤,收集澄清的洗脱液。对滤渣的洗脱过程进行3次,收集3次洗脱后得到的澄清洗脱液。
- [0037] (4)喷雾干燥-将步骤D得到的洗脱液中加入氯化钠使滤液固形物含量在3%~4%,

后放置喷雾干燥器内进行喷雾干燥,其中控制进风温度200~220℃,出风温度80~85℃,得粉状乳酸链球菌素产品。

[0038] 实施例2

[0039] 乳酸链球菌素生产工艺,具体包括一下步骤:

[0040] (1)、制备乳酸乳球菌菌种;

[0041] (2)、发酵;乳酸乳球菌菌种置于发酵罐内,加入葡萄糖进行发酵,得到发酵液;发酵过程中葡萄糖浓度控制在5g/L之间,PH在6.5;发酵初期葡萄糖浓度控制在10g/L。

[0042] 其中菌种培养过程中使用的种子培养基(g/L):葡萄糖6、蛋白胨6、酵母粉12、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8、NaCl 5、MgSO<sub>4</sub> 0.6,调pH7.2,121℃下灭菌20min。

[0043] 菌种发酵过程中使用的发酵培养基(g/L):葡萄糖36、玉米浆干粉2、酵母粉10、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5、NaCl 4、吐温-80 1,调pH7.5。

[0044] (3)、提取;

[0045] A:发酵液预处理-发酵液用盐酸调节pH至2.5~2.7,后升温至80℃~85℃,在该条件下维持20min,然后降低温度至55℃,陶瓷膜过滤得到滤液,控制过滤时的温度在55℃。

[0046] B:浓缩-滤液浓缩至固形物30%,得到浓缩液。浓缩时可能产生较多泡沫,因此可适量加入消泡剂。

[0047] C:盐析-浓缩液降温至30℃;缓慢加入片碱,调节浓缩液pH至3.2~3.4,静置2h-3h;静置后的浓缩液中加入占浓缩液质量分数5‰的珍珠岩,用珍珠岩铺板,经板框过滤,得滤渣。

[0048] D:洗脱-纯化水溶解滤渣,调pH至2.5左右,搅拌1h,进行板框过滤,收集澄清的洗脱液。对滤渣的洗脱过程进行3次,收集3次洗脱后得到的澄清的洗脱液。

[0049] (4)喷雾干燥-将步骤D得到的洗脱液中加入氯化钠使滤液固形物含量在3%-4%,后放置喷雾干燥器内进行喷雾干燥,其中控制进风温度200~220℃,出风温度80~85℃,得粉状乳酸链球菌素产品。

[0050] 实施例3

[0051] 乳酸链球菌素生产工艺,具体包括一下步骤:

[0052] (1)、制备乳酸乳球菌菌种;

[0053] (2)、发酵;乳酸乳球菌菌种置于发酵罐内,加入葡萄糖进行发酵,得到发酵液;发酵过程中葡萄糖浓度控制在8g/L,PH在6.8;发酵初期葡萄糖浓度控制在10g/L。

[0054] 其中菌种培养过程中使用的种子培养基(g/L):葡萄糖6、蛋白胨6、酵母粉12、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8、NaCl 5、MgSO<sub>4</sub> 0.6,调pH7.0~7.2左右,121℃下灭菌20min。

[0055] 菌种发酵过程中使用的发酵培养基(g/L):葡萄糖36、玉米浆干粉2、酵母粉10、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5、NaCl 4、吐温-80 1,调pH7.5。

[0056] (3)、提取;

[0057] A:发酵液预处理-发酵液用盐酸调节pH至2.5~2.7,后升温至80℃~85℃,在该条件下维持20min,然后降低温度至60℃,陶瓷膜过滤得到滤液,控制过滤时的温度在60℃。

[0058] B:浓缩-滤液浓缩至固形物33%,得到浓缩液。浓缩时可能产生较多泡沫,因此可适量加入消泡剂。

[0059] C:盐析-浓缩液降温至33℃;缓慢加入片碱,调节浓缩液pH至3.2~3.4,静置2h-

3h;静置后的浓缩液中加入占浓缩液质量分数5‰的珍珠岩,用珍珠岩铺板,经板框过滤,得滤渣。

[0060] D:洗脱-纯化水溶解滤渣,调pH至2.5左右,搅拌1h,进行板框过滤,收集澄清的洗脱液。对滤渣的洗脱过程进行3次,收集3次洗脱后得到的澄清的洗脱液。

[0061] (4)喷雾干燥-将步骤D得到的洗脱液中加入氯化钠使滤液固形物含量在3%-4%,后放置喷雾干燥器内进行喷雾干燥,其中控制进风温度200~220℃,出风温度80~85℃,得粉状乳酸链球菌素产品。