



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103911419 B

(45)授权公告日 2017.01.11

(21)申请号 201410105132.0

C12P 13/08(2006.01)

(22)申请日 2014.03.20

C12R 1/19(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103911419 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2014.07.09

CN 101235401 A,2008.08.06,

WO 2009093703 A1,2009.07.30,

(73)专利权人 广东肇庆星湖生物科技股份有限
公司

CN 100516230 C,2009.07.22,

冯树等.微生物混合培养及其应用.《微生物
学通报》.2001,(第3期),

地址 526040 广东省肇庆市端州区工农北
路67号

审查员 刘新蕾

(72)发明人 陈羽中 刘剑 谢畅丰 饶汗生

(74)专利代理机构 深圳市君盈知识产权事务所
(普通合伙) 44315

代理人 杨利娟

(51)Int.Cl.

C12P 39/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种双菌株联合发酵生产L-缬氨酸的方法

(57)摘要

本发明公开了一种双菌株联合发酵生产L-缬氨酸的方法,采用两种菌株,其中一种菌体活力高产酸能力强,一种副产杂酸少;分别将两种菌株进行种子扩大培养;将产酸能力强的菌株进行发酵培养;到活力下降后将副产杂酸少的菌株接入发酵液,并补加营养液后继续发酵;采用液相色谱法检测缬氨酸含量及氨基酸纯度。通过双菌株的联合发酵使发酵液纯度和产酸都有所提高。

1. 一种双菌株联合发酵生产L-缬氨酸的方法,采用两株缬氨酸生产菌联合发酵生产,其特征在于:

两株缬氨酸生产菌分别是黄色短杆菌和重组大肠杆菌;发酵生产缬氨酸的步骤如下:

(1)将黄色短杆菌接种于种子培养基上,进行种子扩大培养得种子液;

(2)将重组大肠杆菌接种于种子培养基上,进行种子扩大培养得种子液;

(3)将步骤(1)培养的种子液接入灭好菌的发酵培养基中发酵得发酵液,发酵至菌体活力下降,发酵过程补加糖液;

(4)将步骤(2)培养的种子液接入步骤(3)中的发酵液中,并补加营养液,继续发酵;

步骤(1)中培养条件是,培养温度为 $30 \pm 5^\circ\text{C}$,培养时间16-24小时,控制全过程的氧溶解饱和度大于20%;

步骤(2)中培养条件是,培养温度为 $37 \pm 5^\circ\text{C}$,培养时间12-18小时,控制全过程的氧溶解饱和度大于20%;

所述黄色短杆菌为渗漏缺陷型:XQ6Leu¹,Ile¹,AHV^r, α -AB^{hr},2-TA^{hr},所述重组大肠杆菌为L-亮氨酸和L-异亮氨酸营养缺陷型;

所述步骤(4)的营养液由下述方法配制而来:

酵母膏9g、磷酸85%2.4ml、氯化钾2g、L-异亮氨酸0.3g,定容100ml,121 $^\circ\text{C}$ 灭菌20分钟。

2. 根据权利要求1所述的双菌株联合发酵生产L-缬氨酸的方法,其特征在于,步骤(3)中装于发酵罐中的种子液接种量为8-15% m/v ,培养条件为,培养温度为 $30 \pm 2^\circ\text{C}$,培养时间60-90小时,控制前期的氧溶解饱和度大于20%,中后期的氧溶解饱和度控制在5-10%之间,流加葡萄糖,控制发酵液残糖在1-1.5% m/v 之间,流加糖液浓度为50-75% m/v 。

3. 根据权利要求2所述双菌株联合发酵生产L-缬氨酸的方法,其特征在于,步骤(4)装于发酵罐中的种子液接种量为25-35% m/v ,培养条件为,培养温度为 $37 \pm 2^\circ\text{C}$,培养时间16-24小时,氧溶解饱和度控制5-10%,流加葡萄糖控制发酵液残糖在1-1.5% m/v 之间,流加葡萄糖的糖液浓度为50-75% m/v 。

4. 根据权利要求1所述的双菌株联合发酵生产L-缬氨酸的方法,其特征在于,步骤(4)进行发酵后采用液相色谱法检测缬氨酸含量及氨基酸纯度。

一种双菌株联合发酵生产L-缬氨酸的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物制造L-缬氨酸技术,具体地说涉及一种双菌株联合发酵制备L-缬氨酸的方法。

背景技术

[0002] L-缬氨酸作为支链氨基酸,是人体必需氨基酸之一,具有多种生理功能,广泛应用于医药、食品及调味剂、动物饲料和化妆品的制造,尤其是在医学研究和治疗中的作用,日益受到重视。国外,L-缬氨酸是合成N-乙酰缬氨酸的医药中间体,高纯度的L-缬氨酸用途更广,附加值高。国内外大批量生产L-缬氨酸均采用微生物发酵法。目前,L-缬氨酸生产菌种较多。其中,某些短杆菌生产菌中的重要代谢路径改变较小,因此代谢活力强,产酸水平高,但是副生杂酸多,尤其是副生L-亮氨酸、L-异亮氨酸等,这对后提取高纯度L-缬氨酸造成很大的困难。另外某些生产菌通过定向诱变,使得生产菌在发酵过程不副生L-亮氨酸与L-异亮氨酸,并且在发酵过程中不断消耗培养基中的L-亮氨酸与L-异亮氨酸,使得发酵液纯度高,有利于高纯度L-缬氨酸的提取,但是产酸水平可能并不理想。因此,找到一种既能够提高发酵液中的纯度,又能达到高产酸的发酵方法对工业化生产高纯度L-缬氨酸有着重要意义。

[0003] CN200610013535.8黄色短杆菌突变株及用于发酵法生产L-缬氨酸的工艺公开黄色短杆菌突变株及用于发酵法生产L-缬氨酸的工艺。以黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)HL41(CICC10135)为出发菌种,选育具有遗传标记($Ile^{-}+Leu^{-}+SG^{+}+\alpha-AB^{+}+2-TA^{+}$)的突变株TV230,使其具有L-缬氨酸的生物合成能力。用黄色短杆菌突变株TV230经扩培、发酵培养、及L-缬氨酸的提取步骤可得到L-缬氨酸粗品,进一步精制可得到L-缬氨酸纯品。但收率低,纯度低。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种由双菌株联合发酵生产L-缬氨酸的方法,利用产酸能力强的黄色短杆菌和产酸纯度高的重组大肠杆菌联合发酵生产L-缬氨酸,该方法比单一菌种的产酸水平和发酵液纯度都有显著提高。

[0005] 本发明采用两株L-缬氨酸生产菌:黄色短杆菌和重组大肠杆菌。发酵步骤如下:

[0006] (1)将黄色短杆菌接种于种子培养基上,进行种子扩大培养得种子液;

[0007] (2)将重组大肠杆菌接种于种子培养基上,进行种子扩大培养得种子液;

[0008] (3)将步骤(1)培养的种子液接入灭好菌的发酵培养基中发酵得发酵液,发酵至菌体活力下降,发酵过程补加糖液;

[0009] (4)将步骤(2)培养的种子液接入步骤(3)中的发酵液中,并补加营养液,继续发酵。

[0010] 具体地说,本发明提供的一种由双菌株联合发酵生产L-缬氨酸的方法如下:

[0011] (1)采用的菌种为:

- [0012] 黄色短杆菌XQ6($Leu^1, Ile^1, AHV^r, \alpha-AB^{hr}, 2-TA^{hr}$)
- [0013] 重组大肠杆菌,该菌种为本领域技术人员常用的亮氨酸、异亮氨酸营养缺型的重组大肠杆菌。
- [0014] (2)配制种子培养基
- [0015] 黄色短杆菌种子培养基,葡萄糖20g、蛋白胨10g、玉米浆20g、硫酸铵5g、磷酸二氢钾0.5g、七水硫酸镁0.5g,定容1L,pH6.8,121℃20分钟。
- [0016] 重组大肠杆菌种子培养基,葡萄糖20g、玉米浆35g、硫酸铵5g、磷酸(85%)1.2ml、氯化钾1g、七水硫酸镁0.5g、L-亮氨酸70mg、L-异亮氨酸21mg,定容1L,pH6.8,121℃20分钟。
- [0017] (3)配制发酵培养基
- [0018] 葡萄糖60g/L、氨基酸粉10g/L、玉米浆20g/L、硫酸铵5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、七水硫酸镁0.5g/L、硫酸锰7mg/L、硫酸亚铁7mg/L。
- [0019] (4)配制营养液
- [0020] 酵母膏9g、磷酸(85%)2.4ml、氯化钾2g、L-异亮氨酸0.3g,定容100ml,121℃灭菌20分钟。
- [0021] (5)将两株生产菌分别接入各自的种子培养基中,培养12-24小时,培养温度分别是黄色短杆菌 $30 \pm 2^\circ\text{C}$,重组大肠杆菌 $37 \pm 2^\circ\text{C}$,在发酵过程中,注意控制氧溶解饱和度,以发酵0h未接种时液体发酵培养基的氧溶解饱和度设为100%,实消高温保压状态下的液体发酵培养基的氧溶解饱和度设为0%;通过调节风量和发酵罐搅拌转速来实现。
- [0022] (6)将发酵培养基装于发酵罐中121℃灭菌25分钟,用氨水调节pH至6.7,将步骤(5)中的黄色短杆菌的种子液按10-15%(m/v)接种量接入发酵培养基中,m/v表示质量体积比,下述相同。培养温度 $30 \pm 2^\circ\text{C}$,pH 6.7 ± 0.2 ,前期氧溶解饱和度控制大于20%,中后期控制在5-10%之间,并流加50-75%(m/v)的葡萄糖液,控制残糖在1.0-1.5%(m/v)之间,连续发酵60-90小时;
- [0023] (7)待步骤(6)中黄色短杆菌发酵至后期,菌体活力明显下降后,将步骤(5)中的重组大肠杆菌种子液按25-35%(m/v)的接种量接入步骤(6)的发酵液中,并补加步骤(4)所述的营养液,并继续发酵16-24小时。培养温度 $37 \pm 2^\circ\text{C}$,pH 6.8 ± 0.2 ,氧溶解饱和度控制在5-10%之间,并流加50-75%(m/v)的葡萄糖液,控制残糖在1.0-1.5%(m/v)之间。
- [0024] (8)采用液相色谱法检测发酵液中缬氨酸含量及氨基酸纯度。
- [0025] 本发明采用的两种菌株均具有积累L-缬氨酸的能力,其中黄色短杆菌为渗漏缺陷型,菌体活力高,发酵产酸能力强,但是发酵液纯度不理想,不利于高纯度L-缬氨酸产品的提取;而重组大肠杆菌为L-亮氨酸和L-异亮氨酸营养缺陷型,菌体活力和发酵产酸能力不及黄色短杆菌,但发酵液纯度高,特别是L-亮氨酸同L-异亮氨酸含量低,有利于高纯度L-缬氨酸产品的生产。由于不同菌种的代谢特征各异,混合培养既能提高发酵液纯度,并可以提高产酸量。本发明利用双菌株联合发酵生产L-缬氨酸,利用双菌株各自的优点,其中对高纯度产品L-缬氨酸生产有负面影响的亮氨酸和异亮氨酸大约可降至原来的六分之一和十分之一,使得L-缬氨酸的产率和纯度大大提高,为L-缬氨酸粗品的制造提供高品质的原料基础。

具体实施方式

[0026] 本发明的主旨是采用两株缬氨酸生产菌联合发酵生产L-缬氨酸,下面结合实施例对本发明的内容作进一步详述,实施例中所提及的内容并非对本发明的限定,制备过程中各个原材料的选择可因地制宜而对结果并无实质性影响。

[0027] 实施例1:(5L发酵罐)

[0028] 1、配制种子培养基

[0029] 黄色短杆菌种子培养基,葡萄糖20g、蛋白胨10g、玉米浆20g、硫酸铵5g、磷酸二氢钾0.5g、七水硫酸镁0.5g,定容1L,pH6.8,121℃20分钟。

[0030] 大肠杆菌种子培养基,葡萄糖20g、玉米浆35g、硫酸铵5g、磷酸(85%)1.2ml、氯化钾1g、七水硫酸镁0.5g、L-亮氨酸70mg、L-异亮氨酸21mg,定容1L,pH6.8,121℃20分钟。

[0031] 2、配制发酵培养基,葡萄糖60g/L、氨基酸粉10g/L、玉米浆20g/L、硫酸铵5g/L、磷酸二氢钾0.5g/L、七水硫酸镁0.5g/L、硫酸锰7mg/L、硫酸亚铁7mg/L。

[0032] 3、营养液的配制,酵母膏9g、磷酸(85%)2.4ml、氯化钾2g、L-异亮氨酸0.3g,定容100ml,121℃灭菌20分钟。

[0033] 4、发酵工艺

[0034] (1)将黄色短杆菌接于新鲜的种子培养基上,于30℃培养光密度26倍稀释 OD_{560} 至0.3。(OD₅₆₀表示种子液稀释26倍后,在560nm的波长下测量吸光度,值达到0.3或者0.5的时候,种子液培养终止,可以移入发酵罐,它是反映菌体浓度的一个指标);

[0035] (2)将重组大肠杆菌接于新鲜的种子培养基上,于37℃培养光密度26倍稀释 OD_{560} 至0.5;

[0036] (3)将发酵培养基2700ml装于5L发酵罐中,121℃灭菌25分钟,用氨水调节pH至6.7,将黄色短杆菌的种子液300ml接入发酵培养基中,培养温度30℃,pH6.7,初始风量2L/h,转速300rpm,并根据氧溶解饱和度控制转速,使氧溶解饱和度在5-10%之间,流加70%葡萄糖液控制残糖在1.0-1.5%之间,连续发酵72小时;

[0037] (4)将大肠杆菌的种子液,按总接种量20%加入步骤(3)的黄色短杆菌连续发酵72小时后的发酵液中,并补加营养液继续发酵,培养温度37℃,pH6.7,风量2L/h,并根据氧溶解饱和度控制转速使氧溶解饱和度在5-10%之间,继续发酵24小时,残糖控制在1.0-1.5%之间;

[0038] (5)采用液相色谱仪检测发酵液中缬氨酸含量及氨基酸纯度,其放罐样L-缬氨酸含量平均为8.3%,纯度为95.2%,其中L-亮氨酸纯度为0.23%,L-异亮氨酸纯度为0.03%。

[0039] 实施例2:(100L发酵罐)

[0040] 1、配制种子培养基

[0041] 黄色短杆菌种子培养基,葡萄糖60g、蛋白胨30g、玉米浆60g、硫酸铵15g、磷酸二氢钾1.5g、七水硫酸镁1.5g,定容3L,pH6.8,121℃20分钟;

[0042] 重组大肠杆菌种子培养基,葡萄糖60g、玉米浆105g、硫酸铵15g、磷酸(85%)3.6ml、氯化钾3g、七水硫酸镁1.5g、L-亮氨酸210mg、L-异亮氨酸63mg,定容3L,pH6.8,121℃20分钟。

[0043] 2、配制发酵培养基,葡萄糖60g/L、玉米浆20g/L、酵母膏3g/L、磷酸(85%)1.2ml/L、氯化钾1g/L、硫酸铵5g/L、七水硫酸镁0.5g/L、L-亮氨酸70mg/L、L-异亮氨酸21mg/L、硫酸锰7mg/L、硫酸亚铁7mg/L。

[0044] 3、营养液的配制,酵母膏180g、磷酸(85%)48ml、氯化钾40g、L-异亮氨酸3g,定容1L,121℃灭菌20分钟。

[0045] 4、发酵工艺

[0046] (1)将黄色短杆菌接于新鲜的种子培养基上,于30℃培养光密度26倍OD₅₆₀至0.3;

[0047] (2)将大肠杆菌接于新鲜的种子培养基上,于37℃培养光密度26倍OD₅₆₀至0.5;

[0048] (3)将发酵培养基54L装于100L发酵罐中,125℃灭菌20分钟,将黄色短杆菌的种子液3L接入发酵培养基中,培养温度30℃,pH6.7,初始风量800L/h,转速200rpm,并根据氧溶解饱和度控制转速,使氧溶解饱和度在5-10%之间,流加70%葡萄糖液控制残糖在1.0-1.5%之间,连续发酵72小时;

[0049] (4)将大肠杆菌的种子液,按总接种量20%加入步骤(3)的黄色短杆菌连续发酵72小时后的发酵液中,并补加营养液继续发酵,培养温度37℃,pH6.7,风量1600L/h,并根据氧溶解饱和度控制转速使氧溶解饱和度在5-10%之间,继续发酵24小时,残糖控制在1.0-1.5%之间;

[0050] (5)采用液相色谱仪检测发酵液中缬氨酸含量及氨基酸纯度,其放罐样L-缬氨酸含量平均为7.9%,纯度为94.8%,其中L-亮氨酸纯度为0.43%,L-异亮氨酸纯度为0.06%。

[0051] 比较例1:

[0052] (1)将黄色短杆菌接种于新鲜的种子培养基上,培养条件为温度30℃,pH6.7,培养光密度26倍OD₅₆₀至0.3;

[0053] (2)种子培养基配方同实施例1中黄色短杆菌种子培养基配方,发酵培养基配方同实施例1中的发酵培养基配方。

[0054] (3)将黄色短杆菌种子液以10%接种量加入到发酵培养基中,其余条件同实施例1。

[0055] (4)检测L-缬氨酸含量及纯度方法同实施例1。连续发酵72小时放罐产酸(L-缬氨酸含量)为7.2%,纯度约为91.21%,其中L-亮氨酸含量为1.89%,L-异亮氨酸含量为0.34%。

[0056] 比较例2:

[0057] (1)将大肠杆菌接种于新鲜的种子培养基上,培养条件为温度37℃,pH6.8,培养光密度26倍稀释OD₅₆₀至0.5;

[0058] (2)种子培养基配方同实施例2中大肠杆菌种子培养基配方发酵培养基配方同实施例2中的发酵培养基配方。

[0059] (3)将大肠杆菌种子液以10%接种量加入到发酵培养基中,其余发酵条件同实施例2;

[0060] (4)检测L-缬氨酸含量及纯度方法同实施例1。连续发酵50小时放罐产L-缬氨酸为2.9%,纯度约为95.21%,其中L-亮氨酸含量纯度为0.24%,L-异亮氨酸含量纯度为0.03%。

[0061] 通过实施例1、2和对比例1、2我们可以看出,单独使用黄色短杆菌发酵生产L-缬氨酸,其L-缬氨酸纯度低,特别是L-亮氨酸和L-异亮氨酸含量高,给高纯度缬氨酸提取造成困难;而单独用重组大肠杆菌发酵生产L-缬氨酸,其L-缬氨酸产率低。用黄色短杆菌和重组大肠杆菌的双菌株联合发酵生产L-缬氨酸,利用双菌株各自的优点,使得L-缬氨酸的产率和纯度大大提高,为高纯度L-缬氨酸的制造提供高品质的原料基础。同时主要对高纯度产品L-缬氨酸生产有负面影响的亮氨酸和异亮氨酸大约可降至原来的六分之一和十分之一。