

ϵ -聚赖氨酸发酵培养基的优化

刘翠翠, 耿伟, 宁永霞, 张世敏*

(河南农业大学 生命科学学院/农业部农业微生物酶工程国家重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了提高链霉菌菌株 C_1 的 ϵ -聚赖氨酸产量, 以 ϵ -聚赖氨酸产量为指标, 在正交试验基础上, 采用响应面法对 ϵ -聚赖氨酸发酵培养基进行优化。结果表明, ϵ -聚赖氨酸发酵培养基的最佳配方为: 葡萄糖 23.0 g/L、牛肉膏 4 g/L、蛋白胨 8 g/L、柠檬酸氢二铵 1.84 g/L、pH 值 4.0。在此条件下 ϵ -聚赖氨酸产量为 0.86 g/L, 与模型预期产量 0.80 g/L 接近, 达到预期效果, 模型可用。

关键词: ϵ -聚赖氨酸; 响应面法; 发酵; 培养基; 优化

中图分类号: TS202 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)05-0192-04

Optimization of Fermentation Medium for ϵ -polylysine Production

LIU Cui-cui, GENG Wei, NING Yong-xia, ZHANG Shi-min*

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University/Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To increase the production of ϵ -polylysine from *Streptomyces* C_1 , response surface method was applied to optimize the fermentation medium on the basis of orthogonal test. The results showed that the optimum fermentation medium was glucose of 23.0 g/L, beef extract of 4 g/L, peptone of 3 g/L, $C_6H_{14}N_2O_7$ of 1.84 g/L, pH value of 4.0. Under the above condition, the yield of ϵ -polylysine reached 0.86 g/L, which was closed to the level(0.80 g/L) predicted by model.

Key words: ϵ -polylysine; response surface method; fermentation; medium; optimization

ϵ -聚赖氨酸是由 25~35 个 L-型赖氨酸单体通过 α -羧基和 ϵ -氨基连接而成的单一型氨基酸聚合物, 其首先在日本被发现^[1]。该物质具有抗菌谱广、水溶性强、耐高温和易被人体降解的特性, 同时拥有良好的安全性和生物可降解性, 被广泛应用于食品和药物领域^[2-5]。目前, ϵ -聚赖氨酸已被多个国家广泛应用, 日本已实现工业化^[6], 而我国的 ϵ -聚赖氨酸生产仅处于实验室向生产过渡的初级阶段。因此, 提高 ϵ -聚赖氨酸产量具有重要的现实意义^[7]。

ϵ -聚赖氨酸产生菌主要是链霉菌, 自然界筛选出的野生菌 ϵ -聚赖氨酸产量普遍不高^[8], 为了克服这一障碍, 孙湘婷等^[9]在单因素分析的基础上通过正交试验优化了产 ϵ -聚赖氨酸白色链霉菌 213 的发酵培养基; 张建国等^[10]通过响应面法优化了产

ϵ -聚赖氨酸白色链霉菌 KD-11 的发酵培养基。本研究以实验室从土壤中筛选的产 ϵ -聚赖氨酸链霉菌 C_1 为出发菌株, 综合考虑碳源、氮源、无机盐、温度以及 pH 值的影响, 运用正交试验和响应面法对产 ϵ -聚赖氨酸的发酵培养基进行优化, 以期为其工业化生产提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验菌株及发酵培养基

菌株 C_1 , 从广西北海市海边土壤中筛选得到的链霉菌菌株。发酵培养基: 葡萄糖 25 g/L、牛肉膏 2 g/L、蛋白胨 7 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 g/L、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04 g/L, pH 值 6.0。

收稿日期: 2014-03-01

基金项目: 河南省重大科技攻关项目(072101110100)

作者简介: 刘翠翠(1987-), 女, 河南周口人, 在读硕士研究生, 研究方向: 环境微生物。E-mail: hellocicandy@163.com

* 通讯作者: 张世敏(1970-), 男, 河南济源人, 副教授, 博士, 主要从事环境生物技术方面的研究。E-mail: zztv2008@163.com

1.2 试验方法

1.2.1 C₁ 菌株的发酵培养及 ε-聚赖氨酸产量测定

将 C₁ 菌液按 10% 接种量接种到发酵培养基中,在 28 °C、180 r/min 条件下恒温培养 7 d。取培养好的发酵液于 8 000 r/min 离心 15 min,收集上清液加入等体积 1 mmol/L 的甲基橙,振荡 1 h。混合物于 10 000 r/min 离心 15 min,采用分光光度计在 465 nm 处测 OD 值进行产量分析^[11]。

1.2.2 C₁ 菌株发酵培养基配方的正交试验 对发酵培养基中的葡萄糖、牛肉膏、蛋白胨、柠檬酸氢二铵质量浓度及 pH 值进行五因素四水平的 L₁₆(4⁵) 正交试验设计(表 1),优化培养基配方。

表 1 正交试验因素与水平 g/L

水平	因素				
	葡萄糖质量浓度 (A)	牛肉膏质量浓度 (B)	蛋白胨质量浓度 (C)	柠檬酸氢二铵质量浓度 (D)	pH (E)
1	20	1	6	1.0	4
2	25	2	7	1.5	5
3	30	3	8	2.0	6
4	35	4	9	2.5	7

1.2.3 C₁ 菌株发酵培养基配方的响应面试验 在正交试验结果的基础上,选取对 ε-聚赖氨酸产量影响较大的 3 个因素(葡萄糖质量浓度、柠檬酸氢二铵质量浓度和 pH 值)根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,进行三因素三水平的响应面分析试验^[12](试验设计见表 2),以确定最适培养基配方,并对其进行验证。

表 2 C₁ 菌株发酵培养基配方的响应面试验设计 g/L

水平	因素		
	葡萄糖质量浓度 (F)	柠檬酸氢二铵质量浓度 (G)	pH(H)
-1	23	1.5	4
0	25	2.0	5
1	27	2.5	6

2 结果与分析

2.1 C₁ 菌株发酵培养基配方的正交试验结果

从极差分析结果(表 3)可以看出,5 个因素对 ε-聚赖氨酸产量的影响程度为:葡萄糖质量浓度 > 柠檬酸氢二铵质量浓度 > pH 值 > 牛肉膏质量浓度 > 蛋白胨质量浓度。优化的培养基配方为葡萄糖 25 g/L、牛肉膏 4 g/L、蛋白胨 8 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、pH 值 5。

表 3 C₁ 菌株发酵培养基配方的正交试验结果

试验号	因素					产量/(g/L)
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	0.63
2	1	2	2	2	2	0.69
3	1	3	3	3	3	0.71
4	1	4	4	4	4	0.73
5	2	1	2	3	4	0.79
6	2	2	1	4	3	0.73
7	2	3	4	1	2	0.79
8	2	4	3	2	1	0.79
9	3	1	3	4	2	0.80
10	3	2	4	3	1	0.75
11	3	3	1	2	4	0.58
12	3	4	2	1	3	0.63
13	4	1	4	2	3	0.61
14	4	2	3	1	4	0.56
15	4	3	2	4	1	0.72
16	4	4	1	3	2	0.78
k ₁	0.690	0.707	0.680	0.652	0.722	
k ₂	0.775	0.682	0.708	0.667	0.765	
k ₃	0.690	0.700	0.715	0.758	0.670	
k ₄	0.667	0.732	0.720	0.745	0.665	
R	0.108	0.050	0.040	0.106	0.100	

2.2 C₁ 菌株发酵培养基配方的响应面分析结果

2.2.1 响应面分析及结果 在正交试验结果的基础上,选择对 ε-聚赖氨酸产量影响较大的 3 个因素(葡萄糖质量浓度、柠檬酸氢二铵质量浓度和 pH 值)进行三因素三水平的响应面分析试验,试验结果见表 4。将表 4 中数据进行多元回归拟合,得到表示 ε-聚赖氨酸产量与各因素间关系的二次多项式回归方程:

$$Y = -1.26881 + 0.1312F + 0.639G - 0.01H - 0.0025FG + 0.005FH + 0.03GH - 0.00319F^2 - 0.191G^2 - 0.02025H^2$$

表 4 C₁ 菌株发酵培养基配方的响应面分析结果

试验号	因素			产量/(g/L)
	F	G	H	
1	-1	-1	0	0.72
2	1	-1	0	0.71
3	-1	1	0	0.73
4	1	1	0	0.71
5	-1	0	-1	0.81
6	1	0	-1	0.74
7	-1	0	1	0.73
8	1	0	1	0.70
9	0	-1	-1	0.79
10	0	1	-1	0.68
11	0	-1	1	0.71
12	0	1	1	0.66
13	0	0	0	0.78
14	0	0	0	0.8
15	0	0	0	0.76
16	0	0	0	0.77
17	0	0	0	0.78

对回归方程进行方差分析,结果见表 5。从模型的方差分析可知,该回归模型显著($P=0.0458 < 0.05$);失拟性检验结果不显著($P=0.0514 > 0.05$)(表 5)。 $R^2=0.9304$,说明该模型与数据拟合程度较好,试验误差较小。可以用该模型分析与预测 ϵ -聚赖氨酸产量与葡萄糖质量浓度、柠檬酸氢二铵质量浓度和 pH 值之间的关系。回归方程的方差分析结果表明二次项 G^2 对 ϵ -聚赖氨酸产量影响极显著,pH 值对 ϵ -聚赖氨酸产量影响显著。

表 5 回归模型方差分析结果

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
模型	0.025 245	9	0.002 805	3.808 923	0.045 8
F	0.002 113	1	0.002 113	2.868 574	0.134 2
G	0.002 813	1	0.002 813	3.819 108	0.091 6
H	0.006 05	1	0.006 05	8.215 325	0.024 1
FG	0.000 025	1	0.000025	0.033 948	0.859 0
FH	0.000 4	1	0.000 4	0.543 162	0.485 1
GH	0.000 9	1	0.000 9	1.222 114	0.305 5
F ²	0.000 684	1	0.000 684	0.929 45	0.367 1
G ²	0.009 6	1	0.009 6	13.036 24	0.008 6
H ²	0.001 727	1	0.001 727	2.344 53	0.169 6
残差	0.005 155	7	0.000 736		
失拟项	0.004 275	3	0.001 425	6.477 273	0.051 4
净误差	0.000 88	4	0.000 22		
总和	0.030 4	16			

2.2.2 培养基配方的响应曲面分析 为了直观的考察几个影响因子的交互作用对 ϵ -聚赖氨酸产量的影响,固定 1 个因素在编码的 0 水平上,研究另 2 个因素间的交互作用。由图 1 可以看出,在葡萄糖质量浓度一定时,随着柠檬酸氢二铵质量浓度的增加, ϵ -聚赖氨酸产量先逐渐增加后下降。说明柠檬酸氢二铵质量浓度过高对 ϵ -聚赖氨酸产量反而有抑制作用。当柠檬酸氢二铵质量浓度一定时,随着葡萄糖质量浓度的增加,响应面变化趋势较平缓, ϵ -聚赖氨酸产量变化较小。

由图 2 可以看出,在葡萄糖质量浓度一定时,随

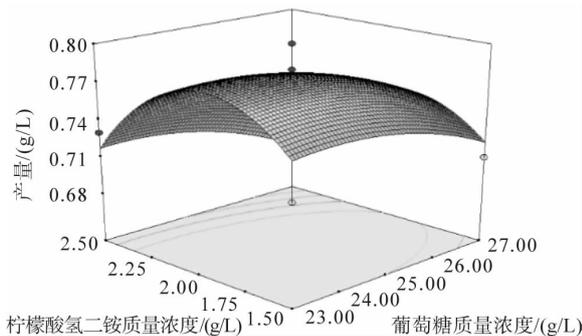


图 1 葡萄糖质量浓度和柠檬酸氢二铵质量浓度对 ϵ -聚赖氨酸产量的影响

着 pH 值的逐渐增大, ϵ -聚赖氨酸产量逐渐下降,且下降趋势较显著。说明 pH 值过高对 ϵ -聚赖氨酸产量有抑制作用。当 pH 值一定时,随着葡萄糖质量浓度的增加 ϵ -聚赖氨酸产量随之增加,但当葡萄糖质量浓度过大时 ϵ -聚赖氨酸产量开始明显下降。

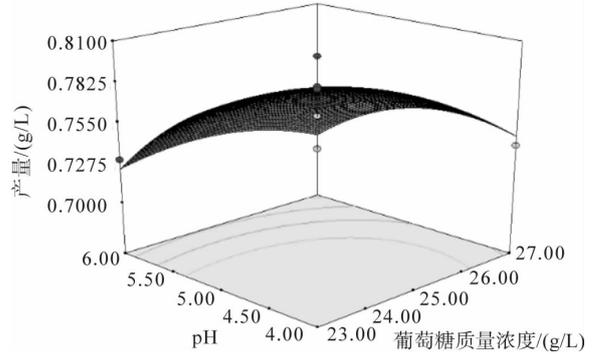


图 2 葡萄糖质量浓度和 pH 值对 ϵ -聚赖氨酸产量的影响

由图 3 可以看出,在 pH 值一定时,随着柠檬酸氢二铵质量浓度的增加 ϵ -聚赖氨酸产量呈先增加后下降的趋势。当柠檬酸氢二铵质量浓度一定时,随着 pH 值的增大 ϵ -聚赖氨酸产量前期较平稳后期开始明显下降。

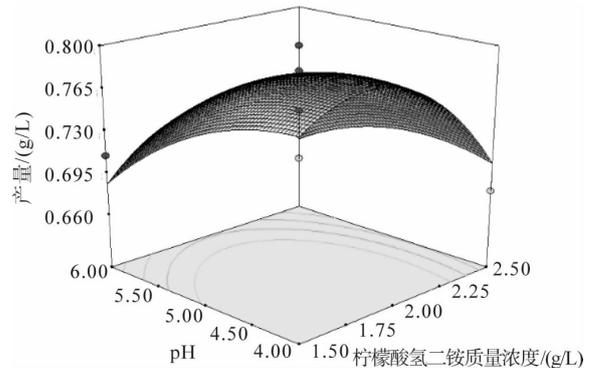


图 3 柠檬酸氢二铵质量浓度和 pH 值对 ϵ -聚赖氨酸产量的影响

2.2.3 响应面法优化试验结果及验证试验 根据回归方程计算出各个因素的最佳水平分别为葡萄糖 23.0 g/L、柠檬酸氢二铵 1.84 g/L、pH 值 4.0,根据回归方程计算预期 ϵ -聚赖氨酸产量为 0.80 g/L。

为了验证模型的准确性,对上述优化结果按上述发酵条件进行 4 次平行试验,试验结果较一致, ϵ -聚赖氨酸产量平均为 0.86 g/L,略大于模型方程预期产量 0.80 g/L。表明上述试验模型准确可靠。

3 结论

本研究以 ϵ -聚赖氨酸产生菌 C₁ 为出发菌株,通过正交试验与响应面分析法,确定培养基组分对 ϵ -

聚赖氨酸产量影响的主次顺序为:葡萄糖质量浓度>柠檬酸氢二铵质量浓度>pH值>牛肉膏质量浓度>蛋白胨质量浓度,其中葡萄糖、柠檬酸氢二铵质量浓度及pH值对ε-聚赖氨酸产量影响较大,pH值对ε-聚赖氨酸产量的影响达到显著水平。ε-聚赖氨酸的最佳发酵培养基配方为葡萄糖23.0 g/L、牛肉膏4 g/L、蛋白胨8 g/L、柠檬酸氢二铵1.84 g/L、pH值4.0。在此条件下,ε-聚赖氨酸产量达0.86 g/L,比模型预期产量(0.80 g/L)高0.06 g/L,达到预期效果,模型可用。采用响应面法优化得到的条件参数准确、可靠,具有很好的参考价值。

参考文献:

- [1] Shima S, Sakai H. Polylysine produced by *Streptomyces*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1977, 41(9):1807-1809.
- [2] Chang S S, Lu W Y W, Park S H, et al. Control of foodborne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by ε-polylysine[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141(3):236-241.
- [3] Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya S, et al. Use of ADME studies to confirm the safety of ε-polylysine as a preservative in food[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2003, 37(2):328-340.
- [4] 李昆仑, 李江阔, 张鹏, 等. ε-聚赖氨酸在食品中应用的研究进展[J]. 保鲜与加工, 2010, 10(1):11-15.
- [5] Otsuka N, Kuwahara Y, Manabe K. Effect of ε-polylysine on preservation of boiled noodles [J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1992, 39(4):344-347.
- [6] Shukla S C, Singh A, Pandey A K, et al. Review on production and medical applications of ε-polylysine[J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 15(65):70-81.
- [7] Jung Y J, Min K J, Yoon K S. Responses of acid-stressed *Salmonella typhimurium* in broth and chicken patties to subsequent antimicrobial stress with ε-polylysine and combined potassium lactate and sodium diacetate[J]. Food Microbiology, 2009, 26(5):467-474.
- [8] Chen X, Tang L, Li S, et al. Optimization of medium for enhancement of ε-poly-L-lysine production by *Streptomyces* sp. M-Z18 with glycerol as carbon source[J]. Bioprocess Technology, 2011, 102(2):1727-1732.
- [9] 孙湘婷, 李洪亮. ε-聚赖氨酸的发酵培养基优化[J]. 赣南医学院学报, 2013, 33(1):8-10.
- [10] 张建国, 陈晓明, 熊双丽. 响应面分析优化ε-聚赖氨酸发酵培养基[J]. 食品与机械, 2010, 26(4):19-22.
- [11] 陈雄, 章莹, 袁金凤, 等. ε-聚赖氨酸高产菌株的筛选及其发酵工艺的初步研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4):731-735.
- [12] Gurkok S, Cekmecelioglu D, Ogel Z B. Optimization of culture conditions for *Aspergillus sojae* expressing an *Aspergillus fumigatus* α-galactosidase [J]. Bioprocess Technology, 2011, 102(7):4925-4929.