

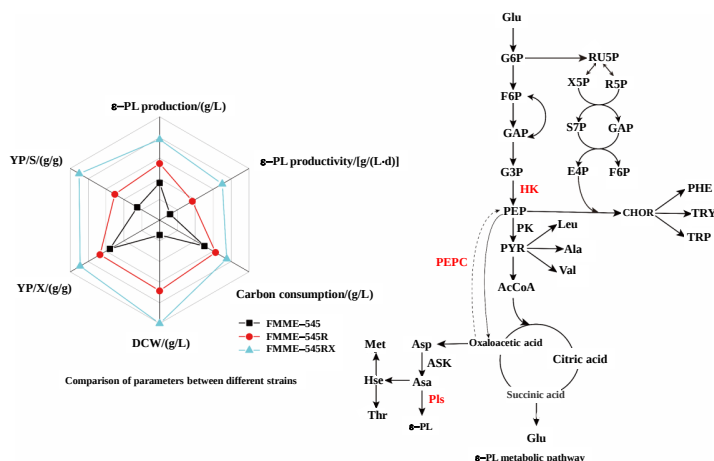
Breeding of ϵ -poly-L-lysine high yield strain by ARTP and fermentation condition optimization

Zuwei XU^{1,2}, Lihao JI^{1,2}, Wenxiu TANG^{1,2}, Liang GUO^{1,2}, Xiulai CHEN^{1,2}, Jia LIU^{1,2}, Liming LIU^{1,2*}

1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) is a natural homo-polymer of microbial origin, consisting of 25~35 L-lysine monomers, which is mainly produced by aerobic microbial fermentation and secreted to extracellular accumulation. Due to its wide antimicrobial spectrum and high safety, ϵ -PL has been successfully used as a food preservative. Besides, as a safe and green biopolymer, it has also been extensively applied in biomedical, chemical, and many other fields. Unfortunately, the efficient microbial production of ϵ -PL has reached a bottleneck owing to the limitations of low



productivity, long fermentation period and unstable fermentation process, which can not satisfy the demand of industrialized production and brought obstacles to its popularity. To tackle these issues, *S. albulus* FMME-545RX with high tolerance to rifamycin was firstly screened and obtained by atmospheric and room temperature plasmas (ARTP) mutagenesis combined with ribosomal engineering, which could produce 2.44 g/L of ϵ -PL, with an increase of 105% in comparison with that of the parent strain *S. albulus* FMME-545. Then, a series of fermentation optimization strategies, including carbon sources regulation, pH control and dissolved oxygen (DO) regulation, were employed in increasing the production of ϵ -PL. The final results demonstrated that the mixed carbon source of glucose and sucrose fermentation was helpful to improve the metabolic intensity of bacteria; the addition of sodium citrate in the fermentation process can effectively improve the ability of the bacteria to resist the acidic environment; the optimum pH and DO values for product synthesis were 3.80 and 30%, respectively. Finally, under the controlled fed-batch fermentation, the production, productivity, and dry cell weight (DCW) of ϵ -PL reached up to 53.0 g/L, 6.63 g/(L·d), and 0.88 g/g, respectively, which were 130%, 131%, and 118% higher than those of the parent strain *S. albulus* FMME-545. Taken together, this study shows great potential for industrial production of ϵ -PL and the strategies described here also pave the way to the production of other value-added chemicals.

Key words: ϵ -PL; *Streptomyces albulus*; ribosome engineering; ARTP mutagenesis; fermentation optimization

收稿: 2021-03-23, 修回: 2021-05-24, 网络发表: 2021-06-09; Received: 2021-03-23, Revised: 2021-05-24, Published online: 2021-06-09

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(编号: 2019B020218001); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题(编号: LITE2018-08)

作者简介: 徐祖伟(1997-), 男, 江苏省常州市人, 硕士研究生, 生物工程专业, E-mail: xzw125836@163.com; 刘立明, 通讯联系人, E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn.

引用格式: 徐祖伟, 季立豪, 唐文秀, 等. ARTP 选育 ϵ -聚赖氨酸高产菌株及其发酵条件优化. 过程工程学报, 2022, 22(3): 347-356.

Xu Z W, Ji L H, Tang W X, et al. Breeding of ϵ -poly-L-lysine high yield strain by ARTP and fermentation condition optimization (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2022, 22(3): 347-356, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.221100.

ARTP 选育 ϵ -聚赖氨酸高产菌株及其发酵条件优化

徐祖伟^{1,2}, 季立豪^{1,2}, 唐文秀^{1,2}, 郭亮^{1,2}, 陈修来^{1,2}, 刘佳^{1,2}, 刘立明^{1,2*}

1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2. 江南大学国际食品安全联合实验室, 江苏 无锡 214122

摘要: ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)是由25~35个L-赖氨酸单体组成的一种天然聚合物,在食品、医学、农药等领域有很大的应用潜力。目前,微生物法生产 ϵ -PL存在生产强度低、发酵周期长、工艺不稳定等问题。为此,本研究以*S.albulus* FMME-545为出发菌株,通过常温常压等离子诱变(ARTP)结合核糖体工程选育了一株具有利福霉素抗性的高产菌株*S.albulus* FMME-545RX,其 ϵ -PL产量达到2.44 g/L,相较于出发菌株提升了105%。为了进一步提高 ϵ -聚赖氨酸的产量,在5 L发酵罐中通过分批补料的方式对碳源的调控策略、pH调控方法、DO控制水平进行了系统的研究。结果表明,采用葡萄糖-蔗糖双碳源调控策略有助于提高菌体代谢强度;在发酵过程中添加柠檬酸钠能有效帮助菌体抵御酸性环境;产物合成所需的最适pH值和DO值分别为3.80和30%。经过192 h的分批补料发酵, ϵ -PL的产量、生产强度、单位细胞合成能力分别达到了53.0 g/L,6.63 g/(L·d),0.88 g/g,相比于原始菌株分别提高了130%,131%,118%。上述研究结果为 ϵ -聚赖氨酸工业化生产提供了有益的借鉴。

关键词: ϵ -聚赖氨酸;白色链霉菌;核糖体工程;ARTP诱变;发酵优化

中图分类号: TQ922.3

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2022)03-0347-10

1 前言

随着抗生素在医疗和食品领域的无节制的滥用,我国人均抗生素消费量远高于世界平均水平,为我国的医疗健康和食品安全带来了巨大挑战,目前急需寻找抗生素的有效替代品。而 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL)作为高安全性的广谱抗菌肽被人们认为是抗生素的有效代替品,其具有水溶性好、热稳定性高、抗菌性能强等优点,在医学、食品、农药等领域有很大的应用潜力^[1-3]。白色链霉菌作为 ϵ -聚赖氨酸的主要生产菌株,但在发酵过程中存在发酵周期过长、产量低、工艺不稳定等缺陷,导致其在工业化的过程中成本较高。

通过传统诱变的手段选育S-2-氨基-L-半胱氨酸(AEC)和甘氨酸抗性的菌株,是常用的高产菌株选育手段。如Hiraki等^[4]通过此方法选育了一株高产菌株, ϵ -PL的摇瓶产量达到了2.1 g/L,相较于出发菌株提高近20倍。然而此方法存在工作量大、耗时长、突变位点单一且产量提高有限等种种问题。为有效解决传统育种中存在的各种问题,核糖体工程育种作为一种新型的育种方式脱颖而出。在发酵过程中,次级代谢产物主要在链霉菌菌丝的营养生长向形态分化这一过渡阶段累积,而鸟苷四磷酸ppGpp是触发生理分化的重要信号因子,其主要受RNA聚合酶的调控。另外,核糖体是细胞中蛋白质合成的最主要细胞器,其与菌体形态分化密不可分。因此核糖体工程是通过使用作用位点在核糖体

或RNA聚合酶上的抗生素,提高菌体的耐药性导致其发生突变,从而提高次级代谢产物的产量^[5]。王靓^[6]通过核糖体工程选育了一株具有链霉素、庆大霉素和利福霉素的抗性菌株*Streptomyces albus* GS-114,在发酵192 h后 ϵ -PL产量达56.3 g/L。除此之外,相关的研究主要还集中在发酵过程优化与代谢工程改造。谭之磊等^[7]在 ϵ -PL发酵过程中补糖的同时复合流加苏氨酸,苏氨酸终浓度控制在2.5~10 g/L,最终不仅发酵时间缩短为168 h,产量也提高了90%,达到38.7 g/L; Xu等^[8]通过对菌株*S.albulus* PD-1基因组上的铵转运蛋白基因*amtB*进行过量表达构建了菌株*S.albulus* PD-4。在发酵168 h后产量达35.7 g/L,产量较之前提升了57.3%。

在本研究中,通过核糖体工程选育了一株具有利福霉素抗性菌株FMME-545RX,在此基础上对其生长所需的碳源种类、pH值、溶氧等条件进行优化来提高 ϵ -PL的生产性能,并在500 L发酵罐中进行中试生产。该研究为 ϵ -PL工业化生产奠定了基础,也为其他产品的生产提供了有益的借鉴。

2 实验

2.1 材料与试剂

2.1.1 菌株

S. albulus FMME-545为实验室保藏的 ϵ -PL生产菌株;*S. albulus* FMME-545RX为利福霉素抗性突变株,

现保存于本实验室。

2.1.2 试剂

ϵ -PL 标品(>95%, Sigma 公司), 葡萄糖(>97%, 山东西王生化科技有限公司), 酵母粉、蛋白胨(Oxoid 公司), 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸铵、七水合硫酸镁、七水合硫酸锌、七水合硫酸亚铁(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2.1.3 培养基

固体培养基(贝特纳培养基, g/L): 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 2.0, 酵母粉 1.0, 琼脂 2.0, pH=7.5。

种子培养基(M3G 培养基, g/L): 葡萄糖 50.0, 酵母膏 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.0, KH_2PO_4 1.36, K_2HPO_4 0.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, pH=6.8。

发酵培养基(葡萄糖单一碳源培养基, g/L): 葡萄糖 60.0, 牛肉膏 13.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, KH_2PO_4 4.0, K_2HPO_4 4.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, pH=6.8。所有培养基均在 115℃ 下灭菌 15 min。

发酵培养基(蔗糖单一碳源培养基, g/L): 蔗糖 60.0, 牛肉膏 13.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, KH_2PO_4 4.0, K_2HPO_4 4.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, pH=6.8。所有培养基均在 115℃ 下灭菌 15 min。

发酵培养基(葡萄糖-蔗糖双碳源培养基, g/L): 葡萄糖 42.0, 蔗糖 18.0, 牛肉膏 13.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, KH_2PO_4 4.0, K_2HPO_4 4.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, pH=6.8。所有培养基均在 115℃ 下灭菌 15 min。

2.2 实验设备与分析仪器

ARTP-3 常压室温等离子体诱变育种仪(清华大学无锡应用技术研究院生物育种中心), BIOTECH-5BG 型 5 L 全自动搅拌式发酵罐(上海保兴生物设备工程有限公司), FMG-500 L 全自动搅拌式发酵罐(上海国强生化装备有限公司), pH 电极 HF405-DPA-SC-S8/225 和溶氧电极 InPro6860i/12/220 (瑞士梅特勒公司), UVmini-1240 分光光度计(日本岛津公司), M-100 生物传感器分析仪(深圳市希尔曼科技有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 诱变、培养条件

单孢子悬浮液的制备: 将菌株从 -80℃ 的冰箱中取出, 转入 -20℃ 冰箱, 再转入 -4℃, 最后转入 4℃ 冰箱中, 进行逐级解冻活化菌株培养。将解冻好的菌株涂布在固体平板上, 在 30℃ 的培养箱中放置 7~8 天, 待平板上长满孢子后通过生理盐水将孢子冲洗下来。在经 8 层纱布过滤两遍后, 适当稀释孢子悬浮液使其浓度在 10^8 cfu/mL。如需要保藏则将单孢子悬浮液与 30% 甘油按质量

比 1:1 融合后放于 -80℃ 的冰箱中。

最小抑菌浓度(MIC)测定: 将单孢子悬浮液适当的稀释后均匀的涂布在利福霉素抗性平板上, 在 30℃ 中培养 3~5 天, 每天观察菌体的生长情况。当平板中没有菌体生长时对应的利福霉素浓度, 即为利福霉素对该菌株的最小抑菌浓度。

ARTP 诱变: 在无菌条件下, 取 10 μL 稀释好的单孢子悬浮液, 均匀涂布于金属载片表面, 以氦气作为工作气体, 设置工作电压 120 W, 照射距离 2 mm, 气体流量为 10 L/min, 诱变时间为 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 s。将诱变完的载片放入装有灭菌水的 EP 管中, 振荡摇匀并进行适当的稀释后均匀涂布在贝特纳固体平板中培养 7 天, 计算诱变的致死率。

高产菌株的筛选: 将诱变处理后的菌株进行适当的稀释后制成新的单孢子悬浮液, 将其均匀涂布在 5, 10, 15, 20, 30, 60 倍的利福霉素最小抑菌浓度抗性平板上, 30℃ 下培养 7~8 天。挑取生长良好的孢子转移至亚甲基蓝平板上培养 3~5 天, 通过与出发菌株对比挑选透明圈更大的菌株进行 24 孔板初筛, 培养条件为装液量 1.5 mL, 30℃, 750 r/min 培养 3 天。将产量明显提升的菌株进行摇瓶复筛, 摇瓶培养条件为 30℃, 200 r/min 培养 3 天。测定 ϵ -PL 含量, 选出高产菌株。

摇瓶培养: 按照 10%~12% (v/v) 的接种量将培养液接种于装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 30℃, 200 r/min 培养 72 h, 每隔 12 h 取样测 pH、碳源含量、干重及产量。

5 L 发酵罐分批补料发酵: 培养基初始装液量 3 L, 种子液按 10%~12% 的接种量, 接种至装有发酵培养基的 5 L 发酵罐中进行培养, 发酵温度控制在 30℃, 初始转速为 200 r/min, 溶氧控制在 30%, 通风比维持在 0.5~2.5 vvm; 在发酵过程中当 pH 下降到 4.0 时通过流加氨水将 pH 维持在 3.80 左右; 当发酵液中碳源的浓度低于 10 g/L 时通过流加 1000 g/L 的葡萄糖-蔗糖母液使碳源浓度维持在 10 g/L; 当培养基中氨氮浓度低于 0.5 g/L 时通过流加 500 g/L 的硫酸铵使氨氮浓度维持在 0.5~0.8 g/L。

2.3.2 分析方法

糖含量的测定: 使用配备有示差折光检测器(RID)和 Aminex HPX-87H (300×7.8 mm) 的高效液相色谱仪(HPLC)进行糖含量分析。流动相为 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=75/25$, 流速为 1 mL/min。柱温和检测器温度分别设定为 25 和 30℃。

氨氮浓度测定: 通过比色法测定 NH_4^+-N 浓度。溶液 A: 35 g/L 苯酚, 0.2 g/L 亚硝基铁氰化钠; 溶液 B: 18 g/L NaOH, 0.04 mol/L 次氯酸钠。将以上溶液配置好后放

入4℃冰箱保存。将样品适当稀释之后取出1 mL,依次加入5 mL溶液A和5 mL溶液B,混合均匀后置于37℃水浴中反应30 min,在625 nm测定吸光度,根据标准曲线计算其浓度。

菌体干重(DCW)测试:取10 mL发酵液,8000 r/min离心10 min,倒去上清液再用无菌水清洗离心2次,将清洗好的菌液倒入提前恒重称量好的滤纸过滤,100℃过夜烘至质量恒定,得到菌体干重。

ϵ -PL含量测定^[9]:采用甲基橙测定法,取发酵液10 mL进行8000 r/min离心10 min,取上清用磷酸缓冲液(0.7 mmol/L)稀释,使 ϵ -PL浓度在0.075~0.135 g/L。用2 mL的稀释液与等体积甲基橙溶液(1 mmol/L)振荡混匀,置于30℃下、转速为200 r/min的摇床中反应30 min,然后10000 r/min离心10 min,将0.5 mL上清液加入到10 mL容量瓶中,用磷酸缓冲液定容振荡混匀。用磷酸缓冲液校零,在465 nm处测定OD值,经标准曲线计算出 ϵ -PL的浓度。

显微镜观察菌球形态:将发酵液至于40倍显微镜下观察其菌丝形态。

3 结果与讨论

3.1 ARTP诱变选育聚赖氨酸高产菌株

ARTP作为一种安全高效的诱变方式,在菌种选育中被广泛使用^[10-12]。为了获得最佳的诱变条件,对白色链霉菌的单孢子悬浮液进行不同时间的诱变处理,ARTP诱变时间对菌体致死率的影响如图1(a)所示。随诱变时间增加,菌体的致死率也在快速增加,至诱变120 s时致死率已经达到88%,诱变150 s时菌株的存活率几乎为零。一般而言,当诱变致死率约90%时,菌株产生高产突变的概率较高,且在此突变率下菌体的回复性更小。因此,考虑到菌体突变的效率和稳定性,最终选择ARTP诱变处理的时间为120 s。

次级代谢产物主要产生在链霉菌形态分化过程中,而核糖体工程主要通过引入抗生素抗性来影响分化过程从而提高次级代谢产物的产量。而利福霉素是核糖体工程中的常用抗生素,其主要作用于RNA聚合酶中的Rif结合域,从而干涉菌体的生理分化,目前已有不少学者通过利福霉素来选育高产菌株^[13-16]。将*S. albulus* FMME-545的单孢子悬浮液均匀涂布在含有利福霉素的抗性平板上,培养3天后发现当利福霉素的浓度提高到0.4 $\mu\text{g/mL}$ [图1(b)]时,平板上几乎没有菌落生长,表明白色链霉菌的生长受到强烈抑制。因此确定了利福

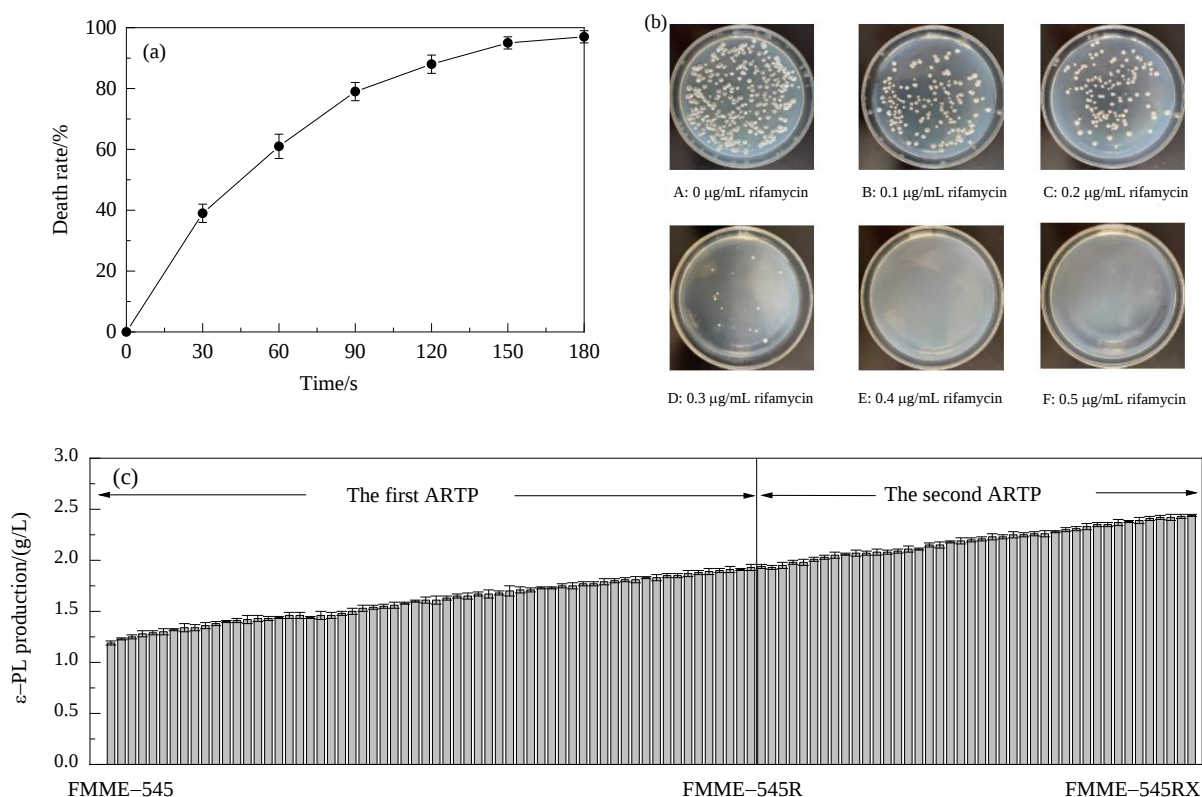


图1 诱变条件的确立与高产菌株的筛选

Fig.1 Establishment of mutagenesis conditions and screening of high yield strains

霉素对 *S. albulus* FMME-545 的最小抑菌浓度(MIC)为 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 。

白色链霉菌经 ARTP 诱变所得的突变株涂布在抗性平板(利福霉素浓度: 5, 10, 15, 20 MIC)上生长。将生长良好的菌株转移至亚甲基蓝平板上以菌株 *S. albulus* FMME-545 作为对照, 根据透明圈的大小挑选出较对照组明显变大的菌株, 共得到 181 株。首先将这些菌株进行了 24 孔板初筛, 其次将产量明显增加的菌株进行摇瓶复筛, 最后一共筛选出 58 株正突变菌株, 正突变率达到 32.0%。其中 ϵ -PL 产量最高的突变株达到了 1.87 g/L。将该菌株命名为 *S. albulus* FMME-545R。并以 FMME-545R 为出发菌株, 进行第二轮 ARTP 诱变用来筛选高浓度的利福霉素(30 和 60 MIC)抗性菌株, 筛选过程与第一轮 ARTP 诱变筛选一样。最终得到了一株高产菌株 *S. albulus* FMME-545RX, 其摇瓶产量达到了 2.44 g/L, 较原始菌株产量提高了 105% [图 1(c)]。

为了探究突变菌株 *S. albulus* FMME-545RX 高产 ϵ -PL 的原因, 对其形态和发酵性能进行评估。在形态方面的改变主要有以下两个方面: (1) 菌落的边缘出现褶皱, 不再光滑; (2) 发酵过程中形成的菌丝球的直径更大, 菌丝之间聚集较为紧密。在发酵性能方面: (1) 摇瓶发酵 72 h 后, 高产菌株 FMME-545RX 的 ϵ -PL 产量提高的同时, DCW 也提升 25.6% [图 2(a) 和 2(b)]。 (2) 在发酵过程中还发现高产菌株 FMME-545RX 的 pH 下降速度更快, 在摇瓶发酵 42 h 时 pH 下降至 4.0, 相较于出发菌株提前了约 6 h; 发酵结束后最低 pH 达到了 3.03, 而出发菌株 FMME-545 的 pH 仅能降低至 3.34 [图 2(c)], 结果表明高产菌株 FMME-545RX 在发酵前期菌体活力更强, 并且可以耐受更加酸性的环境。这些形态和发酵性能上的改变可能是高产菌株 FMME-545RX 具有较强 ϵ -PL 合成能力的关键因素。

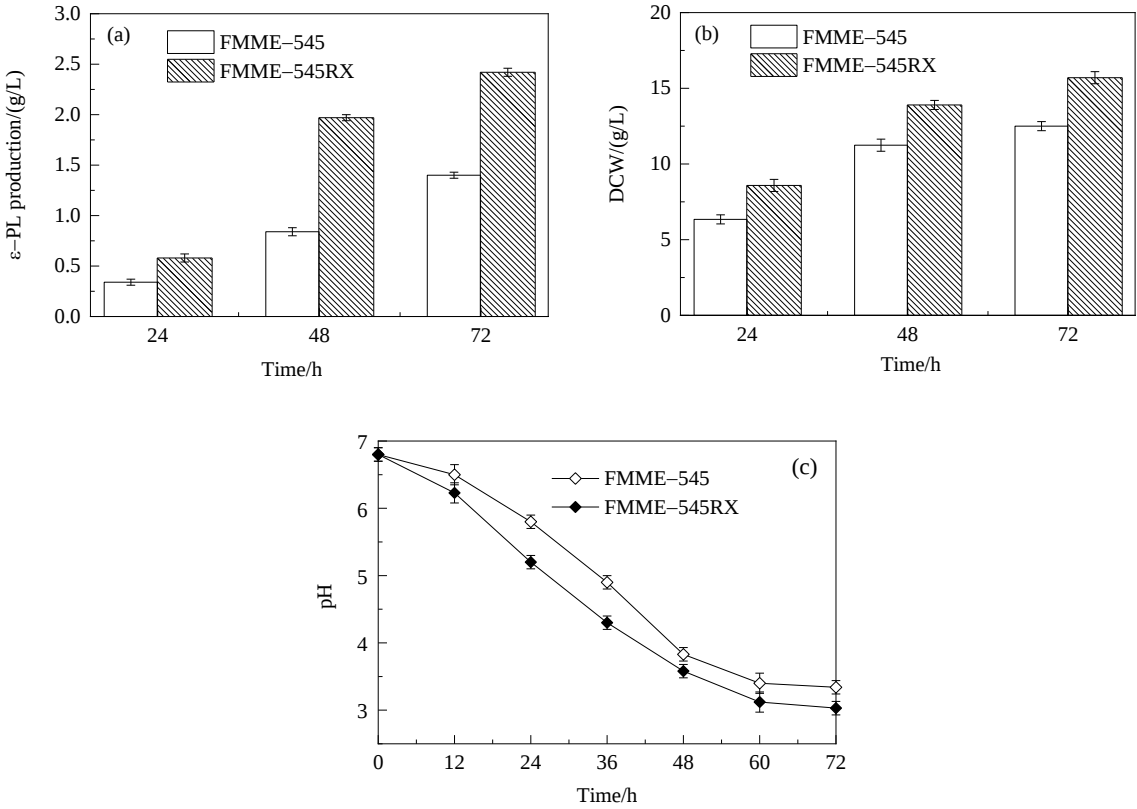


图2 原始菌株与突变株 FMME-545RX 差异对比
Fig.2 Differences comparison between the parent strain and mutant strain FMME-545RX

3.2 以蔗糖为辅助碳源促进白色链霉菌合成 ϵ -PL

大多数微生物在发酵过程中会优先利用适合细胞生长的碳源, 其中最为典型的案例是“葡萄糖效应”^[17]。但也存在少数微生物在发酵过程中可以同步代谢多种

碳源, 通常可有效提高其代谢强度^[18]。其中白色链霉菌在发酵生产 ϵ -聚赖氨酸的过程中可以同步代谢多种碳源。目前葡萄糖、蔗糖是发酵过程中常用的碳源, 二者价格低廉可以进一步减少发酵过程中的生产成本。

为了验证 *S. albulus* FMME-545RX 在利用葡萄糖-蔗糖双碳源时能否有效增加白色链霉菌的代谢强度,比较了葡萄糖、蔗糖、葡萄糖-蔗糖双碳源在摇瓶发酵过程中的参数的差异,结果如表 1 所示。使用葡萄糖-蔗糖双碳源发酵时,碳源的消耗速率更快且消耗的碳源总量更多,相较于以葡萄糖、蔗糖为单一碳源发酵时其消耗量分别增加了 5.0 和 9.0 g/L。当发酵结束时虽然它们三者最终的 DCW 大致相同,但使用双碳源发酵的 ϵ -PL 产量达到 2.78 g/L,相较于以葡萄糖和蔗糖作为单一碳源发酵时产量分别增加了 14.9% 和 28.7%。结果表明,当使用葡萄糖-蔗糖作为碳源进行发酵时,由于二者能够同步被白色链霉菌代谢,因此可大大提升菌体的代谢强度,进而提高 ϵ -PL 产量。

上述实验可知使用葡萄糖-蔗糖双碳源策略时更有利于白色链霉菌发酵生产 ϵ -PL。为了进一步提高 ϵ -PL

产量,对双碳源策略中葡萄糖与蔗糖的比例进行优化。结果如图 3(a)所示,在摇瓶发酵 72 h 后发现,随碳源中蔗糖含量由 0% 提高到 30% 时, ϵ -PL 的产量由 2.43 g/L 提升至 2.96 g/L,但随蔗糖含量继续增加直至 100%, ϵ -PL 的产量开始逐渐降至 2.16 g/L。因此确定了以葡萄糖为主要碳源,蔗糖为辅助碳源的双碳源发酵策略,葡萄糖与蔗糖的比例为 7:3。为了进一步验证这一实验结果,在 5 L 发酵罐中进行了分批补料发酵[图 3(b)]。初始培养基中葡萄糖与蔗糖的含量分别为 42.0 和 18.0 g/L。在发酵过程中当碳源浓度低于 10 g/L 后通过流加混合碳源(葡萄糖:蔗糖=7:3),将碳源的总浓度维持在 8~12 g/L。在发酵 192 h 后 ϵ -PL 产量达到 38.3 g/L,与以葡萄糖为碳源进行发酵相比,其产量提升了 13.3%,进一步说明双碳源策略更有利于 ϵ -PL 的生产。

表 1 以葡萄糖、蔗糖、葡萄糖-蔗糖(1:1)为碳源在发酵过程中参数差异
Table 1 The difference of parameters in fermentation process with glucose, sucrose and glucose-sucrose (1:1) as carbon sources

Parameter	Type of carbon source			Change, (C/A-1)×100%	Change, (C/B-1)×100%
	Glucose (A)	Sucrose (B)	Glucose-sucrose (C)		
Final pH	3.12±0.03	3.29±0.04	3.04±0.03	-2.6%	-7.6%
NH ₄ ⁺ -N consumption/(g/L)	1.21±0.02	1.18±0.01	1.36±0.02	12.4%	15.3%
Maximum dry cell weight/(g/L)	15.8±0.3	15.7±0.4	16.3±0.3	3.2%	3.8%
Carbon consumption/(g/L)	32.0±1.2	28.0±1.5	37.0±0.7	15.6%	32.1%
ϵ -PL production/(g/L)	2.42±0.02	2.16±0.03	2.78±0.03	14.9%	28.7%
Carbon consumption rate/[g/(L·h)]	0.44±0.02	0.38±0.03	0.51±0.01	15.9%	34.2%
ϵ -PL productivity/[g/(L·d)]	0.81±0.01	0.72±0.01	0.93±0.01	14.8%	29.2%
Yield of ϵ -PL on DCW/(g/g)	0.15±0.01	0.14±0.02	0.17±0.02	13.3%	21.4%

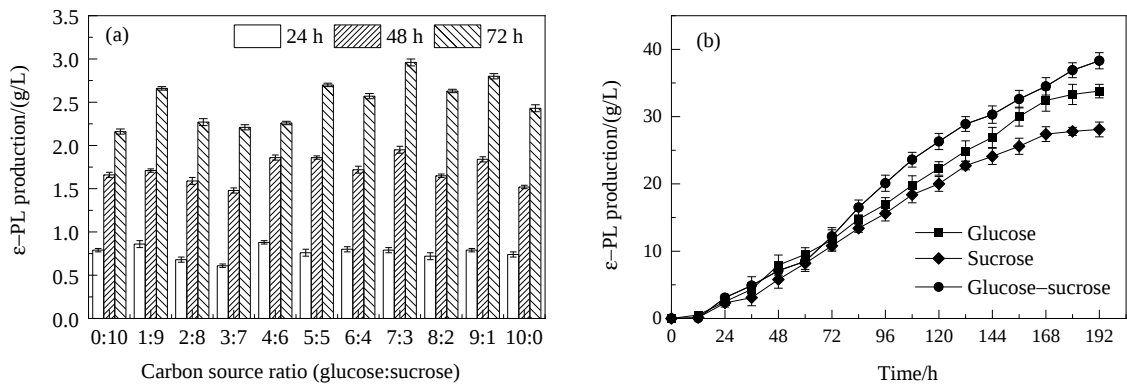


图 3 双碳源比例的优化与验证
Fig.3 Optimization and verification of double carbon source ratio

3.3 5 L 发酵罐中条件优化提高 ϵ -聚赖氨酸产量

3.3.1 pH 控制策略对于菌体生长的影响

pH 是调控 ϵ -PL 合成的最关键因素,目前发酵过程中工艺的优化也主要集中在 pH 调控上^[19-21]。从菌体生

长曲线[图 4(a)]中可以看出,在发酵 24~72 h 期间菌体量增加缓慢。在发酵 72 h 后菌体再次快速增长同时伴随着产物快速的累积。因此猜测在发酵 24~72 h 这一阶段中是由于环境中 pH 值快速下降至 4.0,菌体需要经过一

段时间才能适应这一环境从而继续生长。根据这一特性将 ϵ -PL 合成过程划分为三个阶段:(1) 菌体生长阶段(0~24 h; pH>5.0), 在这一阶段中菌体快速生长, 产物几乎没有合成;(2) 酸抑制阶段(24~72 h; pH $\approx$ 4.0), 在这一阶段中菌体生长缓慢, 产物开始逐渐累积, 其生产强度约为 4.6 g/(L·d); (3) 产物快速合成阶段(72~192 h; pH $\approx$ 4.0), 在这一阶段中菌体量与产物同时快速增加, 其生产强度达到了 5.2 g/(L·d), 但在发酵 192 h 后菌体开始大量死亡并伴随着其生产强度的大幅下降, 192~216 h ϵ -PL 的生产强度降低至 0.5 g/(L·d), 于是在 192 h 时结束发酵。因此猜测能否通过缩短酸抑制阶段周期, 加强菌体对于酸性环境的适应能力, 使其更快进入产物快速合成阶段, 从而提升产量。

菌体在发酵过程中为了抵御外部酸性的环境主要是通过 H^+ -ATPase 将胞内多余 H^+ 泵出体外, 使胞内环境处于稳态。但 H^+ -ATPase 在发挥作用的过程中需要消耗大量 ATP^[22]。考虑到这一特性, 在酸抑制阶段开始时添加 1 g/L 的辅助能量物质柠檬酸钠来帮助菌体抵御酸性环境^[23]。通过对比菌体的生长情况可以看出, 未添加柠檬酸钠菌体的酸抑制周期大概在 48 h 左右, 而添加完柠檬酸钠后菌体在发酵 42 h 时再次快速生长, 其酸抑制

周期缩短为 18 h [图 4(b)], 同时在发酵 192 h 后, ϵ -PL 产量提高了 27.4%, 达到 48.8 g/L [图 4(c)]。说明在酸抑制开始时添加柠檬酸钠可有效帮助菌体快速适应酸性环境, 从而缩短酸抑制周期使菌体更快地进入产物合成阶段。

除此之外, 在发酵过程中还发现在产物合成阶段当 pH 控制出现波动时 ϵ -PL 的合成速率也会出现较大波动, 因此还需要确定产物合成所需的最适 pH 值。于是在补料分批发酵体系中将 pH 控制在 4 个不同的值(4.0, 3.9, 3.8, 3.7)下进行发酵。结果如表 2 所示, 在这四种 pH 值的调控下, ϵ -PL 产量随着 pH 的降低而逐渐增加。当 pH 降至 3.8 时产量升高至 48.3 g/L, 而当 pH 值继续降低至 3.7 时, 菌体活力受到严重的抑制, 菌体干重仅有 51.2 g/L, 同时 ϵ -PL 产量也降至 35.3 g/L。此外在 pH=3.8 时 ϵ -PL 的生产强度、单位细胞合成能力分别达到了 6.04 g/(L·d), 0.83 g/g, 明显高于其他 pH 调控下的生产强度和单位细胞合成能力。因此, 根据上述实验结果确立了合适的 pH 调控策略, 即在发酵过程中当 pH 值降至 4.0 时外源添加 1 g/L 柠檬酸钠, 当发酵进入产物快速合成阶段时将 pH 控制在 3.8 下进行发酵。

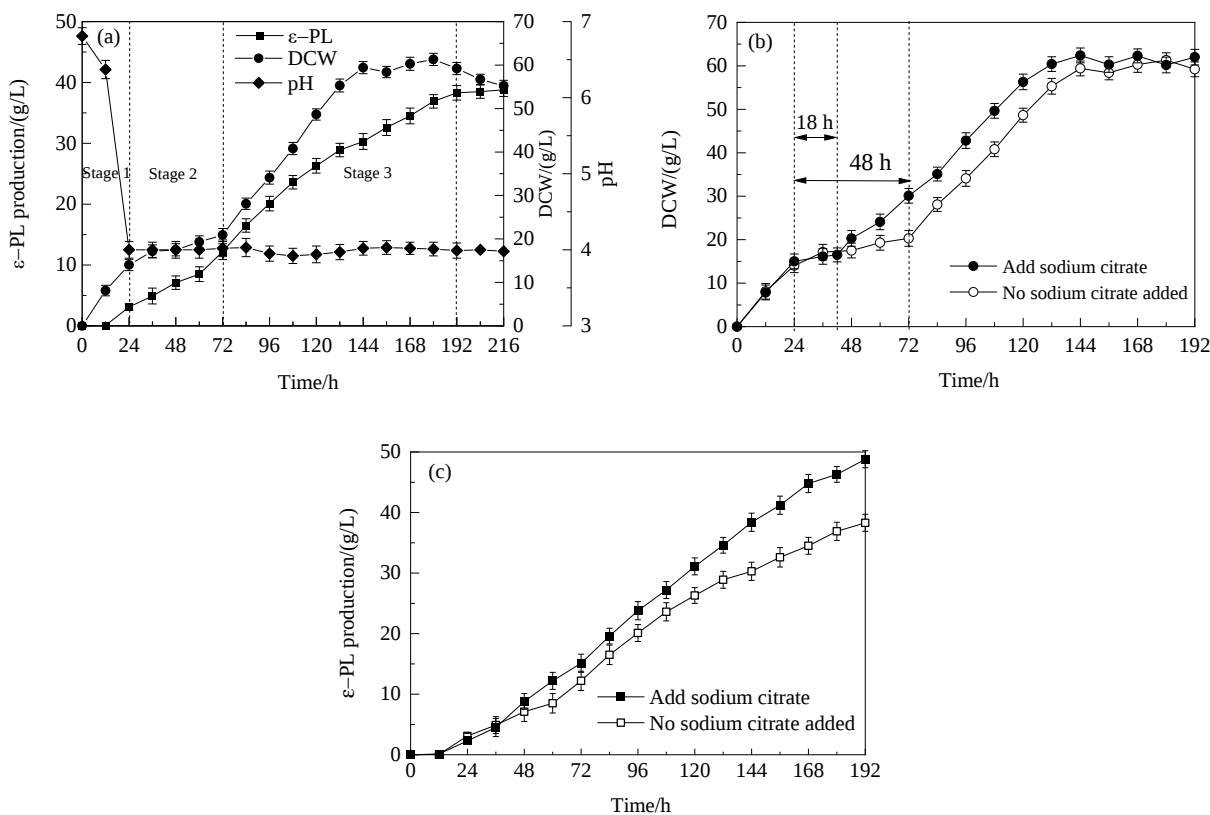


图4 ϵ -PL 生产阶段的划分及柠檬酸钠对发酵过程的影响

Fig.4 The division of ϵ -PL production stage and the effect of sodium citrate on fermentation process

表2 不同pH值对于菌体生长和产物合成的影响

Table 2 Effects of pH values on microorganism growth and product synthesis

Parameter	pH=4.0	pH=3.9	pH=3.8	pH=3.7
NH ₄ ⁺ -N consumption/(g/L)	17.2±0.3	16.8±0.3	15.3±0.2	9.4±0.4
Maximum dry cell weight (DCW)/(g/L)	60.2±1.4	59.3±1.0	58.0±1.3	51.2±1.5
Carbon consumption/(g/L)	418.2±3.1	413.1±3.5	416.3±2.8	294.1±2.1
ε-PL production/(g/L)	41.8±0.7	44.9±1.1	48.3±0.8	35.3±1.3
Carbon consumption rate/[g/(L·h)]	2.18±0.04	2.15±0.06	2.07±0.04	1.53±0.03
ε-PL productivity/[g/(L·d)]	5.23±0.04	5.61±0.06	6.04±0.08	4.41±0.04
Yield of ε-PL on DCW/(g/g)	0.69±0.01	0.76±0.02	0.83±0.02	0.69±0.01

3.3.2 溶氧调控策略对于菌体生长的影响

在发酵过程中除了pH调控外,氧的供给也极大地影响ε-PL的合成^[24]。因为ε-PL的生产是一个高耗能的过程,在发酵过程中需供给充足的氧气,但过高的溶氧所产生的活性氧(ROS)会损伤细胞^[25]。因此还需对发酵过程中的溶氧调控策略进行优化使其在菌体生长和产物合成中达到平衡。将产物合成阶段的DO值控制在三个不同水平(25%, 30%, 35%)进行发酵。结果如图5所示,在溶氧30%的条件下,ε-PL的产量、碳源的消耗

速率、DCW分别达到52.0 g/L, 2.23 g/(L·d), 61.3 g/L相较于DO为25%时分别提高了7.6%, 33.5%, 5.3%;但相较于DO为35%时ε-PL的产量提高了18.2%,碳源的消耗速率、DCW分别降低了13.5%, 5.1%。从中可以推测,当溶氧控制在30%,发酵过程中所含的氧可以使产物的合成与菌体的生长达成动态平衡,从而进一步提高ε-PL产量。除此之外考虑到发酵过程中转速过高产生的剪切力对于菌体的损伤,于是在产物合成阶段采用转速与通气有规律的间歇性交替升高的调控方式将溶氧控制在30%,以减少搅拌的剪切力对于菌体的损伤。即在发酵过程中当转速上升100 r/min后通过调节通气来使溶氧维持在30%,当通气升高0.5 vvm后改用调节转速来维持溶氧,如此反复直至转速升至800 r/min,通气升至2.5 vvm。

经过之前实验确定了ε-PL最优的发酵条件:(1)采用双碳源的调控策略,葡萄糖与蔗糖的比例为7:3;(2)在酸抑制阶段外源添加1 g/L柠檬酸钠,在产物合成阶段将pH控制在3.8用于调控产物的合成;(3)在产物合成阶段通过转速与通气的间歇性交替调控将溶氧控制在30%。在此最优条件下分批补料发酵,在发酵192 h后ε-PL产量、生产强度、单位细胞合成能力分别达到了

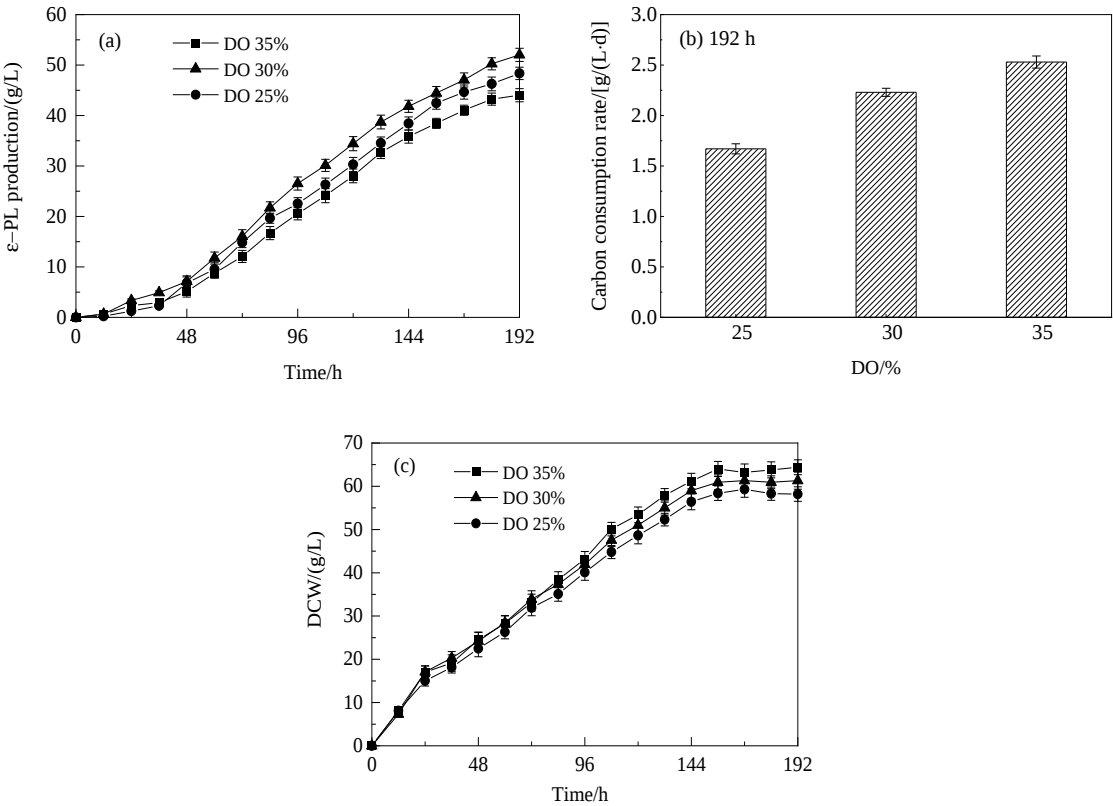


图5 溶氧对于菌体生长、碳源消耗速率、ε-PL合成的影响
Fig.5 Effects of DO on cell growth, carbon consumption rate and ε-PL production

55.3 g/L, 6.88 g/(L·d), 0.90 g/g。较优化前分别提升了 44.3%, 43.6%, 36.4% (表 3)。

表 3 优化前后发酵参数比较
Table 3 Comparison of fermentation parameters before and after optimization

Parameter	Before optimization (A)	After optimization (B)	Change, (B/A-1)×100%
NH ₄ ⁺ -N consumption/(g/L)	11.7±0.2	15.3±0.2	30.8%
Maximum dry cell weight (DCW)/(g/L)	58.4±1.3	61.3±1.3	5.0%
Carbon consumption/(g/L)	398.2±1.2	496.2±1.7	24.6%
ϵ -PL production/(g/L)	38.3±1.2	55.3±1.5	44.3%
Carbon consumption rate/[g/(L·h)]	2.05±0.02	2.58±0.01	25.9%
ϵ -PL productivity/[g/(L·d)]	4.79±0.12	6.88±0.31	43.6%
Yield of ϵ -PL on DCW/(g/g)	0.66±0.01	0.90±0.02	36.4%
Range of pH	6.80~4.00	6.80~3.80	—
Range of DO/%	100~20	100~30	—

3.3.3 500 L 罐的放大实验

为了证明该菌株的工业化潜力,在 500 L 发酵罐中进行放大实验,结果如图 6 所示。在最优条件下发酵,其中当初糖快消耗完时将葡萄糖含量控制在 7 g/L 左右,蔗糖含量控制在 3 g/L 左右。在发酵 192 h 后菌体干重达到 60.2 g/L, ϵ -PL 的产量为 53.0 g/L,生产强度、单位细胞合成能力分别达到 6.63 g/(L·d), 0.88 g/g,相比于原始菌株(菌体干重 55.7 g/L、 ϵ -PL 产量 23.0 g/L、生产强度 2.87 g/(L·d)、单位细胞合成能力 0.403 g/g)分别提高了 8.1%, 130%, 131%, 118%。这与实验室 5 L 罐发酵水平相当,证明了该菌株与发酵调控策略的稳定性和工业化潜力。

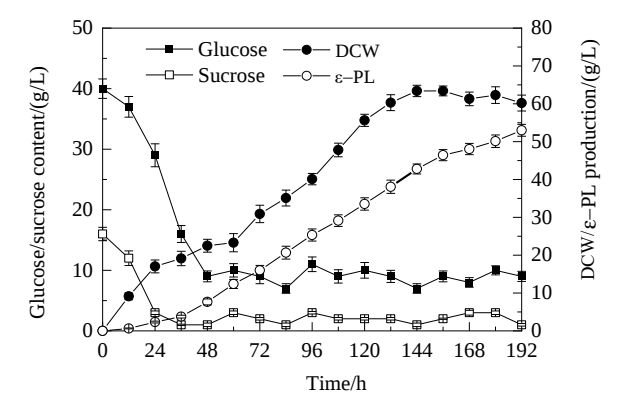


图 6 500 L 发酵罐放大实验
Fig.6 Enlargement experiment of 500 L fermenter

4 结 论

本研究中经过两轮 ARTP 诱变,以利福霉素为抗性筛子选育了一株高产菌株 *S. albulus* FMME-545RX。并在此基础上确立了突变株 *S. albulus* FMME-545RX 发酵生产 ϵ -PL 的最优条件,得到以下结论:

(1) 采用双碳源策略进行发酵,葡萄糖与蔗糖之间

比例为 7:3。
(2) 在酸抑制阶段外源添加 1 g/L 柠檬酸钠,在产物合成阶段将 pH 控制在 3.8 用来调控产物的合成。
(3) 在产物合成阶段通过转速与通气的间歇性交替调控将溶氧控制在 30%。并在 500 L 发酵罐中进行中试生产,发酵 192 h 后 ϵ -PL 的产量、生产强度、单位细胞合成能力分别达到了 53.0 g/L, 6.63 g/(L·d), 0.88 g/g。证明了该菌株与此调控策略的工业化潜力。

参考文献

[1] Chheda A H, Vernekar M R. A natural preservative ϵ -poly-L-lysine: fermentative production and applications in food industry [J]. International Food Research Journal, 2015, 22(1): 23-30.
[2] Pandey A K, Kumar A. Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-L-lysine [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(3): 496-505.
[3] Shih I L, Shen M H, Van Y T. Microbial synthesis of poly(ϵ -L-lysine) and its various applications [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(9): 1148-1159.
[4] Hiraki J, Hatakeyama M, Morita H, et al. Improved ϵ -poly-L-lysine production of an S- (2-aminoethyl) -L-cysteine resistant mutant of *Streptomyces albulus* [J]. Journal of Fermentation & Bioengineering, 1998, 76(12): 487-493.
[5] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2007, 71(6): 1373-1386.
[6] 王靓. ϵ -聚赖氨酸产生菌的育种、发酵及高产机制的初步生理解析 [D]. 无锡: 江南大学, 2018: 12-27.
Wang J. Study on breeding and fermentation of ϵ -poly-L-lysine producing strains and preliminary physiological analysis of the improved production [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018: 12-27.
[7] 谭之磊, 郭凤柱, 贾士儒, 等. 一种 ϵ -聚-L-赖氨酸的发酵生产工艺: CN 105368887B [P]. 2019-01-22.
[8] Xu D L, Yao H Q, Cao C H, et al. Enhancement of epsilon-poly-L-lysine production by overexpressing the ammonium transporter gene in *Streptomyces albulus* PD-1 [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(9): 1337-1345.
[9] Itzhaki R F. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine [J]. Analytical Biochemistry, 1972, 50(2): 569-574.

- [10] 张雪, 张晓菲, 邢新会, 等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展 [J]. 化工学报, 2014, 65(7): 2676–2684.
Zhang X, Zhang X F, Xing X H, et al. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma mutation breeding technology and its applications [J]. CIESC Journal, 2014, 65(7): 2676–2684.
- [11] Ottenheim C, Nawrath M, Wu J C. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): the latest development [J]. Bioresources & Bioprocessing, 2018, 5(1): 12.
- [12] 孔帅, 陈敏, 郑美娟, 等. 常温常压等离子体诱变选育高产L-异亮氨酸谷氨酸棒杆菌 [J]. 中国酿造, 2019, 38(7): 76–79.
Kong S, Chen M, Zheng M J, et al. Mutation breeding of high-yield L-isoleucine *Corynebacterium glutamicum* by atmospheric and room temperature plasmas mutagenesis [J]. China Brewing, 2019, 38(7): 76–79.
- [13] Liu H M, Jiang C Z, Lin J, et al. Genome shuffling based on different types of ribosome engineering mutants for enhanced production of 10-membered enediyne tiancimycin-A [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(10): 4359–4369.
- [14] Tanaka Y, Kasahara K, Hirose Y, et al. Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes [J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(13): 2959–2970.
- [15] Zhang Y H, Huang H M, Xu S S, et al. Activation and enhancement of fredericamycin A production in deepsea-derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 by using ribosome engineering and response surface methodology [J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 11.
- [16] Li S, Chen X, Dong C, et al. Combining genome shuffling and interspecific hybridization among *Streptomyces* improved epsilon-poly-L-lysine production [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(1): 338–350.
- [17] Harder W, Dijkhuizen L. Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences, 1982, 297 (1088): 459–480.
- [18] Kim Y S, Lee J H, Kim N H, et al. Increase of lycopene production by supplementing auxiliary carbon sources in metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(2): 489–497.
- [19] Pan L, Chen X S, Wang K F, et al. Understanding high epsilon-poly-L-lysine production by *Streptomyces albulus* using pH shock strategy in the level of transcriptomics [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(12): 1781–1792.
- [20] Wang L, Li S, Zhao J J, et al. Efficiently activated ϵ -poly-L-lysine production by multiple antibiotic-resistance mutations and acidic pH shock optimization in *Streptomyces albulus* [J]. Microbiology Open, 2018, 8(5): e00728.
- [21] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement of ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 91: 190–194.
- [22] Lee K, Lee H G, Pi K, et al. Effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* [J]. Proteomics, 2008, 8(8): 1624–1630.
- [23] Kang T S, Korber D R, Tanaka T. Contributions of citrate in redox potential maintenance and ATP production: metabolic pathways and their regulation in *Lactobacillus panis* PM1 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(19): 8693–8703.
- [24] Bankar S B, Singhal R S. Improved poly-epsilon-lysine biosynthesis using *Streptomyces noursei* NRRL 5126 by controlling dissolved oxygen during fermentation [J]. Journal of Microbiology Biotechnology, 2011, 21(6): 652–658.
- [25] 燕国梁, 华兆哲, 堵国成, 等. 不同活性氧胁迫下 *Bacillus sp.* F26 以抗氧化物酶合成为特征的应激响应 [J]. 生物工程学报, 2008, (4): 627–634.
Yan G L, Hua Z Z, Du G C, et al. Response of *Bacillus sp.* F26 to different reactive oxygen species stress characterized by antioxidative enzymes synthesis [J]. Journal of Biological Engineering, 2008, (4): 627–634.