



(21) 申请号 202411591185.8

(22) 申请日 2024.11.08

(71) 申请人 广州青囊生物科技有限公司

地址 510765 广东省广州市黄埔区连云路
388号22栋中科院长春应化所黄埔先
进材料研究院园区1101-03

申请人 广州梵之容化妆品有限公司

(72) 发明人 李燕 李安章 吴学明 侯森

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202

专利代理师 许羽冬

(51) Int. Cl.

C12N 1/38 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

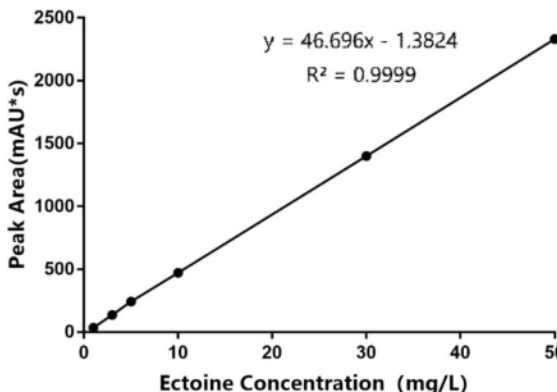
权利要求书1页 说明书14页 附图4页

(54) 发明名称

一种产依克多因工程菌株的发酵培养基、发
酵方法及应用

(57) 摘要

本发明属于微生物发酵技术领域,公开了一种产依克多因工程菌株的发酵培养基、发酵方法及应用。本发明的产依克多因工程菌株的发酵培养基包括以下组分:葡萄糖5g/L-35g/L,蛋白胨5g/L-30g/L,酵母浸粉5g/L-30g/L,天冬氨酸钠20mM-250mM,硫酸铵2g/-12g/L,磷酸二氢钾5g/L-10g/L,磷酸氢二钾10g/L-18g/L,硫酸镁0.5g/L-2g/L,一水柠檬酸0.5g/L-2g/L,复合维生素B0.05g/L-0.5g/L。本发明的发酵方法采用同时流加碳源与氮源的双流加方式补料,发酵罐水平的依克多因产量显著提高,为依克多因工业化规模的生产提供技术支持。



1. 一种产依克多因工程菌株的发酵培养基,其特征在于,包括以下组分:

葡萄糖5g/L-35g/L,蛋白胨5g/L-30g/L,酵母浸粉5g/L-30g/L,天冬氨酸钠20mM-250mM,硫酸铵2g/-12g/L,磷酸二氢钾5g/L-10g/L,磷酸氢二钾10g/L-18g/L,硫酸镁0.5g/L-2g/L,一水柠檬酸0.5g/L-2g/L,复合维生素B0.05g/L-0.5g/L。

2. 根据权利要求1所述的发酵培养基,其特征在于,发酵培养基还包括微量元素;所述微量元素包括以下组分:

硫酸锰0.5g/L-2g/L,硫酸亚铁5g/L-10g/L,氯化钴0.5g/L-1.5g/L,氯化锌2g/L-5g/L,钼酸钠0.05g/L-0.5g/L,氯化钙0.5g/L-1.5g/L,2mol/L-8mol/L的HCl溶液。

3. 根据权利要求1所述的发酵培养基,其特征在于,所述发酵培养基的pH值为6-7.8。

4. 根据权利要求1所述的发酵培养基,其特征在于,包括以下组分:

葡萄糖20g/L-25g/L,蛋白胨15g/L-21.5g/L,酵母浸粉10g/L-11g/L,天冬氨酸钠100mM-200mM,硫酸铵2g/-6g/L,磷酸二氢钾5g/L-7g/L,磷酸氢二钾10g/L-14g/L,硫酸镁0.5g/L-1g/L,一水柠檬酸0.5g/L-1.1g/L,复合维生素B0.05g/L-0.1g/L。

5. 一种产依克多因工程菌株的发酵方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将所述产依克多因工程菌株活化、培养,得活化菌液;

(2) 转接所述活化菌液至种子培养基中培养,得种子液;

(3) 取所述种子液接种于权利要求1-4任一项所述的发酵培养基中发酵。

6. 根据权利要求5所述的发酵方法,其特征在于,在步骤(3)中:所述发酵的条件为:温度35℃-40℃,起始转速150rpm-250rpm,起始风量为50L/min-150L/min;pH值控制为6.5-7.5;关联转速200rpm-800rpm。

7. 根据权利要求5所述的发酵方法,其特征在于,在步骤(3)中:所述发酵的时间为36h-72h。

8. 根据权利要求5所述的发酵方法,其特征在于,在步骤(3)中:所述发酵时溶氧量 $\geq 20\%$ 。

9. 根据权利要求8所述的发酵方法,其特征在于,所述溶氧量低于70%时开始流加30%-40%浓度的葡萄糖控制发酵液中残糖为1g/L-5g/L,流加15%-25%浓度的蛋白胨0-160mL/h。

10. 权利要求1-4任一项所述的发酵培养基,权利要求5-9任一项所述的发酵方法在依克多因工业化规模生产中的应用。

一种产依克多因工程菌株的发酵培养基、发酵方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物发酵技术领域,具体涉及一种产依克多因工程菌株的发酵培养基、发酵方法及应用。

背景技术

[0002] 依克多因(Ectoine)是作为一种两性离子型氨基酸衍生物,属于极端酶组分。Ectoine强烈亲水,水分子络合能力强,能够紧密地捕捉并有序结构化周围的游离水分子,形成独特的“Ectoine-水复合物”。这一复合体宛如一层细腻的、兼具保护、滋养与稳定功能的水合壳,紧紧环绕在细胞、酶、蛋白质和其他关键生物分子的周围,从而维持细胞的渗透压平衡。其对高温炙烤、干燥侵袭、射线辐射或严寒冷冻等极端环境条件下的细胞内蛋白质、酶、核酸等生物活性物质起保护作用,抵御外界恶劣条件侵害。因此,依克多因在对抗环境压力对皮肤造成的损伤方面展现出显著效果,促进皮肤损伤的自然修复过程,为肌肤健康筑起一道坚实的防线。目前,依克多因被公认为一种卓越的生物功能稳定,同时具有修复、抗皱、美白、抗炎、防紫外线、抗氧化应激、长效保湿等显著皮肤保护功效已在护肤品、医药等领域广泛应用。依克多因在化妆品中推荐用量较大(约2%),彰显其市场潜力与需求,但造成了该成分在化妆品使用成本较高,限制扩大应用。

[0003] 当前依克多因发酵技术领域主要使用两种发酵工艺:一是利用野生菌株“高盐诱导合成-低盐释放”的“细胞挤奶法”发酵生产工艺来生产依克多因;但该方法对设备要求高且工艺复杂难度大且产量低,如中国发明专利文献CN117070397A公开了一种培养基及利用其发酵生产依克多因的方法,使用高浓度的NaCl刺激细胞产生依克多因,发酵周期长、依克多因产量低,限制依克多因工业化大规模生产中的实际应用和可行性。另一种工艺是构建依克多因工程菌种,优化代谢途径,进行发酵培养基配方优化和发酵条件优化生产依克多因。碳源、氮源、无机盐、生长因子等是微生物发酵培养体系的重要成分,微生物发酵培养体系种类多,成分和配比直接影响菌株的生长速度和代谢产物的产量,如中国发明专利文献CN115651943A公开了一种小分子氨基酸衍生物依克多因的发酵制备方法,该方法仅用谷氨酸钠作为碳源,未进行发酵条件的优化,且发酵时间长,产量低。

[0004] 因此,亟待研发新的依克多因发酵生产工艺,以期克服现有技术中微生物发酵依克多因产量较低,生产周期长,生产成本高的问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术中微生物发酵依克多因产量较低,生产周期长,生产成本高的不足之处,而提供一种产依克多因工程菌株的发酵培养基、发酵方法及应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案如下:

[0007] 第一方面,本发明提供了一种产依克多因工程菌株的发酵培养基,包括以下组分:

[0008] 葡萄糖5g/L-35g/L,蛋白胨5g/L-30g/L,酵母浸粉5g/L-30g/L,天冬氨酸钠20mM-250mM,硫酸铵2g/L-12g/L,磷酸二氢钾5g/L-10g/L,磷酸氢二钾10g/L-18g/L,硫酸镁0.5g/L

L-2g/L,一水柠檬酸0.5g/L-2g/L,复合维生素B0.05g/L-0.5g/L。

[0009] 本发明的发酵培养基基于大肠杆菌依克多因的代谢特点设计,采用本发明所述产依克多因工程菌株的发酵培养基做发酵小试得到依克多因试验组的依克多因平均产量48.36g/L,较基础培养体系(22.19g/L)分别提高54.12%,直接且显著地影响着依克多因的产量。

[0010] 作为本发明所述的发酵培养基的优选实施方式,发酵培养基还包括微量元素;所述微量元素包括以下组分:

[0011] 硫酸锰0.5g/L-2g/L,硫酸亚铁5g/L-10g/L,氯化钴0.5g/L-1.5g/L,氯化锌2g/L-5g/L,钼酸钠0.05g/L-0.5g/L,氯化钙0.5g/L-1.5g/L,2mol/L-8mol/L的HCl溶液。

[0012] 作为本发明所述的发酵培养基的优选实施方式,所述发酵培养基的pH值为6-7.8。

[0013] 作为本发明所述的发酵培养基的优选实施方式,包括以下组分:

[0014] 葡萄糖20g/L-25g/L,蛋白胨15g/L-21.5g/L,酵母浸粉10g/L-11g/L,天冬氨酸钠100mM-200mM,硫酸铵2g/-6g/L,磷酸二氢钾5g/L-7g/L,磷酸氢二钾10g/L-14g/L,硫酸镁0.5g/L-1g/L,一水柠檬酸0.5g/L-1.1g/L,复合维生素B0.05g/L-0.1g/L。

[0015] 第二方面,本发明提供了一种产依克多因工程菌株的发酵方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 将所述产依克多因工程菌株活化、培养,得活化菌液;

[0017] (2) 转接所述活化菌液至种子培养基中培养,得种子液;

[0018] (3) 取所述种子液接种于上述的发酵培养基中发酵。

[0019] 作为本发明所述的发酵方法的优选实施方式,在步骤(3)中:所述转接时的接种量为1%-10%;优选的,接种量为6%-10%。

[0020] 作为本发明所述的发酵方法的优选实施方式,在步骤(3)中:所述发酵的条件为:温度35℃-40℃,起始转速150rpm-250rpm,起始风量为50L/min-150L/min;pH值控制为6.5-7.5;关联转速200rpm-800rpm。

[0021] 作为本发明所述的发酵方法的优选实施方式,在步骤(3)中:所述发酵的时间为36h-72h。优选的,发酵的时间为52h-68h。

[0022] 作为本发明所述的发酵方法的优选实施方式,在步骤(3)中:所述发酵时溶氧量 $\geq$ 20%。

[0023] 作为本发明所述的发酵方法的进一步优选实施方式,所述溶氧量低于70%时开始流加30%-40%浓度的葡萄糖控制发酵液中残糖为1g/L-5g/L,流加15%-25%浓度的蛋白胨0-160mL/h。

[0024] 本发明的发酵方法采用同时流加碳源与氮源的双流加方式补料,发酵罐水平的依克多因产量显著提高,尤其是当溶氧低于70%时开始流加40%浓度的葡萄糖全程控制残糖2g/L并开始恒速流加20%蛋白胨160mL/h,发酵52h,依克多因产量为176.32g/L。

[0025] 第三方面,本发明将所述的发酵培养基,所述的发酵方法在依克多因工业化规模生产中应用。

[0026] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0027] 本发明通过碳源、氮源以及生长因子筛选优化依克多因最适发酵培养基,优化发酵条件,在单因素实验基础上,结合Plackett-Burman实验和最陡爬坡实验,利用响应面法进行优化发酵体系。发酵罐水平上采用双流加发酵补料工艺放大发酵过程提高依克多因产

量。本发明的依克多因工程菌株发酵过程中不需要添加价格高昂IPTG等诱导剂来诱导菌株生产依克多因也避免引入有毒物质,通过模型分析避免不必要的营养成分添加,优化了发酵体系,大大降低了生产成本以及采用双流加发酵补料工艺为依克多因工业化规模的生产提供技术支持。本发明为依克多因工业化规模的生产提供技术支持。

附图说明

- [0028] 图1为依克多因的标准曲线;
- [0029] 图2为蛋白胨和葡萄糖交互作用对依克多因产量影响的响应曲面及等高线图;
- [0030] 图3为葡萄糖和酵母浸粉交互作用对依克多因产量影响的响应曲面及等高线图;
- [0031] 图4为初始pH值和葡萄糖交互作用对依克多因产量影响的响应曲面及等高线图;
- [0032] 图5为酵母浸粉和蛋白胨交互作用对依克多因产量影响的响应曲面及等高线图;
- [0033] 图6为初始pH值和蛋白胨交互作用对依克多因产量影响的响应曲面及等高线图;
- [0034] 图7初始pH值和酵母浸粉交互作用对依克多因产量影响的响应曲面及等高线图。

具体实施方式

[0035] 除非另有说明,本文使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员所通常理解的含义。

[0036] 术语“包括”指包括所述的要素、整数或步骤,但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在文中,当使用术语“包括”时,除非另有指明,否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如,当提及“包括”某个或某些组分的培养基时,也旨在涵盖由具体某个或某些组分组成的培养基。

[0037] 提及产依克多因工程菌株的情况下,所述工程菌株的出发菌株为能够产生依克多因或其下游衍生物的大肠杆菌;所述工程菌株为将依克多因代谢通路的相关基因的突变所得到的基因工程菌株;所述的突变包括通过基因缺失、基因插入或基因取代导致的基因功能至少部分失活的方式。本发明的发酵培养基和发酵工艺基于大肠杆菌依克多因的代谢特点设计,能够显著提升依克多因工程菌株的依克多因产量,包括大肠杆菌*Escherichia coli* ECT-W020 (GDMCCNo:65012) 菌株、大肠杆菌*Escherichia coli* ET08菌株、大肠杆菌*Escherichia coli* ET11菌株(参照Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Ectoine Production With a Fermentation Strategy of Supplementing the Amino Donor.Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.2022)、大肠杆菌*Escherichia coli* MWZ003菌株(参照Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient ectoine production.Systems Microbiology and Biomanufacturing.2021)等等。

[0038] 为更好地说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。本领域技术人员应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0039] 实施例中所用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。本发明以产依克多因工程菌株大肠杆菌*Escherichia coli* ET11为例说明。

[0040] 下述实施例中,发酵液中依克多因浓度的测试方法为:

[0041] (1) 含依克多因培养基发酵液样品前处理

[0042] 发酵液加入三倍体积的无水乙醇。摇晃反应30min, 高速离心10min, 转速为6000r/min, 除去沉淀, 取上清, 氮吹去除溶剂, 加入无水乙醇超声溶解15min。高速离心10min, 转速为6000r/min, 除去沉淀取上清, 氮吹, 加入水涡旋溶解, 使用HPLC进行检测。

[0043] (2) 依克多因HPLC检测条件

[0044] 色谱柱: ZORBAX StableBond aq(4.6×250mm, 5μm);

[0045] 流动相: 100%的0.02M磷酸二氢钾;

[0046] 流速: 0.5mL/min;;

[0047] 上样量: 10μL;

[0048] 柱温: 25℃;

[0049] 检测波长: 210nm;

[0050] 洗脱方式: 等度洗脱。

[0051] (3) 依克多因标准曲线

[0052] 将500mg依克多因的标准品用水溶液溶解并定容至5mL, 配制100mg/mL依克多因母液, 4℃避光保存。

[0053] 将浓度为100mg/mL的依克多因母液, 用水稀释, 分别配成1mg/mL, 3mg/mL, 5mg/mL, 10mg/mL, 30mg/mL、50mg/mL的系列标准工作液, 0.22μm滤膜过滤, HPLC检测。以依克多因标准工作液浓度为横坐标, 以依克多因的HPLC峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线(见图1)。

[0054] 在该检测方法, 依克多因在5-100μg/mL的浓度范围呈线性关系, 得到的标准曲线方程为 $y = 46.696 \cdot x - 1.3824$, 相关系数 $R^2 = 0.9999$, 表明依克多因浓度可使用标准曲线对样品中依克多因浓度进行定量。

[0055] 实施例1: 产依克多因大肠杆菌工程菌株的发酵培养基

[0056] 1、培养基的配制

[0057] 氯霉素母液配制: 将0.34g氯霉素溶解于10mL无水乙醇中, 使用无菌有机滤膜过滤, 分装, -20℃保存。

[0058] LB平板: 酵母提取物5g/L, 胰蛋白胨10g/L, 氯化钠10g/L, 琼脂16g/L。pH 7.0±0.1, 121℃灭菌20min;

[0059] LB肉汤: 酵母提取物5g/L, 胰蛋白胨10g/L, 氯化钠10g/L。pH 7.0±0.1, 121℃灭菌20min;

[0060] 种子培养基: 葡萄糖20g/L, 酵母提取物5g/L, 胰蛋白胨10g/L, 氯化钠10g/L。pH 7.2±0.1, 121℃灭菌20min。

[0061] 基础发酵培养基: 葡萄糖20g/L, 酵母浸粉10g/L, 磷酸二氢钾7g/L, 磷酸氢二钾14g/L, 硫酸镁1g/L, 一水柠檬酸1.1g/L, 微量元素2mL/L(硫酸锰1.5g/L, 硫酸亚铁7g/L, 氯化钴0.8g/L, 氯化锌4g/L, 钼酸钠0.1g/L, 氯化钙1.1g/L, 溶于5mol/L HCl溶液)、0.1g/L复合维生素B, 121℃灭菌20min;

[0062] 以上培养基使用前, 添加氯霉素至终浓度为34μg/mL。

[0063] 2、依克多因培养基的组分优化实验

[0064] 菌株活化: 将保存的产依克多因工程菌株大肠杆菌接种在LB平板上活化, 37℃培养24h, 接单菌落到5mL的LB试管中, 37℃, 200rpm培养12h。

[0065] 种子液培养:转接1%活化后的菌液至种子培养基中装液体积50mL/250mL,37℃,200rpm培养16h。

[0066] 种子液按10%接种量接入含200mL基础发酵培养基的500mL摇瓶中,用NaOH调节初始pH 7.2,置于摇床培养箱设置发酵温度37℃,200rpm,摇床发酵43h。在基础发酵培养基基础上,分别考察下列因素对依克多因产量的影响。

[0067] 碳源种类筛选:实验设置以10g/L酵母浸粉为氮源,磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基;分别配制20g/L可溶性玉米淀粉、麦芽糊精、葡萄糖、蔗糖、甘油为碳源的这5种培养基,pH调制7.2。

[0068] 不同碳源的影响结果如表1所示,葡萄糖最有利于工程菌株合成依克多因,产量为16.52g/L。因此,选择葡萄糖作为碳源。

[0069] 表1不同碳源对依克多因产量的影响

[0070]	碳源种类	可溶性玉米淀粉	麦芽糊精	葡萄糖	蔗糖	甘油
	依克多因浓度 (g/L)	14.2	8.75	16.52	13.83	11.97

[0071] 有机氮源种类筛选:实验设置以20g/L葡萄糖为碳源,磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基;分别配制以10g/L酵母浸粉、玉米浆干粉、蛋白胨、牛肉膏、胰蛋白胨为有机氮源的这5种培养基,pH调制7.2。

[0072] 有机氮源的影响结果如表2所示,蛋白胨最有利于工程菌株合成依克多因,产量为20.85g/L。酵母浸粉次之,产量为18.26g/L。

[0073] 表2不同氮源对依克多因产量的影响

[0074]	氮源种类	酵母浸粉	玉米浆干粉	蛋白胨	牛肉膏	胰蛋白胨
	依克多因浓度 (g/L)	18.26	16.73	20.85	13.74	17.3

[0075] 单一氮源和组合氮源筛选:实验设置以20g/L葡萄糖为碳源,磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基;分别配制以10g/L酵母浸粉、10g/L蛋白胨、10g/L酵母浸粉+10g/L蛋白胨为有机氮源的这3种培养基,pH调制7.2。

[0076] 进一步筛选比较了蛋白胨、酵母浸粉、蛋白胨+酵母浸粉效果,发现蛋白胨+酵母浸粉搭配使用,效果比单一氮源效果更好。

[0077] 表3单一氮源和组合氮源对依克多因产量的影响

[0078]	氮源种类	酵母浸粉	蛋白胨	蛋白胨+酵母浸粉
	依克多因浓度 (g/L)	17.92	20.23	23.92

[0080] 无机氮源种类筛选:实验设置以20g/L葡萄糖为碳源,以10g/L蛋白胨和10g/L酵母浸粉为有机氮源,磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基;分别配制5g/L尿素、硫酸铵、碳酸氢铵、柠檬酸铵和亚硝酸钠为无机氮源

的5种培养基,pH调制7.2。

[0081] 无机氮源的影响结果如表4所示,硫酸铵有利于工程菌株合成依克多因,产量为24.75g/L。

[0082] 表4无机氮源对依克多因产量的影响

[0083]	复合氮源	尿素	硫酸铵	碳酸氢铵	硝酸铵	亚硝酸钠
	依克多因浓度 (g/L)	18.84	24.75	17.68	9.28	0

[0084] 底物筛选:实验设置以20g/L葡萄糖为碳源,10g/L蛋白胨、10g/L酵母浸粉和5g/L硫酸铵为复合氮源,磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基;分别配制以50mM天冬氨酸钠、50mM富马酸钠和50mM二氨基丁酸为底物的三种培养基,pH调制7.2。

[0085] 底物的影响结果如表5所示,天冬氨酸钠作为底物时有利于工程菌株合成依克多因,产量为25.86g/L。

[0086] 表5底物对依克多因产量的影响

[0087]	底物	天冬氨酸钠	富马酸钠	二氨基丁酸
	依克多因浓度 (g/L)	25.86	18.29	23.93

[0088] 3、依克多因单因素优化实验

[0089] 葡萄糖添加量筛选:实验设置葡萄糖含量分别为5g/L、10g/L、15g/L、20g/L、25g/L、30g/L和35g/L,氮源为10g/L蛋白胨,10g/L酵母浸粉,5g/L硫酸铵,50mM天冬氨酸钠;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基,pH为7.2;

[0090] 不同葡萄糖含量的影响结果如表6所示,当葡萄糖浓度为25g/L,依克多因产量最高为28.64g/L。

[0091] 表6不同葡萄糖浓度对依克多因产量的影响

[0092]	葡萄糖浓度 (g/L)	5	10	15	20	25	30	35
	依克多因浓度 (g/L)	10.32	14.39	16.36	25.13	28.64	26.83	22.73

[0094] 蛋白胨添加量筛选:实验设置蛋白胨含量分别为5g/L、10g/L、15g/L、20g/L、25g/L和30g/L,葡萄糖为25g/L,10g/L酵母浸粉,5g/L硫酸铵,50mM天冬氨酸钠;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基,pH为7.2;

[0095] 不同蛋白胨含量的影响结果如表7所示,当蛋白胨浓度为20g/L,依克多因产量最高为31.83g/L。

[0096] 表7不同蛋白胨浓度对依克多因产量的影响

[0097]	蛋白胨浓度 (g/L)	5	10	15	20	25	30
	依克多因浓度 (g/L)	22.32	24.83	27.64	31.83	28.57	26.50

[0098] 酵母浸粉添加量筛选:实验设置酵母浸粉含量分别为5g/L、10g/L、15g/L、20g/L、25g/L和30g/L,葡萄糖为25g/L,蛋白胨为20g/L,5g/L硫酸铵,50mM天冬氨酸钠;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基,pH为7.2;

[0099] 不同酵母浸粉含量的影响结果如表8所示,当酵母浸粉浓度为10g/L,依克多因产量最高为33.26g/L。

[0100] 表8不同酵母浸粉浓度对依克多因产量的影响

[0101]	酵母浸粉浓度 (g/L)	5	10	15	20	25	30
	依克多因浓度 (g/L)	31.83	33.26	30.33	28.37	25.92	18.36

[0102] 硫酸铵添加量筛选:实验设置硫酸铵分别为2g/L、4g/L、6g/L、8g/L、10g/L和12g/L,葡萄糖为25g/L,蛋白胨含量为20g/L,酵母浸粉10g/L,50mM天冬氨酸钠;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基,pH为7.2;

[0103] 不同硫酸铵含量的影响结果如表9所示,当硫酸铵浓度为6g/L,依克多因产量最高为34.98g/L。

[0104] 表9不同硫酸铵浓度对依克多因产量的影响

[0105]	硫酸铵浓度 (g/L)	2	4	6	8	10	12
	依克多因浓度 (g/L)	33.52	34.94	34.24	33.33	32.03	31.68

[0107] 天冬氨酸钠添加量筛选:实验设置天冬氨酸钠含量为20mM、50mM、100mM、150mM、200mM和250mM,葡萄糖为25g/L,蛋白胨含量为10g/L,酵母浸粉10g/L,硫酸铵为6g/L;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基,pH为7.2;

[0108] 不同天冬氨酸钠含量的影响结果如表10所示,当天冬氨酸钠浓度为100mM,依克多因产量最高为36.28g/L。

[0109] 表10不同天冬氨酸钠浓度对依克多因产量的影响

[0110]	天冬氨酸钠浓度 (mM)	20	50	100	150	200	250
	依克多因浓度 (g/L)	27.64	31.73	36.28	35.41	30.03	25.69

[0111] 接种量筛选:实验设置接种量为1%、2%、4%、6%、8%和10%,葡萄糖为25g/L,蛋白胨含量为20g/L,酵母浸粉10g/L,硫酸铵为6g/L,天冬氨酸钠含量为100mM;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基,pH为7.2;

[0112] 不同接种量的影响结果如表11所示,当接种量为6%,依克多因产量最高为38.63g/L。

[0113] 表11不同接种量对依克多因产量的影响

[0114]	接种量 (%)	1	2	4	6	8	10
	依克多因浓度 (g/L)	14.73	23.69	35.94	38.63	37.89	36.51

[0115] 初始pH值筛选:实验设置pH值为6.0、6.6、7.2、7.8、8.4和9.0,葡萄糖为25g/L,蛋白胨含量为20g/L,酵母浸粉10g/L,硫酸铵为6g/L,天冬氨酸钠含量为100mM;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基,接种量为6%;

[0116] 不同pH值的影响结果如表12所示,当pH值为7.2,依克多因产量最高为37.51g/L。

[0117] 表12不同pH值对依克多因产量的影响

[0118]	初始 pH 值	6.0	6.6	7.2	7.8	8.4	9.0
[0119]	依克多因浓度 (g/L)	25.68	32.83	37.51	29.92	16.09	8.63

[0120] 发酵时间:实验设置发酵时间分别为0h、18h、24h、28h、43h、48h、52h和68h,葡萄糖为25g/L,蛋白胨含量为10g/L,酵母浸粉10g/L,硫酸铵为6g/L,天冬氨酸钠含量为100mM;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、一水柠檬酸、微量元素、复合维生素B同基础发酵培养基,接种量为6%,pH值为7.2;

[0121] 发酵时间的影响结果如表13所示,鉴于68h比52h多余发酵12h,依克多因产量只提高1.07g,发酵生产的生产成本与经济利益不平衡。依克多因工程菌株最佳发酵时间为52h,依克多因产量为45.76g/L。

[0122] 表13发酵时间对依克多因产量的影响

[0123]	时间 (h)	0	18	24	28	43	48	52	68
	依克多因浓度 (g/L)	0	12.93	18.25	21.27	38.12	42.69	45.76	46.83

[0124] 最后得到优化的培养基和发酵工艺,即将依克多因工程菌株以6%的接种量将种子液接种于优选发酵培养基中培养52h。

[0125] 优选发酵培养基配方为:葡萄糖25g/L,蛋白胨20g/L,酵母浸粉10g/L,硫酸铵为6g/L,天冬氨酸钠100mM,磷酸二氢钾7g/L,磷酸氢二钾14g/L,硫酸镁1g/L,一水柠檬酸1.1g/L,0.1g/L复合维生素B,微量元素2mL/L(硫酸锰1.5g/L,硫酸亚铁7g/L,氯化钴0.8g/L,氯化锌4g/L,钼酸钠0.1g/L,氯化钙1.1g/L,溶于5mol/L HCl溶液),初始pH值7.2,培养52h。

[0126] 4、依克多因响应面优化实验

[0127] 基于单因素试验结果,在基础发酵培养基的基础上,选取对结果影响较大的葡萄

糖(A)、蛋白胨(B)、酵母浸粉(C)和初始pH值(D)为考察因素,产依克多因工程菌株的依克多因含量(Y)为响应值,利用Design-Expert 8.0.6软件进行Box-Behnken设计4因素3水平的响应面试验,实验因素水平和实验设计方案如表14和表15所示:

[0128] 表14响应面实验因素水平设计

[0129]	因素	水平		
		-1	0	1
[0130]	A-葡萄糖 (g/L)	20	25	30
	B-蛋白胨 (g/L)	15	20	25
	C-酵母浸粉 (g/L)	5	10	15
	D-初始 pH 值	6.6	7.2	7.8

[0131] 表15响应面实验设计方案

[0132]

试验编号	A 葡萄糖 g/L	B 蛋白胨 g/L	C 酵母浸粉 g/L	D 初始 pH 值
1	1	0	1	0
2	0	0	-1	-1
3	0	0	1	-1
4	-1	0	0	1
5	1	0	0	-1
6	0	1	-1	0
7	0	-1	1	0
8	0	0	1	1
9	0	-1	0	1
10	0	0	0	0
11	0	-1	0	-1
12	-1	1	0	0
13	0	-1	-1	0
14	0	0	0	0
15	1	0	0	1
16	-1	0	0	-1
17	0	0	0	0
18	1	-1	0	0
19	-1	0	1	0
20	0	1	1	0
21	-1	-1	0	0
22	1	1	0	0
23	1	0	-1	0
24	-1	0	-1	0
25	0	0	-1	1
26	0	1	0	-1
27	0	1	0	1
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0

[0133] 采用Design-Expert 12软件对表16试验结果进行多元二次回归拟合,得到多元二次回归方程:

[0134] $Y =$

[0135] $-1312.86 + 5.69A + 8.636B + 1.902C + 329.72D - 0.055AB - 0.022AC + 0.54AD - 0.047BC - 0.148BD + 0.253CD - 0.164A^2 - 0.133B^2 - 0.1C^2 - 23.806D^2$ 。

[0136] 表16响应面设计试验结果

[0137]

试验号	A 葡萄糖 g/L	B 蛋白胨 g/L	C 酵母浸粉 g/L	D 初始 pH 值	依克多因产量 g/L
1	1	0	1	0	41.79
2	0	0	-1	-1	34.63
3	0	0	1	-1	36.44
4	-1	0	0	1	33.68
5	1	0	0	-1	34.29
6	0	1	-1	0	44.52
7	0	-1	1	0	42.73
8	0	0	1	1	37.73
9	0	-1	0	1	33.24
10	0	0	0	0	48.32
11	0	-1	0	-1	33.45
12	-1	1	0	0	42.69
13	0	-1	-1	0	38.68
14	0	0	0	0	47.82
15	1	0	0	1	38.78
16	-1	0	0	-1	35.67
17	0	0	0	0	46.73
18	1	-1	0	0	38.18
19	-1	0	1	0	41.8
20	0	1	1	0	43.82
21	-1	-1	0	0	35.64
22	1	1	0	0	39.78
23	1	0	-1	0	40.93
24	-1	0	-1	0	38.78
25	0	0	-1	1	32.89
26	0	1	0	-1	38.68
27	0	1	0	1	36.69
28	0	0	0	0	47.12
29	0	0	0	0	46.96

[0138] 表17响应面方差分析

[0139]

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	625.408	14	44.67200298	29.28604	< 0.0001	**
A-葡萄糖	14.32319	1	14.32319038	9.389987	0.00841	**
B-蛋白胨	35.04587	1	35.04587282	22.97535	0.00029	**
C-酵母浸粉	1.85393	1	1.853930385	1.215398	0.28886	
D-初始 pH	390.8558	1	390.8558394	256.237	< 0.0001	**
AB	7.425625	1	7.425625	4.868086	0.04456	*
AC	1.1664	1	1.1664	0.764668	0.39663	
AD	10.4976	1	10.4976	6.882009	0.02004	*
BC	5.640625	1	5.640625	3.697877	0.07506	
BD	0.7921	1	0.7921	0.519284	0.48301	
CD	2.295225	1	2.295225	1.504702	0.24018	

[0140]

A^2	108.5066	1	108.5065946	71.13468	< 0.0001	**
B^2	71.87401	1	71.87401014	47.11911	< 0.0001	**
C^2	40.50001	1	40.50001014	26.55097	0.00015	**
D^2	476.3994	1	476.3993514	312.3176	< 0.0001	**
总残差	21.35516	14	1.525368452			
失拟项	19.61196	10	1.961195833	4.50022	0.08011	
净误差	1.7432	4	0.4358			
总和	646.7632	28				

[0141] 注：“*”表示对结果影响显著 ($P < 0.05$)；“**”表示对结果影响极显著 ($P < 0.01$)。

[0142] 由表17可知,模型极显著 ($P < 0.0001$),失拟项P值为0.08,失拟项不显著 ($P > 0.05$),说明该模型拟合程度好,可靠性高。模型的决定系数 R^2 为0.9670,说明该模型自变量与因变量之间函数关系极显著,几乎不存在失拟现象说明回归方程和曲面有较好的拟合,可用于分析和预测依克多因产量。由P值可知,一次项A、B、D及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对依克多因产量影响极显著 ($P < 0.01$),交互项AB和BC对依克多因产量影响显著 ($P < 0.05$),其他项对结果影响不显著 ($P > 0.05$)。

[0143] 利用Design-Expert 12软件绘制各因素间交互作用对依克多因产量影响的响应曲面及等高线图,结果见图2-7。由图可知,葡萄糖和酵母浸粉、蛋白胨和初始pH值、酵母浸粉和初始pH值之间的交互作用较强,响应曲面呈凸形,抛物面更陡,等高线呈椭圆形,这与表16的方差分析结果一致。

[0144] 5、响应面优化验证

[0145] 使用Design-Expert 12软件对回归方程进行最优求解,得到最优发酵条件为葡萄糖25g/L,蛋白胨21.37g/L,酵母浸粉10.83g/L,初始pH值为7.2。为便于实际操作,将最优发酵条件调整为葡萄糖25g/L,蛋白胨21.5g/L,酵母浸粉11g/L,初始pH值为7.2。在此条件下进行4次验证试验,得到依克多因平均产量为48.36g/L,相对误差为1.73,与预测值相近,证明该模型是可靠有效的。

[0146] 为了将其与未优化的发酵培养基进行比较,以未优化的基础发酵培养基和发酵工艺为对照组(将依克多因工程菌株以10%的接种量将种子液接种于优选发酵培养基中培养43h,基础发酵培养基的配方为:葡萄糖20g/L,酵母浸粉10g/L,磷酸二氢钾7g/L,磷酸氢二钾14g/L,硫酸镁1g/L,一水柠檬酸1.1g/L,微量元素2mL/L(硫酸锰1.5g/L,硫酸亚铁7g/L,氯化钴0.8g/L,氯化锌4g/L,钼酸钠0.1g/L,氯化钙1.1g/L,溶于5mol/L HCl溶液)、0.1g/L复合维生素B。初始pH值7.2。),以响应面优化的培养基和发酵工艺为试验组(将依克多因工程菌株以6%的接种量将种子液接种于优选发酵培养基中培养52h,优选发酵培养基配方为:葡萄糖25g/L,蛋白胨21.5g/L,酵母浸粉11g/L,硫酸铵为6g/L,天冬氨酸钠100mM,磷酸二氢钾7g/L,磷酸氢二钾14g/L,硫酸镁1g/L,一水柠檬酸1.1g/L,0.1g/L复合维生素B,微量元素2mL/L(硫酸锰1.5g/L,硫酸亚铁7g/L,氯化钴0.8g/L,氯化锌4g/L,钼酸钠0.1g/L,氯化钙1.1g/L,溶于5mol/L HCl溶液),初始pH值7.2。)进行试验,比较。结果表明,试验组的依克多因产量48.36g/L,较对照组(22.19g/L)分别提高54.12%,说明此次的优化效果显著。

[0147] 实施例2:产依克多因工程菌株在200L发酵罐水平的发酵生产

[0148] 1、实验组1

[0149] 菌体活化:将依克多因工程菌株的甘油管种子在LB平板上划线活化,37℃培养24h,接单菌落到10mL的LB培养基中,37℃,200rpm培养12h。

[0150] 种子培养:转接1%一级种子液至800mL LB培养基中,37℃,200rpm培养16h。转接10%二级种子液至20L体积发酵罐装有10L灭好菌的种子培养基中,37℃,起始转速200rpm,起始风量为100L/min条件下培养6h后。

[0151] 发酵培养:转接6%种子液至200L体积发酵罐装有100L灭好菌的优选发酵培养基(葡萄糖25g/L,蛋白胨21.5g/L,酵母浸粉11g/L,硫酸铵为6g/L,天冬氨酸钠100mM,磷酸二氢钾7g/L,磷酸氢二钾14g/L,硫酸镁1g/L,一水柠檬酸1.1g/L,0.1g/L复合维生素B,微量元素2mL/L(硫酸锰1.5g/L,硫酸亚铁7g/L,氯化钴0.8g/L,氯化锌4g/L,钼酸钠0.1g/L,氯化钙1.1g/L,溶于5mol/L HCl溶液),初始pH值7.2)。发酵培养条件为:温度控制在37℃,起始转速200rpm,起始风量为100L/min条件下培养。发酵全程系统自动流加氨水控制pH在7.2,通过搅拌和改变通气量来维持溶氧不低于20%,关联转速200rpm-800rpm,发酵52h,通过每小时取样检测OD₆₀₀,菌体湿重量,残糖量,当溶氧低于70%时开始流加40%浓度(质量百分比)的葡萄糖,不流加蛋白胨,全程采用控制反馈调节补料速度控制发酵液中残糖2g/L。

[0152] 2、实验组2

[0153] 当溶氧低于70%时开始流加40%浓度的葡萄糖全程控制残糖5g/L,不流加蛋白胨,其他步骤参考实验组1。

[0154] 3、实验组3

[0155] 当溶氧低于70%时开始流加40%浓度的葡萄糖全程控制残糖1g/L,不流加蛋白胨,其他步骤参考实验组1。

[0156] 4、实验组4

[0157] 当溶氧低于70%时开始流加40%浓度的葡萄糖全程控制残糖2g/L并开始恒速流加20%蛋白胨80mL/h,其他步骤参考实验组1。

[0158] 5、实验组5

[0159] 当溶氧低于70%时开始流加40%浓度的葡萄糖全程控制残糖2g/L并开始恒速流加20%蛋白胨160mL/h,其他步骤参考实验组1。

[0160] 6、实验组6

[0161] 当溶氧低于70%时开始流加40%浓度的葡萄糖全程控制残糖2g/L并开始恒速流加20%蛋白胨240mL/h,其他步骤参考实验组1。

[0162] 各实验组的发酵液的OD₆₀₀、依克多因产量、菌体湿重比较如表18所示。

[0163] 表18各实验组的OD₆₀₀、依克多因产量、菌体湿重比较

[0164]	实验分组	OD600	依克多因产量 (g/L)	菌体湿重 (g/L)
	实验组 1	128	136.68	248
	实验组 2	112	113.46	218
	实验组 3	119	125.29	224
	实验组 4	135	145.35	270
	实验组 5	157	176.32	312
	实验组 6	133	157.89	282

[0165] 通过实验组1、实验组2和实验组3的对比分析可以得出依克多因工程菌株的生长性能和成产性能与葡萄糖含量有很大的关系,当葡萄糖含量低时,碳源的缺乏导致菌体活力下降,相反残糖量过高会导致高渗透压进而影响菌体的生长和生产性能。其中实验组1,当溶氧低于70%时开始流加40%浓度的葡萄糖全程控制发酵液中残糖2g/L时,工程菌株发酵OD₆₀₀值达到119,依克多因产量为136.68g/L,发酵性能最佳。

[0166] 分析实验组1、实验组4、实验组5和实验组6的比较得出双流加补充碳源与氮源,且碳氮比对依克多因产量有积极的影响。实验组6中,氮源比例过多,会使菌体生长过于旺盛,pH偏高,不利于代谢产物的积累,氮源不足,则菌体繁殖量少,影响依克多因的产量。实验组4中,碳源比例过多,则容易形成较低的pH,若碳源不足,易引起菌体衰老和自溶。其中实验组5中,当溶氧低于70%时开始流加40%浓度的葡萄糖全程控制残糖2g/L并开始恒速流加20%蛋白胨160mL/h,依克多因产量为176.32g/L,发酵性能最佳。此外,实验组5与实验组1比较,依克多因产量提高32.89%。

[0167] 本发明的发酵工艺中无需使用IPTG等诱导剂诱导菌株表达依克多因合成,避免了IPTG成本高且具有毒性不适用于工业化发酵生产依克多因的问题。本发明的发酵工艺大大降低了每升培养基的成本及缩有效减短了发酵时间,为实现工业化生产提供技术支持。

[0168] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

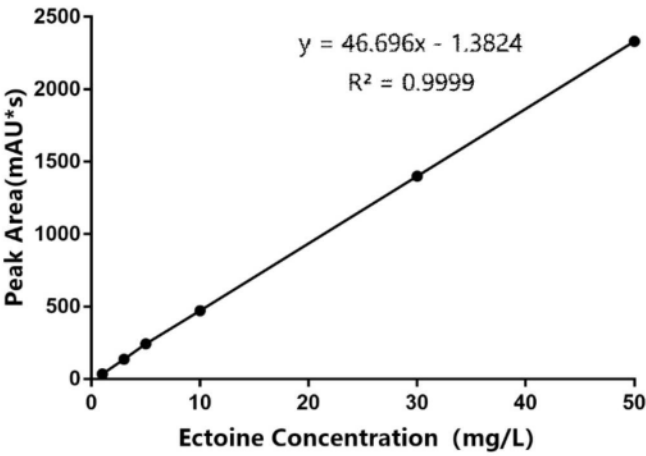


图1

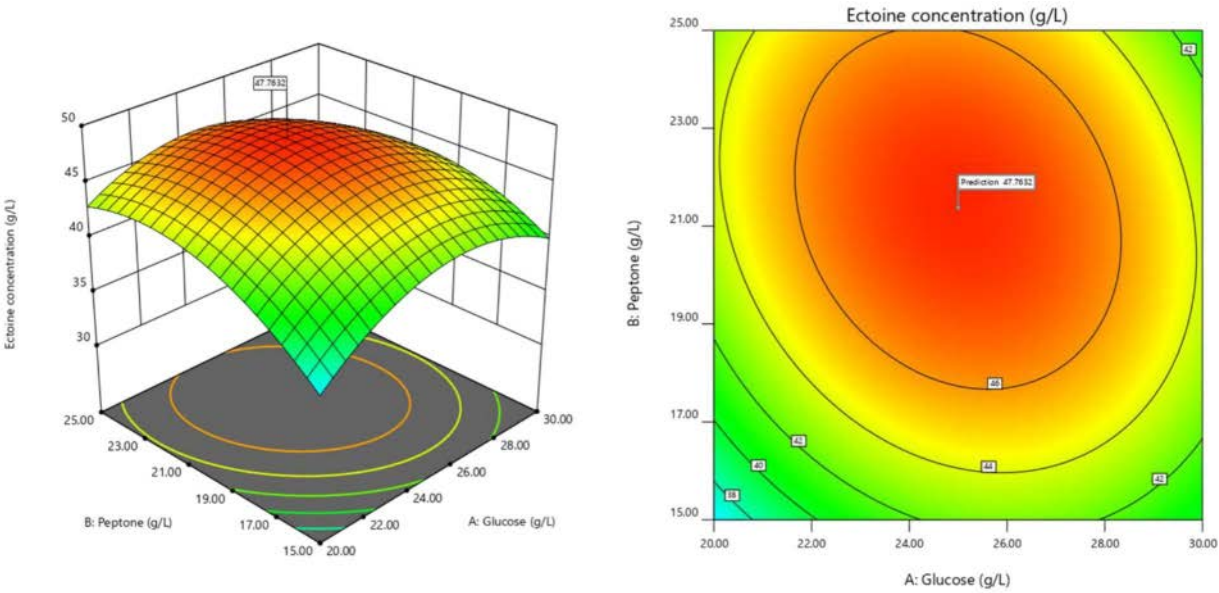


图2

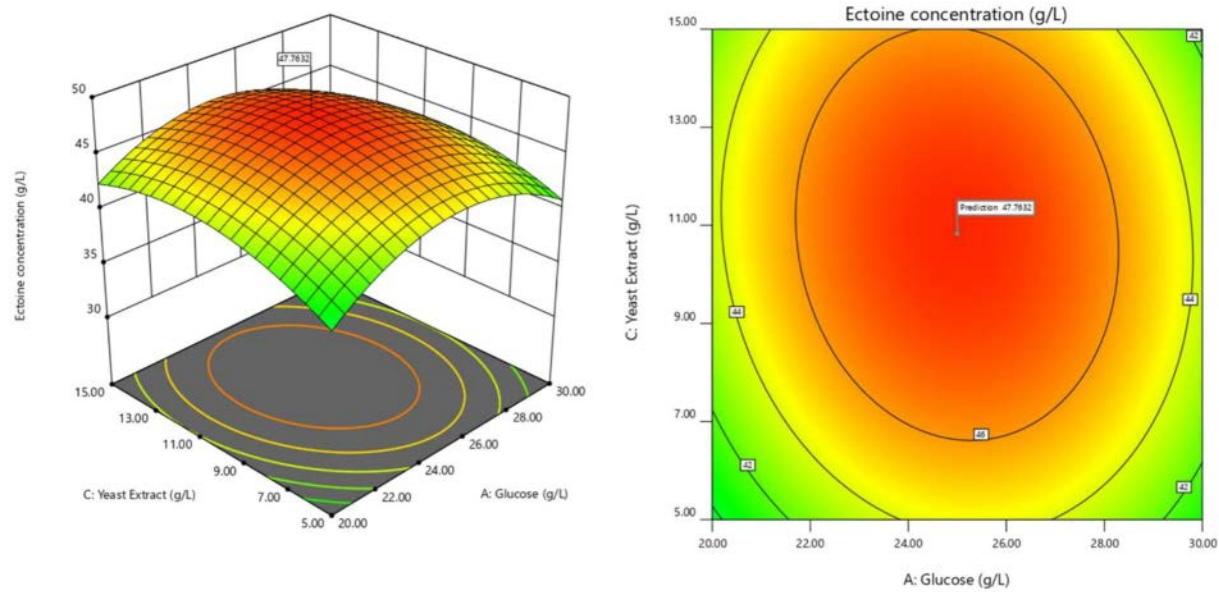


图3

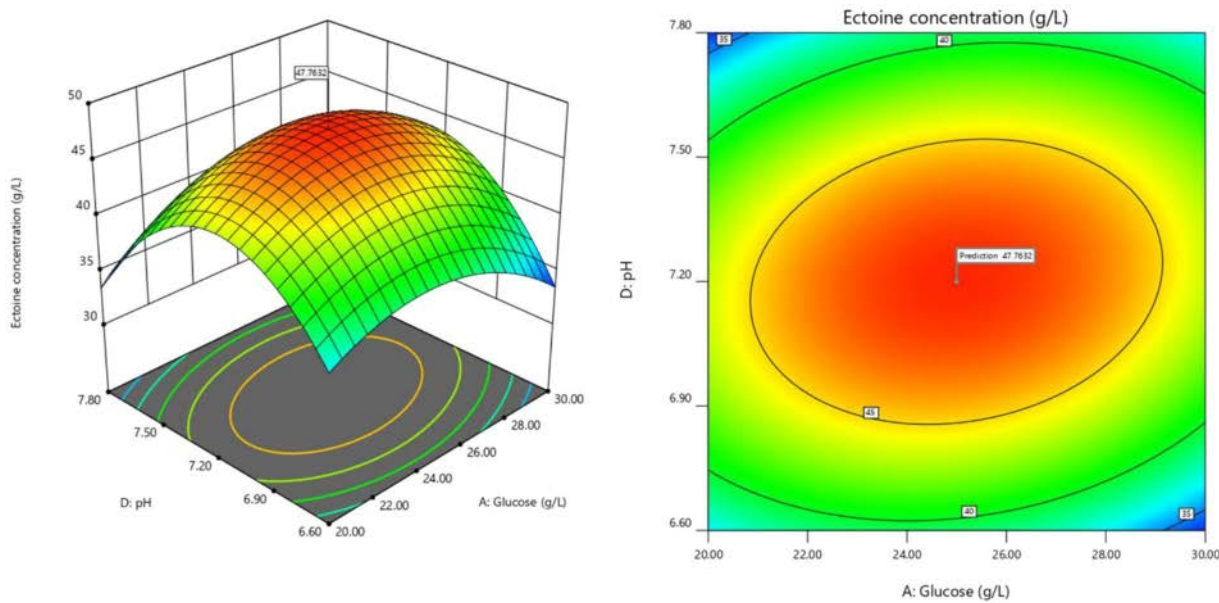


图4

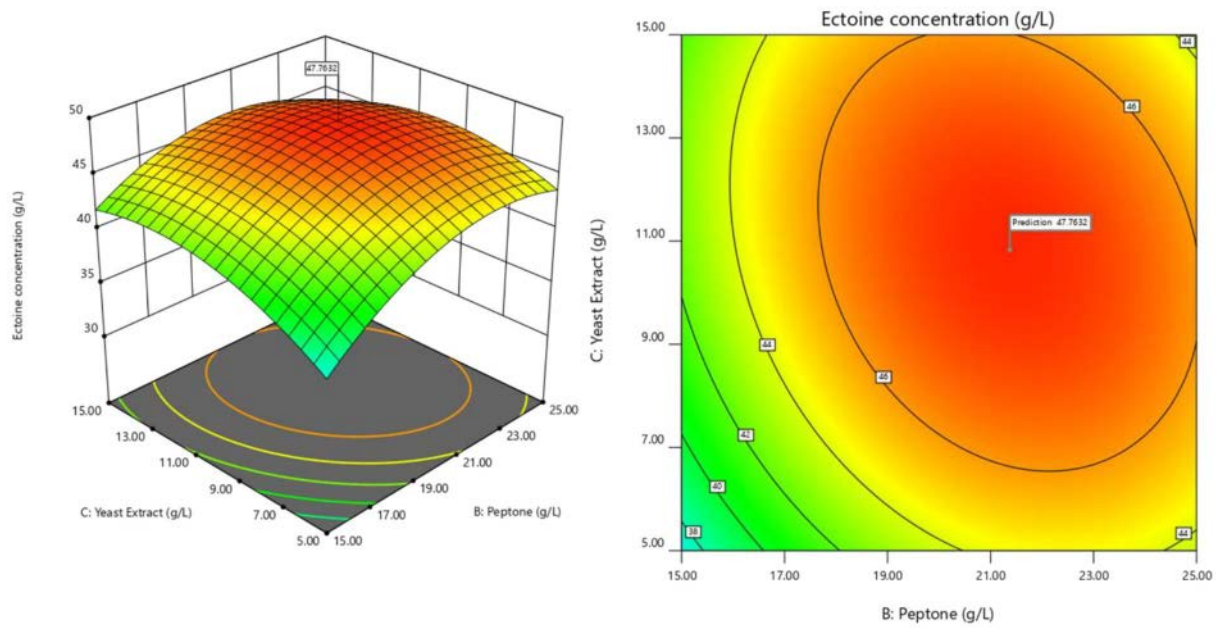


图5

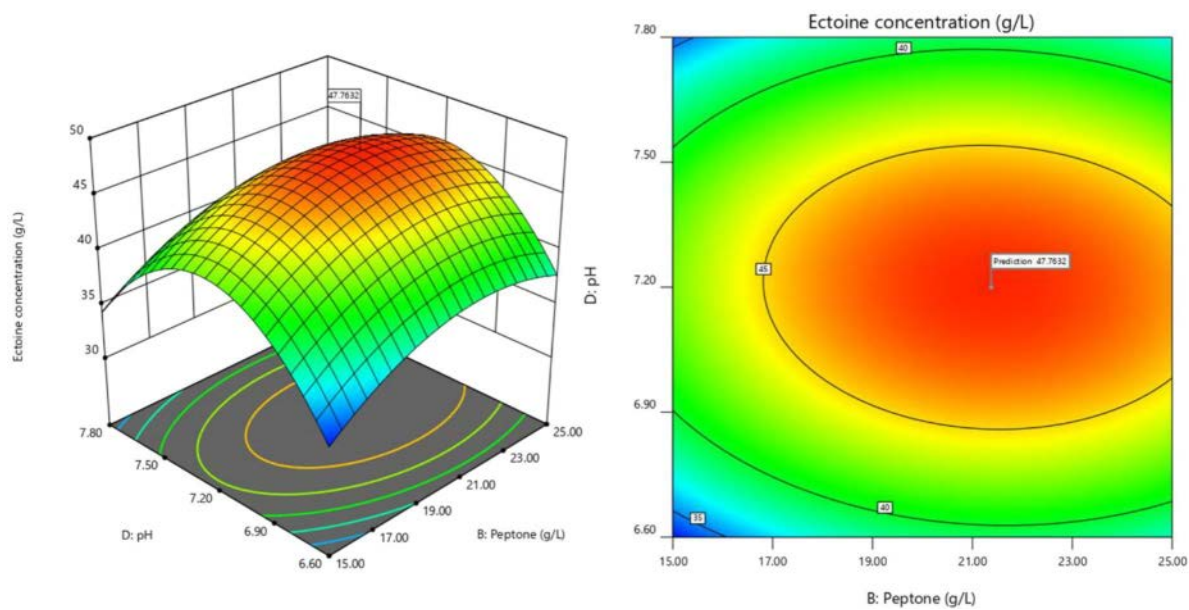


图6

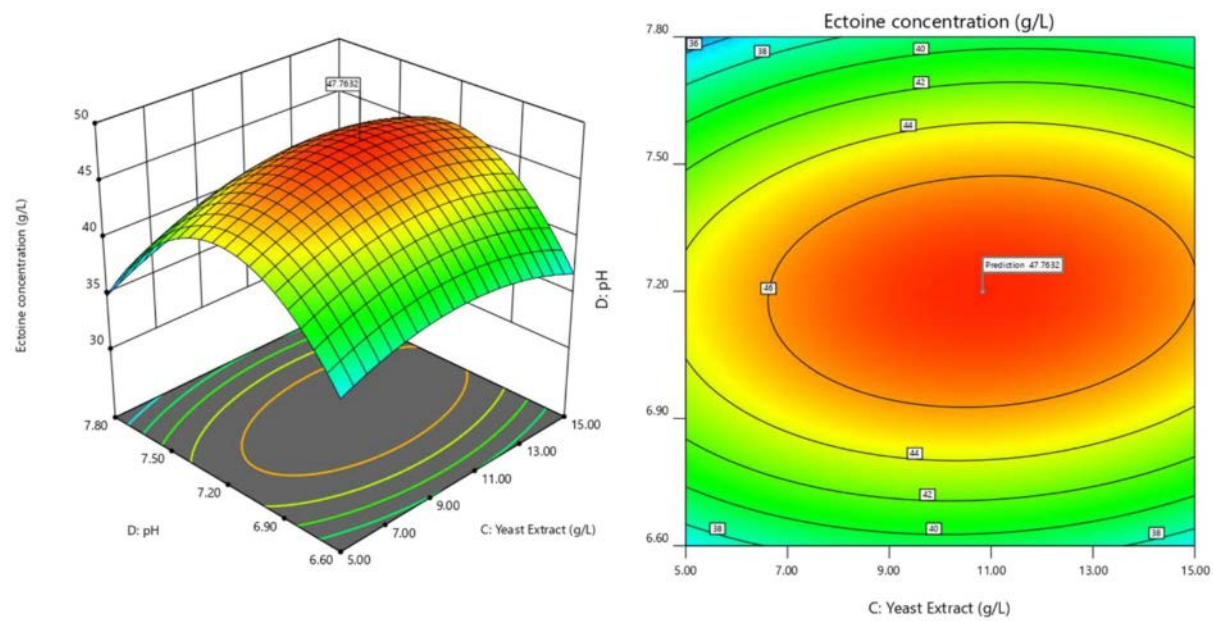


图7