



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111057800 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(21)申请号 201911375992.5

(22)申请日 2019.12.27

(71)申请人 无锡生基医药科技有限公司
地址 214000 江苏省无锡市惠山经济开发
区惠山大道1719-6号一层A区

(72)发明人 曾杰 梁焯 曹曦 姚树元
辛晨浩

(74)专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限
公司 31211

代理人 郑权

(51)Int.Cl.

C12Q 3/00(2006.01)

C12P 1/04(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

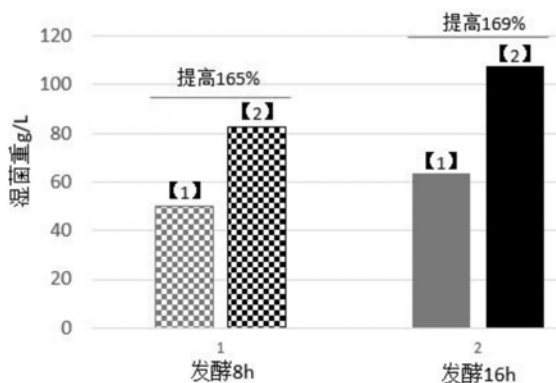
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

采用饥饿发酵工艺生产基因治疗质粒的方法及发酵培养基

(57)摘要

本发明公开一种采用饥饿发酵工艺生产基因治疗质粒的方法,包括以下步骤:(1)发酵罐准备:将一次性pH电极、一次性DO电极和冷却管路插入一次性罐体相应位置;发酵培养基配制好后将一次性罐体灭菌;完成发酵罐各管路的连接,设定温控系统(TCU)的温度并运行;(2)参数设置;(3)接种;(4)饥饿发酵控制。本发明的方法结合了饥饿发酵工艺和一次性全封闭式工艺,能够显著降低质粒产品中细菌宿主蛋白HCP残留含量。本发明还公开一种用于前述方法的发酵培养基,能够有效提高质粒发酵产量。



1. 一种采用饥饿发酵工艺生产基因治疗质粒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 发酵罐准备:将一次性pH电极、一次性DO电极和一次性冷却管路插入到一次性罐体相应位置;发酵培养基配制好后将一次性罐体灭菌;完成发酵罐各管路的连接,设定温控系统(TCU)的温度并运行;

(2) 参数设置:设置工艺空气减压阀压力0.50bar;设置发酵罐参数:温度37.0℃、通气量3.0L/min、转速200rpm;设置pH7.20±0.02开启自动控制补碱瓶进行补碱;在移除溶氧电极线时调节DO零点0%,插上电极线,设置最大转速,调节DO满度95-100%;

(3) 接种:通过接种管路接种,即通过无菌接管机将摇瓶的一次性转接盖管路与发酵罐连接,将摇瓶中菌液泵入发酵罐,用并无菌封管机封闭管路;

(4) 饥饿发酵控制:将溶氧DO与转速关联控制,控制DO≥20%,设置最小转速为初始转速,开启DO自动控制;定义接种时间为0小时,当培养至DO值开始升高时,开始补料,设定补料泵速度0.5%-2%发酵体积/h;当DO值再次开始升高时,提高补料泵速度至1%-4%发酵体积/h;当培养至平台期时停止补料;待DO上升至40%以上后,继续饥饿发酵培养20min~2h之后结束发酵。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中,发酵罐各管路的连接包括补料管路、补碱管路、接种管路、发酵罐进气管路、发酵罐排气管路、冷却管路的连接。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,各管路连接时,使用无菌接管机及无菌封管机进行连接操作。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中,一次性pH电极使用之前先进行电极校准。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述灭菌的条件为121.0℃,20min灭菌。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中,温控系统的温度设定为4-10℃。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中,发酵培养基的配方为:每1L发酵培养基含:大豆蛋白胨10g-20g,酵母粉5g~10g,(NH₄)₂SO₄ 2g~6g,Na₂HPO₄·7H₂O 12g~24g,KH₂PO₄ 2g~4g,甘油15g~30g,MgSO₄ 0.4g~0.8g。所述发酵培养基的配方中还含有适量的消泡剂,约0.3~1g。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述发酵培养基的配方为:每1L发酵培养基含:大豆蛋白胨20g,酵母粉10g,(NH₄)₂SO₄ 4g,Na₂HPO₄·7H₂O 17.8g,KH₂PO₄ 3g,甘油25g,MgSO₄ 0.6g。

9. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(4)中,初始补料速率为1.2%-1.5%发酵体积/h,然后补料速率提高至2.4%-3%发酵体积/h。

10. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(4)中,当发酵培养14h时,停止补料。

11. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(4)中,停止补料,待DO上升至40%以上后,饥饿发酵培养20min~60min。

12. 一种安全高产的发酵培养基,其特征在于,所述发酵培养基的配方为:每1L发酵培养基含:大豆蛋白胨10g-20g,酵母粉5g~10g,(NH₄)₂SO₄ 2g~6g,Na₂HPO₄·7H₂O 12g~24g,

KH_2PO_4 2g~4g, 甘油15g~30g, MgSO_4 0.4g~0.8g。所述发酵培养基的配方中还含有适量的消泡剂, 约0.3~1g。

13. 如权利要求12所述的发酵培养基, 其特征在于, 所述发酵培养基的配方为: 每1L发酵培养基含: 大豆蛋白胨20g, 酵母粉10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17.8g, KH_2PO_4 3g, 甘油25g, MgSO_4 0.6g。

采用饥饿发酵工艺生产基因治疗质粒的方法及发酵培养基

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域中用于基因治疗质粒的发酵方法,特别是涉及一种采用饥饿发酵工艺生产基因治疗质粒的方法及一种安全且高产的发酵培养基。

背景技术

[0002] 基因治疗是指将外源正常基因导入靶细胞,以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病,以达到治疗目的。基因治疗已成为很多重大疾病的有效治疗方法,在血友病、镰状细胞病、失明、多种严重的遗传性神经退行性疾病以及骨髓和淋巴结多发癌等疾病的治疗中均取得了重大进展(Gene therapy comes of age,2018,Science)。目前欧洲药品管理局(EMA)和美国食品药品监督管理局(FDA)已经批准6种基因治疗产品:2种用于B细胞癌的嵌合抗原受体T细胞产品(Car-T)和4种用于严重单基因疾病,如 β -地中海贫血,一种罕见的视力丧失,脊髓性肌萎缩和罕见的原发性免疫缺陷(Gene therapy,2019,The New England Journal of Medicine)。

[0003] 基因治疗主要采用病毒和非病毒两种载体形式。从长远看,非病毒载体具有低免疫原型、低成本、易规模化等优点,因而具有更好的临床应用前景。而当前大部分细胞和基因治疗项目所采用的载体都为病毒载体。目前最为常用的病毒载体包括腺相关病毒(Adeno-associated virus,AAV)、慢病毒(Lentivirus,LV)、腺病毒(Adenovirus,AdV)和逆转录病毒(Retrovirus,RV)等。这些病毒载体均可以通过包装质粒进行生产,因此,无论是从眼前看,还是从长远看,质粒DNA都是基因治疗的基础,而且需求量非常大。

[0004] 质粒作为人用生物制品,对其生产与质量控制具有严格的要求。虽然已有专利(CN1914330B,2012;CN 101213294B,2013)建立大规模符合药学规格的质粒DNA发酵工艺,但均为传统发酵方法,未涉及一次性全封闭式生产工艺。一次性全封闭式生产工艺是基因治疗行业的发展趋势,工艺更加稳定可控,产品质量更加安全有效。

[0005] 众所周知,通过细菌发酵及碱裂解法(A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA,1979,Nucleic Acids Res)可获得质粒。但目前的专利中(CN 1914330B,2012;CN 101213294B,2013;CN 103396975B,2016;CN 108148831A,2018;CN 109337834A,2019)均未涉及饥饿发酵法生产质粒。以上发酵方法中存在质粒产品中HCP残留高的缺点且未考察如何降低HCP残留,例如专利CN 108148831A(2018)中宿主蛋白HCP残留为 $0.001\mu\text{g}/\mu\text{g}$ 质粒DNA,折合为 $1000\text{ng}/\text{mg}$,质粒产品中HCP残留高。现有文献中(Industrial Manufacturing of Plasmid-DNA Products for Gene Vaccination and Therapy,2012)报道用于DNA疫苗的宿主蛋白残留量控制为 $<1\%$,折后为 $10\mu\text{g}/\text{mg}$,因此,生产的基因治疗质粒产品中HCP残留量应当符合该DNA疫苗的要求。现有文献中没有给出如何通过上游发酵工艺克服质粒产品的质量(如HCP残留)的指导。

[0006] 专利CN 103396975B(2016)中公布了一种DNA疫苗的发酵培养基配方,每1L发酵培养基含:脲蛋白胨16.5g,酵母粉5g,NaCl 10g,甘油0.65g, Na_2HPO_4 12.8g, K_2HPO_4 3g, MgSO_4 0.24g, NH_4Cl 3.1g及微量元素1mL。该配方中含有微量金属元素,工艺中引入了重金属

杂质,使用于人体注射的DNA疫苗具有一定的安全风险。该专利采用该发酵培养基,质粒发酵(5L)产量达180mg/L~220mg/L,产量较低。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于,提供一种生产基因治疗质粒的方法,能够显著降低质粒产品中细菌宿主蛋白HCP残留含量。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供的技术方案为:

[0009] 一种采用饥饿发酵工艺生产基因治疗质粒的方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 发酵罐准备:将一次性pH电极、一次性DO电极和一次性冷却管路插入一次性罐体相应位置;发酵培养基配制好后将一次性罐体灭菌;完成发酵罐各管路的连接,设定温控系统(TCU)的温度并运行;

[0011] (2) 参数设置:设置工艺空气减压阀压力0.50bar;设置发酵罐参数:温度37.0℃、通气量3.0L/min、转速200rpm;设置pH7.20±0.02开启自动控制补碱瓶进行补碱;在移除溶氧电极线时调节DO零点0%,插上电极线,设置最大转速,调节DO满度95-100%;

[0012] (3) 接种:通过接种管路接种,即通过无菌接管机将摇瓶的一次性转接盖管路与发酵罐连接,将摇瓶中菌液泵入发酵罐,用并无菌封管机封闭管路;

[0013] (4) 饥饿发酵控制:将DO与转速关联控制,控制DO≥20%,设置最小转速为初始转速,开启DO自动控制;定义接种时间为0小时,当培养至DO值开始升高时,开始补料,设定补料泵速度0.5%-2%发酵体积/h;当DO值再次开始升高时,提高补料泵速度至1%-4%发酵体积/h;当培养至平台期时停止补料;待DO上升至40%以上后,继续饥饿发酵培养20min~2h之后结束发酵。

[0014] 具体的,所述步骤(1)中,发酵罐各管路的连接包括补料管路、补碱管路、接种管路、发酵罐进气管路、发酵罐排气管路、冷却管路的连接。各管路连接时,使用无菌接管机及无菌封管机进行连接操作。其中,补料管路通过补料泵接入发酵罐;补碱管路通过补碱泵接入发酵罐;接种管路通过无菌接管机将摇瓶的一次性转接盖管路与发酵罐连接,通过蠕动泵将摇瓶中菌液泵入发酵罐,用并无菌封管机封闭管路;发酵罐进气管路通过发酵控制器与车间供气管路连接;发酵罐排气管路通过蒸汽冷却装置与0.22μm滤器排出;冷却管路通过温度控制器与一次性冷却管路连接。

[0015] 具体的,所述步骤(1)中,一次性pH电极使用之前先进行电极校准。

[0016] 具体的,所述步骤(1)中,所述灭菌的条件为121.0℃,20min灭菌。灭菌在脉动真空灭菌器中进行。

[0017] 具体的,所述步骤(1)中,温控系统(TCU)的温度设定为4-10℃。

[0018] 具体的,所述步骤(1)中,发酵培养基的配方为:每1L发酵培养基含:大豆蛋白胨10g-20g,酵母粉5g~10g,(NH₄)₂SO₄ 2g~6g,Na₂HPO₄·7H₂O 12g~24g,KH₂PO₄ 2g~4g,甘油15g~30g,MgSO₄ 0.4g~0.8g。所述发酵培养基的配方中还含有适量的消泡剂,约0.3~1g。

[0019] 优选的,所述发酵培养基的配方为:每1L发酵培养基含:大豆蛋白胨20g,酵母粉10g,(NH₄)₂SO₄ 4g,Na₂HPO₄·7H₂O 17.8g,KH₂PO₄ 3g,甘油25g,MgSO₄ 0.6g。

[0020] 优选的,所述步骤(4)中,初始补料速率为1.2%-1.5%发酵体积/h,然后补料速率提高至2.4%-3.0%发酵体积/h。

[0021] 优选的,所述步骤(4)中,当发酵培养14h时,停止补料。

[0022] 优选的,所述步骤(4)中,停止补料,待DO上升至40%以上后,饥饿发酵培养20min~60min。

[0023] 具体的,所述步骤(4)中,培养至3.5h时,开始补料,设定补料泵速度0.2ml/min(补料速度范围:4g/kg/H*3kg/60min-5g/kg/H*3kg/60min,ml/min约等于g/min);培养至5.5h时提高至0.4ml/min(补料速度范围:8g/kg/h*3kg/60min-10g/kg/h*3kg/60min);培养至14h时小时后停止补料,待DO上升至40%以上后继续培养20分钟结束发酵;

[0024] 本发明中所述的用于基因治疗的质粒用于包装慢病毒、腺相关病毒、注射用DNA疫苗等。在一些具体实施例中,所述质粒含有重组转移基因、Gag-Pol基因、Rev基因、VSV-G基因、AAV血清型1-9基因、AAV血清型DJ/DJ8/Rh10基因等。

[0025] 本发明提供了一种简单有效的饥饿发酵工艺,能够显著降低质粒产品中细菌宿主蛋白HCP残留含量。现有文献中未见报道饥饿发酵工艺对质粒产品的HCP残留的任何影响。

[0026] 本发明提供的生产基因治疗质粒的方法中结合了饥饿发酵工艺和一次性全封闭式工艺,全过程采用一次性发酵罐体、一次性pH电极、一次性DO电极、一次性管路、一次性配液袋及储液袋等。应用无菌封口机及封管机实现全封闭式质粒发酵生产。目前的质粒发酵专利均为传统的发酵,并未涉及一次性全封闭式质粒发酵工艺。

[0027] 第二方面,本发明还提供一种安全高产的发酵培养基,能够有效提高质粒发酵产量。

[0028] 本发明提供的发酵培养基的配方为:每1L发酵培养基含:大豆蛋白胨10g-20g,酵母粉5g~10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g~6g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12g~24g, KH_2PO_4 2g~4g,甘油15g~30g, MgSO_4 0.4g~0.8g。所述发酵培养基的配方中还含有适量的消泡剂,约0.3~1g。

[0029] 优选的,所述发酵培养基的配方为:每1L发酵培养基含:大豆蛋白胨20g,酵母粉10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17.8g, KH_2PO_4 3g,甘油25g, MgSO_4 0.6g。

[0030] 本发明提供一种安全高产的发酵培养基配方用于病毒包装质粒的发酵生产,与现有的其他专利及技术相比,有诸多优点。其特点在于避免挥发性有毒害的氨水,采用氢氧化钠替代补碱;不含微量元素,避免工艺引入重金属杂质;采用甘油替代葡萄糖作为碳源,减少发酵过程产酸。采用饥饿发酵工艺,显著降低质粒的HCP残留量。采用该发酵培养基配方,质粒发酵产量可达350mg/L。

附图说明

[0031] 图1为发酵培养基配方对菌体生长的影响比较图。

具体实施方式

[0032] 下面将对本发明的技术方案进行清楚、完整的描述,显然,所描述的实施例是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0033] 实施例1一次性全封闭式质粒发酵工艺的基本步骤

[0034] 1. 一次性发酵工艺的主要设备

[0035]

设备名称	品牌
------	----

生物反应器	Eppendorf
无菌接管机	Sartorius
无菌封管机	Sartorius

[0036] 2. 一次性发酵工艺的主要耗材清单

一次性耗材名称	品牌
一次性发酵罐罐体	Eppendorf
细胞培养瓶	Corning
无菌转移瓶盖	Corning
一次性无菌配液袋	Millipore
一次性无菌储液袋	Millipore
一次性 DO 电极	Mettler
一次性 pH 电极	Mettler
一次性冷却管路	Eppendorf

[0039] 3. 一次性发酵工艺控制参数

[0040] 1) 发酵罐准备: 对pH电极进行校准, 将pH电极、DO电极和冷却管路插入一次性罐体相应位置, 安装好补料、接种管路并用堵头封住出口端。发酵培养基配制好后将罐体放入脉动真空灭菌器121.0℃, 20min灭菌。灭菌后安装好发酵罐进气、排气及冷却相关管路, 用接管机连接补料及补碱管路, 设定温控系统 (TCU) 的温度为6.0℃并运行。在电脑控制端登录, 输入批号并记录数据。

[0041] 2) 参数设置: 设置工艺空气减压阀压力0.50bar, 设置发酵罐参数: 温度37.0℃、通气量3.0L/min、转速200rpm。将补碱瓶通过补碱泵接入发酵罐, 设置pH7.20±0.02开启自动控制。在移除溶氧电极线时调节DO零点0%, 插上电极线, 设置转速1200rpm, 调节DO满度95-100%。同时用纯化水对补料泵进行校准。

[0042] 3) 接种: 通过无菌接管机将摇瓶的一次性转接盖管路与发酵罐连接, 将摇瓶中菌液泵入发酵罐, 用并无菌封管机封闭接种管路。

[0043] 4) 发酵控制: 将DO与转速关联控制, 控制DO≥20%, 设置最小转速200rpm, 开启DO自动控制。培养至3.5h时, 开始补料, 设定补料泵速度0.2ml/min (补料速度范围: 4g/kg/H*3kg/60min-5g/kg/H*3kg/60min, ml/min约等于g/min), 5.5小时后提高至0.4ml/min (补料速度范围: 8g/kg/h*3kg/60min-10g/kg/h*3kg/60min)。14h小时后停止补料, 待DO上升至40%以上后继续培养20分钟结束发酵并停止数据记录, 用20L储液袋收集发酵液。

[0044] 实施例2饥饿发酵工艺对质粒HCP影响的研究

[0045] 1. 采用发酵培养基1配方: 每1L发酵培养基含大豆蛋白胨10g, 酵母粉5g, 硫酸铵0g, 七水合磷酸氢二钠7.7g, 磷酸二氢钾1.5g, 丙三醇16g, 硫酸镁0.6g, 消泡剂0.3g。

[0046] 补料培养基配方, 每1L补料培养基含蛋白胨100g, 酵母粉50g, 丙三醇150g, 消泡剂1g。

[0047] 补料培养基配方,每1L补料培养基含蛋白胨100g,酵母粉50g,丙三醇150g,消泡剂1g。

[0048] 补料碱液配方,每1L补料碱液含氢氧化钠120g。

[0049] 2. 饥饿发酵方法:将DO与转速关联控制,控制DO \geq 20%,转速最小200rpm,最大1200rpm,开启DO自动控制。定义接种时间为0小时,培养至3.5h时,开始补料,设定补料泵速度0.2ml/min(补料速度范围:4mL/L/h*3L/60min),5.5小时后提高至0.4ml/min(补料速度范围:8mL/L/h*3L/60min)。14小时后停止补料,使大肠杆菌消耗培养基中残留的营养物质,待DO上升至40%以上后,此时大肠杆菌呈现饥饿状态,停止生长,但质粒仍然保持复制状态,继续消耗大肠杆菌菌体的宿主蛋白来维持生命,继续培养20min结束发酵(发酵时间16小时),此时收获。

[0050] 3. 发酵批次及取样:使用3种不同的慢病毒包装质粒分别进行发酵,共3批发酵。取样如表1:

[0051] 表1:取样

发酵批次	发酵质粒	取样
01	包装质粒 1	饥饿发酵开始
		饥饿发酵结束
02	包装质粒 2	饥饿发酵开始
		饥饿发酵结束
03	包装质粒 3	饥饿发酵开始
		饥饿发酵结束

[0053] 4. 质粒抽提:将上述3批发酵液样品稀释至质粒抽提试剂盒的线性范围内,稀释OD₆₀₀=1,取1mL抽提质粒DNA,按照试剂盒操作抽提。按照实施例2对抽提的质粒样品检测细菌宿主蛋白质残留(HCP)。

[0054] 5. 结果:饥饿发酵工艺对质粒HCP残留的影响见表2。从表2中的3批不同包装质粒的发酵结果可知,饥饿发酵处理后,细菌HCP分别减少至饥饿前的70.8%、78.5%、58.9%,饥饿发酵法能显著降低质粒的HCP残留量。

[0055] 表2:饥饿发酵工艺对质粒HCP残留的影响

发酵批次	发酵质粒	取样点	细菌 HCP 残留量 (ng/ml)	细菌 HCP 残留量 (ng/mg)	HCP 残留降低效果
1	包装质粒 1	饥饿发酵开始	3.42	176.5	70.8%
		饥饿发酵结束	2.45	124.9	
2	包装质粒 2	饥饿发酵开始	2.80	93.0	78.5%
		饥饿发酵结束	2.36	72.9	
3	包装质粒 3	饥饿发酵开始	2.43	77.0	58.9%
		饥饿发酵结束	1.55	45.4	

[0058] 实施例3:大肠杆菌宿主蛋白残留检测方法

[0059] 1. 标准品准备:检测试剂盒为E.coli HCP酶联免疫试剂盒(CYGNUS公司),将试剂盒自带的标准品0、1、3、12、40、100ng/mL取出平衡至室温。

[0060] 2. 供试品稀释:配制1×PBST洗液,用样品稀释液(CYGNUS公司)将样品梯度稀释到标准曲线范围1-100ng/mL。

[0061] 3. 布板:取出包被板,分别加入25μL/孔的标准品、供试品,各2个复孔。

[0062] 4. 加酶标抗体:100μL/孔加HRP标记的抗体至所有孔,封板膜封板,放置恒温振荡器中,设定温度28℃,转速600rpm,孵育90min。

[0063] 5. 洗板:弃尽各孔内样品溶液,以350μl/孔加入1×PBST洗液,无需浸泡,洗涤4次。最后一次洗涤后弃尽孔内洗液,将反应板倒扣于吸水纸上吸尽洗液。

[0064] 6. 底物显色:以100μl/孔加入TMB底物液,封板膜封板,室温静置孵育30min。

[0065] 7. 终止:以100μl/孔加入终止液。

[0066] 8. 读板:按照酶标仪(公司:MD,型号:i3x)说明书操作,双波长450nm/650nm下读数,10min内完成读板。

[0067] 实施例4:发酵培养基配方研究

[0068] 1. 本发明的发酵培养基特点为:采用甘油替代葡萄糖作为碳源,减少菌体产酸,更有利于菌体生长及质粒积累,含无机氮源硫酸铵,促进菌体快速生长。采用氢氧化钠替代氨水补碱,避免了挥发性氨水在补碱过程中的挥发而对人员造成的呼吸道损害风险。与传统质粒发酵的另一个不同点为,不含微量元素,避免了工艺引入重金属离子的残留。

[0069] 2. 发酵培养基配方1:每1L发酵培养基含大豆蛋白胨10g,酵母粉5g,硫酸铵0g,七水合磷酸氢二钠7.7g,磷酸二氢钾1.5g,丙三醇16g,硫酸镁0.6g,消泡剂0.3g。

[0070] 补料培养基配方,每1L补料培养基含蛋白胨100g,酵母粉50g,丙三醇150g,消泡剂1g。

[0071] 补料培养基配方,每1L补料培养基含蛋白胨100g,酵母粉50g,丙三醇150g,消泡剂1g。

[0072] 补料碱液配方,每1L补料碱液含氢氧化钠120g。

[0073] 3. 发酵培养基2配方:每1L发酵培养基含大豆蛋白胨20g,酵母粉10g,硫酸铵4g,七水合磷酸氢二钠17.8g,磷酸二氢钾3g,丙三醇25g,硫酸镁0.6g,消泡剂1g。

[0074] 补料培养基及补料碱液配方与发酵培养基1的一致。

[0075] 4. 发酵:按照实施例1发酵。

[0076] 5. 发酵样品分析:检测发酵液OD600值,使用发酵培养液作为空白对照,用发酵培养液对发酵液进行稀释,使OD600值在0.2-0.8之间。检测湿菌重,取空的15mL离心管,称量空管重,吸取5mL发酵液到15mL离心管中8000rpm离心10min,小心弃去上清,称量重量,计算获得湿菌重(g/L)。

[0077] 6. 结果:发酵培养基配方研究见表3,发酵培养基配方对菌体生长的影响见图1。

[0078] 表3:发酵培养基配方研究

培养基配方	发酵中期 8h			发酵结束 16h		
	OD ₆₀₀	湿菌重 g/L	质粒产量 mg/L	OD ₆₀₀	湿菌重 g/L	质粒产量 mg/L
1	23.54	50	70.5	28.89	63.75	337
2	34.12	82.5	73.6	39.9	107.5	350

[0080] 图1中,【1】、【2】分别表示发酵培养基配方1、2。由图1可知:发酵培养基配方2的碳源及氮源含量是配方1的1-2倍,能显著促进菌体的生长。

[0081] 综上所述,上述各实施例仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限定本发明的保护范围,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,皆应包含在本发明的保护范围内。

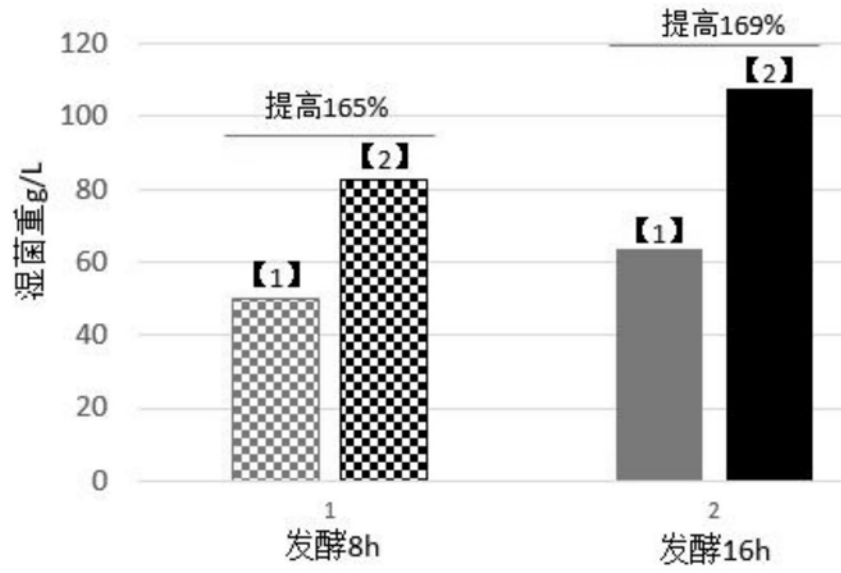


图1