

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480043243.8

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月9日

[11] 公开号 CN 1961067A

[22] 申请日 2004.4.6

[21] 申请号 200480043243.8

[86] 国际申请 PCT/EP2004/003611 2004.4.6

[87] 国际公布 WO2005/108553 德 2005.11.17

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.5

[71] 申请人 亚什兰许可和知识产权有限公司

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 约瑟夫·洛伦茨

S. · P. · 沃罗宁

S. · W. · 科索林

I. · N. · 辛吉尔兹夫

V. · G. · 德巴伯夫

A. · S. · 亚年科

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

脞水合酶生产菌株紫红红球菌 M33 的培养方法

[57] 摘要

本发明涉及脞水合酶生产菌株紫红红球菌 M33 的培养方法,其中使用一种培养基,所述培养基基于 12 至 60mM 磷酸盐缓冲液并在培养期间满足细胞对磷的需求和维持 pH 在 5.5 - 9.0 的范围内,并且当其中已有量的葡萄糖已经耗尽时,向培养基中加入乙酸作为新碳源。本发明也涉及该方法中所用的培养基。

1、脲水合酶生产菌株紫红红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) M33 的培养方法, 该菌株以保藏号 DSM 14230 保藏于德国微生物保藏中心, Marschroder Weg 1b, D-38124, 不伦瑞克, 德国, 该方法特征在于使用一种培养基, 所述培养基基于 12 至 60mM 磷酸盐缓冲液并满足细胞对磷的需求和在培养期间维持 pH 在 5.5-9.0 的范围内, 并且当所有最初提供的葡萄糖已经耗尽时, 向所述培养基中计量加入乙酸作为新碳源。

2、如权利要求 1 定义的方法, 特征在于将玉米提取物在所述培养基中用作生长因子。

3、如权利要求 2 定义的方法, 特征在于将玉米浆和/或玉米浸渍溶液用作玉米提取物。

4、如权利要求 1-3 任意一项定义的方法, 特征在于所述的玉米提取物在所述的培养基中以 1 至 10g/L 的浓度使用。

5、如权利要求 1-4 任意一项定义的方法, 特征在于将葡萄糖和乙酸用作培养基中的碳源。

6、如权利要求 1-5 任意一项定义的方法, 特征在于所述的培养基含有浓度为 20 至 90g/L 的葡萄糖作为碳源。

7、如权利要求 1-6 任意一项定义的方法, 特征在于乙酸最初以其水溶性盐的形式加入。

8、如权利要求 1-7 任意一项定义的方法, 特征在于所用的水溶性乙酸盐是乙酸钠。

9、如权利要求 1-8 任意一项定义的方法, 特征在于将水溶性乙酸盐用于最初的批培养, 并且当 pH 升至 7.5-8.5, 计量加入乙酸。

10、如权利要求 1-9 任意一项定义的方法, 特征在于葡萄糖消耗后, 水溶性乙酸盐以 1 至 4g/L 的浓度计量加入, 优选 3g/L。

11、如权利要求 1-10 任意一项定义的方法, 特征在于随后以 20 至 50%浓度水溶液的形式、优选以 30%浓度水溶液的形式加入乙酸。

12、如权利要求 1-11 任意一项定义的方法，特征在于在 pH7.5-8.5、优选 pH 7.9 时通过 pH-启动的补料计量加入乙酸溶液。

13、如权利要求 1-12 任意一项定义的方法，特征在于在所述培养基中计量加入尿素和 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 。

14、如权利要求 1-13 任意一项定义的方法，特征在于将一部分尿素作为诱导剂加入用作最初的批培养物的培养基，并且当最初提供的葡萄糖已经耗尽时，再次计量加入尿素。

15、如权利要求 1-14 任意一项定义的方法，特征在于在指数生长期的开始向基于葡萄糖作为碳源的培养基中加入 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ，并在葡萄糖耗尽后再次计量加入。

16、如权利要求 1-15 任意一项定义的方法，特征在于在发酵罐培养期间控制氧的供应使得相对 O_2 分压大于 30%，并优选 $\geq 50\%$ 。

17、用于权利要求 1 至 16 任意一项定义的方法中的培养基，包含：

- a.) 7.9g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$
- b.) 1.8g/L CH_2PO_4
- c.) 0.02-0.04g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- d.) 1.0 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- e.) 从 0 至 10g/L 的玉米提取物
- f.) 从 20 至 90g/L 的葡萄糖
- g.) 从 4 至 20g/L 的尿素。

18、如权利要求 17 定义的培养基，特征在于所述培养基含有浓度从 1 至 10g/L 的玉米提取物。

19、如权利要求 17 或权利要求 18 定义的培养基，特征在于其基于 12 至 60mM 磷酸盐缓冲液并满足细胞对磷的需求，且在培养期间维持 pH 在 5.5-9.0 的范围内。

20、如权利要求 17 至 19 任意一项定义的培养基，特征在于所述的培养基包括乙酸作为进一步碳源。

脞水合酶生产菌株紫红红球菌 M33 的培养方法

本发明涉及培养脞水合酶生产菌株紫红红球菌 M33 的生物工艺学方法，并涉及在该方法中用来增加具有高脞水合酶的生物量产率的培养基。

化学化合物的工业生物工艺生产方法的发展已经引起对具有特定酶的微生物产生巨大的兴趣，这些酶可用于所选定的生物催化反应。它们的实例是用于酰胺合成的生物工艺生产方法，该方法基于一些能够合成脞水合酶的微生物，该酶催化有机酸的脞基转化为相应的酰胺。在这方面，能够将丙烯脞转化为丙烯酰胺的细菌菌株特别具有价值。

各种微生物的培养方法在具有催化活性的生物量或生物催化剂的生产上起重要作用。通常存在两种选择来增加每单位体积肉汤培养基的酶活性产率（总活性以 U/ml 计）：

1. 激活（细菌）细胞的酶合成，或换句话说增加特定酶的活性（干生物量的 U/mg）

2. 提高每单位体积肉汤培养基的活性细胞（活性生物量）的产率。

英国专利 2087926A 和此处引用的专利文献中，描述了棒状杆菌（*corynebacterium*）菌株 N-774（发酵研究所（Fermentation Research Institute）的保藏号 FERM 4446）的培养方法。显示脞水合酶的该菌株培养于无机培养基，该培养基含有浓度至少 0.2mg/L 的水溶铁化合物和以重量计 1%的酪蛋白水解产物（酪蛋白氨基酸）。该方法的缺点在于酪蛋白水解产物的成本高和所获得的脞水合酶的活性低：

比活性=53.3U/mg，干生物量=5.66mg/mL，总活性=301.7U/mL。

已知有机酸的脞基和酰胺，尤其是丙酸和异丁酸，引起诱导脞水合酶。在这方面，从美国专利第 4,555,487 号推断出将这些化合物，其是已

知的酶诱导试剂或诱导剂，加于绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) B23 株 (FERM BP-187) 和假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) PS1 株 (FERM BP-188)，能够获得具有 62.65U/mg 比活性和 335.8U/mL 总活性的生物量 (5.36g/L 干生物量)。

该方法的缺点在于使用昂贵的诱导剂和所获得的细胞的脲水合酶活性低。

EP0115781 所描述的用于诱导绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) B23 株 (FERM BP-187) 和假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) PS1 株 (FERM BP-188) 的培养基不仅包括已描述的诱导剂，例如美国专利第 4,555,487 号中的，也包括用于增加酶活性的一种或多种 α -氨基酸。例如， α -氨基酸如胱氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸等，以 0.1 至 10.1g/L 的浓度使用。然而，以该方法获得的生物量的比活性不超过 105.7U/mg，并且总活性不超过 428.1U/mL。

利用培养紫红红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) M33 株已经获得更高的脲水合酶活性，如德国专利 4480132 所描述的。该出版物显示，在含有葡萄糖 (浓度 5g/L) 的合成培养基中培养该菌株期间，可能获得具有比活性高达 200U/mg 和总活性高达 360U/mL 的细胞。所提出方法的基本优点是培养基的简单性，其不包含任何昂贵的成分。然而，提高葡萄糖浓度至 20g/L，总活性的增加不超过 1368U/ml。

欧洲专利 0362829 中所描述培养紫红红球菌 J1 株 (FERM BP-1487) 的方法是工业上适合的方法。其培养基包含便宜的诱导剂 (尿素 (浓度 15g/L) 和二价钴)，所提议的培养方法使得能够获得具有 578U/mg 比活性的细胞。为了增加细胞产率 (生物量产率) 向培养基加入蛋白胨和酵母提取物。然而，获得的总活性不超过 2480U/mL，因为生物量的产率仅 4.3g/L。在工业条件下上调培养步骤增加细胞产率至 28g/ml；伴随着特定脲水合酶活性下降至 76U/mg 和总活性下降至 2100U/mL (Yamama H., Kobayashi M., "Nitrile hydratase and Application to Industrial

Production of Acylamide”, Biosci.Biotech.Biochem., 60 (9), 1391-1400, 1996)。

文献中描述了培养紫红红球菌 M33 株的另一种方法(Kim B-Y., Kim J-C., Lee H-H, Hyun H-H., “Fed-batch Fermentation for Production of Nitrile Hydratase *Rhodococcus rhodochrous* M33”, Biotechnol. Bioprocess Eng., 6:11-17,2001)。该方法包括在含纯合成培养基的 5 升发酵罐中进行限制葡萄糖、补料-分批的发酵,该培养基由 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 、EDTA-2Na、 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl、 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 、尿素和葡萄糖组成。通过不断的计量加入 40%浓度的葡萄糖溶液和向葡萄糖溶液三次周期性加入 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0.01g/L), 可获得 24g/L 的细胞产率和 120U/mg 的脲水合酶比活性。然而, 经过约 115 小时的相对长时间发酵后, 获得的总活性不超过 2882U/mL。

因此, 仍然存在对培养脲水合酶生产菌株的生物工艺学方法的需求, 以便能够增加具有高脲水合酶活性的生物量的工业产率。

因此, 本发明的一个目标是提供这样的方法。

已经令人惊奇地发现, 培养脲水合酶生产菌株紫红红球菌的方法实现了本发明的目标, 所述生产脲水合酶的紫红红球菌例如是 M33 株, 其以保藏号 DSM 14230 保藏于 DSMZ, Deutsche Sammlug von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (德国微生物保藏中心), Marschroder Weg 1b, D-38124, 不伦瑞克, 德国, 该方法使用如下培养基进行培养, 该培养基基于 12 至 60mM 的磷酸盐缓冲液, 满足细胞对磷的需求并在培养期间维持 pH 在 5.5 至 9.0, 并在最初提供的葡萄糖耗尽后计量加入作为新碳源的乙酸。

根据本发明, 使用的培养基满足细胞对磷的需求并在培养期间维持 pH 在 5.5 至 9.0。优选这样的培养基含有作为额外生长因子的玉米提取物。

在本发明的方法中, 尤其优选在培养基中使用作为额外生长因子,

加入的玉米提取物例如为玉米浆 (corn steep liquor) 的形式, 以例如 1 至 10g/L 的浓度加入。所用的玉米提取物可以是任意的玉米浆, 其包括玉米颗粒成分, 成分已经作为常规浸渍步骤的结果以浓缩形式进入溶液。根据本发明, 优选使用由 Cerestar Deutschland GmbH, Krefeld 提供的称作 Cerestar 15840 的玉米浆。

优选能用于本发明方法的培养基(下文简称 SI)具有下列成分(g/L):

- a.) 7.9g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$
- b.) 1.8g/L K_2HPO_4
- c.) 0.02 至 0.04 g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- d.) 1.0g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- e.) 0 至 10g/L 玉米提取物
- f.) 20 至 90g/L 葡萄糖
- g.) 4 至 20 g/L 尿素。

尤其是使用如下培养基, 这些培养基中已经加入 1 至 10g/L 浓度的玉米提取物, 优选 2 至 8g/L, 更优选 2 至 6g/L。最优选, 所使用的玉米提取物以 4 g/L 浓度在培养基中使用。

培养基的基础是 12 至 60mM 的磷酸盐缓冲液, 其满足细胞对磷的需求并在培养期间维持 pH 在 5.5 至 9.0, 使用葡萄糖和乙酸作为碳源, 以及使用乙酸作为除葡萄糖外的新的额外碳源。

非常优选, 在本发明的方法中使用 35.3mM 的磷酸盐缓冲液。

有利的是培养基含有 20 至 90g/L 的作为碳源的葡萄糖, 优选 20 至 60g/L, 和更优选 20 至 40g/L, 特别对于在振荡培养瓶中的培养。除了葡萄糖, 乙酸可用作碳源, 优选碳源通过两相法加入, 特别对于实验室或工业规模的发酵罐中培养。

该方法的第一相特征在于以培养基最初含有的第一碳源为基础的紫红红球菌 M33 株的最初的、强烈细胞生长, 第一碳源优选为 20g/L 葡萄糖。葡萄糖耗尽后, 发酵在已知为补料-分批的过程的第二相中持续, 其

中乙酸用作碳源。不昂贵的乙酸能够替换适合培养的葡萄糖，并且所述的乙酸确保高脞水合酶比活性和高总活性。

有利的是，作为选择乙酸能够以其水溶性盐的形式加入，特别优选乙酸钠作为水溶性乙酸盐。在本发明的一个实施方案中，葡萄糖耗尽后计量加入根据本发明待用的水溶性乙酸盐，其中优选情形使用的乙酸钠以 1 至 4g/L 的补料浓度加入。尤其优选以 3g/L 的补料浓度加入乙酸钠。

在本发明的另一个实施方案中，水溶性乙酸盐，优选乙酸钠，存在于最初的批培养中。当 pH 升至 7.5 至 8.5 后，然后将乙酸以 20 至 50%、优选 30% 浓度的水溶液计量加入。有利的是，通过在 pH 7.5 至 8.5、尤其在 7.9 的 pH-启动补料计量加入乙酸水溶液。

此外，本发明的方法可通过在发酵期间以一定的次数和合适浓度计量加入待加入的组分来进行，优选 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 和尿素，其中钴作为辅助因子以及尿素作为诱导剂。

具体而言，对诱导脞水合酶，在培养基中计量加入 4 至 20g/L 尿素和 0.02 至 0.04g/L 的 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 。优选一些尿素在培养基的最初批中以诱导剂存在，优选浓度为 4g/L，并且在最初提供的葡萄糖耗尽后，优选地以 6g/L 的补料浓度计量加入剩余的尿素。

根据本发明，在基于葡萄糖作为碳源的指数生长期的开始，通过将 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (优选 0.01g/L 的投料浓度) 与培养基混合加入 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 辅助因子，然后，在葡萄糖耗尽后，加入更多的 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 辅助因子，优选地以 0.03g/L 的补料浓度计量加入。

令人惊奇地是已经发现，在进行本发明时，如果在指数生长期的开始时计量加入 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ，优选以 0.01g/L 的补料浓度加入，发酵时间可以缩短。

在温度 25 至 30°C，在挡板式培养瓶（振荡培养器）中和在实验室和工业发酵罐中进行本发明方法的菌株培养，培养时间从 48 至 170 小时。在本发明方法的优选实施方案中，发酵期间氧的供应，特别是对于工业

发酵罐，被控制在相对氧分压大于 30%，优选 $\geq 50\%$ 。

本发明的用于培养腈水合酶生产菌株紫红红球菌 M33 的方法的优点在于，通过使用本发明的培养基，尤其是当将玉米提取物用作额外的生长因子时，其能够不仅产生大量的含腈水合酶的生物量（产率至多达到 39.5g/L 干生物量），也产生具有高腈水合酶比活性的生物量（至多达 315U/mg），而腈水合酶总活性达到 7169U/mg，如从下面实施例推论出。

与已知的培养腈水合酶生产菌株的方法不同的是，根据本发明的本方法特征在于使用基于 12 至 60mM 磷酸盐缓冲液的培养基，所述培养基在培养期间满足细胞对磷的需求并维持 pH 在 5.5 至 9.0，其特征还在于在最初提供的葡萄糖耗尽后，计量加入作为新碳源的乙酸。而且，可将玉米浆形式的玉米提取物用作额外的生长因子。此外，有利的是培养基中可用于培养的葡萄糖可以被不昂贵的乙酸代替，因此当使用本发明的方法可以确保得到高腈水合酶比活性和高总活性。

测量腈水合酶活性的标准试验

将 1ml 的于 10mM 磷酸盐缓冲液（pH7.5）中的 2%浓度的丙烯腈与 1ml 的 M33 细胞悬浮液混合，该悬浮液通过先前的肉汤培养物离心、洗涤和随后在 10mM 磷酸盐缓冲液（pH7.5）中再悬浮细胞获得。悬浮液包含 0.08 至 0.6mg 的细胞（干重）。反应在 20℃进行 5 分钟，之后通过加入 20 μ l 浓盐酸终止反应。利用气相色谱或光度测定法测定所形成的丙烯酰胺的浓度。

腈水合酶活性用下列单位给出：

- 比活性-以 mol 计的丙烯酰胺/分钟 \times 干生物量的 mg = [U/mg]
- 总活性-以 mol 计的丙烯酰胺/分钟 \times 培养物肉汤的 ml = [U/ml]

利用下列实施例阐述本发明：

实施例 1

在含有 50ml 培养基“SI”（以 g/L 计组成：7.9 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ；1.8 KH_2PO_4 ；0.02 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ；1.0 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ；2.0 玉米提取物；pH 7.2 ± 0.2 ）和含有葡萄糖（50g/L）和尿素（4 至 20g/L）的挡板式培养瓶（250ml）中接种 1 ml 紫红红球菌 M33 株接种培养物。接种物已经在同样培养基中培养超过 24 小时。在 30℃，以 180rpm（圆周运动）在振荡培养器中进行培养超过 96 小时。测定生物量的产率和细胞的脲水合酶活性。结果列于表 1。

表 1

尿素浓度 [g/L]	干生物量产率 [g/L]	脲水合酶活性	
		比活性[U/mg]	总活性[U/mL]
4	22.3	62	1383
8	24.2	126	3040
12	24.4	150	3660
16	25.1	177	4453
20	23.0	173	3970

实施例 2

在含有 50ml 培养基“SI”（以 g/L 计组成：7.9 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ；1.8 KH_2PO_4 ；0.02 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ；1.0 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ；16.0 尿素；pH 7.2 ± 0.2 ）和含有葡萄糖（50g/L）和玉米提取物（0 至 10g/L）的挡板式培养瓶（250ml）中接种 1 ml 紫红红球菌 M33 株接种培养物。接种物已经在同样培养基中培养超过 24 小时。在 30℃，以 180rpm（圆周运动）在振荡培养器中进行培养超过 96 小时。测定生物量的产率和细胞的脲水合酶活性。结果列于表 2。

表 2

玉米提取物浓度 [g/L]	生物量产率 [g/L]	脲水合酶活性	
		比活性[U/mg]	总活性[U/mL]
0*	23.3	126	2940
1	23.5	140	3299
2	24.4	150	3660
4	24.9	172	4290
6	24.6	163	4012
8	24.4	156	3802
10	25.3	141	3562

*对该起始混合物计量加入 0.01g/L $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 。

从上面的数据，证明加入玉米提取物导致脲水合酶比活性和总脲水合酶活性的增加。玉米提取物的最佳浓度是 4g/L。

实施例 3

含有 50ml 培养基“SI”（以 g/L 计组成：7.9 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ；1.8 KH_2PO_4 ；0.02 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ；1.0 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ；16.0 尿素；4.0 玉米提取物 pH 7.2 ± 0.2 ）的挡板式培养瓶（250ml）中含有浓度为 20 至 90g/L 的葡萄糖。接种物和培养瓶接种如实施例 1 进行。表 3 总结了测定的生物量产率和细胞脲水合酶活性。

表 3

葡萄糖浓度 [g/L]	干生物量产率 [g/L]	接种时间 [小时]	脲水合酶活性	
			特比活性[U/mg]	总活性[U/mL]
20	10.5	72	306	3212
30	15.9	72	255	4051
40	19.2	96	223	4282
50	23.5	96	216	5076
60	27.4	120	204	5595
70	32.7	144	198	6496
80	36.4	166	191	6956
90	39.5	166	182	7169

从表 3 可以看出，在培养基中细胞产率和总脲水合酶活性的增加与葡萄糖浓度的增加成比例。这得自于事实上所有的培养基成分以无限制的浓度存在。

实施例 4

在含有 1.5 升培养基“SI”（以 g/L 计组成：7.9 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ；1.8 KH_2PO_4 ；0.01 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ；1.0 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ；16.0 尿素；4.0 玉米提取物；pH 7.2 ± 0.2 ）和含有葡萄糖（5g/L）的 3 升实验室发酵罐中接种 100 ml 紫红红球菌 M33 株接种培养物。接种物已经在同样组分的培养基中培养超过 24 小时。

培养条件：

- 温度 30°C
- 搅拌速度 560rpm
- 换气速率 1.5vvm（体积/体积/分钟）

发酵 18 小时后，每 2 小时计量加入 1.5g/L 葡萄糖直到终浓度达到

40g/L。结果显示生产出了具有 215U/mg 比活性的 16.4g/L 的干生物量。总活性是 3526U/mL。

实施例 5

如实施例 4 所述，在含有 1.5 升培养基“SI”（以 g/l 计组成：7.9 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ；1.8 KH_2PO_4 ；0.01g $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ；1.0g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ；16.0 尿素；4.0 玉米提取物；pH 7.2 ± 0.2 ）和含有 20g/L 葡萄糖的 3 升实验室发酵罐中进行接种。培养条件也同实施例 4。发酵 24 至 36 小时和耗尽所有葡萄糖后，计量加入 6g/L 尿素、3g/L 乙酸钠和 0.03g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 。培养基 pH 增加后，计量加入 30%浓度的乙酸（补料分批）。在这些条件下，发现在超过 72 小时里生产出了具有 315U/mg 比活性的 19.6g/L 的干生物量。总活性是 6174U/mL。

实施例 6

在含有 7.0 升培养基“SI”（以 g/L 计组成：7.9 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ；1.8 KH_2PO_4 ；1.0 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ；4.0 尿素；4.0 玉米提取物，pH 7.2 ± 0.2 ）和含有 20g/L 葡萄糖的 15 升实验室发酵罐中接种 4%（v/v）紫红红球菌 M33 株接种培养物。接种物作为振荡培养物已经在同样培养基中培养超过 24 小时。

培养条件：

- 温度 29-30°C
- 换气速率 0.5vvm
- 重叠压 0.3bar
- 相对氧分压 $\geq 50\%$ （通过搅拌速度控制）
- 搅拌速率 300 至 600rpm

发酵 12 小时后（指数生长期开始），计量加入 0.01g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 。发酵 21 至 23 小时和耗尽所有葡萄糖后，计量加入 6g/L 尿素、3g/L 乙酸

钠和 0.03g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 。培养基的 pH 升至 7.9 后, 计量加入乙酸(30%)形式的新碳源, 并调节 pH 至 7.9 (pH-启动的补料 (pH-stat feeding))。在这些条件下, 发现仅在 66.5 小时里便生产出了具有 294U/mg 比活性的 19.9g/L 的干生物量。总活性是 5851U/mL。

由于事实上指数生长期前 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 没有加入, 相比于实施例 5 可能减少发酵时间。

实施例 7

在具有 15 m³ 容量和含有 10 m³ 培养基 “SI” (以 g/L 计组成: 3.48 H_3PO_4 ; 0.74 KOH; 用于调节 pH 至 6.9 的 NaOH; 0.01 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 1.0 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 4.0 尿素; 4.0 玉米提取物, pH 7.2±0.2) 和含有 20g/L 葡萄糖的工业生产发酵罐中接种 5% (v/v) 紫红红球菌 M33 株接种培养物。接种物先前已经以预发酵的方式培养了超过 24 小时, 再次使用“SI”。

- 温度 28-30°C
- 搅拌速度 160-165rpm
- 换气速率 0.5vvm

发酵 24 至 36 小时和耗尽所有葡萄糖后, 向培养基中计量加入 6g/L 尿素、3g/L 乙酸钠和 0.03g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 。乙酸的补料以与实施例 6 所描述类似的方式进行。发酵 72 小时后, 发现生产出了具有 290U/mg 比活性的 18.8g/L 的干生物量。总活性是 5452U/mL。