



(21) 申请号 201910378221.5

C12R 1/01 (2006.01)

(22) 申请日 2019.05.08

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 86108977 A, 1988.04.27

申请公布号 CN 110105435 A

CN 102234675 A, 2011.11.09

CN 105671110 A, 2016.06.15

(43) 申请公布日 2019.08.09

CN 106520871 A, 2017.03.22

CN 107365815 A, 2017.11.21

(73) 专利权人 宜昌东阳光生化制药有限公司

地址 443300 湖北省宜昌市宜都市陆城滨江路62号

陈明等.天然脂糖肽类抗生素A40926的研究进展.《中国抗生素杂志》.2013,第38卷(第4期),第308-313页.

(72) 发明人 高新兵 吴波 鲍素敏 谢文平

陈锡欣 李文佳 李峰

马巧慧.达巴万星前体A40926_B生产菌种的基因工程改造.《中国优秀硕士学位论文电子期刊数据库》.2018,(第2期),第A006-345页.

(74) 专利代理机构 北京辰权知识产权代理有限公司

公司 11619

专利代理师 程杰

马巧慧.达巴万星前体A40926_B生产菌种的基因工程改造.《中国优秀硕士学位论文电子期刊数据库》.2018,(第2期),第A006-345页.

(51) Int. Cl.

C07K 9/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

审查员 陈盛峰

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

一种生产A40926的发酵培养基和发酵方法

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种生产A40926的发酵培养基和发酵方法。所述的发酵培养基,包含碳源和氮源,所述氮源包含脯氨酸,且用量按重量百分比计为0.05%~0.6%。本发明进一步涉及一种使用所述培养基生产A40926的发酵方法。本发明通过优化A40926的发酵培养基和发酵方法,克服了现有技术中A40926的发酵产率低,菌体过早衰老,无法达到生产化的要求,以及组分中杂质高,下游纯化成本高的问题,从而提供了一种产量高、杂质小、下游纯化成本低的发酵培养基,和操作简单,能够大规模生产的发酵方法。

1. 一种生产A40926的发酵方法,其特征在于,具体包括如下步骤:

(a) 将野野村放线菌菌株在斜面培养基中培养8~10d;

(b) 取斜面菌丝接种至种子培养基中进行摇床培养;

(c) 取3%~15%的接种量转接到发酵培养基中进行发酵培养,150~300h后放罐;所述的野野村放线菌为ATCC39727菌株;

所述的发酵培养基由3.0%可溶性淀粉,2.5% 蔗糖,0.1%~0.4% 脯氨酸,1.2%~3.0% 酵母粉,0.15%缬氨酸,1.5%~3.5% 热炸黄豆饼粉,0.8% 大豆蛋白胨,和一种或多种的盐类组成,所述一种或多种的盐类:硫酸镁、碳酸钙、氯化镁、氯化钠。

2. 根据权利要求1所述的发酵方法,其特征在于,步骤(c)所述的发酵培养基的pH 为5.0~8.5。

3. 根据权利要求1所述的发酵方法,其特征在于,步骤(c)所述的发酵培养的温度为30~40℃。

4. 根据权利要求1所述的发酵方法,其特征在于,步骤(b)所述的种子培养基按重量百分比计,选自以下组分中的一种或多种:可溶性淀粉0.5%~3.0%,葡萄糖0.5%~2.0%,酵母粉0.1%-0.5%,大豆蛋白胨0.2%~1.0%,NaCl 0.05%~0.3%。

一种生产A40926的发酵培养基和发酵方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种生产A40926的发酵培养基和发酵方法。

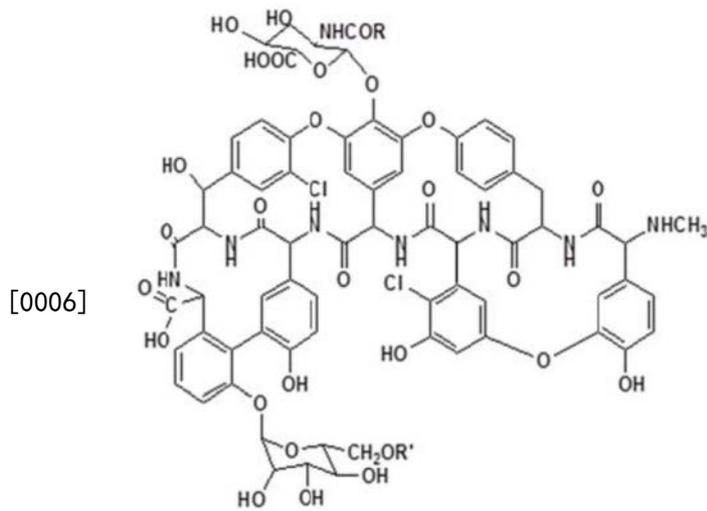
背景技术

[0002] 随着抗生素的广泛使用,细菌耐药性问题日益严重,尤其是耐革兰阳性菌。糖肽类抗生素对几乎所有的革兰氏阳性细菌都有活性,在临床常用于葡萄球菌、肠球菌和肺炎链球菌所致严重感染性疾病的治疗。万古霉素和替考拉宁是临床上普遍应用的两个重要的糖肽类抗生素,在其发现之初,缓解了耐药细菌的问题,人们称它们为“人类对付顽固性耐药菌株的最后一道防线”。但由于临床应用的扩大和不合理用药,导致了耐药菌的出现,例如出现耐万古霉素肠球菌(VER)、对万古霉素中度敏感的金黄色葡萄球菌(VISA)以及耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA),寻找新的糖肽类抗生素已成为临床治疗的迫切需求。

[0003] 1984年,科学家在培养分离自土壤的马杜拉(*Actinomadura*)菌时发现了抗生素A40926。并于1984年6月8日将菌株保藏于美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection, ATCC),编号ATCC39727。该菌株最初被认为属于链霉菌属,后经进一步研究,特别是对细胞壁合成的研究,在2003年,将其产生菌归类于野野村放线菌属(*Nonomuraea*. sp)

[0004] A40926是由野野村放线菌属*Nonomuraea* sp. ATCC39727代谢产生的一种天然糖肽类抗生素,是半合成抗生素达巴万星(Dalbavancin)的前体物质。其作用机制与万古霉素和替考拉宁相同,可抑制革兰阳性菌细胞壁的生物合成,对甲氧西林敏感金葡球菌(MSSA)、耐甲氧西林金葡球菌(MRSA)等革兰阳性菌以及革兰阳性厌氧菌均具有抗菌活性。2014年5月, FDA批准达巴万星用于治疗成人皮肤及软组织感染,成为第一个FDA批准的一周给药一次的,给药两周的静脉注射抗生素。达巴万星半衰期长,用药副作用小,为临床治疗革兰阳性菌提供了新的选择。

[0005] A40926是一种多组分混合物,含有5个主要的组分A0、A1、B0、B1和B2,其中B0占80%以上,是其主要的活性成分。A40926B组分经过化学结构修饰后可得到新型糖肽类抗生素达巴万星。A40926及其各组分化学结构式如下:



组分	R	R'
A1	(CH ₂) ₉ CH ₃	H
A0	(CH ₂) ₉ CH ₃	COCH ₃
B0	(CH ₂) ₈ CH(CH ₃) ₂	H
B1	(CH ₂) ₁₀ CH ₃	H
B2	(CH ₂) ₈ CH(CH ₃) ₂	COCH ₃

A40926化学结构

[0007] 目前,关于A40926的生产主要存在两个技术难点:

[0008] 1) 发酵产率或效价低。A40926主要由意大利的Vicuron Pharmaceuticals制药公司通过发酵进行生产,但其报道的发酵配方仅为一些简单的无机盐培养基,培养温度为28℃,培养时间160h。由于其发酵培养基中的营养成分仅为一些简单的无机盐,菌体活力较差,发酵单位较低,其报道的最高效价为128mg/L。此外,中国发明专利申请CN103060405A也公开了一种A40926的发酵工艺,该发明通过流加补料培养使得A40926产量达到720mg/L。现有技术中基于B0组分效价的提升,A40926的产量通常都不超过1000mg/L。

[0009] 2) 下游纯化成本高。用野野村放线菌属(*Nonomuraea* sp.)发酵生产糖肽类抗生素A40926,利用HPLC分析A40926发酵液中各组分和杂质情况,发现存在2个杂质峰,分别命名为杂质1和杂质2,这两个杂质在后续纯化中较难去除,且纯化成本高。

[0010] 因此,提高A40926的产量,降低其发酵过程中的杂质组分,减少下游纯化的成本是急需解决的技术问题。本发明正是基于这样的目的进行了研究并提供了一种较优的A40926的发酵培养基和发酵方法。

发明内容

[0011] 本发明所要解决的技术问题是通过优化A40926的发酵培养基和发酵方法,克服了现有技术中A40926的发酵产率低,菌体过早衰老,无法达到生产化的要求,以及组分中杂质高,下游纯化成本高的问题,提供了一种较优的发酵培养基和一种操作简单,纯化成本低,能够大规模生产A40926的发酵方法。

[0012] 本发明的上述技术目的是通过下述技术方案实现:

[0013] 本发明提供一种用于生产A40926的发酵培养基,包含碳源和氮源,所述的氮源包含脯氨酸,且用量按重量百分比计为0.05%~0.6%;在一些实施方案中,脯氨酸的用量为0.1%;在另一些实施方案中,脯氨酸的用量为0.4%;在又一些实施方案中,脯氨酸的用量为0.5%。

[0014] 在本发明的一些实施方案中,所述的氮源包含酵母粉,且用量按重量百分比计为0.2%~4.0%;在一些实施方案中,酵母粉用量为1.2%;在一些实施方案中,酵母粉用量为

3.0%。

[0015] 在本发明的一些实施方案中,所述的氮源按重量百分比计,包含选自以下组分中的一种或多种:缬氨酸0.05%~0.30%、热炸黄豆饼粉0.5%~4.0%、酵母抽提物0.1%~0.3%、大豆蛋白胨0.2%~1.0%;在一些实施方案中,氮源包含缬氨酸0.15%、热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%;在一些实施方案中,氮源包含缬氨酸0.15%、热炸黄豆饼粉3.5%,大豆蛋白胨0.8%;在一些实施方案中,氮源包含缬氨酸0.15%、热炸黄豆饼粉0.5%,大豆蛋白胨0.8%;在一些实施方案中,氮源包含缬氨酸0.15%、热炸黄豆饼粉1.5%,酵母抽提物0.3%。

[0016] 在本发明的一些实施方案中,所述的碳源按重量百分比计,包含可溶性淀粉0.5%~6.0%和/或蔗糖0.5%~5.0%;在一些实施方案中,碳源包含可溶性淀粉3.0%和蔗糖2.5%。

[0017] 在本发明的一些实施方案中,所述的发酵培养基中还包含选自以下组分中的一种或多种的盐类:硫酸镁、碳酸钙、氯化镁、氯化钠;在一些实施方案中,发酵培养基中包含硫酸镁、碳酸钙;在一些实施方案中,发酵培养基中包含硫酸镁、碳酸钙、氯化钠。

[0018] 在本发明的一些实施方案中,公开了一种使用权利要求1-5任意一项所述的培养基生产A40926的发酵方法,具体包括如下步骤:

[0019] (a)将野野村放线菌菌株在斜面培养基中培养8~10d;

[0020] (b)取斜面菌丝接种至种子培养基中进行摇床培养;

[0021] (c)取3%~15%的接种量转接到发酵培养基中进行发酵培养,150~300h后放罐。

[0022] 在本发明的一些实施方案中,所述的野野村放线菌为ATCC39727菌株。

[0023] 在本发明的一些实施方案中,所述的发酵培养基的pH为5.0~8.5;在一些实施方案中,发酵培养基的pH为7.8~8.0;在一些实施方案中,发酵培养基的pH为6.0~6.5;在一些实施方案中,发酵培养基的pH为5.0~5.2。

[0024] 在本发明的一些实施方案中,所述的发酵培养的温度为30~40℃;在一些实施方案中,发酵培养基的温度为34℃。

[0025] 在本发明的一些实施方案中,所述的种子培养基按重量百分比计,选自以下组分中的一种或多种:可溶性淀粉0.5%~3.0%,葡萄糖0.5%~2.0%,酵母粉0.1%-0.5%,大豆蛋白胨0.2%~1.0%,NaCl 0.05%~0.3%;种子培养基pH 7.8~8.0;在一些实施方案中,种子培养基按重量百分比计,包含可溶性淀粉1.5%,葡萄糖1.0%,酵母粉0.2%,大豆蛋白胨0.5%,NaCl 0.15%;种子培养基pH 7.8~8.0。

[0026] 在本发明的一些实施方案中,所述的斜面培养采用的培养基是在发酵培养基配方的基础上添加1.8%-2.0%琼脂。

[0027] 本发明所述的“酵母浸粉”是指粉状酵母浸出物,主要成分是经过降解的蛋白质、氨基酸、核苷酸;维生素、生长素、微量元素等营养物质含量也比较丰富,并最符合微生物生产所需的营养配比。酵母浸粉的生物利用度高,微生物的利用速率快,特别有利于对发酵培养基比较挑剔的营养缺陷型、基因重组工程菌的吸收利用,有助于缩短发酵周期,提高微生物发酵效价;同时发酵残留非常少,有利于发酵废液的环保处理。

[0028] 本发明所述的“酵母粉”是指酵母没有经过分解,一般指灭活的酵母,产品成分主要是失去活性的酵母菌体,营养成分包括仍然包裹在菌体内部的粗蛋白、胞壁多糖以及丰

富的维生素、生长素、微量元素等。

[0029] 本发明所述的“酵母抽提物”是指以酵母为原料,采用自溶法或加酶水解法工艺,经分离、脱色(或精制浓缩、喷雾干燥)而成的,含氨基酸、肽、多肽及酵母细胞水溶性成分的产品,包含粉状、与膏状的产品。

[0030] 本发明所述的“流动相”是色谱过程中携带待测组分向前移动的物质称为流动相。与固定相处于平衡状态、带动样品向前移动的另一相。

[0031] 与现有技术相比,本发明取得的有益效果为:

[0032] 1) 本发明的发酵培养基通过添加脯氨酸,既显著提高了A40926的产量,又降低了杂质1;

[0033] 2) 本发明的发酵培养基通过添加酵母粉,可进一步提高A40926的产量;

[0034] 3) 本发明的发酵方法,通过对发酵培养基和发酵工艺进行再优化,不仅可以显著提高A40926的产量,降低杂质1,又可以有效降低杂质2和A1组分;

[0035] 4) 本发明的发酵方法操作简单,可实现大规模生产,且下游纯化成本低。

附图说明

[0036] 图1是对比例2 HPLC图谱;

[0037] 图2是实施例5 HPLC图谱;

[0038] 图3是实施例6 HPLC图谱;

[0039] 图4是实施例7 HPLC图谱;

[0040] 图5是实施例8 HPLC图谱;

[0041] 图6是实施例9 HPLC图谱;

[0042] 图7是市售对照品HPLC图谱。

具体实施方式

[0043] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0044] 对比例1

[0045] 野野村放线菌ATCC39727菌株(购于苏州北纳创联生物技术有限公司)在28℃培养箱中斜面培养8-10d,用接种铲刮取斜面菌丝约0.5cm²,接种到装有25ml种子培养基的三角瓶(250ml)中,将菌丝研磨均匀,在34℃,250rpm摇床中培养48h±2h,按10%接种量转接到装有25ml发酵培养基的三角瓶(250ml)中,培养温度34℃,250rpm摇床中培养6d。收集发酵液,HPLC检测A40926产量。

[0046] 种子培养基:可溶性淀粉1.5%,葡萄糖1.0%,酵母粉0.2%,大豆蛋白胨0.5%,NaCl 0.15%,pH 7.8-8.0。

[0047] 发酵培养基为:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母浸粉1.2%,热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%,NaCl 0.15%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,CaCO₃ 0.2%,pH 7.8-8.0。

[0048] 斜面培养基:在发酵培养基配方的基础上加1.8%-2.0%琼脂。

[0049] 发酵液处理方法:取10ml发酵液至50ml离心管中,用10mol/L NaOH调节发酵液pH

至11.5-12.0之间,取0.8ml发酵液,加入0.8ml甲醇,涡旋混匀,12000rpm离心10min,过0.2μm有机滤膜,用HPLC检测A40926产量及各杂质情况。

[0050] HPLC检测方法见表1,色谱柱:Welch Xbridge C18(4.6mm×150mm,3μm)。

[0051] 表1:HPLC条件

检测波长	207nm		
柱温	35℃		
进样量	进样量为 4μL		
流动相	流动相 A: 30mM NaH ₂ PO ₄ -10%CAN, pH=6; 流动相 C: 乙腈		
[0052] 梯度洗脱	时间 (min)	A(%)	C(%)
	0	85	15
	28	75	25
	20	30	70
	34	30	70
	35	85	15
	40	85	15

[0053] 计算:使用单点定量法计算A40926各组分含量,公用峰面积归一法计算A40926各组分相对百分含量。

[0054] 结论:采用该常规基础发酵培养基配方,通过HPLC检测发酵液中A40926浓度,A40926产量较低,仅有753mg/L。

[0055] 实施例1:

[0056] 其他培养条件均同对比例1,发酵培养基配方中酵母浸粉被替换成酵母粉。

[0057] 发酵培养基为:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉1.2%,热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%,NaCl 0.15%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,CaCO₃ 0.2%,pH 7.8-8.0。

[0058] 通过HPLC检测发酵液中A40926浓度,A40926产量为1235mg/L。

[0059] 结论:发酵培养基中去掉酵母浸粉,添加1.2%酵母粉,A40926产量有显著提高,酵母粉有利于促进A40926的产生。

[0060] 实施例2:

[0061] 其他培养条件均同对比例1,发酵培养基中添加0.1%脯氨酸,酵母浸粉被换成酵母粉。

[0062] 发酵培养基为:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉1.2%,热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%,NaCl 0.15%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,脯氨酸0.1%,CaCO₃ 0.2%,pH 7.8-8.0。

[0063] 通过HPLC检测发酵液中A40926浓度,A40926产量为1563mg/L。

[0064] 结论:培养基中添加0.1%脯氨酸,A40926产量进一步提高,脯氨酸有利于A40926的产生。

[0065] 实施例3:

- [0066] 其他培养条件均同实施例2,发酵培养基中酵母粉的添加量由1.2%提高到3.0%。
- [0067] 发酵培养基为:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉3.0%,热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,脯氨酸0.1%。 CaCO_3 0.2%,pH 7.8-8.0。
- [0068] 通过HPLC检测发酵液中A40926浓度,A40926产量可达2013mg/L。
- [0069] 结论:将发酵培养基酵母粉添加量提高到3.0%,A40926产量也相应提高,可达2013mg/L。
- [0070] 综上所述,培养基配方中添加酵母粉和脯氨酸,均有利于A40926产量的提高。
- [0071] 实施例4:
- [0072] 其他培养条件均同实施例2,发酵培养基中将配方中酵母粉添加量由1.2%提高到3.0%,黄豆饼粉的添加量由1.5%提高到3.5%。
- [0073] 发酵培养基为:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉3.0%,热炸黄豆饼粉3.5%,大豆蛋白胨0.8%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,脯氨酸0.1%。 CaCO_3 0.2%,pH 7.8-8.0。
- [0074] 通过HPLC检测发酵液中A40926浓度,A40926产量为2189mg/L。
- [0075] 结论:发酵培养基中添加酵母粉3.0%,黄豆饼粉3.5%,A40926产量较高。
- [0076] 降低杂质1的实施例
- [0077] 对比例2
- [0078] 野野村放线菌ATCC39727菌株在28℃培养箱中斜面培养8-10d,用接种铲刮取斜面菌丝约8cm²,接种到装有200ml种子培养基的三角瓶(1L)中,将菌丝研磨均匀,在34℃,250rpm摇床中培养48h±2h,按5%接种量直接接种到50L发酵罐,发酵培养温度34℃,初始搅拌200rpm,发酵180h-220h放罐,用HPLC检测A40926样品各组分和杂质情况,HPLC方法同对比例1,色谱结果见图1。
- [0079] 种子培养基:可溶性淀粉1.5%,葡萄糖1.0%,酵母粉0.2%,大豆蛋白胨0.5%,NaCl 0.15%,pH 7.8-8.0。
- [0080] 发酵培养基为:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉1.2%,热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%。 CaCO_3 0.2%,pH 7.8-8.0。
- [0081] 发酵罐上培养工艺参数:初始pH 7.8-8.0,灭菌温度121℃-123℃,灭菌时间30min,溶氧全程联控40%-100%,罐压0.045-0.065Mpa;搅拌200rpm-500rpm;通气比1:0.5-1:1vvm;发酵周期180h-220h,全程pH自然;50L发酵罐装液量30L。
- [0082] 采用HPLC检测A40926样品各组分和杂质占比,液相图谱见图1。
- [0083] 由图1可知,工艺中杂质1比例很高,约占14%,杂质1的比例波动在10%-20%之间,纯化较难去除,增加了后续纯化处理的成本。
- [0084] 结论:发酵培养基配方中不添加脯氨酸时,杂质1含量较高,增加了下游纯化处理的成本。
- [0085] 实施例5
- [0086] 其他培养条件均同对比例2,但发酵培养基中添加0.1%脯氨酸。
- [0087] 发酵培养基为:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉1.2%,热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,脯氨酸0.1%。 CaCO_3 0.2%,pH 7.8-

8.0。

[0088] 采用HPLC检测A40926样品各组分和杂质占比,液相图谱见图2。

[0089] 结论:由图2可知,在培养基配方中,添加0.1%脯氨酸,发酵罐上A40926样品中杂质1的含量显著降低,杂质1比例由14%降至1%以下,可以明显节约后续工艺中纯化成本。

[0090] 实施例6

[0091] 其他培养条件均同对比例2,但发酵培养基配方中将脯氨酸的添加量提高到0.4%。

[0092] 发酵培养基为:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉1.2%,热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,脯氨酸0.4%,CaCO₃ 0.2%,pH 7.8-8.0。

[0093] 采用HPLC检测A40926样品各组分和杂质占比,液相图谱见图3。

[0094] 结论:由图3可知,发酵培养基中添加0.4%脯氨酸时,杂质1比例也可以显著降低,由14%降至1%以下。

[0095] 为了更加清楚的反应脯氨酸的用量对杂质和产量的影响,列表进行对比,结果参考表2。

[0096] 表2脯氨酸的用量对A40926产量和各杂质的影响对比

实施例	脯氨酸用量	杂质1	杂质2	A1组分	A40926产量
对比例2	N/A	14.44%	0.79%	8.02%	1300mg/L
实施例5	0.1%	0.93%	1.76%	9.84%	1935mg/L
实施例6	0.4%	0.92%	1.73%	7.34%	2145mg/L

[0098] 结论:综上,脯氨酸的加入,不仅可以有效降低杂质1,减少下游纯化成本,同时可以显著提高A40926的产量。

[0099] 降低A1和杂质2的实施例

[0100] 实施例7

[0101] 其他培养条件均同对比例2,但发酵培养基配方中添加0.1%脯氨酸,发酵培养基初始pH6.0-6.5。

[0102] 发酵培养基:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉1.2%,热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,脯氨酸0.1%,CaCO₃ 0.2%,pH 6.0-6.5。

[0103] 采用HPLC检测A40926样品各组分和杂质占比,液相图谱见图4。

[0104] 结论:由图4可知,培养基中添加0.1%脯氨酸,发酵培养基初始pH 6.0-6.5,可以有效降低A1组分和杂质2的比例,A1组分由8%~9%降到1%左右,杂质2由0.8~1.7%降到0.5%。

[0105] 实施例8

[0106] 其他培养条件均同对比例2,但发酵培养基配方中脯氨酸的添加量提高到0.5%,发酵罐初始pH 5.0-5.2。

[0107] 发酵培养基:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉1.2%,热炸黄豆饼粉1.5%,大豆蛋白胨0.8%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,脯氨酸0.5%,CaCO₃ 0.2%,pH 5.0-5.2。

[0108] 采用HPLC检测A40926样品各组分和杂质占比,液相图谱见图5。

[0109] 结论:由图5可知,添加0.5%脯氨酸,培养基的初始pH 5.0-5.2,A1组分由8%~9%降到约3.6%,杂质2约占0.9%。

[0110] 实施例9

[0111] 其他培养条件均同对比例2,但发酵培养基配方中添加0.1%脯氨酸,添加0.3%酵母抽提物,培养基初始pH 6.0-6.5。

[0112] 发酵培养基:可溶性淀粉3.0%,蔗糖2.5%,酵母粉1.2%,热炸黄豆饼粉1.5%,酵母抽提物0.3%,无水硫酸镁0.05%,缬氨酸0.15%,脯氨酸0.1%,CaCO₃ 0.2%,pH 6.0-6.5。

[0113] 采用HPLC检测A40926样品各组分和杂质占比,液相图谱见图6。

[0114] 同时采用HPLC对A40926标准品进行杂质分析,液相图谱见图7。

[0115] 结论:1)由图6可知,发酵培养基中添加添加0.1%脯氨酸和0.3%酵母抽提物,培养基初始pH 6.0-6.5,A1组分由8%降至1%,杂质2有0.8%降至约0.2%。采用此方法可以有效降低A1组分和杂质2含量。

[0116] 2)由图6本发明发酵产生的A40926(未进行下游纯化)和图7的市售标准品(已纯化)对比可知,本发明通过优化发酵培养基,在下游纯化之前A40926的杂质水平就可达到和市售对照品的杂质水平接近,大大减少了下游纯化时的成本。

[0117] 将实施例5-9和对比例的实验数据统计至下表3中,进一步进行对比,结果见表3。

[0118] 表3本发明实施例5-9及对比例在50L发酵罐上的试验结果

实施例	发酵培养基添加物料	发酵培养基初始 pH	杂质 1	杂质 2	A1 组分	A40926 产量
对比例 2	无脯氨酸	7.8-8.0	14.44%	0.79%	8.02%	1300mg/L
实施例 5	0.1%脯氨酸	7.8-8.0	0.93%	1.76%	9.84%	1935mg/L
[0119] 实施例 7	0.1%脯氨酸	6.0-6.5	3.86%	0.49%	0.60%	1593mg/L
实施例 8	0.5%脯氨酸	5.0-5.2	3.88%	0.89%	3.67%	1221mg/L
实施例 9	0.1%脯氨酸+ 0.3%酵母抽提物	6.0-6.5	3.15%	0.20%	1.01%	1658mg/L

[0120] 结论:综上,通过对发酵培养基和工艺进行多方面的参数优化,在提高A40926产量的同时,也可进一步降低各杂质的比例,既提高了A40926工业化生产时的产量,又降低了下游纯化时的成本,具有生产工艺简单,成本低的优势。

[0121] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技

术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0122] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

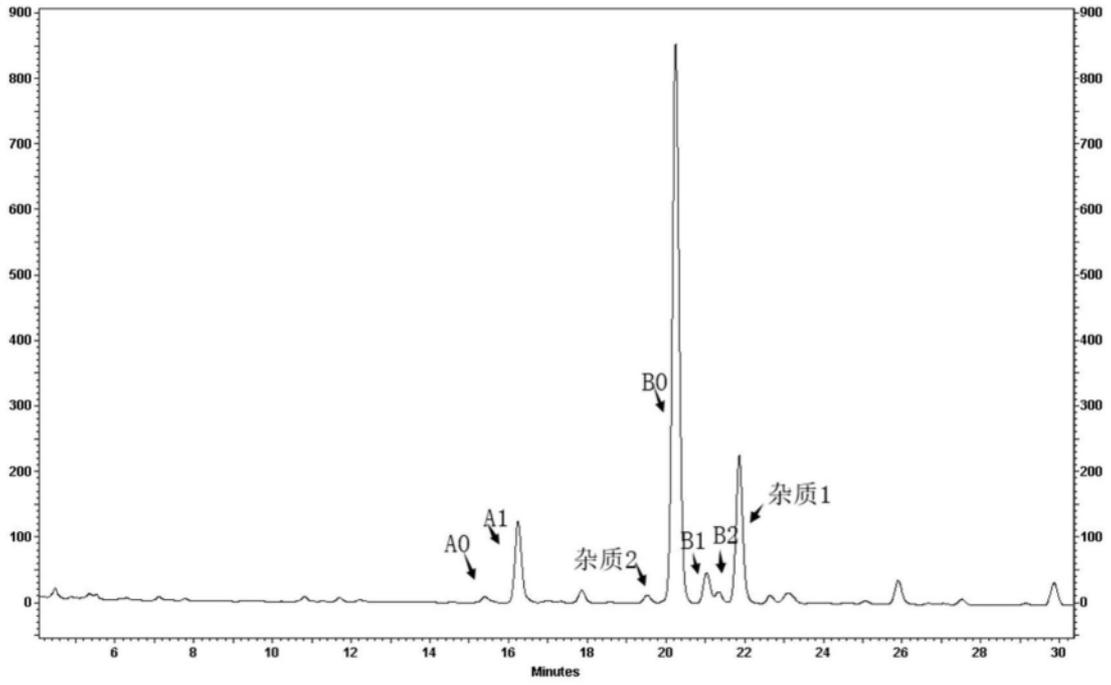


图1

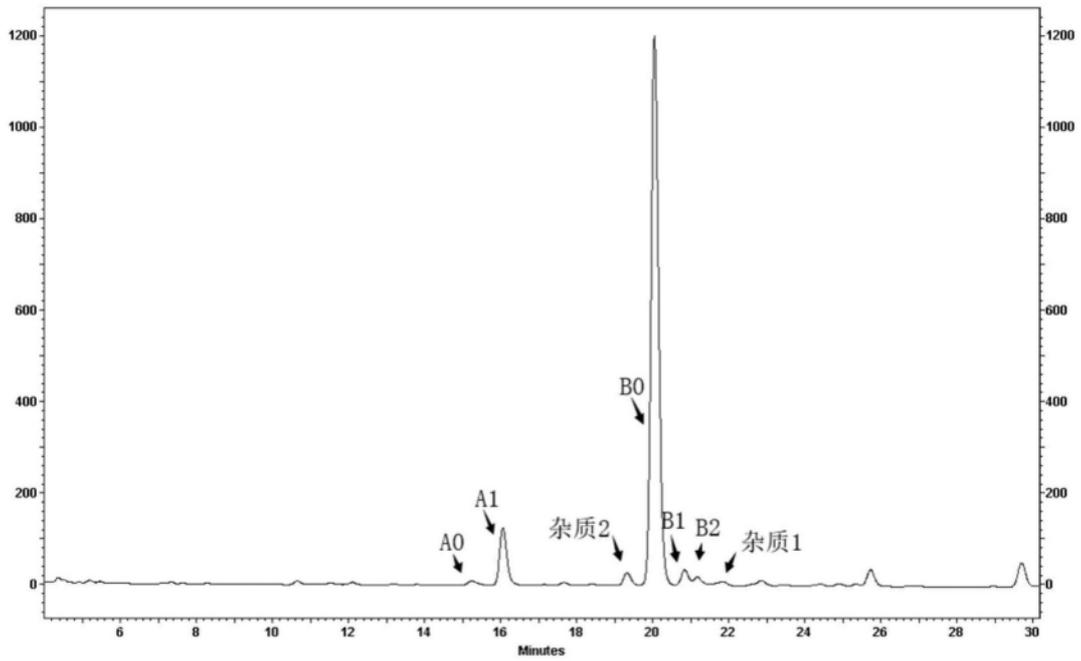


图2

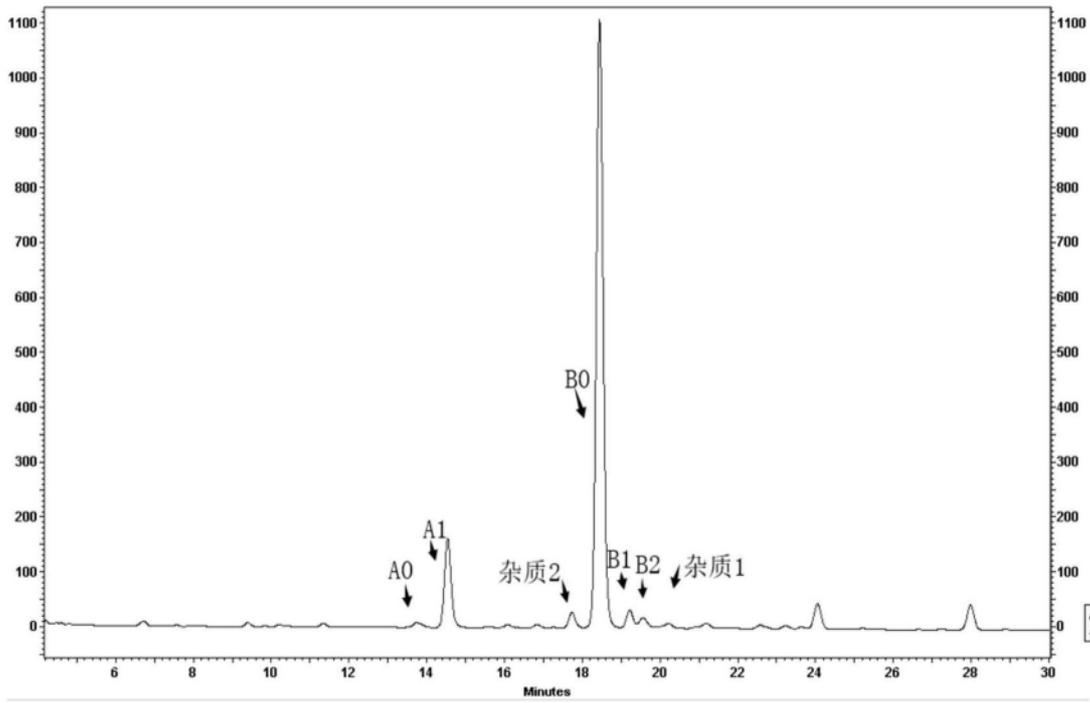


图3

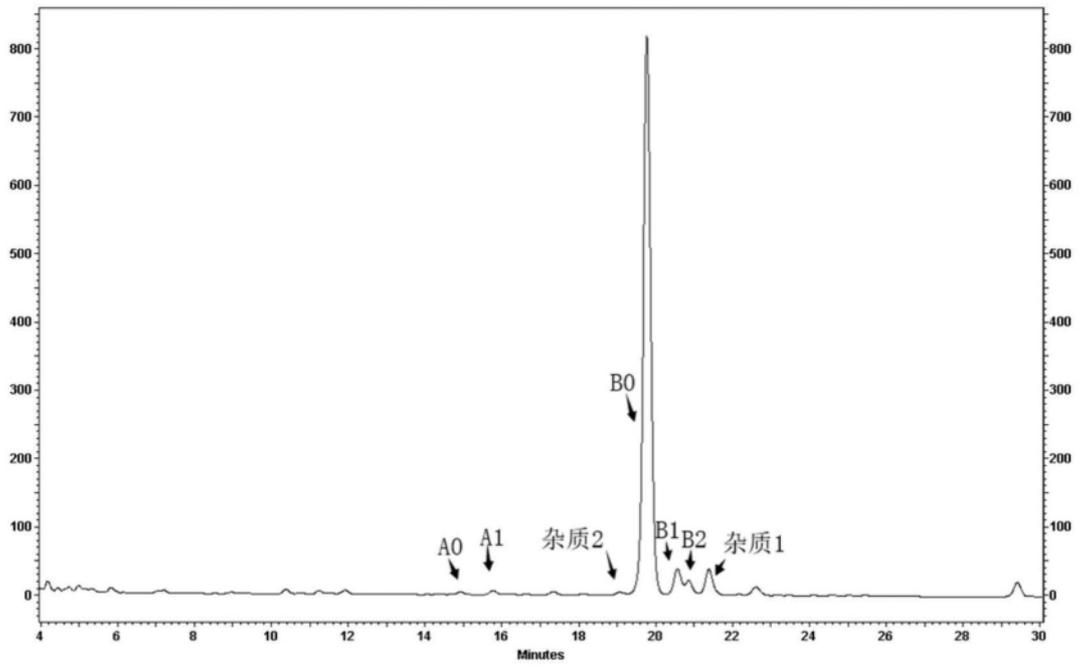


图4

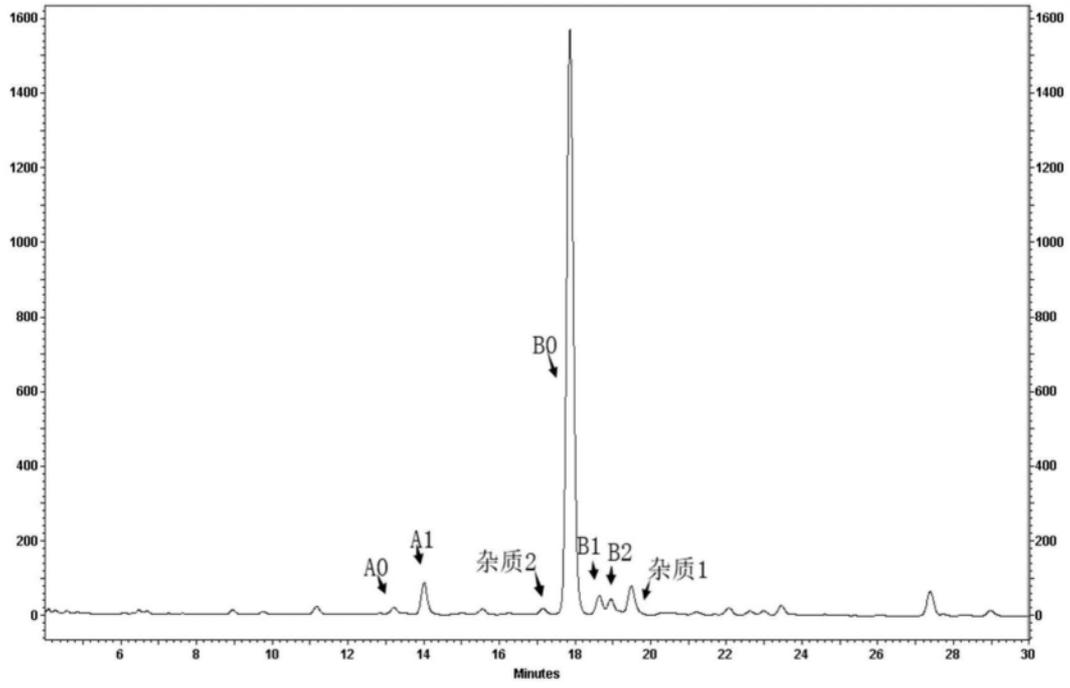


图5

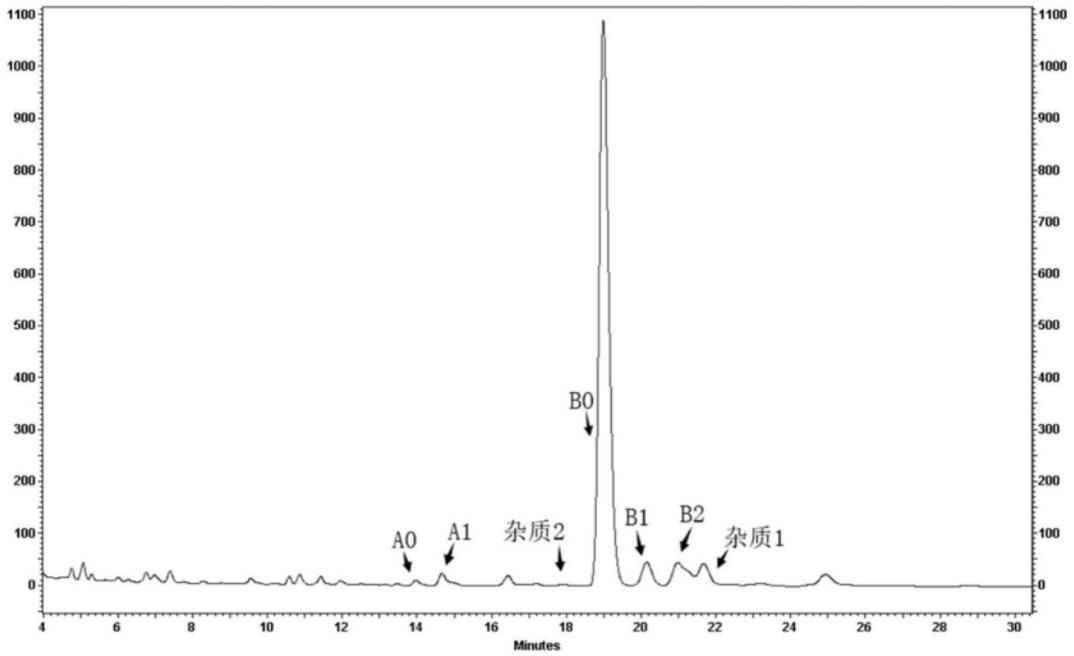


图6

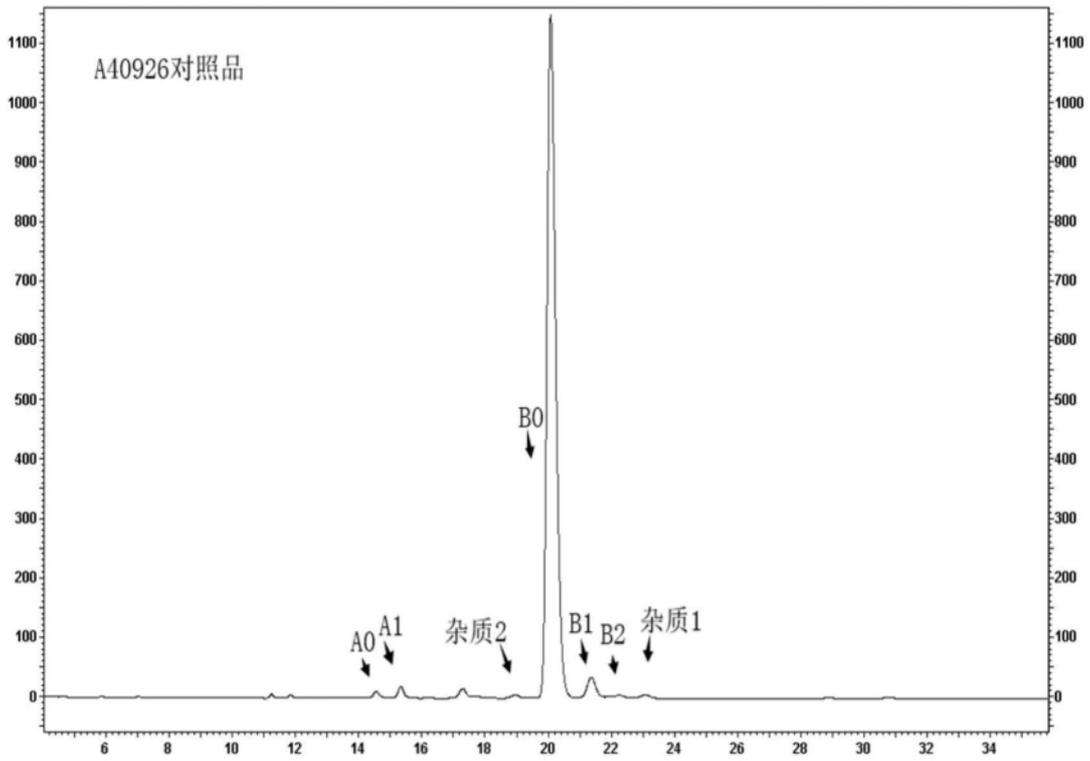


图7