



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109943610 B

(45) 授权公告日 2021.05.25

(21) 申请号 201910369887.4

C12R 1/465 (2006.01)

(22) 申请日 2019.05.06

审查员 杨添淇

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109943610 A

(43) 申请公布日 2019.06.28

(73) 专利权人 淮北师范大学

地址 235000 安徽省淮北市东山路100号

(72) 发明人 曾昕 李峰 曾化伟 徐大勇

张标 信丙越 李珊珊

(74) 专利代理机构 安徽省合肥新安专利代理有

限责任公司 34101

代理人 乔恒婷

(51) Int. Cl.

C12P 19/62 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

一种基于外源饱和脂肪酸添加的纳他霉素  
发酵工艺

(57) 摘要

本发明公开了一种基于外源饱和脂肪酸添加的纳他霉素发酵工艺,通过添加对细胞没有任何毒副作用的缓释前体来源——饱和脂肪酸,其在细胞内进行 $\beta$ 氧化利用时将产生大量乙酰CoA前体和NADH,从而保障纳他霉素大环内酯前体和ATP的供应,促进产物合成。由于饱和脂肪酸常温下呈固态,且不溶于水,其浓度不会影响发酵液中的细胞生长和代谢,因此本工艺中不需要进行严格的饱和脂肪酸浓度控制。本方法能够有效提高纳他霉素的生物合成水平,并大幅降低在发酵液中精密调控前体浓度的检测和补料操作负荷,在工业上具有重要的应用价值。

1. 一种基于外源饱和脂肪酸添加的纳他霉素发酵工艺,采用分批发酵的方式,其特征在于包括如下步骤:

步骤1:发酵种子培养

将褐黄孢链霉菌接种于固体贝塔纳培养基上,于29℃恒温培养箱中培养10天,直至长出褐黄色孢子;用接种环挑取3环孢子置于装有60mL液体种子培养基的500mL三角瓶中,于29℃、220rpm条件下恒温振荡培养2天;

步骤2:5L发酵罐分批培养的前处理

配制除去葡萄糖的纳他霉素发酵培养基,加入到5L发酵罐中,总装液量设置为1.5L,另添加80g饱和脂肪酸,于115-121℃灭菌20-30min,结束后立即开动搅拌,并开通控温系统使发酵罐冷却至29℃,此过程可将高温脂肪酸液滴打碎,冷却后形成小粒度固体饱和脂肪酸;然后将灭菌的溶有80g葡萄糖的500mL水溶液用蠕动泵全部补入,配成混合碳源发酵培养基;

步骤3:5L发酵罐分批发酵

向步骤2获得的混合碳源发酵培养基中以8%的接种量接种步骤1获得的发酵种子,培养发酵,全过程发酵pH值不进行控制,直至纳他霉素合成停止。

2. 根据权利要求1所述的发酵工艺,其特征在于:

所述固体贝塔纳培养基的配方以1L计,包括如下:葡萄糖10g,酵母粉1g,蛋白胨2g,琼脂20g,pH 7.5;

所述液体种子培养基的配方以1L计,包括如下:葡萄糖20g,酵母粉6g,大豆蛋白胨6g,pH 7.5;

所述纳他霉素发酵培养基的配方以1L计,包括如下:碳源若干,酵母粉10g,大豆蛋白胨20g,CaCO<sub>3</sub> 5g,pH 7.5。

3. 根据权利要求1所述的发酵工艺,其特征在于:

所述饱和脂肪酸为硬脂酸或软脂酸。

4. 根据权利要求1所述的发酵工艺,其特征在于:

步骤3中,于初始pH值6.5、温度29℃、溶氧保持在30%以上的培养条件下发酵。

5. 一种基于外源饱和脂肪酸添加的纳他霉素发酵工艺,采用补料分批发酵的方式,其特征在于包括如下步骤:

步骤1:发酵种子培养

将褐黄孢链霉菌接种于固体贝塔纳培养基上,于29℃恒温培养箱中培养10天,直至长出褐黄色孢子;用接种环挑取3环孢子置于装有60mL液体种子培养基的500mL三角瓶中,于29℃、220rpm条件下恒温振荡培养2天;

步骤2:5L发酵罐补料分批培养的前处理

配制除去葡萄糖的纳他霉素发酵培养基,加入到5L发酵罐中,总装液量设置为1.5L,另添加80g饱和脂肪酸,于115-121℃灭菌20-30min,结束后立即开动搅拌,并开通控温系统使发酵罐冷却至29℃,此过程可将高温脂肪酸液滴打碎,冷却后形成小粒度固体饱和脂肪酸;然后将灭菌的溶有160g葡萄糖的500mL水溶液用蠕动泵全部补入,配成混合碳源发酵培养基;

步骤3:5L发酵罐补料分批发酵

向步骤2获得的混合碳源发酵培养基中以8%的接种量接种步骤1获得的发酵种子,培养发酵,全过程发酵pH值不进行控制,当发酵液中葡萄糖浓度降低到10g/L时,通过外源流加60%无菌葡萄糖溶液将葡萄糖浓度维持在10~20g/L范围内,直至纳他霉素合成停止。

6. 根据权利要求5所述的发酵工艺,其特征在于:

所述固体贝塔纳培养基的配方以1L计,包括如下:葡萄糖10g,酵母粉1g,蛋白胨2g,琼脂20g,pH 7.5;

所述液体种子培养基的配方以1L计,包括如下:葡萄糖20g,酵母粉6g,大豆蛋白胨6g,pH 7.5;

所述纳他霉素发酵培养基的配方以1L计,包括如下:碳源若干,酵母粉10g,大豆蛋白胨20g,  $\text{CaCO}_3$  5g,pH 7.5。

7. 根据权利要求5所述的发酵工艺,其特征在于:

所述饱和脂肪酸为硬脂酸或软脂酸。

8. 根据权利要求5所述的发酵工艺,其特征在于:

步骤3中,于初始pH值6.5、温度29℃、溶氧保持在30%以上的培养条件下发酵。

## 一种基于外源饱和脂肪酸添加的纳他霉素发酵工艺

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种促进纳他霉素合成的方法,具体地说是一种基于外源饱和脂肪酸添加的纳他霉素发酵工艺,属于工业生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 纳他霉素(Natamycin)是一种多烯大环内酯类抗真菌剂,目前其生产主要由链霉菌属产生菌(恰塔努加链霉菌、褐黄孢链霉菌、利迪链霉菌和纳塔尔链霉菌等)通过液态深层发酵来实现。纳他霉素能结合真菌细胞膜上的甾醇类基团,从而使真菌细胞膜发生畸变而破裂,故对霉菌、酵母等真菌具有强烈的抑制作用。近30年来,纳他霉素凭借着其极高的安全性(FDA, §172.155, 1994),在真菌类疾病治疗、食品防腐保鲜等领域发挥了重要的作用,具有应用范围广、市场需求大、绿色安全的优点。然而,目前纳他霉素的生产成本过高(市售¥850kg<sup>-1</sup>),这极大的限制了其工业化和市场化进程。如何通过改进发酵工艺来提升纳他霉素的发酵水平已然成为产业界追求的目标。

[0003] 纳他霉素是一种微生物次级代谢产物,其分子中的关键结构——大环内酯环由多个乙酸单位和一个丙酸单位聚合形成,而在生命体中直接提供这些单位的是乙酰CoA和丙酰CoA。在纳他霉素生物合成领域,已有通过外源添加前体物质(乙酸、丙酸、丙醇等)的方式促进纳他霉素合成的研究。然而,值得注意的是,以上添加的前体物质在发酵液中大多不能超过5g/L,一旦超过该限度,细胞生长和纳他霉素合成能力将大幅下降。事实上,抗生素发酵生产中添加分子前体由来已久,适量的前体添加往往能够大幅强化抗生素的合成水平。而由于前体往往对细胞具有一定的毒性,或易引发反馈抑制作用,因此其添加工艺中最大的问题在于如何实时检测发酵液中的低浓度前体,并对其进行精密的补料控制。显然,在大规模微生物工业发酵生产中是很难实现低剂量成分的精密控制的。

[0004] 油脂类底物常常在发酵中发挥着重要的作用。油脂是一种良好的氧载体,可以加速氧气在发酵液体体系的溶解,降低氧气的传递阻力,提高传氧能力。另外,油脂水解后产生的甘油和脂肪酸均是良好的碳源,其中脂肪酸可被部分微生物经 $\beta$ 氧化代谢分解成乙酰CoA,从而为大环内酯结构提供前体。研究表明,外源添加植物油可大幅提高泰乐菌素的发酵水平,而在纳他霉素发酵中,外源添加的植物油往往无法被产生菌利用,而仅仅作为氧载体来改善氧气的转递。若能对油类底物进行处理,使其作为碳源而在纳他霉素生物合成中使用,将大大提高纳他霉素生物合成中的乙酰CoA前体供应能力,避免直接添加前体带来的细胞毒性和反馈抑制作用。

### 发明内容

[0005] 为提高纳他霉素发酵水平,降低直接添加前体的细胞毒性、反馈抑制和调控操作负荷,本发明提供了一种基于外源饱和脂肪酸添加的纳他霉素发酵工艺。本发明针对直接添加乙酸等前体物质容易产生的细胞毒性、反馈抑制的问题,开发出一种以褐黄孢链霉菌Z8(*Streptomyces gilvosporeus*Z8)为生产菌,利用葡萄糖和饱和脂肪酸双碳源进行纳他

霉素合成的方法。本发明方法不仅可提高纳他霉素发酵产量,还可大幅减少前体添加中的调控难度,在纳他霉素生物合成中具有重要的工业应用价值。

[0006] 本发明通过外源饱和脂肪酸添加的方式来提高纳他霉素生物合成水平。本工艺的特点在于添加对细胞没有任何毒副作用的缓释前体来源——饱和脂肪酸,其在细胞内进行 $\beta$ 氧化利用时将产生大量乙酰CoA前体和NADH,从而保障纳他霉素大环内酯前体和ATP的供应,促进产物合成。由于饱和脂肪酸常温下呈固态,且不溶于水,其浓度不会影响发酵液中的细胞生长和代谢,因此本工艺中不需要进行严格的饱和脂肪酸浓度控制。本方法能够有效提高纳他霉素的生物合成水平,并大幅降低在发酵液中精密调控前体浓度的检测和补料操作负荷,在工业上具有重要的应用价值。

[0007] 本发明基于外源饱和脂肪酸添加的纳他霉素发酵工艺之一,采用分批发酵的方式,包括如下步骤:

[0008] 步骤1:发酵种子培养

[0009] 将褐黄孢链霉菌接种于固体贝塔纳培养基上,于29℃恒温培养箱中培养10天,直至长出褐黄色孢子;用接种环挑取3环孢子置于装有60mL液体种子培养基的500mL三角瓶中,于29℃、220rpm条件下恒温振荡培养2天;

[0010] 步骤2:5L发酵罐分批培养的前处理

[0011] 选择5L液态发酵罐,使用两种不同的桨叶形态,其中下层桨叶使用圆盘六直页涡轮搅拌器,上层采用四叶螺旋桨型搅拌器。配制除去葡萄糖的纳他霉素发酵培养基,加入到5L发酵罐中,总装液量设置为1.5L,另添加80g饱和脂肪酸,于115-121℃灭菌20-30min,结束后立即开动搅拌(400-600rpm),并开通控温系统使发酵罐冷却至29℃,此过程可将高温脂肪酸液滴打碎,冷却后形成小粒度固体饱和脂肪酸。此工作结束后将单独灭菌(115-121℃灭菌20-30min)的溶有80g葡萄糖的500mL水溶液用蠕动泵全部补入,配成混合碳源发酵培养基;

[0012] 步骤3:5L发酵罐分批发酵

[0013] 向步骤2获得的混合碳源发酵培养基中以8%的接种量接种步骤1获得的发酵种子,于初始pH值6.5、温度29℃、溶氧保持在30%以上的培养条件下发酵,全过程发酵pH值不进行控制,直至纳他霉素合成停止。

[0014] 本发明基于外源饱和脂肪酸添加的纳他霉素发酵工艺之二,采用补料分批发酵的方式,包括如下步骤:

[0015] 步骤1:发酵种子培养

[0016] 将褐黄孢链霉菌接种于固体贝塔纳培养基上,于29℃恒温培养箱中培养10天,直至长出褐黄色孢子;用接种环挑取3环孢子置于装有60mL液体种子培养基的500mL三角瓶中,于29℃、220rpm条件下恒温振荡培养2天;

[0017] 步骤2:5L发酵罐补料分批培养的前处理

[0018] 选择5L液态发酵罐,使用两种不同的桨叶形态,其中下层桨叶使用圆盘六直页涡轮搅拌器,上层采用四叶螺旋桨型搅拌器。配制除去葡萄糖的纳他霉素发酵培养基,加入到5L发酵罐中,总装液量设置为1.5L,另添加80g饱和脂肪酸,于115-121℃灭菌20-30min,结束后立即开动搅拌(400-600rpm),并开通控温系统使发酵罐冷却至29℃,此过程可将高温脂肪酸液滴打碎,冷却后形成小粒度固体饱和脂肪酸。此工作结束后将单独灭菌(115-121

℃灭菌20-30min)的溶有160g葡萄糖的500mL水溶液用蠕动泵全部补入,配成混合碳源发酵培养基;

[0019] 步骤3:5L发酵罐补料分批发酵

[0020] 向步骤2获得的混合碳源发酵培养基中以8%的接种量接种步骤1获得的发酵种子,于初始pH值6.5、温度29℃、溶氧保持在30%以上的培养条件下发酵。全过程发酵pH值不进行控制,当发酵液中葡萄糖浓度降低到10g/L时,通过外源流加60%无菌葡萄糖溶液将葡萄糖浓度维持在10~20g/L范围内,直至纳他霉素合成停止。

[0021] 所述褐黄孢链霉菌优选为褐黄孢链霉菌Z8(*Streptomyces gilvosporeus*Z8)。

[0022] 所述固体贝塔纳培养基的配方以1L计,包括如下:葡萄糖10g,酵母粉1g,蛋白胨2g,琼脂20g,pH 7.5。

[0023] 所述液体种子培养基的配方以1L计,包括如下:葡萄糖20g,酵母粉6g,大豆蛋白胨6g,pH 7.5。

[0024] 所述纳他霉素发酵培养基的配方以1L计,包括如下:碳源若干,酵母粉10g,大豆蛋白胨20g,CaCO<sub>3</sub> 5g,pH 7.5。

[0025] 本发明中,所述饱和脂肪酸为硬脂酸或软脂酸。本发明还以油脂和不饱和脂肪酸作为对比。所述油脂为猪油、羊油、牛油、鱼油、大豆油、菜籽油、花生油、玉米油等,所述不饱和脂肪酸为油酸。

[0026] 本发明基于饱和脂肪酸的外源添加手段的纳他霉素发酵工艺,是利用葡萄糖和饱和脂肪酸两种碳源进行的纳他霉素发酵。饱和脂肪酸是不溶于水的固体,其添加量不会对细胞生长和产物合成产生影响。经过系统优化,采用新培养基配方及发酵工艺能够在120h合成7.5g/L纳他霉素,相比未添加饱和脂肪酸分批发酵,纳他霉素产量提升了469.8%,在工业微生物发酵领域具有较强的应用价值。

[0027] 与传统纳他霉素发酵生产方法相比,本发明采用饱和脂肪酸外源添加发酵生产纳他霉素的方法具有以下优点:

[0028] 1、能够为纳他霉素生物合成提供大量前体和能量,从而大幅提高纳他霉素的发酵产量;

[0029] 2、饱和脂肪酸不溶于水,高浓度添加不会影响流体特性,也不会影响细胞生长和代谢;

[0030] 3、相比直接添加前体发酵,本工艺不需要严格控制饱和脂肪酸的浓度,降低了操作难度;

[0031] 下面结合具体实施例,可以更好地理解本发明。实施例所描述的具体的油脂及其水解物的筛选、工艺条件以及结果仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

## 具体实施方式

[0032] (一) 油脂类底物的外源添加发酵

[0033] 本发明的生物反应器包括250mL三角瓶和5L液态发酵罐两种。

[0034] 本发明油脂类底物筛选和优化实验均在250mL三角瓶中完成,饱和脂肪酸外源添加分批发酵、饱和脂肪酸外源添加补料分批发酵均在5L发酵罐中进行。具体操作步骤如下:

[0035] 一、菌种:褐黄孢链霉菌Z8 (*Streptomyces gilvosporeus* Z8)。

[0036] 二、培养基配方:

[0037] 1、固体贝塔纳培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):葡萄糖10,酵母粉1,蛋白胨2,琼脂20,pH 7.5。

[0038] 2、液体种子培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):葡萄糖20,酵母粉6,大豆蛋白胨6,NaCl 5,pH 7.5。

[0039] 3、纳他霉素发酵培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):碳源若干,酵母粉10,大豆蛋白胨20,CaCO<sub>3</sub> 5,pH 7.5。

[0040] 三、实验步骤:

[0041] 1、发酵种子培养

[0042] 将褐黄孢链霉菌Z8接种于固体贝塔纳培养基上,于29℃恒温培养箱中培养10天,直至长出褐黄色孢子;用接种环挑取3环孢子置于装液量60mL的500mL液体种子培养基三角瓶中,于29℃恒温振荡培养箱中220rpm培养2天;

[0043] 2、基于葡萄糖-脂肪酸复合碳源的纳他霉素5L发酵罐分批发酵试验

[0044] 选择5L液态发酵罐,使用两种不同的桨叶形态,其中下层桨叶使用圆盘六直页涡轮搅拌器,上层采用四叶螺旋桨型搅拌器。将除去葡萄糖的纳他霉素发酵培养基配好,加入到5L发酵罐中,总装液量设置为1.5L,另添加80g硬脂酸,于115-121℃灭菌20-30min,结束后立即开动搅拌(400-600rpm),并开通控温系统使发酵罐冷却至29℃,此过程可将高温脂肪酸液滴打碎,冷却后形成小粒度固体硬脂酸。此工作结束后将单独灭菌(115-121℃灭菌20-30min)的溶有80g葡萄糖的500mL溶液用蠕动泵全部补入,配成混合碳源发酵培养基。以8%的接种量接种步骤1获得的发酵种子,于初始pH值6.5、温度29℃、溶氧保持在30%以上的培养条件下发酵。全过程发酵pH值不进行控制,当碳源全部耗尽时发酵结束。本发酵过程中,每隔12h取样测定纳他霉素浓度、残葡萄糖、残脂肪酸。

[0045] 3、基于葡萄糖-脂肪酸复合碳源的纳他霉素5L发酵罐补料分批发酵试验

[0046] 选择5L液态发酵罐,使用两种不同的桨叶形态,其中下层桨叶使用圆盘六直页涡轮搅拌器,上层采用四叶螺旋桨型搅拌器。将除去葡萄糖的纳他霉素发酵培养基配好,加入到5L发酵罐中,总装液量设置为1.5L,另添加80g硬脂酸,于115-121℃灭菌20-30min,结束后立即开动搅拌(400-600rpm),并开通控温系统使发酵罐冷却至29℃,此过程可将高温脂肪酸液滴打碎,冷却后形成小粒度固体硬脂酸。此工作结束后将单独灭菌(115-121℃灭菌20-30min)的溶有160g葡萄糖的500mL溶液用蠕动泵全部补入,配成混合碳源发酵培养基。以8%的接种量接种步骤1获得的发酵种子,于初始pH值6.5、温度29℃、溶氧保持在30%以上的培养条件下发酵。全过程发酵pH值不进行控制,当葡萄糖浓度低于10g/L时,通过外流加60%预灭菌的葡萄糖溶液将发酵液中葡萄糖浓度维持在10-20g/L,当纳他霉素浓度不再提高时发酵结束。本发酵过程中,每隔12h取样测定纳他霉素浓度、残葡萄糖、残脂肪酸。

4、检测方法

[0047] 发酵液中纳他霉素浓度检测:将1mL发酵液与9mL甲醇混合,于超声波清洗器中振荡提取20min,4500g离心10min,上清液过0.45 $\mu\text{m}$ 的有机滤膜后,采用HPLC进行浓度检测。使用C18色谱柱,流动相设定为甲醇-水混合液(甲醇60%,水40%),柱温控制为25℃,进样量10 $\mu\text{L}$ 。

[0048] 发酵液中葡萄糖浓度检测:将300 $\mu\text{L}$ 发酵液和700 $\mu\text{L}$ 无水乙醇混合,静置1h后离心取上清,过0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜后进行HPLC检测。使用有机酸测试柱,流动相设定为5mM硫酸,柱温控

制为60℃,进样量10μL。

[0049] 发酵液中硬脂酸浓度检测:将1mL发酵液和5mL异辛烷进行混合,振荡6min,4500rpm离心5min,上层液体移至另一10mL离心管,加入1mL5%醋酸铜显色剂,振荡后4500rpm离心5min,上层液体于715nm处测定吸光度。根据不同浓度硬脂酸标准品和醋酸铜显色剂反应得到的标准曲线测定发酵液中的硬脂酸浓度。

## [0050] (二) 实施例

[0051] 实施例1:可用于纳他霉素生物合成的油脂类底物初筛

[0052] 在250mL三角瓶中,按纳他霉素发酵培养基配方配制液态培养基,其中碳源分别选用80g/L葡萄糖(对照)、50g/L动物油(猪油、羊油、牛油、鱼油)、50g/L植物油(玉米油、花生油、菜籽油、大豆油)、50g/L油酸、50g/L软脂酸、50g/L硬脂酸其中的一种,每瓶中均加入20-30颗玻璃珠,用8层纱布封口,于高温灭菌锅中115℃灭菌15min后立即取出,在30℃摇床中220rpm振荡至培养基冷却,获得具有分散微粒的油脂类底物发酵培养液;将成熟的发酵种子以8%接种量接于以上发酵培养基,于29℃恒温振荡培养箱中培养4天,结束后测定发酵液中纳他霉素浓度,以高纳他霉素产量为主要指标,筛选最优的油脂类底物。最终的发酵液中纳他霉素浓度分别为0.6g/L(对照)、0g/L(猪油)、0g/L(羊油)、0g/L(牛油)、0g/L(鱼油)、0g/L(玉米油)、0g/L(花生油)、0g/L(菜籽油)、0g/L(大豆油),游离细胞浓度分别为16.3g/L(对照)、1.1g/L(猪油)、1.2g/L(羊油)、1g/L(牛油)、0.9g/L(鱼油)、1.3g/L(玉米油)、1.4g/L(花生油)、1.3g/L(菜籽油)、1.3g/L(大豆油)。以上数据显示,无论是动物油还是植物油都不能够被纳他霉素产生菌直接利用,更不能支撑纳他霉素的生物合成。

[0053] 实施例2:葡萄糖-油类底物复合添加试验

[0054] 在250mL三角瓶中,按纳他霉素发酵培养基配方配制液态培养基,其中碳源分别选用80g/L葡萄糖(对照)、80g/L葡萄糖+10g/L动物油(猪油、羊油、牛油、鱼油)、80g/L葡萄糖+10g/L植物油(玉米油、花生油、菜籽油、大豆油)、80g/L葡萄糖+10g/L甘油、80g/L葡萄糖+10g/L油酸、80g/L葡萄糖+10g/L软脂酸、80g/L葡萄糖+10g/L硬脂酸其中的一种,每瓶中均加入20-30颗玻璃珠,用8层纱布封口,于高温灭菌锅中115℃灭菌15min后立即取出,在30℃摇床中220rpm振荡至培养基冷却,获得具有分散微粒的油脂类底物发酵培养液;将成熟的发酵种子以8%接种量接于以上发酵培养基,于29℃恒温振荡培养箱中培养4天,结束后测定发酵液中纳他霉素浓度,以高纳他霉素产量为主要指标,筛选最优的葡萄糖-饱和脂肪酸复合底物形式。最终的发酵液中纳他霉素浓度分别为0.6g/L(对照)、0.5g/L(葡萄糖+猪油)、0.6g/L(葡萄糖+羊油)、0.5g/L(葡萄糖+牛油)、0.7g/L(葡萄糖+鱼油)、0.8g/L(葡萄糖+玉米油)、0.8g/L(葡萄糖+花生油)、0.9g/L(葡萄糖+菜籽油)、0.9g/L(葡萄糖+大豆油)、0.8g/L(葡萄糖+甘油)、0g/L(葡萄糖+油酸)、1.7g/L(葡萄糖+软脂酸)、2.1g/L(葡萄糖+硬脂酸),游离细胞浓度分别为16.3g/L(对照)、14.8g/L(葡萄糖+猪油)、15.4g/L(葡萄糖+羊油)、15.2g/L(葡萄糖+牛油)、17.1g/L(葡萄糖+鱼油)、17.7g/L(葡萄糖+玉米油)、17.4g/L(葡萄糖+花生油)、18.3g/L(葡萄糖+菜籽油)、18.2g/L(葡萄糖+大豆油)、17.2g/L(葡萄糖+甘油)、1.1g/L(葡萄糖+油酸)、20.1g/L(葡萄糖+软脂酸)、21.2g/L(葡萄糖+硬脂酸)。以上数据显示,额外添加动物油和植物油均不能促进纳他霉素合成。油脂水解物包括甘油、饱和脂肪酸(最多的为油酸)、饱和脂肪酸(主要有软脂酸和硬脂酸)。如上数据显示,添加饱和脂肪酸能够显著强化纳他霉素的合成,而添加不饱和脂肪酸(油酸)将对细胞产生毒害,对

纳他霉素合成不利,添加甘油可少量的提高纳他霉素合成水平,但是效果较饱和脂肪酸具有一定差距。

[0055] 实施例3:饱和脂肪酸的添加粒度优化

[0056] 将软脂酸和硬脂酸分别在高温灭菌锅中115℃灭菌15min,取出用预灭菌的研钵磨碎,分成约0.7mm、0.15mm、0.45mm、1.3mm、1.8mm粒径的饱和脂肪酸颗粒。在250mL三角瓶中,按纳他霉素发酵培养基配方配制液态培养基,每瓶中均加入20-30颗玻璃珠,用8层纱布封口,于高温灭菌锅中115℃灭菌15min。冷却后,分别向不同的摇瓶中添加以上制成的50g/L软脂酸(直径约0.15mm)、50g/L软脂酸(直径约0.45mm)、50g/L软脂酸(直径约1.3mm)、50g/L软脂酸(直径约1.8mm)、50g/L硬脂酸(直径约0.15mm)、50g/L硬脂酸(直径约0.45mm)、50g/L硬脂酸(直径约1.3mm)、50g/L硬脂酸(直径约1.8mm)。将成熟的发酵种子以8%接种量接于以上发酵培养基,于29℃恒温振荡培养箱中培养4天,结束后测定发酵液中纳他霉素浓度,以高纳他霉素产量为主要指标,筛选最优的饱和脂肪酸添加粒径。最终的发酵液中纳他霉素浓度分别为葡萄糖0.6g/L(对照)、2.2g/L(0.15mm软脂酸)、2.0g/L(0.45mm软脂酸)、0g/L(1.3mm软脂酸)、0g/L(1.8mm软脂酸)、2.6g/L(0.15mm硬脂酸)、2.3g/L(0.45mm硬脂酸)、0g/L(1.3mm硬脂酸)、0g/L(1.8mm硬脂酸)。以上数据显示,只有1mm粒径以下的饱和脂肪酸微粒才能在纳他霉素生物合成中单独作为碳源使用。

[0057] 实施例4:葡萄糖-梯度浓度饱和脂肪酸为底物的纳他霉素摇瓶发酵

[0058] 在250mL三角瓶中,按纳他霉素发酵培养基配方配制液态培养基,其中碳源分别选用80g/L葡萄糖(对照)、80g/L葡萄糖+2.5g/L软脂酸、80g/L葡萄糖+5g/L软脂酸、80g/L葡萄糖+10g/L软脂酸、80g/L葡萄糖+15g/L软脂酸、80g/L葡萄糖+20g/L软脂酸、80g/L葡萄糖+2.5g/L硬脂酸、80g/L葡萄糖+5g/L硬脂酸、80g/L葡萄糖+10g/L硬脂酸、80g/L葡萄糖+15g/L硬脂酸、80g/L葡萄糖+20g/L硬脂酸,每瓶中均加入20-30颗玻璃珠,用8层纱布封口,于高温灭菌锅中115℃灭菌15min后立即取出,在30℃摇床中220rpm振荡至培养基冷却,获得具有分散微粒的油脂类底物发酵培养液;将成熟的发酵种子以8%接种量接于以上发酵培养基,于29℃恒温振荡培养箱中培养4天,结束后测定发酵液中纳他霉素浓度,以高纳他霉素产量为主要指标,筛选最优的饱和脂肪酸外源添加浓度。最终的发酵液中纳他霉素浓度分别为0.6g/L(对照)、1.2g/L(葡萄糖+2.5g/L软脂酸)、1.6g/L(葡萄糖+5g/L软脂酸)、1.7g/L(葡萄糖+10g/L软脂酸)、1.8g/L(葡萄糖+15g/L软脂酸)、1.9g/L(葡萄糖+20g/L软脂酸)、1.1g/L(葡萄糖+2.5g/L硬脂酸)、1.3g/L(葡萄糖+5g/L硬脂酸)、1.9g/L(葡萄糖+10g/L硬脂酸)、2.4g/L(葡萄糖+15g/L硬脂酸)、2.6g/L(葡萄糖+20g/L硬脂酸)。以上数据显示,随着饱和脂肪酸浓度提高,纳他霉素合成水平逐步提高。

[0059] 实施例5:饱和脂肪酸相比前体直接添加的优势

[0060] 在250mL三角瓶中,按纳他霉素发酵培养基配方配制液态培养基,其中碳源分别选用80g/L葡萄糖(对照)、80g/L葡萄糖+1g/L醋酸钠、80g/L葡萄糖+2g/L醋酸钠、80g/L葡萄糖+3g/L醋酸钠、80g/L葡萄糖+4g/L醋酸钠、80g/L葡萄糖+5g/L醋酸钠、80g/L葡萄糖+10g/L硬脂酸、80g/L葡萄糖+20g/L硬脂酸、80g/L葡萄糖+30g/L硬脂酸、80g/L葡萄糖+40g/L硬脂酸、80g/L葡萄糖+50g/L硬脂酸,每瓶中均加入20-30颗玻璃珠,用8层纱布封口,于高温灭菌锅中115℃灭菌15min后立即取出,在30℃摇床中220rpm振荡至培养基冷却,获得具有分散微粒的油脂类底物发酵培养液。其中醋酸钠溶液经无菌0.22微米滤膜过滤以除菌,再加入

高温灭菌后的发酵培养基中。将成熟的发酵种子以8%接种量接于以上发酵培养基,于29℃恒温振荡培养箱中培养4天,结束后测定发酵液中纳他霉素浓度,对比直接添加前体和添加脂肪酸之间的差异。最终的发酵液中纳他霉素浓度分别为0.6g/L(对照)、1.1g/L(葡萄糖+1g/L醋酸钠)、0.9g/L(葡萄糖+2g/L醋酸钠)、0.7g/L(葡萄糖+3g/L醋酸钠)、0.6g/L(葡萄糖+4g/L醋酸钠)、0.3g/L(葡萄糖+5g/L醋酸钠)、1.9g/L(葡萄糖+10g/L硬脂酸)、2.4g/L(葡萄糖+20g/L硬脂酸)、2.7g/L(葡萄糖+30g/L硬脂酸)、3.4g/L(葡萄糖+40g/L硬脂酸)、2.9g/L(葡萄糖+50g/L硬脂酸)。以上数据显示,随着饱和脂肪酸浓度提高,纳他霉素合成水平逐步提高,其中当硬脂酸浓度为40g/L时,纳他霉素合成水平最高。此外,相比前体醋酸钠的直接添加,高浓度硬脂酸不会抑制纳他霉素的生物合成,而单一的前体醋酸钠添加仅仅在低浓度才对纳他霉素合成有促进作用,且促进效果不如饱和脂肪酸。因此,外源添加饱和脂肪酸是一种相比直接添加前体物质更优的纳他霉素发酵工艺。

#### [0061] 实施例6:葡萄糖-硬脂酸不同配比摇瓶发酵

[0062] 在250mL三角瓶中,按纳他霉素发酵培养基配方配制液态培养基,采用总碳源浓度为80g/L的混合碳源(葡萄糖:硬脂酸,w/w)进行发酵,其比例分别为8:0、7:1、6:2、5:3、4:4、3:5、2:6、1:7和0:8。每瓶中均加入20-30颗玻璃珠,用8层纱布封口,于高温灭菌锅中115℃灭菌15min后立即取出,在30℃摇床中220rpm振荡至培养基冷却,获得具有分散微粒的油脂类底物发酵培养基;将成熟的发酵种子以8%接种量接于以上发酵培养基,于29℃恒温振荡培养箱中培养4天,结束后测定发酵液中纳他霉素浓度,以高纳他霉素产量为主要指标,筛选最优的葡萄糖-硬脂酸配比。最终发酵液中纳他霉素浓度如下,8:0碳源比纳他霉素产量为0.6g/L、7:1碳源比为1.4g/L、6:2碳源比为1.8g/L、5:3碳源比为2.4g/L、4:4碳源比为2.7g/L、3:5碳源比为2.5g/L、2:6碳源比为1.8g/L、1:7碳源比为1.2g/L和0:8碳源比为0.4g/L。以上数据显示,分批发酵中,葡萄糖:饱和脂肪酸最佳比例为1:1,此比例将用于下一步的5L发酵罐分批发酵中。

#### [0063] 实施例7:基于葡萄糖-脂肪酸复合碳源的纳他霉素5L发酵罐分批发酵试验

[0064] 选择5L液态发酵罐,使用两种不同的桨叶形态,其中下层桨叶使用圆盘六直页涡轮搅拌器,上层采用四叶螺旋桨型搅拌器。将除去葡萄糖的纳他霉素发酵培养基配好,加入到5L发酵罐中,总装液量设置为1.5L,另添加80g硬脂酸,于115-121℃灭菌20-30min,结束后立即开动搅拌(400-600rpm),并开通控温系统使发酵罐冷却至29℃,此过程可将高温脂肪酸液滴打碎,冷却后形成小粒度固体硬脂酸。此工作结束后将单独灭菌(115-121℃灭菌20-30min)的溶有80g葡萄糖的500mL溶液用蠕动泵全部补入,配成混合碳源发酵培养基。以8%的接种量接种步骤1获得的发酵种子,于初始pH值6.5、温度29℃、溶氧保持在30%以上的培养条件下发酵。全过程发酵pH值不进行控制,当碳源全部耗尽时发酵结束。本发酵过程中,每隔12h取样测定纳他霉素浓度、残葡萄糖、残脂肪酸。本次发酵共持续96h,最终合成4.2g/L,相比以葡萄糖为单一碳源发酵1.6g/L产量提升162.5%。

#### [0065] 实施例8:基于葡萄糖-脂肪酸复合碳源的纳他霉素5L发酵罐补料分批发酵试验

[0066] 选择5L液态发酵罐,使用两种不同的桨叶形态,其中下层桨叶使用圆盘六直页涡轮搅拌器,上层采用四叶螺旋桨型搅拌器。将除去葡萄糖的纳他霉素发酵培养基配好,加入到5L发酵罐中,总装液量设置为1.5L,另添加80g硬脂酸,于115-121℃灭菌20-30min,结束后立即开动搅拌(400-600rpm),并开通控温系统使发酵罐冷却至29℃,此过程可将高温脂

肪酸液滴打碎,冷却后形成小粒度固体硬脂酸。此工作结束后将单独灭菌(115-121℃灭菌20-30min)的溶有160g葡萄糖的500mL溶液用蠕动泵全部补入,配成混合碳源发酵培养基。以8%的接种量接种步骤1获得的发酵种子,于初始pH值6.5、温度29℃、溶氧保持在30%以上的培养条件下发酵。全过程发酵pH值不进行控制,当葡萄糖浓度低于10g/L时,通过外源流加60%预灭菌的葡萄糖溶液将发酵液中葡萄糖浓度维持在10-20g/L,当纳他霉素浓度不再提高时发酵结束。本发酵过程中,每隔12h取样测定纳他霉素浓度、残葡萄糖、残脂肪酸。本次发酵共持续120h,最终合成7.5g/L,相比以葡萄糖为单一碳源分批发酵1.6g/L产量提升469.8%。此实验数据表明,采用饱和脂肪酸外源添加的方式进行纳他霉素的发酵生产,能够大幅提高纳他霉素发酵水平,在如纳他霉素发酵合成方面具有重要的应用价值。

[0067] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。