



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111733198 B

(45) 授权公告日 2024.03.26

(21) 申请号 202010723233.X

C12N 1/18 (2006.01)

(22) 申请日 2020.07.24

C12N 1/38 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111733198 A

(56) 对比文件

CN 104277989 A, 2015.01.14

CN 108220175 A, 2018.06.29

FR 1429867 A, 1966.02.25

GB 1190079 A, 1970.04.29

US 2003059925 A1, 2003.03.27

CN 105018361 A, 2015.11.04

王昌魁等. 耐高温耐高糖酵母的筛选与驯化. 《江西农业学报》. 2008, 第20卷 (第5期), 第100-101页.

审查员 陈盛峰

(43) 申请公布日 2020.10.02

(73) 专利权人 开封康诺药业有限公司

地址 475000 河南省开封市金明大道南段66号

(72) 发明人 王伟 金永红 潘丽英 普坤

周多玲 王磊

(74) 专利代理机构 合肥市长远专利代理事务所

(普通合伙) 34119

专利代理师 刘勇

(51) Int. Cl.

C12P 19/36 (2006.01)

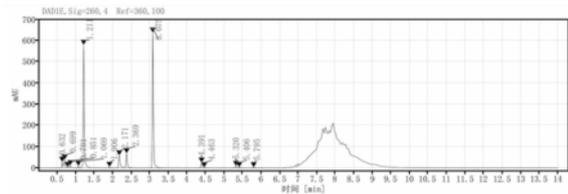
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种提高辅酶I产量的发酵方法

(57) 摘要

本发明公开了一种提高辅酶I产量的发酵方法,包括如下步骤:S1、将酿酒酵母接种到培养基中,然后进行发酵,当发酵液的OD₆₀₀值≥30时,补加糖液保持发酵液中的残糖浓度为2g/L,当酿酒酵母生长进入停止期后,停止补加糖液;S2、向停止期的发酵液中加入生物素和烟酸,继续发酵至辅酶I含量停止增长时,收集酿酒酵母,破壁得到含有辅酶I的破壁液即可。本发明选用合适的酿酒酵母菌种并配合合适的发酵工艺,大幅提高了辅酶I的产量。



保留时间 [min]	类型	峰宽 [min]	峰面积	高度	峰面积%	名称
0.632	BV	0.07	46.27	27.47	1.55	
0.699	VV	0.11	92.28	37.46	3.09	
0.781	VB	0.06	4.75	1.94	0.16	
0.851	BB	0.09	16.60	10.41	0.56	
1.069	BV	0.10	17.36	8.32	0.58	
1.211	VV	0.29	1101.25	578.30	36.93	
1.906	VB	0.27	10.15	3.80	0.34	
2.171	BV	0.23	177.90	57.74	5.97	
2.369	VV	0.21	167.22	67.93	5.61	
3.075	BV	0.34	1246.63	636.71	41.80	NAD
4.391	BV	0.16	55.43	23.72	1.86	
4.463	VV	0.14	6.00	1.84	0.20	
5.320	BV	0.18	21.33	8.36	0.72	
5.406	VB	0.18	9.30	2.69	0.31	
5.795	VB	0.34	9.78	2.28	0.33	
总和			2982.24			

1. 一种提高辅酶I产量的发酵方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、将酿酒酵母接种到培养基中,然后进行发酵,当发酵液的 OD_{600} 值 ≥ 30 时,补加糖液保持发酵液中的残糖浓度为2g/L,当酿酒酵母生长进入停止期后,停止补加糖液;

S2、向停止期的发酵液中加入生物素和烟酸,继续发酵至辅酶I含量停止增长时,收集酿酒酵母,破壁得到含有辅酶I的破壁液即可;

在S1中,酿酒酵母为高糖型酿酒酵母;

在S1中,糖液包含:1Kg含量为60wt%的葡萄糖水溶液和9.6mL的混合水溶液,其中,混合水溶液为浓度为0.2g/L的碘化钾和浓度为1g/L的氯化钴的混合水溶液;

在S1中,培养基包含:葡萄糖60g/L;酪蛋白水解物15g/L; KH_2PO_4 11.17g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5g/L; $ZnCl_2$ 0.01g/L;泛酸钙0.01g/L;维生素B1 0.1g/L;肌醇0.1g/L;柠檬酸铁0.01g/L;尿素5g/L;硫酸铜2g/L;硫酸锰1g/L;消泡剂0.2mL/L和水;

在S1中,整个发酵过程中,发酵温度为30℃、培养基PH=5.4、罐压为0.05Mpa、 CO_2 量为50%,发酵液溶氧标定D0值 $> 30\%$;

在S1中,当发酵液的 OD_{600} 值为100时,先调节发酵液的pH > 5.43 ,再补加糖液;

在S1中,当发酵液的 OD_{600} 值 > 200 时,每隔2h检测一次 OD_{600} 值,当 OD_{600} 值停止增长时即为酿酒酵母生长进入停止期,停止补加糖液;

当残糖浓度 $< 2g/L$ 时,向发酵液中流动加入糖液保持发酵液中的残糖浓度为2g/L,糖液的加入速度为每升发酵液中每小时加入13g糖液;

当发酵液的 OD_{600} 值为60时,糖液的加入速度为每升发酵液中每小时加入20g糖液,保持发酵液中的残糖浓度为2g/L;

当发酵液的 OD_{600} 值为100时,先调节发酵液的pH > 5.43 ,再补加糖液保持发酵液中的残糖浓度为2g/L;

在流动加入糖液的过程中,当发酵液中乙醇含量过高,发酵室内乙醇味道浓时,或残糖浓度 $> 2g/L$ 时,则降低糖液的加入速度或降低糖液的添加量;

在S2中,每1L发酵液中加入0.5g生物素和6g烟酸;在S2中,整个发酵过程中,发酵温度为29.5-30.5℃、培养基PH=5.2-5.6、罐压为0.03-0.07Mpa、 CO_2 量为49.95-50.05%、通风量为 $0.8m^3/h$ 、溶氧标定D0值 $> 30\%$ 。

2. 根据权利要求1所述提高辅酶I产量的发酵方法,其特征在于,在S1中,接种量为5%。

3. 根据权利要求1所述提高辅酶I产量的发酵方法,其特征在于,在S1中,接种参数为:接种温度为29.5-30.5℃、培养基PH=5.2-5.6、通风量为 $1m^3/h$ 、搅拌速度为175rpm、培养基溶氧标定D0值为100%、罐压为0.05Mpa、 CO_2 量为50%。

4. 根据权利要求1所述提高辅酶I产量的发酵方法,其特征在于,在S1、S2中,用浓度为85g/L的磷酸水溶液或体积分数为12.5%的氨水调节发酵液的pH。

一种提高辅酶I产量的发酵方法

技术领域

[0001] 本发明涉及辅酶I技术领域,尤其涉及一种提高辅酶I产量的发酵方法。

背景技术

[0002] 辅酶I (NAD),化学名为烟酰胺腺嘌呤二核甘酸或二磷酸烟苷,在哺乳动物 体内存在氧化型(NAD⁺)和还原型(NADH)两种状态,是人体氧化还原反应中重要的辅酶,参与细胞物质代谢、能量合成、细胞DNA修复等多种生理活动,对 机体免疫能力有重要作用。在健康状态下,人体内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸浓度 稳定,维持各项细胞正常功能。体内的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸浓度决定了细胞 衰老的过程和程度,浓度下降会加速细胞衰老的过程。

[0003] 辅酶I主要存在于酵母细胞线粒体中,属于胞内酶。目前常通过从酵母细胞 中提取辅酶I的方法,来获得辅酶I,但是酵母中辅酶I的含量有限,提取辅酶 I 的产量并不高,需要提供新的提高辅酶I产量的方法。

发明内容

[0004] 基于背景技术存在的技术问题,本发明提出了一种提高辅酶I产量的发酵方 法,本发明选用合适的酿酒酵母菌种并配合合适的发酵工艺,大幅提高了辅酶I 的产量。

[0005] 本发明提出的一种提高辅酶I产量的发酵方法,包括如下步骤:

[0006] S1、将酿酒酵母接种到培养基中,然后进行发酵,当发酵液的OD₆₀₀值 ≥ 30 时,补加糖液保持发酵液中的残糖浓度为2g/L,当酿酒酵母生长进入停止期后, 停止补加糖液;

[0007] S2、向停止期的发酵液中加入生物素和烟酸,继续发酵至辅酶I含量停止增 长时,收集酿酒酵母,破壁得到含有辅酶I的破壁液即可。

[0008] 优选地,在S1中,酿酒酵母为高糖型酿酒酵母。

[0009] 上述高糖型酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)可以从市场购得,如烟台 马利酵母有限公司、安琪酵母股份有限公司;优选烟台马利酵母有限公司。

[0010] 上述酿酒酵母可以直接接种到培养基中。

[0011] 优选地,在S1中,接种量为5%。

[0012] 上述接种量是指移入种子液的体积和接种后培养基体积的比例。

[0013] 优选地,在S1中,培养基包含:葡萄糖60g/L;酪蛋白水解物15g/L;KH₂PO₄11.17g/L; MgSO₄·7H₂O 5g/L;ZnCl₂ 0.01g/L;泛酸钙0.01g/L;维生素B1 0.1g/L;肌醇0.1g/L;柠檬酸铁0.01g/L;尿素5g/L;硫酸铜2g/L;硫酸锰1g/L;消泡剂 0.2mL/L和水。

[0014] 优选地,在S1中,接种参数为:接种温度为29.5-30.5℃、培养基PH=5.2-5.6、通 风量为1m³/h、搅拌速度为175rpm、培养基溶氧标定D0值为100%、罐压为 0.05Mpa、CO₂量为50%。

[0015] 优选地,在S1中,整个发酵过程中,发酵温度为29.5-30.5℃、培养基 PH=5.2-5.6、罐压为0.03-0.07Mpa、CO₂量为49.95-50.05%,发酵液溶氧标定D0 值 $> 30\%$ 。

[0016] 当发酵液溶氧标定D0值 $\leq 30\%$ 时,可以通过调节搅拌转速、通风量来控制 溶氧,

保证溶氧标定DO值>30%，当搅拌转速达到上限后，调整通风量来控制溶氧。

[0017] 优选地，在S1中，糖液包含：1Kg含量为60wt%的葡萄糖水溶液和9.6mL的混合水溶液，其中，混合水溶液为浓度为0.2g/L的碘化钾和浓度为1g/L的氯化钴的混合水溶液。

[0018] 上述S1中，当发酵液的OD₆₀₀值≥30时，检测发酵液中的残糖浓度，当残糖浓度<2g/L时，开始向发酵液中流动加入糖液，保持发酵液中的残糖浓度为2g/L，在流动加入糖液的过程中，当发酵液中乙醇含量过高，发酵室内乙醇味道浓时，或残糖浓度>2g/L时，或CO₂量不等于49.95-50.05%，发酵液溶氧标定DO值≤30%时，则降低糖液的加入速度或降低糖液的添加量。

[0019] 优选地，在S1中，当发酵液的OD₆₀₀值为100时，先调节发酵液的pH>5.43，再补加糖液。

[0020] 优选地，在S1中，当发酵液的OD₆₀₀值>200时，每隔2h检测一次OD₆₀₀值，当OD₆₀₀值停止增长时即为酿酒酵母生长进入停止期，停止补加糖液。

[0021] 优选地，在S2中，每1L发酵液中加入0.5g生物素和6g烟酸。

[0022] 优选地，在S2中，整个发酵过程中，发酵温度为29.5-30.5℃、培养基PH=5.2-5.6、罐压为0.03-0.07Mpa、CO₂量为49.95-50.05%、通风量为0.8m³/h、溶氧标定DO值>30%。

[0023] 优选地，在S1、S2中，用浓度为85g/L的磷酸水溶液或体积分数为12.5%的氨水调节发酵液的pH。

[0024] 上述CO₂量为发酵罐尾气中CO₂的含量，可以通过发酵尾气分析技术实时在线检测。

[0025] 上述发酵过程中，可以添加适量体积分数为20%的消泡剂水溶液，来消除发酵产生的泡沫。

[0026] 上述糖液、磷酸水溶液、消泡剂水溶液均需湿热灭菌后，才能使用。

[0027] 上述培养基需经121℃灭菌20min处理后，才能使用。

[0028] 有益效果：

[0029] 本发明不再从酵母中直接提取辅酶I，而是首次提出了通过发酵来提高酿酒酵母中辅酶I含量的方法，并且通过选用合适的酿酒酵母菌种和合适的发酵工艺，并对整个工艺参数和培养基进行筛选，选用适量的葡萄糖水溶液和碘化钾、氯化钴混合水溶液构成糖液，选用生物素和烟酸作为底物并控制其添加量，最终获得合适的发酵工艺，使得发酵后的酿酒酵母经破壁处理后获得含有高浓度辅酶I的破壁液；与发酵前的酿酒酵母相比，本发明的辅酶I产量是发酵前酿酒酵母的近2倍。

附图说明

[0030] 图1为对比例1得到的含辅酶I的破壁液的高效液相色谱图。

[0031] 图2为实施例1得到的含辅酶I的破壁液的高效液相色谱图。

具体实施方式

[0032] 下面，通过具体实施例对本发明的技术方案进行详细说明。

[0033] 以下实施例1和对比例1中的酿酒酵母均为高糖型酿酒酵母(Saccharomyces

cerevisiae),购自烟台马利酵母有限公司。

[0034] 实施例1

[0035] 一种提高辅酶I产量的发酵方法,包括如下步骤:

[0036] S1、取培养基在发酵罐中121℃灭菌20min,然后将OD₆₀₀值为8-10的酿酒酵母接种到培养基中,其中,接种量为5%;接种参数为:接种温度为30℃、培养基PH=5.4、通风量为1m³/h、搅拌速度为175rpm、培养基溶氧标定DO值为100%、罐压为0.05Mpa、CO₂量为50%;培养基的配方为:葡萄糖60g/L;酪蛋白水解物15g/L;KH₂PO₄ 11.17g/L;MgSO₄·7H₂O 5g/L;ZnCl₂ 0.01g/L;泛酸钙0.01g/L;维生素B1 0.1g/L;肌醇0.1g/L;柠檬酸铁0.01g/L;尿素5g/L;硫酸铜2g/L;硫酸锰1g/L;消泡剂0.2mL/L和水;

[0037] 然后进行发酵,整个发酵过程中,发酵温度为30℃、罐压为0.05Mpa、CO₂量为50%,发酵液溶氧标定DO值>30%;并且用体积分数为12.5%的氨水调节发酵液pH=5.4;

[0038] 当发酵液的OD₆₀₀值为30时,检测发酵液中的残糖浓度,当残糖浓度<2g/L时,开始向发酵液中流动加入糖液保持发酵液中的残糖浓度为2g/L,糖液的加入速度为每升发酵液中每小时加入13g糖液;当发酵液的OD₆₀₀值为60时,糖液的加入速度为每升发酵液中每小时加入20g糖液,保持发酵液中的残糖浓度为2g/L;当发酵液的OD₆₀₀值为100时,先调节发酵液的pH>5.43,再补加糖液保持发酵液中的残糖浓度为2g/L;在流动加入糖液的过程中,当发酵液中乙醇含量过高,发酵室内乙醇味道浓时,或残糖浓度>2g/L时,则降低糖液的加入速度或降低糖液的添加量;

[0039] 当发酵液的OD₆₀₀值>200时,每隔2h检测一次OD₆₀₀值,当OD₆₀₀值停止增长时即为酿酒酵母生长进入停止期,停止补加糖液;其中,糖液为:1Kg含量为60wt%的葡萄糖水溶液和9.6mL的混合水溶液,其中,混合水溶液为浓度为0.2g/L的碘化钾和浓度为1g/L的氯化钴的混合水溶液;

[0040] S2、向停止期的发酵液中加入生物素和烟酸,继续发酵,并每3h检测辅酶I含量,直到辅酶I含量不再增长,结束发酵,放罐收集酿酒酵母液,离心酿酒酵母菌体,破壁得到含有辅酶I的破壁液即可,其中,每1L发酵液中加入0.5g生物素和6g烟酸;整个发酵过程中,发酵温度为30℃、罐压为0.05Mpa、CO₂量为50%、通风量为0.8m³/h、溶氧标定DO值>30%;并用浓度为85g/L磷酸水溶液调节发酵液pH=5.4。

[0041] 对比例1

[0042] 取高糖型酿酒酵母,不经发酵,直接进行破壁处理得到破壁液,其中,破壁处理的方法与实施例1相同。

[0043] 检测发酵前后辅酶I含量(辅酶I含量以每g干菌体中辅酶含量mg计算),结果如表1和图1-2所示:

[0044] 图1为对比例1得到的含辅酶I的破壁液的高效液相色谱图;图2为实施例1得到的含辅酶I的破壁液的高效液相色谱图。

[0045] 表1发酵前后辅酶I产量数据对比结果

发酵状态		破壁前酵母湿重	破壁液体积	液相检测破壁液中辅酶I浓度	辅酶I重量	酵母的干燥失重	干酵母中辅酶I含量	液相检测破壁液中辅酶I的纯度
对比例1	未发酵	60.34g	174mL	1.139mg/mL	198.186 mg	71.330%	11.456mg/g	33.640%
实施例1	发酵	60.6g	190mL	2.105mg/mL	399.950 mg	67.06%	20.036mg/g	41.802%

[0046]

[0047] 由表1和图1-2可以看出:与对比例1(未发酵高糖型酿酒酵母)相比,本发明通过选用适宜的发酵工艺进行高糖型酿酒酵母发酵,使得实施例1中的高糖型酿酒酵母的辅酶I产量是对比例1的近2倍。

[0048] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

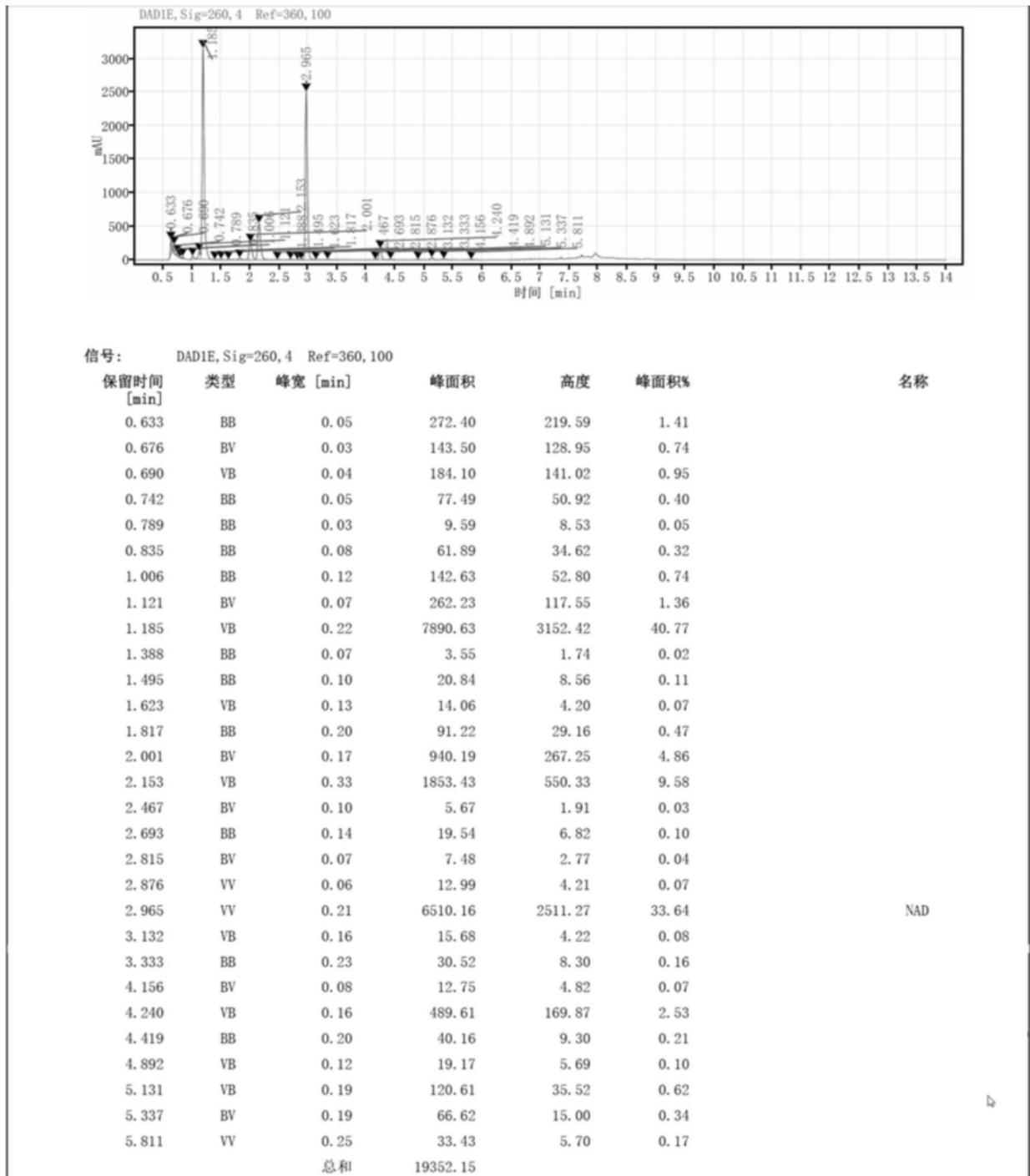
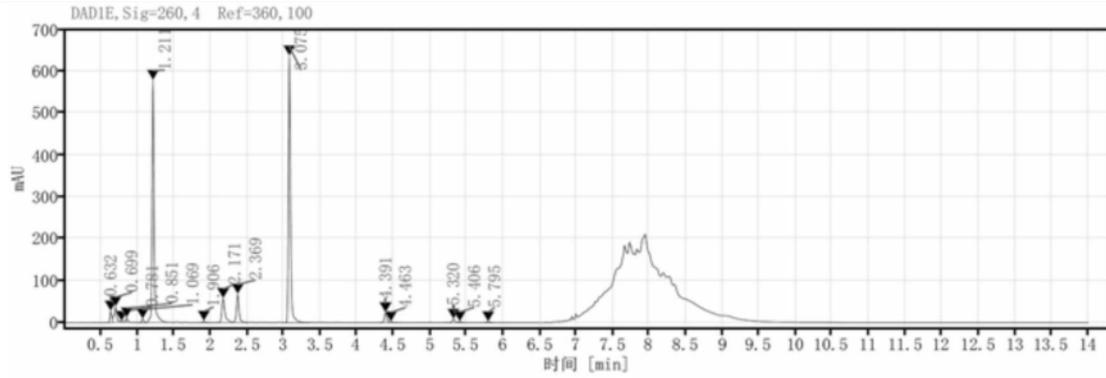


图1



信号: DAD1E, Sig=260, 4 Ref=360, 100

保留时间 [min]	类型	峰宽 [min]	峰面积	高度	峰面积%	名称
0.632	BV	0.07	46.27	27.47	1.55	
0.699	VV	0.11	92.28	37.46	3.09	
0.781	VB	0.06	4.75	1.94	0.16	
0.851	BB	0.09	16.60	10.41	0.56	
1.069	BV	0.10	17.36	8.32	0.58	
1.211	VV	0.29	1101.25	578.30	36.93	
1.906	VB	0.27	10.15	3.80	0.34	
2.171	BV	0.23	177.90	57.74	5.97	
2.369	VV	0.21	167.22	67.93	5.61	
3.075	BV	0.34	1246.63	636.71	41.80	NAD
4.391	BV	0.16	55.43	23.72	1.86	
4.463	VV	0.14	6.00	1.84	0.20	
5.320	BV	0.18	21.33	8.36	0.72	
5.406	VB	0.18	9.30	2.69	0.31	
5.795	VB	0.34	9.78	2.28	0.33	
		总和	2982.24			

图2