



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110079474 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201910291608.7

(22)申请日 2019.04.12

(71)申请人 沈阳药科大学

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路
103号

(72)发明人 张怡轩 李野

(74)专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限公司 21207

代理人 靳玲

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法

(57)摘要

本发明属于微生物发酵领域,涉及一种高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌(Akkermansia muciniphila)的方法,具体涉及一种利用特定氨基酸组合替代培养基中天然组成氮源(如蛋白胨、酵母抽提物等),进而实现利用全单质培养基对艾克曼嗜黏蛋白菌进行高密度培养的方法。本发明的方法一方面用利用较低成本,大量收获 Akk.Muciniphila菌体,另一方面因所利用培养基为全合成培养基(synthetic medium),其氮源组成不含潜在过敏源(allergen-free)及未知组分,且全部原料满足《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》(GB2760-2017),故本方法适用于食品及药品级Akk.Muciniphila的工业化生产。

1. 一种高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法,其特征在于,采用全单质培养基进行发酵,所述的全单质培养基包括氮源、基础组分、碳源、生长因子、微量元素及抗氧化剂,所述的氮源为苏氨酸、脯氨酸、甘氨酸、缬氨酸、丝氨酸和亮氨酸的组合。

2. 如权利要求1所述的高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法,其特征在于,所述的氮源中,各氨基酸占全单质培养基的重量组成为:苏氨酸0.5~20g/L、脯氨酸0.2~9g/L、甘氨酸0.05~2g/L、缬氨酸0.1~3g/L、丝氨酸0.1~12.4g/L、亮氨酸0.04~6g/L。

3. 如权利要求1或2所述的高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法,其特征在于,所述的氮源中还含有半胱氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸、异亮氨酸或谷氨酰胺中的一种或多种。

4. 如权利要求3所述的高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法,其特征在于,各氨基酸占全单质培养基的重量组成为:半胱氨酸0~2.4g/L、异亮氨酸0~2.4g/L、谷氨酰胺0~2.4g/L、谷氨酸0~2g/L、天冬氨酸0~1.6g/L、丙氨酸0~1g/L、赖氨酸0~1.5g/L、天冬酰胺0~1.2g/L、酪氨酸0~1.5g/L、精氨酸0~1.5g/L、组氨酸0~1.1g/L、苯丙氨酸0~1.2g/L、蛋氨酸0~0.5g/L、色氨酸0~0.6g/L;

优选地:半胱氨酸0.22~2.4g/L、异亮氨酸0.22~2.4g/L、谷氨酰胺0.22~2.4g/L、谷氨酸0.17~2g/L、天冬氨酸0.17~1.6g/L、丙氨酸0.11~1g/L、赖氨酸0.11~1.5g/L、天冬酰胺0.11~1.2g/L、酪氨酸0.17~1.5g/L、精氨酸0.11~1.5g/L、组氨酸0.11~1.1g/L、苯丙氨酸0.11~1.2g/L、蛋氨酸0.06~0.5g/L、色氨酸0.06~0.6g/L。

5. 如权利要求3或4所述的高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法,其特征在于,所述的氮源为苏氨酸、脯氨酸、甘氨酸、缬氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸、异亮氨酸或谷氨酰胺中的全部或除去天冬酰胺、酪氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸或色氨酸的其它氨基酸的组合。

6. 根据权利要求1所述的高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法,其特征在于,所述的基础组分为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4Cl 、 $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 或 NaHCO_3 中的一种或几种;所述的碳源为果糖、半乳糖、葡萄糖、N-乙酰-葡萄糖胺、N-乙酰-半乳糖胺中的一种或几种;所述的生长因子为生物素、吡哆醇、氰钴胺、维生素B6、烟酸、核黄素、硫胺素、泛酸、胆碱、肌醇、甲萘醌、叶黄素、叶酸、对氨基苯甲酸中的一种或几种;所述的微量元素为 FeCl_2 、 H_3BO_3 、 ZnCl_2 、 CuCl_2 、 MnCl_2 、 CoCl_2 、 NiCl_2 、 Na_2SeO_3 、 $\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2MoO_4 中的一种或几种;所述的抗氧化剂为硫化钠、L-半胱氨酸、抗坏血酸及硫代硫酸钠中的一种或几种。

7. 如权利要求6所述的高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法,其特征在于,所述碳源中各组分的用量为葡萄糖0.5~100g/L,N-乙酰-葡萄糖胺0.5~100g/L,N-乙酰-半乳糖胺0.5~100g/L;所述生长因子中各组分的用量为:生物素0.001~0.01g/L,维生素B6 0.005~0.05g/L,烟酸0.002~0.02g/L,核黄素0.005~0.05g/L,硫胺素0.01~0.1g/L,泛酸0.01~0.1g/L,氨基苯甲酸0.01~0.1g/L;所述微量元素是各组分的用量为 KH_2PO_4 0.04~2g/L, MgSO_4 0.01~1g/L, CaCl_2 0.01~1g/L;所述抗氧化剂中各组分的用量为:L-半胱氨酸0.1~5g/L,维生素C 0.1~5g/L。

8. 如权利要求1-7中任何一项所述的高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法,其特征在于,其培养条件为:pH 5.5~8.0,利用NaOH或 NaCO_3 溶液在线调节;培养温度为20-40℃。

9. 如权利要求8所述的高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法,其特征在于,在培养过程中,可选择一次性加入碳源、氮源及其它组分,亦可采用流加的方式对其进行补充。

10. 权利要求1-9任何一项所述的高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法在提高艾克曼嗜黏蛋白菌生长速率中的应用。

一种高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物发酵领域,涉及一种高密度培养艾克曼嗜黏蛋白菌(*Akkermansia muciniphila*)的方法,具体涉及一种利用特定氨基酸组合替代培养基中天然组成氮源(如蛋白胨、酵母抽提物等),进而实现利用全单质培养基对艾克曼嗜黏蛋白菌进行高密度培养的方法。

背景技术:

[0002] 艾克曼嗜黏蛋白菌(*Akkermansia muciniphila*,俗称AKK菌)为一种定植于人体肠道内的,严格厌氧的,以肠粘膜分泌的黏蛋白(mucin)为营养物质的革兰氏阴性菌,其主要的的应用及生理功能体现为:

[0003] 1.肥胖症:肥胖作为人体内的一种慢性亚炎症的一种体现,AKK菌被认为可以在小肠壁起到屏障作用,阻止肠内由其它细菌代谢产生的内毒素及脂多糖(LPS)进入血液,进而改善由机体的亚炎症状态引起的肥胖症状(Horm Mol Biol Clin Investig,doi:10.1515/hmbci-2013-0063)。宁光等通过对C57/BL6雄性SPF级小鼠同窝随机分成对照组和灌菌组的对照试验发现,灌菌组给予AKK菌的灌菌组的体重和体脂都明显下降,而且AKK菌株对腹股沟皮下脂肪含量和附睾旁脂肪含量的降低效果非常有效。故该菌被认为可用于肥胖症的治疗或预防(CN105106245A)。

[0004] 2.糖尿病:Hänninen等提示,AKK菌在1型糖尿病中起保护作用,其保护机制被认为是:促进黏液产生以使黏液层增厚、通过促进Foxp3+Treg、IL-10、TGF-β以减少胰岛炎症(Gut,DOI:10.1136/gutjnl-2017-315732)。同时Chaithanya Chelakkot等发现,在高脂饮食(12周)诱导的2型糖尿病小鼠,灌胃AKK菌细胞外囊泡(AmEV)2周后,小鼠肠道紧密连接功能增强,体重增加降低,葡萄糖耐受改善。故认为AKK菌可通过调节肠道屏障的完整性从而改善高脂饮食引起的2型糖尿病症状(Experimental and Molecular Medicine,DOI:10.1038/emm.2017.282)。

[0005] 3.肝损伤:Christoph Grander研究表明,与健康人相比,酒精性肝炎患者粪便AKK菌丰度降低,间接与肝脏疾病的严重程度相关,AKK菌可预防性减少肝损伤、脂肪肝和中性粒细胞浸润,而口服AKK菌可恢复酒精诱导的AKK菌损耗,从而改善酒精性肝病(ALD)的肝损伤和中性粒细胞浸润(Gut,DOI:10.1136/gutjnl-2016-313432)。

[0006] 4.肿瘤:特别值得注意的是,Bertrand Routy等于2017年11月,在国际顶尖杂志Science(DOI:10.1126/science.aan3706)中,首次证明了AKK菌在癌症免疫治疗中的重要作用,并引起了轰动性的反响。研究表明,靶向药PD-1抑制剂在治疗肺癌、肾癌及膀胱癌过程中,其治疗效果与体内AKK菌丰度具有重要相关性。进一步的动物实验亦证明AKK菌作为靶向药PD-1抑制剂佐剂,用以增强抗癌效果的重大价值。

[0007] 由于近年对AKK菌生理功能的一系列重要发现,尤其是在肿瘤免疫疗法中的重要作用,使其被誉为具有重大应用及开发价值的“二代益生菌(NGP)”——生物活体治疗性药物(LBP)的重要候选菌株(Nature Microbiology,DOI:10.1038/nmicrobiol.2017.57)。

[0008] 2004年,Muriel Derrien等首次分离得到AKK菌,并发现其可以在猪胃部的黏蛋白(hog gastric mucin)作为唯一碳源及氮源的培养基中可良好的生长;利用蛋白胨(peptone)、酵母抽提物(yeast extract)、胰蛋白胨(tryptone)及酪蛋白胨(casitone)替代黏蛋白(mucin),则只能微弱生长;而在富营养培养基,如Columbia Broth(CB)及Brain Heart Infusion(BHI)中可生长,但最终生物量较在mucin培养基中生长低一半。(International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology DOI 10.1099/ijs.0.02873-0)。Lukovac等证实,利用酪蛋白胨(casitone)、葡萄糖(glucose)、海藻糖(fucose)及苏氨酸(threonine)替代培养基中的黏蛋白(mucin),也可获得mucin培养基1/4的生物量(MBio., doi:10.1128/mBio.01438-14)。至2016年,Belzer Clara等报道了一种利用苏氨酸(threonine)、乙酰葡萄糖胺(GlcNac)、胰蛋白胨(tryptone)及植物性蛋白(HySoy)等进行AKK菌培养的方法,最终使得AKK菌浓(OD 7.2)3倍于mucin中培养菌浓(OD 2.5)(WO 2016/177801A1)。

[0009] 但是与现有的商品化益生菌,如乳酸杆菌及双歧杆菌等相比,已有方法培养的AKK菌依然具有生长缓慢、培养成本过高及生物量较低等问题,严重影响其产业化实践进程。同时因为培养过程中存在较多动物源或植物源的氮源培养基,亦存在致敏原风险,故本发明拟克服上述问题,利用单质氨基酸替代上述氮源,进而利用全单质培养基实现对AKK菌的高密度发酵。

发明内容:

[0010] 本发明的目的在于利用单质氨基酸及活性物质组合替代黏蛋白(mucin)及动(植)物源氮源,实现全单质培养基对AKK菌的高密度发酵,同时避免培养基中潜在过敏源的引入。

[0011] 本发明是通过如下技术方案实现的:

[0012] 本发明利用全单质培养基对AKK菌进行高密度发酵。所述的全单质培养基包括氮源、基础组分、碳源、生长因子、微量元素及抗氧化剂,各组成成分占全单质培养基的组成为:所述的氮源占1.05~73.3g/L,优选5.55~73.3g/L;所述基础组分占1.15~37.5g/L,优选5.75~37.5g/L;所述碳源占2.0~245.6g/L,优选24.56~245.6g/L;所述生长因子占0.09~5.5mg/L,优选0.514~5.5mg/L;所述微量元素占0.25~13.22mg/L,优选1.322~13.22mg/L;所述抗氧化剂占0.4~15.84 g/L,优选1.98~15.84g/L。

[0013] 本发明的主要设计依据为:通过对人源性黏蛋白(Mucin-2及mucin-3A/B)氨基酸组成及其糖链(O-Linked Glycans)组成进行模拟,进而替代天然黏蛋白为AKK菌提供氮源进行高密度培养。

[0014] 人体肠道内的主要黏蛋白(mucin)组成为:Mucin-2(UniProtKB-Q02817 MUC2_HUMAN,分布于小肠、结肠支气管、宫颈及胆囊);Mucin-3A(UniProtKB -Q02505MUC3A_HUMAN,分布于小肠、结肠、心脏、肝脏、胸腺、前列腺、胰腺及胆囊)及Mucin-3B(UniProtKB-Q9H195MUC3B_HUMAN,分布于小肠及结肠)等。各黏蛋白(mucin)中氨基酸组成及质量比如表1.所示。

[0015] 所述的全单质培养基中的氮源(表2.),为单质氨基酸组合,其氨基酸组成,以人源Mucin-2型黏蛋白、人源Mucin-3A型黏蛋白或人源Mucin-3B型黏蛋白中,各氨基酸组成比例

(表1.)为依据。

[0016] 表1.三种人体内在肠道中分布的黏蛋白(mucin)的氨基酸组成及其质量比.

[0017]

序号	氨基酸种类		Mucin-2		Mucin-3A		Mucin-3B	
			数量	质量比	数量	质量比	数量	质量比
1	苏氨酸	Threonine	1810	34%	978	29%	260	20%
2	脯氨酸	Proline	819	15%	281	8%	104	8%
3	甘氨酸	Glycine	283	3%	96	2%	46	2%
4	缬氨酸	Valine	273	5%	146	4%	69	5%
5	丝氨酸	Serine	243	4%	670	17%	201	14%

[0018]

6	半胱氨酸	Cysteine	215	4%	23	1%	24	2%
7	异亮氨酸	Isoleucine	189	4%	152	5%	59	5%
8	谷氨酰胺	Glutamine	183	4%	51	2%	39	4%
9	亮氨酸	Leucine	168	3%	177	6%	84	7%
10	谷氨酸	Glutamate	135	3%	119	4%	52	5%
11	天冬氨酸	Aspartate	133	3%	52	2%	34	3%
12	丙氨酸	Alanine	120	2%	120	3%	58	3%
13	赖氨酸	Lysine	107	2%	36	1%	23	2%
14	天冬酰胺	Asparagine	105	2%	67	2%	29	2%
15	酪氨酸	Tyrosine	88	3%	42	2%	14	2%
16	精氨酸	Arginine	87	2%	55	2%	37	4%
17	组氨酸	Histidine	77	2%	64	2%	21	2%
18	苯丙氨酸	Phenylalanine	77	2%	100	4%	41	4%
19	蛋氨酸	Methionine	35	1%	74	3%	26	3%
20	色氨酸	Tryptophan	32	1%	20	1%	16	2%
21	总计	Total	5179	100%	3323	100%	1237	100%

[0019] 由表1.可以看出,Mucin-2富含苏氨酸(Thr,34%)及脯氨酸(Pro,15%), Mucin-3A/B则依次富含苏氨酸(Thr,29%/20%),丝氨酸(Ser,17%/14%),脯氨酸(Pro,8%/8%)及亮氨酸(Leu,6%/7%)。提示AKK菌更善于利用上述氨基酸作为自身氮源。

[0020] 基于Mucin-2蛋白质分析可知,其上拥有30个天冬氨酸(Asp)N端N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)结合位点,故认为该蛋白的糖基化支链主要成份为GlcNAc,而非N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),提示在人体内AKK菌更易利用GlcNAc作为自身碳源。

[0021] 故本发明以上述3种黏蛋白各氨基酸组成比例为依据,设计氮源中各单质氨基酸添加量。

[0022] 本发明所述氮源由表2中各单质氨基酸中的几种或全部组成,以全单质培养基总量计,其培养基中各氨基酸添加范围及推荐添加量如表2.所示。

[0023] 表2.全单质培养基中各单质氨基酸的添加范围及推荐添加量.

[0024]

序号	氨基酸组分		最小添加量	最大添加量	推荐添加量
1	苏氨酸	Threonine	0.5g/L	20g/L	1.91 g/L
2	脯氨酸	Proline	0.2g/L	9g/L	0.84 g/L
3	甘氨酸	Glycine	0.05g/L	2g/L	0.17 g/L
4	缬氨酸	Valine	0.1g/L	3g/L	0.28 g/L
5	丝氨酸	Serine	0.1g/L	12.4g/L	0.22 g/L
6	半胱氨酸	Cysteine	0g/L	2.4g/L	0.22 g/L

[0025]

7	异亮氨酸	Isoleucine	0g/L	2.4g/L	0.22 g/L
8	谷氨酰胺	Glutamine	0g/L	2.4g/L	0.22 g/L
9	亮氨酸	Leucine	0.04g/L	6g/L	0.17 g/L
10	谷氨酸	Glutamate	0g/L	2g/L	0.17 g/L
11	天冬氨酸	Aspartate	0g/L	1.6g/L	0.17 g/L
12	丙氨酸	Alanine	0g/L	1g/L	0.11 g/L
13	赖氨酸	Lysine	0g/L	1.5g/L	0.11 g/L
14	天冬酰胺	Asparagine	0g/L	1.2g/L	0.11 g/L
15	酪氨酸	Tyrosine	0g/L	1.5g/L	0.17 g/L
16	精氨酸	Arginine	0g/L	1.5g/L	0.11 g/L
17	组氨酸	Histidine	0g/L	1.1g/L	0.11 g/L
18	苯丙氨酸	Phenylalanine	0g/L	1.2g/L	0.11 g/L
19	蛋氨酸	Methionine	0g/L	0.5g/L	0.06 g/L
20	色氨酸	Tryptophan	0g/L	0.6g/L	0.06 g/L
总量			1.05g/L	73.3g/L	5.55g/L

[0026] 所述的氮源中的苏氨酸、脯氨酸、甘氨酸、缬氨酸、丝氨酸及亮氨酸具有明显的需求,为限制菌体生长的必须氨基酸;

[0027] 其中,所需氮源中如上氨基酸的用量分别为:苏氨酸0.5~20g/L、脯氨酸 0.2~9g/L、甘氨酸0.05~2g/L、缬氨酸0.1~3g/L、丝氨酸0.1~12.4g/L、亮氨酸 0~2g/L。

[0028] 优选地,苏氨酸1.91~20g/L、脯氨酸0.84~9g/L、甘氨酸0.17~2g/L、缬氨酸0.28~3g/L、丝氨酸0.22~12.4g/L、亮氨酸0.17~6g/L。

[0029] 含有不同的氨基酸组合的培养基均可不同程度的提高菌种的生长速率。

[0030] 作为优选,所述氮源为所有氨基酸的组合或是除去天冬酰胺、酪氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸或色氨酸的其它氨基酸的组合;

[0031] 本发明除氮源(表2.)外,所述的全单质培养基还包括:基础组分(见表 3.)、碳源(见表4.)、生长因子(见表5.)、微量元素(见表6.)及抗氧化剂(见表7.)。

[0032] 1.基础组分,包括并不限于表3.中所述基础组分中的一种或几种:

[0033] 表3.全单质培养基中基础组分添加终浓度.

[0034]

序号	基础组分	最低限(g/L)	最高限(g/L)	推荐量 (g/L)
1	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.11	5.30	0.53
2	KH ₂ PO ₄	0.08	4.10	0.41
3	NH ₄ Cl	0.06	3.00	0.30
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02	1.10	0.11

[0035]

5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.02	1.00	0.10
6	NaCl	0.06	3.00	0.30
7	NaHCO ₃	0.80	20.00	4.00

[0036] 2. 碳源组合, 包括并不限于表4. 所述5种碳源中的一种或几种:

[0037] 表4. 全单质培养基中的碳源组分及添加浓度.

[0038]

序号	碳源组分		最低限(g/L)	最高限(g/L)	推荐量(g/L)
1	果糖	Fucose	0.0	45.0	4.50
2	半乳糖	Galactose	0.0	45.0	4.50
3	葡萄糖	Glucose	0.9	45.0	4.50
4	N-乙酰葡萄糖胺	GlcNAc	1.1	55.3	5.53
5	N-乙酰半乳糖胺	GalNAc	0.0	55.3	5.53

[0039] 3. 生长因子组合, 包括并不限于表5. 中所述生长因子中的一种或几种:

[0040] 表5. 全单质培养基中各生长因子的添加量.

[0041]

序号	生长因子		最低限(mg/L)	最高限(mg/L)	推荐量(mg/L)
1	生物素	Biotin	0.00	0.40	0.004
2	烟酸	Niacin	0.01	0.40	0.04
3	吡哆醇	Pyridoxine	0.02	1.00	0.1
4	核黄素	Riboflavin	0.00	0.20	0.02
5	硫胺素	Thiamine	0.01	0.40	0.04
6	氰钴胺	Cyanocobalamin	0.00	0.20	0.02
7	对氨基苯甲酸	p-aminobenzoic acid	0.00	0.20	0.02
8	泛酸	pantothenic acid	0.00	0.20	0.02
9	胆碱	Choline	0.02	1.00	0.1
10	肌醇	Inositol	0.02	0.80	0.08
11	甲萘醌	Phytonadione	0.00	0.20	0.02
13	叶黄素	Phytoxanthin	0.01	0.40	0.04
14	叶酸	Folate	0.00	0.10	0.01

[0042] 4. 微量元素组合, 包括并不限于表6. 中微量元素中的一种或几种:

[0043] 表6. 全单质培养基中各微量元素的添加量.

[0044]

序号	微量元素	最低限(mg/L)	最高限(mg/L)	推荐量(mg/L)
1	FeCl ₂	0.19	9.51	0.951
2	H ₃ BO ₄	0.02	0.78	0.078
3	ZnCl ₂	0.01	0.68	0.068
4	CuCl ₂	0.00	0.13	0.013
5	MnCl ₂	0.01	0.63	0.063
6	CoCl ₂	0.01	0.65	0.065
7	NiCl ₂	0.00	0.13	0.013
8	Na ₂ SeO ₃	0.00	0.17	0.017
9	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.01	0.33	0.033

[0045]

10	Na ₂ MoO ₄	0.00	0.21	0.021
----	----------------------------------	------	------	-------

[0046] 5. 抗氧化剂, 包括并不限于表7. 中所述抗氧化剂中的一种或几种:

[0047] 表7. 全单质培养基中抗氧化剂的添加量.

[0048]

序号	抗氧化剂		最低限(g/L)	最高限(g/L)	推荐量(g/L)
1	硫化钠	Na ₂ S·9H ₂ O	0.10	3.84	0.48
2	半胱氨酸	Cysteine	0.10	4.00	0.5
3	抗坏血酸	Ascorbic Acid	0.10	4.00	0.5
4	硫代硫酸钠	Na ₂ S ₂ O ₃	0.10	4.00	0.5

[0049] 本发明除提供AKK菌全单质培养基组分, 亦提供了全单质培养基高密度培养的方法。其培养条件为:

[0050] 培养温度: 20-40℃, 推荐为37℃。

[0051] pH值: 5.5~8.0, 推荐为pH 6.5; 采用NaOH (10%, w/v) 或Na₂CO₃ (15%, w/v) 碱液控制。[0052] 保护气: N₂/CO₂ (80:20, v/v) 或N₂/CO₂/H₂ (80:20:1, v/v/v), 压力为 100kPa~250kPa; 推荐为182kPa (1.8atm)。

[0053] 其中碳源组合及氨基酸组合, 可一次性加入, 亦可采用分批加入及连续流加加入。

[0054] 其中生长因子组合可以无水乙醇为溶剂, 制成合适浓度母液, 高温蒸汽灭菌后, 直接加入。

[0055] 本发明的各种培养成份可一起混合高温灭菌。

[0056] 本发明的全单质培养基可以AKK菌的生长速率, 实现高密度发酵。

附图说明

[0057] 图1为黏蛋白及人源性黏蛋白氨基酸组分中AKK菌的生长曲线。

[0058] 其中以hog gastric mucin为氮源的AKK菌在36h达到最大菌浓 (5.5×10^9 CFU/ml); mucin-2, mucin-3A及mucin-3B型氨基酸组成为氮源的AKK菌, 均在第20h达到最大菌浓, 分别为 6.5×10^9 CFU/ml, 5.1×10^9 CFU/ml 及 5.0×10^9 CFU/ml。

[0059] 图2为AKK菌在不同必须及非必须氨基酸添加浓度下的生长状态。

[0060] 参见表9.中所分的不同组氨基酸添加浓度,其中:第一组48h菌浓达到 3×10^8 CFU/ml;第二组48h菌浓达到 1.6×10^9 CFU/ml;第三组48h菌浓达到 3×10^7 CFU/ml;第四组24h菌浓达到 9.15×10^9 CFU/ml;第五组36h菌浓达到 3.6×10^9 CFU/ml;第六组48h菌浓达到 2.5×10^8 CFU/ml.

[0061] 图3为AKK菌在优化的氨基酸组合及碳源组合中的生长曲线。

[0062] 其中1倍碳源及1倍氨基酸组合($\times 1C$ and $\times 1muc-X$ aa)在20h达到最高菌浓(7.05×10^9 CFU/ml);1倍碳源及2倍氨基酸组合($\times 1C$ and $\times 2muc-X$ aa)在20h达到最高菌浓(1.04×10^{10} CFU/ml);2倍碳源及2倍氨基酸组合($\times 2C$ and $\times 2muc-X$ aa)在28h达到最高菌浓(1.40×10^{10} CFU/ml);2倍碳源及1倍氨基酸组合($\times 2C$ and $\times 1muc-X$ aa)在24h达到最高菌浓(1.62×10^{10} CFU/ml)。

[0063] 图4为AKK菌在流加碳源及氮源条件下的生长曲线。

[0064] 其中1倍碳源及1倍氨基酸组合($\times 1C$ and $\times 1muc-X$ aa)在20h达到最高菌浓(7.05×10^9 CFU/ml);3倍浓度流加液($\times 3fed-batch$)工艺在32h达到最高菌浓(2.88×10^{10} CFU/ml);5倍浓度流加液($\times 5fed-batch$)工艺在40h达到最高菌浓(2.54×10^{10} CFU/ml)。

具体实施方式:

[0065] 为更好的阐述完全单质培养可以有效的实现AKK菌的高密度发酵,下面将描述本发明的四个实施例,但本发明的内容包括但不限于此。

[0066] 实施实例1:三种人源性黏蛋白氨基酸组分对AKK菌生长的影响

[0067] 基础培养的组成为:表3.中全部基础成份(推荐添加量添加);表4.中葡萄糖(Glucose,4.5g/L)及N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc,5.53g/L);表5.中全部生长因子(推荐添加量添加);表6.中全部微量元素(推荐添加量添加);表7.中 Na_2S-9H_2O 0.48g/L。

[0068] 基础培养基分别添加的氮源组成为:

[0069] (1)5g/L商品化猪胃粘蛋白(hog gastric mucin,Type III,Sigma);

[0070] (2)总质量浓度为2.8g/L的人源Mucin-2型氨基酸组成(见表1.);

[0071] (3)总质量浓度为2.8g/L的人源Mucin-3A型氨基酸组成(见表1.);

[0072] (4)总质量浓度为2.8g/L的人源Mucin-3B型氨基酸组成(见表1.)。

[0073] 接种后培养基中初始AKK菌量约为 2.4×10^7 CFU/ml。

[0074] 不同氮源的培养基生长曲线如图1.所示:

[0075] 如图1.可知,本发明所选取的3种人源性黏蛋白氨基酸组分均可以使AKK菌良好的生长。与动物源性的mucin相比,更易被菌体所利用,表现为三种氨基酸组合可在8~12h使菌体进入对数生长期,而添加mucin组则为第16-20h。由此提示,氨基酸组分可以很好的替代天然mucin对AKK菌进行培养。

[0076] 实施实例2:AKK菌生长过程中的必须氨基酸、非必须氨基酸及其添加量

[0077] 基础培养的组成为:表3.中全部基础成份(推荐添加量添加);表4.中葡萄糖(Glucose,4.5g/L)及N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc,5.53g/L);表5.中全部生长因子(推荐添加量添加);表6.中全部微量元素(推荐添加量添加);表7.中 Na_2S-9H_2O 0.48g/L。

[0078] 所添加的氮源组成,共分为22组,其中第1组添加了表2.中全部20种氨基酸(推荐

添加量),第二组不添加氨基酸,第3至第22组分别较第1组少1种氨基酸组分。

[0079] 接种后培养基中初始AKK菌量约为 2.4×10^7 CFU/ml,培养时间为72h。实验结果如表8.所示:

[0080] 表8.培养基减少不同氨基酸后菌体的生长情况.

[0081]

组别	特征	OD	组别	特征	OD
1	20种AA	5.3	2	不添加AA	0.07
3	无苏氨酸	0.08	4	无脯氨酸	0.12
5	无甘氨酸	0.34	6	无缬氨酸	0.62
7	无丝氨酸	0.94	8	无半胱氨酸	2.4
9	无异亮氨酸	3.4	10	无谷氨酰胺	2.9
11	无亮氨酸	1.3	12	无谷氨酸	3.8
13	无天冬氨酸	3.4	14	无丙氨酸	3.6
15	无赖氨酸	3.9	16	无天冬酰胺	4.2
17	无酪氨酸	4.7	18	无精氨酸	4.5
19	无组氨酸	4.9	20	无苯丙氨酸	4.4
21	无蛋氨酸	5.1	22	无色氨酸	5.2
23	6种必须氨基酸(苏氨酸、脯氨酸、甘氨酸、缬氨酸、丝氨酸、亮氨酸)	2.3			

[0082] 如表8.可知,菌体生长对苏氨酸、脯氨酸、甘氨酸、缬氨酸、丝氨酸及亮氨酸具有明显的需求,可视为限制菌体生长的必须氨基酸;半胱氨酸、异亮氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸及赖氨酸,虽其缺乏可明显降低菌体数量,但为菌体生长所非必须氨基酸;与上述氨基酸相比,天冬酰胺、酪氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸及色氨酸,则对菌体生长的促进作用较弱。

[0083] 进一步的,选取必须氨基酸,包括苏氨酸、脯氨酸、甘氨酸、缬氨酸、丝氨酸及亮氨酸,其添加量见表9.。

[0084] 表9.不同实验组的氨基酸添加量.

[0085]

序号	氨基酸	第一组	第二组	第三组	第四组	第五组	第六组
1	苏氨酸	0.2g/L	0.5g/L	0g/L	1.91g/L	20g/L	30g/L
2	脯氨酸	0.1g/L	0.2g/L	0g/L	0.84g/L	9g/L	13g/L
3	甘氨酸	0.02g/L	0.05g/L	0g/L	0.17g/L	2g/L	3g/L
4	缬氨酸	0.05g/L	0.1g/L	0g/L	0.28g/L	3g/L	4.5g/L
5	丝氨酸	0.05g/L	0.1g/L	0g/L	0.22g/L	12.4g/L	18.6g/L
6	半胱氨酸	0.03g/L	0.06g/L	0g/L	0.22g/L	2.4g/L	3.6/L
7	异亮氨酸	0g/L	0g/L	0.22g/L	0.22g/L	2.4g/L	3.6g/L

8	谷氨酰胺	0g/L	0g/L	0.22g/L	0.22g/L	2.4g/L	3.6g/L
9	亮氨酸	0.02g/L	0.04g/L	0g/L	0.17g/L	6g/L	9g/L
10	谷氨酸	0g/L	0g/L	0.17g/L	0.17g/L	2g/L	3g/L
11	天冬氨酸	0g/L	0g/L	0.17g/L	0.17g/L	1.6g/L	2.4g/L
12	丙氨酸	0g/L	0g/L	0.11g/L	0.11g/L	1g/L	1.5g/L
13	赖氨酸	0g/L	0g/L	0.11g/L	0.11g/L	1.5g/L	2.25g/L
14	天冬酰胺	0g/L	0g/L	0.11g/L	0.11g/L	1.2g/L	1.8g/L
15	酪氨酸	0g/L	0g/L	0.17g/L	0.17g/L	1.5g/L	2.25g/L
16	精氨酸	0g/L	0g/L	0.11g/L	0.11g/L	1.5g/L	2.25g/L
17	组氨酸	0g/L	0g/L	0.11g/L	0.11g/L	1.1g/L	1.6g/L
18	苯丙氨酸	0g/L	0g/L	0.11g/L	0.11g/L	1.2g/L	1.8g/L
19	蛋氨酸	0g/L	0g/L	0.06g/L	0.06g/L	0.5g/L	0.75g/L
20	色氨酸	0g/L	0g/L	0.06g/L	0.06g/L	0.6g/L	0.9g/L

[0086] 分别摇瓶培养24h、36h及48h。其它培养条件与“实施实例1”相同，则 AKK菌的菌体数量如图2.所示。

[0087] 由图2.可知，培养基中只添加表9.第二组所示的7种氨基酸就可满足AKK 菌的生长需求，若这7种氨基酸添加量不足（见表9.中第一组及第三组），则AKK 菌难以生长。表9中，第四组氨基酸组成为推荐添加的氨基酸数量，从图2.可知，若添加的氨基酸数量为推荐剂量的10倍的时候（表9.中第五组），菌体生长受到明显的抑制；当添加的氨基酸数量为推荐剂量的15倍的时候（表9.中第六组），则菌体生长完全受到抑制。

[0088] 实施实例3：优化的氨基酸组合及碳源组合对AKK菌生长的影响

[0089] 基础培养基中，碳源选择两种配方，分别为：

[0090] “×1C”（4.5g/L葡萄糖与5.53g/L N-乙酰葡萄糖胺组合）；

[0091] “×2C”（9.0g/L葡萄糖与11.1g/L N-乙酰葡萄糖胺组合）。

[0092] 氮源（muc-X aa）：基于表1.中mucin-2型氨基酸组分，其中丝氨酸（Serine）为原组分4倍，亮氨酸（Leucine）为原组分2倍；

[0093] 氮源muc-X aa总质量浓度选择2.77g/L（×1muc-X aa）及5.55g/L（×2 muc-X aa）。

[0094] 其它培养条件与“实施实例1”相同，则AKK菌的生长曲线如图3.所示。

[0095] 由图3.可知，改进氨基酸配方后，muc-X aa培养基20h菌浓可达 7.05×10^9 CFU/ml，高于muc-2（图1.）培养基20h菌浓（ 6.5×10^9 CFU/ml）；

[0096] 分别提高氮源及碳源浓度后，“×1C and ×2muc-X aa”及“×2C and ×1muc-X aa”培养基最终菌浓均较“×1C and ×1muc-X aa”培养基为高。培养24h，“×2C and ×1muc-X aa”培养基菌浓可达到 1.62×10^{10} CFU/ml，为该组实验中最高。

[0097] 而当碳源及氮源均加倍（×2C and ×2muc-X aa）后，其达到最高菌浓周期及菌浓均较“×2C and ×1muc-X aa”有所下降，提示其生长抑制作用可能与较高浓度的碳源及氮源相关，故拟采用流加工艺进一步提高AKK菌活菌量。

[0098] 实施实例4：采用流加高浓度碳源及氮源工艺对AKK菌生长的影响

[0099] 初始培养基为：“实施实例3”中“×1C and ×1muc-X aa”培养基；

[0100] 与初始培养基等体积的流加液为：

[0101] (1) 3倍初始培养基浓度的碳源及氮源 ($\times 3C$ and $\times 3muc-X$ aa), 全部流加后终浓度为 $\times 2C$ and $\times 2muc-X$ aa。

[0102] (2) 5倍初始培养基浓度的碳源及氮源 ($\times 5C$ and $\times 5muc-X$ aa), 全部流加后终浓度为 $\times 3C$ and $\times 3muc-X$ aa。

[0103] 培养至8h开始流加, 至20h流加结束。两种流加方式下AKK菌的生长曲线如图4. 所示：

[0104] 由图4. 可知, 采用流加工艺可显著的提升AKK菌的最终菌浓。同时发现, 利用3倍浓度流加 ($\times 3fed-batch$) 工艺其无论是在生长速率还是在最终活菌量上均较5倍浓度流加 ($\times 5fed-batch$) 工艺具有明显的优势。

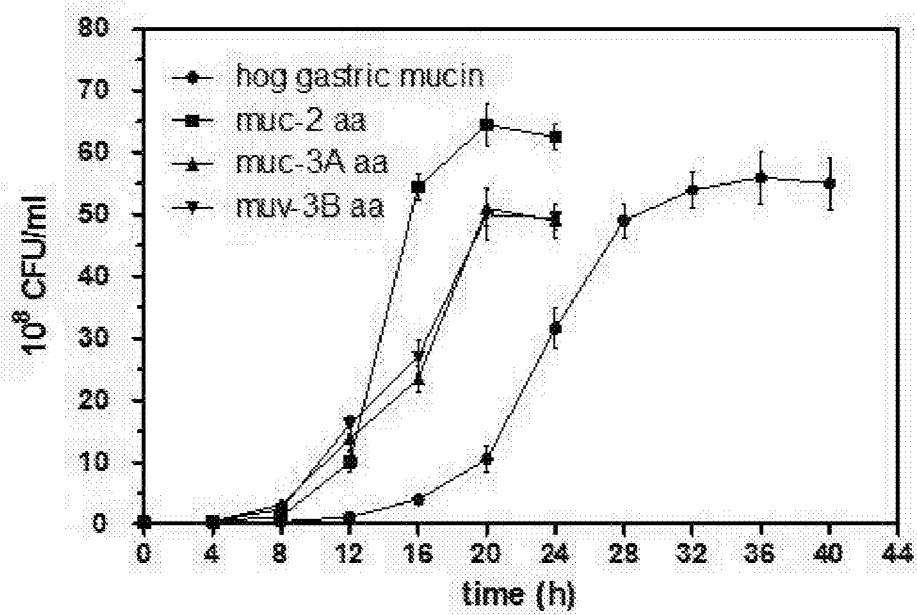


图1

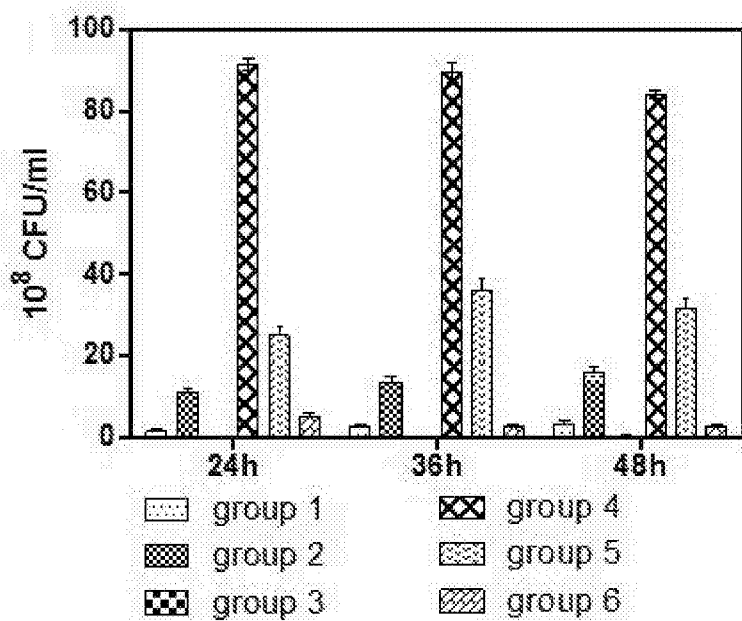


图2

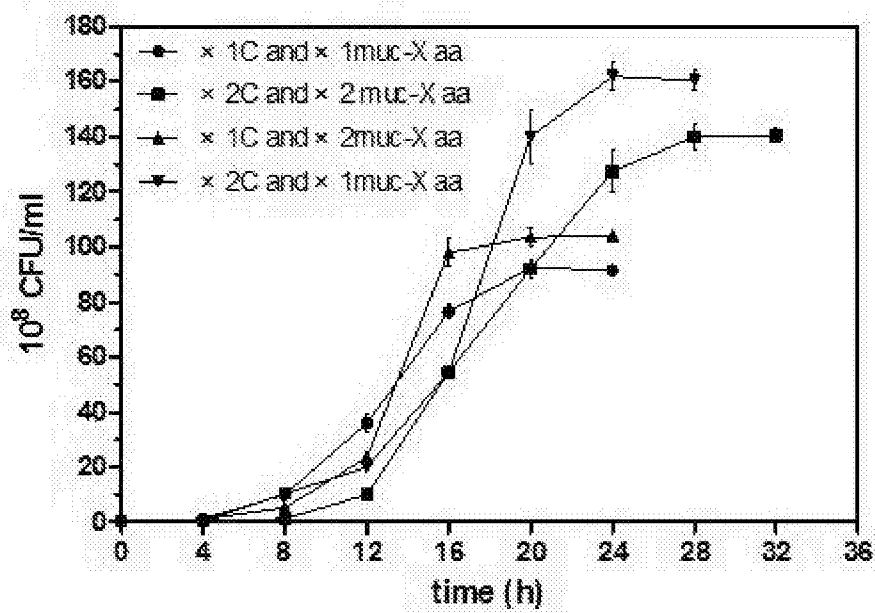


图3

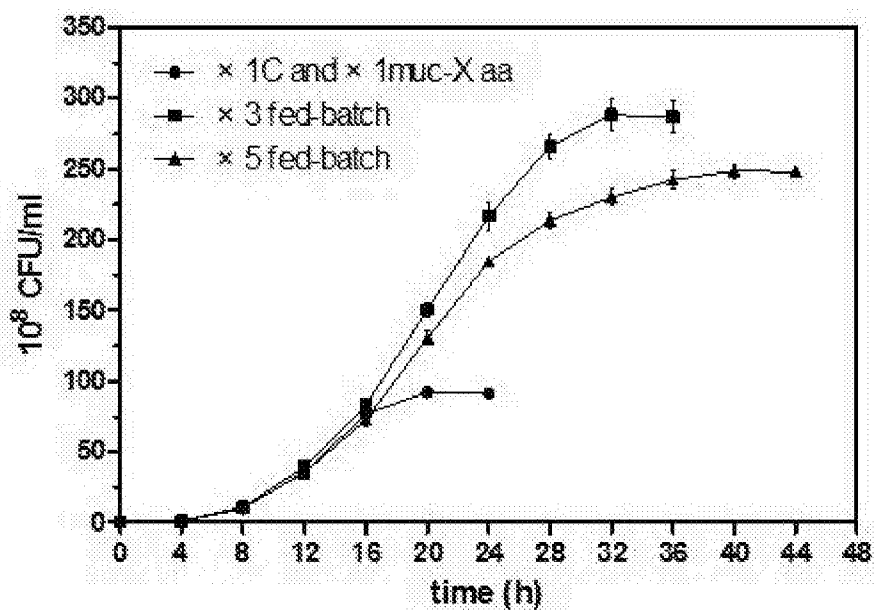


图4