

文章编号: 1006-3080(2025)01-0050-10

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20240121001

延长盐单胞菌生产依克多因高密度发酵工艺优化

张悦, 刘昊, 刘玮, 余君雄, 肖扬, 卞晶伟, 颜诚旭, 庄英萍, 王泽建
(华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

摘要:建立了延长盐单胞菌(*Halomonas elongata* DSM 2581^T)高效合成依克多因的高密度发酵工艺。通过单因素实验、Plackett-Burman实验与Central Composite Design系统考察了合成培养基营养组分对*H. elongata* DSM 2581^T发酵代谢的影响。优化结果表明: 3 g/L 柠檬酸钠, 3 g/L 氯化铵, 80 g/L 氯化钠的培养基组分能够显著促进*H. elongata* DSM 2581^T菌体的生长和产物合成。根据*H. elongata* DSM 2581^T在5 L发酵罐中优化后的培养基条件下的生长代谢情况, 建立了葡萄糖连续流加和pH反馈控制(氨水)的补料方式进行*H. elongata* DSM 2581^T高密度发酵工艺, 实施了将对数生长期发酵液中氯化钠质量浓度从80 g/L提高到130 g/L的快速盐梯度冲击策略, 发酵13 h后OD₆₀₀最高达到169.3, 依克多因产量和合成速率分别达到20 g/L和1.54 g/(L·h)。这项研究为实现依克多因的低成本、高效率工业化生产提供了理论指导。

关键词:延长盐单胞菌; 合成培养基; 高细胞密度培养; 依克多因; 盐冲击

中图分类号: Q815

文献标志码: A

依克多因(Ectoine, 1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-羧酸)为天氨酸的衍生物,是嗜盐菌在极端环境中合成的产物。依克多因可以提高膜脂表面的水合作用力,维持细胞新陈代谢所需的胞质空间和正常细胞形态^[1-5],除此以外该物质在皮肤细胞的保护和稳定方面具有良好功效^[6]。目前,依克多因作为一种高价值的化合物被广泛应用在化妆品、医药和食品等领域,它可以通过化学合成和生物发酵的方法得到,前体的高成本及合成过程中可能带来的环境污染使得化学方法在工业化生产中不具优势^[7]。因此,生物发酵生产依克多因已成为主要生产方式,其中延长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)是主要的工业生产菌株^[8-10]。延长盐单胞菌*H. elongata* DSM 2581^T属于中度嗜盐菌,能够在高盐环境下快速生长,原因在于胞内积累大量的依克多因来维持细胞内外渗透压平衡^[11-13]。

许多研究致力于优化生物合成的方法,设计了许多提高依克多因产量的方法,如“细菌挤奶”工艺^[14]。

同时,代谢工程也为提高依克多因产量作出了贡献,如Ning等^[15]构建了在低盐浓度下高效生产依克多因的大肠杆菌菌株。基因操控下的羟化酶的缺失,也会减少依克多因的羟基化而提高依克多因的产量^[16]。如何有效地控制微生物的生长和代谢产物的生成,提高发酵生产水平是生产下游环节的重点。发酵过程的优化依然是突破生产瓶颈的关键,Salman^[17]和Chen等^[18]都通过优化培养条件成功地提高了淀粉酶和依克多因的生产水平。利用能够精准调控合成培养基,高效快速地生产质量稳定的依克多因,是实现依克多因低成本生产的途径之一。

依克多因的详细生物合成机制迄今还未完全阐明,研究其中的合成机制及调节关键节点具有巨大的商业价值。高细胞密度发酵(High Cell Density Fermentation, HCDF)在工业生产上是用来增加产量的常用方法^[19]。利用合成培养基实现细胞的高细胞密度发酵,兼顾高盐浓度培养基可以刺激依克多因

收稿日期: 2024-01-21

基金项目: 国家重大专项项目(2020YFA096800)

作者简介: 张悦(1998—),女,山东淄博人,硕士生,主要研究方向为发酵工程。E-mail: 1341273170@qq.com

通信联系人: 王泽建, E-mail: wzjvictory@163.com

引用本文: 张悦,刘昊,刘玮,等. 延长盐单胞菌生产依克多因高密度发酵工艺优化[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, 51(1): 50-59.

Citation: ZHANG Yue, LIU Hao, LIU Wei, et al. High-Density Fermentation Process Optimization for Ectoine production by *Halomonas elongata* DSM 2581^T[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(1): 50-59.

生物合成的特点^[20-21],建立 *H. elongata* DSM 2581^T 的高密度培养有效提升依克多因产量的新工艺,为其工业化规模的低成本生产奠定理论基础。

本研究考察并优化了影响 *H. elongata* DSM 2581^T 依克多因发酵的全合成培养基的营养成分及添加浓度,并在 5 L 发酵罐水平考察了 *H. elongata* 在全合成培养基中的发酵代谢情况;基于优化后的合成培养基协同胁迫工艺对延长盐单胞菌进行高细胞密度培养,最终获得高于已报道的天然微生物生产依克多因的产量,并且获得高生产速率的发酵效果。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

1.1.1 出发菌株 实验菌种延长盐单胞菌 *H. DSM 2581^T*,属于中度嗜盐菌和革兰氏阴性细菌,由中国科学院微生物所提供。

1.1.2 培养基与培养条件

(1)菌种活化培养基(g/L):蛋白胨 10.00、酵母粉 5.00、氯化钠 80.00、琼脂 16.00, pH 7.00±0.10。

(2)种子培养基(g/L):酵母粉 5.00、蛋白胨 10.00、氯化钠 80.00、pH 7.00±0.10。

(3)M63 培养基按照 Fatollahi 等^[22] 描述的方法配制;PTM1 微量元素溶液按照 Charoenrat 等^[23] 等描述的方法配制。

1.2 测试与表征

1.2.1 实验仪器 SBA-40E 型生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所);pH 计(梅特勒-托利多);GZX-9420 MBE 型鼓风烘箱(华连医疗器械);5 L 生物反应器(上海国强生化工程装备有限公司);LC-2010A 型高效液相色谱(日本岛津公司);YXQ-LB-100SII 型压力蒸汽灭菌器(BOXUN);FA1004 型电子天平(上海良平仪器分析仪表有限公司);ZWYC-2933 型智城恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);VARIOSKAN LUX 型酶标仪(赛默飞世尔科技公司)。

1.2.2 检测方法

(1)生物量检测方法:利用酶标仪在低振荡、600 nm 波长下测量吸光度值(OD₆₀₀);菌体干重(Dry Cell Weight, DCW):发酵液离心弃上清,取沉淀于 90 °C 烘箱中烘干至恒重,称重,将细胞干重与菌液吸光度值作线性拟合,得 DCW=0.425×OD₆₀₀。

(2)葡萄糖浓度检测方法:发酵液离心取上清进行适当稀释,经 0.22 μm 水系膜过滤后由生物分析传感器测量。

(3)依克多因含量检测方法:取发酵液经超纯水稀释 3 倍后,加入玻璃研磨珠在冷冻研磨机中于 65 Hz 条件下研磨 30 min。取出后经过 12000 r/min 转速下离心 5 min 去沉淀,上清经 0.22 μm 水系膜过滤保存至液相小瓶,待测。依克多因通过岛津 HPLC 检测,使用 SB-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Agilent 公司),流动相为水:乙腈(体积比为 98:2),恒定流速 0.5 mL/min,柱温 30 °C,检测器为 SPD-20AV,紫外检测波长 210 nm^[24]。

1.2.3 动力学计算 菌体生长动力学可以将复杂的细胞代谢过程用简明的方式展现出来^[25-26],本文采用式(1)拟合 *H. elongata* 的生长动力学。

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (1)$$

式(1)积分后重新排列可得

$$X_t = \frac{X_0 \times e^{\mu_m t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_m}\right) \times (1 - e^{\mu_m t})} \quad (2)$$

其中, X 、 X_0 和 X_m 分别代表菌体质量浓度、初始菌体质量浓度和最大菌体质量浓度(g/L), μ_m 代表最大比生长率(h⁻¹), t 代表发酵时间(h)。

1.2.4 统计分析 采用 Design Expert 8.06 软件设计 Plackett-Burman 实验, Central Composite Design 采用 Origin 2021 软件进行数据分析及绘图,统计学分析采用 SPSS 的 ANOVA Tucky *post-hoc* 检验。

1.3 实验步骤

1.3.1 摇瓶培养 将种子液按 10% 的接种量接入装有 45 mL 培养基的 250 mL 挡板摇瓶中,于 37 °C、225 r/min 培养 12 h。

1.3.2 反应器培养 实验采用 5 L 体系发酵罐,装液量为 3 L。高压湿热灭菌后按 10% 的接种量进行接种。通气量为 1 vvm,转速为 600 r/min,罐压控制为 0.05 MPa,温度为 37 °C。发酵过程每间隔 1 h 取样,检测生物量、依克多因含量和残糖浓度等参数。

2 结果与讨论

2.1 合成培养基优选

2.1.1 碳源筛选实验 碳源是细菌生长和代谢过程中的重要物质基础,同时也是生物合成、维持生命活动的能量来源^[27]。不同的碳源对微生物生长代谢的影响不同,易利用的碳源可以促进微生物的生长和代谢。本研究考察了不同碳源种类(葡萄糖、柠檬酸钠、乳糖、甘露糖、木糖、蔗糖、海藻糖)对 *H. elongata* DSM 2581^T 生长的影响,利用多工位反应器

进行碳源筛选实验,培养 20 h 后测定生物量,结果如图 1 所示。在不同碳源下延长盐单胞菌 *H. elongata* 均可以生长,说明 *H. elongata* 具有广泛的碳源底物谱,胞内存在利用多种碳源的酶系。在以葡萄糖为碳源的培养基中获得的生物量最多,其次是柠檬酸钠,可见两种物质都是有利的细胞生长的碳源。而甘露糖、乳糖为碳源的培养基中生物量明显低于其他组别。

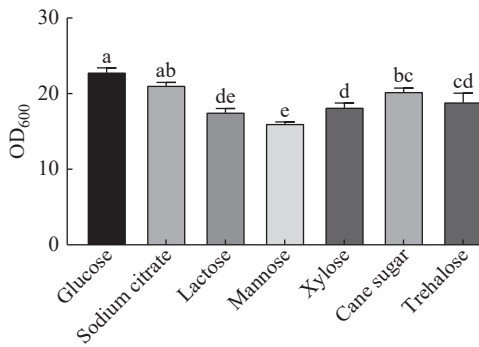


图 1 不同碳源实验对 *H. elongata* 细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of different carbon factors on cell growth of *H. elongata*

2.1.2 Plackett-Burman 实验设计与结果分析 有研究^[28]发现在较高盐浓度 (>10 g/L) 下 *H. elongata* DSM 2581^T 的产物合成为生长相关型。基于此发现,在优选营养成分过程中,当 Plackett-Burman 实验设计时选择以生物量为指标,在基础培养基(葡萄糖 10 g/L; PTM 11 mL/L; 氯化钠 60 g/L) 上利用 Design-Expert 8.06 Trial 软件包统计学工具箱实施 $n=12$ 的 Plackett-Burman 实验设计,考察了合成培养基中的柠檬酸钠、氯化铵、磷酸氢二钠、硫酸钠、氯化钾、硫酸镁、硫酸锌、硫酸锰 8 个成分对延长盐单胞菌生长的影响。利用 250 mL 摇瓶培养 10 h 后测定 OD₆₀₀, 实验设计因素水平及编码见表 1, 实验结果见表 2, 评价指标为生物量。每组设置 3 组平行。

经软件分析得到各培养基成分对生物量 (Y) 影响的拟合方程, $Y=3.73-0.091A+0.21B+0.085C-0.041D+0.088E-0.090F-0.13G-0.035H$ 。因为 p 值为 0.0212 (<0.05), 表明对于生物量评分所建立的回归方程显

著。氯化铵的 p 值 $0.0046 < 0.01$, 表明氯化铵是影响生物量的极显著因素。研究指出氮源对提高生物量和依克多因生产率具有重要意义^[20]。柠檬酸钠、硫酸锰、硫酸锌、硫酸镁的 p 值小于 0.05, 表明这些物质也是影响细胞生长的显著因素。Plackett-Burman 实验结果统计分析后确定了以上几种培养基成分的最佳添加质量浓度为: 硫酸钠 2.50 g/L, 七水合硫酸镁 3.00 g/L, 硫酸锌 0.25 g/L, 硫酸锰 0.09 g/L, 十二水磷酸氢二钠 7.50 g/L。

2.1.3 Central Composite Design 实验设计与结果分析

研究表明盐浓度是影响依克多因合成的重要因素^[29-30]。由本实验筛选出的影响延长盐单胞菌生长显著的因素: 柠檬酸钠 (X_1) 和氯化铵 (X_2), 将其与促进依克多因合成的主要因素氯化钠 (X_3) 相结合。通过中心组合实验考察这 3 种因素对延长盐单胞菌生长(生物量 Y_1) 和依克多因合成(依克多因产量 Y_2) 的影响。实验设置 3 组平行, 各因素及水平的实验设计见表 3, 分析结果见表 4。为了预测最佳点, 运用 Design Expert 8.06 软件对试验数据进行方差分析和二次多项回归拟合, 得到以生长和产物合成为指标的多元二次回归方程: $Y_1=8.48+0.13X_1-0.21X_2-0.084X_3-0.059X_1X_2+0.24X_2X_3-0.32X_1X_3-1.59X_1^2-1.53X_2^2-1.54X_3^2$; $Y_2=620.99+9.02X_1+15.74X_2+44.39X_3+34.89X_1X_2-4.82X_1X_3-17.98X_2X_3-95.16X_1^2-110.30X_2^2-139.20X_3^2$ 。以 Y_1 为响应值的模型决定系数 $R^2=0.9789$, 校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.9599$, $p < 0.0001$, 模型高度显著。以 Y_2 为响应值的模型决定系数 $R^2=0.9809$, 校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.9636$, $p < 0.0001$, 模型高度显著。 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 的 p 均小于 0.0001, 说明因素 X_1 、 X_2 、 X_3 对生物量和依克多因产量的影响都极显著, 因素 X_3 对依克多因产量影响极显著, X_1X_2 两两相交效应对依克多因产量影响显著。

各因素的响应面等值线图如图 2 所示, 3 个响应面的等高线中心都在设定的范围内, 表明在设计因素水平内存在最优设计条件。由图 2 可知, 三维响应曲面呈弧形, 柠檬酸钠、氯化铵、氯化钠呈两两间

表 1 Plackett Burman 实验设计因素水平及编码

Table 1 Factor levels and coding of Plackett-Burman design

Level	$\rho/(g \cdot L^{-1})$							
	NH ₄ Cl (A)	Sodium citrate (B)	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (C)	Na ₂ SO ₄ (D)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (E)	ZnSO ₄ (F)	MnSO ₄ (G)	KCl (H)
-1	2	3	2.5	2.5	1.5	0.25	0.016	2.5
0	4	6	5	5	3.0	0.5	0.048	5
1	6	9	7.5	7.5	4.5	0.75	0.09	7.5

表 2 Plackett-Burman 设计实验结果
Table 2 Experiment results of Plackett-Burman design

Group	A	B	C	D	E	F	G	H	OD ₆₀₀
1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	3.66
2	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	4.11
3	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	3.43
4	-1	1	1	1	-1	1	1	1	3.61
5	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	3.74
6	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	4.20
7	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	3.65
8	1	1	-1	-1	1	-1	1	1	3.80
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	4.14
10	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	3.51
11	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	3.05
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3.87

表 3 Central Composite Design 设计及结果
Table 3 Design and results of Central Composite Design

Group	$\rho/(g \cdot L^{-1})$			OD ₆₀₀	$\rho/(mg \cdot L^{-1})$
	Sodium citrate	NH ₄ Cl	NaCl		
1	1	1	50	3.39	175.84
2	5	1	50	3.59	197.26
3	1	5	50	3.94	245.52
4	5	5	50	3.33	305.09
5	1	1	110	3.86	355.02
6	5	1	110	4.41	255.74
7	1	5	110	2.54	251.39
8	5	5	110	3.46	393.07
9	0	3	80	4.12	357.50
10	6.36	3	80	4.53	357.37
11	3	0	80	4.80	313.50
12	3	6.36	80	4.23	315.75
13	3	3	29.50	4.81	151.17
14	3	3	130.40	4.12	314.56
15	3	3	80	8.67	647.26
16	3	3	80	8.37	642.91
17	3	3	80	8.23	602.89
18	3	3	80	8.51	610.17
19	3	3	80	8.81	608.11
20	3	3	80	8.15	612.69

交互作用, 分别固定柠檬酸钠、氯化铵、氯化钠, 生物量和依克多因产量随着另外两个因素取值的增大先升高后降低, 曲面顶点即为生物量和依克多因产量最高点及其对应的最优因素添加质量浓度。当氯化钠处于中心水平时, 柠檬酸钠和氯化铵对依克多因产量影响较大, 响应面坡度较陡。

由以上实验得到的最优化添加质量浓度为: 柠檬酸钠 3 g/L, 氯化铵 3 g/L, 氯化钠 80 g/L。经过摇瓶实验验证, 在最优条件下培养基中得到的生物量 OD₆₀₀ 和依克多因产量分别为 8.48 和 618.70 mg/L, 与预测值一致, 证明该模型较为合理。

2.2 延长盐单胞菌产依克多因的发酵工艺优化

2.2.1 批发酵工艺

在 5 L 罐的发酵中, 对优化后的合成培养基(HE9)进行延长盐单胞菌的发酵过程代谢参数考察, 结果如图 3 所示。在添加葡萄糖 20 g/L 的条件下菌体 OD₆₀₀ 最高可达到 26.60, 依克多因产量为 2.00 g/L, 对比摇瓶发酵结果均有明显的提高。利用 Logistic 方程拟合菌体的生长动力学模型, 结果表明在优化的全合成培养基 HE9 中延长盐单胞菌的 μ_m 可达到 0.49 h⁻¹。有研究表明 *H. elongata* DSM 2581^T 在盐质量浓度为 80 g/L 的复合培养基条件下 μ_m 为 0.65 h⁻¹[28], 约为 HE9 培养基所达到 μ_m 的 1.3 倍。

从整个发酵过程来看, 菌体生长经历短暂的延滞期后进入菌体快速生长的指数期, 依克多因进入快速合成阶段与菌体生长的对数生长期重合, 这与之之前报道的 *H. elongata* DSM 2581^T 在氯化钠质量浓度为 80 g/L 时依克多因合成是一个高度耦合生长过

表 4 Central Composite Design 实验方差分析
Table 4 Variance analysis of Central Composite Design

Source	Y_1				Y_2			
	Sum of squares	Mean square	F	p	Sum of squares	Mean square	F	p
Model	89.38	9.93	51.48	<0.0001	5.36×10^5	5.96×10^4	56.94	<0.0001
X_1 (Sodium citrate)	0.22	0.22	1.16	0.3074	1.11×10^3	1.11×10^3	1.06	0.3271
X_2 (NH_4Cl)	0.63	0.63	3.27	0.1007	3.38×10^3	3.38×10^3	3.24	0.1023
X_3 (NaCl)	0.10	0.10	0.49	0.4981	2.69×10^4	2.69×10^4	25.73	0.0005
$X_1 X_2$	0.03	0.03	0.14	0.7138	9.74×10^3	9.74×10^3	9.31	0.0122
$X_1 X_3$	0.44	0.44	2.30	0.1603	1.86×10^2	1.86×10^2	0.18	0.6821
$X_2 X_3$	0.82	0.82	4.26	0.0660	2.59×10^3	2.59×10^3	2.47	0.1470
X_1^2	36.59	36.59	189.70	<0.0001	1.31×10^5	1.31×10^5	124.77	<0.0001
X_2^2	33.53	33.53	173.84	<0.0001	1.75×10^5	1.75×10^5	167.61	<0.0001
X_3^2	34.31	34.31	177.85	<0.0001	2.79×10^5	2.79×10^5	266.97	<0.0001
Residual	1.93	0.19			1.05×10^4	1.05×10^3		
Lack of fit	1.60	0.32	4.85	0.0540	8.61×10^3	1.72×10^3	4.66	0.0584
Pure error	0.33	0.07			1.85×10^3	3.7×10^2		
Cor total	91.31				5.47×10^5			

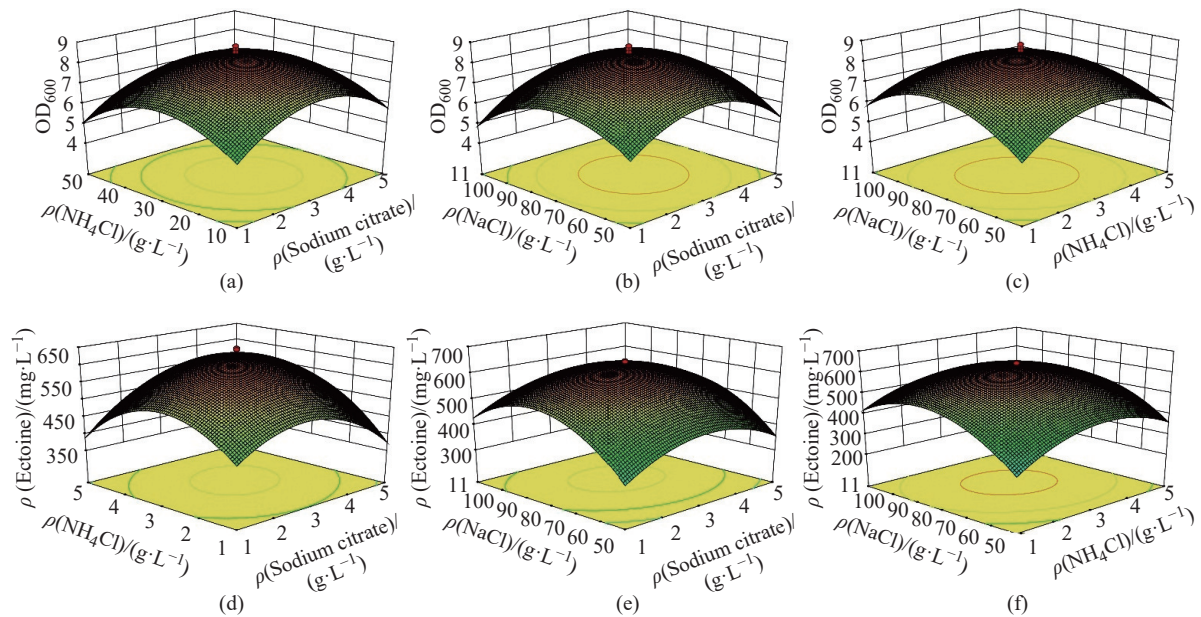


图 2 柠檬酸钠、氯化铵与氯化钠交互影响延长盐单胞菌生长与产物合成影响的等高线图

Fig. 2 Contour lines of effects of sodium citrate, NH_4Cl and NaCl on the growth and ectoine production of *H. elongata*

程的结果一致^[28]。碳源的变化情况表现为: 发酵前 5 h 碳源消耗较慢, 仅仅消耗了 17.50% 的葡萄糖; 随着细胞生长进入对数生长期, 葡萄糖消耗速度显著增加, pH 开始快速下降, 通过氨水调节 pH 值在 6.5 左右至发酵结束。CO₂ 释放率 (Carbon-dioxide Escape Rate, CER) 总体呈现与菌体生长的一致趋势。随着分批培养葡萄糖的耗尽, 菌体生长和依克多因的合

成出现停滞。

2.2.2 分批补料发酵 为了进一步提升菌体的生物量和依克多因的合成, 在优化的培养基基础上研究了连续流加葡萄糖的延长盐单胞菌高密度培养工艺。发酵培养 7 h 后流加葡萄糖溶液, 利用发酵液残糖浓度反馈调整葡萄糖溶液流加速率; 利用氨水进行 pH 调控和氮元素补充, 发酵过程各曲线如图 4

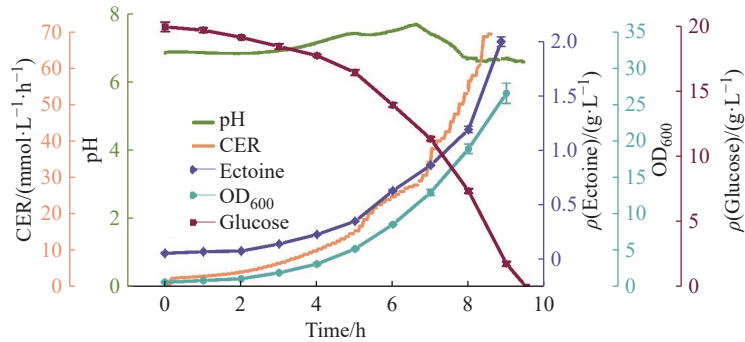


图3 延长盐单胞菌在5 L生物反应器中的发酵过程曲线

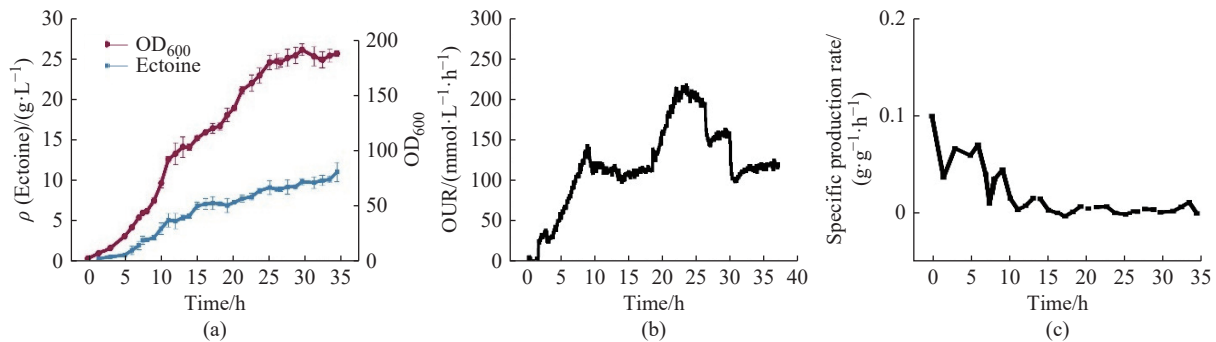
Fig. 3 Fermentation process curve of *H. elongata* in a 5 L bioreactor

图4 高密度培养发酵过程曲线: 菌体生长和产物合成(a); 氧气摄取速率(b); 比产率(c)

Fig. 4 Fermentation process curve under HCDF: Biomass and ectoine production (a); Oxygen uptake rate (b); Specific production rate (c)

所示。发酵培养 34 h 时, OD₆₀₀ 最高可达到 191, 依克多因产量达到 11.05 g/L(图 4(a)), 菌体氧摄取速率(Oxygen Uptake Rate, OUR)最高达到 220 mmol/(L·h)(图 4(b))。与批次发酵相比, 最高 OD₆₀₀ 和依克多因产量分别为批次发酵结果的 7.18 倍和 5.53 倍。发酵中期观察到菌体生长缓慢、OUR 持平的现象, 在发酵 20 h 时补充 2 g/L 的磷酸氢二钾, 随后菌体生长速率和 OUR 增加速率明显加快。磷酸盐含量显著影响工程大肠杆菌和嗜盐生物的生物量和依克多因产量^[18, 31], 说明这段生长的缓慢期可能是由于 HE9 培养基中磷元素不足导致细胞生长受限。对不同发酵时期的生理代谢参数(表 5)进行分析发现, 发酵后期依克多因产率明显下降的现象(图 4(c)), 远低于理论最大产率^[32]。补料过程中持续葡萄糖和氨水的补入会导致盐浓度的逐步下降, 从而影响依克多因的合成, 这可能是导致发酵后期比产率低的重要原因。

2.2.3 盐梯度胁迫促进依克多因合成的优化控制工艺 为改善高密度培养发酵后期出现的菌体生长缓慢和依克多因转化率的问题, 进一步对 HE9 合成培养基中磷源浓度进行优化, 并与盐梯度冲击控制相结合, 以达到促进依克多因的快速生成。在发酵过程的指数期(8 h)进行盐梯度冲击实验, 结果如图 5、表 6 所示。在指数生长中期利用一次性补加的方式将发酵液中氯化钠的质量浓度从 80 g/L 补充到 130 g/L

(图 5(a))。OUR 在盐冲击后有短暂的下降, 随后维持着快速增加的趋势, 最高达到 209.84 mmol/(L·h)(图 5(b))。发酵 13 h 后 OD₆₀₀ 达到 169.3, 依克多因产量为 20 g/L。与优化前的工艺相比, 依克多因产量提高了 81%。依克多因合成速率在进行盐梯度冲击(8 h)后显著增加(图 5(d)), 最大达到了 5.5 g/(L·h)。图 5(c)所示的依克多因比产率的结果也表明在盐梯度冲击的过程中, 发酵 10 h 时的比产率(0.086 g/(g·h))显著高于分批补料发酵最高的比产率(0.016 g/(g·h)), 说明盐梯度冲击能够有效地促进依克多因的合成, 而且优化后发酵时间显著缩短。

本研究中发现摇瓶中生产依克多因的最佳盐质量浓度为 80 g/L。有研究利用动力学模型对不同盐浓度下 *H. elongata* DSM 2581^T 菌体生长和依克多因生物合成进行拟合发现: 当氯化钠质量浓度低于 80 g/L 时, *H. elongata* DSM 2581^T 的依克多因的生物合成速率随着氯化钠质量浓度的增加而增加^[33]。但过高的盐浓度超过了细胞的耐受水平, 反而抑制细胞生长^[28, 34]。因此本研究利用不同盐浓度的培养基分阶段进行依克多因生物合成: 在前期, 80 g/L 的盐质量浓度可以给细胞提供良好的生长环境, 当细胞生长到一定阶段采取提高盐质量浓度的方式进入刺激依克多因合成阶段。

在合成培养基上结合连续补料, 盐梯度冲击工

表 5 高密度培养下发酵过程中的生理代谢参数

Table 5 Physiological metabolic parameters during fermentation under HCDF

t/h	$\Delta\rho_{DCW}/(g\cdot L^{-1})$	$\Delta\rho_{Ectoine}/(g\cdot L^{-1})$	Productivity/ $(g\cdot L^{-1}\cdot h^{-1})$	$Y_{x/s}/\%$	$Y_{p/s}/\%$
0—13	38.40	5.42	0.42	42.63	6.02
13—20	10.72	1.51	0.22	30.01	4.23
20—30	19.96	2.92	0.29	18.46	2.70
30—34	1.96	1.20	0.30	6.00	3.68

$\Delta\rho_{DCW}$ —Increase in biomass over this period of time; $\Delta\rho_{Ectoine}$ —Increase in ectoine over this period of time; $Y_{p/s}$ —Yield of ectoine to glucose consumption; $Y_{x/s}$ —Biomass to glucose consumption; Productivity—Rate of ectoine production

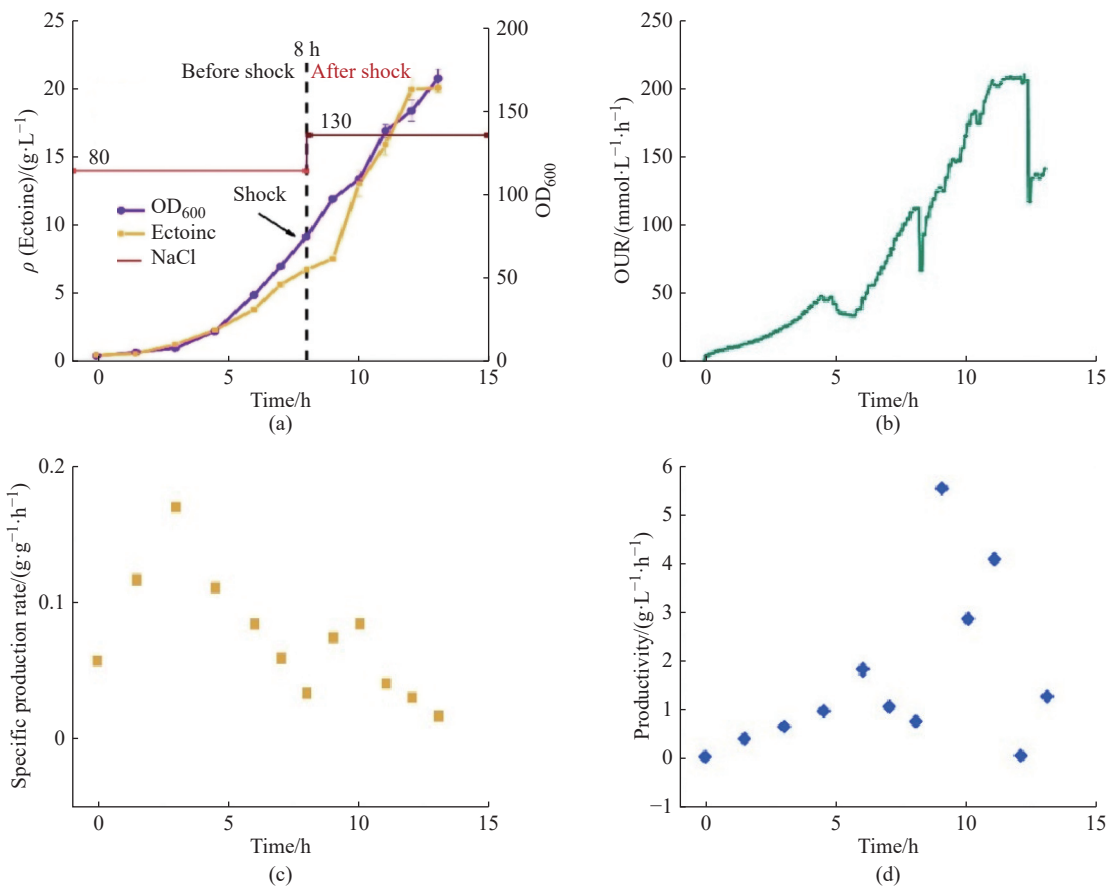


图 5 盐梯度冲击高密度发酵过程: 菌体生长和产物合成(a); 氧气摄取速率(b); 比产率(c); 产物合成速率(d)

Fig. 5 Fermentation process curve of salt shock under HCDF: biomass and ectoine production (a); oxygen uptake rate (b); specific production rate (c); productivity (d)

表 6 盐胁迫工艺条件下发酵过程理化参数

Table 6 Physicochemical parameters of fermentation process under salt shock

X_m/g	$\rho_m/(g\cdot L^{-1})$	$Y_{x/s}/\%$	$Y_{p/s}/\%$	$q_p/(g\cdot g^{-1}\cdot h^{-1})$	μ_m/h^{-1}	Productivity/ $(g\cdot L^{-1}\cdot h^{-1})$
169.30±5.63	20.00±0.32	53.68	14.95	0.021	0.49	1.54

ρ_m —Maximum product concentration, q_p —Specific production rate, $Y_{p/s}$ —Yield of ectoine to glucose consumption, $Y_{x/s}$ —Biomass to glucose consumption, Productivity—Rate of ectoine production

艺进行高密度细胞密度发酵, 可以获得 OD_{600} 为 169.3, 依克多因产量为 20 g/L 的结果。与目前已报道的嗜盐菌底盘的依克多因生产结果(表 7)相比, 本研究优化后的依克多因的产量和生产速率与之相比

具有极大的优势。发酵产量达到了 20 g/L, 比其他嗜盐菌的最高发酵水平(14.86 g/L)^[37] 提高了 34.5%。尤其是依克多因的合成速率达到了 1.54 g/(L·h), 远高于文献中的报道水平。

表7 用于依克多因生产的天然微生物及其产量、生产率
Table 7 Natural microorganisms used for ectoine production, yields and productivity

Strain	Titer/(g·L ⁻¹)	$Y_{p/x}$ /(g·g ⁻¹)	Productivity/ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Process strategy	Reference
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM3043	8.20	0.54	—	Continuous with cell retention	[35]
<i>H. salina</i> BCRC17875	13.96	—	0.29	Fed-batch	[29]
<i>H. hydrothermalis</i> Y2	10.5	0.22	0.22	Fed-batch	[36]
<i>H. salina</i> DSM 5928 ^T	14.86	0.14	0.32	Combined batch	[37]
<i>H. elongata</i> strain 1A01717	14.48	—	0.60	Fed-batch	[38]
<i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T	20.00	0.28	1.54	Fed-batch	This work

$Y_{p/x}$ —Yield of ectoine to biomass

3 结论

本研究首先通过单因素实验研究了不同碳源对 *H. elongata* DSM 2581^T 菌体生长的影响,结果显示葡萄糖是最佳碳源。通过 Plackett-Burman 考察了培养基中各组分的浓度对生物量的影响,结果表明显著因素为柠檬酸钠和氯化铵。利用 Central Composite Design 进一步优化了培养基,最终确定柠檬酸钠 3 g/L,氯化铵 3 g/L,氯化钠 80 g/L。基于优化后的全合成培养基,进行连续补料和指数中期盐梯度式冲击的发酵工艺研究,最终获得的细胞量的 OD₆₀₀ 约为 169.3,依克多因产量和依克多因合成速率分别达到 20 g/L 和 1.54 g/(L·h)。这说明在该合成培养基上联合连续补料和指数期盐梯度冲击进行高密度培养的可行性,为高效合成依克多因的发酵工艺提供了数据支撑。

参考文献:

- [1] GALINSKI E A, PFEIFFER H P, TRUEPER H G. 1, 4, 5, 6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid: A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1985, 149(1): 135-140.
- [2] SCHWIBBERT K, MARIN-SANGUINO A, BAGYAN I, et al. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 1973-1994.
- [3] ROBERTS M F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms[J]. *Saline Systems*, 2005, 1: 5.
- [4] BOLEN D W. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: Issues important in protein crystallization[J]. *Methods*, 2004, 34(3): 312-322.
- [5] BOLEN D W, BASKAKOV I V. The osmophobic effect: Natural selection of a thermodynamic force in protein folding[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 310(5): 955-963.
- [6] GRAF R, ANZALI S, BUENGER J, et al. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant[J]. *Clinics in Dermatology*, 2008, 26(4): 326-333.
- [7] TANIMURA K, MATSUMOTO T, NAKAYAMA H, et al. Improvement of ectoine productivity by using sugar transporter-overexpressing *Halomonas elongata* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 89: 63-68.
- [8] 何宏韬,郑爽,陈国强.基于嗜盐菌合成生物学的下一代工业生物技术[J]. *集成技术*, 2022, 11(1): 1-12.
- [9] LENTZEN G, SCHWARZ T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(4): 623-634.
- [10] HERMANN L, MAIS C N, CZECH L, et al. The ups and downs of ectoine: Structural enzymology of a major microbial stress protectant and versatile nutrient [J]. *Biological Chemistry*, 2020, 401(12): 1443-1468.
- [11] BROWN A. Microbial water stress [J]. *Bacteriological Reviews*, 1976, 40(4): 803-846.
- [12] OREN A. Microbial life at high salt concentrations: Phylogenetic and metabolic diversity[J]. *Saline Systems*, 2008, 4: 2.
- [13] QUILLAGUAMÁN J, GUZMÁN H, VAN-THUOC D, et al. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by *Halophiles*: Current potential and future prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85: 1687-1696.
- [14] KUNTE H-J, LENTEN G, GALINSKI E. Industrial production of the cell protectant ectoine: Protection mechanisms, processes, and products[J]. *Current Biotechnology*,

- 2014, 3(1): 10-25.
- [15] NING Y K, WU X J, ZHANG C L, *et al.* Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 10-18.
- [16] WANG D, CHEN J, WANG Y, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for high-yield production of ectoine [J]. *Green Chemical Engineering*, 2023, 4(2): 217-223.
- [17] SALMAN T, KAMAL M, AHMED M, *et al.* Medium optimization for the production of amylase by *Bacillus subtilis* RM16 in Shake-flask fermentation [J]. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 2016, 29(2): 439-444.
- [18] CHEN R F, ZHU L J, LV L H, *et al.* Optimization of the fermentation process for high yield of ectoine from *Halomonas elongata* in bench scale [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2018, 27(10): 6777-6784.
- [19] SUBRAMANIAM R, THIRUMAL V, CHISTOSERDOV A, *et al.* High-density cultivation in the production of microbial products[J]. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2018, 32(4): 451-464.
- [20] SAUER, GALINSKI. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 57(3): 306-313.
- [21] GARCÍA-ESTEPA R L, ARGANDOÑA M, REINA-BUENO M, *et al.* The *ectD* Gene, Which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 3774-3784.
- [22] FATOLLAHI P, GHASEMI M, YAZDIAN F, *et al.* Ectoine production in bioreactor by *Halomonas elongata* DSM2581: Using MWCNT and Fe-nanoparticle[J]. *Biotechnology Progress*, 2021, 37(1): e3073.
- [23] CHAROENRAT T, KHUMRUAENGSRIN, PROMDONKOY P, *et al.* Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 116(2): 193-198.
- [24] HE Y Z, GONG J, YU H Y, *et al.* High production of ectoine from aspartate and glycerol by use of whole-cell biocatalysis in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 55.
- [25] IKASARI L, MITCHELL D A. Two-phase model of the kinetics of growth of *Rhizopus oligosporus* in membrane culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 68(6): 619-627.
- [26] KLIMEK J, OLLIS D F. Extracellular microbial polysaccharides: Kinetics of *Pseudomonas sp.* *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1980, 22(11): 2321-2342.
- [27] 王晓惠, 王泽建, 肖慈英, 等. 醉金香葡萄愈伤细胞悬浮培养基优化促进白藜芦醇的合成 [J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2022, 48(2): 203-212.
- [28] YU J X, WANG Z J, WANG J, *et al.* Physiological metabolic topology analysis of *Halomonas elongata* DSM 2581^T in response to sodium chloride stress[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(12): 3509-3525.
- [29] CHEN W C, HSU C C, LAN J C W, *et al.* Production and characterization of ectoine using a moderately halophilic strain *Halomonas salina* BCRC17875[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 125(5): 578-584.
- [30] SALAR-GARCÍA M J, BERNAL V, PASTOR J M, *et al.* Understanding the interplay of carbon and nitrogen supply for ectoines production and metabolic overflow in high density cultures of *Chromohalobacter salexigens*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16: 12.
- [31] SINGHA T K, DAGAR V K, GULATI P, *et al.* Kinetic study and optimization of recombinant human tumor necrosis factor-alpha (rhTNF-alpha) production in *Escherichia coli* [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(3): 267-276.
- [32] NING Y K, WU X J, ZHANG C L, *et al.* Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 10-18.
- [33] HOBMEIER K, CANTONE M, NGUYEN Q A, *et al.* Adaptation to varying salinity in *Halomonas elongata*: Much more than ectoine accumulation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 30(13): 846677.
- [34] WOOD, J. M. Bacterial responses to osmotic challenges[J]. *Journal of General Physiology*, 2015, 145(5): 381-388.
- [35] FALLET C, ROHE P, FRANCO-LARA E. Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo-osmotic stress[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(1): 124-133.
- [36] ZHAO Q, LI S, LV P, *et al.* High ectoine production by an engineered *Halomonas hydrothermalis* Y2 in a reduced salinity medium [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 184.
- [37] LANG Y J, BAI L, REN Y N, *et al.* Production of ectoine through a combined process that uses both growing and resting cells of *Halomonas salina* DSM 5928^T[J]. *Extremophiles*, 2011, 15(2): 303-310.
- [38] CHEN R F, ZHU L J, LV L H, *et al.* Optimization of the extraction and purification of the compatible solute ectoine from *Halomonas elongate* in the laboratory experiment of a commercial production project [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(6): 116.

High-Density Fermentation Process Optimization for Ectoine production by *Halomonas elongata* DSM 2581^T

ZHANG Yue, LIU Hao, LIU Wei, YU Junxiong, XIAO Yang, XUN Jingwei, YAN Chengxu,
ZHUANG Yingping, WANG Zejian

(School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: In this study, a high-density fermentation process of *Halomonas elongate* DSM 2581^T was established, which had the advantage of high ectoine production rate. The effects of nutrient components of defined medium on fermentation and metabolism of *H. elongata* DSM 2581^T were investigated by single factor experiment, Plackett-Burman and Central Composite Design. The results showed that sodium citrate (3 g/L), NH₄Cl (3 g/L) and NaCl (80 g/L) could significantly promote the growth and ectoine production of *H. elongata* DSM 2581^T. Furthermore, according to the growth and metabolism of *H. elongata* in the defined medium in a 5 L fermentor, the feeding mode of glucose continuous flow plus and pH feedback control (ammonia water) was established to carry out the high-density fermentation process of *H. elongata* DSM 2581^T. Salt shock, which increased the NaCl concentration in the fermentation broth from 80 g/L to 130 g/L in the exponential growth phase, resulted in OD₆₀₀ reaching 169.3 after 13 h of fermentation, with ectoine production and ectoine synthesis reaching 20 g/L and 1.54 g/(L·h), respectively. This study provides theoretical guidance for the low-cost and efficient industrial ectoine production.

Key words: *Halomonas elongata*; defined medium; high cell density culture; ectoine; salt shock

(责任编辑: 王晓丽)