

伊尼奥小单孢工程菌 S₉₆ 深层优化培养特性研究

洪文荣*, 石贤爱, 林 娟, 程 骥

(福州大学生物工程系, 福州 350002)

【摘 要】 目的: 伊尼奥小单孢工程菌 S₉₆ 的深层优化培养特性。方法: 借助于国内外学者的经验, 并结合微生物生长和生产营养原理, 粗筛出一组较合适的生产配方, 然后应用正交试验和数理统计法, 优化出适合于工程菌 S₉₆ 的发酵生产配方, 其组成为: 淀粉 5.5%, 黄豆粉 3.5%, K₂HPO₄ 0.04%, 花生粉 1.5%, 蛋白胨 0.3%, 葡萄糖 0.1%, CoCl₂ 10 r/ml, 消沫剂适量。根据溶氧曲线, 优化发酵工艺, 获得一套较适合于工程菌 S₉₆ 的代谢曲线特性图, 按照该曲线特性图进行调控, 可使西索米星的生产水平接近于实验室生产水平, 充分发挥了工程菌 S₉₆ 的抗生素生物合成潜力, 达到了较为理想的效果。

【关键词】 西索米星; 工程菌; 伊尼奥小单孢菌; 发酵工程; 抗生素; 深层培养; 优化

【中图分类号】 Q813 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)05-0469-04

伊尼奥小单孢菌是西索米星(sisomicin)的主要产生菌, 对其工程菌 S₉₆ 培养特征的研究, 已进行了报道^[1]。本文吸取国内外学者的经验, 从选择培养基配比和溶氧控制入手, 以尽可能简单的途径描述所获工程菌 S₉₆ 的深层培养特征, 以求最大限度地发挥其合成抗生素的潜力。通过原生质融合, 得到的工程菌 S₉₆, 与出发菌——伊尼奥小单孢菌 T125 显著不同。深层培养菌丝长, 生长速度快, 衰老慢, 稳定期明显延长, 具有明显的高产特征。因此, 优化工艺挖掘生物合成潜力, 研究其深层培养特征, 是继获得工程菌之后的又一重要环节。本文从优化培养基和溶氧曲线, 研究工程菌 S₉₆ 的深层优化培养。

1 材料与方法

1.1 工程菌 S₉₆

本室经细胞工程育种从伊尼奥小单孢菌 T125 获得。

1.2 培养基(%)

斜面配方: 可溶性淀粉 1.5%, 蔗糖 0.5%, KNO₃ 0.1%, K₂HPO₄ 0.05%, NaCl 0.05%, CaCO₃ 0.4%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 麸皮 1.5%, pH 7.8; 种子培养基: 可溶性淀粉 2.7%, CaCO₃ 0.2%, 蛋白胨 0.5%, 花生饼粉 0.5%, 葡萄糖 0.3%, 酵母膏

0.2%; 发酵培养基: 可溶性淀粉 4.5%, KNO₃ 0.15%, MgSO₄ 0.03%, CaCO₃ 0.4%, 蛋白胨 0.4%, 酵母膏 0.4%, 葡萄糖 0.5%, 花生饼粉 2.0%, CoCl₂ 8 r/ml, K₂HPO₄ 0.04%。

1.3 玻璃发酵罐

Biostat B5 (B. Braun), 5 L, 0 ~ 1200 r/min。

1.4 分析方法

发酵单位: 生物检定法^[1]。

菌丝浓度: 取发酵液 10 ml, 于 3000 r/min 下离心 5 min, 去上清液后的固体物作为相对菌丝浓度。

其它项目: 总糖、还原糖、氨基氮、温度、pH 等均采用工业化常规分析法^[2]。

2 工程菌 S₉₆ 培养基的选择和优化

为了确定培养基最佳配方, 从国内外所研究和使用的, 有代表性的各种培养基中筛选, 国内外西索米星研究生产所用培养基如下。

2.1 国外报道使用的培养基

F1^[3]: Beef extract 3.0%, Trypton 0.5%, Yeast extract 0.5%, Dextrose 0.1%, Starch 2.4%, Calcium carbonate 2.0%。

F2^[3]: Dextrin 5.0%, Dextrose 0.5%, Soybean meal 3.5%, Calcium carbonate 0.7%, Cobalt chloride 10 r/ml。

F3^[4]: Soybean meal 3.0%, Dextrin 5.0%, Dextrin 5.0%, CaCO₃ 0.7%, CoCl₂ 10 r/ml, FeSO₄ 0.001%。

F4^[5]: Soybean meal 4.0%, Peptone 1.0%, Starch 1.0%,

Palm oil 0.2%, MgSO₄ 0.2%, Glucose 0.5%, CaCO₃ 0.4%, Fe-SO₄ 7H₂O 0.2%, C₆S₄·6H₂O 10 r/ml.

F5^[9]: Soybean 3.0%, Corn meal 2.5%, CaCO₃ 0.5%, Co-Cl₂·6H₂O 10 r/ml, Antifoam agent 1.0% (Soybean; oil).

F6^[7]: Dextrin 5.0%, glucose 0.5%, wheat flour 0.3%, CaCO₃ 0.7%, CoCl₂ 10 r/ml, pH 7.2.

2.2 国内报道使用的培养基

G1^[8]:斜面培养基: 淀粉、葡萄糖、硝酸钾、氯化钠、碳酸钙、琼脂、pH7.0; 种子培养基: 淀粉、黄豆粉、蛋白胨、碳酸钙、pH 7.5; 发酵培养基: 淀粉、黄豆粉、蛋白胨、鱼粉、磷酸氢二钾、氯化钴、碳酸钙、pH 7.5.

G2^[9]:斜面培养基: 淀粉、麸皮、KNO₃、MgSO₄、NaCl、CaCO₃、琼脂; 种子培养基: 淀粉、黄豆饼粉、蛋白胨、MgSO₄、CaCO₃; 发酵培养基: 淀粉、黄豆饼粉、蛋白胨、K₂HPO₄、CoCl₂、CaCO₃.

2.3 发酵优化培养基初筛

分析国内外工艺研究所用的培养基及其配方, 初步筛选 5 组(F1、F2、F3、F4、F5)发酵培养基, 进行比较, 全部采用摇瓶深层培养发酵法(200 r/min, 35℃, 5 d, 50 ml/500 ml 三角瓶), 接入 S₉₆斜面培养物进行发酵. 5 组不同发酵培养基发酵完毕, 放瓶测生物效价, 结果见表 1.

Tab 1. The production of sisomycin in five different group medium

Mediums	Titer(production)				Average titer
	(u/ml)				(u/ml)
G1	200	190	201	/	197
G2	302	348	280	/	310
G3	470	558	446	/	516
G4	276	230	281	260	262
G5	212	230	222	223	222

G1(%): Starch 9.0, Soybean meal 3.0, glucose 0.5, Peptone 0.4, NaNO₃, ZnSO₄ 0.02, amylase 0.015; G2(%): Starch 5.5, com meal 1.0, Peptone 0.4, Soybean meal 3.0, KNO₃ 0.01, (NH₄)₂SO₄ 0.1, CaCO₃ 0.65, amylase 0.015, CoCl₂ 10 r/ml; G3(%): Starch 4.5, Peptone 0.2, Soybean meal 3.5, Peanut meal 2.0, Glucose 0.5, KNO₃ 0.14, MgSO₄ 0.04, K₂HPO₄ 0.04, CaCO₃ 0.4, CoCl₂ 2 r/ml; G4(%): Starch 1.0, Dextrin 2.5, Glucose 0.5, Peptone 1.0, CaCO₃ 0.4, MgSO₄ 0.2, Soybean; oil 0.2, FeSO₄ 0.2, CoSO₄ 0.2, CoCl₂ 8 r/ml; G5(%): Soybean meal 3.0, com meal 2.5, CaCO₃ 0.5, CoCl₂ 10 r/ml

2.4 培养基优化

从初筛结果可以明显地看出 F3 培养基的组成和配比明显优于其它组, 较适合于工程菌 S₉₆. 因

此决定从 F3 培养基的组成入手, 进一步优化. 采用正交试验法进行优化, 选择 L27(3¹³)交互正交表^[10], 其实验方案如下, 因素水平见表 2, 表头设计见表 3, 所得结果之方差分析见表 4.

Tab 2. Level and factor

Factor /Lever	Starch	Soybean meal	K ₂ HPO ₄	Peanut meal	KNO ₃	MgSO ₄
A	B	C	D	E	F	G
1	4.0	1.0	0	2.0	0	0.1
2	6.0	3.5	0.04	1.0	0.1	0
3	7.0	3.0	0.01	1.5	0.2	0.2

Tab 3. L27(3¹³)Orthogonal layout

Factor	A	B	A×B	C	A×C	A×D	D	A×D	E	F	G	Result	
Arrange	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Tab 4. Calculate result

Variance source	Partial quadratic sum	Freedom	Variance	F value	Fa	Significance
A	324668	2	162334	67.19	F _{0.05} (2, 4)=6.94	* *
B	679109	2	339555	140.54	F _{0.01} (2, 4)=18.00	* *
A×B	218622	4	54656	22.62	F _{0.05} (4, 4)=6.39	*
C	24802	2	12401	5.13	F _{0.01} (4, 4)=15.98	no
A×C	67094	4	16774	6.94		*
D	72999	2	36500	15.11		*
A×D	66876	4	16719	6.92		no
E	24579	2	12299	5.09		no
F	3693	2	1874			no
Error(e)	5970	2	2985			
e [^]	9663	4	2416			

葡萄糖及蛋白胨在正交表中安排不下, 采用常规单独试验以确定最适配方. 最后发酵培养基配方优化到最简单, 而生产效果又达到最好, 简称之为 F6, 正式应用于以后的发酵及工业化生产. 其组成为: 淀粉 5.5%, 黄豆粉 3.5%, K₂HPO₄ 0.04%, 花生粉 1.5%, 蛋白胨 0.3%, 葡萄糖 0.1%, CoCl₂ 10 r/ml, 消沫剂 0.05%. 经反复验证效果很好, 摇瓶效价最高超过 1 600 μg/ml(1 623 μg/ml), 取得了良好的结果.

3 溶氧变化与生物代谢调控

3.1 全程搅拌转速恒定、通气流量不变的溶氧变化曲线

参照出发菌伊尼奥小单孢菌 T₁₂₅的工艺控制,

全程空气流量为 1:1, 搅拌转速 200 r/min, 溶氧值以相对值表示, 将培养基接种后探头所测的溶氧值调节到 100%, 作为参照值, 发酵代谢过程, 溶氧变化曲线自动记录下来, 所得的溶氧曲线见图 1。

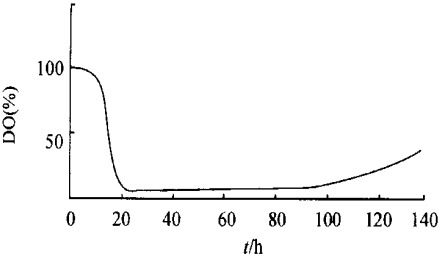


Fig 1. The relation-curve between stable providing oxygen and resperation of engineering strain S₉₆

从溶氧曲线可以看出, 在发酵培养过程, 经 10 h 潜伏期后, 溶氧曲线开始下降到极低值的 8%, 并保持恒定, 一直到 100 h 以后, 才开始有所回升。

3.2 定时改变搅拌转速的溶氧曲线(发酵培养通气恒定)

溶解氧对生物合成至关重要, 常常是细胞体内代谢的控制因素, 而改变通气流量, 虽然能改变溶解氧值, 但不够明显, 在小型发酵罐上进行发酵代谢研究, 通过改变搅拌转速来改变溶解氧浓度, 比改变空气流量更方便, 更显著。在参照图 1 的基础上, 选择最具特征的 50 68 90 h 处, 通过改变搅拌转速, 来改变溶氧值以分析细胞呼吸与溶氧的关系。参照图 1, 基本搅拌转速定为 200 r/min, 但在 50 h 处(A 点)升到 300 r/min, 并保持恒定, 此时溶氧直线上升, 然后缓慢下降, 当下降到恒定时, 将搅拌转速恢复到 200 r/min, 并继续培养。在 68 h(B 点)及 90h(C 点)处进行了同样的重复操作。虽然在 A、B、C 3 点操作相同, 但出现的溶氧曲线却不同。在 A 点, 2 h 后, 溶氧值就降到 8%, 并保持恒定; B 点溶氧值下降较缓慢, 随后还出现一个峰值, 然后才下降到 8% 左右; C 点溶氧值下降更缓慢, 达到恒定时, 不再是 8%, 而是 25% 左右, 到 110 h 后, 溶氧曲线开始上升, 见图 2。

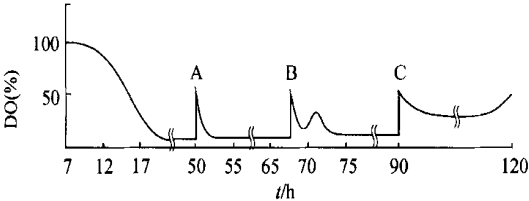


Fig 2. The relation-curve between variable providing oxygen and resperation of engineering strain S₉₆

在 A 点, 溶氧曲线直线上升, 2 h 后下降到极低值的 8%, 说明此时细胞代谢仍然旺盛, 吸氧比较彻底, 所需溶氧的推动力比较小; 在 B 点, 溶氧曲线直线上升后, 下降比较缓慢, 10 h 后才恢复到极低值的 8%, 表明此时细胞代谢已不如前期旺盛; 在 C 点, 溶氧曲线直线上升后, 下降更为缓慢, 而且不能下降到 8%, 而是下降到 25% 就保持恒定, 说明此时细胞代谢能力大大减小, 需氧量显著降低, 所供空气流量已经超过代谢所需。因此 90 h 后, 可以降低空气流量, 这样不仅不会影响代谢, 而且还会大大节约无菌空气用量, 减少动力费用。因此, 在特定的发酵系统中保持特定的稳定调控, 再根据溶氧曲线, 在后期降低空气用量, 可以较充分地发挥工程菌合成西索米星的潜力。

3.3 工程菌 S₉₆ 代谢曲线特性图

在获得合理的培养基配方和溶氧代谢曲线后, 选择了比较合理的代谢调控方案, 为了能使代谢调控更接近大型工业化生产, 采用改变通气流量来改变溶氧值, 结果是通气流量从 1:1.0 下降到了 1:0.3~0.15, 大大地节约了空气用量, 发酵单位大幅度上升, 整体经济效能大大提高, 取得了显著的效果, 其典型代谢控制见图 3。

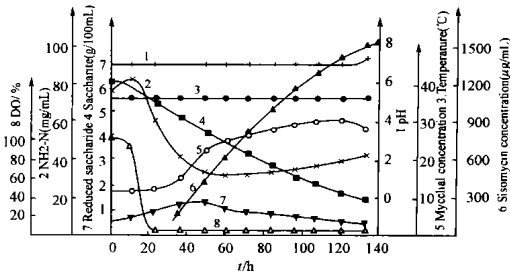


Fig 3 The characteristic curve of metabolism of engineering strain S₉₆
1 pH; 2 NH₂-N(mg/ml); 3 T(°C); 4. saccharide(g/ 100 ml); 5 mycelial concentration(%); 6 sisomycin concentration(μg/ml); 7 reduced saccharide(g/ 100 ml); 8. DO(%)

采用以上图 3 推荐的代谢曲线特性图, 工程菌 S₉₆ 的发酵水平可以达到接近摇瓶的生产水平。

4 结 论

应用正交试验和数理统计等方法, 优化精选出的发酵生产配方, 其组成为: 淀粉 5.5%, 黄豆粉 3.5%, K₂HPO₄ 0.04%, 花生粉 1.5%, 蛋白胨 0.3%, 葡萄糖 0.1, CoCl₂ 10 r/ml, 消沫剂适量, 适合于工程菌 S₉₆ 发酵生产西索米星。根据溶氧曲线,

优化发酵工艺, 获得一套较适合于工程菌 *S₉₆* 的代谢曲线特性图, 按照该曲线特性图进行调控, 可使发酵罐的西索米星生产水平接近于摇瓶的生产水平, 充分发挥了工程菌 *S₉₆* 的抗生素生物合成潜力, 达到了较为理想的效果。

参考文献

[1] 洪文荣(Hong WR), 石贤爱(Shi XA), 林娟(Lin J), 等. 伊尼奥小单孢工程菌 *S₉₆* 培养特性研究[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2003, **34**(2): 177-180.

[2] 中华人民共和国药典(二部)[Z]. 北京: 化学工业出版社, 1995. 70-74.

[3] 陈钧鸣, 徐玲娣. 抗生素工业分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1991. 108-111.

[4] Weinstin MJ, East B, George M, et al [P]. *US Patent*: 3907771 Step.

23 1975

[5] Weinstin MJ, Wagnan GH, Marquez JA. *Chemical Abstract*, 1976, **85**: 318, 85: 3881d

[6] Chinoin Gyogyszer es Vegyeszeti Temeket Gyara Rt. *Chemical Abstract*, 1980, **93**: 496.

[7] Chinoin Gyogyszer es Vegyeszeti Temeket Gyara Rt. *Chemical Abstract*, 1980, **93**: 654.

[8] Weinstin MJ, Luedemann GM, Wagnan GH. *Chemical Abstract*, 1976, **84**: 330 84: 15684j

[9] 朱坚屏(Zhu JP), 倪雅富(Ni YF). 抗生素西索米星发酵过程中的次要组分的调控[J]. 中国抗生素杂志(*Chin J Antibiot*), 1999, **24**(1): 16-18.

[10] 朱坚屏(Zhu JP), 倪雅富(Ni YF), 荣洁(Rong J). 提高西索米星生产菌产量的遗传育种[J]. 中国抗生素杂志(*Chin J Antibiot*), 1999, **23**(2): 129-133.

[11] 杨子胥. 正交表的构造[M]. 山东: 山东人民出版社, 1978. 215-216

Study on the Fermentation Characterizatics of *Micromonospora Inyoensis* Engineering Strain *S₉₆*

HONG Wen-Rong, SHI Xian-Ai, LIN Juan, CHENG Ji
Department of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China

【ABSTRACT】 The immersed culture characteristics of *Micromonospora inyoensis strain S₉₆* (*strain S₉₆*) was studied. The medium constitution of fermentation by orthogonal layout[*L27 (3¹³)*] about sisomycin produced by engineering *strain S₉₆* was explored. The results of orthogonal layout show that reasonable fermentation medium constitution(%) is starch 5. 5, soybean meal 3. 5, *K₂HPO₄* 0. 04, peanut meal 1. 5, pepton 0. 3, glucose 0. 1, *CoCl₂* 10 r/ml, and antifoam 0. 05% Fermentation process was also studied. According to dissolved oxygen curve of *strain S₉₆*, combined with above reasonable fermentation, the typical metabolism character curves of *strain S₉₆* *strain* were proved. Using this recommended control curves and fermentation medium constitution on scale-up fermenter, the titer of antibiotics in culture solution was nearly to flask level. The highest titer of sisomycin passed 1600 *μ*g/ ml.

【KEY WORDS】 Sisomycin; Engineering strain; Fermentation engineering; *Micromonospora strain*; Antibiotics

。征订启事。

欢迎订阅 2004 年《药学教育》

《药学教育》是由国家教育部主管, 中国药科大学、广东药学院、中国医药教育协会联合主办的高等药学教育研究期刊, 是药学教育界惟一公开发行的社科类刊物。

《药学教育》为中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 被万方数据库、中国期刊全文数据库、中文科技期刊数据库等大型检索数据库全文收录。本刊旨在探讨各层次药学教育规律, 研究药学教育理论, 发表药学教育改革成果, 结合实际介绍药学教育的先进经验。刊物力求突出思想性、学术性、实用性, 在药学教育改革中起到宣传、引导、咨询、借鉴、交流作用。

本刊面向医药院校(系)、药科学校, 面向医药企事业职教部门。设有教育研究、德育知行、教学园地、实践训练、现代教育技术、调研与评估、中等教育、成人教育、国外教育等近 20 个栏目, 有较大的信息容量。本刊为大 16 开本, 64 页, 内容丰富, 形式新颖, 每期定价 5.00 元, 全年订费 20.00 元。刊物季末寄发。订费请邮寄至: 南京市董家巷 24 号 中国药科大学《药学教育》编辑部。联系电话: 025-3271476; 邮编: 210009; E-mail: pharmedu@cpu.edu.cn; 网址: <http://www.pharmgarden.net/qikan/edu/index.asp>.