

# 伊尼奥小单孢工程菌 S<sub>96</sub>深层优化培养特性研究

洪文荣<sup>\*</sup>, 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 S<sub>96</sub> 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, 粗筛选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 S<sub>96</sub> 的发酵生产配方, 其组成为: 淀粉 5.5%, 黄豆粉 3.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04%, 花生粉 1.5%, 蛋白胨 0.3%, 葡萄糖 0.1%, CoCl<sub>2</sub> 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 S<sub>96</sub> 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 S<sub>96</sub> 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 S<sub>96</sub> 培养特征的研究, 已进行了报道<sup>[1]</sup>。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 S<sub>96</sub> 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 S<sub>96</sub>, 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 S<sub>96</sub> 的深层优化培养。

## 1 材料与方法

### 1.1 工程菌 S<sub>96</sub>

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%, KNO<sub>3</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 0.05%, CaCO<sub>3</sub> 0.4%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, 麸皮 1.5%, pH 7.8; 种子培养基: 可溶性淀粉 2.7%, CaCO<sub>3</sub> 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%, KNO<sub>3</sub> 0.15%, MgSO<sub>4</sub> 0.03%, CaCO<sub>3</sub> 0.4%, 蛋白胨 0.4%, 酵母膏 0.4%, 葡萄糖 0.5%, 花生饼粉 2.0%, CoCl<sub>2</sub> 8 r/ml, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04%。

### 1.3 玻璃发酵罐

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

### 1.4 分析方法

发酵单位: 生物检定法<sup>[1]</sup>。

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<sup>[2]</sup>。

## 2 工程菌 S<sub>96</sub> 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<sup>[3]</sup>: Beef extract 3.0%, Tryptone 0.5%, Yeast extract 0.5%, Dextrose 0.1%, Starch 2.4%, Calcium carbonate 2.0%。

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

F3<sup>[4]</sup>: Soybean meal 3.0%, Dextrin 5.0%, Dextrin 5.0%, CaCO<sub>3</sub> 0.7%, CoCl<sub>2</sub> 10 r/ml, FeSO<sub>4</sub> 0.001%。

F4<sup>[5]</sup>: Soybean meal 4.0%, Peptone 1.0%, Starch 1.0%,

Palm oil 0.2%, MgSO<sub>4</sub> 0.2%, Glucose 0.5%, CaCO<sub>3</sub> 0.4%, Fe-SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2%, CaSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 r/ml.

F5<sup>[9]</sup>: Soybean 3.0%, Corn meal 2.5%, CaCO<sub>3</sub> 0.5%, Co-Cl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 r/ml, Antifoam agent 1.0% (Soybean oil).

F6<sup>[7]</sup>: Dextrin 5.0%, glucose 0.5%, wheat flour 0.3%, CaCO<sub>3</sub> 0.7%, CoCl<sub>2</sub> 10 r/ml, pH 7.2.

## 2.2 国内报道使用的培养基

G1<sup>[8]</sup>: 斜面培养基: 淀粉、葡萄糖、硝酸钾、氯化钠、碳酸钙、琼脂、pH 7.0; 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<sup>[9]</sup>: 斜面培养基: 淀粉、麸皮、KNO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>、NaCl、CaCO<sub>3</sub>、琼脂; 种子培养基: 淀粉、黄豆饼粉、蛋白胨、MgSO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub>; 发酵培养基: 淀粉、黄豆饼粉、蛋白胨、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、CoCl<sub>2</sub>、CaCO<sub>3</sub>。

## 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, 初步遴选 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 °C, 5 d, 50 ml/500 ml 三角瓶), 接入 S<sub>96</sub>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, NaNO<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub> 0.02, amylase 0.015; G2(%): Starch 5.5, corn meal 1.0, Peptone 0.4, Soybean meal 3.0, KNO<sub>3</sub> 0.01, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1, CaCO<sub>3</sub> 0.65, amylase 0.015, CoCl<sub>2</sub> 10 r/ml; G3(%): Starch 4.5, Peptone 0.2, Soybean meal 3.5, Peanut meal 2.0, Glucose 0.5, KNO<sub>3</sub> 0.14, MgSO<sub>4</sub> 0.04, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04, CaCO<sub>3</sub> 0.4, CoCl<sub>2</sub> 2 r/ml; G4(%): Starch 1.0, Dextrin 2.5, Glucose 0.5, Peptone 1.0, CaCO<sub>3</sub> 0.4, MgSO<sub>4</sub> 0.2, Soybean oil 0.2, FeSO<sub>4</sub> 0.2, CoSO<sub>4</sub> 0.2, CoCl<sub>2</sub> 8 r/ml; G5(%): Soybean meal 3.0, corn meal 2.5, CaCO<sub>3</sub> 0.5, CoCl<sub>2</sub> 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 S<sub>96</sub>。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(3<sup>13</sup>)交互正交表<sup>[10]</sup>, 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Peanut meal | KNO <sub>3</sub> | MgSO <sub>4</sub> |
|----------------|--------|--------------|---------------------------------|-------------|------------------|-------------------|
| 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(3<sup>13</sup>) Orthogonal layout

| Factor A  | B | A×B | C | A×C | A×D | D | A×E | 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 <sub>0.05</sub> (2, 4)=6.94  | *            |
| B               | 679109                | 2       | 339555   | 140.54  | F <sub>0.01</sub> (2, 4)=18.00 | *            |
| A×B             | 218622                | 4       | 54656    | 22.62   | F <sub>0.05</sub> (4, 4)=6.39  | *            |
| C               | 24802                 | 2       | 12401    | 5.13    | F <sub>0.01</sub> (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 <sup>2</sup>  | 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%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04%, 花生粉 1.5%, 蛋白胨 0.3%, 葡萄糖 0.1%, CoCl<sub>2</sub> 10 r/ml, 消沫剂 0.05%。经反复验证效果很好, 摆瓶效价最高超过 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 T<sub>125</sub>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。

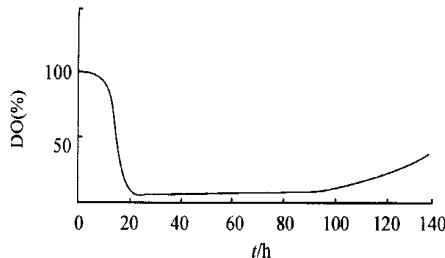


Fig 1. The relation-curve between stable providing oxygen and respiration of engineering strain S<sub>96</sub>

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90 h(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。

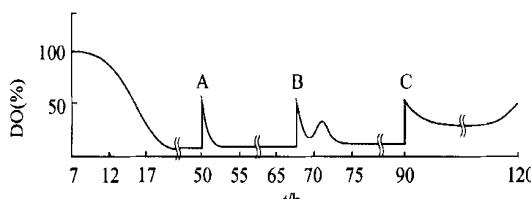


Fig 2. The relation-curve between variable providing oxygen and respiration of engineering strain S<sub>96</sub>

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了代谢所需。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S<sub>96</sub>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。

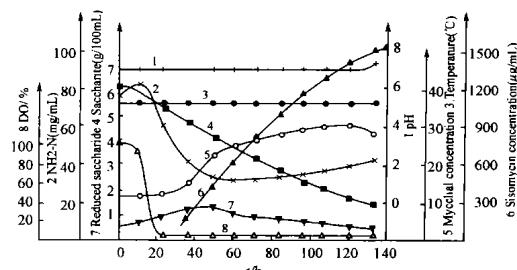


Fig 3. The characteristic curve of metabolism of engineering strain S<sub>96</sub>

1 pH; 2 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration (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S<sub>96</sub>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%,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.04%,花生粉1.5%,蛋白胨0.3%,葡萄糖0.1%,CoCl<sub>2</sub>10 r/ml,消沫剂适量,适合于工程菌S<sub>96</sub>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 S<sub>96</sub>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 S<sub>96</sub>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 S<sub>96</sub>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] Weinstein MJ, East B, George M, et al[P]. US Patent: 3907771 Step. 23 1975
- [5] Weinstein MJ, Wagman GH, Marquez JA. *Chemical Abstract*, 1976, 85, 318, 85, 3881d
- [6] Chinoi Gyogyszer es Vegyeszeti Temeket Gyara Rt. *Chemical Abstract*, 1980, 93, 496.
- [7] Chinoi Gyogyszer es Vegyeszeti Temeket Gyara Rt. *Chemical Abstract*, 1980, 93, 654.
- [8] Weinstein MJ, Luedemann GM, Wagman GH. *Chemical Abstract*, 1976, 84, 330-84, 15684j
- [9] 朱坚屏(Zhu JP), 倪雍富(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), 倪雍富(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 Characteristics of *Micromonospora inyoensis* Engineering Strain S<sub>96</sub>

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 S<sub>96</sub> (strain S<sub>96</sub>) was studied. The medium constitution of fermentation by orthogonal layout [L27 (3<sup>13</sup>)] about sisomycin produced by engineering strain S<sub>96</sub> was explored. The results of orthogonal layout show that reasonable fermentation medium constitution (%) is starch 5.5, soybean meal 3.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04, peanut meal 1.5, pepton 0.3, glucose 0.1, CoCl<sub>2</sub> 10 mg/ml, and antifoam 0.05%. Fermentation process was also studied. According to dissolved oxygen curve of strain S<sub>96</sub>, combined with above reasonable fermentation, the typical metabolism character curves of strain S<sub>96</sub> 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 μg/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、面向医药企事业单位教部门。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 南京市童家巷 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>。