



顾晶,石彦鹏,牛春,等. 癸酸钠抗性菌株产达托霉素的发酵补料策略[J]. 黑龙江农业科学,2022(4):81-84.

癸酸钠抗性菌株产达托霉素的发酵补料策略

顾晶,石彦鹏,牛春,张萍

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,宁夏银川 750101)

摘要:为提高达托霉素产生菌玫瑰孢链霉菌的发酵能力,通过筛选癸酸钠抗性菌株,优化其发酵瓶补加正癸酸的方法,提高达托霉素的摇瓶效价值。首先对原始菌株进行癸酸钠抗性选育,筛选出一株空白摇瓶效价值为 $43.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菌株 TR21-29,利用该菌株对癸酸盐的耐受性,验证其发酵瓶补加正癸酸的最优方式。主要考察正癸酸的耦合剂,向发酵瓶添加正癸酸的补料时间、补料浓度和补料间隔,确定发酵过程中补加正癸酸的关键参数。结果表明:补料可将抗性菌株 TR21-29 的原始效价值由 $43.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高至 $138.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,提高率为 218.2%。补料方式为配制 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的正癸酸溶液,在发酵瓶培养 24 h 后开始补加,补料终浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,补料间隔为 4 h。

关键词:达托霉素;玫瑰孢链霉菌;癸酸钠;正癸酸;发酵瓶补料

达托霉素(Daptomycin)是一种环状脂肽类抗生素,用于治疗革兰氏阳性感染^[1]。达托霉素由玫瑰孢链霉菌发酵产生,发酵代谢产物中活性最强的为 A21978C,是一组包含不同长度脂酰侧链的环脂肽复合物,为达托霉素的母核,是由 13 个氨基酸组成的环十肽结构^[2]。A21978C 含有许多组分,结构虽然相似,但抑菌活性和细胞毒性存在很大差异,其中达托霉素(A21978C0)的治疗指数最高^[3]。在发酵过程中加入外源性前体癸酸,直接参与达托霉素的合成,可提高达托霉素在 A21978C 复合物中的比重^[4]。但正癸酸对菌体有一定的毒性,对达托霉素合成具有抑制性。因此提高达托霉素的发酵产量,需要获得抗性菌株,并在发酵过程中选择适宜的方式添加正癸酸。卢文玉等^[5]通过激光诱变获得一株癸酸抗性菌株,根据达托霉素的生物合成途径优化出适宜的癸酸添加方式,发酵效价达到 $210.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。段然等^[6]在筛选癸酸钠抗性菌株的基础上,通过在发酵过程中添加癸酸钠并优化其发酵培养基,将达托霉素在发酵瓶中的产量提高为 $42.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。吴远杰等^[7]通过诱变选育得到一株突变菌株,并优化发酵小罐中癸酸的添加量,使发酵产量达到 $1.68 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。吴旻等^[8]通过研究癸酸耦合剂,采用乙醇作为癸酸最佳耦合剂,流加补料并进行发

酵摇瓶,使发酵效价达到 $109.95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。徐鲁等^[9]通过向发酵罐补加邻氨基苯甲酸钠,得出无论是向摇瓶中还是发酵罐中添加邻氨基苯甲酸钠均对达托霉素的合成有显著促进作用,最终将发酵单位提高至 $3\,432 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

本试验通过研究达托霉素的抗性选育和发酵补料工艺,首先选择毒性较低的前体癸酸钠获得抗性突变菌株,使菌体增加对癸酸盐的耐受性,其次通过优化发酵瓶添加正癸酸的方式,提高达托霉素在发酵瓶中的合成量,主要对正癸酸耦合剂、正癸酸补料时间、补料浓度和补料间隔进行验证,以期筛选出发酵过程中正癸酸的适宜添加方式,提高达托霉素的发酵产量提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 玫瑰孢链霉菌 TR20-7,由宁夏泰瑞制药股份有限公司技能人才创新工作室筛选保藏。

1.1.2 培养基 斜面及分离培养基:葡萄糖 0.4%,酵母提取物 0.4%,麦芽提取物 1.0%,碳酸钙 0.2%,琼脂 1.5%,pH7.0。

种子培养基:胰蛋白胨大豆肉汤 3.0%,糊精 5.0%,pH7.0。

发酵培养基^[6]:酵母提取物 1.1%,硫酸亚铁铵 0.086%,葡萄糖 1.07%,糊精 7.2%,糖蜜 0.72%,pH7.0。以上培养基均在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min。

收稿日期:2021-11-26

第一作者:顾晶(1990—),女,学士,初级工程师,从事菌种发酵研究。E-mail:juw6883@dingtalk.com。

1.1.3 主要试剂与仪器 主要试剂:达托霉素标准品(加拿大 TRC 公司,纯度为 98.04%),磷酸二氢铵(分析纯),正癸酸(麦克林公司)。

主要仪器:LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);PHS-3C 酸度计(上海精密科学仪器有限公司);BSA3202S-CW 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);XG1-Y 型普通卧式压力蒸汽灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);CR21GⅢ 高速冷却离心机(HITACHI)。

1.2 方法

1.2.1 菌种培养 斜面 and 分离平板培养:取生长良好的斜面菌种制备成菌悬液,使用稀释后的单孢子悬液涂布于分离平板培养基上,使用原液制备斜面,于 30℃ 培养 12 d。

种子瓶培养:选取生长优良的斜面菌种,铲取 2.0 cm² 孢子接入装量为 30 mL·(300 mL)⁻¹ 的种子培养基中,摇床转速 230.0 r·min⁻¹,培养 12 h 后加入 10 颗玻璃珠,继续培养至 48 h。

发酵瓶培养:将培养好的种子液按 10% 的接种量转入装量为 30 mL·(300 mL)⁻¹ 的发酵瓶中,发酵瓶内添加 8~10 颗玻璃珠,摇床转速 230.0 r·min⁻¹,30℃ 振荡培养 5 d。

1.2.2 癸酸钠抗性菌株筛选 配制浓度分别为 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 和 1.2 g·L⁻¹ 的癸酸钠抗性平板,按照 1.2.1 中的方法培养,培养结束记录菌落生长情况。根据菌落生长情况,分别从菌落生长开始变差的癸酸钠平板上挑选单菌落进行发酵初筛摇瓶验证,发酵过程不添加正癸酸,高于对照组的单菌落进行复筛摇瓶验证,筛选抗性菌株。

1.2.3 补加正癸酸最佳方式验证 正癸酸耦合剂的筛选:由于正癸酸不溶于水,常温下呈蜡状固体,需采用合适的溶剂。此外正癸酸本身对菌体有毒害作用,发酵液中过多会导致菌体自溶,因此合适的耦合剂对菌体利用正癸酸至关重要。正癸酸不溶于水,溶于多数有机溶剂中,常见的溶剂为无水乙醇和油酸甲酯,将无水乙醇和油酸甲酯按照不同比例与正癸酸混合,观察对摇瓶效价值和菌体量的影响。

正癸酸补加时间:选取发酵对数生长期到平稳期进行补料时间验证,设置 5 组发酵瓶,每组 3 瓶,配制正癸酸母液 0.5 g·mL⁻¹。5 组发酵瓶补加方式分别为:发酵瓶培养 12,18,24,32 和

48 h 后开始补加正癸酸,每 12 h 补加 1 次。补加的正癸酸终浓度保持 1.5 mmol·L⁻¹,直至发酵结束,测定达托霉素含量,确定最佳开始补加时间。

正癸酸的补加浓度:用油酸甲酯溶解正癸酸,使母液浓度为 0.5 g·mL⁻¹,发酵瓶培养 24 h 后,开始添加正癸酸,补加正癸酸溶液到发酵瓶,终浓度为 1.0,1.5,2.0,2.5 和 3.0 mmol·L⁻¹,发酵培养结束后测定达托霉素含量,确定最佳补加剂量。

正癸酸的补加间隔:在最佳开始补加时间确定后,发酵周期为 5 d 时,考察每 2,4,6 和 8 h 补加正癸酸溶液对发酵摇瓶的影响。

1.2.4 发酵液处理和样品检测方法 1.2.2 中抗性菌株的摇瓶筛选培养结束后,测定发酵液 pH 和菌体含量,菌体含量采用 PMV (Packed Mass Volume) 法测定^[10]。发酵液处理方法为取 10 mL 待测发酵液,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,反复离心两次取上清,经滤膜过滤后进行 HPLC 检测。色谱条件:固定相为 C₈ 色谱柱(250.0 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为 (NH₄)₂ HPO₄ 与乙腈混合,流速 1.5 mL·min⁻¹,柱温 25℃,检测波长 214 nm 紫外光,进样量为 20 μL^[11]。

样品检测结束,根据以下公式计算摇瓶效价:摇瓶效价(mg·L⁻¹)=(样品面积×标准品浓度×样品标示含量×稀释倍数×1 000)/标准品峰面积。

1.2.5 数据分析 使用 Excel 2007 软件对数据进行计算和分析。

2 结果与分析

2.1 癸酸钠抗性菌株筛选

由表 1 可知,当癸酸钠浓度小于 0.4 g·L⁻¹ 时,菌体生长良好,随着癸酸钠浓度的增加,菌体生长情况变差,当癸酸钠浓度为 1.2 g·L⁻¹ 时,对应的抗性平板内没有菌落生长,癸酸钠的最小抑制浓度为 1.2 g·L⁻¹。同时观察到抗性平板上的菌落外观随着癸酸钠浓度的增加,由玫红色渐变为白色,生长速度随之变慢,菌落变小,菌落数随着浓度的增加变少。

选取癸酸钠浓度为 0.2 g·L⁻¹ 及以上浓度的单菌落共 568 个进行摇瓶初筛验证,结果显示有 32 个单菌落效价值普遍高于对照组,对 32 个单菌落进行复筛摇瓶验证,摇瓶效价值最高为 43.4 mg·L⁻¹,对应单菌落号为 TR21-29,作为补加正癸酸试验用菌株。

表 1 不同浓度癸酸钠对菌体生长的影响

癸酸钠浓度/(g·L ⁻¹)	菌落平均数目/个	菌落颜色和形态
0	24	玫红火山状,中间凹陷,具明显褶皱,菌落大小均一
0.2	18	玫红火山状,中间凹陷,具明显褶皱,菌落大小均一
0.4	14	中间玫红边缘多白色,具明显褶皱,个别菌落偏小
0.6	6	中间玫红边缘多白色,具明显褶皱,菌落大小不均一
0.8	2	白色,褶皱不明显,菌落小
1.0	1	白色,无褶皱,菌落小
1.2	0	-

2.2 补加正癸酸最佳方式筛选

2.2.1 正癸酸耦合剂的筛选 对比无水乙醇和油酸甲酯溶解正癸酸添加到发酵瓶中对菌体生长和产素的影响,由表 2 可知,油酸甲酯溶解正癸酸得到的发酵瓶菌体量较大,对发酵瓶内的菌体生长影响较小,油酸甲酯与正癸酸以 1:2 的比例混合补加到发酵培养基中时,摇瓶效价值达到 47.4 mg·L⁻¹。

表 2 不同耦合剂与正癸酸混合对发酵效价的影响

耦合剂	正癸酸(g):耦合剂(mL)	pH	菌体量/%	摇瓶效价/(mg·L ⁻¹)
无水乙醇	1:1	6.93	10.1	17.5
	1:2	6.43	9.7	11.3
油酸甲酯	1:1	7.38	11.1	26.9
	1:2	7.70	14.8	47.4

2.2.2 正癸酸的开始补加时间 由表 3 可知,开始补料时间对玫瑰孢链霉菌的生长和发酵效价值影响较大,过早加入抑制菌体生长并对菌体产生毒害作用,使正癸酸大量积累效价值低。太迟加入使菌体大量生长次级代谢产物合成延迟,缺少前体物正癸酸而导致达托霉素合成率低。因此,最适补加时间为发酵 24 h 左右,使菌体生长处于对数期,促进达托霉素的合成提高效价值。

表 3 正癸酸不同开始补加时间对摇瓶效价的影响

发酵时间/h	摇瓶效价/(mg·L ⁻¹)			
	1	2	3	平均值
12	61.3	67.4	69.6	66.1
18	88.3	82.7	89.9	87.0
24	85.0	96.0	100.0	93.6
32	73.2	74.7	76.5	74.8
48	15.0	12.5	17.6	15.0

2.2.3 正癸酸的补加浓度 在发酵开始 24 h 后添加不同浓度的正癸酸,由表 4 可知,低浓度的正癸酸不足以有效促进达托霉素的合成,高浓度的正癸酸对菌体毒害性大,添加终浓度为 1.5 mmol·L⁻¹ 的正癸酸时菌种合成达托霉素的效价值最佳。

表 4 正癸酸补加浓度对摇瓶效价的影响

浓度/(mmol·L ⁻¹)	摇瓶效价/(mg·L ⁻¹)			
	1	2	3	平均值
1.0	85.0	96.0	100.0	93.6
1.5	123.8	133.2	133.4	130.1
2.0	123.0	122.8	119.8	121.9
2.5	48.1	49.3	47.2	48.2
3.0	39.6	32.1	34.2	35.3

2.2.4 正癸酸的补加间隔 发酵瓶培养周期为 5 d,从发酵 24 h 开始补加终浓度为 1.5 mmol·L⁻¹ 的正癸酸时,由于补加剂量小,对补料间隔要求较高。由表 5 可知,补加间隔时间对菌体发酵能力影响较大,随着补料间隔的延长摇瓶效价值下降明显,其中每 4 h 补加一次效果最佳。

表 5 正癸酸不同补加间隔时间对摇瓶效价的影响

间隔时间/h	摇瓶效价/(mg·L ⁻¹)			
	1	2	3	平均值
2	116.7	104.7	127.8	116.4
4	141.0	140.1	133.2	138.1
6	104.3	108.8	102.7	105.3
8	96.9	92.3	98.5	95.9

3 讨论与结论

段然等^[6]在筛选癸酸钠抗性菌株的基础上,通过向发酵过程添加癸酸钠并优化其发酵培养基,将达托霉素在发酵瓶中的产量提高为 42.38 mg·L⁻¹。杨一恭等^[12]通过紫外和 DES 诱

变法处理原始菌株,并筛选链霉菌耐受菌株,得到一株高产菌,较原始菌株提高 40%。吴旻等^[13]通过在发酵过程中添加脂肪酶和癸酸乙酯,使发酵液中的达托霉素含量达 $130.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。郑卫等^[14]通过在发酵过程中流加 0.5% 的癸酸铵溶液或 10% 的癸酸钠溶液补料生产达托霉素时,发酵罐中的达托霉素效价达到 $1700 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。周兵兵等^[15]通过向发酵液中以等速的方式流加癸酸-油酸甲酯(体积比 1:1)显著提高达托霉素发酵单位,其值为 $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究选择对细胞毒性较小及溶解方式简单的癸酸钠筛选抗性菌株,保证了抗性菌株的筛选效果,选用正癸酸作为发酵补料的前体物,并优化其发酵瓶补加正癸酸方式,筛选出适合溶解正癸酸的溶剂油酸甲酯,将其与正癸酸配制成 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液补加到发酵瓶,有效提高摇瓶效价。在发酵培养 24 h 左右开始补加正癸酸,每 4 h 补加 1 次,补加浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,摇瓶单位达到 $138.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,效价较原始菌株提高 218.2%。

参考文献:

- [1] HEIDARY M, KHOSRAVI A D, KHOSHNOOD S, et al. Daptomycin[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018, 73(1): 1-11.
- [2] WESSELS P, DÖHREN H, KLEINKAUF H, et al. Biosynthesis of acylpeptidolactones of the daptomycin type: A

comparative analysis of peptide synthetases forming A21978C and A54145[J]. European Journal of Biochemistry, 1996, 242(3): 665-673.

- [3] 杨夏露. A21978C 发酵条件优化及高产菌株选育[D]. 武汉:华中科技大学, 2013.
- [4] 王玮, 穆青. 从天然产物到药物——达托霉素的发展历程[J]. 国外医药(抗生素分册), 2009, 30(2): 59-62.
- [5] 卢文玉, 闻建平, 范晶华, 等. 癸酸抗性突变株流加发酵法生产达托霉素[J]. 天津大学学报, 2006(S1): 20-24.
- [6] 段然, 叶驰名, 吴意珣, 等. 癸酸钠抗性菌株产达托霉素培养条件的响应面优化[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2013, 52(4): 531-538.
- [7] 吴远杰, 王向阳, 陈少欣. 达托霉素的菌种选育及补料发酵工艺[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(9): 864-867.
- [8] 吴旻, 王文轶, 王泽根, 等. 达托霉素发酵过程中前体癸酸的添加策略研究[J]. 药物生物技术, 2012, 19(2): 142-145.
- [9] 徐鲁, 卢雪欢, 张建斌, 等. 邻氨基苯甲酸对达托霉素发酵的影响[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(12): 1434-1438.
- [10] 周剑, 张引. 达托霉素产生菌前体物耐受选育及其流加补料发酵[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(7): 817-823.
- [11] 苏永槐. 达托霉素提纯研究[D]. 杭州:浙江大学, 2019.
- [12] 杨一恭, 孙新强, 盛保伟, 等. 达托霉素高产菌株的选育[J]. 中国化工贸易, 2020, 12(2): 236-237.
- [13] 吴旻, 王旻, 王泽根, 等. 一种达托霉素发酵过程中癸酸添加的新方法: CN102703551A[P]. 2012-10-03.
- [14] 郑卫, 程元荣, 周剑, 等. 一种流加癸酸盐发酵达托霉素的方法: CN101880703A[P]. 2012-08-08.
- [15] 周兵兵, 暨火兴, 吴超, 等. 一种提高达托霉素发酵产量的补料方法: CN111892647A[P]. 2020-11-06.

Fermentation Feed Strategy for Daptomycin Production by Sodium Caprate-resistant Strains

GU Jing, SHI Yan-peng, NIU Chun, ZHANG Ping

(Ningxiatairui Pharmaceutical Limited Company, Yinchuan 750101, China)

Abstract: In order to improve the fermentation ability of daptomycin-producing bacterium streptomyces roseolae, by screening sodium caprate resistant strains, optimizing the method of supplementing N-decanoic acid in its fermentation flask, improving the shake flask effect value of tropicollin. The original strain was selected for sodium caprate resistance, a strain TR21-29 with a blank shake flask efficacy value of $43.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was screened out. We took advantage of the strain's tolerance to caprate, verified the optimal strategy of supplementing N-decanoic acid in its fermentation flask. This study mainly investigated the coupling agent of N-decanoic acid, and feed time, feed concentration and feed interval for adding N-decanoic acid to fermentation flasks, determining the key parameters for the addition of N-decanoic acid to fermentation flasks. The results showed that the original efficacy value of the resistant strain TR21-29 was increased from $43.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to $138.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the improvement rate was 218.2%. The feeding method is to start adding N-decanoic acid solution after culturing in the fermentation flask for 24 hours. The concentration of N-decanoic acid is $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the feed final concentration is $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the feed is fed every 4 hours.

Keywords: daptomycin; streptomyces roseosporus; sodium caprate; N-decanoic acid; fermentation bottle refill