



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102242073 B

(45) 授权公告日 2013.03.20

(21) 申请号 201010168925.9

业科学》. 2008, 第 36 卷 (第 19 期), 7974-7976.

(22) 申请日 2010.05.12

审查员 耿晓芬

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3731 2010.04.14

(73) 专利权人 山东鲁北药业有限公司

地址 256800 山东省沾化县城中心路 1145 号

(72) 发明人 王克柳 王美海

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 21/04 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 01/5330 A2, 2001.07.26,

CN 1793356 A, 2006.06.28,

余继叁等. 玫瑰孢链霉菌 NRRL11379 产达托霉素前体物 A21978C 的发酵培养基优化. 《安徽农

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

一种发酵法制取达托霉素的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种达托霉素高产菌株及其用其发酵法制取达托霉素的方法,属于生物化工技术领域。本发明以玫瑰色孢链霉菌 (*Streptomyces roseosporus*) 为出发菌,通过原生质体融合和基因重组技术获得了一株高产诱变菌株 WKL-126,目前已经在微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC) 保藏,保藏号为:3731;本发明同时公开了一种采用该菌株制取达托霉素的方法,该方法与现有方法相比,发酵单位达到 2000mg/L 以上。

1. 一株玫瑰孢链霉菌 (*Streptomyces roseosporus*)WKL-126, 保藏编号为 CGMCC NO. 3731。

2. 一种发酵法制取达托霉素的方法, 其特征在于:

采用权利要求 1 所述的玫瑰孢链霉菌 WKL-126;

一级种子培养基为: 胰蛋白酶大豆肉汤 3.0%~5.0%, 糊精 2.0%~4.0%, 去离子水补足, pH 值为 6.0~8.0;

二级种子培养基为: 大豆粉 0.4%~0.6%, 酵母提取物 0.4%~0.7%, 葡萄糖酸钙 0.7%~1.3%, KCl 0.01%~0.03%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%~0.03%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0003%~0.0005%, 有机硅消泡剂 Sag 4710.02%~0.04%, 去离子水补足, pH 值为 6.0~8.0;

发酵培养基为: 葡萄糖 0.80%~0.85%, $CaCO_3$ 0.1%~0.3%, 大豆粉 1.0%~3.0%, 酵母提取物 0.05%~0.15%, $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ 0.065%~0.068%, KCl 0.015%~0.025%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.015%~0.025%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0003%~0.0005%, 有机硅消泡剂 Sag 4710.01%~0.03%, 去离子水补足, pH 值为 6.0~8.0。

3. 权利要求 2 所述发酵法制取达托霉素的方法, 其特征在于, 发酵培养条件为: 装液量为 20%~50%, 接种体积为 2%~5%, 空气通气量 1~5L/min, 前 15h 搅拌强度 220~280rpm, 然后 350~450rpm, 培养温度 25~35°C, 发酵后 10h 通过加氨水维持 pH 值 6.5 或以上, 从第 28 小时开始, 以每升培养液 0.25~0.28mL/L 的量加入 50% v/v 的无菌己酸, 直至收获。

4. 权利要求 2 所述发酵法制取达托霉素的方法, 其特征在于, 癸酸流加控制工艺为: 癸酸的添加时间和添加浓度为 10~12h、0.1~0.8mmol/L 和 35~40h、0.8~1.2mmol/L, 所述添加浓度为发酵液中测定的癸酸浓度, 采用间歇补料的方法进行发酵产物的调控。

一种发酵法制取达托霉素的方法

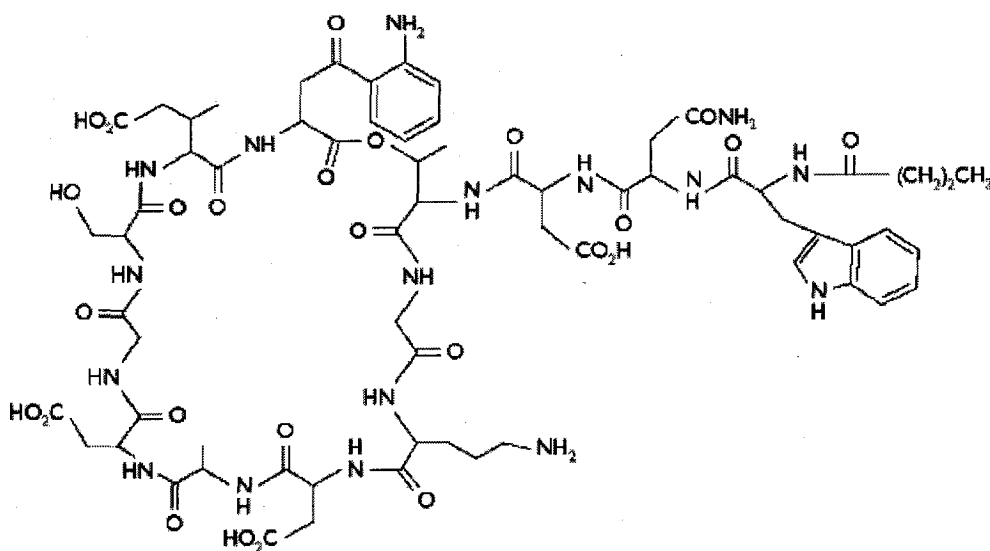
技术领域

[0001] 本发明涉及一种达托霉素人工诱变高产菌株,以及采用该菌株发酵法制取达托霉素的方法,属于生物化工技术领域。

[0002] 背景技术

[0003] 达托霉素 (Daptomycin) (商品名 cubicin) 是从玫瑰孢链霉菌 (*Streptomyces roseosporus*) 发酵液中提取得到的一个环酯肽类物质。达托霉素分子式为 $C_{72}H_{101}N_{17}O_{26}$, 分子量 1619.71, 其中 13 个氨基酸分子中的 4 位苏氨酸与 13 位犬尿酸以肽键闭合成环状, 侧链末端氨基酸色氨酸与癸酸以酰胺键相连, 构成酸性环酯肽类抗生素。其结构式如下图所示:

[0004]



[0005] 通常情况下,达托霉素为黄色或淡黄色晶体物质,能溶于水、甲醇、乙醇、丙醇、正丁醇、二甲基甲酰胺、二氯杂环乙烷、四氢呋喃和二甲基亚砷,微溶或不溶于丙酮、氯仿、乙醚、苯和乙酸乙酯。

[0006] 2003 年 9 月,由于病人对新型耐药抗生素的迫切需求,美国食品与药物管理局 (FDA) 经过快速审理程序批准注射用达托霉素 (商品名 **Cubicin®**) 用于治疗由一些革兰氏阳性敏感菌株引起的并发性皮肤及皮肤结构感染,如脓肿、手术切口感染和皮肤溃疡。据统计,此药上市后第一年即取得约 6000 万美元的收入。尽管达托霉素面临着不可避免的竞争态势,整体的市场份额也相对有限,但由于耐药性革兰氏阳性菌有日益流行的趋势,它在日后数年内仍具有深厚潜力。达托霉素虽然也像利奈唑烷和共杀菌素一样被限用作二、三线用药,但由于它对耐万古霉素和耐利奈唑烷菌株有效,所以实际上它还可以从院区感染一线疗法用药中挤占不少份额,达托霉素的这些附加用途也能提高其将来的销售额。达托霉素在 2007 年院区感染治疗药物市场上的销售额达 2 亿美元,在以后数年内还有上升的潜力。

[0007] 目前,国外生产达托霉素主要有两种工艺,一是以 A21978C 为前体物,在酸碱或脱酰基酶的作用下脱去侧链末端酰基,然后经基团保护、酰基化等多步化学反应使侧链末端重新接上癸酸酰基,从而形成达托霉素,该工艺步骤多、环境污染严重、产品收率极低(约 10%)、纯度不高;二是通过玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*)发酵直接形成达托霉素,但是由于发酵单位较低等多种因素,造成达托霉素工业化生产难度大、成本高,从而导致价格高昂且产量远远不能满足国际市场的需求,是国际市场紧缺的医药原料之一。

[0008] 由于商业利益的原因,国外的一些菌种和工艺等关键技术对外保密,很少公开报道。美国礼来公司自从上世纪 80 年代分离得到达托霉素生产菌玫瑰孢链霉菌以来,进行多年的发酵工艺条件优化和产物提取工作,但产品产量一直没有较大突破。在国内,尽管已有制取达托霉素的菌种,但是该菌株制取达托霉素的能力较弱,效能低。因此,选育出一株高产达托霉素的菌株对实现达托霉素产业化生产具有较大的社会和经济效益。

[0009] 发明内容

[0010] 本发明需要解决的技术问题是公开一种达托霉素的高产菌株,以及采用该菌株发酵法制取达托霉素的方法,以克服现有达托霉素发酵技术中发酵周期长、单位产量低、转化率不高的缺陷。

[0011] 为解决上述问题,本发明提供了一种达托霉素高产菌株 WKL-126。该菌株是以玫瑰孢链霉菌为出发菌,通过原生质体融合和基因重组技术而获得,目前已经在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)保藏,保藏号为:CGMCCNo. 3731。保藏日期从 2010 年 04 月 14 日起保存三十年。该菌株分类命名:玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*), WKL-126。

[0012] 但是,微生物发酵的生产水平不仅取决于菌种本身的性能,而且要有合适的环境条件才可使它的生产能力充分表现出来。因此须通过各种方法了解菌种对环境条件的要求,并了解菌种在合成产物过程中的代谢调控机制以及可能的代谢途径,为设计合理的工艺提供理论基础。发酵培养基可以供菌种生长、繁殖和合成产物。发酵培养基既要使种子接种后能迅速生长到一定的菌丝浓度,又要使长好的菌丝能迅速合成所需的产物,因此,发酵培养基的组成除有菌丝生长所必需的元素和化合物外,还要有产物所需的特定元素和促进剂等。由于发酵目的的不同,其培养基的组成差异也很大。发酵过程受许多因素的影响和工艺条件的制约,影响因素主要有发酵的温度、pH 值、碳源、氮源、溶解氧、无机盐等。本公司对上述影响高产菌株发酵水平的影响因素进行了充分研究,优化了高产菌株发酵法制取达托霉素的工艺条件。

[0013] 另外,在达托霉素的发酵法制取中,前体癸酸的添加浓度和添加时间是一个关键因素。过量的前体往往会对菌体产生毒性或具有反馈调节作用,前体添加不足无法保证合成大量的目的产物。达托霉素是一种典型的微生物次级代谢产物,在次级代谢中存在 2 个生理阶段,即菌体生长阶段和代谢产物合成阶段。过早加入前体不利于菌体生长并最终影响产物生成,过迟加入前体,一方面由于大量形成的母核不能被酰化会出现反馈抑制效应,不利于终产物达托霉素的生成。另一方面,过迟加入前体导致其供应不足,影响终产物的生成。在母核刚刚开始形成时加入前体最有利于终产物的形成,此时加入的癸酸能够与母核快速发生酰化反应,同时由于此时菌体处于对数生长期中后期,对具有毒性的前体癸酸有较强的耐受能力。因此本发明优化了癸酸加入时间、发酵时间等以适合规模化生产的需要。

[0014] 本发明是在上述研究基础上,提供了采用高产菌株发酵法制取达托霉素的方法,给出了优化的发酵培养碳源、氮源及其他培养基的组成,优化溶氧。该方法的技术方案如下:

[0015] 具体的发酵条件如下:

[0016] 一级种子培养基:胰蛋白酶大豆肉汤 2.0~4.0%,糊精 2.0~3.0%,去离子水补足,pH 值为 6.0~8.0。

[0017] 二级种子培养基:大豆粉 0.4~0.5%,酵母提取物 0.4~0.6%,葡萄糖酸钙 0.8~1.2%,KCl 0.01~0.03%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01~0.03%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0003~0.0005%,Sag 471(有机硅消泡剂)0.02~0.04%,去离子水补足,pH 值为 6.0~8.0。

[0018] 发酵培养基为:葡萄糖 0.80~0.85%, $CaCO_3$ 0.1~0.3%,大豆粉 1.0~3.0%,酵母提取物 0.05~0.15%, $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ 0.065~0.068%,KCl 0.015~0.025%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.015~0.025%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0003~0.0005%,Sag 471(有机硅消泡剂)0.01~0.03%,去离子水补足,pH 值为 6.0~8.0。

[0019] 种子培养条件为:菌种复苏后直接接种到装有 50mL 一级种子培养基的 250mL 三角烧瓶中,30℃摇床 250rpm 培养 48h。取 10mL 一级种子培养基,接种到有 250mL 二级种子培养基的 500mL 三角烧瓶,30℃摇床 250rpm 培养 24h。

[0020] 发酵培养条件为:装液量为 20~50%,接种体积为 2~5%,空气通气量 1~5L/min,前 15h 搅拌强度 220~280rpm,然后 350~450rpm,培养温度 25~35℃,发酵后 10h 通过加氨水维持 pH 值 6.5 或以上。从第 28 小时开始,以每升培养液每小时 0.25~0.28mL 的量加入无菌己酸(50% v/v),直至收获。

[0021] 癸酸流加控制工艺为:癸酸的添加时间和添加浓度(发酵液中测定的癸酸浓度)为 10~12h、0.1~0.8mmol/L 和 35~40h、0.8~1.2mmol/L 左右,采用间歇补料的方法进行发酵产物的调控,菌体浓度达到 2000mg/L 左右停止发酵。

[0022] 发酵液中达托霉素的浓度采用高效液相色谱(HPLC)法确定:

[0023] (1) 色谱条件的选择

[0024] 根据达托霉素的性质及色谱要求,确定高效液相色谱的操作条件:

[0025] 固定相:Kromasil C18 色谱柱(4.6mm×250mm);流动相:45:54(体积比)的含有 0.1%三氟乙酸的乙腈:含有 0.1%三氟乙酸的水,流速 1.0mL/min;柱温 30℃,UV 器检测波长 220nm。

[0026] (2) 标准曲线的建立

[0027] 将达托霉素的标准品用去离子水配制成不同已知浓度的标准溶液。在(1)所述的色谱条件下进样 10 μ L,用 HPLC 测定,进行色谱分析。对分析结果的峰面积利用色谱工作站进行积分,并以积分结果为纵轴,以样品的浓度为横轴,绘制达托霉素的标准曲线。线性回归过程由色谱工作站自动完成并将结果储存在分析方法中。

[0028] (3) 标准曲线的建立

[0029] 取 10ml 发酵液样品,8000rpm 下离心 10min,取上清液,再于 8000rpm 下离心 5min,取上清液,0.2 μ m 微孔膜过滤。分别取滤液 10 μ L,用 HPLC 测定。

具体实施方式

[0030] 本发明中所选用菌种为人工诱变高产菌株,目前已经在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC) 保藏,保藏号为:3731。项目所用的蛋白胨、酵母粉为 OXOID 公司产品,其他为国产分析试剂。为了更好的帮助理解本发明的内容,特列举以下实例,但不限于本发明。

[0031] 实施例 1

[0032] (1) 种子培养

[0033] 一级种子培养基:胰蛋白酶大豆肉汤 2.0%,糊精 2.0%,去离子水补足,pH 值为 6.0。

[0034] 二级种子培养基:大豆粉 0.4%,酵母提取物 0.4%,葡萄糖酸钙 0.8%,KCl 0.01%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0003%,Sag 471(有机硅消泡剂)0.02%,去离子水补足,pH 值为 6.0。

[0035] 培养条件:菌种复苏后直接接种到装有 50mL 一级种子培养基的 250mL 三角烧瓶中,30℃摇床 250rpm 培养 48h。取 10mL 一级种子培养基,接种到有 250mL 二级种子培养基的 500mL 三角烧瓶,30℃摇床 250rpm 培养 24h。

[0036] (2) 发酵培养

[0037] 发酵培养基:葡萄糖 0.85%, $CaCO_3$ 0.3%,大豆粉 3.0%,酵母提取物 0.15%, $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ 0.068%,KCl 0.025%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0005%,Sag 471(有机硅消泡剂)0.03%,去离子水补足,pH 值为 6.0。

[0038] 发酵培养条件:装液量为 20%,接种体积为 2%,空气通气量 1L/min,前 15h 搅拌强度 220rpm,然后 350rpm,培养温度 25℃,发酵后 10h 通过加氨水维持 pH 值 6.5。从第 28 小时开始,以每升培养液每小时 0.25mL 的量加入无菌己酸(50% v/v),直至收获。

[0039] (3) 癸酸流加

[0040] 菌体生长初期对外界药物刺激比较敏感,此时添加癸酸不利于菌体生长和达托霉素合成,通过高效液相色谱监控,在达托霉素母核刚刚产生的对数生长前期(10h)加入癸酸,癸酸终浓度为 0.2mmol/L,让菌体适应生长环境,比较有利于后期达托霉素的合成。然而,一次补加前体易引起前体不足,不能继续大量的合成达托霉素,因此在菌体进入对数生长期时(35h)加入癸酸,癸酸终浓度为 0.8mmol,保证大量生产达托霉素的前体用量。

[0041] 发酵反应结束后测得发酵液中达托霉素的发酵单位为 2001mg/L。

[0042] 实施例 2

[0043] (1) 种子培养

[0044] 一级种子培养基:胰蛋白酶大豆肉汤 3.0%,糊精 2.5%,去离子水补足,pH 值为 7.0。

[0045] 二级种子培养基:大豆粉 0.45%,酵母提取物 0.5%,葡萄糖酸钙 0.9%,KCl 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0004%,Sag 471(有机硅消泡剂)0.03%,去离子水补足,pH 值为 7.0。

[0046] 培养条件:菌种复苏后直接接种到装有 50mL 一级种子培养基的 250mL 三角烧瓶中,30℃摇床 250rpm 培养 48h。取 10mL 一级种子培养基,接种到有 250mL 二级种子培养基的 500mL 三角烧瓶,30℃摇床 250rpm 培养 24h。

[0047] (2) 发酵培养

[0048] 发酵培养基:葡萄糖 0.83%, CaCO_3 0.2%, 大豆粉 2.0%, 酵母提取物 0.1%, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.066%, KCl 0.02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0004%, Sag 471(有机硅消泡剂)0.02%, 去离子水补足, pH 值为 7.0。

[0049] 发酵培养条件:装液量为 30%, 接种体积为 3%, 空气通气量 2L/min, 前 15h 搅拌强度 240rpm, 然后 370rpm, 培养温度 28°C, 发酵后 10h 通过加氨水维持 pH 值 6.8。从第 28 小时开始, 以每升培养液每小时 0.26mL 的量加入无菌己酸 (50% v/v), 直至收获。

[0050] (3) 癸酸流加

[0051] 菌体生长初期对外界药物刺激比较敏感, 此时添加癸酸不利于菌体生长和达托霉素合成, 通过高效液相色谱监控, 在达托霉素母核刚刚产生的对数生长前期 (10.5h 左右) 加入癸酸, 癸酸终浓度为 0.4mmol/L, 让菌体适应生长环境, 比较有利于后期达托霉素的合成。然而, 一次补加前体易引起前体不足, 不能继续大量的合成达托霉素, 因此在菌体进入对数生长期时 (36h) 加入癸酸, 癸酸终浓度为 0.9mmol, 保证大量生产达托霉素的前体用量。

[0052] 发酵反应结束后测得发酵液中达托霉素的发酵单位为 2013mg/L。

[0053] 实施例 3

[0054] (1) 种子培养

[0055] 一级种子培养基:胰蛋白酶大豆肉汤 4.0%, 糊精 3.0%, 去离子水补足, pH 值为 8.0。

[0056] 二级种子培养基:大豆粉 0.5%, 酵母提取物 0.6%, 葡萄糖酸钙 1.0%, KCl 0.03%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%, Sag 471(有机硅消泡剂)0.04%, 去离子水补足, pH 值为 8.0。

[0057] 培养条件:菌种复苏后直接接种到装有 50mL 一级种子培养基的 250mL 三角烧瓶中, 30°C 摇床 250rpm 培养 48h。取 10mL 一级种子培养基, 接种到有 250mL 二级种子培养基的 500mL 三角烧瓶, 30°C 摇床 250rpm 培养 24h。

[0058] (2) 发酵培养

[0059] 发酵培养基:葡萄糖 0.80%, CaCO_3 0.1%, 大豆粉 1.0%, 酵母提取物 0.05%, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.065%, KCl 0.015%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0003%, Sag 471(有机硅消泡剂)0.01%, 去离子水补足, pH 值为 8.0。

[0060] 发酵培养条件:装液量为 40%, 接种体积为 4%, 空气通气量 3L/min, 前 15h 搅拌强度 250rpm, 然后 380rpm, 培养温度 30°C, 发酵后 10h 通过加氨水维持 pH 值 7.0。从第 28 小时开始, 以每升培养液每小时 0.27mL 的量加入无菌己酸 (50% v/v), 直至收获。

[0061] (3) 癸酸流加

[0062] 菌体生长初期对外界药物刺激比较敏感, 此时添加癸酸不利于菌体生长和达托霉素合成, 通过高效液相色谱监控, 在达托霉素母核刚刚产生的对数生长前期 (11h 左右) 加入癸酸, 癸酸终浓度为 0.5mmol/L, 让菌体适应生长环境, 比较有利于后期达托霉素的合成。然而, 一次补加前体易引起前体不足, 不能继续大量的合成达托霉素, 因此在菌体进入对数生长期时 (37h) 加入癸酸, 癸酸终浓度为 1.0mmol, 保证大量生产达托霉素的前体用量。

[0063] 发酵反应结束后测得发酵液中达托霉素的发酵单位为 2041mg/L。

[0064] 实施例 4

[0065] (1) 种子培养

[0066] 一级种子培养基:胰蛋白酶大豆肉汤 3.5%,糊精 3.0%,去离子水补足,pH 值为 7.5。

[0067] 二级种子培养基:大豆粉 0.5%,酵母提取物 0.6%,葡萄糖酸钙 1.2%,KCl 0.03%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0005%,Sag 471(有机硅消泡剂)0.04%,去离子水补足,pH 值为 7.5。

[0068] 培养条件:菌种复苏后直接接种到装有 50mL 一级种子培养基的 250mL 三角烧瓶中,30℃摇床 250rpm 培养 48h。取 10mL 一级种子培养基,接种到有 250mL 二级种子培养基的 500mL 三角烧瓶,30℃摇床 250rpm 培养 24h。

[0069] (2) 发酵培养

[0070] 发酵培养基:葡萄糖 0.85%, $CaCO_3$ 0.3%,大豆粉 3.0%,酵母提取物 0.15%, $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ 0.068%,KCl 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0005%,Sag 471(有机硅消泡剂)0.03%,去离子水补足,pH 值为 7.5。

[0071] 发酵培养条件:装液量为 30%,接种体积为 3%,空气通气量 5L/min,前 15h 搅拌强度 260rpm,然后 400rpm,培养温度 32℃,发酵后 10h 通过加氨水维持 pH 值 7.5。从第 28 小时开始,以每升培养液每小时 0.28mL 的量加入无菌己酸(50% v/v),直至收获。

[0072] (3) 癸酸流加

[0073] 菌体生长初期对外界药物刺激比较敏感,此时添加癸酸不利于菌体生长和达托霉素合成,通过高效液相色谱监控,在达托霉素母核刚刚产生的对数生长前期(10.5h 左右)加入癸酸,癸酸终浓度为 0.6mmol/L,让菌体适应生长环境,比较有利于后期达托霉素的合成。然而,一次补加前体易引起前体不足,不能继续大量的合成达托霉素,因此在菌体进入对数生长期时(38h)加入癸酸,癸酸终浓度为 1.1mmol,保证大量生产达托霉素的前体用量。

[0074] 发酵反应结束后测得发酵液中达托霉素的发酵单位为 2113mg/L。

[0075] 实施例 5

[0076] (1) 种子培养

[0077] 一级种子培养基:胰蛋白酶大豆肉汤 3.8%,糊精 2.8%,去离子水补足,pH 值为 6.8。

[0078] 二级种子培养基:大豆粉 0.48%,酵母提取物 0.58%,葡萄糖酸钙 1.1%,KCl 0.03%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0004%,Sag 471(有机硅消泡剂)0.03%,去离子水补足,pH 值为 6.8。

[0079] 培养条件:菌种复苏后直接接种到装有 50mL 一级种子培养基的 250mL 三角烧瓶中,30℃摇床 250rpm 培养 48h。取 10mL 一级种子培养基,接种到有 250mL 二级种子培养基的 500mL 三角烧瓶,30℃摇床 250rpm 培养 24h。

[0080] (2) 发酵培养

[0081] 发酵培养基:葡萄糖 0.83%, $CaCO_3$ 0.2%,大豆粉 2.0%,酵母提取物 0.12%, $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ 0.066%,KCl 0.025%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0004%,Sag 471(有机硅消泡剂)0.03%,去离子水补足,pH 值为 6.8。

[0082] 发酵培养条件:装液量为 50%,接种体积为 5%,空气通气量 5L/min,前 15h 搅拌

强度 280rpm, 然后 430rpm, 培养温度 35°C, 发酵后 10h 通过加氨水维持 pH 值 6.8。从第 28 小时开始, 以每升培养液每小时 0.28mL 的量加入无菌己酸 (50% v/v), 直至收获。

[0083] (3) 癸酸流加

[0084] 菌体生长初期对外界药物刺激比较敏感, 此时添加癸酸不利于菌体生长和达托霉素合成, 通过高效液相色谱监控, 在达托霉素母核刚刚产生的对数生长前期 (11.5h 左右) 加入癸酸, 癸酸终浓度为 0.7mmol/L, 让菌体适应生长环境, 比较有利于后期达托霉素的合成。然而, 一次补加前体易引起前体不足, 不能继续大量的合成达托霉素, 因此在菌体进入对数生长期时 (40h) 加入癸酸, 癸酸终浓度为 1.2mmol, 保证大量生产达托霉素的前体用量。

[0085] 发酵反应结束后测得发酵液中达托霉素的发酵单位为 2082mg/L。