

吸水链霉菌 RP-2001 发酵产雷帕霉素摇瓶工艺优化

盛保伟 孙新强 (浙江昌海制药有限公司, 浙江 绍兴 312366)

杨一恭 董 冰 (浙江医药股份有限公司新昌制药厂, 浙江 绍兴 312500)

摘 要: 为了探索吸水链霉菌 RP-2001 发酵产雷帕霉素的最佳发酵瓶培养工艺, 在单因素试验的基础上, 利用正交试验设计对吸水链霉菌 RP-2001 的发酵条件如培养温度、接种量、摇床转速、装液量等进行了优化。结果表明吸水链霉菌 RP-2001 发酵产雷帕霉素的最佳发酵瓶培养工艺为: 培养温度 30 度, 接种量 10%, 摇床转速 220rpm, 500mL 三角烧瓶装液量 120mL。在此条件下雷帕霉素的效价为 1400ug/mL。

关键词: 吸水链霉菌 RP-2001; 雷帕霉素; 正交试验

0 引言

雷帕霉素(Rapamycin), 商品名西罗莫司(Sirolimus), 由 *S.hygroscopicus* 生产的、一种三十一元环组成的含氮三烯大环内酯类抗生素。具有免疫抑制、抗肿瘤等多种生物活性, 是一种新型强效免疫抑制剂, 是肾毒性最低的免疫抑制剂, 具有广阔的应用前景。国内外文献报道通过菌种诱变和工艺优化来提高雷帕霉素的发酵水平, 50L 发酵罐中产量最高为 920ug/mL, 本研究通过单因素试验和正交试验对吸水链霉菌 RP-2001 的摇瓶发酵条件进行优化研究, 提高了雷帕霉素的发酵效价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) RP-2001, 保藏于浙江昌海制药有限公司技术中心微生物研究室。

1.1.2 培养基

固体培养基(质量浓度): 酵母膏 4.0g/L, 葡萄糖 4.0g/L, 麦片 20g/L, 琼脂 20g/L。

种子培养基(质量浓度): 葡萄糖 15g/L, 玉米蛋白粉 10g/L, 玉米粉 15g/L, KH_2PO_4 0.5g/L, CaCO_3 2.0g/L, GPE 消泡剂 1.0g/L。

发酵培养基(质量浓度): 葡萄糖 70g/L, 玉米蛋白粉 20g/L, 蛋白胨 10g/L, 玉米粉 15g/L, KH_2PO_4 0.5g/L, CaCO_3 3.0g/L, GPE 消泡剂 4.0g/L。

种子和发酵培养基消前 pH 值自然; 所有培养基碳源、氮源分消, 灭菌条件为 121℃, 30min。

1.1.3 仪器与设备

HCB-1300V 型超净工作台, 青岛海尔生物医疗; MQD-B3RS 型震荡培养箱, 上海旻泉仪器; INNOVA 5000 型摇床, New Brunswick; DL-86L338 型超低温保存箱, 青岛海尔生物医疗; SPX-150B-Z 型生物培养箱, 上海博讯实业; ML802T/02 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器; Agilent 1260 II 型高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验

取 -80℃ 冰箱保藏的冷冻甘油保藏液, 融化后用接种环蘸取解冻液, 进行平板划线, 于温度 ($30 \pm 0.5^\circ\text{C}$)、湿度 30%~60% 条件下培养 10~13d。在成熟斜面上挖取 5mm × 20mm 孢子接种种子培养基 (40mL/250mL 三角瓶), 在转速 220rpm、温度 ($30 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 条件下振荡培养 48h, 然后将成熟种子液接入发酵培养基 (500mL 三角瓶), 进行培养。分别考察温度 (28℃、29℃、30℃、31℃、32℃)、接种量 (2%、4%、6%、8%、10%)、摇床转速 (160rpm、180rpm、200rpm、220rpm、240rpm)、装液量 (80mL、100mL、120mL、140mL、150mL) 对雷帕霉素发酵的影响。

1.2.2 正交试验

根据单因素试验的结果, 以雷帕霉素发酵瓶效价 (Y) 为评价指标, 选择培养温度 (A)、接种量 (B)、摇床转速 (C)、装液量 (D) 为因素, 进行 4 因素 3 水平的正交试验对雷帕霉素发酵条件进行优化, 正交试验优化因素与水平见表 1。

表 1 正交试验设计表

Table1 Orthogonal test design table

水平	试验因素			
	(A) 培养温度 / (°C)	(B) 接种量 / (%)	(C) 摇床转速 / (rpm)	(D) 装液量 / (mL)
1	29	6	180	80
2	30	8	200	100
3	31	10	220	120

1.2.3 雷帕霉素效价测定

取发酵液适量, 加入等体积甲醇, 涡旋震荡充分裂解细胞, 室温静置 1h。HPLC 检测雷帕霉素的效价。色谱条件: 色谱柱 C_{18} 柱 (150mm × 4.6mm; 5μm); 流动相为超纯水: 甲醇 = 15%:85%, 流速为 1mL/min, 柱温

30℃，检测波长为 277nm。进样量 5ul。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 培养温度对雷帕霉素效价的影响

由表 2 可知，当培养温度从 28 升高到 31℃时效价逐渐增加，当培养温度 30℃时，效价最高为 1000ug/mL。培养温度 29-31℃范围内时，效价较高，因此选择 29℃、30℃、31℃作为正交试验温度的三个不同水平。

2.1.2 接种量对雷帕霉素效价的影响

由表 2 可知，接种量从 2% 增加到 8% 时效价逐渐增加，当接种量 8% 时，效价最高为 990ug/mL。接种量 6%-10% 时，效价较高，因此接种量选择 6%、8%、10% 作为正交试验接种量的三个不同水平。

2.1.3 摇床转速对雷帕霉素效价的影响

由表 2 可知，摇床转速从 160rpm 增加到 200rpm 时效价逐渐增加，当摇床转速 200rpm 时，效价最高为 1108ug/mL，摇床转速 240rpm 时，发酵液会溅到瓶塞上，影响通气效果。由于摇床转速 180rpm-220rpm 时，效价较高，因此接种量选择 180rpm、200rpm、220rpm 作为正交试验摇床转速的三个不同水平。

2.1.4 装液量对雷帕霉素效价的影响

由表 2 可知，当装液量 120mL 时，效价最高为 1100ug/mL，当继续增加装液量时效价下降。由于接种量 80mL-120mL 时，效价较高，因此接种量选择 80mL、100mL、120mL 作为正交试验装液量的三个不同水平。

表 2 温度、接种量、转速、
装液量对雷帕霉素效价的影响

Table2 Effect of culture

temperature,inoculation amount,shaker speed,culture
volume on potency of potency of rapamycin

温度	效价	接种量	效价	转速	效价	装液量	效价
℃	ug/mL	%	ug/mL	rpm	ug/mL	mL	ug/mL
28	500	2	400	160	600	80	1000
29	901	4	700	180	970	100	1030
30	1000	6	870	200	1108	120	1100
31	880	8	990	220	1050	140	800
32	609	10	960	240	900	160	690

2.2 培养条件的正交试验

在单因素试验的基础上，以雷帕霉素发酵瓶效价（Y）为评价指标，选择培养温度（A）、接种量（B）、摇床转速（C）、装液量（D）4 个因素，采用正交试验

L9（3⁴）对培养条件进行优化，正交试验优化因素和水平见表 2。

表 3 L₉（3⁴）直观分析表

Table3 L₉（3⁴）visual analysis test

因素	A	B	C	D	效价 (ug/mL)
1	1	1	1	1	1000
2	1	2	2	2	803
3	1	3	3	3	1352
4	2	1	2	3	1200
5	2	2	3	1	1047
6	2	3	1	2	1035
7	3	1	3	2	899
8	3	2	1	3	958
9	3	3	2	1	1242
均值 1	1051.67	1033	997.67	1096.33	
均值 2	1094	936	1081.67	912.33	
均值 3	1033	1209.67	1099.3	1170	
极差 R	61	273.67	101.66	257.67	

从表 3 极差 R 值可以得出，影响链霉素西罗莫司产量的 4 个因素的主次顺序为 B > D > C > A，即接种量 > 装液量 > 摇床转速 > 温度，接种量对雷帕霉素效价影响最为显著，为最关键因素，其次是装液量。从上述实验结果，得出雷帕霉素的佳发酵瓶培养条件为 A₂B₃C₃D₃，即培养温度 30℃，接种量 10%，摇床转速 220rpm，装液量 120mL。在此条件下，进行 3 次试验进行验证，雷帕霉素发酵瓶效价为 1400ug/mL。

3 结论

在单因素试验的基础上，利用正交试验设计对吸水链霉菌 RP-2001 的发酵条件如培养温度、接种量、摇床转速、装液量等进行了优化。结果表明吸水链霉菌 RP-2001 发酵产雷帕霉素的佳发酵瓶培养工艺为：培养温度 30℃，接种量 10%，摇床转速 220rpm，500mL 三角烧瓶装液量 120mL。在此条件下雷帕霉素的效价为 1400ug/mL。

作者简介：

盛保伟（1980-），男，工程师，研究方向：微生物药物的研究与开发。