(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103898004 A
(43)申请公布日 2014.07.02

(21)申请号 201310586259.4
(22)申请日 2013.11.21
(83)生物保藏信息
CGMCC NO.7935 2013.07.17
(71)申请人 中国医药集团总公司四川抗菌素工业研究所
地址 610052 四川省成都市成华区龙潭工业园华冠路168号
申请人 太原市威尔潞威动物保健品有限公司
(72)发明人 曾志刚 梁彦明 翟龙飞 徐欣 许之晖
(74)专利代理机构 成都立信专利事务所有限公司 51100
代理人 冯忠亮
(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
C12P 7/02(2006.01)
C12R 1/01(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

假诺卡氏菌及其发酵生产骨化二醇的方法

(57)摘要

本发明为假诺卡氏菌及其发酵生产骨化二醇的方法，解决已有菌株发酵获得骨化二醇过程中底物投料量低，不适于工业化生产的问题。本发明的假诺卡氏菌，自编号为SIIA2243，其拉丁文名 *Pseudonocardia autotrophica*，保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏日期：2013年07月17日，保藏编号CGMCC No.7935。

CN 103898004 A

1. 假诺卡氏菌，其特征在于其自编号为 SIIA2243，其拉丁文名 *Pseudonocardia autotrophica*，保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏日期：2013 年 07 月 17 日，保藏编号 CGMCCNo.7935。

2. 根据权利要求 1 所述的假诺卡氏菌发酵生产骨化二醇的方法，其特征在于生产过程包括：

（1）菌株 SIIA2243 依次经过三角烧瓶，种子罐，发酵罐进行深层培养发酵，

（2）向菌株 SIIA2243 的发酵液中补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素 D_3，继续发酵得发酵液，

（3）将步骤 (2) 的发酵液，用有机溶剂进行萃取，浓缩，柱层析及结晶后得到骨化二醇成品。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于步骤 (1) 中菌株 SIIA2243 的种子罐及发酵罐培养基含有蛋白胨、玉米浆、葡萄糖、黄豆粉、氯化钠、磷酸二氢钾。

4. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于步骤 (2) 中菌株 SIIA2243 的发酵液在补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素 D_3 后，继续发酵的时间为 1 ～ 10 天。

5. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于步骤 (2) 中菌株 SIIA2243 的发酵液在补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素 D_3 后的 24hr 内，通过增加搅拌轴转速，或者增加空气流量来提高发酵液的溶氧水平，搅拌轴转速 200 ～ 500r/min，空气流量 1 ： 0.8 ～ 1 ： 2.5 v/v/m。

6. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于步骤 (3) 中的柱层析是指分离柱直径为 5cm ～ 100cm 制备型高效液相层析系统。

7. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于步骤如下：

（1）菌株 SIIA2243 依次经过三角烧瓶，种子罐，发酵罐进行深层培养发酵，以下各组分的含量均为重量体积百分比，即 g/100ml，

斜面培养：三角烧瓶内配制含葡萄糖 1 ～ 10%，蛋白胨 1 ～ 10%，玉米浆 0.1 ～ 2%，氯化钠 0.1 ～ 1%，琼脂 1 ～ 2.5%，其余为水，pH6.5 ～ 7.5 的培养基，121℃，30 分钟灭菌，灭菌后冷却、制成斜面、接种，20 ～ 35℃培养 5 ～ 10 天，

种子培养及发酵：种子罐，发酵罐内配制含蛋白胨 0.2 ～ 2%，玉米浆 0.2 ～ 2%，葡萄糖 0.5 ～ 5%，黄豆粉 0.1 ～ 1.5%，氯化钠 0.1 ～ 1.5%，磷酸二氢钾 0.1 ～ 1.5%，其余为水，pH7.0 ～ 8.0 的种子培养基装入 500ml 摇瓶中，冷却后将培养好的斜面菌株挖块接入到装有种子培养基的摇瓶中，摇瓶转速 100 ～ 300r/min，温度 20 ～ 35℃，培养 2 ～ 5 天，得摇瓶种子液，

按照摇瓶种子培养基的配比配置种子培养基 30 升，移入到 50 升一级种子罐内，121℃，30 分钟灭菌，冷却后，将培养好的摇瓶种子液按照重量体积百分比 5 ～ 10% 接种量在无菌条件下移入一级种子罐内，20 ～ 35℃搅拌轴转速 100 ～ 400r/min，空气流量 1 ： 0.5 ～ 1 ： 2 v/v/m，罐压 0.02 ～ 0.1MPa 培养 1 ～ 4 天，按照摇瓶种子培养基的配比配置种子培养基 300 升，移入到 500 升二级种子罐内，121℃，30 分钟灭菌，冷却后，将培养好的一级种子罐内的种子液按照重量体积百分比 5 ～ 10% 接种量在无菌条件下移入二级种子罐内，20 ～ 35℃，搅拌轴转速 100 ～ 400r/min，空气流量 1 ： 0.5 ～ 1 ： 2v/v/m，罐压 0.02 ～ 0.1MPa 培养 1 ～ 4 天，

配制含蛋白胨 0.2 ～ 2%，玉米浆 0.2 ～ 2%，葡萄糖 0.5 ～ 5%，黄豆粉 0.1 ～ 1.5%，氯化钠 0.1 ～ 1.5%，磷酸二氢钾 0.1 ～ 1.5%，其余为水，pH7.0 ～ 8.0 的发酵培养基 3000 升，移入到 5000 升发酵罐内，121℃，30 分钟灭菌，冷却后，将培养好的二级种子罐内的种子液按照重量体积百分比 5 ～ 10% 接种量在无菌条件下移入发酵罐内，20 ～ 35℃，搅拌轴转速 100 ～ 400r/min，空气流量 1 ： 0.5 ～ 1 ： 2 v/v/m，罐压 0.02 ～ 0.1MPa 培养 1 ～ 4 天，

（2）向 SIIA2243 的发酵液中补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素 D_3，继续发酵得发酵液，

继续发酵，向 5000 升发酵罐中已经培养了 1 ～ 4 天的发酵液中补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素 D_3，环糊精化合物是指甲基环糊精、乙基环糊精、苄基环糊精，羟丙基环糊精、羟乙基环糊精、羟丁基环糊精，环糊精化合物在发酵液中的终重量百分浓度达到 0.1 ～ 5%，维生素 D_3 在发酵液中的终浓度达到 500ug/ml ～ 5000ug/ml，补料后 24hr 内提高搅拌轴转速为 200 ～ 500r/min，或者增加空气流量到 1 ： 0.8 ～ 1 ： 2.5 v/v/m，继续发酵 1 ～ 10 天，

（3）将步骤 (2) 的发酵液，用有机溶剂进行萃取，浓缩，柱层析及结晶后得到骨化二醇成品，

骨化二醇的提取 ：

终止发酵后，将发酵液通过压差法移入到 10000 升的储罐中，往储罐中加入与发酵液等体积的乙酸乙酯，充分搅拌后，加入破乳剂，静置分层后移去下层的发酵液，得乙酸乙酯萃取液 ；将乙酸乙酯萃取液移入浓缩装置中进行减压浓缩，所回收的有机溶剂乙酸乙酯又进行二次萃取，而减压浓缩后获得的浓缩液利用分离柱直径为 5cm ～ 100cm 高压制备液相层析系统进行分离，获得骨化二醇组分，结晶后即得骨化二醇成品，

骨化二醇的 HPLC 测定 ：色谱柱为 Kromasil 正相硅胶柱 (250×4.6mm i.d,5um)，流动相为异丙醇 - 正己烷 (1 ： 9)，流速 1.5ml/min，柱温为 40℃，检测波长 265nm。

假诺卡氏菌及其发酵生产骨化二醇的方法

[0001] 技术领域：

本发明涉及一种用于发酵生产骨化二醇的假诺卡氏菌，以及利用该假诺卡氏菌发酵生产骨化二醇的方法。

[0002] 背景技术：

骨质疏松症(Osteoporosis，OP)日益成为严重威胁老年人的健康的一种慢性疾病；维生素D类药物中的骨化二醇(25—羟基维生素D_3)是自然存在人体内的维生素D_3的活性代谢产物；多年来，骨化二醇主要用于治疗老年人骨质疏松症等各种慢性骨紊乱，以及与慢性肾衰竭有关的代谢性骨疾病，低钙血病。另外，骨化二醇近年也作为饲料添加剂用于饲料行业。

[0003] 骨化二醇的制备有化学合成和生物发酵两种方法；化学合成反应步骤繁多、需要昂贵试剂、反应过程中会产生外消旋体，需要进行复杂的拆分过程，不仅大大影响收率，而且难以拆分完全，而且化学合成生产骨化二醇会对环境产生较大的污染。而微生物发酵的方式能够利用微生物细胞内的酶特异性的解决骨化二醇的手性结构问题，其生产条件温和，收率高，成本低廉，环境友好，成为一种有效替代化学合成的方法。但是现有方法中添加的维生素D_3的浓度低，专利USP5474923添加维生素D_3的最大浓度仅为1000ug/ml，这不利于通过增加维生素D_3的投料量来提高骨化二醇的产量；而且目前用微生物发酵方式制备骨化二醇的相关研究仅限于实验室水平，没有工业规模深层发酵生产骨化二醇的技术方案。

[0004] 发明内容：

本发明的目的是提供一种维生素D_3的投料量高，产品收率高，质量好，可工业规模发酵生产骨化二醇的假诺卡氏菌株及其发酵生产骨化二醇的方法。

[0005] 本发明是这样实现的：

假诺卡氏菌，其特征在于其自编号为SIIA2243，其拉丁文名*Pseudonocardia autotrophica*，保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏日期：2013年07月17日，保藏编号CGMCCNo.7935。

[0006] 假诺卡氏菌发酵生产骨化二醇的方法，生产过程包括：

(1)菌株SIIA2243依次经过三角烧瓶，种子罐，发酵罐进行深层培养发酵，

(2)向菌株SIIA2243的发酵液中补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素D3，继续发酵得发酵液，

(3)将步骤(2)的发酵液，用有机溶剂进行萃取，浓缩，柱层析及结晶后得到骨化二醇成品。

[0007] 步骤(1)中菌株SIIA2243的种子及发酵罐培养基含有蛋白胨、玉米浆、葡萄糖、黄豆粉、氯化钠、磷酸二氢钾。

[0008] 步骤(2)中菌株SIIA2243的发酵液在补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素D_3后，继续发酵的时间为1～4天。

[0009] 步骤(2)中菌株SIIA2243的发酵液在补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素D_3后的24hr内，通过增加搅拌轴转速或者增加空气流量来提高发酵液的溶氧水平。

[0010] 步骤 (3) 中的柱层析是指制备型高效液相层析系统。

[0011] 假诺卡氏菌发酵生产骨化二醇的方法，步骤如下：

(1) 菌株 SIIA2243 依次经过三角烧瓶，种子罐，发酵罐进行深层培养发酵，以下各组分的含量均为重量体积百分比，即 g/100ml。

[0012] 斜面培养：

配制含葡萄糖 1 ～ 10%，蛋白胨 1 ～ 10%，玉米浆 0.1 ～ 2%，氯化钠 0.1 ～ 1%，琼脂 1 ～ 2.5%，其余为水，pH6.5 ～ 7.5 的培养基，121℃，30 分钟灭菌，灭菌后冷却、制成斜面、接种，20 ～ 35℃培养 5 ～ 10 天。

[0013] 种子培养及发酵：

配制含蛋白胨 0.2 ～ 2%，玉米浆 0.2 ～ 2%，葡萄糖 0.5 ～ 5%，黄豆粉 0.1 ～ 1.5%，氯化钠 0.1 ～ 1.5%，磷酸二氢钾 0.1 ～ 1.5%，其余为水，pH7.0 ～ 8.0 的种子培养基装入 500ml 摇瓶中，冷却后将培养好的斜面菌株挖块接入到装有种子培养基的摇瓶中，摇瓶转速 100 ～ 300r/min，温度 20 ～ 35℃，培养 2 ～ 5 天，得摇瓶种子液。

[0014] 按照摇瓶种子培养基的配比配置种子培养基 30 升，移入到 50 升一级种子罐内，121℃，30 分钟灭菌，冷却后，将培养好的摇瓶种子液按照重量体积百分比 5 ～ 10% 接种量在无菌条件下移入一级种子罐内，20 ～ 35℃搅拌轴转速 100 ～ 400r/min，空气流量 1 ： 0.5 ～ 1 ： 2 v/v/m，罐压 0.02 ～ 0.1MPa 培养 1 ～ 4 天，按照摇瓶种子培养基的配比配置种子培养基 300 升，移入到 500 升二级种子罐内，121℃，30 分钟灭菌，冷却后，将培养好的一级种子罐内的种子液按照重量体积百分比 5 ～ 10% 接种量在无菌条件下移入二级种子罐内，20 ～ 35℃，搅拌轴转速 100 ～ 400r/min，空气流量 1:0.5 ～ 1:2v/v/m，罐压 0.02 ～ 0.1MPa 培养 1 ～ 4 天。

[0015] 配制含蛋白胨 0.2 ～ 2%，玉米浆 0.2 ～ 2%，葡萄糖 0.5 ～ 5%，黄豆粉 0.1 ～ 1.5%，氯化钠 0.1 ～ 1.5%，磷酸二氢钾 0.1 ～ 1.5%，其余为水，pH7.0 ～ 8.0 的发酵培养基 3000 升，移入到 5000 升发酵罐内，121℃，30 分钟灭菌，冷却后，将培养好的二级种子罐内的种子液按照重量体积百分比 5 ～ 10% 接种量在无菌条件下移入发酵罐内，20 ～ 35℃，搅拌轴转速 100 ～ 400r/min，空气流量 1 ： 0.5 ～ 1 ： 2 v/v/m，罐压 0.02 ～ 0.1MPa 培养 1 ～ 4 天。

[0016] (2) 向 SIIA2243 的发酵液中补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素 D_3，继续发酵，向 5000 升发酵罐中已经培养了 1 ～ 4 天的发酵液中补入一种或者多种环糊精化合物的溶液和维生素 D_3，环糊精化合物在发酵液中的终重量百分浓度达到 0.1 ～ 5%，维生素 D_3 在发酵液中的终浓度达到 500ug/ml ～ 5000ug/ml，补料后 24hr 内提高搅拌轴转速为 200 ～ 500r/min，或者增加空气流量到 1 ： 0.8 ～ 1 ： 2.5 v/v/m，继续发酵 1 ～ 10 天。

[0017] (3) 将步骤 (2) 的发酵液，用有机溶剂进行萃取，浓缩，柱层析及结晶后得到骨化二醇成品。

[0018] 骨化二醇的提取：

终止发酵后，将发酵液通过压差法移入到 10000 升的储罐中，往储罐中加入等体积的乙酸乙酯，充分搅拌后，加入破乳剂，静置分层后移去下层的发酵液；将乙酸乙酯萃取液移入浓缩装置中进行减压浓缩，所回收的有机溶剂乙酸乙酯又进行二次萃取，而减压浓缩后获得的浓缩液利用高压制备液相层析系统进行分离，获得骨化二醇组分，结晶后即得骨化二醇成品。

[0019] 骨化二醇的 HPLC 测定：

色谱柱为 Kromasil 正相硅胶柱 (250×4.6mm i.d,5um)，流动相为异丙醇—正己烷 (1 ： 9)，流速 1.5ml/min，柱温为 40℃，检测波长 265nm。

[0020] 假诺卡氏菌 SIIA2243 的获得途径：

菌株分离、诱变与鉴定。

[0021] 从广州白云山的土壤样品中分离筛选得到的能够将维生素 D_3 转化为骨化二醇的原始菌株 SIIA243。往菌株 SIIA243 的斜面培养物中加入 10ml 无菌生理盐水进行洗涤，获得孢子悬液，梯度稀释至菌体浓度在 10^7CFU/ml 左右，取 5ml 菌悬液放置在直径为 9cm 的培养皿中，在 30W 紫外灯下距离 30cm 照射 30 秒，梯度稀释并取 0.1ml 涂布于平板培养基上，28℃培养 10 天，挑取单菌落于斜面培养基上，28℃培养 7 天，获得紫外诱变菌株备用。

[0022] 往菌株 SIIA243 的斜面培养物中加入 10mlpH5.0 的无菌磷酸缓冲液进行洗涤，获得孢子悬液，菌悬液中亚硝基胍的浓度为 50ug/ml，往诱变处理后的菌悬液加入无菌硫代硫酸钠，使亚硝基胍分解以终止其作用，之后梯度稀释并取 0.1ml 涂布于平板培养基上，28℃培养 10 天，挑取单菌落于斜面培养基上，28℃培养 7 天，获得亚硝基胍诱变菌株备用。

[0023] 将紫外诱变和亚硝基胍诱变获得的菌株移种到含维生素 D_3 的基本培养基及完全培养基上，28℃培养 5 ～ 10 天，检出在含维生素 D_3 的基本培养基不长、在完全培养基上生长的菌株；然后将筛选到的菌株移种到含骨化二醇的基本培养基上，28℃培养 5 ～ 10 天，检出不生长或生长势较弱的菌落(含维生素 D_3 或骨化二醇的基本培养基包含 Na_2HPO_4、KH_2PO_4、$MgSO_4$、$CaCl_2$、微量元素溶液和琼脂粉。)。将这些不消耗底物维生素 D_3 和产物骨化二醇的菌落挑选出来，在摇瓶中发酵 72hr 后补入维生素 D_3，使其在发酵液中的终浓度达到 500ug/ml ～ 5000ug/ml，然后再发酵 1 ～ 10 天，经过 HPLC 检测，挑选出能够耐受高浓度底物维生素 D_3 且具有底物维生素 D_3 残留低，产物骨化二醇产量高这种转化特性的菌株；

通过大量的诱变、筛选工作，最终获得了本发明所指的菌株 SIIA2243。菌株 SIIA2243 具有特定的工业用途，发酵生产骨化二醇。

[0024] 通过通用引物 27F 与 1492R 扩增菌株 SIIA 2243 的 16S rDNA，获得的 16s rRNA 基因序列，在 Genebank 数据库中注册，序列号为 KF796659，将其与 GenBank 数据库调集的其它放线菌菌株的 16S rDNA 相应序列进行比较，并用 Mega 5.0 软件包进行系统进化分析，亲缘关系最相近的是自养假诺卡氏菌模式菌 *Pseudonocardia autotrophica* ATCC IMSNU 20050T，相似度 99%，说明菌株 SIIA2243 为自养假诺卡氏菌 *Pseudonocardia autotrophica*。

[0025] 菌株 SIIA2243 的形态学特性：

基内菌丝(营养菌丝)在微黄，明显分枝，有横隔，气生菌丝白色，分枝，产生卷曲的孢子链，孢子类椭圆状；菌丝成节段，在节段间的凹陷处或者节段中间长出芽的方式进行出芽生长。菌落白色，皱褶，致密，圆形，菌落色素浅黄色。

[0026] 菌株 SIIA2243 的培养特性：

将菌株 SIIA2243 接种在各种合成培养基和有机培养基上，28℃培养 14 天，记录相应生长特征。

培养基种类	生长状况	菌落背面颜色	可溶性色素
查氏培养基	良好，菌落白色	微黄色	无
葡萄糖天门冬素培养基	良好，菌落白色	微黄色	无
无机盐淀粉培养基	良好，菌落白色	微黄色	无
酵母麦芽汁培养基	良好，菌落白色	微黄褐色	无
燕麦浸汁培养基	良好，菌落白色	微黄褐色	无
葡萄糖牛肉膏培养基	良好，菌落白色	微黄褐色	无

[0027] 菌株 SIIA2243 的生理生化特性：

在营养丰富的固体培养基上进行培养，发现其最适生长温度为 18℃～ 32℃，在 4℃时仍然缓慢生长，4℃以下及 40℃以上基本观察不到生长了。该菌株革兰氏染色程阳性，需氧生长，但是在氧气少的环境下也可生长，淀粉水解反应阴性，明胶液化反应阴性，牛奶凝固和胨化反应阴性，黑色素产生呈阴性，硝酸盐还原反应阴性，不产生硫化氢；能够利用 D—葡萄糖，L—阿拉伯糖，D—木糖，L—肌醇，D—甘露醇，D—果糖，鼠李糖，棉籽糖，D—乳糖，D—山梨糖，D—麦芽糖，D—半乳糖，不能够利用 D—海藻糖和 D—木糖。另外，该菌株能够利用碳酸氢钠为唯一碳源进行生长。

[0028] 该菌株无枝菌酸，细胞壁含 meso—DAP（内消旋二氨基庚二酸），全细胞水解液中含有半乳糖和阿拉伯糖。

[0029] 综合以上分类数据分析，鉴定菌株 SIIA2243 属于自养假诺卡氏菌 *Pseudonocardia autotrophica*，其与已报道的自养假诺卡氏菌种中的相关菌株在形态学、生理生化特征、16s rRNA 基因序列分析方面有所差异，因此，鉴定菌株 SIIA2243 为自养假诺卡氏菌种中的新菌株，命名为 *Pseudonocardia autotrophica* SIIA2243。菌株 *Pseudonocardia autotrophica* SIIA2243 已于 2013 年 7 月 17 日保藏在中国北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号 CGMCC No. 7935。

[0030] 发明的有益效果：

利用本发明进行骨化二醇的发酵生产有以下优点和有益效果：

1 本发明选育获得菌株 SIIA2243，不利用、不降解底物维生素 D_3 和产物骨化二醇，使得底物维生素 D_3 在发酵的过程中能够更好地被转化为骨化二醇，从而有利于骨化二醇产量的提高。另外，选育获得的菌株 SIIA2243 能够耐受更高浓度的维生素 D_3，这有利于通过增加维生素 D_3 的投料量来提高骨化二醇的产量，从而更充分地发挥发酵罐的生产能力。由于选育获得菌株 SIIA2243 的优良特性，其在工业规模发酵过程中，维生素 D_3 的转化率最高能够达到 80%。

[0031] 2 本发明提供了一种工业规模发酵生产骨化二醇的方法。该生产工艺简单易行，条件温和，安全可控，工艺稳定性好，能够大规模生产骨化二醇。

[0032] 3 萃取剂乙酸乙酯回收反复使用降低了对环境的危害，同时利用高压制备液相层析系统来分离骨化二醇，减少了工业规模生产中人力的投入，提高了提取收率，同时获得的

骨化二醇成品纯度高，杂质少，产品质量好。

[0033] 菌株 SIIA2243 已于 2013 年 7 月 17 日保藏在中国北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号 CGMCC No. 7935。

[0034] 具体实施方式：

以下实施例是对本发明的进一步说明，而不是对本发明的限制。

[0035] 实施例 1：

自养假诺卡氏菌 *Pseudonocardia autotrophica* SIIA2243 的获得途径与鉴定

从广州白云山的土壤样品中分离筛选得到的能够将维生素 D_3 转化为骨化二醇的原始菌株 SIIA243。往菌株 SIIA243 的斜面培养物中加入 10ml 无菌生理盐水进行洗涤，获得孢子悬液，梯度稀释至菌体浓度在 10^7CFU/ml 左右，取 5ml 菌悬液放置在直径为 9cm 的培养皿中，在 30W 紫外灯下距离 30cm 照射 30 秒，梯度稀释并取 0.1ml 涂布于平板培养基上，28℃培养 10 天，挑取单菌落于斜面培养基上，28℃培养 7 天，获得紫外诱变菌株备用。

[0036] 往菌株 SIIA243 的斜面培养物中加入 10mlpH5.0 的无菌磷酸缓冲液进行洗涤，获得孢子悬液，菌悬液中亚硝基胍的浓度为 50ug/ml，往诱变处理后的菌悬液加入无菌硫代硫酸钠，使亚硝基胍分解以终止其作用，之后梯度稀释并取 0.1ml 涂布于平板培养基上，28℃培养 10 天，挑取单菌落于斜面培养基上，28℃培养 7 天，获得亚硝基胍诱变菌株备用。

[0037] 将紫外诱变和亚硝基胍诱变获得的菌株移种到含维生素 D_3 的基本培养基及完全培养基上，28℃培养 5 ～ 10 天，检出在含维生素 D_3 的基本培养基不长、在完全培养基上生长的菌株；然后将筛选到的菌株移种到含骨化二醇的基本培养基上，28℃培养 5 ～ 10 天，检出不生长或生长势较弱的菌落（含维生素 D_3 或骨化二醇的基本培养基包含 Na_2HPO_4、KH_2PO_4、$MgSO_4$、$CaCl_2$、微量元素溶液和琼脂粉。）。将这些不消耗底物维生素 D_3 和产物骨化二醇的菌落挑选出来，在摇瓶中发酵 72hr 后补入维生素 D_3，使其在发酵液中的终浓度达到 500ug/ml ～ 5000ug/ml，然后再发酵 1 ～ 10 天，经过 HPLC 检测，挑选出能够耐受高浓度底物维生素 D_3 且具有底物维生素 D_3 残留低，产物骨化二醇产量高这种转化特性的菌株。

[0038] 通过大量的诱变、筛选工作，最终获得了本发明所指的菌株 SIIA2243。菌株 SIIA2243 具有特定的工业用途，发酵生产骨化二醇。

[0039] 通过通用引物 27F 与 1492R 扩增菌株 SIIA 2243 的 16S rDNA，获得的 16s rRNA 基因序列，在 Genebank 数据库中注册，序列号为 KF796659，将其与 GenBank 数据库调集的其它放线菌菌株的 16S rDNA 相应序列进行比较，并用 Mega 5.0 软件包进行系统进化分析，亲缘关系最相近的是自养假诺卡氏菌模式菌 *Pseudonocardia autotrophica* ATCC IMSNU 20050T，相似度 99%，说明菌株 SIIA2243 为自养假诺卡氏菌 *Pseudonocardia autotrophica*。

[0040] 菌株 SIIA2243 的形态学特性：

基内菌丝（营养菌丝）在微黄，明显分枝，有横隔，气生菌丝白色，分枝，产生卷曲的孢子链，孢子类椭圆状；菌丝成节段，在节段间的凹陷处或者节段中间长出芽的方式进行出芽生长。菌落白色，皱褶，致密，圆形，菌落色素浅黄色。

[0041] 菌株 SIIA2243 的培养特性：

将菌株 SIIA2243 接种在各种合成培养基和有机培养基上，28℃培养 14 天，记录相应生长特征。

培养基种类	生长状况	菌落背面颜色	可溶性色素
查氏培养基	良好，菌落白色	微黄色	无
葡萄糖天门冬素培养基	良好，菌落白色	微黄色	无
无机盐淀粉培养基	良好，菌落白色	微黄色	无
酵母麦芽汁培养基	良好，菌落白色	微黄褐色	无
燕麦浸汁培养基	良好，菌落白色	微黄褐色	无
葡萄糖牛肉膏培养基	良好，菌落白色	微黄褐色	无

[0042] 菌株 SIIA2243 的生理生化特性：

在营养丰富的固体培养基上进行培养，发现其最适生长温度为 18℃～ 32℃，在 4℃时仍然缓慢生长，4℃以下及 40℃以上基本观察不到生长了。该菌株革兰氏染色程阳性，需氧生长，但是在氧气少的环境下也可生长，淀粉水解反应阴性，明胶液化反应阴性，牛奶凝固和胨化反应阴性，黑色素产生呈阴性，硝酸盐还原反应阴性，不产生硫化氢；能够利用 D—葡萄糖，L—阿拉伯糖，D—木糖，L—肌醇，D—甘露醇，D—果糖，鼠李糖，棉籽糖，D—乳糖，D—山梨糖，D—麦芽糖，D—半乳糖，不能够利用 D—海藻糖和 D—木糖。另外，该菌株能够利用碳酸氢钠为唯一碳源进行生长。

[0043] 该菌株无枝菌酸，细胞壁含 meso—DAP（内消旋二氨基庚二酸），全细胞水解液中含有半乳糖和阿拉伯糖。

[0044] 综合以上分类数据分析，鉴定菌株 SIIA2243 属于自养假诺卡氏菌 *Pseudonocardia autotrophica*，其与已报道的自养假诺卡氏菌种中的相关菌株在形态学、生理生化特征、16s rRNA 基因序列分析方面有所差异，因此，鉴定菌株 SIIA2243 为自养假诺卡氏菌种中的新菌株，命名为 *Pseudonocardia autotrophica* SIIA2243。菌株 *Pseudonocardia autotrophica* SIIA2243 已于 2013 年 7 月 17 日保藏在中国北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号 CGMCC No. 7935。

[0045] 实施例 2：

自养假诺卡氏菌 *Pseudonocardia autotrophica* SIIA2243 发酵生产骨化二醇

为了便于理解本发明，下面将结合实施例来进一步详细描述本发明。除非另有特指，本实施例中的灭菌条件为 121℃，30 分钟。% 为质量百分比。

[0046] 1 培养基：

斜面培养基：葡萄糖 1.5%，蛋白胨 1.0%，玉米浆 0.3%，氯化钠 0.4%，琼脂 1.5%，其余为水，pH7.0，

种子培养基：蛋白胨 1.5%，玉米浆 1.5%，葡萄糖 1.5%，黄豆粉 0.4%，氯化钠 0. 5%，磷酸二氢钾 0.2%，其余为水，pH7.5。

[0047] 发酵培养基：蛋白胨 1.5%，玉米浆 1.5%，葡萄糖 1.5%，黄豆粉 0.4%，氯化钠 0. 5%，磷酸二氢钾 0.2%，其余为水，pH7.5，

2 发酵生产骨化二醇

制种：SIIA2243 斜面菌株挖块到装有 100ml 种子培养基的 500ml 三角烧瓶中，摇瓶转

速 280r/min，温度 29℃，培养 3 天，总共制得 1.5 升种子液，火焰保护下移入到已灭菌的装有 30 升种子培养基的 50 升发酵罐中，培养条件为：搅拌轴转速 260r/min，29℃，空气流量 0.9 立方米 / 小时，罐压 0.05Mpa，培养 2 天。将培养了 2 天的 30 升种子液通过灭菌管道压入到已灭菌的装有 300 升种子培养基的 500 升发酵罐中，培养条件为：搅拌轴转速 180r/min，29℃，空气流量 18 立方米 / 小时，罐压 0.05MPa 培养 1 天。

[0048] 发酵：将培养了 1 天的 300 升种子液通过灭菌管道压入到已灭菌的装有 3000 升发酵培养基的 5000 升发酵罐中，培养条件为：搅拌轴转速 80r/min，28℃，空气流量 90 立方米 / 小时，罐压 0.05MPa 培养 3 天。向发酵罐中补入溶解有 9000 g 倍他环糊精的溶液 100 升和溶解有 1500 g 维生素 D_3 的溶液 100 升，补料后将搅拌速度调整为 120 r/min，24hr 后又调整为 80r/min，继续发酵 4 天后终止发酵。

[0049] 提取精制：终止发酵后，将约 3000 升发酵液通过管道移入到 10000 升的储罐中，往储罐中加入 3000 升乙酸乙酯，搅拌 2hr，搅拌轴转速 50r/min，加入破乳剂后静置过夜，分层后移去下层的发酵液，将乙酸乙酯萃取液移入浓缩装置中进行减压浓缩，所回收的有机溶剂乙酸乙酯又进行二次萃取，而减压浓缩后获得的浓缩液利用高压制备液相层析系统进行分离，制备柱为 C18 柱，检测波长为 265nm，流动相为乙腈—水（体积比 80 ： 20），收集目标组分，减压浓缩干后，获得骨化二醇组分，结晶后即得骨化二醇成品 907g。