子囊霉素生产菌种的选育及发酵优化

刘倩倩[1,2]，吴远杰[2]，张正玉[2]，陈少欣[2]
（1. 上海工程技术大学化学化工学院，上海 201620；
2. 中国医药工业研究总院，上海医药工业研究院，创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 201203）

摘要：子囊霉素（ascomycin，FK520）是由吸水链霉菌（*Streptomyces hygroscopicus*）发酵产生的大环内酯类抗菌药，有多种生物活性，具有重要药学应用价值。为了实现 FK520 的规模化发酵生产，本研究以吸水链霉菌 SFK-6-33（2.43 g/L）为出发菌株，通过自然分离、诱变选育和基因改造，获得了高产突变菌株 SFK-OASN-N3-25（2.92 g/L），产量较出发菌株提高了 20.16%。进一步在 5 L 发酵罐研究中进行分批补料培养，通过优化甘油补料浓度和 pH 值，确定甘油补加量为 2.5%、pH 控制在 5.6 以上为最佳发酵条件。采用优化后的发酵工艺，FK520 产量能达到 4.64 g/L，为目前报道最高产量。最后，通过 3 批发酵试验验证了 FK520 发酵单位为 4.66 ～ 4.97 g/L，为规模化发酵 FK520 奠定了基础。

关键字：吸水链霉菌；子囊霉素；菌种改造；发酵；工艺优化
中图分类号：R939.97　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）06-0842-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.06.011

Breeding and Fermentation Optimization of Ascomycin Producing Strains

LIU Qianqian[1,2], WU Yuanjie[2], ZHANG Zhengyu[2], CHEN Shaoxin[2]
（*1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620;*
2. State Key Lab. of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203）

ABSTRACT: Ascomycin（FK520）is a macrolides antibiotic produced by *Streptomyces hygroscopicus*. It has a variety of biological activities and with a high application value. In order to realize the large-scale fermentation production of FK520, in this study, the high-yielding mutation strain SFK-OASN-N3-25（2.92 g/L）was obtained from SFK-6-33（2.43 g/L）through natural isolation, mutation breeding, and genetic modification, and the yield was 20.16% higher than that of the original strain. Then the fed-batch culture was carried out in a 5 L fermenter to optimize the glycerol supplemental concentration and pH. It was determined that the optimal fed-batch culture conditions were as follows: glycerol supplemental concentration was 2.5%, and the pH was controlled above 5.6. In the optimized fermentation process, the yield of FK520 reached 4.64 g/L, which is the highest yield reported at present. Finally, the fermentation yields of FK520 were 4.66 – 4.97 g/L through three batches of fermentation verification, which laid a foundation for large-scale fermentation of FK520.

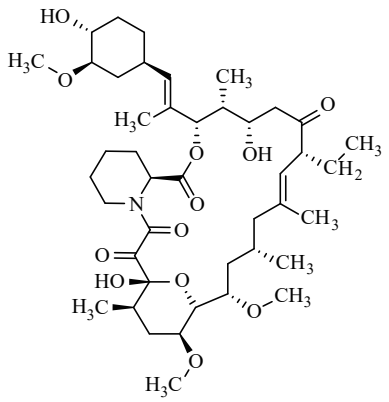
Key Words: *Streptomyces hygroscopicus*; ascomycin; strain modification; fermentation; process optimization

子囊霉素（ascomycin，FK520，结构式如图 1 所示）是由吸水链霉菌（*Streptomyces hygroscopicus*，ATCC 14891）产生的一种大环内酯类抗菌药[1]，有多种生物活性，如抗真菌、抗疟疾、免疫抑制等[2—5]。FK520 及其衍生物具有重要临床应用价值。例如，FK520 衍生物吡美莫司（商品名 Elidel）可用于治疗特应性皮炎（湿疹）和其他炎症性皮肤病[6]；衍生物三乙酰 -L- 鼠李糖子囊霉素在与他克莫司同等或更高的免疫抑制活性剂量下未显

收稿日期：2022-02-14
作者简介：刘倩倩（1991—），女，硕士研究生，专业方向：微生物药学。
通信联系人：陈少欣（1972—），男，研究员，博士生导师，从事微生物药物的研究与开发。
E-mail：sxzlb@263.net

示毒性[7]。

由于FK520具有23元大环内酯结构[8]，具有多个手性中心，利用化学法合成，难度大且成本高，因而微生物发酵是生产FK520的主要方式[9]。YU等以吸水链霉菌ATCC 14891为出发菌株，采用常压室温等离子体诱变，获得了突变菌株SFK-36[9]；对SFK-36再进行多轮自然选育、紫外诱变与链霉素抗性筛选获得菌株SFK-6-33，随即通过对SFK-6-33基因改造获得工程菌株SFK-OASN，然后将工程菌株进行5 L发酵罐培养，FK520的产量可达到3 913.9 mg/L[10]。虽然FK520产量得到显著提高，但是与国外相比，本国的FK520仍然面临产量较低，难以实现工业化生产的问题。本研究通过诱变育种与基因改造结合的方法获得高产突变菌株，进一步通过发酵罐培养并优化罐上工艺参数，一定程度上提高了FK520发酵产量，为FK520的工业化生产奠定了基础。



FK520

图1 FK520化学结构式

Fig.1 Chemical Structure of FK520

1 仪器与试药

LC1260型高效液相色谱仪、1260/6120型液质联用仪（美国Agilent公司）；FMG-5 L发酵罐（上海国强生化工程装备有限公司）；GHP-9160型隔水式培养箱（上海飞跃试验仪器有限公司）；MQL-621R型恒温摇床柜（上海旻泉仪器有限公司）；Mini 15K型高速离心机（杭州奥盛仪器有限公司）；KQ2200OD型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

FK520标准品（澳大利亚BioAustralis公司，纯度97.2%，批号rs20140901）；可溶性淀粉（湖州展望药业有限公司）；棉籽饼粉（上海双华医药科技发展公司）；黄豆饼粉（青岛科瑞培养基有限公司）；甘油、巴豆酸、各种无机盐（国药集团化学试剂有限公司）；DNA聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA连接酶（宝日医生物技术有限公司）；安普霉素、氯霉素、卡那霉素、萘啶酮酸（生工生物工程有限公司）；水为去离子水，乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

吸水链霉菌SFK-6-33由本实验室保藏。

2 方法与结果

2.1 培养基及培养方法

平板培养基/g·L^{-1}：可溶性淀粉10，酵母提取物4，三水合磷酸氢二钾0.5，七水硫酸镁0.5，琼脂20；pH 7.0。

斜面培养基/g·L^{-1}：葡萄糖2，酵母提取物2，麦芽浸粉5，琼脂粉20；pH 7.0。

一级种子（或二级种子）培养基/g·L^{-1}：玉米浆8，葡萄糖10，棉籽饼粉3，磷酸二氢钾1；pH 7.0。

发酵培养基/g·L^{-1}：黄豆饼粉29，磷酸二氢钾0.2，缬氨酸3，巴豆酸1，甘油80，微量元素10，大豆油10；pH 6.5。

微量元素/g·L^{-1}：七水合硫酸锌1，七水合硫酸铁1，五水硫酸铜1，$CoCl_2$ 0.015，浓硫酸0.076。

LB培养基/g·L^{-1}：酵母提取物5，胰蛋白胨10，氯化钠10；pH 7.0。

MS固体培养基/g·L^{-1}：黄豆饼粉20，甘露醇20，琼脂粉20；pH 7.0。

磷酸盐缓冲液（PBS）/g·L^{-1}：磷酸氢二钾11.41，磷酸二氢钾6.8；pH 6.0。

2× 孢子萌发液/g·L^{-1}：酵母提取物10，水解酪蛋白10；pH自然。

平板及斜面培养：将装有菌株的甘油管采用稀释涂布平板法涂布于固体培养基，置28 ℃恒温培养箱培养7 d，挑取形态良好的单菌落于斜面，在28 ℃培养箱中培养8～10 d至有灰黑色孢子产生。

一级种子培养：取出长有丰厚孢子的斜面，铲

取 1/4 接种铲的孢子，接种于广口种子摇瓶（250 ml，装量 20 ml）中，于 28 ℃、200 r/min 振荡培养 2 d。

二级种子培养：将一级种子接种（接种量 10%）于二级种子摇瓶（750 ml，装量 100 ml）中，28 ℃、200 r/min 振荡培养 1 d。

发酵摇瓶培养：将一级种子接种（接种量 10%）于发酵细口摇瓶（250 ml，装量 25 ml）中，28 ℃，200 r/min 振荡培养 8 d。

发酵罐培养：将二级种子液（接种量 8%）转接至 5 L 发酵罐中。设定温度 28 ℃、初始搅拌速度 200 r/min、通气量为 0.001 $m^3/(m^3 \cdot min)$。发酵过程溶氧与转速关联，控制溶氧在 20%～30%；用 50%氨水流加控制培养液的 pH 值。发酵过程中定时取样，用 HPLC 法分析产物发酵单位。

2.2 基因工程改造

孢子悬液制备：取长有丰厚孢子的斜面，用接种铲充分刮取斜面上的孢子于研磨器中，加入 PBS 10 ml，充分研磨后，将菌液移入带六层滤纸及漏斗的锥形瓶中，过滤得孢子悬液。

基因改造：pSET-fkbS-A2BE 质粒［含巴豆酰辅酶 A 羧化 / 还原基因 *fkbS*、乙酰辅酶 A 羧化基因 *accA2BE*（由 *accA2*、*accB* 和 *accE* 基因组成），红霉素启动子 *PermE**，安普抗性基因 *Apr*^{r}］，构建过程参见文献[10]。大肠埃希菌的培养、感受态细胞的制备及大肠埃希菌的转化参考《分子克隆实验》[11]。

接合转移详细操作参见文献[12]，简要步骤如下。

供体菌处理：取 OD_{600} 值约为 0.6 的大肠埃希菌，用 LB 培养基洗去抗菌药，然后将菌体用 LB 培养基 0.5 ml 重悬。

受体菌处理：取孢子悬液 0.5 ml，55 ℃热激 10 min，冷却至室温，加入 2× 孢子萌发液 0.5 ml，5 mol/L 氯化钙溶液 2 μl，于 37 ℃摇床预萌发 2 h。

供受体处理：将上述预萌发的孢子悬液离心（12 000×*g*）3 min，用 LB 培养基 500 μl 重悬，与大肠埃希菌混合均匀，取 200 μl 涂布于 MS 固体培养基上，于 28 ℃培养 22 h 后，向 MS 固体培养基上覆盖无菌水 1 ml（添加最终质量浓度为 4 μg/ml 的安普霉素和 10 μg/ml 的萘啶酮酸），于 28 ℃培养箱培养至有结合子产生。

2.3 分析方法

2.3.1 菌体生物量（PMV）的测定

取 15 ml 离心管，精密加入发酵液 10 ml，离心（12 000×*g*）10 min，测量上清体积 V_1，照下式计算 PMV。

$$PMV=[(10-V_1)/10]\times 100\%$$

2.3.2 FK520 的 HPLC 测定法

取发酵液 300 μl，用丙酮稀释 5 倍，超声（50 Hz）30 min，再离心（13 000×*g*）10 min，经 0.22 μm 滤头过滤，所得上清液用于 HPLC 分析。

色谱条件：色谱柱 Hypersil BDS C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 水∶乙腈（35∶65）；检测波长 210 nm；柱温 室温；流速 1.0 ml/min；进样量 10 μl。

2.3.3 甘油含量的测定方法

取发酵液 1 ml，离心（12 000×*g*）10 min，取上清 300 μl，用 70%乙腈稀释 5 倍，离心（12 000×*g*）10 min，经 0.22 μm 滤头过滤，所得上清液用于液相示差色谱分析。

色谱条件：色谱柱 HILIC-NH_2 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 乙腈∶水（70∶30）；流速 1.0 ml/min；示差检测器；柱温 55 ℃；进样量 20 μl。

2.4 菌种的改造

2.4.1 诱变选育方法

自然筛选：固体培养与摇瓶培养按“**2.1**”项下方法进行，通过 HPLC 分析筛选发酵单位最高的菌株。

紫外诱变：取孢子悬液 2 ml 于小平皿中，将平皿垂直置于距离紫外灯（15 W，254 nm）30 cm 处，照射 80 s，暗反应 30 min，然后将菌株稀释涂布于平板培养基。固体培养与摇瓶培养按“**2.1**”项下方法进行，通过 HPLC 分析筛选发酵单位最高的菌株。

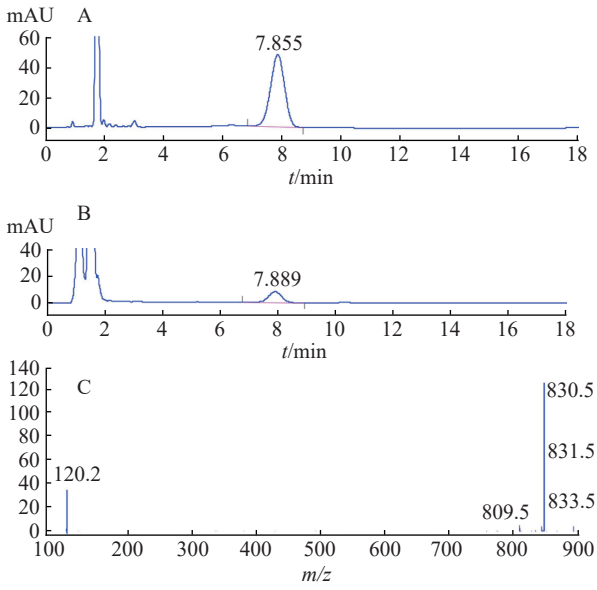
2.4.2 诱变选育改造

通过对出发菌株 SFK-6-33（2.43 g/L）进行自然筛选后获得菌株 SFK-6-33-N20（2.47 g/L）。构建

pSET-fkbS-A2BE 质粒，通过制备感受态细胞、转化及接合转移操作将质粒 pSET-fkbS-A2BE 整合到菌株 SFK-6-33-N20 的基因组 Φ31 位点，得到工程菌株 SFK-OASN-N1-28(2.74 g/L)。然后对该工程菌株进行紫外诱变，获得菌株 SFK-OASN-uv2-4(2.78 g/L)，继而对其进行自然分离得到菌株 SFK-OASN-N3-25(2.92 g/L)，产量较出发菌株提高 20.16%（改造过程如图 2 所示）。

2.5 SFK-OASN-N3-25 菌的发酵产物检测

图 3 为工程菌株 SFK-OASN-N3-25 发酵液的 HPLC-MS 图谱及 FK520 标准品的 HPLC 图谱。图 3B 为吸水链霉菌发酵液的 HPLC 图谱，图中产物的保留时间为 7.9 min，该保留时间与图 3A 中 FK520 标准品保留时间基本一致，进一步采用 HPLC-MS 对发酵产物进行分析，该产物的分子离子峰 $[M+K]^+$ 为 830.5，可知该产物的相对分子质量为 791.5，与 FK520 实际相对分子质量一致，所以推测图 3B 中的产物为 FK520。



A：FK520 标准品的 HPLC 图谱，B：吸水链霉菌发酵液的 HPLC 图谱，C：吸水链霉菌发酵液的 HPLC-MS 图谱

图 3 菌株 SFK-OASN-N3-25 发酵产物的 HPLC-MS 分析

Fig.3 Analysis of SFK-OASN-N3-25 Fermentation Broth by HPLC-MS

2.6 发酵罐分批补料培养

2.6.1 甘油补加浓度

甘油可用于菌体的生长代谢，也是合成次级代谢产物 FK520 的前体物质。通过在发酵过程中补加不同浓度甘油，可考察甘油浓度对吸水链霉菌发酵过程的影响。结果如图 4 所示。

图 4a 是不补加甘油的发酵过程，可见在 0～120 h 甘油急剧消耗，FK520 快速积累，120 h 时发酵液甘油总残留量降到 0.24%。由于后期较低的甘油总残留量无法满足菌丝体的生长以及次级代

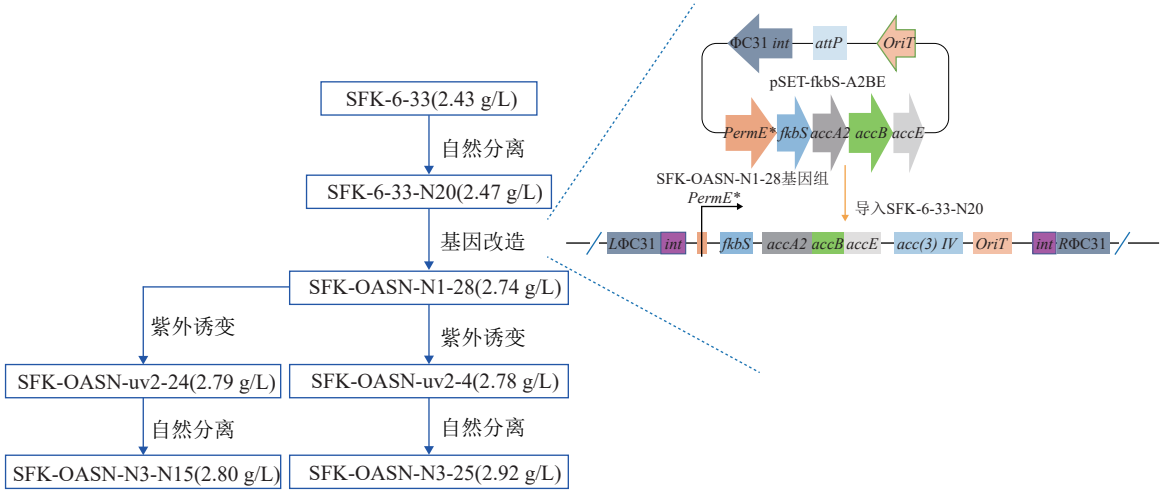


图 2 FK520 生产菌株 SFK-OASN-N3-25 的改造过程

Fig.2 Modification Process of FK520 Producing Strain SFK-OASN-N3-25

谢产物 FK520 的积累，菌丝体逐渐自溶，PMV 降低，pH 值回弹，FK520 的积累速度变得较为缓慢，发酵周期缩短，在 192 h 发酵结束，FK520 产量为 3.2 g/L。

基于以上情况，本试验在发酵 96 h 后，每 24 h 补加 1 次甘油以改善甘油缺乏导致 FK520 在发酵后期积累缓慢的问题。为了确定合适的添加浓度，分别考察了甘油补加量为 2%、2.5%、3.5%（并保证甘油总残留量分别在 0.5%、1%、2%左右）时吸水链霉菌的发酵情况，结果分别如图 4b、4c、4d 所示。

图 4b 为添加 2%甘油的发酵情况（甘油总残留量维持在 0.5%左右）。由于从 96 h 开始甘油的补加，发酵 120 h 后 PMV 没有呈现快速下降趋势，并且 FK520 仍保持较快的增长速率，发酵周期也由 192 h 延长到 288 h，在 288 h 时 FK520 产量达到 4.33 g/L。

为了优化甘油补料浓度，将甘油补加量进一步提高到 2.5%（甘油总残留量维持在 1%左右），以观察其对吸水链霉菌发酵的影响。结果如图 4c 所示，PMV 有所提高，总体维持在 30%以上，FK520 的积累速度也较添加 2%甘油时快，在添加 2%、2.5%甘油的试验组中 96 h 时 FK520 的产量分别为 1.83 和 1.89 g/L（基本相同，图 4b、4c），在 120 h 时 FK520 的积累量分别为 2.10 与 2.78 g/L（初见差异），在发酵结束（288 和 264 h）时 FK520 产量分别为 4.33 和 4.64 g/L。结果显示，添加 2.5%甘油时，FK520 的产量较添加 2%甘油时有所提高，且解决了菌株在补料前碳源不足的问题。

为了考察添加更高浓度的甘油对吸水链霉菌发酵情况的影响，将甘油的添加浓度增加到 3.5%（甘油总残留量维持在 2%左右），结果如图 4d 所示。随着补加甘油比例的增加，吸水链霉菌的 PMV 没有明显变化，FK520 的产量不仅没有得到提高反而有所下降，在 264 h 时发酵结束，FK520 产量为 4.35 g/L。猜测过高的甘油含量对 FK520 的生成可能会有抑制作用。

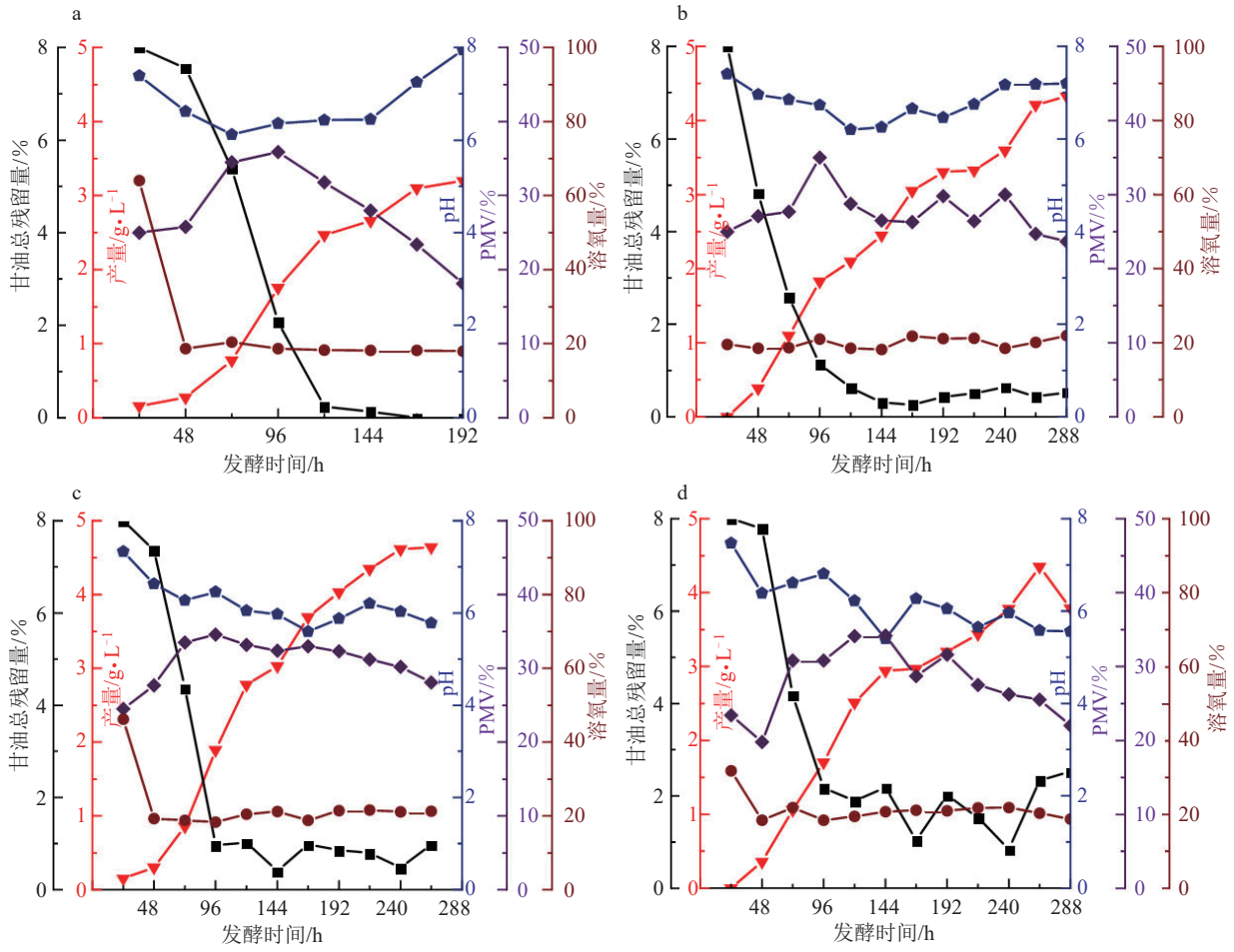
2.6.2　pH 值控制

pH 值是发酵过程中的重要因素。对发酵过程的 pH 值进行调控可以改善发酵环境，有利于延长发酵时间，累积发酵产物。为了考察有利于吸水链霉菌生产 FK520 的 pH 环境，本试验考察了通过流加 50%氨水将 pH 值分别控制在 5.0、5.6、6.0 以上时（发酵液甘油总残留量均维持在 1%左右），吸水链霉菌生产 FK520 的发酵情况，结果分别如图 5a、图 4c、图 5b 所示。将 pH 值控制在 5.6 以上的发酵情况如图 4c 所示，前 96 h 随着甘油的消耗，pH 值逐渐下降。因此通过 50%氨水流加控制 pH 值，使发酵后期的 pH 值在 5.6 以上波动。此情况下，FK520 能持续且快速积累，PMV 总体维持也在 30%以上，在发酵结束时 FK520 产量达到 4.64 g/L。

将 pH 值控制在 5.0 以上的发酵情况如图 5a 所示。随着甘油迅速消耗，FK520 不断积累，PMV 增长，pH 值逐渐下降。但随着 pH 值降低，PMV 逐渐降低并维持 30%以下，甘油的消耗减少，甘油的补加量相应变缓，FK520 的积累速度随之变慢，甚至在快速增长阶段（144 ～ 168 h）FK520 的积累量为 0，最终在 264 h 时发酵结束，FK520 产量仅为 3.45 g/L。推测酸性发酵环境不利于菌体的生长，抑制了 FK520 的积累。

将 pH 值控制在 6.0 以上的发酵情况如图 5b 所示。相较于 pH 值控制在 5.6 以上的情况，pH 6.0 以上的发酵液在 0 ～ 168 h 间 PMV 始终处于增长状态，并在 168 h 达到最高点（38.7%），发酵液较为浓稠，PMV 总体较高；期间甘油消耗增多，甘油补加量相应增加，但 FK520 的增长速度与 pH 值控制在 5.6 以上时相比略显缓慢。发酵在 264 h 时结束，FK520 产量为 4.16 g/L，相比于 pH 值控制在 5.6 以上时降低 10.3%。将 pH 值控制在 6.0 以上时 PMV 有较大提高，但 FK520 的含量有所降低。可能原因是 pH 6.0 以上的发酵环境更适合吸水链霉菌生长，过多的营养物质被用于菌丝体的生长，而限制了 FK520 的积累。

综上所述，最有利于 FK520 的发酵工艺为甘油添加量为 2.5%（发酵罐甘油总残留量在 1%左右），



a：不补加甘油，b：甘油补加量为 2%（pH 5.6 以上），c：甘油补加量为 2.5%，d：甘油补加量为 3.5%

▼－FK520产量；■－甘油含量；⬟－pH；◆－PMV；●－溶氧量

图 4 甘油补加浓度对 SFK-OASN-N3-25 在 5 L 发酵罐中发酵的影响

Fig.4 Effect of Glycerol Supplemental Concentration on SFK-OASN-N3-25 Fermentation in a 5 L Fermenter

pH 值控制在 5.6 以上。采用优化后的发酵工艺，通过 3 批发酵试验（5 L 发酵罐）验证，结果如表 1 所示。

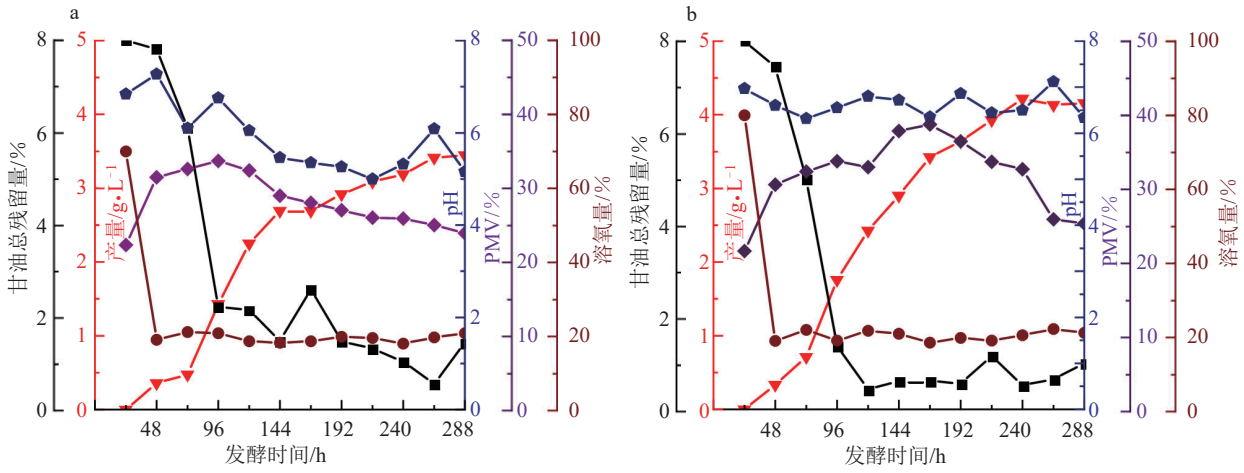
表 1 3 批次 FK520 发酵工艺的验证结果

Tab.1 Verification Results of Three Batches of Fermentation Process of FK520

批次	发酵时间/h	FK520产量/g·L^{-1}
1	240	4.73
2	264	4.97
3	264	4.66

3 讨论

本研究以吸水链霉菌 SFK-6-33 为出发菌株，通过传统诱变和基因工程操作获得菌株 SFK-OASN-N3-25，产量为 2.92 g/L，较出发菌株提高 20.16%。由于微生物生长代谢受到溶氧[13]、pH 值、营养物质等因素控制，摇瓶发酵无法完全发挥菌株生产次级代谢产物的潜力。为了更大幅度提高 FK520 的产量，对吸水链霉菌进行 5 L 发酵罐培养并且对发酵工艺参数（pH 值、甘油补料浓度）进行优化。结果显示较适宜 FK520 积累的发酵工艺参数为 pH 5.6 以上、甘油补加量为 2.5%，最终 FK520 的产量达到 4.64 g/L，为目前报道的最高产量。本研究为 FK520 的工业化生产奠定了试验基础。



a：pH 控制在 5.0 以上，b：pH 控制在 6.0 以上

▼－FK520产量；■－甘油含量；⬟－pH；◆－PMV；●－溶氧量

图 5　pH 值对 SFK-OASN-N3-25 在 5 L 发酵罐中发酵的影响

Fig.5　Effect of pH on SFK-OASN-N3-25 Fermentation in a 5 L Fermenter

参考文献：

[1] WU K, CHUNG L, REVILL W P, *et al*. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units [J]. *Gene*, 2000, **251**(1): 81-90.

[2] SAMBYAL K, SINGH R V. Bioprocess and genetic engineering aspects of ascomycin production: a review [J]. *J Genet Eng Biotechnol*, 2020, **18**(1): 73-84.

[3] QI H, ZHAO S, FU H, *et al*. Enhancement of ascomycin production in *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* by combining resin HP20 addition and metabolic profiling analysis [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, **41**(9): 1365-1374.

[4] MONAGHAN P, FARDIS M, REVILL W P, *et al*. Antimalarial effects of macrolactones related to FK520 (ascomycin) are independent of the immunosuppressive properties of the compounds [J]. *J Infect Dis*, 2005, **191**(8): 1342-1349.

[5] DUMONT F J, STARUCH M J, KOPRAK S L, *et al*. The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin [J]. *J Exp Med,* 1992, **176**(3): 751-760.

[6] BHASKAR S, GOLAB J T, KADUK J A, *et al*. Crystal structure of pimecrolimus Form B, $C_{43}H_{68}ClNO_{11}$ [J]. *Powder Diffr*, 2021, **36**(1): 35-42.

[7] KOCH K, NEWBORY M F, HANSON D C, *et al*. The *C*-32 triacetyl-L-rhamnose derivative of ascomycin: a potent, orally active macrolactone immunosuppressant [J]. *J Med Chem*, 1995, **38**(8): 1255-1258.

[8] QI H, ZHAO S, WEN J, *et al*. Analysis of ascomycin production enhanced by shikimic acid resistance and addition in *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* [J]. *Biochem Eng J*, 2014, **82**: 124-133.

[9] YU Z T, SHEN X F, WU Y J, *et al*. Enhancement of ascomycin production via a combination of atmospheric and room temperature plasma mutagenesis in *Streptomyces hygroscopicus* and medium optimization [J]. *AMB Express*, 2019, **9**(1): 25.

[10] YU Z T, LV H H, WU Y J, *et al*. Enhancement of FK520 production in *Streptomyces hygroscopicus* by combining traditional mutagenesis with metabolic engineering [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, **103**(23/24): 9593-9606.

[11] SAMBROOK J, FRITSH E, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

[12] 刘倩倩, 余志拓, 吴远杰, 等. 产子囊霉素吸水链霉菌遗传操作系统的优化及调控基因的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(12): 1603-1608.

[13] CHEN Y L, KROL J, STERKIN V, *et al*. New process strategy used in a rapamycin fermentation [J]. *Process Biochem*, 1999, **34**(4): 383-389.