

红霉素发酵工艺优化研究*

范代娣¹ 陈 斌¹ 尚龙安¹ 沈立新¹ 孙建敏²

¹(西北大学化工系 西安 710069)

²(西安制药厂 西安 710077)

摘 要 通过摇瓶正交实验,得出 7 种营养成分对红霉素生物合成的影响程度,对发酵工艺条件进行了优化研究,找到了红色链霉菌抗噬菌体 68# 菌种生长的优化组合,得出快速碳源(葡萄糖)与慢速碳源(淀粉)配比为 2.64 时,有利于红霉素的生物合成。还原糖/氮为 20,总糖/氮为 80~120 时对红霉素发酵极为有利。借助磷酸三钙、沸石对 NH_4^+ 的独特吸附和释放作用,将二者按 5:1 混合配成吸附和吐纳效果很好的捕集剂,对发酵液中游离无机氮源进行控制,可使抗生素生物合成提高 15%~29%。

关键词 红霉素,发酵工艺参数,优化

分类号 Q.939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0104-08

红霉素属大环内脂类抗生素,它的抗菌谱和青霉素 G 相似,特别对革兰氏阳性细菌、抗酸杆菌、立克次氏体及大病毒有抗菌活性,是治疗耐药性金黄色葡萄球菌感染和溶血性链球菌感染所引起疾病的首选药物,临床上可用于对青霉素过敏的患者。我国红霉素发酵水平与发达国家相比差距很大,属低水平重复操作,美国亚培公司年生产红霉素能力为 2000 t,而我国红霉素年产量仅为 200 t^[1],国外发酵单位已达 8000~12000 u/mL^[2],生产利润极少,但由于红霉素衍生物的不断涌现及人们对红霉素药理作用的重新认识,尤其是在医药行业被誉为“重磅炸弹”的红霉素衍生物,克拉霉素、阿齐霉素的兴起,更加剧了母体红霉素的供需矛盾。

本研究旨在利用具有抗噬特性的 68# 菌种作为研究对象对其工艺进行优化研究。不仅具有重要理论价值,而且具有明显的经济效益。

1 材料和方法

1.1 菌种

采用西安制药厂 68# 抗噬菌株。

1.2 种子培养基

培养基组成淀粉 3.5g,黄豆饼粉 1.7g,玉米浆 0.9g,花生饼粉 1.5g,葡萄糖 3.5g。蛋白胨 1.3g,硫酸铵 0.6g,磷酸二氢钾 0.15g,酵母粉 0.5g,用自来水定容到 100mL。

* 本课题为陕西省科委重大攻关项目(96K12-G11);陕西省教委重点项目(97JZK09)。

其它工作人员:张 莉,李宝璋,杨隧东。

收稿日期:1997-12-29,修回日期:1998-07-15。

1.3 培养条件

1.3.1 斜面孢子培养:用无菌操作将孢子悬浮液接于茄子瓶斜面培养基上,置 37℃ 恒温室中培养 6~7d。

1.3.2 一级种子培养:培养基灭菌前 pH 调至 6.8,32℃ 培养,将斜面孢子挖块接种于三角瓶内置于摇瓶机上振荡 2 d。

1.3.3 二级种子培养:培养基灭菌前 pH 调至 6.8,将培养 2d 的一级种子以 20% 的接种量接种于无菌培养基中,32℃ 培养 3 d,作为发酵培养种子。

1.3.4 发酵培养:将二级种子接种于无菌三角瓶或发酵罐中进行发酵培养,接种量为 5%,34~31℃ 变温培养,摇瓶发酵周期为 4 d,发酵罐发酵周期可持续到 7 d。

1.4 发酵过程参数检测

1.4.1 还原糖和总糖的测定:取不同时期的培养液,用斐林法^[3]测定其中的还原糖和总糖。

1.4.2 氨基氮的测定:采取不同时期的培养液,用甲醛法测定其中的氨基氮含量。

1.4.3 抗菌素测定方法:红霉素效价的测定:红霉素化学效价测定:采用硫酸水解法,即红霉素经硫酸水解后生成黄色物质,该物质于 483 nm 处有极大吸收值。可用于定量测定。采取不同时期发酵液用无水醋酸丁酯在 pH9.5 时抽提,再用盐酸(0.1 mol/L)抽提,所得盐酸抽提液加硫酸(8 mol/L)水解比色;红霉素的生物测定。

1.4.4 pH 测定:发酵罐发酵过程中 pH 测定由探头和 Omni-Culture Fermentor 本身所带二次仪表自动显示,摇瓶培养过程中的 pH 测定由 pH 测定仪测定。

1.5 工艺参数优化方法

1.5.1 正交实验设计:通过文献和工厂经验,选取发酵配方中 7 种营养基质进行优化组合,为了避免种子批号、种龄,接种量和操作等偶然因素的干扰及减少实验次数,缩短实验时间,在文献[4]基础上选择 L18(2×3⁷)混合水平正交表。选用尚文耐特准则^[5]对实验进行数据处理。

1.5.2 碳氮比优化:碳氮的合适配比,是菌体生长和良好代谢的至关重要的因素,合适的总糖与总氮源之比及还原糖与氮源之比是进行工艺优化的必要措施,通过改变不同配比考察其发酵水平,从而选取其优化配比。

1.5.3 捕集剂添加水平对红霉素发酵的影响:由于配方起始阶段的氮源盐强烈抑制^[6-9]红霉素的生物合成。将对 NH₄⁺ 具有独特吸附和释放作用的磷钙和沸石按 5:1 配成捕集剂与基础料一块加入,对其添加水平进行考察。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶实验

2.1.1 正交实验结果:实验结果见图 1。实验数据经处理后可以清楚地看出,在这 7 种营养成分中,对红霉素效价影响的程度:玉米浆>葡萄糖>黄豆饼粉>碳酸钙>淀粉>硫酸铵>磷酸二氢钾

2.1.2 快速碳源和慢速碳源对红霉素发酵的影响:葡萄糖可以产生碳分解代谢物阻遏效应,是红霉素生物合成的劣质碳源。但发酵初期较高浓度葡萄糖有利于菌丝体(孢子)

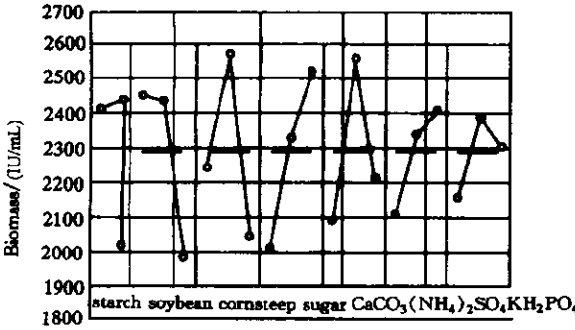


图 1 各因素水平极差图

Fig. 1 The effect of different substrate on the production of erythrus-mycin
 $n = 200 \text{ r/min}, t = 96 \text{ h}$

萌发、生长和大量繁殖。在同样的发酵周期内，缩短了营养期(即红霉素链霉菌生长期)。因此葡萄糖和淀粉二者的配比是优化 68# 菌种工艺，提高红霉素发酵效价的一个重要措施。

实验结果见图 2a、2b。从图 2 可以看出，快速碳源葡萄糖对慢速碳源淀粉的比值增加，红霉素效价经历了一个由低到高，再由高而低的过程，对该图线回归拟合，得：

$$\text{令 } dy/dx = 0 \text{ 解得 } x = 2.64$$

当快速碳源和慢速碳源之比为 2.64 时，对红霉素的生物合成最为有利。

利。

$$y = -1095.62 + 2135x - 102.31x^3 \quad (1.5 \leq x \leq 3.0)$$

$$\text{则 } \frac{dy}{dx} = 2135 - 102.31 \times 3x^2$$

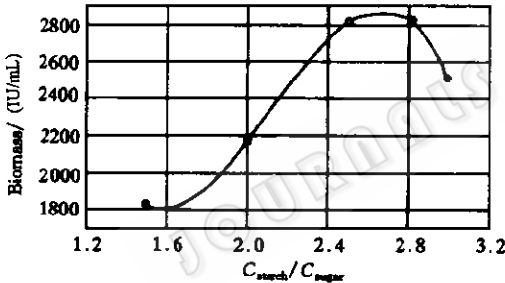


图 2a 快速碳源和慢速碳源之比对红霉素效价的影响

Fig. 2a The effect of the ration of the sugar conc. to the starch conc. on the production of erythrus-mycin

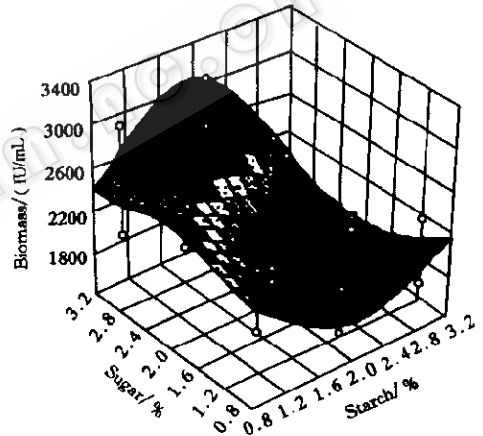


图 2b 葡萄糖和淀粉对红霉素效价的影响

Fig. 2b The effect of the sugar conc. and the starch conc. on the production of erythrus-mycin
 $n = 200 \text{ r/min}, t = 96 \text{ h}$

2.1.3 碳氮比对红霉素效价的影响：图 3 是还原糖与氮源之比，总糖与氮源之比取值的优化结果是 80~120 之间。图 3 示出，还原糖/氮维持在 20 时对红霉素产生极有利。

2.1.4 无机氮源的影响：根据文献[5~8]报道，配方起始阶段过量的快速氮源或硝酸盐强烈地抑制红霉素的生物合成。培养基中残留无机氮源水平是红霉素生物合成的一个关键调节因素。从红霉素生物合成角度讲，无机氮源水平低些好，但是从菌丝体生长来看，过低的无机氮源不利于菌丝体的生长，因此，我们借助吸附缓释原理，把无机氮储藏在一个“库”中缓慢地释放。培养基中无机氮源浓度高时将其纳入“库”中，菌丝体生长需要时又可自如地吐出来。实验结果见表 1。

表 1 捕集剂对红霉素发酵的影响

Table 1 The effect of the absorption agent conc. on the product

The conc. of the absorption agent/ %	The conc. of the product/(u/mL)			Mean value /((u/mL)
	1	2	3	
0.00	2171	2088	—	2130
0.02	—	2404	2479	2442
0.05	2911	2487	—	2699
0.10	2462	—	2662	2462

* Note: $n = 200\text{r/min}$, $t = 96\text{h}$

表 1 示出:捕集剂添加浓度过小,对 NH_4^+ 作用不大,添加浓度过大, NH_4^+ 过多吸附,由于吸附和脱附过程均与 NH_4^+ 所处微观环境有关,捕集剂的添加水平直接影响发酵液酸碱水平,因此必有一最佳值。

由表可以看出,添加少量捕集剂,可使抗生素生物合成增长 15%~24% 以上。

2.2 发酵罐实验

2.2.1 添加捕集剂后 pH 变化情况: 大生产实验与小试实验均表明,添加捕集剂后整个发酵过程中 pH 值变化比较平稳, pH 变化在 6.4~7.0 之间,这对于抗生素生物合成极为有利,这也可能是捕集剂提高发酵水平的一个重要原因。

2.2.2 发酵过程中溶氧变化: 本研究探索的优化工艺配方及其组合能较好地控制发酵过程中溶氧浓度,在进入分泌期后溶氧一直在 30% 左右,从而有效提高了红霉素发酵单位。

这一方面是由于发酵液粘度趋于不变,菌体处于稳定生长期,菌体呼吸趋于恒定,因此在定量不变供气条件下,溶氧水平不变,并且优化工艺能使 DO 水平保持在溶氧限制水平以上。

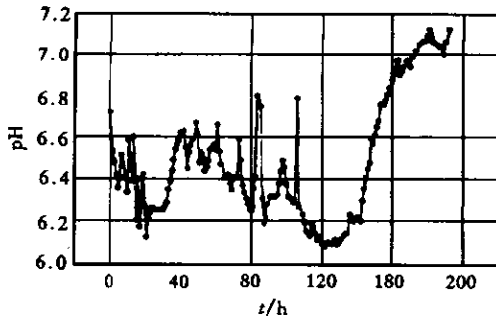


图 4 未加捕集剂前罐发酵 pH 变化情况

Fig.4 The variation of pH value during the process of the old technical ferment

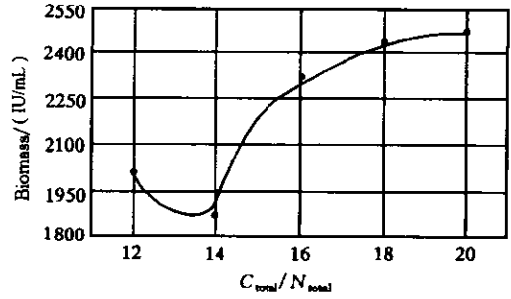


图 3 不同碳氮比对红霉素发酵水平的影响

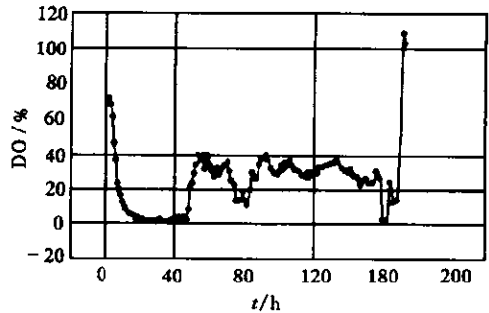
Fig.3 The effect of C/N on the production of erythrus-mycin
 $n = 200\text{r/min}$, $t = 96\text{h}$ 

图 5 罐发酵过程中溶氧变化情况

Fig.5 The variation of DO during the process of new researched technical ferment

3 结 论

对抗噬 68[#] 菌种的红霉素生物合成所需工艺条件进行研究, 得出较为优化的工艺条件, 提高了红霉素发酵水平, 对照实验可高出工厂水平 10%~25%。

对无机氮源、碳氮比、快速氮源与慢速氮源的优化组合进行研究, 得出快速碳源与慢速碳源之比为 2.64 时最有利于 68[#] 抗噬菌种的生物合成, 其水平较对照水平提高 13%。

参 考 文 献

- [1] 马培奇.《医药经济信息》, 203:15.
- [2] 马培奇.《医药经济信息》, 203:17.
- [3] 郑善良, 胡宝龙. 微生物学实验, 北京: 高等教育出版社, 1989, pp. 157~158.
- [4] 佛明仪, 贺建勋. 数理统计分析 with 实验设计, 西安: 西北大学出版社, 1992, 附录 2.
- [5] 肖明耀. 实验误差估计与数据处理, 北京: 科学出版社, 1979, pp. 156~157.
- [6] M. E. Flors, S. Sanchez. *Fems. Microbiol. lett.*, 1985, 26(2): 191~194.
- [7] O. Sataghi. *J. Antibiotics*, 1980, 33(12): 1568~1569.
- [8] T. Yashitaha. *Agr. Biol. Chem.*, 1981, 45(11): 2475~2481.
- [9] N. M. Kalininad. *Antibiotiki*, 1983, 28(6): 410~412.

The Improvement of Fermentation Technical Parameters for the Erythrus-mycin Formation*

Fan Daidi¹ Chen Bin¹ Shang Longan¹ Shen Lixin¹ Li Baozhang¹

Sun Jianmin² Zhang Li² Yang Suidong²

¹(Chemical Engineering Department of Northwest University, Xi'an 710069)

²(Xi'an Pharmaceutical Factory, Xi'an 710077)

Abstract Several fermentation parameters had been observed relating to erythrus-mycin formation. The conditions of the strain growth and metabolism had been revealed. The substrate of the carbon, the nitrogen as well as the proportion of the carbon to the nitrogen in the media and the effect of the addition of the absorption agent on the fermentation were studied. The optimal media and technical parameters were obtained.

Key words Erythrus-mycin, technical parameters, optimum

* Supported by Project of Shanxi Province, National Programs for Science and Technology Development(No. 96K12-G11).