

腐霉素发酵工艺的研究

崔龙泽 张露茜 叶绪慰 王杨声 毛维颖

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 本文报道吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) A-1080 菌在小型发酵罐上产生腐霉素 (Carriomycin) 的研究结果。在发酵罐中进行了通气、搅拌、补加葡萄糖调节碳源浓度及控制溶氧水平等试验,使腐霉素的产量从摇瓶的 2000 $\mu\text{g/ml}$ 提高到 3000 $\mu\text{g/ml}$ 以上,为工业生产打下了基础。

关键词 腐霉素;吸水链霉菌;发酵工艺

腐霉素是由吸水链霉菌产生的一种多醚类抗生素,对枯草杆菌、金黄色葡萄球菌及其他一些革兰氏阳性菌和某些真菌有抑制作用,特别是对球虫有较强的抑制作用,目前主要用于治疗鸡、鸭等家禽的球虫病。它与同类抗生素莫能菌素 (Monensin) 相比较,毒性较低。

腐霉素最初由日本的今田哲 (Akira Ima-da)^[1-3] 等报道,但文章未涉及发酵工艺及生产能力等内容。国内至今也未见这方面的报道。我们在实验室工作的基础上^[4],进行了扩大试验,确定了小罐的发酵工艺条件,为工业生产提

供了依据。

材料与方 法

(一) 菌种

链霉菌 A-1080 属于吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*)。

(二) 操作条件

种子: 在 5000 ml 三角瓶中,装 300 ml 培养液,其组分为(%): 葡萄糖 2,可溶性淀粉 3,黄豆饼粉 1,玉米浆 1,蛋白胨 1,NaCl 0.5 CaCO₃ 0.3,灭菌前 pH 7.2, 121℃ 灭菌 30 分钟。摇

床转速为 250r/min, 温度 28℃, 培养 48 小时。

发酵: 16L 发酵罐上装 10 L 培养液, 其基础组分为 (%): 葡萄糖 2, 淀粉 2, 糊精 2, 玉米浆 0.5, 蛋白胨 0.5, NaCl 0.5, 酵母粉 1, $Fe_2(SO_4)_3$ 0.03, $CaCO_3$ 0.5。灭菌前 pH 7.2, 121℃ 30 分钟实罐灭菌。温度 28℃, 罐压 0.5 kg/cm² (表压)。接种量 300ml。

(三) 仪器与设备

1. 美国 New Brunswick Scientific 公司 SF-116 发酵罐, 带 Gen II 微机控制系统。

2. 美国 New Brunswick Scientific 公司 G 25 摇床。

3. 国产 721 分光光度计。

(四) 分析方法

1. 生物效价测定: 用牛肉膏葡萄糖琼脂培养基, 双层杯碟法。测定菌为枯草杆菌 AS. 1.338。取 2ml 发酵液, 加入 6ml 甲醇, 振荡 5 分钟。取上清液, 用蒸馏水稀释到适当浓度。通过标准曲线计算效价。

2. 还原糖: 3.5-二硝基水杨酸法^[6]。

结 果

(一) 控制碳源浓度对效价的影响

发酵过程中, 补加糖液调节碳源浓度是抗生素生产中常用的方法^[7]。发酵 72 小时, 发酵液中还原糖的浓度为 1% 左右开始补糖。实验分为三组。A 组采用上述基础培养基; B 组在基础培养基中发酵开始就多加 1% 葡萄糖; C 组即补加糖试验, 采用基础培养基, 补加葡萄糖总量亦为 1%。将葡萄糖配成 30% 溶液。每小时均匀补加一次, 全部溶液 20 小时补完。三组实验中, 通气量均采用 1:0.5 vvm。搅拌转速随发酵进程变化。0—25 小时为 600 r/min, 25—32 小时为 700 r/min, 32 小时至放罐为 800 r/min。溶氧值始终保持大于 15% 初始值。

实验表明, A 组发酵后期碳源不足, 不利于腐霉素的产生。B 组发酵初始糖浓度过高, 对发酵也不利。发酵液经离心所得表观菌体量大于其他两组。菌体生长过多看来是腐霉素产量

不高的原因。C 组发酵采用了补糖工艺、避免了 A 组与 B 组中的不利情况, 腐霉素产量最高 (图 1、2)。

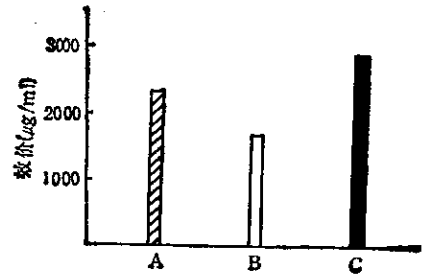


图 1 三组发酵效价比较

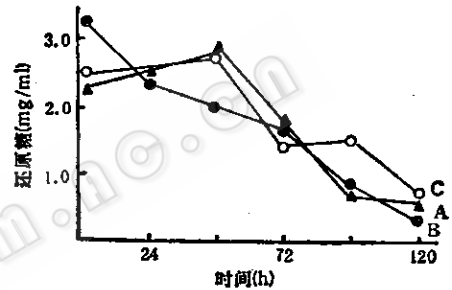


图 2 三组发酵还原糖分析

(二) 通气搅拌对效价的影响

在发酵工厂中, 发酵罐的搅拌转速一般是固定的, 而改变发酵罐的通气量比较容易做到。我们分别考察了改变搅拌和通气量对发酵的影响。实验分 D, E 两组。在其他条件相同的情况下, D 组与前面 C 组相似。随着发酵进程改变搅拌转速。但两组实验改变转速的时间不完全一样。这是由于各批发酵中, 种子质量和消毒条件很难完全一致; 在发酵过程前期, 溶氧下降速度也并不是完全同步的。D 组发酵搅拌转速 0—50 小时为 600 r/min, 50—66 小时为 700 r/min, 66 小时至放罐为 800 r/min。E 组发酵搅拌转速始终为 600 r/min, 从 40 小时开始, 将通气量由 1:0.5 增加到 1:1 vvm。两组实验中溶氧值和效价的变化情况见图 3。实验结果表明, E 组发酵明显不如 D 组发酵。众所周知, 提高发酵罐, 尤其是小型发酵罐的搅拌转

速,比提高发酵罐的通气量,更有利于溶氧的提高^[4]。我们的实验也证实了这一点。但值得指出的是,提高搅拌转速比提高通气量更有助于发酵液的混合。下面的实验将进一步证明,保持一定溶氧水平固然重要,但对腐霉菌发酵来说,必须保持足够的搅拌转速,使发酵液尽可能接近理想混合状态。在D组发酵中,搅拌叶轮端速为2.2 m/s—2.93 m/s。

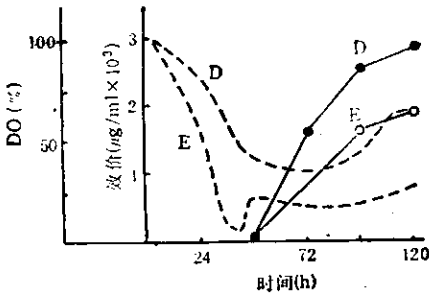


图3 通气搅拌对效价的影响
----- 溶氧, —— 效价

(三) 发酵液混合程度对效价的影响

SF-116 发酵罐可实现溶氧自动控制。但在腐霉菌发酵中,离开发酵液混合情况,单独考虑溶氧水平意义不大。

实验中,溶氧水平的控制点设定在50%初始值。溶氧大于或处于这一水平时,搅拌转速为600 r/min。当溶氧低于50%时,搅拌转速自动增加,使溶氧水平得以提高。搅拌转速的高限为1000 r/min。从实验结果看,效果并不好,效价只有1210 μg/ml。究其原因,虽然在整个发酵过程中保持了较高的溶氧水平,但大部分时间搅拌转速处于600 r/min,不能保证发酵液的充分混合。尤其在发酵后期,由于菌丝量多,发酵液粘度高,混合情况更差。实验表明,象腐霉菌这类抗生素发酵,由于发酵液具有非牛顿型流体的性质,发酵液的混合程度对发酵的成败是至关重要的。

(四) 发酵过程

通过上述实验,确定了补糖(条件同C组)和改变搅拌转速(条件同D组实验)的工艺。发酵过程的pH、溶氧、还原糖和效价情况见图4。

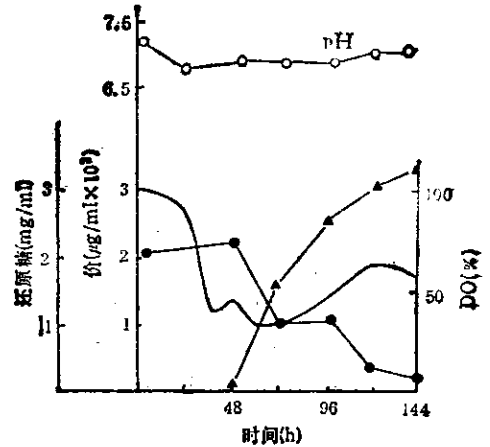


图4 腐霉菌发酵过程

●—● 还原糖 ▲—▲ 效价 —— 溶氧

由于分阶段增加搅拌转速,溶氧的谷底值保持在32%初始值。

从发酵开始到48小时,还原糖有所回升,这与培养基中多糖分解成葡萄糖有关。72小时开始补加葡萄糖,在加糖期间,还原糖浓度略有回升。发酵48小时后开始产生腐霉菌效价,到120小时达3000 μg/ml以上。延长周期,效价能继续增加,但给提取带来困难。所以在目前工艺条件下,发酵周期以120小时为宜。

讨 论

通过实验确定了工艺条件,使腐霉菌产量有较大幅度的提高。补糖工艺无疑是十分有效的,但目前还是凭经验补加。更好的补加工工艺,乃至实现模型化,还需进一步研究。菌体量过多对发酵不利,其适量范围值得进一步摸索。

虽然在腐霉菌发酵中维持充分混合比控制溶氧水平更为重要,但并不意味着溶氧水平对发酵不重要。只是在我们的实验条件下,只要维持充分的混合,就能保证足够的溶氧。

参 考 文 献

- [1] Imada, A. et al.: J. Antibiotic, 34(1):7, 1978.
- [2] 日本公开特许: 昭51-35494, 1978.
- [3] 日本公开特许: 昭51-7973, 1976.
- [4] 日本公开特许: 昭52-83805, 1977.
- [5] 叶绪麒, 许怡: 抗生素, 12(6):433, 1987.

- [6] Summer. J. B.: J. Biol. Chem., 65:393, 1925. Technology, ch. 9, John Wiley and Sons, New York, 1979.
- [7] 毛维颖: 生物工程学报, 2(2):19, 1986。
- [8] Wang, D. I. C. et al.: Fermentation and Enzyme