

间歇补料对小单孢菌产庆大霉素的影响

范一文, 靳坤, 郭家伟, 刘蓓蕾, 李法远, 何平

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 在 10 L 发酵罐中研究了间歇补料对小单孢菌发酵生产庆大霉素的影响, 以期提高庆大霉素的产量, 为建立生物制药工艺综合性实验奠定基础。在保持发酵罐 pH 恒定的基础上, 以摇瓶发酵优化条件作为发酵罐初始发酵条件, 分别采用不同的间歇补料方式, 在发酵的初期、中期和后期流加糊化玉米淀粉, 探索较优的碳源补料方式。结果表明, 少量多次补料方式的发酵水平优于多量少次补料方式。在少量多次补料方式的基础上, 增加溶氧量, 不仅延长了产素期, 而且发酵水平较初始发酵提高了 87.3%。说明优化后的间歇补料方式不仅延长了发酵周期, 而且提高了庆大霉素发酵产量。

关键词: 间歇补料; 小单孢菌; 庆大霉素

文章编号: 1673-9078(2012)11-1551-1553

Influence of Fed-batch Fermentation on Gentamicin Production of *Micromonospora*

FAN Yi-wen, JIN-shen, GUO Jia-wei, LIU Bei-lei, LI Fa-yuan, HE-ping

(College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to enhance gentamicin production and build up the foundation for comprehensive experiment in Bio-pharmaceutical Technology, the influence of fed-batch fermentation on the gentamicin production of *Micromonospora* in a 10 L fermentor was studied. The result showed that fermentation production under frequent small amounts feeding pattern was better than that under the feeding pattern with large amounts at once. Increasing the amount of dissolved oxygen under the frequent small amounts feeding pattern not only extended production phase, but also increased fermentation productivity to 87.3%. It was concluded that the optimized fed-batch pattern can not only extend fermentation period, but also improve the yield of gentamicin.

Key words: fed-batch fermentation; micromonospora; gentamicin

庆大霉素是由放线菌属小单孢菌发酵产生的氨基糖苷类广谱抗生素, 对多种革兰阴性菌(如大肠杆菌、沙门菌等)和金黄色葡萄球菌(包括 β -内酰胺酶菌株)具有抗菌作用^[1-4], 不仅在临床上具有广泛的应用, 而且发现庆大霉素能促进饲料的利用率, 在禽畜体内不留残毒或低残毒^[5], 于是又被广泛用于畜牧业, 生产“绿色食品”。

庆大霉素是采用深层液态发酵法生产的, 目前国内生产水平不高, 且发酵周期长、产素率低、成本高。因此为提高庆大霉素生产水平、降低成本, 国内研究多集中在高产菌株的筛选、培养基的优化、发酵工艺的研究和庆大霉素胞外分泌的研究等方面, 其中发酵工艺的改进对发酵水平的提高有至关重要的作用^[6]。

碳源在抗生素的发酵生产中是菌体生长、繁殖和抗生素合成的重要原料和能量来源, 碳源的浓度水平

最直接地反映了微生物细胞的代谢和呼吸活性, 左右发酵培养过程中的代谢走向和各类代谢产物的生成状况。因此, 在许多微生物发酵和培养过程中控制碳源浓度是实现过程优化的关键^[7]。在发酵过程中流加补入碳源可以控制微生物的中间代谢, 使发酵向着有利于产物积累的方向发展, 并可以根据具体情况, 通过实验研究确定最合适的控制方法, 由此可以解除发酵过程中葡萄糖的分解阻遏效应, 促进菌体进行次级代谢产物的合成^[8]。庆大霉素是小单孢菌生长的次级代谢产物, 根据小单孢菌的生长和庆大霉素合成的代谢规律, 通过调节发酵过程中的流加方式, 可以使庆大霉素合成期有足够而又不过量的碳源, 延长庆大霉素的分泌期, 提高庆大霉素的产量。

生物制药工艺学是我学院生物制药专业的一门重要专业课程, 建立包含专业多个知识点的综合性实验十分必要^[9]。本课题组以庆大霉素的制取工艺为主线, 申报了“庆大霉素的发酵、提取、制片及片剂分析综合性实验”项目, 分别进行了小单孢菌液体发酵生产庆大

收稿日期: 2012-07-12

作者简介: 范一文 (1968-), 女, 讲师, 主要从事生物制药及其药物分析实验室工作

毒素的培养基优化研究^[10]、庆大霉素发酵液的分离提取研究^[11]。以期为庆大霉素的制片研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和试剂

绛红小单胞菌, 广东省微生物研究所提供, 由本课题组保藏。实验所用试剂均为分析纯。

1.1.2 培养基:

种子培养基(%): 淀粉 1.5, 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 0.5, 酵母粉 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05, K_2HPO_4 0.05, NaCl 0.05, MgSO_4 0.05, CaCO_3 0.1, 用蒸馏水定容至 100 mL, 调 pH 至 7.5, 121 °C 灭菌 20 min, 分装两瓶 (50 mL/250 mL 三角瓶)。

初始发酵培养基(%): 玉米淀粉 5, 葡萄糖 0.5, 黄豆饼粉 3, 玉米浆粉 0.5, 蛋白胨 0.3, KNO_3 0.05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05, CaCO_3 0.5, CoCl_2 0.0008, 甘氨酸 0.01, 蛋氨酸 0.02, 赖氨酸 0.015, 酪氨酸 0.01, 泡敌 0.01, 调 pH 至 7.2。

用于发酵罐补料的糊化淀粉: 称取 200 g 玉米淀粉, 加入少量水, 搅拌溶解混匀, 缓慢倒入煮沸的水中, 并保持不断搅拌, 加入 0.5 g 淀粉酶, 并加水至 800 mL, 搅拌至溶液颜色变黄, 溶液呈糊状即可, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 仪器

10 L 发酵罐 (上海格物生物工程设备有限公司); 摇床 (太仓市华利达试验设备有限公司); 分析天平 (BS 323S, 北京赛多利斯仪器系统有限公司); pH 酸度计 (PHS-3C 型, 上海雷磁仪器厂); 紫外分光光度计 (UV-3100PC 型, 上海美谱达仪器设备厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

种子培养: 用接种环挑起适量培养好的斜面菌种, 接种于装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 置于摇床中, 34 °C, 240 r/min 培养 60 h, 使菌体处于对数生长期, 作为种子液备用。

初始发酵条件培养: 发酵罐体积为 10 L, 装液量为 6 L, 接种量为 5%, 培养温度 34 °C, 罐压 0.05 MPa, 空气流量 200 L/h, 转速 200 r/min, 发酵过程中流加 25% 的氨水控制发酵液的 pH, pH 维持在 7.0。

1.2.2 分析测定方法

1.2.2.1 菌体干重的测定

取有精确刻度的 15 mL 离心管, 在烘箱中烘至恒重, 并称得其重量。准确量取 10 mL 发酵液样品, 装于离心管中, 在高速离心机中 5000 r/min 离心 30 min

后, 倒掉上清液, 再向离心管中加入无菌水至 10 mL, 置于振荡器上, 将下层菌体摇散混匀, 随后继续置于高速离心机中 5000 r/min 离心 30 min, 倒掉上清液, 将离心管置于烘箱中, 100 °C 烘 24 h 至恒重, 称得重量, 即可得到 10 mL 发酵液样品中菌体的干重。

1.2.2.2 还原糖浓度的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS 法) 测定^[12]

1.2.2.3 氨基氮浓度的测定

采用甲醛滴定氨基氮法测定^[13]

1.2.2.4 庆大霉素的效价测定

效价测定前对发酵液进行预处理: 调节发酵液 pH 到 1.5~2.0, 搅拌酸化 30 min, 加 NaOH 中和至 6.4~6.8, 高速离心 12 min, 取上清液备用。庆大霉素效价测定采用磷酸钠紫外分光光度法^[10,14]。根据磷酸钠与庆大霉素反应生成相对稳定的沉淀, 其滤液吸光度与磷酸钠残留量呈线性关系, 建立标准曲线。测定样品与磷酸钠反应后的滤液吸光度, 从而确定庆大霉素的效价。

2 结果与分析

2.1 初始发酵条件对小单胞菌产庆大霉素的影响

本课题组关于庆大霉素的液体发酵已经做了摇瓶阶段的优化研究^[10], 本论文是在此基础上确定了初始发酵条件。初始发酵结果表明, 小单胞菌在发酵 12 h 左右进入对数生长期, 24 h 左右进入稳定期, 庆大霉素开始产生并分泌, 72 h 后随着发酵液中营养物质的消耗以及代谢产物的不断积累, 使菌体细胞进入衰亡期并加速裂解, 菌体浓度降低, 庆大霉素产量也趋于减少。

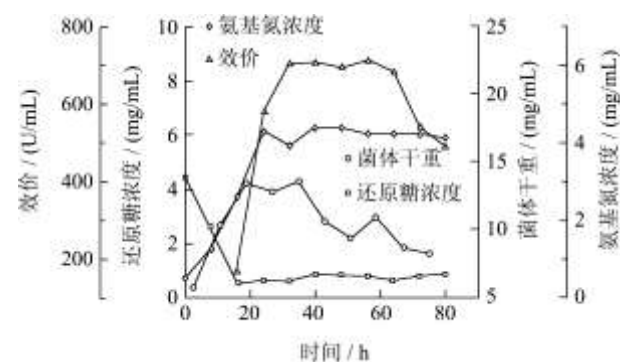


图 1 初始发酵条件的发酵代谢曲线

Fig.1 Metabolic curve of fermentation under initial fermentation condition

碳水化合物是微生物细胞生长、繁殖以及合成抗生素的基础原料, 它的消耗直接反映了生命的代谢过程。由图 1 可见接种后微生物快速利用糖, 20 h 左右维持在一个较低恒定的水平。可能在菌体生长初期,

菌体大量利用还原糖来促进菌体的生长,即葡萄糖效应,之后菌体进入产素期,由于营养物质不足,菌体细胞过早衰亡、裂解,糖代谢减弱,糖浓度很快趋于稳定,整个产素期也因而缩短。

氨基氮是菌体在发酵过程中,利用培养基中的营养物质进行生长繁殖的代谢产物。本研究中,由于一直流加氨水维持发酵液的pH,氮源丰富,氨基氮水平在菌体快速生长期不降反升,后随着菌体的衰亡、裂解,发酵液中氨基氮水平趋于稳定。

碳源、氮源是菌体生长、产素所需的重要营养物质,由图1的结果分析可知,菌体发酵过程中,氮源丰富,碳源不足,菌体过早进入衰亡期,产素水平也不高,由此确定必须对整个发酵过程进行碳源补料。

2.2 不同的补料方式对小单胞菌产庆大霉素的影响

碳源补料是控制中间代谢、提高产量的一个灵活而有效的手段,但应该根据具体菌种或培养条件、确定最适的补料量和补料方式。本研究根据初始发酵的结果,在一直补充氮源的同时,采用两种间歇补料方式进行碳源补料,并对两种方式进行了比较,以确定一种较优的补料方式。

方式一-多量少次间歇补料:分别在在对数生长期、生长末期、稳定期、稳定中后期进行碳源补料,即在发酵12h、24h、48h、64h补入糊化淀粉各800mL,合计3200mL。

方式二-少量多次间歇补料:从发酵12h起,每隔8h补入糊化淀粉400mL,合计3200mL。

分别检测了两种间歇补料方式发酵液的还原糖浓度、氨基氮浓度、菌体干重、庆大霉素效价等指标,结果见下表。由表中可以看出,各项代谢指标方式二均好于方式一。故将方式二作为较优的碳源补料方式。

表1 不同补料方式发酵罐主要参数

Table 1 Main parameters of fermenter under different feeding patterns

补料方式	菌体干重 (mg/mL)	还原糖 (mg/mL)	氨基氮 (mg/mL)	效价 (mg/mL)
多量少次补料	12	0.8	5.2	801
少量多次补料	14	1.2	5.7	1115

2.3 增加溶氧对小单胞菌产庆大霉素的影响

小单胞菌属于需氧菌,需要在有氧的条件下才能生长、繁殖与分泌抗生素。氧不仅是代谢所需的,而且也是细胞和抗生素的组成元素。生物的代谢途径主要靠三羧循环,在此过程中氧分子处于关键地位,所以为了保证菌体的正常代谢,就必须供给足够的氧气。发酵过程中影响溶氧量的主要是通入无菌空气的流量与发酵罐搅拌转速,本研究在较优间歇碳源补料方式

下,通过改变无菌空气的流量与发酵罐搅拌转速来达到增加溶氧量的目的。经过初步实验,将无菌空气通入量提升为300L/h,发酵罐搅拌转速调整为300r/min,由此发酵条件进行发酵,发酵结果见图2。由图可以看出,庆大霉素发酵水平整体得到提高,而且产素期延长至5d。

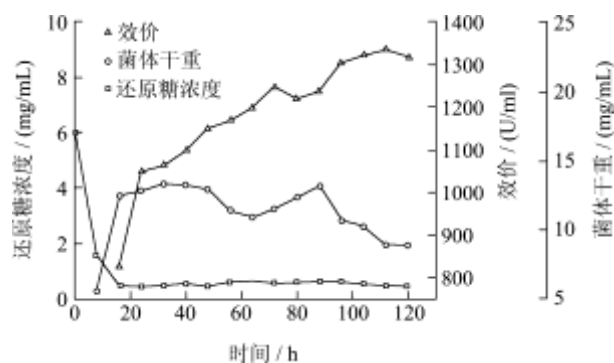


图2 优化间歇补料方式的发酵代谢曲线

Fig.2 Metabolic curve of optimized fed-batch fermentation

3 结论

3.1 在微生物发酵过程中,控制碳源浓度是实现过程优化的关键。采用间歇补料分批发酵技术可以解除高浓度基质抑制和葡萄糖分解阻遏效应,以及避免在分批发酵中一次性投糖过多造成细胞大量生长,耗氧过多而供养不足的状况^[15]。对于好氧发酵,发酵液溶氧水平不仅影响与呼吸链有关的能量代谢,从而影响微生物的生长,而且直接影响产物的合成。本研究选择较优的碳源补料方式,并通过提高空气流量、搅拌转速增加发酵液溶氧水平,庆大霉素产量得到明显提高。效价较初始发酵提高了87.3%,产素周期也延长到5d。

3.2 本研究是“庆大霉素的发酵、提取、制片及片剂分析综合性实验”项目中的一个关键环节,在今后进一步的研究实验中,我们将着手利用薄层色谱、HPLC等技术手段对发酵液庆大霉素组份进行分析研究,希望获得更优的补料工艺,改善发酵液庆大霉素组份,进一步提高庆大霉素产量,为庆大霉素的制剂研究奠定基础。

参考文献

- [1] 卢亚林,万军,周丽娜.头孢曲松和庆大霉素对铜绿假单胞菌协同作用的探讨[J].实用医技杂志,2006,13(20):3574-3575
- [2] 熊南燕,王雪玲,曹明耀,等.鱼腥草注射液对硫酸庆大霉素兔体内抗菌作用的影响[J].现代中西医结合杂志,2007,1(24):3471-3472

- [3] 高辉,敖康,涂国全.棘孢小单孢菌原生质体制备条件的优化[J].现代食品科技,2010,26(2):184-187
- [4] 卓如意,董伟,张旭.靶向硫酸庆大霉素的制备及体外抗菌试验[J].动物医学进展,2008,29(1):36-39
- [5] 沈川,肖希龙.新霉素在动物体内的残留及其测定方法[J].中国兽医杂志,1998,32(2):53-56
- [6] 郭家瑞,王卫国,李磊,等.庆大霉素研究概述[J].海峡药学,2009,21(10):5-8
- [7] 何艳玲,鄢建国,路福平,等.间歇补料分批发酵提高那他霉素产量[J].药物生物技术,2002,9(4):224-226
- [8] 怀丽华,寇广会,周昌平,等.碳氮源对酶法合成 L-半胱氨酸的影响[J].现代食品科技,2006,22(4):85-87
- [9] 范一文,吴晓英.生物制药专业综合性实验教学改革[J].化工高等教育,2011,28(4):62-64
- [10] 范一文,吴晓英.紫外分光光度法快速测定庆大霉素含量在优化培养基中的应用[J].中国抗生素杂志,2011,36(6):
- [11] 范一文,梁伟凡,李嘉胜,等.庆大霉素发酵液的分离提取[J].实验室研究与探索,2011,30(8):28-31
- [12] 张龙翔,张庭芳.生物化学试验方法与技术[M].北京:高教出版社,1997
- [13] 王秀奇,秦淑媛,高天慧,等.基础生物化学实验(第2版)[M].北京:高等教育出版社,1999
- [14] 刘本发,吴兆亮,郝冬霞,等.紫外分光光度法快速测定庆大霉素发酵液中庆大霉素浓度及其机理[J].中国抗生素杂志,2002,27(3):166-169
- [15] 申屠旭萍,俞晓平.分批发酵和补料分批发酵生产木霉素的研究[J].中国生物防治,2010,26(4):492-496