

暗霉素产生菌 F₋₂₁₁ 发酵工艺完善的研究*

洪文荣 郭养浩 孟 春 石贤爱 陈剑峰 刘致新¹ 陈生裕¹

(福州大学生物工程系, 福州 350002; ¹ 福州福益制药有限公司, 福州 350002)

摘要 采用正交试验法研究深层发酵培养黑暗链霉菌 F₋₂₁₁的培养基组成。实验结果表明, 合理的培养基组成是(%): 葡萄糖 1.5; 玉米粉 2.0; 硫酸镁 0.5; 玉米淀粉 2.0; 豆油 1.1; 碳酸钙 0.7; 黄豆粉 3.5; 硫酸锌 0.01; 硫酸铵 0.7; 淀粉酶 0.025。实验结果还显示, 在天然培养基中, 无需再加铁、锰金属元素。研究发现, 黑暗链霉菌孢子发芽对机械剪切敏感, 利用孢子接种培养一级种子, 采用空气搅拌, 能得到良好的生长菌丝。菌丝浓度对暗霉素发酵生产水平影响显著, 过高过低的菌丝浓度对菌体合成暗霉素均不利。采用改变空气流量来控制菌丝浓度, 使其维持在推荐的曲线上, 不至于过高或过低是一个好办法, 可以有效地提高并稳定暗霉素的发酵水平。

关键词 暗霉素; 发酵; 正交试验; 妥布霉素

黑暗链霉菌 F₋₂₁₁ 经深层发酵产生暗霉素^[1]。

暗霉素由很多组分组成^[2], 其中主要组分为阿泊拉霉素, 6"-O-氨基甲酰卡那霉素 B 和 6"-O-氨基甲酰妥布霉素。6"-O-氨基甲酰妥布霉素经酸或碱催化水解后即为妥布霉素^[3]。妥布霉素属氨基糖苷类抗生素, 已在临幊上广泛使用。在低浓度下, 能抑制革兰氏阴性菌的生长, 它有很强的抗绿脓杆菌作用, 比其它氨基糖苷类抗生素强 28 倍^[4]。暗霉素发现于 70 年代, 但我国直到 90 年代, 才进入小规模工业化生产, 且生产水平提高缓慢, 发酵水平波动大, 为了提高发酵生产水平, 完善发酵工艺控制, 本文有针对性地对发酵生产的培养基进行了筛选, 并对影响发酵单位的关键参数进行探讨, 找出影响发酵水平的主要因素, 并提出控制方法, 取得了良好的效果。从研究结果导出了合理的暗霉素发酵代谢曲线图。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

菌种: 黑暗链霉菌 F₋₂₁₁。妥布霉素标准品和生测培养基: 中国药品生物制品检定所。培养基: 工业化生产上使用的。摇瓶机: 220 r/min。台式离心机: 80-2, 4000 r/min, 20M L×12。发酵罐: 2000 L, 180 r/min。

1.2 分析方法

发酵单位: 生物检定法^[5]。

菌丝浓度: 取发酵液 10 ml, 于 2500 r/min 下离心 3 min, 去上清液后的固体物作为相对菌丝浓度。

其它项目: 总糖、还原糖、氨基氮、温度、pH 等均采用工业化常规分析法^[6]。

2 结 果

2.1 培养基成分的确定^[7]

2.1.1 培养基中营养成分对暗霉素发酵单位的影响 用 L₂₇(3¹³) 正交表^[8] 对已筛选的常用 13 种培养基成分: 葡萄糖, 玉米淀粉, 玉米粉, 黄豆粉, 硫酸锌, 硫酸镁, 鱼粉, 硫酸铵, 碳酸钙, 蚕蛹粉, 豆油, 谷氨酸钠, 淀粉酶的 3 个水平进行考察, 每个 500 ml 三角瓶装 60 ml, 结果见表 1。它们对暗霉素发酵单位影响从大到小依次为: 硫酸铵, 玉米粉, 硫酸镁, 玉米淀粉, 豆油, 碳酸钙, 黄豆粉, 葡萄糖, 硫酸锌, 蚕蛹粉, 鱼粉, 谷氨酸钠, 淀粉酶。将蚕蛹粉, 鱼粉, 谷氨酸钠三个影响小的成分去除, 但保留淀粉酶。去除简化后的培养基组成, 经反复试验, 对暗霉素发酵单位没有影响, 因此最后培养基组成确定为(%): 葡萄糖 1.5; 玉米粉 2.0; 硫酸镁 0.5; 玉米淀粉 2.0; 豆油 1.1; 碳酸钙 0.7; 黄豆粉 3.5; 硫酸锌 0.01; 硫酸铵 0.7; 淀粉酶 0.025。

Tab 1. Orthogonal layout of effect of medium constitution on nebramycin products

No.	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e	6 ^f	7 ^g	8 ^h	9 ⁱ	10 ^j	11 ^k	12 ^l	13 ^m	$\mu\text{g}/\text{ml}$
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3653
	(1.0)	(2.0)	(2.0)	(3.5)	(0.7)	(0.6)	(0.7)	(0.7)	0.001	(0.3)	(1.3)	(0.1)	0.050	
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3753
					(0.4)	(0.8)	(0.8)	(0.6)	0.01	(0.8)	(1.1)	0.08	0.005	
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2058
					(0.2)	(0.3)	(0.5)	(0.8)	0.08	(0.5)	(0.8)	0.06	0.025	
4	1	2	2	2	1	1	1	2	3	2	3	2	3	2817
		(3.0)	(3.0)	(4.0)										
5	1	2	2	2	2	2	2	3	1	3	1	3	1	2842
6	1	2	2	2	3	3	3	1	2	1	2	1	2	1933
7	1	3	3	3	1	1	1	3	2	3	2	3	2	2251
		(1.0)	(1.0)	(2.5)										
8	1	3	3	3	2	2	2	1	3	1	3	1	3	832
9	1	3	3	3	3	3	3	2	1	2	1	2	1	910
10	2	1	2	3	1	2	3	1	1	2	3	3	2	2055
					(3.0)									
11	2	1	2	3	2	3	1	2	2	3	1	1	3	3462
12	2	1	2	3	3	1	2	3	3	1	2	2	1	1799
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	3	2	1	1	1767
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	1	3	2	2	1690
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	2	1	3	3	2817
16	2	3	1	2	1	2	3	3	2	1	1	2	3	1898
17	2	3	1	2	2	3	1	1	3	2	2	3	1	3400
18	2	3	1	2	3	1	2	2	1	3	3	1	2	2152
19	3	1	3	2	1	3	2	1	1	3	2	2	3	3310
					(1.5)									
20	3	1	3	2	2	1	3	2	2	1	3	3	1	1848
21	3	1	3	2	3	2	1	3	3	2	1	1	2	2767
22	3	2	1	3	1	3	2	2	3	1	1	3	2	2021
23	3	2	1	3	2	1	3	3	1	2	2	1	3	2500
24	3	2	1	3	3	2	1	1	2	3	3	2	1	3439
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	2	3	1	1	1968
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	3	1	2	2	2971
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	1	2	3	3	3165
K ₁	21049	24708	24874	23842	21743	22808	26644	24413	22280	18839	23341	21034	21626	
K ₂	21043	21826	23015	22967	23298	22521	21494	21895	23369	22990	23878	22587	21596	
K ₃	23989	19547	18192	20182	21040	20752	17943	19773	20432	24252	18862	22460	22859	
Range	2946	5156	6682	3660	2258	2056	8701	4640	2937	5413	5016	1553	1235	

a. glucose b. corn starch c. corn meal d. soybean cake meal e. silk worm chrysalis meal f. fish meal g. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ h. CaCO_3 i. ZnSO_4 j. MgSO_4 k. Soybean oil l. sodium glutamate m. starch enzyme. Fermentation was carried out in 500 ml flask on 220 r/min shaker for 112 hours (temperature 37°C), medium(%), pH natural, 60 ml/500ml flask.

2.1.2 培养基中外加金属离子对暗霉素发酵单位的影响^[9] 用以上确定了的培养基[2.1.1], 再用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 增加对硫酸镁, 硫酸锌, 硫酸亚铁, 硫酸锰的三个水平对发酵单位的影响, 主要

考察金属离子 Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} 对暗霉素最终发酵单位的影响, 条件同表 1, 结果见表 2。从结果看, 它们的影响从大到小的次序为: 镁; 锌; 锰; 铁。

Tab 2. Orthogonal layout of effect of metal ion on nebramycin products

No.	MgSO ₄ (%)	ZnSO ₄ (%)	FeSO ₄ (%)	MnSO ₄ (%)	$\mu\text{g}/\text{ml}$ (Nebramycin)
1	1(0.4)	1(0.01)	1(0.006)	1(0.03)	3812
2	1	2(0.001)	2(0.06)	2(0.01)	3496
3	1	3(0.1)	3(0.1)	3(0.1)	3328
4	2(0.5)	1	2	3	3924
5	2	2	3	1	3408
6	2	3	1	2	3756
7	3(0.8)	1	3	2	3100
8	3	2	1	3	2000
9	3	3	2	1	3072
K1	10636	10836	9568	10292	
K2	11088	8904	10492	10352	
K3	8172	10156	9836	9252	
Range	2924	1932	924	1100	

Other medium constitution is the same as [2.1.1]; Fermentation was carried out as the note of table 1

2.2 发酵工艺的研究^[10]

2.2.1 菌丝浓度与暗霉素发酵单位的影响 本试验在 2000 L 发酵罐中进行, 装料体积 500 L, 培养温度 37 °C, 发酵周期 112 h, 培养基组成[2.1.1]作为对照(a), 为了得到不同浓度的菌丝, 主要采用改变最易影响菌丝生长的黄豆饼粉的浓度来实现。为了得到较高浓度的菌丝, 将黄豆饼粉配比提高到 4.5(b); 为了获得较低浓度的菌丝, 将黄豆粉的配比下降为 1.5(c), 最后将菌丝浓度—发酵单位与时间的关系绘成图 1。

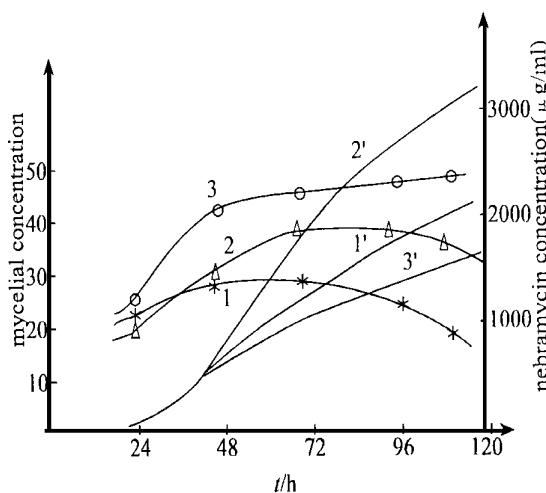


Fig. 1. Effect of mycelial concentration-time on nebramycin products. 1, 2, 3 different mycelial concentration. 1', 2', 3' nebramycin concentration responded to 1, 2, 3 respectively.

2.2.2 空气流量与暗霉素发酵单位的关系 试验同样是在 2000 L 发酵罐中进行, 培养基组成为[2.1.1]已确定的配方。以不同的空气流量来

实现不同的菌丝浓度。分三组:(1)为了达到高浓度的菌丝, 采用恒定的高通气流量 0.8 ($\text{m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$); (2)为了达到低的菌丝浓度, 采用恒定的低通气流量 0.1 ($\text{m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$); (3)视菌丝浓度的变化调整不同的通气流量(见图 2), 最后将空

气流量—菌丝浓度—发酵单位与时间的关系绘成图 2, 多次试验重复性良好。

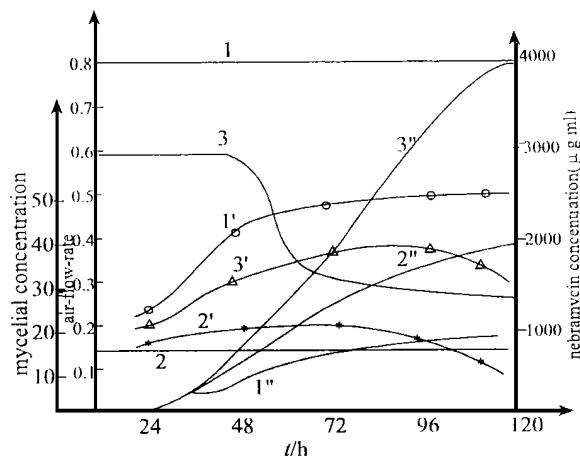


Fig. 2. Effect of air flow rate and mycelial concentration on nebramycin products. 1, 2, 3 different air flow rate. 1'', 2'', 3'' mycelial concentration responded to 1, 2, 3 respectively. 1', 2', 3' nebramycin concentration responded to 1, 2, 3 respectively

2.2.3 搅拌对黑暗链霉菌孢子发芽的影响 本试验在 1 m^3 发酵罐中进行, 装料 300 L, 搅拌转速 150 r/min, 培养基组成为(%): 葡萄糖 0.5; 玉米淀粉 1.0; 黄豆饼粉 1.0; 硫酸镁 0.5; 磷酸二氢钾 0.05; 碳酸钙 0.1。分三组进行, 实验安排与结果见表 3。

Tab 3. Effect of mechanical stir on spore germination

Experiment No.	1	2	3	
Culture time(h)	0~19	19~25	0~5	15~0~10~20
Rotative velocity(r/min)	150	0	0	0
Germination	-	+	++	- - -

(-) no germination; (+) germination (++) germination and growth good. Medium(%): glucose 0.5; corn starch 1.0; soybean cake meal 1.0; MgSO₄ 0.5; KH₂PO₄ 0.05; CaCO₃ 0.1. 37 °C, airflow-rate 0.8 m³/m²·min⁻¹.

2.2.4 不搅拌对暗霉素发酵单位的影响 本试验在2000 L 发酵罐中进行, 装料量800 L, 培养基按[2.1.1]确定的配方。全程空气流量0.5 m³/m³·min⁻¹, 其余条件与正常生产一致, 但不搅拌, 结果发酵112 h后, 暗霉素发酵单位仅192 μg/ml, 且得到反复证明。

2.2.5 黑暗链霉菌F-211发酵代谢控制图 根据正交试验确定的培养基配方[2.1.1], 结合菌丝浓度、空气流量与发酵单位对时间的关系, 对发酵代谢进行调节, 得到了比较完善的发酵代谢调节控制图, 总糖、还原糖、氨基氮等均在代谢图上反映。见图3。

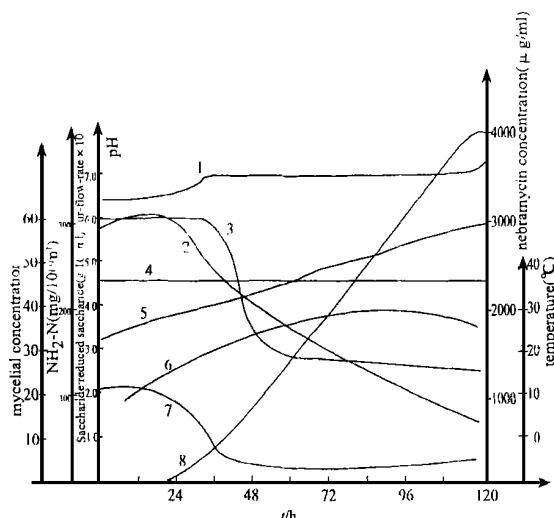


Fig. 3. The recommended operation curves about nebramycin fermentation control. 1. pH 2. Saccharide 3. air-flow-rate × 10 4. temperature (°C) 5. NH₂-N 6. mycelial concentration 7. reduced saccharide(g/100ml) 8. nebramycin

本代谢控制图已应用于生产, 经正交试验, 确立了合理的配方, 加上关键工艺控制点的完善, 使暗霉素的发酵单位从原来的1800 u/ml上升到了3800 u/ml, 取得了明显实际应用效果。

2.3 结果讨论

1) 从L₂₇(3¹³)正交试验的结果可以看出, 培养基搭配适当与否, 极大地影响暗霉素的生物合成。最高发酵单位3753 μg/ml, 最低仅910 μg/ml。通过实验, 确定了较为合理的培养基配比[2.1.1]。去除了影响较小的成分, 使配方趋于合理化。

2) 为了验证金属离子在本发酵条件下的影响程度, 选用了已报道⁹的对暗霉素合成影响较大的四种金属离子镁、锌、铁、锰, 采用L₉(3⁴)正交表进行考察, 结果与L₂₇(3¹³)正交表所得的实验结果相吻合, 镁离子作用最显著, 铁、锰离子的作用比锌的作用还要弱。所以铁锰不列作培养基成分(这个结果与报道的相反, 主要原因是前人所做的试验是用合成培养基, 而本试验是用与生产相一致的天然培养基)。其组成中的玉米粉、黄豆饼粉等已具备了足够的金属离子等微量元素。

3) 采用改变培养基中的黄豆饼粉含量等获得了不同菌丝浓度对发酵单位的影响, 从结果可以看出, 菌丝浓度过高过低对提高发酵水平均不利, 且过高比过低更不利。菌丝浓度过高, 可能是菌体代谢没有及时地转向合成暗霉素, 导致菌体猛长, 结果发酵单位低; 菌体浓度低单位反而好些, 可能是菌体代谢已转向合成目标产物。因此存在合适菌丝浓度问题。

4) 当以变化的空气流量进行培养, 以控制空气流量来达到控制菌体浓度时, 得到发酵单位始终是最高的。所以菌体浓度是影响暗霉素发酵单位的关键因素。通过改变空气流量来实现控制菌体浓度, 是工业化中最方便、最简捷的办法, 也是暗霉素发酵生产的显著特征。通气控制变化曲线见图3。

5) 经综合各试验结果, 绘制了合理的暗霉素发酵代谢控制图3。

6) 由于目标产物6''-O-氨基酰妥布霉素含CONH₂基团, 从生化原理上讲, 应该类似于尿素(NH₂CONH₂)合成, 需要CO₂和NH₃的参与, 氨来源于谷氨酰胺。因此发酵环境中应保持一定浓度的CO₂, 通气量过大, 发酵液中的CO₂被大量带走, 从而影响了暗霉素合成所需要的基本组分CO₂。还有通气量大, 大量长菌丝, 三羧酸循环不受限制, 导致谷氨酰胺的合成受到削弱, 从而导致

菌体内 NH₃ 的供应受到限制, 所以通气量不能过大, 也不能过小。存在不同培养时间有不同的最适通气量的特性^[11]。

7)用 L₂₇(3¹³)正交实验法确定的[2. 1. 1] 培养基是可行的。在用天然培养基培养黑暗链霉菌生产暗霉素时, 无需再加锰、铁离子。

8)菌丝浓度对暗霉素发酵单位影响明显, 过高过低的菌体浓度对提高暗霉素发酵单位均不利, 适当的菌体浓度(38%~40%)对提高和稳定暗霉素发酵单位最有利, 而采用改变空气流量能方便地将菌体浓度控制在合适的水平上, 这是暗霉素发酵生产的显著特征。采用该方法进行发酵生产, 不仅发酵单位提高, 而且实践证明 6"-O-氨基酰妥布霉素的含量比例没有下降。

9)黑暗链霉菌的孢子发芽对机械剪切敏感, 孢子接种培养种子, 不必开机械搅拌, 以空气搅拌就能得到良好的一级种子, 这是其又一显著特征。

参 考 文 献

1 Robert QT, William MS, Calvin EH. Pat. US, 3691279.

- 1972
- 2 王岳, 方金瑞主编. 抗生素. 北京: 科学出版社 1988. 288~291
- 3 Susan B, Maryadele J O'Neil, Ann S, et al. *The Merck Index (twelfth ed)*. Merck Research Laboratories 1996.
- 4 顾觉奋, 钟琼. 反相 HPLC 快速分析妥布霉素的方法建立. 药学世界, 1994, 2(1): 7
- 5 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典(二部). 北京: 化学工业出版社, 1995. 70~74
- 6 陈钧鸣, 徐玲娣编. 抗生素工业分析. 北京: 中国医药科技出版社, 1991. 108~111
- 7 俞俊棠, 唐孝宣主编. 生物工艺学(上册). 上海: 华东化工学院出版社, 1991. 99~110
- 8 杨子胥编. 正交表的构造. 山东: 山东人民出版社, 1978. 215~216
- 9 王鲁燕, 王耀伟, 韩春雷等. 无机离子对妥布霉素生物合成的影响. 中国抗生素通讯, 1994, (8): 3
- 10 俞俊棠, 唐孝宣主编. 生物工艺学(上册). 上海: 华东化工学院出版社, 1991. 117~156
- 11 沈仁权, 顾其敏, 李棠等编. 基础生物化学. 上海: 上海科学技术出版社, 1980. 346~349

Studies on the Perfecting Fermentation of Nebramycin by *Streptomyces tenebrarius*

HONG Wen-Rong, GUO Yang-Hao, MENG Chun, SHI Xian-Ai, CHEN Jian-Feng, LIU Zhi-Xin¹, CHEN Sheng-Yu¹

Department of Biotechnology, Fuzhou University Fuzhou 350002; ¹Fuzhou Fuyee Pharmaceutical Co. Ltd, Fuzhou 350002

Abstract The medium constitution of fermentation by orthogonal layout [L₂₇(3¹³) and L₉(3⁴)] about nebramycin produced by *Streptomyces tenebrarius* F₂₁₁ was studied. The results of orthogonal layout show that reasonable fermentation medium constitution(%) is ①glucose 1.5, ②corn starch 2.0, ③corn meal 2.0, ④soy bean cake mea 3.5, ⑤(NH₄)₂SO₄ 0.7, ⑥CaCO₃ 0.7, ⑦soybean oil 1.1, ⑧MgSO₄ 0.5, ⑨starch enzyme 0.025%, ⑩ZnSO₄ 0.01 and does not need supplement of Fe²⁺, Mn²⁺, metal ion. It was found that mechanical stirring inhibited spore germination and good mycelium was cultured from spore of *streptomyces tenebrarius* by compressed flowing air stirring on industrial scale. When fermentation medium constitution was decided the concentration of nebramycin in fermentation liquid was closely related with the mycelial density and can not get maximum nebramycin production in super over or super lower mycelial concentration. Suitable mycelial density was easily cultured by modification air flowing rate. Different air flowing rates in different fermentation ages were decided by the mycelium thickness and control curves were given in fig. 3. Using this recommended control curves and culture medium constitution in industrial fermentation, nebramycin concentration in cultural liquid was gotten in double than the original and the ratio of tobramycin in nebramycin was not decreased. Therefore the result of this research is believed to be correct.

Key words Nebramycin; Fermentation; Orthogonal layout; Tobramycin