

氮源优化及新型补糖工艺 提高红霉素效价研究

陈 勇,李 静

(青岛农业大学 食品科学与工程学院,山东 青岛 266109)

摘 要:在总氮相等条件下优化了红霉素工业发酵培养基的速效氮源和迟效氮源比例,同时尝试性地引入羽毛蛋白胨作为新型速效氮源。实验结果表明,迟效氮源与速效氮源比值为3.9时,即羽毛蛋白胨浓度为6 g/L、黄豆饼粉为33 g/L时,红霉素效价最高为11 059 U/mL。与玉米浆相比,羽毛蛋白胨具有质量稳定的特点,从而可避免玉米浆质量不稳定引起的红霉素效价波动。采用优化后的培养基,比较了传统pH反馈补糖工艺和pH结合呼吸熵(RQ)反馈补糖工艺。结果表明,pH结合RQ反馈补糖工艺下的红霉素效价达到11 915 U/mL,比传统pH反馈补糖工艺的效价提高了7.7%,而新补糖工艺下的补糖总量降低了40%。

关键词:红霉素;培养基优化;氮源;补糖工艺

中图分类号:TQ 465.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)03-0101-04

Increasing the titer of erythromycin by optimization of nitrogen source with new glucose feeding process

CHEN Yong, LI Jing

(College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao Shandong 266109)

Abstract:The ratio of available nitrogen source to slow release nitrogen source in erythromycin industrial fermentation medium were optimized under the condition of equal proportion of total nitrogen. Meanwhile feather peptone was tentatively used as a new type of available nitrogen source. The experimental results showed that, when the optimal ratio of available nitrogen source to slow release nitrogen source was 3.9, (the concentration of feather peptone 6 g/L and the soybean meal 33 g/L), erythromycin titer reached to 11 059 U/mL. Compared with corn steep liquor, feather peptone has the characteristic of stable quality, thus erythromycin titer fluctuation caused by quality instability of corn steep liquor can be avoided. Using the optimized medium, the traditional pH-feedback glucose feeding was compared with pH-RQ-feedback glucose feeding. The results showed that the erythromycin titer reached to 11 915 U/mL with pH-RQ-feedback glucose feeding, which was 7.7% higher than that with the traditional pH-feedback glucose feeding, moreover the total glucose amount fed to fermenter was decreased by 40%.

Key words:erythromycin; optimization of medium; nitrogen source; glucose feeding process

红霉素是14元大环内酯类广谱抗生素。由于其对军团肺炎和支原体肺炎具有独特疗效,因此被列为治疗这些疾病的首选药物。目前,一系列新型红霉素衍生物(如阿奇霉素、克拉霉素、罗红霉素和泰利霉素)的不断出现,使红霉素原料药的市场需求猛增^[1]。因此,通过培养基和发酵过程工艺优化提高红霉素效价对增加企业经济效益具有重要

意义。

上世纪90年代,红霉素发酵培养基的主要成份为淀粉和黄豆饼粉^[2]。范代娣等在初始培养基中添加葡萄糖并确定了葡萄糖和淀粉的比例为2.64:1时红霉素的效价最高^[3]。王晓磊等首次用玉米粉水解物作为碳源并成功放大至30 t发酵罐规模,使红霉素发酵效价提高了5.8%,综合成本降低了26.0%^[4]。刘晓宏等从降低生产成本的角度出发,采用廉价的生物氮素替代部分黄豆饼粉,在生产罐规模使发酵总收提高了7.75%^[5]。邹祥等在初始

收稿日期:2014-09-29

基金项目:青岛农业大学高层次人才科研基金(1114333)

作者简介:陈勇,1980年出生,男,山东枣庄人,讲师。

培养基中添加玉米浆促进了菌体的前期生长,最终红霉素效价提高了22.2%^[6]。2005年,Minas报道红霉素发酵的产量已达到10~13 g/L^[7]。然而,在这些文献中,鲜有关速效氮源和迟效氮源比例对发酵过程的影响。速效氮源主要以较易吸收的蛋白质降解产物形式存在,如酵母浸出物和玉米浆。而迟效氮源主要以大分子蛋白质形式存在如黄豆饼粉和花生饼粉。在生产中,常通过控制速效氮源和迟效氮源的比例,来控制菌体生长期和代谢产物形成期的协调,达到提高产量的目的。在红霉素发酵过程中,迟效氮源对发酵中后期维持菌体的代谢及菌丝形态具有重要的作用,而速效氮源消耗后造成的氮饥饿诱导细胞合成四磷酸鸟苷(PPGPP),PPGPP进而诱导抗生素合成途径相关酶基因的表达^[8]。因此,本文在总氮相等条件下优化速效氮源和迟效氮源的比例,同时引入新型氮源羽毛蛋白胨替代质量不稳定的玉米浆,以解决工业生产中玉米浆质量不稳定造成的红霉素效价波动问题。

优化发酵过程是提高红霉素效价的重要手段。2002年范代娣等报道发酵前期和发酵中期的最优pH为6.80^[9]。2003年Elmahdi等通过全过程控制发酵pH为7.0,实现了红霉素A纯度的提高^[10]。庄英萍等发现,通过控制补糖速率来胁迫菌体利用黄豆饼粉是红霉素高产稳产的必要条件^[11]。邹祥等报道称依据pH补糖工艺明显优于依据残糖的补糖工艺^[12]。但依据pH补糖工艺造成了补糖速率高,且较多的糖生成了CO₂而非红霉素,因此可以通过改进补糖工艺来降低补糖量。随着尾气质谱在工业发酵中的应用,摄氧率、二氧化碳释放速率和呼吸熵(RQ)可以作为补料的新指标。由于在红霉素合成期,葡萄糖经生物氧化为CO₂并产生能量时的呼吸熵接近1.0,而葡萄糖经中间代谢物流向合成红霉素时的呼吸熵小于1.0。因此,本文考察了pH结合RQ的反馈补糖工艺与传统pH反馈补糖工艺的优劣。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

菌种(Saccharopolypora erythraea ZL1004):本实验保存;黄豆饼粉:宜都市明远实业有限公司;玉米浆:华北制药康欣公司;羽毛蛋白胨:上海汇合生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

FUS-50(A)多参数全自动发酵罐(配有梅特勒溶氧电极和pH电极、自主研发biostar在线数据采集软件):上海国强生化装备有限公司;722型可见光分光光度计:上海天普仪器有限公司;TDL-80-2B台式离心机:上海安亭仪器科学仪器厂。

1.3 方 法

用接种铲挖取新鲜试管斜面(1 cm × 1 cm)接种到装有50 mL培养基的500 mL种子摇瓶中,在34 °C、220 r/min条件下培养48 h。摇瓶种子转接至含8 L培养基的15 L种子罐(接种量10%),34 °C培养40 h,通过手动改变搅拌转速和通气量使种子罐培养过程溶氧维持在40%左右。将种子罐的培养液全部转接至装有30 L发酵培养基的50 L发酵罐,34 °C培养190 h,通过手动改变搅拌转速和通气量使发酵罐的发酵过程溶氧维持在30%左右。种子罐培养基:淀粉30 g/L、黄豆饼粉30 g/L、玉米浆10 g/L、CaCO₃ 5.0 g/L、消泡剂1.25 mL/L;50 L发酵罐初始培养基:淀粉35 g/L、糊精5 g/L、硫酸铵3.0 g/L、NaCl 2.0 g/L、CaCO₃ 7.0 g/L和消泡剂1.9 mL/L,黄豆饼粉、玉米浆和羽毛蛋白胨浓度见表1。

1.3.1 迟效氮源与速效氮源比值优化

表1为设计的5种发酵培养基的配方(其它成份相同),发酵过程采用pH反馈补糖工艺,即补糖控制发酵液pH在6.9~7.0范围内。通过比较5种培养基下的菌体浓度(PMV)、总糖浓度、氨基氮浓度和红霉素效价的时间变化曲线,考察迟效氮源和速效氮源比例对发酵的影响。

表1 总氮大体相当原则下调整黄豆饼粉、玉米浆和羽毛蛋白胨的比例

培养基名称	黄豆饼粉/(g/L)	玉米浆/(g/L)	羽毛蛋白胨/(g/L)	迟效氮源/速效氮源
1	20	18	7	1.2
2	25	13	5	2.0
3	30	5	5	3.3
4	33	0	6	3.9
5	40	0	3	9.3

1.3.2 pH反馈补糖工艺和pH结合RQ的反馈补糖工艺比较

发酵约30 h后,pH升高至6.9,此时补加300 g/L的葡萄糖溶液。pH反馈补糖工艺为:补糖控制发酵液pH在6.9~7.0范围内。pH结合RQ反馈补糖工艺为:pH超过7.10时,采用pH反馈补糖使pH降低至7.10;当pH低于6.8时,停止补糖。当pH在6.8~7.10的范围内时,每间隔30 min调节一次补糖速率,每次补糖速率降幅为10 g糖溶液/h,直至RQ在0.75左右。

1.3.3 分析方法

菌体浓度测定方法:取10 mL发酵液,3 500 r/min转速下离心15 min,沉淀物体积即为菌体浓度(PMV)。

化学效价、总糖、还原糖、氨基氮含量测定方法参考相应文献^[13]。

在线参数测定:由 FUS-50(A) 多参数全自动发酵罐(国强生化装备有限公司)自动检测 pH、溶氧、罐压等参数。

尾气测定采用尾气质谱 MAX300-LG 分析仪(美国 Extrel),并通过 biostar 在线数据采集软件在线计算摄氧率(OUR)、二氧化碳释放速率(CER)、呼吸熵(RQ)。

2 结果与分析

2.1 迟效氮源和速效氮源的比例优化

由图 1a 可知,培养基 1~4 条件下的 PMV 在 40 h 前快速增加到较高水平,而培养基 5 的速效氮源过低(3 g/L 羽毛蛋白胨)引起菌体生长速率低,从而使 PMV 在 80 h 达到与其它培养基下的菌体浓度相当的水平。这表明较高速效氮源浓度是获得较高菌体浓度的关键。发酵后期,黄豆饼粉浓度较低的培养基(培养基 1~2)其 PMV 值相应较低。25~33 g/L 的黄豆饼粉对维持发酵后期的菌体浓度具有重要的作用。图 1b 和图 1c 表明在培养基 2~4 条件下,总糖和氨基氮分别在 40 h 和 30 h 降至较低水平。氨基氮的消耗造成氮饥饿,从而启动红霉素合成。培养基 2~4 条件下较早氮饥饿对应于较高的红霉素起始效价(35 h 约 2 000 U/mL)。与之相比,培养基 1 下的较高速效氮源浓度延缓了总糖的利用,推迟了补糖起始时间(图 1b)。而培养基 5 下的较低速效氮源引起菌体生长速率下降,进而降低了总糖和氨基氮的消耗速率,这也是培养基 1 和培养基 5 条件下红霉素起始效价过低的原因(图 1d)。由图 1d 可知,总氮相等条件下,迟效氮源和速效氮源的比例对红霉素效价有较明显的影响。当迟效氮源和速效氮源比值为 2.0、3.3 和 3.9 时,红霉素效价高于其比值为 1.2 和 9.3 时的红霉素效价。当迟效氮源和速效氮源比值为 3.9 时,发酵 190 h 的红霉素效价最高(11 059 U/mL)。为了用羽毛蛋白胨替代玉米浆,首先尝试玉米浆浓度由 13 g/L 降至 5 g/L。图 1d 显示玉米浆浓度的降低没有明显影响红霉素效价。进一步将玉米浆浓度由 5 g/L 降至 0,同时增加黄豆饼粉和羽毛蛋白胨的浓度。该培养基调整使红霉素效价由 10 659 U/mL(培养基 3)提高至 11 059 U/mL(培养基 4),增幅为 4%。这表明羽毛蛋白胨可以作为一种新型速效氮源用于红霉素工业发酵培养基。由于羽毛蛋白胨质量稳定,所以用羽毛蛋白胨替代玉米浆可避免工业生产中玉米浆质量不稳定造成的红霉素效价波动。综合考虑,选取黄豆饼粉浓度 33 g/L、羽毛蛋白胨浓度 6 g/L(迟效氮源与速效氮源比为 3.9)的培养基配方继续优化发酵过程补糖工艺。

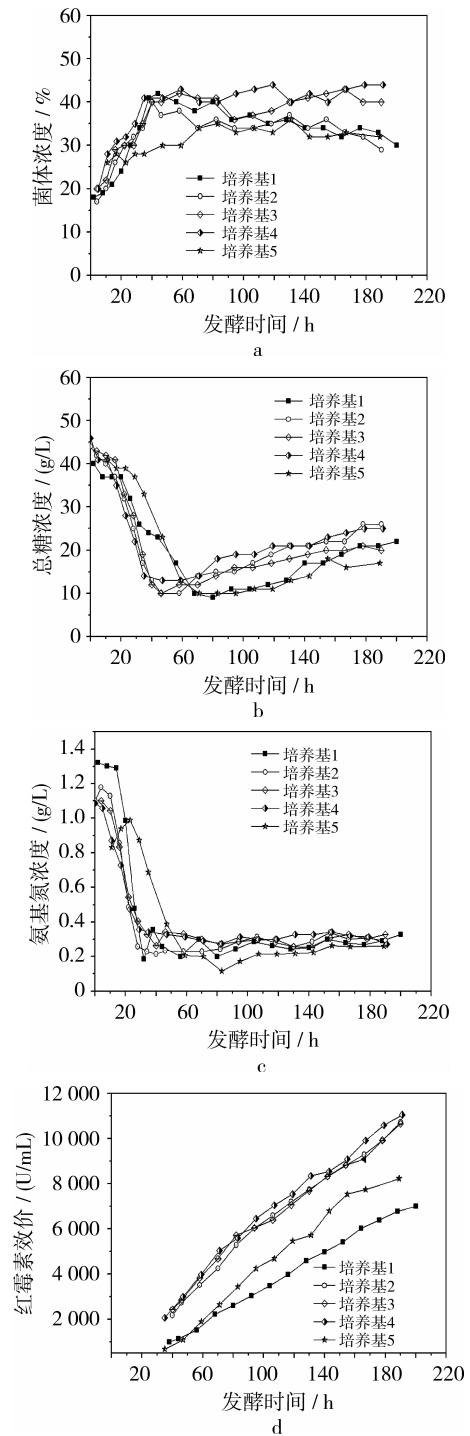


图1 不同培养基下的菌体浓度(a)、总糖(b)、氨基氮(c)和红霉素效价(d)的时间曲线

2.2 pH 反馈补糖工艺和 pH 结合 RQ 的反馈补糖工艺比较

目前,工业红霉素发酵中采用 pH 反馈补糖工艺。由图 2 和图 3 可知,在 30 h 前新培养基条件下氨基氮浓度快速降低,菌体浓度迅速增加。这表明菌体主要利用速效氮源合成菌体。菌体处于生长时的 RQ 接近于 1。当羽毛蛋白胨被利用后,菌体开始利用还原度较高的黄豆饼粉,从而引起 RQ 略有下降。总糖浓度在 40 h 降低至最低水平,菌体被迫利用黄豆饼粉作为碳源,进而引起 pH 的迅速升高。

pH 超过 6.9 便开启 pH 反馈补糖工艺控制 pH 在 6.9~7.0 范围内。由图 2 可知,在 40~70 h pH 反馈补糖工艺的葡萄糖补加速率由 0.2 g/(L·h) 快速增加至 1.0 g/(L·h)。与之相比,pH-RQ 反馈补糖工艺中依据 RQ 值确定补糖速率,从而使补糖速率维持在较低的水平。在此阶段,菌体的中心代谢旺盛,补入较多葡萄糖会使葡萄糖经中心代谢转化为 CO₂。新补糖工艺依据 RQ 限制葡萄糖补加速率,进而促使菌体由中心代谢途径转向红霉素的合成代谢途径。图 2 中补糖曲线表明,新补糖工艺下的补糖速率始终低于原补糖工艺。从计算得出的补糖总量来看,新补糖工艺下的补糖总量仅 69 g/L,而原补糖工艺下的补糖总量为 115 g/L。新补糖工艺下补糖量比原工艺下的补糖量降低了 40%。

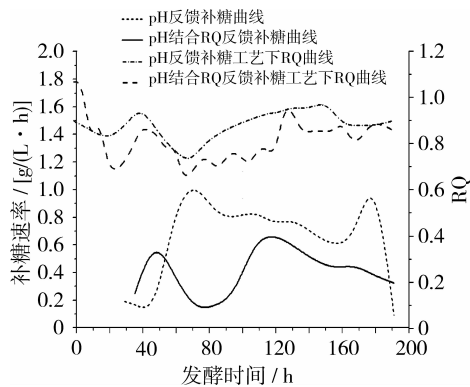


图 2 两种补糖工艺下的补糖曲线和 RQ 过程曲线

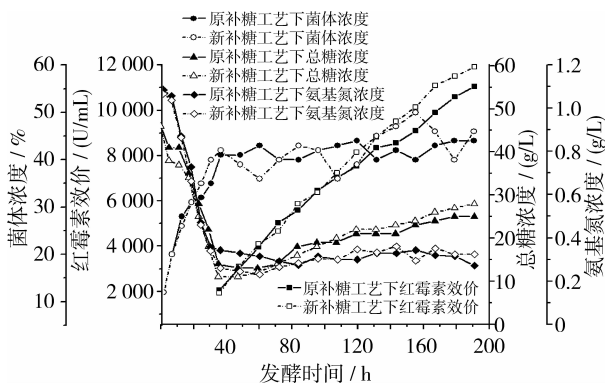


图 3 两种补糖工艺下菌体浓度、总糖、氨基氮和效价的比较

由图 3 可知,补糖工艺的调整并没有对菌体浓度曲线和底物(氨基氮和总糖)消耗曲线造成较大的影响。在新补糖工艺下,放罐时红霉素效价为 11 915 U/mL,这比 pH 反馈补糖工艺下的红霉素效价提高了 7.7%。在新补糖工艺下,50~120 h 内补糖速率非常低,此阶段较低的补糖速率有利于胁迫菌体利用培养基中的豆油和正丙醇,进而合成更多的红霉素前体,有利于红霉素的合成。新补糖工艺下 120 h 前的低补糖量引起后期 pH 值超过 7.10,相应的补糖速率也增加。新补糖工艺发酵后期的较高补糖速率可以避免菌体早衰,进而维持了较高的红

霉素合成速率。综合分析表明,新补糖工艺可以使菌体始终处于红霉素合成的较佳生理状态,增加红霉素的效价,降低补糖量,因而优于原始的补糖工艺。

3 结论

本文先从迟效氮源和速效氮源之比的角度优化红霉素工业培养基,新培养基中的迟效氮源和速效氮源比值为 3.9,即黄豆饼粉浓度为 33 g/L、羽毛蛋白胨浓度为 6 g/L。之后研究了 pH 结合 RQ 的新补糖工艺。与原补糖工艺相比,新补糖工艺下的红霉素效价提高了 7.7%,而补糖总量降低了 40%。本研究结果表明,通过优化迟效氮源和速效氮源之比使羽毛蛋白胨完全替换掉工业培养基中的玉米浆,提高了红霉素发酵效价,同时证明了 pH 结合 RQ 补糖工艺优于 pH 反馈补糖工艺,为工业生产优化培养基和发酵过程提供参考。

参考文献:

- [1]张伦. 红霉素市场现状与发展趋势[J]. 中国药房, 2003, 14(12): 713-715.
- [2]邹美云, 朱卫民, 于学琴. 红霉素链霉菌 1-25 菌株的特性研究[J]. 中国抗生素杂志, 1989, 14(3): 187-191.
- [3]范代娣, 陈斌, 尚龙安, 等. 红霉素发酵工艺优化研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(1): 104-107.
- [4]王晓磊, 刘建周, 廖志忠, 等. 玉米粉水解物作为红霉素发酵培养基的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(4): 134-138.
- [5]刘晓宏, 宋合强, 孙建敏, 等. 生物氮素在红霉素发酵中的应用研究[J]. 医药工程设计杂志, 2005, 26(5): 19-20.
- [6]Zou X, Hang H F, Chu, J, et al. Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50 L to 372 m³ scale[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(3): 1406-1412.
- [7]Minas W. Production of erythromycin with *Saccharopolyspora erythraea*[J]. Microbial Processes and Products 2005, 18(4): 65-90.
- [8]Chakraborty R, Bibb M. The ppGpp synthetase gene (relA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) play a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation [J]. Bacteriology, 1997, 179(18): 5854-5861.
- [9]范代娣, 党政, 孙晓红, 等. 红霉素摇瓶发酵实验工艺条件[J]. 西北大学学报, 2000, 30(1): 43-46.
- [10]Elmahdi I, Baganz F, Dixon K, et al. pH control in microwell fermentations of *S. erythraea* CA340: influence on biomass growth kinetics and erythromycin biosynthesis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 16(3): 299-310.
- [11]庄英萍, 储炬, 张嗣良, 等. 红霉素发酵过程前期参数相关分析及调控[J]. 华东理工大学学报, 2004, 30(6): 636-638.
- [12]Zou X, Chen C F, Hang H F, et al. Response surface methodology for optimization of the erythromycin production by fed-batch fermentation using an inexpensive biological nitrogen source[J]. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2010, 24(1): 95-100.
- [13]Zou X, Hang H F, Chen C F, et al. Application of oxygen uptake rate and response surface methodology for erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(12): 1637-1642. ☉