

螺旋霉素(SPM)膜透析发酵研究

邹崇达

(华侨大学)

李友荣

(华东化工学院)

摘要 本文采用膜透析法对 SPM 发酵工艺进行探讨. 结果表明, 经透析向发酵液提供新鲜基质, 稳定了铵离子、葡萄糖浓度, 同时除去了部分产物, 减轻了碳、氮代谢物调节作用及终产物反馈调节作用, 减少了微生物生长及产物合成的不稳定性. 当透析膜孔为 $3.0\mu\text{m}$, 开始透析时间为 60h, 发酵液与透析液体积之比为 1 时, SPM 总产增加 50%.

关键词 膜透析发酵, 螺旋霉素, 反馈

0 前言

SPM 是一种大环内酯抗生素, 对 G^+ 菌具有较好的抗性, 尤其能抗对青霉素具耐药性的菌株, 使之在医疗、农业、畜牧业上都具有重要作用. 但其发酵单位不高, 因而在生产、应用上都受到很多限制. 为了提高发酵单位, 故应用膜透析法补充基质及消除中间代谢物、终产物的影响.

Gallup 及 Gerhardt 在《高密度微生物培养的透析发酵系统》一文中指出, 透析培养 *Serratia Marcescens*, 菌体活计数可达 10^{12} 个/ml, 离心体积(可溶性培养基)超过 50%^[1]. Dostalek 及 M. Haggstrom 在《过滤发酵器—仪器与控制装置》一文中报导, 间歇培养 *Pedococcus Pentosacens* 生产酒精, 采用过滤法, 12h 可达 15g/L, 透析法可达 12g/L, 而对照只有 5g/L^[2]. R. W. Stieber 及 Gerhardt 在《连续透析发酵生产乳酸铵》一文中报导, 膜透析连续发酵生产乳酸铵 26 天, 发酵罐内平均浓度 53.6g/L, 透析液内平均浓度 40.9g/L, 并减少了培养基消毒这一环节^[3]. 可见, 膜透析(或过滤)发酵在提高微生物菌体浓度, 及初级代谢物浓度方面取得巨大成功. 但迄今为止, 尚没见到该法应用于次级代谢物发酵的研究. 本试验将膜技术运用于 SPM 生产, 取得一些成果.

1 材料与方法

- 1) SPM 生产菌种: *Streptomyces ambofaciens*
- 2) 培养基

本文 1990-09-11 收到.

斜面培养基:葡萄糖 2,黄豆粉 1,麸皮 1,硫酸镁 0.05,碳酸钙 0.5,琼脂 2%.

种子培养基:淀粉 4,黄豆粉 2,氯化钠 0.4,碳酸钙 0.5,葡萄糖 0.5%.

发酵培养基:淀粉 6.5,鱼粉 2.5,硝酸铵 0.6,硫酸镁 0.1,磷酸二氢钾 0.1,氯化钠 1,碳酸钙 0.5,玉米浆 2,葡萄糖 1%.

以上培养基均采用自来水配制,调节 PH 于 6.0—6.5.

静息细胞培养基:葡萄糖 1,氯化钠 0.5,硫酸镁 0.05,碳酸钙 0.02,硝酸钠 0.5%,以蒸馏水配制,PH 自然.

3) 测定方法

糖的测定方法:热斐林法.

NH_2 -N 测定方法:甲醛滴定法.

无机磷测定方法:钼兰比色法.

DNA 测定方法:二苯胺法.

总核酸(TNA)测定方法:发酵液 4℃ 离心,去上清液,用 5%三氯乙酸(TCA)洗涤三次.加 5% TCA 溶液适量于菌体中,80℃ 保温 30min,搅拌数次.冷至室温,离心,取上清.测定 $\text{OD}_{260\text{nm}}$.

铵离子浓度测定:氨气敏电极法.

SPM 生物效价测定:管碟法,试验菌为肺炎八叠球菌.

丙酮酸测定:参考上海医化所编《临床生化检测》一书^[4].

4) 仪器

PNH_3 -1 型氨气敏电极(上海光电器件厂);821 型数字式离子计(中山大学电子器件厂);FCY-I 型溶氧电极(华东化工学院生物传感器研究室);LDB-H 型电子蠕动泵(上海细胞生物学研究所监制);MD-250 型发酵罐(日本丸菱公司).

5) 微生物培养流程

种子斜面(茄子瓶) $\xrightarrow[14\text{天}]{28^\circ\text{C}}$ 发酵斜面 $\xrightarrow[14\text{天}]{28^\circ\text{C}}$ 种子摇瓶 $\xrightarrow[2\text{天}]{28^\circ\text{C}}$ 发酵罐 $\xrightarrow[4\text{天}]{28^\circ\text{C}}$ 放罐. 如图 1.

静息培养:从种子瓶取 24h 种龄之菌丝,接种于静息培养基,保温 28℃,18h.

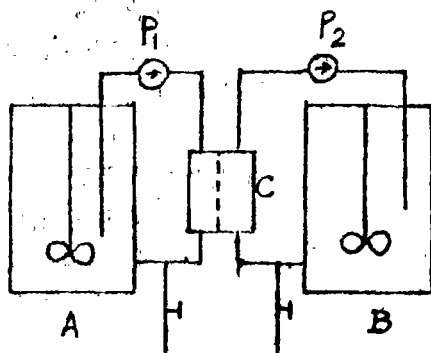


图 1 透析发酵流程模式图

A—发酵罐;B—透析罐;C—透析器;

P_1 、 P_2 —蠕动泵; K_1 、 K_2 —取样开关

2 结果与讨论

2.1 发酵过程中核酸的变化

菌丝量是发酵过程的重要参数,本试验采用

含固体培养基,难于测定菌丝干重,故以总核酸(TNA)代替之.实验发现,TNA 是以梯级模式增加的,且在某些时候有下降趋势.而 SPM 生物合成与 TNA 变化有关,当 TNA 下降时,SPM 停止增长.而 DNA 与 TNA 曲线有所不同,与常见的菌体生长曲线相似.实验结果还表明,经过透析可以改变 TNA 增长的梯级特性,有利于 SPM 稳产.如图 2.

2.2 糖代谢

实验结果还表明,SPM 生物合成受糖分解代谢物阻遏,如图 3. 当培养基内葡萄糖浓度超过 2% 时,SPM 合成严重受阻;当葡萄糖浓度超过 5% 时,SPM 产量只有对照的 20%.

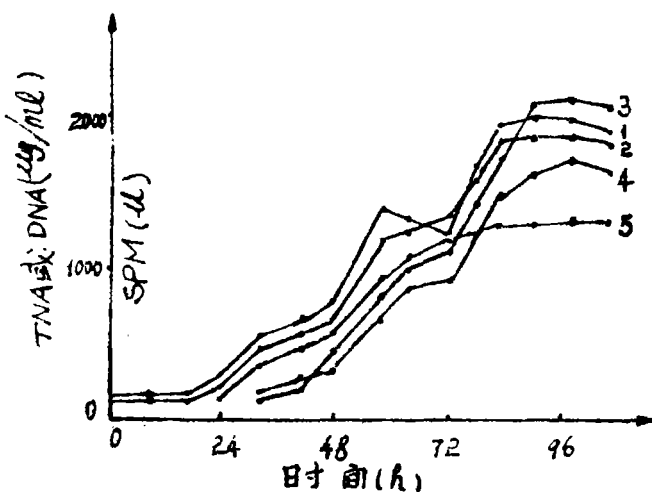


图2 核酸与 SPM 产量的关系

1、2—透析前后之 TNA; 4、3—透析前后之 SPM;
5—无透析发酵之 DNA

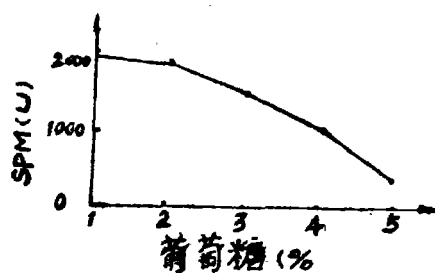


图3 葡萄糖对 SPM 的影响

随着发酵进行,总糖持续减少,而还原糖变化则较复杂,开始时下降,到含量为 0.2% 时又上升,一直增加到 1.5 左右,然后在 1.0—1.5 之间波动直到发酵结束,总糖耗尽.

实验结果还表明,总糖、还原糖、淀粉酶活力存在一定关系,如图 4. 由图可以看出,菌体在

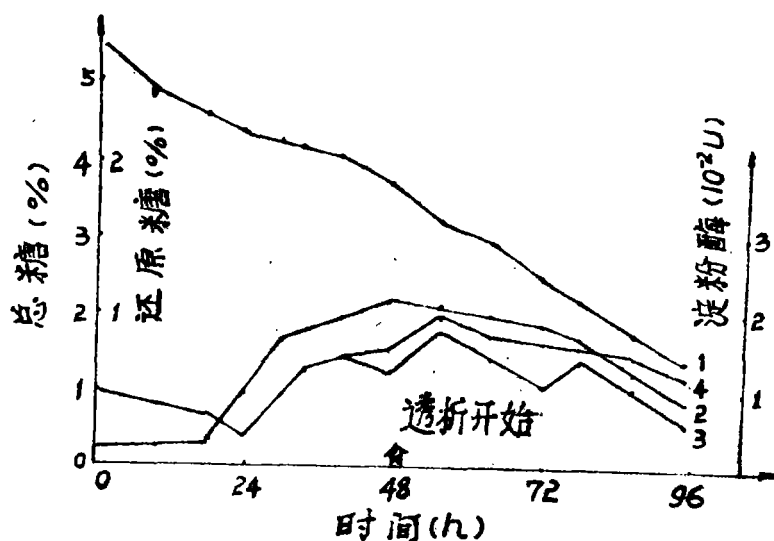


图4 糖、淀粉酶随时间变化及透析对葡萄糖变化的影响

1—总糖; 2—淀粉酶; 3—无透析时葡萄糖曲线

24h 以前利用的基本为培养基的原初葡萄糖,淀粉酶活力亦很低. 20h 左右,当葡萄糖浓度较低时,淀粉酶活力上升,开始将淀粉转化为葡萄糖. 在生产期,淀粉酶保持在一定水平. 至淀粉含量亦很少时,淀粉酶活力也下降. 这说明该菌种分泌淀粉酶是受环境葡萄糖及底物淀粉的影响的.

实验结果还表明,当发酵罐内糖不够时,适当补充葡萄糖会延长生产期,既可以采用一次性补糖,也可以采用透析法缓慢补糖. 采用后者,培养基内总糖及还原糖波动均不大,SPM 生产亦很平稳,总产可以提高.

2.3 氮代谢

SPM 生物合成受氮代谢物调节. 无论是静息培养,还是摇瓶发酵试验均表明,低浓度 NH_4^+ 对 SPM 生物合成具有促进作用,而过多则呈抑制作用. 静息培养时最适 NH_4Cl 浓度为 0.1%,摇瓶发酵时 NH_4NO_3 最适浓度为 0.6%. 如图 5.

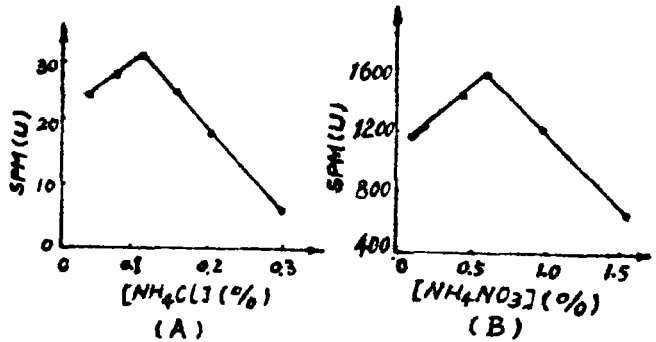


图 5 铵离子浓度对 SPM 合成的影响
(A)静息细胞;(B)发酵罐结果

在小罐试验中,当发酵至 48—72h 期间, $\text{NH}_2\text{-N}$ 下降很快. 70h 出现低谷. NH_4^+ 亦在此时出现最低点. 这种状况对发酵很不利.

膜透析
发酵过程中,向透析液添加含 N 物质,可以使 NH_4^+ 保持基本稳定,这对 SPM 生产很重要. 由图 6 可知,在 NH_4^+ 低谷区,也有一个 SPM 合成停滞区. 膜透析改善了 N 的供应,从而也改善了 SPM 生产.

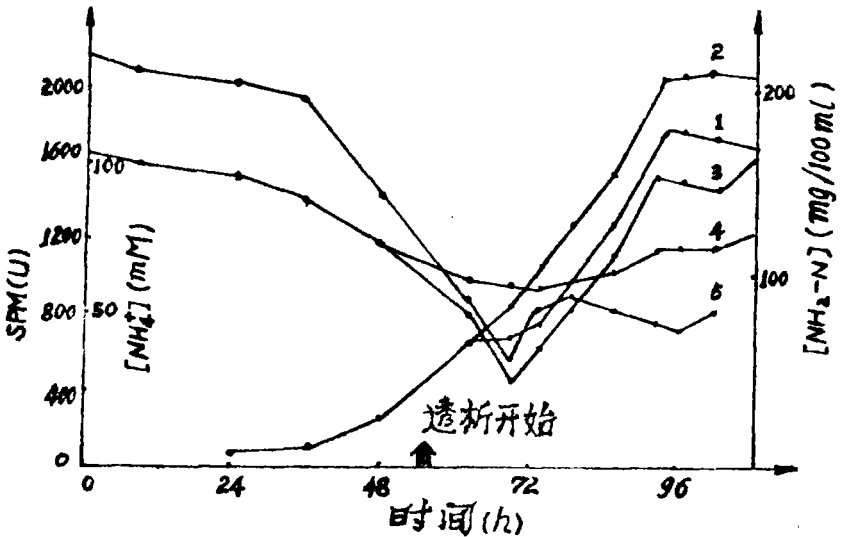


图 6 SPM 生物合成与氮变化
1、2—对照与透析之 SPM; 3、4—对照与透析之 NH_4^+

2.4 无机磷代谢

本试验采用复合培养基,若从配方中减去无机磷盐,SPM 可照样合成,但产量低. 增加

0.1% KH_2PO_4 会提高产量. 这与其它抗生素生产是一致的. 实验结果还表明, KH_2PO_4 分次少量加入比一次加入对 SPM 生物合成更有利. 若向静息细胞系统加入 KH_2PO_4 , 虽然 TNA 有所增加, 但菌丝 SPM 生物合成能力(比生产率)有很大提高(一般地, 静息细胞系统是不加无机磷的). 这说明 KH_2PO_4 在 SPM 生物合成中具有特殊地位, 见表 1、

表 2. 需要进一步实验证明. 在中后期, 通过透析向发酵液补充无机磷亦有利于 SPM 生物合成, 如图 7 所示, 这一现象在其它抗生素生产中尚没见报导.

表 1 静息条件下 KH_2PO_4 对 SPM 比生产率之影响

项 目	1	2	3	4
葡萄糖(%)	1	3.5	3.5	1
KH_2PO_4 (%)	/	/	0.1	0.1
生物效价(μ)	13	11	36	31
TNA(mg/ml)	0.280	0.275	0.345	0.311
比生产率($\mu/\text{mg} \cdot \text{TNA}$)	45	36	104	100

表 2 无机磷对 SPM 生物合成的影响

时 间	对 照	P_2	P_4	P_7	
加 肥 时 间 (h)	0	0.1	/	0.05	/
	48	/	/	0.05	0.05
	60	/	/	/	0.025
	72	/	/	/	0.025
产 量	μ	1350	1036	1622	1700
	增量(%)	/	-23.3	20	26

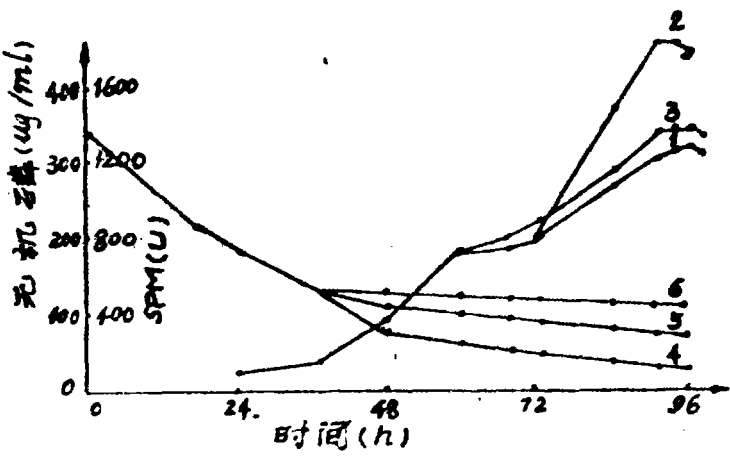


图 7 发酵中后期 P 含量对 SPM 产量的影响

1. 2. 3—三种磷含量条件下的 SPM 产量;

4. 5. 6—与 1. 2. 3 相对应的磷含量

2.5 丙酮酸与 SPM 生物合成的关系

从图 8 可知, 发酵至 36h 后, 丙酮酸浓度高些对 SPM 生物合成有利. 静息细胞系统实验结果表明, 0.2% 丙酮酸较合适, 见表 3. 丙酮酸转化成为 C_2 单位, 是所有大环内酯抗生素重要前体, 亦是 SPM 生物合成的前体. 实验结果与理论相符.

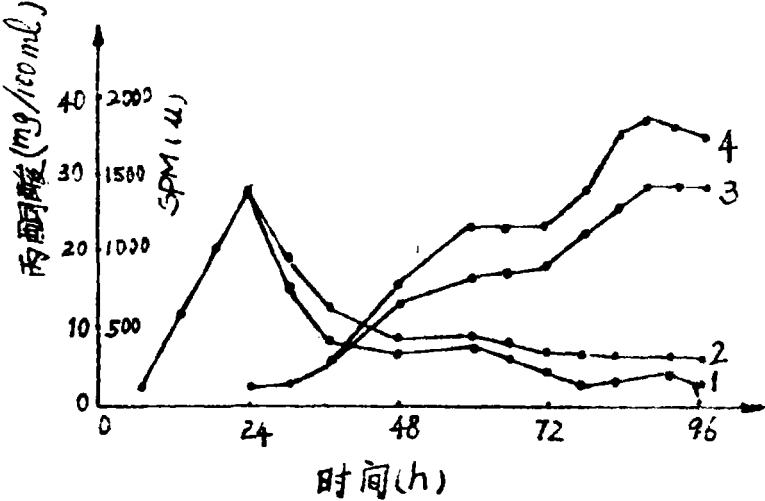


图 8 发酵液中丙酮酸含量对 SPM 生物合成的影响

1、2—丙酮酸; 3、4—与 1、2 相对应的 SPM

表 3 丙酮酸对 SPM 生物合成的影响*

丙酮酸钠(%)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	4.0
SPM(μ)	31	45	50	45	48	19

* 静息条件下试验。

2.6 透析条件的优化

摇瓶实验结果表明,培养基中外加 SPM 与后来生成之 SPM 总和大致保持一定,这说明 SPM 产生菌所能耐受的 SPM 量是有限的,外部加入的越多,则自身合成的便减少,如图 9.

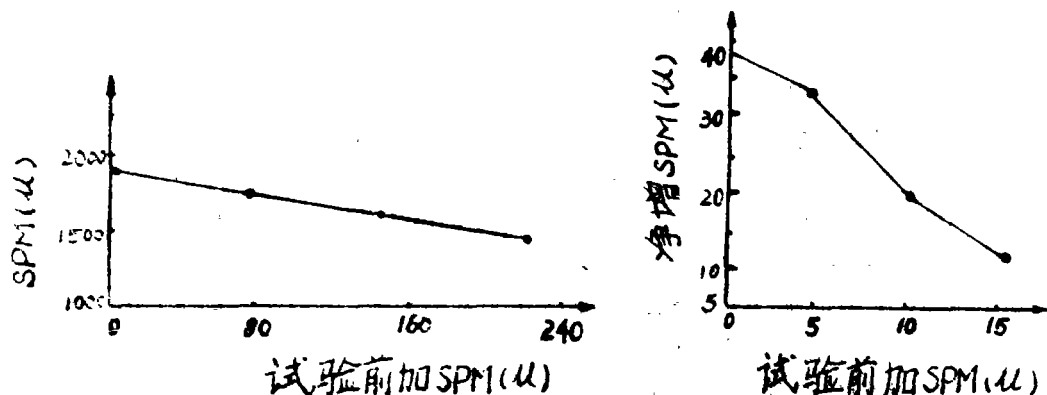


图 9 SPM 对自身生物合成的影响

(A) 发酵摇瓶 (B) 静息培养

用透析法解除终产物抑制试验表明, SPM 的合成具有明显的阶段性,如图 10. 在发酵过程中,SPM 比生产速率有两次低谷. 经透析,比生产速率波动可大为减小. 而且,透析批号的比生产速率比对照要高. 与摇瓶试验结果相吻合. 而且,透析膜孔径对 SPM 总产增量亦有影响. 当膜孔径为 0.16—0.65 μ m 时,随孔径增大,总产量渐次降低,当膜孔为 0.65—3.0 μ m 时,总产增量渐次增加. 如图 11. 从图 12 可以看出,透析液体积与发酵液体积之比约为 1 时,总产增量最多.

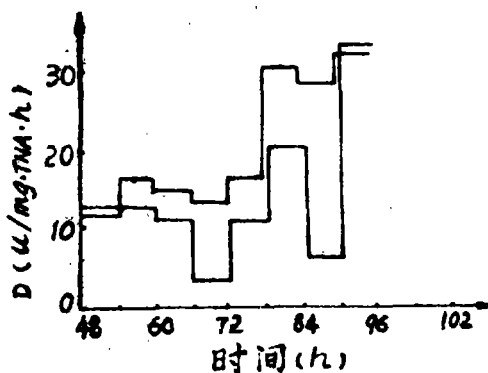


图 10 SPM 生产的阶段性及膜透析的影响

实验结果还表明,透析开始时间为 60h,效果最明显,见图 13. 菌株生产能力越低,效果越好,如图 14. 透出量越多,总产增量越多,如图 15.

3 结论

SPM 产生菌之生长,用 TNA 表示时,表现出阶段增长的特性. 无机磷在 SPM 生物合成中不光起供微生物生长的作用,可能还有其它作用,有待进一步的实验证实. 中间体丙酮酸对 SPM 生物合成有重要用,发酵过程中丙酮酸浓度较高对 SPM 合成有利. 通过透析可以补充有

关养分,除去有害代谢物,部分解除 SPM 反馈调节作用,稳定微生物生长及 SPM 生物合成环境,特别是避免 NH_4^+ 大幅度回升,提高 SPM 产量.

当透析膜孔径为 $3.0\mu\text{m}$,60h 开始透析,R 为 1 时,可提高产量 50%.

透析发酵是一项新技术,在发酵同时分离终产物及除去部分有毒成分,并补充基质,延长生产期,提高产率.如果应用于生产实际,将产生巨大经济效益.

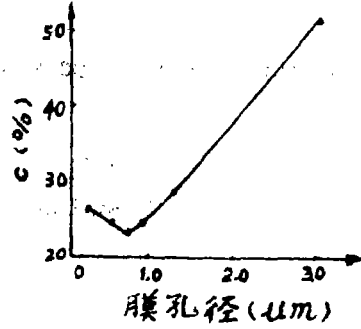


图 11 膜孔径对 SPM 总产增量的影响

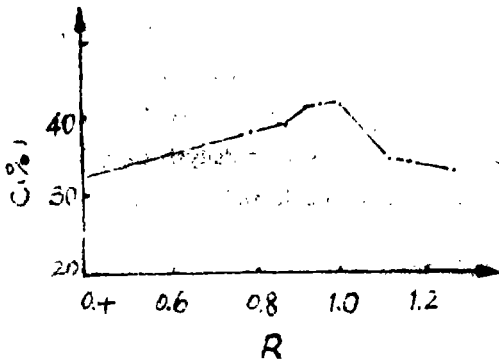


图 12 R 与 C 的关系

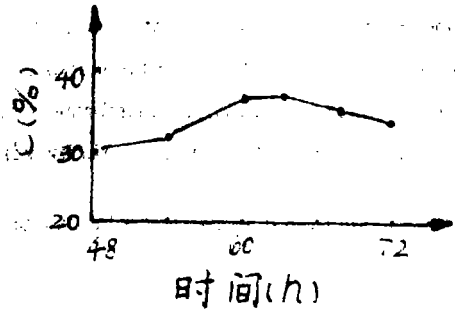


图 13 透析开始时间与 C 的关系

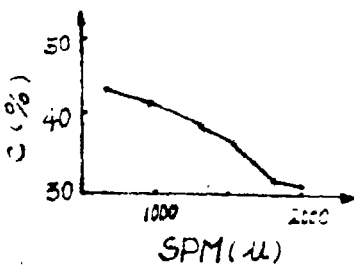


图 14 罐内最高浓度与 C 之关系

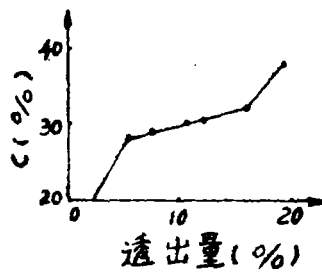


图 15 透出量与 C 的关系

参 考 文 献

- [1] Gallup M. D. and Gerhardt P. , *Appl. Microbiol.* , 11(1963), 506—512.
- [2] Dostalek M. , and Haggstrom M. , *Biotechnology and Bioengineering* , 24, (1982), 2077—2086.
- [3] Stieber R. W. and Gerhardt P. , *Biotechnology and Bioengineering* , 23, (1981), 535—549.
- [4] 上海医化所, 临床生化检测, 上海科技出版社, (1979), 289.

A Study on the Process of Dialysis in Spiramycin Fermentation

Zou Chongda

Huqiao University

Li Yourong

(East China Chemical

Technology University)

Abstract The technology of spiramycin induced fermentation is studied by means of membrane dialysis. The results reveal that the dialysis supplements the fermentation liquid with fresh substrate and thus stabilizes the concentration of ammonium and glucose. The removal of part of products by dialysis eases the carbon — nitrogen catabolite repression and the feedback inhibition, and reduces the fluctuation in the growth of microbes and the synthesis of products. The total yield of spiramycin has a 50% increase under such conditions as a dialytic membrane with pore diameter of 3.0 μm , a dialysis starting time of 60 hours, and a ration of 1 : 1 as the ratio by volume of fermentation liquid and dialyzate.

Key word membrane dialysis fermentation, spiramycin, feedback