

红霉素摇瓶发酵控制条件的优化

左勇,李杨,谢晖,祁峰,刘利平,张晶

(四川理工学院生物工程学院,四川 自贡 643000)

摘要:文章讨论摇瓶发酵控制条件对红霉素发酵水平的影响。通过单因素和正交实验优化,最佳发酵条件为 $A_1B_2C_2D_2$:前期发酵、中期和后期发酵三阶段发酵温度分别为 31 °C、33 °C、29 °C,发酵起始 pH 值为 6.7,摇床转速控制为:0~48 h 为 220 r/min,48~96 h 为 300 r/min,96~144 h 为 220 r/min,144~168 h 为 150 r/min。优化后菌株 UL5 的发酵水平比优化前提高 15.54%。

关键词:红色糖多孢菌;摇瓶发酵;条件优化;正交实验

中图分类号:TQ465.5

文献标识码:A

红霉素是红色糖多孢菌产生的一种 14 元大环内酯类碱性抗生素,是应用最广的大环内酯类抗生素之一^[1]。红霉素的生产主要采用发酵法,其发酵周期一般为 6~7 天,采用二级种子接种发酵,一级种子培养 48 h,二级种子培养 36~48 h。

我国红霉素发酵水平属低水平重复操作,与发达国家相比差距较大,目前国外发酵单位已达 8 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,而国内大多企业红霉素发酵水平却一直在 4 000~5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[2]。红霉素发酵水平主要受工作菌种、培养基组成、发酵条件的控制以及后期的分离提纯条件等多方面因素的影响^[3]。由于国外企业对红霉素生产进行技术封锁,而国内红霉素生产的发酵水平一直比较落后,因此,目前国内很多科技工作者从红霉素发酵相关参数和调控入手,希望提高红霉素发酵水平^[4]。根据这些情况,本研究拟通过对摇瓶发酵过程中的温度、摇瓶转速及发酵起始 pH 等因素进行优化,以提高红霉素发酵水平。

1 材料与方法

1.1 菌种

红色糖多孢菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) UL5^[5]:四川理工学院微生物实验室提供。

1.2 培养基及培养条件

改进高氏培养基:可溶性淀粉 2%,NaCl 0.05%,硝酸钾 0.1%,磷酸二氢钾 0.05%,硫酸镁 0.05%,硫酸亚铁 0.001%,重铬酸钾(70~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$),青霉素(2.5~3 $\mu\text{g}/\text{mL}$),琼脂 1.5~2.5%,pH7.4~7.6(NaOH 调)。33 °C 培养 168 h。

改进斜面培养基:可溶性淀粉 1%,硫酸铵 0.3%,玉米浆 1.2%,NaCl 0.3%,碳酸钙 0.3%,琼脂 1.5~2.5%,重铬酸钾(70~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$),青霉素(2.5~3 $\mu\text{g}/\text{mL}$),pH7.5(NaOH 调)。33 °C 培养 168 h。

种子培养基:淀粉 3.0%,黄豆饼粉 2.5%,蛋白胨 0.5%,糊精 3.0%,葡萄糖 1.0%,NaCl 0.4%,硫酸铵 0.75%,碳酸钙 0.6%,硫酸镁 0.025%,磷酸二氢钾 0.02%,pH7.5(NaOH 调)。挖取新鲜活化菌种平板(1 cm×2 cm)接到装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中,培养温度 33 °C,摇床转速 220 r/min,培养 48 h。

发酵培养基^[6]:黄豆饼粉 2.89%,淀粉 3.03%,糊精 2.04%,硫酸铵 0.1%,碳酸钙 0.7%,葡萄糖 1.97%,玉米浆 1.2%,磷酸二氢钾 0.04%,pH6.8,121 °C 灭菌 25 min。接种量 5%(二级种子),250 mL 摇瓶装液量为 50 mL,培养温度 33 °C,摇床转速 220 r/min,培养 168 h。

收稿日期:2012-05-20

基金项目:四川省教育厅成果培育项目(11ZZ016)

作者简介:左勇(1972-),男,重庆万州人,副教授,主要从事生物工程和生物制药方面的研究,(E-mail)sgzuoyong@tom.com

1.3 红霉素生物效价测定

采用管碟法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 红霉素发酵温度的控制

在红霉素的整个发酵周期内,由于发酵环境在不断改变,红色糖多孢菌在不同生长阶段的最适温度就不同,通过把红霉素整个发酵周期分为前期发酵(0~48 h)、中期发酵(48~120 h)、后期发酵(120~168 h)。对不同发酵阶段,分别研究不同阶段温度对红霉素发酵的影响。

2.1.1 前期发酵温度的控制对红霉素效价的影响

取5个250 mL锥形瓶,各装入50 mL起始pH值6.8的发酵培养基,接种,摇床转速为220 r/min,在0~48 h前期发酵阶段,温度分别控制为27℃、29℃、31℃、33℃、35℃培养,48~168 h后,温度控制为33℃。通过观察,在不同的温度控制下,前期发酵结束以后,发酵液随着培养温度的升高,颜色逐渐加深,33℃时最深。可能是因为前期发酵阶段,菌株生长繁殖较快,所以在不同温度下发酵液呈现不同颜色,在最适温度下,发酵液的颜色最深。前期发酵阶段不同的温度控制对发酵结果的影响如图1所示。

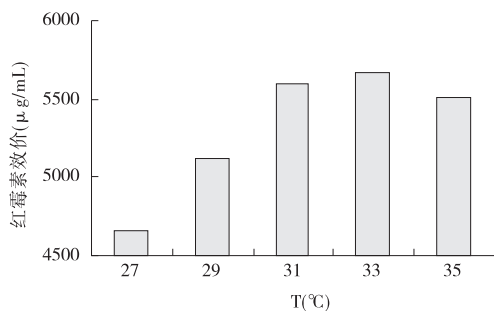


图1 前期发酵温度对红霉素效价的影响

从图1可知,在前期发酵阶段,控制不同的温度,对红霉素的发酵结果影响非常显著,当温度为33℃左右时,发酵液中红霉素的效价最高。因此,前期发酵阶段,最适温度控制为33℃。

2.1.2 中期发酵温度的控制对红霉素效价的影响

取5个250 mL锥形瓶,各装入50 mL起始pH值6.8的发酵培养基,接种,摇床转速为220 r/min,在48~120 h中期发酵阶段,温度分别控制为27℃、29℃、31℃、33℃、35℃,其它发酵阶段温度控制为33℃。发酵结束以后,中期发酵阶段不同的温度控制对发酵结果的影响如图2所示。

发酵中期是红霉素合成的时期,温度高低直接影响

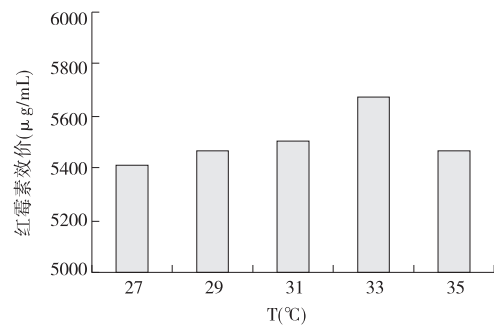


图2 中期发酵温度对红霉素效价的影响

着红霉素合成。从图2中可知,当温度超过33℃时红霉素发酵效价不再增加,这是因为红霉素的生物合成需要大量的酶参加,温度过高过低都将影响酶的活性,从而影响红霉素的最终发酵效价。因此,红霉素中期发酵温度控制为33℃。

2.1.3 后期发酵温度的控制对红霉素效价的影响

取5个250 mL锥形瓶,各装入50 mL起始pH值6.8的发酵培养基,接种,摇床转速为220 r/min,在120~168 h后期发酵阶段,温度分别控制为27℃、29℃、31℃、33℃、35℃,其他发酵阶段温度控制为33℃。发酵结束以后,后期发酵阶段不同的温度控制对发酵结果的影响如图3所示。

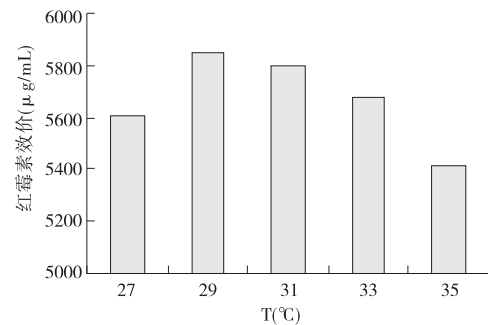


图3 后期发酵温度对红霉素效价的影响

发酵后期菌株进入衰亡期,温度的高低影响着菌株的衰亡情况,从图3中得到,温度29℃时,发酵水平最高。

2.2 发酵起始pH值对红霉素效价的影响

pH值控制不仅是保证红色糖多孢菌正常生长繁殖代谢的主要条件,而且是防止杂菌污染的一个主要措施。当pH值偏高或偏低,都会影响红色糖多孢菌的生长繁殖和红霉素的积累。取5个250 mL锥形瓶,各装入50 mL发酵培养基,发酵起始pH值分别调为6.4、6.7、7.0、7.3、7.6,接种,发酵温度采用变温发酵,前期发酵温度为33℃,中期发酵温度为33℃,后期发酵温度为29℃,转速220 r/min摇床培养。

通过观察,起始 pH 值对发酵液颜色和菌丝体影响较大。随 pH 值的增大,发酵液颜色加深,菌丝浓度也增大。而且随 pH 值的增大菌丝有成因现象。用 pH 计测得,发酵结束时发酵液 pH 值均小于 7.0。发酵起始 pH 值对红霉素效价的影响如图 4 所示。

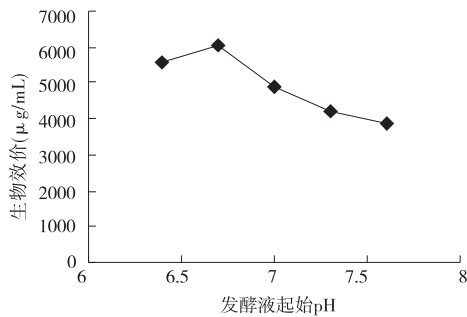


图 4 pH 值对红霉素效价的影响

由图 4 可知,pH 值对红霉素发酵效果影响显著。当发酵起始 pH 值过低时,影响菌丝体繁殖,从而影响中期红霉素的生物合成。当发酵起始 pH 值偏碱时,菌丝体大量繁殖,导致发酵液中菌丝体浓度过高,影响发酵液中的溶氧量,从而影响红霉素合成。在发酵过程中,发酵液颜色加深可能是因为菌体自溶引起的。综上,发酵起始 pH 值为 6.7 左右时,发酵效果最好。

2.3 正交实验

将各发酵阶段温度优化结果和起始 pH 值优化结果进行正交实验,进一步优化温度与 pH 值对红霉素效价的影响。其各因素水平见表 1,实验结果见表 2。

表 1 正交因素水平表

水平	A 前期温度 (°C)	B 中期温度 (°C)	C 后期温度 (°C)	D 起始 pH
1	31	31	27	6.5
2	33	33	29	6.7
3	35	35	31	6.9

表 2 正交实验结果(3⁴)

实验号	A	B	C	D	生物效价(μg/mL)
1	1	1	1	1	5770
2	1	2	2	2	6253
3	1	3	3	3	4983
4	2	1	2	3	5227
5	2	2	3	1	5531
6	2	3	1	2	4781
7	3	1	3	2	5963
8	3	2	1	3	4914
9	3	3	2	1	4694
k1	5669	5653	5155	5332	G = 48116
k2	5180	5566	5391	5666	
k3	5190	4819	5492	5041	
R	489	834	337	625	

注:前期发酵时间为 0~48 h、中期发酵时间为 48~120 h、后期发酵时间为 120~168 h。

从正交实验结果可以看出,实验号 2、7 得到较高的发酵水平。其中 2 号的发酵水平最高,其实验方案为 A₁B₂C₂D₂,即前期、中期、后期三个阶段的发酵温度分别为 31 °C、33 °C、29 °C,起始 pH 值为 6.7。由极差分析可知,四个因素中对发酵水平影响最大的是中期发酵温度,其次是发酵起始 pH 值,影响最小的是发酵后期温度。原因在于中期发酵是红霉素合成的主要时期,温度高低直接影响红霉素生物合成有关酶的活性。发酵起始 pH 值和前期发酵温度主要影响红色糖多孢菌的生长繁殖。

2.4 摇床转速对红霉素效价的影响

红霉素发酵过程是一个高耗氧的过程^[8],红色糖多孢菌的生长繁殖和红霉素合成都需要消耗氧气,因此,通过控制摇床转速来控制红霉素发酵液中的溶氧量。取 5 个 250 mL 锥形瓶各装入 50 mL 发酵培养基,编号为 1~5;发酵起始 pH 值 6.7,接种,0~48 h 温度为 31 °C,48~120 h 温度为 33 °C,120~168 h 温度为 29 °C,转速控制情况与实验结果见表 3。

表 3 摇床转速情况对发酵水平的影响

组号	发酵时间(h)					生物效价 (μg/mL)
	150 r/min	220 r/min	300 r/min	220 r/min	150 r/min	
1	0~12	12~24	24~72	72~144	144~168	5584
2	0~24	24~48	48~96	96~144	144~168	6383
3	—	0~24	24~48	48~144	144~168	5321
4	—	0~48	48~96	96~144	144~168	6556
5	—	0~168	—	—	—	6312

通过控制不同时期摇床转速发现,红霉素发酵过程中各个时期菌体对氧气的需求量不同。在发酵前期菌体大量增殖,因此转速过慢则不能满足菌体生长繁殖所需要的氧。发酵中期到后期是红霉素合成的关键时期,这时对氧的需求量整体水平高于前期,但是发酵将结束时,菌体已处于老龄阶段,供氧过高则加速了菌体的自溶。从表 3 的实验结果可知,4 号取得最高的生物效价 6556 μg/mL,比恒速发酵的生物效价 6312 μg/mL 提高了 3.87%,其最佳控制条件为:0~48 h 摇床转速为 220 r/min,48~96 h 摇床转速为 300 r/min,96~144 h 摇床转速为 220 r/min,144~168 h 摇床转速为 150 r/min。

3 结束语

红霉素发酵过程中温度影响着红色糖多孢菌的生长繁殖和与红霉素生物合成有关的酶的活性。pH 呈碱性时,菌丝体繁殖较快,不利于红霉素的生物合成,当发酵液 pH 值过低时,影响菌丝体生长繁殖,也不利于菌株

的生长繁殖。通过正交试验,红霉素最佳的发酵条件为,其实验方案为 $A_1B_2C_2D_2$,前期发酵温度为 $31\text{ }^\circ\text{C}$,中期发酵温度为 $33\text{ }^\circ\text{C}$,后期发酵温度为 $29\text{ }^\circ\text{C}$,起始最佳 pH 值为 6.7。在此条件下,摇床转速控制为:0~48 h 为 220 r/min,48~96 h 为 300 r/min,96~144 h 为 220 r/min,144~168 h 为 150 r/min,出发菌株 UL5 的发酵水平从工艺优化前的 $5674\text{ }\mu\text{g/mL}$ 提高到 $6556\text{ }\mu\text{g/mL}$,提高了 15.54%。

参考文献:

- [1] Stassi D, Donadio S, Staver M J, et al. Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis[J]. J Bacteriol, 1993, 175(1):182-189.
- [2] 张金国, 刘翔. 红霉素发酵培养基优化研究[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(7):406-416.
- [3] 施敏敏. 红霉素发酵过程的控制技术[J]. 工业控制与应用, 2009, 28(7):18-22.
- [4] 李啸, 陈长华, 李友元. 红霉素 A 发酵条件的优化[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(6):381-383.
- [5] 左勇, 李杨, 任永利, 等. 红霉素产生菌的诱变及培养基优化研究[J]. 四川理工学院学报:自然科学版, 2012, 25(1):14-18.
- [6] 左勇, 霍丹群, 李杨, 等. 红霉素发酵培养基的优化研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30):18763-18765.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [8] 庄英萍, 储炬, 张嗣良. 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):636-639.

Experimental Study on Technical During Shake Flask Fermentation for Erythromycin Production

ZUO Yong, LI Yang, XIE Hui, QI Feng, LIU Li-ping, ZHANG Jing

(School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: Several technologies during the shake flask fermentation of erythromycin have been studied. Through the regression of orthogonal experiment design, the optimum fermentation temperatures are obtained: $31\text{ }^\circ\text{C}$ at earlier stage, $33\text{ }^\circ\text{C}$ at middle stage, $29\text{ }^\circ\text{C}$ at last stage. In addition, the optimum pH value is 6.7. By optimizing the rotation speeds condition, the optimal speed condition are 220 r/min in 0~48 h, 300 r/min in 48~96h, 220 r/min in 96~144 h, 150 r/min in 144~168 h in erythromycin fermentation. Compared with the previous conditions, the erythromycin yield is increased by 15.54%.

Key words: *Saccharopolyspora erythraea*; shake flask fermentation; technical optimization; orthogonal test