

奈替米星发酵放大工艺研究

杨 丽¹

王莲芬²

(青岛化工学院 青岛 266042)¹ (青岛大学 青岛 266071)²

摘要: 考察了奈替米星摇瓶发酵代谢特征,研究了磷酸盐和甲硫氨酸对菌丝生长和发酵单位的促进与提高作用。进而,以相同单位体积搅拌功率为基准放大,使 15t 发酵罐奈替米星发酵过程接近摇瓶水平。

关键词: 奈替米星, 发酵, 放大

中图分类号: TQ465.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0356-04

STUDIES ON SCALE-UP OF NETILMICIN FERMENTATION TECHNOLOGY

YANG Li¹

WANG Lian-Fen²

(Qingdao Institute of Chemical Technolog, Qingdao 266042)¹ (Qingdao University, Qingdao 266071)²

Abstract: Netilmicin n etabolic characteristics of shaking-flask fermentation were investigated. In 12L glass fermentor, it was showed that phosphate and methionine stimulated growth of mycelia and increased the production of antibiotic. On this basis, netilmicin fermentation had been scaled up successfully according to the standard of the same agitated power per unit volume from 12L fermentor to 5t fermentor.

Key words: Netilmicin, Fermentation, Scale-up

奈替米星 (Netilmicin, NET) 是新一代氨基糖甙类半合成抗生素^[1], 它在迄今氨基糖甙类抗生素中耳毒性最低^[2~3], 是国际上公认的氨基糖甙类抗生素的换代产品, 国内九十年代中后期正式投入市场, 经医院临床应用证明, 它对呼吸道、泌尿系统、消化道感染造成的疾病和外科手术引起的重度感染有显著治疗作用, 被日益广泛应用。奈替米星无论单独使用或与其它药物 (大多为 β -内酰胺类抗生素) 联合治疗 G^+ 或 G^- 引起的不同感染均有很高疗效。为使各项关键工艺指标达到或接近国外先进水平, 本课题组对发酵进行了研究与实验, 在摇瓶发酵的基础上, 进行放大规律研究, 得到了适合当前条件的发酵工艺, 应用于 15t 发酵罐生产中, 提高了奈替米星的生产能力。

1 材料与方法

1.1 菌株

橄榄星孢小单孢菌 (*Micromonospora olivoasterospora* DM-59) 由青岛第二制药厂提供。

1.2 培养基

种子培养基: 葡萄糖 5g, 酵母粉 6g, 蛋白胨 6g, 淀粉 20g, 定容至 1L。发酵培养基: 淀粉 30g, 蛋白胨 15g, 糊精 20g, 豆粉 15g, 玉米浆

5g, 少量无机盐溶液, 定容至 1L。

1.3 培养条件

摇瓶种子培养: 500mL 三角瓶中装入 40mL 种子培养基, 接种后置 34℃ 旋转式摇床上, 振荡培养 40~45h。摇瓶发酵: 500mL 三角瓶中装入 40mL 发酵培养基, 接种后置旋转式摇床上, 34℃ 振荡培养 160h。小罐发酵: 34℃ 培养 40h 的摇瓶种子, 接入 12L 发酵罐 (BF-12-1 型, 华东理工大学产品) 中, 34℃ 培养 160h, 搅拌转速 300r/min, 单位体积培养液的空气流量 $0.5\text{m}^3/\text{min}$ 。大罐发酵: 经种子罐扩大培养的摇瓶种子, 接入 15t 发酵罐, 34℃ 培养 160h, 搅拌转速 150r/min, 通气量同小罐。

1.4 参数测定

1.4.1 生物效价: 按中国药典 1990 年版中规定操作^[4]。

1.4.2 菌丝干重: 将发酵液抽滤, 收集菌体, 蒸馏水洗 3 次, 在 105℃ 红外灯烘至恒重。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶发酵

2.1.1 种龄、发酵周期的确定: 不同培养时间的摇瓶种子接入发酵培养基中, 进行 160h 摇瓶发酵, 结果见表 1, 40h 种子在不同的时间中止发酵, 测其生物效价, 见表 2。

表1 种龄对DM-59发酵的影响 (n=5)*

种子培养时间 (h)	30	32	34	36	38	40	42	44
相对效价 (%)	48.7	58.3	62.7	92.6	100.0	109.1	97.6	83.8

*实验结果的平均相对偏差小于2.5%

表2 发酵周期试验结果 (n=5)*

发酵时间 (h)	120	130	140	150	160	170
相对效价 (%)	65.8	71.2	78.9	83.9	114.9	100.0

*实验结果的平均相对偏差小于1.8%

可以看出, 移种时间过早, 发酵单位偏低, 主要是由于菌丝量较少, 且尚未进入对数期, 接入发酵培养基后, 导致菌种不能顺利进入分泌期, 影响发酵的正常进行; 种龄太长, 菌丝过早衰老, 对发酵不利, 适宜的种龄在 40h 左右。发

酵周期过短, 菌种生产能力尚未完全发挥; 过长, 则造成过分发酵, 菌丝衰老、自溶, 发酵单位反而下降, 并给产品的提取与精制带来困难, 因此发酵周期以 160h 较合适。

2.1.2 溶氧对发酵的影响: 为研究菌种 DM-59

对氧的需求情况,考察了不同转速、装量条件下摇瓶发酵状况,由表 3 可见,随装量体积的增加,发酵效价下降幅度较大;高转速时发酵水平较高,说明菌种对氧的需求较大,实际生产时应该注意改善供氧状况。

表3 摇瓶中溶氧对发酵单位的影响(n=4)*

装量 (mL)	相对效价 (%)	
	160 (r/min)	230 (r/min)
40	100.0	165.0
60	55.5	99.0
90	0	0

*实验结果的平均相对偏差小于1.9%

2.2 小罐发酵

在摇瓶试验的基础上,利用小发酵罐进行发酵研究,考虑到发酵液中豆粉、蛋白胨等成分易产生泡沫,发生顶罐现象而造成染菌,故通气量选定为单位体积培养液空气流量 0.5m³/min。在小罐试验中经常出现菌丝生长缓慢甚至停止生长现象,通过工艺研究,寻找了解决这一问题的途径,另外为进一步提高发酵水平,进行了甲硫氨酸试验。

2.2.1 磷酸盐对菌丝生长和发酵的影响:磷酸盐对初级代谢主要途径的许多酶有刺激作用,

高浓度磷酸盐能阻遏一些抗生素合成酶的基因表达^[5]。因此培养基中适当添加磷酸盐将有助于促进菌丝生长及产物分泌。图 1 显示了不同浓度的磷酸氢二钾对 DM-59 菌丝生长及发酵的影响,当添加浓度为 0.03% 时,最适于发酵产物的生物合成。

2.2.2 搅拌转速对 DM-59 发酵的影响:根据摇瓶试验结果,菌丝生长缓慢或停止生长的另一原因可能是溶氧不足造成的。选择 200、300、400r/min 转速分别进行小罐发酵,不同转速与发酵效价的关系见图 2,转速为 200r/min 时,由于供氧能力不足,溶氧很快耗完,菌体因缺氧而不能正常生长和代谢,镜检显示,菌丝细而短小,发酵水平较低;转速为 400r/min,供氧能力较强,发酵前期,菌体疯长,镜检显示菌丝粗壮,呈密网,但 36h 后部分菌丝开始自溶,发酵结束时,产物浓度不高;转速为 300r/min 时,发酵前期,供氧能力不太高,使菌体生长不至过于旺盛,36h 后菌种进入抗生素分泌期,溶氧可满足产物分泌需要,使最终发酵水平较高。

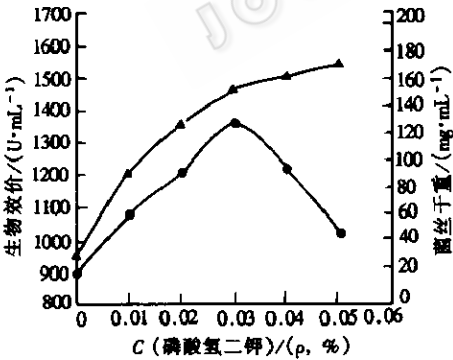


图1 磷酸氢二钾浓度对菌丝生长与效价的影响
—▲—菌丝干重,—●—生物效价

为菌体生长所需要,但同时磷酸盐在转录水平调控着次级代谢产物包括抗生素的生物合成,

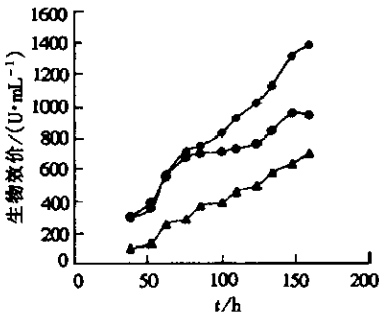


图2 搅拌转速对发酵效价的影响

—■— 300r/min,—●— 400r/min,—▲— 200r/min

2.2.3 甲硫氨酸对大罐发酵的影响:在 DM-59 菌种合成产物的过程中有多步甲基化,甲硫氨酸做为甲基供体,可为充分发挥菌种潜力,提高产物合成量,可在培养基中加入适量甲硫氨酸,表 4 显示了添加不同浓度的甲硫氨酸时对产物

表4 甲硫氨酸对DM-59发酵的影响(n=4)*

甲硫氨酸浓度 (%)	0	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12
相对效价 (%)	47.8	82.3	91.2	98.6	106.5	100.0

*实验结果的平均相对偏差小于2.0%

合成的影响情况,培养基中甲硫氨酸含量为 0.10% 时,发酵产物生物效价最高。

2.3 大罐发酵

由上述试验可知,溶氧对 DM-59 发酵影响较大。在发酵液性质及通气量维持不变的条件下,供氧能力主要由搅拌功率决定,由于大罐与小罐结构几何相似,若以单位体积通气搅拌功率相等为基准放大^[6],则:

$$(Pg/V)_1 = (Pg/V)_2 \quad (1)$$

$$\text{可得 } n_2 = n_1(d_1/d_2)^{0.745}[(\omega g)_2/(\omega g)_1]^{0.08} \quad (2)$$

式中:Pg 为通气情况下的搅拌功率(W),n

为搅拌转速(r/min),d 为搅拌桨叶直径(m), ωg 为操作状态下的空气线速度(m/min)。由于大罐和小罐空气流量相同,

$$\omega g \propto (VVM)V_1/(PD)^2 \propto (VVM)D/P \quad (3)$$

$$\text{故 } (\omega g)_2/(\omega g)_1 = D_2/D_1 = P_1/P_2 \quad (4)$$

$$\text{这样 } n_2 = n_1(d_1/d_2)^{0.745}(d_2/d_1)^{0.08} \quad (5)$$

小罐桨叶直径为 $d_1 = 0.12\text{m}$, 转速 300r/min, 大罐桨叶直径 $d_2 = 0.8\text{m}$, 由式(5)计算得到大罐搅拌转速为 90r/min, 以此转速为依据进行大罐校正, 在 90、150、200r/min 转速下分别进行发酵, 其它条件按小罐试验优化工艺, 并将

表5 大罐搅拌转速的确定(n=3)*

转速(r/min)	90	150	230	摇瓶对照230(r/min)
相对效价(%)	74.3	93.8	71.4	100.0

*实验结果的平均相对偏差小于3.1%

所得结果与摇瓶发酵比较见表5。显然转速为 150r/min 的大罐优化工艺, 菌种发酵水平较高且与摇瓶发酵接近。由于大罐与小罐内流体流型、氧的传递速度、空气比表面积等诸多不同, 加上发酵液粘度较大, 使实际搅拌功率较计算值大些, 生产中应注意改善供氧状况。

以上结果表明 DM-59 菌株对氧需求量大, 在原培养基配方的基础上添加 0.03% 的磷酸盐、0.1% 的甲硫氨酸能促进菌丝生长, 提高发酵水平。依据单位体积通气搅拌功率相等的原则, 可进一步将奈替米星发酵放大到 15t, 发酵水平与摇瓶发酵接近。加强氧的传递, 对菌种代谢机制的全面考察等工作有待于进一步研究与探索。

参 考 文 献

- [1] 山东省立人民医院. 临床新药. 济南: 山东科技出版社, 1992, 144~146.
- [2] Blaser J, Simmen H P, Thurnheer U *et al.* J Antimicrob Chemother, 1995, 36(5): 803~814.
- [3] Kotretsou S, Mingot-Leclercq M P, Tulkens P M. J. Med. Chemical, 1995, 38(23): 4710~4719.
- [4] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(二部). 北京: 人民卫生出版社, 化学工业出版社, 1990, 113.
- [5] 武兵元译. 国外医药抗生素分册, 1992, 13(5): 326~328.
- [6] 俞俊棠, 唐孝宣. 生物工艺学(下册). 上海: 华东化工学院出版社, 1992, 132~135.