

醋酸可的松微生物转化工艺条件的研究

金青萍 郑自龙

(华东化工学院生化工程教研组, 上海)

刘维达 彭贵章

(上海第十二制药厂)

利用微生物将醋酸可的松转化成醋酸强的松的工艺在国内外早已普遍采用。近年来醋酸强的松的医疗用途日趋广泛, 再加上一些高效皮质激素又以醋酸强的松为原料, 因此醋酸强的松的需要量较大, 产值也较高。但目前我国强的松生产上普遍存在着装料系数低、转化周期长、转化率不高等问题。本文主要报道有关醋酸可的松以简单节杆菌转化为醋酸强的松的工艺条件, 着重介绍消沫剂和分散剂、控制转化 pH、提高节杆菌生长温度及增加底物投料量等方面的试验。使醋酸可的松的转化率稳定在 93—95%, 收率从 78% 增加到 83%, 发酵罐的装料系数从 30% 提高到 50—60%, 底物投料浓度从 4% 增加到 5—6%, 转化周期从原来的 72 小时缩短到 45 小时以内。转化后杂质少, 产品质量均可达到优级品标准。

材料与方法

(一) 菌种

简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*)。

(二) 设备

BF-II-12 型玻璃发酵罐

实际体积: 10L; 罐高: 400mm; 罐径: 200mm;

搅拌形式: 六平叶、三挡; 装料体积: 5—6L。

(三) 发酵

1. 培养基配方(%): 工业葡萄糖 0.6; 玉米浆 0.6; 蛋白胨 0.4; 磷酸二氢钾 0.15; 豆油

0.1; pH: 7.1—7.2。

2. 微生物生长阶段的工艺条件: 罐温: 28℃; 罐压: 0.3—0.5kg/cm² (表压); 通气量: 100L/h; 搅拌速度: 250—300rpm; 培养时间: 20—24 小时; 一级培养; pH 自然变化; 接种量: 一个扁瓶 (500L) 接 18L 培养基。

3. 底物转化阶段的工艺条件: 罐温: 32℃; 罐压: 0.3—0.5kg/cm² (表压); 通气量: 100L/h; 搅拌转速 350—400rpm; 醋酸可的松投入量: 4%; 酒精投入量: 7% (95% 工业酒精)。

4. 投料指标: ①菌体形态: 呈短棒状, 最好能结成网, 无杂菌; ②菌体浓度: 透光率 < 55%; ③脱氢酶活力: 脱氢酶指示剂变色时间 < 1 分钟; ④ pH 在 7.2 左右。

5. 投料方式: 待发酵参数达到上述指标即可投料。投料时打开发酵罐入孔 (此时菌已长好, 不易染菌), 用氨水调 pH 到 7.1—7.5, 再将醋酸可的松、酒精、消沫剂等同时投入发酵罐, 将入孔关上进行转化。

(四) 分析测定

1. 菌体浓度: 用 58-1 型比色计 (红色滤光片) 测定样品的透光率 (用灭菌后的培养基作空白对照)。

2. 脱氢酶活力: 用 1% 2, 3, 5-三氯化苯基四氮唑的水溶液作指示剂。取 8ml 发酵液在 28℃ 水浴保温 5 分钟, 然后加入 2—3 滴指示剂, 随即记录时间直到发酵液变红为止。

华东化工学院生化工程专业 79 届毕业生王淼、何超美、费莎、刘园、严东红、周重道、陈晓峰、王继鸣等参加部分试验工作。

3. 比值测定： 用 751-G 型分光光度计测定。以比值作为底物转化的参考指标，一般比值在 2.09—1.95 之间的样品其薄板层析所得转化率在 90—95% 之间。比值越小转化率越高。

比值 = $\frac{\text{样品在 240nm 波长时的吸收值}}{\text{样品在 260nm 波长时的吸收值}}$

结果与讨论

(一) 添加消沫剂与分散剂对转化率的影响^{[1][2]}

醋酸可的松在微生物转化过程中会产生大量泡沫，生产上不得不降低装料系数，一般只有 30%，严重影响了设备的利用率。另外，在发酵过程中许多菌体、底物、产物等汇集在泡沫中，形成一个很稳定的“泡沫层”，其体积约占整个体积的一半以上，并浮动在发酵液之上而不能被搅拌器分散，严重影响了发酵液的物质传递。所以泡沫层中的底物转化率要比液体中的转化率低 5—10%。为了消除泡沫层，我们选用了消泡剂泡敌（I），豆油（II）以及两者混合液进行试验。这些消泡剂均在底物投入前加入。试验结果见表 1。

由于不加消沫剂在玻璃罐上逃液严重无法控制，所以上述试验没有对照试验，只能与工厂的实际生产进行比较。目前生产上由于不加消沫剂装料系数只有 30% 左右，转化时间为 72

小时，转化率约为 90%，比值在 2.05 左右。从表 1 可以看出，无论是 I 或 II，还是混合加入，转化率均可在 92% 以上，转化时间缩短到 40 小时左右，装料系数可增加到 50—60%。但是单独加入 II 其用量要大于 0.36% 才能做到无逃液现象，I 的用量为 0.1% 即能完全消除“泡沫层”，且产物的结晶颗粒明显变小，质量均达到优级品。

醋酸可的松的微生物转化过程属于微晶发酵过程^[3]。因此增加发酵液中固体粒子的分散度，就有利于酶促反应的进行，并有可能减少产物晶体中所包埋的底物的量。我们选用十二烷基磺酸钠作为分散剂，试验结果表明当该分散剂用量为 0.05% 时可以提高转化率，改善产物的色泽。

(二) 控制转化期 pH 值

目前工业生产中整个发酵周期 pH 变化较大，一般从培养基灭菌前的 7.1—7.2 逐渐下降到放罐时的 6.0 左右，有时会下降到 5.0。pH 值偏低会影响酶的活性中心对底物的催化作用。本实验用 20—25% 的氨水使 pH 稳定在 7.1—7.5 之间。实验证明，当发酵液的 pH 偏离该范围时，转化率受到明显影响。据报导^[4]简单节杆菌产生的脱氢酶的最适 pH 为 7—8，酶活性在 pH6—7 较稳定，我们的试验结果与前者相符。

表 1 消沫剂对发酵的影响*

罐批	消沫剂	消沫剂用量	添加时间	转 化 率	发酵情况
2-1	II	0.3%	发酵20小时后	92%	泡沫频繁上升,较难控制
2-2	II	0.36%	同上	92%	同上
6-1	II	0.20%	同上	92%	开始泡沫大,加 3i 后泡沫才能控制
	I	0.06%	发酵36小时后		
8-1	I	0.05%	发酵20小时后	93%	后期泡沫才稳定
	II	0.15%			
	I	0.04%	发酵32小时后		
5-2	I	0.1%	发酵20小时后	95%	发酵正常,泡沫易控制
8-4	I	0.1%	同上	95%	同上

* 转化时间为 40 小时,转化率为薄板层析法所测得。

(三) 增加底物投料量

由于实验中加入了泡敌, 因此就有可能增加底物的投加量。本试验把投料量从 4% 增加到 5%, 酒精投加量仍为 7%, 其它工艺条件不变, 经 40 小时转化后比值均可在 2.05 以下, 即转化率在 92% 以上。这样在不增加设备、动力及人力的情况下, 即可使产量增加 20%。

(四) 温度对菌体生长及转化率的影响

目前生产上菌体的生长温度为 28℃, 培养 22—24 小时可以达到投料标准, 为了加快菌体的生长速度, 我们改用 32℃ 培养, 结果培养 16 小时透光率即可达到 55% 以下, 酶活力也比 28℃ 培养高。用 32℃ 培养还可节约冷却水, 缩短生长期。另外我们对转化温度也做了一些试验, 发现用 35℃ 效果较好, 一般当转化时间为 21—36 小时, 比值即可达到 1.95 左右。原工艺转化温度为 32℃, 转化时间需 72 小时, 因此提高转化温度可使转化时间大幅度降低。

(五) 转化期间补加菌体培养液

为了使整个转化期间保持充足的酶量以维持较高的转化速率, 在转化期间补加 10% 的培养液也取得了较好的效果, 转化速率加快, 转化时间缩短。从摇瓶试验看出, 转化 8 小时以前补加菌液对转化率影响不大, 转化 12 小时后补加菌液能促进转化。在玻璃罐上也得出了同样的结果。(见表 2)。

表 2 转化 12 小时后补加菌液对转化的影响

罐批	5-17*	7-12	2-16	3-16	5-16	2-17	4-17
比值	2.02	1.94	1.97	1.90	1.99	1.95	1.92

* 未补菌液

参 考 文 献

- [1] Коченко, К. А. Изд.: СССР, 323975.
- [2] 磯田考一、藤本武彦著, 天津市轻工业化学研究所译: 表面活性剂, 轻工业出版社, 1973 年。
- [3] Болман, Е. А. И др.: Изв. Акад. Наук. СССР. Сер. Биол., 1: 143—144 1975.
- [4] 杨廉婉、钟丽婵 微生物学报, 23(2): 128—132, 1983.