

新霉素发酵工艺研究

II. *Streptomyces fradiae* 61-7-12 菌株发酵*

張筱玉 謝信媛 許文思

(国营上海第三制药厂, 上海)

1951年 Lechevalier^[1]用水解酪素、肉膏有机培养基, Nickerson和Mohan^[2]用谷氨酸合成培养基研究了新霉素的生物合成。报告中指出当菌丝体早期自溶时新霉素达到最高产量。

我们从 *Streptomyces fradiae* u₁-19 菌株经氮芥子气处理获得的变种 61-7-12 菌株, 其培养特征与母种有明显区别^[3], 新霉素生物合成能力显著提高。虽然前文指出抗菌素生产菌株的选育对提高抗菌素的产量起着很大的作用, 但发酵培养基的选择亦有着重要的意义, 因为综合抗菌素的量在一定程度上取决于培养基的成分。经过强烈因素或化学诱变剂处理而获得的变种, 往往在发酵生理特性上有一定的改变。因此, 我们在摇瓶及 800 升罐进行了 61-7-12 及 u₁-19 两菌株的发酵工艺比较试验, 其目的在于寻找适合于 61-7-12 菌株大量综合新霉素的最适合发酵条件。

试验材料与方法

发酵条件试验: 先在 500 毫升三角瓶内, 贮 60 毫升培养基, 于旋转式摇瓶机上培养, 摇瓶机转速为 230 r. p. m.; 继在 800 升不锈钢罐扩大试验, 内贮培养基 500 升, 搅拌速度 320 r. p. m., 通气量为 1—1.5 v./v./min.; 种子罐用 120 升罐, 内贮培养基 60 升, 搅拌速度 230 r. p. m., 通气量为 1:1v./v./min., 消沫剂用豆油; 培养温度均为 28°C。

孢子培养基: 肉膏 0.5%; 蛋白胨 0.5%; 氯化钠 0.5%; 葡萄糖 1.0%; 洋菜 2.0%; pH 7.6。

种子培养基: 花生饼粉 2%; 葡萄糖 3%; 氯化钠 0.25%; 酵母粉 1%; 硫酸铵 0.1%; 磷酸氢二钠 0.1%; 碳酸钙 0.5%; 自然 pH。

发酵的基础培养基: 花生饼粉 3%; 酵母粉 0.5%; 氯化钠 0.4%; 硫酸铵 0.1%; 磷酸氢二钠 0.1%; 碳酸钙 0.8—1.0%。

在以淀粉为基础碳源时, 培养基的浓度分为:

(1) 稀培养基: 淀粉 2.5%; 糊精 2.5%。

(2) 半丰富培养基: 淀粉 3%; 糊精 3%。

(3) 丰富培养基: 淀粉 3.5%, 糊精 3.5%, 花生饼粉增加至 3.5%。

(4) 稀培养基中添加 0.5% 胨或其它氮源物质, 如麸质, 酵母膏等。

以葡萄糖为基础碳源时, 葡萄糖用量为 4—6%, 其纯度按工业原料 80% 折算。

在培养过程中, 取样作新霉素效价, 糖、氮、pH 等测定。

分析: 新霉素效价测定采用生物检定法。糖分析用修改后的斐林溶液法, 氨基氮的测定用甲醛固

* 本文部分内容曾在 1961 年 10 月化学化工学术年会上宣读。

本文 1963 年 10 月 7 日收到。

定后滴定法。

结 果 与 讨 论

一、几个基本发酵条件的考察

(1) 接种龄及接种量对新霉素综合的影响:

不同的接种龄对发酵过程中新霉素的产量有着直接的影响(表1)。两菌株的接种龄均以40小时左右为宜,此时以复红染色后显微镜观察,可看到61-7-12菌株的菌丝体较粗壮,原形质充实,部分分枝。 u_1-19 菌株比61-7-12菌株生长较快,菌体易衰老。从新霉素产量来看,种龄对61-7-12菌株的影响比对 u_1-19 菌株的影响要小一些。

表1 不同接种龄对新霉素产量的比较

菌株 效价 接种龄 (小时)	61-7-12 菌 株			u_1-19 菌 株		
	接 种 pH	120 小时 (微克/毫升)	%	接 种 pH	120 小时 (微克/毫升)	%
72	7.25	3,416	80.1	7.02	1,346	70.3
64	7.22	3,710	86.0	7.01	1,366	71.3
48	6.93	3,920	91.9	6.63	1,549	80.9
40	6.9	4,264	100	6.54	1,914	100
24	6.11	3,990	93.6	6.08	1,234	64.4
16	6.2	3,727	87.4	6.45	1,177	60.9

从不同接种量的试验结果(见表2),在摇瓶发酵中,以5%左右为宜;减少至1%时,仅在前期生长缓慢,48小时以后,培养液的浓度即与接种量5%的相似,在以后的发酵过程中,对新霉素的综合无显著的影响。接种量增至10—15%,培养液中养分消耗快,发酵120小时,大部分菌丝已自溶,新霉素停止产生并有下降趋势。自表2结果指出,61-7-12菌株的接种量以3—5%为佳,但在大量生产中,接种量采用5—8%为宜。

表2 不同接种量对新霉素产量的比较

菌株 效价 接种量 (%)	61-7-12 菌 株		u_1-19 菌 株	
	120 小 时 (微克/毫升)	%	120 小 时 (微克/毫升)	%
1	4,587	94.3	1,560	78.4
3	4,725	97.1	1,710	85.9
5	4,865	100	1,990	100
8	4,054	83.7	1,860	93.4
10	4,060	83.6	1,640	82.4
13	4,010	82.4	1,557	78.2
15	3,978	81.7	1,430	71.5

(2) 磷酸盐浓度对新霉素综合的影响:

在链霉素及金霉素发酵培养基中,增加无机磷酸盐的浓度,能促进菌体对糖类的利用,明显地抑止链霉素及金霉素的产量,同时堆积了多量的丙酮酸^[4,5]。在我们所采用的以花生饼粉为基础氮源的新霉素发酵培养基中,加入不同量的磷酸盐,在一定范围内对新

霉素综合的影响较小。 Na_2HPO_4 用量从 0% 至 0.1%, 对新霉素的综合影响不大, Na_2HPO_4 用量自 0.15% 逐渐增加, 新霉素效价便相应地逐步下降(表 3)。

(3) 以淀粉为基础碳源时, 发酵培养基中碳、氮源的浓度与新霉素综合的关系:

我们以不同的碳、氮源的浓度, 将发酵培养基分为稀培养基, 半丰富培养基及丰富培养基三种进行试验。在发酵过程中观察 61-7-12 菌株的代谢变化(表 4)。结果指出, 增加培养基中的碳源或氮源物质, 可以使发酵周期延长, 提高新霉素产量; 但是有其不利的一面, 在半丰富培养基中的发酵情况比在稀培养基中缓慢, pH 上升亦慢, 新霉素的分泌期亦

相应地延长, 在发酵前期新霉素效价并不高, 培养液较粘稠。如果继续增加培养基中的碳、氮源至丰富培养基, 则发酵更为缓慢, 必须延长发酵时间才能获得较高效价的发酵液, 但由于培养液的浓度更粘稠, 对过滤、提炼不利。比较适宜的是在稀培养基中添加 0.5% 其它氮源物质(表 5), 如胰、酵母膏或麸质, 可以使菌体不易衰老, 其中尤以胰为佳, 能使 61-7-12 菌株在发酵后期使新霉素效价有显著提高。

表 3 无机磷酸盐浓度对两菌株新霉素综合的影响

菌株 效价 Na_2HPO_4 加入量(%)	61-7-12 菌株	u ₁ -19 菌株
	144 小时 (微克/毫升)	144 小时 (微克/毫升)
0	5,970	1,583
0.01	6,190	1,737
0.05	6,420	1,866
0.1	6,220	1,965
0.15	5,600	1,530
0.2	4,845	1,482
0.3	4,741	1,305
0.5	4,247	1,009

表 4 61-7-12 菌株在以淀粉为基础碳源的三种培养基中的代谢变化

发酵 时间 (小时)	稀 培 养 基				半 丰 富 培 养 基				丰 富 培 养 基			
	pH	糖 (克/100 毫升)	$\text{NH}_3\text{-N}$ (毫克/毫 升)	新霉素 (微克/毫 升)	pH	糖 (克/100 毫升)	$\text{NH}_3\text{-N}$ (毫克/毫 升)	新霉素 (微克/毫 升)	pH	糖 (克/100 毫升)	$\text{NH}_3\text{-N}$ (毫克/毫 升)	新霉素 (微克/毫 升)
0	6.78	5.4	0.5514		6.64	7.45	0.6537		6.6	8.5	0.4805	
12	6.32	5.34	0.4923		6.17	5.79	0.5937		6.23	7.65	0.6145	
24	6.08	4.53	0.2521	560	6.71	5.54	0.5750	265	6.85	7.35	0.5907	258
36	7.12	4.20	0.3545	1120	6.78	5.2	0.3222	566	6.73	7.65	0.3702	690
48	7.33	4.03	0.3591	1510	7.0	4.93	0.3860	1250	6.98	6.85	0.3656	1220
60	7.15	3.45	0.5395	1850	6.96	4.48	0.4726	1460	6.95	5.40	0.4372	1480
72	7.05	3.15	0.5474	2425	6.84	4.11	0.5159	2253	6.94	5.11	0.5552	2338
84	7.15	2.76	0.7759	3713	7.30	3.49	0.6302	3375	7.10	4.56	0.7050	3090
96	7.30	2.50	0.7956	4215	7.20	3.20	0.6302	3990	7.25	4.38	0.8075	3888
108	7.52	2.24	0.8310	4600	7.38	2.31	0.7877	4310	7.34	3.99	0.8429	4240
120	7.66	2.09	0.9454	4925	7.50	2.30	0.9296	4748	7.38	3.71	0.9059	4650
144	8.0	1.99	1.450	5040	7.75	2.23	1.2480	5235	7.55	2.82	1.155	5090
156	8.34	1.72	1.520	5120	7.84	2.19	1.2670	5612	7.71	2.70	1.184	5510

二、以葡萄糖, 淀粉为基础碳源两菌株发酵变化的比较

Leach 等^[6]在铁制发酵罐内进行大量生产时, 采用葡萄糖作碳源, 黄豆粉、酵母粉为氮源的有机培养基中, 发酵 90 小时, 新霉素产量达 750—2,000 微克/毫升。Arai^[7]所用的菌株, 碳源以淀粉、麦芽糖为佳。

表 5 不同发酵培养基组成对 61-7-12 及 u_1-19 两菌株新霉素综合的关系

发 酵 培 养 基	61-7-12 菌 株			u_1-19 菌 株		
	120 小时			120 小时		
	微克/毫升	pH	残 糖	微克/毫升	pH	残 糖
稀培养基	4,501	7.25	1.91	1,719	7.50	1.77
稀培养基 + 0.5% 麸质	4,803	7.10	2.01	2,062	7.40	1.78
稀培养基 + 0.5% 酵母膏	5,070	7.28	1.92	1,820	7.55	1.78
稀培养基 + 0.5% 胰	5,333	7.34	1.95	2,113	7.70	1.89
半丰富培养基	4,750	7.01	2.25	2,290	7.14	2.08
丰富培养基	4,387	7.0	2.95	2,280	7.10	2.60

61-7-12 菌株以淀粉为基础碳源时, 发酵条件较难控制, 培养液较粘, 过滤困难。减少培养基中的固体物质, 可使粘度降低。在可溶性碳源中, 以葡萄糖应用最广。如以葡萄糖全代及半代淀粉、糊精作碳源, 并分别在配制培养基时调节及不调节 pH, 结果见表 6。

表 6 61-7-12 菌株以葡萄糖代多糖对新霉素综合的影响

培养基中主要碳源	0 小时	120 小时	
	pH	pH	效价(微克/毫升)
对照(淀粉 2.5%, 糊精 2.5%)	6.67	8.72	3465
半代(葡萄糖 2.5%, 淀粉、糊精各 1.25%)	6.64	8.4	3605
全代(葡萄糖 5%, 自然 pH)	5.5	8.0	1259
全代(葡萄糖 5%, 调 pH 至 7.5)	6.45	8.32	3669

从以上试验结果, 如培养基配制为自然 pH, 由于经灭菌后, 部分葡萄糖被氧化, 使培养基 pH 降为 5.5, 菌体接入发酵培养基后, 更由于菌体对糖类利用的结果, 使 pH 继续下降, 不利于菌体生长, 培养液一直很稀, 从而, 新霉素的生物合成能力很低, 发酵 120 小时, 仅为 1,259 微克/毫升。如在培养基配制时, 调节 pH 至 7.5, 经灭菌后 pH 为 6.5 左右, 与淀粉培养基相似, 则在发酵过程中, pH 变化、菌体生长均属正常, 对新霉素的综合无影响。发酵液的粘度大大地降低。

我们分别以淀粉及葡萄糖为基础碳源时观察 61-7-12 与 u_1-19 两菌株在 800 升罐发酵过程中的代谢变化。如图 1—4 所示:

从图 1, 3 可以看出 61-7-12 菌株的一般代谢情况, 它与 u_1-19 菌株的不同点可以归纳为以下几点: (1) 61-7-12 菌株对糖类的利用较为缓慢而均匀; 在初期 24 小时约利用 1—1.5%, 其后每 24 小时约利用 0.5%, 在相同时期比较, 其残糖比 u_1-19 菌株高 0.3—0.8%。(2) 61-7-12 菌株在发酵 24 小时即开始分泌新霉素, 当 pH 上升至 7.0 以上, 单位时间内新霉素的生长逐渐增多; 在发酵后期, 菌体自溶缓慢, 因此延长发酵时间可提高新霉素产量。而 u_1-19 菌株在 36 小时才有极少量的新霉素产生, 新霉素分泌期较短, 在 120 小时以后, 大部分菌丝已自溶, pH 迅速上升, 新霉素效价亦随着很快的下降。(3) 以葡萄糖作为基础碳源时, 对 61-7-12 菌株发酵更为适宜, 新霉素产量高, 可稳定在 7,500 微克/毫升左右; 同时发酵液粘度低。但 u_1-19 菌株在以葡萄糖为基础碳源及淀粉为基础碳源的

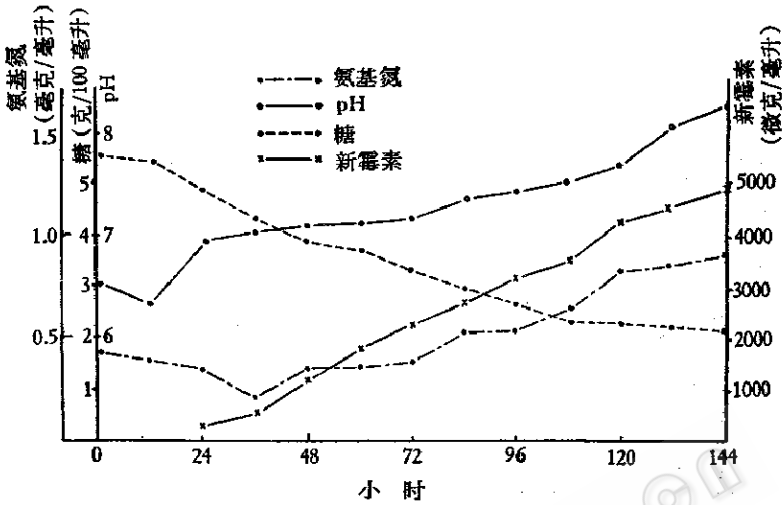


图 1 61-7-12 菌株在以淀粉为基础碳源时, 稀培养基中 pH、糖、氨基氮、新霉素等的代谢变化。

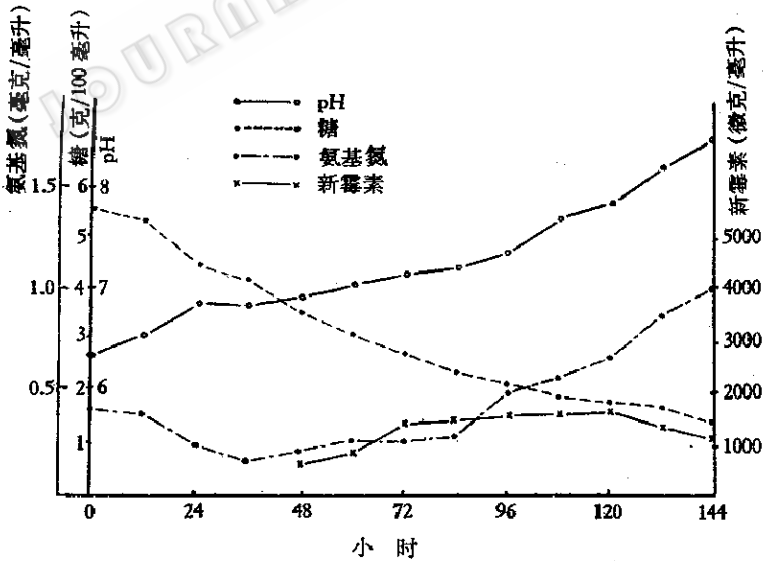


图 2 u1-19 菌株在以淀粉为基础碳源时, 稀培养基中, pH、糖、氨基氮、新霉素等的代谢变化。

注: 图 1,2 稀培养基不加蛋白胨。

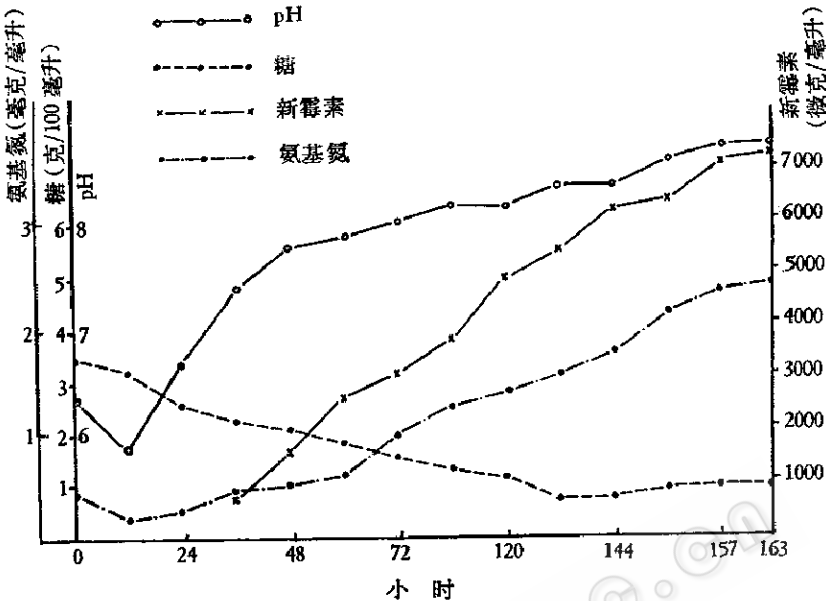


图3 61-7-12 菌株在以葡萄糖(4%)为基础碳源培养基中, pH、糖、氨基氮、新霉素等的代谢变化。

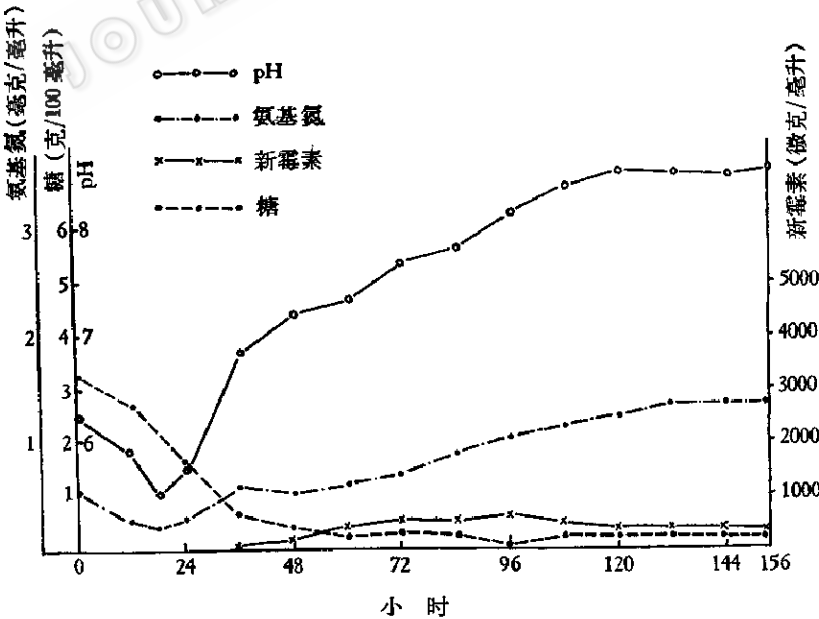


图4 u1-19 菌株在以葡萄糖(4%)为基础碳源培养基中, pH、糖、氨基氮、新霉素等的代谢变化。

注: 图3,4 培养基中添加0.5%蛋白胨。

发酵变化有着较大的区别。 u_1-19 菌株对葡萄糖耗用速度更快,氨基氮并迅速被利用,因此培养液的 pH 在发酵初期下降至 5.5,菌丝体生长很旺盛,但此大量菌体的新霉素生物合成能力很差,如图 4 所示。发酵 72 小时,新霉素效价仅为 550 微克/毫升;至 96 小时仍为 637 微克/毫升;当至发酵后期,由于培养液养分已被用竭,菌体很早自溶,故 pH 迅速上升,新霉素效价逐渐下降。以淀粉作基础碳源时新霉素产量达 1,500—2,000 微克/毫升,采用丰富培养基才稍能提高产量,故对 u_1-19 菌株而言,碳源以淀粉为宜。

在不加 0.5% 蛋白胨培养基中,61-7-12 菌株从 120 小时以后效价的增长极少,菌丝渐趋衰老(图 5)。与图 3 相比,明显地可看出添加 0.5% 蛋白胨可提高新霉素产量。

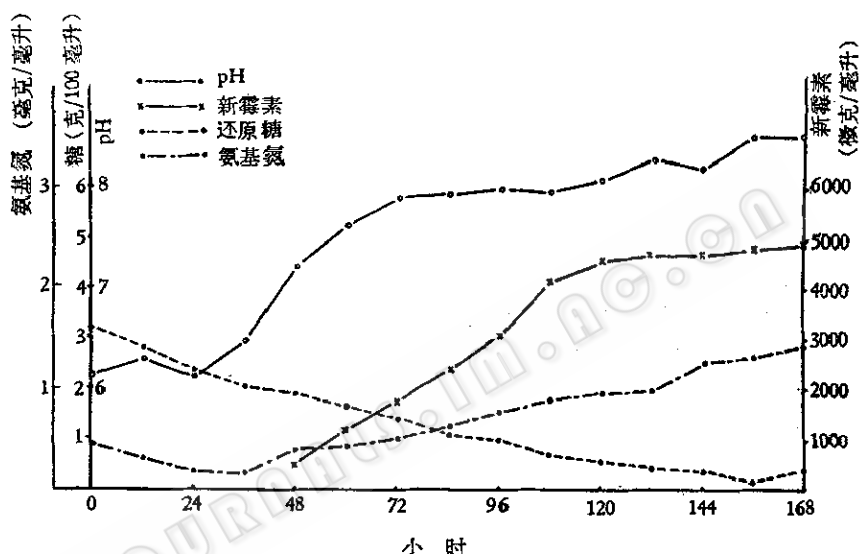


图 5 61-7-12 菌株在以葡萄糖(4%)为基础碳源不加 0.5% 蛋白胨培养基中, pH、糖、氨基氮、新霉素等的代谢变化。

结 论

1. 从比较 61-7-12 菌株及 u_1-19 菌株的发酵条件,说明两菌株有明显的区别;前者以葡萄糖为基础碳源最好,在 800 升罐适宜的发酵条件下,新霉素效价达 7,500 微克/毫升,并且发酵液粘度低,易于提炼;后者以淀粉为基础碳源为宜,达 2,200 微克/毫升,在葡萄糖培养基中仅 500 微克/毫升左右。

2. 在发酵培养基中添加 0.5% 蛋白胨,可提高新霉素产量。

3. 61-7-12 菌株对碳、氮源的利用较 u_1-19 菌株缓慢而均匀,前期效价高,新霉素分泌期长,适合于工业生产条件。

参 考 文 献

- [1] Lechevalier, H. A.: Neomycin, a new antibiotic produced by streptomyces fradiae. Thesis, Rutgers Univ., New Brunswick N. J. 1951.
- [2] Nickerson, W. J. and Mohan, R. R.: Symp. Actinomycetales, p. 137—146. 6th Intern. Congr. Microbiol., Rome, 1953.
- [3] 张筱玉、谢信媛、许文思:微生物学报, 9: 406, 1963.

- [4] Perlman, D. and Wagman, G. H.: *J. Bact.*, **63**: 253, 1952.
[5] 沈善炯、宋鴻遇、洪孟民、陳俊標、殷宏章: 實驗生物學報, **5**: 249, 1956。
[6] Leach, B. E., Devries, W. H., Nelson, H. A., Jackson, W. G., and Evans, J. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**: 2797—2800, 1951.
[7] Arai, T.: *J. Antibiotics* (Japan), **4**: 215—220, 1951.

THE TECHNICAL STUDIES ON NEOMYCIN FERMENTATION

II. THE FERMENTATION OF *STREPTOMYCES FRADIAE* 61-7-12 STRAIN

CHANG SHIAO-YU, HIE TSIN-NAN AND HSÜ WEN-SHIH
(National Shanghai No. 3 Pharmaceutical Plant, Shanghai)

1. In the comparison of the fermentation processes of the strains of *Streptomyces fradiae* 61-7-12 and *Streptomyces fradiae* u₁-19, it has been found that glucose, as a carbon source, was more favourable for the former to produce neomycin than for the latter in 800 liter tank. The titer of neomycin was about 7500 γ /ml, and the viscosity of the fermented medium was lower, and thus, the extraction of the antibiotic was to be easier. But for the strain u₁-19, starch was the more favourable carbon source than glucose. The titer of neomycin was about 2200 γ /ml.

2. The addition of 0.5% peptone to the fermentation medium had a stimulative effect for the neomycin production.

3. The consumption of the carbon and nitrogen sources for the strain 61-7-12 was slower and the neomycin production duration was longer than that of the strain u₁-19, therefore the strain 61-7-12 is more suitable for industrial neomycin production.