

利福霉素产生菌育种及发酵罐放大试验研究

王付转¹, 周爱萍², 吴存朝³

1(江南大学生物工程学院, 江苏无锡, 214122) 2(平顶山教育学院生物系, 河南平顶山, 467000)

3(漯河南街村药业集团制药有限公司, 河南漯河, 462000)

摘 要 用紫外和氯化锂复合诱变利福霉素产生菌, 得到发酵效价为 6 837 u/mL 的菌株 A22-04, 比初始菌株提高 36.5%。对该菌株进行发酵罐放大试验, 10 L 罐发酵效价为 7 234 u/mL, 发酵时间为 120 h, 比对照菌株缩短了 12 h; 30 m³ 生产罐的发酵效价为 6 497 u/mL, 发酵时间也略有缩短。

关键词 利福霉素, 育种, 发酵罐放大

利福霉素(Rifamycins)属于安莎霉素(Ansamycin)类抗生素^[1], 其化学结构包括 1 个芳香发色基团和 1 条安莎链^[2]。1958 年, 研究人员从放线菌地中海拟无枝酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)发酵产物中分离得到第一种天然的利福霉素^[3], 并于 1965 年合成利福平, 1968 年投入临床应用^[2]。利福霉素类抗生素是 DNA 依赖型 RNA 聚合酶和 RNA 依赖型 DNA 聚合酶的抑制剂, 也可能是逆转录酶(RT)特别是 HIV RT 的抑制剂^[4], 在临床上用于治疗结核分枝杆菌引起的结核病、麻风分枝杆菌引起的麻风病^[5], 以及艾滋病相关的分枝杆菌感染^[6]。

有关利福霉素的研究报道主要集中在以下几个方面: 育种、发酵工艺和后提取工艺的研究^[5,7]; 代谢及其调控研究^[8,9]; 药物机制和临床应用研究^[2,6]; 新的衍生药物研究^[10]以及利福霉素基因簇等遗传操作研究^[11]。商业发酵生产的利福霉素类药物只有利福霉素 B 和 SV, 前者再进一步转化为后者。利福霉素 SV 是合成利福平、利福定、利福喷丁、利福布丁等半合成利福系列药物的医药中间体。

我国是利福霉素 SV 的主要生产地, 但工业生产产物的发酵效价较低, 且易受季节等外界因素影响, 产量波动较大。笔者通过紫外和氯化锂复合诱变等传统育种手段, 选育到利福霉素 SV 高产菌株, 再对该菌株进行发酵工艺优化, 10 L 发酵罐小试效价有较大幅度提高, 30 m³ 发酵罐试生产也达到较好的发酵水平。

1 材料和方法

1.1 菌 种

第一作者: 博士研究生, 讲师。

收稿日期: 2007-04-13, 改回日期: 2007-06-05

利福霉素产生菌: 地中海拟无枝酸菌 *Amycolatopsis mediterranei*; 鉴定菌: 藤黄八叠球菌。

1.2 培养基组成及培养条件

固体培养基(%): 葡萄糖 2.0, 蛋白胨 0.2, 牛肉膏 0.1, 酵母膏 0.1, 甘油 1.0, 琼脂 2.0。pH 7.2。

氯化锂平板: 在固体培养基中加入 0.3% 或 0.6% 氯化锂, 制成分离平板。

种子培养基(%): 葡萄糖 1.5, 蛋白胨 1.0, 黄豆饼粉 1.0, 淀粉 1.0, KNO₃ 0.05, KH₂PO₄ 0.01, CaCO₃ 0.2。pH 7.2。

一级种子罐培养基(%): 葡萄糖 2.5, 蛋白胨 1.0, 黄豆饼粉 1.0, 淀粉 1.0, KNO₃ 0.05, KH₂PO₄ 0.01, CaCO₃ 0.2, 泡敌 0.1。pH 7.2。

二级种子罐培养基(%): 葡萄糖 4.5, 蛋白胨 1.0, 黄豆饼粉 1.0, 淀粉 1.0, 鱼粉 0.5, KNO₃ 0.6, KH₂PO₄ 0.01, CaCO₃ 0.2, CoCl₂ 1g/mL, 泡敌 0.1。pH 7.2。

发酵培养基(%): 葡萄糖 6.0, 蛋白胨 1.0, 黄豆饼粉 1.0, 淀粉 1.0, 鱼粉 0.5, KNO₃ 0.8, KH₂PO₄ 0.01, CaCO₃ 0.2, CoCl₂ 1g/mL, 泡敌 0.1。pH 7.2。

培养条件: 斜面 and 分离平板培养 6~8 d, 种液 150 r/min 摇瓶培养 60 h, 发酵瓶 150 r/min 摇瓶培养 120 h, 培养温度均为 28℃; 一级和二级种子罐培养温度 28~29℃, 罐压 0.05 MPa, 培养时间 48 h 左右; 发酵罐培养温度 26~29℃, 罐压 0.05 MPa, 培养时间 5~6 d。

1.3 诱变方法

紫外诱变: 用接种环从斜面刮取利福霉素菌种 1 环, 放入带玻璃珠的无菌水试管中, 在快速旋涡混匀器上打碎成均匀菌丝小段, 制成菌悬液, 取菌悬液 0.2 mL 放入无菌平皿中, 涂成菌液薄层, 在超净台中

风干,制成风干皿。取风干皿置于15 W紫外灯下15 cm处进行紫外辐照。这种紫外诱变方法的改进,更有利于紫外对菌体细胞的持续稳定辐照作用^[7]。

LiCl诱变:采用LiCl后处理方法。将UV诱变后的菌体涂布于LiCl平板。

1.4 筛选方法

筛选方法分为初筛和复筛2步进行,方法同参考文献^[7]。

1.5 分析方法

1.5.1 效价的测定

使用生物法测定效价的目的是验证化学测定法的准确性,文中效价均由化学法测得。生物法:用杯碟法生物测定,鉴定菌为藤黄八叠球菌^[12];化学法:用氧化还原法,分光光度计测定。

1.5.2 还原糖的测定

斐林试剂法^[13]。

1.5.3 菌丝浓度的测定

取发酵液10 mL于离心管中,4 000 r/min离心10 min,测沉淀物在发酵液中的比例即得菌体浓度。

1.6 分批补料发酵工艺

培养约40 h,发酵罐中还原糖浓度降到3.5%左

右时,分批补加高浓度的葡萄糖溶液,使还原糖维持在一定浓度范围,并控制发酵罐中总还原糖加入量约为10%。

2 结果与讨论

2.1 紫外线和氯化锂复合处理对利福霉素发酵效价的影响

利福霉素产生菌是不产孢子的放线菌,只能以其菌丝体进行诱变。菌丝体对诱变剂较敏感,所以诱变剂量不宜过大。紫外诱变采用1 min、1 min 30 s、2 min等3种辐照时间,分离平板中氯化锂含量使用0.3%和0.6%两种浓度。经多次实验证明,使用紫外1 min 30 s和氯化锂0.3%复合诱变,产生高产菌株数量最多,是较为合适的复合诱变剂量(数据未列出)。用该复合诱变剂量处理利福霉素产生菌,选出发酵效价有明显提高的8株菌株,其发酵能力如表1所示。得到A22-04菌株的发酵效价达到6 837 u/mL,比出发株(CK)提高36.5%。A22-04菌株连续3批摇瓶发酵,其效价分别为6 837、6 952、6 617 u/mL,平均6 802 u/mL,说明该菌株发酵稳定性能良好。

表1 UV和LiCl复合诱变产生的高产株及其发酵能力

菌株	A22-02	A22-04	A22-33	A22-36	A22-44	A22-49	A22-64	A22-65	ck
效价/u·mL ⁻¹	6554	6837	6285	5973	6667	6299	5959	5591	5010
提高/%	30.8	36.5	25.4	19.2	33.1	25.7	18.9	11.6	—

2.2 10 L发酵罐分批补料发酵

以A22-04为试验菌株,研究温度、pH值、转速、溶氧和通气量等发酵过程参数对利福霉素SV产量的影响。发酵的初始pH值为7.2,整个发酵过程中,pH值缓慢上升,结束时达到7.9左右,才会得到较理想的效价值;生长期菌体需氧旺盛,应提供充足的溶氧以获得健壮的菌体细胞,后续发酵才能得到保障。

A22-04菌株在10 L发酵罐中发酵过程曲线如图1所示。由图1可以看出,pH值比较稳定,随着葡萄糖的3次分批补加,pH值和菌体浓度也略有波动,pH最终达到7.9。利福霉素SV效价增长速率较大,使得最终发酵效价达到7 234 u/mL,比摇瓶发酵6 837 u/mL高出近400 u/mL,而且还未考虑摇瓶发酵的浓缩效应等因素的影响。较摇瓶发酵条件而言,在10 L罐中发酵的温度、pH值和溶氧等发酵过程参数可以控制在更好状态,更有利于利福霉素的合

成。进入主发酵期后,菌体细胞处在生长稳定期和衰亡前期,要控制发酵液中还原糖的浓度,使细胞处于半饥饿状态,物质代谢流更多地朝向利福霉素合成的方向分布。更重要的是,经紫外和氯化锂复合诱变产生的A22-04菌株,在10 L罐中发酵时间为120 h,而诱变前的对照菌株在相同条件下的发酵时间则需132 h,缩短了12 h。

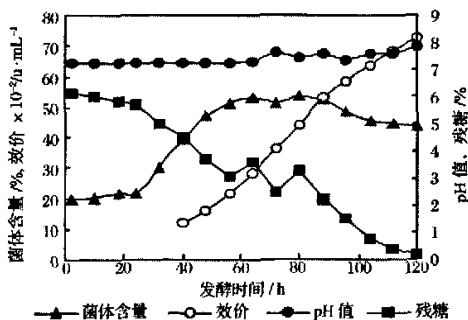
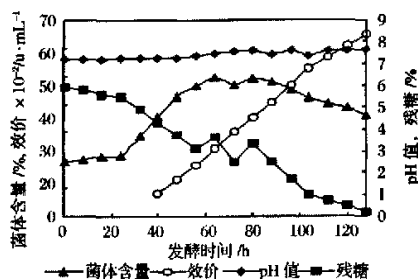


图1 10 L发酵罐发酵过程曲线

2.3 30 m³ 罐试生产

A22-04 菌株在 10 L 发酵罐中发酵稳定,多批次重复性良好,而且 10 L 发酵罐的发酵工艺也较为粗放,适合大型的工业生产应用,所以未经中试就把该菌株进行 30 m³ 生产罐放大试验。30 m³ 生产罐发酵过程如图 2 所示,和 10 L 发酵罐中发酵过程相比较,菌体量有所减少,发酵结束时的 pH 值不到 7.7,发酵效价曲线增长速率较慢,最终效价达到 6497 u/mL,发酵时间 129 h。

图 2 30 m³ 罐发酵过程曲线

3 结 论

30 m³ 生产罐和 10 L 发酵罐的各种营养物质的投料比相同,而最终利福霉素 SV 的发酵水平却相差较多。但同期的工业生产水平仅有 4 000~5 000 u/mL,因此 A22-04 菌株已具有较强的生产优势。发酵结束时,30 m³ 生产罐的 pH 值低于 10 L 发酵罐,而且,在发酵效价很低的失败试验中(未列出数据),发酵液有明显的酸味,pH 值更低。这都说明发酵过程中产生了酸性代谢产物,消耗了一部分营养物质,使得目的产物合成减少。阐明这一问题需要对发酵产物进行较为详尽的测定和分析,继而研究利福霉素

的代谢途径网络,控制发酵条件,使得代谢流更多地向次级代谢产物利福霉素 SV 合成的方向分布。这部分内容,有待进一步研究报道。

参 考 文 献

- Oppolzer W, Prelog V. On the constitution and configuration of rifamycin B, O, and SV[J]. *Helv Chim Acta*, 1973, 56:2 287~2 314
- Bujnowski K, Synoradzki L, Dnjus E, et al. Rifamycin antibiotics-new compounds and synthetic methods. Part 1: Study of the reaction of 3-formylrifamycin SV with primary alkylamines or ammonia[J]. *Tetrahedron*, 2003, 59: 1 885~1 893
- Lancini G, Parenti F, Gallo GG. 抗生素—多学科研究入门[M]. 北京:人民卫生出版,1998. 46
- Bartolucci C, Cellai L, Fillipo DP, et al. Rifamycins as inhibitors of HIV-1[J]. *Pharm Pharmacol Lett*, 1993, (3):1~4
- Venkateswarlu G, Krishna PSM, Pandey A, et al. Evaluation of *Amycolatopsis mediterranei* VA18 for production of rifamycin-B[J]. *Proc Biochem*, 2000, 36:305~309
- Sepkowitz KA, Rafalli J, Riley L, et al. Tuberculosis in the AIDS era[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1995, 8:180~199
- 王付转,梁秋霞,李宗伟,等. 利福霉素产生菌诱变育种研究[J]. 郑州大学学报(理学版), 2003, 35: 43~45
- 张蔚文,焦瑞身. 丙酸盐对利福霉素生物合成的调控[J]. 中国抗生素杂志, 1995, 20:268~272
- 张蔚文,焦瑞身. 力复霉素前体甲基丙二酰 CoA 合成途径的研究[J]. 微生物学报, 1996, 36:276~283
- Combrink KD, Denton DA, Harran S, et al. New C25 carbamate rifamycin derivatives are resistant to inactivation by ADP-ribosyl transferases[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 522~526
- Floss HG, Tin-Wein Y. Lessons from the rifamycin biosynthetic gene cluster[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, 3: 592~597
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[Z]. 北京:人民卫生出版社,化学工业出版社,1990. 113
- 管敦仪. 啤酒工业手册(中册)[M]. 北京:轻工业出版社, 1982. 184~187

Study on Breeding and Scale-up in Fermenters of Rifamycin Producer

Wang Fuzhuan¹, Zhou Aiping², Wu Cunchao³¹ (School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)² (Department of Biology, Pingdingshan Institute of Education, Pingdingshan 467000, China)³ (Pharmaceutical Limited, Nanjiecun Pharmaceutical Group Corporation, Luohe 462000, China)

ABSTRACT Using UV and LiCl as mutating agent, the *Amycolatopsis mediterranei* strain A22-04 was successfully obtained. The strain's potency of rifamycin SV reached 6 837 u/mL and was 36.5% higher than the original strain. In 10 L fermentor its potency was 7 234 u/mL and the fermentation period was 120 h, with 12 h shorter than the former fermentation time. And in 30 m³ tank its yield was 6 497 u/mL and the fermentation time was little shorter than the original.

Key words rifamycin, breeding, scale-up of fermentation