

“十三五”国家重点出版物出版规划项目

*The Production Technology of
Enduracidin in Polypeptide Antibiotic*

胡永红 欧阳平凯 著

多肽类抗生素安来霉素 生产工艺学



江苏凤凰科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

多肽类抗生素安来霉素生产工艺学/胡永红,欧阳平凯著. —南京:江苏凤凰科学技术出版社,2016.4

ISBN 978-7-5537-5087-3

I. ①多… II. ①胡… ②欧… III. ①抗生素—生产工艺 IV. ①TQ465

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 165195 号

多肽类抗生素安来霉素生产工艺学

著 者 胡永红 欧阳平凯

责任编辑 樊 明 葛 昀

责任校对 郝慧华

责任监制 曹业平 方 晨

出版发行 凤凰出版传媒股份有限公司

江苏凤凰科学技术出版社

出版社地址 南京市湖南路1号A楼,邮编:210009

出版社网址 <http://www.pspress.cn>

经 销 凤凰出版传媒股份有限公司

照 排 江苏凤凰制版有限公司

印 刷 江苏凤凰数码印务有限公司

开 本 787 mm×1 092 mm 1/16

印 张 20.75

插 页 4

字 数 256 000

版 次 2016 年 4 月第 1 版

印 次 2016 年 4 月第 1 次印刷

标准书号 ISBN 978-7-5537-5087-3

定 价 118.00 元(精)

图书如有印装质量问题,可随时向我社出版科调换.

致 读 者

社会主义的根本任务是发展生产力,而社会生产力的发展必须依靠科学技术。当今世界已进入新科技革命的时代,科学技术的进步已成为经济发展、社会进步和国家富强的决定因素,也是实现我国社会主义现代化的关键。

科技出版工作肩负着促进科技进步、推动科学技术转化为生产力的历史使命。为了更好地贯彻党中央提出的“把经济建设转到依靠科技进步和提高劳动者素质的轨道上来”的战略决策,进一步落实中共江苏省委、江苏省人民政府作出的“科教兴省”的决定,江苏科学技术出版社于1988年倡议筹建江苏省科技著作出版基金。在江苏省人民政府、江苏省委宣传部、江苏省科学技术厅(原江苏省科学技术委员会)、江苏省新闻出版局负责同志和有关单位的大力支持下,经江苏省人民政府批准,由江苏省科学技术厅、凤凰出版传媒集团(原江苏省出版总社)和江苏科学技术出版社共同筹集,于1990年正式建立了“江苏省金陵科技著作出版基金”,用于资助自然科学范围内符合条件的优秀科技著作的出版。

我们希望江苏省金陵科技著作出版基金的持续运作,能为优秀科技著作在江苏省及时出版创造条件,并通过出版工作这一平台,落实“科教兴省”战略,充分发挥科学技术作为第一生产力的作用,为建设更高水平的全面小康社会、为江苏的“两个率先”宏伟目标早日实现,促进科技出版事业的发展,促进经济社会的进步与繁荣做出贡献。建立出版基金是社会主义出版工作在改革发展中新的发展机制和新的模式,期待得到各方面的热情扶持,更希望通过多种途径不断扩大。我们也将实践中不断总结经验,使基金工作逐步完善,让更多优秀科技著作的出

版能得到基金的支持和帮助。

这批获得江苏省金陵科技著作出版基金资助的科技著作,还得到了参加项目评审工作的专家、学者的大力支持。对他们的辛勤工作,在此一并表示衷心感谢!

江苏省金陵科技著作出版基金管理委员会

前 言

安来霉素是一种全新的饲用多肽类抗生素,稳定性高、毒性低、药物残留少、抗革兰阳性菌、敏感菌几乎不对其产生耐药性,而且具有优良的促生长和改善饲料利用率的作用,因此被许多国家推荐为抗生素促生长剂。作为一种动物专用多肽类抗生素,安来霉素既可以满足人们对农产品安全性的要求,又可显著降低农产品加工过程中的生产成本,已成为当前畜牧业中不可或缺的添加剂,市场份额越来越大。

近年来,国内外在多肽类抗生素安来霉素的研究开发和生产等方面均取得重大进展,而国内目前尚没有一本书籍来系统地总结近年来安来霉素生产技术所取得的进步,这也是笔者着手撰写本书的出发点。为全面系统地介绍安来霉素先进生产工艺及其应用研究成果,加强本书的学术性和实用性,笔者参照国内外近几十年来的理论研究成果、先进工艺和实用技术,结合自己在安来霉素生产方面的理论研究、实验成果和实践体会,撰写成书,以供从事多肽类抗生素生产、科研和教学的同行们参考,为我国多肽类抗生素生产、应用的发展尽绵薄之力。

本书共分九章,分别为:饲用抗生素的概述;安来霉素生产菌;安来霉素的发酵工程;安来霉素的分离;安来霉素的精制;安来霉素的检定方法;安来霉素的剂型研究;饲用抗生素的管理;其他抗生素。本书不仅介绍了安来霉素生产路线的发展历程、产业化概况,还通过理论分析和研究实例分别介绍了安来霉素生产菌多阶段培养技术以及图像采集与处理系统自动检测等方法在安来霉素生产菌发酵领域的应用研究,内容丰富详实。

在本书的成书过程中,得到国家自然科学基金项目(项目编号:31471692)、材

料化学工程国家重点实验室项目(项目编号:ZK201304)、农业科技成果转化资金项目(项目编号:2014GB2C100317)、江苏省高校自然科学研究重大项目(项目编号:14KJA180001)、江苏省科技支撑计划(农业)项目(项目编号:BE2014386)、江苏省农业科技自主创新资金项目(项目编号:CX(14)2057)、博士点基金博导类课题项目(项目编号:20133221110010)的支持,感谢江苏省金陵科技著作出版资金的资助。

感谢杨文革、荀志金、管珺、曹翠翠、程丽民、杨洋、张棋、王春晓、吴刚、丁志雯、顾鹏飞、李涛、邓人伦、张玉皓、于烨敏等人此书收集资料,协助绘图、排版等,谨此致谢。

由于现代生物技术发展迅速,加上笔者水平有限,不妥之处恳请读者批评指正,不胜感激!

笔者

2015 年 12 月于南京工业大学

目 录

第一篇 绪论	001
第一章 饲用抗生素的概述	003
第一节 饲用抗生素的简介	003
一、饲用抗生素的定义	003
二、饲用抗生素的形成及其生物学意义	004
第二节 饲用抗生素的发展简史	004
一、饲用抗生素的发现	004
二、国内饲用抗生素的生产概况	005
三、国外饲用抗生素的生产概况	007
四、饲用抗生素的分类	008
五、饲用抗生素的发展趋势	012
第三节 饲用抗生素的行业现状	014
饲用抗生素的总概况	014
第四节 新型饲用抗生素安来霉素	017
一、安来霉素的概述	017
二、安来霉素的结构和性质	018
三、安来霉素的作用机制	019
四、安来霉素的应用	028
参考文献	030

第二篇 安来霉素的生产工艺	031
第二章 安来霉素产生菌	033
第一节 安来霉素菌种选育及贮藏	033
一、国内外安来霉素产生菌	033
二、菌种的选育	036
三、菌种衰退、复壮和贮藏	048
第二节 安来霉素菌种的营养和生长	055
一、培养基	056
二、菌种的制备	072
第三节 图像采集与处理系统	073
一、菌株图像预处理	074
二、菌株图像特征描述	075
三、菌株图像识别	076
四、菌株识别系统的软件实现	077
参考文献	080
第三章 安来霉素的发酵工程	083
第一节 安来霉素发酵放大及控制	083
一、安来霉素发酵原理	083
二、安来霉素发酵培养方法	084
三、发酵过程控制	089
四、灭菌	103
五、发酵动力学研究	109
第二节 安来霉素的生产设备	116
一、培养基灭菌设备	116
二、空气除菌设备	126
三、发酵设备	133
第三节 杂菌的污染与防治	137
一、染菌的检查和判断	138

二、发酵染菌的原因	138
三、杂菌污染的防治	139
四、染菌的处理	140
参考文献	141
第三篇 安来霉素的分离及精制	143
第四章 安来霉素的分离	145
第一节 安来霉素的提取	145
一、安来霉素产生菌发酵液的性质	145
二、安来霉素产生菌发酵液的预处理	146
三、溶媒萃取法提取安来霉素	150
第二节 安来霉素的分离纯化	160
一、分离前处理	160
二、安来霉素分离纯化方法的选择	166
三、离子交换法	166
四、吸附法	179
参考文献	192
第五章 安来霉素的精制	194
第一节 安来霉素的精制	194
一、高交联度树脂精制	194
二、浓缩精制	195
第二节 安来霉素的结晶	195
一、结晶过程的实质	196
二、晶核的形成	197
三、晶体的生长	198
参考文献	200

第四篇 安来霉素的检定方法	201
第六章 安来霉素的检定方法	203
第一节 微生物检定法	203
一、微生物检定法的指导原则	203
二、比浊法	209
三、管碟法	211
第二节 安来霉素的仪器检定法	225
一、UV 紫外可见分光光度法	225
二、高效液相色谱法	229
参考文献	235
第五篇 饲用抗生素安来霉素的剂型研究	237
第七章 安来霉素的剂型研究	239
第一节 安来霉素的剂型的基础理论	239
一、安来霉素剂型的选择	239
二、剂型加工助剂	241
三、分散剂	244
第二节 安来霉素的剂型研究	251
一、安来霉素固体制剂	251
二、安来霉素液体制剂	257
三、安来霉素半固体制剂	259
四、安来霉素混悬剂	261
参考文献	266
第六篇 饲用抗生素安来霉素的管理	267
第八章 饲用抗生素的管理	269
第一节 国内外饲用抗生素的法律法规	269
一、国内对饲用抗生素的管理	270

二、国外对饲用抗生素的管理	272
三、饲用抗生素使用规范	274
第二节 饲用抗生素安来霉素工业的综合利用和环境保护	275
一、安来霉素工业“三废”的性质	276
二、安来霉素工业废渣和废水的利用	276
三、安来霉素工业废水的处理技术	279
参考文献	283
第九章 其他抗生素	285
第一节 大环内酯类抗生素的研究	285
一、绪论	285
二、红霉素的发酵、提炼工艺及过程	287
第二节 四环素类抗生素的研究	291
一、绪论	291
二、四环类抗生素的理化性质	292
三、发酵工艺	297
四、提取和精制	300
五、四环类抗生素的发酵工艺及过程	305
六、土霉素发酵工艺及过程	310
第三节 多肽类抗生素	310
一、多肽类抗生素的分类和特征	310
二、多粘菌素的理化性质	312
三、多粘菌素的菌种和发酵	315
四、生物合成与产芽孢的关系	317
五、多粘菌素的提取和精制	318
参考文献	319

第一篇 绪论

第一章 饲用抗生素的概述

第一节 饲用抗生素的简介

当前社会,随着抗生素产业的不断发展,抗生素除了广泛地应用在医疗方面,在农业上的应用也获得迅速发展。特别是 20 世纪 50 年代以来,基于公共卫生和环境保护的要求,高效、低毒、无残留的抗生素,作为植物保护剂、饲料添加剂和食品防腐剂的需
求量不断增长,受到世界各国的普遍重视,已成为当代抗生素研究工作中迅速发展的一个重要方面。经过几十年的发展,抗生素产业在国内从无到有,从小到大,已成为国民经济中的一个重要产业,它不仅能促进养殖业和农村商品经济发展,还对丰富市场供应和改善人民生活起到重要的作用。

一、饲用抗生素的定义

抗生素(antibiotics)这个词,在日常生活中人们可能并不陌生,早在 1942 年,美国学者 Waksman 曾给抗生素这样定义:“抗生素是微生物在新陈代谢过程中产生的,具有抑制他种微生物生长或代谢作用的化学物质。”但是随着抗生素研究工作的发展和研究领域的日益扩大,上述抗生素的定义显然很难确切地概括抗生素这个名词的含义。所以,随着对抗生素认识的逐步深化,人们对抗生素这个术语的内涵也曾多次补充和修改,现在人们将其定义为:它是微生物产生的次级代谢产物,其中包括结构种类繁多、生理生化作用多样化的一些小分子化合物,这些化合物具有特异性抗菌的作用,即在有效浓度很低的情况下,通过生物化学的作用,能够选择性地抑制某些生物的生长和代谢活动,甚至杀死它们,而对产生菌本身则没有或很少有影响的一种化学物质,它在微生物整个生命活动过程中都能产生,如青霉素、链霉素、土霉素、卡那霉素,等等。

由于抗生素研究涉及很多学科领域,所以它的定义也可以从各种角度来考虑。如应用于动物方面的抗生素也就是所谓的饲用抗生素,它是指由细菌、真菌或放线菌等微生物代谢产生、人工合成或半人工合成的具有杀灭或抑制病原微生物、寄生虫或肿

瘤细胞作用的,长期低剂量添加在动物饲料中,用以预防疾病、保障动物健康、改善营养物质代谢、促进动物生长、提高动物生产性能的一类有机物质。

畜禽在其生命的任意阶段都面临被各种微生物感染的威胁,尤其是在出生、断奶、转群、免疫接种和日粮更换等特殊时期,更容易因为受到应激刺激,消化道微生态平衡破坏,消化机能紊乱,动物生长发育受到抑制,从而致病或死亡。自 20 世纪 50 年代以来,我国畜牧生产中大量使用抗生素,抗生素在维护畜禽肠道健康以达到提高畜禽日增重、改善饲料利用率及预防疾病等方面发挥了重要作用。目前,饲用抗生素在畜禽抗菌促生长方面效果最好,成本较低,具有不可取代性。

二、饲用抗生素的形成及其生物学意义

土壤微生物是饲用抗生素的主要来源,它们有着数量巨大、种类繁多的优势,包括各种细菌、真菌和放线菌等。这些微生物之间有着紧密的联系,有些互相依存,这种现象称为共生,所谓共生,也就是指两种不同生物之间所形成的紧密互利关系,一方为另一方提供有利于生存的帮助,同时也获得对方的帮助;有些微生物之间互相阻抑,这种现象称为拮抗,所谓拮抗,也就是指一种微生物能产生拮抗性物质,以抑制或杀死另一种微生物的现象,能产生拮抗性物质的微生物称为拮抗菌,其中能产生抗生素的也称为抗生素产生菌。

最早一些研究者认为,饲用抗生素是在微生物生命活动过程中偶然产生的,是微生物“自发性”突变的结果。然而,从拮抗菌的生态学研究中,可以找到饲用抗生素产生菌分布的规律性。如我国东北地区的一些省份的不同土壤中,拮抗性放线菌的分布情况为:在含 CaCO_3 的土壤($\text{pH}7.0$ 以上)中,拮抗性放线菌最多,这说明土壤的 pH 与抗生素产生率有关联。在湖泥、腐熟厩肥及接入各种细菌混合物的温床中,拮抗菌也较多,在枯枝落叶层等有机物质丰富的条件下,微生物之间存在着强烈的相互竞争关系,也有利于拮抗菌的产生。因此在饲用抗生素研究的初期,有些学者认为饲用抗生素是拮抗作用的产物,即微生物相互间在自然竞争中因需要适应环境而具有的防卫本能所产生的一类化学物质。

第二节 饲用抗生素的发展简史

一、饲用抗生素的发现

饲用抗生素的发展是劳动人民长期以来与疾病进行斗争的结果,也随着人类与自

自然界中微生物相互作用的结果,尤其是对微生物拮抗现象的研究而发展起来的。在我国,用微生物或其产品来治病具有悠久的历史和丰富的实践经验。追溯至 2 500 年前,我们的祖先就用长在豆腐上的霉菌来治疗疮等疾病。

1928 年英国细菌学家弗莱明(Fleming)在研究葡萄球菌变异时发现,污染在培养物葡萄球菌双碟上的一株霉菌,能杀死周围的葡萄球菌,将此霉菌分离后得到的纯菌株,经鉴定为青霉(*Penicillium notatum*),弗莱明将这种菌产生的物质命名为青霉素。1940 年弗洛里(Florey)和钱恩(Chain)重新研究弗莱明的青霉菌,并从培养液中制出了干燥的青霉素制品,经过实验和临床实验证明青霉素的毒性很小,对金黄色葡萄球菌及其他革兰阳性细菌所引起的许多严重疾病确有卓越的疗效。1944 年瓦克斯曼(Waksman)发现了由链霉菌产生的链霉素,用于治疗由结核杆菌引起的感染。这个发现使人们对从土壤中寻找放线菌产生新型抗生素充满信心。此后陆续发现了抗革兰阳性、抗革兰阴性、抗病毒的广谱抗生素,如氯霉素、金霉素、土霉素(1946—1950 年),抗真菌的制霉菌素、对青霉素耐药菌有效的红霉素及抗癌抗生素丝裂霉素 c(1956 年)等。1947 年发现的氯霉素,它主要针对痢疾、炭疽病菌,治疗其轻度感染。1948 年四环素被发现,这是最早的广谱抗生素,现今四环素基本上只被用于家畜饲养。1956 年礼来公司发明了万古霉素,它被称为抗生素的最后武器,因为它对革兰阳性细菌细胞壁、细胞膜和 RNA 有三重杀菌机制,不易诱导细菌对其产生耐药性。20 世纪 80 年代喹诺酮类药物出现,和其他抗菌药不同,它们破坏细菌染色体,且不受基因交换耐药性的影响。

自从 1946 年首次报道了链霉素可刺激雏鸡生长,1950 年美国食品与药物管理局(FDA)首次批准抗生素用作饲料添加剂后,世界各国相继进行抗生素的饲喂实验,并用于畜牧生产。饲用抗生素的使用曾被认为是 20 世纪畜牧业生产中最伟大的生物技术,在大量用作治疗和预防细菌性疾病的同时,还作为饲料添加剂被大范围的推广和应用,对控制畜禽感染性疾病、保障现代养殖业的健康发展发挥了极其重要的作用。

二、国内饲用抗生素的生产概况

中国是抗生素使用大国,也是抗生素生产大国。我国每年年产抗生素原料大约 21 万 t,出口 3 万 t,其余自用(包括医疗与农业使用),人均年消费量 138 g 左右(美国仅 13 g)。新中国成立前,我国根本没有抗生素工业,广大劳动人民缺医少药;新中国成立后在党的领导下,我国抗生素的研究和生产从无到有,从小到大地迅速发展起来。自 1953 年建立第一个生产青霉素的抗生素工厂以来,抗生素工业迅速发展,不仅建成了大型抗生素生产企业,而且建立了几十个中小型工厂。抗生素产量大幅度增长,为

人民的日常生活提供了物质基础,而且还有相当数量可供出口。目前,常用种类的抗生素,我国基本上都有生产,如青霉素、头孢菌素类、链霉素、四环素类、氯霉素、红霉素、卡那霉素、庆大霉素、制霉菌素、灰黄霉素等,并研制出国外没有的抗生素——创新霉素等,共计有 60 多种。抗生素的质量不断提高,生产成本不断降低,产品的销售价格多次大幅度地降低。抗生素在农业上的研究及应用也取得了可喜的成绩,如研制出灭瘟素、春日霉素和有效霉素等,并已投入生产。

在抗生素生产技术方面,国内研究人员进行了多方面的研究和改进,并且取得了一定的进展。如在菌种选育方面,利用各种强烈因素与自然选育相结合的方法,选出了产生青霉素、链霉素、土霉素、四环素、金霉素、红霉素等抗生素的优良高产菌株,由金霉素产生菌种的基因重组、灰黄霉素产生菌种的杂交育种等方法所得的新菌株产量比原来的菌种提高不少;对发酵过程参数的自动测定、自动记录及自动控制方面所作的研究,有些已应用于工业生产,由于提取工艺的不断改进,大部分抗生素产品的质量在纯度、效价、毒性等方面都有很大提高,如四环素盐酸盐等产品在国际市场上得到好评。此外,如以合成消沫剂代替食用油,以菌丝体代替蛋白胨等,用新型过滤介质代替棉花、活性炭净化空气等发酵工艺研究都取得了一定成效;由于改进了空气预处理工艺,使染菌率也有所降低;在综合利用方面,对利用菌丝废渣和废液的一些途径进行了积极的探索,如从链霉素和庆大霉素的发酵废液中提取维生素 B_{12} ,从青霉菌菌丝体中提取核苷酸等。

(一) 饲用抗生素工业的性质

饲用抗生素的生产包括发酵和提取两部分,前者属于微生物发酵工业范畴,后者属于化学工业范畴。从广义上讲,发酵是某些物质通过微生物所产生的酶的作用转化为其他物质的过程。抗生素大多数是微生物次级代谢的产物,是产生菌在一定条件下,利用各种养料在自身产生的酶的作用下合成的。因此,在抗生素工业中,常把“发酵”与“生物合成”等同起来。饲用抗生素的发酵过程一般在通气下进行,所用的培养基和设备都必须经过灭菌,与培养液接触的罐体、管件都应严密不泄漏,以保证培养过程保持纯种状态,避免杂菌污染。在培养过程中要求导入大量的无菌空气,因此还需要考虑输入空气的除菌问题。

饲用抗生素发酵与其他发酵工业如酒精、丙酮、丁醇等生产过程不同。后者主要是微生物对糖代谢的结果。因此,其理论产量可以从物料衡算中求得;而饲用抗生素不是微生物的主要代谢产物而是次级代谢产物,目前对这种次级代谢变化还不够了解,所以,饲用抗生素的理论产量很难从物料衡算计算出来。一般每生产 1 kg 饲用抗生素需要 15~200 kg 粮食。饲用抗生素发酵的产量与菌种的性能有关,也和培养条