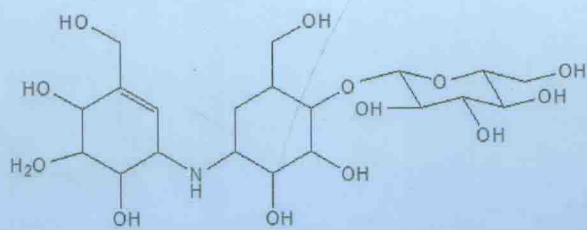
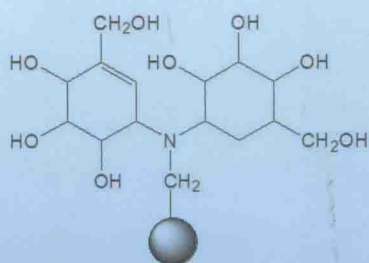


井冈霉素生产工艺改进 及其功能化树脂研究

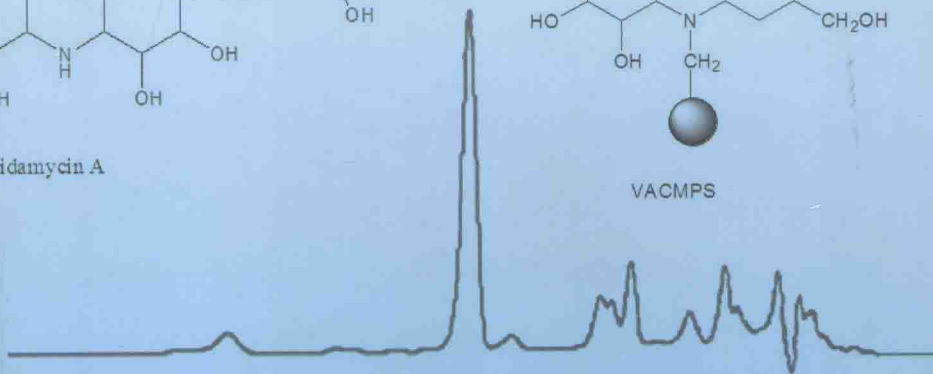
钟世华 著



Validamycin A

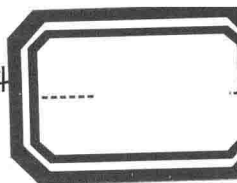


VACMPS



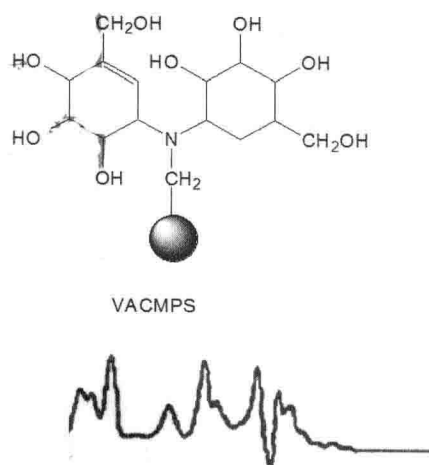
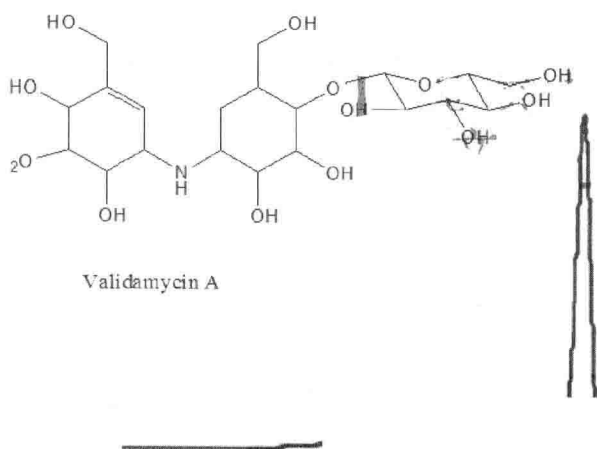
湖南师范大学出版社

湖南师范大学化学化工学院化学一级博士学科
湖南省校企合作人才培养示范基地
湖南师范大学产学研基地



井冈霉素生产工艺改进 及其功能化树脂研究

钟世华 著



湖南师范大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

井冈霉素生产工艺改进及其功能化树脂研究 / 钟世华著. —长沙: 湖南师范大学出版社, 2013. 11

ISBN 978 - 7 - 5648 - 1418 - 2

I. ①井… II. ①钟… III. ①农药—生产工艺—研究 IV. ①TQ450.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 255256 号

井冈霉素生产工艺改进及其功能化树脂研究

钟世华 著

◇责任编辑: 柳 丰

◇责任校对: 蒋旭东

◇出版发行: 湖南师范大学出版社

地址/长沙市岳麓山 邮编/410081

电话/0731. 88853867 88872751 传真/0731. 88872636

网址/http: //press. hunnu. edu. cn

◇经销: 湖南省新华书店

◇印刷: 长沙利君漾印刷厂

◇开本: 710 mm × 1000 mm 1/16

◇印张: 11.5

◇字数: 155 千字

◇版次: 2013 年 11 月第 1 版第 1 次印刷

◇书号: ISBN 978 - 7 - 5648 - 1418 - 2

◇定价: 22.00 元

前 言

本书从井冈霉素生产工艺的菌种着手,对菌种的自然选育与纯化、发酵培养基配方的优化、发酵工艺中染菌的控制和井冈霉素的提取精制工艺提出改进,并对井冈霉素无渣发酵进行了探讨。利用体积排除效应,通过对交联剂和致孔剂的选择,合成了新型聚丙烯酸 Na^+ 型树脂,结合井冈霉素分子中亚胺基在碱性介质中显电正性的特点,提出了一步法提取井冈霉素的工艺。利用井冈霉素、井冈霉素酸解产物井冈羟胺 A 分子结构中富含邻羟基和间羟基的特点,在合成不同孔径的大孔交联疏水聚苯乙烯网络的基础上,通过化学转化合成几种新型智能疏水/亲水性聚苯乙烯井冈霉素、智能疏水/亲水性聚苯乙烯井冈羟胺 A 两亲聚合物微球。利用该材料的特殊亲和性能和本身分子结构的体积排除效应,实现对分子大小不同的化合物及天然产物的吸附分离。

本书的出版得到了湖南师范大学化学化工学院化学一级博士学科的资助,得到了湖南省校企合作人才培养示范基地和湖南师范大学产学研基地的资助;得到王春风、宋青霞对稿件的细心校对,得到齐风佩、刘兵玉、王春风的支持,在此一并表示衷心的感谢。

本书适合从事井冈霉素工业生产和产品综合开发利用的科技人员以及从事功能与智能高分子材料分离纯化天然产物及有毒物质的分离方面的科技人员参考。由于作者水平有限,在写作过程中定有不少遗漏或不妥之处,敬请广大读者批评指正。

作 者

2013 年 9 月于长沙

目 录

第一篇 井冈霉素生产工艺改进

第 1 章	井冈霉素工艺简介	(3)
第 2 章	井冈霉素菌种自然选育及产素能力研究	(22)
第 3 章	正交法优化井冈霉素发酵培养基研究	(30)
第 4 章	井冈霉素发酵工艺染菌的控制	(36)
第 5 章	井冈霉素无渣发酵新工艺研究	(44)
第 6 章	新型聚丙烯酸树脂的合成及对提取井冈霉素工艺研究	(50)
第 7 章	农用井冈霉素	(61)

第二篇 井冈霉素功能化树脂研究

第 8 章	聚苯乙烯支载井冈霉素两亲微球的合成及性能研究	(89)
第 9 章	聚苯乙烯井冈霉素微球 (I) 的合成及对硼酸的络合吸附	(100)
第 10 章	聚苯乙烯井冈霉素微球 (II) 的合成及其对甲苯二异 氰酸酯 (TDI) 的吸附研究	(113)
第 11 章	聚苯乙烯井冈霉素微球 (III) 的合成及对葛根 异黄酮的吸附	(123)

第 12 章	聚苯乙烯井冈羟胺 A 树脂的合成及其对香兰素的吸附行为研究	(134)
第 13 章	聚苯乙烯井冈羟胺 A 树脂对水杨酸的吸附性能研究	(152)
第 14 章	聚苯乙烯井冈羟胺 A 树脂对虎杖中白藜芦醇的吸附性能研究	(166)

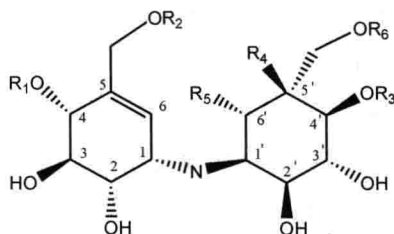
第一篇

井冈霉素生产工艺改进

第1章 井冈霉素工艺简介

1 井冈霉素的性质

井冈霉素^[1]是采用微生物发酵法生产的一种含井冈霉素各组分的抗生素^[2]（如图 1.1），其有效成分为 A、B、C、D、E、F、G，其中 A 成分含量大于 70%，B 成分占 20% 左右^[3]。纯品易溶于水和甲醇，微溶于乙醇和丙酮，不溶于乙醚、苯等有机溶剂，分解点 135℃，吸潮性强，呈弱碱性，常温下在中性及弱酸弱碱介质中稳定，在较强酸性或碱性介质中易分解。对人、畜、鱼、蚕等无毒，动物口服井冈霉素可被肠内细菌分解成葡萄糖和井冈胺，后者不被肠道吸收，可全部排出体外。纯品小白鼠毒性实验 LD₅₀20000 mg/kg。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Jinggangmycin A	H	H	H	β-D-Glc	H	H
Jinggangmycin B	H	H	OH	β-D-Glc	OH	H

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Jinggangmycin C	H	H	α-D-Glc	β-D-Glc	H	H
Jinggangmycin D	H	H	H	H	H	α-D-Glc
Jinggangmycin E	H	H	H	α-D-Glc (1, 4-) β-D-Glc	H	H
Jinggangmycin F	α-D-Glc	H	H	β-D-Glc	H	H
Jinggangmycin G	OH	H	H	β-D-Glc	H	H
Validoxylamine A	H	H	H	H	H	H
Validoxylamine A	H	H	H	H	OH	H
Validoxylamine A	H	H	H	OH	H	H

Glc: Glucopyranosyl

图 1.1 井冈霉素分子结构式

2 井冈霉素的生产工艺

在 20 世纪 70 年代初，水稻纹枯病（俗称稻瘟病）危害十分严重，染菌水稻几乎是颗粒无收，但没有好的防治农药。1973 年，上海农药研究所组织有关专家，参照日本防治稻瘟病的农药产品——有效霉素（Validamycin），分别从江西井冈山地区和杭州植物园的土壤中定向筛选，得到了一种菌株——吸水链霉菌井冈变种（*S. hygroscopicus. var jinggangensis, yen*），通过对这一菌种的多次筛选，采用微生物发酵方法，合成了一种抗生素农药^[4,5]——井冈霉素。其有效成分与日本生产的有效霉素（或百里达新）相同^[6,7]。井冈霉素从研究开发 40 年以来，一直是我国治疗水稻纹枯病的首选农用抗生素，已成为我国农民家喻户晓的理想生物农药。它的生产可分为以下几个工艺阶段：

菌种→孢子制备→种子制备→发酵→发酵液预处理→提取及精制→成品检验→成品包装

2.1 菌种

在生产过程中, 不经过人工处理, 利用菌种的天然突变而进行菌种筛选的过程, 叫做菌种的天然选育或天然分离。

菌种选育的目的是改良已知菌种或生产菌株的特性, 使其符合工业生产的要求。根据菌种天然变异而进行的天然选育, 用人工方法引起菌种变异或形成新的杂种 (hybrid), 再按照工业微生物学的要求进行筛选来获得新的菌株或杂种, 这就是当前菌种选育的基本内容。

菌种选育在抗生素工业中的地位越来越重要。抗生素产量和质量的不断提高, 是由于在菌种选育、发酵和提炼等三个方面不断取得进展的结果, 但其中菌种选育的作用是主要的、根本的。发酵培养基成分和发酵条件的改进, 充分发挥菌种的生产潜力, 提高发酵单位, 但这些因素的改进不能离开菌种本身固有的遗传特性。提炼方法的改进, 可以提高发酵产物的收得率, 但是理想的最高回收率也只能以达到菌种的潜在产量为极限, 而且实际上还受到工艺和成本核算的限制。总之, 抗生素的产量、质量及其抗菌性能, 主要是由菌种特性所决定的。

菌种选育有两个基本任务: 一个是抗生素工业生产方面的任务; 另一个是抗生素产生菌的遗传研究方面的任务。总的来说菌种选育的任务是随着抗生素工业的发展而发展的, 也是随着菌种本身特性的改变而变化的。

在抗生素生产中, 通过菌种选育可以达到以下几项目的:

① 提高发酵单位

对已经投入生产的菌种要通过菌种选育继续提高其发酵单位; 对新菌种更需迅速提高其发酵单位, 使之迅速投入工业生产。在工业生产上所使用的菌种都是经过选育以后的变种, 抗生素发酵单位的不断提高主要是不断选育菌种的结果。

② 提高产品质量、减少多余的代谢产物

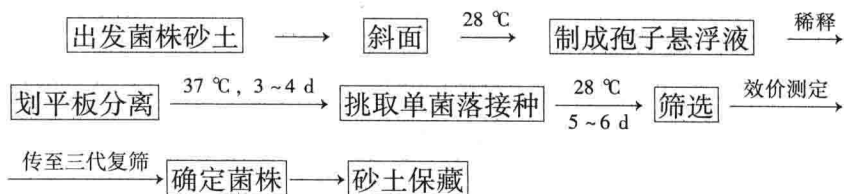
通过菌种选育,可以分离得到各种突变型菌株,其中生物合成障碍突变型菌株的一部分酶引起遗传性阻断,积蓄了合成中间体,这样,就有可能增添新抗生素或去除有毒或活性低的多余组分。

自然选育以微生物的自然突变为基础。在工业生产中,抗生素产生菌呈现出巨大的自然变异能力。这种自然变异的结果往往导致菌种的退化,表现出活力减弱、产孢子能力减少和生产抗生素能力降低等。菌种退化实质上是遗传上的退化,严重的退化甚至造成菌种的死亡。但自然变异有时也会出现生产抗生素能力提高的优良特性。因此,经常地从大量的天然孢子群体中,淘汰衰退的菌株,保存优良的菌株,可以达到纯化菌种、稳定生产的目的。

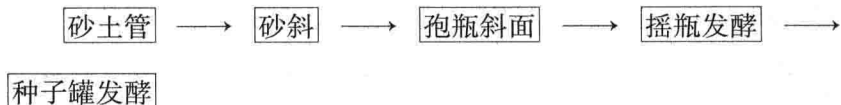
生产菌种在使用过程中,要在人工培养的条件下进行传代。虽然原始斜面是由单菌落发育而来,但菌落上的许多分生孢子已经具有不同的遗传基础,所以菌种的性状实际上是孢子群体的特征。群体较纯的,传代后变异较少;群体不纯的,传代后变异菌株将会占优势。因此,菌种在传代过程中,很容易丧失一种或多种特性而导致退化。在抗生素生产中,为使生产不断向前发展,要求发酵单位不断提高,需要反复对生产菌株进行挑选。尽管生产上使用的菌种都用合理的方法保藏着,而且研究工作者还在不断地改进保藏方法,但是菌种在保藏过程中仍不断发生变异。

综上所述,自然选育可以达到纯化菌种、防止菌种衰退、稳定生产、提高产量的目的。自然选育的一般程序是把菌种制备成单孢子悬浮液,经过适当的稀释以后,在固体平板上进行分离,然后挑选单个菌落进行测定,从中选出优良菌落。

其选育流程如下:



生产菌种制备工艺流程：



2.2 孢子制备

孢子制备是发酵工序的开端，也是一个主要的环节。抗生素的产量和成品质量同菌种性能以及同孢子和种子制备有密切关系。生产用的孢子需经过纯种和生产能力的检验，符合规定的孢子才能用来制备种子。

制备孢子时，一般是将保藏的处于休眠状态的孢子，通过严格的无菌手续将其接种到灭菌的固体斜面培养基上，在 28 ~ 37 °C 下培养 3 ~ 6 天。但这样培养出来的孢子数量还是有限的，为了获得数量更多的孢子以供生产需要，可进一步采用有较大表面积的培养基（如小米或麸皮）进行扩大培养。

2.3 种子制备

种子制备是使孢子发芽、繁殖的同时获得足够数量的菌丝，以便接种到发酵罐中去。种子制备有的从摇瓶培养开始，再接入种子罐进行逐级扩大培养；有的直接从种子罐开始进行逐级扩大培养。摇瓶培养过程是否需要，与种子扩大培养级数的多少有关，决定于菌种的性质、生产规模的大小和生产工艺特点。种子制备一般在种子罐中进行，扩大培养级数通常为二级。

摇瓶培养是在锥形瓶内装入一定数量的液体培养基，灭菌后用无菌操作接入孢子，放在摇床上恒温培养。种子罐培养时，在接种前有关设备和培养基都必须经过严格的灭菌消毒。孢子接入一级种子罐的方法是制成孢子悬浮液，通过微孔差压法（也可采用火焰保护法）接种，如用孢子悬浮液接种，约为 1 ~ 2 个孢瓶，具体视孢瓶内孢子丰富程度和种子罐的大小而定；如用菌丝接种，酌情接入 1 ~ 3 瓶，相当于 0.1% ~ 2.0%（以罐内发酵液体积计算，下同）。二级

种子罐接种量一般为 5% ~ 20%，培养温度一般为 28 ~ 37 ℃；在罐内培养过程中，需要搅拌和通入无菌空气，控制罐温和罐压，并定时取样作无菌试验，观察菌丝形态和进行生化分析等，确保种子质量后方可移种。

2.4 灭菌

2.4.1 空气过滤除菌

空气的组成：氧气、二氧化碳、氮气的混合物，其中还有水汽及悬浮的尘埃，包括各种微粒、灰尘及微生物。空气需严格除菌，达到无菌状态才能使用^[8]。在井冈霉素发酵工业中，采用过滤介质（filter medium）除菌方法制备无菌空气。微生物体积很小，空气中附着在尘埃上的微生物大小为 0.5 ~ 5 μm。其原理在于空气通过过滤介质时，颗粒在离心场产生沉降，同时惯性碰撞产生摩擦黏附，颗粒的布朗运动使微粒之间相互集聚成大颗粒，颗粒接触介质表面，直接被截留。气流速度越大，惯性越大，截留效果越好。惯性碰撞截留起主要作用，另外静电引力也有一定作用。过滤介质可以除去游离的微生物和附着在其他物质上的微生物。

2.4.2 蒸汽灭菌

湿热灭菌效果优于干热灭菌，原因在于湿热状态下，穿透力强，蒸汽冷凝时释放出大量能量，使蛋白质、核酸等内部的化学键破坏、降解，导致生物体死亡。一般在 115 ~ 140 ℃，保持一段时间，可以杀死各种生物体。由于蒸汽价格低廉，来源方便，效果可靠，操作控制简便，因此湿热灭菌常用于培养基和设备容器的灭菌。为了确保彻底灭菌，实际操作中往往增加 50% 的保险系数。灭菌过程中，高温会使营养成分受到一定程度破坏。灭菌活化能大大高于营养物质分解活化能，因此应尽量减少灭菌时间和温度。从微生物死亡动力学方程可以看出，随着温度的升高，微生物的死亡速率加快，而且比营养物质分解速率快得多，因此高温短时灭菌可达到相同的灭菌效果，而营养物质破坏大大减少。这就是高温短时灭菌的理论基

础。井冈霉素发酵工艺中蒸汽灭菌温度采用 121 ℃，维持 30 min。

2.5 发酵

这一过程的目的是为了微生物分泌大量的抗生素。发酵开始前，有关设备和培养基必须先经过灭菌，后接入种子。井冈霉素接种量一般为 5%，发酵周期为 40 h。在整个过程中，需要不断地通入无菌空气和搅拌，维持一定的罐温和罐压，并隔一定时间取样进行生化分析和无菌试验，观察代谢变化、抗生素产生情况和有无杂菌污染。在发酵过程中往往要加入消泡剂控制泡沫，并加入酸碱控制发酵液的 pH。发酵中可供分析的参数主要有菌丝的浓度和形态、残糖含量、氨基氮、溶解氧浓度、pH 和抗生素含量。发酵过程中主要控制罐内温度、通气量、搅拌转速以及添加酸、碱、消泡剂。每种抗生素发酵都有它自己的控制点和最合适的参数进行控制。影响发酵的因素是错综复杂的，各种因素相互影响，相互制约。因此抗生素发酵要得到预期的效果，需要各方面密切配合和严格操作。

抗生素生物合成过程较为复杂，影响因素比较多。因此控制生产往往要凭经验，随着对抗生素生物合成机理和微生物遗传学的研究，特别是分子生物学及遗传工程的研究，对微生物生命活动的规律、代谢的控制和调节有了进一步的了解，大大地促进了发酵工业的发展。现在有人试图研究把产生抗生素的基因移植给发育快、易于培养的微生物例如大肠杆菌上，以简化抗生素的生产方法。还有研究无细胞合成，亦即运用离析的酶合成抗生素。这些研究如果成功将会引起抗生素工业巨大变革。

2.6 发酵液的预处理

通常在提取前，发酵液需先进行过滤，将菌丝和滤液分开。如抗生素分泌在液体中，则需将滤液进行预处理，以利于以后的提取，如抗生素分泌在菌丝中，则通常先用有机溶剂萃取，井冈霉素属于前者。

发酵液的过滤和预处理是抗生素提炼的第一步操作。过滤和预

处理的目的不仅在于分离菌丝，还着眼于将一些杂质除去和改变滤液性质，以利于后续各步的操作。当发酵终了时，抗生素可能在溶液中，也可能在菌丝内部或两相中同时存在。预处理时应尽可能使抗生素转入便于以后处理的相中（多数是液相中），通常可用调节 pH 至酸性或碱性的方法来达到。

2.7 提取和精制

发酵液预处理后，发酵液即送去提取和精制，利用一些物理和化学方法将抗生素提纯为合乎标准规定的成品。井冈霉素传统的提取方法是采用真空浓缩的办法，将发酵液直接浓缩到一定的浓度，经检验合格后进入包装工艺，或将浓缩到一定浓度的发酵液采用真空喷雾干燥或真空烘烤经粉碎过筛后制成粉剂，检验合格后进入包装工艺。因此得到的粉剂效价较低，含有残糖、蛋白质等其他物质。目前对于高含量的井冈霉素产品则采用树脂吸附提取的方法，即将井冈霉素发酵液预处理后得清液，通过离子交换树脂吸附、去离子水洗涤、盐酸解析、活性炭脱色、真空浓缩得产品。郑裕国^[9]等采用二步离子交换法对井冈霉素提取工艺做了研究，其收率为 80%，纯度 90%（化学效价），不含残糖、蛋白质等。

3 井冈霉素的应用领域和开发前景

3.1 农用井冈霉素的应用

水稻纹枯病是常发多发病，是我国水稻高产的主要障碍，我国水稻种植面积达 267 万 hm^2 。井冈霉素对防治水稻纹枯病具有特效，可用于水稻稻瘟病，小麦纹枯病^[10]、蔬菜立枯病和根腐病^[11]、棉花、豆类立枯病^[12]及水稻小粒菌核病^[13]、玉米大斑病^[14]、玉米纹枯病、玉米穗腐病^[15]、稻粒黑粉病^[16]、柑橘果梗炭疽病^[17,18]、白术根茎腐烂病^[19]、家鱼烂鳃病^[20]的防治。多年大规模的田间使用结

果充分显示其“防效高、无药害、无污染”的环保型农药的特点，深受国内外用户欢迎。在水稻任何生长期使用均不影响其生长。使用十分方便，施用后耐雨水冲刷，4小时后遇到雨水，不影响药效，持效期20~30天。另外井冈霉素还推广到其他作物的菌害防治上，并且对棉花、蔬菜等其他农作物的纹枯病也有很好的疗效，市场稳定，潜力很大。微生物发酵农药为当今社会经济发展的朝阳产业，是我国21世纪重点开发研究的生物工程领域，中国抗菌素开发较早，水平处于世界先进之列。井冈霉素是内吸性很强的抗菌素，被植物吸收后，接触菌体很快被菌丝细胞吸收并在菌丝内传导，干扰和抑制菌体细胞的正常生长反应而起治疗作用。井冈霉素是一种对人畜无害，不污染环境的无公害农药，解决了水稻主要多发病——水稻纹枯病的防治问题。二十多年来经久不衰，年防治使用面积达2亿多亩，为我国水稻的高产稳产做出了重要的贡献，是目前农业上无法替代的优良药剂，占全国农用抗生素生产应用的80%以上。

3.1.1 井冈霉素的复配剂

国内各大井冈霉素生产厂家和各大农药生产企业和科研院所，已将井冈霉素与其他化学农药制成复配药剂^[21,22]，并取得了很好的结果，例如粉锈宁、井冈霉素混用防治稻粒黑粉病；纹枯灵与担菌胺防治水稻纹枯病；吡虫啉、杀虫单、井冈霉素协同防治水稻中后期病虫害；纹霉清及其复配剂防治水稻纹枯病；立克秀防治小麦纹枯病^[23]。井冈霉素还应用在果树上^[24]等。

江苏省农科院微生物研究所将益菌芽孢杆菌类——多效菌与井冈霉素这两种生物制剂经科学研究配制而成40%多效井冈霉素粉剂，试验表明该合剂除对人畜毒性低，对水稻安全，不污染环境外，在促进水稻健壮生长、防病和增产上均优于单一井冈霉素。主要表现在：

① 合剂防治水稻纹枯病效果比单用提高16.9%，并对稻曲病、稻瘟病等也有一定的兼治效果。

② 能增加水稻有效穗数、实粒数、粒重，提高单位面积产量