[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[6]
C12P 19/62
//(C12P19/62,C12R1:465)

# [12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 92110468.5

[45]授权公告日 1999 年 1 月 6 日

[11]授权公告号 CN 1041536C

[22]申请日 92.8.5 [24]颁证日 98.9.26
[21]申请号 92110468.5
[30]优先权
[32]91.8.5 [33]US [31]740,536
[73]专利权人 生物技术资源公司
地址 美国威斯康星州
[72]发明人 P·T·奥尔森
审查员 47 13

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 齐曾度

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 纳他霉素的连续生产

[57]摘要

以连续发酵的方法制备纳他霉素,该方法包括一个发酵培养液纳他霉素尝试浓 度建立期;接着是一个平衡期,其中发酵液的组成和体积通过纳他霉素生成,培养物制备和等体积地加入培养基和取出发酵液来维持恒定。

97.12.25

# 权 利 要 求 书

1.一种通过发酵制备纳他霉素的方法，包括:

(a)至少两个阶段的发酵，第一阶段包括非稳定状态的培养物生长和纳他霉素产生期，该阶段中发酵液中纳他霉素的产生使其浓度增加: 第二阶段包括培养物繁殖和纳他霉素产生速度的稳定状态，其中第二阶段发酵液的组成和体积保持基本恒定，

(b)将 Streptomyces gilvosporeus ATCC 13326 的接种物接种到一种含有 2 到 16g/l 蛋白氮源和可代谢碳源的接种培养基中，培养基中要含有足够量的碳源以避免接种物制备过程中总碳量的耗尽，加入到第一阶段发酵培养基中所说接种物的量是 0.1 到 10 % 的体积百分比，

(c)在所说的第一发酵阶段中使用一种含有 15g/l 蛋白氮源和可代谢碳源的发酵培养基，其中所含可代谢碳源的量要足以能够使发酵培养液中的碳源浓度维持在 5 到 40g/l 的范围内，

(d)继续向第一阶段发酵液中加入一种能够维持高产率纳他霉素生成的第二阶段发酵培养基，所说的培养基包含有 15g/l 的蛋白氮源和能够维持纳他霉素生成的足够量的可代谢碳源，

(e)在加入所说的第二阶段培养基过程中，通过等体积地加入培养基和取出发酵液，可以达到发酵培养液组份和体积的稳定状态，和;

(f)从取出的发酵培养液中回收纳他霉素。

2.权利要求 1 的方法，还包括给发酵培养基通气。

3.权利要求 1 的方法，还包括对发酵培养基进行搅拌。

4.权利要求 2 的方法，其中通气速度要足以能引起对发酵培养基的搅拌。

5.权利要求 1 的方法，还包括在将发酵培养基加入到发酵罐中之

前连续地使发酵培养基灭菌.

6.权利要求 1-5 的任一方法，其中蛋白氮源含有非酵母蛋白成分和酵母蛋白成分.

7.权利要求 6 的方法，其中基于蛋白总含量非酵母蛋白成分和酵母蛋白成分的比为 5： 1 至 11： 1 .

# 说　明　书

## 纳他霉素的连续生产

本发明涉及通过连续发酵一种接种物生产纳他霉素，以在较长一段时期内获得连续高产量的纳他霉素。

纳他霉素是抗真菌药物聚烯族的一个成员。化合物纳他霉素是一种分子量大约是666的四烯，实验式一般与$C_{33}H_{47}NO_{13}$相对应，它含有一个配糖键连接的碳水化合物基团，放线菌糖胺。纳他霉素的等电点大约是pH6.5，其结构一般以两种构型存在：烯醇式结构和酮式结构。

美国Cyanamid氏的英国专利NO.846,933(1960)描述了一种生产纳他霉素的传统间歇式发酵方法。本发明参考并结合了英国专利NO.846,933的公开内容。

尽管纳他霉素具有抗菌和抗真菌的价值，但是此产品在商业上的应用非常小。这种应用受限的一个主要因素就是受到其生产成本太高的限制。

本发明的目的之一就是克服传统方法中的效率不高问题，通过在预定培养基中繁殖和发酵一种接种物，提供一种以成本可行的方式生产可用量纳他霉素的连续生产方法。

本发明涉及纳他霉素的发酵制备，其中发酵是连续进行的。该发酵过程包括两个基本阶段。第一阶段包括培养物繁殖，而第二阶段包括纳他霉素产生。此方法可带来纳他霉素的连续高产量，即在一个持

续发酵期内约产生至少4到12g／l。

本发明是连续使一种能够产生纳他霉素的微生物发酵。本发明具体涉及制备(如，芽孢形成)和繁殖一种含有链霉菌种的在发酵过程中可以产生纳他霉素的接种物。

由于增加了从发酵培养基中回收纳他霉素的容易程度，纳他霉素的高产量在经济上具有重要意义。而且，通过本发明的连续生产还可以获得发酵设备成本效率的改进和生产培养基的更有效利用。连续发酵方法与一系列间歇式操作方法相比还可以降低所需的接种制剂的数量。

图1是本发明接种物繁殖过程中所用方法方块流程图。

图2是本发明连续纳他霉素发酵过程中两个阶段的座标图。

根据本发明，使一种能产生纳他霉素的微生物与一种预定培养基接触产生一种接种物，然后置于一种预定的发酵生产培养基中，该培养基将支持微生物在进一步繁殖和连续产生纳他霉素中的最大代谢活性。在续续发酵过程中，微生物使至少一部分预定生产培养基转化成纳他霉素。

本发明的发酵过程包括两个阶段。第一阶段包括繁殖一种含有链霉菌种培养物的接种物，这一过程会伴随有部分纳他霉素的产生。第一阶段中纳他霉素的产率从零增加到第二阶段产率的稳定状态。第二阶段基本上是指纳他霉素以平衡或稳定状态的高速生产，可使发酵培养基浓度达到大约至少4到12g／l。当培养物繁殖处于主要状态时，随着纳他霉素的产生这两个阶段会有所重叠，并且培养物生长贯穿于整个纳他霉素产生过程。

在第二阶段中，达到和保持一种预定的平衡，以致于使培养物繁

殖和纳他霉素高速率保持大致恒定。这种培养物繁殖／纳他霉素高产率的平衡是由下列步骤达到的1）在合适的时间开始向发酵罐中连续加入连续生产培养基以维持培养物繁殖和纳他霉素产生的恒定速度，和2）取出含有纳他霉素的发酵培养基。在连续或第二阶段中，使培养基浓度和体积保持恒定。但是，如果需要，可以通过修改组份或培养基加入速度获得不同的纳他霉素产生速度。

从理论上讲，连续生产阶段中的平衡可以无期限地延续下去。但是，在本发明的实际实施过程中，连续阶段会受到污染或设备失灵的限制，通常延续至少大约40天或延续到纳他霉素的产生降低到一种不经济的产生速率为止。

使本发明连续发酵的主要特征是：

1．将用于繁殖培养物的接种物培养基组合物加入到发酵罐中以开始发酵的第一阶段。

2．至少进行两个阶段的发酵：第一阶段包括非稳定状态的培养物生长／纳他霉素产生，在这期间纳他霉素的产生速度是增加的，第二阶段包括培养物繁殖／在预定的平衡状态下纳他霉素大量产生。

3．配制发酵培养基。

4．通过加入发酵培养基并取出等体积发酵培养液平衡以获得第二阶段恒定的发酵培养液体积、组成和培养物浓度。

5．选择培养基加入／培养液取出的速度使其达到最经济的培养基消耗和最大的纳他霉素产量。

6．如果需要，可以从取出的发酵培养液中回收或分离纳他霉素。

任何含有产生纳他霉素的链霉菌种的微生物均可以按照本发明使用。推荐的链霉菌种包括已经在美国典型培养物保藏中心(ATCC)，

Rockville, Maryland, U.S.A 寄存了的Streptomyces gilvosporeus 入藏号是ATCC NO. 13326。

从合适芽孢的芽孢悬浮液中制备用于发酵的接种物。然后使该合适的链霉菌种接种物发酵，当置于本发明的连续发酵培养基中时会产生大量的纳他霉素。一般使接种物经过一系列繁殖步骤，其中每一步骤都使产生纳他霉素的链霉菌属细胞数量增加。待链霉菌属细胞的数量足够以后，使该链霉菌置于一种设计的环境和／或培养基中，当该链霉菌种发酵时达到连续的纳他霉素生产。

芽孢悬浮液

收集从美国典型培养物保藏中心获得的产生纳他霉素的链霉菌种芽孢，开始接种。使芽孢发芽产生一种链霉菌种的活性生长培养物。用链霉菌种（如，链霉菌Streptomyces gilvosporeus 或其它任何纳他霉素产生菌种）的活性生长培养物大量接种灭菌的（如高压灭菌）的琼脂斜面，并且保温到斜面基本上完全被芽孢覆盖。将琼脂斜面上的芽孢刮到小量的液体，如水（如去离子水），营养培养基等中，以产生一种水的芽孢悬浮液。使得到的芽孢悬浮液繁殖产生一种用于发酵步骤（也即生产纳他霉素）的接种物。为了达到最佳结果，用于开始接种繁殖的芽孢悬浮液应当含有大约$10^{5}-10^{10}$CFU／ml的芽孢浓度，通常至少是大约$10^{8}$ CFU／ml。

许多琼脂斜面培养基可用于促进链霉菌种(如，S. gilvosporeus)培养物的芽孢形成，以用于形成芽孢悬浮液。典型的用琼脂斜面培养基包含至少下面一组成份中的一种：酵母麦芽琼脂，Hickey- Turner 琼脂，CYA 琼脂，Pridham 琼脂，马铃薯葡萄糖琼脂，Bennett's 琼脂，等等。

芽孢悬浮液中含有高浓度的（如：$10^8$ CFU／ml）活性芽孢是本发明的一个关键方面。首先，如果芽孢浓度太低，则将需要很长的时间在接种繁殖过程中获得足够量的链霉菌属细胞以用于成本有效的纳他霉素发酵生产。第二，悬浮液中芽孢含量的降低会延长总的接种物繁殖时间，并且增加污染（如被一种不需要的微生物污染）的可能性。再者，悬浮液中芽孢浓度太低会促进形成大的紧密压缩的菌丝体小丸。因为向小丸内输送氧和营养物质等会带来一些问题，这些小丸于对于获得高产量的纳他霉素是适合的。如果菌丝体小丸的体积太大不会令人满意，可以通过剪力（如搅拌）机械地破碎这些小丸使其分开。

接种物繁殖

使上述的芽孢的水悬浮液（如，S. gilvosporeus）发芽，并使细胞继续繁殖，直至微生物达到足够用其含水接种物进行纳他霉素的生产的量。合适的接种物细胞密度是干细胞重量大约1－5g／l，并且它在使用中的体积大约是纳那霉素生产培养基的0．1－10％。

接种物繁殖所使用的含水培养液决定了接种物的细胞密度和代谢状态（如：最好是足够密度的健康细胞）。为了使接种物具有所需要的细胞密度和代谢状态，需要足够量的蛋白氮，它含有通常存在于蛋白氮源中的复合生长因子（如，维生素）、无机元素（如，钾、钠、钙等）和微量元素（如，硼、钴、铁、铜、锌等）。这种蛋白氮源可以是能够使芽孢悬浮液繁殖成接种物以进行发酵产生所需的高产率的纳他霉素的任何来源。

为了获得所需要的接种物细胞密度在接种物培养液中还必须加入足够量的可代谢碳源。为了达到最好的结果，在接种物繁殖过程中不

能完全去除碳源。碳源的去除会反向地改变接种物的代谢状态，使发酵过程中纳他霉素的产量降低。

尽管按照本发明可以有效地使用各种不同的接种物培养液，但是为了获得高产量的纳他霉素最好使用预定量的培养基成份。

可以在水（如，低矿物质含量的水，去离子等）中制备一种适用于接种物繁殖的培养基，它包含：

a）一种蛋白氮源，用量为大约2－16g／l，一般是8g／l；和

b）其含量要足以避免总碳量的耗尽的足够量的可代谢碳源，含量通常是5－30g／每升培养基，一般是大约15g／l。

下面给出了适合于接种物繁殖的培养基的两种具体组合物。

| 组合物1 | 含量 |
|---|---|
| Difco "Bacto" 胨 | 5g／l |
| 玉米浆 | 3g／l |
| 氯化钠 | 10g／l |
| 葡萄糖 | 15g／l |
| 组份2 | 含量 |
| Hormel胨PSR5 | 8g／l |
| 氯化钠 | 10g／l |
| 葡萄糖 | 15g／l |

可以通过传统的方法（如，在大约120－140℃的温度下分别或使碳源和氮源同时灭菌）来制备一种能为提高链霉菌属细胞产率提供营养的接种物培养基。灭菌后的接种物培养pH应为大约7。把芽孢悬浮液加入到接种物培养基中，加热接种物培养基至温度大约为25－40℃，一般大约是28－35℃。

为了获得为连续发酵生产纳他霉素所需要的接种物液体的大体积，需要进行几个步骤的接种物繁殖，每一步繁殖的体积都要大于前一个步骤。例如，接种物繁殖的方式可以是使细胞数量呈指数增加。特别是，最好通过在每一步繁殖过程中有效地增加接种物用量来维持繁殖过程中培养物的指数生长。这可以通过尽可能地减少每一步骤的时间长短或尽可能地减少步骤的数目来实现。例如，一旦达到了预定的接种物细胞密度，则马上将其转移到一种较大的环境中（如，容器）进行下一步的繁殖。通过有效地控制接种物的繁殖，使接种物繁殖过程中的时间和成本花费降低到最小，因而增加了发酵过程中成体有效的纳他酶素的产率。

在一系列接种物繁殖步骤中每一单一步骤中所允许延续的时间长度取决于培养基的组成，所需链霉菌属细胞的量、温度等等。典型的一个单一繁殖步骤大约是进行6至24小时。

接种物繁殖过程中需要给接种物通气。例如，用一种旋转的搅拌器以大约200rpm的转速对该容器进行搅拌。本发明的一个方案是，通过在容纳接种物的容器中安置的一个转子叶片对接种物进行搅拌，同时强行向容器的底部通入无菌空气。

参见图1，此图是制备接种物用以发芽产生纳他霉素的方法框图。图1指出了通过繁殖而达到的接种物体积的增加，这是为了获得足够量的接种物以进行成本有效纳他霉素生产所必需的。例如，向含有1225升接种物培养液的容器中加入25升的接种物可使接种物的体积从25升增加到1250升。

把繁殖的接种物加入到容纳有发酵培养基的发酵罐中。在第一发酵阶段持续进行快速培养物繁殖，同时纳他霉素的产量增加。第二发

酵阶段中的纳他霉素产生速度通常在1天之后即可稳定于高产量，并将持续几天。培养液中纳他霉素的浓度以大致恒定的速度增加；直到通常是由于一种或几种接种培养基成份的耗尽，纳他霉素产生的速度才开始降低。

连续性纳他霉素生产

在纳他霉素产生速度开始下降之前或之后不久开始第二阶段的发酵。通过连续地监测发酵液中纳他霉素的浓度确定纳他霉素的生成速度。当达到第二阶段时，使加入培养基的速度与取出发酵液的速度相等。通过监测取出发酵液的组份，可以调整培养基加入／培养液取出的速度，以获得发酵培养基的最佳利用。如果加入到培养基中的每一种成份在发酵液中的稳定状态浓度降至0，则达到了培养基最大程度的利用。根据培养基和设备的成本，从经济角度上考虑加入培养基和取出发酵液的速度要比达到培养基最大程度利用所需的速度快是合乎需要的。

培养基的加入和发酵液的取出可通过任何可接受的方法来完成。例如，可通过使用一种泵（如，一种真空泵）、压力、重力等来完成培养基的加入和／或发酵液的取出。

如果需要，可以在任何时候对第二阶段发酵培养基的组成或加入速度进行调整或甚至实质性地改变，以取得连续性生产的最佳经济效益。而且还可以基本上根据所使用的设备，在总平均发酵液体积保持大致恒定的情况下，进行间歇性的培养基加入和／或发酵液取出。再者，第二阶段培养基的加入可以在第一阶段结束前提前开始；但是第二阶段直到达到上述的平衡或稳定状态才可开始。

在第二阶段中，连续地取出含有纳他霉素产物、生物物质（如链

霉菌属细胞）和生产培养基的发酵液，并且从取出的发酵液中以与生物物质混合的形式和／或提取为纳他霉素的形式（如结晶态）回收纳他霉素产物（如过滤、离心，等）。可以通过任何能获得可用形式和可用量和纳他霉素的合适方法回收纳他霉素。与生物物质混在一起的纳他霉素，需要分离时可通过任何合适的方法从生物物质中回收纳他霉素。

连续稳定状态的第二发酵阶段可以持续一段较长的时间，基本上只受到污染或设备失常的限制（如，本发明可以延续至少４０天）。

连续性纳他霉素生产是在能够容纳发酵过程的发酵罐中进行的。达到纳他霉素最高产量的一个重要因素就是液体发酵培养基的组成。发酵培养基必须含有适量的可代谢的碳源和蛋白氮源。而且，该培养基还应含有通常存在于蛋白氮源中的复合物生长因子（如，维生素），无机元素（如，钾、钠、钙等）以及微量元素（如，磷、钴、铁、铜、锌等）。

可以在水中（如，低矿物含量的自来水、蒸馏水等）制备适合于发酵的培养基，它包括：

（ａ）大约８０－２５０ｇ／ｌ的可代谢碳源；和

（ｂ）至少１５ｇ／ｌ，一般大约是２０ｇ／ｌ至８０ｇ／ｌ的蛋白质和微量元素。蛋白质氮源可以包括一种非酵母蛋白氮成份和一种非酵母蛋白氮成份。根据蛋白的含量，这两种蛋白氮源存在的比率大约通常分别是５：１至１１：１，最好一般是8：1。

通过连续和等量地加入合适的来源物质使发酵培养基中这些可代谢碳源和蛋白氮源的量持续维持整个第二发酵阶段。通过监测取出的发酵液以及进行适当的调整来确定发酵培养基中某一特定物质来源的

量。

可以从广泛的来源中连续地提供蛋白氮来源。例如，大豆蛋白产物（如，分离物，豆粉，以及粗豆粉等）当中含有非酵母蛋白氮源（如可用含有80－95%蛋白的大豆蛋白源获得所希望的纳他霉素产量）。蛋白氮还包括牛肉提取物，蛋白水解物（如胨）和／或酵母（如，提取物、自溶产物等）。

如上所述，生产培养基还必须包括一种可被链霉菌种代谢的碳源。碳源可以任何方便的形式如葡萄糖，多糖，玉米和土豆淀粉等提供。

而且，本发明的一个方面是，不必要在开始就将生产纳他霉素所需要的全部量的碳源作为纳他霉素生产培养基的起始成份加入（如，起始量的碳源不一定要足够用于完成发酵）。在本发明此方案的第一阶段中，可在纳他霉素产生过程中加入碳源以维持大约5－30g／l，通常是20g／l的碳源含量。因此，将适当量的合适碳源加入到开始发酵的培养基中，然后在发酵开始后再加入碳源。在第二阶段的连续纳他霉素生产过程中，以预定的速度加入碳源，该速度与纳他霉素生产培养基的加入速度成比例。优选的是，加入碳源的速度要足以提供能维持连续高速生产纳他霉素的碳源用量，而且不致于使未消耗的碳源被从发酵罐中取出（如，碳源的量基本上等于发酵培养基中用于维持发酵过程所必需的特定量的碳源）。

本发明的另一个方面是，碳源是作为生产培养基的一部分加入的，在这种情况下，碳源加入的速度取决于生产培养基加入的速度。

通过传统方法（如：在大约120－140℃的温度下分别或同时灭菌碳源和氮源）制备纳他霉素生产培养基，为链霉菌属发酵和纳他霉素生产提供营养。希望灭菌后的生产培养基具有大约7的pH值。

在本发明的一个方案中，可在向发酵罐加入的途中使发酵培养基灭菌。例如，可以通一个能使发酵培养基灭菌的管子，通道或其他方式工具（如，一种连续灭菌器）向发酵罐中连续加入发酵培养基。

向发酵罐中加入接种物直至生产培养基中的种菌浓度达到大约0．1－10%，通常大约2%体积百分比（例如，种菌的浓度足以能够接种多个连续的发酵罐）。发酵罐剩余的体积是发酵培养基。任何将种菌加入到生产培养基的方法只要能输送活性代谢状态的种菌即是可被接受的。

使发酵或生产培养基的温度达到大约25°－40℃，一般是28°－35℃。

在发酵过程中向纳他霉素生产培养基中供氧。最好是使大部分发酵过程中生产培养基的溶氧水平维持在大约20%－80%的空气饱和度。通过适当协调通气和／或搅拌速度可以增加达到合适溶氧水平的能力。例如，通常是以每体积发酵培养基大约至少0．3至1．0体积空气的速度迫使气体（如，灭菌空气）通过发酵培养基，给发酵或生产培养基通气。本发明的一个方案是希望在搅拌发酵培养基的同时通气。而且，通气的速度还要足以能够引起对发酵培养基的搅拌。

参见图2，该图表示了本发明两个基本阶段的每个阶段中时间与纳他霉素产生速度之间的关系。第一阶段包括链霉菌种的繁殖，同时伴随有部分纳他霉素的产生。当培养基加入和发酵液取出之间达到平衡后即可建立连续生产纳他霉素的第二阶段。第二阶段延续至纳他霉素不再以成本有效方式产生（例如，污染降低了生产效率）。

在本发明的一个方案中．如果希望控制泡沫，可以向发酵培养基中加入发酵体积或纳他霉素生产培养基体积大约0．01%－1%的

一种抗发泡剂（如硅消泡剂）。

加入种菌之后的纳他霉素生产培养基pH大约7．0，在发酵过程中一般它会慢慢地降低到大约4．5。这种pH值的降低是链霉菌种的代谢活性所引起的。根据发酵液的最终使用，希望发酵培养基的pH值较低。但是，如果希增加可以通过不时地加入碱性物质增加或控制pH值（例如，通过连续或间歇地向发酵培养基中加入氢氧化钾来维持某一特定的pH）。还可以通过改变培养基的组成和／或培养基加入／发酵液取出的速度来增加或降低pH。

如果正确地实施本发明（例如，有效地使用链霉菌种，协调地加入培养基和取出发酵液，等），所得到的发酵液一般包含至少大约．4g／l的纳他霉素。在特定情况下，纳他霉素产生的水平可以是从大约7g／l至12g／l。

本发明可通过下列实施例得以说明，但这些实施例只是为了说明但不限制那些认为是等同发明的范围。除非另外说明，可以使用市售的试剂级别的物质实施下列实施例。

实施例1

在下列实施例中，在蒸馏水中制备具有下面总组份的琼脂斜面。在121℃灭菌大约15分钟。

3g／l的酵母提取物（Difco "Bacto" 酵母提取物）

3g／l麦芽提取物（Difco麦芽提取物）

5g／l胨（Difco "Bacto" 胨）

10g／l葡萄糖

15g／l琼脂

在蒸馏水中制备具有下列总组份的接种物培养基，并用氢氧化钾

调pH至7．0。在121℃灭菌大约15分钟。

15g／l葡萄糖

10g／l氯化钠

6g／l玉米浆（PPM，玉米浆）

5g／l胨（Difco "Bacto"胨）

用从ATCC获得的冻干芽孢悬浮体形式的链霉菌Streptomyces gilvosporeus，ATCC Reg，No. 13326作为培养源。使培养物在接种培养基中生长，并使之在琼脂斜面上于大约25℃下发芽。种菌的制备与琼脂斜面培养同时进行。

大约10天之内种菌在这种制备方法的琼脂斜面上大量发芽。将芽孢从这些琼脂斜面上刮到接种培养基中，使芽孢悬浮浓度达到大约$10^8$ CFU／ml。向一个500ml遮光烧瓶中的大约100ml接种培养基中加入大约2ml的芽孢悬浮液。在29℃下分三步保温此培养物，总保温时间是大约48小时，并在一个转动的震荡器上以大约240rpm转速进行搅拌。前两步各为12小时，第三步为大约是24小时。对于第二步和第三步来说，要加入该步骤体积大约2%的新鲜接种培养基。用如此产生的最终接种培养物以所需要的种菌浓度接种生产培养基。

第一阶段纳他霉素生产培养基的综合的最初组份如下：

19．5g／l大豆蛋白分离物（ADM，"Profam" S970）

4．5g／l酵母提取物（Stauffer，Type KAT）

0．2ml／l消泡剂（Ma2u，DF 289）

在1升的发酵容器中用蒸馏水配制大约600ml的培养基，并用氢氧化钾调pH 至大约7.6。然后将这个1升的发酵器在大约121℃

灭菌大约15分钟。将做为第二阶段培养基一部分的葡萄糖以大约50%的蒸馏水溶液形式单独灭菌，并以达到40g／l的浓度加入到起始培养基中。

在接种之前，把生产培养基加热到大约29℃，通气速度大约控制在250ml／分钟，搅拌速度大约是500rpm。

然后向发酵容器中加入含有链霉菌Streptomyces gilvosporeus, ATCC Reg. No 13326大约是生产培养基体积的2%的接种物，开始第一阶段的生产周期。在接种40小时后开始加入葡萄糖以使第一发酵阶段的葡萄糖浓度维持在大约20g／l。这可以通过以大约1g／1小时的速度向发酵容器中加入葡萄糖来实现。

大约在第一发酵阶段接种开始之后72小时，纳他霉素的产生速度开始下降。发酵液中的浓度大约是3．9g／l。加入第二阶段培养基，并以大约12ml／小时的速度从发酵器中取出发酵液以维持大约600ml的恒定发酵液体积。生产培养基包含有大约19．5g／l的大豆蛋白分离物，4．5g／l的酵母提取物，50g／l葡萄糖和0．2ml／l的消泡剂。

以大约12ml／小时的速度连续加入和取出培养液，发酵持续到第一发酵阶段开始之后大约200小时。在这一阶段当中纳他霉素的生成只是中等水平，发酵液中纳他霉素的浓度大约是4．5g／l。从取出的发酵液中回收此产物。

为了增加纳他霉素生成速度，将培养基组份改为下面的总组份：26g／l大豆蛋白分离物，6g／l酵母提取物，80g／l葡萄糖和0．3ml／l的消泡剂。以大致相同的速度连续地加入增加营养的培养基和取出发酵液。在第一阶段开始之后大约250小时，取出

的发酵液中纳他霉素的浓度已增加到大约８．５ｇ／ｌ的高产量。这一浓度在剩余的发酵过程中保持大致恒定。大约在４５０小时，中断该过程

实施例２

基本上按照实施例１进行第一阶段和方法，不同之处是第一阶段的生产培养基大致含有：２６．０ｇ／ｌ大豆蛋白分离物，６．０ｇ／ｌ酵母提取物和０．３ｍｌ／ｌ消泡剂。

第一阶段开始大约７０小时之后，纳他霉素浓度达到大约６．０ｇ／ｌ，然后开始第二阶段的连续操作。第二阶段的培养基大致含有：２６．０ｇ／ｌ大豆蛋白分离物，６．０ｇ／ｌ酵母提取物，８０ｇ／ｌ葡萄糖和０．３ｍｌ／ｌ的消泡剂。以大约１２ｍｌ／小时的速度加入培养基并从发酵器中取出发酵液，以维持大约６００ｍｌ的恒定体积。大约在１１７小时时，达到稳定状态的平衡，纳他霉素浓度大约是８．０ｇ／ｌ。这一浓度一直保持大约２５０小时，此时发酵被终止。

尽管上面详细叙述了本发明的几个实施例，但是本领域中的熟练技术人员会容易地接受本发明还包括许多的变动和结合。

图 1

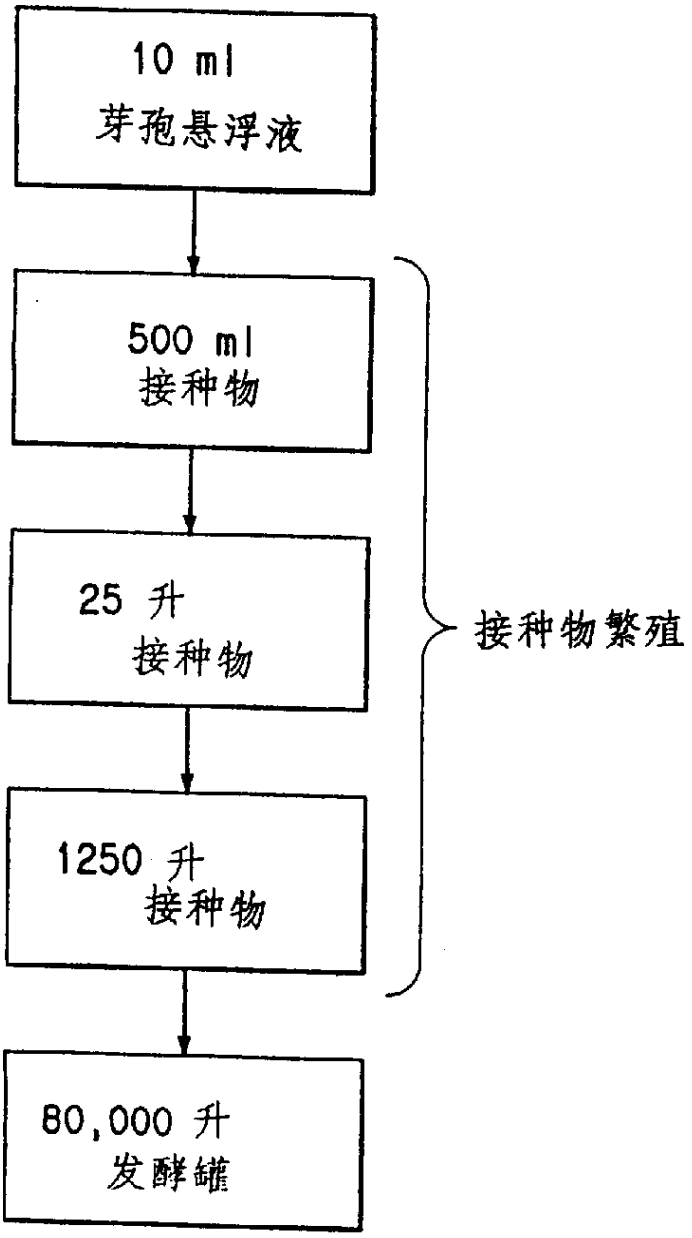
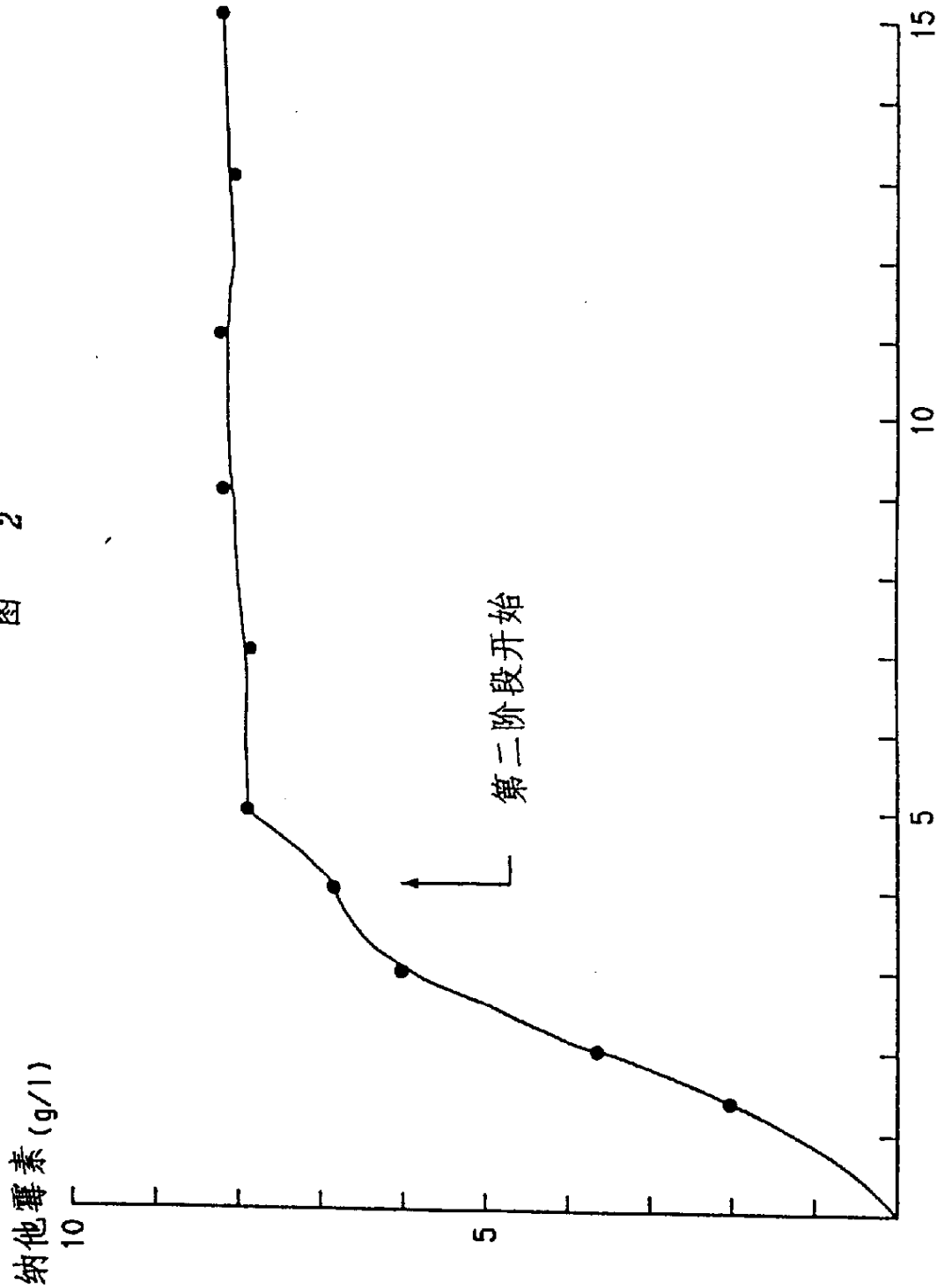
图 2