

文章编号: 1000-5862(2014)05-0501-05

液化液代替液化糖生产林可霉素的研究

胡彪群¹, 王筱兰^{1*}, 钟益清², 肖永梅²

(1. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022; 2. 江西国药有限责任公司, 江西 南昌 330052)

摘要: 考察在基础培养基和补糖中用液化液代替液化糖对 *Streptomyces lincolnensis* 13 生长及林可霉素发酵效价的影响. 结果表明: 在基础培养基中用液化液代替液化糖, 发酵效价提高了 8.6%, 而在基础培养基和补糖中都用液化液代替液化糖, 发酵效价提高了 12.4%. 液化液在基础培养基和补糖中代替液化糖生产林可霉素是可行的.

关键词: 液化液; 液化糖; 林可霉素; 发酵效价

中图分类号: Q 93

文献标志码: A

0 引言

林可霉素又称洁霉素, 是林肯链霉菌发酵过程中产生的次级代谢产物, 具有抗革兰氏阳性菌的能力, 主要作用于敏感菌核糖体的 50S 亚基, 达到阻止肽链延长的目的, 从而抑制细菌细胞蛋白质合成^[1-3]. 林可霉素与其他抗生素没有交叉耐药性, 本身毒性较低, 因此, 林可霉素及其衍生物被广泛用于医疗卫生行业, 是国内外制药企业重点生产的抗生素^[4-6].

目前, 林可霉素发酵多采用液化糖, 液化糖主要由企业自己生产, 通过 α -淀粉酶和糖化酶水解淀粉所得^[7], 主要成分为还原糖. 液化液是液化糖生产的中间产物, 主要成分为糊精和低聚糖. 淀粉要彻底糖化需多种水解酶, 更多酶量、更长降解时间, 因此, 成本提高了. 本文比较研究 2 种不同淀粉水解产物对林可霉素生产的影响, 以期实现林可霉素生产成本降低和生产周期缩短的目标.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

FUS-50L(A) 自控发酵罐(上海国强生化工程装备有限公司); Eclipse E200 光学显微镜(日本 Nikon 公司); WZZ-2S 数字式自动旋光仪(上海精密科

学仪器有限公司).

豆饼粉、液化液、液化糖等发酵原材料均由江西国药有限责任公司提供; 其他化学试剂均为分析纯.

1.2 菌种

Streptomyces lincolnensis 13 由江西国药有限责任公司提供.

1.3 培养基

斜面培养基(质量体积比): 黄豆饼粉 0.60%, 可溶性淀粉 1.50%, 琼脂 1.80%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NaCl 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, KNO_3 0.01%, pH 值为 7.0~7.5.

种子培养基(质量体积比): 黄豆饼粉 1.80%, 可溶性淀粉 1.50%, 葡萄糖 1.60%, 玉米浆 2.00% (体积比), CaCO_3 0.50%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.30%, pH 值为 7.0~7.5.

摇瓶培养基(质量体积比): 黄豆饼粉 1.80%, 可溶性淀粉 1.50%, 葡萄糖 6.00%, 玉米浆 1.50% (体积比), NaNO_3 0.70%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.80%, NaCl 0.50%, KH_2PO_4 0.05%, CaCO_3 0.50%, pH 值为 7.0~7.5.

15 L 发酵罐基础培养基(质量体积比): 黄豆饼粉 2.00%, 可溶性淀粉 1.50%, 葡萄糖 3.50%, 玉米浆 1.50%, NaCl 0.40%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.80%, KH_2PO_4 0.10%, CaCO_3 0.50%, 泡敌 0.03%~0.04% (体积比), 豆油 0.02%~0.03% (体积比), pH 值为 7.0~7.5.

收稿日期: 2014-07-10

基金项目: 江西省科技厅重大科技项目(20142BBG70016)资助.

通信作者: 王筱兰(1965-), 女, 江西景德镇人, 教授, 博士, 主要从事菌种选育及发酵工艺优化方面的研究.

50 L 实验发酵罐基础培养基(质量体积比): 黄豆饼粉 2.00% 液化液 6.00% 玉米浆 1.50% (体积比), NaCl 0.50%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.20%, KH_2PO_4 0.02%, CaCO_3 0.80%, 泡敌 0.03% ~ 0.04% (体积比), 豆油 0.02% ~ 0.03% (体积比), pH 值为 7.0 ~ 7.5.

50 L 对照发酵罐基础培养基(质量体积比): 黄豆饼粉 2.00% 液化糖 6.00% 玉米浆 1.50% (体积比), NaCl 0.50%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.20%, KH_2PO_4 0.02%, CaCO_3 0.80%, 泡敌 0.03% ~ 0.04% (体积比), 豆油 0.02% ~ 0.03% (体积比), pH 值为 7.0 ~ 7.5.

1.4 培养方法

斜面孢子培养: 将菌种从沙土管中接到斜面培养基于 30 °C 恒温培养 7 d.

发酵种子培养: 将斜面孢子悬浮液接种到装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 于 220 r · min⁻¹、30 °C 恒温培养 2 d.

摇瓶发酵: 将 10% 接种量接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 于 220 r · min⁻¹、30 °C 恒温培养 7 d.

15 L 发酵罐上发酵: 将 10% 摇瓶接种量接种于 15 L 发酵罐中, 进行二级扩大培养, 30 °C 恒温培养 2 d, 罐压为 0.03 ~ 0.05 MPa, 转速为 350 r · min⁻¹.

50 L 发酵罐上发酵: 将 15 L 罐的种子按 15% 的接种量接种至 50 L 发酵罐中, 30 °C 恒温发酵 8 d, 罐压为 0.03 ~ 0.05 MPa, 转速为 350 r · min⁻¹.

1.5 分析方法

用旋光法测定生物效价^[8-9]、斐林试剂法测定总糖与还原糖^[10]、甲醛氧化法测定氨基氮^[11]. 采用美兰染色法检查菌丝形态. 取 10 mL 发酵液于 3 000 r · min⁻¹、离心 10 min, 倒出上清液, 计算湿菌体浓度^[12].

2 结果与分析

2.1 在基础培养基中以液化液代替液化糖发酵

在基础培养基中进行林可霉素的发酵, 实验罐用液化液, 对照罐用液化糖, 其他成分、培养条件、接种量及菌种批次都相同. 接种 8 h 后每隔 8 h 取样, 进行总糖、还原糖、氨基氮、湿菌体浓度的测定及菌丝形态检查. 根据检测到的还原糖和氨基氮含量进行碳源和氮源的补充, 还原糖浓度控制在 3.2 ~

8.0 g · L⁻¹ 氨基氮浓度控制在 0.462 ~ 0.700 g · L⁻¹.

如图 1(数据为 3 批实验平均值) 所示, 在基础料中液化液的湿菌体浓度在前期比液化糖的低, 但在中后期始终比液化糖的高. 如图 2 所示 24 h 时实验罐的菌丝少, 对照罐的菌丝多, 但 96 h 时实验罐的菌丝比对照罐的菌丝多且菌丝舒展, 168 h 时实验罐及对照罐的菌丝都开始自溶, 林可霉素生产能力下降. 由此可知, 基础料中液化液在前期菌丝生长不如液化糖的快, 但在中后期却比液化糖的快.

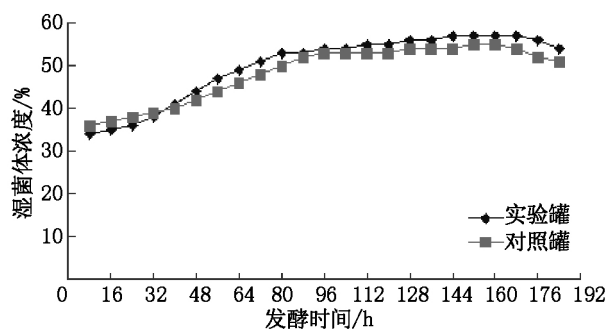


图 1 实验罐和对照罐发酵过程中湿菌体浓度变化

接种 40 h 后每隔 24 h 进行效价测定, 发酵效价变化情况如图 3 所示(3 批实验数据), 发酵前期实验罐的发酵效价低于对照罐, 但发酵中后期实验罐的效价高于对照罐. 实验罐的最终放罐效价分别为 6 517、6 398 和 6 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均值为 6 405 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对照罐的最终放罐效价分别为 6 018、5 896 和 5 777 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均值为 5 897 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 实验罐的平均发酵效价比对照罐的提高了 8.6%.

2.2 基础培养基及补糖中均用液化液代替液化糖发酵

实验方法如本文 2.1 节所述, 只是在进行碳源补充时, 实验罐用液化液, 对照罐用液化糖. 湿菌体浓度变化如图 4(数据为 3 批实验平均值) 所示, 结果和 2.1 节类似, 此时实验罐中后期的湿菌体浓度略高于 2.1 节中的实验罐. 如图 5 所示, 48、96 和 144 h 时实验罐的菌丝均比对照罐的菌丝长得更好, 菌丝更多、更舒展.

接种 40 h 后每隔 24 h 进行效价测定, 发酵效价变化情况如图 6(3 批实验) 所示, 前期实验罐的发酵效价低于对照罐, 但中后期实验罐高于对照罐. 实验罐最终放罐效价分别为 6 789、6 614 和 6 511 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均值为 6 638 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对照罐最终放罐效价分别为 6 054、5 875 和 5 789 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均值为 5 906 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 实验罐平均发酵效价比对照罐的提高了 12.4%.

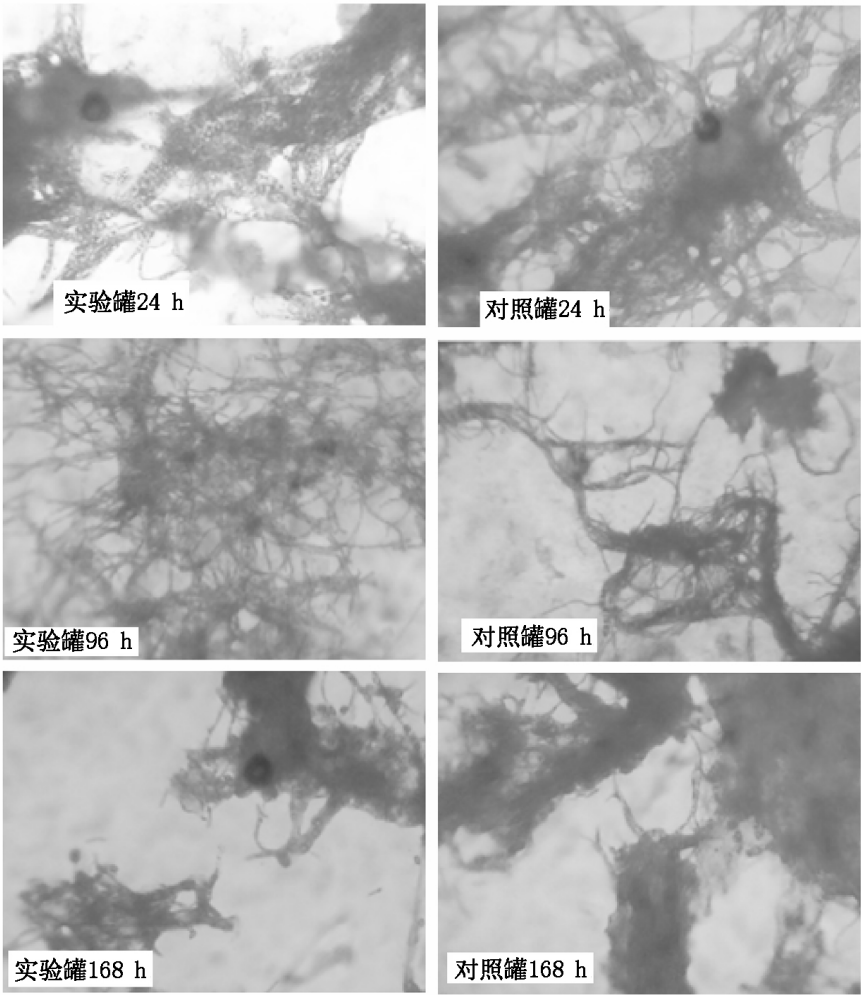


图 2 实验罐和对照罐菌丝形态

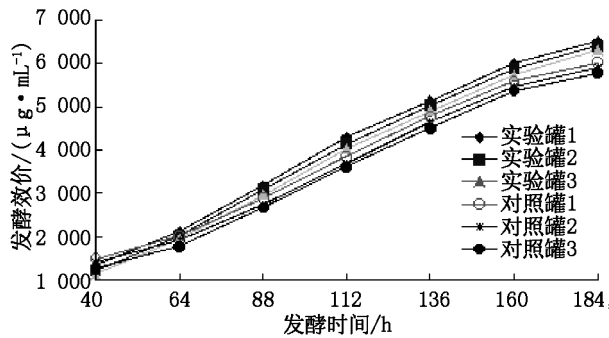


图 3 实验罐和对照罐 3 个批次的发酵效价

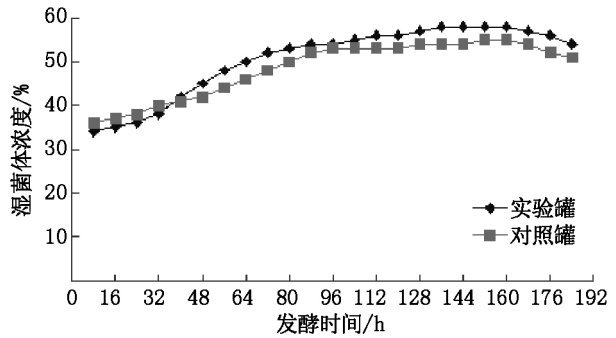


图 4 实验罐和对照罐发酵过程中湿菌体浓度变化

3 讨论

在基础培养基或基础培养基和补糖中都 用液化液代替液化糖生产林可霉素,通过湿菌体浓度检测及菌丝形态显微观察,结果表明,40 h 之前菌体长势均没有使用液化糖的好,这是因为液化液还原糖很少,即远低于液化糖中的还原糖,而还原糖是林可

霉素发酵中的速效碳源,在中后期使用液化液的发酵罐却比使用液化糖的长势更好,因为林肯链霉菌可能存在利用短链淀粉的酶系,而液化液的主要成分 是糊精和低聚糖,液化液中的速效碳源和持续碳源的比例相对于液化糖来说,可能更利于林肯链霉菌在发酵过程中的生长以及林可霉素的释放。

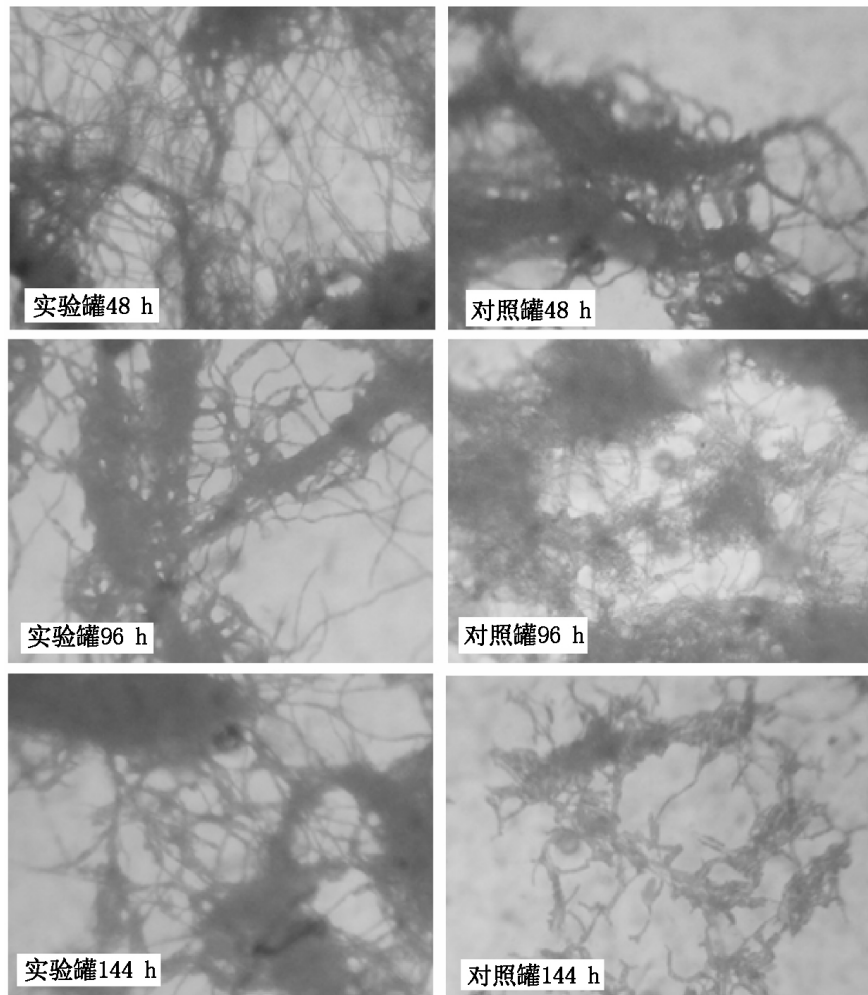


图5 实验罐和对照罐菌丝形态

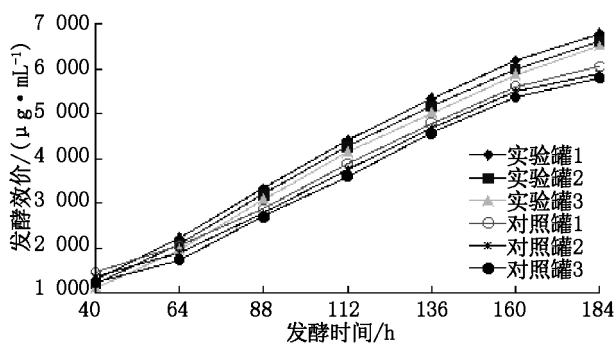


图6 实验罐和对照罐3个批次的发酵效价

通过在基础培养基及补糖中用液化液代替液化糖进行林可霉素发酵的实验,发现在基础培养基中用液化液代替液化糖进行发酵,最终放罐平均发酵效价提高了8.6%;在基础培养基及补糖中均用液化液代替液化糖进行发酵,最终放罐平均发酵效价提高了12.4%。因此,使用液化液代替液化糖进行林可霉素的发酵,可降低生产林可霉素的成本,提高效率及产能,今后将在生产上对该工艺进行验证及完善。

4 参考文献

- [1] Rajeswaran M, Srikrishnan T. Crystal and molecular structure and absolute configuration of lincomycin hydrochloride monohydrate [J]. Carbohydr Res, 2004, 339 (12): 2111-2115.
- [2] Olsovska J, Jelinkova M, Man P. High-through put quantification of lincomycin traces in fermentation broth of genetically modified streptomyces spp. comparison of ultra performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography with UV detection [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1139: 214-220.
- [3] Spizek J, Rezanka T. Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63 (5): 510-519.
- [4] Gerasimova S, Berezina E. Cytomorphological study of lincomycin toxicity [J]. Antibiotiki, 1977, 22 (6): 539.
- [5] 王忠, 王立琦. 林可霉素在兽医临床上的应用进展 [J]. 兽医导刊, 2010 (2): 42-44.

- [6] 董明 邵琼芳. 林可霉素发酵液絮凝过滤研究 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2002, 26(4): 372-374.
- [7] 何家骏 樊世从. 液化糖代替葡萄糖在林可霉素发酵中的应用 [J]. 中国医药工艺杂志, 1992, 23(7): 296.
- [8] 叶万荣. 旋光法测定发酵液中林可霉素的含量 [J]. 医药工业, 1987, 18(2): 76-77.
- [9] 李琨. 多元萃取体系提取林可霉素的热力学研究 [D]. 河北: 河北工业大学, 2004: 10-11.
- [10] 北京大学生物系生化教研室. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 92-96.
- [11] 孙婉菊 王筱兰. 废弃菌体水解液作氮源发酵产胍水合酶的研究 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2013, 37(5): 530-534.
- [12] 李啸 储炬 张嗣良 等. 玉米浆对林可链霉菌的代谢特性及形态的动态影像 [J]. 工业微生物, 2009, 39(6): 16-19.

The Study on Production of Lincomycin by Using Liquefied Starch Instead of Saccharified Starch

HU Biao-qun¹, WANG Xiao-lan^{1*}, ZHONG Yi-qing², XIAO Yong-mei²

(1. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China;

2. Jiangxi Guoyao Pharmaceutical Limited Liability Company, Nanchang Jiangxi 330052, China)

Abstract: The study about the effect of liquefied starch instead of saccharified starch on *Streptomyces lincolnensis* 13 growth and lincomycin fermentation in basic culture medium and carbohydrate supplement was carried out. The result showed that fermentation titer increased 8.6% when using liquefied starch instead of saccharified starch in basic culture medium and that fermentation titer increased 12.4% in basic culture medium and carbohydrate supplement. Therefore, production of lincomycin by using liquefied starch instead of saccharified starch in the basic culture medium and carbohydrate supplement is feasible.

Key words: liquefied starch; saccharified starch; lincomycin; fermentation titer

(责任编辑: 刘显亮)