

科研与开发

两性霉素和制霉菌素发酵及添加其发酵液对甘油发酵影响的比较

张建安^{1,2} 刘德华² 杨燕鸥³ 谢东明² 孙 燕² 杨海荣² 钟修林²

(1. 清华大学核能与新能源技术研究院绿色化学与技术研究室, 北京 102201;

2. 清华大学化学工程系, 北京 100084;

3. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 研究了两性霉素和制霉菌素的发酵过程, 比较了添加两性霉素和制霉菌素发酵液对克鲁氏假丝酵母发酵甘油的影响, 结果表明两性霉素发酵菌体与制霉菌素发酵菌体的生长过程类似, 都存在一个最大值; 当两性霉素和制霉菌素发酵至 156 h 和 144 h 时, 菌体分别达到最大, 但制霉菌素发酵的菌体高于两性霉素发酵的菌体; 当两性霉素和制霉菌素发酵至 192 h 时, 发酵液中两性霉素和制霉菌素的质量浓度分别达到 148 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 181 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与不添加两性霉素和制霉菌素发酵液的甘油发酵相比, 添加两性霉素和制霉菌素发酵液可进一步提高甘油的含量, 其甘油质量分数分别增加了 0.57% 和 2.0%; 此外, 添加制霉菌素发酵液的菌体和甘油含量要高于添加两性霉素发酵液的菌体和甘油含量, 而残糖较低, 而且添加制霉菌素发酵液的甘油含量比添加两性霉素发酵液的甘油质量分数增加了 1.47%。

关键词: 两性霉素; 制霉菌素; 甘油; 耐高渗酵母; 发酵

中图分类号: TQ923

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)05-0027-04

Comparisons of fermentation processes of amphotericin and nystatin and glycerol fermentation with *Candida krusei* by adding amphotericin fermentation broth and nystatin fermentation broth

ZHANG Jian-an^{1,2}, LIU De-hua², YANG Yan-ou³, XIE Dong-ming², SUN Yan², YANG Hai-rong², ZHONG Xiu-lin²

(1. Green Chemistry and Technology Division, Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University,

Beijing 102201, China; 2. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

3. State Key Lab of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences,

Beijing 100080, China)

Abstract: The fermentation processes of amphotericin and nystatin were studied, and the comparisons of glycerol fermentation with *Candida krusei* by adding amphotericin fermentation broth (AFB) and nystatin fermentation broth (NFB) were made respectively. The results show that the process of cell growth in amphotericin fermentation is similar to that in nystatin fermentation, in which maximal cell concentrations are obtained after 156 h, and 144 h of fermentation time, respectively. However, compared with the cell concentration in amphotericin fermentation, the cell concentration in nystatin fermentation is higher. When fermentation time is 192 h, concentrations of amphotericin and nystatin would arrive at 148 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 181 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Furthermore, compared with glycerol concentration of fermentation without adding AFB and NFB, glycerol concentrations would increase further when adding AFB and NFB in glycerol fermentation, with increment of 0.57%, and 2.0%, respectively. In addition, concentrations of cell and glycerol in glycerol fermentation by adding NFB are higher than those by adding AFB, whereas residual glucose is lower, and glycerol concentration via adding NFB is 1.47% higher than that via adding AFB.

Key words: Amphotericin; nystatin; glycerol; *Candida krusei*; fermentation

收稿日期: 2004-02-02

基金项目: 国家“九五”攻关项目(No. 96-C03-03-03A)和国家计委重点工业性实验项目

作者简介: 张建安(1964-), 男, 博士, 讲师, 主要从事生物化工和有机化工研究, 通讯联系人, 010-89796088, zhangja@tsinghua.edu.cn; 刘德华(1962-), 男, 博士, 教授, 主要从事生物化工研究。

甘油的生产方法有 3 种:天然油脂皂化水解得到甘油、通过丙烯氧化法和丙烯氯化法化学合成甘油、微生物发酵法生产甘油。微生物发酵法生产甘油以其原料来源丰富、设备简单等优点受到了高度重视^[1-6]。

由于发酵过程中甘油是自胞内向胞外,甘油分子通过细胞膜的运输是主动运输过程,过高的外界渗透压不利于甘油自胞内向胞外的运输,因此必须维持一个合适的基质压力以促进甘油的分泌。研究者对几种耐高渗酵母进行研究后发现,菌体在含盐高渗条件下膜内的脂肪酸含量增加,胞内的麦角甾醇含量也比无盐时高,这种变化使膜透性下降,并使一些膜蛋白的构象发生改变,进而对甘油从胞内向胞外运输产生了影响。研究还发现加入膜干扰剂和表面活性剂可改善细胞的膜透性,多烯类抗生素如两性霉素和制霉菌素就具有这样的作用^[7-9]。多烯类抗生素可与甾醇结合在膜上形成通道,从而使阳离子或小分子非电解质渗透出来,还诱导了膜对甘油的渗透性,而对其他代谢产物的渗透性没有影响。利用多烯类抗生素与细胞膜脂质成分结合形成膜分子通道可改善细胞的渗透性,使细胞内部大量的钾离子流失,降低耐高渗酵母乙醇途径中一些钾离子依赖酶的活性,减少产物向乙醇的流向,从而提高产物的产出^[10-12]。

尽管多烯类抗生素可改善细胞膜的通透性,但多烯类抗生素医药级试剂价格昂贵,而且在克鲁氏假丝酵母菌发酵甘油中的应用报道较少。笔者初步研究了两性霉素和制霉菌素的发酵以及添加其发酵液对克鲁氏假丝酵母菌发酵甘油的影响,并进行了比较,为进一步提高甘油的产量,降低甘油工业化生产成本提供了一定依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

两性霉素和制霉菌素发酵的菌种分别为结节链霉菌(*Streptomyces nodusus*)和诺尔斯链霉菌(*Streptomyces noursei*),均购于中国科学院微生物研究所和中国农业科学院,甘油发酵为本实验室保存的耐高渗酵母菌,经鉴定为克鲁氏假丝酵母菌(*Candida krusei*)。

1.2 培养基

1.2.1 两性霉素发酵培养基

斜面培养基:酵母提取物 5 g,葡萄糖 5 g, CaCO₃ 0.05 g, K₂HPO₄ 0.25 g, 琼脂 7.8 g, 水 500 mL, pH 值

7.2~7.4。

种子培养基:酵母提取物 5 g,葡萄糖 5 g, CaCO₃ 0.05 g, 水 500 mL, pH 值 7.2~7.4。

发酵培养基:葡萄糖 25 g, 蛋白胨 5 g, CaCO₃ 0.5 g, MnCl₂·4H₂O 0.005 g, FeSO₄·7H₂O 0.005 g, 水 500 mL, pH 值 7.2~7.4。

1.2.2 制霉菌素发酵培养基

斜面培养基:葡萄糖 20 g, NaCl 0.25 g, KNO₃ 0.5 g, K₂HPO₄·3H₂O 0.25 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, FeSO₄·7H₂O 0.005 g, 琼脂 7.5 g, 水 500 mL, pH 值 7.2~7.4。

除去斜面培养基中的琼脂,其余不变,即为种子培养基和发酵培养基。

1.2.3 甘油发酵培养基

斜面培养基:葡萄糖 20% (m/V 比, g/mL, 下同), 玉米浆 0.3% (质量分数, 下同), 尿素 0.3%, 琼脂 2%, pH 值 4.0~4.5。

种子培养基:葡萄糖 10%, 玉米浆 0.4%, 尿素 0.3%, pH 值 4.0~4.5。

发酵培养基:葡萄糖 30%, 玉米浆 0.25%, 尿素 0.25%, pH 值 4.0~4.5。

以上各培养基均于 110℃ 灭菌 20 min。

1.3 发酵过程

将两性霉素和制霉菌素发酵培养基分别置于三角瓶中,分别接相应的发酵菌种,在相应的温度和转速下摇床培养,每隔一定时间取样分析。

将甘油发酵培养基置于三角瓶中,接甘油发酵菌种,在一定温度、转速下摇床培养。在甘油发酵过程中分别加入两性霉素发酵液(简称 AFB)和制霉菌素发酵液(简称 NFB)继续进行甘油发酵,并每隔一定时间取样分析。

1.4 分析测定

发酵液中两性霉素浓度、制霉菌素浓度、甘油含量、残糖含量的测定分别参见文献[10, 13-15]。两性霉素和制霉菌素以及甘油发酵菌体的菌体密度(OD 值)均在 610 nm 处用分光光度仪测定。

2 结果与讨论

2.1 两性霉素的发酵

图 1 为两性霉素发酵的过程曲线。从图可知:菌体在 144 h 之前随发酵时间的延长而增加,在 144 h 时菌体达到最大,之后菌体随发酵时间的增加而降低,可能是菌体发生自溶。发酵液中两性霉素的含量在 36 h 之前增加较快,在 36~48 h 之间两性霉素

的含量略有降低,在 48 ~ 84 h 之间又有所增加,在 84 ~ 96 h 之间又有所降低,在 96 h 之后,两性霉素含量又开始增加,直至发酵到 192 h 时,两性霉素的含量达到 148 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

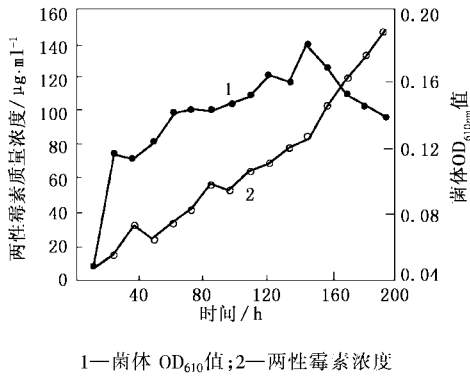


图 1 两性霉素的发酵过程曲线

2.2 制霉菌素的发酵

图 2 是制霉菌素发酵的过程曲线。从图可以看出,随着发酵时间的增加,菌体在 144 h 之前随着发酵时间的增加而增加,在 144 h 之后随着发酵时间的增加而降低。在 24 h 之前,发酵液中制霉菌素的含量增加较快,在 24 ~ 84 h 之间,制霉菌素的含量增加减慢,在 84 h 之后,制霉菌素的含量变化不大。当发酵至 168 h 时,制霉菌素的含量最大为 183 $\mu\text{g}/\text{mL}$,当发酵至 192 h 时,制霉菌素的含量为 181 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与图 1 相比,制霉菌素发酵菌体的生长过程与两性霉素菌体的生长过程类似,都是先增加、达到最大值后再降低。在相同的发酵时间下,制霉菌素发酵的菌体要高于两性霉素发酵的菌体。发酵液中制霉菌素的含量也高于发酵液中两性霉素的含量,并且发酵液中制霉菌素的含量在发酵 84 h 之后变化不大,而发酵液中两性霉素的含量在发酵 84 h 之后仍在持续增加。

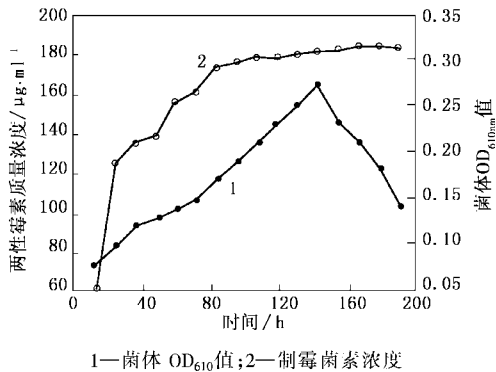
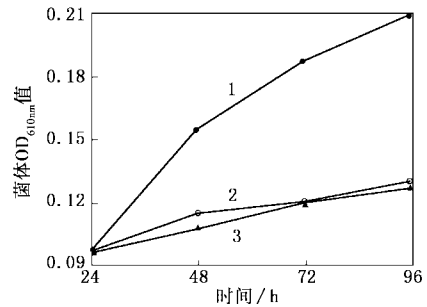


图 2 制霉菌素的发酵过程曲线

2.3 添加 AFB 和 NFB 对甘油发酵菌体影响的比较

图 3 是添加 AFB 和 NFB 对菌体影响的比较。

随着发酵时间的增加,发酵甘油的菌体增加。与不添加 AFB 和 NFB 的甘油发酵相比,添加 AFB 后菌体略有增加,而添加 NFB 后菌体增加较快。从图中还可以看出添加 NFB 后菌体的增加要远高于添加 AFB 后的菌体。虽然两性霉素和制霉菌素都属于多烯类抗生素,但添加 AFB 后菌体的增加较少,而添加 NFB 后菌体的增加较多,说明添加 NFB 可较大幅度地促进甘油发酵菌体的生长,而添加 AFB 可能对菌体的生长有抑制作用。

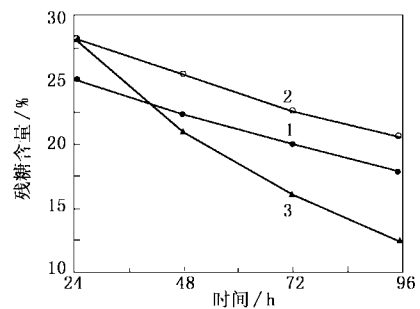


1—添加 NFB;2—添加 AFB;3—不添加 AFB 和 NFB

图 3 添加 AFB 和 NFB 对甘油发酵菌体影响的比较

2.4 添加 AFB 和 NFB 对甘油发酵残糖影响的比较

图 4 是添加 AFB 和 NFB 对残糖影响的比较。与不添加 AFB 和 NFB 的甘油发酵相比,添加 AFB 和 NFB 后残糖降低较慢,而与添加 AFB 后残糖相比,添加 NFB 后残糖降低要快。因为 NFB 促进细胞的生长,而 AFB 抑制细胞的生长。



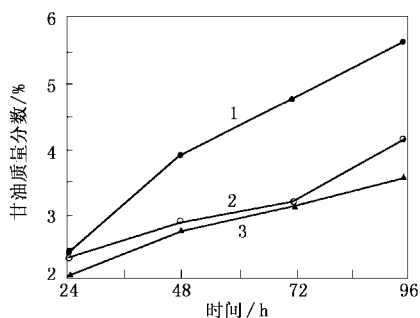
1—添加 NFB;2—添加 AFB;3—不添加 AFB 和 NFB

图 4 添加 AFB 和 NFB 对甘油发酵残糖影响的比较

2.5 添加 AFB 和 NFB 对发酵甘油含量影响的比较

图 5 是添加 AFB 和 NFB 对发酵甘油含量影响的比较。添加 AFB 和 NFB 后甘油含量要高于不添加 AFB 和 NFB 的发酵甘油含量,而添加 NFB 后甘油含量也明显高于添加 AFB 后甘油的含量。由于甘油的发酵过程是一个甘油从胞内向胞外传递的主动运输过程,外界渗透压不能过高,因此需要维持合适

的基质压力来促进甘油由胞内向胞外不断地分泌,因为添加 AFB 和 NFB 可改善克鲁氏假丝酵母细胞的渗透性和甘油所处的基质环境,从而打破细胞内外的平衡压力,提高胞内甘油向胞外分泌的能力,使得甘油含量增加。



1—添加 NFB;2—添加 AFB;3—不添加 AFB 和 NFB

图 5 添加 AFB 和 NFB 对发酵甘油含量影响的比较

3 结论

研究比较了两性霉素和制霉菌素的发酵过程,结果表明二者发酵菌体的生长过程类似,都是先增加至最大值后再降低,最大的菌体 OD 值分别是 0.168 和 0.270;发酵液中制霉菌素的含量要高于两性霉素的含量,在发酵 84 h 之后,发酵液中制霉菌素的含量变化不大,而两性霉素的含量仍在增加,当发酵至 192 h 时,分别得到含两性霉素 148 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和制霉菌素 181 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的发酵液。

研究比较了添加两性霉素和制霉菌素发酵液对甘油发酵的影响,与不添加两性霉素和制霉菌素发酵液的甘油发酵相比,添加两性霉素和制霉菌素发酵液可进一步增加甘油含量,同时,添加制霉菌素发

酵液,其菌体和甘油含量要高于添加两性霉素发酵液的菌体和甘油含量,而残糖低于添加两性霉素发酵液的残糖,当发酵至 96 h 时,添加两性霉素和制霉菌素发酵液的甘油质量分数分别达到 4.1% 和 5.6%,而不添加两性霉素和制霉菌素发酵液的发酵甘油质量分数仅为 3.5%。

参考文献

- [1] 邹世能.[J]. 日用化学工业,1996,3:36.
- [2] 施春辉.[J]. 山东化工,1997,3:42.
- [3] Vijaikishore P, Karanth N G.[J]. Biotechnol Lett, 1986, 8(4):257.
- [4] Bisping B, Rehm H J.[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1986, 23:174.
- [5] Kalle G P, Naik S C, Lashkari B Z.[J]. J Ferment Technol, 1985, 63(3):231.
- [6] Zhang J A, Liu D H, Xie D M, et al.[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30:758-762.
- [7] Arnold N W, Johnson B P.[J]. Appl Environ Microbiol, 1982, 43(2):311-318.
- [8] Gancedo C, Gancedo J M, Sols A.[J]. Eur J Biochem, 1968, 5:165-172.
- [9] Francis F B, Ilene S, Mordhay A, et al.[J]. Biochimical Biophysica Acta, 1982, 690:165-173.
- [10] Iciar E, Celia B, Maria J R, et al.[J]. J Chromatogr A, 1998, 819:171-176.
- [11] Ramos H, Attias M A, Cohen B E, et al.[J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 982:303-306.
- [12] Son T D, Martine H, Odette I, et al.[J]. Eur J Biochem, 1991, 197:271-279.
- [13] 马剑文.[J]. 药物学报, 1985, 20(4):294-301.
- [14] Neish A C. Analytical Methods for Bacterial Fermentation[M]. 2nd revision. Ottawa, Canada: National Research Council of Canada, Bulletin No. 25292, 1954.
- [15] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1981.9. ■

环保博览会 IFAT 将登陆上海

慕尼黑的 IFAT 是全球规模最大的环保博览会。2004 年 6 月 29 日至 7 月 2 日 IFAT CHINA 2004 将在上海新国际博览中心拉开帷幕,这将是 IFAT 首次登陆中国。国内外知名企业踊跃报名,其中中国展商占 60% 以上。届时全球环保市场领先者和主要经营者将向世人集中展示本行业的最新发展趋势以及国内外最新的产品和服务。IFAT CHINA 将是一次全球行业盛会。

现已报名参展的国际著名企业有卡特彼勒、阿法拉伐、西格斯吉宝、得利满、格兰富、ITT 飞力、凯士比、耐驰、Westfalia、连恩舍、福乐伟、派克汉尼汾、必达福、丹麦霍威特博、维尔利、Wiedemann & Reichhardt、Fritz Schäfer、Lurgi Lentjes AG、Umweltbundesamt、Lipp 等;国内的长沙中联重科、浙江精工、德州德隆、武汉凯迪电力等知名企业也将一展风采。

欲了解有关展会的详情请登陆 www.ifat-china.com。