

利普司他汀生产菌株发酵工艺的研究

蒋彩霞, 李宏杰, 方军, 沈康(杭州中美华东制药有限公司, 杭州 310011)

摘要: 目的 研究利普司他汀发酵配方和培养条件, 确定最佳生产工艺。方法 从利普司他汀的摇瓶发酵着手, 通过考察 pH、碳源、氮源、无机盐、种龄、接种量、温度、发酵时间等因素的影响, 优化发酵培养基以及发酵培养条件。结果 最佳初始 pH 为 6.5~7.0; 最佳的碳源是丙三醇; 最佳的氮源是去脂黄豆粉; 对发酵影响最大的无机离子为锌离子; 最佳培养温度是 30 °C; 最佳种龄是 25 h; 最佳接种量是 4%~6%。结论 采用优化的发酵配方和发酵条件可提高发酵活性单位。

关键词: 毒三素链霉菌; 利普司他汀; 工艺优化

中图分类号: R931.6

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)06-0841-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.06.012

引用本文: 蒋彩霞, 李宏杰, 方军, 等. 利普司他汀生产菌株发酵工艺的研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(6): 841-845.

Study on the Fermentation Process of Strain Which Can Produce Lipstatin

JIANG Caixia, LI Hongjie, FANG Jun, SHEN Kang(Hangzhou Zhongmei Huadong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To find a best production process by studying Lipstatin fermentation formula and culture conditions. **METHODS** During the aerobic fermentation, pH, carbon source, nitrogen source, inorganic salt, inoculate age, inoculate quantity, temperature and fermentation time were studied to optimize the fermentation media and culture conditions.

RESULTS The most suitable pH for original culture was 6.5–7.0; the best carbon source was glycerol; the best nitrogen source was skimmed bean flour; and zinc ion was mostly impact the fermentation process among the inorganic salt; the best culture temperature was 30 °C; the suitable fermentation time was 25 h and the best inoculate quantity was 4%–6%. **CONCLUSION** Fermentation activity unit can be increased through optimized fermentation formula and culture condition.

KEY WORDS: *Streptomyces toxytricini*; Lipstatin; process optimize

随着人们生活水平的不断提高, 肥胖症已成为一种威胁人类健康的全球性慢性疾病^[1]。肥胖不仅影响美观和人体活动能力, 而且易引发高血压、高血脂症、糖尿病与其他严重疾病, 目前是全球成年人最大的慢性疾病, 被世界卫生组织(WHO)明确认定为导致疾病发生的十大危险因素之一^[2-3]。肥胖作为心血管病重要的危险因素之一, 其患病率呈快速上升态势^[4]。我国 2002 年 >18 岁人群超重率为 22.8%, 肥胖率为 7.1%; 2010 年有资料显示 >18 岁居民超重率增加至 30.6%, 肥胖率增加至 12.0%。其他相关调查也发现我国 >18 岁居民中心性肥胖患病率为 30%~40%^[5-6]。因此, 消除肥胖势在必行, 治疗和遏制肥胖已成为全球医学攻关的重要内容, 减肥药的研制正是科研人员关注的焦点之一。微生物发酵产生的利普司他汀(Lipstatin)是来源于毒三素链霉菌的次级代谢产物^[7], 通过氢化合成成为奥利司他, 奥利司他能选择性抑制胃肠道中胰脂肪酶的活性, 减少脂肪的分解和吸收,

已被成功开发为新型减肥药物, 是目前作为非中枢神经系统作用的唯一一个治疗肥胖症的药物^[8]。研究表明, 奥利司他非全身作用、具有良好耐受性和有效性, 不用食欲抑制剂而治疗肥胖, 为肥胖症的药物治疗开辟了新途径^[9]。但我国所用的菌种都是从国外进口的, 其传代次数太多, 菌种的活性以及生物学特性可能会发生变化, 并且从国外进口成本也比较高, 本研究拟通过对利普司他汀生产菌株的发酵培养基及发酵条件进行优化, 从而得到能使利普司他汀发酵活性单位提高的生产工艺。

1 对毒三素链霉菌生物学特性的分析

利普司他汀发酵菌种属于 *Streptomyces* 属的 *toxytricini* 种。为了证明现研究使用的利普司他汀发酵菌种与原始菌种一致, 未发生菌种变异, 笔者将经过传代的现有利普司他汀发酵菌株送浙江工业大学生物工程研究所进行微生物菌种鉴定试验。通过对利普司他汀发酵菌株进行形态学、生

作者简介: 蒋彩霞, 女, 工程师 Tel: (0571)89918261 E-mail: 1596483486@qq.com

理生化和分子遗传学的鉴定,确定目前使用的菌种为 *Streptomyces toxytricini*, 其中文名为毒三素链霉菌。

毒三素链霉菌为白色粉末状菌落,在斜面培养时培养基呈粉红色或无色,表面为白色单个圆形菌落;对种子液以及发酵液镜检结果是菌丝形态为树状,并且大量菌丝缠绕在一起,在种子培养时还有大量孢子产生。

2 方法

2.1 基础工艺条件 摇瓶装量为 25 mL/250 mL,调节培养基 pH 为 6.5~7.0,发酵条件为 30 ℃、220 r·min⁻¹ 发酵 120 h,测定利普司他汀发酵活性单位。其中 pH 对利普司他汀发酵的影响试验中,pH 根据实际实验进行控制;培养温度和发酵时间对利普司他汀发酵的影响试验中,培养温度和发酵时间根据实际实验进行控制。

2.2 利普司他汀发酵活性单位测定方法

利普司他汀发酵活性单位采用 HPLC 进行测定。用 20 mL 丙酮浸泡 5 mL 发酵液(稀释倍数可根据活性单位调整)离心所得的上清液为检测样品。检测条件:流动相为乙腈-缓冲溶液(84:16),缓冲溶液为 50 mg KH₂PO₄+50 mg K₂HPO₄ 加 1 000 mL 纯化水(根据配制量进行调整),色谱柱为 C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流速为 1.9 mL·min⁻¹,柱温为 40 ℃,检测波长为 200 nm,进样体积为 20 μL。

2.3 培养基的组成对利普司他汀发酵的影响^[10-11]

2.3.1 pH 对利普司他汀发酵的影响 采用基础发酵培养基,调节初始 pH 分别为 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 二级发酵,种子生长 25 h,接种量为 6%,按“2.1”项下方法进行试验。

2.3.2 最佳碳源的确定 基础培养基组成为去脂黄豆粉 30 g·L⁻¹,豆油 50 g·L⁻¹,大豆卵磷脂 16 g·L⁻¹,再加入 2%碳源:葡萄糖、丙三醇、可溶性淀粉,按“2.1”项下方法进行试验。

2.3.3 最佳氮源的确定 基础培养基组成为丙三醇 20 g·L⁻¹,豆油 50 g·L⁻¹,大豆卵磷脂 16 g·L⁻¹,再加入 3%以下氮源:去脂黄豆粉、黄豆粉、绿豆粉、麸质粉,按“2.1”项下方法进行试验。

2.3.4 无机离子对利普司他汀发酵的影响 基础培养基组成为去脂黄豆粉 30 g·L⁻¹,丙三醇 20 g·L⁻¹,大豆卵磷脂 16 g·L⁻¹,豆油 50 g·L⁻¹,分别配制浓度为 1%的硫酸亚铁、硫酸镁、硫酸锌母

液,用移液管吸取 0.25 mL 母液至发酵培养基中使其终浓度为 0.01%,按“2.1”项下方法进行试验。

2.3.5 卵磷脂对利普司他汀发酵的影响 基础培养基组成为去脂黄豆粉 30 g·L⁻¹,丙三醇 20 g·L⁻¹,豆油 50 g·L⁻¹,大豆卵磷脂 16 g·L⁻¹,设计的 4 组培养基如下:A,基础培养基中既不加豆油也不加卵磷脂;B,基础培养基中加入豆油不加入卵磷脂;C,基础培养基中加入卵磷脂不加入豆油;D,基础培养基中既加入豆油也加入卵磷脂。按“2.1”项下方法进行试验。

2.3.6 不同油对利普司他汀发酵的影响 基础培养基组成为去脂黄豆粉 30 g·L⁻¹,丙三醇 20 g·L⁻¹,大豆卵磷脂 16 g·L⁻¹,再加入 5%的以下油:菜籽油、豆油、葵花子油,按“2.1”项下方法进行试验。

2.4 发酵条件对利普司他汀发酵的影响^[12]

2.4.1 种龄对利普司他汀发酵的影响 种子培养过程,每隔一段时间取样。称重空的干燥离心管,将种子液倒入离心管,瓶壁上沾附的菌丝体需用水冲洗下来,于 12 000 r·min⁻¹ 离心 25 min,弃去上清液,用滤纸将离心管壁附着的水吸干,称取总重量,其差值即为菌丝体湿重,菌体生长 0, 7, 13, 20, 22, 25.5, 28, 34 h 时菌丝体湿重值分别为 0.025 3, 0.040 65, 0.083 25, 0.230 05, 0.579 65, 0.886 2, 0.936, 0.951 g。做出种子曲线,找出最佳的接种种龄。

2.4.2 接种量对利普司他汀发酵的影响 基础培养基组成为去脂黄豆粉 30 g·L⁻¹,丙三醇 20 g·L⁻¹,豆油 50 g·L⁻¹,大豆卵磷脂 16 g·L⁻¹,分别加入 0.5, 1, 1.5, 2 mL 的种子液使接种量分别为 2%, 4%, 6%, 8%,按“2.1”项下方法进行试验。

2.4.3 培养温度对利普司他汀发酵的影响 基础培养基组成为去脂黄豆粉 30 g·L⁻¹,丙三醇 20 g·L⁻¹,豆油 50 g·L⁻¹,大豆卵磷脂 16 g·L⁻¹,按“2.1”项下方法进行实验,分别放入 25, 27, 28, 30 ℃摇床上培养。

2.4.4 发酵时间对利普司他汀发酵的影响 基础培养基组成为去脂黄豆粉 30 g·L⁻¹,丙三醇 20 g·L⁻¹,豆油 50 g·L⁻¹,大豆卵磷脂 16 g·L⁻¹,按“2.1”项下方法进行实验,分别在 30 ℃摇床上培养 100, 120, 140, 150, 160 h。

3 结果

3.1 培养基的组成对利普司他汀发酵的影响

3.1.1 pH 对利普司他汀发酵的影响 发酵液的初

始 pH 对菌体的生长和产物的合成均有影响,其中发酵液的初始 pH 为 7.0,与培养成熟的种子液的 pH 比较接近(种子液 pH 为 6.5~7.0),有利于菌体迅速繁殖,扩增至对数生长期,有利于利普司他汀的生物合成。结果见表 1。

表 1 不同初始 pH 对利普司他汀发酵的影响

Tab. 1 Effect of different initial pH impact on Lipstatin fermentation

初始 pH	消后 pH	培养 2 d 后菌体量	吸光度	发酵活性单位/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
6.50	6.1	12	1.307	8.8×10^3
7.00	6.8	14	1.304	8.8×10^3
7.50	7.1	11	1.280	7.5×10^3
8.00	7.6	9	1.272	6.4×10^3

3.1.2 最佳碳源的确定 利普司他汀发酵的碳源以丙三醇为最佳,以葡萄糖为最差,因此最佳碳源为丙三醇,结果见表 2。

表 2 最佳碳源的确定

Tab. 2 Determination of the optimum carbon source

碳源	吸光度	发酵活性单位/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	放瓶 pH
葡萄糖	1.292	8.6×10^3	7.0
丙三醇	1.304	8.8×10^3	6.5
可溶性淀粉	1.300	8.7×10^3	7.0

3.1.3 最佳氮源的确定 有机氮源以去脂黄豆饼粉为最佳。而加入麸质粉和蛋白胨后则没有利普司他汀产生,并且加入此 2 种氮源的发酵液 pH 也比较低,可能是加入此 2 种物质后使得菌体在生长过程中产生过多的酸性物质,从而抑制了菌体的生长和目的产物的合成。结果见表 3。

表 3 最佳氮源的确定

Tab. 3 Determination of optimum nitrogen source

氮源	吸光度	发酵活性单位/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	放瓶 pH
去脂黄豆粉	1.305	8.8×10^3	6.5
黄豆粉	1.300	8.7×10^3	6.5
绿豆粉	1.278	8.4×10^3	6.0
麸质粉	1.270	8.3×10^3	5.0

表 5 卵磷脂对利普司他汀的影响

Tab. 5 Effect of lecithin impact on Lipstatin

培养基	发酵活性单位/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	吸光度	发酵液表现状态	镜检结果	菌体浓度/g
A	0	0.773 6	发酵液较稀	基本看不到菌丝	0
B	0	0.773 6	发酵液稀	基本看不到菌丝	0
C	8.5×10^3	1.300	发酵液黏稠	大量菌丝且菌丝粗壮	6.0
D	8.8×10^3	1.308	发酵液比较黏稠	菌丝最多并且菌丝粗壮	6.8

3.1.4 无机离子对利普司他汀发酵的影响 镁离子和锌离子对利普司他汀的发酵有促进作用,尤其是锌离子的加入,使得利普司他汀的发酵活性单位比对照组提高不少。结果见表 4。

表 4 无机离子对利普司他汀发酵的影响

Tab. 4 Effect of inorganic ions impact on Lipstatin fermentation

无机盐	吸光度	发酵活性单位/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
不加	1.280	8.4×10^3
硫酸亚铁	1.300	8.7×10^3
硫酸镁	1.304	8.7×10^3
硫酸锌	1.308	8.8×10^3

3.1.5 卵磷脂对利普司他汀发酵的影响 A、B 培养基中没有利普司他汀菌丝产生。加入豆油的发酵培养基在发酵 120 h 后的菌丝状态显示,菌丝量偏少且生长不良;既加入豆油又加入卵磷脂的菌丝状态显示,菌丝量多且生长良好。结果见表 5,菌丝状态见图 1。卵磷脂在试验中起到乳化剂的作用,把豆油乳化成亚油酸等能够直接被利普司他汀菌利用的营养物质,如果加入豆油不加入卵磷脂,菌丝在利用完丙三醇后,培养基中没有供利普司他汀菌利用的碳源,当发酵培养 120 h,菌丝因营养物质缺失而衰老;反之,既加入豆油又加入卵磷脂的培养基为利普司他汀菌的生长提供持续的碳源,同时为产物的合成提供持续的前提物质,菌丝生长和产物合成持续的时间就更长。除此之外,在试验过程中还发现当增加卵磷脂的加入量时会增加发酵液的黏度,产物单位也会下降。这可能是因为发酵液黏度的增加降低了培养基中的溶氧,从而影响产物的合成。

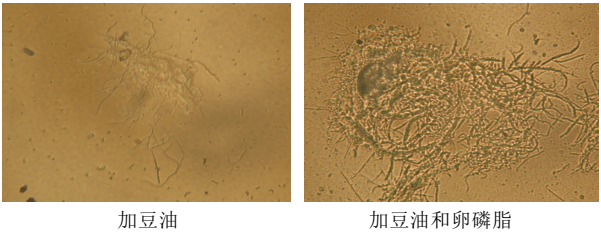


图 1 菌丝状态

Fig. 1 The state of the mycelium

3.1.6 不同油对利普司他汀产生的影响 油的种类对利普司他汀产量影响较大。以豆油和葵花籽油的产量最高，菜子油最低，结果见表 6。主要原因可能是不同油中不饱和脂肪酸特别是亚油酸的含量不同而造成。根据已有的文献报道，在利普司他汀中烷基链结构并不是逐步合成，而是由外源不饱和脂肪链直接添加上去。而亚油酸的结构与利普司他汀的碳架结构基本一样，豆油中含有亚油酸的量最多，所以加入豆油的培养基中利普司他汀的发酵活性单位就较高。

表 6 不同油对利普司他汀发酵的影响

Tab. 6 Effect of different oils impact on Lipstatin fermentation

油	吸光度	发酵活性单位/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
菜籽油	1.027	8.3×10^3
葵花籽油	1.302	8.7×10^3
豆油	1.306	8.8×10^3

3.2 发酵条件对利普司他汀发酵的影响

3.2.1 种龄对利普司他汀发酵的影响 种子生长曲线见图 2，最佳的种龄是 25 h。

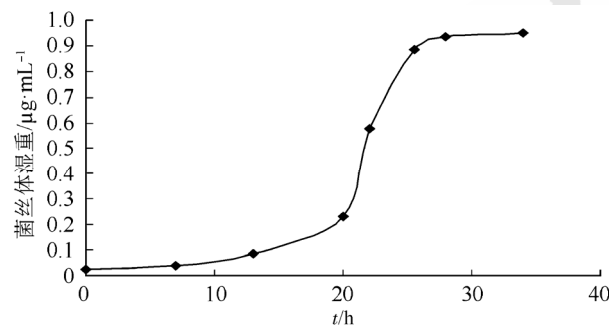


图 2 种子生长曲线

Fig. 2 Seed growth curve

3.2.2 接种量对利普司他汀发酵的影响 最佳接种量为 4%~6%，接种量大可能造成菌浓较大，营养不足，菌丝提前自溶，引起发酵液 pH 上升，从而影响产物的稳定性，结果见表 7。合适的接种量可缩短生长期，使产物合成提前，因为合适的种子量，种子的数量多，同时种子液中含有大量胞外水解酶，有利于基质的利用，并且生产菌在发酵液中迅速占优势，从而减少杂菌生长的机会，有利于菌体快速生长和产物的合成。

3.2.3 培养温度对利普司他汀发酵的影响 温度对利普司他汀的发酵影响也较大，结果见表 8。温度偏低偏高都不利于利普司他汀的生物合成。同

时发酵温度对发酵液的 pH 影响也比较突出，pH 值同样影响发酵活性单位，在 30 ℃ 发酵液活性单位以及 pH 都达到最佳，即最佳发酵温度定为 30 ℃。

表 7 接种量对发酵的影响

Tab. 7 Effect of inoculation amount impact on fermentation

接种量/%	发酵液形态	pH	吸光度	发酵活性单位/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
2.0	稍微黏稠	6.5	1.276	8.4×10^3
4.0	比较黏稠	6.5	1.308	8.8×10^3
6.0	特别黏稠	7.0	1.305	8.8×10^3
8.0	较稀	7.5	1.272	8.4×10^3

表 8 温度对利普司他汀发酵得影响

Tab. 8 Effect of temperature impact on Lipstatin fermentation

温度/℃	吸光度	发酵活性单位/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
25	1.275	8.3×10^3
27	1.277	8.3×10^3
28	1.300	8.6×10^3
30	1.307	8.8×10^3
32	1.286	8.3×10^3
34	0.815	5.4×10^3

3.2.4 发酵时间对利普司他汀发酵的影响 发酵 100 h 时发酵液黏稠，但利普司他汀的发酵活性单位较低，因为菌体仍在代谢，营养物质还没有消耗尽；120 h 时发酵液黏稠，利普司他汀的发酵活性单位达到最高，此时营养也刚好消耗完毕；从 140 h 后菌体开始自溶，利普司他汀发酵活性单位也随之减小。所以发酵的最佳时间为 120 h。到了 150 h 菌体自溶，所以发酵液开始变稀。结果见表 9。

表 9 发酵时间对发酵的影响

Tab. 9 Effect of fermentation time impact on fermentation

发酵时间/h	发酵液形态	菌体浓度/%	吸光度	发酵活性单位/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
100	稍变黏稠	12	1.270	8.2×10^3
120	比较黏稠	16	1.310	8.9×10^3
140	黏稠	17	1.302	8.8×10^3
150	开始变稀	6	1.201	8.1×10^3
160	比较稀	2	1.198	8.0×10^3

3.2.5 最佳工艺 按照上述方法得到的最佳工艺结果见表 10。

表 10 最佳工艺优化表

Tab. 10 The table of the best process optimization

工艺优化	发酵培养基						发酵条件			
	pH	碳源	氮源	无机离子	表面活性剂	油	种龄/h	接种量/%	发酵温度/℃	发酵时间/h
最佳选择	6.5~7.0	丙三醇	去脂黄豆粉	锌离子	卵磷脂	豆油	25	4~6	30	120
用量		2.0%	3.0%	0.05%	1.6%	5.0%				

4 结论

通过试验得到利普司他汀发酵的最佳培养基组成如下: pH 为 6.5~7.0, 去脂黄豆粉 3.0%, 丙三醇 2.0%, 豆油 5.0%, 大豆卵磷脂 1.6%, 硫酸锌 0.05%; 最佳的培养条件如下: 种龄为 25 h, 接种量为 4%~6%, 发酵时间为 120 h; 影响最大的无机离子为锌离子。

REFERENCES

- [1] WANG Z W, DU G, WANG X, et al. Current prevalence rates of overweight, obesity, central obesity, and related cardiovascular risk factors that clustered among middle-aged population of China [J]. Chin J Epidemiol(中国地方病学杂志), 2014, 35(4): 354-358.
- [2] DU J, ZHANG S H, WU H J, et al. Central obesity is related to the microalbuminuria in Chongqing University natives [J]. Chin J Lab Diag(中国实验诊断学), 2011, 15(9): 1482-1484.
- [3] YANG J X, WANG J F, FU P Y, et al. Study on the prevalence and risk factors of obesity in rural communities [J]. Mod Prev Med(中华预防医学杂志), 2007, 34(7): 1248-1250.
- [4] NI G H, ZHANG J, ZHENG F T. Status and trends of Chinese obesity epidemic [J]. Food Nutr China(中国食物与营养), 2011, 19(10): 70-74.
- [5] MA G S, LI Y P, WU Y F, et al. The prevalence of body overweight and obesity and its changes among Chinese people during 1992 to 2002 [J]. Chin J Prev Med(中华预防医学杂志), 2005, 39(5): 311-315.
- [6] 中国疾病预防控制中心. 中国慢性病及其危险因素监测报告[R]. 2010.
- [7] YUAN G J, LI P B, PAN W W. Uick identification of anti-MRSA secondary metabolites produced by two streptomyces strains isolated from special surroundings [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(4): 337-341.
- [8] ZHAO P J, MIAO C D, LIANG S W, et al. Identification and fermentation characteristics of Lipstatin produced by streptomyces toxytricini [J]. Chin J Trop Agr(热带农业科学), 2014, 34(7): 69-72.
- [9] 马微, 付丽, 王海波, 等. 新型减肥药奥利司他的研究进展 [J]. 华西药理学杂志, 2009, 24 (4): 431-433.
- [10] HU W M, ZHUANG Y P, WANG Y H, et al. Fermentation and extraction process of lipstatin produced by *Streptomyces toxytricini* [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2007, 38(10): 705-708.
- [11] DONG H J, JIANG J Y, CHEN F. Investergation of lipid and Lipstatin biosynthesis in *Streptomyces toxytricini* by addition of biotin and ATP [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(1): 19-24.
- [12] LI J Y, DING Y, ZHOU P. Study on the fermentation condition of coenzyme Q10 by *Candida tropicalis* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(2): 103-106.

收稿日期: 2016-12-26
(本文责编: 蔡珊珊)