

抗生素 AGPM 摇瓶发酵条件的正交实验

石炳兴, 赵红, 刘喜朋, 元英进, 胡宗定

(天津大学生化工程系, 天津 300072)

摘要: 采用正交实验设计考察了培养基组成对新型抗生素 AGPM 发酵的影响, 改进后在培养基组成为(g/L) 葡萄糖 5, 玉米淀粉 40, 黄豆饼粉 16, 玉米浆 2 ml, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.5, 淀粉酶 0.05 及 pH 5.5 的条件下, 单位发酵液的活性提高了 18.9 倍; 同时表明较高的碳氮比对抗生素 AGPM 的合成有利。

关键词: 抗生素; 培养基; 链霉菌; 正交实验

中图分类号: Q935; Q939.13 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2001)04-0442-03

1 前言

微生物是自然界最丰富的天然药物资源之一, 开发微生物的次生代谢产物以得到抗癌、抗菌等天然药物或先导化合物具有重要价值。本实验室从土壤中筛选得到一株新的链霉菌变种 (*Streptomyces* sp.), 其次生代谢产物对多种革兰氏阳性菌具有显著的抑制作用, 该产物尚未见文献报道(其结构正在鉴定中), 具有良好的应用开发前景。研究发现, 培养基的组成、配比等营养条件对活性成份的合成具有较大影响。本文考察了碳、氮源及磷对其发酵活性的影响, 采用正交实验方法得到了较为合适的发酵条件。

2 材料和方法

2.1 菌种

链霉菌变种(*Streptomyces* sp.)从土壤中分离。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)由天津轻工业学院杜连祥教授惠赠。

2.2 培养基

细菌培养基^[1]: 牛肉膏蛋白胨固体培养基。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 5, 可溶性淀粉 40, 蛋白胨 4, 玉米浆 2 ml, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.5, 自来水 1000 ml, pH 6.0, 121°C 灭菌 15 min。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.5, 其它不同水平碳氮源见各表中相应条件, 自来水 1000 ml, pH 5.5, 121°C 灭菌 15 min。

2.3 培养方法

液体种子培养: 将活化好的斜面孢子转接于液体培养基, 装液量 50 ml (250 ml 三角瓶), 28°C, 180 r/min 摇瓶培养 48 h。

发酵培养: 将上述培养种子液按 10% 的接种量接种于发酵培养基, 装液量 50 ml (250 ml 三角瓶), 28°C, 180 r/min 摇瓶发酵 96 h。

2.4 活性测定方法(杯碟法^[2])

将 37°C 培养 48 h 的枯草芽孢杆菌(浓度为 1×10^7 CFU/ml) 0.5 ml 和冷却至 50°C 左右的细菌培

收稿日期: 2000-11-28, 修回日期: 2001-02-13

基金项目: 天津市自然科学基金重点资助项目(编号: 013801211)

作者简介: 石炳兴(1967-), 男, 安徽省宿松人, 博士研究生, 生物化工专业。

培养基 12 ml 混合倒入已灭菌的直径 10 cm 的培养皿,待凝固后,放置于牛津杯,取一定量过滤发酵液置于牛津杯中,37°C 下培养 24 h,量取抑菌透明圈直径,即可表示相应活性,或与序列稀释所得标准曲线对照。

AGPM 活性单位定义:在上述测定条件下,50 μl 发酵液抑菌透明圈直径为 7.5 mm 时定义为 1 个活性单位(u),即此发酵液活性为 20 u/ml。

活性 $U(\text{u/ml})=1.92e^{0.3117D}$ ($R^2=0.9954$, $7.5 < D < 28$), D 为抑菌透明圈直径(mm)。

3 结果与讨论

3.1 碳源对发酵活性的影响

碳源常通过影响微生物的糖代谢、呼吸、能量、生长及相关代谢而影响抗生素等次生代谢产物的合成与分泌。实验考察了葡萄糖、可溶性淀粉、玉米淀粉等对发酵液活性的影响,结果见表 1,表明可溶性淀粉较葡萄糖和玉米淀粉有利于产物的生成,而玉米淀粉加适量的 α -淀粉酶,其效果与可溶性淀粉几乎相当。这说明一定程度降解的淀粉糊精对该活性成份 AGPM 的生成是有利的。

表 1 碳源对抗生素 AGPM 合成的影响

Table 1 Effect of carbon source on the productivity of AGPM

Carbon source	Glucose	Soluble starch	Corn starch	Corn starch+0.05 g amylase
Relative activities (%)	61.8	100.0	58.8	98.1

Note: nitrogen source — corn steep liquor 2 ml, peptone 4 g; others as in Section 2.2; carbon source conc. 40 g/L.

3.2 氮源对发酵活性的影响

尿素、硫酸铵、玉米浆、蛋白胨、黄豆饼粉等是常用的工业微生物发酵氮源,实验对相同氮含量的不同氮源进行了对比,结果见表 2。表 2 表明,蛋白胨和黄豆饼粉明显优于尿素和硫酸铵,这说明氨基酸可能是更好的氮源。在活性与成本之间权衡,黄豆饼粉更适合于生产应用。

表 2 氮源对抗生素 AGPM 合成的影响

Table 2 Effect of nitrogen source on the productivity of AGPM

Nitrogen source	Peptone	Corn steep liquor	Soybean meal	Urea	Ammonium sulfate
Concentrations (g/L)	6	30 ml	24	6	10
Relative activities (%)	100.0	58.6	82.0	30.2	31.4

Note: carbon source — glucose 25 g, others as in Section 2.2.

3.3 培养基组成正交实验设计及分析

根据以上实验结果,以淀粉酶一定程度降解的玉米淀粉和黄豆饼粉为主要碳氮源作为工业可采用原料,采用四因素三水平 $[L_9(3^4)]$ 正交实验设计进一步改进培养基组成,同时考虑通常对抗生素代谢影响较大的磷用量。每一实验条件重复 3 次,共 27 组实验,抑菌圈直径取 3 组实验平均值。实验设计及结果分析见表 3 和 4。

极差分析与方差分析结果表明,氮源对活性影响最为显著,各因素对活性的影响次序为:黄豆饼粉>玉米浆>淀粉>磷,其最优配置为 $A_2B_1C_1D_3$,即玉米淀粉 16 g/L,玉米浆 2 ml/L, K_2HPO_4 1.0 g/L;同时表明,较高的碳氮比对产物 AGPM 的生成有利。

培养基经实验改进后使单位发酵液活性提高到 1562.2 u/ml (抑菌圈直径 21.5 mm),较优化前葡萄糖蛋白胨培养基发酵活性 82.7 u/ml (抑菌圈直径 12 mm)提高了 18.9 倍。

表 3 正交实验设计^[3] [$L_9(3^4)$]

No.	Corn starch A (g/L)	Soybean meal B (g/L)	Corn steep liquor C (g/L)	K_2HPO_4 D (g/L)	Mean diameter of the inhibition halos (mm)	Mean activity (u/ml)
1	20	16	2	0	19.0	716.7
2	20	24	7	0.5	12.5	94.5
3	20	32	12	1.0	9.7	39.5
4	40	16	7	1.0	18.7	652.7
5	40	24	12	0	13.3	121.3
6	40	32	2	0.5	15.8	264.3
7	60	16	12	0.5	16.7	349.9
8	60	24	2	1.0	17.7	477.9
9	60	32	7	0	13.0	110.4
I/3	13.7	18.1	17.5	15.1	$\Sigma 136.4$	
II/3	15.9	14.5	14.7	15.0		
III/3	15.8	12.8	13.2	15.4		
R	2.2	5.3	4.3	0.4		

表 4 正交实验方差分析结果(以抑菌圈直径数据分析)

Table 4 Analysis of variance of orthogonal design of experiment

Source	Sum of squared deviation	Degrees of freedom	Mean variance	F test	Significance
A	9.63	2	4.815	9.717	<0.005
B	113.67	2	56.835	114.70	<0.001
C	67.59	2	33.795	68.20	<0.001
D	9.90	2	4.950	9.99	<0.001
Sum of error	9.91	20			

Note: $F_{0.005}=6.99$, $F_{0.001}=9.95$.

4 结论

实验考察了培养基组成对新型抗生素 AGPM 发酵的影响,采用正交实验设计方法改进了培养基的组成,单位发酵液的活性提高了 18.9 倍,较高的碳氮比对抗生素 AGPM 的合成有利,氮源对活性影响最显著。

参考文献:

- [1] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995. 110.
- [2] Lancini G, Parenti F, Gallo G G. Antibiotics: A Multidisciplinary Approach [M]. New York and London: Plenum Press, 1995. 21-35.
- [3] 朱伟勇, 段晓东, 唐明, 等. 最优设计在工业中的应用 [M]. 沈阳: 辽宁科技出版社, 1993. 72-80.

Improvement of the Fermentation Productivity of a New Antibiotic AGPM by Orthogonal Design Experiment

SHI Bing-xing, ZHAO Hong, LIU Xi-peng, YUAN Ying-jin, HU Zong-ding

(Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The effects of medium composition on the activity of a new antibiotic APGM was studied by orthogonal design experiment. It seems that nitrogen source presented the most significant effect on the production of AGPM and that higher ratio of carbon to nitrogen was beneficial. It was concluded that the fermentation activity was increased by 18.9 times to 1562.2 u/ml under the optimal conditions as the medium was composed of glucose 5 g/L, corn starch 40 g/L, soybean meal 16 g/L, corn steep liquor 2 ml, K_2HPO_4 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 0.5 g/L and amylase 0.05 g/L.

Key words: antibiotic; medium; *Streptomyces*; orthogonal design