

文章编号:1673-1689(2009)02-0240-03

金褐霉素高产菌株的选育及发酵条件的优化

魏杰^{1,2}, 孟宪军^{*2}, 姜秋实¹, 刘宏生¹

(1. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用单因素分析方法找到金褐链霉菌较适合的发酵培养基: 玉米淀粉和葡萄糖为主要碳源, 黄豆粉和酵母粉为混合氮源。较优的发酵条件为: 接种体积分数为 10%、pH 7.5、装液体积分数为 20%、种龄为 40 h、转速为 220 r/min、发酵时间为 66 h, 其产素单位达到 2 897.41 μg/mL。金褐链霉菌原始菌株经紫外诱变, 照射时间 30 s 的金褐霉素产量最高。

关键词: 金褐霉素; 发酵; 条件优化; 诱变

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Study on the Breeding of High Aureofuscin Producing Strains and Their Fermentation Conditions

WEI Jie^{1,2}, MENG Xian-jun^{*2}, JIANG Qiu-shi¹, LIU Hong-sheng¹

(1. Life and Sciences Academy, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. School of Food Science, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The nutritional and environmental conditions for *Aureofuscin* production were determined by single factor test. The optimum medium consisted of: glucose and corn amyllum, soya bean meal and yeast powder. The optimum fermentation conditions: inoculation volume 10%, pH 7.5, volume 20%, culture time for the seed was 40 h and the agitation speed was 220 r/min. The yield of *Aureofuscin* was achieved at 2 897.41 μg/mL. The *Aureofuscin* yields of the mutants which were treated with ultraviolet light were higher than that of the original strain.

Key words: *Aureofuscin*; fermentation; optimization; mutation

金褐霉素 (*Aureofuscin*) 是链霉菌新种——金褐链霉菌 (*Streptomyces aureofuscus*, n. sp) 产生的一种四烯大环内酯类抗真菌抗生素, 其化学结构与国外文献报道的纳他霉素 (*Natamycin*) 结构相似。早期研究表明, 金褐霉素对霉菌、多种酵母菌及丝状真菌有很强的抗菌作用, 但不抗细菌, 临床上用于治疗真菌性角膜炎, 其疗效优于两性霉素 B, 同时对一些真菌引起的皮肤病及霉菌性阴道炎等也有很好疗效^[1-2]。虽然对金褐霉素作了化学结构和初

步药效试验, 但一直未作深入研究和产业化开发。1997年, 我国正式批准使用纳他霉素作为安全食品防腐剂后, 金褐霉素才被重新重视起来, 由于未作高产菌种选育和分离提取工艺的深入研究, 发酵单位和提取收率都不高, 难以达到产业化开发的要求^[3-4]。因此, 金褐霉素的研究开发在食品防腐上显示出了极好的应用前景和市场潜力, 这对促进新药研制、食品防腐和发酵工业的发展都具有积极意义。作者采用紫外诱变方法得到金褐霉素高产菌

收稿日期: 2008-01-10

基金项目: 病毒学国家重点实验室开放资金资助 (编号 2007007)。

作者简介: 魏杰 (1977-), 女, 辽宁抚顺人, 微生物学博士研究生, 讲师。Email: weij41177@sina.com

* 通讯作者: 孟宪军 (1960-), 男, 辽宁沈阳人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事果蔬加工方面的研究。

Email: mengxjsy@126.com

株,并对其发酵工艺进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

金褐链霉菌(*Streptomyces aureofuscus*, n. sp)由沈阳农业大学食品学院实验室保存。

黑根霉(*Rhizopus nigricans*)由辽宁大学生命科学院微生物实验室提供。

1.2 培养基

种子培养基(组分 g/dL):葡萄糖 2,玉米淀粉 1.5,黄豆粉 1,蛋白胨 0.3,玉米浆 1,酵母粉 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, NaCl 0.4, $CaCO_3$ 0.6; pH 自然。

发酵培养基(组分 g/dL):葡萄糖 4,玉米淀粉 2,蛋白胨 0.3,黄豆粉 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $CaCO_3$ 0.6。

指示菌培养基(组分 g/L):蛋白胨 10、葡萄糖 40、琼脂 10;灭菌前调 pH 至 6.5。

1.3 摇瓶发酵实验

将斜面活化好的菌种用挖块法接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,摇床培养,29 °C 于 220 r/min 培养 40 h,使菌体处于迅速生长期。然后以体积分数 10% 的接种量接种种子液 50 mL 到 250 mL 的三角瓶中,29 °C、220 r/min 摇床发酵 72 h。

1.4 紫外诱变

1.4.1 紫外诱变程序 出发菌株→斜面活化→单孢子悬浮液的制备→紫外线诱变→单菌落分离→稳定性复筛

1.4.2 单细胞悬浮液的制备 用无菌水洗下斜面培养的孢子于三角瓶中,用玻璃珠充分振荡至孢子均匀分散,制成 10^8 cfu/mL 的单细胞悬浮液。取 10 mL 孢子悬液(浓度 10^8 /mL)于培养皿中,在紫外灯(15 W,照射距离 30 cm)下分别照射一定时间进行诱变处理,适当稀释后涂布于培养基平板上,29 °C 培养 6 d。

1.4.3 紫外线致死曲线的制作 取 10^8 cfu/mL 单细胞悬浮液 10 mL,置于 $\Phi 90$ 的培养皿中,在磁力搅拌下,用紫外线灯(15 W,照射距离 30 cm)分别照射 10、20、30、40、50、60、70、80 s。取不同照射剂量处理的菌液各 0.1 mL,适当稀释后分别涂皿,29 °C 培养 6 d,计数活菌,然后以照射时间为横坐标,存活率为纵坐标绘制曲线。

1.5 筛选

取经过紫外线诱变的单细胞悬浮液涂布于培养基平板上,分别接种于发酵培养基,220 r/min、29 °C 发酵 72 h,检测金褐霉素产量,由产量确定正突

变高产株。

1.6 金褐霉素生物检测标准曲线的制作

精密称取金褐霉素标准品 25 mg,用少量二甲基甲酰胺(DMF)溶解,转移入容量瓶中,然后加 70% 正丙醇定容,配成质量浓度为 1 000 μ g/mL 金褐霉素标准母液,再用 pH 6.0 磷酸缓冲液稀释成质量浓度分别为 20、30、40、50、60、70、80 μ g/mL 的溶液。测定抑菌圈,以抑菌圈直径作纵坐标,金褐霉素质量浓度的对数值作横坐标作图。

1.7 金褐霉素含量的测定

采用高效液相色谱法(HPLC)。

2 结果与分析

2.1 金褐霉素生物检测的标准曲线

以黑根霉作为指示菌。按照方法 1.6 制作金褐霉素生物检测标准曲线,由抑菌实验中抑菌圈直径确定金褐霉素质量浓度,见图 1。

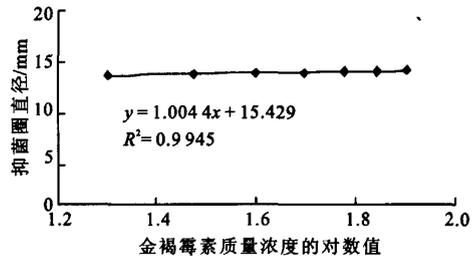


图1 金褐霉素生物检测的标准曲线

Fig. 1 Operating curve of Aureofuscin by determination of bioassay

根据金褐霉素生物检测标准曲线,可以通过抑菌实验来比较发酵液中金褐霉素产量的高低,为后续发酵实验做准备。

2.2 紫外线剂量的确定

经验表明,高诱变剂量正突变率较高,同时负突变率也高。将诱变处理的单细胞涂布于培养基平板上,分别接种于发酵培养基,220 r/min、29 °C 发酵 72 h,检测金褐霉素产量,采用 HPLC 快速测定方法确定正突变高产株。从表 1 可以看出,以原始菌株为对照,经紫外线诱变后,不同照射剂量处理的菌液金褐霉素产量不同,照射 30 s 的产量最高,为 2 039 μ g/mL。

2.3 发酵培养基的优化

2.3.1 不同碳源对金褐霉素发酵的影响 以原发酵培养基为基础,固定氮源,分别以葡萄糖、玉米淀粉、玉米浆、蔗糖、可溶性淀粉、甘油等作为碳源,质量浓度均为 4 g/dL。它们对菌株的发酵效价的影响结果见图 2。从图 2 可以看出,单一碳源玉米淀

粉和可溶性淀粉对金褐霉素生产最有利,其次是甘油、玉米浆、葡萄糖和蔗糖。葡萄糖是一种快速利用的碳源,是菌体生长良好的碳源和能源,作为初始碳源,可以采用葡萄糖,而从产素和经济上考虑可将玉米淀粉作为后期碳源。

表1 不同照射剂量的金褐霉素产量表

Tab.1 Aureofuscin yield of different exposure dose

照射时间/s	金褐霉素质量浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	照射时间/s	金褐霉素质量浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0	537	50	1 850
10	1 270	60	1 216
20	1 830	70	830
30	2 039	80	—
40	1 903		

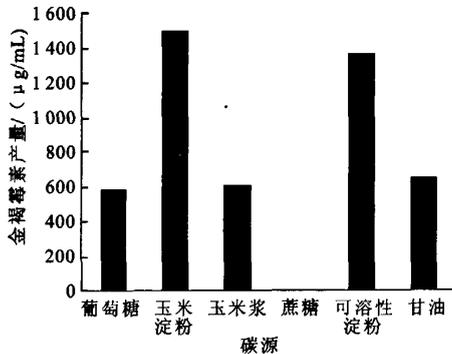


图2 不同碳源对发酵的影响

Fig.2 Effect of carbon source on fermentation

2.3.2 不同氮源对金褐霉素发酵的影响 以原发酵培养基为基础,固定碳源,分别以黄豆粉、酵母粉、蛋白胨、牛肉膏等作为氮源,质量浓度为2 g/dL。它们对菌株的发酵效价影响见图3。从图3可知,最利于金褐霉素生产的单一氮源是黄豆粉,其次是蛋白胨、酵母粉,然后是牛肉膏。实验中作者组合了几种混合氮源,从产素和经济上考虑,选择黄豆粉和酵母粉作金褐霉素发酵时的混合氮源。

2.4 发酵条件的优化

接种量、pH值、溶氧和种龄单因素对金褐霉素产量的影响见表2。从表2可以看出:从体积分数

2%接种量开始,随着接种量的增加,金褐霉素产量随之增加,当接种体积分数达到15%时,金褐霉素的产量最大。从经济上考虑,作者选择体积分数10%接种量。当pH值为7.5时,金褐霉素的产量最高。装液量为20%,即250 mL三角瓶装50 mL发酵液时,金褐霉素的产量最大。当种龄为40 h时,金褐霉素产量最高。

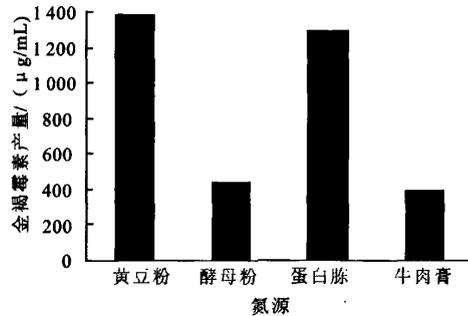


图3 不同氮源对发酵的影响

Fig.3 Effect of nitrogen source on fermentation

表2 不同因素对发酵的影响

Tab.2 Effect of different factor on fermentation

接种体积分数/%	产量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	pH值	产量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	装液量/%	产量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	种龄/h	产量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
2	1939	7.0	2379	20	2219	24	1603
5	2102	7.5	2890	40	2603	30	2009
10	2753	8.0	2796	50	2854	40	2896
15	2897	8.5	2501	60	2390	50	1701
20	2033	9.0	2193	80	2207	60	1596

3 结 语

作者通过研究紫外诱变筛选出突变高产金褐霉素菌株,照射时间为30 s。较适合的发酵培养基中,以玉米淀粉和葡萄糖为主要碳源,选择黄豆粉和酵母粉作金褐霉素发酵时的混合氮源。较优的发酵条件:接种体积分数10%、pH值为7.5、装液量为20%(即250 mL三角瓶装50 mL发酵液)、种龄为40 h时,金褐霉素产量最高。

参考文献(References):

[1] 上海药物研究所金褐霉素研究小组. 一种新的抗真菌的抗生素——金褐霉素[J]. 微生物学报, 1975, 15(3): 180-187. Institute of Pharmaceutical Research in Shang Hai. An original antimycotic antibiotic[J]. *Microbiol Journal*, 1975, 15(3): 180-187. (in Chinese)

[2] Basilio J C, Debasilio M Z, Chlericattic, et al. Characterization and contron of thread mould in cheese[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32(6): 419-423.

[3] 王富金, 武济民. 金褐霉素微生物检定法[J]. 抗生素, 1980, 5(5): 25-26. WANG Fu-jin, WU Ji-min. Aureofuscin biological standardization[J]. *Antibiotic*, 1980, 5(5): 25-26. (in Chinese)

[4] Basilio J C, Debasilio M Z, Chlericatti C, et al. Characterization and contron of thread mould in cheese[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32 (6): 419-423.

(责任编辑:李春丽)