

拮抗链霉菌 No. 24 菌株发酵条件优化研究^{*}

龙建友, 吴文君

(西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对1株拮抗链霉菌 No. 24 菌株的发酵条件进行了初步研究, 确定了其最佳培养基组成及培养条件。单因素发酵试验和正交试验结果表明, 碳源以 30 g/L 葡萄糖和 30 g/L 小米最佳, 有机氮源以 10 g/L 黄豆饼粉最好, 无机氮源以 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 最好, 最适发酵时间为 96 h, 最适发酵培养温度为 32℃, 最适初始 pH 值为 7.2~7.4, 最佳振荡频率为 210 r/min, 装液量为 40 mL/250 mL。

[关键词] No. 24 菌株; 发酵条件; 链霉菌

[中图分类号] Q935; S482.2⁺8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)04-0052-05

近年来, 如何提高抗生素发酵产量已成为许多专家研究的热点^[1]。目前, 许多抗生素通过培养基和发酵条件的优化其产量大大提高, 如中生菌素^[2]通过发酵条件优化其产量提高到 5 000 $\mu\text{g/mL}$; 金核霉素^[3]通过培养基和发酵条件的优化其产量提高了 30%。No. 24 菌株能产生一种防治枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏杆菌等的水溶性抗生素, 其发酵液对许多细菌具有很好的防治效果。为了使 No. 24 菌株获得最佳产抗条件, 提高其抗生素产量, 本研究对其培养基配方的选择及发酵条件的优化进行了研究, 以期为进一步中试放大及大规模生产提供依据^[4, 5]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 No. 24 菌株, 为从秦岭山区不同生态环境土样中, 经过大量筛选获得的拮抗菌株。

1.1.2 培养基原料 小米: 市售, 淀粉含量 78.35 g/kg。黄豆饼粉: 市售。葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、 CaCO_3 等。

1.2 方法

1.2.1 斜面培养 将 No. 24 菌株的孢子接种于高氏合成一号培养基斜面上, 28℃ 培养 7 d, 待生长成熟后, 4℃ 保存备用。

1.2.2 种子培养 取适量孢子接种于可溶性淀粉、葡萄糖、蛋白胨等组成的种子培养基, 使其孢子浓度

为 10^6 mL^{-1} , 32℃、210 r/min 振荡培养 24 h。

1.2.3 摇瓶发酵 将培养好的种子培养液按体积分数 10% 接入发酵培养基中, 32℃、210 r/min 条件下振荡培养 4 d。

1.2.4 生物活性测定 以枯草芽孢杆菌 (*B. acillus subtilis*) 为供试菌, 采用管碟法测定抑菌圈直径, 每处理重复 4 次。

1.2.5 矿质元素的筛选 在培养液中加入不同质量浓度的矿质元素 KH_2PO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , CaCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 每种矿质元素设 5 个质量浓度梯度, 每梯度 4 个重复。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基配方的选择

2.1.1 碳源的选择 配置含有蛋白胨、酵母膏以及各种矿质元素的培养基, 加入不同的碳源, 接种 No. 24 菌株, 对其摇床培养后, 进行抗生素效价的生物测定, 结果见表 1。从表 1 可以看出, 以葡萄糖和小米作为碳源, 可使抑菌圈平均直径达到 2.5 cm, 因此本研究选用 30 g/L 葡萄糖和 30 g/L 小米作为碳源。

2.1.2 氮源的选择 以 30 g/L 葡萄糖和 30 g/L 小米为碳源, 加入少量的矿质元素, 然后加入不同的有机氮源 (10 g/L), 无机氮源设 5 个质量浓度梯度。摇瓶发酵后进行抗生素效价的生物测定, 结果见表 2。

* [收稿日期] 2004-06-09

[基金项目] 国家 863 高技术计划项目 (2002AA 245121)

[作者简介] 龙建友 (1977-), 男, 湖南衡阳人, 在读博士, 主要从事农药毒理学和农用抗生素研究。

[通讯作者] 吴文君 (1945-), 男, 四川洪雅人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药化学和农药毒理学研究。

表 1 不同碳源对 No. 24 菌株产抗的影响

Table 1 Different carbon sources on production of antibiotics of No. 24 strain

编号 Number	碳源 Carbon	平均抑菌圈直径/cm Average diameter of inhibition
1	30 g/L 葡萄糖 30 g/L Glucose	2.4
	60 g/L 葡萄糖 60 g/L Glucose	2.3
	90 g/L 葡萄糖 90 g/L Glucose	1.9
2	30 g/L 葡萄糖+ 10 g/L 蔗糖 30 g/L Glucose+ 10 g/L sucrose	2.2
	30 g/L 葡萄糖+ 20 g/L 蔗糖 30 g/L Glucose+ 20 g/L sucrose	2.1
	30 g/L 葡萄糖+ 30 g/L 蔗糖 30 g/L Glucose+ 30 g/L sucrose	1.8
3	30 g/L 葡萄糖+ 10 g/L 乳糖 30 g/L Glucose+ 10 g/L lactose	2.0
	30 g/L 葡萄糖+ 20 g/L 乳糖 30 g/L Glucose+ 20 g/L lactose	1.8
	30 g/L 葡萄糖+ 30 g/L 乳糖 30 g/L Glucose+ 30 g/L lactose	1.5
4	30 g/L 葡萄糖+ 10 g/L 小米 30 g/L Glucose+ 10 g/L millet	2.4
	30 g/L 葡萄糖+ 20 g/L 小米 30 g/L Glucose+ 20 g/L millet	2.5
	30 g/L 葡萄糖+ 30 g/L 小米 30 g/L Glucose+ 30 g/L millet	2.7

注: 抑菌圈直径——牛津杯外径。
Note: Diameter of inhibition——Oxford cup outside diameter.

表 2 不同氮源对 No. 24 菌株产抗的影响

Table 2 Different nitrogen sources on production of antibiotics of No. 24 strain

有机氮源 Organic nitrogen source		无机氮源 Inorganic nitrogen source	
氮源(10 g/L) N nitrogen source	平均抑菌圈直径/cm Average diameter of inhibition	硫酸铵/(g·L ⁻¹) Concentration of (NH ₄) ₂ SO ₄	平均抑菌圈直径/cm Average diameter of inhibition
对照(不加氮源) Contrast	1.1	0	1.7
牛肉膏 Beef extract	1.3	1	1.8
蛋白胨 Peptone	1.7	2	2.1
酵母膏 Yeast extract	2.3	3	1.8
黄豆饼粉 Soybean cake powder	2.4	4	1.3
小米 Corn steep liquor	1.9	5	0.9

从表 2 可以看出, 牛肉膏、蛋白胨、酵母膏及黄豆饼粉都可以作为有机氮源。其中黄豆饼粉对 No. 24 菌株的产抗影响最大。这可能与黄豆饼粉能够为 No. 24 菌株的生长提供必要的营养元素有关。生物活性测定结果表明, 10 g/L 黄豆饼粉对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径最大, 这说明 No. 24 菌株在 10 g/L 黄豆饼粉培养液中产生抗生素最多, 故其产抗条件最为有利。因此, 选用 10 g/L 黄豆饼粉作为有机氮源。从表 2 还可以看出, 以 2 g/L (NH₄)₂SO₄ 作为无机氮源的效果最好。

2.1.3 矿质元素对 No. 24 菌株产抗的影响 在 30 g/L 葡萄糖、30 g/L 小米、10 g/L 黄豆饼粉、2 g/L

(NH₄)₂SO₄ 组成的发酵培养基中加入不同的矿质元素, 进行发酵培养和效价的生物测定。试验中观察发现, KH₂PO₄、MgSO₄、FeSO₄ 对 No. 24 菌株的产抗无明显影响, 但 0.4 g/L CaCO₃ 对 No. 24 菌株的产抗有促进作用(表 3)。

2.1.4 酵母膏对 No. 24 菌株产抗的影响 由于酵母膏富含蛋白质、生物素、维生素以及微量元素, 能够提供丰富的生长元素及有机氮养分, 为此进行了在培养基中添加不同质量浓度酵母膏的试验, 结果见表 3。试验表明: 酵母膏以 2 g/L 的添加量效果最好。

表 3 Ca²⁺ 和酵母膏对 No. 24 菌株产抗的影响

Table 3 Effect of Ca²⁺ and yeast extract on production of antibiotics of No. 24 strain

CaCO ₃ /(g·L ⁻¹) Concentration of CaCO ₃	平均抑菌圈直径/cm Average diameter of inhibition	酵母膏/(g·L ⁻¹) Concentration of yeast extract	平均抑菌圈直径/cm Average diameter of inhibition
0	2.2	1	2.4
0.2	2.4	2	2.5
0.4	2.7	3	2.4
0.6	2.5	4	2.2
0.8	2.1	5	2.1

2 2 No. 24 菌株发酵条件的优化

2 2 1 初始 pH 的影响 配制 30 g/L 葡萄糖 30 g/L 小米、10 g/L 黄豆饼粉、2 g/L (NH₄)₂SO₄ 的发酵培养基,用 HCl 和 NaOH 调节不同的起始 pH 值,接种和摇瓶发酵后,进行效价的生物测定,结果见图 1。从图 1 可以看出,初始 pH 为 7~8 时,对 No. 24 菌株的产抗较为有利,当 pH 值小于 6 或大于 9 时,都不利于 No. 24 菌株产生抗生素,故本试验初始 pH 值为 7.2~7.4。

2 2 2 种龄和接种量的影响 斜面孢子接种于由

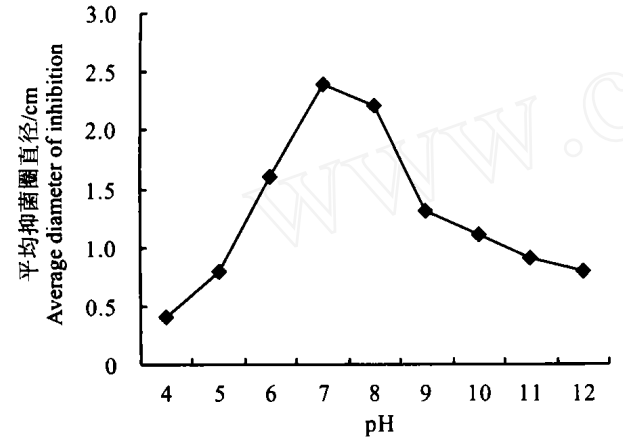


图 1 初始 pH 对 No. 24 菌株产抗的影响

Fig 1 Effect of initial pH on production of antibiotics of No. 24 strain

表 4 不同接种量对 No. 24 菌株产抗的影响

Table 4 Effect of inoculation doses on production of antibiotics of No. 24 strain

接种量/% Inoculation dose	平均抑菌圈直径/cm Average diameter of inhibition
1	0.9
2	1.1
5	1.5
7.5	2.2
10	2.7
15	2.3
20	1.9

葡萄糖、蛋白胨、可溶性淀粉组成的种子培养基中,培养不同时间后,以体积分数 10% 接种量接入发酵瓶,培养 96 h 后进行效价的生物测定,结果见图 2。由图 2 可知,种龄的最佳培养时间为 24 h,过短或过长都不利于 No. 24 菌株产生抗生素,所以本试验选择种龄时间为 24 h。对培养 24 h 的种子培养液按不同接种量进行接种,摇瓶发酵 96 h,再进行效价的生物测定,观察不同接种量对 No. 24 菌株产抗的影响,结果见表 4。由表 4 可见,接种量以 10% 为最佳,故本试验取 10%。

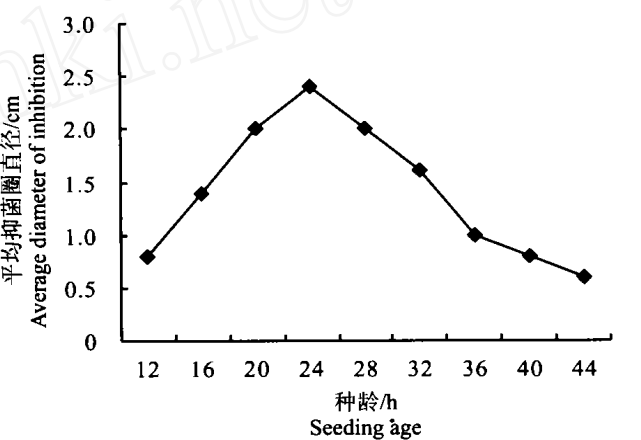


图 2 种龄对 No. 24 菌株产抗的影响

Fig 2 Effect of seeding age on production of antibiotics of No. 24 strain

2 2 3 发酵条件的正交试验 选取发酵温度、装液量、发酵时间为主要发酵条件,设计三因素三水平正交试验,见表 5。配制培养基,按不同发酵条件发酵培养后,进行效价的生物测定,结果见表 6。从表 6 可以看出,发酵温度为 32℃,发酵时间为 96 h 对 No. 24 菌株产抗有利。随着装液量的减少(通气量增加),菌体生长旺盛,抗生素产生也多。以 250 mL 三角瓶中培养基量 40 mL 为最佳,产抗效果最好。

对表 6 的结果进行正交试验的方差分析和极差分析,结果表明:装液量对产抗的影响显著。

表 5 发酵条件的正交试验设计

Table 5 Elements and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	发酵温度(A)/ Femental temperature	发酵时间(B)/h Femental time	装液量(C)/mL Aerobic amount
1	28	72	40
2	30	96	80
3	32	120	120

注:装液量用 250 mL 三角瓶装量多少表示。

Note: The aerobic amount is showed by loading amount in 250 mL erienme per flask.

表 6 发酵条件正交试验结果

Table 6 Results of orthogonal experiment

试验号 Experiment	发酵温度(A) / Femental temperature	发酵时间(B) /h Femental time	装液量(C) /mL Aerobic amount	平均抑菌圈直径/cm Average diameter of inhibition	误差 Error
1	(1) 28	(1) 120	(1) 40	1.9	
2	(1) 28	(2) 96	(2) 80	2.2	
3	(1) 28	(3) 72	(3) 120	1.8	
4	(2) 30	(1) 120	(2) 80	2.2	
5	(2) 30	(2) 96	(3) 120	2.0	
6	(2) 30	(3) 72	(1) 40	1.6	
7	(3) 32	(1) 120	(3) 120	2.4	
8	(3) 32	(2) 96	(1) 40	2.7	
9	(3) 32	(3) 72	(2) 80	2.2	
k ₁	5.9	6.5	6.2		1.2
k ₂	5.8	6.9	6.6		0.9
k ₃	7.3	5.6	6.2		1.9
k ₁ /3	1.97	2.17	2.07		0.4
k ₂ /3	1.93	2.3	2.2		0.3
k ₃ /3	2.43	1.87	2.07		0.63

注: 括号内为列号。

Note: Line numbers are within the brackets

3 讨 论

本研究获得了较为适合于工业生产的摇瓶培养基配方: 30 g/L 葡萄糖, 30 g/L 小米, 10 g/L 黄豆饼粉, 2 g/L (NH₄)₂SO₄。同时优化了发酵条件: 32 条件下, 采用 10% 接种量, 发酵初始 pH 值为 7.2~7.4, 在 40 mL/250 mL 装液量情况下, 210 r/min 振荡培养, 经过 96 h 的发酵, 抑菌圈直径可达 2.7 cm。从正交试验结果分析可以看出, 如果减少装液量, 即增加通气量, 使摇床转速达到 300 r/min 以上, 抗生素的产量可望提高。

从筛选的发酵培养基可以看出, 迅速利用的碳源, 如葡萄糖虽然对产抗菌株的生长是很好的碳源和能量源, 但其质量浓度过高对次级代谢产物的形成表现出显著的抑制作用, 因此, 对发酵培养基中的

碳源, 选择了 30 g/L 葡萄糖和 30 g/L 小米, 这样既能满足菌体迅速生长, 同时又能保证次级代谢产物的大量积累^[6]。同样, 氮对抗生素的生物合成也有调节作用。迅速利用的氮源, 特别是氨, 对含氮底物分解酶的合成有显著抑制作用。在发酵培养基中, 铵离子浓度增高则影响抗生素的产量, 因此在培养基中加入铵和黄豆饼粉作氮源。黄豆饼粉一般利用较慢, 对抗生素生产有利, 也符合工业生产抗生素的要求。所以, 在获得的发酵培养基中加入这两种物质, 既有快速利用的碳源、氮源供菌体生长消耗, 又有缓慢利用的碳源和氮源供产抗菌株积累代谢产物时期的需要^[7,8]。另外, 为菌株提供生长的矿质元素及微量元素, 对提高抗生素产量也是必不可少的, 有时甚至对抗生素产量影响较大, 因此在筛选发酵培养基时, 不应忽略^[9]。

[参考文献]

[1] 沈寅初. 农用抗生素研究开发新进展[J]. 国外医药——抗生素分册, 1998, 19(2): 155- 161.

[2] 朱昌雄, 蒋细良, 孙东园, 等. 新农用抗生素——中生菌素[J]. 精细与专用化学品, 2002, (16): 14- 17.

[3] 吴 霞, 徐文明, 王 磊. 应用等离子注入技术进行金核霉素菌种选育的研究[J]. 上海化工, 2002, 21(3): 19- 21.

[4] 夏湛恩, 黄文彩, 桑金隆, 等. 633 菌剂发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 1998, 38(3): 237- 239.

[5] 何培青, 田 黎, 李光友. 海洋细菌 B-9987 发酵条件的优化及胞外抑菌物质的性质[J]. 中国海洋药物, 2000, 19(2): 8- 12.

[6] 孟庆芳, 张 汀, 杨文香, 等. 拮抗链霉菌 S23 发酵条件研究[J]. 中国生物防治, 2002, 18(2): 79- 82.

[7] 阚振荣, 张元亮, 李 斌, 等. ALDC 产生菌 BD-5 菌株的发酵条件初探[J]. 河北大学学报, 1997, 17(2): 63- 67.

[8] 王东昌. 链霉菌 S-10 菌株发酵条件的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(1): 35- 39.

[9] 石炳兴, 赵 红, 刘春朋, 等. 抗生素 AGPM 摇瓶发酵条件的正交试验[J]. 过程工程学报, 2001, 1(4): 442- 444.

Studies on the optimization of fermentation conditions of antagonistic streptomycetes No. 24

LONG Jian-you, WU Wen-jun

(Institute of Pesticide, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The fermentation conditions of 1 No. 24 strain of antagonistic streptomycetes were studied. The composition of fermentation medium and cultural conditions were confirmed. The single factor and orthogonal experiment indicated that the optimal carbon source was 30 g/L glucose, and millet 30 g/L; the optimal nitrogen source was 10 g/L Soybean cake powder and 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; The optimal fermentation time was 96 h; The optimal cultivation temperature was 32 °C with optimal pH 7.2-7.4. The most suitable shake was 210 r/min, and the volume of cultivated liquid in 250 mL conic bottle was 40 mL.

Key words: No. 24 strain; fermentation condition; streptomycetes

(上接第 51 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)04-0047-EA

Effect of different irrigation maximums on growth dynamics, yield and quality of greenhouse cucumber during initial bloom stage

LI Qing-ming^{1,2}, ZOU Zhi-rong¹, GUO Xiao-dong^{1,2}, CAI Huan-jie³, ZHANG Xi-ping³

(1 College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Vegetable Research, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China;

3 Key Laboratory for Agricultural Soil and Water Engineering in Arid Area of Ministry of Education,
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Growth dynamics, yield, fruit quality and water use efficiency of greenhouse cucumber were studied under the different soil irrigation maximums in different seasons during initial bloom stage. The results showed: the treatment with irrigation maximum of 90% field water capacity is more reasonable, and under this treatment, stems in spring and autumn was thicker by 0.03 cm and 0.05 cm; first fruit positions got lower by 1.39 nodes and 0.69 nodes; contents of reductive sugar, soluble sugar, Vitamin C, soluble protein increased by 11.8 g/kg, 13.2 g/kg, 10.0 mg/kg, 0.13 g/kg and 10.3 g/kg, 4.5 g/kg, 24.9 mg/kg, 0.13 g/kg respectively; prophase yield increased by 9.09% and 7.77%; water use efficiency increased by 26.14% and 22.72% respectively in autumn and spring than the treatment with irrigation maximum of 100% field water capacity. So the treatment with 90% field water capacity is the more suitable soil irrigation maximum index.

Key words: cucumber; initial bloom stage; irrigation maximum; growth dynamics; yield; quality