

生防菌青霉 TS67 发酵条件优化研究

李海峰, 王素英*

(天津商学院, 天津 300134)

摘要: 研究了发酵条件及培养基组成对新型农用抗生素海洋真菌 TS67 发酵的影响, 改进后的培养条件为: 初始 pH 8.0, 接种量 8%, 在 180 r/min 下 28℃振荡培养 96 h, 优化培养基组成为: 葡萄糖 5 g/L, 甘油 5 g/L, 蛋白胨 3 g/L, 酵母膏 1 g/L, 单位发酵液的活性提高了 6.6 倍; 同时表明适量的甘油对活性物质的合成有利。

关键词: 生防菌; 海洋真菌; 培养基; 优化; 培养条件

中图分类号: S476 文献标识码: 文章编号: 1004-3268(2007)06-0070-04

Research of Culture Medium and Cultural Conditions for Antagonistic Marine Mildew TS67

LI Hai feng, WANG Su ying*

(Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: The effects of culture medium and cultural conditions on the fermentation of antagonistic marine mildew TS67, a new agricultural antibiotic fungus, were studied. The result showed that nitrogen source presented the most significant effect on the production, and glycerol addition was beneficial. It was concluded that the fermentation activity was increased by 6.6 times to 712u/mL under the optimal conditions as the medium was composed of glucose 5 g/L, glycerol 5 g/L, peptone 3 g/L, yeast extract 1.0 g/L, and the optimal cultural conditions was the initial pH value of 8.0, inoculation quantity of 8%, cultural temperature of 28℃, and fermentation period of 96 hours.

Key words: Bio-control microbes; Marine mildew; Medium; Optimization; Culture condition

中国加入 WTO 后, 面对国际农产品和食品工业品市场上众多的“绿色壁垒”, 我国出口的农产品因农药残留问题而遭受了巨额损失。为了应对生态环境安全和加入 WTO 双重挑战, 调整我国农药产品结构, 限制高毒化学农药的生产和使用, 加大研究和推广使用无公害生物农药的力度, 提高农产品质量的安全水平, 已成为不可逆转的趋势。生物农药是自然界本身存在的微生物或其产物, 对人类和环境的潜在危害比有机农药小, 且生物农药选择性高, 不易使害虫产生抗性, 在环境中极少或无残留^[1, 2]。

海洋环境独特, 其高压、高盐、低营养、低温的特

点, 被认为是生命活动的极端环境, 这种环境造就了微生物种类及代谢途径特异性, 可产生完全不同于陆地微生物的新颖生物活性物质^[3]。青霉菌 TS67 菌株是天津商学院微生物实验室从渤海近海海域水样中分离获得的^[4], 研究发现, 该菌株的次生代谢产物对玉蜀黍平脐囊孢菌 (*Bipolaris maydis*)、大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 等多种植物病原真菌具有很高拮抗活性, 并可以导致玉蜀黍平脐囊孢菌菌丝体膨胀, 并伴随有溶菌作用, 其次生代谢产物具有替代相应化学农药的潜力。对于今后从源头控制食品安全具有重要意义。本研究通过发酵条件及液体发酵培养基优化以提高其发酵液活性成分含量,

收稿日期: 2007-03-10

基金项目: 天津市高校科技发展重点研究项目资助 (2004ZD20)

作者简介: 李海峰 (1981-), 男, 河南洛阳人, 在读硕士研究生, 主要从事微生物资源开发研究。E-mail: lhfkek@163.com

通讯作者: 王素英 (1964-), 山西孟县人, 教授, 博士, 主要从事微生物教学与科研工作。

为工业化生产和大面积推广应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌种

青霉 TS67 由天津商学院微生物实验室从渤海海域海水中分离得到; 玉蜀黍平脐孺孢菌 (*Bipolaris maydis*) 由中国农科院惠赠。

1.2 培养基

人工海水配方: NaCl 4.477 g, Na₂SO₄ 3.917 g, KCl 0.664 g, KBr 0.096 g, SrCl₂ 0.024 g, MgCl₂ · 6H₂O 4.981 g, CaCl₂ · H₂O 1.102 g, NaHCO₃ 0.1920 g, H₃BO₃ 0.026 g, NaF 0.0039 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.5。

PDA 固体培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

海洋真菌种子培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 1 g, 人工海水 1000 mL, 琼脂 20 g, pH 自然 121℃ 灭菌 15 min。

海洋真菌斜面传代培养基: 海洋真菌培养基中加入 2% 琼脂。

海洋真菌发酵培养基: 人工海水 1000 mL, 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 1 g, pH 自然, 121℃ 灭菌 15 min。

1.3 培养方法

液体种子培养: 将 TS67 斜面菌种 28℃ 活化 3 d 后接种 1 环于海洋真菌种子培养基, 装液量 50 mL (250 mL 三角瓶), 28℃ 180 r/min 摇瓶培养 48 h。

发酵培养: 将上述培养种子液按 5% 的接种量接种于发酵培养基, 装液量 50 mL (250 mL 三角瓶), 28℃, 180 r/min 摇瓶发酵 120 h。

1.4 发酵条件优化

1.4.1 初始 pH 值选择 选取初始 pH 分别为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 摇床温度 28℃, 摇床转速 180 r/min, 培养 96 h 分别测定发酵液活性。

1.4.2 接种量选择 培养基中分别以 4%, 6%, 8%, 10% 和 12% 的接种量接入种子液, 在 28℃, 180 r/min 条件下发酵培养 96 h, 分别测定发酵液活性。

1.4.3 培养温度选择 分别以 20℃, 25℃, 28℃, 32℃, 37℃, 40℃ 6 个温度作为摇床温度。初始 pH 7.0, 摇床转速 180 r/min, 培养 96 h 分别测定发酵液活性。

1.4.4 培养时间选择 初始 pH 7.0, 摇床温度 28℃, 摇床转速 180 r/min, 分别培养 72 h, 84 h,

96 h, 108 h, 120 h, 132 h 分别测定发酵液活性。

1.5 培养基成分优化

1.5.1 碳源选择 以原始培养基中葡萄糖的碳含量计算碳浓度, 将海洋真菌培养基中的碳源分别用葡萄糖、麦芽糖、可溶性淀粉和甘油替换, 在 28℃, 180 r/min 条件下发酵培养 96 d, 分别测定发酵液活性。

1.5.2 氮源选择 以原始培养基中蛋白胨的氮含量计算氮浓度, 将海洋真菌培养基中的氮源分别用蛋白胨、尿素、硫酸铵和豆饼替换, 在 28℃, 180 r/min 条件下发酵培养 96 h, 分别测定发酵液活性。

1.6 活性测定方法(杯碟法^[3])

1.6.1 发酵液的预处理 将发酵液 5000 r/min 离心 15 min 除菌, 用 5% NaOH 溶液调节至 pH 为 10 左右, 同样条件下离心除去生成的杂质沉淀, 回调发酵液 pH 值至 5 待用。

1.6.2 杯碟法检测抗菌活性 将 28℃ 培养 60 h 的玉蜀黍平脐孺孢菌(孢子浓度为 1×10^6 cfu/mL) 0.3 mL 菌悬液均匀涂布于 PDA 平板上, 在平板四周均匀放置牛津杯, 置于 4℃ 冰箱中 10~15 min, 以使牛津杯沉降。向牛津杯中加一定量发酵液, 同时以灭菌的海洋真菌发酵培养基做空白对照。28℃ 培养 36 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。

发酵液活性单位定义: 在上述测定条件下, 50 μL 发酵液抑菌透明圈直径为 7.8 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 $U(U/mL) = 2.499e^{0.2666D}$ ($R^2 = 0.9954$, $7.8 < D < 25$), D 为抑菌透明圈直径(mm)。

2 结果与分析

2.1 发酵条件优化

2.1.1 初始 pH 值对发酵液活性的影响 试验结果(图 1)表明。初始 pH 值在 7 以下时产物活性随 pH 值升高而升高, pH 为 7 到 8 时活性较高并且相对稳定, 初始 pH 达到 9 后产物活性下降较大。培养基初始 pH 值对微生物生长和活性产物的产生具有非常明显的影响, 偏酸性环境不利于产物的积累, 这主要是由于该菌株筛选于渤海浅海海域, 对酸性环境比较敏感。

2.1.2 接种量对发酵液活性的影响 发酵液活性测定结果如(图 2)显示。接种量由 2% 增至 6% 时, 发酵液活性提高缓慢; 接种量在 8% 时, 发酵液活性迅速升高达到最高值, 此后随着接种量的增加活性略有下降, 其原因可能是过大的接种量使得在正常

的发酵时间下发酵液中菌体提前老化。

2.1.3 培养温度对发酵液活性的影响 结果(图3)显示,培养温度由 20℃开始,发酵液的活性随着温度的增加逐渐升高,增高的幅度较缓,到 28℃时达到最大,此后发酵液活性随着温度的提高迅速下降。其原因在于试验菌株筛选自海水,适应较低的温度环境,对温度变化比较敏感。

2.1.4 培养时间对发酵液活性的影响 结果(图4)显示,培养时间由 72 h 至 96 h,产物的活性随着时间的延长逐渐升高;培养时间至 96 h 发酵液活性达到最高;此后发酵液活性不随着培养时间的延长

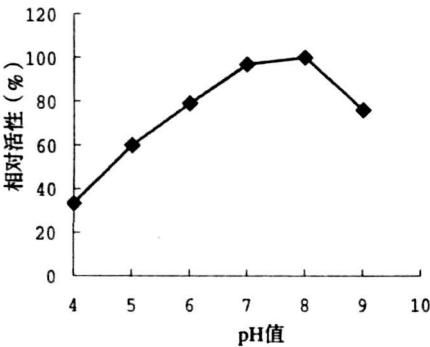


图 1 不同初始 pH 值条件下发酵液相对活性

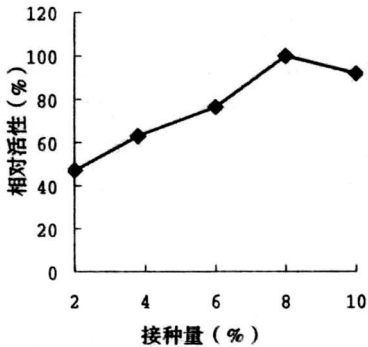


图 2 不同接种量下发酵液相对活性

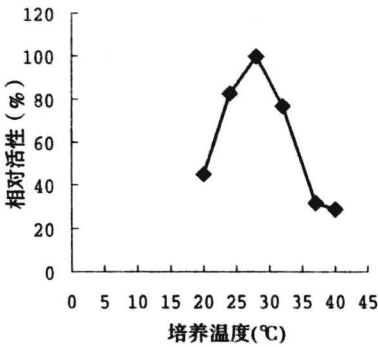


图 3 不同培养温度下发酵液相对活性

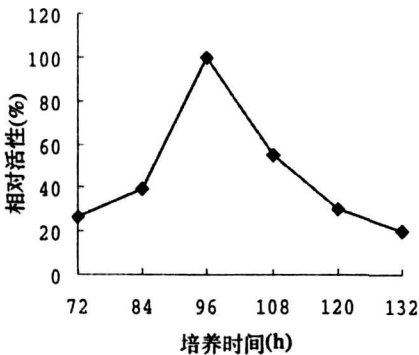


图 4 不同培养时间发酵液相对活性

而提高,而是迅速下降。其原因可能是在稳定后期由于环境中营养物质减少,发酵液中活性物质被菌体大量消耗。

2.2 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。本试验考察了葡萄糖、麦芽糖、甘油、和可溶性淀粉等碳源对发酵液活性的影响,结果见表 1,表 1 表明,葡萄糖与甘油均有利于产物的生成,葡萄糖虽然对产抗生素有刺激作用,但如果全部用做碳源则成本较高且浓度过高具有抑制作用,故选择葡萄糖和甘油共同作为碳源。

表 1 碳源对发酵液活性的影响

项目	葡萄糖	麦芽糖	甘油	可溶性淀粉
相对活性(%)	100	76.5	89.2	17.6

2.3 氮源对发酵活性的影响

尿素、硫酸铵、蛋白胨、黄豆饼粉等是常用的工业微生物发酵氮源,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,蛋白胨明显优于尿素、硫酸铵,这可能与 NH₄⁺ 在抗生素发酵中能抑制多种酶的活性有关。而氨基氮应该是更好的氮源,一方面在于氨基氮结构相对简单,容易利用,另一方面某些氨基氮有可能作为活性物质的前体物质。因此在实验室条件下蛋白胨应是最佳选择。

表 2 氮源对发酵液活性的影响

项目	蛋白胨	尿素	硫酸铵	豆饼
相对活性(%)	100	47.6	42.5	63.2

2.4 培养基组成正交试验设计 及分析

根据以上试验结果,采用四因素三水平[L₉ (3⁴)] 正交试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。每一试验条件 3 次重复,共 27 组试验,抑菌圈直径取 3 次重

复试验平均值。试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,碳源对活性影

响最为显著,各因素对活性的影响次序为:甘油>葡
萄糖>酵母膏>蛋白胨,其最优配置为 A₁B₂C₁D₃,

表 3 正交试验设计[L₉(³⁴)]

编号	葡萄糖 A(g/L)	酵母膏 B(g/L)	甘油 C(g/L)	蛋白胨 D(g/L)	抑菌圈平均直径 (mm)	活性均值 (U/mL)
1	5	0.5	5	1	19.0	396.0
2	10	0.5	10	2	12.5	70.0
3	15	0.5	15	3	9.7	33.2
4	10	1	5	3	18.7	365.5
5	15	1	10	1	13.3	86.6
6	5	1	15	2	15.8	168.7
7	15	1.5	5	2	16.7	214.5
8	5	1.5	10	3	17.7	280.0
9	10	1.5	15	1	13.0	80.0
I/3	17.5	13.7	18.1	15.1		
II/3	14.7	15.9	14.5	15.0		
III/3	13.2	15.8	12.8	15.4		
R	4.3	2.2	5.3	0.4		

表 4 正交试验方差分析结果

数据源	总方差	自由度	方差	F 检验
A	9.63	2	33.795	< 68.20 **
B	113.67	2	4.815	< 9.72 *
C	67.59	2	56.835	< 114.70 **
D	9.90	2	4.950	< 9.99 **

注:以抑菌圈直径数据分析, F_{0.005} = 6.99, F_{0.001} = 9.95
葡萄糖 5 g/L, 酵母膏 1 g/L, 甘油 5 g/L, 蛋白胨 3 g/L。由于最佳配置没有在正交试验的组合中出现,因此,我们再以 A₁B₂C₁D₃ 的条件进行发酵培养,以所得发酵液用杯碟法做验证试验测得抑菌圈直径为 21.2 mm,即活性为 711.8 U/mL。

3 结论与讨论

在微生物农药的工业化生产中,降低原料成本和提高发酵液效价是提高经济效益的重要途径,利用单因子试验和正交试验相结合的方法,可以用较少的试验就能找出各因素之间的相互关系,从而较快地确定出培养基的最佳组合^[9]。为了降低生产的成本,提高原材料的利用率,需要满足发酵生产的最佳条件,如碳源、氮源的选择影响抗生素的产生。经改进后的培养基组成为葡萄糖 5 g/L, 酵母膏 1 g/L, 甘油 5 g/L, 蛋白胨 3 g/L。
发酵条件对微生物的生长及次生代谢产物的产率也有重要的影响。改进后的最适发酵条件为初始 pH 8.0, 接种量 8%, 在 180 r/min 下 28℃振荡培养 96h。另在代谢过程中检测活性的同时测定了发酵液的 pH 值,从 pH 的变化中发现,该菌株在快速生长时 pH 值下降,继续生长则开始上升,产物合成期 pH 为 4.8 左右。

通过培养条件和培养基优化后使单位发酵液活性提高到 711.8 U/mL (抑菌圈直径 21.2 mm),较优化前葡萄糖蛋白胨培养基发酵活性 93.8 U/mL (抑菌圈直径 13.6 mm)提高了 6.6 倍。

微生物的次生代谢物是非常复杂的,某些情况下是几种活性物质一定比例的协同作用才表现出高活性,这种情况下恰当的比例比某一种物质的含量更重要。在试验中,适量的甘油有利于发酵液活性的提高,适量的葡萄糖有利于 TS67 生物量的快速积累,当葡萄糖消耗殆尽,解除葡萄糖效应,TS67 利用甘油积累活性物质。但目前对青霉菌 TS67 的次生代谢物中活性成分了解很少,所以在该菌株广泛应用之前,有必要进一步研究其活性成分的组成和活性成分的合成途径,这些是提高发酵滤液中活性成分含量的关键条件。

参考文献:

[1] 李典漠,戈峰. 害虫综合防治现状问题及发展趋势[C] // . 陈建峰. 中国有害生物综合治理论文集. 北京: 中国农业出版社, 1996: 34 – 37.
[2] 李向辉,朱祯. 生物途径控制虫害[J] . 科学通报, 1998, 43(9): 25 – 28.
[3] 田黎,陈杰. 农用抗生素的新资源——海洋微生物[J] . 中国生物防治, 2003 19 (3): 121 – 124.
[4] 郝树站,王素英. 具抗植物病原真菌活性海洋霉菌的筛选与鉴定[J] . 亚热带农业研究, 2002 2(1): 45 – 48.
[5] Lancini G, Parenti F, Gallo G G. Antibiotics: A Multidisciplinary Approach [M] . New York and London: Plenum Press, 1995: 21 – 35.
[6] Parag S, Saudagar, Rekha *et al.* Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* [J] . Bioresource Technology, 2006, 98(10): 2010 – 2017.