

多粘芽孢杆菌发酵培养基优化及发酵特性研究

凤 权, 汤 斌, 陈中碧

(安徽工程科技学院, 安徽芜湖, 241000)

摘 要 采用正交实验方法, 对多粘芽孢杆菌的发酵培养基进行优化, 通过统计学分析, 确定发酵培养基, 并利用 30 L 发酵罐进行实验, 测定发酵过程中相关参数, 确定生长代谢曲线。结果表明, 发酵效价由优化前的 8.6×10^4 U/mL 提高到 12.9×10^4 U/mL, 提高近 1.5 倍。

关键词 多粘芽孢杆菌, 正交设计, 发酵特性

硫酸粘杆菌素又名克利斯汀(Colistin)、多粘菌素 E(Polymyxin E)等, 系一种碱性环状多肽类(polypeptide system)抗生素, 其有效成分分子中带阳电荷的游离氨基和革兰氏阴性菌细胞膜中的磷脂中带阴电荷的多聚磷酸根结合, 引起细胞膜或渗透屏障的破坏, 使细胞膜的通透性增加, 导致细胞内磷酸盐、核酸等成分外漏, 从而使细菌死亡。硫酸粘杆菌素耐热, 消化道不易吸收, 排泄迅速, 毒性小, 无副作用, 不易产生耐药菌株, 被认为是最安全的畜禽促生长抗生素之一^[1~5]。

我国于 1990 年代末开始研制生产硫酸粘杆菌素, 目前国内仅有几家投入生产, 产量有限, 主要依赖从日本等国进口来满足需求。国内多粘菌素 E 的发酵效价偏低, 一般低于 10×10^5 U/mL, 成本较高。实验中采用正交实验对多粘芽孢杆菌的发酵培养基进行优化, 确定最佳发酵培养基组分, 提高发酵效价, 降低生产成本。

1 材料与方法

1.1 菌 种

生产菌: 多粘芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa* GK-1)。

指示菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

1.2 培养基

斜面种子培养基: 葡萄糖 1%、NaCl 0.05%、麸皮 1% (煮沸 0.5 h 后的滤液)、 NH_4Cl 0.1%、 KH_2PO_4 0.3%、 Na_2HPO_4 0.5%、琼脂 1.8%, 用无盐水配制, 自然 pH。

液体种子培养基: 葡萄糖 3.15%、肉胨 0.7%、鱼陈 0.55%、NaCl 0.3%、泡敌 0.01%、重质 CaCO_3

0.42%, 自来水配制, 灭菌后调 pH 到 6.3~6.7。

效价测定培养基: 蛋白胨 1 g, 牛肉膏 0.3 g, 葡萄糖 0.25 g, NaCl 2 g, K_2HPO_4 0.25 g, H_2O 100 mL, 琼脂 1.6 g, 调 pH 为 7.1, 在 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min。

大肠杆菌斜面培养基: 培养基 VI (配方见《中华人民共和国药典》2005 版, 附录 XIA 抗生素微生物鉴定法)^[6]。

1.3 指示菌悬液

将大肠杆菌的营养琼脂斜面培养物, 接种于斜面培养基, 36℃ 培养 22 h, 用接种环刮取适量菌苔置于灭菌蒸馏水中。

1.4 硫酸粘杆菌素标准液

准确称取硫酸粘杆菌素标准品 (含量 19 536 U/mg), 溶于灭菌磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.0) 中, 配成 1 000 U/mL 的标准贮备液, 试验时分别稀释成 1 600 U/mL 和 800 U/mL 的标准液。

1.5 仪器与设备

BS-1EA 型数显振荡培养箱、W-GJ-2FD 型净化工作台、CRDX-280 型不锈钢电热灭菌消毒器、TDL-40B 型离心机、WKT-J-D-30L/3 型全自动发酵罐、牛津杯 (内径 6 mm、外径 7.8 mm、高 10 mm)、瓦盖。

1.6 测定方法

生物效价: 按照药典规定的抗生素生物效价测定的“二剂量法”来测定^[6]。

糖含量: 斐林试剂法。

氨基氮含量: 甲醛法。

1.7 实验方法

通过单因素实验, 发现培养基中玉米淀粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、玉米浆、L-天冬氨酸 4 个组分对粘杆菌素的发酵效价影响较大。以粘杆菌素的发酵效价为依据, 选择玉米淀粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、玉米浆、L-天冬氨酸这 4 个因素, 每个因素分别选 4 个水平, 设计正交实

第一作者: 硕士研究生, 助理研究员 (汤斌教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-01-18, 改回日期: 2007-04-17

验,应用 $L_{16}(4^5)$ 正交表对各组分进行优化实验^[7~9]。

2 实验结果

2.1 正交实验

表 1 培养基配方的因素水平

水平	玉米淀粉糖化液质量分数(A)/%	硫酸铵质量分子数(B)/%	玉米浆质量分子数(C)/%	L-天冬氨酸质量百分比(D)/%
1	14	1.1	0.2	0.10
2	16	1.2	0.3	0.15
3	18	1.3	0.4	0.20
4	20	1.4	0.5	0.25

表 2 正交实验设计和测定结果

实验号	A	B	C	D	效价 $\times 10^{-4}/U \cdot mL^{-1}$
1	1	2	3	2	8.5
2	2	4	3	3	9.2
3	3	4	1	2	6.7
4	4	2	1	3	7.2
5	1	3	1	4	7.3
6	2	1	1	1	8.2
7	3	1	3	4	8.1
8	4	3	3	1	8.0
9	1	1	4	3	6.0
10	2	3	2	3	8.3
11	3	3	4	2	7.7
12	4	1	2	2	7.0
13	1	4	2	1	6.2
14	2	2	4	1	7.8
15	3	2	2	4	6.4
16	4	4	4	4	6.4
K_1	28	29.3	29.4	30.2	
K_2	33.5	29.9	27.9	29.9	
K_3	28.9	31.3	33.8	30.7	
K_4	28.6	28.5	27.9	28.2	
k_1	7.00	7.33	7.35	7.55	
k_2	8.38	7.48	6.98	7.48	
k_3	7.23	7.83	8.45	7.68	
k_4	7.15	7.13	6.98	7.05	
R	1.38	0.70	1.47	0.63	

表 3 正交实验方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F	因素影响
玉米淀粉	4.855	3	1.618	14.9	显著
$(NH_4)_2SO_4$	1.11	3	0.37	3.4	
玉米浆	5.905	3	1.968	18.2	显著
L-天冬氨酸	0.945	3	0.315	2.9	
误差	0.325	3	0.108		
总和	13.14	15			

注: $F_{0.05}(3,3)=9.28$, $F_{0.01}(3,3)=29.5$

2.2 优化后培养基的发酵特性

根据正交实验得出的最佳发酵培养基配方,进行摇瓶发酵,发酵效价达到 $9.8 \times 10^4 U/mL$,高于正交

从极差分析结果可以看出,对发酵效价影响由大到小的顺序是玉米浆、玉米淀粉、 $(NH_4)_2SO_4$ 、L-天冬氨酸,最佳水平为 $A_2B_3C_3D_3$ 。

表中所列的各组实验中的最高发酵效价 $9.2 \times 10^4 U/mL$ 。在此基础上采用 30L 发酵罐进行放大实验。

2.2.1 发酵过程中溶氧控制与通气量的关系(图 1)

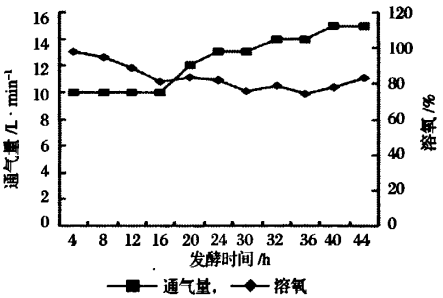


图 1 发酵过程中溶氧控制与通气量的关系

2.2.2 发酵过程中总糖和氨基氮的变化曲线(图 2)

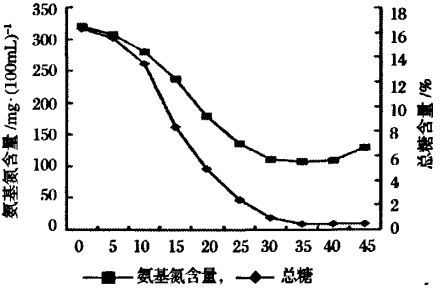


图 2 发酵过程中总糖、氨基氮的变化曲线

2.2.3 发酵过程中菌体含量和生物效价的变化曲线

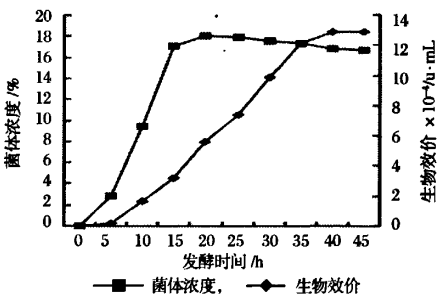


图 3 发酵过程中菌体含量与生物效价的变化曲线

从图 1、图 2 和图 3 可以看出,多粘芽孢杆菌发酵 5 h 左右进入对数生长期,溶氧迅速下降,菌体含量快速上升。15 h 左右进入稳定期,此时有大量粘杆菌素生成,发酵液中氨基氮和糖含量在菌体的对数生长期和稳定期迅速消耗。发酵到 40 h 左右,氨基氮的含量有所上升,可能少量菌体已经自溶,此时发酵效价已达到 12.9×10^4 U/mL。

3 讨 论

在单因素实验的基础上,根据正交实验结果及方差分析,得出玉米淀粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、玉米浆、L-天冬氨酸这 4 个组分的最佳浓度分别是:玉米淀粉 16%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.3%、玉米浆 0.4%、L-天冬氨酸 0.2%。根据正交实验得出的最佳发酵培养基配方,进行摇瓶发酵,其发酵效价达到 9.8×10^4 U/mL,并在此基础上采用 30L 发酵罐进行放大实验,发酵效价由优化前的 8.6×10^4 U/mL 提高到 12.9×10^4 U/mL,提高了 1.5 倍。

参 考 文 献

- 1 Falagas, Matthew E Colistin. The Revival of Polymyxin for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections[J]. Clinical Infectious Diseases, 2005,(5): 1 333~1 341
- 2 李德培. 抗革兰氏阴性菌促长药物—粘杆菌素[S]. 兽药与饲料添加剂, 1999,(1): 21~23
- 3 Koyama Y, A Kurosasa, Tsuchiya A, et al. A new antibiotic 'colistin' produced by spore-forming soil bacteria [J]. J Antibiot, 1990,(3): 457~458
- 4 Sofia K K, Argyris M. Combination Therapy with Intravenous Colistin for Management of Infections Due to Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria in Patients without Cystic Fibrosis [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005,(6): 3 136~3 146
- 5 Wootton M, Holt H A, MacGowan A P. Development of a novel assay method for colistin sulphomethate [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2005,(3): 243~244
- 6 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 XIA 抗生素微生物检定法
- 7 阎亚丽, 陈庆森, 崔细鹏, 等. 冰核活性细菌发酵培养基的优化筛选[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(4): 19~23
- 8 王海波, 欧俊杰, 耿信笃. 基因工程菌生产 rhG2CSF 发酵培养基的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(11): 68~71
- 9 胡德亮, 陈有容, 李柏林. 黄原胶高产菌株 HL-9901 发酵培养基的优化[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(4): 343~347

Optimization of Fermentation Culture Medium for *Paenibacillus polymyxa* and Studies on Fermentation Feature

Feng Quan, Tang Bin, Chen Zhongbi

(Anhui University of Technology and Science, Wuhu 241000, China)

ABSTRACT In this paper, orthogonal test is designed to optimize fermentation culture medium for *Paenibacillus polymyxa*. The optical prescription for fermentation was obtained by statistical analysis. Some relevant parameters were measured and growth-curves were confirmed in the course of fermentation with 30L bioreactor. The result shows that biological activity was 12.9×10^4 U/mL, which increased by 50%.

Key words *Paenibacillus polymyxa*, orthogonal design, fermentation feature

市场
动态

袋泡茶包装机市场广阔

随着消费者对健康、安全的要求越来越高,传统的茶叶生产及制作方式面临着一次大变革,人们不但要求茶叶好喝,还要干净卫生、安全无污染。消费水平不断的提高,袋泡茶给人们带了方便。有关统计数字显示,国内袋泡茶的消费量约占国内茶叶消费量的 5%,袋泡茶市场有广阔的发展空间。袋泡茶包装机由于成型工艺的特点在自动化、生产效率、计量及包装精度等方面又有高于其他包装机械的要求,需要完成内袋滤纸、外袋纸、标签纸的传输、被包装物料的计量与填充、制袋、挂线、粘标签或钉铅钉、光电配准、自动计数及装盒等一系列功能。因此,袋泡茶包装机具有非常可观的市场潜力、市场广阔、发展前景好。