

文章编号:1671-1513(2012)05-0046-06

链霉菌 TD-1 菌株抑菌活性物质发酵条件的优化

杨晓静, 王昌禄, 王志芳, 李凤娟, 陈勉华, 王玉荣

(天津科技大学食品营养与安全教育部重点实验室/食品科学与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 利用正交设计法及均匀设计法对链霉菌 TD-1 菌株发酵条件进行了优化, 研究不同发酵因子对链霉菌 TD-1 产抑菌活性物质的影响. 结果表明, 发酵培养基中影响抑菌活性大小的主要因素为葡萄糖、黄豆粉、硫酸亚铁、磷酸氢二钾及硝酸钾; 抑菌活性物质较佳发酵条件为 90 mL/250 mL 三角瓶, 接种量的体积分数为 0.06, 发酵周期 8 d, 初始 pH 值为 7.15. 在此条件下, 最终抑菌效率与原发酵液相比发酵液对串珠镰刀菌抑菌活性提高了 53.38%.

关键词: 链霉菌 TD-1; 抑菌活性物质; 发酵条件

中图分类号: TS205.9

文献标志码: A

真菌及其毒素能通过粮食、饲料和畜产品等途径危害人类及动物健康, 其中镰孢菌属 (*Fusarium*) 中的串珠镰刀菌是粮食及饲料中的常见霉菌, 其严重性已经被人们所公认. 如何抑制粮食、饲料中霉菌及其毒素, 减轻其危害, 已成为众多学者研究的热点^[1-2]. 在对真菌及其毒素的防治中, 化学防霉防腐剂发挥着举足轻重的作用. 但由于过量使用化学防霉防腐剂引起的一系列环境及社会问题越来越引起人们的重视, 我国政府将重点致力于生物杀虫剂、杀菌剂的研究与产业化^[3].

据统计, 目前已获得的天然产物化合物总量已超过 100 万种, 其中微生物代谢产物约为 2 万多种^[4], 而从微生物代谢产物中分离得到的活性化合物直接使用的有 150 ~ 160 个^[5-6]. 放线菌是重要的微生物资源, 其产生的活性成分具有周期短、易于研究、无毒无害等优点, 一直是研究者关注的焦点^[7-10]. 特别是链霉菌能产生多种防霉防腐的活性物质^[11-12]. 本研究在前期研究^[13-14]的基础上, 对能够抑制多种产毒素霉菌的链霉菌 TD-1 菌株产生抑菌活性物质的发酵条件及最佳培养基配方进行了优化.

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌株

实验菌株: 链霉菌 TD-1, 从天津市宝坻区某饲料厂储粮仓库周围土壤中筛选获得.

指示菌株: 串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*), 由天津市畜牧兽医研究所提供.

1.1.2 培养基

液体发酵培养基为可溶性淀粉 20.0 g, 黄豆粉 10.0 g, KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 自来水 1 000.0 mL, pH 值为 7.2 ~ 7.4; 121 °C, 灭菌 20 min.

1.1.3 试剂

碳源为葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘油、柠檬酸三钠、乙酸钠、可溶性淀粉; 氮源为蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏、黄豆粉、尿素、硫酸铵、硝酸铵; 无机盐为氯化钙、硫酸亚铁、硝酸钾、硫酸镁、磷酸氢二钾、氯化钠、氯化钾.

1.1.4 仪器

1 类 B 型超净工作台, 上海博讯事业有限公司

收稿日期: 2012-01-15

作者简介: 杨晓静, 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术;

王昌禄, 男, 教授, 主要从事食品生物技术方面的研究. 通讯作者.

医疗设备厂;LS-B50L型立式压力蒸汽灭菌器,上海华线医用核子仪器有限公司;HYG-III型回转式恒温调速摇瓶柜,上海欣蕊自动化设备有限公司;牛津杯,外径8 mm,上海黄海药检仪器销售有限公司.

1.2 方法

1.2.1 发酵液的制备

28 ℃培养3~4 d活化TD-1菌株,刮取孢子制成菌悬液,接种于装有100 mL液体发酵培养基的250 mL三角瓶中,28~30 ℃,180 r/min摇床中培养

5~6 d.

1.2.2 发酵培养基配方优化

1.2.2.1 无机盐正交试验

以串珠镰刀菌为指示菌,以氯化钙、硫酸亚铁、硝酸钾、硫酸镁、磷酸氢二钾、氯化钠、氯化钾7种无机盐作为实验因素,选用正交设计表 $L_{18}(3^7)$,各因素设定3个水平(如表1),牛津杯法^[15-16]测定不同浓度无机盐对TD-1菌株产抑菌活性的影响.

表1 各因素试验水平
Tab.1 Level of each factor $g \cdot (100 mL^{-1})$

因素水平	氯化钙	水合硫酸亚铁	硝酸钾	水合硫酸镁	磷酸氢二钾	氯化钠	氯化钾
1	0.00	0.001	0.000	0.05	0.05	0.00	0.00
2	0.02	0.002	0.05	0.10	0.10	0.05	0.02
3	0.04	0.003	0.10	0.15	0.15	0.10	0.04

1.2.2.2 培养基成分正交试验

选用正交设计表中 $L_9(3^4)$,以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘油、柠檬酸三钠、乙酸钠作为碳源因素,以蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏、黄豆粉、尿素、硫酸铵、硝酸铵作为氮源因素,经单因素试验选用较优碳、氮源作为培养基成分正交试验因素;在无机盐正交实验的基础上,选用较优无机盐作为培养基成分正交因素,每个因素分别设置3个浓度水平,确定优化后的链霉菌菌株TD-1发酵培养基成分.

1.2.3 培养条件优化

选取对菌株TD-1产抑菌活性物质影响较大的4个发酵条件进行优化,4个主要条件为:装液量、接种量、发酵时间、pH值.从均匀设计表中选用 $U_{10}^*(10^8)$ 表,每个因素水平设为10.

1.2.4 优化效果对比试验

根据上述实验结果,菌株TD-1分别在优化发

酵条件、最优培养基条件下和原始发酵条件、原始培养基条件下进行发酵培养,以串珠镰刀菌为指示菌,牛津杯法测定2种发酵条件对菌株TD-1产抑菌活性物质的影响,实验重复进行3次,取平均值作为最终结果,比较优化后抑菌效果提高率.

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基配方的优化

2.1.1 无机盐对菌株TD-1发酵液活性的影响

选用不同的无机盐进行正交试验,结果如表2,比较各因素的极差 R 可知,硝酸钾($R, 1.57$)、水合硫酸亚铁($R, 1.28$)及磷酸氢二钾($R, 1.23$)为影响发酵液抑菌活性的主要因素;试验各因素水平的平均数表明对菌株TD-1发酵液抑菌物质影响较大的是硝酸钾、水合硫酸亚铁、磷酸氢二钾.

表2 无机盐正交试验结果

Tab.2 Data of orthogonal test of inorganic salts mm

种类	氯化钙	水合硫酸亚铁	硝酸钾	水合硫酸镁	磷酸氢二钾	氯化钠	氯化钾
k_1	21.73	21.73	20.50	21.12	20.98	21.17	21.25
k_2	21.48	20.73	21.92	21.77	22.22	21.75	21.92
k_3	21.27	21.02	21.07	21.55	21.28	21.57	21.32
极差 R	0.47	1.28	1.57	0.60	1.23	0.58	0.67

2.1.2 碳源对菌株TD-1产抑菌活性物质的影响

选取葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘油、柠檬酸钠、乙酸钠为碳源,测定其对抑菌活性的影响.结果表明,

等量替换原始发酵培养基中的可溶性淀粉时,其抑菌效果由大到小依次为葡萄糖>柠檬酸钠>甘油>蔗糖>麦芽糖>乙酸钠(如图1).所选碳源均能使

菌株 TD-1 发酵液产生抑菌活性,其中葡萄糖为碳源时,产生的抑菌活性最大,抑菌圈直径达 19.8 mm,故选葡萄糖代替淀粉作为碳源进行发酵培养基配方的进一步优化。

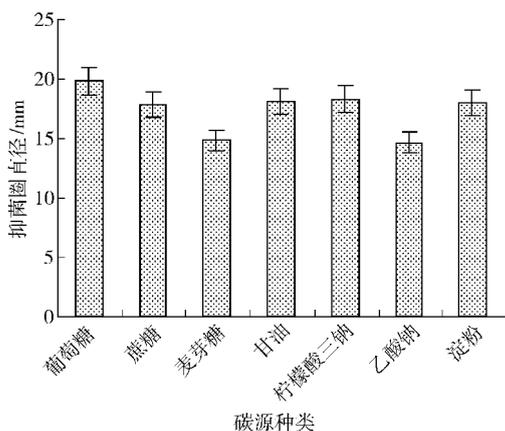


图1 碳源对抑菌活性物质活性的影响

Fig. 1 Influence of different carbon sources on antifungal activity

在测定不同碳源对菌株 TD-1 抑菌活性影响的基础上,将抑菌活性较高的葡萄糖、甘油、柠檬酸三钠 3 种碳源分别按质量浓度为 0.02, 0.05, 0.08 g/mL 加入到培养基中作为碳源,进行单因素浓度对抑菌活性的测定,结果如图 2。随葡萄糖浓度的增大,抑菌效果先增大后减小,这可能是由于胞外渗透压过大培养基中碳氮比例失衡引起的;而甘油和柠檬酸三钠质量浓度为 0.02 g/mL 时,抑菌效果最好。甘油随质量浓度的增大,抑菌物质活性有所下降,这可能与发酵液粘度过大不利于发酵造成的,柠檬酸三钠质量浓度为 0.08 g/mL 时抑菌物质活性有所回升,但用量过大不利于发酵。从经济性考虑,选用葡萄糖质量浓度为 0.05 g/mL 时为最宜。

2.1.3 氮源对菌株 TD-1 产抑菌活性物质的影响

选用蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏、尿素、硫酸铵、硝酸铵为氮源,以黄豆粉作为对照,测定其对抑菌活性的影响。结果表明,在以酵母浸粉、硫酸铵作为氮源时,菌株 TD-1 发酵培养时不能合成抑菌活性物质,发酵培养基优化时不再考虑此 2 种氮源。其他氮源对抑菌活性的测定,结果如图 3,其中以牛肉膏产生抑菌物质活性最大,抑菌圈直径达 18.0 mm。各不同氮源抑菌效果由大到小依次为黄豆粉 > 蛋白胨 > 硝酸铵 > 尿素(如图 3)。

在测定不同氮源对菌株 TD-1 抑菌活性影响的基础上,将抑菌活性较好的蛋白胨、牛肉膏、黄豆粉,

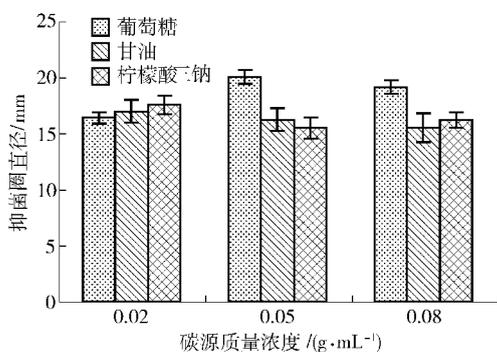


图2 不同质量浓度碳源对抑菌物质活性的影响

Fig. 2 Influence on active substance production of different concentration carbon

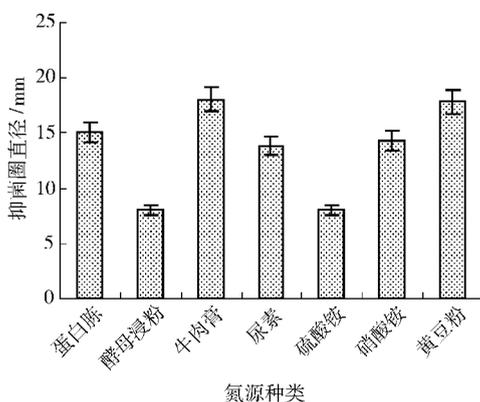


图3 氮源对抑菌物质活性的影响

Fig. 3 Influence of different nitrogen sources on antifungal activity

分别按质量浓度为 0.01, 0.025, 0.04 g/mL 加入到发酵培养基中,检测结果如图 4。黄豆粉作为氮源时,随用量增大抑菌效果先增大后减小,当质量浓度为 0.01 g/mL 时,抑菌圈最大;质量浓度为 0.04 g/mL 时,抑菌活性下降。蛋白胨随质量浓度的增大抑菌

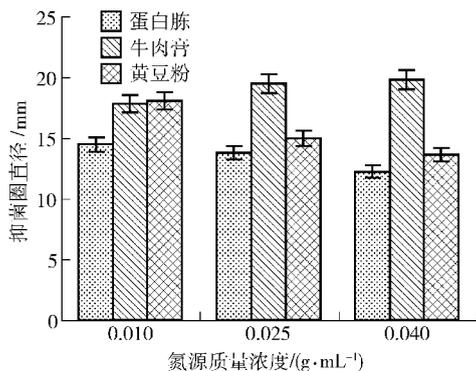


图4 不同质量浓度氮源对抑菌物质活性的影响

Fig. 4 Influence on active substance production of different concentration nitrogen

活性反而降低. 牛肉膏在质量浓度增大时, 抑菌物质活性随之增大, 但成本过高, 故选黄豆粉质量浓度为 0.01 g/mL 时为较佳条件.

2.1.4 培养基成分正交试验

在碳氮源单因素及无机盐正交试验基础上, 分别选用对抑菌活性物质影响较大的碳源(葡萄糖)、氮源(黄豆粉)及无机盐(水合硫酸亚铁与磷酸氢二

钾)进行正交试验, 通过正交 $L_9(3^4)$ 设计, 得出结果如表 3, 从各因素的 R 值看出, 培养基成分影响抑菌活性产生的主次顺序为: 水合硫酸亚铁与磷酸氢二钾组合($R, 3.6$) > 葡萄糖($R, 3.3$) > 硝酸钾($R, 2.5$) > 黄豆粉($R, 1.1$), 分析 k 值可知 4 种因素的最优配比水平为: 葡萄糖 65 g/L, 硝酸钾 0.5 g/L, 磷酸氢二钾 1 g/L, 水合硫酸亚铁 0.01 g/L.

表 3 发酵培养基优化最终正交试验结果

Tab. 3 Data of final fermentation optimization

$g \cdot (100 \text{ mL}^{-1})$

试验号	葡萄糖	水合硫酸亚铁、磷酸氢二钾	黄豆粉	硝酸钾	抑菌圈直径/mm
1	5.75	0.002, 0.10	1.00	0.01	23.8
2	5.75	0.001, 0.10	1.50	0.05	26.4
3	5.75	0.002, 0.05	2.00	0.10	20.9
4	6.50	0.002, 0.10	1.50	0.10	27.5
5	6.50	0.001, 0.10	2.00	0.01	25.8
6	6.50	0.002, 0.05	1.00	0.05	25.8
7	7.25	0.002, 0.10	2.00	0.05	24.6
8	7.25	0.001, 0.10	1.00	0.10	25.0
9	7.25	0.002, 0.05	1.50	0.01	19.7
k_1	23.6	25.3	24.9	23.1	
k_2	26.4	25.7	24.5	25.6	
k_3	23.1	22.1	23.8	24.5	
极差 R	3.3	3.6	1.1	2.5	

对以上结果进行 F 值显著性检验, 结果如表 4, 分析可知水合硫酸亚铁与磷酸氢二钾组合、葡萄糖对菌株 TD-1 发酵液产抑菌活性物质影响较大, 即 2 种因素对实验结果有显著差异性, 其中水合硫酸亚铁与磷酸氢二钾组合与葡萄糖相比, 对菌株 TD-1 发酵液产抑菌活性物质的影响较大. 根据前期实验

室对菌株 TD-1 的研究, 此结果可能与 TD-1 菌株本身的生物学特性有关^[13].

综上所述, 优化后的培养基配方为葡萄糖 65 g/L、黄豆粉 10 g/L、硝酸钾 0.5 g/L、水合硫酸镁 1 g/L、磷酸氢二钾 1 g/L、氯化钠 0.5 g/L、氯化钾 0.2 g/L、水合硫酸亚铁 0.01 g/L.

表 4 发酵培养基配方 F 检验

Tab. 4 F -test of composition of fermentation medium

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值 ($F_{0.05}$)	显著性
葡萄糖	18.142	2	9.503	9.000	*
硫酸亚铁与磷酸氢二钾组合	23.176	2	12.140	9.000	*
黄豆粉	1.909	2	1.000	9.000	
硝酸钾	9.402	2	4.925	9.000	
误差	1.91	2			

2.2 培养条件对菌株 TD-1 产抑菌活性物质的影响

在培养基成分优化的基础上进行均匀试验设计, 选取对菌株 TD-1 发酵影响较大的 4 组培养条

件: 装液量、接种量、培养时间及 pH, 测定各培养条件不同水平下对抑菌活性大小的影响, 结果如表 5, 通过 DPS 软件对试验结果进行偏最小二乘回归建

表5 均匀设计试验结果

Tab.5 Data of uniform test

实验号	装液量/ mL	接种量/ %	培养 时间/d	pH	抑菌圈 直径/mm
1	30	0.08	5	7.47	4.1
2	40	0.11	7	7.87	16.9
3	50	0.14	3.5	7.39	19.0
4	60	0.06	5.5	7.79	7.3
5	70	0.09	7.5	7.31	23.9
6	80	0.12	4	7.71	15.4
7	90	0.15	6	7.23	22.6
8	100	0.07	8	7.63	25.4
9	110	0.10	4.5	7.15	19.7
10	120	0.13	6.5	7.55	3.4

模分析,最终得到菌株 TD-1 较优培养条件为:摇瓶装液量 90 mL/250 mL 三角瓶、接种量的体积分数为

表6 优化发酵结果与原始发酵结果抑菌效果对比

Tab.6 Comparison between optimized results and original fermentation

试验号	原发酵测定结果/mm	优化发酵测定结果/mm	回归方程预测值/mm	相对偏差/%	抑菌效果提高率/%		
1	16.6	26.2	30.3				
2	17.9	17.3	26.5	26.6	30.3	5.8	53.38
3	17.5	27.0	30.3				

3 讨论

通过实验,确定了培养基中不同成分对链霉菌菌株 TD-1 产抑菌活性物质的影响,通过极差 R 判断,影响因素主次排列顺序为:水合硫酸亚铁与磷酸氢二钾组合($R, 3.6$) > 葡萄糖($R, 3.3$) > 硝酸钾($R, 2.5$) > 黄豆粉($R, 1.1$),并得出较佳培养条件为摇瓶装液量 90 mL/250 mL 三角瓶,接种量的体积分数为 0.06,发酵周期 8 d,初始 pH 值 7.15,抑菌物质的活性较优化前提高了 53.38%。以上结果为 TD-1 菌株进行发酵罐扩大培养提供了依据。

菌株 TD-1 所产抑菌活性物质对饲料、粮食中霉菌有较强的抑制作用,在目前文献资料的报道中较为少见,该抑菌活性物质有望成为新型的微生物源农药,用于储粮及饲料储藏中霉菌防治必将有广阔的发展前景。后续工作中需继续根据菌株 TD-1 生长及产素的营养要求特点,在生物调节的基础上,

0.06、发酵周期 8 d、初始 pH 值 7.15,其他培养条件不变。从偏最小二乘回归方程

$$y = 1\,023.571\,075\,1 + 1.329\,313x_1 + 799.614\,407x_2 - 14.277\,359x_3 - 278.316\,697x_4 - 0.002\,631x_1^2 - 54.718\,024x_2^2 + 1.011\,067x_3^2 + 18.263\,90x_4^2 - 3.337\,547x_1x_2 - 0.012\,890x_1x_3 - 0.065\,244x_1x_4 - 51.349\,67x_2x_3 - 30.318\,054x_2x_4 + 1.274\,863x_3x_4$$

得菌株 TD-1 理论上的抑菌值为 30.36 mm。

2.3 优化发酵结果与原始发酵结果抑菌效果判断

分别测定菌株 TD-1 在优化前后的发酵条件产抑菌活性物质的大小,结果如表 6。由表 6 可知,优化后 TD-1 抑菌效果由原来的 17.3 mm 增大到优化后的 26.6 mm,抑菌率提高了 53.3%。优化后实验结果为 26.6 mm,与偏最小二乘回归方程得到的理论值 30.3 mm 之间的相对偏差为 5.8%,小于 10%,说明均匀试验得到的回归方程较好的反映了实际情况,对实际生产具有指导意义。

进行高密度大规模的发酵培养,提高活性物质产量,降低生产成本。

参考文献:

- [1] Hussein H S, Brasel J M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals[J]. *Toxicol*, 2001,167(2):101-134.
- [2] 苏永腾,刘强. 谷物霉菌毒素的危害及其控制措施的研究[J]. *中国食物与营养*, 2010,34(4):9-12.
- [3] 沈寅初,张一宾. 生物农药[M]. 北京:化学工业出版社, 2000.
- [4] Knight V, Sanglier J J, DiTullio D, et al. Diversifying microbial natural products for drug Discovery[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003,61(2):446-458.
- [5] Fehér M, Schmidt J M. Property. Distributions; Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry[J]. *J Chem Inf Comput Sci*, 2003(43):218-227.
- [6] Richard H B. Antimicrobials from actinomycetes: back to

- the future[J]. *Microbe*,2007,2(3):125-131.
- [7] Carl S,Wiesel M. Mycophenolate mufti [MMF] for prevention of kidney transplant rejection. A new immunosuppressive agent, international mycophenolate mofetil study group[J]. *Urologie A*,2011,37(3):26-28.
- [8] Wessjohann L. Epothilones, Promising natural products with taxol-like activity[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007,3(6):715.
- [9] Hardt I H, Steinmeta H. New natural epothilones from sporangium cellulose, strains Soce 90/B2 and Soce 90/DB: isolation, structure, elucidation and SAR studies [J]. *J Nat Prod*,2001,64(7):847.
- [10] 姜怡,唐蜀昆,张玉琴,等. 放线菌产生的生物活性物质[J]. *微生物学通报*,2007,34(1):188-190.
- [11] Kayakir H,Takase S,Shibata T,et al. Structure of Kifunensine, a new immunomodulator isolated from an actinomycete[J]. *J Org Chem*,1989,5(4):4015-4016.
- [12] Ahn C,Stiles M E. Plasmid-associated bacteriocin Production by a strain of *Carnobacterium Piscicola* from meat [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990,56(8):2503-2510.
- [13] 刘春静,王昌禄,陈勉华,等. 串珠镰刀菌拮抗菌的分离筛选及其抑菌作用[J]. *粮食与饲料工业*,2011(1):41-43.
- [14] 王昌禄,郑传宝,陈勉华,等. 产粉红色素红曲霉 M4 菌株发酵培养基的优化[J]. *氨基酸和生物资源*, 2010,2(32):26-29.
- [15] 彭小伟,杨丽源,陈有为,等. 黄花夹竹桃内生真菌抗病原细菌的初步研究[J]. *菌物研究*,2003,1(1):33-36.
- [16] 孙力军,陆兆新. 植物内生菌抗菌活性物质研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2005,2(31):51-57.

Optimization of Fermentation Conditions for Antibacterial Activity Substance Produced by *Streptomyces* TD-1

YANG Xiao-jing, WANG Chang-lu, WANG Zhi-fang, LI Feng-juan, CHEN Mian-hua, WANG Yu-rong
(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety of Ministry of Education/College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Fermenting conditions for antibacterial activity substance produced by *Streptomyces* TD-1 was optimized by orthogonal and homogeneous test design method. The effects of different experimental factors on *Streptomyces* TD-1 producing antibiotic substance were studied. The results showed that the most important factors which influence the antibacterial activity were glucose, soy flour, FeSO_4 , K_2HPO_4 and KNO_3 ; the optimized cultural conditions were the initial pH 7.15, culture temperature 30 °C, 6% of inoculum, the amount of shake flask 90 mL/250 mL, shaking speed 180 r/min and fermentation time 8 d. The final results showed that the antifungal activity of the fermentation broth could increase by 53.38%.

Key words: *Streptomyces* TD-1; antibacterial activity substance; fermenting conditions

(责任编辑:李 宁)