

# 天蚕素抗菌肽发酵培养基优化

秦鹏, 赵培静, 梁淑娃, 明飞平, 张宜靖

(广州市微生物研究所, 广东广州 510663)

**摘要:** 选用抗菌肽生产菌 KJ02 为出发菌, 对其发酵培养基进行了研究并使用正交设计优化了发酵培养基。优化后的培养基: 葡萄糖 3%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 2%, NaCl 0.5%。同时在 500 L 中式水平上对该培养基的效果进行了试验, 发酵液杀菌效价为 13651 IU/mL。

**关键字:** 天蚕素抗菌肽; 发酵; 培养基优化

文章编号: 1673-9078(2012)8-1046-1048

## Optimization of the Fermentation Medium of Cecropins Production

QIN Peng, ZHAO Pei-jing, LIANG Shu-wa, MING Fei-ping, ZHANG Yi-jing

(Guangzhou Microbiology Research Institute, Guangzhou 510663, China)

**Abstract:** The fermentation medium of a cecropin-production strain KJ02 were studied and optimized by orthogonal test. The optimal components for fermentation medium were glucose 3%, peptone 1%, yeast extract 2% and NaCl 0.5%. With the optimal medium, the cecropin efficiency in 500 L fermentator was up to 13651 IU/mL.

**Key words:** cecropin; fermentation; optimization

天蚕素抗菌肽由 31~39 个氨基酸残基组成的分子质量约为  $4 \times 10^3$  的小分子多肽<sup>[1]</sup>。是由瑞典科学家在 1972 首次分离得到<sup>[2]</sup>。天蚕素抗菌肽对革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌有抑制作用<sup>[3]</sup>; 对 DNA、RNA 病毒有很强的抑制作用<sup>[4]</sup>; 近年来, 天蚕素抗菌肽在肿瘤细胞上的作用的研究已被广泛开展<sup>[5]</sup>。

抗生素添加剂的使用严重破坏了畜禽肠道的微生物平衡, 且易在畜禽产品内积蓄残留, 还可能造成环境的污染, 严重影响畜禽产品的品质和人类的健康。抗菌肽具有抗菌谱广、效果稳定、无残留、不易产生耐药性的特点, 具有广阔的前景。

目前, 对于微生物发酵生产抗菌肽的研究已经展开, 各种优化试验更是屡见不鲜。但这些研究基本上都是在摇瓶水平或小试发酵罐水平上进行的<sup>[6,7]</sup>。本文选取抗菌肽生产菌 KJ02 为出发菌种生产抗菌肽, 通过对培养基的优化来提高抗菌肽的杀菌效价, 并在 500 L 中试水平的发酵罐上进行了验证, 以期工业化生产提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

抗菌肽生产菌 KJ02 和大肠杆菌 K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 为本课题组保藏。

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 种子培养基

甘油 2%, 蛋白胨 2%, 酵母膏 1%, pH 自然。

#### 1.2.2 发酵培养基

甘油 2%, 豆粕 2%, 牛肉浸膏 2%, NaCl 0.5%, pH 自然。

#### 1.2.3 大肠杆菌培养基

蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%, NaCl 0.5%, pH 自然。

### 1.3 主要仪器

紫外可见分光光度计(上海精密仪器科技有限公司); pHS-25 数显酸度计(上海雷磁仪器厂); TGL-168 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 50 L, 500 L 不锈钢发酵罐(上海洋格)。

### 1.4 试验方法

从活化斜面挑取一环菌体接入种子摇瓶 200 r/min、30 °C 培养 20 h。将培养好的种子液接入发酵摇瓶, 接种量 5%, 200 r/min、30 °C 培养 24 h。取样测定发酵液杀菌效价。

### 1.5 过程参数测量

#### 1.5.1 生物量测定

测量经适当稀释后的发酵液在 570 nm 处的 OD 值。

#### 1.5.2 pH 值

pHS-25 数显酸度计测定。

#### 1.5.3 还原糖测定

采用 DNS 法测量<sup>[8]</sup>。

收稿日期: 2012-04-16

1.5.4 效价测定<sup>[9]</sup>

灭菌后的固体培养基溶化后,冷却至 55℃时,加入大肠杆菌 K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 菌液(菌浓约 10<sup>6</sup> cfu/mL) 5 μL,再加入上述待用培养基 6 mL 于已灭菌平皿(Φ=7.5 cm)中,迅速振荡摇匀后,水平放置,凝固备用,用打孔器打孔(2.7 mm),备用。

发酵液经 500 rpm 5 min 离心,上样。上样量 5 μL,重复 3 次,37℃培养过夜,测定抑菌圈直径(mm),按下列公式计算杀菌效价:

$$\text{杀菌效价 (IU/mL)} = 2^X \times 1000$$

其中: X=(抑菌圈直径-2.7 mm)÷2.1

2 结果与讨论

2.1 最佳培养基确定

2.1.1 最佳碳源试验

分别使用 2%的葡萄糖、果糖、糖蜜、蔗糖替代发酵培养基中的甘油,做摇瓶发酵试验。结果见图 1。

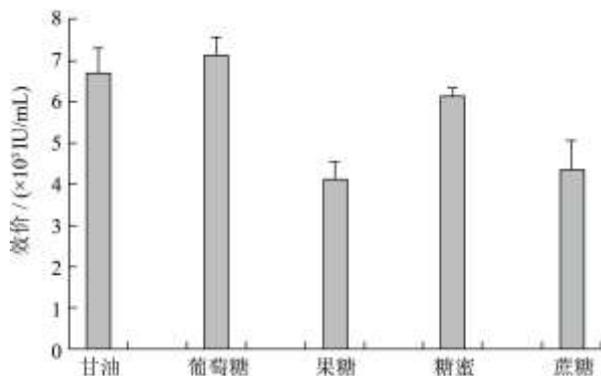


Fig.1 Effect of carbon sources on cecropins production

碳源是菌体的主要养料,菌体的大部分固体成分来自培养基的碳源,抑菌物质的分子骨架也是来自培养基中的碳源。因此选择合适的碳源不仅对菌体的生长而且对抑菌物质的产生都极为重要。从图 1 可以看出,培养基使用葡萄糖做碳源的时候, KJ02 杀菌效价(7133 IU/mL)明显高于其他组别。故选取葡萄糖作为培养基碳源。

2.1.2 最佳氮源试验

分别使用 2%蛋白胨、硫酸铵、鱼粉替代发酵培养基中的豆粕做摇瓶发酵试验。结果见图 2。

从图 2 可知,培养基中使用无机氮源硫酸铵时, KJ02 杀菌效价显著的低于其他组别;使用有机氮源时,所产抗菌肽杀菌效价差别不大,其中以使用蛋白胨和酵母膏为氮源时,效价最高(分别为 7344 IU/mL, 7297 IU/mL);考虑到酵母膏在当做氮源的同时,可以提供大量的生长因子,促进 KJ02 菌体的生长(酵母膏组生物量最高, OD570 达到 6.1),而抗菌肽的合成

分泌与生物量有一定的正相关,故确定最佳氮源为蛋白胨和酵母膏。

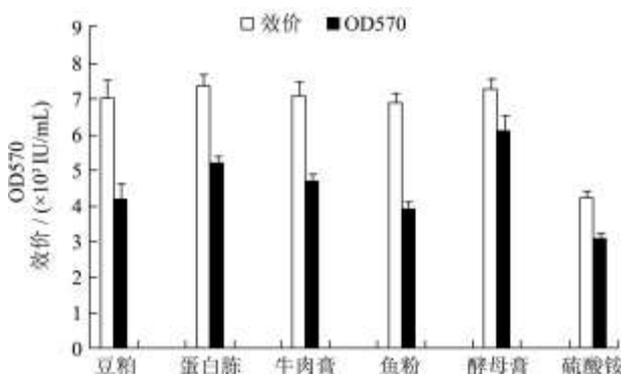


图 2 不同氮源试验结果

Fig.2 Effect of nitrogen sources on cecropins production

2.2 发酵培养基正交优化试验结果

使用正交试验设计(3 因素 3 水平),对发酵培养基中的碳源葡萄糖、氮源蛋白胨和酵母粉的组分进行优化。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A(葡萄糖/%)	B(蛋白胨/%)	C(酵母膏/%)
1	1	1	0.50
2	3	3	1
3	4	4	2

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal test

序号	A	B	C	空列	效价/(IU/mL)
1	1	1	1	1	5977
2	1	2	2	2	5732
3	1	3	3	3	5533
4	2	1	2	3	9021
5	2	2	3	1	9423
6	2	3	1	2	9122
7	3	1	3	2	7631
8	3	2	1	3	7297
9	3	3	2	1	7413
k1	5747.33	7543.00	7465.33	7604.33	
k2	9188.67	7484.00	7388.67	7495.00	
k3	7447.00	7356.00	7529.00	7283.67	
R	3441.33	187.00	140.33	320.67	

根据极差大小可以得出对效价影响的显著性顺序葡萄糖>蛋白胨>酵母膏,也即培养基中初始的葡萄糖含量对产物杀菌效价的影响最大;从上表可以得出最优培养基组合为葡萄糖 2 蛋白胨 1 酵母膏 3,也即葡萄糖 3%,蛋白胨 1%,酵母膏 2%。

在摇瓶中使用优化后的培养基进行验证试验,杀

菌效价可达到 9826 IU/mL。

### 2.3 发酵中试试验

根据上述的优化结果,在 500 L 发酵罐上进行了放大验证。培养温度为 30 °C,通风量为 0.6~0.8 m<sup>3</sup>/h,搅拌转速为 300 r/min,罐压为 0.04~0.06 MPa,接种量为 3%。

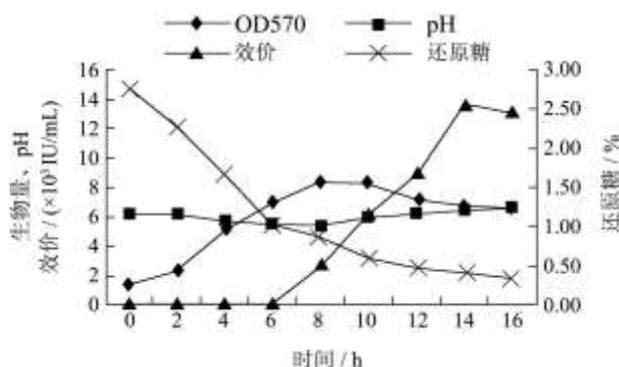


图 3 500L 发酵结果

Fig.3 Time courses of biomass, pH, efficiency and reducing sugar content during fermentation in 500 L tank

从图 3 可以看到菌体接种到 500 L 发酵罐后,经过短暂的适应期后,进入对数期,开始快速生长,在 8 h 时,OD570 达到最大值 8.4。还原糖在过程中呈下降趋势。pH 在初期先下降,再缓慢上升,伴随着 pH 上升, KJ02 开始分泌出抗菌肽,杀菌效价随 OD570 上升而增加。进入到发酵末期后, OD570 呈下降趋势,菌体出现自溶,细胞内的抗菌肽大量溶出。抗菌肽效价在 14 h 达到最大 13651 IU/mL,这一结果优于摇瓶的杀菌效价可能是由于发酵罐中的物质传递的效果,更好菌体生长过程中产生的代谢产物能够迅速的扩散;同时主动通气,溶解氧较摇瓶高的原因。之后杀菌效价也开始倒退。因而发酵的最佳结束时间在 14 h。从 KJ02 的整个发酵过程来看,在 6 h 开始分泌抗菌肽后,杀菌效价随着 OD570 的变化而上下浮动。因而我们推断抗菌肽的杀菌效价在一定程度上与 OD570 正相关联。

## 3 结论

3.1 本文使用正交设计的方法优化了天蚕素抗菌肽生产菌 KJKJ02 的发酵培养基。优化后的培养基为葡萄糖 3%,蛋白胨 1%,酵母膏 2%, NaCl 0.5%。优化

后摇瓶的杀菌效价为 9826 IU/mL,较优化前提高了 47.72%,表明优化后的培养条件非常适合 KJ02 的生长,以及抗菌肽的合成和分泌。根据极差大小可以得出葡萄糖对效价的影响最为显著,这为后期进行发酵补料工艺研究提供了理论依据。

3.2 根据上述优化结果,在 500 L 发酵罐进行了中试水平的验证。经验证其发酵液的杀菌效价可以达到 13651 IU/mL。这表明使用正交设计优化 KJ02 发酵生产抗菌肽培养基准确可靠,具有实际价值,并且在试水平上提高了抗菌肽的发酵效价,为今后大规模工业化的生产抗菌肽提供了基础,具有很好的经济效益、社会效益和发展前景。

## 参考文献

- [1] 单体中,汪以真.抗菌肽 cecropinP1 的研究进展[J].中国收益杂志,2005,39(2):29-32
- [2] BOMAN H G, NILSSON I, RASMUSON B. Inducible antibacterial defence system in drosophila [J]. Nature, 1972, 237(5352): 232-235
- [3] Vunnam S, Iuvvadi P, Merrifield R B. Synthesis and antibacterial action of cecropin and praline-arginine-rich peptides from pig intestine [J]. J Pept Res, 1997, 49(1): 59-66
- [4] WACHINGER M, KLEINSCHMIDET A, WINDERD, et al. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus by suppressing viral gene expression [J]. Journal of General Virology, 1998, 79(4): 731-740
- [5] 刘秀明,万秋,杨晶,王艳芳,等.天蚕素抗菌肽的研究进展[J].动物营养学报,2012,24(1):41-47
- [6] 鲍勇刚,朱馨蕾,刘进,马纪登,等.新疆家蚕抗菌肽(Cecropin-XJ)毕赤酵母高密度发酵条件的研究[J].新疆大学学报(自然科学版),2004,21(3):232-236
- [7] 周宇荀,曹巍,魏东芝,罗清平,等.抗菌肽 Adenoregulin 基因工程菌培养条件的优化及分批发酵研究[J].生物工程学报,2005,21(4):615-621
- [8] MANDELSM. Measurement of saccharifying cellulose [J]. Biotech Bioeng, 1976, 6: 21-34
- [9] 梁洁,彭中键,梁淑娃,等.转基因酵母菌深层发酵生产抗菌肽的研究[J].现代食品科技,2009,25(6):639-640