

固定化枯草芽孢杆菌发酵生产捷安肽素*

付雯^{1,2} 张晓勇¹ 周金燕¹ 钟娟¹ 谭红^{1**}

(¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041; ²中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 采用吸附固定化细胞技术发酵生产捷安肽素. 首先对7种不同的吸附性固体载体进行筛选, 发现木屑作为载体效果最好; 然后通过正交优化实验和单因素实验确定载体木屑的最佳条件为: 粒度0.5~0.6 mm, 添加浓度10 g L⁻¹发酵液. 为避免吸附法固定的菌体细胞从载体上脱落, 尝试在木屑固定化细胞体系中加入粘稠剂以增强吸附性能, 运用单因素实验确定了粘稠剂的种类和浓度, 即为15 g L⁻¹海藻酸钠. 最后应用响应面方法优化固定化细胞发酵培养基及培养条件, 结果表明: 接种量为10%、黄豆粉水解液总氮浓度为1.7 g L⁻¹发酵液、葡萄糖浓度为33.7 g L⁻¹发酵液时捷安肽素的生物效价最大, 达到7 282.08 U, 比非固定化细胞培养提高了53.9%. 图3 表7 参17

关键词 固定化细胞; 捷安肽素; 枯草芽孢杆菌; 木屑; 粘稠剂; 响应面方法

CLC TQ920.1 : S476.8

Jiean-peptide Production by Immobilized Cell Fermentation of *Bacillus subtilis**

FU Wen^{1,2}, ZHANG Xiaoyong¹, ZHOU Jinyan¹, ZHONG Juan¹ & TAN Hong^{1**}

(¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The paper described a novel method for adsorption and application of immobilized cells for Jiean-peptide production. Seven absorptive solids were chosen as the candidate carriers for immobilization of *Bacillus subtilis* cells and among them wood chips were identified as the best. The optimal conditions of wood chips as *B. subtilis* cells' carriers were 0.5~0.6 mm in diameter and 10 g L⁻¹ in fermentation broth, which were determined through single factor and orthogonal experiments. In order to avoid the detachment of the immobilized *B. subtilis* cells from the carriers, different adhesive agents were added into the wood chips to increase its absorption, and 15 g L⁻¹ sodium alginate gel was found to be the best by single factor experiment. Then the optimal fermentation media and conditions were obtained by response surface methodology: 10% inocula, 1.7 g L⁻¹ total nitrogen of soymeal hydrolysate and 33.7 g L⁻¹ glucose in fermentation broth. Under these conditions, the biological potency of Jiean-peptide peaked as high as 7 282.08 U, which was 53.9% higher than that in carrier-free liquid cultivation. Fig 3, Tab 7, Ref 17

Keywords immobilized cell; Jiean-peptide; *Bacillus subtilis*; wood chip; adhesive agent; response surface methodology

CLC TQ920.1 : S476.8

多肽类抗菌素是抗生素中的一类, 主要来自芽孢杆菌. 自从1952年J. Bided等从枯草芽孢杆菌培养液中分离出抗菌肽以来, 已有多种抗菌肽陆续被分离出来. 这些抗菌肽多呈闭合环状, 少数为线形, 多数抗细菌, 仅少数抗真菌. 作者所在实验室研究人员从新疆棉株上分离得到的一株枯草芽孢杆菌(代号ZK)经发酵培养产生一种抗真菌环脂肽, 结构鉴定表明其属于伊枯草菌素(Iturin)家族, 将其命名为捷安肽素(Jiean-peptide). 研究发现, 捷安肽素具有相当广泛的抗真菌特性, 对甜瓜疫霉病、棉花枯黄萎病、番茄立枯病、小麦白粉病和柑橘青霉病等真菌病害都有良好的防治效果, 并且具有稳定性好、低毒的特点, 是一种极具研究和应用开发价值的抗菌肽^[1]. 我们已对捷安肽素进行了发酵菌种诱变^[2]和基本发酵条件优化^[3]等研究, 取得了一定进展, 但其发酵水平仍未达到工业化生产要求.

目前国内外伊枯草菌素的发酵方式分为液体发酵^[4, 5]和固态发酵^[6, 7], 其中液体发酵均是游离细胞培养. 生物表面活性素(Surfactin)是由枯草芽孢杆菌产生的与伊枯草菌素结构相似的环脂肽^[8-10], 因此它们可能具有类似的发酵原理. 在生物表面活性素液体发酵方法优化的研究中发现, 当在发酵培养基中加入多孔固体载体一同培养时, 其产量大幅提高^[11]; 当在另一种脂肽类生物活性剂Serrawettin发酵液中加入硅胶一同培养时, 产量也得到极大提高^[12]. 由此可见, 固体载体可能对脂肽物质的合成具有促进作用, 该过程及原理类似于吸附固定化细胞. 因此, 本研究尝试利用吸附固定化细胞技术发酵生产捷安肽素.

1 材料与方 法

1.1 菌 种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, 代号ZK), 疫霉菌C1 (*Phytophthora* sp., 代号C₁)均为本实验室保藏菌种.

1.2 培养基

摇瓶种子培养基(ρ /g L⁻¹): 葡萄糖 25, 蛋白胨 30,

收稿日期: 2008-03-06 接受日期: 2008-05-06

*中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-YW-G-039-2)资助 Supported by the Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-G-039-2)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: abath@cib.ac.cn)

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3, pH7.0. 摇瓶发酵培养基($\rho/\text{g L}^{-1}$): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.5, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.1, 酵母膏0.8, 葡萄糖33, 黄豆粉水解液的总氮 1.5, pH 7.0.

1.3 发酵方法

1.3.1 非固定化细胞培养方法 将已培养20 h的种子液以10%的接种量接种到发酵培养基(装液量为60 mL/250 mL)中, 在30 °C、150 r/min条件下震荡培养48 h.

1.3.2 固定化细胞培养方法 将已培养20 h的种子液以10%的接种量接种到含有载体的发酵培养基(装液量为60 mL/250 mL)中, 在30 °C、150 r/min条件下震荡培养48 h.

1.3.3 加粘稠剂的固定化细胞培养方法 无菌操作将6 mL培养20 h的种子液在6 000 r/min下离心15 min, 倾去部分上清液, 制成菌悬液, 将该菌悬液先后与一定量载体和一定浓度的粘稠剂混和均匀, 最后将吸附有菌体和粘稠剂的木屑加入到发酵培养基中, 在30 °C、150 r/min条件下震荡培养48 h.

1.4 载体筛选单因素实验

分别将固体载体玉米芯、糠壳、活性炭、木屑、硅藻土、粉煤灰和泡沫等量加入到发酵培养基中, 按照方法1.3.2进行发酵, 根据48 h的生物效价确定最佳的固体载体.

1.5 载体粒度与含量正交优化实验

按 $L_9(3^4)$ 正交设计表(表1)进行实验. 发酵方法见1.3.2. 测定48 h发酵液生物效价, 根据效价大小确定最佳的载体条件.

表1 $L_9(3^4)$ 正交设计实验因素及水平

Table 1 Experimental factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal design

水平 Level	因素 Factor	
	载体粒度 Diameter of carrier (d/mm)	载体含量 Content of carrier ($\rho/\text{g L}^{-1}$)
1	0.5~0.6	10
2	0.6~1	30
3	1~3	40

1.6 载体含量优化单因素实验

将一定粒度的载体分别以5、10、15、20、30、40、50 g L^{-1} 发酵液的量加入到发酵培养基中, 按1.3.2方法进行固定化细胞培养, 由发酵结束时的生物效价确定载体的最佳含量.

1.7 粘稠剂筛选单因素实验

根据无毒、来源广泛、低廉的特点, 选择黄原胶, 海藻酸钠和羧甲基纤维素钠(CMC) 3种粘稠剂进行该实验. 根据粘稠剂的性质, 设计一定的浓度梯度, 按照1.3.3方法进行发酵实验, 由生物效价确定最佳的粘稠剂种类及浓度.

1.8 响应面方法实验设计

以碳源(葡萄糖)、氮源(黄豆粉水解液)和接种量三因素为自变量, 捷安肽素效价为响应值进行三因素三水平的Box-Behnken响应面方法设计. 具体实验设计见表2. 按1.3.3方法进行发酵, 根据实验结果得到二次多元回归方程, 对方程求解可得到响应值最大时所对应的各因素的最优组合, 以模型预测的各因素的最优值组合及任意设定的3组各因素的组合进行发酵实验, 以验证该模型的可靠性并得到最佳的发酵培养基及培养条件.

表2 Box-Behnken实验设计因素及水平

Table 2 Experimental factors and levels of Box-Behnken design

因素 Factor	符号 Symbol	水平 Level		
		-1	0	1
碳源 Carbon source ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	X_1	30	35	40
氮源 Nitrogen source ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	X_2	0.9	1.3	1.7
接种量 Inoculation ($\phi/\%$)	X_3	6%	10%	14%

1.9 菌体干重测定

1.9.1 非固定化细胞培养条件下菌体干重测定 分别取10 mL发酵结束的发酵液和空白发酵培养基于已烘至恒重的离心管(质量为 m_1), 在6 000 r/min下离心15 min, 倾去上清液, 并将离心管烘至恒重(发酵结束的发酵液和空白发酵培养基的质量分别为 m_2 和 m_3), $(m_2 - m_1) - (m_3 - m_1)$ 即为菌体干重.

1.9.2 固定化细胞培养条件下菌体干重测定 利用1.9.1方法分别测得发酵结束时含有载体的发酵液干重 m_4 和仅含有载体的空白发酵培养基的干重 m_5 , $(m_4 - m_5)$ 即为固定化条件下的菌体干重.

1.10 生物效价测定方法 采用改进的管碟法^[13, 14].

2 结果与分析

2.1 不同载体固定化细胞发酵生产捷安肽素

按1.4方法筛选固体载体, 结果见图1. 从图1可以看出, 分别以泡沫、硅藻土和木屑为载体进行固定化细胞发酵的产量均高于对照, 其中木屑效果最佳, 其效价为5 188.48 U, 比非固定化细胞培养的对照提高了14.9%. 同时在实验中发现, 木屑固定化条件下的菌体干重比非固定化条件下提高了73.97%. 因此, 确定木屑为固定化载体.

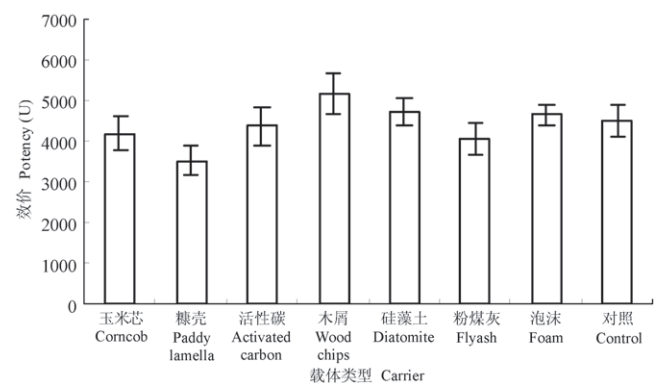


图1 不同载体对捷安肽素效价的影响
Fig. 1 Effect of different carriers on Jian-peptide potency

2.2 木屑粒度与含量正交优化实验结果

载体的性质对固定化发酵相当重要, 按1.5方法进行正交实验, 以确定载体的最佳条件. 实验结果及方差分析见表3和表4. 方差分析表明, 木屑粒度对生物效价影响显著, 而含量影响不显著, 其中当木屑粒度为0.5~0.6 mm时, 生物效价最高, 因此通过正交实验可以确定木屑粒度的最佳条件为0.5~0.6 mm.

2.3 木屑添加量优化单因素实验

根据正交实验结果, 将0.5~0.6 mm的木屑按1.6方法进行发酵实验, 以确定木屑添加的最佳浓度. 实验结果见图2. 从图2可以看出, 当木屑含量为10 g L^{-1} 发酵液时生物效价最高,

表3 $L_9(3^4)$ 正交实验结果
Table 3 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal tests

实验号 Test number	实验因素 Factor		结果 Result 效价(U) Potency
	木屑粒度 Diameter of wood chip	木屑含量 Content of wood chip	
1	1	1	5350.76
2	1	2	5109.2
3	1	3	4803.99
4	2	1	4730.58
5	2	2	4517.02
6	2	3	4118.38
7	3	1	4118.38
8	3	2	4587.11
9	3	3	4055.45

表4 $L_9(3^4)$ 正交实验结果方差分析

Table 4 Analysis of variance of the $L_9(3^4)$ orthogonal test results

方差来源 Variance analysis	偏差平方和 Sum of standard deviation (S)	自由度 Degree of freedom f	均方平方和 Sum of mean square (V)	F值 F test	显著性 Significance
A	1103724.665	2	551862.333	13.185	*
B	268868.43	2	134434.215	3.212	/
误差 Error	167422.956	4	41855.739		
总和 Total	1540016.052	8			

“/”表示因子影响不显著; “*”表示显著 “/”: Not significant; *: Significant

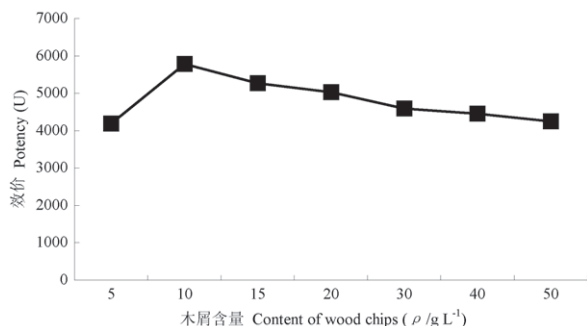


图2 不同含量木屑对效价的影响
Fig. 2 Effect of wood chip content on potency

因此确定木屑的最佳浓度为10 g L⁻¹发酵液。

2.4 加粘稠剂的吸附固定化细胞技术发酵生产捷安肽素

木屑固定化细胞发酵提高了捷安肽素的产量,为了进一步增强这种效果,对其原因进行了分析,认为木屑吸附法固定化细胞,菌体干重提高了73.97%,在一定程度上形成了高密度细胞培养,从而促进了产量的提高,但发现在发酵液内仍有许多游离菌体,这可能是由于吸附法固定化细胞时,菌体与载体之间通过较弱的力结合,吸附不牢固,因此在摇瓶振荡下菌体易从载体上脱落.尝试在木屑吸附固定化细胞体系中加入粘稠剂,以增加木屑空隙中液体介质的粘度,从而增强菌体与载体之间的结合程度。

按1.7方法发酵生产捷安肽素.实验设计及结果见表5.从表5可以看出,含有15 g L⁻¹海藻酸钠的发酵液的生物效价在所有处理中最大,比对照提高了16.6%.虽然黄原胶和羧甲基纤维素钠在设定的浓度范围内处于最高浓度时效价最高,但

若继续以更高的浓度发酵,则粘稠剂不能溶解,无法固定细胞.最终通过单因素实验确定了粘稠剂的种类和浓度,为15 g L⁻¹海藻酸钠.

表5 粘稠剂添加实验结果
Table 5 Results of adhesive agents on potency

粘稠剂种类 Adhesive agent	粘稠剂浓度 Adhesive concentration (ρ/g L ⁻¹)	效价 Potency (U)	效价增量 Increment
黄原胶 Xanthan gum	20	5434.89	-3.03%
黄原胶 Xanthan gum	40	4380.9	-21.8%
黄原胶 Xanthan gum	60	6242.79	+11.4%
黄原胶 Xanthan gum	80	6339.67	+13.1%
CMC	20	5032.13	-10.2%
CMC	40	5691.85	+1.6%
CMC	60	6147.40	+9.6%
CMC	80	6147.40	+9.7%
海藻酸钠 Sodium alginate gel	5	4804.96	-14.3%
海藻酸钠 Sodium alginate gel	10	5604.87	0
海藻酸钠 Sodium alginate gel	15	6537.95	+16.6%
海藻酸钠 Sodium alginate gel	20	6053.46	+8%
对照 Control	0	5604.80	0

2.5 吸附固定化细胞技术发酵培养基及培养条件响应面优化实验

按1.8方法进行响应面设计.实验结果见表6.对实验结果进行多元回归拟合,得到二次多元回归方程如下:

$$Y = 6478.62 - 157.17X_1 + 872.90X_2 - 9.72X_3 - 201.84X_1X_2 + 42.50X_1X_3 - 103.74X_2X_3 - 337.32X_1^2 - 317.98X_2^2 - 578.92X_3^2$$

表6 发酵培养基和条件的Box-Behnken实验设计及结果
Table 6 Fermentation media and condition experiment design and corresponding results of Box-Behnken

实验编号 Test number	因素水平 Level			发酵液效价 Potency (U)
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	5189.52
2	-1	1	0	7170.80
3	1	-1	0	4879.52
4	1	1	0	6053.46
5	0	-1	-1	4517.92
6	0	-1	1	4731.54
7	0	1	-1	6639.40
8	0	1	1	6438.04
9	-1	0	-1	5604.88
10	1	0	-1	5604.88
11	-1	0	1	5434.88
12	1	0	1	5604.88
13	0	0	0	6438.04
14	0	0	0	6339.66
15	0	0	0	6537.96
16	0	0	0	6438.04
17	0	0	0	6438.04

(Y为发酵液效价, X_1 、 X_2 和 X_3 分别对应发酵培养基碳源葡萄糖浓度、氮源黄豆粉水解液浓度和接种量)

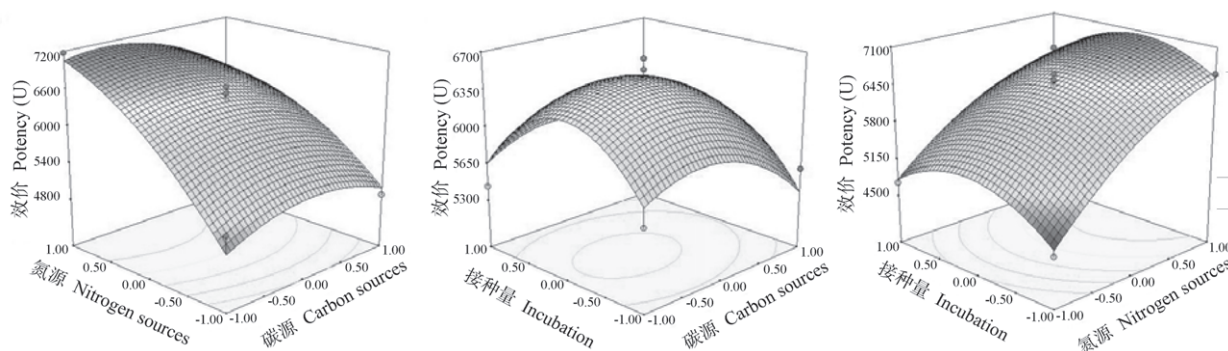


图3 碳源、氮源和接种量交互影响捷安肽素效价的曲面图

Fig. 3 Response surface stereogram related to fermentation potency of carbon sources, nitrogen sources and inoculation amount

该模型 P 值为0.000 7, 小于0.01, 说明该模型在 $\alpha = 0.01$ 水平上显著. 同时该模型相关系数 R^2 为0.954 6, 大于0.900 0, 说明该模型的预测值与试验值具有较好的相关性.

对上述多元回归方程作响应曲面, 各因素的交互影响结果见图3, 通过图形可以直观地得到响应值和实验参数之间的关系. 从图3可以看出, 当碳源、接种量和氮源分别取中间水平和最高水平时, 响应值最大.

对二次多元回归方程求偏导等于0, 解得当 $X_1 = -0.23$, $X_2 = 1.01$, $X_3 = -0.02$ 时, Y 具有最大值. 这与图形的直观分析相吻合. 转换后可获得最佳发酵条件为: 葡萄糖 33.85 g L^{-1} (发酵液), 黄豆粉水解液的总氮 1.7 g L^{-1} (发酵液), 接种量10%.

对模型进行验证实验, 实验设计及结果见表7. 从表7可以看出, 实际值与预测值的误差均在5%内, 说明该模型能够较好地模拟各影响因子对效价的影响.

表7 模型验证实验设计及结果

Table 7 Experiment design and results of validation of model

实验号 Test	因素 Factor			效价 Potency (U)	
	X_1	X_2	X_3	预测 Forecasted	实际 Real
1	-0.23	1.01	-0.02	7103.53	7282.08
2	-0.4	0.5	0	6884.84	6639.41
3	0.4	-0.5	1	5356.44	5434.89
4	0	0	0	6478.62	6405.42

根据响应面实验结果, 葡萄糖浓度为 33.85 g L^{-1} 发酵液、黄豆粉水解液总氮浓度为 1.7 g L^{-1} 发酵液、接种量为10%时, 捷安肽素效价具有最大值, 为7 282.08U, 比非固定化细胞培养提高了53.9%.

3 小结

关于利用固定化技术发酵生产伊枯草菌素, 国内外尚未见报道. 本实验首次通过吸附固定化技术并添加粘稠剂的方法发酵生产伊枯草菌素类环脂肽物质——捷安肽素, 使其生物效价提高了53.9%. 该操作简单, 易行, 易于放大, 所用材料无毒, 来源广泛且生产成本低.

本研究首次将响应面方法设计应用于固定化细胞发酵生产伊枯草菌素类环脂肽物质的培养基及培养条件的优化实验, 建立二次多元回归方程来拟合各因素与响应值之间的函数关系, 并通过求偏导获得了各因素的最优水平, 验证实验结果表明, 响应面优化后获得的实际值与预测值之间拟合

程度较好. 该方法快速、有效, 为传统方法所不能比拟^[15-17], 是一种具有巨大应用潜力的微生物发酵条件优化的实验方法.

References

- Cao TT (曹婷婷), Zhou JY (周金燕), Zhong J (钟娟), Tan YY (谭悠久), Fu W (付雯), Tan H (谭红). Postharvest biological control of green and blue mold of citrus fruit by Jian-peptide and its possible antifungal mechanism. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (2): 192~197
- Zhong J (钟娟), Zhou JY (周金燕), Tan H (谭红). Mutation breeding a strain producing high-yield Jian-peptide, an antifungal peptide. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2004, **10** (1): 204~107
- Lai YN (赖娅娜), Tan H (谭红). Fermentation conditions for antifungal polypeptide Jian-peptide. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2004, **10** (2): 231~235
- Akihiro O, Takashi A, Makoto S. Effect of temperature change and aeration on the production of the antifungal peptide antibiotic Iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in liquid cultivation. *J Ferment Bioeng*, 1993, **75** (6): 463~465
- Choukri H, Philippe J, Hary R, Mpanya KM, Eric M, Michel P, Philippe T. Influence of the production of two lipopeptides, Iturin A and Surfactin S1, on oxygen transfer during *Bacillus subtilis* fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **57/58**: 571~579
- Akihiro O, Takashi A, Makoto S. Use of soybean curd residue, Okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, Iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. *Proc Biochem*, 1996, **31** (8): 801~806
- Akihiro O, Takashi A, Makoto S. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, Iturin A and Surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *J Ferment Bioeng*, 1995, **80** (5): 517~519
- Gu ZR (顾真荣), Wu W (吴畏), Gao XH (高新华), Ma CZ (马承铸). Antifungal substances of *Bacillus subtilis* strain G3 and their properties. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2004, **34** (2): 166~172
- Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, Ptak M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of Iturin A. *Biochim*, 1992, **74**: 1047~1051
- Catherine S, Francoise P, Georges M. Coproduction of surfactin and Iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by

- Bacillus subtilis*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1990, **12**: 370~375
- 11 Mao SY, Yu HW, Jo SC. Enhanced production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnol Prog*, 2005, **21**: 1329~1334
- 12 Yamashita M, Nakagawa Y, Li H, Matsuyama T. Silica gel-dependent production of prodigiosin and serrawettins by *Serratia marcescens* in a liquid culture. *Microb Environ*, 2001, **16**: 250~254
- 13 微生物研究法讨论会[日]. 微生物学实验法. 北京: 出版社, 1981
- 14 Zhong J (钟娟). Study and improvement of a strain producing Jian-peptide: [Master's Degree Dissertation]. Chengdu, China (成都): Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences (中国科学院成都生物研究所), 2003
- 15 Xu GY (徐广宇), Luo JM (骆健美), Yang DS (杨德山), Wang M (王敏). Optimization of Natamycin fermentation culture media and conditions. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2007, **27** (4): 73~78
- 16 Jiang YX (江元翔), Gao SH (高淑红), Chen CH (陈长华). Optimization of medium components for adenosine production by *Bacillus subtilis* using response surface design. *J East China Univ Sci & Technol* (华东理工大学学报), 2005, **31** (3): 309~313
- 17 Yang WQ (杨文清), Hu J (胡晋), Wu B (吴斌), Zhang S (张胜), Song WJ (宋文坚). Combining response surface analysis and principal component analysis to optimize the combination of GA₃ concentration in film coating and storage time of coated seed in cucumber. *J Biomathematics* (生物数学学报), 2007, **22** (2): 323~328