

溶氧对变溶菌素发酵的影响

刘同军¹ 徐文琳¹ 孙文波² 张玉臻¹

¹(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

²(广西省科学院 南宁 530000)

关键词 溶氧,变溶菌素,发酵,球孢链霉菌 S186

中图分类号 Q817 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)02-0229-03

变溶菌素是由球孢链霉菌产生的一种胞外溶菌酶群。它包括几种不同类型的溶菌酶,有着广阔的用途和良好的应用前景。许多研究结果^[1,2]表明,它比卵清溶菌酶有更为广泛的溶菌谱,应用范围更广,尤其是在预防和治疗龋齿^[3]方面有其独特的优点。在医药上可用作灭菌剂,也可用其作用于不同菌体的细胞壁而分解产生有活性的免疫佐剂^[4];其重要的学术价值表现在可以作为工具酶来制备原生质体、提取质粒 DNA 和天然蛋白质以及用来研究细菌细胞壁的结构^[5]。日本、美国和德国等国家已做了很多这方面的研究,并在应用上取得了一些进展。但是我国至今还停留在基础研究阶段^[6,7],特别是对其发酵条件还不够了解。

在变溶菌素发酵的各种工艺参数中,技术关键之一就是氧供应。氧对变溶菌素发酵有着极为重要的影响。本文首先利用摇瓶研究了不同装液比、摇床转速对变溶菌素发酵的影响,进而用 3L 发酵罐初步探讨了通气量和搅拌转速这两个最重要因素对溶氧以及溶氧对变溶菌素发酵的影响。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株:变形链球菌(*Streptococcus mutans*)Ingbritt 由日本九州大学齿学部赠送。球孢链霉菌(*Streptomyces globisporus*)S186 为本室分离筛选并鉴定。

1.1.2 培养基:参见文献[7]。

1.1.3 主要仪器:Biostat B 3L 全自动发酵罐(德国 B. Braun 公司产品),实际装量 2 L。LG10-2.4A 型离心机(北京医用离心机厂产品)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的收集:变形链球菌 37℃ 静置培养 48 h,5000r/min 离心 20min,蒸馏水洗 2 次,再用 pH5.6,0.05 mol/L 磷酸缓冲液稀释至 OD_{580nm} 值为 0.8 左右,冷藏备用。

1.2.2 变溶菌素活性的测定方法:将球孢链霉菌 S186 的孢子悬浮液接入种子培养基,30℃,200r/min 振荡培养 24 h,

再以 10% 的接种量接入发酵培养基中,同样条件下培养 96 h,过滤离心去沉淀,所得上清液即为变溶菌素粗提液。将 0.05 mL 备用变形链球菌悬液及 1 mL 适当稀释的变溶菌素粗提液加入 5 mL pH5.6 醋酸-醋酸钠缓冲液中,55℃ 保温 10 min,测保温前和保温后的 OD_{580 nm} 值,每分钟使反应液浊度降低 0.001 个 OD 值单位的变溶菌素量定义为一个活性单位。变溶菌素活性(u/mL) = (OD_{0'} - OD_{10'})1000/10。

1.2.3 菌体生物量的测定:定时取一定量的发酵液 6000 r/min 离心 20 min,用蒸馏水洗 2 次,将沉淀 85℃ 烘干至恒重。

1.2.4 发酵液中残糖含量的测定:见文献[8]。

1.2.5 体积溶氧系数 K_La 的测定:采用亚硫酸钠氧化法测定 3L 发酵罐的 K_La,详细实验程序及计算公式参见文献[9],略作改动。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶实验探讨氧对变溶菌素发酵的影响

一定温度下溶氧是装液比(培养液装量/三角瓶体积)和摇瓶转速的函数,如果摇床转速固定则装液比就会直接影响到培养液中的溶氧情况,同样,如果固定装液比则溶氧就会成为摇床转速的函数。虽然利用摇瓶并不能直接地研究出溶氧与菌体生长、变溶菌素产量之间的关系,但利用摇瓶实验还是可以观察到大体趋势的,尤其是在实验室基础研究阶段。

2.1.1 装液比对变溶菌素产量的影响:在 300 mL 三角瓶中分别加入不同体积(10,20,30,40,60,80 mL)的培养基,其余条件均相同,培养 4 d,测变溶菌素活性。结果如图 1,较小的装液比有利于变溶菌素的产生。在培养基装量为 20 mL/300 mL 时,变溶菌素产量最高。在装量为 10 mL/300 mL 时变溶菌素产量反而下降的原因主要是培养基水分挥发过度所致。

收稿日期:1999-03-25,修回日期:1999-10-28。

基金项目:山东省自然科学基金和山东省科委资助项目。

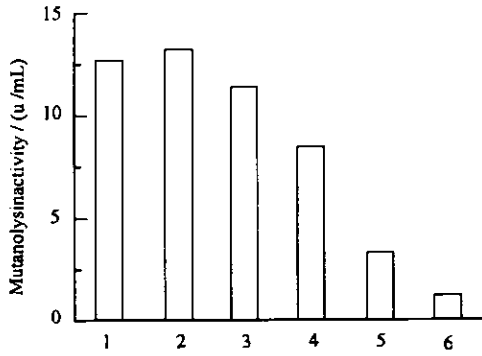


图 1 装液比对变溶菌素产量的影响

Medium volume/(mL/300 mL):

1. 10; 2. 20; 3. 30; 4. 40; 5. 60; 6. 80

2.1.2 摇床转速对变溶菌素产量的影响: 在其余条件均相同而摇床转速不同(100, 120, 160, 200, 240 r/min)的情况下培养 4 d, 测定变溶菌素活性, 结果(见图 2、图 3)显示, 随着摇床转速的提高, 球孢链霉菌的菌体量及变溶菌素的产量都有明显提高。上述摇瓶实验结果显示, 溶氧的提高有利于变溶菌素的产生。

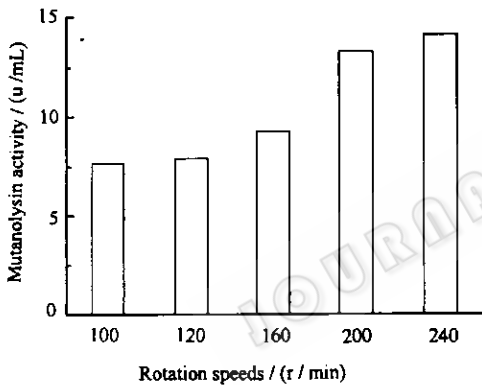


图 2 摇床转速对变溶菌素活性的影响

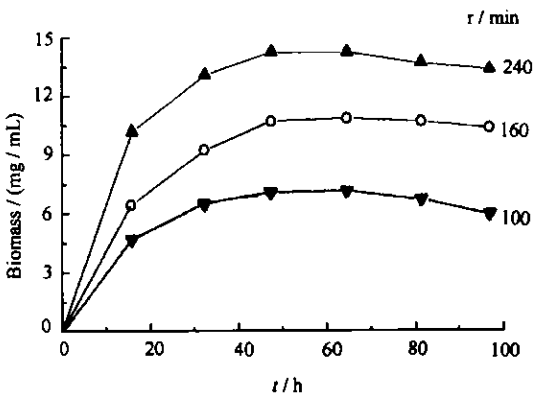


图 3 摇床转速对球孢链霉菌 S186 菌体生长的影响

2.2 利用 3L 发酵罐研究溶氧对变溶菌素的影响

2.2.1 通气量对变溶菌素发酵的影响: 在实装量为 2L 的发酵罐中, 将搅拌转速固定在 200 r/min, 研究了不同通气量对变溶菌素的影响。结果如表 1 所示。

表 1 不同通气量对变溶菌素发酵的影响

Batch	97001	97002	97003	97004	97005
Aeration rate/(L/min)	0.5	1	2	3	4
Fermentation time/h	99	96	96	93	88
Mutanolysin activity/(u/mL)	1.2	19.0	18.1	14.0	8.0

上述各罐均以残糖 ≤ 0.1% 为发酵终点。由结果看出, 通气量必须适宜, 采用 1L/min ~ 2L/min 的通气量比较合适。

2.2.2 搅拌转速对变溶菌素发酵的影响: 将通气量固定在 1L/min, 探讨了不同搅拌转速(100, 300, 500 r/min)对变溶菌素发酵的影响。实验结果如表 2 所示。从表 2 可知, 最佳搅拌速度为 200 r/min。

表 2 不同搅拌转速对变溶菌素发酵的影响

Batch	97001	97002	97003	97004	97005
Aeration rate/(r/min)	100	200	300	400	500
Fermentation time/h	98.5	96	90	83	77
Mutanolysin activity/(u/mL)	4.8	19.0	14.8	10.5	7.0

2.2.3 通气量、搅拌转速对体积溶氧系数 K_La 的影响: 尽管亚硫酸钠氧化法测量的是发酵罐中亚硫酸盐的 K_La , 不是实际发酵液中所表现出来的 K_La , 而且不同方法测得的 K_La 值不尽相同, 但它仍具有参比的意义, 其实用价值不可低估^[9]。结果见表 3。只提高通气量, 由于与发酵液接触面小很难提高溶氧量, 而且还会引起逃液。而适当加大搅拌速度, 将气泡打碎, 使空气同发酵液接触面加大, 从而提高了溶氧系数。实验表明在 200r/min 条件下通气量 1:0.8(液体: 空气)较好。

表 3 通气量、搅拌转速对体积溶氧系数 K_La 的影响

Aeration rate/ (L/min)	Agitation rate/(r/min)				
	100	200	300	400	500
1	14.29	42.86	78.57	152.86	150.00
2	32.86	75.82	135.44	164.29	164.29
3	64.30	121.43	132.86	152.86	164.29

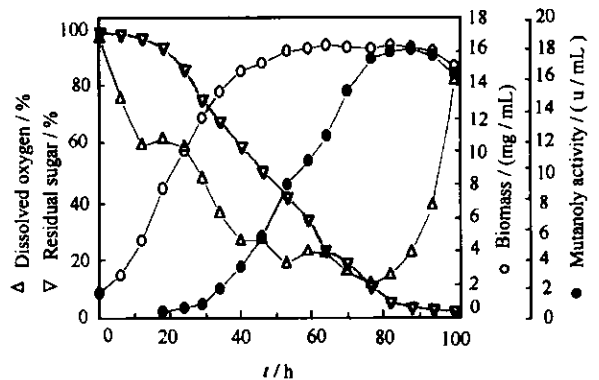


图 4 最适条件下变溶菌素发酵进程曲线

2.2.4 最佳通气量、搅拌转速条件下整个发酵过程中的溶氧、菌体生物量、残糖和变溶菌素产量等的变化规律:在最佳条件下,不同阶段,氧的供求情况总在发生变化。发酵前期(0~40 h)球孢链霉菌处于指数生长期,碳源消耗速率很快,菌体生长需氧量大于氧供应量,溶氧急剧下降,同时粘度的迅速增大,也影响了氧的进一步溶解,进入菌体生长稳定期后,菌体需氧量略有减少,变溶菌素开始形成并分泌。40

h后溶氧维持在一定水平,略有波动,大约在90 h迅速回升。变溶菌素的产量在72 h后逐渐达到最高值(见图4)。

多次实验结果显示,溶氧过高或过低对菌体生长和变溶菌素的积累都有很大的影响。溶氧过高,只长菌而不产变溶菌素或产量很低,溶氧不足则使菌体生长受到抑制,进而影响到变溶菌素的产生。

参 考 文 献

- [1] Yokogawa K, Kawata S, Yoshimura Y. *Agr Biol Chem*, 1972, 36(12): 2055~2065
- [2] Yokogawa K, Kawata S, Yoshimura Y. *Agr Biol Chem*, 1973, 37(4): 799~808
- [3] Yokogawa K, Kawata S, Nishimura S. *et al. Antimicrob Agents Ch*, 1974, 6(2): 156~165
- [4] Ogawa T, Shimauchi H, Furuta R. *Vaccine*, 1995, 13(10): 887~889
- [5] Bronneke V, Fiedler F. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(3): 785~791
- [6] 张玉臻, 刘同军, 宋庆训. 食品与发酵工业, 1997, 23(6): 16~19
- [7] 刘同军, 张玉臻, 徐文琳. 食品与发酵工业, 1999, 25(3): 5~9
- [8] 张龙翔. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1981, pp. 9~11
- [9] 伦世仪. 生化工程. 北京: 中国轻工业出版社, 1993, pp. 66~67

Effect of Dissolved Oxygen on Mutanolysin Fermentation

LIU Tong-Jun¹ XU Wen-Lin¹ SUN Wen-Bo² ZHANG Yu-Zhen¹

¹(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

²(Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530000)

Abstract Effects of several parameters relating to dissolved oxygen(DO) on mutanolysin fermentation were studied. The experiment using shake flasks shows that the medium volume and shaker agitation speed affect the production of mutanolysin. At the same time, the agitation rate together with aeration rate has effects on DO in fermentor. Mutanolysin fermentation was affected by DO greatly. Oxygen is a key restricted factor in mutanolysin fermentation. It affects the metabolism and physiological action of *Streptomyces globisporus* S186. Whatever the DO is excessive high or low, it won't benefit the mutanolysin production. If DO is super, *S. globisporus* S186 will grow luxuriantly but do not produce mutanolysin, while if DO is lower, the *S. globisporus* S186 won't grow well even not to produce mutanolysin. During the course of fermentation, the DO changed regularly. It is similar to many antibiotic fermentation and some amino acid fermentation. As *S. globisporus* S186 grow in exponential phase, DO begin to decrease rapidly from 6 h and get to the lowest point at 40 h or so. Subsequently mutanolysin starts to be produced. DO rises again from 90 h. The key technology of oxygen control in the fermentation is to keep the DO at a suboptimum level. In order to get a high mutanolysin yield, during the culture in fermentor the agitation rate and aeration rate should be kept at 200 r/min and 1:0.8 (V: V) respectively.

Key words Dissolved oxygen, mutanolysin, fermentation, *Streptomyces globisporus* S186