

基于快速筛选的纳他霉素产生菌的微量培养

骆健美^{1,2,3*} 刘峰³ 张俊威³ 李建姝³ 王建锋³ 王敏^{1,2,3}

(1. 工业微生物教育部重点实验室 天津 300457)

(2. 天津市工业微生物重点实验室 天津 300457)

(3. 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

摘要: 以纳他霉素产生菌——褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*)为研究对象,以96深孔板为载体,建立适合大规模菌株快速筛选的微量培养体系。首先用8层纱布外加有孔不锈钢盖子较好地解决了水分蒸发及交叉污染的问题;确定了深孔板装液量600 μL、转速300 r/min、振幅40 mm的最佳培养条件,此时菌体生长和产物合成的变化趋势均与摇瓶培养过程非常类似。实验发现微量培养体系的最大板内和板间差异分别为1.93%和6.62%,通过统计学软件分析,两种不同培养体系下获得的菌株产量之间具有极显著的线性回归关系($F = 39.303, P = 0.00 < 0.01$),产量分布的排序大致相同,这表明微孔板作为培养体系,具有标准化、平行化等优点,能很好地应用于大量菌株的快速筛选。

关键词: 快速筛选, 微量培养, 纳他霉素, 褐黄孢链霉菌, 深孔板

The Micro-cultivation of Natamycin-producing Strains for Rapid Screening

LUO Jian-Mei^{1,2,3*} LIU Feng³ ZHANG Jun-Wei³ LI Jian-Shu³
WANG Jian-Feng³ WANG Min^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China)

(3. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: As natamycin-producing strain, *Streptomyces gilvosporeus* was studied to develop the micro-cultivation system in 96 deep-well microplates for rapid screening from a large number of isolates. Firstly, the stainless steel cover perforated with holes and dressed with eight gauzes was designed to solve water evaporation and cross-contamination in 96 deep-well microplates. The optimal conditions for micro-cultivation were as follows: culture volume 600 μL, shaking speed 300 r/min, shaking diameter 40 mm, and the pattern of microbial growth and natamycin biosynthesis with the above micro-cultivation mode was quite similar with that in shake flasks. It was found that the maximum intra-microplate and inter-microplate difference were 1.93% and 6.62%, respectively. Using the statistic software analysis, the productivity in 96 deep-well microplates were in good linear correlation with

those in shake flasks ($F = 39.303$, $P = 0.00 < 0.01$) and the rank of production distribution in two different cultivation systems was consistent. Therefore, the micro-cultivation in microplates was proved to be good standardization and parallelization, which was potential to be applied in rapid screening from a large number of strains.

Keywords: Rapid screening, Micro-cultivation, Natamycin, *Streptomyces gilvosporeus*, Deep-well microplate

近年来,以微孔板为操作平台的微型培养技术得到了广泛的关注,微孔板作为一种能够提供具有相同形状和流体动力学特性的微型反应器,具有平行化、微量化和集约化的优点^[1-3]。目前已在菌种的复制和保藏^[4]、基因工程菌培养^[5]、新型药物开发^[6-7]等领域得到应用。

纳他霉素(Natamycin)是一种高效、广谱的抗真菌抗生素,美国食品药品监督管理局和我国卫生部先后于1982和1996年正式批准其作为食品防腐剂^[8]。本文以纳他霉素产生菌-褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*)为研究对象,探讨适合大规模菌株快速筛选的微量培养体系的建立。将传统筛选方法中在平板、试管或者摇瓶上进行的菌体培养和产物积累过程转移到微孔板中,这样不仅大大节省了培养的空间、时间和原料成本,而且能同时处理多个样品。更重要的是,板中每个微孔进行的液体培养,能很好地克服现有琼脂块法筛选时其固体培养方式与实际摇瓶液体发酵有很大差别而增大实验误差的缺点,尽可能的避免漏选和错选。此外,实验室已建立了基于抑菌活性的纳他霉素微孔板生物检测方法^[9],这些都为处理量大、快速且具有较高准确度的筛选方法的最终建立奠定了良好的基础。

本实验采用96深孔板作为纳他霉素产生菌的培养平台,通过微孔板上设计闭合体系,较好的解决了微量液体培养过程中因为剧烈振荡导致的板孔间的交叉污染、培养液的过度挥发等问题,实现了不同菌株的同步液体培养。同时,针对微量培养体系中溶氧较差的问题对一些重要的工艺参数如装液量、摇床转速和振幅进行了系统优化,验证了深孔板微量培养体系用于菌株快速筛选的可行性和有效性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试验菌株: 褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gil-*

vosporeus) SG2002及其各种突变株,天津科技大学微生物制药研究室保存。

1.1.2 培养基: 褐黄孢链霉菌的斜面培养基、平板分离培养基、种子培养基和发酵培养基均参照文献^[10]。

1.2 实验方法

1.2.1 褐黄孢链霉菌的摇瓶发酵: 从甘油管吸取已制备好的浓度为 10^8 个/mL孢子悬浮液0.01 mL,接种到斜面培养基上,29°C恒温培养5-7 d至斜面长满孢子。用接种铲接种一铲至装有30 mL种子培养基的250 mL三角瓶中,29°C、200 r/min振荡培养至40 h左右。以10%的接种量转接到装液量50 mL的500 mL三角瓶中,3个平行样,29°C、200 r/min回转式摇床发酵96-120 h。

1.2.2 褐黄孢链霉菌的深孔板微量培养: 将菌株在装有平板分离培养基的微孔板上进行培养,然后用无菌牙签一一对应的点接到装有发酵培养基的另一块微孔板各孔中,3个平行样,在适宜的装液量、摇床转速和振幅条件下振荡培养96-120 h,考察产物合成的情况。

1.2.3 菌体干重的测定: 摇瓶发酵后的菌体干重采用布氏漏斗抽滤法测定。首先将滤纸预先于烘箱105°C烘1 h至恒重,称重后放入布氏漏斗。取5 mL发酵液加入布氏漏斗抽滤,将滤纸和菌体在烘箱中50°C烘干至恒重,称量并计算菌体干重。由于深孔板装液量小,微量培养后采用从10个平行样中各取200 μ L发酵液混合,加入布氏漏斗抽滤,50°C烘干,称量并计算菌体干重。

1.2.4 残糖的测定: 利用SBA生物传感分析仪测定^[10]。

1.2.5 纳他霉素产量的测定: 采用高效液相色谱法^[11]。

2 结果与讨论

2.1 深孔板盖子的设计

实验发现,原始的深孔板盖子在培养4-5 d后微孔内的水分挥发非常厉害,对数据测定产生较大

干扰。而文献[4]报道的三明治式盖子虽然效果良好,但结构复杂,成本高。根据其原理,本实验先于深孔板上铺放 8 层纱布,再用一块不锈钢盖盖紧,该盖子上钻有 96 个直径为 1 mm 的圆孔,圆心与 96 深孔板各孔的中心重合。实验考察了以上设计的盖子在减少水分蒸发及交叉污染方面的效果。

2.1.1 深孔板盖子对水分挥发的影响: 由于深孔板各孔的装液量较小,直接测水分挥发率比较困难,因此采用空白样测糖度法的方法换算出挥发率。计算公式如下:

$$\text{挥发率}(\%) = \left(1 - \frac{C_1}{C_F}\right) \times 100\%$$

其中, C_1 和 C_F 分别为培养前、后培养液中的糖浓度(mg/L)。

实验分别采用 18 层纱布和以 8 层纱布 + 打孔的不锈钢盖作为微孔板盖子进行微量培养,水分挥发的情况见表 1。由表 1 可知,采用 18 层纱布作为盖子,深孔板不同装液量下的水分挥发情况都比较严重,挥发率均超过 40%,有的甚至达到 80%以上;而采用自行设计的 8 层纱布 + 打孔的不锈钢盖后,深孔板各装液量下的水分挥发情况得到了较好的控制,挥发率大幅度降低,在装液量 400–800 μL 时均控制在 10%左右。

表 1 不同微孔板盖子微量培养时水分挥发的情况
Table 1 The water evaporation in micro-cultivation with different covers

培养液体积 Culture volume (μL)	挥发率 Evaporation ratio (%)	
	18 层纱布 Eighteen gauzes	8 层纱布+打孔的不锈钢盖子 Stainless steel cover perforated with holes and dressed with eight gauzes
300	82.4 \pm 8.3	18.5 \pm 2.4
400	65.5 \pm 4.9	12.4 \pm 1.7
500	53.6 \pm 3.3	11.3 \pm 1.1
600	51.9 \pm 2.8	8.7 \pm 0.6
700	46.3 \pm 3.7	8.1 \pm 0.8
800	42.4 \pm 5.4	9.5 \pm 1.7

2.1.2 深孔板盖子对交叉污染的影响: 向深孔板各孔的无菌发酵培养基中交替接入褐黄孢链霉菌,即接菌孔与空白孔交替存在,于 29 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 300 r/min、振幅 40 mm 的条件下振荡培养,镜检观察各深孔中的菌体情况。结果发现,接菌孔中的培养液中出现了大量的褐黄孢链霉菌,培养液变得浑浊;而只

装有发酵培养基的空白孔培养结束后仍保存澄清,显微镜下观察并没有受到邻近接菌孔的污染。这说明实验设计的盖子不仅能解决微量培养过程中液体挥发的问题,还能很好地防止邻近微孔的交叉污染。

2.2 褐黄孢链霉菌的微量培养体系

2.2.1 深孔板装液量的确定: 实验采用的 96 方型深孔板 28.2 mm \times 86.0 mm \times 44.0 mm 的最大装液量约为 2.2 mL,不同装液量对纳他霉素合成的影响见图 1。由图 1 可知,装液量为 300、400 和 500 μL 时,实验结果的误差较大,相对标准偏差(RSD)分别为 6.8%、7.1% 和 8.1%,均超过 5%。这可能是因为装液量较小,随着培养时间的延长微孔中的水分挥发情况比较严重(由表 1 可知,此时挥发率均超过 10%),对实验结果产生显著干扰。当装液量为 600 μL ,纳他霉素的产量达到最大,为 1190 mg/L,且误差值较小(RSD 为 2.9%),进一步增大装液量,纳他霉素的产量开始下降,这可能与溶氧的下降有关。因此,选择 600 μL 为合适的装液量。

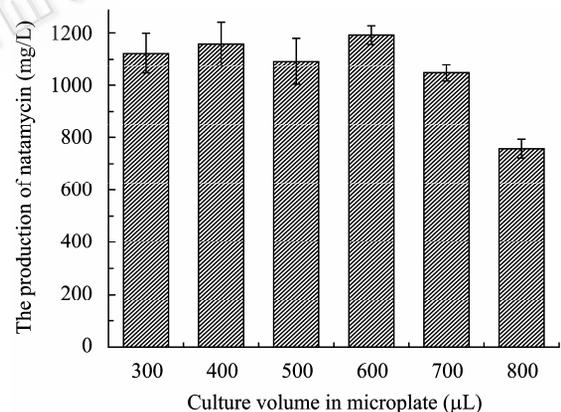


图 1 不同装液量对深孔板微量培养纳他霉素产量的影响
Fig. 1 Effects of culture volume on natamycin productivity in 96 deep-well microplates

2.2.2 摇床转速和振幅的确定: 回旋式摇床的转速和振幅对微量培养的影响如图 2 所示。当振幅直径小于 30 mm 时,转速从 150 r/min 增大到 250 r/min 对纳他霉素的合成几乎没有明显的影响,进一步增大转速,纳他霉素的积累量逐渐增加,且随着振幅直径的增大,产物合成速率明显提高。这可能是因为微孔板的横截面积较小,存在一定的表面张力,当振幅和转速较小时,产生的离心力不能克服液面的表面张力,培养体系的溶氧值较低,影响产物

的合成^[1-2]。当振幅直径增大为40 mm, 转速从250 r/min增加到300 r/min时, 深孔板中纳他霉素的产量从410 mg/L急剧增加到1368 mg/L。这可能是由于振幅和转速的增大产生的离心力克服了液面表面张力的作用, 提高了培养体系中的溶氧水平, 从而促进了纳他霉素的合成。由图2可知, 在40 mm的振幅下, 继续提高转速, 纳他霉素的产量变化不大, 但却会增大摇床的负荷, 而且还容易使培养液外溢, 大大增加各孔的交叉感染和从空气中感染杂菌的几率。因此, 转速确定为300 r/min, 振幅直径40 mm。

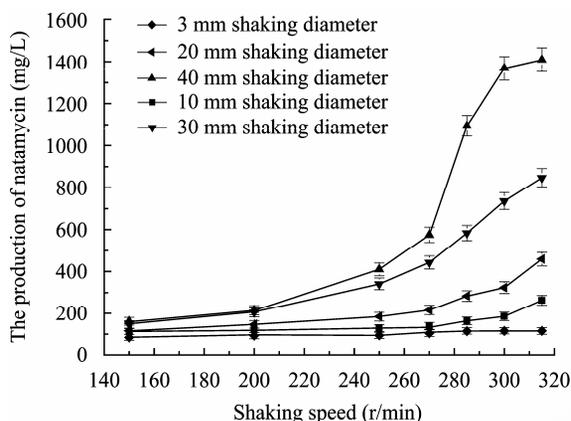


图2 振幅与转速对深孔板微量培养纳他霉素产量的影响
Fig. 2 Effects of shaking diameter and shaking speed on natamycin productivity in 96 deep-well microplates

2.3 深孔板微量培养体系用于菌株快速筛选的可行性分析

2.3.1 深孔板微量培养的板内差异: 同一深孔板不同板孔位置对微量培养的影响见表2。由表2可知, 3个突变株在不同位置的微孔中培养得到的纳他霉素产量相对标准偏差(RSD)分别为1.35%, 1.93%, 0.72%, 这说明深孔板微量培养体系的板内差异较小, 微孔板上的各微孔作为一种具有相同形状和流体动力学特性的微型反应器能很好的应用于菌株的培养和快速筛选。

菌株 Strain	纳他霉素产量 Natamycin production (mg/L)					RSD (%)
	A ₁₋₄	A ₉₋₁₂	D ₅₋₈	H ₁₋₄	H ₉₋₁₂	
SG2-UV-3	934.27	938.56	919.24	935.88	954.61	1.35
SG3-A ⁻ -7	1130.82	1083.54	1132.32	1104.19	1129.61	1.93
SG4-P ⁻ -28	803.23	814.48	809.82	816.86	817.06	0.72

2.3.2 深孔板微量培养的板间差异: 由表3的结果可知, 不同菌株经微量培养后产生的最大板间差异小于7%, 平均RSD为5.09%, 这说明板间差异较小。

深孔板 Deep-well plate	纳他霉素产量 Natamycin production (mg/L)							
	SG4-P ⁻ -22	SG6-P ⁻ -78	SG8-P ⁻ -54	SG5-A ⁻ -212	SG7-A ⁻ -96	SG2-UV-128	SG2-UV-79	SG3-A ⁻ -303
1	1065.63	782.14	865.26	1147.92	1139.57	1261.71	1393.21	725.76
2	1193.52	738.62	943.65	1246.52	1195.98	1268.82	1286.46	821.83
3	1139.56	758.53	932.54	1195.84	1119.53	1183.03	1267.86	792.02
4	1192.93	839.47	898.46	1285.49	1294.90	1164.75	1386.86	789.36
RSD (%)	5.26	5.59	3.90	4.91	6.62	4.38	4.92	5.17
The average of RSD (%)	5.09							

2.3.3 深孔板微量培养与摇瓶培养的比较: 褐黄孢链霉菌在摇瓶和深孔板微量培养体系下的代谢过程如图3和图4所示。由图3可知, 在深孔板微量培养和摇瓶培养过程中, 菌体在0-40 h具有几乎相同的生长速率, 且均在40 h左右达到了最大(19.0 g/L), 培养40 h以后, 菌体干重基本维持不变。纳他霉素的产

量均在15-100 h之间快速积累, 其中摇瓶培养过程中的产物合成速率要明显大于微量培养体系, 培养结束时深孔板中纳他霉素的产量约是摇瓶发酵产量(2359 mg/L)的1/2, 为1200 mg/L。摇瓶中残糖量在发酵后期基本耗完, 而深孔板中的残糖量有剩余, 约为8.0 g/L。由图4可知, 深孔板微量培养过程的菌丝

体变化情况与摇瓶培养过程基本一致, 在38 h左右菌丝体最为茂密和粗壮, 104 h左右菌丝体变得细小, 且出现断裂和自溶现象, 这与图3中菌体干重曲线的变化符合。综上所述, 褐黄孢链霉菌在深孔板微量培养体系下的菌体生长和产物合成情况与摇瓶培养具有一定的相似性, 采用深孔板作为发酵培养的载体是可行的。

2.3.4 深孔板微量培养与摇瓶培养的相关性: 选取14株不同生产水平的突变株分别进行深孔板微量培养和摇瓶培养, 结果见图5。由图5可知, 同一菌株分别经深孔板微量培养和摇瓶培养后获得的产物产量之间存在着很好的对应性。用SPSS统计软件对以上数据进行分析发现(表4), $F=39.303$, $P=0.00 < 0.01$, 这说明两种不同培养体系下获得的菌株产量之间具有极显著的线性回归关系, 产量分布的排序大致相同, 因此采用深孔板的微量培养体系用于大量菌株的快速筛选是可行和有效的。

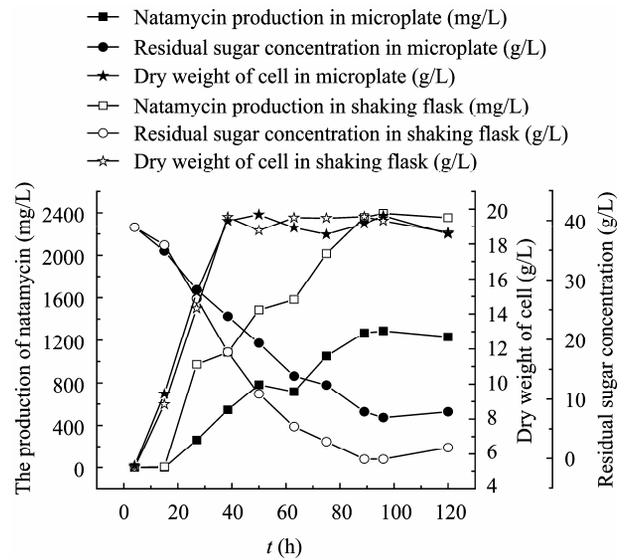
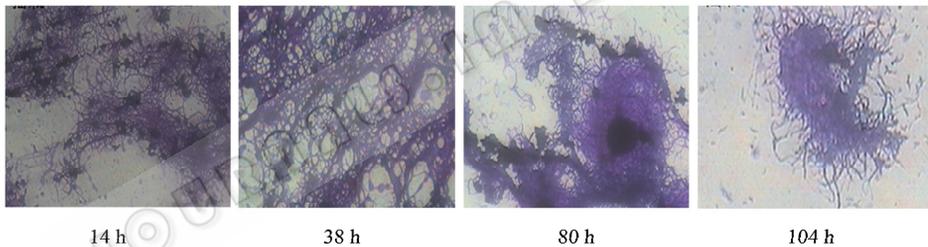


图3 *Streptomyces gilvosporeus* 在摇瓶和深孔板微量培养体系下的代谢过程曲线

Fig. 3 The metabolism curve of *Streptomyces gilvosporeus* in shake flasks and 96 deep-well microplate

A: Shake-flask cultivation



B: Microplate cultivation

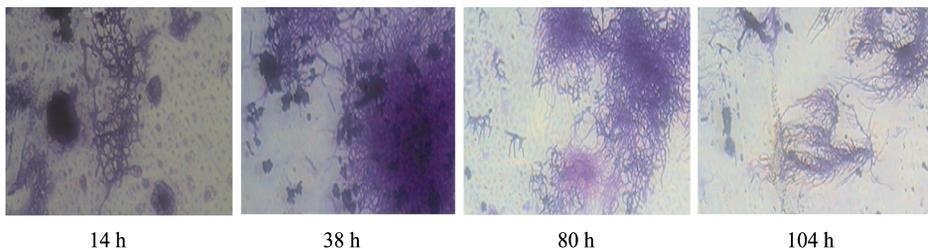


图4 *Streptomyces gilvosporeus* 在摇瓶和深孔板微量培养体系下的菌丝形态变化

Fig. 4 The mycelial morphology of *Streptomyces gilvosporeus* in shake flasks and 96 deep-well microplate

表4 深孔板与摇瓶两种培养方式下纳他霉素产量的线性回归分析

Table 4 The linear regression analysis of natamycin production in 96-deep-well microtiter plate and shake flasks

	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	R 平方 R square	F 值 F value	P 值 P value
回归 Regression	3231372.253	1	3231372.253	89.303	39.303	0.00
总变异 Total variation	4217976.101	13	82216.987			

2.4 深孔板微量培养体系用于纳他霉素产生菌株的快速筛选

利用上述建立的深孔板微量培养体系对纳他霉素产生菌的50个突变株进行了筛选, 并将结果与摇瓶筛选进行了比较, 见图6。由图6可知, 两种筛选方法得到的产量最高的前10个菌株的排序吻合率达到80%, 但摇瓶筛选需要更大的培养空间, 周期长且实验原材料消耗大, 因此, 本文建立的微量培养体系在对大量菌株进行快速筛选时具有明显的优势, 效果令人满意。

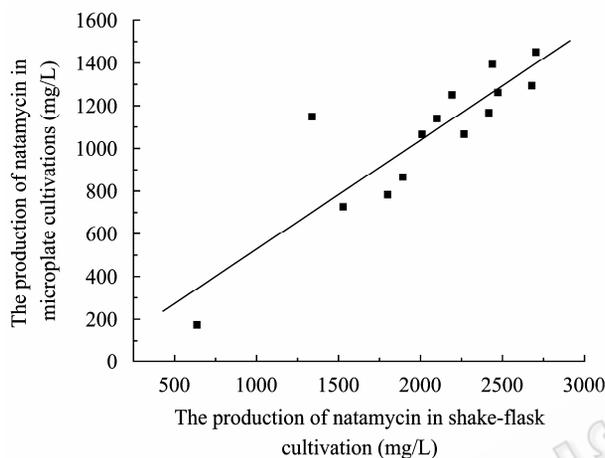


图 5 深孔板微量培养与摇瓶培养纳他霉素产量的相关性比较

Fig. 5 The comparison of natamycin production in 96-deep-well microtiter plate and shake flasks

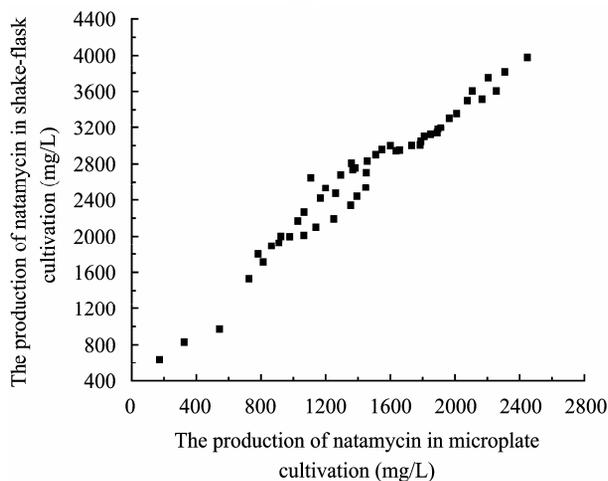


图 6 微孔板快速筛选和摇瓶筛选的结果比较

Fig. 6 The comparison of screening results between microplate and shake-flask cultivation

3 结论

本实验以96方型深孔板为载体, 通过设计8层纱布外加有孔不锈钢盖子较好地解决了微量培养过程中的水分挥发和交叉感染问题, 建立了适合纳他霉素产生菌快速筛选的微量培养体系。通过对微量培养体系的板内和板间差异的分析、深孔板微量培养和摇瓶培养过程的比较, 证明了以深孔板为操作平台的微量培养体系具有处理量大、节约成本、操作简单、标准化和平行性高等优点, 将其应用于纳他霉素产生菌突变株的快速筛选, 效果令人满意, 同时, 也为其他抗生素产生菌的菌种快速筛选提供了思路和方法。

参考文献

- [1] Duetz WA. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *Trends microbiol*, 2007, **15**(10): 469–475.
- [2] Micheletti M, Lye GJ. Microscale bioprocess optimisation. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17**(6): 611–618.
- [3] Kumar S, Wittmann C, Heinzle E. Minibioreactors. *Bio-technol Lett*, 2004, **26**(1): 1–10.
- [4] Duetz WA, Ruedi L, Hermann R, et al. Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(6): 2641–2646.
- [5] Boccazzi P, Zanzotto A, Szita N, et al. Gene expression analysis of *Escherichia coli* grown in miniaturized bioreactor platforms for high-throughput analysis of growth and genomic data. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**(4): 518–532.
- [6] Pelaez F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-can history repeat? *Biochem Pharmacol*, 2006, **71**(7): 981–990.
- [7] Singh SB, Barrett JF. Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. *Biochem Pharmacol*, 2006, **71**(7): 1006–1015.
- [8] 骆健美, 金志华, 岑沛霖. 褐黄孢链霉菌纳他霉素发酵条件优化. *高校化学工程学报*, 2006, **20**(1): 68–73.
- [9] 刘峰, 骆健美, 刘丹, 等. 基于抑菌活性的纳他霉素微孔板生物检测法. *食品与发酵工业*, 2009, **35**(2): 142–145.
- [10] 徐广宇, 骆健美, 杨德山, 等. 纳他霉素发酵培养基及发酵条件的优化. *微生物学杂志*, 2007, **27**(4): 73–78.
- [11] 陈冠群, 杨东靖, 杜连祥. 反相高效液相色谱法测定发酵液中的纳他霉素. *天津科技大学学报*, 2003, **18**(1): 9–11.