



无机盐 $MgCl_2$ 和微量金属离子 Zn^{2+} 对克拉维酸产量的影响

王艳萍, 郭金体, 张 阳, 左志晗

(天津市食品营养与安全重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 对本实验室 UV 诱变获得的棒状链霉菌 *Streptomyces clavuligerus* B71-14 在优化培养基配方的基础上, 考察不同微量金属离子对克拉维酸发酵产量的影响, 确定 Zn^{2+} 对其发酵产量有比较明显的促进作用. 进一步考察不同添加浓度 $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 对克拉维酸合成趋势的影响, 确定在本实验发酵培养基中 $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 的最佳添加量分别为 1.5 g/L 和 0.05 g/L 最佳添加浓度, 并在最适添加浓度下考察其对发酵代谢过程参数的影响, 其最高产量与不添加相比分别提高了 45.76% 和 63.10%.

关键词: 棒状链霉菌; 克拉维酸; $MgCl_2$; Zn^{2+}

中图分类号: R978.1+1

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 01-0013-04

Effect of Mineral Salt $MgCl_2$ and Trace Metal Ion Zn^{2+} on Clavulanic Acid Production

WANG Yan-ping, GUO Jin-ti, ZHANG Yang, ZUO Zhi-han

(Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The effect of different mineral salts and trace metal ions was studied on the production of clavulanic acid produced by *Streptomyces clavuligerus* B71-14 which was acquired from UV mutation in our laboratory. The significant stimulation effects of Zn^{2+} on CA production were shown. The further study on the effect of different concentration of $MgCl_2$ and Zn^{2+} on the tendency of CA biosynthesis was carried out to find out the optimal addition concentration of each. The results show that the optimal addition concentration of $MgCl_2$ and Zn^{2+} are 1.5g/L and 0.05g/L, respectively. Clavulanic acid production is increased by 45.76% and 63.10%, respectively, with adding the optimal addition concentration of $MgCl_2$ and Zn^{2+} as compared to the control.

Keywords: *Streptomyces clavuligerus*; Clavulanic acid; $MgCl_2$; Zn^{2+}

克拉维酸 (clavulanic acid, 简称 CA) 是棒状链霉菌 (*Streptomyces clavuligerus*) 产生的一种天然的 β -内酰胺酶抑制剂, 能与 β -内酰胺类抗生素协同作用于 β -内酰胺类抗生素耐药菌株^[1]. 国内外对如何提高 CA 产量的研究一直在进行^[2].

培养基的优化是发酵过程优化的首要研究内容之一, 克拉维酸的生产发酵过程也是一样. 发酵首选天然培养基, 天然培养基包括农产品如黄豆粉和淀粉等, 相比较于组合培养基, 在抗生素发酵生产中更有助于产量的提高, 因此, 工业上基本上应用天然培养基用于抗生素的生产^[3]. 然而, 天然培养基成分复杂,

包含了不确定浓度的各种金属离子. 为了避免分批发酵时各批次发酵产量的差异, 消除可能过高的某些离子浓度而产生的抑制作用, 确定各种金属离子浓度的最低抑制浓度, 是十分必要的.

在克拉维酸合成途径中, 金属离子作为辅酶或辅基而起到影响代谢物产量的作用, 例如羧乙基精氨酸 β -内酰胺合成酶、前克拉维胺基水解酶和克拉维胺合成酶是三种克拉维酸合成途径中分别需要 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 作为辅基的金属酶^[4,5]. 许多金属离子对微生物生理活性的作用与其浓度相关, 低浓度时往往呈现刺激作用, 高浓度却表现出抑制作用, 最适浓度

收稿日期: 2007-08-27; 修回日期: 2007-12-24

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (043802711)

作者简介: 王艳萍 (1962—), 女, 天津人, 教授, 博士生导师.

要依据菌种的生理特性和发酵工艺条件来确定^[6]. 因此, 研究金属离子对提高克拉维酸产量的影响具有重要意义. 本文在优化培养基成分的基础上, 研究 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对棒状链霉菌的生长和克拉维酸产量的影响, 确定促进产量主要因子的最适添加浓度.

1 材料与方法

1.1 菌种

棒状链霉菌 *Streptomyces clavuligerus* B71-14, 本实验室诱变获得, 天津科技大学分子生物实验室保藏.

1.2 培养基

平板活化培养基 (g/L): YMGA 酵母粉 4; 麦芽提取物 10; 葡萄糖 4; 琼脂 20; pH 7.3.

一级种子培养基 (g/L): ISP 8; pH 7.3.

二级种子培养基 (g/L): TSB 30; 淀粉 10; pH 7.3.

发酵培养基 (g/L): 黄豆粉 30; 甘油 25; KH_2PO_4 0.8; pH 7.5.

以上培养基均在 121 °C, 灭菌 20 min.

1.3 发酵工艺流程

菌种活化 → 一级种子活化 → 二级种子活化 → 发酵培养 → 定时取样 → 参数测量.

1.4 培养方法

用竹签从活化平板上挖取约为 1 cm × 1 cm 菌丝体连同培养基接于装有 25 mL ISP 培养基的 250 mL 挡板三角瓶中, 于 180 r/min 摇床, 28 °C 培养 48 h, 然后转接于装有 50 mL TSB 培养基的 500 mL 挡板三角瓶, 于 180 r/min, 28 °C 培养 24 h, 按 5% 的接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 挡板三角瓶相同条件下培养, 发酵时间 72~120 h.

1.5 无机盐与微量金属离子的添加方法

不同浓度的无机盐与微量元素的溶液 (去离子水配制) 通过 0.22 μm 滤菌膜过滤除菌后, 添加到高温灭菌的发酵培养基, 避免金属离子在高温灭菌过程中与培养基其他成分反应.

1.6 分析方法

菌体量: 采用干重法, 取 5 mL 发酵液, 3 500 r/min, 15 min 离心 2 次, 中间用蒸馏水洗涤, 85 °C 干燥 24 h, 计算菌体干重.

甘油含量测定: 采用比色法^[7].

克拉维酸含量: HPLC 法和生物效价检测法^[8].

2 结果与讨论

2.1 不同微量金属离子对克拉维酸发酵产量的影响

实验考察了 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 6 种微量金属离子对克拉维酸发酵产量的影响. 发酵培养基中微量金属离子的添加量如表 1, 不添加任何微量金属离子的发酵培养基作为空白参照.

表 1 不同微量金属离子的添加量

Tab. 1 Quality of different metal ions addition $g \cdot L^{-1}$

金属离子	培养基 1	培养基 2	培养基 3
Fe^{3+}	0.05	0.1	0.15
Fe^{2+}	0.05	0.1	0.15
Zn^{2+}	0.05	0.1	0.15
Co^{2+}	0.05	0.1	0.15
Cu^{2+}	0.05	0.1	0.15
Mn^{2+}	0.05	0.1	0.15

不同微量金属离子对克拉维酸发酵产量的影响如图 1 所示.

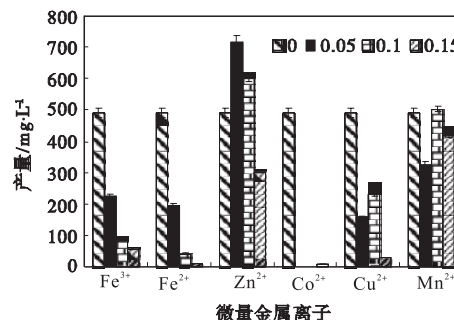


图 1 不同微量金属离子对克拉维酸产量的影响

Fig. 1 Effect of different metal ions on CA production

由图 1 可知, Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 和 Cu^{2+} 这 4 种微量金属离子对克拉维酸产量有明显的抑制作用, Mn^{2+} 的添加并未显著促进克拉维酸产量. 由于黄豆粉本身可能富含相应微量金属离子, 满足发酵要求, 如果额外添加, 超过适度范围, 反而抑制 CA 产量, 这说明金属离子对克拉维酸的产量有着非常重要的作用, 因此在发酵过程中, 稳定发酵培养基中黄豆粉成分或来源对克拉维酸的产量稳定具有重要意义.

低浓度 (0.05 g/L) 的 Zn^{2+} 对克拉维酸产量促进作用比较明显; 随浓度增高, 其促进作用逐渐减弱, 在高浓度添加时呈现抑制作用. 据文献报道^[9], 黄豆粉中的锌含量为 3.89 mg/100 g, 即其在天然培养基中浓度远远低于本实验最低添加浓度 0.05 g/L, 因此可以排除黄豆粉中锌离子含量对实验结果的干扰.

2.2 不同浓度 $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 对 B71-14 产克拉维酸的合成趋势的影响

如 2.1 所述, 适量 Zn^{2+} 对克拉维酸产量促进作用比较明显, 因此, 选择 Zn^{2+} 进行进一步研究. 此外, 据文献报道^[10, 11], Mg^{2+} 是某些酶的辅基或激活剂, 缺少 Mg^{2+} , 菌体生长将受到影响, 且考虑到 $MgSO_4$ 因其含有硫原子, 易引起克拉维酸产生菌生成其他代谢终产物, 如头霉素等, 因此选择 $MgCl_2$ 作为 Mg^{2+} 的添加来源. 本实验主要考察不同浓度的 $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 对 CA 合成趋势的影响, 结果如图 2、3 所示.

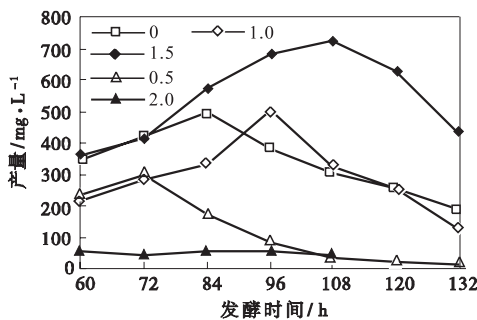


图 2 不同浓度 $MgCl_2$ 对 CA 合成趋势的影响

Fig. 2 Effect on CA biosynthesis by adding different concentration of $MgCl_2$

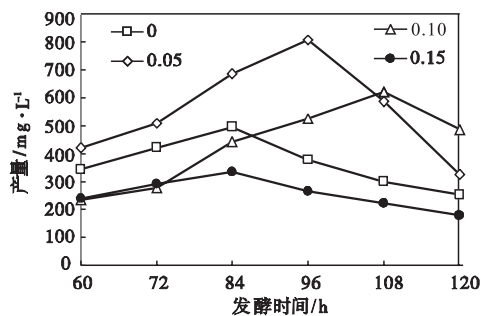


图 3 不同浓度 Zn^{2+} 对 CA 合成趋势的影响

Fig. 3 Effect on CA biosynthesis by adding different concentration of Zn^{2+}

由图 2 可知, 当 $MgCl_2$ 添加浓度在 0.5~1.5 g/L, 随添加浓度增加, 其对 CA 发酵产量的促进作用增加; 而当浓度达到 2 g/L 时, 呈现较明显抑制作用. 不同浓度 $MgCl_2$ 的添加对 CA 合成趋势的影响各不相同: 与不添加 $MgCl_2$ 的空白参照相比较, 低浓度添加下, CA 产量峰值出现在较早的 72 h; 随添加浓度增加, 其产 CA 的峰值分别出现在 96 h 和 108 h, 高浓度下, 其产量明显被抑制. CA 产量在 $MgCl_2$ 添加量为 1.5 g/L 时达到最高, 为 723 mg/L. 在发酵后期, 随 $MgCl_2$ 添加浓度的增加, CA 的降解速率明显减缓, 这说明 Mg^{2+} 有利于减缓 CA 的降解, 这与相关文献

报道结果一致^[12].

由图 3 可知, 低浓度的 Zn^{2+} 对克拉维酸的产量促进作用最明显, 据报道^[5], Zn^{2+} 与 CA 合成酶作用有关, Zn^{2+} 常在酶蛋白中心起稳定结构和作为酶的活性中心. 随 Zn^{2+} 浓度增加, 其促进作用减弱, 可能会产生抑制作用, 本实验中 Zn^{2+} 浓度为 0.2 g/L 的添加量时, 基本不生成 CA. CA 产量在添加量 0.05 g/L 时, 达到最高为 809 mg/L. CA 合成发酵后期, 随 Zn^{2+} 浓度的增加, CA 的降解速率减缓, 一方面可能通过影响生物合成酶而促进 CA 产量继续生成, 另一方面可能通过抑制在发酵后期对 CA 降解起主要作用的酶系作用而减缓 CA 降解速率.

2.3 最适添加浓度的 $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 对发酵过程参数的影响

如 2.2 所述, 确定 $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 的最适添加浓度分别为 1.5 g/L 和 0.05 g/L. 在此添加浓度下, 考察发酵过程参数的变化, 包括菌体量、甘油消耗量以及 CA 含量, 结果如图 4、5、6 所示.

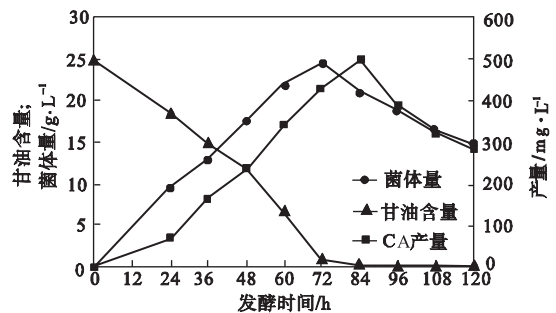


图 4 原始发酵培养基发酵代谢曲线

Fig. 4 Curve of CA fermentation parameters in control culture

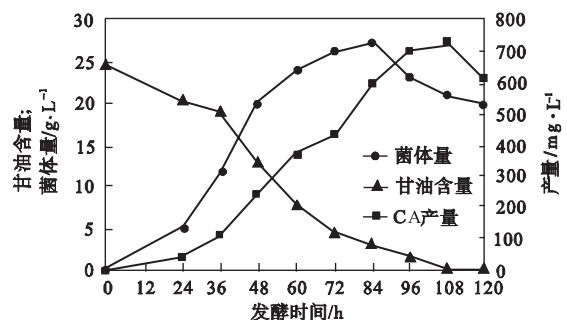


图 5 $MgCl_2$ 最适添加浓度的发酵代谢曲线

Fig. 5 Curve of CA fermentation parameters in culture adding $MgCl_2$

由图 4、5、6 可知, 最适浓度的 $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 的添加与原始发酵过程参数比较, 存在如下差异. 菌体生长方面: 原始发酵培养基中, 菌体量在 72 h 达到菌

体最大量 24.5 g/L. 之后, 菌体量开始快速下降; $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 的添加对菌体生长都有促进作用, 均在 84 h 时分别达到菌体最大量 27.3 g/L 和 30.2 g/L, 之后, 菌体量开始下降, 但其下降趋势均低于原始培养基, 特别是 Zn^{2+} 的添加尤为明显. 甘油消耗方面: 原始发酵培养基中, 甘油在发酵前期消耗迅速, 在 72 h 基本消耗完; $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 对甘油的消耗有不同程度的影响, 在发酵前期, 甘油消耗速度比较缓慢, 甘油消耗完全的时间分别出现在比较滞后的 108 h 和 96 h. CA 产量方面: 原始发酵培养基中, CA 产量在 84 h 时达到最高产量, 为 496 mg/L, 随后, CA 迅速降解; $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 对 CA 产量有明显促进作用, 其 CA 产量分别在 108 h 和 96 h 达到最大值 722 mg/L 和 809 mg/L, 产率与不添加比较分别提高 45.76% 和 63.10%.

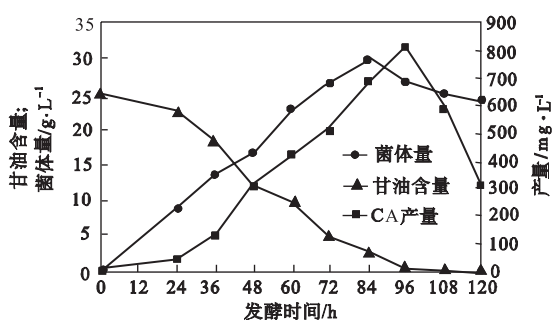


图6 Zn^{2+} 最适添加浓度的发酵代谢曲线

Fig. 6 Curve of CA fermentation parameters in culture adding Zn^{2+}

3 结论

(1) 在天然培养基中, Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 4种微量金属离子的添加对克拉维酸的生物合成具有明显的抑制作用; Mn^{2+} 对 CA 产量的作用不明显, 适量的 Zn^{2+} 对 CA 产量促进作用显著.

(2) 添加适量的 $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} 时, 可以促进 CA 产量, 其最适添加浓度为 1.5 g/L 和 0.05 g/L, 产量分别提高 45.76% 和 63.10%. 产量提高一方面可能发酵前期添加物通过影响 CA 合成途径的生物合成酶而促进 CA 合成, 另一方面可能在发酵后期抑制或减缓 CA 降解, 从而达到提高 CA 产量.

(3) 通过添加适量 $MgCl_2$ 和 Zn^{2+} , 有助于提高 CA 产量, 从生物工艺学角度而言, 对发酵产量的提高有较大的实用价值, 但由于天然培养基本身成分的

复杂性, 基于现有的数据, 并不能具体确定哪些无机盐和微量金属离子对棒状链霉菌本身生长是有益或有毒的, 因此, 需要进一步的研究利用成分确定的组合培养基进行有目的的实验设计, 从而确定无机盐和微量金属离子的作用, 以及与其他培养基成分的交互作用.

克拉维酸的研究, 多集中于菌种的选育和发酵条件的优化, 而针对发酵培养基的特点, 从克拉维酸代谢过程中酶的角度去研究金属离子的影响, 发现金属离子对克拉维酸的产量具有十分重要的作用, 因此, 为在提高克拉维酸的产量研究方面提供了又一值得注意的因素, 必将为寻找合适的发酵条件产生积极的影响.

参考文献:

- [1] Rading M. Clavulanic acid: a β -lactamase inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1977, 11: 852—857.
- [2] Gouveia E R. Optimization of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* [J]. Biotechno Letters, 2001, 23 (2): 157—161.
- [3] Waites M J, Morgan N L, Higton G. Industrial Microbiology [M]. Second edition. UK: Black Well Science, 2001.
- [4] Bachmann B O. β -lactam synthetase: a new biosynthetic enzyme: USA, 95, 9082—9086 [P]. 1998.
- [5] Elkins J M, Hewitson K S. Oligomeric structure of proclavaminic acid amidino hydrolase: evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis [J]. Biochem, 2002, 366: 423—434.
- [6] 白秀峰. 发酵工艺学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 56—57.
- [7] 张永生, 高辉. 克拉维酸发酵液中碳源—甘油含量的比色法测定 [J]. 天津科技大学学报, 2006, 21 (1): 15—17.
- [8] 王艳萍, 左志哈. 发酵液中克拉维酸含量的测定方法 [J]. 食品与发酵工艺, 2005, 31 (5): 102—105.
- [9] 孙远明. 食品营养学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [10] 史毓芳. 克拉维酸产生菌菌种选育及发酵工艺研究 [D]. 浙江: 浙江工业大学, 2006.
- [11] Romero J, Liras P. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *S. Clavuligerus* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1984, 20: 318—325.
- [12] Roubos J A, Krabben P. Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations [J]. Biotechnol Prog, 2002, 18: 451—457.