

两性霉素 B 生产菌培养基成分及发酵条件

张博, 窦宾贤, 张海东, 柳志强

浙江工业大学生物工程学院, 杭州 310014

摘要 两性霉素 B 是多烯类广谱抗真菌抗生素, 已广泛应用于深部真菌感染。以结节链霉菌 *Streptomyces nodosus* ZJB15076 为出发菌种, 对其发酵生产两性霉素 B 的培养基成分进行了优化, 确定了较优的碳源和氮源及最适浓度: 质量分数为葡萄糖 4.5%、牛肉膏 4%; 在此基础上继续进行发酵条件的研究, 确定了较优的发酵条件: 发酵初始 pH 值为 7.0, 培养温度为 28℃, 装液量为 40 mL/250 mL, 接种量(体积分数)为 2%。分析了在摇瓶内添加玻璃珠对两性霉素 B 产量的影响, 研究结果表明, 添加玻璃珠后能显著改善菌丝聚集情况并显著提高两性霉素 B 的产量, 产量与对照组相比提高了 341.1%, 达到 4563.2 mg/L。

关键词 两性霉素 B; 结节链霉菌; 碳源; 氮源; 发酵条件; 微粒

两性霉素 B (Amphotericin B, AmB) 是重要的抗真菌类抗生素, 自 1966 年上市以来, 一直是深部真菌感染的首选药物, 其结构式如图 1 所示。AmB 纯品的颜色为黄色或橘黄色, 由于其分子结构中亲水基团与疏水基团的不对称分布和带有酸碱性的特点, 使得 AmB 在水相及大部分有机相中的溶解度极低^[1]。

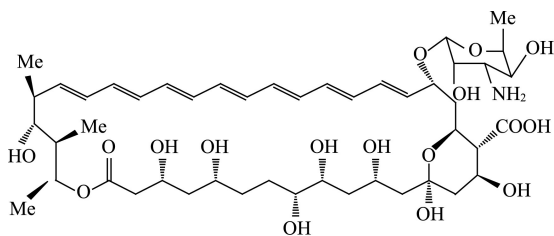


图 1 AmB 结构式

Fig. 1 Chemical structure of AmB

近些年 AmB 的合成途径得到了解析, 整个合成途径可以概括为两步: 第一步细胞内 16 个乙酸盐和 3 个丙酸盐在聚酮化合物合成酶 (PKS) 的作用下, 合成大环内酯聚酮化合物主体; 第二步在大环内酯聚酮化合物主体上, 进一步通过细胞色素 P450 (CYP450)、铁氧还原蛋白及糖基转移酶等的作用, 完成羟基化、甲基化以及糖基化, 最终形成 AmB^[2-5]。

AmB 能与真菌细胞膜上的麦角固醇结合, 在膜上形成微孔, 使细胞膜的通透性发生改变, 最终导致重要的细胞内容物如钾离子、核苷酸、氨基酸等无节制的流失而造成菌体死亡^[6-8]。AmB 抗真菌谱广、活性强, 对念珠菌、隐球菌、毛霉菌、曲霉菌、组织胞浆菌、球孢子菌等大多数深部真菌都有很强的抗真菌作用, 还能有效抑制假丝酵母菌和用于治疗利什曼病等。值得注意的是, AmB 与真菌麦角固醇结合的特异性不高, 也能与哺乳动物和人体细胞膜上的胆固醇结合, 引起同样的损伤。在用药过程中, 患者受到肾功能损害的情况较为常见, 少数患者可发生肝毒性。但对于某些严重的深部真菌感染, 如曲霉以及其他丝状菌引起感染的病人仍需用到 AmB^[9]。近年来, 在 AmB 结构修饰和脂质体制备方面进行了大量研究, 得到毒副作用明显降低的衍生物^[10-11]。

不同菌种所需要的最适发酵培养基成分和发酵条件不同, 本研究以实验室保藏的结节链霉菌 *Streptomyces nodosus* ZJB15076 为初始发酵菌种, 以提高 AmB 的发酵产量为目标, 通过单因素优化得到该菌株的最适发酵培养基配方和最适发酵条件。AmB 的发酵生产是一个好氧过程, 其发酵过程中菌丝容易相互缠绕并聚集成团, 这种情况不利于菌体在发酵液内摄取足够的溶氧与其他营养物质, 严重影响 AmB 的产量。近年来有学者报道了通过在发酵液内添加微粒的方法来改善发酵液内菌丝聚集, 进而提高代谢产物产量^[12-16]。结

收稿日期: 2016-03-25; 修回日期: 2016-11-21

基金项目: 浙江工业大学科研启动项目 (G5817101201)

作者简介: 张博, 讲师, 研究方向为代谢工程及合成生物学, 电子信箱: zhangbo0305@zjut.edu.cn; 柳志强 (通信作者), 教授, 研究方向为工业催化及酶定向改造, 电子信箱: microlu@zjut.edu.cn

引用格式: 张博, 窦宾贤, 张海东, 等. 两性霉素 B 生产菌培养基成分及发酵条件[J]. 科技导报, 2016, 34(24): 87-92; doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.24.012

合实验菌株的生长特性,实验分析了在培养基内添加无机微粒对发酵产量的影响。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养基

结节链霉菌 *Streptomyces nodosus* ZJB15076 由本实验室保存。培养基的组成分别为,MS培养基(质量分数):黄豆饼粉 2%,甘露醇 2%,琼脂粉 2%;种子培养基(质量分数):植物蛋白胨 1.5%,酵母浸膏 1%,葡萄糖 1%,氯化钠 0.5%,碳酸钙 0.1%;初始发酵培养基(质量分数):葡萄糖 2%,酵母浸膏 2%,碳酸钙 1%,pH 值 6.8~7.0;灭菌条件:在(122±2)℃,压力 0.1~0.2 MPa 的条件下灭菌 20~25 min。

1.2 培养方法

平板培养:平板划线法分离单菌落,25℃,培养 8~10 d。

种子培养:接种量约 1 mL,(25±1)℃,(200±10) r/min,培养(48±3) h,当 pH 值在 7.0~8.2、PMV≥10%,结束培养(PMV 值:离心菌丝体积百分比,取 10 mL 发酵液,3000 r/min 离心 10 min,计算菌丝体积与总体积的比值)。

发酵培养:接种后的培养基在 28℃,200 r/min 的转速下培养 7~8 d,发酵结束后取样测定相关数据。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定

细胞干重(cell dry weight,DCW)测定:取 1 mL 发酵液至 2 mL 离心管,12000 r/min 离心 10 min,弃上清,去离子水洗涤 3 次,放入 90℃ 烘箱烘干至恒重,称量得到生物量。

1.3.2 发酵产物的测定

取 1 mL 发酵液至 30 mL 离心管,加入 9 mL DMSO,25℃ 条件下充分震荡 5~10 min,静置 30 min 左右,取 2 mL 上清于离心管,12000 r/min 离心 10 min,取上清冷冻保存^[17];产物采用高效液相色谱法检测,色谱柱为 Unitary C18(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 A 为 21.9 mmol/L 的柠檬酸:乙腈:甲醇的混合溶液,体积比为 60:30:10,用氨水调节 pH 值至 4.7;流动相 B 为 21.9 mmol/L 的柠檬酸:乙腈:甲醇混合溶液,体积比为 20:68:12,用氨水调节 pH 值至 3.9,流速 1.0 mL/min,吸光度 405 nm,柱温 40℃。梯度洗脱程序:0~10 min 100% A,10~20 min 70% A 和 30% B,20~40 min 100% B^[18]。检测时间 30 min,26 min 出现 AmB 产物峰。

1.4 碳源对两性霉素 B 发酵的影响

在初始发酵培养基的基础上,碳源质量浓度皆为 20 g/L,通过单因素法研究不同碳源(麦芽糖、葡萄糖、甘油、甘露醇、淀粉和乳糖)对发酵的影响;确定最佳碳源后,分析碳源质量浓度(15、30、45、60、70 g/L)对发酵的影响。

1.5 氮源对两性霉素 B 发酵的影响

以优化得到的最佳碳源及其质量浓度为基础,分析不同氮源(有机氮源:植物蛋白胨、干酪素、牛肉浸膏、酵母粉、蛋白胨、酵母浸出汁、浓缩酵母粉、棉子粉、肉胨;无机氮源:尿

素、氯化铵、硝酸钾)对发酵的影响。以发酵结束后 AmB 的产量为指标,筛选出最适氮源并确定其最适发酵浓度。

1.6 发酵条件研究

1.6.1 接种量对发酵的影响

将种子液接种至发酵培养基,设置接种量(体积分数):1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%,发酵结束后检测 AmB 产量,确定最适接种量。

1.6.2 发酵温度对发酵的影响

以最适接种量将种子液接种到发酵培养基内,设置培养温度:25、28 和 32℃。发酵结束后检测两性霉素 B 产量,确定最适发酵温度。

1.6.3 摇瓶装液量对发酵的影响

在最适接种量和最适发酵温度条件下,设置不同的装液量:20、30、40、50、60、70、80 mL,发酵结束后检测 AmB 的产量,确定最适装液量。

1.6.4 初始 pH 值对发酵的影响

在以上实验确定的发酵条件下,分析不同初始 pH 值对发酵的影响,设置不同初始 pH 值:6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5,发酵结束后检测 AmB 的产量,确定最适初始 pH 值。

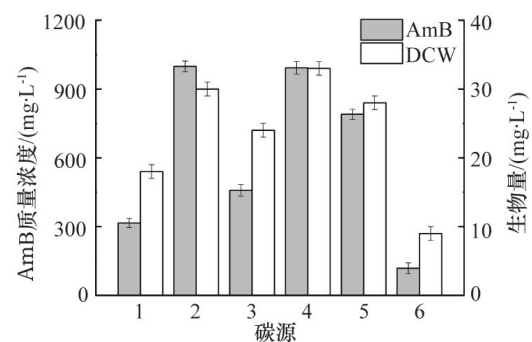
1.6.5 添加微粒对两性霉素 B 发酵的影响

在前期实验确定的发酵条件下,选择粒径相同(4 mm)但不同数目的玻璃珠(30、40、50、60 粒/瓶)作为无机微粒添加到发酵培养基中,研究发酵液中添加无机微粒对 AmB 产量的影响。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对发酵的影响

在基本培养基的基础上保持其他条件不变,分析不同碳源对发酵的影响。实验选取的碳源包括麦芽糖、葡萄糖、甘油、甘露醇、淀粉和乳糖。结果如图 2 所示,当碳源为葡萄糖或甘露醇时 AmB 的产量较高,菌体能够较好生长。碳源为葡萄糖时的产量最高,达到 998.2 mg/L。



1—麦芽糖;2—葡萄糖;3—甘油;4—甘露醇;5—淀粉;6—乳糖

图 2 碳源对 AmB 产量的影响

Fig. 2 Effects of different carbon sources on the fermentation

确定合适的碳源质量浓度不仅可以提高产物产量,而且可以使工业生产过程变得更加经济与环保。从表1的数据中可以看出,当葡萄糖质量浓度为45 g/L时,AmB的产量达到最大,为1850.7 mg/L,高于或低于这个质量浓度时AmB的产量以及生物量都有明显的下降。

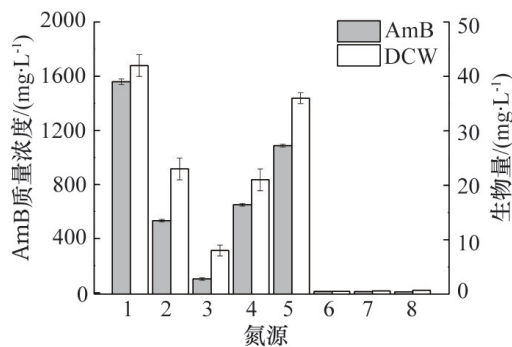
表1 葡萄糖质量浓度对AmB产量的影响

Table 1 Effect of glucose concentration on the fermentation

葡萄糖质量浓度/(g·L ⁻¹)	AmB产量/(mg·L ⁻¹)	DCW/(mg·L ⁻¹)
15	894.6	26
30	1544.4	42
45	1850.7	45
60	1486.5	41
75	1215.6	34

2.2 不同氮源对发酵的影响

氮源是构成生物体蛋白质、核酸等物质的基础,也是微生物生长代谢的能量来源之一。实验分析了有机氮源和无机氮源对AmB产量的影响。结果如图3所示,可以看出氮源对发酵产量有较大的影响:有机氮源的发酵产量普遍高于无机氮源,其中牛肉膏作为氮源时的效果最好,AmB的产量可以达到1558.2 mg/L,肉胨次之。与无机氮源相比,有机氮源通常含有的营养物质更丰富,更利于菌体的生长,而无机氮源结构简单,在被菌体利用后会引发发酵液内pH值较大的变化,不利于菌体的生长。因此后续实验选取有机氮源牛肉膏作为发酵使用的氮源^[19]。



1—牛肉膏;2—植物蛋白胨;3—酵母浸膏;4—棉籽粉;
5—肉胨;6—硝酸钾;7—氯化铵;8—尿素

图3 氮源对AmB产量的影响

Fig. 3 Effects of different nitrogen sources on the fermentation

从表2氮源质量浓度优化结果可看出,当牛肉膏质量浓度在10~40 g/L时,AmB的产量随着氮源质量浓度的升高而升高,在牛肉膏质量浓度为40 g/L时达到最高。充足的氮源有利于菌体的生长,但随着氮源质量浓度从40 g/L增加到85 g/L,AmB的产量有明显的下降趋势。

表2 牛肉膏质量浓度对AmB产量的影响

Table 2 Effects of beef extraction concentrations on the fermentation

牛肉膏质量浓度/(g·L ⁻¹)	AmB/(mg·L ⁻¹)	DCW/(mg·L ⁻¹)
10	1272.7	26
25	1521.3	31
40	1580.0	33
55	1157.0	29
70	268.3	25
85	240.1	27

2.3 接种量对发酵的影响

接种量会影响种子液接入发酵培养基后生长延迟期的长短。接种量过少会使生长延迟期相对拉长而增加整个发酵周期,会降低设备使用效率,也会增加生产成本;若接种量过大,菌种可能会在发酵初期过快生长,大量消耗培养基内的营养物质和溶氧,并且积累代谢废物,不利于次级代谢产物的积累。实验分析了接种量(体积分数)为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%时对AmB产量的影响。从图4可看出,当接种量为2%时,AmB的产量达到最高,为1285.2 mg/L,之后随着接种量的增加AmB的产量有显著的下降趋势,因此确定接种量为2%。

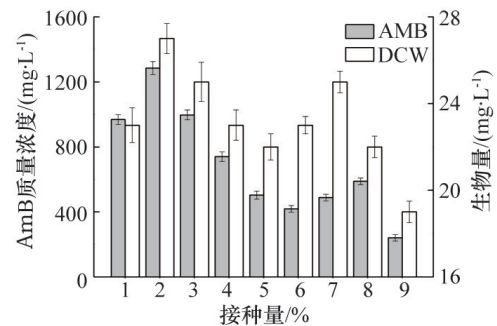


图4 接种量对AmB产量的影响

Fig. 4 Effects of inoculation on the fermentation

2.4 装液量对发酵的影响

实验选取250 mL规格的摇瓶,分析不同装液量对菌种发酵生产AmB的影响。从图5可以看出,装液量在20~40 mL时,随着装液量的增加AmB的产量也在逐渐增加,当装液量为40 mL时产量达到最大,为1953.4 mg/L。当装液量超过40 mL后,随着装液量的增加产量则逐渐降低。

2.5 温度对发酵的影响

温度是影响发酵产量高低的重要因素之一。温度会影响发酵过程的各个方面,如细胞生长速度、产物合成速度、发酵液的理化性质等。实验分析了25、28和32℃3个温度对AmB产量的影响。实验结果如图6所示,恒定温度为28℃发酵时AmB的产量最高,达到1830.2 mg/L,当高于或低于28℃

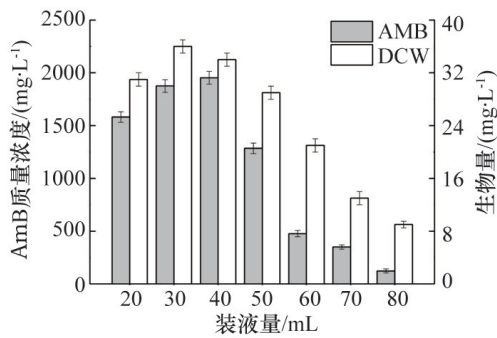


图5 装液量对AmB产量的影响

Fig. 5 Effects of liquid volume on the fermentation

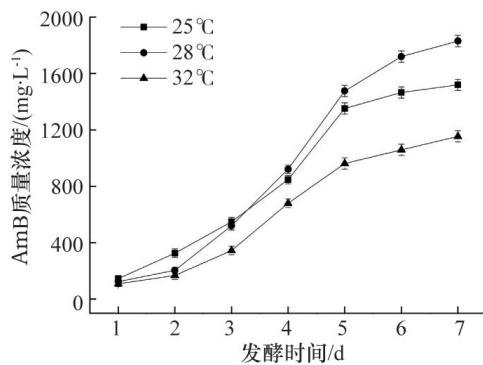


图6 温度对AmB产量的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the fermentation

时, AmB的产量有所下降, 因此选择28℃作为发酵培养温度。

2.6 初始pH值对发酵的影响

发酵过程中, 培养基内的pH值会影响菌体的生长和次级代谢。实验分析了初始pH值在6.0~9.5时AmB产量变化情况如图7所示。初始pH值在6.5~7.5较利于AmB的合成, 并且在pH值从6.0变化到7.0的过程中, AmB的产量有随pH值升高而升高的趋势, 在pH值为7.0时达到最大值2183.5 mg/L, 之后随着pH值的继续升高, AmB产量明显下降。

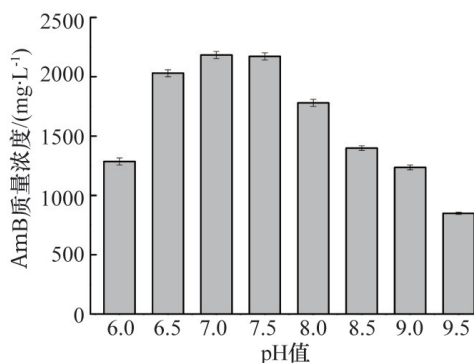


图7 初始pH值对发酵的影响

Fig. 7 Effects of initial pH values on the fermentation

2.7 添加微粒对两性霉素B产量的影响

实验选取的无机微粒为玻璃珠, 研究添加其到培养基后对AmB产量的影响。从表3结果发现, 当在发酵培养基内添加不同数目的微粒后, AmB的产量与对照相比都有明显提高, 并且当微粒的添加量越高AmB的产量也越高。当玻璃珠添加量为每瓶60粒时产量达到4563.2 mg/L, 与对照组相比提高了341.1%。显微镜下观察发酵液内菌体形态(图8)可以看出, 当培养基内添加微粒后, 实验组与对照组相比视野内菌丝球的数量有明显减少, 而且发现微粒的添加数量越多, 菌丝球越松散。

表3 微粒数量对AmB产物的影响

Table 3 Effects of glass bead quantity

玻璃珠数量	AmB/(mg·L ⁻¹)	DCW/(mg·L ⁻¹)
对照	1034.5±18.5	30±3.0
10	2138.2±4.5	32±1.0
30	3110.5±1.2	36±0.9
40	4033.1±2.3	38±3.1
50	4179.4±9.6	37±5.0
60	4563.2±11.2	39±4.2

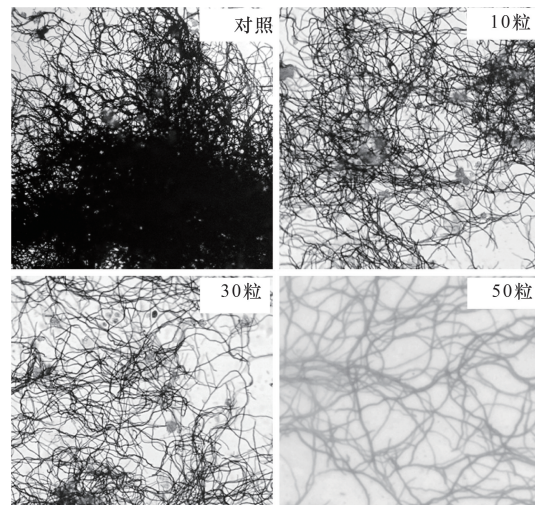


图8 玻璃珠对菌丝体形态的影响(10×40)

Fig. 8 Effects of glass bead numbers on the morphology of *Streptomyces nodosus* (10×40)

3 讨论

微生物发酵生产抗生素的水平高低除了与菌种遗传特性有关, 还与发酵培养基成分和发酵条件有关。对于前者目前有诱变育种和分子改造等手段, 对于后者主要还是通过优化的方法得到最适发酵培养基配方和最适发酵培养条件。实验结果表明, 结节链霉菌 *Streptomyces nodosus* ZJB15076 发酵产AmB的最适碳源和氮源分别为葡萄糖和牛肉浸膏。在随后的实验中发现发酵所需的最适碳氮源质量浓度都是在

一定范围内,当超过或低于这一质量浓度后产量都会有明显下降的趋势。当碳氮源的质量浓度过低时,菌体生长必需的营养物质不足而限制了生物量的积累,生物量积累不足必然会影响到 AmB 的产量;当碳氮源质量浓度超过最适质量浓度后,发酵前期会出现菌体大量生长的情况,使得发酵液内的溶氧快速消耗,菌体质量浓度增加又会使发酵液的黏度增加,进一步加剧溶氧不足的问题,同时积累大量的代谢废物,最终导致产物的产量下降。较少的装液量有利于增加发酵液内的溶氧,但装液量过少会导致培养基内营养物质不能满足菌体的正常生长代谢,并最终影响到产物的积累;装液量过多不利于发酵液内氧气的传递而使溶氧下降,溶氧不足会严重限制菌种的正常生长与代谢,最终影响到产物的产量。当 pH 值大于 7.0 后,随着 pH 值的升高,菌体在碱性条件下生长受到抑制,同时 AmB 在碱性条件下稳定性下降,因此产量开始下降。

在发酵培养基内添加微粒后,微粒产生的剪切力会使得菌丝体聚集成团的现象得到明显改善,菌丝团也更为松散。相比于聚集成团的菌丝球,松散形态的菌丝能够更好的摄取培养基内营养物质与溶氧的传递,同时也更利于发酵液内的营养物质与氧气传递,因而也更利于菌体的生长^[20]。

4 结论

1) 确定了 *Streptomyces nodosus* ZJB15076 发酵产 AmB 的最适碳源和氮源及最适质量浓度:葡萄糖 4.5%,牛肉浸膏 4%。在此基础上继续对发酵条件进行了优化,发现该菌在发酵初始 pH 值为 7.0,温度为 28℃,装液量为 40 mL/250 mL,接种量为 2% 的发酵条件下,产量可以达到 2183.5 mg/L,较优化前提高 118.7%。

2) 发酵培养基内添加微粒能够显著促进 AmB 的发酵产量,当添加量为每瓶 60 粒时,AmB 的产量与对照组相比产量提高了 341.1%,达到 4563.2 mg/L。

参考文献 (References)

- [1] Torrado J J, Espada R, Ballesteros M P, et al. Amphotericin B formulations and drug targeting[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97(7): 2405-2425.
- [2] Caffrey P, Lynch S, Flood E, et al. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: Deductions from analysis of polyketide synthase and late genes[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(7): 713-723.
- [3] Chen S, Huang X, Zhou X, et al. Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex[J]. *Chemistry & Biology*, 2003, 10(11): 1065-1076.
- [4] Leadlay P F, Staunton J, Oliylyk M, et al. Engineering of complex polyketide biosynthesis—insights from sequencing of the monensin biosynthetic gene cluster[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2001, 27(6): 360-367.
- [5] Nikodinovic J, Barrow K D, Chuck J A. High frequency transformation of the amphotericin-producing bacterium *Streptomyces nodosus*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(1): 273-277.
- [6] Lemke A, Kiderlen A F, Kayser O. Amphotericin B[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2005, 68(2): 151-162.
- [7] Brajtburg J, Powderly W G, Kobayashi G S, et al. Amphotericin B: Delivery systems[J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 1990, 34(3): 381-384.
- [8] 黄振, 陈小龙. 抗真菌剂两性霉素 B 的结构修饰[J]. *中国抗生素杂志*, 2010, 35(8): 571-575.
Huang Zhen, Chen Xiaolong. Structural modifications of an antifungal agent: Amphotericin B[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2010, 35(8): 571-575.
- [9] Volmer A A, Szpilman A M, Carreira E M. ChemInform abstract: Synthesis and biological evaluation of Amphotericin B derivatives[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(9): 1329-1349.
- [10] Taylor A W, Costello B J, Hunter P A, et al. Synthesis and antifungal selectivity of new derivatives of Amphotericin B modified at the C-13 position[J]. *Journal of Antibiotics*, 1993, 46(3): 486-493.
- [11] Ibragimova V, Alieva I, Kasumov K, et al. Transient permeability induced by alkyl derivatives of amphotericin B in lipid membranes[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2006, 1758(1): 29-37.
- [12] Kaup B A, Ehrlich K, Pescheck M, et al. Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: Increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2008, 99(3): 491-498.
- [13] Walisko R, Krull R, Schrader J, et al. Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(11): 1975-1982.
- [14] 牛坤, 胡逸博, 毛健, 等. 微粒添加对棘白菌素 B 发酵过程的影响[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(7): 1082-1088.
Niu Kun, Hu Yibo, Mao Jian, et al. Effect of microparticles on Echinocandin B production by *Aspergillus nidulans*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(7): 1082-1088.
- [15] Driouch H, Roth A, Dersch P, et al. Filamentous fungi in good shape: Microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production[J]. *Bioengineered Bugs*, 2011, 2(2): 100-104.
- [16] Habib D, Becky S, Christoph W. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2010, 105(6): 1058-1068.
- [17] Linke H A, Mechliniski W, Schaffner C P. Production of amphotericin B-¹⁴C by *Streptomyces nodosus* fermentation, and preparation of the amphotericin B-¹⁴C-methyl-ester[J]. *Journal of Antibiotics*, 1974, 27(3): 155-160.
- [18] Pfeifer C, Fassauer G, Gerecke H, et al. Purity determination of amphotericin B, colistin sulfate and tobramycin sulfate in a hydrophilic suspension by HPLC[J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*, 2015, 990: 7-14.
- [19] 龚劲松, 李恒, 刘恒霞, 等. 碳氮源对枯草芽孢杆菌发酵产 β -甘露聚糖酶的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(10): 34-39.
Gong Jinsong, Li Heng, Liu Hengxia, et al. Effect of carbon and nitrogen sources on β -mannanase production from *Bacillus subtilis*[J]. *Food and Fermentation Industries Editorial Staff*, 2015, 41(10): 34-39.
- [20] Krull R, Wucherpennig T, Esfandabadi M E, et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 163(2): 112-123.

Optimization of fermentation medium and fermentation conditions of Amphotericin B producing strain

ZHANG Bo, DOU Binxian, ZHANG Haidong, LIU Zhiqiang

Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract Amphotericin B (AmB) is one of the most efficient antimycotic agents, thus widely used in clinical practice. In this study, *Streptomyces nodosus* ZJB15076 is used for AmB fermentation. The optimal carbon source, nitrogen source and fermentation conditions for the production of AmB are tested. The results show that glucose and nitrogen beef extraction is best for the fermentation of AmB. And the optimized fermenting conditions through single factor test are summed up as follows: culture temperature 28°C, initial pH value 7.0, inoculation 2% and liquid volume 40 mL/250 mL. The influence of adding glass bead is significant. After adding glass bead, the production of AmB is increased by 341.1% and reaches 4563.2 mg/L.

Keywords Amphotericin B; *Streptomyces nodosus*; carbon source; nitrogen source; optimization of fermentation; microparticles

(责任编辑 王媛媛)