

海洋侧孢短芽孢杆菌 *Brevibacillus laterosporus* Lh-1 产抗菌肽 R-1 的培养条件优化

郑媛 王跃军 孙谧*

(中国水产科学院黄海水产研究所海洋酶与酶工程实验室 山东 青岛 266071)

摘要:采用 Plackett-Burman(PB)设计和响应面分析(RSM)方法, 对一株海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 产抗菌肽 R-1 的发酵条件进行了优化。研究中数据的统计和分析均使用 MINITAB 15.0。在研究中, 首先使用了 Plackett-Burman (PB)设计对影响 Lh-1 产抗菌肽的 15 个因素进行了筛选, 得到了影响产量的显著因素为: 葡萄糖、蛋白胨和氯化钙。在此基础上采用响应面法对该 3 个显著因素的最佳水平范围进行研究, 得到的最佳浓度为 15.72 g/L 葡萄糖、6.01 g/L 蛋白胨和 3.29 g/L CaCl₂, 同时 R-1 的产量从 82.15 kU/mL 提高到了 116.27 kU/mL。

关键词: *Brevibacillus laterosporus* Lh-1, 抗菌肽 R-1, Plackett-Burman (PB)设计, 响应面分析(RSM)

Optimization of an Antimicrobial Peptide R-1 Production by *Brevibacillus laterosporus* Lh-1

ZHENG Yuan WANG Yue-Jun SUN Mi*

(Laboratory of Marine Enzyme and Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: To improve and optimize marine antimicrobial peptide R-1 production by a newly isolated *Brevibacillus laterosporus* Lh-1, Plackett-Burman (PB) design and response surface methodology (RSM) using central composite design was adopted in culture conditions. MINITAB 15.0 was used for planning the experiments, data analysis, contour diagrams and response optimizations. In this study, PB design was undertaken to evaluate the effects of the fifteen factors. By the statistical regression analysis, the significant factors affecting the novel antimicrobial peptide R-1 in submerged fermentation by *Br. laterosporus* Lh-1 were determined as follows: glucose, peptone and CaCl₂. Then a RSM was used to optimize the above critical internal factors, and the optimal concentration of the variables were determined as: 15.72 g/L glucose, 6.01 g/L peptone and 3.29 g/L CaCl₂. The content of R-1 was increased from 82.15 kU/mL to 116.27 kU/mL.

Keywords: *Brevibacillus laterosporus* Lh-1, Antimicrobial peptide R-1, Plackett-Burman (PB) design, Response surface methodology(RSM)

芽孢杆菌在生长代谢过程中能够产生许多抗菌物质, 例如 plipastatin、surfactin、iturin、fengycin、

subtilin、subtilosin、sunlancin 等等^[4], 其多为肽类物质, 对植物病原真菌、细菌、病毒和寄生虫都有一

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30571429); 国家十一五“863”计划(No. 2006AA10Z349, 2007AA091602)

* 通讯作者: Tel: 86-532-85833961; ✉ clowisme@sina.com.cn

收稿日期: 2008-09-05; 接受日期: 2008-11-18

定抑制效果, 因此, 其代谢产物在医学、农业和食品上都具有广阔的应用前景^[1-3]。海洋独特的高盐、高压、低温、低营养和无光照等特殊区域生态环境造就了海洋芽孢杆菌种类的丰富多样性和特殊性, 产生许多有特殊结构和功能的新型多肽, 目前国外已报道的该类海洋微生物活性物质接近 100 多种, 其中很多具有化学结构和生物活性多样化的特点^[5], 但由于其含量较低, 生物量有限, 使得许多研究成果的应用推广受到一定的限制。

近年来, 本实验室一直开展芽孢杆菌各种抗菌物质的研究^[6-8], 已经从海洋极端环境中分离到的一株侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus* Lh-1), 其产生的抗菌肽 R-1 具有高稳定性、低分子量、抗菌谱广(G^+ 、 G^- 、真菌)的特点, 对许多致病微生物都均有良好的抑制效果^[6]。本研究使用 Plackett-Burman(PB) 设计和响应面分析 (Response surface methodology, RSM) 的方法, 优化此海洋芽孢杆菌的培养与发酵技术, 以提高该新型抗菌肽(R-1) 的产量, 为其进一步的利用打下基础。

Plackett-Burman(PB) 设计结合响应面分析 (Response surface methodology, RSM) 方法可以从众多考察因素中迅速有效地筛选出主要影响因子, 并对其水平和交互作用进行评价, 从而确定最佳培养条件, 因此广泛应用于各类培养基以及发酵条件的研究中^[9-14]。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

海洋侧孢短芽孢杆菌 *Br. laterosporus* Lh-1 本实验室保存。溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) ATCC No.4698 购自 Sigma 公司。

1.2 培养基及培养条件

基础种子培养基: 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, $CaCl_2$ 2 g/L, $MgSO_4$ 5 g/L, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2~7.5。Plackett-Burman 实验和 RSM 实验发酵培养基 (g/L): 按照实验设计配置, 蒸馏水 1000 mL。取活化好的菌株到种子培养基, 30°C、200 r/min, 培养 18 h 后, 以 8%(V/V) 的接种量接入发酵培养基, 装液量为 25 mL (250 mL 三角瓶), 30°C、200 r/min, 培养 24 h。

1.3 抗菌肽 R-1 活力的测定

管碟法^[15]。每个平板上成三角形放置 3 个重复,

重复 3 个平板, 最后取平均值。处理与对照均为稀释至合适倍数(使在标准曲线范围内)的样品。

1.4 实验设计

1.4.1 Plackett-Burman(PB)设计: 根据细菌生长所需营养要素的一般原则以及微生物发酵影响因素的一般规律, 结合之前有关该菌的前期实验进行设计。数据分析及模型建立均采用 Minitab 15.0 进行, 所选取的相应值为抗菌肽活力, 自变量及其代号、编码和水平见表 1。

1.4.2 响应面设计(RSM): 响应面设计(RSM)方法可以使用有限的实验次数, 评估各个因子之间的相互作用, 并探讨每个因子对发酵的影响。根据 Plackett-Burman (PB)设计确定出主要影响因素葡萄糖、氯化钙和蛋白胨之后, 我们将采用 RSM 方法构建模型, 寻找抗菌肽 R-1 发酵的最大产量和最优条件。表 2 给出了研究中使用的因素水平和编码。

各个变量按照公式(1)进行编码:

$$x_i = (X_i - X_i^x) / \Delta X_i \quad (1)$$

其中 x_i 是变量 X_i 的编码值, X_0 是变量 X_i 中心点的值, ΔX_i 是变量 X_i 的变化间隔值。用于描述各个变量影响的二次方程为:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \sum b_{ii} x_i^2 + e \quad (2)$$

其中 Y 是被预测的相应值, 即抗菌肽 R-1 的产量, b_0 是常数, b_i 是次常数, b_{ij} 是交叉常数。按照中心复合旋转设计的要求, 需要进行 20 组实验对上述方程的各项回归系数进行拟合。

2 结果

2.1 抗菌活力测定

使用管碟法, 以溶壁微球菌作为作用底物, 可以在平板上得到清晰的透明水解圈。以抑菌圈直径为横坐标, 标准抗菌肽(液相纯^[6])活力对数值为纵坐标, 绘制标准曲线(图 1)。根据标准曲线求得发酵过程中各个条件下抗菌肽 R-1 的活力以表示产量的高低。

2.2 影响抗菌肽 R-1 产量的关键因素

Plackett-Burman(PB)设计的方差分析结果见表 3, 实验数据进行 3 次平行取均值。

由表 3 可知, 该模型显著。通过对回归系数的归纳发现, 葡萄糖($P=0.008$)、 $CaCl_2$ ($P=0.003$)、蛋白胨($P=0.008$)这 3 个因子都在 95%概率水平上差异显著, 其他因子差异不显著, 因此下面的研究选择葡

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

表 1 Plackett-Burman 实验因素水平及编码
Table 1 Level and code of variables chosen for Plackett-Burman design

Variable (g/L)	Symbol	Coded levels	
		-1	1
NH ₄ NO ₃	X ₁	1	10
Glucose	X ₂	5	25
KH ₂ PO ₄	X ₃	1	10
Sucrose	X ₄	5	25
Soluble starch	X ₅	5	25
MgSO ₄	X ₆	1	10
CaCl ₂	X ₇	1	10
Peptone	X ₈	1	15
(NH ₄) ₂ SO ₄	X ₉	1	10
Maltose	X ₁₀	5	25
Beef extract	X ₁₁	1	15
Yeast extract	X ₁₂	1	15
ZnCl ₂	X ₁₃	1	10
BaCl ₂	X ₁₄	1	10
Dextrine	X ₁₅	5	25

表 2 实验因素水平和编码
Table 2 Boundaries of experimental domain and spacing of levels expressed in coded and natural units

Code unit	Experimental factor		
	Glucose (g/L, X ₁)	Peptone (g/L, X ₂)	CaCl ₂ (g/L, X ₃)
-2	5	1	1
-1	10	3	2
0	15	5	3
1	20	7	4
2	25	9	5
Δx	5	2	1

表 3 抗菌肽 R-1 在 Plackett-Burman 设计中回归方程方差分析表
Table 3 ANOVA for the regression equation of antimicrobial peptide R-1 in Plackett-Burman design

Source	Seq SS	DF	Adj MS	F value	P value
Model	9363.4	15	624.23	7.15	0.035
Residual	349.1	4	87.27		
Total	9712.5	19			
				R ² = 96.41%	Adj R ² = 82.93%

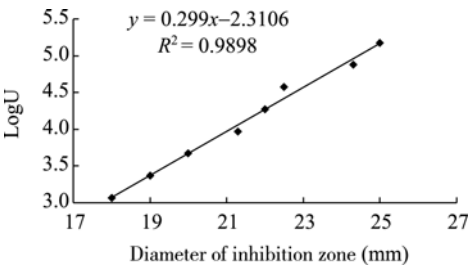


图 1 抗菌肽 R-1 活力标准曲线
Fig. 1 Standard activity curve of antimicrobial peptide R-1

葡萄糖、CaCl₂、蛋白胨作为影响短小芽孢杆菌 Lh-1 产抗菌肽 R-1 的关键因素, 其他因子可以不予考虑, 保持原培养基成分不变, 进一步优化培养条件对抗菌肽产量的影响。

2.3 利用响应面方法优化抗菌肽 R-1 发酵培养基
2.3.1 多元二次模型的建立以及检验: 选择葡萄糖、蛋白胨和氯化钙为研究对象, 以抗菌肽 R-1 产量为相应值, 设计 20 组实验。实验设计及结果见

表 4。

利用 Minitab 15.0 对表 4 中的数据进行二次多元回归拟合, 获得了以下多元回归方程:

$$Y=102.395+6.584X_1+13.358X_2+7.117X_3-12.163X_1^2-14.621X_2^2-12.199X_3^2+4.006X_1X_2-0.291X_1X_3+0.249X_2X_3$$

其中, Y 为抗菌肽产量的预测值, X_1 、 X_2 、 X_3 为葡萄糖、蛋白胨和氯化钙的编码值。

方差分析表见表 5, 由结果可见, 该模型显著, 预测值和实测值之间有高相关性($R^2=92.61\%$)。对回归系数的显著性检验表明, 实验各个因素对 R-1

的曲面相应和线型效应皆显著。

2.3.2 响应面交互作用分析及优化: 多元二次回归方程对应的响应曲线图和等高线图见图 2~4, 各个因素及其之间相互的影响都可以从图上直接分析得到。

图 2~4 显示的是葡萄糖、蛋白胨和氯化钙位于中心水平时的交互作用, 可以看出所有的作用都比较显著。葡萄糖、蛋白胨和氯化钙之间存在着明显的协同作用, 在一定范围内, 同时浓度升高获降低才能提高 R-1 的产量。图上显示在实验水平范围内, 葡萄糖、蛋白胨和氯化钙在中心水平附近可以获得

表 4 中心复合设计以及抗菌肽 R-1 产量的实验结果
Table 4 Central composite design and values of antimicrobial peptide R-1

Run no.	X_1	X_2	X_3	Yield (kU/mL)	
				Observed value	Predicted value
1	-1	-1	-1	34.17	40.316
2	1	-1	-1	39.21	46.055
3	-1	1	-1	49.21	58.523
4	1	1	-1	81.34	80.286
5	-1	-1	1	40.26	54.635
6	1	-1	1	55.20	59.209
7	-1	1	1	67.36	73.836
8	1	1	1	87.26	94.435
9	-2	0	0	52.07	40.576
10	2	0	0	68.74	66.913
11	0	-2	0	26.22	17.193
12	0	2	0	74.92	70.626
13	0	0	-2	43.33	39.366
14	0	0	2	77.19	67.833
15	0	0	0	102.45	102.395
16	0	0	0	111.22	102.395
17	0	0	0	108.73	102.395
18	0	0	0	94.35	102.395
19	0	0	0	110.48	102.395
20	0	0	0	100.46	102.395

表 5 抗菌肽 R-1 在中心复合设计中回归方程方差分析表
Table 5 ANOVA for the regression equation of antimicrobial peptide R-1 in Central composite design

Source	Seq SS	DF	Adj MS	F value	P value
Model	13531.1	9	1503.46	13.93	<0.001
Residual	1079.1	10	107.91		
Total	14610.2	19			
				$R^2 = 92.61\%$	Adj $R^2 = 85.97\%$

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

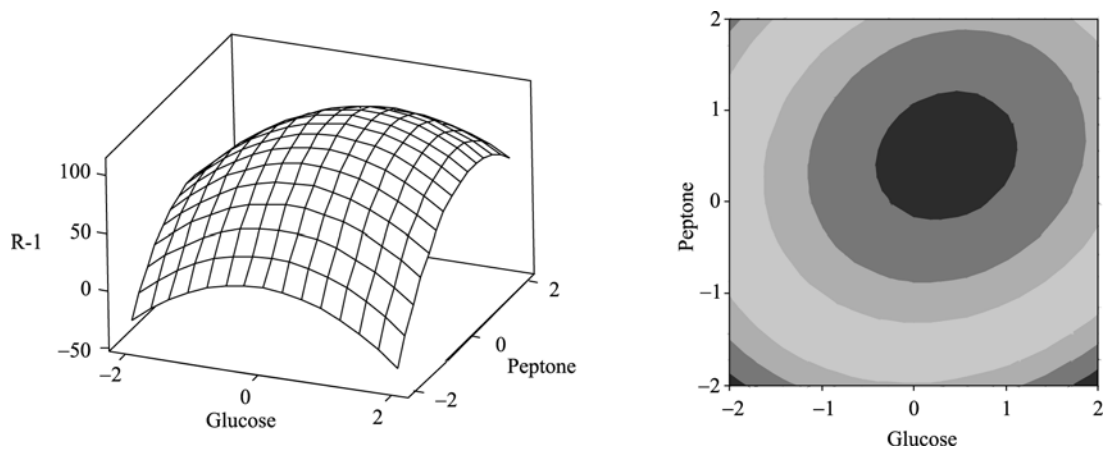


图 2 葡萄糖与蛋白胨交互影响 R-1 产量的曲面图和等高线图

Fig. 2 Response surface plot and corresponding contour plot of R-1 versus glucose and peptone

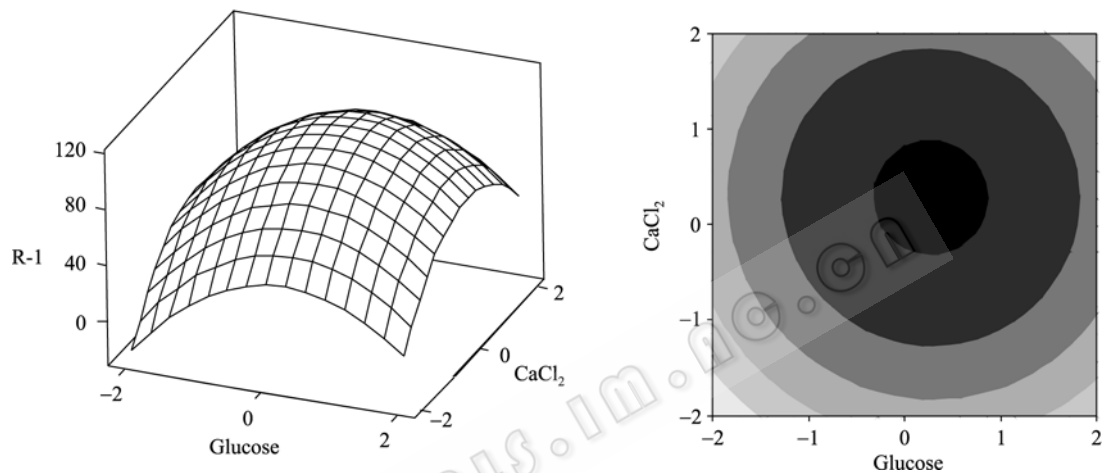


图 3 葡萄糖与 CaCl_2 交互影响 R-1 产量的曲面图和等高线图

Fig. 3 Response surface plot and corresponding contour plot of R-1 versus glucose and CaCl_2

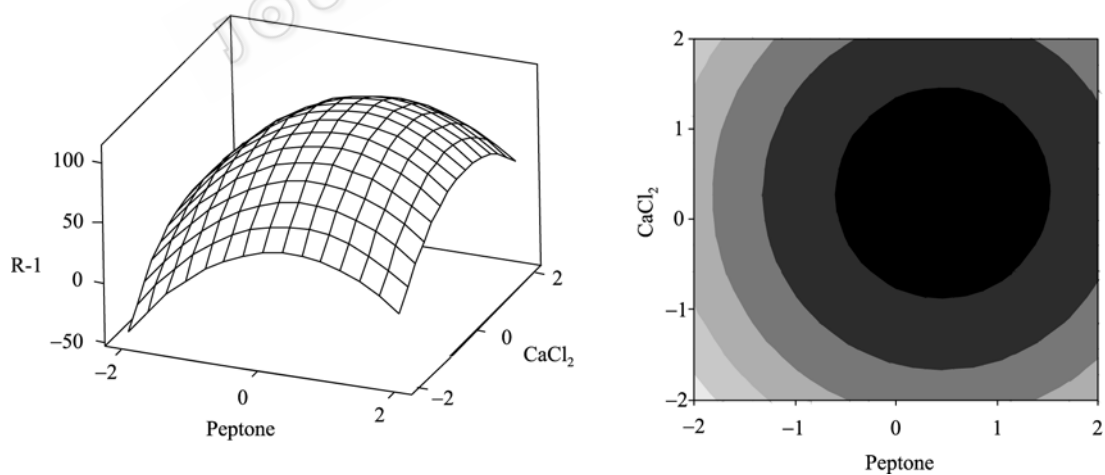


图 4 蛋白胨与 CaCl_2 交互影响 R-1 产量的曲面图和等高线图

Fig. 4 Response surface plot and corresponding contour plot of R-1 versus peptone and CaCl_2

最大的产量,充分说明菌体的生长繁殖需要合适的碳氮比和盐浓度,过大浓度加速了细胞的呼吸,

抑制了产物的积累,而过小浓度不利于菌体富集,引起细胞衰老和自溶。

3 讨论

一般来说, 影响微生物发酵的培养因素有很多种, 包括氮源、碳源和无机盐等等, 传统的单次单因子法优化发酵培养条件, 或是在逐因子实验的基础上采用正交实验, 仅能比较各因素已选定水平的优劣, 无法提供未考察区域的信息, 不能进行预报和控制, 并非获得最佳的优化条件^[16,17]。而利用 Plackett-Burman 设计可以从众多变量间快速筛选出主效果因素, 再与响应面方法(response surface methodology, RSM)结合确定重要因素的最佳水平, 得出回归模型和最佳水平后, 进行实验验证, 评价回归模型的预测结果是否理想。从原理来看, 采用上述方法可以弥补以前在微生物培养优化中的一些不足。近年来很多研究人员都使用了此方法来实现微生物的高密度培养、提高次级代谢产物的产量, 取得了良好的效果^[9-14]。

在本研究中, 为了提高来自海洋的短小芽孢杆菌 Lh-1 发酵产抗菌肽 R-1 的能力, 本研究首先采用了 Plackett-Burman 设计, 对影响 Lh-1 发酵的 15 个因子进行了评价和筛选, 得到了 3 个影响 R-1 产量和活力的主要因素, 减少了实验次数, 提高了效率。

在以上实验的基础上, 采用中心复合设计和响应面分析得到 3 个主要因素: 葡萄糖、蛋白胨和氯化钙影响 R-1 发酵生产的二次多项模型, 并对此模型进行了显著性检验。通过对该模型求导可知, 在葡萄糖 15.72 g/L, 蛋白胨 6.01 g/L, 氯化钙 3.29 g/L 的时候, 可以获得最大的活性的抗菌肽 R-1, 预测值为 107.98 kU/mL。在此条件下进行验证实验, 得出的实际产量为 116.27 kU/mL, 而在原来的种子培养基上产量仅为 82.15 kU/mL, 显著提高。经实践证明, PB 设计结合 RSM 方法进行培养条件优化, 经济有效, 科学合理。

参 考 文 献

- [1] Alexander DJ, Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: Diseases of Poultry, 9th ed. Iowa State University Press, Ames, LA. 1991, pp.496-519.
- [2] 卡尔尼克 BW. 禽病学. 北京: 中国农业出版社, 1999, p.59.
- [3] Faulkner DJ. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 1996, **13**(2): 75.
- [4] 别小妹, 吕凤霞, 陆兆新, 等. 枯草芽孢杆菌 fmbR 抗菌物质稳定性研究. *食品科学*, 2006, **27**(6): 104-108.
- [5] Kobayashy J, Ishibashi M, Walchi MR, et al. Amphidinolide C: The first 25-membered macrocyclic lactone with potent antineoplastic activity from the cultured dinoflagellate *Amphidinium* sp.. *J Am Chem Soc*, 1988, **110**: 490.
- [6] 任召珍, 郑媛, 孙 谧, 等. 海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 抗菌活性物质的分离及特性研究. *微生物学报*, 2007, **47**(6): 997-1001.
- [7] 张 琇, 王跃军, 孙 谧, 等. 海洋细菌 S-12-86 的产溶菌酶条件. *中国水产科学*, 2007, **14**(3): 425-429.
- [8] Xiu Z, Yue-jun W, Mi S, et al. Purification and properties of lysozyme from a marine strain. *Annals of Microbiology*, 2008, **58**(1): 89-94.
- [9] 高鹏飞, 李 妍, 赵文静, 等. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 增殖培养基的优化. *微生物学通报*, 2008, **35**(4): 623-628.
- [10] 刘代新, 宁喜斌, 张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件. *微生物学通报*, 2008, **35**(2): 306-310.
- [11] 董锡文, 杜春梅, 林建强, 等. 响应面法优化斜卧青霉 Ju-A10 产 CMCase 的条件. *微生物学通报*, 2006, **33**(3): 31-35.
- [12] 徐子钧, 李 剑, 梁凤来, 等. 利用 SAS 软件优化 L-乳酸发酵培养基. *微生物学通报*, 2004, **31**(3): 85-87.
- [13] 王允祥, 陆兆新. 翅鳞伞培养条件响应面法优化研究. *微生物学通报*, 2004, **31**(6): 42-47.
- [14] 刘建忠, 翁丽萍, 计亮年. 表面响应法优化黑曲霉过氧化氢酶的发酵工艺. *微生物学通报*, 2002, **29**(5): 17-21.
- [15] 徐积恩, 朱明珍. 抗生素. 北京: 科学出版社, 1982, p.152.
- [16] Li F, Rong-ping L, Jin L, et al. Study on a protein kinases lysis activity of *Bacillus subtilis* HW-2: Selection of liquid fermentation conditions. *Progress in Biotechnology*, 1997, **17**(3): 31-33.
- [17] Qiu-ling X, Yong G. The optimization of fermentation conditions of nattokinase. *Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition*, 1999, **27**(5): 127-130.