

研究报告

解淀粉芽胞杆菌 PC2 产抑菌物质培养基及发酵条件优化

申光辉* 郑丽君 张志清 程璐 杨红霞 吴贺君 黎杉珊

(四川农业大学食品学院 四川 雅安 625014)

摘要:【目的】优化解淀粉芽胞杆菌 PC2 产抑菌活性物质发酵培养基及发酵条件。【方法】以马铃薯葡萄糖液体培养基为基础,依据发酵液对金黄色葡萄球菌抑菌圈的单因素试验结果,采用 Box-Behnken 响应面法优化发酵培养基,二次通用旋转组合设计,频率分析法优化发酵条件。【结果】影响发酵液抑菌活性的培养基主要组分为马铃薯、蔗糖和 L-谷氨酸钠,最优发酵培养基配方为:马铃薯 188.0 g/L,蔗糖 22.0 g/L, L-谷氨酸钠 1.80 g/L,培养基成本为 0.81 元/L;最佳发酵条件为:接种量 6%、发酵温度 30 °C、装液量 40 mL/250 mL、摇床转速 185 r/min、发酵时间 24 h、初始 pH 7.0。优化后发酵液对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径为 30.82 mm,较优化前的 18.22 mm 增加了 12.60 mm。【结论】优化后的培养基和发酵条件提高了解淀粉芽胞杆菌 PC2 发酵液的抑菌活性,为该菌株的工业化生产应用提供了依据。

关键词: 解淀粉芽胞杆菌, 抑菌物质, 发酵条件, 响应面法, 二次通用旋转组合设计, 优化

Optimization of fermentation medium and conditions for antimicrobial substances production by *Bacillus amyloliquefaciens* PC2

SHEN Guang-Hui* ZHENG Li-Jun ZHANG Zhi-Qing CHENG Lu YANG Hong-Xia
WU He-Jun LI Shan-Shan

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: [Objective] To improve antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* strain PC2, the medium composition and fermentation conditions were optimized in our work. [Methods] Single factor experiments were carried to evaluate the effect of alternative constitutes for PDB medium on inhibition zone diameter against *Staphylococcus aureus*, Box-Behnken response surface methodology was conducted to obtain the optimal composition of the crucial medium factors. The optimal fermentation conditions were obtained through frequency analysis based on quadratic general rotary composite design. [Results] The optimal medium compositions were (g/L): potato 188.0, sucrose 22.0,

Foundation item: Youth Foundation of Education Commission of Sichuan Province, China (No. 13ZB0288); Foundation for Discipline Construction and Development of Sichuan Agricultural University (No. 03572107)

*Corresponding author: Tel: 86-835-2882281; E-mail: shenghuishen@163.com

Received: August 22, 2016; **Accepted:** December 02, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 05, 2016
基金项目: 四川省教育厅青年基金项目(No. 13ZB0288); 四川农业大学“双支计划”项目(No. 03572107)

*通讯作者: Tel: 86-835-2882281; E-mail: shenghuishen@163.com

收稿日期: 2016-08-22; 接受日期: 2016-12-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-05

L-monosodium glutamate 1.80, and the media cost was 0.81 RMB per litre. The optimal fermentation conditions were as follows: inoculation amount 6%, culture temperature 30 °C, liquid volume 40 mL/250 mL, rotation speed 185 r/min, initial pH value 7.0, and fermentation for 24 h. Applying optimal medium and culture conditions, the inhibition zone diameter of free-cell fermentation broth on *Staphylococcus aureus* reached to 30.82 mm, increased by 12.60 mm compared with the original conditions. [Conclusion] The present study provides a cost-effective medium and fermentation conditions for further study on large scale fermentation for antimicrobial substances production.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, Antimicrobial substance, Fermentation conditions, Response surfaces methodology, Quadratic general rotary composite design, Optimization

寻找化学农药、保鲜防腐剂的有效替代物是目前食品安全研究的热点。微生物代谢产物丰富多样,是筛选安全有效的微生物农药、食品生物防腐剂的重要来源,受到国内外研究的广泛关注。解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)可产生抗菌脂肽、抗菌蛋白和聚酮类化合物等多种抑菌活性物质^[1-2],具有易培养、生物安全性高^[3]等优势,在食品原料生产^[4-6]、采后保鲜防腐安全控制^[7-9]等方面具有广泛的应用价值。生产成本和效率是制约解淀粉芽胞杆菌相关产品工业化生产应用的主要瓶颈^[10]。发酵培养基成分和发酵条件对解淀粉芽胞杆菌抑菌物质生物合成^[11]和生产成本^[12]均有重要影响,是相关产品商品化生产应用的基础。

解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* PC2 是本课题组利用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板从天然蜂粮中分离获得的 1 株广谱抑菌菌株,对革兰氏阳性、阴性细菌、酵母菌和霉菌均有不同程度的抑菌活性。此外,菌株营养需求简单,可利用马铃薯葡萄糖液体培养基发酵产脂肽和蛋白类抑菌活性成分,而利用营养肉汤(NB)等常用培养基发酵抑菌活性较弱,甚至无抑菌活性,同时该菌株具有发酵周期短,抑菌活性成分对高温、强酸和紫外照射稳定性好等优势^[13],有较强的开发应用潜力。为了获得低廉的培养基和高效的发酵条件,国内外对不同来源的解淀粉芽胞杆菌产抑菌活性物质培养基组分及发酵条件进行了优化实验研究^[9-12,14-15],相继获得了比较理想的结果,但来源不同的解淀粉芽胞杆菌往往具有不同的营养需求和抑菌物质发酵特性,最适发酵培养基组分和发酵条件差异较大^[14]。

为了进一步提高菌株 PC2 发酵液抑菌活性,本实验以马铃薯葡萄糖液体培养基为基础,分别采用 Box-Behnken 响应面设计和二次通用旋转组合设计,对其发酵培养基组分和发酵条件进行优化,为其工业化生产和开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) PC2、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、瓜果腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum*) 保存于四川农业大学食品学院微生物实验室。

1.1.2 培养基: NB 培养基、PDB 培养基参照文献[16]配制,NA、PDA 培养基分别在 NB、PDB 培养基基础上添加 15.0 g/L 琼脂。Landy 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, L-谷氨酸钠 5.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, KCl 0.5, K₂HPO₄·3H₂O 1.0, FeSO₄·7H₂O 0.000 15, MnSO₄·H₂O 0.005, CuSO₄·5H₂O 0.000 16, pH 7.2。

1.2 方法

1.2.1 发酵液抑菌活性测定: 发酵结束后,按照文献[13]的方法制备无菌发酵液,采用改良牛津杯双层平板法测定无菌发酵液对金黄色葡萄球菌等供试指示细菌的抑菌活性,牛津杯法测定对酵母、霉菌的抑菌活性。无菌发酵液添加量为 100 μL,指示细菌 37 °C 培养 24 h,酵母、霉菌 28 °C 培养 48 h,十字交叉法测定抑菌圈直径(mm)。

1.2.2 外加营养成分和浓度筛选: 分别用乳糖、麦

芽糖、甘露糖、蔗糖和可溶性淀粉等量替代基础发酵培养基中的葡萄糖,选择最佳碳源;向基础发酵培养基中分别添加 2.0 g/L 的硫酸铵、尿素、胰蛋白胍、L-谷氨酸钠、牛肉膏和酵母膏,筛选最优外加氮源;发酵基础培养基中添加 6 种无机盐,考察外加无机盐的效应。无机盐添加量分别为(g/L): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.10, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NaCl 3.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.50。考察不同浓度的马铃薯、蔗糖和 L-谷氨酸钠对发酵液抑菌活性的影响。上述实验接种量为 6.0%,装液量 50 mL/250 mL, 37 °C、140 r/min 振荡培养 24 h。

1.2.3 培养基配方 Box-Behnken 响应面优化: 根据外加营养成分筛选实验结果,选择主要影响因素马铃薯、蔗糖和 L-谷氨酸钠,采用 Design-Expert 8.0.6 软件设计 3 因素 3 水平 Box-Behnken 响应面试验并进行数据分析。

1.2.4 发酵条件单因素试验: 采用优化的最佳培养基,分别考察接种量、装液量、摇床转速、发酵温度、发酵时间和初始 pH 值对无菌发酵液抑菌活性的影响,各组重复 3 次。各因素固定水平分别为:接种量 6.0%、装液量为 50 mL/250 mL、摇床转速 140 r/min、发酵温度 37 °C、发酵时间 24 h、初始 pH 7.0。不同发酵条件下获得的发酵液先调 pH 值至 7.0,再按照 1.2.1 方法测定抑菌活性。

1.2.5 二次通用旋转组合设计优化发酵条件: 根据单因素试验结果,选择发酵温度、装液量、摇床转速 3 个主要影响因素,采用 DPS 7.05 软件进行三元二次通用旋转组合试验设计,其他因素选择单因素试验最佳水平,采用频率分析法确定最佳发酵条件组合,并验证预测结果。

1.2.6 数据统计与分析: 结果差异显著性分析采用 DPS 7.05 软件,Duncan 法进行多重比较;采用 Origin Pro 9.0 作图。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基组分单因素试验

2.1.1 外加碳源、氮源和无机盐种类筛选: 由图 1A 可知,不同碳源对发酵液抑菌圈直径有较大影响,

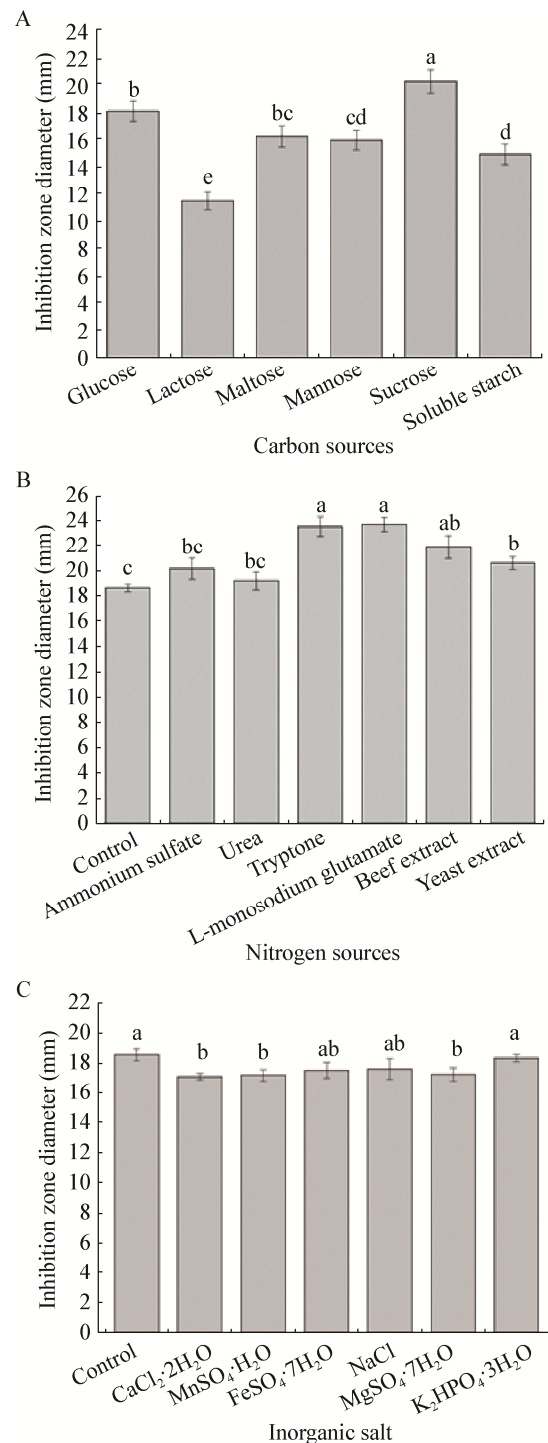


图 1 不同碳源(A)、氮源(B)和无机盐(C)对发酵液抑菌活性的影响

Figure 1 Effect of different carbon sources (A), nitrogen sources (B) and inorganic salt (C) on inhibition zone diameter

与对照(葡萄糖, 抑菌圈直径为 18.22 mm)相比, 添加蔗糖显著提高了发酵液抑菌圈直径, 添加麦芽糖发酵液抑菌圈直径与葡萄糖对照无显著差异, 而添加甘露糖、可溶性淀粉及乳糖发酵液抑菌圈显著小于基础发酵培养基, 其中添加乳糖发酵液抑菌圈直径最小。从发酵液抑菌活性和碳源成本考虑, 蔗糖可作为 PC2 产抑菌活性物质的最佳碳源。

不同外加氮源对发酵液抑菌圈直径的影响不同(图 1B)。总体上看, 添加有机氮源的发酵液圈直径大于添加无机氮源; 添加无机氮源硫酸铵和尿素并没有显著增加发酵液抑菌圈直径, 而添加 4 种有机氮源的发酵液抑菌圈直径显著大于基础发酵培养基, 其中添加胰蛋白胍和 L-谷氨酸钠发酵液抑菌圈直径较大, 添加牛肉膏和酵母膏的抑菌圈较小。从培养基原料价格比较, L-谷氨酸钠较其他 3 种氮源售价低廉。因此, 综合发酵液抑菌活性和原料成本, 以 L-谷氨酸钠作为 PC2 发酵抑菌活性物质的最佳外加氮源。

基础发酵培养基中添加无机盐并未提高发酵液抑菌活性(图 1C), 添加氯化钙、硫酸锰和硫酸镁发酵液抑菌直径显著小于对照培养基, 其他 3 种无

机盐添加对发酵液抑菌圈直径并无显著影响。由于基础发酵培养基主要成分为马铃薯汁, 其中所含的各种无机盐类可以满足 PC2 发酵产抑菌活性物质的营养代谢需求, 额外添加部分无机盐反而会抑制抑菌活性物质合成代谢。因此基础发酵培养基无需添加无机盐。

2.1.2 马铃薯、蔗糖、L-谷氨酸钠添加量试验: 根据 2.1.1 实验结果, 在不添加无机盐的基础上, 分别考察不同浓度马铃薯、蔗糖和 L-谷氨酸钠对发酵液抑菌圈直径的影响。由表 1 可知, 在实验浓度范围内, 发酵液抑菌圈直径均随添加浓度的升高先升后降, 当马铃薯添加量为 200 g/L, 发酵液抑菌圈直径最大; 蔗糖添加量在 15–25 g/L 范围内, 发酵液抑菌圈直径相对较大, 但无显著性差异($P>0.05$); L-谷氨酸钠添加量为 1.5 g/L 时, 发酵液抑菌圈直径最大。

2.2 培养基组分 Box-Behnken 试验结果

2.2.1 响应面回归模型建立与分析: Box-Behnken 试验设计与结果见表 2。通过 Design-Expert 软件对结果分析获得抑菌圈直径(Y)与马铃薯(A)、蔗糖(B)、L-谷氨酸钠(C)之间的二次多项式回归方程: $Y = -47.678 + 0.588 5A + 1.194 6B + 3.266 0C - 0.001 3AB + 0.004 3AC + 0.036 3BC - 0.001 5A^2 - 0.021 8B^2 - 1.395 3C^2$ 。

表 1 不同浓度马铃薯、蔗糖和谷氨酸钠对菌株 PC2 抑菌活性的影响

Table 1 Effect of different medium component concentration on inhibition zone diameter of PC2 strain

马铃薯 Potato (g/L)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	蔗糖 Sucrose (g/L)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	L-谷氨酸钠 Sodium hydrogen glutamate (g/L)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)
100	22.10±0.40 ^d	10.0	22.97±0.44 ^b	1.0	21.89±0.62 ^b
150	22.77±0.43 ^{bc}	15.0	24.51±0.69 ^a	1.5	23.95±0.56 ^a
200	23.89±0.53 ^{ab}	20.0	23.76±0.23 ^{ab}	2.0	19.97±0.22 ^d
250	22.61±0.20 ^b	25.0	24.39±0.67 ^a	2.5	20.83±0.22 ^c
300	21.53±0.59 ^{cd}	30.0	20.90±0.48 ^c	3.0	21.58±0.39 ^b

注: 同列不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: The different letter in the same column means significant difference ($P<0.05$).

表2 Box-Behnken 试验设计及结果

试验号 Run	A: 马铃薯 Potato (g/L)	B: 蔗糖 Sucrose (g/L)	C: L-谷氨酸钠 L-monosodium glutamate (g/L)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)
1	250 (1)	20.0 (0)	1.0 (-1)	16.70
2	200 (0)	20.0 (0)	2.0 (0)	24.62
3	250 (1)	20.0 (0)	3.0 (1)	15.98
4	200 (0)	10.0 (-1)	1.0 (-1)	19.72
5	200 (0)	20.0 (0)	2.0 (0)	23.15
6	200 (0)	20.0 (0)	2.0 (0)	23.95
7	150 (-1)	30.0 (1)	2.0 (0)	20.51
8	200 (0)	10.0 (-1)	3.0 (1)	17.18
9	200 (0)	30.0 (1)	3.0 (1)	21.35
10	150 (-1)	10.0 (-1)	2.0 (0)	17.15
11	250 (1)	10.0 (-1)	2.0 (0)	16.36
12	200 (0)	20.0 (0)	2.0 (0)	23.62
13	150 (-1)	20.0 (0)	1.0 (-1)	21.60
14	150 (-1)	20.0 (0)	3.0 (1)	20.03
15	250 (1)	30.0 (1)	2.0 (0)	17.15
16	200 (0)	30.0 (1)	1.0 (-1)	22.44
17	200 (0)	20.0 (0)	2.0 (0)	23.40

注：括号内数字表示因素水平编码值。

Note: Factors level code values are shown in the brackets.

对回归模型进行方差分析，由表3可见，模型显著性检验 $P=0.0003 < 0.001$ ，模型达到了极显著水平，失拟项不显著 ($P=0.1011 > 0.05$)，模型 $R^2=0.9820$ ， $R_{adj}^2=0.9589$ ，表明该回归模型误差小，拟合度好，可用于分析预测菌株 PC2 产抑菌活性物质的最佳发酵培养基配方。

此外，由表3中 P 值可知，马铃薯、蔗糖和谷氨酸钠对发酵液抑菌圈直径均有显著影响 ($P < 0.05$)，由 F 值可知3个因素对抑菌圈直径的影响作用次序为：马铃薯 > 蔗糖 > L-谷氨酸钠；从交互项 P 值可知，各因素间交互作用不显著 ($P > 0.05$)。剔除不显著项 ($P > 0.05$)，回归方程可简化为： $Y = -47.678 + 0.5885A + 1.1946B + 3.2660C - 0.0015A^2 - 0.0218B^2 - 1.3953C^2$ 。由该简化方程，采用 Origin Pro 9.0 软件作出响应面 3D 图和等高线图(图2)。因素的响应坡面越陡，其对抑菌圈直径的影响越大，由图2可见，马铃薯的坡面较陡，蔗糖次之，谷氨酸钠的坡面相对较平缓，表明因素对抑菌圈直径的影响作用次序为：马铃薯 > 蔗糖 > L-谷氨酸钠，与表3结果一致。等高线图均略呈现椭圆形，表明因素间交互作用不强烈，与表3方差分析结果一致。

表3 Box-Behnken 试验方差分析

Table 3 Analysis of variance for Box-Behnken experiment

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 Prob > F	显著性 Significant
模型 Model	139.949 4	9	15.549 9	20.386 9	0.000 3	**
A (Potato)	21.451 3	1	21.451 3	28.123 9	0.001 1	**
B (Sucrose)	15.235 2	1	15.235 2	19.974 3	0.002 9	**
C (L-monosodium glutamate)	4.380 8	1	4.380 8	5.743 5	0.047 7	*
AB	1.651 2	1	1.651 2	2.164 9	0.184 7	NS
AC	0.180 6	1	0.180 6	0.236 8	0.641 4	NS
BC	0.525 6	1	0.525 6	0.689 1	0.433 9	NS
A^2	60.010 6	1	60.010 6	78.677 6	<0.000 1	**
B^2	20.014 7	1	20.014 7	26.240 5	0.001 4	**
C^2	8.196 7	1	8.196 7	10.746 4	0.013 5	**
残差 Residual	5.339 2	7	0.762 7			
失拟项 Lack of fit	4.042 9	3	1.347 6	4.158 5	0.101 1	NS
纯误差 Pure error	1.296 3	4	0.324 1			
总和 Cor. total	145.288 6	16				

注：*：差异显著 ($P < 0.05$)；**：差异极显著 ($P < 0.01$)；NS：差异不显著。

Note: *: Significant difference; **: Extremely significant; NS: Non-significant.

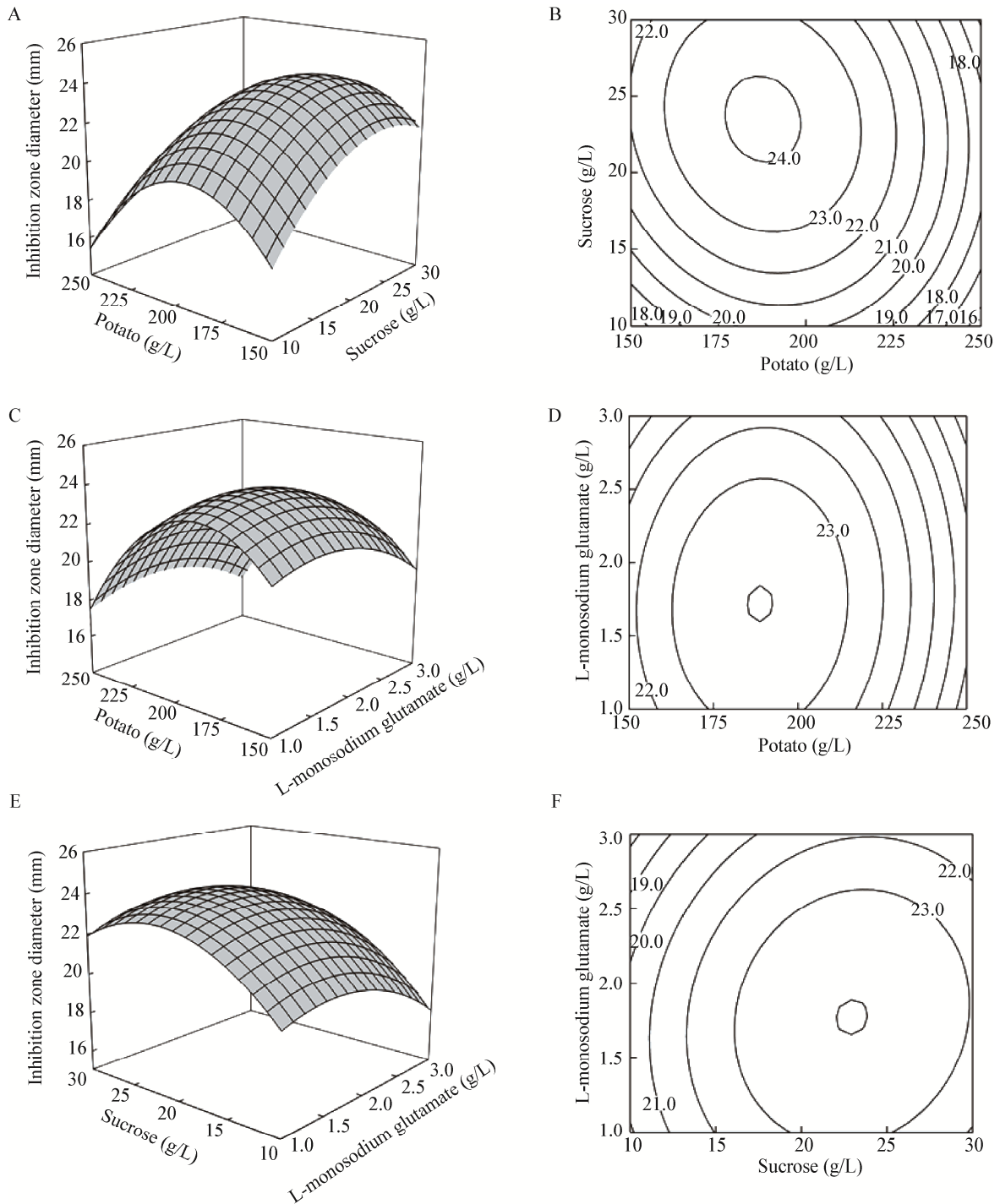


图 2 三个主要因素交互影响菌株 PC2 抑菌活性的响应曲面图

Figure 2 The response surface plots for effects of three main factor interactions on inhibition zone diameter of PC2 strain

2.2.2 培养基配方优化与验证: 通过回归模型获得各因素最佳添加量分别为: 马铃薯 188 g/L, 蔗糖 22.0 g/L, L-谷氨酸钠 1.80 g/L, 发酵液抑菌圈直径最大预测值为 24.89 mm。为了验证模型准确性, 利用上述优化培养基, 按 6%接种量接种, 装液量 50 mL/250 mL, 发酵温度 37 °C, 摇床转速 140 r/min, 发酵 24 h 获得发酵培养基, 共进行 5 组平行验证试验。验证结果显示, 实测抑菌圈直径为 24.62±0.26 mm, 与预测值差异很小, 表明该模型参数可靠。优化后培养基发酵液抑菌圈直径较基础发酵培养基的 18.22 mm (图 1)增加了 6.40 mm。

2.2.3 优化培养基成本及其抑菌活性比较: 为进一步比较实验获得的优化培养基成本优势, 依据培养基原材料购买价格进行 3 种培养基成本比较。此外, 选择 4 种指示菌, 按照文献[13]的方法测定不同培养基发酵液抑菌圈直径。由表 4 可见, 优化培养基

成本均低于其他 2 种发酵培养基, 且成分种类数量少, 更方便发酵培养基的配制, 同时发酵液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、酿酒酵母和瓜果腐霉菌的抑菌圈直径均大于其他 2 种培养基。

2.3 发酵条件单因素试验

2.3.1 接种量: 由图 3A 可见, 不同接种量发酵液抑菌活性差异明显, 接种量 6%条件下发酵液抑菌圈直径最大, 为 24.86 mm, 显著高于其他接种量抑菌活性($P<0.05$)。

2.3.2 装液量: 装液量对发酵液抑菌活性的影响很大(图 3B)。发酵液抑菌圈直径随着装液量的提高逐渐减小, 装液量 20 mL/250 mL, 发酵液抑菌圈直径最大, 当装液量大于 110 mL/250 mL, 发酵液基本无抑菌活性。装液量会影响发酵过程中液体培养基中的通氧量, 表明菌株 PC2 抑菌活性物质的生物合成属于需氧代谢。

表 4 培养基成本与发酵液抑菌活性比较

Table 4 Cost and inhibitory activity comparison for fermentation media for PC2 strain

发酵培养基 Fermentation media	成分及添加量 Compositions and amount (g/L)	成分单价 Cost (Yuan/500 g)	总价格 Total cost (Yuan)	平均成本 Average cost (Yuan/L)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)
NB 培养基 NB medium	Beef extract 3.0	115	0.69	3.07	<i>S. aureus</i> 15.35±0.75
	Peptone 10.0	115	2.30		<i>E. coli</i> 12.28±0.86
	NaCl 5.0	8.0	0.08		<i>S. cerevisiae</i> -
					<i>P. aphanidermatum</i> -
Landy 培养基 Landy medium	Glucose 20.0	8.5	0.34	0.84	<i>S. aureus</i> 21.39±0.46
	L-monosodium glutamate 5.0	42.5	0.43		<i>E. coli</i> 16.86±0.68
	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5	9.8	0.009 8		<i>S. cerevisiae</i> 34.57±0.63
	KCl 0.5	21.8	0.021 8		<i>P. aphanidermatum</i> 15.36±0.84
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 1.0	20.0	0.040 0		
	FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.000 15	9.0	2.7×10 ⁻⁶		
	MnSO ₄ ·H ₂ O 0.005	26.0	0.000 3		
	CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.000 16	30.0	9.6×10 ⁻⁶		
优化培养基 Optimal medium	Potato 188.0	2.0	0.300	0.81	<i>S. aureus</i> 24.62±0.26
	Sucrose 22.0	8.0	0.352		<i>E. coli</i> 20.35±0.38
	L-monosodium glutamate 1.8	42.5	0.153		<i>S. cerevisiae</i> 38.45±0.58
					<i>P. aphanidermatum</i> 19.24±0.49

2.3.3 摇床转速: 发酵过程通过摇床振荡可增加培养基中溶解氧浓度, 由图 3C 可知, 发酵液抑菌圈直径随着摇床转速的提高而增大, 也表明了氧气可促进该菌株抑菌活性物质的合成代谢。当转速低于 80 r/min, 发酵液无抑菌圈, 当转速增加到 170 r/min 时, 发酵液抑菌圈直径达到了最大值, 继续提高摇

床转速至 200 r/min, 发酵液抑菌圈直径并未显著增加($P>0.05$)。

2.3.4 发酵温度: 发酵温度对发酵液抑菌圈直径也有显著影响(图 3D)。随着温度的提高, 发酵液抑菌圈直径逐渐增大, 发酵温度为 30 °C 时, 抑菌圈直径最大, 为 29.36 mm。继续提高发酵温度, 发酵液

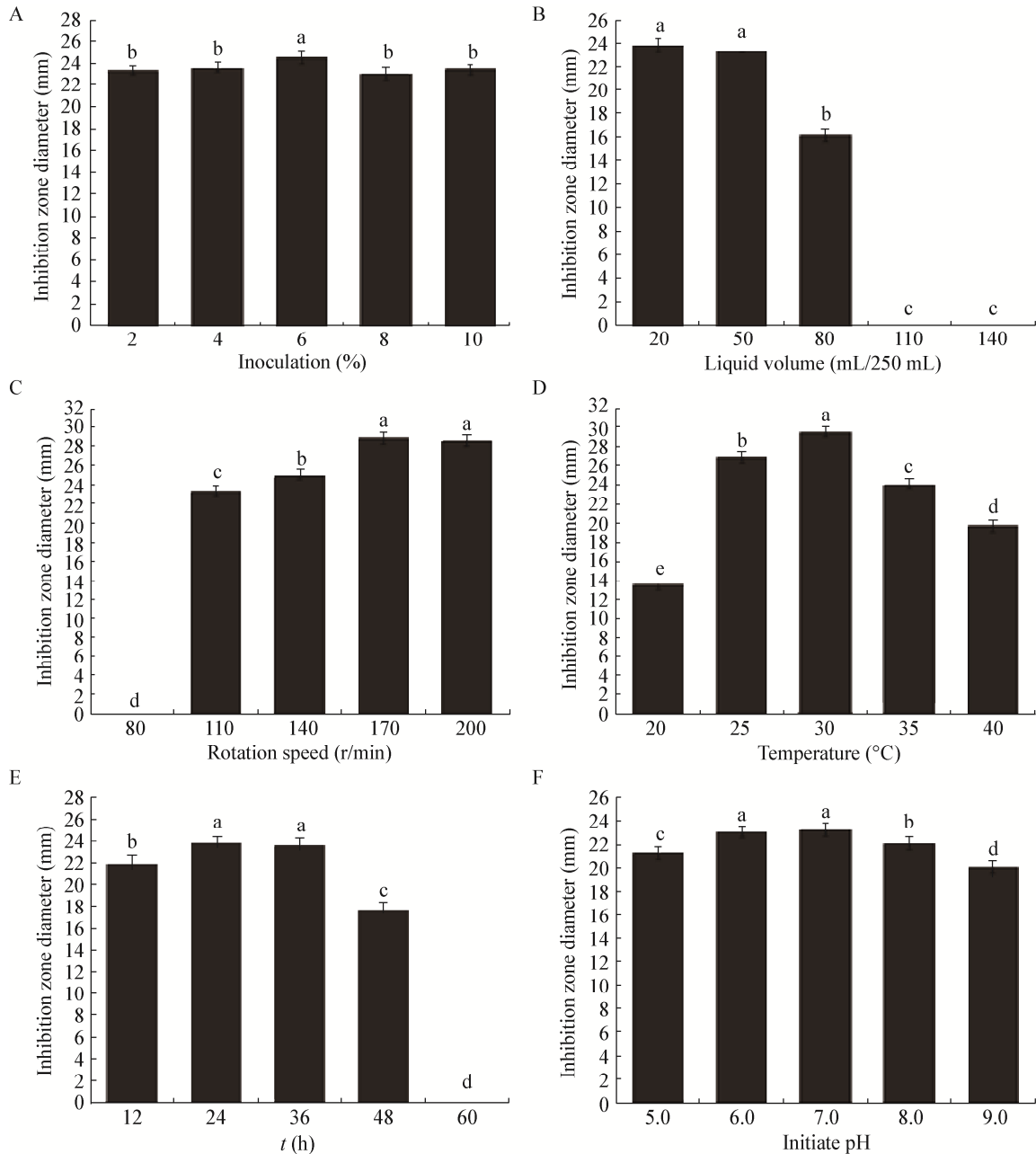


图 3 不同发酵条件对 PC2 抑菌活性的影响

Figure 3 Effect of fermentation conditions on the inhibition zone diameter of PC2 strain

抑菌圈直径显著下降。发酵温度会直接影响相关合成酶活性,温度过高或过低都会影响发酵液抑菌圈直径大小。结果表明,菌株 PC2 合成相关抑菌活性物质的最佳温度为 30 °C。

2.3.5 发酵时间:不同发酵时间的发酵液抑菌圈直径差异显著。从图 3E 可知,随着发酵时间的延长,发酵液抑菌圈直径呈先增后减的变化趋势,发酵至 24 h 时,抑菌圈直径即达到了最大峰值,随着发酵继续,抑菌活性逐渐降低,当发酵至 60 h,抑菌活性基本丧失。结果表明,发酵液中主要抑菌活性成分合成速度快,但在发酵到一定时间会被降解,而无细胞发酵液抑菌活性室温贮藏过程中较为稳定(数据待发表),抑菌活性物质的活性的丧失可能与细胞衰亡期产生的酶类降解作用有关。

2.3.6 初始 pH:由图 3F 可见,发酵培养基初始 pH 对发酵液抑菌圈直径也有明显影响,初始 pH 在 6.0–7.0 条件下发酵液活性最强。初始 pH 偏酸(pH≤5.0)或偏碱(pH≥8.0)均会影响发酵液抑菌活性。

2.4 二次通用旋转组合试验优化发酵条件

2.4.1 模型的建立与显著性检验:根据发酵条件单因素试验结果,选择发酵温度、装液量和摇床转速 3 个因素为自变量,通过三元二次通用旋转组合试验,进一步确定产抑菌活性物质的最佳发酵条件,结果见表 5。

利用 DPS 7.05 软件对表 5 结果进行方差分析,逐步回归法获得了发酵液抑菌圈直径(Y)与 3 个发酵试验参数关系的二次回归方程: $Y=28.458+0.265X_1-1.659X_2+1.432X_3-2.242X_1^2-0.146X_2^2-0.414X_3^2+0.270X_1X_2+0.248X_1X_3+0.128X_2X_3$ 。由表 6 可知,回归模型失拟检验 $F_1=3.148 0 < F_{0.05}(5, 5)=5.05$,不显著,拟合检验 $F_2=22.378 9 > F_{0.01}(9, 10)=4.94$,模型极显著,所得回归模型与实测值拟合良好,适用于发酵条件参数的优化预测。从表 6 中 F 值可知,各因素对发酵液抑菌圈直径的影响次序为:装液量(X_2)>转速(X_3)>温度(X_1),装液量(X_2)和转速(X_3)对发酵液抑菌圈直径的影响达到了极显著性($P < 0.01$),其余各项均不显著($P > 0.05$),3 因素间两两交互作用

均不显著($P > 0.05$)。在 $\alpha=0.10$ 显著水平剔除不显著项,建立模型的简化回归方程: $Y=28.458-1.659X_2+1.432X_3-2.242X_1^2-0.414X_3^2$ ($R^2=0.952 7, R_{adj}^2=0.952 0$)。

2.4.2 单因素效应分析:对结果进行单因素效应分析作图,由图 4 可知,装液量对发酵液抑菌活性影响最大,温度对其影响最小。当温度取 0 水平,即 30 °C 时,抑菌活性最强,低于或高于 30 °C,发酵液抑菌活性均会明显下降,与丁翠珍等^[17]的研究结果类似。不同的装液量和摇床转速会导致培养基溶氧量的变化,影响到好氧菌菌体生长和抑菌活性物质的产生^[18-19]。由图 4 可见,装液量对抑菌圈直径

表 5 三元二次通用旋转组合试验设计及结果
Table 5 Quadratic general rotary composite design and corresponding results

试验号 Run	温度 Temperature (°C)	装液量 Liquid volume (mL/250 mL)	转速 Rotation speed (r/min)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)
1	32.5 (1)	60 (1)	190 (1)	26.47
2	32.5 (1)	60 (1)	170 (-1)	23.22
3	32.5 (1)	40 (-1)	190 (1)	28.10
4	32.5 (1)	40 (-1)	170 (-1)	25.52
5	27.5 (-1)	60 (1)	190 (1)	24.59
6	27.5 (-1)	60 (1)	170 (-1)	22.49
7	27.5 (-1)	40 (-1)	190 (1)	27.46
8	27.5 (-1)	40 (-1)	170 (-1)	25.71
9	25.8 (-1.681 8)	50 (0)	180 (0)	22.25
10	34.2 (1.681 8)	50 (0)	180 (0)	22.58
11	30 (0)	33 (-1.681 8)	180 (0)	32.10
12	30 (0)	67 (1.681 8)	180 (0)	24.59
13	30 (0)	50 (0)	163.2 (-1.681 8)	24.65
14	30 (0)	50 (0)	196.8 (1.681 8)	30.52
15	30 (0)	50 (0)	180 (0)	27.96
16	30 (0)	50 (0)	180 (0)	28.31
17	30 (0)	50 (0)	180 (0)	28.59
18	30 (0)	50 (0)	180 (0)	29.18
19	30 (0)	50 (0)	180 (0)	28.95
20	30 (0)	50 (0)	180 (0)	27.66

注:括号内数字表示因素水平编码值。

Note: Factors level code values are shown in the brackets.

表 6 二次通用旋转组合试验结果方差分析
Table 6 Analysis of variance for quadratic general rotary composite design

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	偏相关系数 Partial correlation coefficient	F 值 F value	P 值 Prob>F
X_1 Temperature	0.956 9	1	0.956 9	0.346 9	1.368 4	0.269 2
X_2 Liquid volume	37.566 1	1	37.566 1	-0.918 2	53.719 3	0.000 1
X_3 Rotation speed	27.992 2	1	27.992 2	0.894 5	40.028 7	0.000 1
X_1^2	72.462 0	1	72.462 0	-0.955 0	103.620 4	0.000 1
X_2^2	0.306 3	1	0.306 3	-0.204 8	0.438 0	0.523 1
X_3^2	2.475 8	1	2.475 8	-0.511 3	3.540 3	0.089 3
X_1X_2	0.583 2	1	0.583 2	0.277 4	0.834 0	0.382 6
X_1X_3	0.490 1	1	0.490 1	0.255 9	0.700 8	0.422 1
X_2X_3	0.130 1	1	0.130 1	0.135 1	0.186 0	0.675 4
Model	140.846 3	9	15.649 6	$F_2=22.378 9$		0.000 1
Residual	6.993 0	10	0.699 3			
Lack of fit	5.307 1	5	1.061 4	$F_1=3.148 0$		0.057 9
Pure error	1.685 9	5	0.337 2			
Cor. total	147.839 3	19				

的影响呈负效应,即随着装液量的增加,发酵液抑菌圈直径几乎呈直线下降。摇床转速对抑菌圈直径的影响呈负效应,随着转速的提高,抑菌圈直径的增加幅度越来越小,当转速大于 190 r/min 后,提高转速并未明显增大发酵液抑菌圈直径。减少装液量,提高摇床转速均可提高培养基中溶解氧浓度,

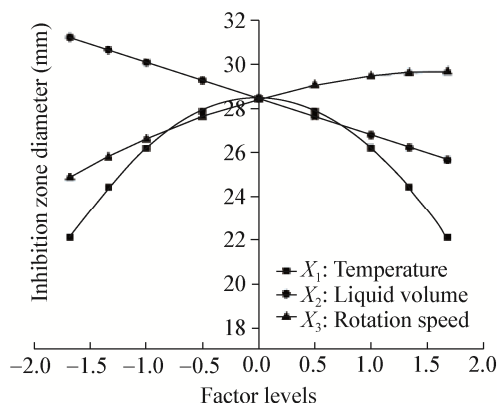


图 4 单因素效应分析图

Figure 4 Analysis of the one-factor effect of three main cultivate parameters on inhibition zone diameter

利于抑菌活性的合成代谢,这与单因素试验结果一致。

2.4.3 最佳发酵条件的优化与验证: 装液量和摇床转速是发酵过程中重要的效率因子,装液量过少,转速太高都会影响实际的发酵效率。因此,试验采用频率分析法对回归模型进行寻优分析,结果见表 7。

由表 7 可知,在 95%置信区间发酵液抑菌圈直径大于 26.55 mm 的各变量的编码取值区间分别为 $-0.231-0.231$ 、 $-1.041-0.376$ 、 $0.310-0.958$,即优化参数取值范围为:发酵温度 $29.42-30.58$ °C、装液量 $39.6-50.8$ mL/250 mL、摇床转速 $183-189$ r/min。考虑到实际操作的可行性,将最优发酵条件方案调整为:发酵温度 30 °C、装液量 40 mL/250 mL、摇床转速 185 r/min。对此发酵条件参数最优方案进行 5 次平行试验验证,测得发酵液抑菌圈直径为 30.82 mm,与方程理论预测值 30.73 mm 很接近,进一步证明所得模型方程的可靠性。

表 7 各变量取值的频率分布
Table 7 Frequency distribution of variable value in the optimization scheme

水平 Levels	X_1 Temperature		X_2 Liquid volume		X_3 Rotation speed	
	次数 Times	频率 Frequency	次数 Times	频率 Frequency	次数 Times	频率 Frequency
-1.681 8	0	0.000 0	13	0.361 1	1	0.027 8
-1.000 0	9	0.250 0	10	0.277 8	5	0.138 9
0.000 0	18	0.500 0	8	0.222 2	8	0.222 2
1.000 0	9	0.250 0	3	0.083 3	11	0.305 6
1.681 8	0	0.000 0	2	0.055 6	11	0.305 6
加权均数 Weighted average	0.000 0		-0.708 0		0.634 0	
标准误 Standard error	0.118 0		0.170 0		0.165 0	
95%置信区间 95% Confidence interval	-0.231-0.231		-1.041- -0.376		0.310-0.958	
发酵条件范围 Factor range	29.42-30.58		39.6-50.8		183-189	

3 讨论

解淀粉芽胞杆菌是一类与枯草芽胞杆菌亲缘关系很近的细菌, 活性代谢产物种类及功能丰富, 稳定性好, 安全性高, 在农业生物防治、食品防腐保鲜、生物医药开发等方面受到国内外的普遍关注。国内相关领域的产品开发应用落后于国外, 主要受制于产品发酵工艺的成本、效率及产品的稳定性。国内对其发酵培养基和发酵条件的优化研究不少, 所获得的大部分培养基原料成本还不够低廉, 如需要添加牛肉膏、蛋白胨、酵母粉等成本较高的有机氮源^[14-15], 离工业化发酵的成本要求尚有一定差距。本课题组前期从天然蜂粮中分离获得了 1 株解淀粉芽胞杆菌 PC2, 其在马铃薯蔗糖液体培养基中主要产脂肽类和抗菌蛋白两大类抑菌活性物质(分离鉴定结果另文发表)。本研究通过碳源、氮源和无机盐单因素试验, 采用 Box-Behnken 响应面设计方法获得了解淀粉芽胞杆菌 PC2 最优发酵培养基: 马铃薯 188.0 g/L, 蔗糖 22.0 g/L, L-谷氨酸钠 1.80 g/L。该培养基与已报道的芽胞杆菌抑菌活性发酵培养基完全不同, 组成成分简单易得, 成本优势明显, 其中蔗糖、谷氨酸钠属于成本低廉的化工原料; 而马铃薯属于常见的农产品, 且只需取其煮沸的汁液即可。由此我们也大胆推测, 利

用马铃薯淀粉或全粉加工废液作为发酵培养基主要组分, 能够进一步降低发酵成本, 下一步将以这两种食品加工废液为主要成分, 对培养基作进一步优化试验研究。

本试验在单因素试验基础上, 通过二次通用旋转回归设计, 采用频率分析法获得最佳发酵条件: 接种量 6%、发酵温度 30 °C、装液量 40 mL/250 mL、摇床转速 185 r/min、发酵时间 24 h、初始 pH 7.0。其中所得的最优发酵温度和初始 pH 条件与卢彩鸽等^[15]和张荣胜等^[20]的研究一致。摇床转速和装液量会影响溶解氧含量, 最优发酵需要在较低的装液量和较高的摇床转速条件下进行, 也说明了本试验菌株 PC2 抑菌活性物质的代谢过程需要充足氧气, 这也与卢彩鸽等^[15]及方传记等^[10]的研究一致, 摇床转速远高于刘京兰等^[12,14]及 He 等^[21]的研究结果。这也表明不同分离来源的芽胞杆菌菌株可能由于抑菌活性产物的代谢途径存在差异, 存在不同的最优发酵条件。

参 考 文 献

- [1] Wang T, Liang YF, Wu MB, et al. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2015, 23(4): 744-754
- [2] Cochrane SA, Vederas JC. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates[J]. Medicinal Research Reviews, 2016, 36(1): 4-31

- [3] Meena KR, Kanwar SS. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics[J]. Biomed Research International, 2015, 2015: 473050
- [4] Kim YG, Kang HK, Kwon KD, et al. Antagonistic activities of novel peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(48): 10380-10387
- [5] He H, Zhu YL, Chi LQ, et al. Screening and antibacterial function of *Bacillus amyloliquefaciens* X030[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(9): 1133-1143 (in Chinese)
何浩, 朱颖龄, 迟立庆, 等. 解淀粉芽孢杆菌 BaX030 的分离鉴定及抗菌功能[J]. 微生物学报, 2015, 55(9): 1133-1143
- [6] Alfonzo A, Lo Piccolo S, Conigliaro G, et al. Antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 active against grapevine fungal pathogens[J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(4): 1593-1599
- [7] Liu HM, Sun LJ, Wang YL, et al. Modeling antimicrobial activity of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 against *Shewanella putrefaciens* in shrimp meat using a response surface method[J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(10): 1855-1858
- [8] Kadaikunnan S, Rejiniemon TS, Khaled JM, et al. *In-vitro* antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2015, 14: 9
- [9] Pretorius D, van Rooyen J, Clarke KG. Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease[J]. New Biotechnology, 2015, 32(2): 243-252
- [10] Fang CJ, Lu ZX, Sun LJ, et al. Optimization of fermentation technology for lipopeptides producing bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2-4[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(2): 533-539 (in Chinese)
方传记, 陆兆新, 孙力军, 等. 淀粉液化芽孢杆菌抗菌脂肽发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 533-539
- [11] Sun LJ, Lu ZX, Bie XM, et al. Influence of medium on antimicrobial lipopeptide production by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2. [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(10): 3389-3398 (in Chinese)
孙力军, 陆兆新, 别小妹, 等. 培养基对解淀粉芽孢杆菌 ES-2 菌株产抗菌脂肽的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(10): 3389-3398
- [12] Liu JL, Cai XC, Xue YR, et al. Optimization of iturin A synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 using response surface technique[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 235-243 (in Chinese)
刘京兰, 蔡勋超, 薛雅蓉, 等. 生防解淀粉芽孢杆菌 CC09 合成 iturin A 条件的响应面优化[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 235-243
- [13] Shen GH, Feng M, Zhang ZQ, et al. Isolation, identification of an antagonistic bacteria from bee bread and characteristics of antimicrobial substances[J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2197-2206 (in Chinese)
申光辉, 冯孟, 张志清, 等. 一株蜂粮源拮抗细菌的分离鉴定及其抑菌物质特性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2197-2206
- [14] Liu JL, Xue YR, Liu CH. Optimization of shake flask-fermentation conditions for Iturin A production by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* CC09[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 75-82 (in Chinese)
刘京兰, 薛雅蓉, 刘常宏. 内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 产 Iturin A 摇瓶发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 75-82
- [15] Lu CG, Dong HP, Zhang DP, et al. Optimization of fermentation medium components and cultural conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* MH71 in flask[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(3): 369-377 (in Chinese)
卢彩鸽, 董红平, 张殿朋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 MH71 摇瓶发酵培养基及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(3): 369-377
- [16] Li PL, He ZF. Experimental Principles and Techniques of Food Microbiology[M]. 2nd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 222-224 (in Chinese)
李平兰, 贺稚非. 食品微生物学实验原理与技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 222-224
- [17] Ding CZ, Qiu JY, Liu WC, et al. Optimization of media components and cultural conditions for improving antagonistic activity of *Bacillus subtilis* B02[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(2): 159-163 (in Chinese)
丁翠珍, 裴季燕, 刘伟成, 等. 枯草芽孢杆菌 B02 产生拮抗物质培养基及发酵条件优化[J]. 中国生物防治, 2008, 24(2): 159-163
- [18] Zhang WZ, Wang YP, Liu HX, et al. Optimization of medium components and cultural conditions of *Bacillus cereus* AR156[J]. Microbiology China, 2010, 37(6): 803-810 (in Chinese)
张文芝, 王云鹏, 刘红霞, 等. 蜡质芽孢杆菌 AR156 发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 803-810
- [19] Ye YF, Li QQ, Yuan GQ, et al. Optimization of culture medium and fermentation conditions for high production of antimicrobial substance by *Bacillus subtilis* strain B47[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1339-1346 (in Chinese)
叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 等. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1339-1346
- [20] Zhang RS, Liang XJ, Liu YF, et al. Optimization of fermentation process of *Bacillus amyloliquefaciens* Lx-11[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2013, 29(2): 254-262 (in Chinese)
张荣胜, 梁雪杰, 刘永锋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 生物发酵工艺优化[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(2): 254-262
- [21] He S, Wang HQ, Wu B, et al. Response surface methodology optimization of fermentation conditions for rapid and efficient accumulation of macrolactin A by marine *Bacillus amyloliquefaciens* ESB-2[J]. Molecules, 2012, 18(1): 408-417