

倪赛, 刘银春, 李健, 等. 响应面法优化桔青霉 PA-33 菌株的发酵工艺[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(2): 94-102.
NI Sai, LIU Yinchun, LI Jian, et al. Fermentation optimization of *Penicillium citrinum* PA-33 strain by response surface method[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(2): 94-102.

响应面法优化桔青霉 PA-33 菌株的发酵工艺

倪 赛, 刘银春, 李 健, 李肖鹤, 朱向东

(江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要:【目的】优化桔青霉 *Penicillium citrinum* PA-33 发酵培养基和发酵条件, 以提高桔青霉 PA-33 的抗菌活性。【方法】采用单因素试验确定桔青霉 PA-33 发酵所需最适基础培养基、碳氮源和无机盐, 并利用响应面法设计确定最适发酵培养基配方; 在发酵条件单因素试验基础上, 采用三元二次通用旋转组合设计和频率分析法优化其最适发酵条件组合。【结果】经优化后, 最佳发酵培养基配方为马铃薯汁液 219.91 g·L⁻¹、甘露醇 34.11 g·L⁻¹、黄豆粉 6.25 g·L⁻¹; 最适发酵条件为装液量 50 mL、接种量 3.5% (ϕ)、发酵温度 28 °C、摇床转速 150 r·min⁻¹、发酵时间 12 d。优化后发酵液对大肠埃希菌 *Escherichia coli* 的抑菌圈直径为 28.99 mm, 较优化前抑菌圈直径 (18.73 mm) 增加了 10.26 mm。【结论】采用响应面法、三元二次通用旋转组合设计和频率分析法优化发酵工艺, 显著提高了桔青霉 PA-33 发酵液的抗菌活性, 为该菌株的抗菌活性物质的分离以及工业化生产提供依据。

关键词: 桔青霉; 抗菌活性; 响应面法; 二次通用旋转组合设计; 优化; 发酵

中图分类号: S182

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)02-0094-09

Fermentation optimization of *Penicillium citrinum* PA-33 strain by response surface method

NI Sai, LIU Yinchun, LI Jian, LI Xiaohu, ZHU Xiangdong

(College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: 【Objective】To optimize the medium composition and fermentation conditions of *Penicillium citrinum* PA-33 to improve its antibacterial activity. 【Method】Single factor experiments were used to determine the optimum basic medium, carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts. The optimum formulation of fermentation medium was determined by response surface methodology. On the basis of single factor tests of fermentation conditions, the optimal combination of fermentation conditions was optimized by ternary quadratic rotation unitized design and frequency analysis method. 【Result】The optimal medium composition were: Potato juice 219.91 g·L⁻¹, mannitol 34.11 g·L⁻¹ and soybean powder 6.25 g·L⁻¹. The optimal fermentation conditions were: Liquid volume 50 mL, inoculation concentration 3.5% (ϕ), culture temperature 28 °C, rotation speed 150 r·min⁻¹ and fermentation for 12 d. The inhibition zone diameter of fermentation broth after optimization on *Escherichia coli* reached 28.99 mm, increased by 10.26 mm compared with 18.73 mm under the original conditions. 【Conclusion】Response surface methodology, ternary quadratic rotation unitized design and frequency analysis method significantly enhance the antibacterial activity of fermentation broth of *Penicillium citrinum* PA-33, and this study provides a basis for isolation of antibacterial active substances and industrial production of this strain.

收稿日期: 2018-04-18 网络首发时间: 2019-01-30 09:10:00

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20190129.1006.002.html>

作者简介: 倪 赛 (1992—), 男, 硕士研究生, E-mail: 373455035@qq.com; 通信作者: 朱向东 (1965—), 男, 教授, 博士, E-mail: zhuxdau@jxau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (21366012); 江西省教育厅自然科学基金 (GJJ170286)

Key words: *Penicillium citrinum*; antibacterial activity; response surface methodology; quadratic general rotatory unitized design; optimization; fermentation

如今, 新抗生素的研发速度缓慢, 已不足以应对当今耐药菌感染的现状。面对这一现状, 注重新型抗生素的研究、加快新型抗生素的发现和更替已成为应对耐药菌的研究热点。而来源于青霉属 *Penicillium* sp. 真菌的活性产物具有抗菌、抗肿瘤和抗病毒等功效, 除此之外青霉属真菌还能分泌高活性的水解酶类、降解多种芳香类污染物和促进 C、N 等多种元素的循环利用^[1]。目前为止, 已报道 1 300 种以上来源于青霉属真菌的代谢产物, 普遍具有抗菌、杀虫、抗病毒、抗肿瘤和抗心血管疾病等活性^[2]。桔青霉 *Penicillium citrinum* 属于青霉属的一种, 来源于桔青霉的新型生物碱腺苷 (Penicitrinine A) 可抑制多种肿瘤细胞的增殖, 除此之外, 桔青霉也是抗菌药物桔霉素衍生物的重要来源^[3-5]。已报道从桔青霉中分离出一种新的桔霉素衍生物柠檬醛 (Citrinacetal), 以及另一种新的衍生物苯地林醇 (Penicitrinol L) 和 2 种已知的类似物腺苷 (Penidicitrinin B^[6]、pennicitrinone A^[7])。

优化产抗生素菌株的发酵培养基是提高抗生素产率的重要途径。微生物发酵代谢受多种生物和非生物因子的影响, 发酵培养基和发酵条件的改变均可导致代谢途径出现差异, 由此可能产生不同的代谢产物^[8]。碳源、氮源、微量元素以及培养条件等的改变会导致青霉属真菌发酵液的体外抗菌谱和抗肿瘤谱变化, 这也说明青霉属发酵液中的活性产物出现差异^[1]。对于产抗生素的菌株而言, 发酵培养基的营养成分和发酵条件直接影响菌株的生长、代谢产物的调控和途径, 进而影响其生物活性的强弱。来源不同的同一种菌株往往具有不同的营养需求和产抑菌物质发酵特性, 最适发酵培养基组分和发酵条件差异较大^[9]。因此, 研究微生物发酵所需的最适发酵培养基配方和发酵条件是提高其抗生素产量的另一条途径和思路。响应面分析法是优化发酵工艺的一种高效方法, 已成为国际上新发展的一种优化理论方法, 广泛应用于化学化工、生物工程、制药、食品工业、农业等领域^[10-13]。响应面法不仅可以得到响应值与变量之间的关系, 而且可以设计出最优组合, 使响应值达到最大^[14]。在多变量系统中, 响应面法用于研究变量的作用及寻找最适条件方面得到广泛应用, 包括优化反应条件和优化发酵条件, 通过响应

面法优化培养基提高发酵产物产量^[15]。金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和大肠埃希菌 *Escherichia coli* 是最常见的感染致病菌, 并且是革兰阳性和阴性菌的代表性菌株, 除此之外枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 也是最普遍的芽孢杆菌属菌株, 以此为抗菌活性测试菌具有代表性。

为了提高桔青霉 PA-33 抗菌活性, 本试验采用 Box-Behnken 响应面法、二次通用旋转组合设计和频率分析法进行最适发酵培养基和发酵条件优化试验, 为菌株的进一步开发和工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 桔青霉 PA-33 由南昌市生物资源保护与利用重点实验室从江西省鄱阳湖国家湿地公园白沙洲土样中分离筛选并保藏; 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌的菌株保存于江西农业大学生物科学与工程学院实验室。

1.1.2 供试试剂 牛肉膏和酵母膏等购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 玉米粉、甘露醇和黄豆粉等购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB): 马铃薯汁液 200 g·L⁻¹, 葡萄糖 20 g·L⁻¹, 蒸馏水 1 L; 沙氏液体培养基 (SD): 葡萄糖 40 g·L⁻¹, 蛋白胨 10 g·L⁻¹, 蒸馏水 1 L; 查氏酵母膏液体培养基 (CY): 蔗糖 30 g·L⁻¹, 酵母膏 10 g·L⁻¹, NaNO₃ 3 g·L⁻¹, KCl 0.5 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹, FeSO₄ 0.01 g·L⁻¹, K₂HPO₄ 1 g·L⁻¹, 蒸馏水 1 L; 马铃薯葡萄糖蛋白胨培养基 (PDP): 马铃薯汁液 200 g·L⁻¹, 葡萄糖 20 g·L⁻¹, 蛋白胨 10 g·L⁻¹, pH 6.0~6.5, 蒸馏水 1 L; 查氏培养基 (CA): NaNO₃ 2 g·L⁻¹, KCl 0.5 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹, FeSO₄ 0.01 g·L⁻¹, K₂HPO₄ 1 g·L⁻¹, 蒸馏水 1 L。

1.2 发酵液抗菌活性测试

1.2.1 病原菌的活化 活化病原细菌时, 挑取冷冻保存的病原细菌至新鲜的牛肉膏蛋白胨培养基, 37 °C 恒温培养 24 h, 然后接种至牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 37 °C、160 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h, 备用。

1.2.2 活性测试 采用管碟法,将 1 mL 病原菌菌液与 100 mL 冷却至 45~50 °C 的培养基混合后,分装倒入直径为 90 mm 平板中,待培养基凝固后,用直径为 6 mm 打孔器打孔,以无菌蒸馏水为对照(CK),每个孔加入 200 μ L 发酵液,重复 3 次,细菌 37 °C 恒温培养 24 h,十字交叉法测量抑菌圈直径。下述活性测试均参照此方法,以大肠埃希菌为病原指示菌,根据抑菌圈直径大小确定最适因素。

1.3 菌株 PA-33 发酵工艺优化

1.3.1 培养基成分单因素试验 参照文献[16-17]优化培养基成分:1) 将菌株 PA-33 分别接种至 PDB、SD、CY、PDP 和 CA 液体培养基中,确定最适基础培养基。2) 分别将蔗糖、淀粉、玉米粉、乳糖、果糖、糊精、甘油、甘露醇、麦芽糖、葡萄糖等替换基础培养基中的碳源,确定最适碳源;3) 分别将蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏、胰蛋白胨、黄豆粉、尿素、麸皮、KNO₃、NH₄NO₃ 和 NH₄Cl 等加入到最佳碳源培养基中,确定最适氮源;4) 分别将 5 g·L⁻¹ NaCl、KCl、K₂HPO₄、KH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄, 以及 0.5 g·L⁻¹ CaCl₂ 和 MgSO₄·7H₂O 加至最适碳氮源培养基,确定最适无机盐。5) 考察不同浓度马铃薯、甘露醇和黄豆粉对菌株 PA-33 发酵液抗菌活性的影响。上述试验接种量为 6% (φ),装液量为 50 mL,28 °C 条件下 150 r·min⁻¹ 摇床培养 7 d。

1.3.2 Box-Behnken 响应面法优化培养基配方 根据最适碳氮源和无机盐的筛选结果,选择影响菌株 PA-33 抗菌活性强弱的马铃薯、甘露醇和黄豆粉 3 个因素,采用 Design-Expert 8.0.6 软件设计三因素三水平 Box-Behnken 响应面试验并进行数据分析。

1.3.3 发酵条件单因素试验 选用优化的最佳发酵培养基配方,利用单因素试验分别考察装液量(25、50、75、100、150 和 200 mL)、接种量(1%、3%、6%、9%、15% 和 20%)(φ)、初始 pH(3、5、6、7、8 和 9)、温度(24、28、30 和 37 °C)以及发酵时间(4、6、8、10、12 和 16 d)对发酵液抑菌活性的影响,各组重复 3 次。各因素固定发酵条件为:接种量为 6% (φ),装液量为 50 mL,28 °C、150 r·min⁻¹ 摇床培养 7 d。并根据抑菌圈直径的大小确定最适发酵条件。

1.3.4 三元二次通用旋转组合设计优化发酵条件 在发酵条件单因素优化基础上,选择对抗菌活性强弱影响最大的温度、接种量和装液量 3 个因素,运用 DPS(7.05) 软件进行三元二次通用旋转组合设计,其他因素选用单因素试验最佳水平,采用频率分析法确定最佳发酵条件,并验证试验结果。

1.3.5 优化培养基发酵液抗菌活性测试 在优化后发酵培养基和发酵条件基础上,参照“1.3”节方法测定其发酵液对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和大肠埃希菌的抗菌活性,以 PDB 培养基为对照,每组重复 3 次。

1.4 数据统计与分析

用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,采用 Duncan's 法进行多重比较,采用 Origin pro 8.0 作图。

2 结果与分析

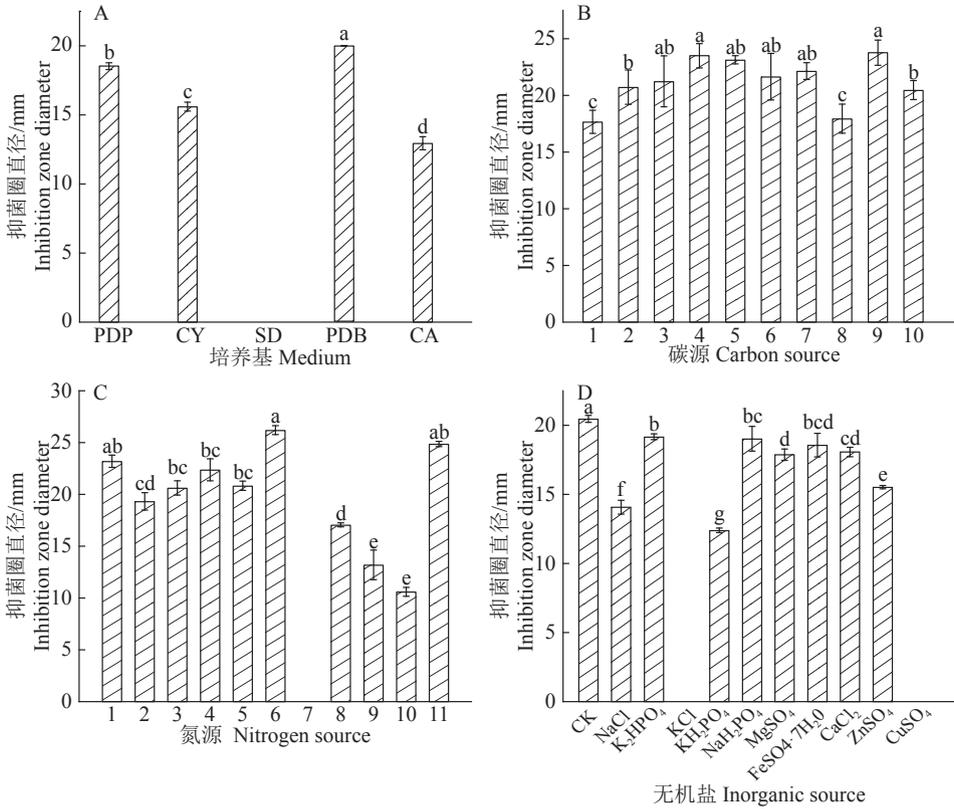
2.1 菌株 PA-33 发酵培养基单因素优化

2.1.1 基础培养基 不同的培养基对菌株 PA-33 抗菌活性的影响差异显著。PDB 培养基中的发酵液抗大肠埃希菌的抑菌圈直径最大,达到 20.01 mm。在 PDP、CY 和 CA 培养基中发酵液的抑菌圈直径分别为 18.53、15.06 和 12.95 mm,而在 SD 培养基中未表现出活性。因此选择 PDB 培养基作为发酵优化的初始培养基(图 1A)。

2.1.2 碳源 与葡萄糖(抑菌圈直径 17.67 mm)相比,甘露醇、玉米粉和乳糖的添加显著提高抗菌活性,分别增加 6.10、5.83 和 5.47 mm,且差异极显著;添加蔗糖、淀粉、果糖、糊精和麦芽糖发酵液的抑菌圈直径分别增加 3.06、3.57、3.98、4.47 和 2.80 mm,其差异显著;而添加甘油的发酵液的抑菌圈直径仅增加 0.28 mm。从发酵液活性提高的程度和成本考虑,选择甘露醇作为发酵培养基的最佳碳源(图 1B)。

2.1.3 氮源 10 种外加氮源中,与对照(PDB 培养基+甘露醇,抑菌圈直径 23.20 mm)相比,黄豆粉的添加使菌株 PA-33 发酵液的抑菌圈增加 3.00 mm,达到最大;添加麸皮发酵液的抑菌圈直径提高不明显,仅增加 1.66 mm;而添加有机氮源蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏、胰蛋白胨和尿素,以及无机氮源 KNO₃、NH₄NO₃ 和 NH₄Cl 的发酵液抑菌圈直径均小于对照组,其中添加尿素无抗菌活性。因此根据抗菌活性提高的程度,选择黄豆粉作为发酵培养基优化的最佳氮源(图 1C)。

2.1.4 无机盐 最佳碳氮源基础培养基(对照)的基础上,添加无机盐并未提高菌株 PA-33 发酵液的抗菌活性。添加 K₂HPO₄ 和 CaCl₂ 等 10 种无机盐发酵液抑菌圈直径均低于对照培养基,且对发酵液的抗菌活性无影响。由于基础培养基中的马铃薯汁含有各种微生物生长所需的无机盐成分,额外的无机盐添加会抑制微生物的正常生长,进而影响代谢



B 图中横坐标的数字 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 分别代表葡萄糖、蔗糖、淀粉、玉米粉、乳糖、果糖、糊精、甘油、甘露醇和麦芽糖; C 图中横坐标的数字 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 和 11 分别代表对照、蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏、胰蛋白胨、黄豆粉、尿素、KNO₃、NH₄NO₃、NH₄Cl 和陈皮; 各图中柱子上的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)

In figure B, number 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 represent glucose, sucrose, starch, corn flour, lactose, fructose, dextrin, glycerin, mannitol and maltose, respectively; In figure B, number 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11 represent control, peptone, yeast extract, beef extract, tryptone, soybean powder, urea, KNO₃, NH₄NO₃, NH₄Cl and bran, respectively; In each figure, different lowercase letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's test)

图 1 不同培养基成分对发酵液抗菌活性的影响

Fig. 1 Effects of different medium ingredients on the antibacterial activities of fermentation broth

活性产物的合成。因此, 菌株 PA-33 发酵液优化的培养基无需额外添加无机盐(图 1D)。

2.1.5 菌株 PA-33 培养基成分添加量的测定 在各浓度区间内, 发酵液抑菌圈直径均随浓度的增加

先升后降, 当马铃薯添加量为 200 g·L⁻¹, 发酵液抑菌圈直径最大; 甘露醇添加量为 30~35 g·L⁻¹, 发酵液抑菌圈直径最大; 黄豆粉为 7.5 g·L⁻¹ 时, 发酵液抑菌圈直径最大(表 1)。

表 1 不同质量浓度的培养基成分对菌株 PA-33 抗菌活性的影响¹⁾

Table 1 Effects of different concentrations of medium components on antibacterial activities of fermentation broth

ρ (马铃薯)/(g·L ⁻¹) Patato content	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	ρ (甘露醇)/(g·L ⁻¹) Mannitol content	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	ρ (黄豆粉)/(g·L ⁻¹) Soybean powder content	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter
100	22.93±0.52ab	20	22.03±0.12c	5.0	23.83±0.69c
150	23.13±0.25ab	25	23.33±0.09b	7.5	27.93±0.19a
200	23.47±0.25a	30	26.60±0.83a	10.0	25.77±0.31b
250	22.53±0.19b	35	25.50±0.08a	12.5	25.13±0.09b
300	21.80±0.16c	40	23.43±0.87b	15.0	22.43±0.17d

1) 同列数据后的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)

1) Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's test)

2.2 培养基配方 Box-Behnken 响应面优化

2.2.1 Box-Behnken 试验 对 Box-Behnken 试验结

果进行回归方差分析(表 2), 模型显著性检验 P 为 0.000 2, 影响极显著; 失拟性检验 P 为 0.118 9, 模型

表 2 Box-Behnken 试验方差分析

Table 2 Analysis of variance for Box-Behnken experiment

来源 ¹⁾ Source	SS	DF	MS	F	P ²⁾
模型 Model	76.25	9	8.47	22.24	0.000 2**
A	1.07	1	1.07	2.80	0.138 3
B	15.62	1	15.62	41.01	0.000 4**
C	14.36	1	14.36	37.70	0.000 5**
AB	0.07	1	0.07	0.17	0.691 9
AC	9.52	1	9.52	24.98	0.001 6**
BC	0.01	1	0.01	0.02	0.894 4
A ²	14.56	1	14.56	38.22	0.000 5**
B ²	12.31	1	12.31	32.30	0.000 7**
C ²	5.19	1	5.19	13.61	0.007 8**
残差	2.67	7	0.38		
Residual					
失拟	1.96	3	0.65	3.71	0.118 9
Lack of fit					
误差	0.71	4	0.18		
Error					
总变异	78.92	16			
Total variation					

1) A、B 和 C 分别表示马铃薯、甘露醇和黄豆粉; 2) “**” 表示模型具有极显著影响 ($P < 0.01$)

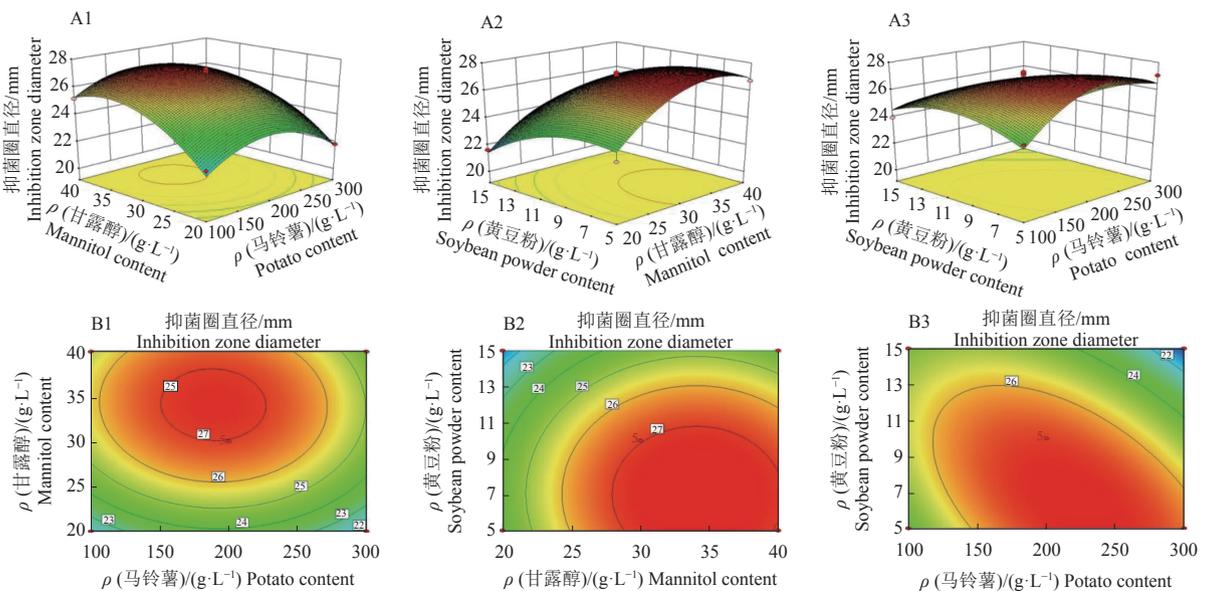
1) A, B and C represent potato, mannitol and soybean powder, respectively; 2) “**” indicates the model is highly significant ($P < 0.01$)

失拟性不显著; 另外 CV%、RH 和 Radj² 分别为 2.490 0、0.966 2 和 0.922 7, 表明该回归模型误差

小、拟合度好, 可用于分析预测菌株 PA-33 产抗菌活性物质发酵培养基优化。除此之外, 甘露醇和黄豆粉对菌株 PA-33 发酵液抗菌活性的影响极显著 ($P < 0.01$), 而马铃薯对菌株 PA-33 发酵液抗菌活性的影响不显著。由 F 值可知, 3 因素对发酵液抗菌活性的影响程度为甘露醇 > 黄豆粉 > 马铃薯。由各因素交互影响 P 值可知, 仅因素 AC 项影响极显著, AB 和 BC 项影响均不显著, 去除不显著项, 可得回归模型方程: $Y = 26.98 + 1.4B - 1.34C - 1.54AC - 1.86A^2 - 1.71B^2 - 1.11C^2$ 。

由 Expert Design 8.0.6 软件作 3 因素交互影响曲面图, 由图 2 可知, 甘露醇曲面最陡, 黄豆粉次之, 而马铃薯坡面最缓, 因坡面越陡对其抑菌圈直径的影响最大, 可得知 3 因素对抗菌活性影响程度为: 甘露醇 > 黄豆粉 > 马铃薯, 与表 2 结果一致。

2.2.2 培养基配方优化与验证 由 Expert Design 8.0.6 软件对回归模型进行 RSM 优化预测, 得最佳发酵培养基配方为马铃薯汁液 $219.91 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、甘露醇 $34.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、黄豆粉 $6.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 发酵液抑菌圈直径预测最大值为 27.71 mm 。通过此配方以发酵温度 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、摇床转速 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、接种量 6% (φ)、装液量 50 mL 、发酵时间 7 d 为发酵条件, 重复 3 次, 抗性试验表明抑菌圈直径为 27.37 mm , 与预测值 27.71 mm 无显著差异, 表明此模型可靠。与 PDA 基础培养基发酵液抑菌圈直径 18.73 mm 相比, 抑菌圈直径增加 8.64 mm 。



A1、A2 和 A3 为响应面 3D 图; B1、B2 和 B3 为等高线图

A1, A2, and A3: 3D maps of response surfaces; B1, B2, and B3: Contour maps

图 2 菌株 PA-33 抗菌活性的响应曲面图

Fig. 2 Response surface plots of antibacterial activity of strain PA-33

2.3 菌株 PA-33 发酵条件单因素优化

2.3.1 装液量 装液量对发酵液的抑菌活性影响极显著(图 3A), 随着装液量的递增, 其发酵液的抗菌活性先增加后减小, 当装液量为 50 mL 时, 抑菌圈直径最大, 为 27.13 mm。当装液量为 100 和 150 mL 时, 抑菌圈直径显著降低。装液量会影响菌株发酵的需氧量, 说明菌株 PA-33 抑菌活性物质的合成属于需氧代谢。

2.3.2 接种量 不同的接种量其发酵液的抗菌活性差异较显著(图 3B)。随着接种量增加, 发酵液的抑菌圈直径呈递减趋势, 接种量为 3% (φ) 时, 发酵液抑菌圈直径最大, 为 28.23 mm。菌量会影响发酵液的抗菌活性, 菌量越大, 可能对所需的营养成分需求越大, 进而无法满足自身需求, 从而影响生物活性物质的合成。

2.3.3 初始 pH pH 对其发酵液抗菌活性影响不大(图 3C)。初始 pH 在 3~9 时, 抑菌圈直径总体无明显变化, pH3 条件下的抑菌圈直径略高于 pH5 和 pH6 条件下的抑菌圈直径。

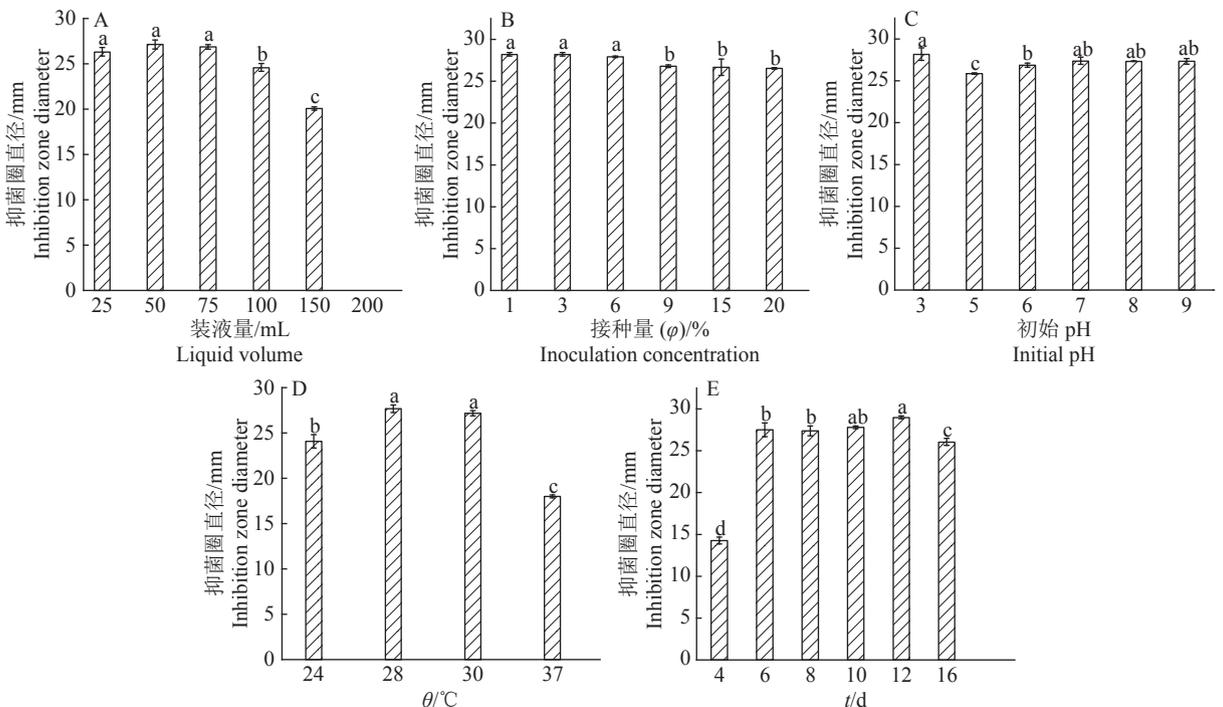
2.3.4 发酵温度 温度对发酵液的抗菌活性有显著影响(图 3D)。随着温度的增加, 其发酵液抑菌圈直径先增加后减小。当发酵温度为 28 °C 时, 发酵液抑菌圈直径最大, 为 27.67 mm, 温度达 37 °C 时, 其抑菌圈直径显著降低。

2.3.5 发酵时间 发酵时间显著影响其发酵液的抗菌活性(图 3E)。随着发酵时间的延长, 其发酵液的抑菌圈直径呈先增后减的变化趋势。发酵至 12 d 时, 抑菌圈直径最大, 为 29.00 mm。

2.4 三元二次通用旋转组合设计优化发酵条件

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, 选取发酵温度、装液量和接种量 3 个因素为自变量, 通过三元二次通用旋转组合试验, 进一步确定最佳发酵条件(表 3)。

利用 DPS7.05 软件对表 3 试验结果进行方差分析, 结果如表 4 所示, 回归失拟性检验 F 值为 2.233 2, 其 P 值为 0.130 9 > 0.05, 不显著; 拟合检验 F 值为 10.413 2, 其 P 值为 0.000 8 < 0.01, 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。逐步回归法得到发酵液抑菌圈直径 (Y) 与 3 个发酵试验参数关系的二次回归方程: $Y = 28.937 - 0.144X_1 + 0.168X_2 + 0.004X_3 - 0.667X_1^2 + 0.067X_2^2 - 0.044X_3^2 + 0.039X_1X_2 + 0.0138X_1X_3 + 0.011X_2X_3$ 。由 F 值可知各试验因素对发酵液抑菌圈直径的影响能力为接种量 > 温度 > 装液量, 3 个因素对发酵液的抗菌活性影响不显著 ($P > 0.05$), 3 个因素间两两交互作用均不显著。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: $Y = 28.937 - 0.144X_1 + 0.168X_2 - 0.667X_1^2$ 。



各图中, 柱子上方的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)

In each figure, different lowercase letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's test)

图 3 不同发酵条件对菌株 PA-33 抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of different dermentation condition on antimicrobial activity of strain PA-33

表 3 三元二次通用旋转组合试验设计及结果¹⁾

Table 3 Design and results for quadratic general rotary composite

试验号 Test No.	$\theta/^\circ\text{C}$	接种量(ϕ)/% Inoculation concentration	装液量/mL Liquid volume	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter
1	30(1)	5(1)	60(1)	28.30
2	30(1)	5(1)	40(-1)	28.37
3	30(1)	2(-1)	60(1)	27.80
4	30(1)	2(-1)	40(-1)	27.93
5	26(-1)	5(1)	60(1)	28.73
6	26(-1)	5(1)	40(-1)	28.87
7	26(-1)	2(-1)	60(1)	28.40
8	26(-1)	2(-1)	40(-1)	28.57
9	24.6(-1.682)	3.5(0)	50(0)	26.88
10	31.4(1.682)	3.5(0)	50(0)	27.00
11	28(0)	0.977(-1.682)	50(0)	28.80
12	28(0)	6(1.682)	50(0)	29.23
13	28(0)	3.5(0)	33.2(-1.682)	28.53
14	28(0)	3.5(0)	66.8(1.682)	28.87
15	28(0)	3.5(0)	50(0)	28.80
16	28(0)	3.5(0)	50(0)	28.93
17	28(0)	3.5(0)	50(0)	29.20
18	28(0)	3.5(0)	50(0)	29.13
17	28(0)	3.5(0)	50(0)	29.00
18	28(0)	3.5(0)	50(0)	28.90

1) 括号中的数值为编码值

1) Numbers in the brackets are coded values

表 4 三元二次通用旋转组合试验结果方差分析

Table 4 Analysis of variance for results from quadratic general rotary united design

来源 Source	SS	DF	MS	PCC	F	P
X ₁	0.283 6	1	0.283 6	-0.515 4	3.617 2	0.086 4
X ₂	0.385 1	1	0.385 1	0.573 9	4.910 4	0.051 0
X ₃	0.000 3	1	0.000 3	0.018 9	0.003 6	0.953 5
X ₁ ²	6.406 3	1	6.406 3	-0.943 9	81.696 5	0.000 1
X ₂ ²	0.064 5	1	0.064 5	0.275 6	0.822 2	0.385 9
X ₃ ²	0.028 5	1	0.028 5	-0.187 3	0.363 6	0.559 9
X ₁ X ₂	0.012 0	1	0.012 0	0.122 8	0.153 2	0.703 7
X ₁ X ₃	0.001 5	1	0.001 5	0.043 9	0.019 3	0.892 3
X ₂ X ₃	0.001 0	1	0.001 0	0.035 9	0.012 9	0.911 8
回归 Regression	7.349 1	9	0.816 6	10.413 2		0.000 8
残差 Residual	0.784 2	10	0.078 4			
失拟 Lack of fit	0.541 6	5	0.108 3	2.233 2		0.130 9
误差 Error	0.242 5	5	0.048 5			
总和 Total	8.133 2	19				

1) X₁、X₂ 和 X₃ 分别表示温度、接种量和装液量; PCC 为偏相关系数1) X₁, X₂ and X₃ represent temperature, inoculation concentration and liquid volume, respectively; PCC is partial correlation coefficient

2.4.2 单因素效应分析 对试验结果进行单因素效应分析(图 4), 可知温度对发酵液抗菌活性呈现先增加后降低的趋势, 温度取 0 水平时, 抑菌圈直径最大。接种量在水平区间内对发酵液抗菌活性呈现递增的变化趋势, 表明在试验水平区间内接种量的增加有利于抗菌活性物质的合成, 而在试验水平区间内, 装液量的变化对发酵液的抗菌活性无显著影响, 表明装液量在 33.2~66.8 mL 变化区间内, 溶氧量的变化小, 致使发酵液抗菌活性物质合成不受影响。

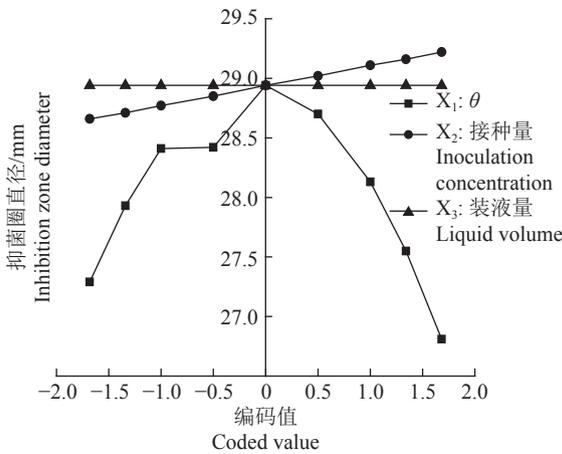


图 4 单因素效应分析图

Fig. 4 Analysis of the single factor effect

2.4.3 最佳发酵条件的优化与验证 在试验变化水平区间内, 温度和接种量是影响发酵液抗菌活性物质的重要效应因子, 采用频率分析法确定最适发酵条件。在 95% 置信区间内发酵液抑菌圈直径大于 28.50 mm 的各变量的编码取值区间分别为 -0.435~-0.136、-0.022~0.788、-0.410~0.410, 即各参数实际取值范围为发酵温度 27.13~28.27 °C、接种量 3.48%~4.68% (φ)、装液量 45.9~54.1 mL。结合实际试验条件, 确定发酵最适条件为发酵温度 28 °C、接种量 3.5% (φ)、装液量 50 mL。对此发酵条件进行 5 次平行验证, 测得发酵液抑菌圈直径为 28.99 mm, 很接近方程理论预测值 29.22 mm, 进一步证明模型的可行性(表 5)。

2.5 优化发酵培养基抗菌活性测试

菌株 PA-33 发酵液在基础培养基 PDB 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和大肠埃希菌的抑菌圈直径分别为 16.27、18.53、18.67 和 18.73 mm, 优化后培养基条件下, 菌株 PA-33 发酵液对这 4 种细菌的抑菌圈直径分别为 25.20、31.87、27.60 和 28.99 mm, 与基础培养基 PDB 相比, 抑菌圈直径分别增加 8.93、13.34、8.93 和 10.26 mm, 其中对枯草芽孢杆菌的抗菌活性增加最大。由此可知, 优化后培养基桔青霉 PA-33 发酵液抗菌成分出现差异, 抗菌活性增强。

表 5 各变量取值频率分布

Table 5 Frequency distribution of variable value

水平 Level	θ		接种量 Inoculation concentration		装液量 Liquid volume	
	次数 Times	频率 Frequency	次数 Times	频率 Frequency	次数 Times	频率 Frequency
-1.682	0	0.000	5	0.143	7	0.200
-1.000	10	0.286	5	0.143	7	0.200
0.000	25	0.714	5	0.143	7	0.200
1.000	0	0.000	10	0.286	7	0.200
1.682	0	0.000	10	0.286	7	0.200

3 讨论与结论

本研究在基础培养基、碳源、氮源和无机盐单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 响应面设计方法, 得到菌株 PA-33 产抗菌活性物质的最佳培养基配方: 马铃薯汁液 219.91 g·L⁻¹、甘露醇 34.11 g·L⁻¹、黄豆粉 6.25 g·L⁻¹, 其发酵液抑菌圈直径最大为 27.37 mm, 与 PDB 基础培养基发酵液抑菌圈直径 18.73 mm 相比, 抑菌圈直径增加 8.64 mm。发酵培养基成分对菌株 PA-33 发酵液的抗菌活性有非常显著性影响, 且和已报道桔青霉最适发酵培养基配

方不同, 此培养基成分价格低廉易得, 马铃薯属于生活常见的农产品, 甘露醇和黄豆粉属于成本低廉的化工原料。不同的碳、氮源和无机盐使得微生物的代谢途径不同、微生物自身需求不同以及微生物对营养成分的利用效率不同, 从而显著影响产生物活性物质微生物的合成途径和代谢通路。

在最佳培养基配方基础上, 采用单因素试验、三元二次通用旋转组合设计、单因素效应分析以及频率分析法优化最适发酵条件, 得到菌株 PA-33 最适发酵条件为装液量 50 mL、接种量 3.5% (φ)、发酵温度 28 °C、摇床转速 150 r·min⁻¹、发酵时间 12 d, 发

酵液抑菌圈直径最大为 28.99 mm, 与 PDB 基础培养基发酵液抑菌圈直径 18.73 mm 相比, 抑菌圈直径增加 10.26 mm。菌株 PA-33 发酵条件的优化并未显著增强其发酵液的抗菌活性, 由此可知, 发酵条件仅能改变微生物代谢时的酶活、通氧量、发酵快慢等因素, 并未从根本影响微生物的代谢途径, 进而对微生物的发酵影响不显著。本研究中, 菌株 PA-33 在试验发酵条件水平区间内, 其发酵液的抑菌圈直径变化幅度不显著, 因此发酵条件的优化效果不显著。

本文依次采用 Box-Behnken 响应面法、三元二次通用旋转组合设计法和频率分析法优化产抗生素桔青霉的发酵工艺, 且发酵培养基成分优化后抗菌活性提高显著。国内对桔青霉的研究偏向于产核酸酶等生物活性物质的优化。胡一峰等^[18]对美伐他汀产生菌桔青霉 NS-3-16 进行优化, 美伐他汀产率可达 $9.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经 Plackett-Burman 试验, 采用响应面中心组合设计, 得到的最佳发酵培养基配方: 葡萄糖 $30.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、可溶性淀粉 $42.46 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和玉米浆干粉 $11.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 使得桔青霉核酸酶 P1 理论产量提高到 $1672.6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[15]。采用部分析因试验设计、中心组合实验设计和响应面分析法对桔青霉产核酸酶 P1 培养基进行优化研究, 优化后的培养基发酵酶活力提高了 64%^[19]。近年来, 很多研究致力于培养基前体物质的添加和微生物共培养方法, 以改变其代谢途径和通路, 进而提高抗菌活性。Meng 等^[20]研究桔青霉与白僵菌属 *Beauveria* sp. 真菌的共培养, 发现 2 种新的对人类病原菌有明显抑制作用的桔霉素化合物。因此, 采用响应面法等统计学方法研究产抗生素桔青霉的发酵工艺优化, 进而提高桔青霉产抗生素产量具有重大意义。

参考文献:

- [1] 罗清, 彭程, 叶波平. 青霉属真菌研究新进展[J]. 药物生物技术, 2016, 5(23): 452-456.
- [2] 郑婕施, 江北, 张琪, 等. 青霉属真菌活性代谢产物研究进展[J]. 工业微生物, 2017(06): 50-56.
- [3] LU Z Y, LIN Z J, WANG W L, et al. Citrinin dimers from the halotolerant fungus *Penicillium citrinum* B-57 [J]. J Nat Prod, 2008, 71(4): 543-546.
- [4] DU L, LI D, ZHANG G, et al. Novel carbon-bridged citrinin dimers from a volcano ash-derived fungus *Penicillium citrinum* and their cytotoxic and cell cycle arrest activities[J]. Tetrahedron, 2010, 66(47): 9286-9290.
- [5] CLARK B R, CAPON R J, LACEY E, et al. Citrinin revisited: From monomers to dimers and beyond[J]. Org. Biomol Chem, 2006, 4(8): 1520-1528.
- [6] LIU H C, DU L, ZHU T J, et al. Two new citrinin di-

- mers from a volcano ash-derived fungus, *Penicillium citrinum* HGY1-5[J]. Helv Chim Acta, 2010, 93(11): 2224-2230.
- [7] NI M, LIN W L, YANG P, et al. A novel citrinin derivative from the marine-source fungus *Penicillium citrinum*[J]. Acta Pharm, 2015, 50(2): 203-206.
- [8] LIU Y, LI X M, MENG L H, et al. Bisthiodiketopiperazines and acorane sesquiterpenes produced by the marine-derived fungus *Penicillium adametzioides* AS-53 on different culture media[J]. J Nat Prod, 2015, 78(6): 1294-1299.
- [9] 申光辉, 郑丽君, 张志清, 等. 解淀粉芽孢杆菌 PC2 产抑菌物质培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2017, 44(6): 1358-1369.
- [10] 王昊鹏, 吴黎明, 赵柳微, 等. 烟曲霉素发酵培养基的优化研究[J]. 食品工业科技, 2017: 1-14.
- [11] RUQAYYAH T I D, JAMAL P, ALAM M Z, et al. Application of response surface methodology for protein enrichment of cassava peel as animal feed by the white-rot fungus *Panus tigrinus* M609RQY[J]. Food Hydrocolloid, 2014, 42: 298-303.
- [12] MUTHUKUMAR V, RAJESH N, VENKATASAMY R, et al. Mathematical modeling for radial overcut on electrical discharge machining of incoloy 800 by response surface methodology[J]. Procedia Materials Science, 2014, 6: 1674-1682.
- [13] YANG P, FANG M, LIU Y W. Optimization of a phase adjuster in a thermo-acoustic stirling engine using response surface methodology[J]. Energy Procedia, 2014, 61: 1772-1775.
- [14] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.
- [15] 梁新乐, 黄莹莹, 张虹, 等. 响应面法优化桔青霉 F-5-5 核酸酶 P1 发酵培养基碳氮源[J]. 核农学报, 2011, 25(1): 57-61.
- [16] 谢祥聪, 刘琴英, 蒋冬花, 等. 淡色生赤壳菌 (*Bionectria chroleuca*)Bo-1 菌株产生抗菌物质的发酵条件优化[J]. 生物技术通报, 2014(1): 166-170.
- [17] 郭雷, 朱文成, 刘玮炜, 等. 抗菌活性海洋真菌 HN4-13 的鉴定及其发酵优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(6): 951-958.
- [18] 胡一峰, 曹一岚, 黄俊龙. 美伐他汀发酵菌种筛选和发酵条件优化[J]. 浙江化工, 2012, 43(2): 4-6.
- [19] 喻晨, 张亚雄, 赵劼, 等. 响应面法优化桔青霉产核酸酶 P1 培养基[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 283-286.
- [20] MENG L H, LIU Y, LI X M, et al. Citrifelins A and B, citrinin adducts with a tetracyclic framework from cocultures of marine-derived isolates of *Penicillium citrinum* and *Beauveria felina*[J]. J Nat Prod, 2015, 78(9): 2301-2305.