

# 响应面法优化解淀粉芽孢杆菌 D1 产抗菌素培养基研究

吕 钊<sup>1,2</sup>, 张丽萍<sup>1,3</sup>, 程辉彩<sup>1,3</sup>, 麻耀华<sup>1</sup>, 习彦花<sup>1</sup>

(1. 河北省科学院 生物研究所, 河北 石家庄 050081; 2. 河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050016;

3. 河北省主要农作物病害微生物控制工程技术研究中心, 河北 石家庄 050081)

**摘 要:**以 1 株解淀粉芽孢杆菌为出发菌, 采用 Box-Behnken 试验及响应面分析相结合的方法对其产抗菌素的发酵培养基进行优化。结果表明: 最佳培养基配方为 C 源淀粉 1.88%, N 源牛肉膏 1.76%, 酵母膏 0.74%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.08%。通过优化产抗菌素培养基, 抗菌素的抑菌圈直径由优化前的 19.2 mm 提高到优化后的 27.2 mm, 提高了 41.7%。

**关键词:**解淀粉芽孢杆菌; 响应面分析; Minitab 软件; 抗菌素

**中图分类号:**S 482.2<sup>+</sup>8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)05-0094-04

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是广泛存在于自然界的非致病细菌, 是目前生物防治中比较具有代表性的芽孢杆菌<sup>[1-2]</sup>。其易于发酵, 在生长过程中会产生一系列对细菌和真菌具有强力抑制作用的胞外代谢产物, 主要包括一些抗生素、抗菌蛋白和多肽等活性物质, 能抑制植物病原菌、病毒、真菌、线虫等<sup>[3-5]</sup>。这些抗菌素又具有稳定性好, 易溶于水等优点, 便于作为生物制剂。该课题组在前期研究中分离到 1 株植物内生解淀粉芽孢杆菌 D1, 对金黄色葡萄球菌、黄瓜灰霉病菌等多种病原细菌和真菌都有明显的抑制作用, 而且产生的抗菌素具有温度、酸碱度、储藏稳定性好等特点。但是较高的生产成本和较低的产量限制了其抗菌素肽的工业化生产, 因此, 降低成本、提高抗菌素产量成为当前面临的主要问题。现通过单因素试验和响应面法结合优化该菌株发酵条件<sup>[6-8]</sup>, 通过曲面模型和数学方程, 获得该菌代谢产生抗菌素的最优发酵参数, 为该抗菌素的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为解淀粉芽孢杆菌 D1 和黄瓜灰霉病菌,

均为实验室分离保存。

种子培养基: 葡萄糖 20 g, 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 为 7.0~7.2。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养方法 采用二级摇瓶培养, 接试管种于装有 50 mL 液体种子培养基的 250 mL 三角瓶中,  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养, 制备种子液。5%接种于发酵培养基中, 按不同试验条件进行摇床培养。

1.2.2 单因素试验 以种子培养基为基础培养基, 分别采用不同的碳源(蔗糖、葡萄糖、淀粉、玉米粉、柠檬酸钠、甘油、麦芽糖)和氮源(牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、硫酸铵、豆饼粉、硝酸钠、胰蛋白胨), 固定其它成分, 采用平板扩散法测定发酵滤液抑菌活性, 选出最适碳氮源。每组试验设 3 次重复, 结果取平均值。

1.2.3 DOE 试验 依据前期试验结果, 以牛肉膏、酵母膏、淀粉、葡萄糖、甘油、蔗糖和蛋白胨为碳氮源, 选用  $N=7$  的多因子试验设计安排, 每个因素取 2 个水平, 高水平约取低水平的 1.5 倍。试验设 3 次重复, 结果取平均值。

1.2.4 最陡爬坡试验 根据试验结果中显著因素的效应值大小来确定最陡上升路径, 基础取值依据各因素效应的正负和大小, 正效应的因素取较高值, 负效应的因素取较低值, 试验设 3 次重复, 结果取平均值。

1.2.5 Box-Behnken 试验 以抑菌效果最好的取值作为试验的中心点零水平, 以中心点确立高水平 and 低水平, 分别比零水平高或低一个实际步长, 其它因素不变。用 Minitab 软件设计 Box-Behnken 响应面试验并对数据进行处理。每组试验 3 次重复, 结果取平均值。

1.2.6 无机盐筛选 以优化好的培养基为基础, 选取了 12 种无机盐添加到培养基进行抑菌活性检测。并从单

**第一作者简介:**吕钊(1987-), 男, 硕士, 研究方向为应用微生物学。E-mail:lv\_zhao@hotmail.com.

**责任作者:**张丽萍(1969-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向为应用微生物学。E-mail:lizzle-69@163.com.

**基金项目:**国家农业成果转化基金资助项目(2010GB2A200041); 河北省科技支撑计划资助项目(10205520D); 河北省科学院重大攻关计划资助项目(12306)。

**收稿日期:**2012-11-08

因素试验结果里选取对微生物发酵有明显作用的无机盐进行爬坡梯度试验,确定其发酵所需求的最适浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳碳氮源筛选

单因素试验结果见图 1。由图 1 可以看出,淀粉、葡萄糖、甘油、蔗糖作为碳源抑菌活性较高,抑菌圈接近或达到 20 mm,优于其它 3 个因子;牛肉膏、蛋白胨、酵母膏作为氮源抑菌圈也接近 20 mm 左右,优于其它 4 个因子,且有机氮源效果明显好于无机氮源。

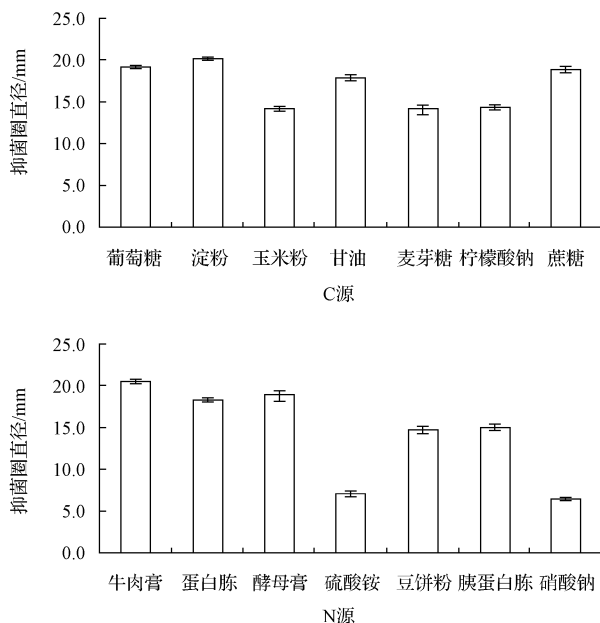


图 1 单因子试验结果

Fig. 1 Design of single-factor experiment

### 2.2 DOE 试验

该试验选取抑菌活性较高的 7 个因素作为 DOE 试验因子,试验设计及结果见表 1。由表 1 中  $t$  值可以看出,对于响应值的影响因子中,牛肉膏、淀粉、蔗糖、葡萄糖均为正效应,而酵母膏、蛋白胨、甘油均为负效应。方差分析显示,酵母膏、淀粉、牛肉膏  $P < 0.01$ ,极显著,表明三者对于菌株发酵液产抗菌物质的效应极显著,是影响发酵液抑菌活性的主要影响因子。

### 2.3 最陡爬坡试验

根据多因子试验中各因素的正负效应和显著性,选取酵母膏、牛肉膏、淀粉进行最陡爬坡试验,正效应的取高水平,负效应的取低水平,浓度变化和方向的试验设计及结果见表 2。由结果中选取效果最好的浓度:酵母膏 0.8%,淀粉 1.6%,牛肉膏 1.6%为中心点进行响应面分析。

### 2.4 Box-Behnken 试验

以试验组 4 为中心点进行 Box-Behnken 试验,并对试验结果进行响应面分析。试验设计及结果见表 3。

表 1 试验设计及结果

水平	1	2	$t$	$P$	重要性
酵母膏	8.327	7.938	-0.488	0.003	3
葡萄糖	8.069	8.442	0.273	0.012	4
蛋白胨	8.182	8.083	-0.098	0.272	7
淀粉	7.860	8.405	0.544	0.009	2
蔗糖	7.998	8.267	0.268	0.026	5
甘油	8.191	8.074	-0.117	0.222	6
牛肉膏	7.252	9.013	1.761	0.000	1

酵母膏	葡萄糖	蛋白胨	淀粉	蔗糖	甘油	牛肉膏	抑菌圈直径/mm
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	19.4
-1	-1	-1	-1	-1	1	1	21.4
-1	-1	1	1	1	-1	-1	20.0
-1	1	-1	1	1	-1	1	22.5
-1	1	1	-1	1	1	-1	19.0
-1	1	1	1	-1	1	1	21.8
1	-1	1	1	-1	-1	1	21.1
1	-1	1	-1	1	1	1	21.1
1	-1	-1	1	1	1	-1	19.5
1	1	1	-1	-1	-1	-1	19.0
1	1	-1	1	-1	1	-1	19.2
1	1	-1	-1	1	-1	1	21.3

表 2 最陡爬坡试验设计与结果

实验组	酵母膏/%	淀粉/%	牛肉膏/%	抑菌圈直径/mm
1	0.5	1.0	1.0	18.7
2	0.6	1.2	1.2	18.6
3	0.7	1.4	1.4	20.4
4	0.8	1.6	1.6	23.3
5	0.9	1.8	1.8	22.9
6	1.0	2.0	2.0	21.3
7	1.1	2.2	2.2	20.5
8	1.2	2.4	2.4	20.9

表 3 Box-Behnken 试验设计及结果

因素	水平		
	-1/%	0/%	1/%
淀粉	1.2	1.6	2.0
牛肉膏	1.2	1.6	2.0
酵母膏	0.6	0.8	1.0

标准序	运行序	点类型	区组	酵母膏	牛肉膏	淀粉	抑菌圈直径/mm	预测值/mm
13	1	0	1	0	0	0	24.5	24.7
11	2	2	1	0	-1	1	23.5	23.4
8	3	2	1	1	0	1	23.5	23.4
2	4	2	1	1	-1	0	22.3	22.4
3	5	2	1	-1	1	0	24.0	23.9
15	6	0	1	0	0	0	24.5	24.7
12	7	2	1	0	1	1	24.6	24.7
10	8	2	1	0	1	-1	22.1	22.1
1	9	2	1	-1	-1	0	22.5	22.5
9	10	2	1	0	-1	-1	21.6	21.5
6	11	2	1	1	0	-1	21.8	21.8
5	12	2	1	-1	0	-1	21.6	21.6
4	13	2	1	1	1	0	23.0	23.0
14	14	0	1	0	0	0	25.1	24.7
7	15	2	1	-1	0	1	24.6	24.6

将表 3 结果利用 Minitab 软件对试验数据进行回归分析,得二次多项式方程: $Y=24.7033-0.2575X_1+0.475X_2+1.13X_3-0.902917X_1^2-0.1975X_1X_2-0.3275X_1X_3-0.812917X_2^2+0.1975X_2X_3-0.912917X_3^2$ 。 $R-Sq=98.52\%$ , $R-Sq(\text{预测})=92.62\%$ , $R-Sq(\text{调整})=95.86\%$ 。对上述回归模型进行回归分析,结果见表 4。从表 4 可以看出,该模型是显著的( $P<0.01$ ),失拟项不显著,方程的相关系数  $R-Sq=98.52\%$ ,调整后的  $R-Sq(\text{调整})=95.86\%$ ,即表明模型可以解释 95.86% 的发酵产抗菌物质水平的变化,仅有总变异的 4.14% 不能用此模型来解释,说明了回归方程的拟合程度较好,试验误差小,因此,可用此模型对该菌株产抗菌素的发酵条件进行分析和预测。

表 4 回归模型分析

Table 4 Analysis of the regression model

方差来源	自由度	F	P
回归模型	6	30.9942	0.000041
残差	8		
失拟项	6	1.3982	0.473473
纯误差	2		
总误差	14		

回归模型的方差分析见表 5。由回归方程系数显著性检验可知:一次项  $X_2$ 、 $X_3$ ,二次项对于产抗菌物质的影响为极显著水平( $P<0.01$ ); $X_1$ 、交互项  $X_1X_3$  对于产抗菌物质为显著水平( $P<0.05$ );交互项  $X_1X_2$ 、 $X_2X_3$  对其产抗菌物质为不显著水平( $P>0.05$ )。

表 5 回归模型显著性分析

Table 5 Significance test of each coefficient of quadratic regression model

项	系数	系数标准误	T	P
常量	24.7033	0.1438		
$X_1$ 酵母膏	-0.2575	0.08806	-2.924	0.033
$X_2$ 牛肉膏	0.4750	0.08806	5.394	0.003
$X_3$ 淀粉	1.1300	0.08806	12.83	0.000
$X_1^2$	-0.9029	0.1296	-6.966	0.001
$X_2^2$	-0.8129	0.1296	-6.272	0.002
$X_3^2$	-0.9129	0.1296	-7.043	0.001
$X_1X_2$	-0.1975	0.1245	-1.586	0.174
$X_1X_3$	-0.3275	0.1245	-2.630	0.047
$X_2X_3$	0.1975	0.1245	1.586	0.174

## 2.5 最佳浓度与模型验证

由显著性分析结果可知,酵母膏和淀粉交互作用显著,利用 Minitab 对上述数据进行二次多元回归拟合,所得到的二次回归方程的响应面分别见图 2。回归分析可以看出,2 个因素的交互项显著,由响应面可以看出,淀粉含量不变,随着酵母膏含量的增加,抑菌活性先显著增加,达到一定浓度之后,抑菌活性呈缓慢下降的趋势。酵母膏含量不变时,抑菌活性随着淀粉含量的增大呈先增大后减小趋势。淀粉含量在 1.6%~2.0% 的时候,抑菌活性普遍较高。响应面优化回归模型分析可得,当

C 源淀粉为 1.88%,N 源牛肉膏为 1.76%,酵母膏 0.74% 时,回归方程可得最大值。

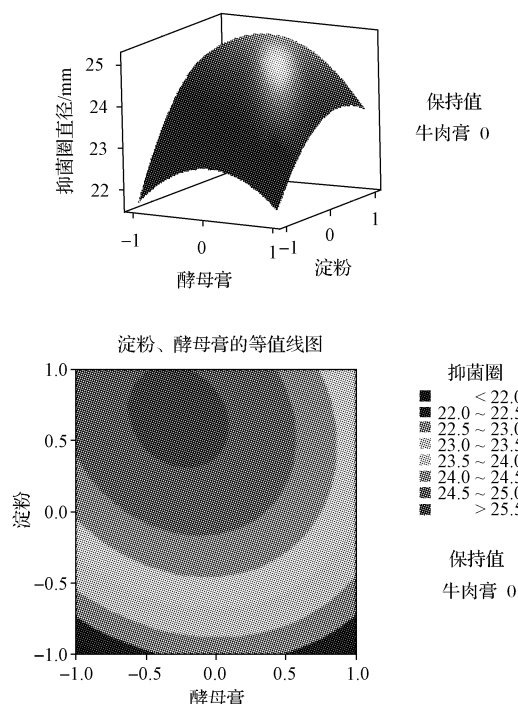


图 2 淀粉和酵母膏浓度的交互影响的曲面图及等高线图

Fig. 2 Response surface and contour plots showing the interactive effect of yeast extract and starch concentrations on inhibitory zone diameter of produced antibacterial peptides

## 2.6 无机盐筛选

2.6.1 正效应因子确定 以优化的碳氮源培养基为基础,选取的 12 种无机盐含量及试验结果见表 6。单因素试验显示,对菌株发酵产物提高作用的是 3 种:  $KH_2PO_4$ 、 $K_2HPO_4$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ ,而其它无机盐或无明显作用,或对菌株生长及发酵产物有负作用。

表 6 无机盐单因素试验设计与结果

Table 6 Design and results of Single-Inorganic salts-factor experiment

无机盐	含量/%	抑菌圈直径/mm	X-CK/±CK%
NaCl	0.20	25.0b	0.40
MnSO <sub>4</sub>	0.05	24.1b	-3.50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20	26.5a	7.60
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.10	24.7b	-0.80
CaCl <sub>2</sub>	0.05	16.5d	-33.7
CoCl <sub>2</sub>	0.01	16.5d	-33.7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.10	26.4a	6.80
FeCl <sub>3</sub>	0.05	20.1c	-19.3
MgSO <sub>4</sub>	0.10	23.5bc	-5.60
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.20	24.7b	-0.80
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05	26.3a	5.60
CK	0.00	24.9b	0.00

2.6.2 梯度爬坡试验 对 3 种无机盐分别进行爬坡梯度试验,选取适合的浓度,作为发酵的最适无机盐浓度。由表 7 可知,当  $KH_2PO_4$  浓度 0.25%, $K_2HPO_4$  浓度

0.1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度 0.08% 时, 抑菌活性最高, 抑菌圈直径为 27.2 mm。

表 7 无机盐梯度试验

Table 7 Design and results of gradient experiment

序号	1		2		3	
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ /%	抑菌圈直径 /mm	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ /%	抑菌圈直径 /mm	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /%	抑菌圈直径 /mm
水平 1	0.075	25.4	0.10	24.5	0.02	25.3
水平 2	0.100	26.4	0.15	25.0	0.05	26.3
水平 3	0.125	26.0	0.20	26.0	0.08	27.2
水平 4	0.150	25.4	0.25	26.8	0.10	26.5
水平 5	0.175	25.6	0.30	26.1	0.12	25.1

### 3 结论

信珊珊等<sup>[9]</sup>利用单因素与响应面结合的方法, 借助 Minitab 软件分析, 对解淀粉芽孢杆菌产生抗菌物质的发酵条件进行了研究并得到优化结果, 最终确定解淀粉芽孢杆菌 D1 液体发酵产生抗菌物质的发酵培养基为: 碳源为淀粉 1.88%, 氮源为牛肉膏 1.76%, 酵母膏 0.74%, 无机盐为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.08%。优化后抑菌圈直径由优化前的 19.2 mm 提高到了 27.2 mm, 增大了 41.7%。该研究结果提高了细菌素的产量, 确定的培养基成分简单易得, 为解淀粉芽孢杆菌 D1 开发利用提供了依据。

解淀粉芽孢杆菌 D1 本身能够产生抗逆性强的芽孢, 更重要的是能产生种类繁多的抗菌素。长久以来的研究已经证实, 这类抗菌素具有广谱抗菌效果, 并且自身在自然条件下极其稳定, 因此, 在作为食品防腐剂和

无公害饲料添加剂、开发为药物和生防制剂<sup>[10]</sup>等方面有巨大的潜在应用前景。

### 参考文献

- [1] Nakamura L K. *Bacillus amylololyticus* sp. nov, nom. rev, *Bacillus lautus* sp. nov, nom. rev, *Bacillus pabuli* sp. nov, nom. rev, and *Bacillus validus* sp. nov, nom. rev[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96: 1151-1160.
- [2] Peoria. *Bacillus amylololyticus* sp. nov, nom. rev, *Bacillus lautus* sp. nov, nom. rev, *Bacillus pabuli* sp. nov, nom. rev, and *Bacillus validus* sp. nov, nom. rev[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1984(4): 224-226.
- [3] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 7-12.
- [4] Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves[J]. Biological Control, 2001, 91(2): 181-187.
- [5] 王英国, 王军华, 权春善, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 41-45.
- [6] Deepak V, Kalishwaralal K, Ramkumarpandian S. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(17): 8170-8174.
- [7] 张蕾, 张铎, 张丽萍, 等. 枯草芽孢杆菌 BSD-2 产抗菌肽发酵培养基的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 189-192.
- [8] 陈琳, 孟祥晨. 响应面法优化植物乳杆菌代谢产细菌素的发酵条件[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 176-180.
- [9] 信珊珊, 祁高富, 朱发银, 等. 1 株解淀粉芽孢杆菌发酵条件的优化及其对油茶炭疽病的防效[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 411-415.
- [10] 申莉莉, 王凤龙, 纪出民, 等. 解淀粉芽孢杆菌 By33 产活性蛋白抑制 TMV 体内复制作用研究[C]. 中国烟草学会 2009 年学术年会论文集, 2009.

## Optimization of Fermentation for Production Conditions of Antibiotic by *Bacillus amyloliquefaciens* D1

LV Zhao<sup>1,2</sup>, ZHANG Li-ping<sup>1,3</sup>, CHENG Hui-cai<sup>1,3</sup>, MA Yao-hua<sup>1</sup>, XI Yan-hua<sup>1</sup>

(1. Institute of Biology, Hebei Academy of Science, Shijiazhuang, Hebei 050081; 2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050016; 3. Microbial Control Engineering Technology Research Center of Main Crops Disease in Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050081)

**Abstract:** The Box-Behnken experiment and response surface analysis method were combined to optimize the fermentation medium of a *Bacillus amyloliquefaciens*. The results showed that the optimal fermentation medium formula consisted of 1.88% starch, 1.76% beef extract, 0.74% yeast extract,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.08%. There was a 41.7% increase in the yield of antibacterial peptides obtained using the optimal fermentation medium, compared with that before optimization.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*; response surface methodology; Minitab software; bacteriocin