

内生真菌 Hd3 菌株发酵条件优化研究^①

陈华保¹, 杨春平^{1,2}, 吴文君²,
杨继芝¹, 王学贵¹, 张敏¹

1. 四川农业大学 农学院, 四川 雅安 625014; 2. 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100

摘要: 利用 Plackett-Burman 设计和响应面设计方法对 Hd3 菌株的发酵条件进行了优化研究, 确定了最佳培养基组成及培养条件. 试验结果表明: Hd3 菌株的摇瓶培养基配方为葡萄糖 24.71 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.08 g/L, 土豆 244.17 g/L. 发酵条件为 pH 6~7, 250 mL 三角瓶装 90 mL 发酵液, 接入 9×10³ cfu/mL 菌量, 31 °C 培养 9 d.

关键词: 内生真菌; 发酵; 优化; 响应面

中图分类号: Q949.32

文献标志码: A

植物内生菌能代谢多种生物活性物质^[1-4], 但目前真正进行产业化的内生菌还很少, 较主要的原因是由于内生菌代谢的活性产物量较少, 达不到工业生产的要求^[5-6]. Hd3 菌株为从新鲜苦皮藤根韧皮部中分离得到的一株内生真菌, 该菌株发酵液对玉米弯孢菌 *Curvularia lunata* 等植物病原真菌具有较强的杀菌活性, 直接开发利用潜力较大^[7]. 但目前该菌株产生活性物质较低, 需对其发酵条件进行优化.

影响微生物发酵的主要因素有培养基选择、发酵温度、发酵时间、接种量、pH 值、无机盐添加等方面. 优化方法主要通过常规方法进行筛选^[8], 而采用响应面分析法(Response surface methodology, RSM)设计筛选发酵条件优化模式的研究相对较少.

响应面分析法是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法. 通过局部试验回归拟合因素与结果间的全局函数关系, 从而得到准确有效的试验结论, 能在整个考察区域上确定各个因素的最佳组合及最优响应值^[9-11].

本研究为了提高 Hd3 菌株代谢活性物质的产量, 利用 Plackett-Burman 设计和 Box-Behnken 响应面设计, 对影响 Hd3 菌株发酵水平的培养基进行优化; 采用正交设计方法对 Hd3 菌株的发酵条件进行优化, 确定最佳发酵条件.

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株

苦皮藤内生真菌 Hd3, 由西北农林科技大学农药研究所提供.

1.1.2 指示菌株

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 由西北农林科技大学农药研究所提供.

① 收稿日期: 2009-10-13

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(nyhyzx07-048).

作者简介: 陈华保(1979-), 男, 安徽淮南人, 讲师, 主要从事农药及天然产物研究.

通信作者: 张敏, 副教授.

1.1.3 发酵基础培养基

葡萄糖 10 g, 蛋白胨 3 g, 蒸馏水 1 000 mL.

1.2 方 法

1.2.1 摇瓶发酵

取直径 15 mm 的无菌打孔器, 将培养好的供试菌株平板上打成菌饼(平均每个菌饼的菌落形成单位数为 1.5×10^3 cfu/mL), 按试验要求量接入发酵培养基中, 并在试验设置条件下振荡培养.

1.2.2 发酵产物活性评估

以枯草芽孢杆菌为指示菌, 采用管碟法^[12]测定发酵产物的生物活性.

1.2.3 发酵培养基优化试验设计及分析

(1) Plackett-Burman 试验设计及分析

试验中每个因素取高低 2 个水平, 用 Minitab 15 软件进行试验设计, 并根据试验结果用 Minitab 15 软件对结果进行显著性分析.

(2) Box-Behnken 响应面设计及分析

采用 Design-Expert 7.0 软件进行 Box-Behnken 响应面试验设计, 并分析试验结果.

1.2.4 初始 pH 值影响测定

分别用 1 mol/L HCl 溶液及 1 mol/L HCl 和 NaOH 溶液将各菌株发酵前液体培养基的 pH 值调节至 pH 2~12, 得到 11 个处理, 装瓶灭菌后, 各接入 4 个供试菌菌饼, 然后在 26~28 °C、转速 180~200 r/min 的恒温摇床上进行摇瓶发酵. 发酵终止后, 将发酵滤液的 pH 值调为 7, 以枯草芽孢杆菌为指示菌测定不同样品的抑菌活性, 试验设 3 次重复.

1.2.5 发酵条件优化试验

通过对菌株发酵过程中的发酵温度、发酵时间、通气量(本试验采用一定体积的三角瓶, 固定转速, 改变装液量来确定最佳通气量)以及接种量等因素的考查, 确定最佳发酵条件, 发酵培养基为优化后的培养基.

2 结果与分析

2.1 发酵培养基配方的初步选择

在发酵基础培养基中, 加入不同的碳源、氮源和无机盐, 对 Hd3 进行接种和摇床培养后, 以枯草芽孢杆菌为指示菌, 测定各发酵产物的抑菌活性(表 1). 由表 1 可知, 适合菌株 Hd3 产生抗生素的发酵培养基碳源为葡萄糖、乳糖、麦芽糖和蔗糖; 在 7 种试验氮源中, 仅土豆利于 Hd3 菌株产生抗生素, 其代谢产物对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径达 21.20 mm; 发酵培养基中除添加 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 对菌株 Hd3 发酵产物活性有所提高外, 其它无机盐对菌株产生抗生素均无正影响.

表 1 不同碳源、氮源和无机盐的比较

碳源	含量 /%	抑菌圈直径 /mm	氮源	含量 /%	抑菌圈直径 /mm	无机盐	含量 /%	抑菌圈直径 /mm
葡萄糖	1	12.83	土豆	20.0	21.20	C_2H_5OONa	0.15	11.40
可溶性淀粉	1	8.33	蛋白胨	0.3	14.70	$CaCO_3$	0.2	14.93
蔗糖	1	14.30	酵母膏	0.6	11.25	K_2HPO_4	0.06	15.67
乳糖	1	14.87	$(NH_4)_2SO_4$	0.2	11.50	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	17.73
麦芽糖	1	11.37	NH_4Cl	0.2	13.80	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002	15.90
米糠	1	9.33	NH_4NO_3	0.3	13.10	无盐对照	—	16.50
麦麸	1	9.30	无氮对照	—	10.80	—	—	—
无碳对照	—	7.80	—	—	—	—	—	—

2.2 Hd3 菌株发酵培养基配方筛选结果

由 2.1 中试验结果可知, 葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、土豆和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 共 6 种物质有利于 Hd3 菌株产生活性物质. 为了筛选最有利的营养成分, 试验对这 6 种成分进行 Plackett-Burman 设计. Plackett-Burman 试验设计的自变量编码和水平因素见表 2, 试验设计及结果见表 3.

表 2 Hd3 菌株培养基筛选的 Plackett-Burman 试验因素与水平

试验因素	代码	(-)低水平/(g · L ⁻¹)	(+)高水平/(g · L ⁻¹)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	X_1	0	0.6
蔗糖	X_2	0	30
葡萄糖	X_3	0	30
乳糖	X_4	0	30
麦芽糖	X_5	0	30
土豆	X_6	0	30

表 3 Hd3 菌株培养基筛选的 Plackett-Burman 试验设计及结果

试验编号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	抑菌圈直径/mm
1	-	+	-	-	-	+	+	+	-	9.80
2	-	+	+	-	+	-	-	-	+	13.17
3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	13.00
4	+	-	+	-	-	-	+	+	+	13.67
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00
6	-	-	-	+	+	+	-	+	+	14.17
7	+	+	+	-	+	+	-	+	-	22.73
8	+	+	-	+	+	-	+	-	-	13.33
9	-	+	+	+	-	+	+	-	+	16.50
10	+	-	+	+	-	+	-	-	-	22.67
11	-	-	+	+	+	-	+	+	-	13.17
12	+	-	-	-	+	+	+	-	+	12.33

注: X_7 、 X_8 、 X_9 为虚构变量, 用来估计误差.

对试验结果进行回归分析, 得最优回归方程为 $Y(\text{抑菌圈}) = 13.7117 + 2.5767X_1 + 1.0433X_2 + 3.7233X_3 + 1.7617X_4 + 1.1050X_5 + 2.6500X_6$. 结果表明影响 Hd3 菌株发酵产生抑菌活性的主要影响因子为葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和土豆.

选取葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和土豆, 采用响应面分析法作进一步研究. Box-Behnken 响应面设计被用来考察该 3 个因子的相互作用和最佳水平. 对 3 个显著因子重新编码, 各因子设定水平及编码见表 4, 试验设计及结果见表 5.

表 4 Hd3 菌株培养基筛选的 Box-Behnken 试验因素与水平

试验因素	代码	编码水平/(g · L ⁻¹)		
		-	0	+
葡萄糖	A	10	20	30
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	B	0.8	1.2	1.6
土豆	C	150	230	310

表 5 Box-Behnken 试验设计表及其试验结果

试验编号	试验因子及水平			抑菌圈直径 /mm
	葡萄糖/(g·L ⁻¹)	MgSO ₄ ·7H ₂ O/(g·L ⁻¹)	土豆/(g·L ⁻¹)	
1	20	1.6	310	23.33
2	10	1.6	230	23.33
3	10	0.8	230	23.33
4	20	1.2	230	23.33
5	20	1.2	230	23.33
6	30	1.2	150	21.33
7	20	1.2	230	22.67
8	10	1.2	150	19.00
9	20	0.8	310	20.33
10	20	1.2	230	17.50
11	10	1.2	310	18.67
12	20	1.6	150	18.33
13	30	1.6	230	21.00
14	20	0.8	150	17.50
15	30	0.8	230	16.50
16	20	1.2	230	20.33
17	30	1.2	310	18.67

试验数据使用 Design-Expert 软件进行二次回归拟合后, 得到抑菌圈直径(Y)对葡萄糖(A)、MgSO₄·7H₂O(B)和土豆(C)含量的回归方程为

$$Y = 23.33 + 0.81A - 0.92B + 1.02C - 0.0025E - 0.03AB + 0.37AC - 0.16BC - 0.94A^2 - 1.56B^2 - 3.52C^2$$

由以上回归方程, 通过 Design-Expert 软件作出抑菌圈直径对葡萄糖、MgSO₄·7H₂O 和土豆含量的响应曲面图(图 1), 并估计当葡萄糖为 24.71 g/L, MgSO₄·7H₂O 为 1.08 g/L 和土豆为 244.17 g/L 时, 抑菌圈直径最大, 为 25.74 mm. 在试验相同条件下, 以此配方对 Hd3 菌株进行发酵后测定发酵产物对枯草芽孢杆菌的抑菌活性, 其抑菌圈直径为 25 mm, 与理论值基本吻合. 因此, 确定 Hd3 菌株的最优发酵培养基配方为葡萄糖 24.71 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.08 g/L, 土豆 244.17 g/L.

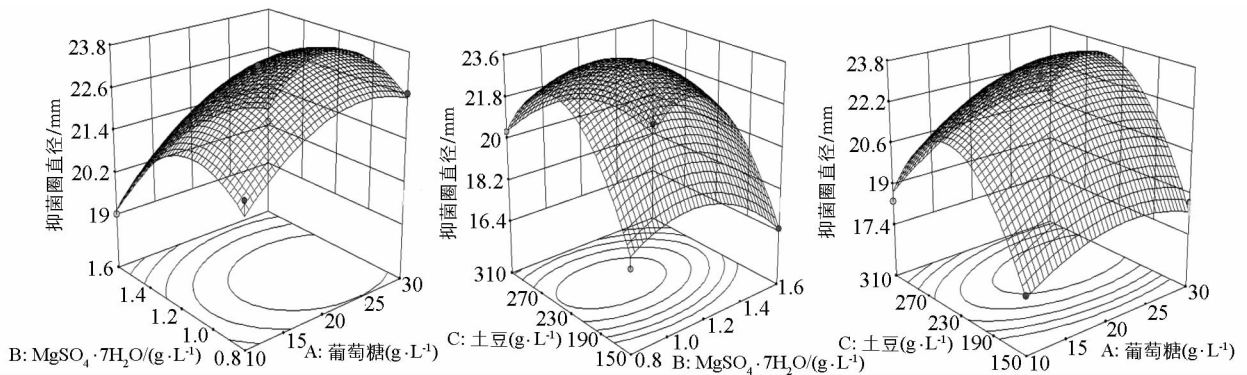


图 1 不同质量浓度培养基成分对 Hd3 菌株发酵产物抑菌活性的响应曲面

2.3 发酵条件优化

2.3.1 初始 pH 值的影响

菌株 Hd3 接种在不同起始 pH 值的发酵培养基中摇瓶发酵后, 发酵滤液调至 pH 7 对枯草芽孢杆菌的抑菌活性结果见图 2. 由图 2 可知, Hd3 菌株在 pH 6~7 时最适合该菌产生抑菌活性产物, 随着 pH 值逐渐上升到 10 时, 菌株已完全不能生长并代谢活性产物. 当初始 pH 值小于 6 时, 发酵培养基也不利于该菌株抑菌产物的产生.

2.3.2 发酵条件的正交试验

选取发酵温度、通气量、发酵时间和接种量为主要发酵条件, 设计四因素三水平正交试验, 以菌株优化最佳培养基进行发酵培养后, 测定 Hd3 菌株在不同条件下的发酵产物对枯草芽孢杆菌的抑菌活性(表 6). 由表 6 可知, 当发酵温度为 31 °C, 发酵时间为 9 d, 装液量为 90 mL, 接种量为 9×10^3 cfu/mL 个菌饼时, 为最优发酵条件. 在该条件下对 Hd3 菌株进行发酵, 得到发酵产物对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径为 29.0 mm.

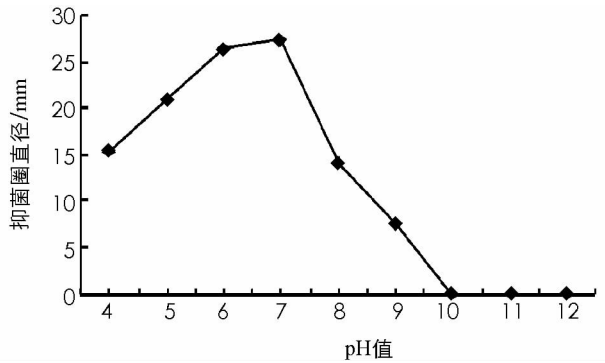


图 2 初始 pH 值对 Hd3 菌株发酵产物抑菌活性的影响

表 6 不同发酵条件对 Hd3 菌株抑菌活性的影响

试验号	A 装液量 /mL	B 发酵温度 /°C	C 接种量 /(cfu · mL ⁻¹)	D 发酵时间 /d	抑菌圈直径 /mm
1	60	26	4.5×10^3	6	20.83
2	60	29	9×10^3	9	27.50
3	60	31	1.35×10^4	12	22.50
4	90	26	9×10^3	12	25.83
5	90	29	1.35×10^4	6	24.83
6	90	31	4.5×10^3	9	27.50
7	120	26	1.35×10^4	9	26.83
8	120	29	4.5×10^3	12	20.83
9	120	31	9×10^3	6	26.33
K(和)	I	70.83	73.50	69.17	72.00
	II	78.17	73.17	79.67	81.83
	III	74.00	76.33	74.17	69.17
k(均值)	I	23.61	24.50	23.06	24.00
	II	26.06	24.39	26.56	27.28
	III	24.67	25.44	24.72	23.06
R(极差)	2.44	1.06	3.50	3.22	

3 讨 论

通过改善微生物的发酵培养基配方, 寻找最适合的发酵条件, 可以提高菌株代谢目标物质的产量. Plackett-Burman 设计法是一种经济且有效的试验设计方法, 它能快速、有效地从众多因子中筛选出促进活性菌株产生抗生素的因子; 响应面法(RSM)能快速地对主要影响因子进行优化与评价, 并能得到各因素最佳组合和响应值的最优值. 本文通过 Plackett-Burman 设计和响应面试验筛选出了 Hd3 菌株的摇瓶培养基配方为葡萄糖 24.71 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.08 g/L, 土豆 244.17 g/L. 通过测定发酵培养基初始 pH 值及利用正交试验设计法筛选了 Hd3 菌株摇瓶发酵的最优发酵条件. 其发酵条件为 pH 6~7, 250 mL 三角瓶装 90 mL 发酵液, 接入 9×10^3 cfu/mL 菌种, 31 °C 培养 9 d. 在优化后的培养基及发酵条件下进行发酵, Hd3 菌株的发酵液抗菌活性抑菌圈直径从起始土豆培养基的 21.20 mm 提高到 29.0 mm.

常规情况下, 大规模发酵的各种条件与室内试验不会相同, 各种参数的数据会有变化, 但总体趋势差

异不大. 本研究探索了 Hd3 菌株摇瓶发酵培养产生抑菌活性物质的培养基和最优发酵条件. 工业化生产还应在发酵罐内进行试验, 将各种原料和发酵条件进行合理配合. 本试验所得优化条件是否符合大规模发酵生产, 还需进一步验证.

参考文献:

- [1] Strobel G A, Miller R V, Miller C, et al. Cryptocandin, a Potent Antimycotic from the Endophytic Fungus *Cryptosporopsis* cf. *Quercina* [J]. *Microbiol*, 1999(145): 1919 – 1926.
- [2] 钱 勇, 杨春平, 姬志勤. 苦皮藤内生真菌 A10 代谢产物的杀菌活性 [J]. *中国生物防治*, 2006, 22(2): 150 – 154.
- [3] 李欣龙, 王 涛, 游 玲, 等. 香樟内生细菌抑制植物病原真菌及对纤维素利用初步研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2009, 31(2): 126 – 131.
- [4] 何 劲, 雷帮星, 康冀川, 等. 石斛抗真菌内生细菌的筛选及其抗菌特性的初步研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2009, 31(6): 92 – 96.
- [5] 葛菁萍, 平文祥, 周东坡. 紫杉醇产生菌 HU1353 分类地位的探讨 [J]. *黑龙江大学学报: 自然科学版*, 2004, 21(2): 135 – 136.
- [6] 高 杨, 殷 红, 孙宇宏, 等. 产小檗碱内生真菌的诱变 [J]. *菌物研究*, 2008, 6(4): 216 – 219.
- [7] 张继文, 杨春平, 姬志勤, 等. 苦皮藤内生真菌 Hd3 菌株抑菌活性成分分离及结构鉴定 [J]. *农药学学报*, 2009, 11(2): 225 – 229.
- [8] 杨东靖, 陈冠群, 王 敏, 等. 纳他霉素高产菌株的链霉素抗性选育及其发酵工艺的优化 [J]. *药物生物技术*, 2003, 10(2): 84 – 87.
- [9] Ambat P, Ayyanna C. Optimizing Medium Constituents and Fermentation Conditions for Citric Acid Production from *Palmyra* jaggery Using Response Surface Methods [J]. *World J Microbiol & Biotechnol*, 2001(17): 331 – 335.
- [10] Rastogi N K, Rashmi K R. Optimization of Enzymatic Liquid Fraction of *Mango pulp* by Response Surface Methodology [J]. *Eur Food Res Technol*, 1999(20): 57 – 62.
- [11] Hosoya Y, Okamoto S, Muramatsu H, et al. Acquisition of Certain Streptomycin-Resistant(str) Mutations Enhances Antibiotic Production in Bacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 1998, 42(8): 2941 – 2947.
- [12] 吴文君. 植物化学保护实验技术指导 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988.

Optimization of the Fermentation Conditions of the Endophytic Fungus Hd3

CHEN Hua-bao¹, YANG Chun-ping^{1,2}, WU Wen-jun²,
YANG Ji-zhi¹, WANG Xue-gui¹, ZHANG Min¹

1. Agronomy College, Sichuan Agriculture University, Ya'an Sichuan 625014, China;

2. Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China

Abstract: The components of liquid medium for strain Hd3 were studied by Plackett-Burman design and response surface methodology and their fermentation conditions including culture temperature, culture period, the pH value of medium, inoculate concentration and the volume of liquid medium of strains were optimized. The studied results of strain Hd3 showed that the suitable liquid medium was composed of 24.71 g/L glucose, 1.08 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 244.17 g/L potato and distilled water; and the suitable cultivated condition was 31 °C, 9 d, 9 × 10³ cfu/mL and 90 mL liquid medium in 250 mL flask, pH 6~7.

Key words: endophytic fungus; fermentation; optimization; response surface