

文章编号: 1000-5862(2021)05-0503-11

枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质的发酵条件优化

丰磊¹, 魏伟群^{2*}, 付鸣佳^{1*}, 肖世平², 叶德晓¹, 钟雪晴¹, 黄紫妍¹

(1. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022; 2. 江西天佳生物工程股份有限公司, 江西 南昌 330200)

摘要: 枯草芽孢杆菌 SX3411 菌株自身带有 subtilomycin 基因簇, 其主要的抑菌成分为 subtilomycin. 该文采用单因素分析法分析了枯草芽孢杆菌 SX3411 在不同发酵条件和营养成分时对抑菌物质产生的影响. 根据单因素分析, 对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质设计了响应面法分析, 通过响应面法获得了最优的发酵条件和最佳营养成分配比. 结果表明: 最佳培养条件是初始 pH 值为 8.25、转速为 169 r·min⁻¹、温度为 30.24 °C、装液量为 37.9%、接种量为 1.46%、抑菌圈直径预测值为 30.04 mm; 最佳培养基的成分为葡萄糖 11.4 g·L⁻¹、酵母粉 5.0 g·L⁻¹、ZnSO₄ 0.000 56 g·L⁻¹、CaCl₂ 0.059 5 g·L⁻¹, 抑菌圈直径预测值为 27.83 mm. 实际检测值与预测值完全吻合. 实验结果为生产羊毛硫细菌素 subtilomycin 提供了依据.

关键词: 枯草芽孢杆菌 SX3411 菌株; 抑菌物质; 发酵; 单因素分析; 响应面法

中图分类号: Q 815 文献标志码: A DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2021.05.09

0 引言

抗菌肽所具有的抑菌和安全特性已经受到饲料行业的广泛关注. 羊毛硫细菌素广泛存在于自然界中, 具有化学结构及生物活性的多样性. 这类化合物是由多种革兰氏阳性细菌产生的天然抗菌肽, 是在细菌核糖体上合成并经翻译后加工修饰而成的, 是一大类含有硫醚键的环肽类化合物^[1-2]. 根据在羊毛硫细菌素生物合成机制中催化形成羊毛硫氨酸的酶特性, 羊毛硫细菌素可分成 4 类^[2-6]. 羊毛硫细菌素对革兰氏阳性细菌的作用有特异性^[7], 研究显示羊毛硫细菌素可以与细胞壁的前体物质 lipid II 结合或者形成多聚物, 导致细菌细胞壁的合成受阻或导致细菌细胞膜形成孔道而使细胞内容物流失, 这 2 方面的作用对细菌都是致死的^[1, 8]. 由于同时具有 2 种对细菌的作用机制, 这使得细菌不容易产生抗药性. 从 *Lactococcus lactis* 中分离的羊毛硫细菌素乳酸链球菌素 Nisin 是羊毛硫细菌素的代表, 在食品防腐中应用多年没有发现其抗药性^[9-11].

羊毛硫细菌素 subtilomycin 最初来源于枯草芽孢杆菌 MMA7 菌株 (*Bacillus subtilis* Strain MMA7),

该菌株是从海绵 (*Haliclona simulans*) 中分离获得的^[12]. 随后它在枯草芽孢杆菌 BSn5 (*B. subtilis* BSn5) 菌株中也被发现^[13]. 目前已经基本确定了 subtilomycin 的氨基酸序列为 TWATIGKTIVQSVKKCRTFTCGCSLG-SCSN CN. 在基因簇中包括 *subA* (Subtilomycin 结构基因)、*subB* (羊毛硫氨酸脱水酶基因, lanthionine dehydratase)、*subC* (羊毛硫氨酸合成酶基因, lanthionine synthetase)、*subP* (丝氨酸蛋白酶基因, serine protease) 和 *subT* (ABC 转运蛋白基因) 等^[12].

subtilomycin 具有较广的抗菌谱, 研究表明其对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抵抗作用, 同时对某些真菌也有抵抗作用^[12]. 从相关研究结果来看, 其对革兰氏阳性菌的效果更明显. subtilomycin 的理化特性比较稳定, 水溶性好, 在低温下可以长期保存 (在室温下可保存 14 d); 在 100 °C 处理 30 min 后仍可维持活性; 耐受 pH 值范围比较广, 在检测的 pH 值为 2.0 ~ 8.5 时均有活性, 耐酸性更好; 可耐受蛋白酶处理且不失活^[12]. subtilomycin 的这些特性表明其具有较好的应用前景, 且适合在工业化生产中的加工和包装运输. 在笔者前期的工作中分离到 1 株产羊毛硫细菌素的枯草芽孢杆菌 SX3411, 已经确定可以产生 subtilomycin, 并对该菌株进行了产

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 国家自然科学基金 (31760601) 和南昌市重大科技攻关课题 (2020) 资助项目.

通信作者: 付鸣佳 (1964—), 男, 江西高安人, 教授, 博士, 主要从事药用真菌和益生菌研究. E-mail: mingjiafu@126.com

魏伟群 (1984—), 男, 江西南昌人, 工程师, 主要从事发酵工程研究. E-mail: qunweiwei@163.com

subtilomycin 的特性研究,确定其发酵液中的抑菌成分主要为 subtilomycin^[14]. 本文据此开展枯草芽孢杆菌 SX3411 发酵产抑菌物质的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

测试菌株: 枯草芽孢杆菌 SX3411 (*B. subtilis* SX3411), 由本实验室分离, 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 菌种保藏号为 CGMCC NO. 14396. 指示菌株为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 由本实验室保存.

LB 培养基为基础培养基: 蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母提取物 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 7.2, 加水定容至 1 L, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min, 固体培养基每 1 L 加 15.0 g 琼脂粉.

碳源基础发酵培养基: 蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母提取物 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 7.0.

氮源基础发酵培养基: 葡萄糖 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 7.0.

1.2 滤纸片法测定 SX3411 菌株发酵液的抑菌活性

在培养皿中加入 20~30 mL LB 固体培养基, 待培养基凝固后, 在超净台上吹干冷凝水; 涂布 $100 \mu\text{L}$ 指示菌悬液, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 10 min. 用 2 层滤纸片轻轻粘在制备好的抑菌平板上, 轻轻按压一下. 取 $25 \mu\text{L}$ SX3411 菌株的发酵液缓慢滴到滤纸片上, 按照顺时针方向进行实验. 在加样后于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中放置 4 h 以上, 使发酵液在琼脂糖平板上充分扩散, 然后在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养 12 h, 测量抑菌圈直径. 以 LB 液体培养基作为阴性对照.

1.3 枯草芽孢杆菌 SX3411 发酵条件的单因素实验

将枯草芽孢杆菌 SX3411 接种至 LB 基础培养基中并培养至 $O_{D_{600}} = 1.0$, 即为液体菌种(后续实验液体菌种均如此), 再接种至基础发酵培养基中进行不同发酵条件的发酵培养. 在各因素下, 分别取枯草芽孢杆菌 SX3411 培养 24 h 的发酵液, 在 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 15 min, 弃菌体取上清液. 以金黄色葡萄球菌为指示菌, 检测枯草芽孢杆菌 SX3411 发酵液的抑菌活性. 选用的单因素分别为培养基的初始 pH 值、种子液接种量、摇瓶装液量、培养温度和摇床转速.

1.3.1 培养基初始 pH 值的影响 将基础发酵培养基的初始 pH 值分别设置为 5、6、7、8、9 和 10, 灭菌备用. 将液体菌种按照 2.0% 的接种量接种至不

同初始 pH 值的基础发酵培养基中, 在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上恒温培养 24 h.

1.3.2 种子液接种量的影响 液体菌种分别按照 0.5%、2.0%、4.0%、6.0%、8.0% 和 10.0% 的接种量接种至不同的基础发酵培养基中, 在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上恒温培养 24 h.

1.3.3 摇瓶装液量的影响 在 6 个 250 mL 的三角瓶中分别装入 20%、30%、40%、50%、60% 和 70% 基础发酵培养基, 灭菌备用. 液体菌种按照 2.0% 的接种量接种至不同装液量的基础发酵培养基中, 在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上恒温培养 24 h.

1.3.4 培养温度的影响 液体菌种分别按照 2.0% 的接种量接种至不同的基础发酵培养基中, 分别将培养温度设置为 20、25、30、35 和 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 在 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上恒温培养 24 h.

1.3.5 摇床转速的影响 将液体菌种分别按照 2.0% 的接种量接种至不同的基础发酵培养基中, 摇床参数分别设置为 140、160、180、200 和 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 的摇床上恒温培养 24 h.

1.4 枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质发酵培养基组分的单因素实验

选用的单因素有碳源、氮源和无机盐离子. 将液体菌种接种至不同碳源、氮源和无机盐离子的发酵培养基中进行发酵培养 24 h, 检测发酵液的抑菌活性, 确定各个发酵条件对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质的影响.

1.4.1 碳源的影响 配制不同碳源培养基, 分别以 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度将葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露醇和可溶性淀粉加入碳源基础培养基中, 以碳源基础培养基为对照. 将液体菌种按 2.0% 的接种量接种至 50% 装液量的摇瓶中, 置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温摇床上培养 24 h. 在筛选到最适碳源后, 将该碳源设置浓度梯度进行发酵培养, 测定抑菌活性, 得到最适碳源浓度.

1.4.2 氮源的影响 配制不同氮源培养基, 分别以 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的量将蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉膏和酵母粉加入氮源基础培养基中, 以氮源基础培养基为对照. 将液体菌种按 2.0% 的接种量接种至 50% 装液量的摇瓶中, 置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温摇床上培养 24 h. 在筛选到最适氮源后, 将该氮源设置浓度梯度进行发酵培养, 测定抑菌活性, 得到最适氮源浓度.

1.4.3 无机盐离子对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抗菌物质的影响 以上述实验得到的最适碳源和氮源

为无机盐基础培养基 配制不同无机盐离子培养基, 根据微生物对无机盐离子的利用量不同, 分别以 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 、 $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4$ 的量加入无机盐基础培养基中, 以无机盐基础培养基为对照. 将液体菌种按 2.0% 的接种量接种至 50% 装液量的摇瓶中, 置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温摇床上培养 24 h.

1.5 响应面法优化培养条件

根据上述单因素实验的结果, 选取初始 pH 值、转速、温度、装液量和接种量进行响应面实验设计, 各设计因素水平值和代码如表 1 所示. 以抑菌圈直径为响应值, 确定菌株 SX3411 最佳发酵条件.

表 1 培养条件响应面试验因素水平表

变量	代码	水平		
		-1	0	1
初始 pH 值	A	7.5	8.0	8.5
转速/($\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)	B	170	180	190
温度/ $^\circ\text{C}$	C	28	30	32
装液量/%	D	30	40	50
接种量/%	E	1.5	2.5	3.5

1.6 响应面法优化培养基组分

根据上述单因素实验的结果, 选取葡萄糖、酵母粉、 ZnSO_4 和 CaCl_2 进行响应面实验设计, 各设计因素水平值和代码如表 2 所示. 以抑菌圈直径为响应值, 确定菌株 SX3411 最佳发酵培养基组分.

表 2 培养基组分响应面试验因素水平表

变量	代码	水平		
		-1	0	1
葡萄糖/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	A	5.0	10.0	15.0
酵母粉/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	B	5.0	10.0	15.0
ZnSO_4 /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	C	0.000 1	0.000 5	0.001 0
CaCl_2 /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	D	0.010 0	0.050 0	0.100 0

2 结果与分析

2.1 发酵条件的单因素分析

2.1.1 培养基初始 pH 值的影响 在 6 组不同初始 pH 值的基础发酵培养基中进行枯草芽孢杆菌 SX3411 培养, 然后对其发酵液抑菌活性进行检测. 结果表明: 培养基的不同 pH 值对枯草芽孢杆菌 SX3411 抑菌物质的产生和积累有明显的影

响. 菌圈大小来表示产生抑菌物质的相对量. 结果表明: 在 pH 值为 8.0 时抑菌活性最好, 其次是在 pH 值为 9.0 和 7.0 时, 其他的 pH 值较差(见图 1(a)). 因此, 选择 pH 值为 8.0 作为最适初始 pH 值.

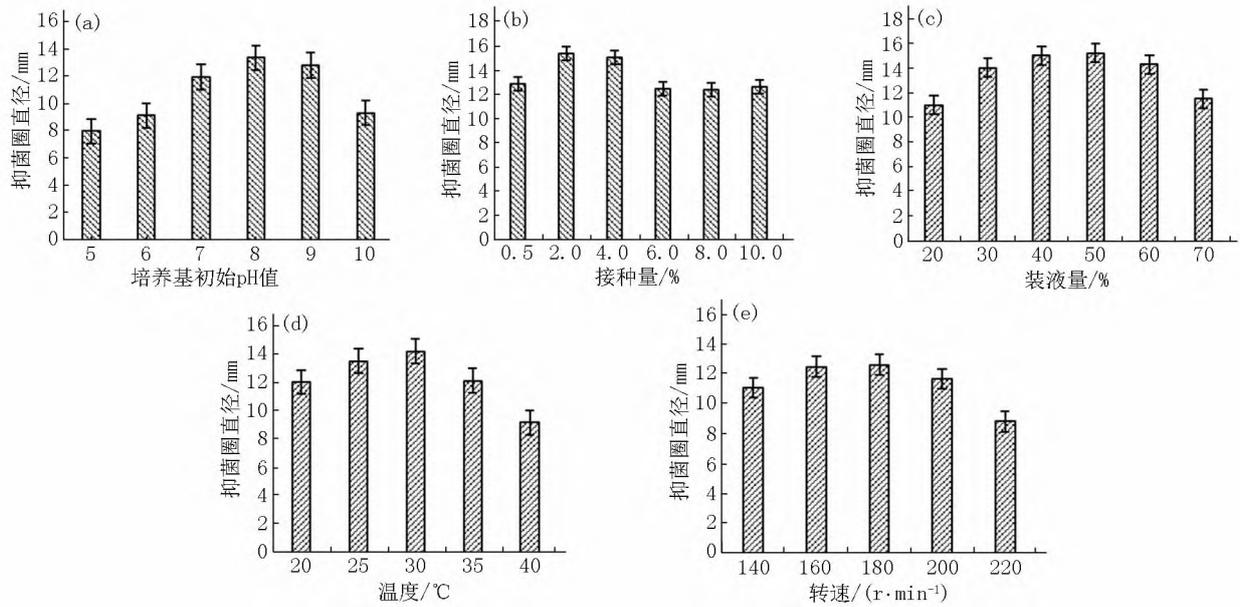
2.1.2 接种量的影响 设置 6 组不同接种量的菌种接种在基础发酵培养基中, 经 24 h 发酵培养后对发酵液抑菌活性进行检测. 结果表明接种量有一定的影响. 以抑菌圈大小来表示产生抑菌物质的相对量. 结果表明: 在接种量为 2.0% ~ 4.0% 时所产发酵液的抑菌活性最好; 当接种量为 0.5% 时, 抑菌活性次之; 当接种量为 6.0% ~ 10.0% 时, 抑菌活性相差不大, 这可能是由于生长太快, 导致抑菌蛋白有所降解或者不利于积累(见图 1(b)). 因此, 实验选择在发酵时的接种量为 2.0% ~ 4.0%.

2.1.3 装液量的影响 设置 6 组不同装液量的基础发酵培养基, 经 24 h 发酵培养后对发酵液抑菌活性进行检测. 结果表明: 在摇瓶装液量为 40% ~ 50% 时生长较好, 所产发酵液的抑菌活性最好, 抑菌物质积累较多; 当摇瓶装液量为 30% 和 60% 时, 抑菌活性相差不大, 抑菌活性次之; 当摇瓶装液量为 20% 和 70% 时, 抑菌活性较低(见图 1(c)). 因此, 实验选择菌株 SX3411 发酵时摇瓶装液量为 40% ~ 50%.

2.1.4 培养温度的影响 设置 5 组不同培养温度对枯草芽孢杆菌 SX3411 进行发酵培养, 对其所产抗菌物质发酵液抑菌活性进行检测. 结果表明: 不同培养温度对菌株 SX3411 抑菌物质的产生和积累有明显的影

响. 在培养温度为 25 ~ 30 $^\circ\text{C}$ 时生长较好, 所产发酵液的抑菌活性最好, 抑菌物质积累较多; 在培养温度为 20 $^\circ\text{C}$ 和 35 $^\circ\text{C}$ 时, 抑菌活性相差不大, 抑菌活性次之; 在培养温度为 40 $^\circ\text{C}$ 时, 抑菌活性较低, 抑菌物质的产生有所降解或积累较少(见图 1(d)). 因此, 实验选择菌株 SX3411 发酵的培养温度为 25 ~ 30 $^\circ\text{C}$.

2.1.5 摇床转速的影响 设置 5 组不同转速对枯草芽孢杆菌 SX3411 进行发酵培养, 对其所产抗菌物质发酵液抑菌活性进行检测. 结果表明: 不同摇床转速对菌株 SX3411 产抗菌物质的产生和积累有明显的影



注: (a) 为不同培养基初始 pH 值的影响, (b) 为不同接种量的影响, (c) 为不同装液量的影响, (d) 为不同温度的影响, (e) 为不同转速的影响。

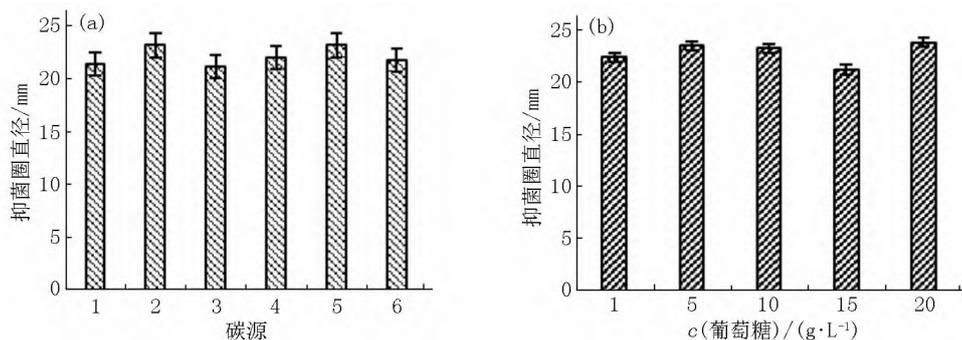
图 1 单因素发酵条件对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质的影响

2.2 发酵培养基组分的单因素分析

2.2.1 碳源的影响 不同碳源对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质的影响相差不大,其中以甘露醇和葡萄糖作为碳源的抑菌效果最好,抑菌圈直径分别为 23.18 mm 和 23.21 mm;其次是蔗糖和可溶性淀粉,抑菌圈直径分别为 21.97 mm 和 21.76 mm;果糖和碳源对照的抑菌圈效果相差不大,抑菌圈直径分别为 21.19 mm 和 21.43 mm,这说明果糖对枯草

芽孢杆菌 SX3411 发酵分泌抗菌蛋白无明显影响(见图 2(a)).综合考虑甘露醇和葡萄糖的价格和获取渠道因素,因此选择葡萄糖为最佳碳源。

不同葡萄糖质量浓度对枯草芽孢杆菌 SX3411 发酵分泌抑菌物质的影响不明显(见图 2(b)).综合考虑微生物利用碳源的效率和经济因素,最终选用葡萄糖的质量浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



注: (a) 为碳源种类的影响(1. CK; 2. 葡萄糖; 3. 果糖; 4. 蔗糖; 5. 甘露醇; 6. 可溶性淀粉) (b) 为葡萄糖浓度的影响。

图 2 碳源对枯草芽孢杆菌 SX3411 发酵产抑菌物质的抑菌活性影响

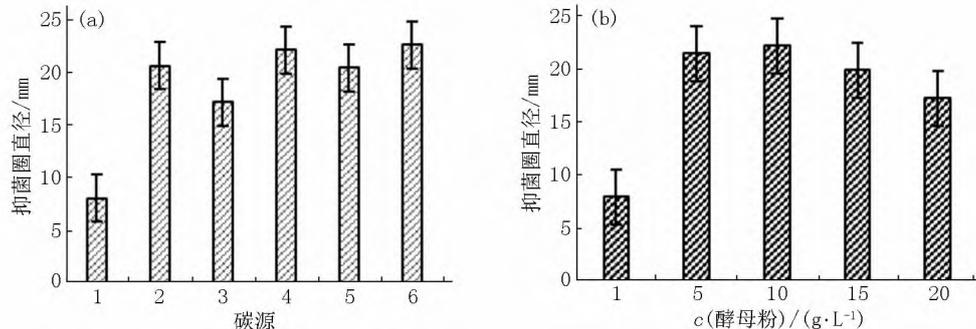
2.2.2 氮源的影响 不同氮源对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质的活性具有显著影响.当以酵母粉为氮源时,发酵液的抑菌圈直径为 22.66 mm;当以大豆蛋白胨为氮源时,抑菌圈直径为 22.18 mm;当以牛肉膏和蛋白胨分别为氮源时,抑菌圈直径分别为 20.47 mm 和 20.67 mm;无氮源的培养基生长缓慢,没有检测到抑菌活性,这说明氮源对枯草芽

孢杆菌 SX3411 分泌抑菌物质具有重要的影响(见图 3(a)).对比大豆蛋白胨和酵母粉的价格,选用酵母粉为最佳氮源。

当酵母粉的质量浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质抑菌活性最好,抑菌圈直径为 22.26 mm,最有利于抗菌物质的积累;当酵母粉的质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑菌圈直径为

21.52 mm, 抑菌能力较好; 当酵母粉的质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 基本检测不到抑菌活性. 这说明低浓度的氮源不利于菌株 SX3411 的生长和抑菌物质的

产生. 当氮源为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酵母粉时, 抑菌直径分别为 19.93 mm 和 17.30 mm(见图 3(b)). 因此, 选用质量浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酵母粉作为氮源.



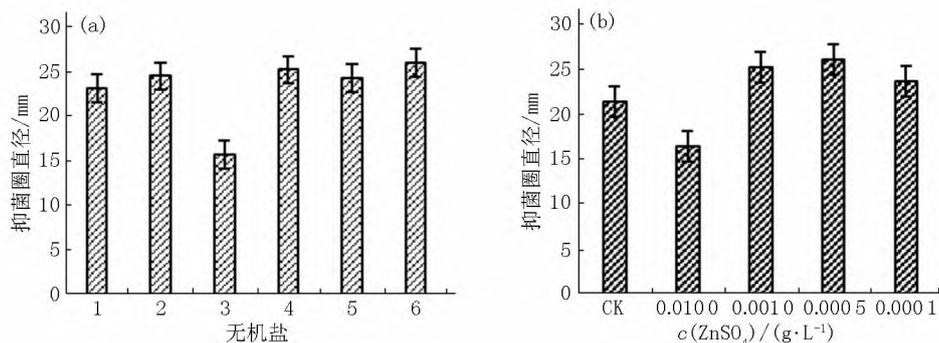
注: (a) 为氮源种类的影响(1. CK; 2. 蛋白胨; 3. 胰蛋白胨; 4. 大豆蛋白胨; 5. 牛肉膏; 6. 酵母粉) (b) 为酵母粉浓度的影响.

图3 氮源对枯草芽孢杆菌 SX3411 发酵产 Subtilomycin 的抑菌活性影响

2.2.3 无机盐离子的影响 在含有 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母粉的无机盐基础培养基中, 根据前期的预实验, 加入无机盐分别为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 , $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnSO_4 来发酵培养枯草芽孢杆菌 SX3411. 利用 30% 硫酸铵沉淀发酵液(全过程同步定量)检测抑菌活性. 不加无机盐的对照抑菌圈直径为 23.15 mm; 加入 ZnSO_4 和 CaCl_2 的抑菌圈直径分别为 26.00 mm 和 25.25 mm, 显示对抑菌活性有促进作用; 当加入 K_2HPO_4 时, 测得的抑菌圈直径为 15.70 mm, 抑菌活性下降; NaCl 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对抑菌活性的影响不明显, 抑菌圈直

径分别为 24.53 mm、24.30 mm(见图 4(a)). 由此可知 ZnSO_4 最有利于枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌抑菌物质, CaCl_2 次之.

在不含无机盐的培养基中加入不同质量浓度的 ZnSO_4 进行发酵培养, 分别检测发酵液的抑菌活性, 以不含无机盐的培养基为对照. 结果表明: 高浓度的 ZnSO_4 会抑制枯草芽孢杆菌 SX3411 的生长, 不利于抑菌物质的分泌和积累; $0.0001 \sim 0.0010 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZnSO_4 可以促进枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌和积累抑菌物质, 其中以 $0.0005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZnSO_4 最为有利(见图 4(b)).



注: (a) 为无机盐种类的影响(1. CK; 2. NaCl; 3. K_2HPO_4 ; 4. CaCl_2 ; 5. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6. ZnSO_4) (b) 为 ZnSO_4 质量浓度的影响.

图4 无机盐对枯草芽孢杆菌 SX3411 发酵产 Subtilomycin 的抑菌活性影响

2.3 响应面法优化培养条件

2.3.1 回归模型的建立 依据单因素实验得到的结果, 选择初始 pH 值、摇床转速、培养温度、装液量和接种量进行响应面实验, 以抑菌圈直径为响应值. 表 3 是利用 Box-Behnken 进行实验设计得到的实际值和回归方程的预测值. 对抑菌圈直径进行回归分析, 拟合的 2 次回归方程为

$$Y = 24.10 - 1.27A - 0.61B + 0.42C - 2.25D - 0.32E - 1.56AB - 3.31AC - 2.22AD - 0.23AE - 0.80BC + 1.44BD + 2.84BE + 1.28CD - 3.09CE + 2.00DE - 1.77A^2 - 2.81B^2 - 3.22C^2 - 1.23D^2 - 0.32E^2,$$

其中 Y 为抑菌圈直径, A 为培养基初始 pH 值, B 为摇床转速, C 为培养温度, D 为装液量, E 为接种量.

表3 培养条件响应面试验设计及实际值与预测值

实验号	A	B/(r·min ⁻¹)	C/°C	D/%	E/%	抑菌圈直径/mm	
						实际值	预测值
1	0	-1	0	0	1	18.88	18.42
2	-1	1	0	0	0	21.50	21.74
3	-1	0	0	-1	0	22.75	22.41
4	1	0	-1	0	0	21.25	20.74
5	0	0	1	0	-1	24.00	24.39
6	0	0	0	0	0	23.88	24.10
7	1	0	0	1	0	15.38	15.37
8	0	1	0	0	-1	18.00	17.83
9	0	0	0	-1	1	22.50	22.49
10	0	0	-1	-1	0	23.00	22.76
11	0	1	1	0	0	17.50	17.08
12	0	-1	1	0	0	20.50	19.90
13	1	-1	0	0	0	20.50	20.43
14	0	0	0	1	-1	19.25	18.62
15	-1	0	0	0	-1	23.00	23.37
16	-1	0	-1	0	0	17.25	16.65
17	1	1	0	0	0	16.00	16.08
18	1	0	0	0	-1	21.00	21.30
19	0	0	-1	1	0	15.75	15.70
20	0	-1	-1	0	0	17.63	17.46
21	0	0	-1	0	1	22.63	22.92
22	1	0	0	-1	0	24.50	24.31
23	0	1	0	-1	0	20.00	20.26
24	-1	-1	0	0	0	19.75	19.84
25	0	1	-1	0	0	18.25	17.83
26	-1	0	0	1	0	22.50	22.35
27	-1	0	0	0	1	22.93	23.20
28	0	-1	0	-1	0	24.00	24.36
29	0	0	1	0	1	17.25	17.57
30	0	-1	0	1	0	16.50	16.99
31	0	1	0	1	0	18.25	18.64
32	0	0	1	-1	0	20.75	21.04
33	0	1	0	0	1	23.00	22.89
34	1	0	0	0	1	20.00	20.20
35	1	0	1	0	0	14.75	14.95
36	0	0	-1	0	-1	17.00	17.36
37	0	-1	0	0	-1	25.25	24.74
38	0	0	0	1	1	22.50	21.99
39	0	0	1	1	0	18.63	19.10
40	-1	0	1	0	0	24.00	24.12
41	0	0	0	-1	-1	27.25	27.12
42	0	0	-1	0	0	21.25	20.46
43	0	1	1	0	0	17.75	17.08
44	0	-1	1	0	0	20.00	19.90
45	0	-1	-1	0	0	16.50	17.46
46	0	1	-1	0	0	17.00	17.83
47	0	0	-1	0	0	20.13	20.46

2.3.2 回归模型的方差分析 表4是根据实验结果进行回归方程分析后得到的2次回归方程(ANOVA)的方差分析.对各个因素进行显著性分析, A、B、C、D、E、AB、AC、AD、BC、BD、BE、CD、CE、DE、A²、

B²、C²、D²对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抗菌肽具有显著性,其中对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抗菌物质影响程度大小依次为装液量 > pH 值 > 转速 > 温度 > 接种量.

表4 培养基回归模型的方差分析

来源	方差平方和 S_s	自由度 d_f	均方 M_s	F 值	P 值	显著性
模型	400.65	20	20.03	69.50	<0.000 1	***
A	25.76	1	25.76	89.36	<0.000 1	***
B	7.50	1	7.50	26.03	<0.000 1	***
C	3.76	1	3.76	13.05	0.001 3	***
D	81.00	1	81.00	281.03	<0.000 1	***
E	1.61	1	1.61	5.58	0.025 9	*
AB	9.77	1	9.77	33.88	<0.000 1	***
AC	43.89	1	43.89	152.28	<0.000 1	***
AD	19.69	1	19.69	68.32	<0.000 1	***
AE	0.21	1	0.21	0.74	0.396 8	不显著
BC	5.08	1	5.08	17.63	0.000 3	***
BD	8.27	1	8.27	28.68	<0.000 1	***
BE	32.35	1	32.35	112.23	<0.000 1	***
CD	6.57	1	6.57	22.78	<0.000 1	***
CE	38.29	1	38.29	132.83	<0.000 1	***
DE	16.00	1	16.00	55.51	<0.000 1	***
A ²	12.73	1	12.73	44.16	<0.000 1	***
B ²	34.81	1	34.81	120.76	<0.000 1	***
C ²	38.24	1	38.24	132.67	<0.000 1	***
D ²	6.16	1	6.16	21.37	<0.000 1	***
E ²	0.41	1	0.41	1.44	0.241 5	不显著
残差	7.49	26	0.29			
失拟项	5.29	21	0.25	0.57	0.832 6	不显著
纯误差	2.20	5	0.44			
总离差	408.14	46				

注:***非常显著,*显著.

2.3.3 响应面分析最优发酵条件 根据试验结果,分析处理后得出2个因素交互作用的响应曲面(见图5).从图5可以观察到5个因素对枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌抗菌物质的影响.由观察各因素两两之间的关系可知:除了pH值和接种量的交互作用不显著外,其他各因素之间相互作用都比较显著,曲面图均较为陡峭.

利用 Design-Expert 软件进行优化,发酵枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌抗菌蛋白的最佳培养条件是初始 pH 值为 8.25、转速为 169 r·min⁻¹、温度为 30.24℃、装液量为 37.9%、接种量为 1.46%,抑菌圈直径预测值为 30.04 mm.根据实际操作,选用初始 pH 值为 8.25、转速为 170 r·min⁻¹、温度为 30℃、装液量为 38%、接种量为 1.5%的培养条件进行验证试验,

实验测定的抑菌圈直径为 29.83 mm,符合预测值.

2.4 响应面法优化培养基成分

2.4.1 回归模型的建立 依据单因素实验得到的结果,选择对枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌抗菌蛋白有影响的葡萄糖、酵母粉、硫酸锌和氯化钙进行响应面实验,以抑菌圈直径为响应值.表5是利用 Box-Behnken 进行实验设计得到的实际值和回归方程的预测值.对抑菌圈直径进行回归分析,拟合的2次回归方程为

$$Y = 25.65 + 2.23A - 3.68B - 0.37C - 0.53D + 1.33AB + 1.64AC - 0.20AD - 0.75BC - 1.77BD - 0.21CD - 3.74A^2 - 1.70B^2 - 2.34C^2 - 3.09D^2,$$

其中 Y 为抑菌圈直径, A、B、C、D 分别为葡萄糖、酵母粉、硫酸锌、氯化钙的质量浓度.

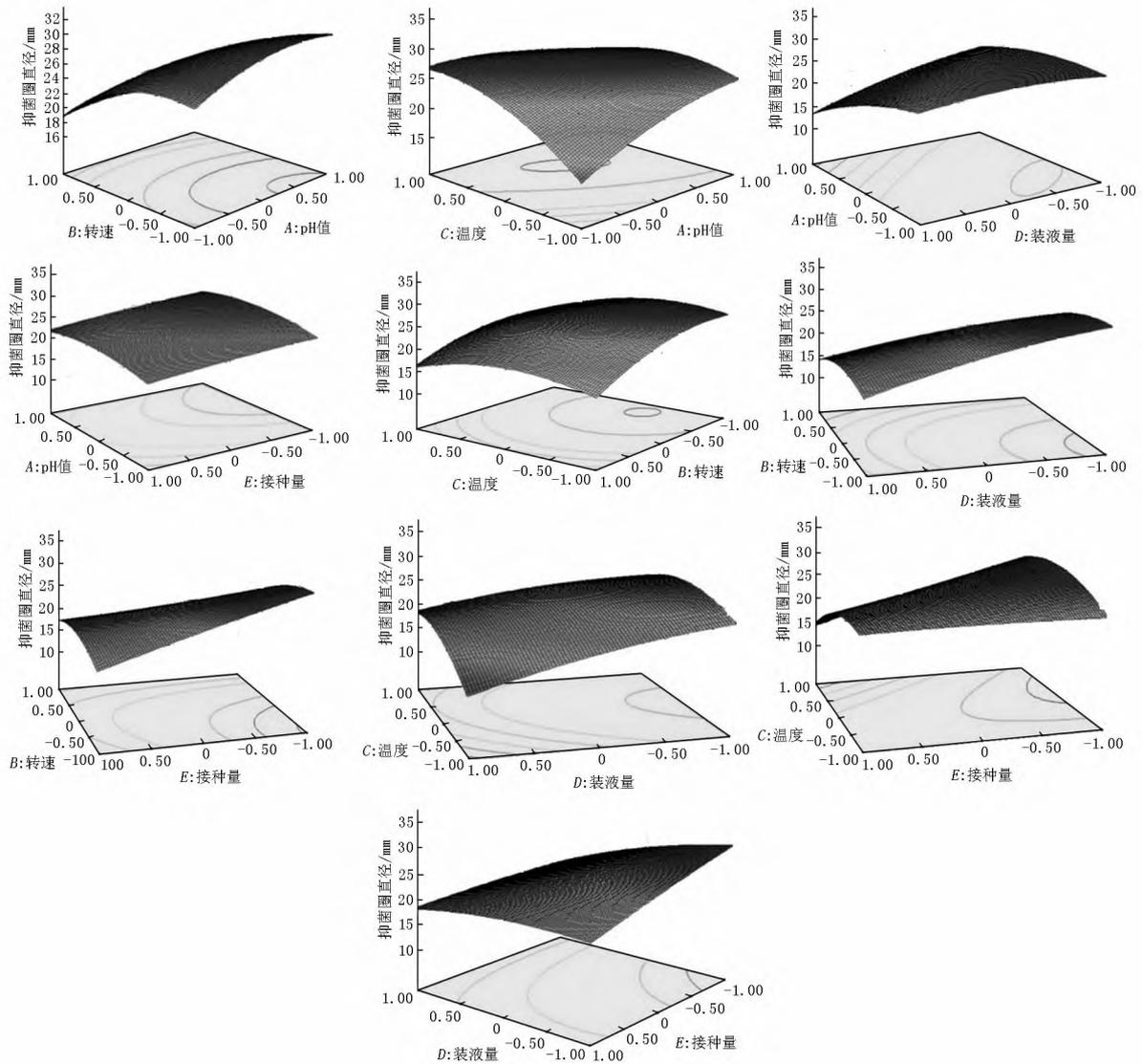


图5 各培养条件影响枯草芽孢杆菌 SX3411 产抗菌物质的响应面图

表5 培养基成分响应面试验设计及实际值与预测值

实验序	A	B	C	D	抑菌圈直径/mm	
					实际值	预测值
1	0	1	0	1	15.40	14.88
2	1	0	0	-1	21.95	21.79
3	1	1	0	0	20.70	20.09
4	-1	1	0	0	13.25	12.98
5	-1	0	0	1	15.15	16.27
6	0	1	0	-1	18.95	19.49
7	0	0	1	1	19.50	19.11
8	0	0	0	0	25.25	25.65
9	0	0	1	-1	21.35	20.60
10	0	-1	-1	0	24.50	24.90
11	0	-1	0	1	26.55	25.78
12	-1	0	-1	0	20.00	19.35
13	1	-1	0	0	25.25	24.79
14	-1	-1	0	0	23.10	22.98
15	0	1	1	0	16.25	16.81

表5(续)

实验序	A	B	C	D	抑菌圈直径/mm	
					实际值	预测值
16	1	0	0	1	19.80	20.33
17	1	0	1	0	22.65	23.07
18	-1	0	1	0	15.85	15.34
19	0	0	-1	-1	21.25	20.91
20	0	0	-1	1	20.25	20.27
21	0	-1	1	0	25.00	25.66
22	1	0	-1	0	20.25	20.53
23	0	-1	0	-1	23.00	23.29
24	-1	0	0	-1	16.50	16.93
25	0	1	-1	0	18.75	19.05
26	0	0	0	0	25.45	25.65
27	0	0	0	0	26.25	25.65
28	0	0	0	0	25.65	25.65

2.4.2 回归模型的方差分析 表6 是根据实验结果进行回归方程分析后得到的2次回归方程(ANO-

VA) 的方差分析. 对各个因素进行显著性分析, A、B、D、AB、AC、BD、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质具有显著性, 其中 C 不具显著

性, 可能还存在其他因素的影响, 其中对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抗菌肽影响程度大小依次为酵母粉 > 葡萄糖 > 钙离子 > 锌离子.

表 6 培养基成分回归模型的方差分析

来源	方差平方和 S_s	自由度 d_f	均方 M_s	F 值	P 值	显著性
模型	379.54	14	27.11	50.43	<0.000 1	***
葡萄糖(A)	59.63	1	59.63	110.92	<0.000 1	***
酵母粉(B)	162.07	1	162.07	301.46	<0.000 1	***
锌离子(C)	1.61	1	1.61	3.00	0.106 9	不显著
钙离子(D)	3.36	1	3.36	6.25	0.026 6	*
AB	7.02	1	7.02	13.06	0.003 1	***
AC	10.73	1	10.73	19.95	0.000 6	***
AD	0.16	1	0.16	0.30	0.594 6	不显著
BC	2.25	1	2.25	4.19	0.061 6	不显著
BD	12.60	1	12.60	23.44	0.000 3	***
CD	0.18	1	0.18	0.34	0.572 1	不显著
A^2	83.72	1	83.72	155.73	<0.000 1	***
B^2	17.43	1	17.43	32.41	<0.000 1	***
C^2	32.90	1	32.90	61.2	<0.000 1	***
D^2	57.12	1	57.12	106.25	<0.000 1	***
残差	6.99	13	0.54			
失拟项	6.43	10	0.64	3.44	0.168 5	不显著
纯误差	0.56	3	0.19			
总离差	386.53	27				

注: *** 非常显著, * 显著.

2.4.3 响应面分析最优培养基成分 根据试验结果, 经分析处理后得出了 2 个因素交互作用的响应曲面图(见图 6). 从图 6 可见 4 个因素对枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌抗菌蛋白的影响. 各因素之间交

互作用, 其中葡萄糖和氯化钙的交互作用不显著, 硫酸锌和氯化钙的交互作用不显著, 其他各因素间交互作用均显著.

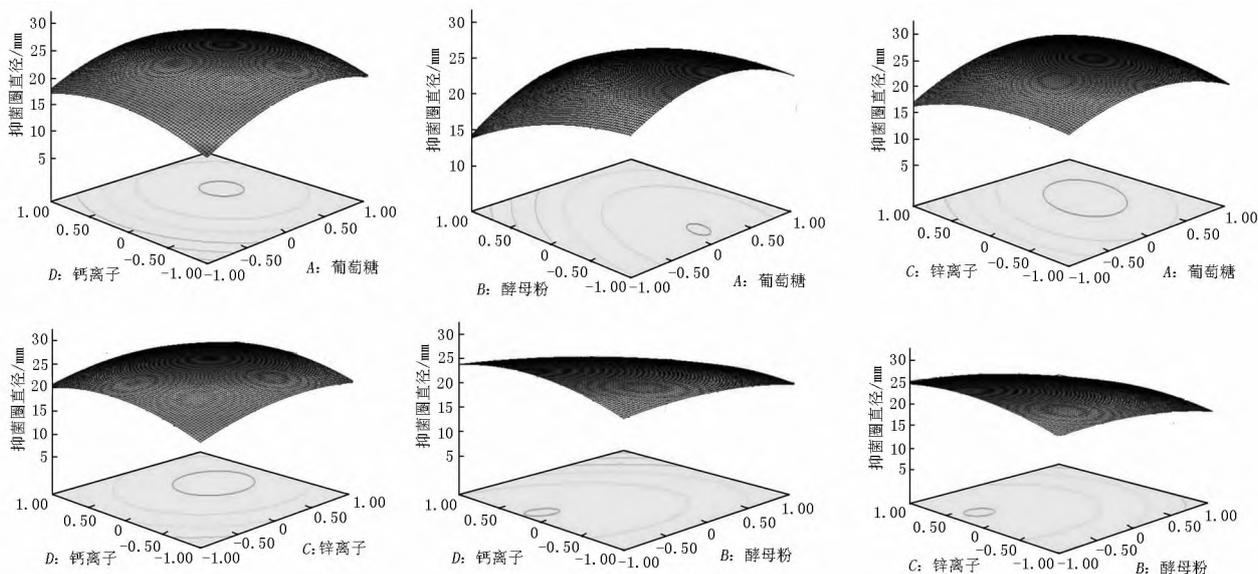


图 6 各培养基成分影响枯草芽孢杆菌 SX 产抗菌物质的响应面图

利用 Design-Expert 软件进行优化,发酵枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌抗菌蛋白的最佳培养基的组分为葡萄糖 $11.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母粉 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 ZnSO_4 $0.00056 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CaCl_2 $0.0595 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑菌圈直径预测值为 27.83 mm . 为方便相关试剂的配比,实验选用葡萄糖 $11.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母粉 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.0006 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnSO_4 、 $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 的培养基组分进行验证实验,实验测定的抑菌圈直径为 27.22 mm ,符合预测值.

3 讨论

发酵条件的不同会影响枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌产生抑菌物质,这与枯草芽孢杆菌的代谢调节机理有关.对于枯草芽孢杆菌 SX3411,中性偏弱碱性的 pH 值有利于其分泌积累抑菌活性物质.2% ~ 4% 种子液的接种量对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质最为合适.摇瓶装液量会影响枯草芽孢杆菌 SX3411 的有氧发酵,摇瓶 40% ~ 50% 的装液量最有利于枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌和积累抑菌物质.温度和摇床转速的不同会影响枯草芽孢杆菌 SX3411 的生长速度,在温度为 $25 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$ 和转速为 $160 \sim 180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌积累抑菌物质最为有利.这些单因素发酵条件的获得,为确立综合的发酵条件提供了前期的依据.

发酵培养基成分单因素实验确立了对枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌抑菌物质有利的最佳碳源(葡萄糖)、最佳氮源(酵母粉)和无机盐(ZnSO_4 和 CaCl_2),其中氮源对菌株 SX3411 分泌积累抑菌物质的影响最强.在单因素的发酵培养基成分中营养物质适宜浓度的获得,在物质上为枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质提供了直接依据.

根据预先的培养条件和培养基成分单因素实验结果,采用 Design-Expert 软件设计了响应面实验.以抑菌圈直径为响应值,分别进行回归分析,得到拟合的 2 次回归方程.对培养条件的各个因素进行显著性分析,结果表明初始 pH 值、摇床转速、培养温度、装液量、接种量对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抗菌肽具有显著性,其中影响程度大小依次为装液量 > pH 值 > 转速 > 温度 > 接种量.利用 Design-Expert 软件进行优化,发酵枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌抑菌物质的最佳培养条件为初始 pH 值 8.25、转速 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、温度 30°C 、装液量 38%、接种量

1.5%,实验测定的抑菌圈直径为 29.83 mm ,符合预测值.

对培养基成分各个因素进行显著性分析,结果表明葡萄糖、酵母粉、 CaCl_2 对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质具有显著性影响,其中 ZnSO_4 不具显著性.对枯草芽孢杆菌 SX3411 产抑菌物质影响程度大小依次为酵母粉 > 葡萄糖 > CaCl_2 > ZnSO_4 .利用 Design-Expert 软件进行优化,发酵枯草芽孢杆菌 SX3411 分泌抑菌物质的最佳培养基的组分为葡萄糖 $11.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母粉 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 ZnSO_4 $0.0006 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CaCl_2 $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,实验测定的抑菌圈直径为 27.22 mm ,符合预测值.

4 参考文献

- [1] Chatterjee C, Paul M, Xie Lili, et al. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics [J]. Chem Rev, 2005, 105(2): 633-684.
- [2] Kner P J, Van D. Discovery, biosynthesis and engineering of lantipeptides [J]. Annual Review of Biochemistry, 2012, 81(1): 479-505.
- [3] Müller W M, Schmiederer T, Enslé P, et al. In vitro biosynthesis of the prepeptide of type-III lantibiotic labyrinthopeptin A2 including formation of a C—C bond as a post-translational modification [J]. Angew Chem Int Ed, 2010, 49(13): 2436-2440.
- [4] Pag U, Sahl H G. Multiple activities in lantibiotics—models for the design of novel antibiotics [J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(9): 815-833.
- [5] Goto Y, Li Bo, Claesen J, et al. Discovery of unique lantibiotic synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights [J]. PLoS Biol, 2010, 8(3): e1000339.
- [6] Kodani S, Hudson M E, Durrant M C, et al. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(31): 11448-11453.
- [7] Piper C, Cotter P D, Ross R P, et al. Discovery of medically significant lantibiotics [J]. Current Drug Discovery Technologies, 2009, 6(1): 1-18.
- [8] Breukink E, Wiedemann I, Van K C, et al. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic [J]. Science, 1999, 286(5448): 2361-2364.
- [9] Gross E, Morell J L. Structure of nisin [J]. Journal of the American Chemical Society, 1971, 93(18): 4634-4635.
- [10] Rogers L A. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on

- Lactobacillus bulgaricus* [J]. Journal of Bacteriology, 1928, 16(5): 321-325.
- [11] Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans R J, et al. Applications of the bacteriocin, nisin [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 69(2): 193-202.
- [12] Phelan R W, Barret M, Cotter P D, et al. Subtilomycin: a New Lantibiotic from *Bacillus subtilis* Strain MMA7 Isolated from the Marine Sponge *Haliclona simulans* [J]. Mar Drugs, 2013, 11(6): 1878-1898.
- [13] Deng Yun, Li Congzi, Zhu Yiguang, et al. Apnl, a transmembrane protein responsible for subtilomycin immunity, unveils a novel model for lantibiotic immunity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(20): 6303-6315.
- [14] 李晓然, 叶德晓, 付鸣佳, 等. 枯草芽孢杆菌 SX3411 产羊毛硫细菌素 subtilomycin 的初步鉴定与理化特性分析 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(12): 46-54.

The Optimization of Fermentation Conditions Producing Antimicrobial Substances from *Bacillus subtilis* SX3411

FENG Lei¹, WEI Weiqun^{2*}, FU Mingjia^{1*}, XIAO Shiping², YE Dexiao¹, ZHONG Xueqing¹, HUANG Ziyan¹

(1. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China;

2. Jiangxi Tianjia Bioengineering Company Limited, Nanchang Jiangxi 330200, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* SX3411 strain has subtilomycin gene cluster, and its main antimicrobial component is subtilomycin. The effects of *Bacillus subtilis* SX3411 on the production of antimicrobial substances under different fermentation conditions and nutritional components are analyzed by single factor method. According to the single factor analysis, the response surface methodology is designed to analyze the bacteriostatic substances produced by *Bacillus subtilis* SX3411. The optimal fermentation conditions and the optimal nutrient composition are obtained by response surface methodology. The results show that the optimum culture conditions are initial pH 8.25, rotational speed 169 r · min⁻¹, temperature 30.24 °C, liquid loading 37.9%, inoculation quantity 1.46%, and the predicted value of bacteriostasis circle diameter is 30.04 mm. The optimum medium is glucose 11.4 g · L⁻¹, yeast powder 5.0 g · L⁻¹, zinc sulfate 0.000 56 g · L⁻¹, calcium chloride 0.059 5 g · L⁻¹, and the predicted value of bacteriostasis circle diameter is 27.83 mm. The actual measured value is in good agreement with the predicted value. This provides a basis for the production of lantibiotic subtilomycin.

Key words: *Bacillus subtilis* SX3411 strain; bacteriostatic substances; fermentation; single-factor analysis; response surface methodology

(责任编辑: 刘显亮)