

响应面法优化解硫胺素类芽孢杆菌SY20产抑菌物质发酵条件

吴雅萍^{1,2}, 曹偲², 林勇文¹, 陈健旋¹, 陈健凯¹, 林良美¹, 叶惠恋¹, 刘冬梅^{2*}

(1. 漳州职业技术学院食品工程学院, 福建漳州 363000)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 解硫胺素类芽孢杆菌 (*Paenibacillus thiamolyticus* SY20) 是一株从福建漳州酸笋中分离的抗菌活性菌株, 前期已经证明它能产生一种罕见的脂肽类抗菌剂多粘菌素 A1。为了提高其产抑菌物质的能力, 以该活性菌株为研究对象, 以大肠杆菌的抑菌直径为考察指标, 进行产抑菌物质发酵条件优化。首先通过单因素实验探究了不同碳源、氮源、无机盐及添加浓度对菌株产抑菌活性物质的影响; 然后采用 Plackett-Burman 法筛选 3 个重要因素磷酸氢二铵、KCl 和 NaCl 进行分析; 接着通过 Box-Behnken 中心组合试验确定培养基最优组合; 最后在此基础上进行接种量、pH 值条件、发酵时间和发酵温度优化以获得最优发酵条件并进行优化方案验证。结果表明: *P. thiamolyticus* SY20 发酵产抑菌物质的最佳培养基配方为麦芽糖 20 g/L, 棉籽饼粉 15 g/L, 磷酸氢二铵 8 g/L, KCl 10 g/L, NaCl 10 g/L, 最佳发酵条件为: pH 值为 7.5, 培养温度 28 °C, 发酵时间 60h, 优化后发酵上清的抑菌圈直径 22.8mm 为优化前 (15.2mm) 的 1.5 倍。优化后该菌株产抑菌活性物质的能力显著提高, 该研究为后续大规模分离纯化抑菌物质奠定基础。

关键词: *P. thiamolyticus* SY20; 产抑菌物质; 响应面法; 发酵条件

文章编号: 1673-9078(2024)12-110-118

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1382

Optimization of Fermentation Conditions for Antimicrobial Substance Production from *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20 Using Response Surface Methodology

WU Yaping^{1,2}, CAO Cai², LIN Yongwen¹, CHEN Jianxuan¹, CHEN Jiankai¹, LIN Liangmei¹,

YE Huilian¹, LIU Dongmei^{2*}

(1. Faculty of Food Engineering, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China)

(2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20 is an antimicrobial strain isolated from acid bamboo shoots in

引文格式:

吴雅萍, 曹偲, 林勇文, 等. 响应面法优化解硫胺素类芽孢杆菌SY20产抑菌物质发酵条件[J]. 现代食品科技, 2024, 40(12):110-118.

WU Yaping, CAO Cai, LIN Yongwen, et al. Optimization of fermentation conditions for antimicrobial substance production from *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20 using response surface methodology [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 110-118.

收稿日期: 2023-11-19

基金项目: 漳州职业技术学院博士启动基金 (ZZYB2207)

作者简介: 吴雅萍 (1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 787410180@qq.com

通讯作者: 刘冬梅 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物的利用与控制, E-mail: liudm@scut.edu.cn

Zhangzhou, Fujian. Previous studies have demonstrated that this species can produce a rare lipopeptide antimicrobial substance, polymyxin A1. To improve the ability of *P. thiaminolyticus* to produce antimicrobial substances, the active strain was used as the research object, and the antimicrobial diameters against *Escherichia coli* were used as the investigation index to optimize the fermentation conditions. Single-factor experiments were conducted to evaluate the effects of different carbon sources, nitrogen sources, and inorganic salt types and their concentrations on the production of antimicrobial substances. The three significant factors, namely ammonium phosphate, KCl, and NaCl, were screened and further analyzed using the Plackett-Burman method. The optimal medium combination was determined using a Box-Behnken central composite design. Finally, the inoculation volume, pH value, fermentation time and temperature were optimized to obtain the most effective fermentation conditions, which were then verified experimentally. The results showed that the optimum fermentation medium for producing antimicrobial substances in *P. thiaminolyticus* SY20 was composed of 20 g/L maltose, 15 g/L cottonseed cake flour, 8 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 g/L KCl, and 10 g/L NaCl. The optimized fermentation conditions were as follows: pH 7.5, fermentation temperature of 28 °C, and fermentation time of 60 h. After optimization, the inhibition diameter of the fermented supernatant was 22.8 mm, which was 1.5-fold larger than that before optimization (15.2 mm). The ability of the strain to produce antimicrobial substances was significantly improved, providing a foundation for large-scale isolation and purification of the antibacterial substances.

Key words: *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20; production antimicrobial substance; response surface methodology; fermentation condition

天然产物在药物开发中一直发挥着重要作用, 新型的天然化合物可用于开发治疗耐药菌感染药物、食品防腐剂以及工业和农业生物制剂^[1,2]。微生物具有生产多种生物活性化合物的潜力, 这些化合物可以广泛用于制药行业^[3,4]。通过对 16S rRNA 序列的广泛比较分析, 直到 1993 年类芽孢杆菌属才从芽孢杆菌属中剥离出来^[5,6]。截止 2017 年, 已经有超过 200 种的类芽孢杆菌被报道, 它们广泛分布于环境中, 能产生多种抗菌活性物质包括细菌素、非核糖体脂肽、聚酮、多肽-聚酮杂合物、挥发性有机化合物等^[7-9]。然而, 类芽孢杆菌代谢产抗菌活性物质的水平往往容易受到培养条件、菌体生长阶段以及自身诱导肽调控等因素的影响^[10-12], 这严重限制了对活性抑菌物质的开发与应用。响应面法可通过构建模型对不同因子水平及交互作用进行优化, 从而快速有效地确定多因子系统的最佳条件^[13]。该法已被广泛应用于培养基和培养条件的优化、提取技术和酶学性质等方面的研究^[14-16]。Ugwuaji 等^[17]通过响应面法优化 *Paenibacillus lactis* OPSA3 发酵条件, 使其产碱淀粉酶的产量增加了 2.1 倍。邓志平等^[18]对类芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp.1-49 进行响应面培养条件优化, 使摇瓶发酵培养后的菌体浓度 OD₆₀₀ 达到 10.280。张智等^[11]利用响应面法优化 *Paenibacillus cookii* PLD-01 产抑菌素发酵条件, 使优化后的抑菌圈直径达到 15.7 mm。

解硫胺素类芽孢杆菌 (*Paenibacillus thiamolyticus*) 最初是从硫胺素缺乏的临床患者的粪便中分离得到的这一种类芽孢杆菌, 由于其能够产生硫胺降解酶 (硫氨基酶 I), 所以它被当做研究硫氨基酶 I 的模式生物^[19]。然而, 对于解硫胺素类芽孢杆菌的研究仅限于其降解硫胺素能力, 针对其抗菌的研究目前国内外尚未报道。本研究的对象是一株从酸笋中分离出的活性解硫胺素类芽孢杆菌 (*P. thiamolyticus* SY20), 前期已经从其发酵上清液中分离出一种罕见的脂肽类抗生素——多粘菌素 A1^[9]。为了提高该菌株产活性抑菌物质的水平, 结合单因素分析、Plackett-Burman 设计以及 Box-Behnken 中心组合试验对发酵培养基进行优化, 并在此基础上探究最佳培养条件, 为后续大规模的分离纯化活性物质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 活性菌株与指示菌

活性菌株 *P. thiamolyticus* SY20 为实验室前期从福建漳州的酸笋中筛选所得。指示菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922) 为实验室所保有。

1.1.2 主要培养基与试剂

细菌学蛋白胨、技术琼脂粉、酵母提取粉、牛

肉浸粉、棉籽饼粉、麦芽糊精、麦芽糖、玉米淀粉、蔗糖、葡萄糖、豆粕提取物，购于广东环凯微生物科技有限公司；磷酸氢二铵、硫酸铵、NaCl、硫酸镁、丙三醇、乳糖、硫酸锰氯化镁、尿素、硝酸铵、氯化钾，以上均为分析纯购于天津市大茂化学试剂厂。

1.1.3 主要仪器与设备

SW-CJ-1R 超净工作台，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；QYC-200 恒温震荡培养箱，广州市泉宏科技仪器有限公司；Sorrall Legend Micro 17 微量离心机，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；752N 紫外分光光度计，上海仪田精密仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抑菌活性检测

采用琼脂平板扩散法^[20]进行抑菌活性检测。取发酵液以 12 000 r/min 离心 8 min，然后使用 0.22 μm 滤器去除发酵上清液残留的菌体，用 10 mm 打孔器在指示菌抑菌平板上打孔，挑去孔内的培养基后加入 100 μL 的上清液于 4 °C 冰箱扩散，待完全吸收后放入 37 °C 培养箱培养 6~12 h，利用卡尺测量平板上抑菌直径。

1.2.2 发酵培养基单因素

1.2.2.1 碳源优化

以 LB 培养基为基础培养基，选择葡萄糖、麦芽糖、乳糖、甘油、淀粉、蔗糖、玉米淀粉、麦芽糊精、山梨醇为碳源，分别添加 20 g/L。按 2% 的接种量接入种子液后，在 28 °C 摇床 180 r/min 恒温培养 48 h，检验抑菌活性后确定最佳碳源，进一步进行添加量优化。

1.2.2.2 氮源优化

以 10 g/L NaCl、20 g/L 麦芽糖作为基础培养基，有机氮源选择蛋白胨、酵母提取粉、牛肉浸粉、豆粕提取物、棉籽饼粉，分别添加 20 g/L。无机氮源优化以 10 g/L NaCl、20 g/L 麦芽糖、15 g/L 棉籽饼粉作为基础培养基，选择硫酸铵、尿素、磷酸氢二铵，分别添加 20 g/L。氮源确定后进行添加量优化。

1.2.2.3 无机盐优化

在确定碳源、氮源的基础上，选择 MgSO₄、KCl、NaCl 初始添加量为 20 g/L，进行无机盐种类和添加浓度优化。

1.2.3 Plackett-Burman 试验

选用试验次数 N=12 的实验设计，对麦芽糖 (X₁)、蔗糖 (X₂)、棉籽饼粉 (X₃)、磷酸氢二

铵 (X₄)、硫酸铵 (X₅)、KCl (X₆)、NaCl (X₇)、MgSO₄ (X₈) 8 个因素进行考察，其编码及其所代表的质量浓度值见表 1。每个因素各取 -1 和 +1 两个编码的两个水平，低水平和高水平根据单因素实验探究结果进行取值，响应值为抑菌圈直径 (Y)。

表 1 Plackett-Burman 试验设计中各参数的编码值及其质量浓度

Table 1 Assigned concentration of each variable at different levels of Plackett-Burman design

独立变量	编码水平/(g/L)	
	-1	1
麦芽糖 (X ₁)	15	25
蔗糖 (X ₂)	1.5	15
棉籽饼粉 (X ₃)	10	20
磷酸氢二铵 (X ₄)	5	15
硫酸铵 (X ₅)	5	20
KCl (X ₆)	10	30
NaCl (X ₇)	1	20
MgSO ₄ (X ₈)	1	10

1.2.4 响应面法优化培养基

以 Plackett-Burman 设计确定的因素和最陡爬坡实验确定的逼近浓度作为 Box-Behnken 的中心组合实验中 (0,0,0) 代码，进一步进行三因素三水平的响应面实验。共进行 17 组实验，其中 12 个实验为析因点，自变量取值在拟合曲面的三维定点，其他 5 个是零点，即 (0,0,0) 中心点，重复 5 次以估计误差。使用 Design-Expert 13 对实验数据进行拟合，得到模型后预测得到三个因素最佳水平。

1.2.5 发酵条件优化

基于响应面法实验得到的发酵培养基优化结果，分别以体积比接种量 (1%、2%、4%、5%、6%、8%、10%)，pH 值 (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0、11.0)，发酵温度 (15、28、37、45 °C)，发酵时间 (12、24、36、48、60、72、84、96 h) 确定最佳接种量、pH 值、发酵温度和发酵时间。

1.2.6 响应面模型验证

用 LB 培养基作为原始发酵培养基，用响应面法实验所得的配方作为优化培养基，分别在原始发酵条件和优化发酵条件下进行发酵培养，取发酵液离心得上清液，通过抑菌活性检测，检验优化是否有效。

1.2.7 数据处理

用 GraphPad 软件进行单因素实验数据分析和制图, 利用 Minitab 17 软件设计 Plackett-Burman 实验和分析实验数据。利用 Design-Expert 13 软件设计中心组合 Box-Behnken 响应面实验和分析结果。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 碳源优化

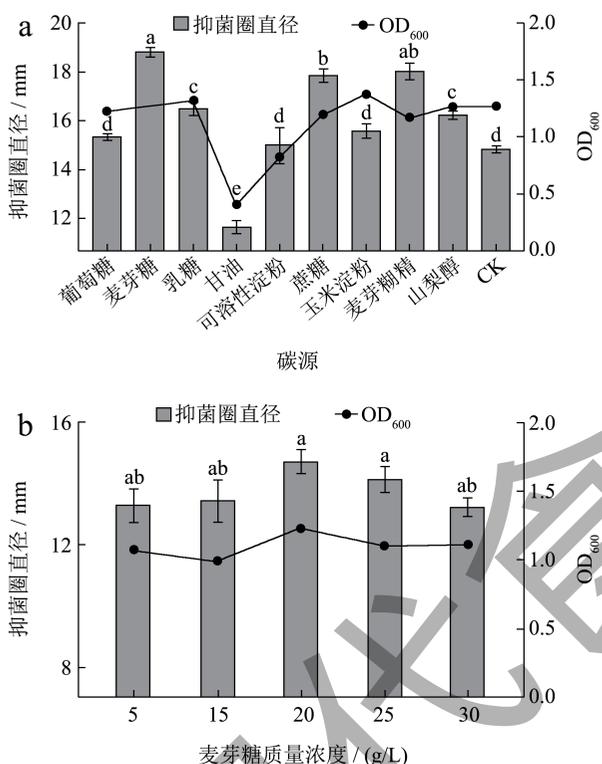


图1 碳源对 *P. thiamolyticus* SY20 产抑菌物质的影响

Fig.1 The effects of carbon sources on the antibacterial ability of *P. thiamolyticus* SY20 strain

注: (a) 不同碳源对产抑菌物质的影响; (b) 添加不同质量浓度麦芽糖对产抑菌物质的影响。不同字母表示同一指标不同组间差异显著 ($P < 0.05$)。

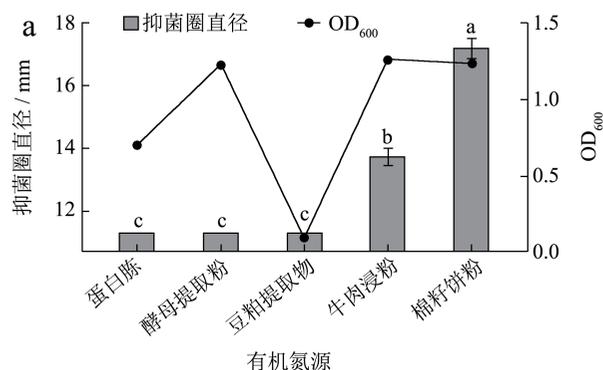
分别通过测定抑菌圈直径以及 OD₆₀₀ 值来监测抑菌活性变化与菌的生长状况, 选择 9 种不同的碳源培养基发酵 *P. thiamolyticus* SY20, 其促进作用排序为麦芽糖 > 麦芽糊精 > 蔗糖 > 乳糖 > 山梨醇 > 玉米淀粉 > 葡萄糖 > 可溶性淀粉 > 甘油, 因此促进产抑菌物质效果最优的为麦芽糖 (图 1a), 其中以麦芽糖作为碳源抑菌直径为 19.2 mm。此外, 从 OD₆₀₀

值可知, 相比于其它碳源, 可溶性淀粉和甘油不利于菌的生长也不利于抑菌物质的产生。以麦芽糖作为唯一碳源, 考察其添加量在 5~30 g/L 抑菌活性变化情况, 结果显示随着添加量的增加, 菌株产抑菌物质能力趋于升高, 但添加量超过 20 g/L 时, 发酵上清抑菌圈直径趋于降低, 这可能是由于因糖浓度过高, 渗透压增大, 不利于抑菌产物的产生与分泌^[21]。因此, 确定 20 g/L 的麦芽糖为最佳添加量水平 (图 1b)。

2.1.2 氮源优化

蛋白胨、酵母提取粉、牛肉浸粉、豆粕提取物、棉籽饼粉五种有机氮源作为唯一氮源添加, 对活性菌的繁殖和抑菌物质的产生影响巨大 (图 2a)。从菌发酵 OD₆₀₀ 值可知, 相比于酵母提取粉、牛肉浸粉及棉籽饼粉, 蛋白胨和豆粕提取物对活性菌的繁殖具有一定的抑制作用, 其中豆粕提取物作为唯一氮源会严重阻碍了 *P. thiamolyticus* SY20 的增殖。从抑菌活性上看, 仅牛肉浸粉和棉籽饼粉作为唯一氮源显示出抑菌活性, 其中棉籽饼粉作为氮源抑菌效果最佳, 其抑菌直径为 16.8 mm。值得注意的是, 以蛋白胨、酵母提取粉以及豆粕提取物作为唯一氮源基本没有抑菌活性, 说明抑菌活性物质的产生与有机氮源种类关系较大。这可能是由于菌株代谢产物的合成与有机氮源提供的游离氨基酸、蛋白质或肽类等小分子物质有关^[21,22]。确定棉籽饼粉为最佳有机氮源, 进一步探究发现棉籽饼粉添加量的最佳水平在 15 g/L (图 2b)。

无机氮源优化结果显示添加磷酸氢二铵和硫酸铵均有利于活性物质的产生, 而添加尿素抑菌活性减小 (图 2c)。进一步探究这两种无机氮源的最佳添加量, 在磷酸氢二铵添加量 5 g/L 时, 产抑菌物质的能力达到较高水平 (图 2d), 因此选择其作为发酵培养基的无机氮源, 添加量为 5 g/L。



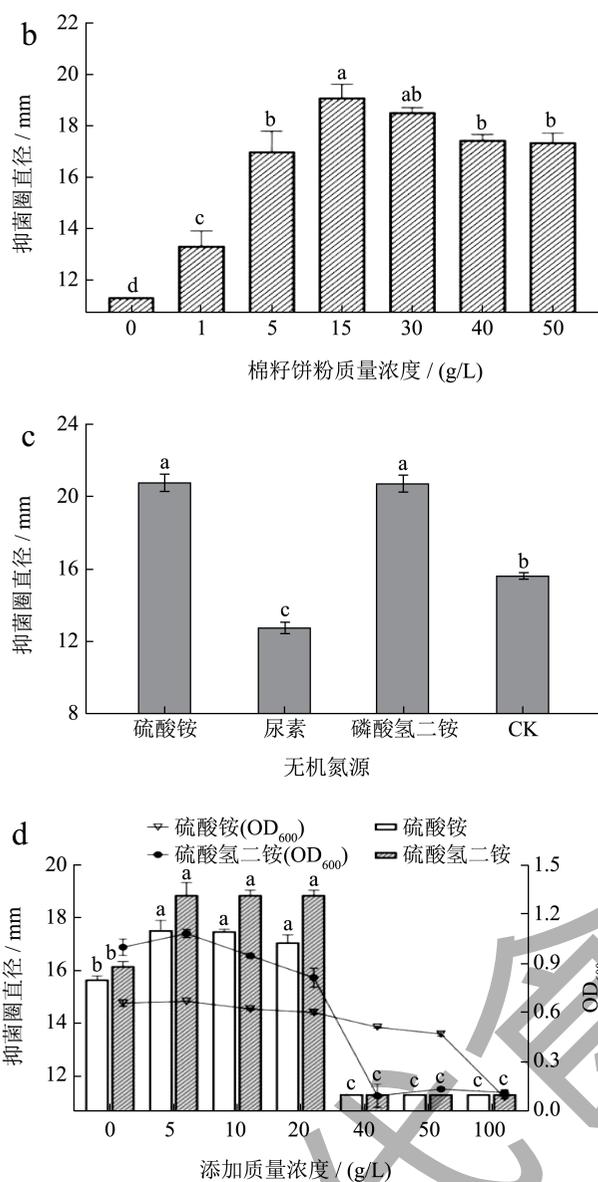


图2 有机氮源和无机氮源对 *P. thiamolyticus* SY20 产抑菌物质的影响

Fig.2 The effects of carbon sources on the antibacterial ability of *P. thiamolyticus* SY20 strain

注: (a) 不同有机氮源对产抑菌物质的影响; (b) 添加不同质量浓度棉籽饼粉对产抑菌物质的影响; (c) 不同无机氮源对产抑菌物质的影响; (d) 添加不同质量浓度硫酸铵和磷酸氢二铵对产抑菌物质的影响; 不同字母表示同一指标不同组间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.1.3 无机盐优化

无机盐是微生物生长代谢过程中不可缺少的营养物质^[23], 选择的 Mg^{2+} 、 Na^+ 和 K^+ 三种无机盐离子进行探究, 结果显示添加 K^+ 对抑菌物质的产生有

一定的促进作用, 其抑菌直径为 21.8 mm (图 3a)。对 K^+ 添加量进行优化, 添加量为 20 g/L 时抑菌活性最强 (图 3b), 因此最终选择 KCl 作为无机盐加入培养基, 最佳添加量为 20 g/L。

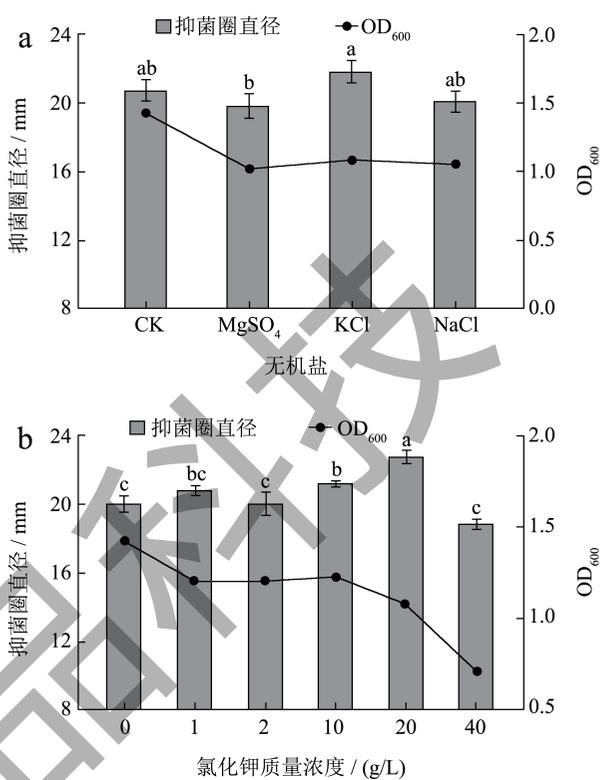


图3 无机盐对 *P. thiamolyticus* SY20 产抑菌物质的影响
Fig.3 The effects of mineral salt on the antibacterial ability of *P. thiamolyticus* SY20 strain

注: (a) 不同无机盐对产抑菌物质的影响; (b) 添加不同质量浓度氯化钾对产抑菌物质的影响。不同字母表示同一指标不同组间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 Plackett-Burman法筛选重要因素

在单因素的基础上, 根据 Plackett-Burman 实验设计在发酵 48 h 时取样测定发酵液的抑菌直径作为响应值数据, 结果见表 2。

用 Design-Expert 13 软件分析结果见表 3, X_3 和 X_8 对提高 SY20 发酵产抑菌物质能力有显著正效应, X_1 、 X_2 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 对提高 SY20 发酵产抑菌物质能力有显著负效应。这 8 个因素对 SY20 产抑菌物质能力提升的影响排序为: $KCl (X_6) > NaCl (X_7) > 磷酸氢二铵 (X_4) > MgSO_4 (X_8) > 蔗糖 (X_2) > 硫酸铵 (X_5) > 棉籽饼粉 (X_3) > 麦芽糖 (X_1)$, 其中 X_4 、 X_6 、 X_7 对抑菌圈直径影响较大。

表 2 Plackett-Burman实验响应值

Table 2 The response values of Plackett-Burman experiments

(n=12)									
编号	变量水平								响应值
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	抑菌圈直径/mm
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	18.5
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	10.0
3	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	23.5
4	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	21.2
5	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	10.0
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	22.4
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	22.4
8	1	-1	1	1	-1	1	1	1	10.0
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	10.0
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	23.3
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	22.6
12	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	15.2

表 3 Plackett-Burman实验各因素的影响效果

Table 3 The effect of each factor in Plackett-Burman experiments

因素	效应	均方和	影响/%
麦芽糖 (X ₁)	-0.022 2	0.001 5	0.000 4
蔗糖 (X ₂)	-1.722 2	8.898 2	2.335 4
棉籽饼粉 (X ₃)	0.644 4	1.245 9	0.327 0
磷酸氢二铵 (X ₄)	-4.955 5	73.672 6	19.335 6
硫酸铵 (X ₅)	-0.744 4	1.662 6	0.436 4
KCl (X ₆)	-6.220 0	116.148 0	30.483 5
NaCl (X ₇)	-6.130 0	112.853 0	29.618 7
MgSO ₄ (X ₈)	4.088 8	50.167 0	13.163 9

使用 Design-Expert 13 软件对各因素方差分析, 分析结果见表 4。模型 F 值为 16.32 表示该模型显著。如此大的 F 值由噪声产生的可能性只有 0.19%, 即仅有 0.19% 的情况不能用该模型来解释。 P 值 < 0.050 0 表示模型项显著, P 值 > 0.100 0 表示模型项不显著, 结果 X_4 、 X_6 、 X_7 的值均小于 0.05, 是重要的模型项。预测 R^2 为 0.726 0, 调整 R^2 为 0.874 4, 其差值小于 0.2。综上, 该模型显著且能很好地表明各因素的变化情况。

表 4 Plackett-Burman试验显著性分析表

Table 4 Significance analysis of Plackett-Burman design

来源	均方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	361.73	5	72.4	16.3	0.001 9	显著
蔗糖 (X ₂)	8.90	1	8.9	2.0	0.206 4	—
磷酸氢二铵 (X ₄)	73.67	1	73.7	16.6	0.006 5	*
KCl(X ₆)	116.15	1	116.2	26.2	0.002 2	**
NaCl(X ₇)	112.85	1	112.9	25.5	0.002 3	**
MgSO ₄ (X ₈)	50.16	1	50.2	11.3	0.015 2	—
残差	26.60	6	4.4	—	—	—
校正总和	388.33	11	—	—	—	—
R^2	0.93	—	—	—	—	—
校正 R^2	0.87	—	—	—	—	—
预测 R^2	0.72	—	—	—	—	—
Adeq 精度	11.63	—	—	—	—	—

注:***差异极显著, $P < 0.001$; **差异高度显著, $P < 0.01$; *差异显著, $P < 0.05$ 。

2.3 响应面法设计与结果分析

2.3.1 Box-Behnken试验设计结果与回归模型的方差分析

表 5 Box-Behnken试验设计方案及结果

Table 5 Results of Box-Behnken central composite design

试验号	X ₄	X ₆	X ₇	抑菌圈直径/mm
1	-1	-1	0	16.9
2	1	-1	0	16.7
3	-1	1	0	17.7
4	1	1	0	11.3
5	-1	0	-1	15.7
6	1	0	-1	16.8
7	-1	0	1	16.8
8	1	0	1	10.0
9	0	-1	-1	17.9
10	0	1	-1	16.1
11	0	-1	1	18.0
12	0	1	1	10.0
13	0	0	0	16.8
14	0	0	0	16.4
15	0	0	0	16.4
16	0	0	0	16.3
17	0	0	0	17.6

根据最陡爬坡法确定磷酸氢二铵添加量 8 g/L、KCl 添加量 15 g/L 和 NaCl 添加量 10 g/L 为中心点，以磷酸氢二铵 (X_4)、KCl (X_6)、NaCl (X_7) 为考察因素，以抑菌直径 (Y) 为响应值，进行响应面试验设计，试验结果见表 5。利用 Design Expert 软件进行多元回归拟合，得到模型的二次回归方程 $Y=16.71-1.52X_4-1.8X_6-1.47X_7-1.55X_4X_6-1.99X_4X_7-1.53X_6X_7-0.88X_4^2-0.21X_6^2-1.00X_7^2$

对实验结果进行多元回归分析，结果见表 6。该模型 F 值为 17.84，故模型显著，不能用此模型解释的可能性只有 0.05%。 $P<0.0500$ ，模型项显著， X_4 、 X_6 、 X_7 、 X_4X_6 、 X_4X_7 、 X_6X_7 、 X_7^2 是重要的模型项，其余项 $P>0.1000$ 表示不显著。回归方程决定系数 R^2 为 0.9582，说明此模型对各因素与响应值间的关系可以解释 95.82%，模拟失拟项 $F=4.3$ ， $P=0.0973>0.05$ ，失拟项不显著，说明拟合情况可靠。 $R^2=0.96$ ，校正确定系数 $R^2_{Adj}=0.90$ ，证明拟合程度较高，可运用该回归方程对试验结果进行分析和预测。

表 6 Box-Benhnken Design 回归分析

系数来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	104.61	9	11.6	17.8	0.0005	**
X_4	18.50	1	18.5	28.4	0.0011	**
X_6	25.80	1	25.8	39.6	0.0004	**
X_7	17.21	1	17.2	26.4	0.0013	**
X_4X_6	9.61	1	9.6	14.7	0.0064	**
X_4X_7	15.87	1	15.9	24.3	0.0017	**
X_6X_7	9.30	1	9.3	14.3	0.0069	**
X_4^2	3.25	1	3.2	5.0	0.0607	—
X_6^2	0.19	1	0.2	0.3	0.6072	—
X_7^2	4.24	1	4.2	6.5	0.0381	*
残差	4.56	7	0.7	—	—	—
失拟项	3.48	3	1.2	4.3	0.0973	不显著
净误差	1.09	4	0.27	A	A	—
总离差	109.18	16	—	—	—	—

$R^2=0.96$; $R^2_{Adj}=0.90$

注：*** 差异极显著， $P<0.001$ ；** 差异高度显著， $P<0.01$ ；* 差异显著， $P<0.05$ 。

2.3.2 Box-Behnken 试验设计结果与回归模型的分差分析

用 Design-Expert 13 软件绘制拟合磷酸氢二铵、

KCl 和 NaCl 三因素之间两两所得的三维曲面图并分别绘制其等高线图，见图 4~6。由相应面曲线可知，磷酸二铵和 KCl 曲面平缓，说明这两个因素交互作用较弱，响应值影响不显著；而 KCl 和 NaCl、磷酸氢二铵、NaCl 拟合结果较好，均有明显的坡度和高点。通过软件分析进行最优值预测：磷酸氢二铵添加量 0.815%、KCl 1.072%、NaCl 0.952% 时，*P. thiamolyticus* SY20 发酵液的产抑菌物质能力最强。

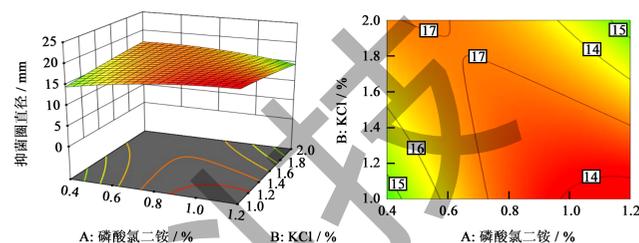


图 4 磷酸氢二铵和 KCl 对菌株 SY20 抑菌能力影响的响应面图和等高线图

Fig.4 Response surface plot and contour plot of the effects of $(NH_4)_2HPO_4$ and KCl on the antibacterial ability by strain SY20

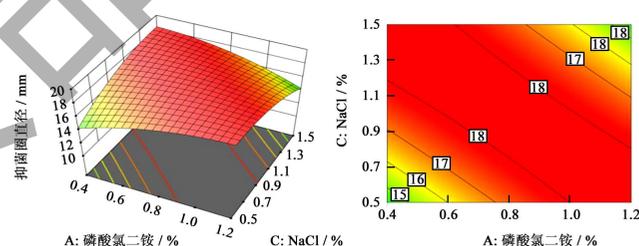


图 5 磷酸氢二铵和 NaCl 对菌株 SY20 抑菌能力影响的响应面图和等高线图

Fig.5 Response surface plot and contour plot of the effects of $(NH_4)_2HPO_4$ and NaCl on the antibacterial ability by strain SY20

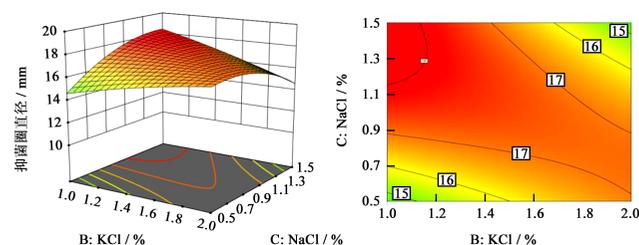


图 6 KCl 和 NaCl 对菌株 SY20 抑菌能力影响的响应面图和等高线图

Fig.6 Response surface plot and contour plot of the effects of X_6 and X_7 on the antibacterial ability by strain SY20

2.4 发酵条件优化

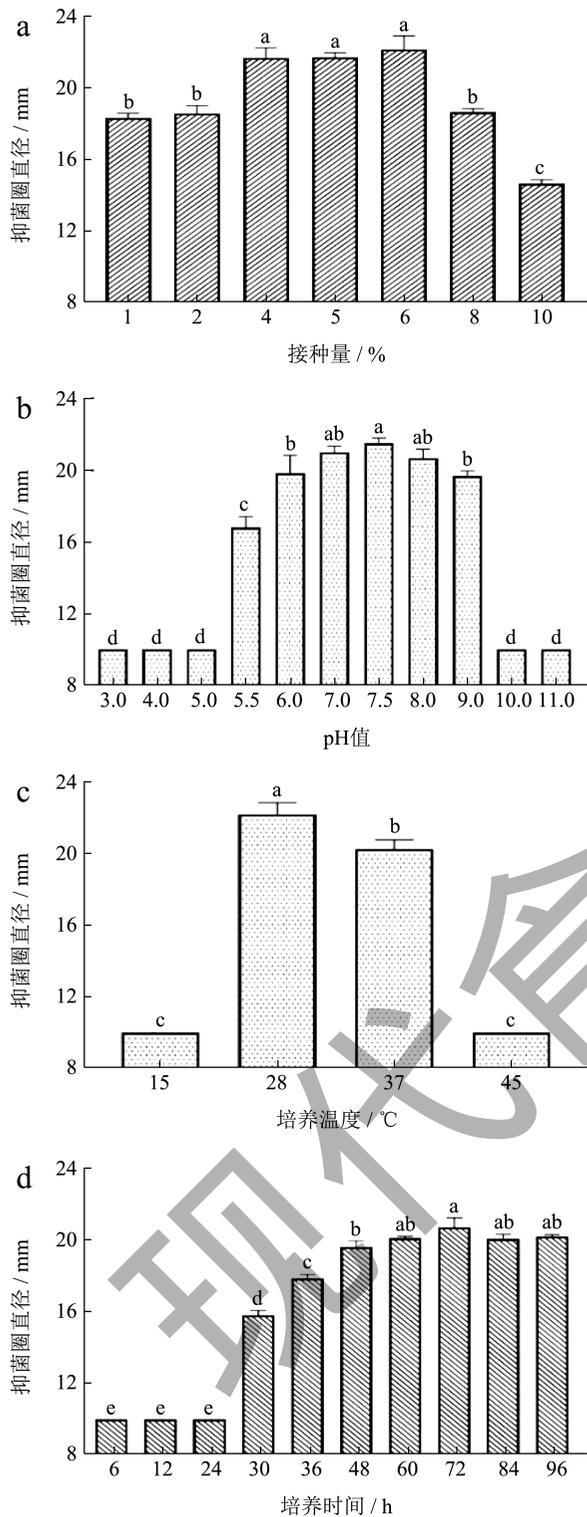


图7 *P. thiamolyticus* SY20 产抑菌物质发酵条件优化

Fig.7 The optimization fermentation conditions of the antibacterial substances produced by *P. thiamolyticus* SY20

注: 不同字母表示同一指标不同组间差异显著 ($P < 0.05$)。

在优化的培养基条件下, 对 *P. thiamolyticus* SY20 产抑菌物质发酵条件进行优化, 结果如图 7

所示。当接种量为 4%~6% 时菌株产抑菌物质能力最强, 抑菌圈直径达到 21.7 mm (图 7a), 接种量过高和过低抑菌活性均有所降低。培养基 pH 条件对菌种发酵产抑菌物质的产生影响较大, pH 值偏中性时抑菌直径为 21.3 mm, 为弱酸性和弱碱性时抑菌物质的产量均有所减少, pH 值低于 5.5 和高于 9 下菌株基本无抑菌活性 (图 7b)。温度对菌株产抑菌物质的影响也较大, 当培养温度为 28 °C 时菌株产抑菌物质能力最强, 抑菌圈直径达到 22.2 mm, 当温度高于 45 °C 和低至 15 °C 时, 菌株基本无抑菌活性 (图 7c)。此外, 发酵时间少于 24 h 发酵上清未能检测到抑菌活性, 之后随着发酵时间的增加, 抑菌活性逐渐增强并在 48~72 h 达到最高水平后略有下降 (图 7d)。因此, 选择 5% 接种量, 初始培养基 pH 值为 7.5, 培养温度为 28 °C, 发酵时间 60 h 进行产抑菌物质培养。

2.5 验证实验

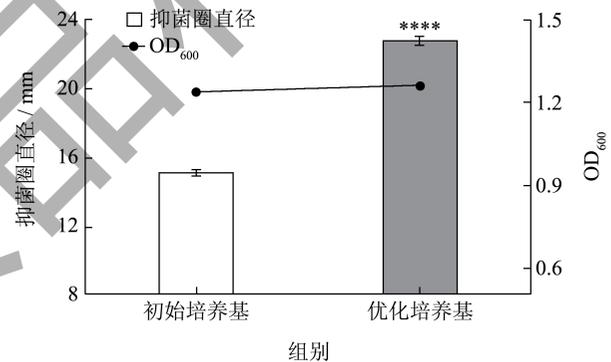


图 8 优化培养前后菌浓度及抑菌活性变化

Fig.8 Changes in bacterial concentration and antibacterial activity before and after optimization of culture

注: **** 表示差异差异极显著, $P < 0.001$ 。

在优化的培养基和培养条件基础上, 用 LB 培养基进行对照, 优化前发酵 $OD_{600}=1.24$, 优化培养基后 $OD_{600}=1.29$, 表明两种培养基对菌的增殖效果相当, 但发酵上清的抑菌活性却相差较大。优化前抑菌圈直径为 15.2 mm, 优化后为 22.8 mm, 抑菌直径为原来的 1.5 倍, 说明优化后的培养基和发酵条件更有利于菌株抑菌物质的产生 (图 8)。徐顾榕等^[24]利用响应面法对蜡样芽孢杆菌产类细菌素培养基进行优化, 使得优化后抑菌圈直径为 12.9 mm 较优化前提高了 21.66%; 陈亮等^[13]对枯草芽孢杆菌产抗菌脂肽的发酵条件进行响应面优化, 使抗菌脂肽粗提物产量为原来的 1.6 倍; 杜焜^[16]利用响应面法使得乳酸乳球菌 Z103 菌株发酵上清的最大抑菌直

径达到 13.5 mm, 产抑菌物质的效价较优化前提高了 41.17%。这些结果表明, 利用响应面进行发酵条件优化可以明显提高活性菌株产抗菌物质的能力。

3 结论

本研究首先在单因素条件下探究了 *P. thiamolyticus* SY20 在添加不同的碳源、氮源、无机盐中产抑菌物质的能力以及最佳添加浓度; 随后, 采用响应面分析, 得到最优发酵培养基组合; 再进行接种量、pH 值、发酵时间和发酵温度优化获得最优发酵条件。最后, 对优化方案进行与验证。优化后 *P. thiamolyticus* SY20 发酵产抑菌物质的最佳培养基配方为麦芽糖 20 g/L, 棉籽饼粉 15 g/L, 磷酸氢二铵 8 g/L, KCl 10 g/L, NaCl 10 g/L, 最佳培养条件为接种量 5%, pH 值为 7.5, 培养温度 28 °C, 发酵时间 60 h。在此条件下, *P. thiamolyticus* SY20 抑菌圈直径 22.8 mm 为优化前的 1.5 倍, 说明优化后的培养条件能有效提高菌体产抑菌物质的能力, 为后续进一步分离纯化抑菌物质提供条件。

参考文献

- [1] NGASHANGVA N, MUKHERJEE P, SHARMA K C, et al. Analysis of antimicrobial peptide metabolome of bacterial endophyte isolated from traditionally used medicinal plant *Millettia pachycarpa* Benth [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 656896.
- [2] NICHOLAS E G, JACQUELINE M, LINDA L, et al. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 203-220.
- [3] LEBEDEVA J, JUKNEVICIUTE G, ČEPAITĖ R, et al. Genome mining and characterization of biosynthetic gene clusters in two cave strains of *Paenibacillus* sp [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 612483.
- [4] FAN Z, MIAO Z, R D B, et al. A marine microbiome antifungal targets urgent-threat drug-resistant fungi [J]. *Science*, 2020, 370: 974-978.
- [5] PRANAV S P, MAHALAKSHMI B, SIVAKUMAR R, et al. Whole-genome sequence analysis of *Paenibacillus alvei* JR949 revealed biosynthetic gene clusters coding for novel antimicrobials [J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(4): 1168-1176.
- [6] SEOKH Y, SUNGM H, SOONJAE K, et al. Introducing EzBio Cloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [7] ZENGGUO H, DUYGU K, LIWEN Z, et al. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1): 168-178.
- [8] GUO Y Q, HUANG E N, YUAN C H, et al. Isolation of a *Paenibacillus* sp. strain and structural elucidation of its broad-spectrum lipopeptide antibiotic [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3156-3165.
- [9] WU Y P, LIU D M, LIANG M H, et al. Genome-guided purification and characterization of polymyxin A1 from *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20: A rarely explored member of polymyxins [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 962507.
- [10] LANGENDRIES S, GOORMACHTIG S. *Paenibacillus polymyxa*, a Jack of all trades [J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(10): 5659-5669.
- [11] 张智, 王露, 尹文哲, 等. 响应面法优化 PLD-01 生产抑菌素发酵条件的研究 [J]. *东北农业大学学报*, 2017, 48(6): 33-42.
- [12] 田东, 袁其朋, 孙新晓, 等. 响应面法优化多粘菌素 B 的发酵条件 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(15): 53-57.
- [13] 陈亮, 毛晶晶, 宇光海, 等. 响应面法优化 *Bacillus subtilis* 抗菌脂肽发酵工艺条件 [J]. *食品科技*, 2015, 40(4): 17-21.
- [14] 陈成, 宁喜斌. 响应面法优化产 β -内酰胺酶菌 *Bacillus cereus* B03 的发酵条件 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(10): 138-145.
- [15] ELIBOL M. Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(9): 1057-1062.
- [16] 杜琨. 响应面法优化乳酸乳球菌 Z103 菌株产抑菌物质的发酵条件 [J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(10): 155-161.
- [17] UGWUOJI, EMMANUEL T, NWAGU, et al. Detergent-stable amylase production by *Paenibacillus lactis* strain OPSA3 isolated from soil optimization by response surface methodology [J]. *Biotechnology Reports*, 2023, 39: 00808.
- [18] 邓志平, 陈浩, 陈三凤. 利用响应面法优化固氮类芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp. 1-49 的发酵培养基 [J]. *微生物学报*, 2016, 56(9): 1415-1425.
- [19] SANNINO D, ANGERT ER. Genomic insights into the thiamin metabolism of *Paenibacillus thiaminolyticus* NRRL B-4156 and *P. apiarius* NRRL B-23460 [J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2017, 12: 59.
- [20] WU Y P, GUO W B, ZHAO J B, et al. Isolation and identification of a novel LCI like antibacterial protein from *Bacillus* sp. MD-5 reveals its potential application in controlling *Staphylococcus aureus* in food industry [J]. *Food Control*, 2018, 89: 142-149.
- [21] 上官玲玲, 卢慧芳, 张辉燕, 等. 基于响应面法优化谷氨酸棒杆菌发酵条件 [J]. *中国酿造*, 2023, 42(3): 202-208.
- [22] 薛锐, 付玉飞, 邓细周, 等. 基于响应面法优化莱氏绿僵菌 SZCY200812 的液相发酵条件 [J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(6): 1484-1494.
- [23] 鲁雷震, 宏丹, 封成玲, 等. 产抗真菌肽的爱媛类芽孢杆菌 HD 的筛选、鉴定及发酵条件优化 [J]. *中国食品学报*, 2022, 22(3): 212-224.
- [24] 徐顾榕, 陈志伟, 钟小廷, 等. 响应面法优化蜡样芽孢杆菌产类细菌素培养基 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(19): 212-217.