

扩展青霉拮抗放线菌 CCTCC M207210 液体培养条件的优化

朱从会, 师俊玲, 孙 卉

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**优化扩展青霉拮抗放线菌 CCTCC M207210 的液体发酵条件, 为其大量生产提供技术支撑。**【方法】**采用单因素试验和 Box-Benhnken 试验设计, 研究培养温度、初始 pH、装液量、接种量对放线菌 CCTCC M207210 菌体干质量的影响, 通过响应面分析优化了各因素综合影响下的培养条件。**【结果】**放线菌 CCTCC M207210 的最优培养条件为: 接种量 135 mL/L, 初始 pH 7.4, 摇床转速 180 r/min, 培养温度 27.6 °C, 250 mL 摇瓶装液量 125 mL。在此条件下培养 72 h, 菌体干质量的预测值为 6.27 g/L, 验证值为 6.33 g/L。**【结论】**在最佳液体培养条件下, CCTCC M207210 最大菌体干质量为 6.27 g/L, 是优化前的 2 倍。

[关键词] 扩展青霉; 拮抗放线菌; 液体培养; 培养条件优化; 响应面分析

[中图分类号] S182; S482.2⁺8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)07-0165-06

Optimization of conditions for liquid cultivation of the antagonistic actinomycete CCTCC M207210 to *Penicillium expansum*

ZHU Cong-hui, SHI Jun-ling, SUN Hui

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The paper aimed at optimizing the conditions for liquid cultivation of the antagonistic actinomycete CCTCC M207210 to *Penicillium expansum* thus providing information for scaling up the cultivation. **【Method】** Single-factor design and Box-Benhnken design were used to select the important factors and their level region. Response Surface Analysis was used to optimize the conditions with complex effect among various factors. **【Result】** The optimal conditions were obtained at inoculums' amount of 135 mL/L, initial pH 7.4, rotation speed 180 r/min, 27.6 °C, and medium volume of 125 mL in 250 mL flask. **【Conclusion】** Under the optimal conditions, the dried cell weight of strain CCTCC M207210 reached 6.27 g/L, 2 times to the original one.

Key words: *Penicillium expansum*; antagonistic actinomycete; liquid cultivation; optimization of the cultivation condition; response surface analysis

展青霉素(Patulin, PAT), 又称为棒曲霉素, 是一种具有致癌、致畸、致突变作用的神经性真菌毒素^[1-2], 也是一种免疫抑制剂^[3-4], 广泛存在于国产苹果浓缩汁中。毒素产生菌在苹果贮藏期或果汁加工

环节中的生长与产毒, 是苹果浓缩汁中展青霉素的根本来源。苹果原料中的主要展青霉素产生菌是扩展青霉^[5]。扩展青霉的侵染主要发生在苹果贮藏期^[6-7], 以及加工过程中的二次生长和交叉污染^[7-8]。

* [收稿日期] 2008-11-03

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAK02A24); 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目

[作者简介] 朱从会(1981—), 男, 山东莱芜人, 在读硕士, 主要从事发酵工程与食品生物技术研究。

[通信作者] 师俊玲(1972—), 女, 陕西渭南人, 教授, 博士, 主要从事食品发酵工程与生物技术研究。

E-mail: sjlshi2004@yahoo.com.cn

抑制毒素产生菌的生长,是从根本上解除苹果汁中展青霉素污染的主要途径。利用微生物间的拮抗作用抑制扩展青霉的生长与产毒,具有环境友好、无农药残留等优点。

前期研究发现,放线菌 CCTCC M207210 的发酵液能有效抑制扩展青霉的生长^[9]。为了实现放线菌 CCTCC M207210 的最优培养,本试验研究了培养温度、初始 pH、装液量、接种量等培养条件,对放线菌 CCTCC M207210 菌体干质量的影响,并通过 Box-Behnken 试验设计方法^[10-11],对培养温度、接种量、装液量 3 个主要影响因子与菌体干质量的关系进行了探讨,以期确定获得最大菌体生长量的最优培养条件。

1 材料与方法

1.1 菌 种

放线菌 CCTCC M207210,为西北农林科技大学食品生物工程研究室从菜地土壤中分离所得,现保藏于中国典型微生物保藏中心。

1.2 培养基

(1)放线菌固体培养用培养基:高氏一号。(2)液体发酵培养基:麦芽糖 25 g,酵母膏 3 g,MgSO₄ 1.5 g,K₂HPO₄ 1 g,NaCl 0.1 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.4。

1.3 测量指标及方法

以菌体生物量,即菌体干质量为指标。菌体干质量参考文献[12]用恒重法测定。

1.4 试验设计与数据分析

1.4.1 单因素试验 以菌体干质量为测定指标进行单因素试验,以确定培养基初始 pH、培养温度、装液量和接种量。每个试验设 3 次重复,用 DPS 分析各水平间差异在 $\alpha=0.05$ 上的显著性。取平均值作图,用不同字母表示各点间的显著差异。

(1)培养基初始 pH。在 250 mL 摇瓶装液 100 mL,接种量 30 mL/L,培养温度 28 ℃,摇床转速 180 r/min,培养基初始 pH 分别为 5.5,6.5,7,7.5 和 8 的条件下培养 72 h。

(2)培养温度。在培养基初始 pH 为 7.4,250 mL 摇瓶装液 100 mL,接种量 30 mL/L,摇床转速 180 r/min,培养温度分别为 15,20,25,30 和 37 ℃的条件下培养 72 h。

(3)装液量。在培养基初始 pH 为 7.4,接种量 30 mL/L,培养温度 28 ℃,摇床转速 180 r/min,装液量分别为 250 mL 摇瓶装液 50,100 和 150 mL 的

条件下培养 72 h。

(4)接种量。在培养基初始 pH 为 7.4,250 mL 摇瓶装液 100 mL,培养温度 28 ℃,摇床转速 180 r/min,接种量分别为 25,50,100,150 和 200 mL/L 的条件下培养 72 h。

1.4.2 Box-Behnken 试验设计 在单因素试验的基础上,选择培养温度、接种量、装液量 3 个因素为主因子,按照 Box-Behnken 试验设计安排试验,以菌体干质量为评定指标,因子水平及编码见表 1。用 SAS 数据处理软件对试验所得数据进行分析处理。

表 1 Box-Behnken 试验设计的因素及其编码
Table 1 Level and code of variables chosen for Box-Behnken design

编码水平 Code level	接种量 X ₁ / (mL · L ⁻¹) Inoculums amount	培养温度 X ₂ /℃ Temperature	装液量 X ₃ /mL Medium volume
-1	50	20	80
0	100	27.5	115
1	150	35	150

2 结果与分析

2.1 各培养条件对菌体生长的影响

2.1.1 培养基初始 pH 每个菌种都有适宜的 pH 范围,超过这一范围,菌种的生长就会受到抑制。图 1 显示,培养基初始 pH 为 7.5 时,菌体生长量(菌体干质量)最大;pH 为 5.5 时,菌体生长量在 $\alpha=0.05$ 水平上显著低于 pH 7.5;pH 为 6.5~8.0 时,培养基初始 pH 的变化对菌体生长无显著影响($\alpha=0.05$)。培养基的自然 pH 是 7.4,接近于 pH 的最适值。因此,无需对培养基的 pH 进行调整,即可达到较高的菌体生长水平。

2.1.2 接种量 接种量大,菌种生长过程中的延滞期短、单位时间内的菌体总量大;但是,受培养基中营养物质及反应器体积的限制,分批培养能达到的菌体总量有限,接种量增大至一定程度时,不但对菌体生长无益,反而容易造成菌体老化和自溶。图 2 显示,接种量小于 100 mL/L 时,随着接种量增加,菌体生长量增大;接种量大于 100 mL/L 时,接种量对菌体生长无显著影响($\alpha=0.05$)。因此,选用接种量为 100 mL/L 比较适宜。

2.1.3 培养温度 适宜的培养温度对菌种的生长十分重要,温度过高或过低都会抑制菌种的生长。图 3 显示,培养温度为 25~30 ℃时,菌体均能良好

生长,且温度变化对菌体生长无显著影响($\alpha = 0.05$);但当培养温度低于或高于这一范围时,菌体生长量则显著降低($\alpha = 0.05$)。因此,25~30℃较适宜菌种生长。

2.1.4 装液量 反应器的体积和摇床转速一定时,装液量越大,营养物质总量越大,所能供养的菌种总量也越大;但装液量越大,单位发酵液中的溶氧量越小,从而不利于好氧微生物的生长。图 4 显示,装液量在 250 mL 摇瓶中装液 100 mL 时,菌体生长量最大;装液量增至 150 mL 时,菌体生长稍有下降;装

液量低于 100 mL 时,菌体生长显著降低($\alpha = 0.05$)。因此,装液量以 250 mL 摇瓶中装液 100 mL 较适宜菌种的生长。

综合对比各单因素试验结果可以发现,固定接种量为 30 mL/L,改变其他因素的水平时,菌体干质量的最大值均在 3.5 g/L 以下;固定其他因素,只改变接种量水平时,菌体干质量最高可达 6 g/L。由此说明,接种量对菌体生长量有很大影响,其他单因素试验中的菌体生长量少主要是因为接种量不足所致。

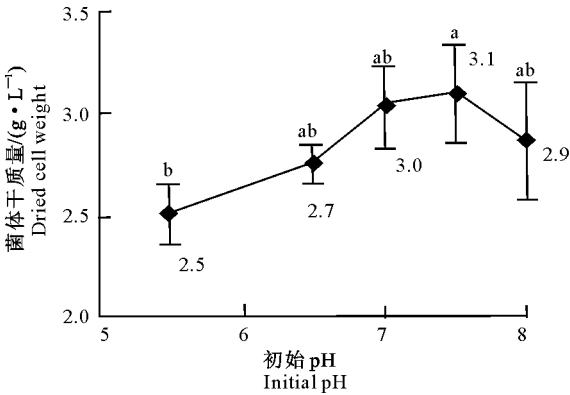


图 1 初始 pH 对菌体生长的影响
Fig. 1 Effect of pH on the cell growth

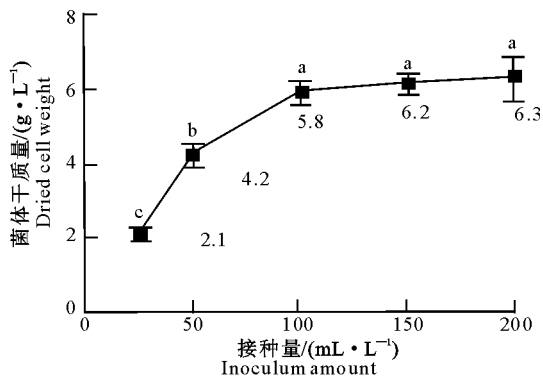


图 2 接种量对菌体生长的影响
Fig. 2 Effect of inoculum amount on the cell growth

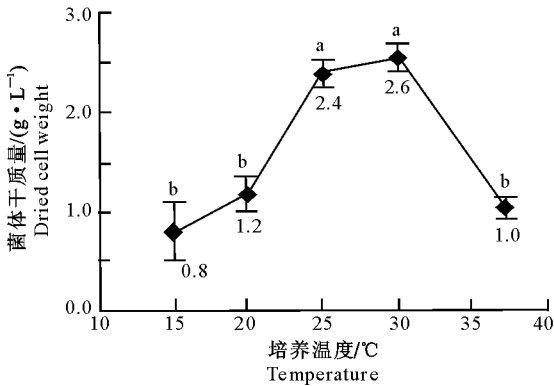


图 3 培养温度对菌体生长的影响
Fig. 3 Effect of temperature on the cell growth

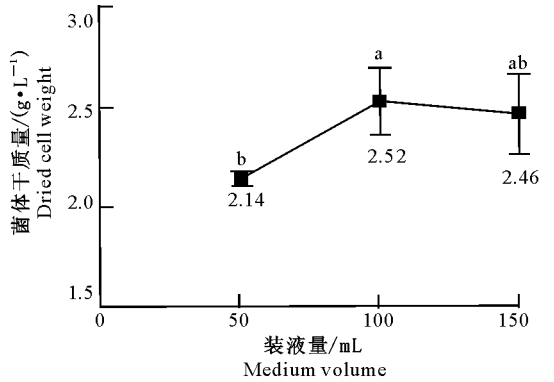


图 4 装液量对菌体生长的影响
Fig. 4 Effect of medium volume on the cell growth

2.2 菌体生长条件的优化

为了在各因素综合影响的条件下,对各因素的水平进行进一步优化,本试验在培养基维持自然 pH 的条件下,对培养温度、接种量和装液量 3 个因素进行了综合优化。

2.2.1 多元二次方程的建立 按照 Box-Behnken 试验设计对主要影响因子的水平组合进行了优化,结果见表 2。利用 Design-Expert 软件,采用逐步回

归对表 2 的结果进行二次多项式拟合,可得菌体干质量对接种量、培养温度及装液量的多元回归方程为:

$$Y = 5.96 + 0.78X_1 - 0.35X_2 + 0.28X_3 - 0.65X_1^2 - 2.02X_2^2 - 0.57X_3^2 - 0.20X_1X_2 + 0.26X_1X_3$$
 (1)
式中:Y 为菌体干质量的预测值, X_1 、 X_2 、 X_3 分别为接种量、培养温度、装液量的编码值。对方程(1)的方差分析结果(表 3)表明,该模型极显著($P <$

0.000 1),预测值与实测值之间具有高度的相关性($R_{Adj}^2=0.986\ 2$)。方程中各因素的回归系数显著性检验结果(表 4)表明,接种量、培养温度及装液量与响应值间的线性关系显著;接种量与培养温度、接

种量与装液量的交互作用影响显著。从各因子的回归系数可以看出,在试验设定的水平范围内,培养温度的二次项影响最大,其次为接种量,装液量的影响相对较小。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 2 Design and result of Box-Behnken

试验号 No	各因素的编码值 Coded levels			菌体干质量/(g·L ⁻¹) Dry cell weight	
	接种量/(mL·L ⁻¹) Inoculum amount	培养温度/℃ Temperature	装液量/mL Medium volume	实测值 Experimental values	预测值 Predicted values
1	-1	-1	0	2.55	2.43
2	1	-1	0	4.26	4.40
3	-1	1	0	2.28	2.14
4	1	1	0	3.19	3.31
5	-1	0	-1	3.72	3.93
6	1	0	-1	5.02	4.97
7	-1	0	1	3.92	3.96
8	1	0	1	6.26	6.05
9	0	-1	-1	3.30	3.21
10	0	1	-1	2.65	2.58
11	0	-1	1	3.75	3.83
12	0	1	1	2.97	3.07
13	0	0	0	5.97	5.97
14	0	0	0	6.05	5.97
15	0	0	0	5.96	5.97
16	0	0	0	5.94	5.97
17	0	0	0	5.92	5.97

表 3 多元二次回归方程的方差分析
Table 3 ANOVA for the regression equation of cultivation conditions

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方差 Mean square	F 值 F value	$P > F$	R^2	R_{Adj}^2
模型 Model	32.65	9	3.63	128.897	<0.000 1		
失拟项 Lack of fit	0.19	3	0.06	26.044	0.004 4		
纯误差 Pure error	0.01	4	0.01				
总变异 Cor total	32.85	16					
决定系数 R-square						0.993 0	0.986 2

表 4 回归方程系数的显著性检验
Table 4 Regression coefficients and their significance of the quadratic model

因素 Factor	参数估计 Parameter estimate	标准误差 Standard error	t 值 t value	$P > t $
常数项 Intercept	5.96	0.075	—	—
X_1	0.78	0.059 3	13.202 5	< 0.000 1
X_2	-0.35	0.059 3	-5.838 7	0.000 6
X_3	0.28	0.059 3	4.641 0	0.002 4
X_1^2	-0.65	0.081 7	-8.204 8	< 0.000 1
X_2^2	-2.02	0.081 7	-7.222 3	< 0.000 1
X_2^3	-0.57	0.081 7	-6.975 6	0.000 2
X_1X_2	-0.20	0.083 8	-2.389 2	0.048 2
X_1X_3	0.26	0.083 9	3.099 3	0.017 3

2.2.2 响应面分析与优化结果 图 5 为装液量位于中心水平(115 mL)时,接种量与培养温度间交互作用对菌体干质量影响的响应面及等高线。从图 5 的等高线图可以直观地看出,接种量与培养温度间

交互作用显著。由图 5 的响应面图可以看出,培养温度一定时,菌体干质量随着接种量的增加呈抛物线型增加;接种量一定时,菌体干质量随着培养温度的升高呈二次曲线增加。接种量对菌体干质量的影

响大于培养温度。综合分析响应面图和等高线图可知,接种量为 80~150 mL/L,培养温度为 22~30 ℃ 时,菌体干质量可达较高水平(≥ 5.54 g/L)。

图 6 为培养温度处于中心水平(27.5 ℃)时,接种量与装液量间交互作用对菌体干质量影响的响应面及等高线图。由图 6 的等高线图可以看出,接种量与装液量交互作用对菌体干质量有显著影响。由图 6 的响应面图可以看出,装液量为低水平范围内

的某一定值时,菌体干质量随接种量的增大呈二次曲线变化;装液量为高水平范围内的某一定值时,菌体干质量随接种量的增大呈抛物线型增加。接种量一定时,菌体干质量随装液量的增加呈二次曲线增大。接种量的影响稍大于装液量。综合等高线图和响应面图可以看出,接种量为 80~150 mL/L,装液量为 250 mL 摇瓶中装液 90~150 mL 时,菌体干质量可达到 5.54 g/L 以上。

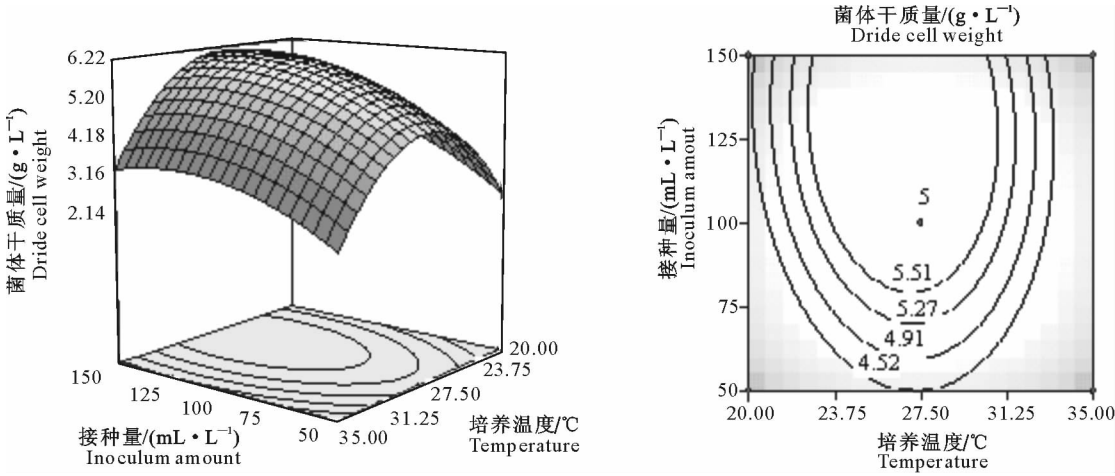


图 5 接种量与培养温度交互作用对菌体干质量影响的响应曲面及等高线图

Fig. 5 Response surface and contour plots for the effect of innoculum amount and temperatureon the cell growth

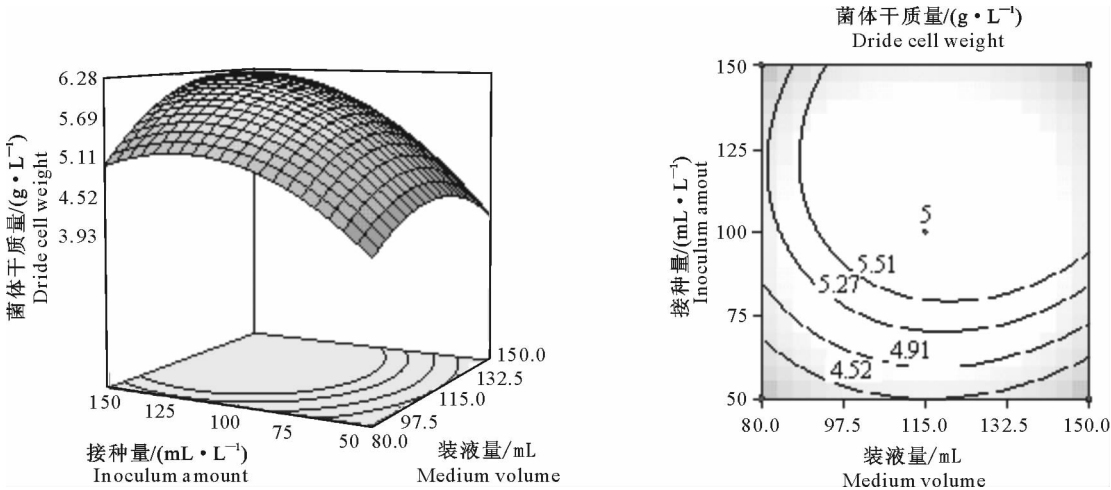


图 6 接种量与装液量交互作用对菌体干质量影响的响应曲面及等高线图

Fig. 6 Response surface plot and contour plot of inoculum amount and medium volume on the cell growth

2.2.3 最佳条件 使菌体干质量取最大值,对回归方程(1)求解,可得最佳条件组合为:接种量 135 mL/L,培养温度 27.6 ℃,250 mL 摇瓶装液量 125 mL,自然 pH(7.4),摇床转速 180 r/min。在此条件下培养 72 h 时,菌体干质量预测值为 6.27 g/L,验证值为 6.33 g/L,是优化前培养条件(250 mL 摇瓶装液 100 mL,接种量 30 mL/L,培养温度 28 ℃,摇

床转速 180 r/min,培养基自然 pH7.4)下菌体干质量(约 3 g/L)的 2 倍。

3 结论与讨论

(1)本研究结果有效地提高了扩展青霉拮抗放线菌 CCTCC M207210 的菌体生长量。本研究在单因素试验的基础上,用响应面分析对扩展青霉拮抗

放线菌 CCTCC M207210 的液体培养条件进行了优化,得出了最佳培养条件,使菌体生长量提高了 1 倍。

(2)研究结果可以为从根本上解决展青霉素污染问题提供安全的新途径。随着人们对食品安全问题重视程度和检测水平的不断提高^[13],食品中展青霉素的限量不断降低,我国苹果汁出口也将面临越来越强的技术壁垒^[14]。完全去除展青霉素是解决这一问题的根本途径。目前,生产上所用技术只能降低果汁中展青霉素的残留量,而不能将其完全去除。另外,残留在果渣和废水中的毒素会影响动物健康,而且会对环境造成二次污染。利用拮抗放线菌抑制展青霉素产生菌的生长,是一种无农药残留危害、安全有效的展青霉素控制途径。前期研究中发现,放线菌 CCTCC M207210 能够有效抑制扩展青霉的生长和产毒^[9]。本研究进一步优化了该菌的生长条件,从而为该菌的扩大化培养,及将其用于扩展青霉的生物防治提供了基础和依据。

(3)扩展青霉拮抗放线菌的研究也为其他毒素的生物防治提供了参考。研究发现,扩展青霉除能够产生展青霉素外,还能同时产生橘霉素(citrinin)、毛壳球素 chaetoglobosins)、roquefortine C 和 expansolides A 等多种毒素^[15]。从根本上抑制扩展青霉的生长在食品安全上具有广泛和重要意义。本研究所用拮抗放线菌能够有效抑制展青霉素的生长,从而为其他相关毒素的生物防治也提供了依据。

(4)对扩展青霉拮抗放线菌所产有效成分,还有待进一步研究。大多数放线菌所产有效抑菌成分是抗生素,但是笔者的前期研究结果发现,链霉素、青霉素、卡拉霉素等抗生素对扩展青霉均无显著抑制作用。由此说明,放线菌 CCTCC M207210 发酵液中抑制扩展青霉的有效成分可能不是抗生素,但具体是什么,还有待进一步研究。

(5)拮抗放线菌 CCTCC M207210 产生有效物质的条件还有待进一步优化。本试验所得条件仅为该菌种生长的最佳条件,但并不一定是其产生有效物质的最佳条件。有关内容尚待进一步研究。

(6)拮抗放线菌 CCTCC M207210 的生长量有望进一步提高。菌种生长除受培养环境的影响外,培养基中的营养成分对其也有重要影响。本研究仅对菌种培养的环境条件进行了优化,在此基础上配以最佳营养条件,菌种生长量还有望得到进一步提高。

[参考文献]

- [1] Mahfoud R, Maresca M. The mycotoxin patulin alter the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism action of the toxin and protective effects of glutathione [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2002, 181(3): 209-218.
- [2] 贺玉梅, 贾珍珍, 齐祖桐. 展青霉素产生菌产毒性能研究 [J]. 中国卫生检疫杂志, 2001, 11(3): 302-303.
He Y M, Jia Z Z, Qi Z T. Study on the capability of patulin producing of *Penicillium* [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2001, 11(3): 302-303. (in Chinese)
- [3] Sharma R P. Immunotoxicity of mycotoxins [J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76: 892-897.
- [4] Liu B H, Yu F Y, Wu T S, et al. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2003, 191(3): 255-263.
- [5] Dombink-Kurtzman M A, Blackburn J A. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 98(3): 241-248.
- [6] 张小平, 李元瑞, 师俊玲, 等. 苹果汁中棒曲霉素控制技术进展 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1672-1676.
Zhang X P, Li Y R, Shi J L, et al. A review on the control of patulin in apple juice [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(11): 1672-1676. (in Chinese)
- [7] Gokmen V, Artik N, Acar J, et al. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid composition of apple juice [J]. European Food Research and Technology, 2001, 213: 194-199.
- [8] 王 强, 林定根, 张宇昊, 等. 农产品加工中的立体交叉污染及其防治对策 [J]. 中国农业科技导报, 2005, 7(4): 41-45.
Wang Q, Lin D G, Zhang Y H, et al. Tri-dimension pollution cure measures in agricultural products [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2005, 7(4): 41-45. (in Chinese)
- [9] 朱从会, 师俊玲, 杨保伟, 等. 展青霉素产生菌拮抗放线菌的分离、筛选与初步鉴定 [J]. 农业机械学报, 2008, 39(3): 86-89.
Zhu C H, Shi J L, Yang B W, et al. Isolation screening and identification of antagonistic actinomycetes having ability in inhibiting patulin-producing *Penicillium* [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(3): 86-89. (in Chinese)
- [10] 范文霞, 蔡友华, 刘学铭, 等. 响应面法优化毛云芝菌产漆酶的培养条件研究 [J]. 现代食品科技, 2008, 24(2): 153-156.
Fan W X, Cai Y H, Liu X M, et al. Optimization of culture conditions of a white-rot fungus for laccase production by response surface design [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(2): 153-156. (in Chinese)
- [11] 邵 伟, 乐超银. 响应面法在酵母细胞固定化条件优化中的应用 [J]. 酿酒科技, 2007(6): 61-64.
Shao W, Le C Y. Application of RSM in the optimization of the immobilization conditions of yeast cells [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2007(6): 61-64. (in Chinese)