

广西地不容内生真菌 DBR-9 产橘霉素的发酵条件优化

汤夏安,刘彩莲,邓业成,冯蓓蓓,骆海玉,邓志勇
(广西师范大学 生命科学学院/珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室,广西 桂林 541006)

摘要: 为了优化广西地不容内生真菌 DBR-9 产抗菌物质橘霉素的发酵条件,以发酵液中橘霉素质量浓度为指标,在单因素试验基础上运用 Plackett-Burman 试验筛选出影响 DBR-9 产橘霉素的关键因素,并进一步采用响应面中心组合试验设计分析确定各关键因素的最优取值。结果表明,影响 DBR-9 产橘霉素的关键因素为葡萄糖、酵母粉和氯化钠,经对响应面试验所拟合出的模型进行解析,得到各关键因素的最优质量浓度为酵母粉 1.474 g/L、葡萄糖 38.628 g/L、氯化钠 0.379 g/L。在最佳培养基成分组合及初始接种量 20.8×10^6 个孢子、发酵时间 35 d 条件下发酵,橘霉素质量浓度可达到 692.421 mg/L,与原始发酵液中的橘霉素质量浓度相比提高了 19.01%。
关键词: 广西地不容;内生真菌;橘霉素;发酵条件;优化;响应面法
中图分类号: S482.2⁺92;TQ920.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2019)07-0081-07

Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Citrinin from Endophytic Fungus DBR-9 of *Stephania kwangsiensis*

TANG Xiaan, LIU Cailian, DENG Yecheng, FENG Beibei, LUO Haiyu, DENG Zhiyong
(College of Life Science, Guangxi Normal University/Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, Ministry of Education of China, Guilin 541006, China)

Abstract: In order to optimize the fermentation conditions for the production of antimicrobial citrinin from endophytic fungus DBR-9 of *Stephania kwangsiensis*, the concentration of citrinin in the fermentation broth was used as the index, the Plackett-Burman test was conducted to screen the key factors influencing the production of citrinin based on the single factor tests, and the response surface center combination test design was employed to determine the optimal value of each key factor. The results showed that three key factors influencing the production of citrinin were glucose, yeast powder and sodium chloride, and their optimal concentrations were yeast powder 1.474 g/L, glucose 38.628 g/L, and sodium chloride 0.379 g/L. Fermentation was conducted under the conditions of optimal medium composition, initial inoculum of 20.8×10^6 spores and fermentation time of 35 d, and the concentration of citrinin could reach 692.421 mg/L. Compared with the concentration of citrinin in the original fermentation broth, it was increased by 19.01% .
Key words: *Stephania kwangsiensis*; Endophytic fungus; Citrinin; Fermentation conditions; Optimization; Response surface methodology

收稿日期:2019-01-09
基金项目:广西自然科学基金项目(2016GXNSFAA380207,2016GXNSFBA380049);广西研究生教育创新计划项目(XYCSZ2019079);广西高校中青年教師基础能力提升项目(2017KY0080);广西珍稀濒危动物生态学重点实验室基金项目(GKN17-A-02-02);广西师范大学珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室生态学博士点建设基金项目(EDPC2018002)
作者简介:汤夏安(1995-),男,安徽蚌埠人,在读硕士研究生,研究方向:天然产物。E-mail:15078371592@163.com
通信作者:邓业成(1965-),男,广西全州人,教授,博士,主要从事天然产物及植物保护研究。E-mail:dycheng@163.com

橘霉素是由青霉属、曲霉属、红曲霉属等真菌产生的一种聚酮类次级代谢产物,常引起粮食和食品污染,但同时也具有广谱的生物活性,包括抗细菌和真菌活性,以及潜在的抗癌活性和神经保护作用^[1-2]。前期研究发现,广西地不容内生真菌 DBR-9 可产生橘霉素,并且显示出广谱的抗植物病原真菌活性,在农用杀菌剂领域具有潜在的开发利用价值。因为在通常条件下内生真菌 DBR-9 产生橘霉素的量较低,所以通过优化内生真菌 DBR-9 产橘霉素的发酵条件以提高橘霉素的产量,对橘霉素的开发利用具有重要意义。

响应面法是一种利用合理的试验设计方案,采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析优化工艺参数,预测响应值的统计方法^[3]。响应面法具有试验次数少、周期短、精度高等优点,已在食品、医药、生物工程、发酵工程等领域得到广泛应用^[4-13]。为此,利用响应面法探索内生真菌 DBR-9 产橘霉素的最佳发酵条件,以期提高橘霉素的产量,旨在为今后利用内生真菌 DBR-9 大规模发酵生产橘霉素奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 内生真菌 DBR-9 从采自广西植物研究所种质园的广西地不容块根中分离获得。

1.1.2 供试培养基 种子培养基:去皮马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL。发酵培养基:去皮马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL。上述培养基均为自然 pH 值,且在 121 ℃ 下高压灭菌 30 min。

1.1.3 试剂及仪器 磷酸、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、琼脂粉、硝酸钠、硫酸镁、磷酸氢二钾、氯化钾、酵母粉等均购自西陇科学股份有限公司;橘霉素纯品由本实验室分离制得;色谱纯甲醇购自美国天地有限公司;超纯水由美国 Milli-Q Reference 超纯水系统制得。安捷伦 1260 Infinity 液相色谱仪购自美国安捷伦公司;色谱柱 Sapphire-C18 (4.6 mm × 150 mm × 5 μm) 购自美国赛默飞科技公司;台式高速冷冻离心机 H2050R 购自湖南湘仪离心机仪器有限公司;LYZ-2102C 恒温摇床购自上海龙跃仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 橘霉素标准液配制 准确称取 10 mg 橘霉

素纯品,用适量色谱纯甲醇溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,用色谱纯甲醇定容至刻度,配制成 100 mg/L 的橘霉素标准液备用。

1.2.2 橘霉素含量分析 发酵液在 12 000 r/min、5 ℃ 条件下离心 10 min,取上清液经 0.22 μm 水系滤膜过滤,用色谱纯甲醇稀释发酵液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{发酵液}} = 9:1$),然后采用 HPLC 进行分析。参照陈蕴等^[14]的方法设定 HPLC 分析条件:采用 C18 柱 (Sapphire-C18, 4.6 mm × 150 mm × 5 μm),柱温 28 ℃;流动相为甲醇-水 (体积比 55:45),用磷酸调 pH 值为 4.0;流速为 1.0 mL/min;紫外检测器波长 254 nm;进样体积 20 μL。

1.2.3 发酵方法 在种子培养基上接种 0.1 mL 孢子液并涂布均匀,28 ℃ 恒温培养 10 d。用 20 mL 无菌水将培养基表面的孢子洗下,并用擦镜纸过滤,制成孢子悬浮液 (种子液),用血球计数板计数后备用。取 250 mL 三角瓶加入液体发酵培养基 100 mL,灭菌后接入孢子悬浮液,置于摇床中 26 ℃、160 r/min 培养。不同条件处理重复 3 次。

1.2.4 单因素试验设计 分别选择葡萄糖、可溶性淀粉和蔗糖作为碳源 (设置 10、20、30、40、50、60 g/L 的质量浓度梯度),选择硝酸钠、蛋白胨和酵母粉作为氮源 (设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g/L 的质量浓度梯度),选择硫酸亚铁、氯化钾、氯化钠和硫酸镁作为无机盐 (设置 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g/L 的质量浓度梯度),发酵时间分别设置为 5、10、15、20、25、30、35、40 d,初始接种量分别设置为 1、2、3、4、5、6 个单位 (每个单位为 5.2×10^6 个孢子)。

1.2.5 Plackett-Burman (PB) 试验设计 在单因素试验基础上,应用 PB 试验确定影响内生真菌 DBR-9 产橘霉素的主要因素。根据单因素试验的结果,确定 PB 试验设计中的因素高低水平,每个因素 2 个水平 (表 1)。其中,因素 C、F、J 为虚拟因素,用于平衡误差。

1.2.6 最陡爬坡试验设计 在响应面试验中,为了得到有效的响应面拟合方程,所选各个因素的水平必须逼近最优因素水平的区域,因此必须进行最陡爬坡试验。在 PB 试验中得到影响显著的关键因素基础上,根据 PB 试验结果所拟合的一阶拟合方程中的变量系数设定关键影响因素的爬坡方向和步长,若变量系数为正,则变量水平需在梯度递增的方向进行爬坡,反之亦然。这样可快速经济地逼近最大响应值区域。

表 1 Plackett – Burman 试验设计的因素水平

Tab.1 Factors and levels of Plackett-Burman test design

水平 Level	因素 Factor							
	初始接种量	发酵时间	葡萄糖(D)/	酵母粉(E)/	氯化钠(G)/	氯化钾(H)/	硫酸亚铁(K)/	硫酸镁(L)/
	(A)	(B)/d	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
	Initial inoculum	Fermentation time	Glucose	Yeast powder	Sodium chloride	Potassium chloride	Ferrous sulfate	Magnesium sulfate
-1	2	25	30	1	0.3	0.2	0.1	0.2
1	4	35	50	2	0.5	0.4	0.3	0.4

1.2.7 响应面中心组合试验设计 以 PB 试验所确定的影响显著因素作为试验因素,并以最陡爬坡试验中得到的橘霉素产量最大时的因素水平作为中心点,采用中心组合试验设计原理对产橘霉素的培养条件进行三因素五水平响应面试验,具体设计因素水平见表 2。

表 2 响应面中心组合试验设计因素水平

Tab.2 Factors and levels of response surface center combination test design

水平 Level	因素 Factor		
	葡萄糖(A)	酵母粉(B)	氯化钠(C)
	Glucose	Yeast powder	Sodium chloride
-1.682	25.591	0.830	0.266
-1	30	1	0.3
0	35	1.25	0.35
1	40	1.5	0.4
1.682	43.409	1.670	0.434

1.3 数据处理

试验数据采用 SPSS 19.0 处理,PB 试验和响应面试验的设计和数据统计分析采用 Design – Expert 10.0.4 软件。

2 结果与分析

2.1 橘霉素标准曲线

将橘霉素储备液用色谱纯甲醇稀释配成质量浓度分别为 2.5、5、12.5、25、50、100 mg/L 的样品溶液,在设定的色谱条件下进行 HPLC 分析。以峰面积(y)为纵坐标,橘霉素质量浓度(x)为横坐标,得到标准曲线回归方程: $y = 16.614x - 27.282$, $r^2 = 0.9994$ 。说明标准曲线的拟合度高,线性关系好。

2.2 发酵单因素试验结果

不同碳源种类及其含量对内生真菌 DBR - 9 产橘霉素的影响见图 1a。橘霉素质量浓度随着碳源质量浓度的增加呈现先升高后下降的趋势。与其他 2 种碳源相比,葡萄糖效果较好。当葡萄糖质量浓度为 40 g/L 时,DBR - 9 发酵产物中橘霉素质量浓度最大,达到 578.88 mg/L,故选取葡萄糖为条件优化的碳源。

不同氮源种类及其含量对内生真菌 DBR - 9 产橘霉素的影响见图 1b。与其他 2 种氮源相比,酵母粉效果较好。当酵母粉质量浓度为 1.5 g/L 时,DBR - 9 发酵产物中橘霉素质量浓度最大,达到 528.03 mg/L,故选取酵母粉为条件优化的氮源。

无机盐对内生真菌 DBR - 9 产橘霉素的影响见图 1c。随着无机盐质量浓度的增加,橘霉素质量浓度先增大后减小。氯化钾质量浓度为 0.3 g/L 时,橘霉素质量浓度达到最大值 449.67 mg/L。氯化钠质量浓度为 0.4 g/L 时,橘霉素质量浓度达到最大值 455.65 mg/L。硫酸亚铁质量浓度为 0.2 g/L 时,橘霉素质量浓度达到最大值 430.45 mg/L。硫酸镁质量浓度为 0.3 g/L 时,橘霉素质量浓度达到最大值 449.02 mg/L。

发酵时间对内生真菌 DBR - 9 产橘霉素的影响见图 1d。在 5 ~ 30 d 的发酵时间内,橘霉素质量浓度随发酵天数的增加而增加,之后随发酵天数的增加橘霉素质量浓度下降。在 30 d 时橘霉素质量浓度达到最大值 465.07 mg/L。

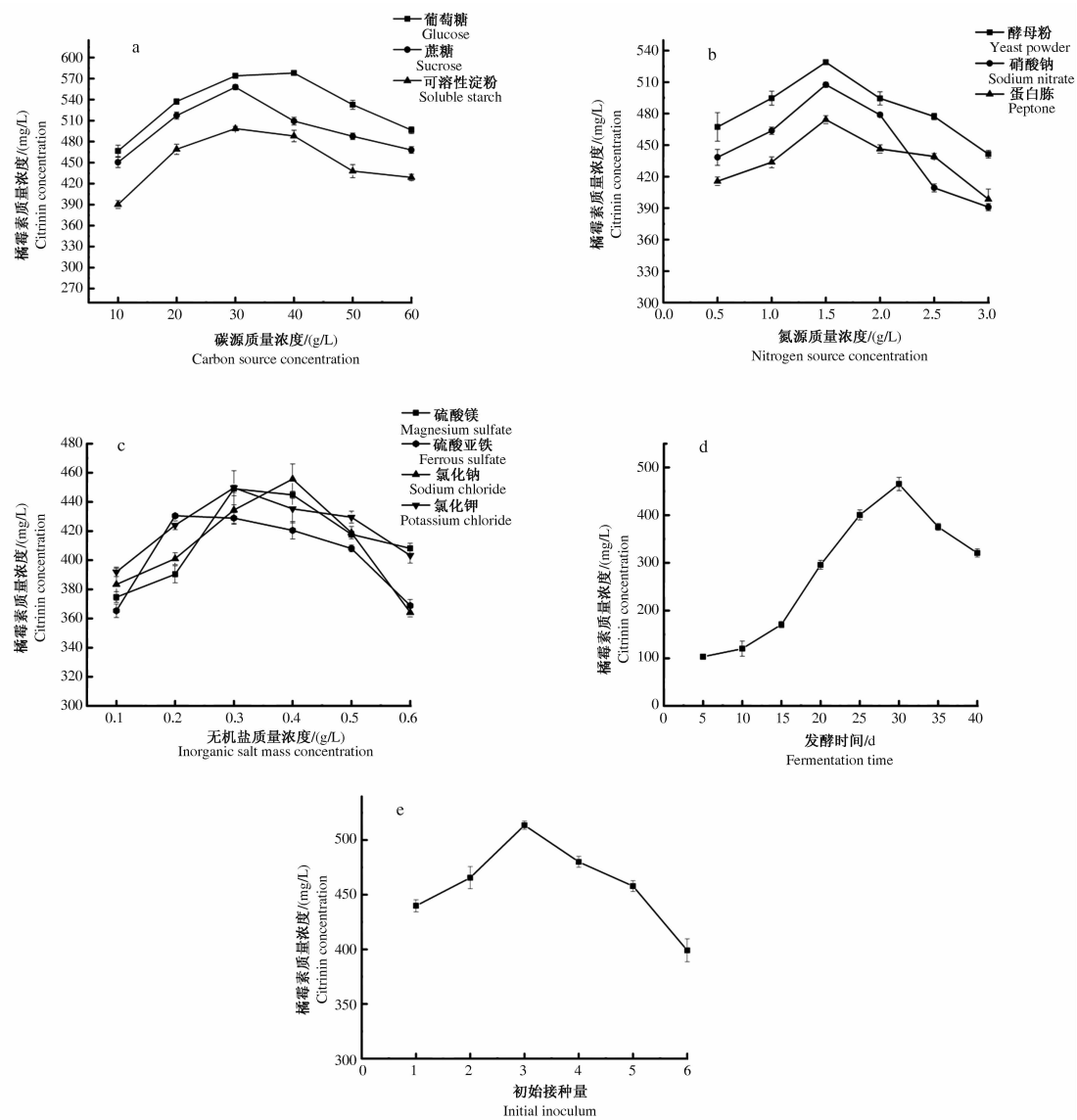
初始接种量对内生真菌 DBR - 9 产橘霉素的影响见图 1e。当孢子初始接种量为 3 个单位($5.2 \times 10^6 \times 3$ 个孢子)时,橘霉素质量浓度达到最大值 513.54 mg/L,之后随初始接种量增加橘霉素质量浓度下降。

2.3 发酵 PB 试验结果

PB 试验采用 $n = 12$ (至多可以分析 11 个因素)的设计方法,分析了葡萄糖质量浓度、酵母粉质量浓度、发酵时间、初始接种量、氯化钾质量浓度、氯化钠质量浓度、硫酸亚铁质量浓度、硫酸镁质量浓度等 8 个真实因素和 3 个虚拟因素共 11 个因素对内生真菌 DBR - 9 产橘霉素的影响,试验结果见表 3。利用 Design – Expert 软件进行数据处理和方差分析,结果见表 4。由表 4 可知,葡萄糖质量浓度、酵母粉质量浓度、氯化钠质量浓度对内生真菌 DBR - 9 产橘霉素的影响显著 ($P < 0.05$),因素效应大小依次为葡萄糖 > 酵母粉 > 氯化钠,所以选择这 3 个因素进入下一步优化试验。其他非显著因素的取值根据

各因素的效应正负以及大小而定,正效应取高水平,负效应取低水平,即初始接种量为 4 个单位($5.2 \times 10^6 \times 4$ 个孢子)、发酵时间为 35 d,此外,因为另外 3 种无机盐氯化钾、硫酸亚铁、硫酸镁对 DBR-9 产橘

霉素影响不显著且远低于上述 3 个主要因素,为了节省成本、减少操作步骤,在接下来的试验中对发酵培养基不再添加这 3 种无机盐。



a. 碳源的影响;b. 氮源的影响;c. 无机盐的影响;d. 发酵时间的影响;e. 初始接种量的影响

a. Effect of carbon source;b. Effect of nitrogen source;c. Effect of inorganic salts;d. Effect of fermentation time;e. Effect of initial inoculum

图 1 不同因素对橘霉素产量的影响

Fig.1 Effect of various factors on the production of citrinin

表 3 Plackett – Burman 试验设计及结果

Tab.3 Plackett-Burman test design and results

试验序号 No.	因素 Factor											橘霉素质量浓度/(mg/L)	
												Citrinin concentration	
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	实测值 Actual value	预测值 Predictive value
1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	376.45	374.63
2	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	498.55	503.89
3	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	289.19	283.85
4	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	645.78	667.20
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	298.36	326.94

续表 3 Plackett – Burman 试验设计及结果
Tab.3 (Continued) Plackett-Burman test design and results

试验序号 No.	因素 Factor											橘霉素质量浓度/(mg/L) Citrinin concentration	
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	实测值 Actual value	预测值 Predictive value
6	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	284.14	282.32
7	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	496.39	467.81
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	349.58	344.24
9	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	536.04	514.62
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	298.18	276.76
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	530.95	532.77
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	236.48	265.06

表 4 Plackett – Burman 试验结果的方差分析
Tab.4 Variance analysis of Plackett-Burman test results

因素 Factor	效应 Effect	F 值 F value	P 值 P value	重要性 Importance
初始接种量 Initial inoculum	14.06	1.81	0.270 8	8
发酵时间 Fermentation time	31.19	8.93	0.058 2	4
葡萄糖 Glucose	76.15	53.23	0.005 3 *	1
酵母粉 Yeast powder	61.94	35.21	0.009 6 *	2
氯化钠 Sodium chloride	-57.13	29.96	0.012 0 *	3
氯化钾 Potassium chloride	21.71	4.32	0.129 1	6
硫酸亚铁 Ferrous sulfate	17.73	2.89	0.187 9	7
硫酸镁 Magnesium sulfate	-27.36	6.87	0.078 9	5

注：* 表示影响达到显著水平 ($P < 0.05$)。
Note: * indicates that the effect reaches a significant level ($P < 0.05$).

2.4 发酵最陡爬坡试验结果

根据 PB 试验结果,葡萄糖、酵母粉为正效应进行正爬坡,氯化钠为负效应进行负爬坡。根据 3 个因素的效应大小比例设定它们的变化方向以及步长,具体试验方案以及结果见表 5。由表 5 可知,第

表 5 最陡爬坡试验设计及结果
Tab.5 The steepest climbing test design and results

试验序号 No.	葡萄糖/ (g/L) Glucose	酵母粉/ (g/L) Yeast powder	氯化钠/ (g/L) Sodium chloride	橘霉素质量浓度/ (mg/L) Citrinin concentration
1	25	0.75	0.45	611.24
2	30	1.00	0.40	634.97
3	35	1.25	0.35	650.78
4	40	1.50	0.30	643.14
5	45	1.75	0.25	628.59
6	50	2.00	0.20	583.48
7	55	2.25	0.15	570.64

3 组试验方案即葡萄糖 35 g/L、酵母粉 1.25 g/L、氯化钠 0.35 g/L 时,橘霉素质量浓度最大,此时以各因素质量浓度为坐标值所对应的点逼近最大响应值的响应区域。所以以第 3 组试验方案各因素的质量浓度值作为后续试验的中心点进行响应面中心组合设计分析。

2.5 发酵响应面中心组合试验结果

由表 6 响应面试验结果分析获得二次拟合回归方程:橘霉素质量浓度 $Y = 642.49 + 35.94A + 93.55B + 34.84C + 20.14AB + 9.38AC + 7.14BC - 48.70A^2 - 59.65B^2 - 61.49C^2$ 。对该回归方程进行方差分析,结果见表 7。由表 7 可知,模型 $P < 0.000 1$,表明该模型达到极显著水平。失拟项 $P = 0.145 2 > 0.05$,失拟项不显著,说明试验数据与模型高度符合,

表 6 响应面中心组合试验设计及结果
Tab.6 Response surface center combination test design and results

试验 序号 No.	因素 Factor			橘霉素质量浓度/(mg/L) Citrinin concentration	
	A	B	C	实测值 Actual value	预测值 Predictive value
1	-1	-1	1	359.13	381.60
2	1	1	1	650.89	673.64
3	1	-1	1	443.54	431.97
4	-1	-1	-1	359.04	344.97
5	0	1.682	0	646.42	631.11
6	-1	1	1	539.13	542.72
7	0	0	0	631.48	642.49
8	0	0	1.682	545.11	527.15
9	0	0	-1.682	404.27	409.96
10	0	0	0	665.36	642.49
11	1.682	0	0	562.47	565.19
12	1	1	-1	584.71	570.91
13	0	-1.682	0	313.38	316.43
14	0	0	0	635.19	642.49
15	1	-1	-1	352.74	357.82
16	-1.682	0	0	459.29	444.30
17	0	0	0	631.64	642.49
18	-1	1	-1	457.27	477.52
19	0	0	0	634.52	642.49
20	0	0	0	654.64	642.49

表 7 响应面模型方差分析

Tab.7 Variance analysis of response surface model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	2.753 × 10 ⁵	9	30 583.44	79.43	<0.000 1 **
A	17 641.06	1	17 641.06	45.81	<0.000 1 **
B	1.195 × 10 ⁵	1	1.195 × 10 ⁵	310.42	<0.000 1 **
C	16 576.27	1	16 576.27	43.05	<0.000 1 **
AB	3 243.75	1	3 243.75	8.42	0.015 8 *
AC	703.69	1	703.69	1.83	0.206 2
BC	408.27	1	408.27	1.06	0.327 4
A ²	34 178.09	1	34 178.09	88.76	<0.000 1 **
B ²	51 281.19	1	51 281.19	133.18	<0.000 1 **
C ²	54 497.12	1	54 497.12	141.53	<0.000 1 **
残差 Residual	3 850.58	10	385.06		
失拟项 Lack of fit	2 824.91	5	564.98	2.75	0.145 2
纯误差 Pure error	1 025.67	5	205.13		
总和 Total	2.791 × 10 ⁵	19			

注: $R^2=0.986\ 2$; $\text{Adj}\ R^2=0.973\ 8$; $\text{Adeq}\ \text{Precisor}=25.744$; * 表示差异达到显著水平 ($0.01\leq P<0.05$), ** 表示差异极显著 ($P<0.01$)。

Note: $R^2=0.986\ 2$; $\text{Adj}\ R^2=0.973\ 8$; $\text{Adeq}\ \text{Precisor}=25.744$; * indicates that the difference reaches a significant level ($0.01\leq P<0.05$), and ** indicates that the difference is extremely significant ($P<0.01$).

因此模型选择正确。该模型 R^2 为 0.986 2, $\text{Adj}\ R^2$ 为 0.973 8, 两者数值较接近, 说明该模型用于实际预测时误差小, 可用于实际预测。模型 Adeq Precisor 信噪比为 25.744, 可信度高。在回归模型中, A、B、C、A²、B²、C² 6 项的 $P<0.000\ 1$, 表现为极显著, AB 项中 $0.01\leq P<0.05$, 表现为显著, 说明上述各项对发酵液中橘霉素产量均有显著影响。

利用 Design - Expert 10.0.4 软件分别绘制出 AB、AC 和 BC 交互项的等高线图 and 响应曲面图(图 2、图 3 和图 4)。因素对响应值的影响程度由响应曲面的陡峭程度反映, 曲面越陡峭, 说明该因素对响应值的影响越大, 反之, 则对响应值的影响越小。从响应曲面图(图 2b、3b、4b)可以看出, 当其中 1 个因素的值固定在中心水平时, 橘霉素质量浓度随另外 2 个因素的变化先增加后逐步下降, 这说明 3 个因素之间存在明显的交互作用。

2.6 最佳发酵条件的确定与验证

利用 Design - Expert 10.0.4 软件对回归方程求一阶偏导数, 解得最佳发酵条件为葡萄糖 38.628 g/L、酵母粉 1.474 g/L、氯化钠 0.379 g/L, 此时橘霉素质量浓度达到最大值 699.327 mg/L。在最适因素水平条件下进行验证试验, 结果表明, 内生真菌 DBR - 9 产橘霉素质量浓度达到 692.421 mg/L, 与模型预测值无显著差异, 说明优化结果可靠。

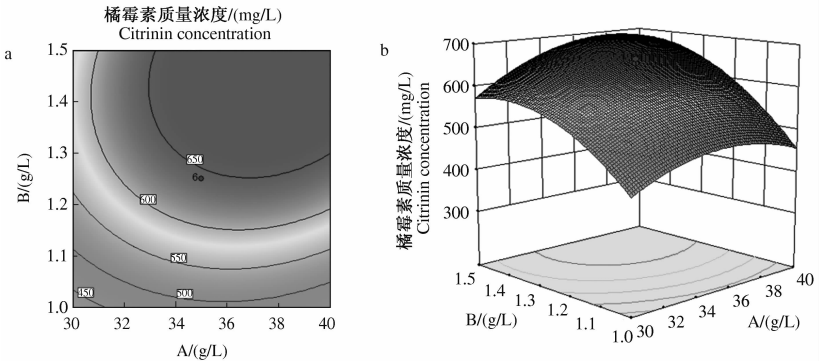


图 2 葡萄糖 (A) 与酵母粉 (B) 交互影响的等高线 (a) 与响应曲面 (b)

Fig.2 Contour line(a) and response surface(b) of interaction between glucose (A) and yeast powder (B)

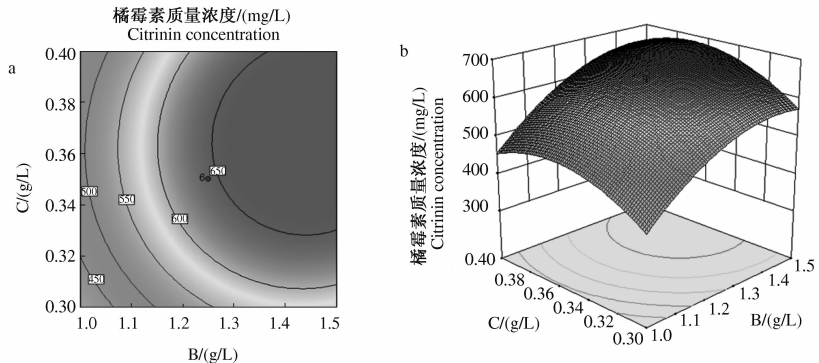


图 3 酵母粉 (B) 与氯化钠 (C) 交互影响的等高线 (a) 与响应曲面 (b)

Fig.3 Contour line(a) and response surface(b) of interaction between yeast powder (B) and sodium chloride (C)

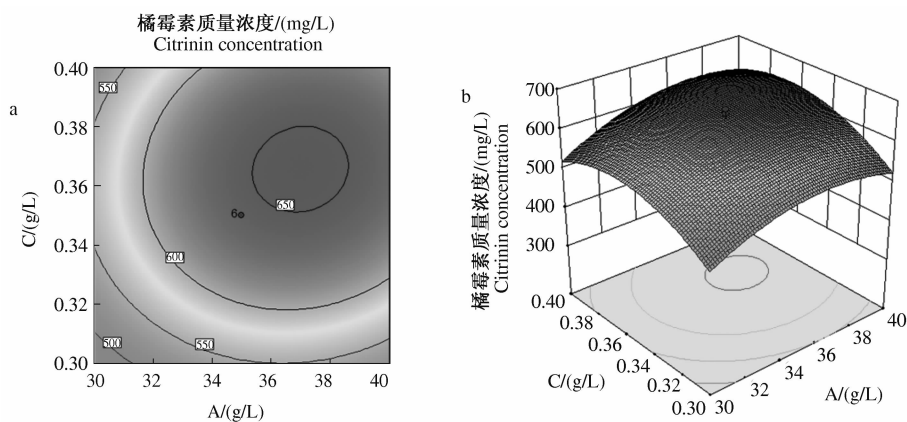


图 4 葡萄糖 (A) 与氯化钠 (C) 交互影响的等高线 (a) 与响应曲面 (b)

Fig. 4 Contour line (a) and response surface (b) of interaction between glucose (A) and sodium chloride (C)

3 结论与讨论

通过采用单因素试验、Plackett - Burman 试验、最陡爬坡试验、中心组合响应面试验,筛选出适合广西地不容内生真菌 DBR-9 发酵的最佳培养基成分组合,即酵母粉、葡萄糖、氯化钠质量浓度分别为 1.474、38.628、0.379 g/L。在最佳培养基成分组合及初始接种量 20.8×10^6 个孢子、发酵时间 35 d 条件下发酵,橘霉素质量浓度可达到 692.421 mg/L,和预测值 699.327 mg/L 十分接近,与原始发酵液(初始接种量为 10.4×10^6 个孢子,采用未额外添加任何物质的发酵培养基发酵 30 d)的橘霉素质量浓度 581.817 mg/L 相比提高了 19.01%。研究结果为进一步利用广西地不容内生真菌 DBR-9 大规模发酵生产抗菌物质橘霉素奠定了基础。

本研究仅在室内进行小瓶发酵试验,并未对广西地不容内生真菌 DBR-9 进行放大培养以及大型发酵罐培养,有关 DBR-9 发酵产橘霉素的工业化生产条件还需要进一步摸索。此外,没有对橘霉素大规模快速提取方法进行优化,这也是下一步需要研究的方向。

参考文献:

[1] DE OLIVERIO FILHO J W G, ISLAM M T, ALI E S, et al. A comprehensive review on biological properties of citrinin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 110: 130-141.

[2] 高彤, 蔡思源, 许兰兰, 等. 海洋来源真菌 *Penicillium griseofulvum* 中橘霉素类化合物的分离及抗菌活性 [J]. 高等学校化学学报, 2016, 37(7): 1282-1286.

[3] FRANCIS F, SABU A, NAMPOOTHIRI K M, et al. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus*

oryzae [J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 15(2): 107-115.

[4] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用 [J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.

[5] 余小翠, 刘高峰. 响应面分析法在中药提取和制备工艺中的应用 [J]. 中药材, 2010, 33(10): 1651-1655.

[6] 杨文雄, 高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用 [J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 68-71.

[7] 潘晴, 孙京海, 李卫国, 等. 响应面法优化女贞子三萜酸的提取工艺 [J]. 中国药理学杂志, 2015(13): 1093-1097.

[8] 龙明华. 响应面法优化芦荟活性成分提取工艺 [J]. 山西农业科学, 2018, 46(8): 1387-1391.

[9] 刘连成, 袁书林. 响应面法优化北冬虫夏草液态发酵条件 [J]. 河南农业科学, 2014, 43(2): 142-146.

[10] 卢忠英, 鲁道旺, 陈仕学, 等. 微波辅助提取竹荪中膳食纤维的工艺优化 [J]. 河南农业科学, 2017, 46(7): 137-141.

[11] HERNÁNDEZ-AGUIRRE M A, ISLAS-HERNÁNDEZ J J, SÁNCHEZ-PARDO M E, et al. Response surface methodology for optimization of gluten-free bread made with unripe banana flour [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 2: 1-9.

[12] 邹立飞, 余小兰, 邹雨坤, 等. 拮抗甜瓜枯萎病链霉菌 D2 菌株发酵条件的优化 [J]. 南方农业学报, 2018, 49(5): 905-911.

[13] LIU W, YU Y, YANG R, et al. Optimization of total flavonoid compound extraction from *Gynura medica* leaf using response surface methodology and chemical composition analysis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(11): 4750-4763.

[14] 陈蕴, 许赣荣, 顾玉梅, 等. TLC 及 HPLC 测定红曲产品中的橘霉素 [J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(2): 164-168.