

韩 兴,刘亚南,甄丹妹,等. 玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 产抗生素发酵培养基的优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):100 - 103.  
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2017.10.028

# 玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 产抗生素 发酵培养基的优化

韩 兴,刘亚南,甄丹妹,刘大群,赤国彤

(河北农业大学植物保护学院/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心/国家北方山区农业工程技术研究中心,河北保定 071001)

**摘要:**以玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 为发酵菌株,采用 Plackett - Burman 试验设计、最陡爬坡试验、中心复合试验设计和响应面分析法,以抗生素产量为响应值,对其发酵培养基进行优化。首先,采用 Plackett - Burman 设计筛选出具有正显著效应的花生饼粉和玉米浆。其次,通过最陡爬坡试验逼近最大响应区域。最后,采用中心复合试验对这 2 个因素进行优化。最终确定发酵的最适培养基含量配方为葡萄糖 2%,可溶性淀粉 1%,花生饼粉 4.96%,玉米浆 2.66%,氯化钠 0.4%,碳酸钙 0.3%,磷酸二氢钾 0.02%。优化后发酵培养基抗生素产量为 2 030.6 mg/L,比优化前的 771.9 mg/L 提高了 1.63 倍。

**关键词:**玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63; 发酵; 抗生素; 响应面分析

**中图分类号:** S476<sup>+</sup>.8      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002 - 1302(2017)10 - 0100 - 03

玫瑰黄链霉菌 (*Streptomyces roseoflavus*) Men - myco - 93 - 63 是从马铃薯疮痂病自然衰退土壤中分离到的 1 株对多种植物病原菌具有抑制作用的拮抗链霉菌<sup>[1]</sup>。通过研究发现,该菌及其次生代谢产物对不同致病力的棉花黄萎病菌都有很强的抑制作用,可以导致黄萎病菌菌丝变形,并伴随有溶菌作用<sup>[2-3]</sup>。温室及大田试验结果表明,其发酵液对棉花黄萎病有较好的田间防效<sup>[3]</sup>。赵志泉等从玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 发酵液中分离得到抑制棉花黄萎病菌的抗生素,并对其性质和结构进行了分析,但并未明确其具体结构<sup>[4]</sup>。张艳对玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 的发酵培养基和发酵条件进行了研究,筛选出了较适宜的发酵培养基<sup>[5]</sup>。

Plackett - Burman 法基于不完全平衡块原理,能从众多变量中快速筛选出最为重要的因素<sup>[6]</sup>。响应面方法(response surface methodology, RSM) 能将试验设计和数学建模联合起来,通过局部试验回归拟合因素与结果间的全局函数关系<sup>[7]</sup>,得到准确有效的试验结论。本试验在前期试验研究基础上,以抗生素产量为目标响应值,通过一系列统计学方法,改良发酵培养基的组分含量,以期提高发酵过程中抗生素的产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 菌株,由河北农业大学植物保护学院分子植物病理学和植物病

害生物防治实验室保存。

1.1.2 培养基 PDA 培养基;初始发酵培养基含量配方:葡萄糖 2.4%,可溶性淀粉 0.8%,花生饼粉 1.5%,玉米浆 0.8%,氯化钠 0.4%,碳酸钙 0.3%,磷酸二氢钾 0.02%。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 发酵培养

将玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 在 PDA 培养基上培养 14 d 至孢子发育成熟,将孢子刮下,制成孢子悬浮液,调整孢子浓度为  $5 \times 10^8$  CFU/mL,向装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中接入 200  $\mu$ L 孢子悬浮液,在 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 的摇床上振荡培养 5 d。

1.2.2 抗生素标准曲线绘制 准确称取 0.010 3 g 抗生素标准品,抗生素提取方法参照赵志泉等的方法<sup>[4]</sup>。加 80% 乙醇溶解,容量瓶中定容至 50 mL,得浓度为 0.206 mg/mL 的抗生素溶液,梯度稀释 8、10、12、14、16、32、64 倍至浓度分别为 0.025 8、0.020 6、0.017 2、0.014 7、0.012 9、0.006 4、0.003 2 mg/mL,测定不同浓度溶液在 363 nm 处的吸光度,绘制标准曲线。

1.2.3 抗生素含量测定方法 玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 所产生的抗生素不溶于水,即存在于发酵液的沉淀中。将发酵液摇匀,取 5 mL 发酵液,加入 20 mL 乙醇,振荡混匀,此时抗生素即溶于液相(含有 80% 乙醇)中,12 000 r/min 离心 3 min,将上清液稀释 40 倍,紫外分光光度计测其在 363 nm 处的吸光度,即为响应值。代入标准曲线中计算浓度。

1.2.4 Plackett - Burman (PB) 试验 利用 Design Expert 8.0.6.1 软件,选取  $n = 12$  的 Plackett - Burman 试验设计,对初始发酵培养基中 7 个组分进行考察,试验因素和水平见表 1,试验设计见表 2。每个试验点重复 3 次,取平均值。

1.2.5 最陡爬坡试验 对 PB 试验筛选出的关键因素进行最陡爬坡试验,根据因素的系数正负及大小确定爬坡方向和步长,正因素增加用量,负因素减少用量<sup>[8]</sup>。使关键因素浓

收稿日期:2016 - 02 - 26

基金项目:国家自然科学基金(编号:31572050);河北省中药材产业技术体系(编号:1004029)。

作者简介:韩 兴(1990—),男,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事天然产物农药研究。E - mail:15100201526@163.com。

通信作者:赤国彤,硕士,教授,硕士生导师,主要从事农药剂型加工研究,E - mail:chiguotong@126.com;刘大群,博士,教授,博士生导师,主要从事植物病理学研究,E - mail:ldq@hebau.edu.cn。

表 1 Plackett – Burman 试验因素与水平

因素	水平	
	– 1	+ 1
A:葡萄糖含量(%)	2	6
B:可溶性淀粉含量(%)	1	3
C:花生饼粉含量(%)	2	6
D:玉米浆含量(%)	1	3
E:NaCl 含量(%)	0.4	1.2
F:CaCO <sub>3</sub> 含量(%)	0.3	0.9
G:KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 含量(%)	0.02	0.06

表 2 Plackett – Burman 试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	E	F	G	<i>D</i> <sub>363 nm</sub>
1	– 1	1	1	1	– 1	– 1	– 1	0.550 3
2	– 1	1	1	– 1	1	1	1	0.421 0
3	– 1	– 1	– 1	– 1	– 1	– 1	– 1	0.281 9
4	1	– 1	1	1	1	– 1	– 1	0.574 4
5	– 1	1	– 1	1	1	– 1	1	0.412 0
6	1	1	1	– 1	– 1	– 1	1	0.500 6
7	– 1	– 1	– 1	1	– 1	1	1	0.529 1
8	1	– 1	1	1	– 1	1	1	0.621 3
9	1	1	– 1	– 1	– 1	1	– 1	0.342 0
10	1	– 1	– 1	– 1	1	– 1	1	0.330 6
11	– 1	– 1	1	– 1	1	1	– 1	0.424 2
12	1	1	– 1	1	1	1	– 1	0.462 0

度最大限度靠近极大响应值区域。试验设计如表 3 所示,每个试验点重复 3 次,取平均值。

表 3 最陡爬坡试验设计与结果

试验号	花生饼粉含量(%)	玉米浆含量(%)	<i>D</i> <sub>363 nm</sub>
1	4	2	0.516 9
2	6	3	0.550 5
3	8	4	0.322 4
4	10	5	0.264 1

1.2.6 中心复合试验设计 根据 PB 试验得到的显著影响因子和最陡爬坡试验确定的中心点,采用 Design Expert 8.0.6.1 软件设计中心复合试验。试验的因素和水平见表 4,试验设计见表 5。每个试验点重复 3 次,取平均值。

表 4 中心复合试验因素与水平

因素	水平				
	– α	– 1	0	+ 1	+ α
花生饼粉含量(%)	3.17	4	6	8	8.83
玉米浆含量(%)	1.59	2	3	4	4.41

1.2.7 最优发酵培养基验证 根据中心复合试验和响应面分析得到的最优发酵培养基,以初始培养基为对照,进行发酵验证试验,重复 5 次,求其平均值。

2 结果与分析

2.1 抗生素标准曲线的绘制

以抗生素浓度为横坐标(*x*),363 nm 处的吸光度为纵坐标(*y*)作图(图 1),得到线性回归方程  $y = 50.844x + 0.050 6$ ,  $r = 0.999 5$ ,在所测浓度范围内线性关系良好。

2.2 Plackett – Burman 试验设计与结果

PB 试验结果和方差分析分别如表 2、表 6 所示,模型确

表 5 中心复合试验的设计及结果

试验号	C:花生饼粉含量	D:玉米浆含量	<i>D</i> <sub>363 nm</sub>
1	0	1.414	0.407 9
2	0	0	0.555 7
3	0	0	0.539 1
4	0	– 1.414	0.546 5
5	0	0	0.539 5
6	– 1	1	0.522 7
7	0	0	0.558 4
8	– 1	– 1	0.525 3
9	1	1	0.304 2
10	– 1.414	0	0.520 1
11	0	0	0.545 9
12	1	– 1	0.408 7
13	1.414	0	0.307 6

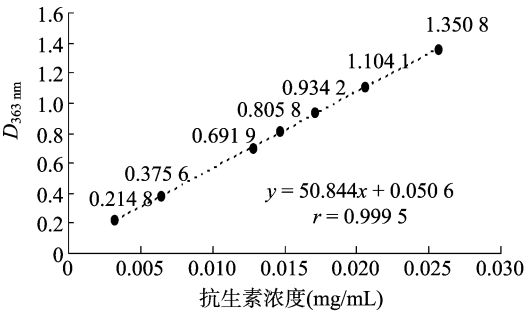


图 1 抗生素标准曲线

定系数  $R^2 = 0.969 7$ ,校正后的确定系数  $R^2_{adj} = 0.916 6$ ,表明模型拟合较好。 $P = 0.006 9 < 0.01$ ,表明该回归方程显著。试验考察的 7 个因素中,花生饼粉含量和玉米浆含量对抗生素产量的影响远远大于其他因素,且达到极显著水平,因此选择这 2 个因素进一步进行优化。

表 6 各因素效应值及显著性分析

变量编码	因素	效应系数	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型		0.450	18.27	0.006 9**
A	葡萄糖含量	0.018	4.10	0.112 8
B	可溶性淀粉含量	– 0.006	0.49	0.520 8
C	花生饼粉含量	0.061	49.06	0.002 2**
D	玉米浆含量	0.071	65.56	0.001 3**
E	NaCl 含量	– 0.017	3.68	0.127 4
F	CaCO <sub>3</sub> 含量	0.012	2.04	0.226 2
G	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 含量	0.015	2.94	0.161 6

注:“\*\*”表示  $P < 0.01$ ,影响极显著。

2.3 最陡爬坡试验设计与结果

由表 6 可知,花生饼粉含量和玉米浆含量都为正效应,效应系数分别为 0.061 和 0.071,根据这 2 个因素的效应大小确定爬坡步长,其他不显著因素均取低水平,试验设计与结果如表 3 所示。由表 3 可知,*D*<sub>363 nm</sub> 最大值出现在第 2 组试验附近,因此将其作为后续中心复合试验的中心点。

2.4 中心复合试验设计与结果

试验共设 13 个试验点,其中包括 8 个析因点和 5 个中心点,对试验结果进行二次二元回归拟合,得到回归方程  $Y = 0.550 - 0.079C - 0.038D - 0.025CD - 0.068C^2 - 0.037D^2$ ,模型  $R = 0.985 4$ ,表明模型拟合良好,对回归方程进行方差分析, $P < 0.000 1$ ,模型极显著,失拟项  $P = 0.078 7$  不显著,说

明模型有意义,因此可用此模型分析预测响应值。同时,由表 7 可知,交互项 CD 的  $P=0.010\ 5$ ,达到显著水平,说明花生饼粉含量和玉米浆含量存在一定的交互作用,响应曲面及等高线图如图 2 所示,响应曲面存在极值点。

以 363 nm 处紫外吸光度最大即抗生素产量最大为目标,利用 Design expert 8.0.6.1 软件对回归方程求解极大值,得到最终优化结果为花生饼粉含量 4.96%,玉米浆含量 2.66%。在最佳优化条件下预测的最佳响应值为 0.574 7。

2.5 最优条件验证

为了验证预测值,按照优化后的条件进行验证试验,结果如表 8 所示。优化后  $D_{363\text{ nm}}$  为 0.566 8 与预测值 0.574 7 非常接近,可见该模型能很好地预测发酵过程中抗生素的产量。将  $D_{363\text{ nm}}$  代入标准曲线中,并按照稀释浓度计算,可得优化后抗生素产量为 2 030.6 mg/L,比优化前的 771.9 mg/L 提高了

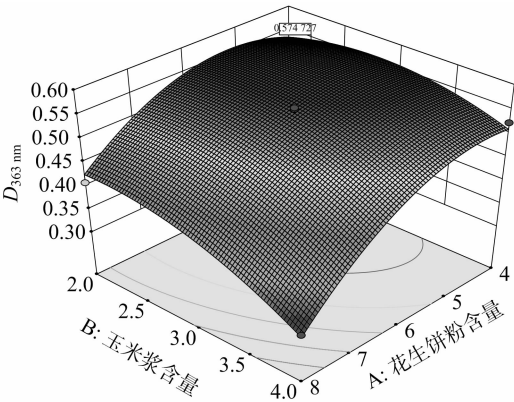


图2 花生饼粉含量和玉米浆含量的响应曲面和等高线

表 8 模型验证试验结果

试验组	$D_{363\text{ nm}}$					平均值
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	
初始培养基	0.242 9	0.239 5	0.243 4	0.251 0	0.257 4	0.246 8
优化后培养基	0.566 6	0.559 7	0.573 5	0.570 1	0.564 2	0.566 8

3 结论与讨论

玫瑰黄链霉菌 (*Streptomyces roseoflavus*) Men - myco - 93 - 63 对棉花黄萎病有较强的抑制作用,但利用发酵液进行生物防治在成本、运输、保存等方面存在诸多不便,因此,从发酵液中提取分离得到抗生素尤为必要,而发酵培养基对抗生素的代谢合成有着重要影响<sup>[9]</sup>。因此本试验通过改良发酵培养基来获得更高的抗生素产量。

响应面法作为一种统计学方法,近年来已被广泛应用于生物领域<sup>[10-13]</sup>,特别是发酵行业,相对于正交试验只能对单个孤立的试验点进行分析,响应面法在试验条件寻优过程中可以连续地对试验的各个水平进行分析,因而可以得到更为准确的最优条件。

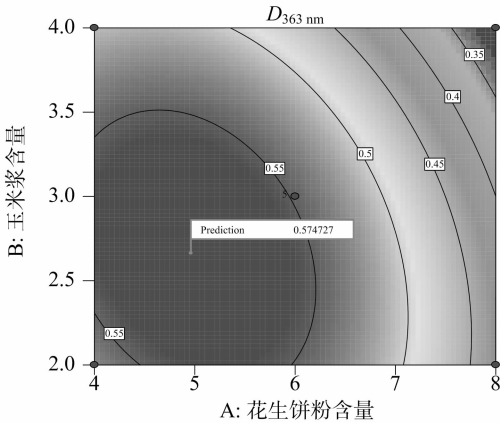
本试验利用 Plackett - Burman 试验设计从初始发酵培养基中筛选出花生饼粉含量和玉米浆含量 2 个影响抗生素产量的主要因素。在此基础上,通过最陡爬坡试验找到其最优值区域,在花生饼粉含量为 6%、玉米浆含量为 3% 附近。并以此为中心复合试验设计的中心点,用响应曲面分析法确定花

表 7 中心复合试验结果的方差分析

变量	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$
模型	0.100 0	5	0.020	94.54	<0.000 1 **
C	0.051 0	1	0.051	233.08	<0.000 1 **
D	0.011 0	1	0.011	53.00	0.000 2 **
CD	0.002 6	1	0.003	11.98	0.010 5 *
$C^2$	0.032 0	1	0.032	149.60	<0.000 1 **
$D^2$	0.009 3	1	0.009	42.97	0.000 3 **
残差	0.001 5	7	0.000		
失拟项	0.001 2	3	0.000	4.93	0.078 7
纯误差	0.000 3	4	0.000		
总离差	0.100 0	12			

注:“\*”表示  $P<0.05$ ,影响显著;“\*\*”表示  $P<0.01$ ,影响极显著。

1.63 倍。



生饼粉含量和玉米浆含量的最佳因素水平分别为 4.96%、2.66%。最后按照响应面优化的培养基进行验证试验,得到实际抗生素产量为 2 030.6 mg/L,与模型预测值非常接近,并且,相对于初始发酵培养基的 771.9 mg/L,抗生素产量提高了 1.63 倍。

参考文献:

[1] Liu D Q. Biological control of *Streptomyces scabies* and other plant pathogens[D]. Minnesota: University of Minnesota, 1992.

[2] Meng Q F, Yang W X, Zhang Q L, et al. Field evaluation of antagonistic *Streptomyces* Men - myco - 93 - 63 preparation in biocontrol of cotton verticillium wilt [C]//Proceedings of the 15th International Plant Protection Congress. Beijing: Foreign Languages Press, 2004:153.

[3] 刘大群,杨文香,祁碧菽,等.拮抗链霉菌 Men - myco - 93 - 63 及其发酵液对棉花黄萎病菌生长的影响[J].河北农业大学学报,1999,22(4):79-82.

[4] 赵志泉,赤国彤,孟庆芳,等.玫瑰黄链霉菌 Men - myco - 93 - 63 有效成分的初步提取与纯化[J].河北农业大学学报,2007,30(1):76-78.

[5] 张艳.生防菌株 Men - myco - 93 - 63 发酵工艺优化研究[D].保定:河北农业大学,2006.

[6] Sayyad S A, Panda B P, Javeed S, et al. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369

李素霞,莫小荣,覃雪梅,等. 氮镉交互作用下石灰对白菜的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):103-105.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.029

# 氮镉交互作用下石灰对白菜的影响

李素霞,莫小荣,覃雪梅,张继红

(钦州学院资源与环境学院,广西钦州 535000)

**摘要:**对湖北省武汉市城郊黄陂熟地蔬菜基地典型潮土进行盆栽模拟试验,研究氮镉交互作用下 1 kg 土分别施入石灰 1、2、4 g 对白菜物理性状、品质、土壤酶活性的影响。结果表明,石灰用量为 1 g/kg 土时,白菜株高、单株质量、根长、叶绿素含量、维生素 C 含量显著高于不施石灰处理(对照)( $P < 0.05$ ),白菜硝酸盐、镉含量显著低于对照( $P < 0.05$ ),土壤酸性磷酸酶、蛋白酶活性较明显高于对照,对蔗糖酶活性的影响不明显。白菜—土壤系统内氮镉交互作用下施入石灰,能有效降低白菜镉与硝酸盐的累积量,改善白菜品质,有效提高部分土壤酶的活性。

**关键词:**镉;氮;石灰;白菜;物理性状;品质;酶;累积量;交互作用

**中图分类号:** S634.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0103-03

随着现代工农业的发展,“三废”排放及大量施用化肥农药导致城郊菜地污染日趋严重。镉是被公认的农田主要重金属污染物质之一,同时,随着化肥的施用,菜地土壤普遍呈现氮素的富营养化。菜地土壤—蔬菜系统氮镉复合污染在前期研究中的成果较为显著,植物修复、双氰胺修复、有机质修复等对土壤均有一定的效果<sup>[1-3]</sup>,但也存在一些不足。石灰具有成本低廉、操作简单等特点,石灰对单一重金属污染土壤的修复尤其是对镉的修复效果较为显著,受到越来越多研究者的关注<sup>[4]</sup>,石灰对复合重金属污染土壤的修复研究相对较多<sup>[5-9]</sup>,但石灰对重金属与氮交互作用的修复还很鲜见。本试验通过研究石灰对湖北省武汉市城郊土壤氮镉交互作用的修复效果,为石灰在重金属与富营养化因子复合污染治理的应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

上海青白菜于 2013 年 5 月 22 日上午植入盆中,生长期

为 5 月 22 日至 6 月 21 日,6 月 21 日收获。试验盆栽土壤取自武汉城郊黄陂熟地蔬菜基地,为潮土,pH 值为 7.34,有机质含量为 23.26 g/kg,速效磷、碱解氮、有效镉含量分别为 25.15、90.0、0.27 mg/kg,黏粒质地 52.5%。石灰为分析纯,含  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  95.52%,氨水沉淀物 0.27%,全镉未检出。

### 1.2 试验设计

土壤风干,过 5 mm 筛;按 1 kg 土分别添加石灰 0、1、2、4 g/kg 与土进行混合,并分别以 CK、处理 1、处理 2、处理 3 表示;装盆,每盆 5 kg 混合土,重复 3 次;蒸馏水浇灌,使其达到田间持水量的 60%~70%;平衡培养 1 周,各处理的 pH 值分别为 7.33、7.76、7.83、8.38,每盆播种 15 粒;待幼苗稳定,定植 8 株/盆。在土与石灰混合的同时,一次性施入底肥,即施入  $\text{P}_2\text{O}_5$  0.2 g/kg、 $\text{K}_2\text{O}$  0.3 g/kg、N 0.2 g/kg(以纯氮计,尿素为氮源)、Cd 2.0 mg/kg(以纯镉计,以  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  为镉源)。

### 1.3 测定内容和方法

白菜收获前,准确量取根部到最长叶尖的距离,即为株高,每个植株取 2~3 张叶片用仪器直接测定叶绿素含量;白菜收获后,称取其鲜质量,取平均值。参照鲍士旦等的方法<sup>[10-14]</sup>,分别测定白菜维生素 C、可溶性糖、硝酸盐、镉含量,土壤硝酸盐、镉含量及土壤蔗糖酶、酸性磷酸酶、蛋白酶的活性。

收稿日期:2016-12-26

基金项目:国家高技术研究发展计划(编号:2012AA06A204);广西自然科学基金(编号:2016GXNSFAA380242)。

作者简介:李素霞(1976—),女,新疆玛纳斯人,硕士,副教授,主要从事植物营养与农产品安全研究。E-mail:zyclsx1122@126.com。

under submerged fermentation using response surface methodology [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(5):1054-1058.

[7] 梅乐和,胡升,许静,等. 纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶发酵条件优化[J]. 浙江大学学报(工学版),2004,38(10):1355-1360.

[8] 刘青芝,李霞,苏移山,等. 响应面法优化  $\gamma$ -聚谷氨酸发酵条件[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(2):99-102.

[9] 卢彩鸽,董红平,张殿朋,等. 解淀粉芽胞杆菌 MH71 摇瓶发酵培养基及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报,2015,31(3):369-377.

[10] Jung J P, Moyano J V, Collier J H. Multifactorial optimization of endothelial cell growth using modular synthetic extracellular matrices

[J]. Integrative Biology, 2011, 3(3):185-196.

[11] Li X Y, Liu Z Q, Chi Z M. Production of phytase by a marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3 in an oats medium; optimization by response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(14):6386-6390.

[12] Yuan L L, Li Y Q, Wang Y, et al. Optimization of critical medium components using response surface methodology for phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas* sp. M-18Q [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2008, 105(3):232-237.

[13] Li C, Bai J H, Cai Z L, et al. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis*, using response surface methodology [J]. Journal of Biotechnology, 2002, 93(1):27-34.