

烟曲霉素发酵培养基的优化

王昊鹏¹, 吴黎明², 赵柳微², 倪 辉³, 肖安风³, 张中印^{1,*}

(1. 河南科技学院资源与环境学院, 河南新乡 453003;

2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093;

3. 集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021)

摘要:目的:以烟曲霉 CEA-1701 为生产菌株,对烟曲霉素发酵培养基进行优化。方法:运用 HPLC 测定发酵液中烟曲霉素含量,通过单因素实验选择发酵碳源和氮源种类,进一步用 Plackett-Burman (PB) 和 Box-Behnken Design (BBD) 设计优化各成分在培养基中的浓度。结果:单因素实验筛选到适宜烟曲霉素合成的碳源和氮源分别为甘油和酵母提取粉。PB 实验表明,甘油、玉米粉和酵母提取粉是影响烟曲霉素产量的主要因素;BBD 实验优化得到产烟曲霉素的适宜培养基成分为:甘油 33.5 g/L、酵母提取粉 3.1 g/L、玉米粉 1.7 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、 K_2HPO_4 1.5 g/L、KCl 0.5 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.013 g/L。以此培养基发酵 144 h 测得发酵液中烟曲霉素含量达到 68.51 mg/L,较优化前提高了 122.4%。结论:实验优化了发酵烟曲霉素的培养基成分,显著提高了烟曲霉 CEA-1701 菌株合成烟曲霉素产量,为烟曲霉素的发酵生产提供了参考依据。

关键词:烟曲霉,烟曲霉素,培养基优化,碳源,氮源,响应面法

Optimization of fermentation medium for fumagillin production

WANG Hao-peng¹, WU Li-ming², ZHAO Liu-wei², NI Hui³, XIAO An-feng³, ZHANG Zhong-yin^{1,*}

(1. College of Resources and Environment, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;

2. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

3. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Objective: Medium was optimized for the production of fumagillin from *Aspergillus fumigatus* CEA-1701. Method: The content of fumagillin was determined by HPLC. The carbon and nitrogen sources were optimized using single factor experiment design. The major components in the medium were further optimized by Plackett-Burman (PB) and Box-Behnken Design (BBD). Results: Results show that the suitable sources of carbon and nitrogen for fumagillin productions are glycerol and yeast extract respectively; Glycerol, corn flour and yeast extract are the main factors affecting the production of fumagillin. BBD test showed that the optimum medium was composed of glycerol 33.5 g/L, yeast extract powder 3.1 g/L, corn flour 1.7 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, KCl 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.013 g/L, which resulted in the fumagillin productivity of 68.51 mg/L that was 122.4% higher than that of the initial medium. Conclusion: After the medium optimization, the fumagillin production significantly increased, which provides a reference for fumagillin production.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; fumagillin; medium optimization; carbon source; nitrogen source; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)10-0110-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.10.021

引文格式: 王昊鹏, 吴黎明, 赵柳微, 等. 烟曲霉素发酵培养基的优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(10): 110-116.

烟曲霉素(Fumagillin)是一种重要的生理活性物质,是由烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)产生的次级代谢产物并具有高效的抗菌、抗虫和抗癌抗肿瘤作用。Hanson等^[1]在1949年第一次从编号为H-3的曲霉菌株中分离得到烟曲霉素,在发现之初就被用作抗菌抗虫药物(抗阿米巴药)^[2]。Mccowen等^[3]首

次提到烟曲霉素对蜜蜂微孢子虫病(*Apis Nosema*)有预防作用,在美国、加拿大等养蜂发达国家,烟曲霉素已被用于治疗蜜蜂微孢子虫病,并获得了良好的治疗效果^[4]。烟曲霉素是当前治疗蜜蜂微孢子虫病的唯一有效药物^[5],也可用于治疗鱼类的小孢子虫病^[6-7];此外,烟曲霉素能够显著降低脂肪量改善由

收稿日期: 2017-10-13

作者简介: 王昊鹏(1992-),男,硕士研究生,研究方向:微生物发酵, E-mail: 1120275413@qq.com。

* 通讯作者: 张中印(1965-),男,大学本科,副教授,研究方向:蜜蜂饲养管理学, E-mail: zzy206@126.com。

基金项目: 北京市自然科学基金(6164044);国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-45)。

于饮食诱导的肥胖症^[8],有望成为减肥新药物。同时烟曲霉素能够抑制新生血管的生成^[9],具有抑制肿瘤生长的作用^[10-11]。烟曲霉素结构复杂,性质不稳定,易发生热降解和紫外降解^[12-13],化学合成过程复杂^[14],主要是通过微生物发酵获得。由于知识产权和贸易保护等原因,目前国内烟曲霉素发酵生产研究尚属空白,尚未实现产业化发酵生产。

发酵优化工艺是提高微生物发酵产量的有效方法。响应面分析法(Response surface methodology, RSM)是优化发酵工艺的一种高效方法,广泛应用于化学化工、生物工程、食品工业等领域^[15-17]。

本研究以工业发酵常见碳、氮源为基础,通过单因素实验及响应面实验对烟曲霉素的培养基成分进行优化,以提高烟曲霉素的发酵产量,为烟曲霉素产业化发酵生产研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

烟曲霉 CEA-1701 (*Aspergillus fumigatus* CEA-1701) 中国农科院蜜蜂研究所提供;烟曲霉素标准品 北京百灵威科技有限公司;色谱纯甲醇 美国 Tedia 公司;玉米粉 漳州闽成玉米制品有限公司;消泡剂 按照泡敌:植物油:水(V/V/V)=1:1:3 配制,其中泡敌取自厦门汇盛生物有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

WFJ7200 型紫外可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;REC5004V21 型层析柜 赛默飞世尔科技(上海)公司;BS223S 型电子分析天平 德国赛多利科学仪器(北京)有限公司;SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司;ZWYR-D2403 型恒温培养振荡器 上海智城分析仪器制造有限公司;pH 计 PE20 实验室 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;LC-20AT 型高效液相色谱仪和 Inertsustain® C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱 岛津公司。

1.2 培养基

PDA 培养基:土豆洗净切丝,称取 200 g,使用电磁炉加水煮沸 30 min,待冷却后,过 200 目筛滤去滤渣,添加 20 g 葡萄糖,15 g 琼脂,定容至 1000 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

初始发酵培养基:蔗糖 30 g/L、NaNO₃ 3.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、KCl 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.013 g/L、K₂HPO₄ 1.0 g/L、玉米粉 2.0 g/L,初始 pH 为 6.0±0.5, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3 实验方法

1.3.1 初始发酵条件 装液量为 50 mL 的 250 mL 锥形瓶,玻璃珠 10 颗,接种量为装液量的 1%,培养温度 30 ℃,转速 180 r/min,培养周期 144 h。

1.3.2 单孢子菌悬液的制备 将 4 ℃ 贮藏的菌种接种到 PDA 斜面培养基上,28 ℃ 培养 5~7 d 得到成熟孢子。无菌操作下,用无菌生理盐水洗下孢子,倒入装有玻璃珠的无菌锥形瓶中,充分振荡 30 min。待孢子充分打散后,测菌悬液 OD₆₀₀ 值,并用无菌生理盐水调整其 OD₆₀₀ 至 2.0,即得单孢子菌悬液^[18]。

1.3.3 接种及发酵 将制得的单孢子菌悬液于 4 ℃ 层析柜中静置,同步培养 1 h 后取出;待温度升至室温,以装液量 1% 的接种量接种至装有 50 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中,在 30 ℃、180 r/min 的条件下培养 144 h。

1.3.4 最适碳源氮源的筛选

1.3.4.1 碳源筛选 保持摇瓶初始发酵培养基其他成分不变,并固定碳源含碳量为 12.6 g/L,分别以蔗糖、可溶性淀粉、葡萄糖、甘油、一水麦芽糖为单一碳源,每组 3 个平行,发酵培养 144 h,取发酵液于 5000 r/min 离心 10 min,测定发酵液中烟曲霉素含量。

1.3.4.2 氮源筛选 分别以酵母提取粉、尿素、胰蛋白胨、硝酸钠、牛肉膏、硫酸铵为单一氮源,并固定各氮源的质量浓度为 3.0 g/L,其他物质添加量同初始发酵培养基保持一致,每组 3 个平行,发酵培养 144 h,取发酵液于 5000 r/min 离心 10 min,测定发酵液中烟曲霉素含量。

1.3.5 单因素实验

1.3.5.1 甘油浓度筛选 在上述碳源和氮源的基础上,保持初始发酵培养基其他成分不变,在 1.3.1 所述的发酵条件下,考察 0、10、20、30、40 g/L 这 5 个不同甘油浓度对烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的影响。

1.3.5.2 酵母提取粉浓度筛选 在以甘油 30 g/L 添加量时,保持初始发酵培养基其他成分不变,在 1.3.1 所述的发酵条件下,考察不同酵母提取粉浓度 0、1、2、3、4、5 g/L 对烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的影响。

1.3.5.3 玉米粉浓度筛选 在以甘油 30 g/L 和酵母提取粉 3 g/L 添加量时,保持初始发酵培养基其他成分不变,在 1.3.1 所述的发酵条件下,考察不同玉米粉浓度 0、1.5、2、2.5、3 g/L 对烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的影响。

1.3.5.4 镁离子浓度筛选 在以甘油 30 g/L、酵母提取粉 3 g/L 和玉米粉 1.5 g/L 添加量时,保持初始发酵培养基其他成分不变,在 1.3.1 所述的发酵条件下,考察不同 MgSO₄·7H₂O 浓度 0、0.25、0.5、0.75、1 g/L 对烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的影响。

1.3.5.5 磷酸根离子浓度筛选 在以甘油 30 g/L、酵母提取粉 3 g/L、玉米粉 1.5 g/L 和 MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L 添加量时,保持初始发酵培养基其他成分不变,在 1.3.1 所述的发酵条件下,考察不同 K₂HPO₄ 浓度 0、0.5、1、1.5、2 g/L 对烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的影响。

1.3.5.6 氯化钾浓度筛选 在以甘油 30 g/L、酵母提取粉 3 g/L、玉米粉 1.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L 和 K₂HPO₄ 0.5 g/L 添加量时,保持初始发酵培养基其他成分不变,在 1.3.1 所述的发酵条件下,考察不同 KCl 浓度 0、0.5、1、1.5、2 g/L 对烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的影响。

1.3.6 Plackett-Burman (PB) 实验设计 按照最适碳源、氮源配制培养基,根据单因素实验结果,对甘油、酵母提取粉、玉米粉、MgSO₄·7H₂O、K₂HPO₄ 和 KCl 在内的 6 个因素运用 Minitab 17.0 软件设计 PB 实验

($n = 12$),测定 144 h 后发酵液中烟曲霉素的含量,从而有效地筛选出对烟曲霉素生产影响较大的因素,PB 实验设计因素及水平如表 1。

表 1 Plackett-Burman 实验设计因素及水平(g/L)

Table 1 Variables and levels of Plackett-Burman experiments(g/L)

因素	水平	
	低水平(-1)	高水平(+1)
甘油	20	40
酵母提取粉	2	4
玉米粉	1	2
氯化钾	0.25	0.75
磷酸氢二钾	1	2
七水硫酸镁	0.5	1.5

1.3.7 Box-Behnken Design (BBD) 实验设计 在 PB 和单因素实验的基础上,用 Deign-Expert 8.0.6 软件对 PB 实验得到的显著因素进行 BB 设计,并对实验结果进行分析,以获得最佳培养基配比,BBD 实验因素与水平如表 2。

表 2 Box-Behnken 实验因素与水平(g/L)

Table 2 Factors and levels in Box-Behnken design(g/L)

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 甘油	20	30	40
X_2 酵母提取粉	2	3	4
X_3 玉米粉	1	1.5	2

1.3.8 生物量的测定 准确移取 5 mL 发酵液于室温下 5000 r/min 离心 10 min,然后转移、保存上清液测定烟曲霉素的含量,将沉淀的菌体用蒸馏水清洗 3 次后于 80 ℃ 烘箱内烘干至恒重,称重,统计生物量。

1.3.9 烟曲霉素测定方法 样品处理:发酵液于室温下 5000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,通过 0.22 μm 的滤膜过滤于进样瓶中,过程尽量避免。

色谱分析条件:Inertsustain $\text{\textcircled{R}}$ C18 反相柱,350 nm 波长,柱温 25 ℃,进样 20 μL ,流速 0.8 mL/min;流动相为水(A)、甲醇(B),溶剂的梯度洗脱程序是:0~2 min, A/B (V/V) = 80/20;2~5 min, A/B (V/V) = 70/30;5~15 min, A/B (V/V) = 30/70;15~25 min, A/B (V/V) = 10/90;25~27 min, A/B (V/V) = 10/90;27~28 min, A/B (V/V) = 80/20;28~40 min, A/B (V/V) = 80/20。

烟曲霉素标准曲线绘制:以烟曲霉素标准品 1000 mg/L 为母液,甲醇色谱纯为溶剂,稀释成不同浓度的标准溶液 5、10、20、40、80、100、150、200 mg/L,每个梯度做 5 个平行。在色谱条件下进行 HPLC 分析,以各标准品的峰面积 y 对其浓度 x (mg/L) 进行线性回归分析,得到标准曲线回归方程为 $y = 209858x - 12376$,相关系数 $R^2 = 0.9998$ 。以峰面积为横坐标,根据回归方程计算烟曲霉素浓度。

1.4 数据统计方法

实验数据为 3 次平行实验的平均值,用 Excel 软

件计算平均值和标准偏差,用 SPSS 对各指标包括碳源、氮源、无机盐在内的几个因素进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 碳源和氮源的筛选

碳源是微生物细胞结构及代谢产物中碳架结构的主要来源,为微生物的正常生长和细胞的分裂提供了物质基础,适宜的碳源浓度有利于微生物的繁殖代谢;氮是组成细胞中核酸和蛋白质的重要元素,适宜的碳源、氮源直接影响着代谢产物烟曲霉素的合成。不同碳源、氮源对烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的影响结果图 1 所示。

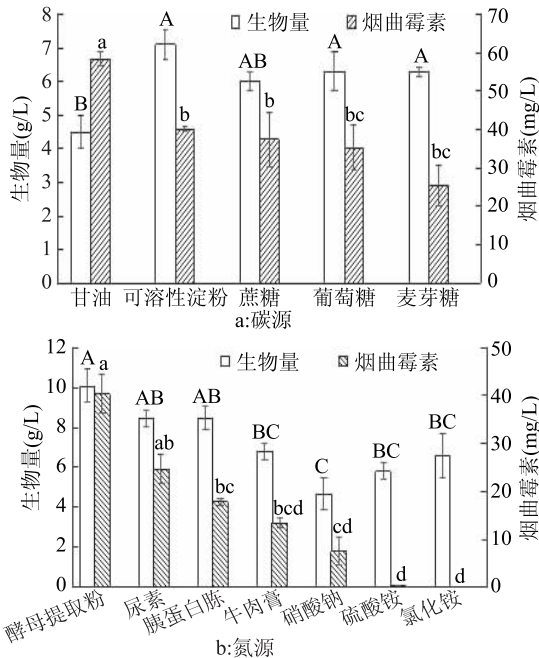


图 1 不同碳源、氮源对烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的影响

Fig.1 Effects of different carbon sources and nitrogen sources on fumagillin production by *Aspergillus fumigatus* CEA-1701

注:不同大写字母表示生物量有显著差异($p < 0.05$);不同小写字母表示烟曲霉素具有显著差异($p < 0.05$);同 2 同。

由图 1(a)可知 5 种碳源发酵均能生成烟曲霉素,以甘油作为碳源时烟曲霉素产量最高,为 58.45 mg/L,其次是可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖和麦芽糖。可溶性淀粉、蔗糖和葡萄糖作为碳源发酵时烟曲霉素产量无显著性差异。根据生物量变化可知,可溶性淀粉作为发酵碳源较其它碳源获得了较高的生物量产量,但烟曲霉素产量低于甘油作为碳源时的烟曲霉素产量,这可能跟实际发酵操作中可溶性淀粉作为碳源发酵液易出现菌体结团有关,导致烟曲霉素产量降低。这跟吴升山等^[18]在优化黑曲霉发酵条件时在发酵培养基中加入玻璃珠以获得松散的菌丝体提高细胞产量的观点相同。因此,甘油更有利于烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素。

图 1(b)反映出以酵母提取粉作为单一氮源时烟曲霉素和生物量同时获得了最高产量。氮源有速效氮源和迟效氮源之分,对比 7 种氮源可以看出:烟曲霉在不同氮源条件下都能正常生长,有机氮源作为

迟效氮源更有利于烟曲霉素的生产,这可能跟有机氮源中含有丰富的氨基酸、蛋白质、小分子肽有关。氨基氮源不利于烟曲霉素的生产,这可能是由于氨基氮源引入后导致发酵液 pH 升高不利于生成烟曲霉素。

Wen 等^[19]以烟曲霉 NRRL2436 为生产菌株筛选烟曲霉素生物合成的最佳碳源氮源,研究发现最佳的碳源组合为木聚糖 30 g/L 和甘露糖 50 g/L,最佳氮源为 L-谷氨酸 9 g/L,同时指出铵盐类物质不适宜作为氮源。与本实验的结果有一些相似之处,有机氮源较无机氮源更利于烟曲霉素的生成,铵盐类氮源氯化铵不利于烟曲霉素的生成。最适碳源的不同可能是不同菌株特异性的表现。

综上所述,适宜于烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的适宜碳源和氮源分别为:甘油和酵母提取粉。

2.2 初始培养基基因素优化

甘油、酵母提取粉、玉米粉、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 K_2HPO_4 、KCl 不同添加量对烟曲霉 CEA-1701 发酵产烟曲霉素的影响,结果如图 2 所示。

从图 2(a)可以看出,在以甘油作为单一碳源发酵生产烟曲霉素时,30 g/L 的添加量有利于烟曲霉素合

成产量达到 50.15 mg/L,对应的生物量达到 6.98 g/L。当甘油添加量偏离最适添加量时,烟曲霉素产量都有所降低。图 2(b)以酵母提取粉为氮源,在培养基中加入酵母提取粉明显提高了生物量的产量,随着酵母提取粉添加量的增加,烟曲霉素产量得到提高,在添加量为 3 g/L 时,烟曲霉素产量达到最高即 51.35 mg/L,添加量继续增加烟曲霉素产量反而下降,这可能是因为过量的氮源导致菌体徒增,溶氧降低不利于后期烟曲霉素的合成。王胤等^[20]在研究三峡库区烟曲霉 IMB-SX28 次级代谢产物时指出,1% 的玉米浆添加量提高了次级代谢产物的产量。玉米浆作为生物素,不仅能够提供微生物生长所需的微量元素,同时还能作为有机氮源,适宜的添加量能够提高次级代谢产物的产量。本研究以玉米粉代替玉米浆,由图 2(c)可以看出玉米粉的添加可以显著提高烟曲霉素和生物量产量。在添加量为 1.5 g/L 时更有利于烟曲霉素的生成即达到 55.24 mg/L,此后随着添加量的增加烟曲霉素和生物量产量无显著性差异。 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 K_2HPO_4 适宜的添加量都有利于烟曲霉素产量的提高,但是组间的差异性不显著,分别以 0.5 g/L 和 1.5 g/L 添加量时烟曲霉素产量达

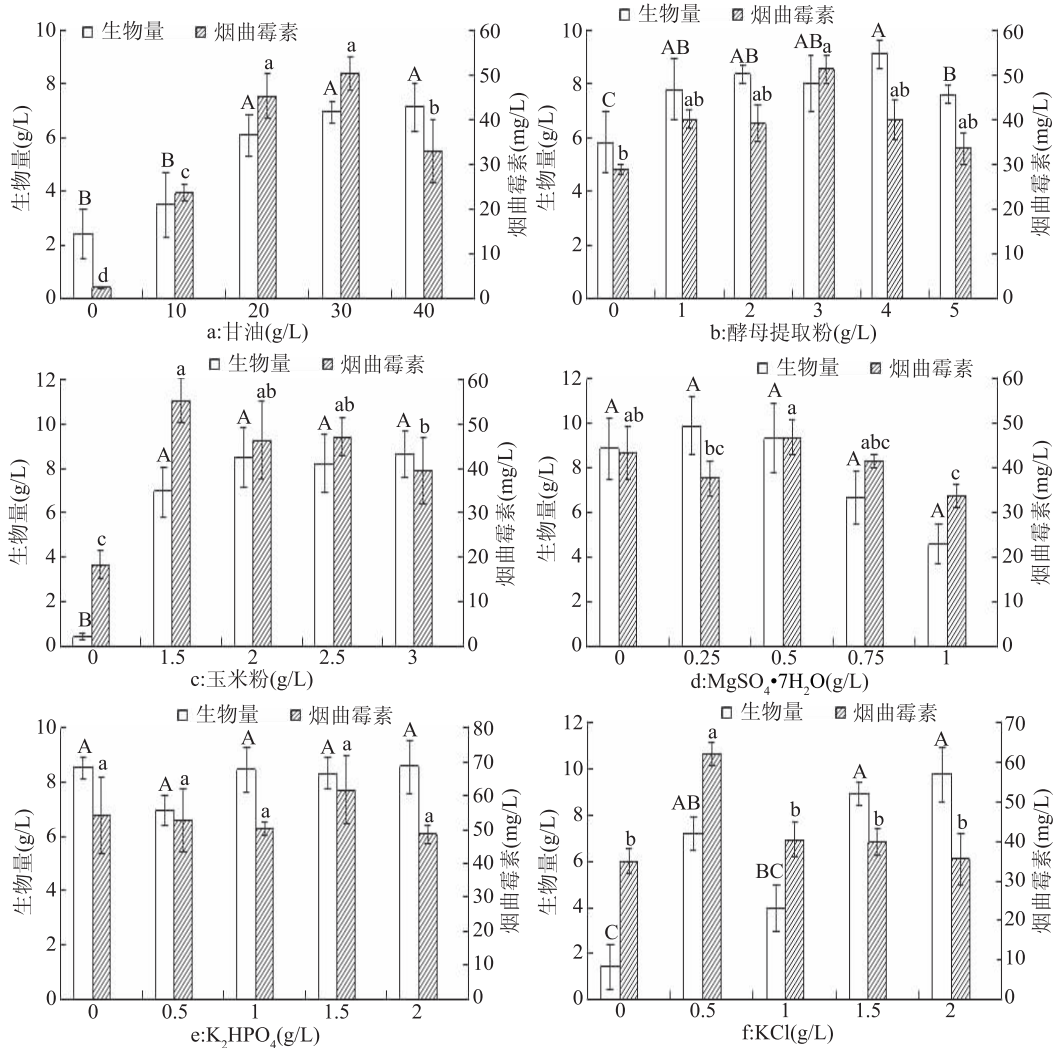


图 2 不同因素对烟曲霉素产量的影响

Fig.2 Effect of different factors on the yield of fumagillin

表3 Plackett-Burman 实验设计及结果

Table 3 Design and results of Plackett-Burman experiments

实验号	甘油(g/L)	酵母提取粉(g/L)	玉米粉(g/L)	KCl(g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O(g/L)	烟曲霉素(mg/L)
1	1	1	-1	1	-1	1	49.97
2	-1	1	-1	-1	1	1	30.18
3	-1	-1	1	1	1	1	31.48
4	1	-1	-1	-1	1	1	42.59
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	16.23
6	-1	-1	1	1	-1	1	35.97
7	1	1	1	-1	-1	1	67.19
8	-1	1	-1	1	-1	-1	31.97
9	-1	1	1	-1	1	-1	30.18
10	1	1	1	1	1	-1	51.7
11	1	-1	-1	1	1	-1	43.29
12	1	-1	1	-1	-1	-1	49.18

到最高为 48.88 mg/L 和 61.58 mg/L。适宜的 KCl 添加量能够提高烟曲霉素的产量,图 2(f)可以看出烟曲霉素产量随着氯化钾添加量的增加呈现出先增后减的趋势,添加量为 0.5 g/L 时烟曲霉素产量达到 62.22 mg/L,之后随着氯化钾添加量的增加烟曲霉素产量反而下降,这可能是过高的盐浓度改变了细胞膜的通透性^[21]导致烟曲霉素产量降低。

通过以上实验得到烟曲霉素发酵培养基配方为:甘油 30 g/L、酵母提取粉 3.0 g/L、玉米粉 1.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、K₂HPO₄ 1.5 g/L、KCl 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.013 g/L。

2.3 Plackett-Burman(PB)实验设计及结果分析

运用 Minitab 17.0 软件,选取甘油、酵母提取粉等影响烟曲霉素产量的 6 个因素进行考察,PB 实验设计及结果如表 3 所示。PB 设计主效应分析如表 4 所示,可以看出影响烟曲霉素产量的重要因素为甘油、玉米粉和酵母提取粉,其中甘油的主效应极显著($p < 0.01$),其次为玉米粉和酵母提取粉。因此,将甘油、玉米粉、酵母提取粉这 3 个培养基组分作为主要因素做进一步的响应面法优化。

表4 Plackett-Burman 设计主效应分析(g/L)

Table 4 Significance testing of Placket-Burman design(g/L)

因素	T 值	p 值	重要性排列
甘油	7.89	0.0005 **	1
酵母提取粉	2.61	0.047 *	3
玉米粉	3.17	0.0247 *	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.21	0.8441	6
K ₂ HPO ₄	-0.92	0.4020	5
KCl	2.03	0.0987	4

注: * 表示在 5% 的显著性水平通过检验; ** 表示在 1% 的极显著性水平通过检验。

2.4 Box-Behnken Design(BB)实验设计及结果分析

烟曲霉素培养基成分配方的 Box-Behnken 设计及结果分析,用 Deign-Expert 8.0.6 软件对实验方案

进行 Box-Behnken 设计,结果见表 5。

表5 BBD 实验设计及结果

Table 5 Design and results of Box-Behnken experiments

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	A:烟曲霉素(mg/L)
1	-1	-1	0	45.07
2	1	-1	0	51.64
3	-1	1	0	41.11
4	1	1	0	56.48
5	-1	0	-1	46.76
6	1	0	-1	49.23
7	-1	0	1	48.56
8	1	0	1	61.84
9	0	-1	-1	50.51
10	0	1	-1	51.58
11	0	-1	1	50.70
12	0	1	1	55.98
13	0	0	0	64.37
14	0	0	0	65.22
15	0	0	0	65.60

以烟曲霉素浓度为响应值 A,通过 Design-Expert 8.0.6 软件对实验结果进行分析,得到响应值 A 和因素 X 之间的回归方程为:

$$A = -97.98701 + 41.23611X_1 + 388.23162X_2 + 412.988X_3 + 22.0215X_1X_2 + 54.096X_1X_3 + 210.63X_2X_3 - 8.54084X_1^2 - 794.75375X_2^2 - 1969.885X_3^2$$

以上二次多项回归方程的方差分析和显著性检验结果见表 6。

由表 6 可知,回归模型高度显著($p = 0.0019 < 0.01$),失拟项不显著($p = 0.0549 > 0.05$),模型可以较好的拟合实验结果。且由 $R^2_{adj} = 0.9271$,信噪比 = 13.313 > 4 可知,回归方程拟合度和可信度均较高,因此可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。显著性检验表明,一次项 X_1 ,二次项 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 对烟曲霉产烟曲霉素影响极显著($p < 0.01$),一

表6 回归方程的方差分析及其系数显著性检验
Table 6 Variance analysis of regression equation and significance test of regression coefficients

方差来源	自由度	平方和	均方和	F 值	p 值
模型	9	801.55	89.06	20.79	0.0019 **
X ₁	1	177.61	177.61	41.46	0.0013 **
X ₂	1	6.53	6.53	1.53	0.2717
X ₃	1	45.12	45.12	10.53	0.0228 *
X ₁ X ₂	1	19.40	19.40	4.53	0.0866
X ₁ X ₃	1	29.26	29.26	6.83	0.0475 *
X ₂ X ₃	1	4.44	4.44	1.04	0.3555
X ₁ ²	1	269.34	269.34	62.87	0.0005 **
X ₂ ²	1	233.22	233.22	54.44	0.0007 **
X ₃ ²	1	89.55	89.55	20.90	0.0060 **
残差	5	21.42	4.28		
失拟项	3	20.63	6.88	17.39	0.0549
净误差	2	0.79	0.40		
总离差	14	822.97			

$R^2 = 0.9740, R^2_{adj} = 0.9271$, 信噪比 = 13.313

注: * 表示具有显著差异 ($p < 0.05$); ** 表示具有极显著差异 ($p < 0.01$)。

次项 X₃ 和交互项 X₁X₃ 对烟曲霉产烟曲霉素影响显著 ($p < 0.05$), 其他因子 X₂、X₁X₂ 和 X₂X₃ 对烟曲霉产烟曲霉素的影响不显著。

用 Design Expert 8.0.6 软件根据回归方程进行绘图分析, 得到响应曲面图和等高线图 (如图 3~ 图 5 所示)。响应曲面图将任意两个自变量对响应值的影响直观地反映在球面上, 响应值的最大值位于球

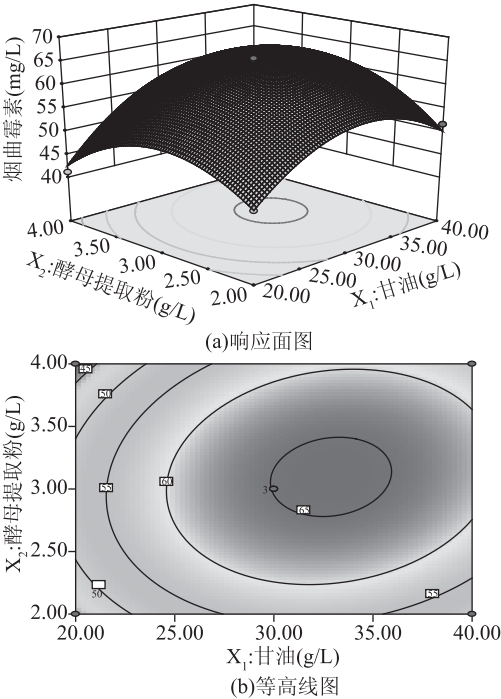


图3 甘油及酵母提取粉添加量影响烟曲霉素的响应面图及等高线图

Fig.3 The three-dimensional image and contour plot of the relationship between glycerol and yeast powder

面的最高点, 等高线形状反映两个自变量的交互作用^[22-23]。由图 3~ 图 5 可知, X₁X₃ 对响应值的等高线形状呈椭圆形, 这表明两个自变量间有一定的交互效应, X₁X₂ 和 X₂X₃ 的交互作用较弱。

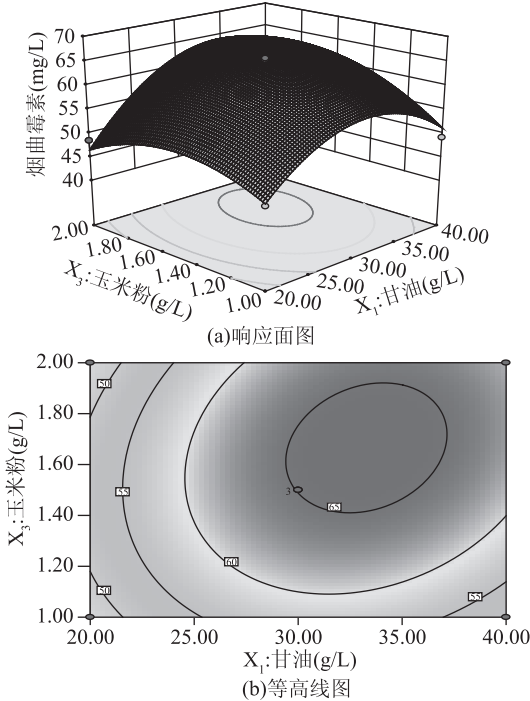


图4 甘油及玉米粉添加量影响烟曲霉素的响应面图及等高线图
Fig.4 The three-dimensional image and contour plot of the relationship between glycerol and corn flour

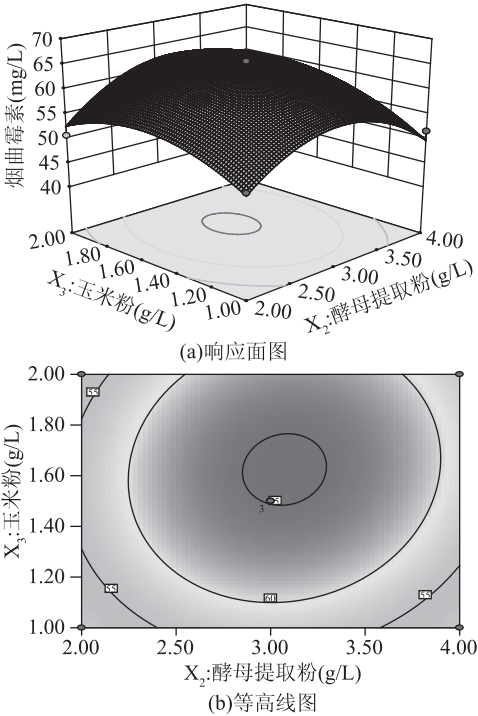


图5 酵母提取粉及玉米粉添加量影响烟曲霉素产量的响应面图及等高线图

Fig.5 The three-dimensional image and contour plot of the relationship between yeast powder and corn flour

对回归方程用 Design Expert 8.0.6 软件分析求出最佳值,得到极值点坐标 $X_1 = 3.35$, $X_2 = 0.31$, $X_3 = 0.17$ 时相应因素的对应值分别为:甘油 33.5 g/L、酵母提取粉 3.1 g/L、玉米粉 1.7 g/L,预测响应值 144 h 烟曲霉素浓度为 66.3554 mg/L。以此条件进行验证实验,发酵培养烟曲霉,发酵 144 h 测得发酵液中烟曲霉素浓度为 68.51 mg/L(比预测值高 3.25%),如图 6 较培养基优化前烟曲霉素产量提高了 122.4%。

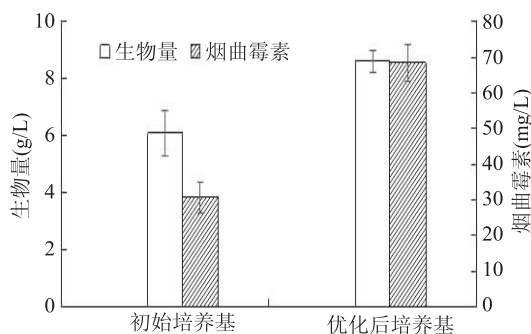


图6 培养基优化前后烟曲霉素产量对比

Fig.6 Comparisons of fumagillin before and after optimization of culture medium

3 结论

碳源、氮源的筛选实验确定了适宜烟曲霉 CEA-1701 产烟曲霉素的碳氮源分别为甘油和酵母提取粉。在单因素实验的基础上采用 PB 分析和 BBD 设计响应面实验,通过建立模型得到较优的摇瓶发酵培养基。优化后的培养基组成为:甘油 33.5 g/L、酵母提取粉 3.1 g/L、玉米粉 1.7 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 K_2HPO_4 1.5 g/L、KCl 0.5 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.013 g/L。最后利用优化后的培养基在实验室条件下进行发酵培养,烟曲霉 CEA-1701 烟曲霉素生成量达到 68.51 mg/L,较培养基优化前提高了 122.4%。

参考文献

- [1] Hanson F R, Eble T E. An antiphage agent isolated from *Aspergillus* sp. [J]. Journal of Bacteriology, 1949, 58 (4): 527-529.
- [2] Mccowen M C, Callender M E, Lawlis J F J. Fumagillin (H-3), a new antibiotic with amebicidal properties [J]. Science, 1951, 113 (2930): 202-203.
- [3] Katznelson H, Jamieson C A. Control of Nosema disease of honeybees with fumagillin [J]. Science, 1952, 115 (2977): 70-71.
- [4] Huang W F, Solter L, Yau P, et al. Effects of fumagillin on nosema ceranae infections in honey bees (*Apis mellifera*) [J]. American Bee Journal, 2013, 153 (8): 885-886.
- [5] Martín - Hernández R, Botías C, Bailón E G, et al. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: Coexistence or competition is Nosema ceranae replacing *Nosema apis* [J]. Environmental Microbiology, 2012, 14 (8): 2127-2138.
- [6] Saleh M, Kumar G, Abdelbaki A A, et al. Development of a novel *in vitro* method for drug development for fish; Application to test efficacy of antimicrosporidian compounds [J]. Veterinary

Record, 2014, 175 (22): 561.

- [7] Kent M L, Shaw R W, Sanders J L. Microsporidia in fish [M]. Microsporidia wiley-Blackwell, 2014: 493-520.
- [8] Lijnen H R, Frederix L, Van H B. Fumagillin reduces adipose tissue formation in murine models of nutritionally induced obesity [J]. Obesity, 2010, 18 (12): 2241.
- [9] Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth [J]. Nature, 1990, 348 (6301): 555-557.
- [10] Ravindran B, Wong J W, Selvam A, et al. Microbial biodegradation of proteinaceous tannery solid waste and production of a novel value added product-Metalloprotease [J]. Bioresource Technology, 2016, 217: 150-156.
- [11] Li H, Mori D, Takase Y, et al. Fumagillin inhibits colorectal cancer growth and metastasis in mice; *In vivo* and *in vitro* study of anti-angiogenesis [J]. China Oncology, 2009, 59 (7): 448-461.
- [12] Lin H C, Tsunematsu Y, Dhingra S, et al. Generation of complexity in fungal terpene biosynthesis: discovery of a multifunctional cytochrome P450 in the fumagillin pathway [J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136 (11): 4426.
- [13] Jp V D H, Thompson T S, Curtis J M, et al. Stability of dicyclohexylamine and fumagillin in honey [J]. Food Chemistry, 2015, 179: 152.
- [14] Taber D F, Christos T E, And A L R, et al. Synthesis of (-)-fumagillin [J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121 (23): 86.
- [15] Wu L, Qiu L, Zhang H, et al. Optimization for the production of deoxynivalenol and zearalenone by fusarium graminearum using response surface methodology [J]. Toxins, 2017, 9 (2).
- [16] Córdova F J C, León A M G, Reyes R B G, et al. Response surface methodology for lead biosorption on *Aspergillus terreus* [J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2011, 8 (4): 695-704.
- [17] Yolmeh M, Jafari S M. Applications of response surface methodology in the food industry processes [J]. Food & Bioprocess Technology, 2017, 10 (3): 413-433.
- [18] 吴升山, 倪辉, 肖安凤, 等. 黑曲霉 DB056 产柚苷酶发酵条件初步优化 [J]. 微生物学通报, 2010, 37 (9): 1305-1311.
- [19] Yang W, Kim W S, Fang A, et al. Carbon and nitrogen source nutrition of fumagillin biosynthesis by *Aspergillus fumigatus* [J]. Current Microbiology, 2003, 46 (4): 275.
- [20] 王胤. 三峡库区烟曲霉 IMB-SX28 次级代谢产物的分离及活性初步研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [21] 张文芝, 郭坚华. 微生物发酵工艺优化研究进展 [J]. 广东农业科学, 2013, 40 (6): 114-117.
- [22] Zou T B, Wang M, Gan R Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12 (5): 3006.
- [23] 周剑, 陈宏, 杨煌建, 等. 响应面法优化疏螺旋体素发酵培养基 [J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41 (5): 344-347.