

## 内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 产 Iturin A 摇瓶发酵条件优化

刘京兰 薛雅蓉\* 刘常宏

(南京大学 生命科学学院 医药生物技术国家重点实验室 江苏 南京 210093)

**摘要:**【目的】提高内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 发酵产抗菌脂肽 Iturin A 的产量。【方法】首先采用单因子实验研究了碳源、氮源、NaCl 浓度、pH、温度、转速和装液量等因子对 CC09 产 Iturin A 能力的影响, 然后对其中显著性因子: 氮源浓度、pH、温度及装液量 4 个因素进行正交实验, 进一步优化发酵条件。【结果】优化培养基组成及发酵条件可以提高 CC09 菌株的生长速度及产 Iturin A 的量, 其中可溶性淀粉以及一定比例的蛋白胨和酵母粉是 CC09 菌株产 Iturin A 的良好碳源和氮源; 培养温度、装液量、培养液 pH 等也对 CC09 菌株产 Iturin A 有显著影响。优化后的培养基成分: 可溶性淀粉(碳源)5 g/L、比例为 3:1 的胰蛋白胨酵母粉混合氮源 15 g/L、NaCl 1 g/L; 最佳培养条件: pH 6.0、28 °C、摇床转速 120 r/min、培养瓶装液量 20%。【结论】在此条件下, Iturin A 的产量可达到 690 mg/L, 较优化前的 138 mg/L 提高了 4 倍。

**关键词:** 内生细菌, 解淀粉芽孢杆菌, 液体发酵, 正交实验, Iturin A

## Optimization of shake flask-fermentation conditions for Iturin A production by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* CC09

LIU Jing-Lan XUE Ya-Rong\* LIU Chang-Hong

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

**Abstract:** [Objective] In order to improve the production of Iturin A from *Bacillus amyloliquefaciens* CC09. [Methods] We first investigate the alterative constitutes and their concentrations (various carbon and nitrogen sources), NaCl concentration and pH based on LB medium, and the cultural conditions in the flask including temperature, shaking speed, medium volume using single factor experiments. Based on the results obtained from the single factor experiments, four key factors, including nitrogen concentration, pH, temperature, and medium volume were further optimized using orthogonal experiment. [Results] Through the optimization of medium and cultural condition, the growth speed and Iturin A production of strain CC09 could be improved. Soluble starch and a suitable ratio of tryptone to yeast powder were respectively good carbon and nitrogen sources for strain CC09 to synthesize Iturin A. Moreover, cultural conditions including temperature, medium volume and pH had significant influences on the Iturin A

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31272081); 江苏省科技支撑计划农业部分项目(No. BE2011355, BE2012372)

\*通讯作者: Tel: 86-25-83685469; ✉: xueyr@nju.edu.cn

收稿日期: 2013-01-31; 接受日期: 2013-03-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

production of strain CC09. The optimal fermentation condition is as follow, medium composition is 5 g/L starch, 15 g/L tryptone and yeast powder mix (3:1, V/V), 1 g/L NaCl; cultural condition is pH 6.0, shaking speed 120 r/min, medium volume 20%, temperature 28 °C. **[Conclusion]** Under the optimal fermentation condition, the production of Iturin A of strain CC09 was up to 690 mg/L, 4 times higher than when it was cultured in LB medium (138 mg/L).

**Keywords:** Endophytic bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens*, Liquid fermentation, Orthogonal experiment, Iturin A

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是一种与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)亲缘性很高的细菌,在其自身的生长过程中可以产生一系列低分子量抗生素以及抗菌蛋白或多肽等活性代谢产物<sup>[1]</sup>,抑制多种植物病原菌的生长<sup>[2-8]</sup>;同时,还可以分泌一些植物激素类物质,促进植物生长<sup>[9]</sup>。本实验室2005年从樟树叶片中分离得到一株内生解淀粉芽孢杆菌CC09,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(保藏号:CGMCC No.4669)。该菌株具有广谱抗真菌活性,对大豆炭疽、立枯丝核和链格孢菌的抑制率分别为95%、85%和80%。盆栽试验证明该菌代谢产物对小麦白粉病及小麦赤霉病等植物病害有很高的防治作用。进一步的研究证明其抗真菌活性物质主要为Iturin A<sup>[10]</sup>。因此,解淀粉芽孢杆菌CC09菌株及其代谢产物有望开发为植物病害生防制剂,用于多种植物真菌和细菌病害的防治。

为了进一步提高CC09菌株发酵产抗菌脂肽的水平,本研究运用单因子试验和正交试验,优化解淀粉芽孢杆菌CC09的培养基成分和培养条件,为该生防菌株的产业化奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

本实验室前期从樟树叶片中分离并保存的解淀粉芽孢杆菌CC09<sup>[10]</sup>。

### 1.2 主要仪器和试剂

上海智城分析仪器制造公司生产的ZHWHY-1102恒温摇床,用于细菌的摇瓶发酵;北京莱伯泰科仪器有限公司生产的Bright LC高效液相色谱仪,用于Iturin A的定性和定量检测;瑞士

梅特勒公司的pH计(FE20),用于发酵液pH的实时检测;Iturin A标准品购自Sigma公司;蛋白胨、酵母粉等培养基成分购自MDBio, Inc公司;HPLC检测所用的乙腈、甲醇购自美国新天地公司;其它试剂均购自南京基天生物有限公司。

### 1.3 CC09菌株培养方法

采用摇瓶(250 mL)培养,每瓶装入培养基50 mL,接种1%的活化种子液,于36 °C、120 r/min培养36 h,取样检测其Iturin A含量和生物量。

### 1.4 脂肽类物质 Iturin A 定量检测

取发酵液1 mL,12 000 r/min离心10 min,弃沉淀,取上清,用甲醇稀释一倍后进行定量检测。

HPLC检测条件:参考方传记等<sup>[11]</sup>的方法对甲醇稀释液进行HPLC检测(C<sub>18</sub>, 250 mm×4.6 mm×5 μm, Lab Tech),流动相为乙腈:水(45:55, 体积比)等体积洗脱,流速为1 mL/min, Iturin A检测波长为220 nm。

### 1.5 CC09菌株生物量检测方法

取发酵液1 mL,12 000 r/min离心10 min,弃上清,沉淀于60 °C烘箱烘24 h后称重。

### 1.6 发酵时间确定

首先活化种子液(37 °C, 120 r/min, 24 h),然后按1%接种量接种到含50 mL LB培养基的250 mL三角瓶中,于37 °C、120 r/min培养,不同时间取样检测其生物量和Iturin A含量,初步确定最佳发酵时间。

### 1.7 发酵培养基成分的单因子筛选

CC09菌株种子培养基和基础发酵培养基均为LB培养基,组成为:10 g/L胰蛋白胨、5 g/L酵母粉、10 g/L NaCl。在基础培养基和37 °C、120 r/min

培养条件下, 研究不同营养成分及浓度对 Iturin A 合成的影响, 每个处理 3 个重复。

**1.7.1 碳源种类的选择:** 在 LB 基础培养液中原有成分不变的前提下, 分别添加 10 g/L 的葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉, 选择最佳碳源。

**1.7.2 碳源浓度的选择:** 根据 1.7.1 选出的最佳碳源, 在相同条件下考察其浓度(0、3、5、10、15、20、30、40 g/L)对产 Iturin A 及生物量的影响。

**1.7.3 氮源种类的选择:** 分别将 15.0 g/L 的胰蛋白胍、酵母粉、谷氨酸和水解酪蛋白作为单一氮源以及 1:1、2:1、3:1 的胰蛋白胍和酵母粉作为混合氮源加入到基础培养基中, 筛选最优氮源。

**1.7.4 氮源浓度的选择:** 根据 1.7.3 结果, 确定最佳氮源, 在保持基础培养基中其他成分不变的条件下, 研究氮源浓度(5、10、15、20、25、30、40 g/L)对产 Iturin A 及生物量的影响。

**1.7.5 NaCl 浓度的选择:** 通过改变基础培养基中 NaCl 浓度(1、3、5、10、15、20 g/L), 筛选出产 Iturin A 及生物量最大的盐浓度。

## 1.8 最佳培养条件的筛选

在 LB 基础培养基、接种量为 1% 和培养时间为 36 h 的条件下, 研究培养基 pH (5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 9.0)、培养温度(24、28、32、36 和 40 °C)、转速(80、100、120、150 和 180 r/min) 和装液量(25、50、75、100 和 125 mL)对 CC09 产 Iturin A 及生物量的影响。每个处理做 3 个重复。

## 1.9 正交试验

根据单因子实验结果, 选择对 Iturin A 产量影响显著的氮源浓度、pH、温度、装液量为考察因素, 按正交试验表  $L_9(3^4)$  设计 4 因素、3 水平的正交实验(表 2), 比较各种发酵条件组合对 CC09 菌株产 Iturin A 能力的影响。其他条件: 可溶性淀粉 5 g/L, NaCl 1 g/L, 接种量 1%, 转速 120 r/min。

## 1.10 数据分析方法

用 GraphPad Prism 5.0 软件, 对实验数据进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵时间的确定

与生长相比, CC09 菌株合成 Iturin A 具有明显的滞后效应, 约 7 h 进入稳定生长期, 但 Iturin A 的产生在 15–24 h 进入了一个快速增长期, 24 h 以后缓慢增长, 在 36 h 时达到了最高值 139 mg/L, 之后没有显著的增减(图 1)。据此, 初步确定在 LB 培养基中, CC09 菌株发酵产 Iturin A 的最佳时间为 36 h。

### 2.2 单因素试验

**2.2.1 碳源种类的筛选:** 由图 2 可见, 不同碳源对 Iturin A 产量影响很大 ( $P < 0.05$ ), 与对照组 (70.9 mg/L) 相比, 其中可溶性淀粉组 (180.2 mg/L) 和半乳糖组 (131.8 mg/L) 能显著促进 Iturin A 的产生; 甘露糖组则对 Iturin A 的产量没有显著影响 ( $P > 0.05$ ); 葡萄糖 (38.6 mg/L)、果糖 (24.5 mg/L)、蔗糖 (15.5 mg/L) 以及麦芽糖组 (23.8 mg/L) 显著降低了 Iturin A 的产量 ( $P < 0.05$ )。

不同碳源同样也显著影响 CC09 菌株的生长, 其中葡萄糖、果糖、半乳糖、可溶性淀粉组的生物量显著高于空白对照, 而其他碳源对其生物量无显著影响。

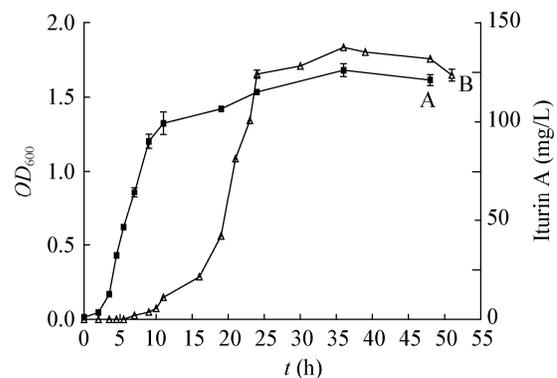


图 1 CC09 菌株的生长曲线及其产 Iturin A 过程

Figure 1 Growth curve and Iturin A production course of CC09 strain

注: A: 生长曲线 ( $OD_{600}$ ); B: Iturin A 产量曲线 (mg/L).

Note: A: Growth curve ( $OD_{600}$ ); B: Iturin A production curve (mg/L).

根据生物量和 Iturin A 产量,可以得出可溶性淀粉为 CC09 菌株产 Iturin A 的最佳碳源。

**2.2.2 可溶性淀粉浓度的优化:**不同浓度的可溶性淀粉对 CC09 菌株 Iturin A 产量和生物量有显著影响(图 3),随着可溶性淀粉浓度的增加,CC09 菌株的生物量和 Iturin A 产量都随之增加,5 g/L 时达到最大生物量(5.1 g/L)和最高 Iturin A 产量(240.8 mg/L)。之后,随着可溶性淀粉浓度的进一

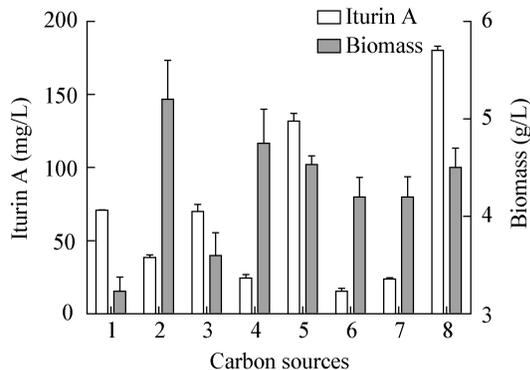


图 2 不同碳源对 CC09 菌株合成 Iturin A 产量及生物量的影响

Figure 2 Effect of different carbon sources on Iturin A production and the biomass of CC09 strain

注: 1: CK; 2: 葡萄糖; 3: 甘露糖; 4: 果糖; 5: 半乳糖; 6: 蔗糖; 7: 麦芽糖; 8: 可溶性淀粉。

Note: 1: CK; 2: Glucose; 3: Mannose; 4: Fructose; 5: Galactose; 6: Sucrose; 7: Maltose; 8: Soluble starch.

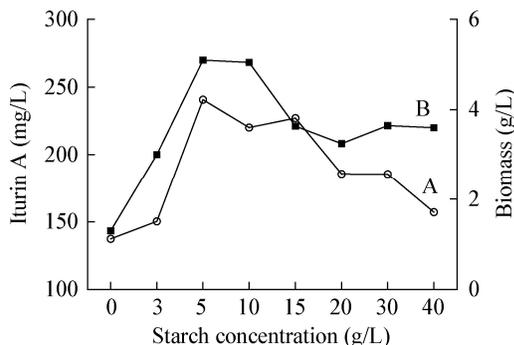


图 3 可溶性淀粉浓度对 CC09 菌株合成 Iturin A 产量(A)及生物量(B)的影响

Figure 3 Effect of soluble starch concentration on Iturin A production (A) and the biomass (B) of CC09 strain

步增加,CC09 菌株的生物量反而下降,最终达到一个稳定水平(3.7 g/L);而 Iturin A 的产量则随浓度的增加而持续降低,40 g/L 时的 Iturin A 产量(157.0 mg/L)仅为 5 g/L 时(240.8 mg/L)的 65%。因此,5 g/L 是 CC09 菌株发酵产 Iturin A 的最佳可溶性淀粉浓度。

**2.2.3 氮源的筛选:**从图 4 可以看出,不同氮源显著影响了 Iturin A 的产量( $P < 0.05$ )。其中胰蛋白胍:酵母粉为 3:1 最高(246.7 mg/L),是对照组(胰蛋白胍:酵母粉为 2:1)的 1.47 倍;其次是胰蛋白胍:酵母粉为 1:1 和 2:1 组以及胰蛋白胍和酵母粉组,平均 Iturin A 产量为 149.0 mg/L;而以酪蛋白和谷氨酸作为唯一氮源,抑制了 CC09 菌株合成 Iturin A, Iturin A 的产量分别为 36.2 mg/L 和 4.6 mg/L。然而,对于生物量的影响,除胰蛋白胍:酵母粉为 1:1 处理组显著低于其它氮源,其它氮源对 CC09 菌株生物量没有显著影响( $P > 0.05$ )。基于不同氮源对 CC09 菌株生长及 Iturin A 合成的影响,选择最佳氮源为 3:1 的蛋白胍与酵母粉混合物。

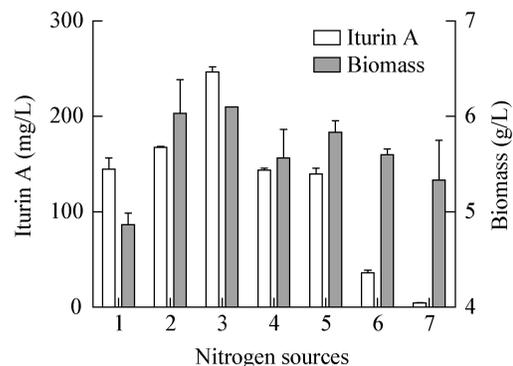


图 4 不同氮源对 CC09 菌株合成 Iturin A 产量及生物量的影响

Figure 4 Effect of different nitrogen sources on Iturin A production and the biomass of CC09 strain

注: 1: 胰蛋白胍:酵母粉(1:1); 2: 胰蛋白胍:酵母粉(2:1)为对照; 3: 胰蛋白胍:酵母粉(3:1); 4: 胰蛋白胍; 5: 酵母粉; 6: 酪氨酸; 7: 谷氨酸。

Note: 1: Tryptone: Yeast powder (1:1); 2: Tryptone: Yeast powder (2:1); 3: Tryptone: Yeast powder (3:1); 4: Tryptone; 5: Yeast powder; 6: Casein; 7: Glutamic acid.

**2.2.4 最佳氮源浓度的优化:** 根据 2.2.3 的研究结果, 选择 3:1 的蛋白胨与酵母粉混合物氮源培养 CC09 菌株, 其生物量随着浓度的提高而增大, 20 g/L 的生物量最大, 而其产生 Iturin A 的量则在 10 g/L 时达到最大(225.5 mg/L), 之后逐渐降低(图 5)。基于 Iturin A 的产量以及菌体生物量, 确定 CC09 菌株培养的最佳氮源浓度为 10 g/L。

**2.2.5 最佳 NaCl 浓度的筛选:** NaCl 浓度对 CC09 菌株产 Iturin A 能力和生物量都有显著影响(图 6)。Iturin A 的产量随其浓度的提高而持续下降 ( $P<0.05$ ), 当浓度在 1 g/L 时 Iturin A 的产量为 202.2 mg/L, 10 g/L 时 Iturin A 的产量下降为 157.7 mg/L, 当其浓度为 20 g/L 时 Iturin A 的产量更是低至 82.4 mg/L。并且 CC09 菌株的生物量在低盐浓度(1–5 g/L)下显著高于高盐浓度(10–20 g/L) ( $P<0.05$ )。因此, CC09 菌株发酵产 Iturin A 的最佳盐浓度为 1 g/L。

**2.2.6 最佳初始 pH 的筛选:** 基础培养液初始 pH 值对 CC09 菌株生长和产 Iturin A 的量影响显著(表 1)。对菌体生长而言, 偏碱性培养环境更有利于该菌生长, 在 pH 9.0 时的生物量达到最高值 5.7 g/L。然而 Iturin A 最高产量(195.0 mg/L)出现在 pH 6.0, 低于或高于该 pH 值, Iturin A 的产量则显著降低。因此, CC09 菌株发酵产 Iturin A 的最佳 pH 为 6.0。

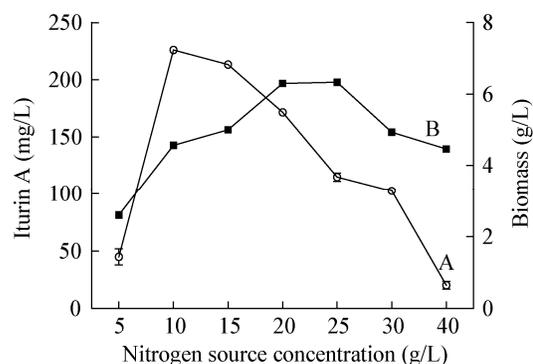


图 5 氮源浓度对 CC09 菌株合成 Iturin A 产量(A)及生物量(B)的影响

Figure 5 Effect of nitrogen source concentration on Iturin A production (A) and biomass (B) of CC09 strain

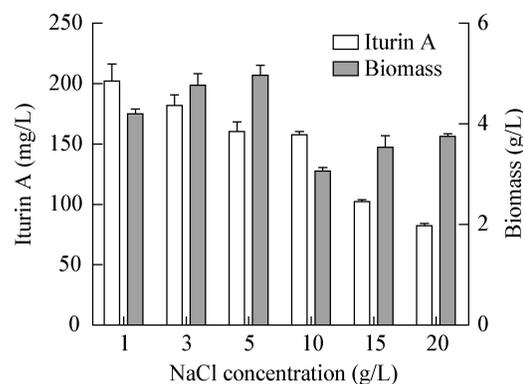


图 6 盐浓度对 CC09 菌株合成 Iturin A 产量及生物量的影响

Figure 6 Effect of NaCl concentration on Iturin A production and biomass of CC09 strain

表 1 初始 pH 对 CC09 菌株生物量及合成 Iturin A 的影响

Table 1 Effect of initiate pH value on the biomass and Iturin A production of CC09 strain

pH	Iturin A 含量 Iturin A production (mg/L)	生物量 Biomass (g/L)
5.0	165.8±3.3ab	3.7±0.2a
6.0	195.0±9.3a	4.2±0.4b
6.5	147.7±6.1b	4.8±0.2ab
7.0	138.1±9.6b	4.8±0.2ab
7.5	136.9±11.1b	5.1±0.3ab
8.0	135.2±0.4b	5.2±0.2ab
9.0	0±0c	5.7±0.4a

注: a、b、c、d 和 e 代表各因子对 CC09 生物量或 Iturin A 产量方差分析 ( $P<0.05$ ) 的 Duncans' 新复极差检验结果。

Note: Columns with different letters on behalf of the significance of analysis of Variance ( $P<0.05$ ).

**2.2.7 最佳培养温度的筛选:** 在 32 °C 发酵条件下, CC09 菌株的生物量(5.9 g/L)和 Iturin A 产量(292.0 mg/L)均最高, 低于或高于此温度, 均不利于 CC09 菌株合成 Iturin A (图 7)。因此, CC09 菌株发酵合成 Iturin A 的最佳温度为 32 °C。

**2.2.8 最佳转速的筛选:** 在发酵培养 CC09 菌株时, 120 r/min 的摇床转速对菌体生长和 Iturin A 生成都是最有利的, 均达到最高值(图 8), 分别为 8.4 g/L 和 167.9 mg/L。转速高于或低于 120 r/min, CC09 菌株的生物量和 Iturin A 的产量均显著下降( $P < 0.05$ )。

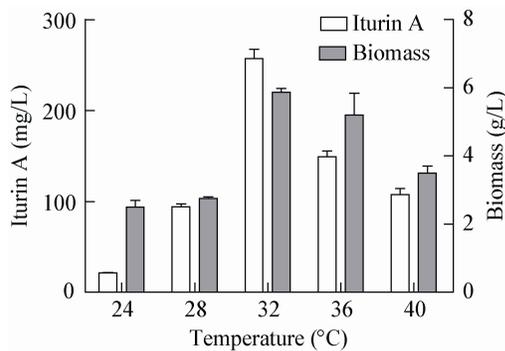


图 7 温度对 CC09 菌株合成 Iturin A 产量及生物量的影响

Figure 7 Effect of temperature on Iturin A production and the biomass of CC09 strain

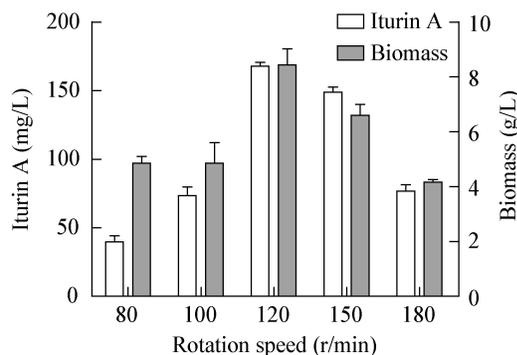


图 8 转速对 CC09 菌株合成 Iturin A 产量及生物量的影响

Figure 8 Effect of rotation speed on Iturin A production and the biomass of CC09 strain

**2.2.9 最佳装液量的筛选:** 装液量对 CC09 菌株的生物量没有显著影响( $P > 0.05$ ), 但对合成 Iturin A 有显著影响(图 9), 最佳装液量为 250 mL 摇瓶中装 50 mL, 少于或多于该装液量, 均会显著降低 CC09 菌株合成 Iturin A 的产量( $P < 0.05$ )。

### 2.3 正交试验设计及结果

根据上述单因素试验结果, 各因素对 CC09 菌株生物量及合成 Iturin A 都有影响, 但影响较显著的因子主要有氮源浓度(A)、pH (B)、温度(C)和装液量(D)。为此, 我们采用  $L_9(3^4)$  正交表, 设计了 4 因素 3 水平的正交试验, 以进一步确定影响 CC09 菌株发酵产生 Iturin A 各因子的最佳配比, 结果见表 2。

$R$  值(极差)的大小次序( $R_C > R_A > R_B > R_D$ )表明, 影响 CC09 菌株发酵生产 Iturin A 的因子强度由强到弱依次为培养温度、氮源浓度、pH 值和装液量。培养温度是左右 CC09 菌株发酵生产 Iturin A 的最重要因子(表 2)。

$K$  值大小可以反映每个因素在 3 个不同水平中产 Iturin A 能力。从 4 个因素各自的  $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$  中, 选择最大值, 可以获得每个因素的最优水平; 每个因素的最优水平组合在一起便得到四因素的最优组合。因此, 结合  $K$  值, 适合 CC09 菌株发酵生产 Iturin A 的最优组合为: 蛋白胨/酵母粉 15 g/L (3:1), 培养液 pH 6.0, 培养温度 28 °C, 装液量 20%。

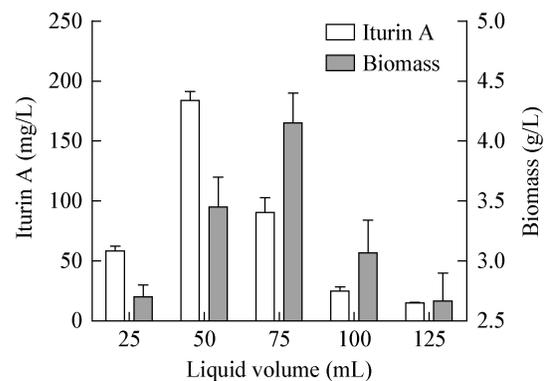


图 9 装液量对 CC09 菌株合成 Iturin A 产量及生物量的影响

Figure 9 Effect of liquid volume on Iturin A production and the biomass of CC09 strain

表 2 正交试验  $L_9(3^4)$  结果及极差分析  
Table 2 The analysis of range and result of orthogonal experiment

实验号 Medium No.	因素 Factors				Iturin A (mg/L)
	N 源浓度 Nitrogen concentration (g/L)	pH	温度 Temperature (°C)	装液量 Medium volume (%)	
	A	B	C	D	
1	1 (5)	1 (5.0)	1 (28)	1 (10)	72.85
2	1 (5)	2 (6.0)	2 (32)	2 (20)	57.28
3	1 (5)	3 (7.0)	3 (36)	3 (30)	35.90
4	2 (10)	1 (5.0)	2 (32)	3 (30)	34.42
5	2 (10)	2 (6.0)	3 (36)	1 (10)	56.83
6	2 (10)	3 (7.0)	1 (28)	2 (20)	218.54
7	3 (15)	1 (5.0)	3 (36)	2 (20)	63.17
8	3 (15)	2 (6.0)	1 (28)	3 (30)	218.94
9	3 (15)	3 (7.0)	2 (32)	1 (10)	57.20
$K_1$	166.00	170.41	510.29	186.84	$\sum M=815.08745$
$K_2$	309.78	333.05	148.90	338.99	
$K_3$	339.30	311.63	155.90	289.26	
R	173.30	162.64	361.40	152.15	

## 2.4 优化培养条件下的 Iturin A 产量

结合单因子实验和正交实验结果, 确定 CC09 菌株产 Iturin A 的最优条件为: 可溶性淀粉(碳源) 5 g/L、3:1 蛋白胨酵母粉混合氮源 15 g/L、NaCl 1 g/L、pH 6.0、28 °C、摇床转速 120 r/min、接种量 1%、装液量为 50 mL/250 mL。用该优化发酵条件培养 CC09 菌株, 其生产 Iturin A 的水平较优化前的 LB 培养基大为提高, 由优化前的 138 mg/L 提高至 690 mg/L, 提高了 4 倍。

## 3 讨论

芽孢杆菌产生的脂肽类抗菌物质主要有 3 类: 表面活性素(Surfactin)、伊枯草菌素(Iturin)和芬芥素(Fengycin)。其中 Iturin A 抗菌活性较强, 是防治植物病害的主要成分<sup>[12]</sup>。抗菌脂肽的合成途径为非核糖体途径, 由多酶复合物催化合成, 环境因素对抗菌脂肽合成的影响很大<sup>[13-14]</sup>。有研究表明, 优化解淀粉芽孢杆菌发酵培养液及发酵条件可以提高菌体的生长速度<sup>[15-16]</sup>、抗菌活性物质的产量及防效<sup>[17-20]</sup>。因此, 本研究将 Iturin A 的产生量作为

主要考量指标, 从碳源、氮源种类及含量、氯化钠含量、培养基初始 pH 值、温度、转速及装液量、发酵时间等方面对解淀粉芽孢杆菌 CC09 菌株发酵条件进行了优化。

通过单因子实验发现, 温度、转速、碳源浓度及 pH 等因素对 CC09 菌株生物量的影响比较大; 而温度、氮源浓度、pH、装液量等因素对该菌株的 Iturin A 产量影响比较大(根据极差大小)。有关可溶性淀粉, 发酵温度对解淀粉芽孢杆菌产 Iturin A 的影响基本上与相关报道一致<sup>[18-20]</sup>。

各因素对 CC09 菌株生物量和 Iturin A 产量的影响并不一致。这样的结果不矛盾, 因为在不同环境下菌株产 Iturin A 的能力会受到影响, 所以菌体浓度大时不一定产 Iturin A 的量就高, 因此, 把握最佳的发酵条件是非常重要的。

利用正交表进行正交试验设计是研究多因素多水平的一种科学的试验设计方法, 可研究多因素、多水平的交互作用。因此, 本研究在单因子实验的基础上, 还通过正交实验对影响 Iturin A 合成的主要因子水平及其交互作用进行优化和统计分

析,筛选出了优化组合。优化后的解淀粉芽孢杆菌CC09菌株的IturinA产量较优化前有了显著提高,为进一步的工业发酵提供了参考依据。

## 参 考 文 献

- [1] 杨福廷. 脂肽类生物表面活性剂研究进展[J]. 精细化工, 2006, (2): 121-125.
- [2] 王军华, 权春善, 徐洪涛. 解淀粉芽孢杆菌 Q12抗真菌特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 47-49.
- [3] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 7-12.
- [4] 别小妹, 陆兆新, 吕凤霞, 等. *Bacillus subtilis* fmbR 抗菌物质的分离和鉴定[J]. 中国农业科学, 2006, 39(11): 2327-2334.
- [5] 郝建安, 曹志辉, 赵凤梅, 等. 解淀粉芽孢杆菌 NK10. BAhjaWT 抑真菌作用的研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 903-908.
- [6] 田洁萍, 王玉霞, 张淑梅. 解淀粉芽孢杆菌防治水稻恶苗病效果初报[J]. 黑龙江科学, 2010, 4(10): 10-14.
- [7] 王德培, 孟慧, 管叙龙, 等. 解淀粉芽孢杆菌 BI2的鉴定及其对黄曲霉的抑制作用[J]. 天津科技大学学报, 2010, 25(6): 5-9.
- [8] 陈成, 崔堂兵, 于平儒. 一株抗真菌的解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其抗菌性研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(1): 36-39.
- [9] 邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN 21抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报, 2012, 40(2): 202-209.
- [10] 刘常宏, 双惊雷, 薛雅蓉, 等. 一种防治植物病害的杀菌及其制备方法[P]. 中国, ZL201110073773.9, 2011-3-25.
- [11] 方传纪, 陆兆新, 孙力军, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌脂肽发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 533-539.
- [12] 侯红漫, 靳艳, 金美芳, 等. 环脂肽类生物表面活性剂结构、功能及生物合成[J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 122-126.
- [13] Ohno A, Aao T, Shoda M. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, Iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 80: 517-519.
- [14] Akpa E, Jacques P, Wathelet B, et al. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, 93: 551-561.
- [15] 车晓曦, 李社增, 李校堃. 1株解淀粉芽孢杆菌发酵培养基的设计及发酵条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(18): 9402-9405.
- [16] 郭龙涛, 邱思鑫, 蔡学清, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 TB2液体发酵条件的研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(2): 259-264.
- [17] 孙力军, 陆兆新, 别小妹, 等. 培养基对解淀粉芽孢杆菌 ES-2菌株产抗菌脂肽的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(10): 3389-3398.
- [18] 刘新涛, 刘玉霞, 邓建良, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN21发酵条件的优化[J]. 河南农业科学, 2009, 10: 102-104.
- [19] 信珊珊, 祁高富, 朱发银, 等. 1株解淀粉芽孢杆菌发酵条件的优化及其对油茶炭疽病的防效[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 411-415.
- [20] 丁立孝, 何国庆, 栾明川, 等. 脂肽生物表面活性剂摇瓶发酵条件的研究[J]. 中国食品学报, 2005, 5(1): 10-15.