

拮抗链霉菌 S24 发酵培养基的优化及其对黄曲霉的抑菌作用

周启升¹, 刘训理¹, 张楠², 宋振², 仇念全¹, 张本峰¹, 国辉², 吕常旭¹, 于建¹

1 山东农业大学林学院, 泰安 271018

2 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018

摘要: 拮抗链霉菌 S24 对黄曲霉、赭曲霉、黑曲霉等粮食和饲料中常见的曲霉菌具有广谱抗性。优化了该菌株抗菌物质高产发酵培养基配方, 并分析该菌株产生的抗真菌物质对黄曲霉的抑菌作用。通过单次单因子试验、正交试验, 对 S24 菌株抗菌物质的发酵培养基进行了优化, 利用显微镜观察, 研究了 S24 菌株产生的抗菌物质对黄曲霉菌丝及孢子的抑制作用。获得适合 S24 菌株抗菌物质产生的最佳培养基配方为: 淀粉 10 g、葡萄糖 40 g、黄豆饼粉 24 g、酵母浸膏粉 8 g、KH₂PO₄ 4 g、CaCO₃ 0.8 g、水 1 L。优化后的发酵培养基发酵液效价达到 10 235.45 μg/mL, 比基础培养基提高了 280.67%; S24 菌株产生的抗菌物质能够有效抑制黄曲霉菌丝的生长及孢子的萌发, 抗菌物质作用于菌丝后, 菌丝出现变粗、扭曲、皱褶、膨大、内容物流出、消融等现象; 作用于黄曲霉孢子后, 孢子出现聚集、内容物分布不均、变形、空腔及孢壁断裂等异常。

关键词: 链霉菌, 发酵, 培养基优化, 抑菌作用

Medium optimization for antagonistic *Streptomyces* S24 and its inhibition on *Aspergillus flavus*

Qisheng Zhou¹, Xunli Liu¹, Nan Zhang², Zhen Song², Nianquan Qiu¹, Benfeng Zhang¹, Hui Guo², Changxu Lü¹, and Jian Yu¹

1 College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

2 College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

Abstract: *Streptomyces* S24 has broad spectrum against *Aspergillus* spp. in food and feed, such as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus alutacells*. The objective of this study was to improve the production of antifungal substances produced by S24 and to test their inhibitory effects on *Aspergillus flavus*. By using one-factor-at-a-time experiment and orthogonal design method, we optimized the fermentation medium. The composition of an optimized medium for the production of antifungal substances contained (g/L): starch soluble, 10; Glucose, 40; yeast extract, 8; soybean powder, 24; KH₂PO₄ 4; and CaCO₃ 0.8. As a result, the productivity of antifungal substances could reach to 10 235.45 μg/mL, and this value was 2.81 times higher than that of initial

medium before optimization. Additionally, inhibitory effects of the products on *Aspergillus flavus* were analyzed. Antagonistic tests indicated that the antifungal substances greatly inhibited mycelium growth and spores germination of *Aspergillus flavus*. We observed through microscope that the mycelia grew abnormally, such as contorting, bulging, vacuole increasing and the cytoplasmic contents inside effusing and the spores appeared unusual, such as gathering, deforming, cytoplasmic contents inside effusing and fracturing.

Keywords: *Streptomyces*, fermentation, medium optimization, inhibitory effect

黄曲霉 *Aspergillus flavus* 属于曲霉属真菌, 是很多作物的腐生菌或致坏死病原菌, 依靠产生的分生孢子和菌核在作物中交叉感染, 侵染粮食、油料作物的种子、各种食品和饲料等, 导致农作物减产, 威胁人、畜和禽类健康。黄曲霉最大的危害是产生黄曲霉毒素 (Aflatoxins), 黄曲霉毒素具有很强的毒性, 被认为有致癌性、致突变、致畸性、抑制免疫力, 并可引起肝部损伤等危害, 其中毒性最大的黄曲霉毒素 B1, 其毒性为氰化钾的 10 倍、砒霜的 68 倍^[1-2]。许多国家都限定了食品和饲料中黄曲霉毒素的最高含量, 欧盟规定农作物中的黄曲霉毒素 B1 的含量不得高于 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 总毒素含量不高于 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3], 因此如何有效地防治黄曲霉及其毒素的产生具有十分重要的理论和现实意义。以往防治黄曲霉及其毒素污染的方法主要是用物理、化学和生物学方法防止黄曲霉的生长及清除食品中已污染的毒素, 这些方法不仅成本高, 而且效果并不理想^[4]。目前国内外相关研究主要集中在对黄曲霉的生物防治, 包括从植物或微生物中提取抗菌物质抑制黄曲霉生长或产毒, 以及利用微生物的竞争、拮抗作用抑制黄曲霉生长或者对黄曲霉毒素进行降解^[5]。从食品安全角度考虑利用微生物之间的拮抗作用, 探索生物控制方法以预防黄曲霉的生长与产毒具有重要意义。

拮抗链霉菌 S24 由本实验室从泰山林地土壤中分离获得, 该菌株对黄曲霉、赭曲霉、黑曲霉等粮食和饲料中常见的曲霉菌具有较强的拮抗作用, 该菌株鉴定为白网链霉菌 *Streptomyces albireticuli* 近似种, 已在 GenBank 注册, 注册号为 FJ596182。该菌株产生的抗菌物质粗物对黄曲霉的最低抑菌浓度为 19.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[6]。初步研究发现该抗菌物质为一组

多烯大环内酯类抗生素, 性质稳定且提取方法简单, 大孔吸附树脂 AB-8 对其有较大的吸附量, 且容易吸附解吸^[7]。抗菌物质经有机溶剂抽提、硅胶柱层析、反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分离共获得 2 种四烯大环内酯类抗生素, 6 种五烯大环内酯类抗生素。本研究对 S24 菌株产生的抗菌物质的发酵培养基进行了优化, 并研究了抗菌物质对黄曲霉抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

S24 菌株由本实验室分离鉴定。现已保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会, 专利菌种保藏编号为 CGMCC 3503。抗菌物质效价测定指示菌: 黄曲霉 *Aspergillus flavus* 由国家粮食局科学研究院提供。

1.1.2 培养基

S24 菌株活化培养基: 土豆 200 g, 葡萄糖 20.0 g, NH_4NO_3 1.0 g, 硫酸镁 1.0 g, KH_2PO_4 0.6 g, 琼脂 16.0 g, 水 1 L; 发酵基础培养基: 淀粉 2.5 g, 葡萄糖 16.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 玉米浆 1.0 g, NaCl 7.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0 g, 水 1 L; 种子发酵培养基同基础培养基; 发酵液效价生测培养基同菌株活化培养基。

1.1.3 主要仪器

SPX 型智能生化培养箱 (江南仪器厂); 光学显微镜 (Olympus); HZQ-F160 全温振荡培养箱 (太仓仪器厂); 台式高速冷冻离心机 (Heraeus)。

1.2 S24 菌株摇瓶培养及抗菌物质粗物的制备

种子液的制备: 将 S24 斜面菌种接种到活化培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d, 用打孔器打取菌块 2 个接种到种子培养基中, 200 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 24 h。

摇瓶培养条件: 培养基 121 °C 湿热灭菌 20 min, 种子液以 2% 的接种量接种到 50 mL/250 mL 三角瓶中, 200 r/min、30 °C 振荡培养 72 h。

抗菌物质粗物的制备: 发酵液 100 °C 灭菌 10 min, 低速大容量多管离心机 4 200 r/min 离心 30 min, 上清液经大孔吸附树脂 AB-8 吸附后, 85% 丙酮解吸, 解吸液经旋转蒸发、冷冻干燥得到抗菌物质粗物^[11]。

1.3 发酵液效价的测定

黄曲霉孢子悬液的制备: 黄曲霉在 PDA 培养基上 28 °C 培养 5 d 后, 用 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液 (PBS) 将孢子从培养基上洗下, 经漩涡混合器振荡 20~40 s, 双层无菌纱布过滤, 4 °C 保存备用。

生测平板的制备: 生测培养基融化后, 温度降至 50 °C~55 °C 时, 加入黄曲霉孢子悬液, 使孢子的浓度为 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ CFU/mL, 将培养基孢子悬液倒入培养皿, 20 mL/培养皿, 制备混菌平板。

发酵液效价的测定: 采用牛津杯法^[8]。发酵液 100 °C 灭菌 10 min, 加入牛津杯中 (250 μ L/孔), 28 °C 培养 18 h, 十字交叉法测量抑菌圈直径, 根据抑菌圈的直径大小计算其效价, 发酵液效价计算公式^[7]: $y = 10^{(x+10.931)/10.797} \times n$ [y: 发酵液效价 (μ g/mL); x: 抑菌圈直径 (10.5 mm < x < 18.0 mm); n: 稀释倍数]。

1.4 发酵培养基的优化

1.4.1 不同有机氮源对发酵液效价的影响

用蛋白胨、酵母粉、牛肉浸膏、黄豆饼粉、玉米浆、尿素 6 种有机氮源代替基础培养基中的有机氮源, 浓度分别为 0.8%、1.6%、0.8%、1.6%、1.6% 和 0.2%, 其他培养基组成同基础培养基, 以不加有机氮源的培养基 (CK₁) 及基础培养基 (CK₂) 作为对照, 每个处理 2 个重复。测定发酵液效价, 比较不同有机氮源对发酵液效价的影响。

1.4.2 不同无机氮源对发酵液效价的影响

用 (NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、NaNO₃、NH₄Cl 4 种无机氮源代替基础培养基中的无机氮源, 浓度分别为 0.8%、0.48%、0.32% 和 1.0% (氮素含量基本相

同), 以 1.4.1 筛选出的最佳有机氮源组合作为发酵培养基有机氮源, 其他培养基组成同基础培养基, 以不加无机氮源的培养基作为对照, 每个处理 2 个重复。测定发酵液效价, 比较不同无机氮源对发酵液效价的影响。

1.4.3 不同碳源对发酵液效价的影响

用葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、淀粉、玉米粉、甘露糖 7 种碳源代替基础培养基中的碳源, 浓度均为 2.0%, 以筛选出的最佳氮源作为发酵氮源, 其他的培养基组成同基础培养基, 以不加碳源的培养基作为对照, 每个处理 2 个重复。测定发酵液效价, 比较不同碳源对发酵液效价的影响。

1.4.4 不同 C/N 比对发酵液效价的影响

以 1.4.1~1.4.3 筛选出的最佳碳源 (淀粉、葡萄糖) 和氮源 (黄豆饼粉、酵母浸膏粉) 为因素, 每个因素设 4 个水平, 采用 L₁₆(4⁵) 正交试验, 对碳、氮源的浓度进行优化, 其中各因素及水平见表 1, 其他的培养基组成同基础培养基, 每个处理 2 个重复。测定发酵液效价。利用 SAS9.0 软件对数据进行分析, 比较不同碳、氮源浓度对发酵液效价的影响。

表 1 L₁₆(4⁵) 正交试验中因素与水平的设置

Table 1 Arrangement of factors and levels of orthogonal L₁₆(4⁵)

Levels	Factors			
	Starch soluble (%)	Glucose (%)	Yeast extract (%)	Soybean powder (%)
1	0.5	1.0	0.4	1.0
2	1.0	2.0	0.8	2.0
3	1.5	3.0	1.2	3.0
4	2.0	4.0	1.6	4.0

1.4.5 不同无机盐对发酵液效价的影响

考察 4 种无机盐 CaCO₃、MgSO₄、KH₂PO₄、NaCl 对发酵液效价的影响。根据正交表 L₁₆(4⁵) 进行正交试验设计, 其因素与水平的设置见表 2, 每个处理 2 个重复。测定发酵液效价, 比较不同无机盐对发酵液效价的影响。

表2 $L_{16}(4^5)$ 正交试验中因素与水平的设置Table 2 Arrangement of factors and levels of orthogonal $L_{16}(4^5)$

Levels	Factors			
	CaCO ₃ (%)	MgSO ₄ (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	NaCl (%)
1	0.1	0.05	0.05	0.1
2	0.2	0.10	0.10	0.2
3	0.4	0.20	0.20	0.4
4	0.8	0.40	0.40	0.8

1.4.6 无机盐营养限制试验

根据无机盐的正交试验结果, 得到对发酵液效价影响显著的无机盐及其最佳水平, 在此基础上进行无机盐的营养限制试验, 进一步探讨不同的无机盐及其组合对发酵液效价的影响, 从中选择出影响最敏感的因素, 每个处理 2 个重复, 方法参照文献[9]。

1.4.7 发酵培养基的正交优化

选取对发酵液效价影响显著的培养基因素, 采用正交表 $L_{27}(3^{13})$ 进行正交试验设计, 试验因素与水平的设置分别见表 3, 每个处理 2 个重复。测定发酵液效价, 比较不同因素对发酵液效价的影响, 筛选最佳发酵培养基。

表3 $L_{27}(3^{13})$ 正交试验中因素与水平的设置Table 3 Arrangement of factors and levels of orthogonal $L_{27}(3^{13})$

Levels	Factors					
	Starch soluble (%)	Glucose (%)	Yeast extract (%)	Soybean powder (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	CaCO ₃ (%)
1	1.0	3.2	0.8	1.8	0.2	0.08
2	1.5	4.0	1.0	2.4	0.4	0.12
3	2.0	4.8	1.2	3.0	0.6	0.16

1.4.8 发酵配方的验证

优化后的发酵培养基和基础培养基在相同的发酵条件下发酵, 每个处理 2 个重复。测定发酵液效价, 比较优化前后发酵培养基对发酵液效价的影响, 验证发酵配方。

1.5 S24 菌株及抗菌物质对黄曲霉的抑制作用

1.5.1 S24 菌株抗菌物质粗物对黄曲霉孢子的影响

取 $4 \times \text{MIC}$ 抗菌物质粗物处理 8、16、24 h 的黄曲霉孢子悬液, 用显微镜观察孢子形态, 以未加抗

菌物质粗物的孢子悬液为对照。

1.5.2 S24 菌株对黄曲霉菌丝形态的影响

将黄曲霉菌盘接种在平板中央, 在距中央 2 cm 处接种 S24 菌株, 28 °C 培养 96 h 后, 挑取拮抗圈边缘的菌丝镜检, 以正常生长的菌丝为对照, 观察黄曲霉菌丝的形态变化。

2 结果与分析

2.1 不同氮源对发酵液效价的影响

2.1.1 不同有机氮源对发酵液效价的影响

蛋白胨、牛肉膏、玉米浆、黄豆饼粉、酵母粉和尿素 6 种有机氮源对抗菌物质产量的影响见图 1。当培养基中不添加有机氮源时 (CK₁), 发酵液的效价小于 500 U。说明有机氮源对抗菌物质的产生有明显的影响。以黄豆饼粉、酵母粉和牛肉膏作为氮源时, 发酵液效价较高; 蛋白胨和尿素作为氮源时, 发酵液效价都较低, 而以玉米浆作为有机氮源添加时检测不到抗菌物质的产生。另外培养基中只添加一种有机氮源时发酵液效价均低于基础培养基 (CK₂)。说明, S24 菌株对氮素营养有较高的要求, 因此选择产素水平较高的黄豆饼粉和酵母粉的混合有机氮源作为发酵培养基最佳氮源。

2.1.2 不同无机氮源对发酵液效价的影响

(NH₄)₂SO₄、NaNO₃、NH₄Cl、NH₄NO₃ 4 种无机氮源发酵液效价的影响见图 2。添加任意一种无机氮源时效价均低于 CK, 因此发酵培养基中不再添加无机氮源。

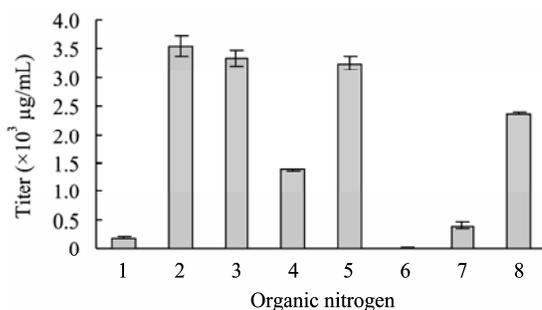


图1 不同有机氮源对发酵液效价的影响

Fig. 1 Effect of different organic nitrogen on titer of fermentation broth. 1: CK₁; 2: CK₂; 3: soybean powder; 4: peptone; 5: yeast extract; 6: corn plasm; 7: urea; 8: beef extract.

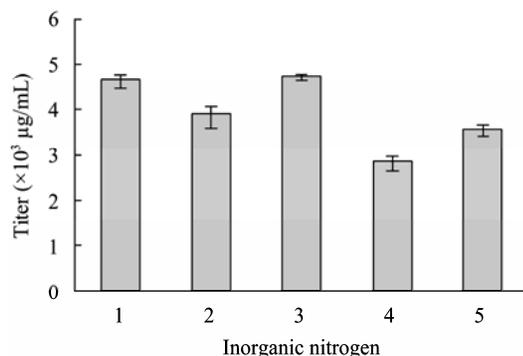


图2 不同无机氮源对发酵液效价的影响

Fig. 2 Effect of different inorganic nitrogen on titer of fermentation broth. 1: CK; 2: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3: NaNO_3 ; 4: NH_4Cl ; 5: NH_4NO_3 .

2.2 不同碳源对发酵液效价的影响

葡萄糖、蔗糖、乳糖、淀粉、玉米粉、麦芽糖、甘露糖 7 种碳源对发酵液效价的影响见图 3。7 种不同碳源对发酵液效价的影响有明显差别。当培养基中不加碳源时 (图中 CK) 发酵液的效价最低, 说明碳源对 S24 菌株产生抗菌物质起着非常重要的作用。以葡萄糖为碳源时发酵液效价最高; 以缓效碳源淀粉作为碳源时发酵液效价也较高。因此, 选择淀粉和葡萄糖作为复合碳源。

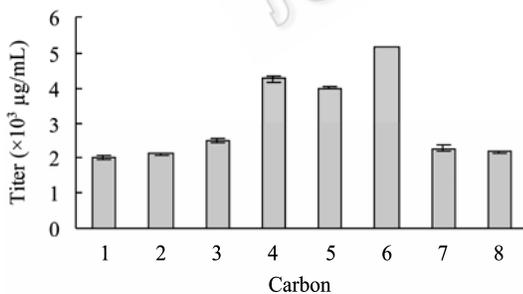


图3 不同碳源对发酵液效价的影响

Fig. 3 Effect of different carbon on titer of fermentation broth. 1: CK; 2: maltose; 3: sucrose; 4: starch soluble; 5: indian meal; 6: glucose; 7: mannitol; 8: lactose.

2.3 不同 C/N 比对发酵液效价的影响

不同碳、氮源浓度对发酵液效价的影响结果见表 4, 不同碳、氮源浓度对抗菌物质的产量有较大影响。经 SAS 系统 ANOVA 过程分析, 结果见表 5。4 个因素对发酵液效价的影响均达到极显著水平, 它

们的最佳组合为: 淀粉 1.5%, 葡萄糖 4.0%, 酵母粉 1.2%, 黄豆饼粉 2.0%。从试验结果可以看出, S24 菌株的产素水平与碳、氮源的种类、浓度关系密切。

表 4 碳、氮源浓度对发酵液效价影响的正交试验设计及结果

Table 4 Experimental design and results of different carbon and nitrogen on titer of fermentation broth

Treatment	Starch soluble (%)	Glucose (%)	Yeast extract (%)	Soybean powder (%)	Titer ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.5	1.0	0.4	1.0	2 939.80
2	0.5	2.0	0.8	2.0	4 944.90
3	0.5	3.0	1.2	3.0	6 682.14
4	0.5	4.0	1.6	4.0	7 388.78
5	1.0	1.0	0.8	3.0	4 194.90
6	1.0	2.0	0.4	4.0	4 529.08
7	1.0	3.0	1.6	1.0	5 661.74
8	1.0	4.0	1.2	2.0	7 656.63
9	1.5	1.0	1.2	4.0	4 467.86
10	1.5	2.0	1.6	3.0	5 516.33
11	1.5	3.0	0.4	2.0	7 355.61
12	1.5	4.0	0.8	1.0	6 036.74
13	2.0	1.0	1.6	2.0	4 569.90
14	2.0	2.0	1.2	1.0	4 511.22
15	2.0	3.0	0.8	4.0	6 569.90
16	2.0	4.0	0.4	3.0	7 335.20

表 5 碳、氮源浓度对发酵液效价影响的试验结果 SAS 分析表

Table 5 The SAS analysis result of the experiment of carbon and nitrogen source concentration

Factors	\bar{x}	F value	Pr>F
Starch soluble	5 844.1	5.29	0.008
Glucose	7 104.3	351.57	<.0001
Yeast extract	5 829.5	6.18	0.0041
Soybean powder	6 131.8	60.92	<.0001

2.4 不同无机盐对发酵液效价的影响

无机盐对发酵液效价的影响结果见表 6。试验结果经 SAS 系统 ANOVA 过程分析, 结果见表 7, 由表中 Pr 值得知, CaCO_3 、 KH_2PO_4 和 NaCl 对发酵液效价的影响均达极显著水平, MgSO_4 的影响不显著。根据试验结果和数据分析得出 CaCO_3 0.1%, KH_2PO_4 0.4%, NaCl 0.2% 为最佳无机盐组合。

表 6 无机盐对发酵液效价影响的正交试验设计 ($L_{16}(4^5)$) 及结果

Table 6 The design and result of $L_{16}(4^5)$ orthogonal test for effect of inorganic salt on titer of fermentation broth

Treatment	CaCO ₃ (%)	MgSO ₄ (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	NaCl (%)	Titer (μg/mL)
1	0.1	0.05	0.05	0.1	8 986.74
2	0.1	0.10	0.10	0.2	8 956.12
3	0.1	0.20	0.20	0.4	9 675.51
4	0.1	0.40	0.40	0.8	9 889.80
5	0.2	0.05	0.10	0.8	8 338.78
6	0.2	0.10	0.05	0.4	7 685.71
7	0.2	0.20	0.40	0.2	10 517.35
8	0.2	0.40	0.20	0.1	9 364.29
9	0.4	0.05	0.20	0.2	8 440.82
10	0.4	0.10	0.40	0.1	10 088.78
11	0.4	0.20	0.05	0.8	7 690.82
12	0.4	0.40	0.10	0.4	8 170.41
13	0.8	0.05	0.40	0.4	9 359.19
14	0.8	0.10	0.20	0.8	7 542.86
15	0.8	0.20	0.10	0.1	5 522.45
16	0.8	0.40	0.05	0.2	6 966.33

表 7 无机盐对发酵液效价影响试验结果的 SAS 分析表

Table 7 The SAS analysis result of the experiment of inorganic salt

Factors	\bar{x}	F value	Pr>F
CaCO ₃	9 377.0	42.05	<0.0001
MgSO ₄	8 781.4	1.69	0.2021
KH ₂ PO ₄	9 963.8	58.20	<0.0001
NaCl	8 842.6	11.60	0.0002

2.5 无机盐营养限制对发酵液效价的影响

通过无机盐营养限制的研究, 可以寻找到对抗菌物质产量影响最敏感的无机盐及其组合。从图 4 可以看出, 0.4% KH₂PO₄+0.1% CaCO₃ 组合的发酵液效价最高, 达到 9 670 μg/mL, 而其他无机盐组合发酵液效价均降低。因此, 选择 0.4% KH₂PO₄+0.1% CaCO₃ 为培养基的无机盐组分。

2.6 发酵培养基的正交优化

以葡萄糖和淀粉为最佳碳源, 黄豆饼粉、酵母粉为最佳氮源, KH₂PO₄、CaCO₃ 为最佳无机盐进行正交试验结果见表 8, 采用 SAS9.0 数据分析软件进行方差分析, 分析结果见表 9。从结果可以看出,

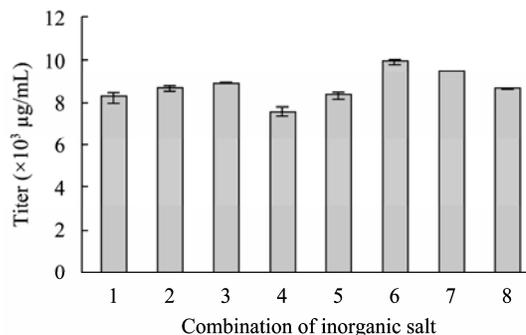


图 4 不同无机盐组合对发酵液效价的影响

Fig. 4 Effect of different combination of inorganic salt on titer of fermentation broth. 1: 0.2% NaCl; 2: 0.4% KH₂PO₄; 3: 0.1% CaCO₃; 4: 0.2% NaCl+0.4% KH₂PO₄; 5: 0.2% NaCl+0.1% CaCO₃; 6: 0.4% KH₂PO₄+0.1% CaCO₃; 7: 0.2% NaCl+0.4% KH₂PO₄+0.1% CaCO₃; 8: CK.

各因素对发酵液效价影响的程度: 葡萄糖 > KH₂PO₄ > 黄豆饼粉 > CaCO₃ > 淀粉 > 酵母粉。葡萄糖的影响达到了极显著的水平, KH₂PO₄ 和黄豆饼粉的影响在 0.05 水平上显著, 淀粉、CaCO₃ 及酵母粉的影响不显著。综合各因素及其水平对发酵液效价的影响结果, 得到最佳的发酵培养基配方: 葡萄糖 4.0%、黄豆饼粉 2.4%、KH₂PO₄ 0.4%、酵母粉 0.8%、淀粉 1.0%、CaCO₃ 0.08%。

2.7 优化后发酵培养基配方的验证

对优化后的培养基配方进行验证, 相同的发酵条件下, 优化后的培养基发酵液效价达到 10 235.45 μg/mL, 较基础培养基发酵液效价 (3 646.72 μg/mL) 提高了 280.67%。因此, 确定淀粉 10 g、葡萄糖 40g、黄豆饼粉 24 g、酵母浸膏粉 8 g、KH₂PO₄ 4 g、CaCO₃ 0.8 g、水 1 L 的培养基组合为 S24 菌株发酵的最佳配方。

2.8 S24 菌株及其抗菌物质对黄曲霉的抑制作用

2.8.1 抗菌物质粗物对黄曲霉孢子形态的影响

光镜下观察黄曲霉菌的正常孢子颜色发亮, 外形圆滑, 内容物分布均匀且比较分散 (图 5A、B)。经抗菌物质粗物处理 8 h 后, 孢子颜色变暗, 聚集成团 (图 5C)。处理 16 h 后, 孢子外形不规则, 内容物分布不均匀, 有的内容物开始流出, 形成空腔 (图 5D)。处理 24 h 的孢子边缘模糊、胞壁出现断裂现象 (图 5E)。

表 8 发酵培养基各组分分配比优化的正交试验设计 ($L_{27}(3^{13})$) 及结果Table 8 The design and results of $L_{27}(3^{13})$ orthogonal test for every proportion of fermentation medium

Treatment	Starch soluble (%)	Glucose (%)	Yeast extract (%)	Soybean powder (%)	KH_2PO_4 (%)	$CaCO_3$ (%)	Titer ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.0	3.2	0.8	1.8	0.2	0.08	6 486.99
2	1.0	3.2	1.0	2.4	0.4	0.12	9 885.65
3	1.0	3.2	1.2	3.0	0.6	0.16	6 689.95
4	1.0	4.0	0.8	1.8	0.6	0.16	5 898.56
5	1.0	4.0	1.0	2.4	0.2	0.08	9 995.86
6	1.0	4.0	1.2	3.0	0.4	0.12	6 986.54
7	1.0	4.8	0.8	1.8	0.4	0.12	4 493.32
8	1.0	4.8	1.0	2.4	0.6	0.16	5 568.96
9	1.0	4.8	1.2	3.0	0.2	0.08	6 102.32
10	1.5	3.2	0.8	3.0	0.2	0.16	6 896.63
11	1.5	3.2	1.0	1.8	0.4	0.08	8 869.96
12	1.5	3.2	1.2	2.4	0.6	0.12	6 986.63
13	1.5	4.0	0.8	3.0	0.6	0.12	5 896.72
14	1.5	4.0	1.0	1.8	0.2	0.16	9 069.68
15	1.5	4.0	1.2	2.4	0.4	0.08	9 156.23
16	1.5	4.8	0.8	3.0	0.4	0.08	6 586.55
17	1.5	4.8	1.0	1.8	0.6	0.12	3 619.52
18	1.5	4.8	1.2	2.4	0.2	0.16	8 687.66
19	2.0	3.2	0.8	2.4	0.2	0.12	7 216.17
20	2.0	3.2	1.0	3.0	0.4	0.16	9 394.01
21	2.0	3.2	1.2	1.8	0.6	0.08	4 216.17
22	2.0	4.0	0.8	2.4	0.6	0.08	8 415.36
23	2.0	4.0	1.0	3.0	0.2	0.12	8 167.65
24	2.0	4.0	1.2	1.8	0.4	0.16	7 550.16
25	2.0	4.8	0.8	2.4	0.4	0.16	5 143.67
26	2.0	4.8	1.0	3.0	0.6	0.08	6 143.67
27	2.0	4.8	1.2	1.8	0.2	0.12	5 049.54

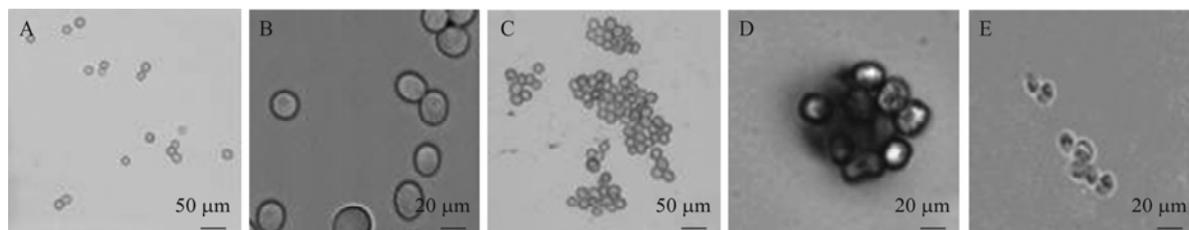


图 5 S24 菌株产生的抗菌物质对黄曲霉孢子形态的影响

Fig. 5 Effect of the antibacterial substances of S24 on spore morphology of *Aspergillus flavus*. (A) Normal spore ($\times 400$). (B) Normal spore ($\times 1\ 000$); (C) Spores having been treated for 8 h ($\times 400$; Spores became gloomy and collective). (D) Spores having been treated for 16 h ($\times 1\ 000$; figure indicate irregular spore shape, uneven distribution of cellular contents, outflow of some inner substances from the cell, and empty cavity). (E) Spores having been treated for 24 h ($\times 1\ 000$; figure indicate fuzzy edge of the spores and breakage of cell wall).

表 9 正交优化培养基分析结果

Table 9 Results of orthogonal design optimized fermentation medium

Factors	\bar{x}	F value	Pr>F
Glucose	7 904.08	7.23	0.007
KH ₂ PO ₄	7 562.89	4.69	0.0276
Soybean powder	7 895.13	4.22	0.0369
CaCO ₃	7 330.34	1.16	0.3404
Starch soluble	6 900.90	0.38	0.6885
Yeast extract	7 058.01	0.01	0.9858

2.8.2 S24 菌株对黄曲霉菌丝形态的影响

挑取拮抗圈边缘菌丝镜检,发现大部分菌丝生长杂乱,菌丝变粗,颜色变暗,并且出现扭曲、皱褶等现象(图 6B);有的菌丝细胞内容物流出,出现空腔(图 6C);部分菌丝细胞长度变短,中部膨大呈念珠状,且有一些开始消融(图 6D)。而对照组菌丝颜色鲜亮、粗长,表面光滑,内容物分布均匀(图 6A)。

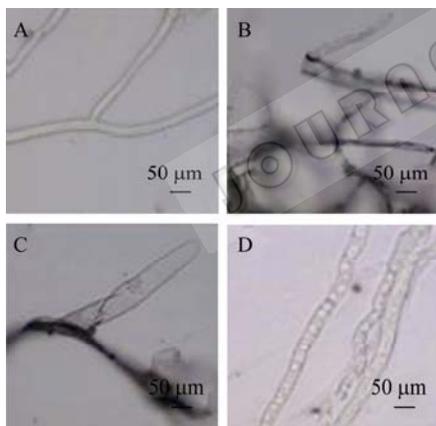


图 6 S24 菌株对黄曲霉菌丝形态的影响

Fig. 6 Effect of strain S24 on mycelial morphology of *Aspergillus flavus*. (A) Normal mycelia ($\times 400$). (B) Treated mycelia ($\times 400$; The mycelia disorder, coarsen, retorted and corrugated). (C) Treated mycelia ($\times 400$; outflow of inner substance and empty cavity in the mycelia). (D) Treated mycelia ($\times 400$; shortened, inflated and bead-like mycelia and partially ablated mycelia).

3 结论与讨论

通过正交试验优化了 S24 菌株发酵培养基配方,得到了适合 S24 菌株产生抗菌物质的培养基配

方:淀粉 10 g、葡萄糖 40 g、黄豆饼粉 24 g、酵母浸膏粉 8 g、KH₂PO₄ 4 g、CaCO₃ 0.8 g、水 1 L。优化后的发酵培养基配方组分较少,抗菌物质产量较高,发酵液效价较基础培养基提高了 280.67%。

S24 菌株及其抗菌物质对黄曲霉菌丝及孢子均表现强烈的拮抗作用,显微镜下观察,抗菌物质作用于黄曲霉孢子后,可以使孢子出现聚集、内容物分布不均、变形、空腔及胞壁断裂等异常;S24 菌株作用于黄曲霉菌丝后,使菌丝出现变粗、扭曲、皱褶、膨大、内容物流出、消融等现象。

正交设计是从“均匀分散、整齐可比”的角度出发用正交表来安排少量的试验,从多个因素中分析出哪些是主要的,哪些是次要的,以及它们对实验的影响规律,从而找出较优的工艺条件^[10-13]。本试验中对于 C/N、无机盐及最终培养基配方对抗菌物质产量的影响均采用正交设计试验,提高了工作效率和试验结果的可靠性。同时,试验中对于无机盐的研究采用营养限制方法,寻找到了对抗菌物质产量影响最敏感的无机盐。

拮抗链霉菌 S24 产生的抗菌物质主要成分由四烯和五烯两类多烯大环内酯类抗生素组成,经硅胶柱层析可将这两类物质完全分离^[7],进一步通过 RP-HPLC 分离共获得 2 种四烯大环内酯类抗生素,6 种五烯大环内酯类抗生素,其中 6 种五烯大环内酯类抗生素的分子量已确定,与已有的五烯大环内酯类抗生素差别较大,推测该菌株产生的抗菌物质极有可能为一组新的多烯类抗菌物质。要确定该抗菌物质的准确结构还需通过进一步的质谱、核磁共振分析等。多烯大环内酯类抗生素由于化学结构的原因,对紫外线较为敏感,不宜与阳光接触,因此,限制了其在大田中的应用,但在医疗、兽药及食品和饲料的防腐方面都得到了较好的应用,此外,多烯类抗生素是一类目前临床常用药中最不容易产生抗药性的抗真菌抗生素^[14-15],开发高效低毒的多烯类抗真菌抗生素,是抗真菌药物研发的有效途径之一。本试验和前期试验结果表明,拮抗链霉菌 S24 是一

株抗菌谱广、发酵性状优异、遗传稳定的拮抗菌,产生的抗菌物质理化性质稳定,对多种粮食和饲料中常见的能引起人畜传染性疾病的曲霉菌有强烈的拮抗作用,显示了良好的应用潜力,值得进一步研究。S24 菌株产生的抗菌物质的结构及其作用机制正在研究中。

REFERENCES

- [1] Eaton DL, Groopman JD. The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. New York: Academic Press, 1994: 3-26.
- [2] Oakley EJ, Schmitt F, Jost JP, et al. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Scientific Publication, 1993, 56(6): 489-521.
- [3] van Egmond HP, Jonker MA. Worldwide regulations on aflatoxins—the situation in 2002. J Toxicol Toxin Rev, 2004, 23(2/3): 273-293.
- [4] Mckenzie KS, Kubena LF, Denvir AJ, et al. Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. Poult Sci, 1998, 77(8): 1094-1102.
- [5] Liu FX, Li L, Liang XQ. Advances on biological control of aflatoxin contamination. Chin J Biol Control, 2010, 26(1): 96-101.
刘付香, 李玲, 梁炫强. 生物防治黄曲霉毒素污染研究进展. 中国生物防治, 2010, 26(1): 96-101.
- [6] Zhou QS, Sun CP, Zhang N, et al. Identification of actinomycete strain S24 and its antagonistic effects on *Aspergillus flavus*. Microbiol Chin, 2009, 36(12): 1832-1837.
周启升, 孙长坡, 张楠, 等. 拮抗放线菌 S24 的鉴定及其对黄曲霉的抑制作用. 微生物学通报, 2009, 36(12): 1832-1837.
- [7] Zhou QS, Cao NN, Qiu NQ, et al. Extraction and characterization of antifungal substances produced by antagonistic *Streptomyces* S24. Chin J Biotech, 2010, 26(3): 350-356.
周启升, 曹宁宁, 仇念全, 等. 拮抗链霉菌 S24 抗菌物质的提取及其部分理化性质. 生物工程学报, 2010, 26(3): 350-356.
- [8] China Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. Addenda 84.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005. 附录 84.
- [9] Lee IY, Seo WT, Kim GJ, et al. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. Bioprocess Eng, 1997, 16(2): 71-75.
- [10] Chu J, Li YR. Modern Concepts of Industrial Fermentation. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
储炬, 李友荣. 现代工业发酵调控学. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [11] Yu JT, Tang XX. Biotechnology. Shanghai: East China of Science and Technology Press, 1991: 107-108.
俞俊棠, 唐孝宣. 生物工艺学. 上海: 华东化工学院出版社, 1991: 107-108.
- [12] Liang YZ, Fang KT, Xu QS. Uniform design and its applications in chemistry and chemical engineering. Chemometr Intell Lab Syst, 2001, 58(1):43-57.
- [13] Lü YN, Li PL, Zhou W. Optimization of bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1. Microbiol Chin, 2005, 32(3):13-19.
吕燕妮, 李平兰, 周伟. 戊糖乳杆菌 31-1 菌株产细菌素发酵条件优化. 微生物学通报, 2005, 32(3): 13-19.
- [14] Zhang ZP, Yao TJ. Antibiotics and Bioactive Substances Produced by Microbes. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 302, 418.
张致平, 姚天爵. 抗生素与微生物产生的生物活性物质. 北京: 化学工业出版社, 2005: 302, 418.
- [15] Vilar V, Botelho CMS, Boaventura RAR. Equilibrium and kinetic modelling of Cd(II) biosorption by algae *Gelidium* and agar extraction algal waste. Water Res, 2006, 40(2): 291-302.