

张 棋,胡永红,杨文革,等.金龟子绿僵菌发酵培养基响应面优化[J].江苏农业科学,2016,44(7):173-176.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.047

# 金龟子绿僵菌发酵培养基响应面优化

张 棋,胡永红,杨文革,张琬崧,杨 洋

(南京工业大学生物与制药工程学院/材料化学工程国家重点实验室,江苏南京 211816)

**摘要:**为了优化金龟子绿僵菌发酵培养基,在单因素试验的基础上进行 Plackett-Burman 试验和中心组合试验设计,采用响应面法建立发酵培养基的优化模型。得到最优的培养基为:蔗糖 20.07 g/L、酵母膏 20.04 g/L、 $\text{MgSO}_4$  0.70 g/L。经试验验证,在此条件下,金龟子绿僵菌的生物量可达 16.523 g/L,比优化前提高了 37.24%。

**关键词:**金龟子绿僵菌;培养基;响应面法;优化条件

**中图分类号:** S188<sup>+</sup>.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0173-04

金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)是一类重要的昆虫病原真菌,它作为生物防治制剂具有环境安全性好、昆虫不易产生抗性等特点。此外,绿僵菌的寄主广泛性和广谱性使得其成为一种研究昆虫病原真菌侵染寄主过程的重要模式生物<sup>[1-2]</sup>。目前,植物病害在全球范围内每年造成高达数千亿美元的损失,而其中又以昆虫病害最为严重。金龟子绿僵菌具有寄生范围广、无残毒、后效期长等特点,已成为国内外杀菌、除虫的一线药物之一<sup>[3-4]</sup>。然而,在金龟子绿僵菌发酵生产过程中,菌体生物量低,生产成本低,发酵周期长等问题限制了其推广应用<sup>[5-7]</sup>;因此,对金龟子绿僵菌发酵培养基优化及条件探索具有重大意义。本研究以金龟子绿僵菌 NJYH-WG 3820 为试验菌株,应用响应面法系统考察了影响金龟子绿僵菌生物量的培养基成分,得到了最佳培养基配方,从而提高了生物量。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

金龟子绿僵菌:*Metarhizium anisopliae* NJYHWG 3820,由笔者课题组保藏。

### 1.2 培养基

斜面培养基:马铃薯 200 g/L,蔗糖 20 g/L,琼脂 15 ~ 20 g/L,自然 pH 值。

种子培养基:蔗糖 10 g/L,酵母膏 10 g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L, $\text{MgSO}_4$  2 g/L,pH 值 6.5。

发酵培养基:蔗糖 10 g/L,酵母膏 10 g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L, $\text{MgSO}_4$  2 g/L,pH 值 6.5。

### 1.3 主要试剂和仪器

蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、木糖、甘油、可溶性淀粉、蛋

白胨、酵母膏、牛肉浸膏、甘氨酸、琼脂粉,由国药集团化学试剂有限公司提供; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{CaCO}_3$ ,由广东汕头市西陇化工厂提供;马铃薯,市售。

电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂;灭菌锅,华粤行仪器有限公司;医用净化工作台,苏州净化设备厂;鼓风电热恒温干燥箱,上海试验仪器厂有限公司;台式高速离心机,德国艾本德股份公司;电子天平,瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;基础分析型纯水机,青岛富勒姆科技有限公司。

### 1.4 试验方法

**1.4.1 金龟子绿僵菌生物量测定** 取发酵液倒入 50 mL 的离心管中,10 000 r/min 离心 15 min,去上清。沉淀的菌体用去离子水悬浮,再离心 2 次,去上清。把菌体倒在干净的已称质量的称量纸上,放入 80 ℃ 的烘箱烘干至恒质量,在电子天平上称质量,计算干菌体质量:菌体生物量(g/L) = 菌体干质量(g)/发酵液取样体积(L)。

**1.4.2 单因素试验设计** 分别对碳源、氮源、无机盐进行优化,配制发酵培养基,28 ℃ 发酵培养 5 d,测定每种因素对生物量的影响,选择最佳培养基成分。

### 1.4.3 响应面试验设计

**1.4.3.1 Plackett-Burman(PB)设计试验** 利用 Plackett-Burman(PB)试验从多个单因素中筛选出对菌体生长影响最显著的几个因素,使用 Design Expert 6.0 软件设计试验方案,包括 11 个变量( $n = 11$ ),其中 8 个主要变量(蔗糖、乳糖、甘油、蛋白胨、酵母膏、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ )和 3 个虚拟变量,分别用 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 和 K 来代表变量,每个变量有高(+)和低(-)2 个水平,设置高(+)水平是低(-)水平的 1.5 倍(表 1)。

**1.4.3.2 最陡爬坡试验** 在 PB 试验中得到影响较为显著的 3 个因素,并且根据 PB 设计得出的一次项拟合方程中相应变量的系数,从而确定变化梯度和爬坡方向。若变量系数为负,则该变量水平以梯度递减的方向进行爬坡试验。若变量系数为正,则该变量水平以梯度递增的方向进行爬坡试验,这样就能够经济、快速地逼近最佳区域。将最陡爬坡试验中得到的金龟子绿僵菌生物量最高点作为中心组合设计的中心点来设计试验方案。

收稿日期:2015-06-05

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)2057];江苏省科技支撑计划(编号:BE2014386)。

作者简介:张 棋(1989—),男,江苏连云港人,硕士研究生,主要从事发酵工程和生物分离技术研究。E-mail:zq2024@126.com。

通信作者:胡永红,博士,教授,主要从事农业科学、生物发酵分离等相关研究。E-mail:yonghonghui1@126.com。

表 1 金龟子绿僵菌发酵培养基 Plackett – Burman 试验因素及水平

变量		水平	
序号	培养基	(-1)低水平 (g/L)	(+1)高水平 (g/L)
A	蔗糖	5.0	7.5
B	乳糖	5.0	7.5
C	甘油	5.0	7.5
D	蛋白胨	5.0	7.5
E	酵母膏	5.0	7.5
F	MgSO <sub>4</sub>	0.5	0.75
G	CaCl <sub>2</sub>	0.5	0.75
H	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	0.75
I,J,K	虚拟变量	—	—

1.4.3.3 响应面分析法 经过最陡爬坡试验,逼近金龟子绿僵菌发酵生物量最大化区域,根据 Box – Bellnken 原理,对经过 PB 和爬坡试验的变量进行 3 水平试验(-1、0、+1),共 17 组试验,使用 Design – Expert 软件对试验结果进行分析,研究金龟子绿僵菌的最优发酵培养基配方。

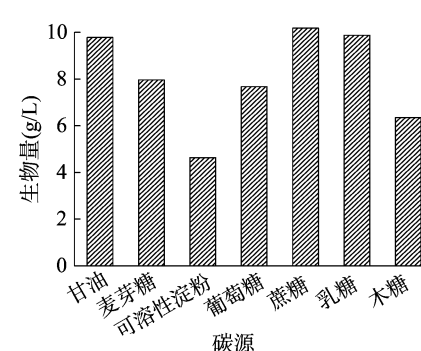


图1 不同碳源对菌体干质量的影响

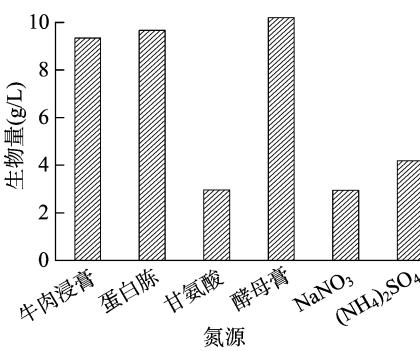


图2 不同氮源对菌体干质量的影响

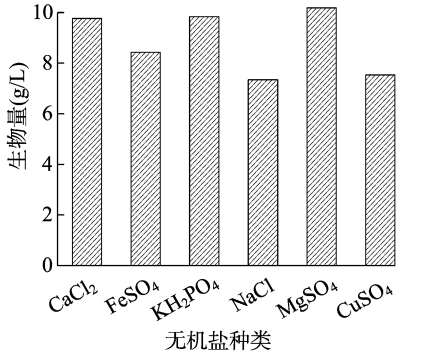


图3 不同无机盐对菌体干质量的影响

2.2 响应面试验设计

2.2.1 Plackett – Burman (PB) 试验 通过单因素试验表明,对菌体生长影响较大的 8 个主要变量为蔗糖、乳糖、甘油、酵母膏、蛋白胨、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub> 和 CaCl<sub>2</sub>,再加 3 个虚拟变量,每个变量有高(+)、低(-)2 个水平,采用 Design – Expert 软件设计试验,共计 12 组试验(表 2)。使用 Design – Expert 软件对表 2 进行分析,得到表 3。由表 3 可知,上述 8 个因素对

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 碳源对金龟子绿僵菌发酵的影响 碳源是菌体碳架构成及能量供应的来源。由图 1 可知,在选择的 7 种碳源中蔗糖、甘油和乳糖对金龟子绿僵菌发酵效果较为理想,其中蔗糖效果最好。其他几种碳源对生物量的影响较小,该金龟子绿僵菌对其他 4 种碳源利用率不高。

2.1.2 氮源对金龟子绿僵菌发酵的影响 氮源是构成菌体蛋白、核酸等含氮物质的来源。由图 2 可知,有机氮源比无机氮源对金龟子绿僵菌发酵的影响更为显著,在有机氮源培养基中,菌体生长良好;而在无机氮源培养基中,菌体生长较稀疏。在有机氮源中,酵母膏效果最好,蛋白胨次之。

2.1.3 无机盐对金龟子绿僵菌发酵的影响 无机盐是微生物生命活动所不可缺少的物质,它的种类和含量对菌体生长和代谢产物的生成影响很大。由图 3 可知,MgSO<sub>4</sub> 对金龟子绿僵菌发酵影响最大,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 次之;因此在下个阶段的 PB 设计中,将 MgSO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub> 作为考察因素。

金龟子绿僵菌生物量的影响顺序由大到小为:蔗糖、酵母膏、MgSO<sub>4</sub>、乳糖、蛋白胨、甘油、CaCl<sub>2</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,其中蔗糖为极显著因素。该模型 R<sup>2</sup> = 0.988 4,表示 98.84% 的试验数据可以使用该模型进行解释。Prob > F 值小于 0.05 表示该因素为显著因素,从 8 个因素中选出对金龟子绿僵菌生长显著的因素(蔗糖、酵母膏、MgSO<sub>4</sub>),进行下一步试验优化。

表 2 金龟子绿僵菌发酵培养基 Plackett – Burman 试验设计

序号	变量											生物量 (g/L)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	10.824
2	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	7.408
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	9.616
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	11.008
5	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	12.632
6	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	11.336
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	13.528
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	13.376
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8.008
10	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	14.216
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	11.264
12	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	12.760

表 3 金龟子绿僵菌发酵培养基 Plackett – Burman 设计方差分析

方差来源	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	重要性
蔗糖	184.00	0.000 9	1
乳糖	8.82	0.059 1	4
甘油	7.35	0.073 1	6
蛋白胨	8.24	0.064 0	5
酵母膏	30.11	0.011 9	2
MgSO <sub>4</sub>	16.12	0.027 7	3
CaCl <sub>2</sub>	1.19	0.355 6	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.85	0.425 3	8

2.2.2 最陡爬坡试验 根据 PB 试验结果,蔗糖、酵母膏、MgSO<sub>4</sub> 的模型方程系数为正值,进行正爬坡。具体设计方案及试验结果见表 4。由表 4 可知,选择第 5 组试验方案时,即蔗糖 20 g/L、酵母膏 20 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.7 g/L,对应的生物量达到最高值,以此值为中心值进行响应面试验,这样响应面方程才能充分逼近真实值。

表 4 金龟子绿僵菌发酵培养基最陡爬坡试验设计

试验编号	蔗糖 (g/L)	酵母膏 (g/L)	MgSO <sub>4</sub> (g/L)	生物量 (g/L)
1	8	12	0.3	10.880
2	11	14	0.4	12.720
3	14	16	0.5	14.272
4	17	18	0.6	15.168
5	20	20	0.7	15.520
6	23	22	0.8	14.240
7	26	24	0.9	11.536
8	29	26	1.0	10.224

2.2.3 响应面分析法 经过 Plackett – Burman 试验和爬坡试验,确定蔗糖、酵母膏、MgSO<sub>4</sub> 的水平,利用 Design – Expert 软件设计响应面试验见表 5、表 6。根据表 6 的数据,使用 Design – Expert 软件进行拟合,得到三元二次回归方程: $Y = -303.58 + 6.90A + 6.79B + 523.41C + 0.03AB - 1.16AC - 1.41BC - 0.16A^2 - 0.16B^2 - 338.12C^2$ ,其中: $Y$  为菌体生物量, $A$ 、 $B$ 、 $C$  分别为蔗糖、酵母膏、MgSO<sub>4</sub> 浓度。根据表 6 的结果,运用 Design – Expert 软件对其进行方差分析和模型的显著性分析,得到表 7。由表 7 可知:该模型的  $P < 0.000 1$ ,表明该模型极显著。通过  $R^2$  来判断该模型的拟合度, $R^2 = 0.990 4$ ,即表明该模型可以解释 99.04% 试验所得菌体生物量的变化,进一步说明了回归方程的拟合程度较好。

表 5 金龟子绿僵菌发酵培养基中心组合设计试验因素与水平

编码水平	因素		
	蔗糖(g/L)	酵母膏(g/L)	MgSO <sub>4</sub> (g/L)
-1	15	15	0.6
0	20	20	0.7
1	25	25	0.8

2.3 响应面优化结果的分析

由二元回归方程所得到的响应面图与相应的等高线图见图 4 至图 6。各因素交互作用对响应值菌体生物量的影响由图可以直观地反映出来<sup>[8-10]</sup>。图 4 表明,在 MgSO<sub>4</sub> 一定的情况下,蔗糖和酵母膏的交互作用显著,随着蔗糖和酵母膏含量的增加,菌体生物量不断提高,后期呈现小幅下降。

由图 5 可知,在酵母膏一定的情况下,随着蔗糖和 MgSO<sub>4</sub>

含量的增加,菌体生物量不断提高,后期呈现下降趋势。在一定程度上,提高培养基中蔗糖和 MgSO<sub>4</sub> 的含量有利于提高菌体生物量,但蔗糖浓度过高会影响细胞通透性,抑制菌体生长,不利于生物量的增加。

表 6 金龟子绿僵菌发酵培养基响应面分析设计及试验结果

试验编号	蔗糖	酵母膏	MgSO <sub>4</sub>	生物量 (g/L)
1	0	0	0	16.034
2	0	0	0	16.123
3	1	1	0	8.973
4	-1	0	-1	7.987
5	0	-1	-1	8.569
6	0	1	1	7.934
7	0	0	0	15.342
8	0	0	0	16.074
9	-1	0	1	8.975
10	0	-1	1	9.643
11	1	0	1	8.422
12	1	-1	0	7.234
13	0	1	-1	9.675
14	0	0	0	16.113
15	-1	-1	0	8.753
16	1	0	-1	9.748
17	-1	1	0	7.934

表 7 回归方程方差分析结果

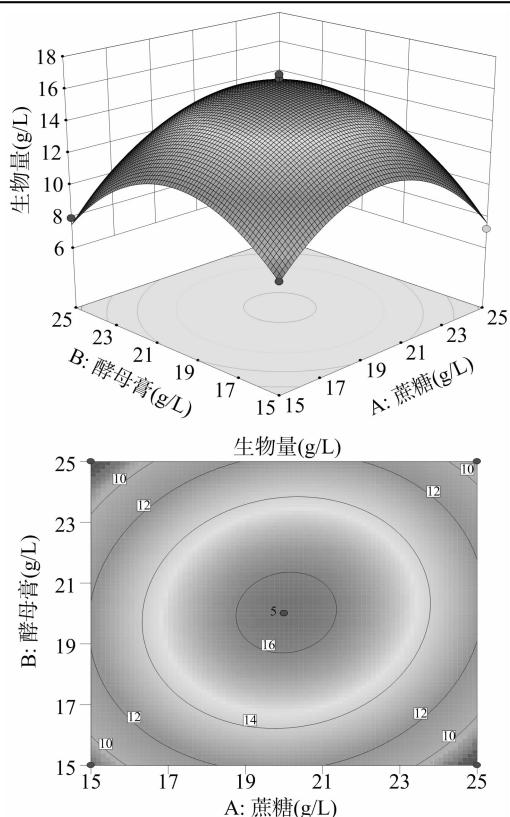
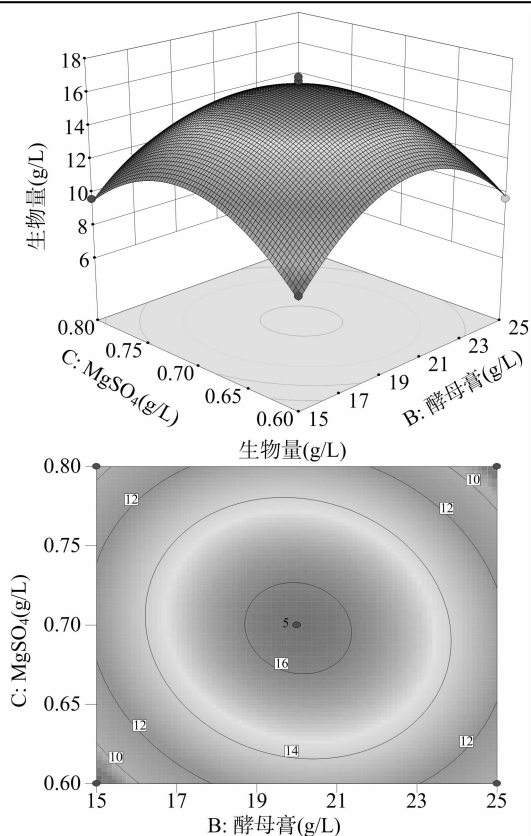
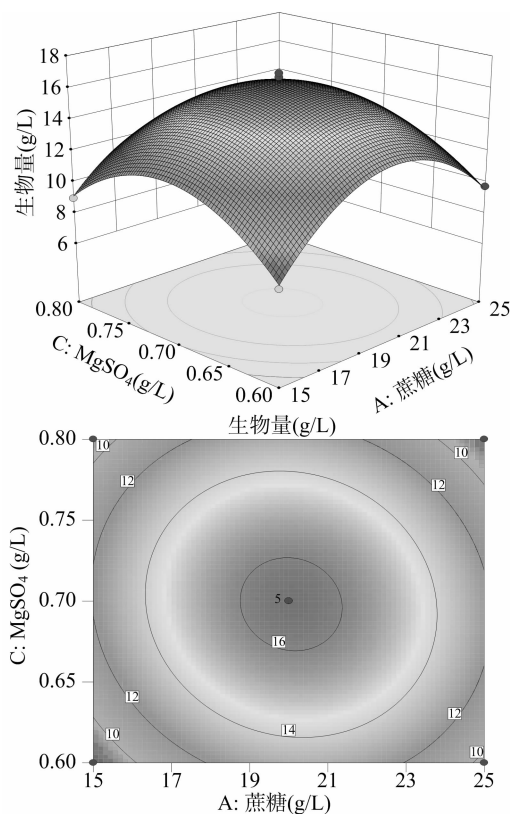
方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	211.44	9	23.49	77.77	< 0.0001
A:蔗糖	0.066	1	0.066	0.22	0.6538
B:酵母膏	0.013	1	0.013	0.042	0.8442
C:MgSO <sub>4</sub>	0.13	1	0.13	0.42	0.5386
AB	1.64	1	1.64	5.41	0.0528
AC	1.34	1	1.34	4.43	0.0733
BC	1.98	1	1.98	6.56	0.0375
A <sup>2</sup>	71.23	1	71.23	235.77	<0.0001
B <sup>2</sup>	65.39	1	65.39	216.44	<0.0001
C <sup>2</sup>	48.14	1	48.14	159.34	<0.0001
残差	2.11	7	0.3		
失拟项	0.66	3	0.22	0.6	0.646
误差	1.46	4	0.36		
合计	213.56	16			

由图 6 可知,在蔗糖一定的情况下,酵母膏和 MgSO<sub>4</sub> 交互作用较显著,随着酵母膏和 MgSO<sub>4</sub> 含量的增加,菌体生物量不断提高,后期呈现小幅下降。

为求出培养基最佳配方,对回归方程各个变量求一阶偏导数,解得: $A = 20.07$ , $B = 20.04$ , $C = 0.70$ ,此时金龟子绿僵菌生物量达到 16.173 g/L。同时进行试验验证,在最适发酵条件下,重复进行 3 次试验,金龟子绿僵菌生物量实测值为 16.523 g/L,与预测值基本符合。说明响应面法对金龟子绿僵菌发酵培养基优化具有较强可靠性。因此,得到最佳培养基配方是:蔗糖 20.07 g/L、酵母膏 20.04 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.70 g/L。

3 结论

在单因素试验的基础上,经 Plackett – Burman 试验确定了蔗糖、酵母膏、MgSO<sub>4</sub> 为主要影响因素,在此基础上,进行最

图4  $Y=f(\text{蔗糖、酵母膏})$ 等高线与响应曲面图图6  $Y=f(\text{酵母膏、MgSO}_4)$ 等高线与响应曲面图图5  $Y=f(\text{蔗糖、MgSO}_4)$ 等高线与响应曲面图

证在此发酵条件下金龟子绿僵菌生物量达到 16.523 g/L,与原始发酵液的菌体生物量相比提高了 37.24%,成本降低了约 30%,有利于其工业化生产。然而此研究仅限于摇瓶发酵,很多因素(如溶氧、通气量等)难以有效控制,下一步可以上罐分批发酵,进一步优化影响金龟子绿僵菌发酵的条件。

#### 参考文献:

- [1]代鹏,宋妍,许天委,等. 绿僵菌的研究进展[J]. 热带农业科学,2005,25(2):73-77.
- [2]王滨,樊美珍,李增智. 真菌杀虫剂剂型的研究与应用[J]. 安徽农业大学学报,2003,30(2):206-209.
- [3]李宝玉,张泽华,农向群,等. 真菌杀虫剂标准化研究进展[J]. 中国生物防治,2004,20(增刊1):32-38.
- [4]Chandler D, Davidson G, Pell J K, et al. Fungal biocontrol of Acari[J]. Biocontrol Science and Technology,2000,10(4):357-384.
- [5]赵俊生,郭素萍,武慧贞等. 应用绿僵菌防治鳞翅目蔬菜害虫及壮苗试验[J]. 植物保护,2001,27(5):29-301.
- [6]陈祝安,黄基荣. 不同来源绿僵菌对云斑金龟蛴致残力评价[J]. 微生物学通报,1997,24(2):81-83.
- [7]王宏平. 植物保护与持续农业[J]. 湖北植保,2000(2):37-38.
- [8]黄海,董昌金. 绿僵菌的培养及其防治白蚁的效果[J]. 湖北农业科学,2006(1):62-64.
- [9]李超,吴雪晴,郑艳. 乳糖酸产生菌的发酵培养基优化[J]. 食品工业科学,2014,35(3):187-191.
- [10]杨其义,赵祥颖,刘建军. 响应面法优化木糖醇发酵培养基[J]. 山东轻工业学院学报,2013,27(2):34-38.

陡爬坡试验,确定最佳响应面区域,然后采用中心组合试验设计和 Design Expert 软件分析计算,得到这3种因素的添加量:蔗糖 20.07 g/L、酵母膏 20.04 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.70 g/L。经过验