

利用响应面分析法优化深绿木霉 Tr16 液体发酵产孢培养基研究

陈晨, 钱林, 于稳欠, 毛伟力* (上海万力华生物科技有限公司, 上海 200120)

摘要 采用响应面分析法(RSAM)对深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)菌株 Tr16 液体发酵产孢培养基进行优化。通过 Plackett-Burman (PB) 方法, 先筛选出培养基中影响产孢量的 3 个主要因素: $MgSO_4$ 、 $H_8MoN_2O_4$ 和酵母提取物, 再运用“最陡爬坡路径法”和 RSAM, 确定主要因子之间的交互影响并筛选出最佳液体发酵培养基配方。结果表明, 最佳培养基配方: 葡萄糖 5 g/L、 KH_2PO_4 8 g/L、 $MgSO_4$ 1.29 g/L、丙三醇 10 mL/L、蔗糖 10 g/L、 $H_8MoN_2O_4$ 0.99 mL/L、酵母提取物 4.83 g/L、可溶性淀粉 5 g/L。经过 3 次平行测试, Tr16 的平均孢子产量为 6.19×10^8 CFU/mL, 与预测最大孢子产量接近, 比未优化的培养基孢子产量提高了 70.8%。

关键词 响应面法; 深绿木霉; 产孢; 优化

中图分类号 S476.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)10-0117-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.10.031



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization the Culture Medium of Liquid Fermentation for Spore Production of *Trichoderma atroviride* Strain Tr16 by Utilizing Response Surface Analysis Method (RSAM)

CHEN Chen, QIAN Lin, YU Wen-qian et al (Shanghai W.L.H.-Biotech Corporation, Shanghai 200120)

Abstract Response surface analysis method (RSAM) was used to optimize the liquid fermentation culture medium for spore production of *Trichoderma atroviride* strain Tr16. Through Plackett-Burman method (PB), three main factors ($MgSO_4$, $H_8MoN_2O_4$ and yeast extract) affecting sporulation quantity in the medium were firstly screened out. Then, the steepest climbing path method (SCPM) and RSAM were used to determine the interaction among the main factors and the best formula of liquid fermentation medium was screened and determined. The results showed that the optimal formula of the medium was glucose 5 g/L, KH_2PO_4 8 g/L, $MgSO_4$ 1.29 g/L, glycerol 10 mL/L, sucrose 10 g/L, $H_8MoN_2O_4$ 0.99 mL/L, yeast extract 4.83 g/L, soluble starch 5 g/L. After three parallel tests, the average spore yield of Tr16 was 6.19×10^8 CFU/mL, which was close to the predicted maximum spore yield and was 70.8% higher than that of the unoptimized medium.

Key words Response surface method (RSM); *Trichoderma atroviride*; Spore production; Optimization

早在 20 世纪 30 年代科研工作者就发现, 木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 对多种植物病原菌有拮抗作用^[1]。作为一种生防菌, 木霉菌的抗菌机制有占位竞争、产生抗生素、重寄生、诱导抗性等^[2]。目前在世界范围内, 商业化生产和应用的各种活体木霉菌生物农药已有 300 多种, 在绿色、有机农业生产和现代农业可持续发展中, 对多种植物病害的绿色防控起到了良好的助推作用^[3]。随着现代生物技术的不断发展, 在发酵设备和工艺上为生产优质的木霉菌孢子提供了一定的支撑^[4], 但如何通过液体发酵获得大量的木霉菌孢子, 仍是制约木霉菌产业化生产的关键因素之一。

微生物发酵过程机理复杂, 影响因素众多, 对微生物发酵工艺进行优化显得尤为重要, 已成为发酵水平的决定因素, 其相关的研究也越来越多^[5]。同时, 许多试验技术和设计方法在微生物发酵工艺优化中得到应用。传统的优化试验方法有单因素法、正交设计法等, 当考察的因子较多以及因素之间存在交互作用时, 试验次数会大增, 甚至试验结果不准确^[6]。而很多其他方法即使减少了试验次数, 却未能给出直观的图形, 不能凭直觉观察其最优点。有的虽能找出最优值, 但又难以直观地判别优化区域。由 Box 和 Willson 最早提出, 后经 Hill 和 Hittner 进一步完善的响应曲面法 (response surface method, RSM) 在微生物发酵工艺优化研究中成功克服了传统方法的缺点, 取得了良好效果^[7]。然而我国在木霉菌发酵培养基优化的研究方面, 目前主要采用单因素

法和正交法。对深绿木霉菌液体发酵, 以及利用 RSAM 优化深绿木霉菌液体发酵产孢培养基的研究目前鲜有报道。笔者采用 RSAM, 对深绿木霉菌产孢培养基进行了优化, 使菌株 Tr16 在发酵液中的孢子产量提高了 70.8%, 为产业化生产深绿木霉菌提供了参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株。深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*) 菌株 Tr16, 由上海万力华生物科技有限公司从西瓜根际土壤中分离获得, 并保藏。

1.1.2 供试培养基。马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA): 200 g 去皮马铃薯开水煮沸 20 min, 过滤, 滤液中加入 20 g 葡萄糖, 20 g 琼脂粉, 定容 1 L, 充分混匀, 用 1 L 三角瓶分装, 每瓶装 500 mL, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却至 50 °C, 无菌条件下倒入培养皿, 凝固备用^[8]。

液体发酵培养基: 葡萄糖 5 g/L、 KH_2PO_4 2 g/L、 $MgSO_4$ 1 g/L、丙三醇 10 mL/L、蔗糖 1 g/L、 $H_8MoN_2O_4$ 0.5 mL/L、酵母提取物 41 g/L、可溶性淀粉 5 g/L。

$H_8MoN_2O_4$ 母液配制: 0.1 g/L $H_8MoN_2O_4 \cdot 2H_2O$ 的母液, 4 °C 冰箱保存, 使用时按照要求用量添加到培养基中。

1.1.3 供试试剂。葡萄糖、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4$ 、丙三醇、蔗糖、 $H_8MoN_2O_4$ 、酵母提取物、可溶性淀粉等试剂均为分析纯 (上海润捷化学试剂有限公司)。

1.1.4 供试设备。显微镜 (Olympus BX51), 摇床 (SY2020 天呈设备有限公司), 天平 (OHAUS CP64)。

作者简介 陈晨 (1989—), 男, 安徽休宁人, 工程师, 从事木霉菌液体发酵研究。* 通信作者, 博士, 从事植物病理学研究。

收稿日期 2019-10-17; **修回日期** 2019-11-19

1.2 试验方法

(1) Tr16 种子发酵液制备。将纯化的 Tr16 菌块转移到 PDA 平板上培养 72 h (28 °C), 在无菌条件下刮取长在平板上的分生孢子, 用无菌水配成含 5×10^7 CFU/mL 分生孢子悬浮液备用。

(2) 摇瓶测试培养条件。设定摇床的温度为 30 °C, 转速为 200 r/min, 装液量为 110 mL/500 mL 摇瓶, 接种量为 2% (V/V), 每个处理 3 个重复, 培养 144 h。

(3) 发酵液孢子含量测定。用血球计数板法。

木霉菌孢子个数 (CFU/mL) = 80 个小方格细胞总数 / 80 ×

400 × 10 000 × 稀释倍数

1.3 试验设计

(1) 根据 Plackett–Burman (PB) 的设计原理, 选取 11 个变量因素, 分别为 A (葡萄糖)、B (KH_2PO_4)、D (MgSO_4)、E (丙三醇)、G (蔗糖)、H ($\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$)、J (酵母提取物)、K (可溶性淀粉), 以及 3 个虚拟变量: C、F、I (以便估算误差), 共进行 12 次发酵测试, 响应值为发酵液体的产孢量。PB 测试设计见表 1。采用 Design–Expert 8.0.6 软件, 对表 2 中 12 次发酵测试的孢子产量进行回归分析, 得到各因子对孢子产量的影响偏差回归系数, 以及各因子对孢子产量影响的显著差异性。

表 1 PB 设计因子、水平及编码

Table 1 Factors, levels and codes of PB design

水平 Level	因素 Factor										
	A (葡萄糖) g/L	B (KH_2PO_4) g/L	C (虚拟变 量 1)	D (MgSO_4) g/L	E (丙三醇) mL/L	F (虚拟变 量 2)	G (蔗糖) g/L	H ($\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$) mL/L	I (虚拟变 量 3)	J (酵母 提取物) g/L	K (可溶性 淀粉) g/L
-1	5	2	-1	1	10	-1	1	0.5	-1	1	5
1	15	8	1	1.5	90	1	10	2.0	1	5	20

(2) 最陡爬坡法 (SCPM) 试验。根据 PB 试验得到的 3 个正或负显著影响因素效应值, 设定 SCPM 试验的正负步长、爬坡方向, 确定 3 个显著影响因素的最佳值区。

(3) Box–Behnken (BB) 设计。依据 PB 试验原理和最陡爬坡试验结果, 设计一个对菌株 Tr16 发酵培养基 3 因素 3 水平的 RSAM 试验。使用软件 Design–Expert 8.0.6 构建试验设计并对试验结果进行分析。

(4) 验证试验。用所得到的最佳培养条件进行 3 次平行

发酵试验, 得到平均值后与理论值进行比较, 以验证测试的模型是否可靠, 进而得出最终优化结果^[9]。

2 结果与分析

2.1 PB 设计测试结果 通过 PB 设计, 其测试结果 (表 2、3) 表明, 酵母提取物、 MgSO_4 、 $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ 对孢子产量的影响最大, 葡萄糖、 KH_2PO_4 、丙三醇、蔗糖、可溶性淀粉对孢子产量无显著影响, 其中酵母提取物的影响为正效应, MgSO_4 、 $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ 的影响为负效应。

表 2 PB 试验设计及测试结果

Table 2 Design and results of PB experimental

编号 No.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	孢子产量 (Y) Spore production × 10 ⁸ CFU/mL
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	3.18
2	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	4.07
3	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	4.43
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	5.73
5	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	2.58
6	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	2.55
7	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	4.80
8	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	2.22
9	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	4.35
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3.68
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	2.55
12	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	3.38

2.2 SCPM 测试结果 根据 PB 测试结果, 明确了酵母提取物、 MgSO_4 、 $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ 是发酵培养基中对孢子产量影响最大的 3 个因素。再根据 SCPM 原理, 设定这 3 个因素的爬坡方向及步长测试, 其设计和测试结果见表 4。由表 4 可知, 测试

2 和测试 3 的孢子产量变化不大, 说明此 3 个因素在这 2 个测试中的用量浓度值, 已很接近最佳用量值。因此, 该试验选择酵母提取物 5 g/L、 MgSO_4 1.3 g/L、 $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ 1 mL/L 为中心点, 展开响应面对发酵培养基的优化。

表 3 PB 测试多元回归分析结果

Table 3 Results of multiple regression analysis of PB experiment

变量 Variable	回归系数 Regression coefficient	影响水平 Effect level	F	P Prob> t	显著水平 Significant level	贡献率 Contribution rate %	重要性 Importance
A	-0.30	-0.600	7.72	0.049 9	99.95	8.33	5
B	0.13	0.260	1.50	0.287 4	99.71	1.62	8
D	-0.45	-0.910	17.95	0.013 3	99.98	19.38	2
E	0.45	0.048	8.98	0.023 6	99.87	8.31	6
G	0.23	0.630	4.59	0.098 9	99.90	4.95	7
H	-0.43	-0.870	16.41	0.015 5	99.98	17.71	3
J	0.56	0.023	27.52	0.006 3	99.99	29.70	1
K	0.34	0.014	14.36	0.005 8	99.41	10.00	4

表 4 SCPM 设计及测试结果

Table 4 Design and result of SCPM experimental

测试编号 Test No.	酵母提取物 Yeast extract g/L	MgSO ₄ g/L	H ₈ MoN ₂ O ₄ mL/L	孢子产量 Spore yield ×10 ⁸ CFU/mL
1	1	1.5	2.0	4.68
2	3	1.4	1.5	5.77
3	5	1.3	1.0	5.76
4	7	1.2	0.5	4.79
5	9	1.1	0	4.74

2.3 RSAM 对发酵培养基优化的测试结果 以酵母提取物、MgSO₄、H₈MoN₂O₄ 3 个因素为自变量, BB 试验设计及结果见表 5。

表 5 BB 设计及测试结果

Table 5 Experiments design and result of BB

试验编号 Experimental No.	A (MgSO ₄)	B (H ₈ MoN ₂ O ₄)	C(酵母 提取物)	孢子产量 Spore yield ×10 ⁸ CFU/mL
1	1	0	-1	4.09
2	0	-1	-1	4.13
3	1	-1	0	3.13
4	1	0	1	3.42
5	0	0	0	6.13
6	-1	-1	0	4.64
7	0	0	0	6.10
8	-1	0	1	4.54
9	0	1	-1	4.75
10	-1	0	-1	3.95
11	0	0	0	6.38
12	1	1	0	4.34
13	0	0	0	6.08
14	0	1	1	3.26
15	0	-1	1	4.07
16	-1	1	0	3.53
17	0	0	0	6.20

用 Design-Expert 8.0.6 软件对测试数据进行二次回归拟合, 得到以下回归方程:

$$\text{产孢量 } Y = 6.18 - 0.20A - 0.077B - 0.26C + 0.71AB - 0.43AC - 0.36BC - 1.28A^2 - 1.12B^2 - 1.01C^2$$

式中, A、B、C 分别代表 MgSO₄、H₈MoN₂O₄ 和酵母提取物。

显著性方差分析测试结果(表 6)表明, 方差模型的 $R^2 =$

0.982 7, 表明方程模型与测试结果数据有 98.27% 的符合度, 调整后的 $R^2_{\text{adj}} = 0.960 4$, 表明方程有很高的可信度。在 $\alpha = 0.05$ 的显著水平上, A、B、C、AC、A²、B²、C² 是显著的。

表 6 变量间相互作用的多元回归分析

Table 6 Multiple regression analysis of the interaction between variables

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 The mean square	F	P
模型	19.92	9	2.21	44.06	<0.000 1
A	0.36	1	0.36	7.07	0.032 5
B	8.405E-0.04	1	8.405E-0.04	0.017	0.900 7
C	0.33	1	0.33	6.63	0.036 8
AB	1.35	1	1.35	26.86	0.001 3
AC	0.40	1	0.40	7.86	0.026 4
BC	0.51	1	0.51	10.19	0.015 2
A ²	5.66	1	5.66	112.72	<0.000 1
B ²	5.17	1	5.17	102.93	<0.000 1
C ²	4.36	1	4.36	86.81	<0.000 1
失拟	0.29	3	0.10	6.57	0.050 2

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对回归模型进行响应面分析, 得到各响应面三维图和等高线图(图 1~3)。

从图 1~3 可以看出, 随着培养基中酵母提取物、MgSO₄ 和 H₈MoN₂O₄ 浓度的增加, 孢子含量先增加后下降, 表明两因素间交互作用明显。根据回归方程式的求解, 得到响应面模型极值点, 即酵母提取物、MgSO₄、H₈MoN₂O₄ 最佳使用浓度为 4.83 g/L、1.29 g/L、0.99 mL/L 时, 按此用量配制的发酵液培养基, 能使菌株 Tr16 的孢子产量达 6.19 × 10⁸ CFU/mL 最大值。

2.4 回归模型结果试验验证 根据响应面分析法得到的最优发酵培养基培养配方, 进行了 3 次平行发酵测试, 进一步对响应面模型进行验证。3 次测试的孢子产量分别为 6.17 × 10⁸、6.36 × 10⁸、6.09 × 10⁸ CFU/mL, 平均孢子产量为 6.21 × 10⁸ CFU/mL。这个数值与理论值 6.19 × 10⁸ CFU/mL 非常接近。2 个数值的相对吻合, 证明了响应面模型的可靠性。优化后的培养基: 葡萄糖 5 g/L、KH₂PO₄ 8 g/L、MgSO₄ 1.29 g/L、丙三醇 10 mL/L、蔗糖 10 g/L、H₈MoN₂O₄ 0.99 mL/L、酵母提取物 4.83 g/L、可溶性淀粉 5 g/L。

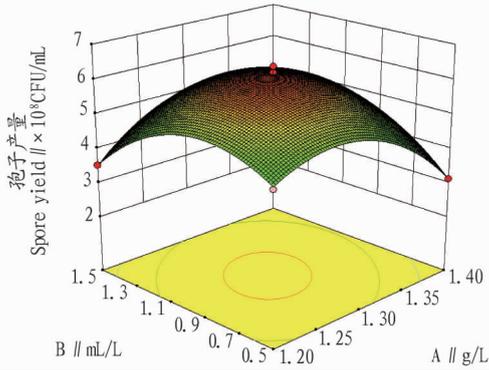


图1 MgSO_4 和 $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ 对孢子产量的交互影响

Fig.1 The interaction effect of MgSO_4 and $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ on spore yield

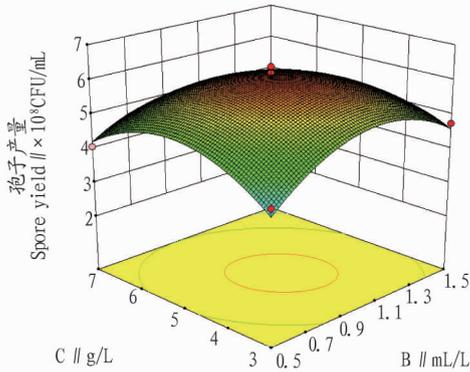


图2 $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ 和酵母提取物对孢子产量的交互影响

Fig.2 The interaction effect of $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ and yeast extract on spore yield

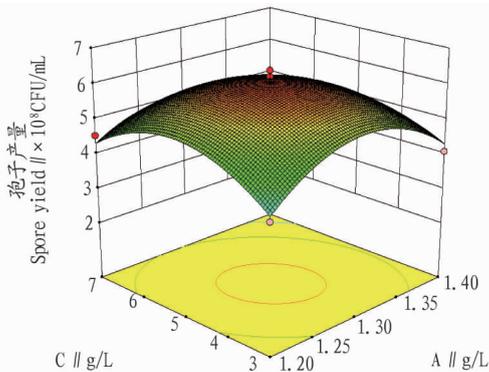


图3 MgSO_4 和酵母提取物对孢子产量的交互影响

Fig.3 The interaction of MgSO_4 and yeast extract on spore yield

3 结论与讨论

用 RSAM 法对发酵培养条件进行优化,能够精准地判断和评价各因素之间的交互作用,从而获得一个最佳组合。袁辉林^[10]对一株植物促生菌的培养基进行了优化,首先利用 PB 设计对影响 SZ7-1 生长的 11 个营养因素进行评价,并筛选出显著影响因子:玉米糖浆、酵母膏和 K_2HPO_4 ;其次用最

陡爬坡试验逼近以上 3 因素最优水平;最后采用 RSM 法对 3 个显著因素的最佳水平范围进行研究,得到的最佳浓度分别为玉米浆 28 g/L、酵母膏 14 g/L 和 K_2HPO_4 2.2 g/L。该测试结果与以上研究结果相似,通过 PB 设计试验筛选出酵母提取物、 MgSO_4 、 $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$ 对孢子含量贡献较大,其中酵母提取物对孢子含量的影响最为明显,然后利用 BB 设计建立了 3 个主要因素与响应值之间的二次回归模型,并由此确定了木霉菌 Tr16 产孢的最佳配方为酵母提取物、 MgSO_4 、 $\text{H}_8\text{MoN}_2\text{O}_4$,最佳浓度为 4.83 g/L、1.29 g/L、0.99 mL/L。

在优化过程中,RSAM 可以单独针对微生物发酵的培养条件进行优化,也可综合培养基组分和培养条件一起进行考察。目前,利用该方法对不同微生物的发酵条件进行优化,均不同程度地提高目标产物的产量^[11]。Lotfy 等^[12]采用 BB 设计,用一种新分离的黑曲霉进行发酵,生产柠檬酸。在对该黑曲霉培养基进行优化的同时,也对培养条件进行了优化。结果发现,当孢子浓度为 10^8 CFU/mL, pH 为 4.0,通气量为 6 500 mL/min,温度为 31.5 °C 时,柠檬酸的生产率可达 87.81%,是优化前的 14 倍。该测试结果与以上研究结果说明,在微生物培养基的优化工作中,PB 设计、最陡爬坡试验和响应面分析法结合是一种逻辑性强、效果良好的过程优化过程。木霉菌 Tr16 经过 RSAM 测试,孢子含量明显提高,达 6.21×10^8 CFU/mL,与理论值相近,比未优化的培养基孢子产量提高了 70.8%。该结果将为木霉菌 Tr16 液体发酵的放大和工业化生产提供了可参考数据。

参考文献

- [1] 惠有为,孙勇,潘亚妮,等.木霉在植物真菌病害防治上的作用[J].西北农业学报,2003,12(3):96-99.
- [2] 台莲梅,高俊峰,张亚玲,等.拮抗长枝木霉 T115D 菌株发酵条件[J].江苏农业科学,2013,41(10):333-334.
- [3] WEINDLING R.Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* in *Rhizoctinia solani* and other soil fungi[J].Phytopathology,1934,24:1153-1179.
- [4] 高雪丽,吴坚平,徐刚,等.侧钩木霉的分离、鉴定及产孢条件优化[J].中国生物工程杂志,2014,34(2):84-92.
- [5] BOSCOLO P R S,MENOSI M,JORGE R A.Aluminum-induced oxidative stress in maize[J].Phytochemistry,2003,62(2):181-189.
- [6] CHO U H,PARK J O.Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings [J].Plant science,2000,156(1):1-9.
- [7] SAMANTARY S.Biochemical responses of Cr-tolerant and Cr-sensitive mung bean cultivars grown on varying levels of chromium [J].Chemosphere,2002,47(10):1065-1072.
- [8] 陈晨,旷文丰,陈娟,等.钙离子和蓝光对深绿木霉 Tr775 在液体发酵过程中分生孢子产量的影响[J].化学与生物工程,2018,35(1):36-40.
- [9] 梁昌聪,郭立佳,刘磊,等.响应面法优化解淀粉芽孢杆菌 C101 发酵培养基[J].生物技术通报,2014(8):169-174.
- [10] 袁辉林.植物促生菌培养优化及作用机理研究[D].北京:中国林业科学研究院,2011.
- [11] 袁辉林,康丽华,马海滨.响应曲面法及其在微生物发酵工艺优化中的应用[J].安徽农业科学,2011,39(16):9498-9500,9502.
- [12] LOTFY W A,GHANEM K M,EL-HELOW E R.Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate; II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs[J].Bioresour technol,2007,98:3470-3477.