

张功营, 杨华, 董丽红, 等. 响应面法优化绿僵菌产绿僵菌素 A 的培养条件[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(1): 76-82.

响应面法优化绿僵菌产绿僵菌素 A 的培养条件

张功营, 杨 华, 董丽红, 万树青
(华南农业大学 农学院/天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】优化绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 产绿僵菌素 A 的培养条件, 提高绿僵菌素的产量。【方法】应用响应面法设计试验, 以 Plackett-Burman 试验设计和中心组合试验设计筛选得到影响绿僵菌液体发酵的关键因素。【结果】试验得到 1 个拟合程度高、误差小的模型, 该模型给出的最佳培养条件为: 蔗糖 22.7 g·L⁻¹、蛋白胨 13.4 g·L⁻¹ 和发酵时间 9.70 d, 预测绿僵菌素 A 最大质量浓度为 6.90 μg·mL⁻¹, 实际测得质量浓度为 6.89 μg·mL⁻¹。【结论】结果可为绿僵菌大规模发酵获得粗毒素提供理论依据, 使绿僵菌粗毒素的广泛开发与应用成为可能。

关键词: 绿僵菌; 绿僵菌素; 产量; 响应面法; 液体发酵; 培养条件
中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)01-0076-07

Optimization of culture condition of *Metarhizium anisopliae* for destruxin A production by response surface methodology

ZHANG Gongying, YANG Hua, DONG Lihong, WAN Shuqing
(College of Agriculture, South China Agricultural University/Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To raise the destruxin A production of *Metarhizium anisopliae* by optimizing culture conditions of liquid fermentation. 【Method】Experiments were designed by response surface methodology (RSM). The key factors affecting the liquid fermentation were screened by Plackett-Burman design and central composite design. 【Result】A model with high fitting degree and small error was obtained. The optimum culture condition of this model was 22.7 g·L⁻¹ sucrose, 13.4 g·L⁻¹ peptone and 9.70 d for fermentation. The maximum predicted concentration of destruxin A was 6.90 μg·mL⁻¹, while the actual measured concentration was 6.89 μg·mL⁻¹. 【Conclusion】The results can provide a theoretical basis for large-scale fermentation of *M. anisopliae* and production of crude toxin, which can potentially enable the widespread development and application of crude toxin.

Key words: *Metarhizium anisopliae*; destruxin; yield; response surface methodology; liquid fermentation; culture condition

绿僵菌素又称为腐败素或破坏素, 最初是从金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 发酵液中分离得到, 是由 1 个 α-羟基酸和 5 个氨基酸残基组成的

环缩肽类化合物, 目前共分离到 40 余种类似物, 其中绿僵菌素 A、B 和 E 的活性较高^[1]。绿僵菌素除具有杀虫活性外, 还具有除草、抗病毒等活性^[2-4]。

收稿日期: 2017-04-20 优先出版时间: 2017-12-29
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20171229.1142.026.html>
作者简介: 张功营 (1990—), 男, 硕士研究生, E-mail: 1358905013@qq.com; 通信作者: 万树青 (1953—), 男, 教授, 博士, E-mail: wanshuqing@scau.edu.cn
基金项目: 广东省烟草专卖局 (公司) 科技项目 (粤烟科[2015]7 号)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

在绿僵菌侵染寄主的过程中分泌的绿僵菌素可以加速昆虫的死亡, 所以绿僵菌素与绿僵菌的致病力密切相关^[5-6]。目前, 国内对绿僵菌的研究主要集中在绿僵菌发酵获得大量分生孢子方面, 鲜有探索绿僵菌产毒素培养条件的优化。蔡守平^[7]优化了绿僵菌固体发酵培养基, 以 500 g 固体培养基加 400 mL 水后灭菌, 绿僵菌产孢量最高, 达到 $8.11 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 。许天委等^[8]优化金龟子绿僵菌固液双相发酵条件后, 得到较适合的培养基, 在液体培养时分生孢子达到 $4.30 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 菌丝生长量达到 $5.99 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 固体发酵时, 浅盘发酵法优于袋装发酵法, 培养 7 d 的产粉量可达 $16.10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。通常绿僵菌素产量较低, 分离提纯较为困难, 所以优化绿僵菌产毒素发酵条件, 提高毒素产量获得粗毒素显得至关重要^[9]。将绿僵菌发酵液经过萃取浓缩即可获得绿僵菌粗毒素, 提取工艺简单且粗毒素中同时含有多种绿僵菌素, 生产成本相对比获得绿僵菌素纯品要低。

响应面法是将试验设计与数学建模综合起来的一种试验设计优化方法, 通过对关键因素进行优化试验, 获得回归拟合模型, 并得到各因素的最优值^[10]。响应面法具有试验次数少、设计合理, 能够同时研究多个因素间的交互作用等优点, 已在工程机械、微生物发酵、物质提取等领域得到广泛应用^[11-13]。本研究利用响应面法探索绿僵菌产毒素的培养条件, 以期提高粗毒素的产量, 为绿僵菌素的开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

金龟子绿僵菌菌株 M25, 来自广东省林业科学研究院林业生物杀虫剂研究团队。

高效液相色谱仪 1100(安捷伦公司); SW-CJ-IBU 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); DHZ-D 型恒温振荡器(太仓试验设备厂); HVE-50 型高压灭菌器(日本株式会社平山制作所); 1702-MP8 型电子天平(德国 Startorius 公司)。

1.2 方法

1.2.1 绿僵菌素 A 标准液配制 准确称取 10.00 mg 绿僵菌素 A 标准品, 用适量色谱乙腈溶解, 转移至 100 mL 容量瓶, 用色谱乙腈定容至刻度, 配置成 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 绿僵菌素 A 标准品储备液, 备用。

1.2.2 绿僵菌素 A 的提取制备 绿僵菌素 A 的提取制备参照文献^[14]的方法, 将绿僵菌发酵液进行多次反复抽滤, 将滤液 pH 调节至 2~4, 与等体积的萃取剂【 $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{乙酸乙酯})=1:1$ 】混匀进行萃取, 连续萃取 3 次, 每次萃取 2 h。将分离到的有机相于 50 ℃ 条件下旋转蒸发浓缩, 得到的黄色黏稠物用丙酮溶解, 在 50 ℃ 条件下烘干得到粗毒素。

1.2.3 绿僵菌素 A 的鉴定 将提取制备的粗毒素用色谱乙腈溶解稀释后, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜, 然后在高效液相色谱(HPLC)仪上进行鉴定。色谱条件参考 Hu 等^[15]的方法: Agilent ZORBAX SB-C18 液相色谱柱 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm}$), 流动相为 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=45:55$, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $25 \mu\text{L}$, 温度 25 ℃, 检测波长为 215 nm。

1.2.4 单因素试验设计 选取蔗糖(C 源)、pH、温度、培养时间、转速、蛋白胨(N 源)、装液量、氨基酸共 8 个影响绿僵菌素 A 产量的因素进行单因素试验设计。

1.2.5 Plackett-Burman 试验设计 在单因素试验设计的基础上, 应用 Plackett-Burman 试验设计确定影响绿僵菌产毒素的关键因素。根据试验结果确定 Plackett-Burman 试验设计中因素的水平(表 1), 每个因素 2 个水平, 包括虚拟因素。

1.2.6 响应面中心组合试验设计 以单因素试验设计结果为依据, 对关键因素蔗糖质量浓度、发酵时间和蛋白胨质量浓度, 利用响应面中心组合试验设计原理, 以绿僵菌素 A 质量浓度为响应值, 设计 3 因素 3 水平的响应面试验(表 2)。

1.3 数据处理

以上每组试验均重复 3 次, 试验数据采用 Microsoft Excel 2016 进行处理, 响应面试验设计和数据统计分析采用 Design-Expert 8.0 软件。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素水平表
Tab. 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

水平	因素							
	$\rho(\text{蔗糖})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	pH	$\theta/^\circ\text{C}$	转速/ ($\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)	$t_{\text{培养}}/\text{d}$	$\rho(\text{蛋白胨})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	装液量/ ($\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\rho(\beta\text{-丙氨酸})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
-1	5	5	24	140	6	5	200	1
1	25	10	32	220	11	20	500	2

表 2 中心组合试验设计因素水平表
Tab. 2 Factors and levels of central composite design

水平	因素		
	$\rho(\text{蔗糖})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{蛋白胨})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$t_{\text{培养}}/\text{d}$
-1	15	5	7
0	20	10	9
1	25	15	11

2 结果与分析

2.1 绿僵菌素 A 标准曲线

将绿僵菌素 A 储备液稀释成 0.5、1.0、2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列标准液,按照方法中色谱条件测定。绿僵菌 A 标准品和发酵液 HPLC 色谱图见图 1。以峰面积为纵坐标,绿僵菌素 A 质量浓度为横坐标,建立标准曲线,得到线性回归方程: $y=27.046x-8.328$,决定系数为 0.993。

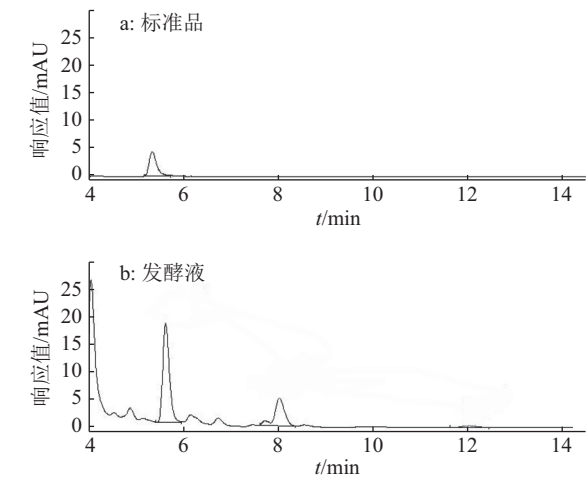


图 1 绿僵菌素 A 标准品和发酵液 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of destruxin A standard substance and fermentation broth

2.2 单因素试验结果与分析

蔗糖为绿僵菌的生长繁殖提供碳源,考察不同蔗糖含量对绿僵菌素 A 产量的影响,试验结果见图 2a。蔗糖质量浓度在 0~20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随蔗糖质量浓度增加,绿僵菌产绿僵菌素 A 的质量浓度增加。当蔗糖为 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,绿僵菌素 A 的质量浓度达到最大值 (6.48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。之后绿僵菌素 A 的质量浓度随蔗糖质量浓度增加而下降。

pH 对绿僵菌产毒素 A 的影响见图 2b,在 pH=7 时,绿僵菌素 A 的产量最高,质量浓度达到 6.32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;在 pH=8 时,绿僵菌素 A 质量浓度为 6.19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,比在 pH=7 条件下略低。当 pH 偏酸

或偏碱时,绿僵菌素 A 的产量受抑制。因此,绿僵菌产毒素 A 的最适 pH 为 7。

温度对绿僵菌产绿僵菌素 A 的影响见图 2c,温度在 24~28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,绿僵菌素 A 的质量浓度随温度升高而增加,温度高于 28 $^{\circ}\text{C}$,绿僵菌素 A 质量浓度下降。在 28 $^{\circ}\text{C}$ 时绿僵菌素 A 质量浓度达最大值 (6.29 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);30 $^{\circ}\text{C}$ 时绿僵菌素 A 质量浓度为 6.11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;其余温度下均低于 6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

转速对绿僵菌产绿僵菌素 A 的影响见图 2d,当转速在 140~220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,随发酵液转速的增加,绿僵菌素 A 的质量浓度增大,当发酵时的转速为 220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,绿僵菌素 A 的质量浓度最大,达到 6.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

发酵培养时间对绿僵菌产绿僵菌素 A 的影响见图 2e,在发酵时间内,绿僵菌素 A 的质量浓度呈先增加后略有下降的趋势。发酵 6~9 d,绿僵菌素 A 质量浓度随发酵时间延长而不断增大。在第 9 天达到最大值 (6.51 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);在第 8、10 和 11 天时的质量浓度分别为 6.11、6.34 和 6.29 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。绿僵菌产毒素 A 最佳发酵培养时间为 9 d。

蛋白胨含量对绿僵菌发酵产生绿僵菌素 A 的影响见图 2f,蛋白胨质量浓度在 5~10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着蛋白胨质量浓度的增加绿僵菌素 A 的质量浓度增加。在蛋白胨质量浓度为 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,绿僵菌素 A 的质量浓度达到最大值 (6.33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),在蛋白胨质量浓度为 15 和 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,绿僵菌素 A 的质量浓度分别为 6.24 和 6.18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

发酵时培养基装液量对绿僵菌产生绿僵菌素 A 的影响见图 2g,结果显示,当 1 L 的三角瓶中,装有 300 mL 发酵液时,绿僵菌素 A 的质量浓度最大,为 6.35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,在其他装液量条件下,绿僵菌素 A 质量浓度均小于 6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;随着装液量的增加,三角瓶中空间减小,空气量下降,绿僵菌发酵受到影响。

氨基酸对绿僵菌产绿僵菌素 A 的影响见图 2h,3 种氨基酸中 β -丙氨酸对促进绿僵菌分泌绿僵菌素 A 的效果最好,绿僵菌素 A 质量浓度为 6.46 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;添加甘氨酸、赖氨酸时,绿僵菌素 A 的质量浓度分别为 6.21 和 6.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 Plackett-Burman 试验设计结果与分析

Plackett-Burman 试验设计采用 $N=12$ 的设计方法,分析了 11 个因素对绿僵菌产毒素 A 的影响。有 3 个虚拟因素,其余 8 个因素为蔗糖质量浓度、pH、温度、培养时间、转速、蛋白胨质量浓度、装液量、 β -丙氨酸质量浓度。试验结果见表 3。利用 Design-Expert 软件数据进行处理和显著性分析。

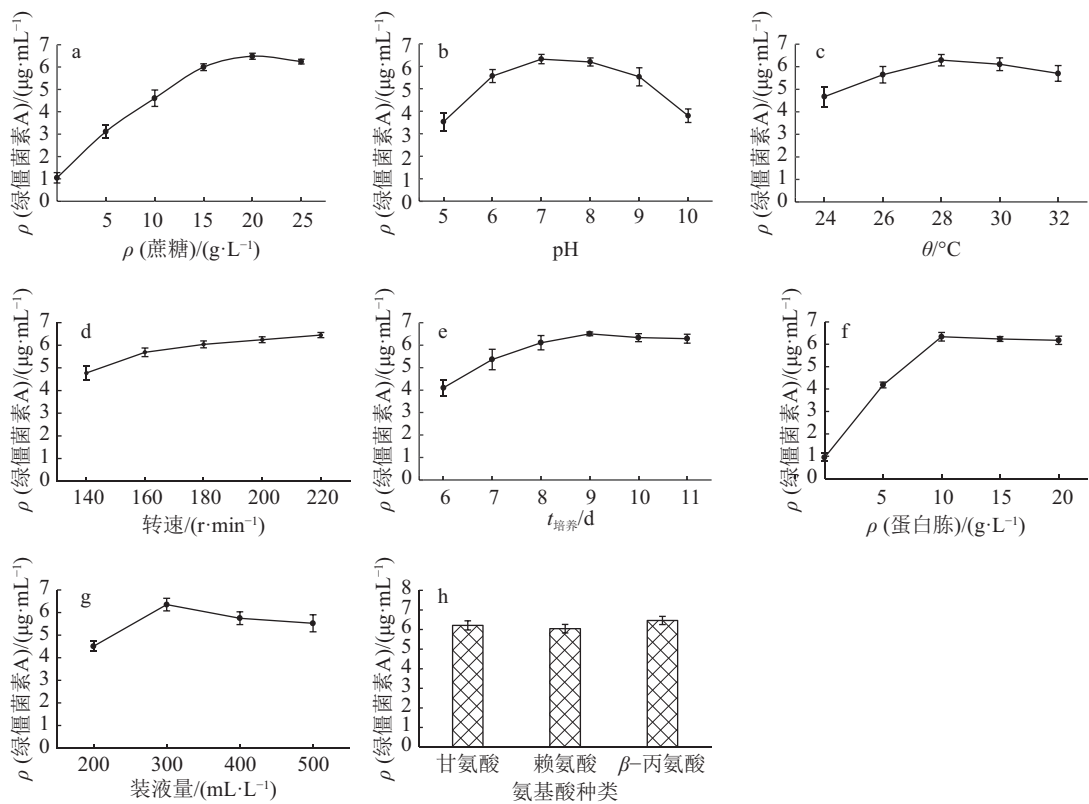


图 2 各因素对绿僵菌素 A 产量的影响

Fig. 2 Effects of different factors on the production of destruxin A

表 3 Plackett-Burman 试验设计及结果

Tab. 3 Plackett-Burman design and results

试验号	因素及水平									ρ (绿僵菌素A)/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	蔗糖质量浓度	pH	温度	转速	培养时间	蛋白胨质量浓度	装液量	β -丙氨酸质量浓度		实际值	预测值
1	1	-1	1	1	-1	1	1	1		5.26	4.92
2	-1	1	-1	1	1	-1	1	1		3.54	3.08
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1		2.26	1.92
4	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1		4.93	4.92
5	1	1	-1	1	1	1	-1	-1		6.55	6.56
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1		2.99	3.33
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1		3.81	4.27
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1		4.91	4.80
9	-1	1	1	-1	1	1	1	-1		2.94	3.05
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1		1.88	2.34
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1		5.17	5.16
12	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1		1.89	1.78

由表 4 可以看出, 蔗糖质量浓度、培养时间和蛋白胨质量浓度对绿僵菌产毒素 A 发酵培养影响显著 ($P<0.05$), 其贡献值分别为 27.30%、17.27% 和 29.88%。

2.4 响应面中心组合设计结果与分析

由表 4 可知, 蔗糖、蛋白胨质量浓度和培养时间为对绿僵菌产毒素 A 发酵培养的显著影响因子,

对其进行中心组合试验设计, 设计结果见表 5。获得二次拟合回归方程: $y=6.40+0.36x_1+0.93x_2+0.35x_3+0.13x_1x_2+0.02x_1x_3-2.50\times10^{-3}x_2x_3-0.49x_1^2-0.60x_2^2-0.62x_3^2$, 式中, y 为绿僵菌素 A 的质量浓度, x_1 、 x_2 和 x_3 分别代表蔗糖、蛋白胨质量浓度和培养时间。对该回归模型进行方差分析 (表 6) 可知, 模型

表 4 Plackett-Burman 试验的方差分析
Tab. 4 Variance analysis of Plackett-Burman design

因素	效应	<i>F</i>	<i>P</i> ¹⁾	贡献值/%	重要性
蔗糖质量浓度	1.52	20.56	0.020 1 [*]	27.30	2
pH	-0.37	1.19	0.354 5	1.58	8
温度	-0.42	1.57	0.299 2	2.08	7
转速	0.70	4.33	0.129 0	5.74	5
培养时间	1.21	13.01	0.036 6 [*]	17.27	3
蛋白胨质量浓度	1.59	22.51	0.017 8 [*]	29.88	1
装液量	-0.88	6.91	0.078 4	9.17	4
β-丙氨酸质量浓度	0.50	2.25	0.230 2	2.99	6

1) “*” 表示该因素的影响达到显著水平($P<0.05$, t 检验)

表 5 响应面中心组合设计及结果
Tab. 5 Central composite design and results

试验号	因素及水平			$\rho(\text{毒素A})/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
	蔗糖质量浓度(A)	蛋白胨质量浓度(B)	培养时间(C)	实际值	预测值
1	1	-1	-1	3.52	3.60
2	1	-1	1	4.43	4.34
3	-1	1	-1	4.57	4.80
4	-1.682	0	0	4.59	4.40
5	-1	1	1	5.39	5.45
6	0	0	0	6.55	6.40
7	-1	-1	-1	3.30	3.18
8	0	-1.682	0	3.13	3.12
9	0	0	0	6.54	6.40
10	0	0	0	6.35	6.40
11	1	1	1	6.20	6.46
12	0	0	1.682	5.45	5.23
13	0	0	0	6.31	6.40
14	1.682	0	0	5.62	5.60
15	1	1	-1	5.84	5.73
16	0	1.682	0	6.46	6.26
17	0	0	0	6.26	6.40
18	0	0	0	6.34	6.40
19	0	0	-1.682	4.04	3.85
20	-1	-1	1	3.59	4.06

的失拟项 $P=0.056\ 1>0.05$, 不显著; 模型 $P<0.000\ 1$, 表明所得模型达到极显著水平。模型校正决定系数 (R^2_{adj}) 为 0.970 4, 说明该模型能解释 97.04% 的响应值; 模型的决定系数 (R^2) 为 0.984 4, 表明该模型拟合程度高、试验误差小, 可以对试验结果进行准确预测和分析。在模型中因素 A、B、C、 A^2 、 B^2 及

表 6 响应面模型方差分析¹⁾
Tab. 6 Variance analysis of response surface model

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	27.44	9	3.05	70.20	<0.000 1 ^{**}
A	1.74	1	1.74	40.02	<0.000 1 ^{**}
B	11.92	1	11.92	274.51	<0.000 1 ^{**}
C	1.65	1	1.65	38.06	0.000 1 ^{**}
AB	0.13	1	0.13	2.99	0.114 2
AC	3.20×10^{-3}	1	3.20×10^{-3}	0.07	0.791 6
BC	5.00×10^{-5}	1	5.00×10^{-5}	1.15×10^{-3}	0.973 6
A^2	3.52	1	3.52	80.96	<0.000 1 ^{**}
B^2	5.25	1	5.25	120.87	<0.000 1 ^{**}
C^2	5.56	1	5.56	128.06	<0.000 1 ^{**}
残差	0.43	10	0.04		
失拟项	0.36	5	0.07	4.75	0.056 1
纯误差	0.08	5	0.02		
总和	27.87	19			

1) A、B、C 分别为蔗糖质量浓度、蛋白胨质量浓度和培养时间; “**” 表示达极显著水平($P<0.001$, t 检验); $R^2=0.984$, $R^2_{\text{adj}}=0.970\ 4$

C^2 6 项的 $P<0.000\ 1$, 具有极高的显著性。

利用 Design-Expert8.0 软件绘出模型中 AB、AC 和 BC 交互项的等高线图和响应曲面图 (图 3、

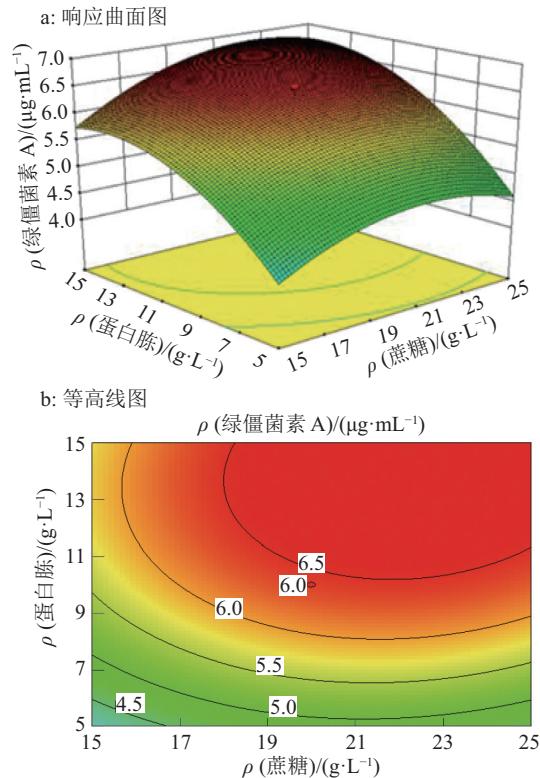


图 3 蔗糖与蛋白胨交互影响的响应曲面和等高线图
Fig. 3 Response surface and contour of interaction between sucrose and peptone contents

图 4 和图 5)。响应曲面的陡峭程度,反映了因素对试验的影响程度,如果曲面陡峭程度高,说明该因素对试验结果影响大,反之,则对试验结果影响小。

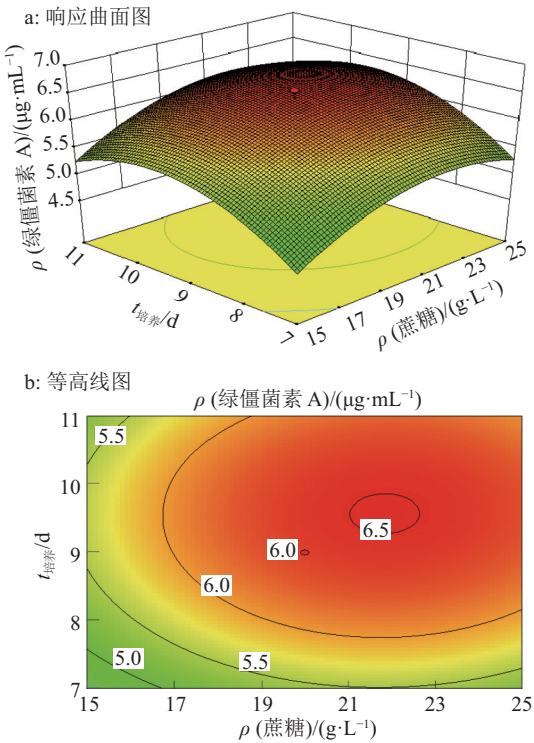


图 4 蔗糖与培养时间交互影响的响应曲面和等高线图
Fig. 4 Response surface and contour of interaction between sucrose content and fermentation time

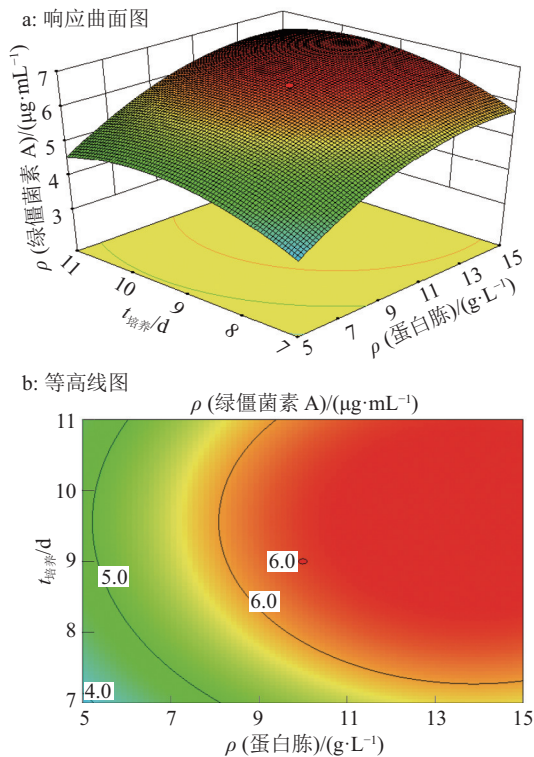


图 5 蛋白胨与培养时间交互影响的响应曲面和等高线图
Fig. 5 Response surface and contour of interaction between peptone content and fermentation time

从曲面图(图 3a、4a、5a)可知,蔗糖质量浓度、蛋白胨质量浓度和培养时间之间,当其中 1 个因素固定时,绿僵菌素 A 的质量浓度随另 2 个因素的增加先增加后下降,这说明 3 个因素与绿僵菌素 A 的浓度间存在交互作用。

2.5 最佳培养条件的确立与验证

用软件对模型回归方程进行解析,得出最佳培养条件:蔗糖(C 源)为 22.7 g·L⁻¹、蛋白胨(N 源)为 13.4 g·L⁻¹和培养时间 9.70 d,绿僵菌素 A 最大质量浓度为 6.90 μg·mL⁻¹。考虑到实际操作条件,将最佳方案调整为蔗糖(C 源)23.0 g·L⁻¹、蛋白胨(N 源)13.0 g·L⁻¹和培养时间 9.50 d,试验重复 3 次。应用调整后的方案培养绿僵菌,根据绿僵菌素 A 标准曲线计算得到绿僵菌素 A 质量浓度平均值为 6.89 μg·mL⁻¹,与模型预测值无显著差异。

3 讨论与结论

绿僵菌分泌的绿僵菌素具有杀虫、除草、抗病毒活性;还具有一定的药理活性,其对引起阿尔茨海默病的 β-淀粉样蛋白的产生有抑制作用^[16];还可作为与肿瘤、糖尿病和肾小管酸中毒等疾病形成有关的 V-ATPases 的抑制剂^[17-19]。

响应面法作为一种试验设计优化方法,与正交试验相比,可以减少试验次数且试验设计较为合理,能够同时研究多个因素间的交互作用,已广泛应用于微生物发酵培养条件的优化等领域。张婧迪等^[20]应用响应面法优化了金龟子绿僵菌固体发酵培养条件,最佳培养基条件下实际产孢量达 6.94×10⁹g⁻¹。张棋等^[21]应用响应面法优化了金龟子绿僵菌液体发酵培养基,优化后绿僵菌生物量达 16.52 g·L⁻¹,比优化前提高 37.24%。本研究应用响应面法,筛选出了与绿僵菌产毒素有关的 3 个关键因素:蔗糖质量浓度、发酵时间和蛋白胨质量浓度。试验得到可靠和预测能力高的模型,优化后的最佳培养条件为:蔗糖 23 g·L⁻¹、蛋白胨13 g·L⁻¹、β-丙氨酸 2 g·L⁻¹、培养时间 9.50 d、pH 为 7~8、温度 28 ℃、转速 220 r·min⁻¹以及 1 L 的三角瓶中装 300 mL 培养基。模型预测绿僵菌素 A 质量浓度为 6.90 μg·mL⁻¹,验证后实际质量浓度达 6.89 μg·mL⁻¹,比优化前绿僵菌素 A 产量提高 8% 以上。通常情况下,绿僵菌对毒素的产量较低,同时绿僵菌素的分离纯化工艺过程复杂、成本较高,使得绿僵菌素的推广应用受到制约。本研究结果为绿僵菌大规模发酵获得绿僵菌粗毒素提供了理论依据,同时也使得绿僵菌粗毒素的广泛开发与应用成为可能。

参考文献:

- [1] ARROYO N, DIANA D M J, GARRIDO I, et al. Analytical strategy for determination of known and unknown destruxins using hybrid quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(13): 1-11.
- [2] RCCAVINDRAN K, AKUTSE K S, SIVARAMAKRISHNAN S, et al. Determination and characterization of destruxin production in *Metarhizium anisopliae* Tk6 and formulations for *Aedes aegypti* mosquitoes control at the field level[J]. Toxicon, 2016, 120: 89-96.
- [3] RIOSMORENO A, CARPIO A, GARRIDO I, et al. Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UH-PLC-MS/MS[J]. Biocontrol Sci Techn, 2016, 26(9): 1-25.
- [4] LOZANO M D, GARRIDO I, LAFONT F, et al. Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)[J]. J Econ Entomol, 2015, 108(2): 462-472.
- [5] KERSHAW M J, MOORHOUSE E R, BATEMAN R, et al. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect[J]. J Invertebr Pathol, 1999, 74(3): 213.
- [6] DUMAS C, ROBERT P, PAIS M, et al. Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins[J]. Comp Biochem Phys C, 1994, 108(2): 195-203.
- [7] 蔡守平. 绿僵菌 MaZPTR-01 菌株固体发酵条件筛选研究[J]. 西南林业大学学报, 2016, 36(5): 100-105.
- [8] 许天委, 张世清, 黄俊生. 金龟子绿僵菌的液固双相发酵研究[J]. 河南农业科学, 2013, 42(2): 93-97.
- [9] 胡琼波, 任顺祥. 绿僵菌素的研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2004, 20(4): 234-242.
- [10] 刘志祥, 曾超珍. 响应面法在发酵培养基优化中的应用[J]. 北方园艺, 2009(2): 127-129.
- [11] RUQAYYAH T, JAMAL P, ALAM M, et al. Application of response surface methodology for protein enrichment of cassava peel as animal feed by the white-rot fungus *Panustigrinus* M609RQY[J]. Food Hydrocolloid, 2014, 42(2): 298-303.
- [12] TRUPKIN S, LEVIN L, FORCHIASSIN F, et al. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology[J]. J Ind Microbiol Biot, 2003, 30(12): 682-690.
- [13] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.
- [14] 卢艳阳. 绿僵菌粗毒素的提取、分离和结构鉴定及对几种重要害虫的毒性测定[D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
- [15] HU Q, REN S, WU J, et al. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10[J]. Toxicon, 2006, 48(5): 491-498.
- [16] ITOH N, OKOCHI M, TAGAMI S, et al. Destruxin E decreases beta-amyloid generation by reducing colocalization of beta-amyloid-cleaving enzyme 1 and beta-amyloid protein precursor[J]. Neurodegener Dis, 2009, 6(5/6): 230-239.
- [17] KOUVELIS V N, WANG C, SKROBEK A, et al. Assessing the cytotoxic and mutagenic effects of secondary metabolites produced by several fungal biological control agents with the Ames assay and the VITOTOX (R) test[J]. Mutat Res-Gen Tox En, 2011, 722(1): 1-6.
- [18] WU C, CHEN T, LIU B, et al. Destruxin B isolated from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* induces apoptosis via a Bcl-2 family-dependent mitochondrial pathway in human nonsmall cell lung cancer cells[J]. Evid-Based Compl Alt, 2013, 2013: 1-11.
- [19] LIU B, TZENG Y. Development and applications of destruxins: A review[J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(6): 1242-1254.
- [20] 张婧迪, 蔡明美, 刘志诚, 等. 响应面设计优化绿僵菌固体发酵条件[J]. 微生物学通报, 2016, 43(9): 2072-2078.
- [21] 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.

【责任编辑 霍 欢】