

响应面法优化生防菌吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 的发酵工艺

李浩, 任嘉红, 叶建仁

南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037

李浩, 任嘉红, 叶建仁. 响应面法优化生防菌吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 的发酵工艺. 生物工程学报, 2013, 29(2): 243-246.

Li H, Ren JH, Ye JR. Optimization of biocontrol agent *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 fermentation by response surface methodology. Chin J Biotech, 2013, 29(2): 243-246.

摘要: 以吡咯伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 为出发菌株, 对其发酵工艺进行优化, 以期提高发酵效率。通过筛选试验、最陡爬坡试验和响应面分析确定影响 JK-SH007 菌株生长最重要两因素为玉米浆和葡萄糖, 其最佳浓度分别为 13.88 g/L 和 3.37 g/L。优化后的发酵工艺培养该菌浓度可达 1.18×10^9 CFU/mL, 比优化前提高 1.35 倍, 抑菌活性提高 28.84%。

关键词: 吡咯伯克霍尔德氏菌, 发酵, 响应面法, 玉米浆, 生防菌

Optimization of biocontrol agent *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 fermentation by response surface methodology

Hao Li, Jiahong Ren, and Jianren Ye

College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

Abstract: In order to improve ferment efficiency of biocontrol agent *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007, the fermentation conditions of this strain were optimized. The optimal fermentation conditions were corn steep liquor (13.88 g/L) and glucose (3.37 g/L) by screening test, steepest ascent experiments and response surface analysis. The results showed that the cell density of JK-SH007 (1.18×10^9 CFU/mL) increased 1.35 times than before, and there was a 28.84% increase in antifungal activity.

Keywords: *Burkholderia pyrrocinia*, fermentation, response surface methodology, corn steep liquor, biocontrol agent

Received: October 22, 2012; **Accepted:** December 6, 2012

Supported by: China Postdoctoral Science Foundation (No. 20110491434), Chinese Special Fund Project for the Scientific Research of the Forest Public Welfare Industry (No. 201304404), the Innovation Plan for Graduate Students of Jiangsu Province (No. CXZZ11_0505).

Corresponding author: Jianren Ye. Tel: +86-25-85427305; E-mail: jrye@njfu.edu.cn

国家博士后基金 (No. 20110491434), 国家林业公益性行业科研专项项目 (No. 201304404), 江苏省普通高校研究生科研创新计划 (No. CXZZ11_0505) 资助。

洋葱伯克霍尔德氏菌群 (*Burkholderia cepacia* complex, 简称 BCC) 是常见的生防菌, 具有生物防治、生物降解及促进植物生长等多种功能^[1-5]。本文研究的 JK-SH007 菌株隶属 genomovar IX: *B. pyrrocinia*, 前期研究显示其对杨树溃疡病具防治作用, 且对杨树具显著的促生长作用^[6-7]。为提高其生防效益, 扩大应用范围, 本文采用响应面法优化其发酵工艺, 以得到大量菌体, 进行菌体制剂生产。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

吡咯伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号: M 209028; 金黄壳囊孢菌 *Cytospora chrysosperma*, 杨树溃疡病原真菌, 用于检测 JK-SH007 发酵液抑菌活性, 本实验室分离保存^[8]。

1.2 培养基与培养方法

初始发酵工艺参考文献^[7], 选取 7 种常用营养元素作为优化发酵工艺的对象 (表 1)。

1.3 菌体浓度测量及抑菌活性测定

发酵后测量各发酵液吸光值 OD_{600} , 根据标准曲线计算相应的菌体个数: $y=(1.61x+0.11)10^8$ (式中: y 为菌体个数/mL, x 为吸光值)。发酵液抑菌活性测定参考文献^[7]。

1.4 数理统计方法

首先采用二水平正交试验筛选主因素, 然后采用最陡爬坡试验逼近最大响应区域, 最后采用响应面法对主因素的浓度进一步研究, 以获得最优发酵工艺。

1.5 模型验证

对最终所得的发酵工艺进行验证, 测定菌体浓度和发酵液抑菌活性, 若菌体浓度与模型相符且抑菌活性无损失, 便可以确定杨树溃疡病拮抗细菌 JK-SH007 的最佳发酵工艺。

2 结果与分析

2.1 筛选试验

各因素水平及方差分析见表 1, 试验设置见表 2。可见玉米浆 ($P<0.01$) 和葡萄糖 ($P<0.01$) 对响应影响极显著。故选取此二者进行最陡爬坡试验。麸皮和黄豆粉对响应影响很小, 不再添加; 其他变量维持低水平。

2.2 最陡爬坡试验

试验设置及结果见表 3, 可见处理 2 的响应值

表 1 各种因素的影响

Table 1 Effects of different factors

Variables		Level (g/L)		F test	
Symbol	Parameter	Level 1	Level 2	F value	Prob>F
A	Soybean powder	2.00	3.00	3.48	0.16
B	Glucose	0.00	1.00	79.45	0.00
C	Corn steep liquor	4.00	8.00	175.90	0.00
D	Bran	2.00	3.00	1.38	0.33
E	Sucrose	0.00	1.00	0.48	0.54
F	NaCl	1.00	3.00	0.18	0.70
G	KH ₂ PO ₄	0.50	1.00	0.59	0.50

表 2 正交试验设计及响应值

Table 2 Orthogonal design and responding value

Run	A	B	C	D	E	F	G	Cell density
1	1	1	1	1	1	1	1	2.11
2	1	1	1	1	2	2	2	2.04
3	1	1	2	2	1	1	1	2.97
4	1	1	2	2	2	2	1	3.32
5	1	2	2	1	2	2	1	2.12
6	1	2	2	1	2	2	1	2.97
7	1	2	2	2	1	1	1	5.27
8	1	2	2	2	1	1	1	5.31
9	2	1	2	1	2	1	2	2.46
10	2	1	2	1	2	1	2	2.32
11	2	1	2	2	1	2	1	3.43
12	2	1	2	2	1	2	1	3.57
13	2	2	1	1	2	2	1	2.91
14	2	2	1	1	2	1	1	2.89
15	2	2	1	2	1	2	1	5.21
16	2	2	1	2	1	1	2	5.37

表3 最陡爬坡试验设计及响应值

Table 3 Experimental design of steepest ascent and responding value

Run	Corn steep liquor (g/L)	Glucose (g/L)	NaCl (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Cell density
1	8.00	1.00	1.00	0.50	5.52
2	12.00	3.00	1.00	0.50	7.08
3	16.00	5.00	1.00	0.50	6.54
4	20.00	7.00	1.00	0.50	5.82
5	24.00	9.00	1.00	0.50	5.41

最大,故以其作为响应面试验的中心点,步长不变,进行下步试验。

2.3 响应面试验

试验设置及结果见表4,经拟合得完全二次回归方程: $Y=7.10+0.34A+0.33B-0.34A^2-0.71B^2-0.16AB$ (式中: Y 为响应; A , B 分别为玉米浆和葡萄糖浓度,单位g/L)。表5可见回归模型的 P 值为0.00,拟合效果极显著。计算可得当玉米浆13.88 g/L、葡萄糖3.37 g/L时响应值最大为7.21,见图1。

2.4 模型验证

分别采用初始和优化后发酵工艺发酵,24 h后

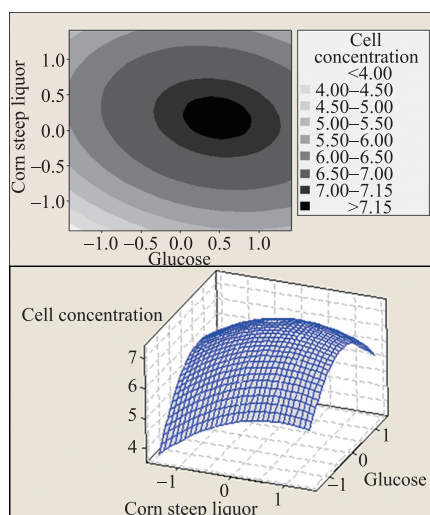


图1 菌体浓度的等值线图 and 响应曲面图

Fig. 1 Contour diagram and response surface plot of cell density.

表4 中心组合试验设计及响应值

Table 4 Central composite design and responding value

Run	Corn steep liquor	Glucose	Cell density
1	-1	-1	5.22
2	1	-1	6.27
3	-1	1	6.14
4	1	1	6.54
5	0	0	7.13
6	0	0	7.03
7	0	0	7.10
8	-1.41	0	5.98
9	1.41	0	6.90
10	0	-1.41	5.17
11	0	1.41	6.20
12	0	0	7.16
13	0	0	7.09
14	0	0	7.10

表5 回归分析结果

Table 5 Results of regression analysis

Source	Degree of freedom	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F test	
					F value	Prob>F
Regression	5	6.26	6.26	1.25	445.70	0.00
Linear	2	1.82	1.82	0.91	323.60	0.00
Squar	2	4.34	4.34	2.17	771.80	0.00
Interaction	1	0.11	0.11	0.11	37.57	0.00
Residual	7	0.02	0.02	0.00	/	/
Lack of fit	3	0.01	0.01	0.00	1.89	0.27
Pure error	4	0.01	0.00	/	/	/
Total	13	6.29	/	/	/	/

$S=0.05$; $R^2=99.69\%$; $R^2(\text{adjust})=99.42\%$

测量吸光值和抑菌活性,试验重复4次。结果优化后响应值为 7.25 ± 0.37 ,与模型拟合较好。菌体浓度分别为 1.18×10^9 CFU/mL和 5.02×10^8 CFU/mL,提高了1.35倍;抑菌活性分别为36.95%和28.68%,提高了28.84%。

3 结论

响应面法是优化因素配比的有效方法,得到广泛的应用^[9-12]。本文通过此方法优化得到生防菌JK-SH007的发酵工艺为:玉米浆13.88 g/L,葡萄糖3.37 g/L, NaCl 1.00 g/L, KH₂PO₄ 0.50 g/L, 1/2

装液量, pH 值 7.00, 接种量 2%, 30 °C, 200 r/min, 培养 24 h。优化后菌体浓度提高了 1.35 倍, 抑菌活性提高了 28.84%。玉米浆是制造玉米淀粉的副产品, 葡萄糖可由淀粉水解得到, 均广泛应用于发酵工业^[13-16], 价格较低, 而前期研究最佳主成分为牛肉膏和蛋白胨, 价格高昂, 本研究结果提高发酵效率的同时降低了培养基成本, 为大量获得 JK-SH007 生防菌剂奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Banna NE, Winkelmann G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J Appl Microbiol*, 1998, 85(1): 69-78.
- [2] Govan JRW, Hughes JE, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol*, 1996, 45(6): 395-407.
- [3] Parke JL, Gurian-Scherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol*, 2001, 39: 225-258.
- [4] Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future. *Syst Appl Microbiol*, 2011, 34(2): 87-95.
- [5] Luo YC, Xie GL. *Burkholderia cepacia*: our enemy or friend? *Acta Microbiol Sin*, 2005, 45(4): 647-652 (in Chinese).
罗远婵, 谢关林. 洋葱伯克氏细菌是我们的敌人还是朋友. *微生物学报*, 2005, 45(4): 647-652.
- [6] Ren JH, Ye JR, Liu H, et al. Isolation and characterization of a new *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 as a potential biocontrol agent. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(9): 2203-2215.
- [7] Ren JH, Ban HD, Ye JR, et al. Fermentation conditions of antagonistic strain *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 and its control effect on poplar canker disease. *Chin J Biol Control*, 2010, 26(3): 300-306 (in Chinese).
任嘉红, 班虎栋, 叶建仁, 等. 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 的发酵条件及其对杨树溃疡病的防治效果. *中国生物防治*, 2010, 26(3): 300-306.
- [8] Wang Y, Wu XQ. Study on several kinds of poplar canker disease and the pathogenicity of the pathogens in north of Jiangsu. *J Nanjing Forestry Univ: Natural Sci*, 2008, 32(5): 47-50 (in Chinese).
王勇, 吴小芹. 苏北杨树溃疡病类型及其病原的致病力. *南京林业大学学报:自然科学版*, 2008, 32(5): 47-50.
- [9] Contesini FJ, Silva VCF, Maciel RF, et al. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State fermentation. *J Microbiol*, 2009, 47(5): 563-571.
- [10] Chen N, Chang GF, Zhang KX. Optimization of L-isoleucine fermentation medium using response surface methodology. *Food Ferment Ind*, 2004, 30(2): 33-37 (in Chinese).
陈宁, 常高峰, 张克旭. L-异亮氨酸发酵培养基的响应面法优化. *食品与发酵工业*, 2004, 30(2): 33-37.
- [11] Liu HJ, Ren HL, Guan B, et al. Optimization of the extraction technique of radix *Astragalus polysaccharide* via response surface methodology. *Food Ind*, 2008(3): 11-14 (in Chinese).
刘军海, 任惠兰, 官波, 等. 响应面分析法优化黄芪多糖提取工艺. *食品工业*, 2008(3): 11-14.
- [12] Tian YY, Li RF. Application of response surface method on biological process optimization. *Food Eng*, 2010(2): 8-11 (in Chinese).
田泱源, 李瑞芳. 响应面法在生物过程优化中的应用. *食品工程*, 2010(2): 8-11.
- [13] Li WY, Zhao XM. Production of L-lactic acid by L-lactic acid bacteria with corn steep liquor as organic nitrogen source. *Chem Ind Times*, 2006, 20(9): 61-63 (in Chinese).
李文友, 赵学明. 玉米浆为有机氮源的 L-乳酸发酵的研究. *化工时刊*, 2006, 20(9): 61-63.
- [14] Liu ZL, Zhao H, Chu N, et al. Effects of the fermentative culture medium on production of Chitosan from *Actinomyces elegans*. *J Tianjin Univ Sci Technol*, 2010, 25(2): 13-17 (in Chinese).
刘珍利, 赵华, 楚宁, 等. 培养基组成对雅致放射毛霉发酵生产壳聚糖的影响. *天津科技大学学报*, 2010, 25(2): 13-17.
- [15] Pang QL, Li QG. Effects of corn steep liquor on Penicillin fermentation. *Chin J Pharm*, 2006, 37(8): 528-530 (in Chinese).
庞巧兰, 李庆刚. 玉米浆对青霉素发酵生产的影响. *中国医药工业杂志*, 2006, 37(8): 528-530.
- [16] Wei JQ, Wang ZY, Qi HS, et al. Application of corn steep liquor in dextran fermentation. *China Brewing*, 2008(19): 64-66 (in Chinese).
魏甲乾, 王治业, 祁宏山, 等. 玉米浆在右旋糖酐发酵生产中的应用. *中国酿造*, 2008(19): 64-66.

(本文责编 陈宏宇)