

# 响应面法优化灰霉病生防菌 CNY-04 培养条件

陆继臣<sup>1,2</sup> 迟乃玉<sup>2</sup> 窦少华<sup>2\*</sup> 奥杰<sup>2</sup>

(1. 大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

(2. 大连大学 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心 辽宁 大连 116622)

**摘要:** 【目的】通过优化生防菌 CNY-04 的培养条件, 提高其对灰霉病菌的抑菌效果。

【方法】在单因素试验的基础上, 利用响应面法(Response surface methodology)对灰霉病生防菌 CNY-04 培养条件进行整体优化, 并测其生长曲线。【结果】生防菌 CNY-04 最优培养条件为牛肉膏 0.5%、蛋白胨 2.0%、酵母膏 0.1%、葡萄糖 0.5%、时间 48 h、接种量 4%、温度 32 °C、pH 8.0、装液量 75 mL/250 mL 和转速 150 r/min, 在此培养条件下生防菌 CNY-04 的  $OD_{600}$  为 2.907, 与模型预测值相符, 对灰葡萄孢菌的抑菌圈直径为 44.5 mm, 较优化前提高了 30.9%。【结论】从整体上确定了生防菌 CNY-04 的最优培养条件, 为该菌扩大化生产提供理论基础。

**关键词:** 生防菌, 响应面, 灰葡萄孢菌, 生长曲线

## Optimization of culture conditions of the biocontrol strain CNY-04 against *Botrytis cinerea* by response surface methodology

LU Ji-Chen<sup>1,2</sup> CHI Nai-Yu<sup>2</sup> DOU Shao-Hua<sup>2\*</sup> AO Jie<sup>2</sup>

(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

(2. Liaoning Marine Microbial Engineering and Technology Center, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

**Abstract: [Objective]** In order to raising the antagonistic effect, the growth conditions of

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA021306)

\*通讯作者: Tel: 86-411-87402624; ✉: doushaohua@dlu.edu.cn

收稿日期: 2012-10-23; 接受日期: 2012-12-18

biocontrol strain CNY-04 was optimized. **[Methods]** The growth conditions of the biocontrol strain CNY-04 were optimized by response surface methodology basing on single factor tests. The growth curve was also measured. **[Results]** The optimal culture conditions of the biocontrol strain CNY-04 were determined for 0.5% glucose, 2.0% peptone, 0.1% yeast extract, 0.5% beef extract, temperature at 32 °C, pH 8.0, speeding at 150 r/min, the incubation time of 48 h, inoculation amount of 4%, liquid volume of 75 mL/250 mL. The  $OD_{600}$  of CNY-04 was 2.907 with the optimal growth conditions, consistenting with the predicted value. The antibacterial circle diameter was 44.5 mm, improving by 30.9%. **[Conclusion]** The optimal growth condition of the biocontrol strain CNY-04 was identified, providing a theoretical basis for enlargement of production.

**Keywords:** Biocontrol strain, Response surface methodology, *Botrytis cinerea*, Growth curve

灰霉病由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)所致, 病菌通过孢子萌发产生出芽管, 从寄主伤口、衰老器官或枯死组织上侵入, 也可由表皮直接侵染引起发病, 在保护地栽培条件下、植物产品贮藏或运输过程中极易发生, 造成严重损失。目前防治该病害的主要措施还是喷洒化学药剂<sup>[1]</sup>, 为了农业的可持续发展, 应该减少化学农药的使用量, 增加生物防治措施。植物根围促生菌(PGPR)可通过产生各种代谢物抑制农作物病害, 调节植物生长。本文所用菌为格氏沙雷菌(*Serratia grimesii*) CNY-04 (KC167881), 该菌作为生防菌的报道尚属首次, 通过研究发现其可能是通过病原菌诱导产生抑菌物质(待发表)。

工业菌培养条件的优化对其扩大化生产的指导是必不可少的, 因此, 本文在单因素试验的基础上, 利用响应面法(Response surface methodology)对灰霉病生防菌 CNY-04 培养条件进行整体优化, 并测定生长曲线, 采用 Design-Exper 8.05b 软件的响应面 Box-Behnken 试验设计系统, 对生防菌 CNY-04 培养条件的试验结果进行参数优化与分析, 从整体上确定最优培养条件, 为该菌扩大化生产提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试菌株和培养基: 生防菌 CNY-04、灰霉病菌原菌, 由大连大学发酵工程实验室保藏。灰霉病菌的培养基为 PDA, 生防菌 CNY-04 的培养基为 BPY (牛肉膏 0.5%、蛋白胨 1.0%、酵母膏 0.5%、葡萄糖 0.5%、pH 7.0)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 生防菌 CNY-04 培养条件 Plackett-Burman (PB)设计:** 在单因素试验基础上, 选取对发酵影响的 10 个因素(牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、葡萄糖、时间、接种量、pH、温度、装液量、转速), 进行实验次数  $N=12$  次的 Plackett-Burman 设计, 参考各因素的主效应和交互作用的一级作用, 以确定 3 个重要影响因素, 另外 1 个虚拟变量用于误差估计。本设计以拮抗菌的生长量( $OD_{600}$ )为评价指标, 因素水平及编码见表 1。

**1.2.2 中心组合试验设计:** 根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 由 Plackett-Burman 设计确定的 3 个重要因素各取 3 个水平, 设计三因素三水平共 15 个试验点的响应面分析。其中 12 个试验点为析因点, 3 个为零点, 零点实验重复 3 次以估计实验误差。

表 1 PB 实验因素和水平设计  
Table 1 Design of factors and levels for PB experiment

因素 Factor		水平 Level	
代码 Code	参数 Parameter	低(-1) Low (-1)	高(+1) High (+1)
A	虚拟项	/	/
B	牛肉膏(%)	0.25	0.75
C	接种量(%)	2.00	6.00
D	酵母膏(%)	0.05	0.15
E	转速(r/min)	130.00	170.00
F	时间(h)	48.00	72.00
G	蛋白胨(%)	1.50	2.50
H	pH	6.00	7.00
J	温度(°C)	24.00	28.00
K	装液量(mL)	50.00	100.00
L	葡萄糖(%)	0.05	0.25

**1.2.3 生长曲线测定:** 在优化的培养条件下, 生防菌 CNY-04 在发酵培养基中培养, 每隔 2 h 取 2 mL 培养液, 测量  $OD_{600}$ , 同时每隔 12 h 测抑菌圈大小。

**1.2.4 数据统计分析:** 采用 Design-Exper 8.05b 软件的响应面 Box-Behnken 试验设计系统, 对生防菌 CNY-04 培养条件的试验结果进行参数优化与分析。应用 SAS 9.1 统计分析软件处理原始数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 Plackett-Burman 设计筛选重要影响因素

在单因素试验基础上, 选取对发酵影响的 10 个因素(牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、葡萄糖、时间、接种量、pH、温度、装液量、转速), 进行实验次数  $N=12$  次的 Plackett-Burman 试验, 参考各因素的主效应和交互作用的一级作用, 确定重要影响因素(表 2)。水平及效价分析结果表明(表 3): 葡萄糖效价  $0.0648 < 0.1$ 、温度效价  $0.0388 < 0.05$ 、pH 效价  $0.0446 < 0.05$ , 即葡萄糖对试验结果的影响大于 90%, 温度和 pH 对试验结果的影响均大

于 95%, 达到显著水平, 在所选因素中对实验结果影响最大, 故将该三因素作为重要影响因素, 进行后续试验。

### 2.2 最陡爬坡试验研究最大响应值的响应区域

根据葡萄糖、温度、pH 3 个因素的 PB 试验结果, 进行最陡爬坡试验。将葡萄糖、pH 和温度的值按照步长逐步增大, 即在葡萄糖 0.25%、温度 28 °C、pH 7.0 的基础上继续升高, 以寻找最大响应区域。实验设计和结果如表 4 所示, 在第 2 组实验中, 当葡萄糖 0.50%, 温度 30 °C, pH 7.5 时  $OD_{600}$  最大, 此后各因素值继续变化,  $OD_{600}$  不断减小。故以第 2 组实验作为中心组合实验的中心点, 进行响应面试验。

### 2.3 中心组合试验设计

根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 由 Plackett-Burman 设计获得的 3 个重要因素各取 3 个水平(表 5)。设计三因素三水平共 15 个试验点的响应面分析。其中 12 个试验点为析因点, 3 个为零点, 零点实验重复 3 次以估计试验误差。实验方案和结果见表 6, 为后续二次回归拟合与方差分析提供试验数据。

表 2  $N=12$  的 Plackett-Burman (PB) 试验设计与响应值表  
Table 2 Experimental design and response of Plackett-Burman ( $N=12$ )

序号 No.	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	$OD_{600}$
1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1.987±0.013
2	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1.761±0.106
3	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	2.008±0.023
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	2.156±0.015
5	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1.132±0.012
6	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1.423±0.033
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.256±0.025
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	2.008±0.016
9	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1.875±0.067
10	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1.421±0.133
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	2.056±0.018
12	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1.098±0.033

注: 表中数据为平均数±标准差.

Note: Data in the table are  $\bar{x} \pm s$ .

表 3 Plackett-Burman 设计的各因素水平及效应评价  
Table 3 Factors levels and effect estimates of Plackett-Burman design

代码 Code	因素 Factor	$F$ 值 $F$ value	$P$ 值 Prob> $F$
B	牛肉膏(%)	0.97	0.504 2
C	接种量(%)	55.03	0.085 3
D	酵母膏(%)	8.92	0.205 7
E	转速(r/min)	76.59	0.072 4
F	时间(h)	79.83	0.071 0
G	蛋白胨(%)	36.87	0.103 9
H	pH	202.83	0.044 6
J	温度( $^{\circ}\text{C}$ )	268.06	0.038 8
K	装液量(mL)	31.96	0.111 5
L	葡萄糖(%)	95.99	0.064 8

表 4 最陡爬坡实验设计及实验结果  
Table 4 Experimental design and the results of steepest ascent

序号 No.	葡萄糖 Glucose (%) $X_1$	温度 Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) $X_2$	pH $X_3$	$OD_{600}$
1	0.25	28	7.0	2.138±0.106
2	0.50	30	7.5	2.418±0.167
3	0.75	32	8.0	2.089±0.033
4	1.00	34	8.5	1.873±0.136

注: 表中数据为平均数±标准差.

Note: Data in the table are  $\bar{x} \pm s$ .

表 5 因素水平编码  
Table 5 Coding of factors and levels

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	+1
葡萄糖( $X_1$ ) Glucose (%)	0.25	0.50	0.75
温度( $X_2$ ) Temperature (°C)	28	30	32
pH ( $X_3$ )	7.0	7.5	8.0

表 6  $N=15$  的 Box-Behnken 试验设计  
Table 6 Result and design table of Box-Behnken ( $N=15$ )

序号 No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$OD_{600}$
1	1	1	0	1.958±0.067
2	-1	0	1	2.516±0.133
3	0	1	-1	1.899±0.023
4	0	0	0	2.416±0.056
5	0	0	0	2.435±0.167
6	0	-1	-1	1.679±0.033
7	-1	0	-1	1.685±0.015
8	1	0	1	1.965±0.125
9	0	1	1	2.614±0.067
10	1	-1	0	1.746±0.033
11	0	0	0	2.456±0.167
12	1	0	-1	1.791±0.033
13	-1	-1	0	1.679±0.067
14	0	-1	1	1.798±0.126
15	-1	1	0	2.649±0.133

注: 表中数据为平均数±标准差。

Note: Data in the table are  $\bar{x} \pm s$ .

## 2.4 二次回归拟合与方差分析

运用 Design-Exper 8.05b 软件对表 6 试验数据进行回归分析, 得出回归方程:

$$Y=2.44-0.13X_1+0.28X_2+0.23X_3-0.19X_1X_2-0.16X_1X_3+0.15X_2X_3-0.22X_1^2-0.21X_2^2-0.23X_3^2。$$

进行显著性检验和方差分析。结果显示, 该模型能很好地解释试验数据的变异性, 交互因子

对  $OD_{600}$  的影响都极显著, 单因子对抑菌效果的影响显著, 说明响应值的变化相当复杂, 试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系, 三因素之间交互效应较大(表 7); 回归方程的相关系数  $R^2=99.4\%$ , 表明该模型拟合程度良好, 试验设计可靠; 从表 8 看出方程的失拟项为 0.106  $0 > 0.05$ , 表明失拟不显著, 模型稳定, 能很好地进行预测<sup>[2]</sup>。

表 7 回归系数显著性检验  
Table 7 Regression coefficients and their significance of the quadratic model

变量 Variable	系数估计 Coefficient estimates	标准误 Standard error	F 值 F value	P 值 Prob>F
$X_1$	-0.13	0.017	64.20	0.000 5
$X_2$	0.28	0.017	276.37	0.000 0
$X_3$	0.23	0.017	189.99	0.000 0
$X_1X_2$	-0.19	0.024	64.56	0.000 5
$X_1X_3$	-0.16	0.024	48.50	0.000 9
$X_2X_3$	0.15	0.024	39.91	0.001 5
$X_1X_1$	-0.22	0.025	78.83	0.000 3
$X_2X_2$	-0.21	0.025	72.98	0.000 4
$X_3X_3$	-0.23	0.025	86.61	0.000 2

Note:  $R^2=99.44\%$ ; Adj  $R^2=98.44\%$ .

表 8 回归方程的方差分析  
Table 8 Variance analysis for regression equation

方差来源 Variance sources	自由度 Degrees of freedom	调整平方和 Sum of squares	调整均方 Mean square	F 值 F value	P 值 Prob>F
回归 Model	9	1.980	0.22	98.91	0.000 0
线性 Linear vs Mear	3	1.180	0.39	5.33	0.016 3
平方 2FI vs linear	3	0.340	0.11	1.93	0.203 8
交互作用 Quadratic vs 2I	3	0.460	0.15	68.90	0.000 2
残差误差 Residual	5	0.011	2.225E-003		
失拟 Lack of fit	3	0.010	3.442E-003	8.60	0.106 0
纯误差 Pure error	2	8.007E-004	4.003E-004		
合计 Cor total	14	1.990			

## 2.5 响应面分析

根据响应面法分析数据绘出响应面及其等高线图,可以直观反映出葡萄糖、温度、pH 及其交互作用对  $OD_{600}$  的影响(图 1-3)。在响应面图中圆形等高线表示参数之间交互作用不显著,椭圆形或马鞍形等高线表示参数之间交互作用较强。

由响应面立体优化图可以看出,葡萄糖、温

度、pH 与  $OD_{600}$  存在显著的相关性。由图 1、图 2 和图 3 表明:当温度和 pH 固定在一般水平时,葡萄糖浓度在-1.0 到-0.5 时, $OD_{600}$  变化不大,葡萄糖浓度大于-0.5 时, $OD_{600}$  随其浓度的增大而减小,说明高浓度的葡萄糖对菌体的生长有抑制作用;当葡萄糖和温度固定在一般水平时,pH 在-1.0 到 0 时, $OD_{600}$  呈增大趋势,在 pH 大于 0 时, $OD_{600}$  变化不大;当葡萄糖和 pH 固定在一般

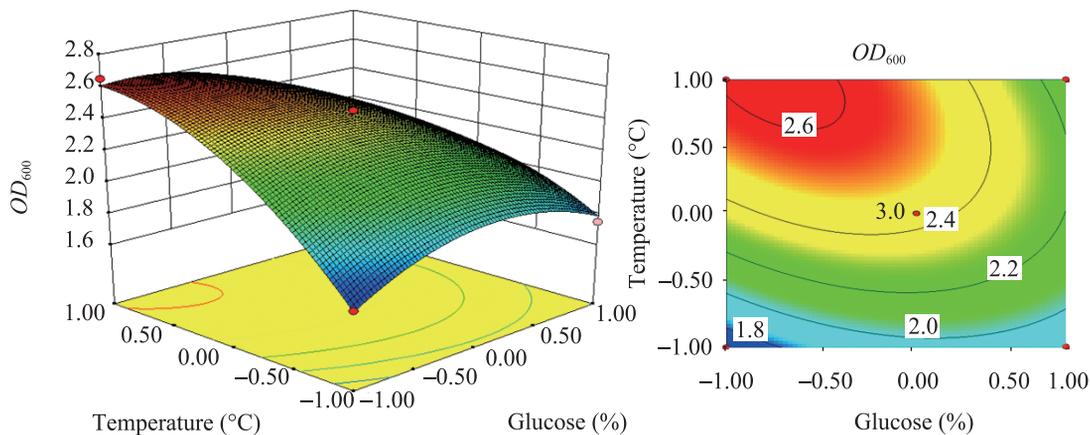


图1 葡萄糖与温度交互影响  $OD_{600}$  的曲面图和等高线图

Fig. 1 Response surface plot and contour plot for the effects of glucose and temperature extract on the  $OD_{600}$

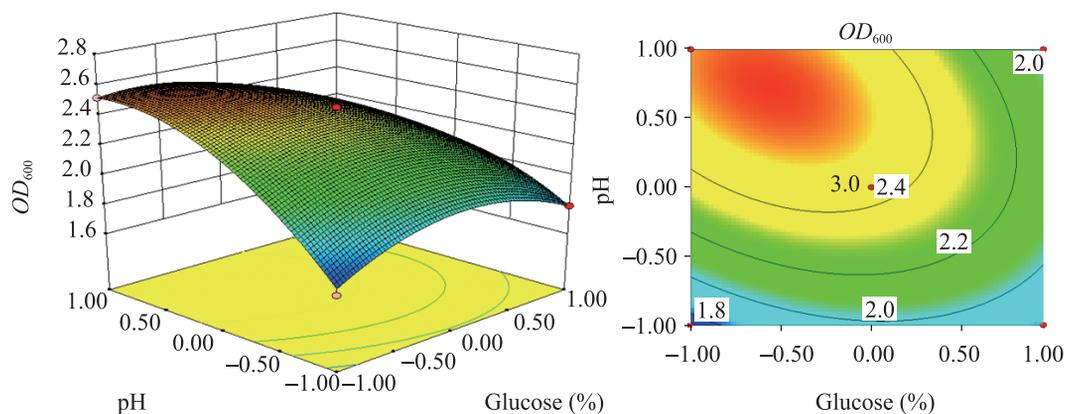


图2 葡萄糖与 pH 交互影响  $OD_{600}$  的曲面图和等高线图

Fig. 2 Response surface plot and contour plot for the effects of glucose and pH extract on the  $OD_{600}$

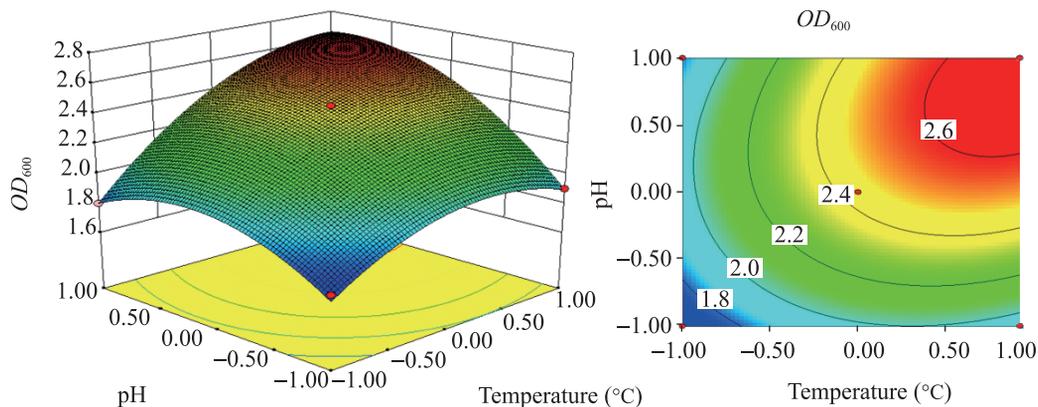


图3 温度与 pH 交互影响  $OD_{600}$  的曲面图和等高线图

Fig. 3 Response surface plot and contour plot for the effects of temperature and pH extract on the  $OD_{600}$

水平时, 温度在-1.0到0时  $OD_{600}$  呈增大趋势, 高于0时,  $OD_{600}$  变化趋于平缓。上述结果可使我们在发酵生产时选择合理的葡萄糖浓度、温度和 pH, 提高发酵效率, 避免不必要的资源浪费, 节约成本。

## 2.6 最优条件的确定与验证

利用 Design-Exper 8.05b 软件可以求得最大

$OD_{600}$  时对应的各因素参数值, 预测最大  $OD_{600}$  为 2.923 时所对应的葡萄糖、温度和 pH 的编码值分别为-1、1 和 1, 根据编码值与实际值关系, 可得到最佳条件为葡萄糖 0.5%、温度 32 °C 和 pH 8.0。实测 3 次平均  $OD_{600}$  为 2.907 (表 9), 与理论预测相近度较高, 表明采用响应面法对培养条件进行优化准确可靠。

表 9 最优条件的验证结果

Table 9 The verification result of the optimal conditions

最优试验条件											$OD_{600}$	平均值 $\bar{x}$
Test conditions												
牛肉膏 Beef extract (%)	蛋白胨 Peptone (%)	酵母膏 Yeast extract (%)	葡萄糖 Glucose (%)	温度 Temperature (°C)	pH	时间 Time (h)	转速 Rotational speed (r/min)	接种量 Inoculation amount (%)	装液量 Liquid volume (mL)			
0.5	2.0	0.1	0.5	32	8.0	48	150	4	75	2.909		
										2.915	2.907	
										2.897		

## 2.7 生防菌 CNY-04 生长曲线

如图 4 所示, 生防菌 CNY-04 在优化后的培养条件下, 不用经过延迟期便直接进入对数期, 48 h 左右进入稳定期, 在 72 h 左右进入衰退期。对其抑菌效果的测定可知, 在 48-60 h 时, 抑菌效果最大, 为 44.5 mm。在 60-80 h 间, 菌体  $OD_{600}$  变化不大, 但抑菌圈直径明显变小。

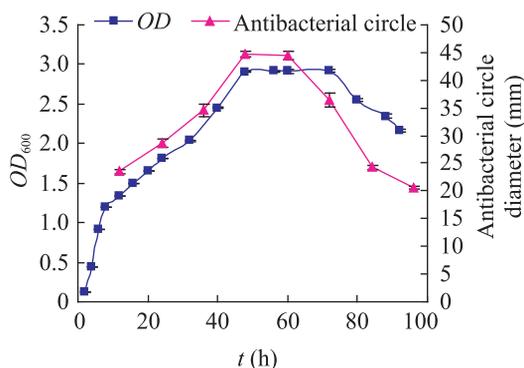


图 4 生防菌 CNY-04 生长曲线

Fig. 4 The vegetative curve of CNY-04

## 3 讨论

本实验所用的拮抗菌 CNY-04 (KC167881) 为格氏沙雷菌, 国内外关于沙雷氏菌作为生防菌的研究报道不多, 已报道普城沙雷氏菌 (*Serratia plymuthica* HRO-C48、A21-4、IC14 和 IC1270)、粘质沙雷氏菌 (*S. marcenscens* N 4-5) 和气味沙雷氏菌 (*S. odorifera* L5) 可防治多种土传、气传和采后病害的发生<sup>[3-7]</sup>, 还未见格氏沙雷菌作为生防菌的报道。因此, 对其培养条件的研究, 可为该菌深层发酵乃至工业化生产提供理论基础。

目前, 对生防菌培养条件研究的报道, 主要以单因素及正交试验等传统方式进行优化, 但其结果对扩大化生产的指导意义不大, 童蕴慧、李俊等<sup>[8-9]</sup>均通过单因素试验对灰霉病拮抗菌培养条件进行优化。本实验通过以单因素试验为基础, 利用响应面法 (Response surface methodology) 对灰霉病生防菌 CNY-04 培养条件进行整体优化。

试验结果表明, 生防菌 CNY-04 最优培养条件为牛肉膏 0.5%、蛋白胨 2.0%、酵母膏 0.1%、葡萄糖 0.5%、时间 48 h、接种量 4%、温度 32 °C、pH 8.0、装液量 75 mL/250 mL 和转速 150 r/min, 在此培养条件下生防菌 CNY-04 的  $OD_{600}$  为 2.907, 与模型预测值相符。于最优培养条件下测生防菌 CNY-04 生长曲线, 在 48–60 h 时, 抑菌效果最好, 抑菌圈直径最大为 44.5 mm, 较优化前提高了 30.9%。

本试验以灰霉病菌为指示菌, 研究了 CNY-04 菌株的最佳培养条件, 明确了其发酵代谢途径中的一些规律, 可为其工业深层发酵提供理论基础。关于该菌的中试发酵, 有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Wedge DE, Smith BJ, Quebedeaux JP, et al. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi[J]. *Crop Protection*, 2007, 26(9): 1449–1458.
- [2] Dong S, Chi NY, Zhang QF. Optimization of culture conditions for cold-active cellulose production by *Penicillium cordubense* D28 using response surface methodology[J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 3(183/185): 994–998.
- [3] Kamensky M, Ovadis M, Chet I, et al. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases[J]. *Soil Biochemistry*, 2003, 35(2): 323–331.
- [4] Meziane H, Gavriel S, Ismailov Z, et al. Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2006, 39(2): 125–133.
- [5] Shen SS, Choi OH, Park SH, et al. Root colonizing and biocontrol competency of *Serratia plymuthica* A21-4 against phytophthora blight of pepper[J]. *Plant Pathol*, 2005, 21(1): 64–67.
- [6] Roberts DP, Mckenna LF, Lakshman DK, et al. Suppression of damping-off cucumber caused by *Pythium ultimum* with live cells and extracts of *Serratia marcescens* N4-5[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39: 2275–2288.
- [7] 钱兰娟, 李倩, 张清霞, 等. 生防细菌 L5 相关因子的初步分析及其种类鉴定[J]. *植物病理学报*, 2011, 41(3): 295–300.
- [8] 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友, 等. 灰葡萄孢拮抗细菌的种类鉴定及生长条件研究[J]. *扬州大学学报*, 2002, 23(2): 67–70.
- [9] 李俊, 纪明山, 刘浩强, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌 R26 拮抗物质产生条件的研究[J]. *沈阳农业大学学报*, 2004, 35(2): 105–108.