

## 响应面设计优化绿僵菌固体发酵条件

张婧迪 蔡明美 刘志诚 陈捷\*

(上海交通大学农业与生物学院 农业部都市农业南方重点实验室 微生物代谢国家重点实验室  
上海 200240)

**摘要:**【目的】为了提高绿僵菌分生孢子产量及孢子质量,应用响应面设计对金龟子绿僵菌菌株 CY-1 (*Metarhizium anisopliae*)进行固体发酵培养基的优化。【方法】单因素试验基础上,采用响应面试验设计方法优化培养基组分。【结果】添加了碳、氮营养的最佳固体发酵培养基为玉米粉:稻壳=8:2,料水比 1:0.8,葡萄糖 0.8%,硫酸铵 2.5%,磷酸二氢钾 0.8%;在固体培养基上的理论产孢量为  $7.45 \times 10^9$  个/g;验证后实际为  $6.94 \times 10^9$  个/g。【结论】运用响应面法对绿僵菌固体发酵的培养基成分进行优化,得到了绿僵菌孢子粉,为孢子粉进行地下害虫防治和制剂加工的研究奠定了基础。

**关键词:** 绿僵菌, 响应面法, 优化, 固体发酵

### *Metarhizium* solid-state fermentation optimization by response surface analysis

ZHANG Jing-Di CAI Ming-Mei LIU Zhi-Cheng CHEN Jie\*

(College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Urban Agriculture in the South, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** [Objective] In order to improve the yield and quality of the *Metarhizium* conidia spores, response surface design was used to optimize the medium components for solid fermentation of the *Metarhizium anisopliae* CY-1. [Methods] On the basis of one-factor experiment, medium components were optimized by the response surface design. [Results] The carbon and nitrogen sources were added to the best solid fermentation medium, which also contained cornmeal and rice husk (8:2, W/W), water ratio 1:0.8, 0.8% glucose, 2.5% ammonium sulfate, 0.8%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . In the optimized solid fermentation medium, the theory of spores production was  $7.45 \times 10^9$  CFU/g, and the validation was actually  $6.94 \times 10^9$  CFU/g. [Conclusion] The response surface method was applied to optimize the components of solid fermentation medium of the *M. anisopliae*, and the spores powders were obtained, which laid a foundation for the research of the control the underground soil borne pathogens and insect pests and the research of the powder preparation and processing.

**Foundation item:** Special Project of the Basic Work for National Science and Technology (No. 2014FY120900); China Agriculture Research System Project (No. CARS-02)

\*Corresponding author: E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn

Received: October 24, 2015; Accepted: January 27, 2016; Published online (www.cnki.net): February 29, 2016

基金项目: 国家科技基础性工作专项项目(No. 2014FY120900); 国家玉米产业技术体系项目(No. CARS-02)

\*通讯作者: E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2015-10-24; 接受日期: 2016-01-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-02-29

**Keywords:** *Metarhizium*, Response surface, Optimization, Solid fermentation

绿僵菌属(*Metarhizium*)作为一种昆虫病原真菌物种,被广泛应用于有害昆虫的生物防治<sup>[1]</sup>。昆虫病原真菌金龟子绿僵菌能通过主动侵染寄主穿透昆虫体壁致死寄主,其发病迅猛,可在短期内有效遏制害虫种群数量的急剧增加,将害虫控制在经济损害水平以下<sup>[2]</sup>。近年来国内外利用近百种农作物害虫、林木害虫及卫生害虫对绿僵菌进行毒力防治效果评价,结果显示,绿僵菌对供试害虫杀虫效果均较理想<sup>[3]</sup>,绿僵菌已发展成为仅次于白僵菌的真菌杀虫剂资源<sup>[4]</sup>。它致病力强,效果好,对人、畜、作物无毒害,是当今用于生物防治的虫生真菌研究的主要对象之一。

绿僵菌属于活体杀虫微生物,其防效取决于活孢子的生产水平,而活孢子的产量又取决于发酵工艺,发酵技术决定了生物杀虫剂产品的特性及品质<sup>[5]</sup>。目前绿僵菌主要是通过液体发酵、固体发酵和液固两相发酵法进行生产。采用固态发酵一方面有利于使其保持菌丝体的自然生理状态,保护其菌丝体的生长;另一方面采用固态发酵所用培养基和发酵条件更加低廉和简单,而且投资少。培养基中氮源和碳源的选择是发酵的基础。固态发酵培养基组成简单,常采用来源广泛且便宜的天然基质或工农业下脚料,如麸皮、玉米芯粉、大米等,同时也可以包括不营养的蛭石、海绵甚至织物等<sup>[6]</sup>。在进行优化实验时,正交试验或响应

面法是常用的试验设计方法,二者相比,响应面法对数据分析比较详细。本文在较强毒性的金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)的筛选及固体发酵培养基单因子试验基础上,应用响应面设计研究了固体发酵培养基的优化,为高效生产绿僵菌气生分生孢子奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、培养基及主要仪器

金龟子绿僵菌菌株 CY-1 (*Metarhizium anisopliae*),由中国农业科学院植物保护研究所提供。

PDA 固体培养基和 PD 基本液体培养基<sup>[7]</sup>。

ZFD-5430 恒温培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;ZHJH-1109B 超净工作台,上海智城分析仪器制造有限公司;OLMPUS-CX41 光学显微镜,北京中仪光科科技发展有限公司;ZHWHY-2102C 恒温摇床,上海智城分析仪器制造有限公司。

### 1.2 绿僵菌固体发酵条件的优化

**1.2.1 液相培养阶段:** 无菌条件下,用 0.1%吐温 80 将在 PDA 培养基上培养 7 d 的绿僵菌分生孢子洗下制成孢子悬浮液,振荡均匀后用血球计数板测定孢子悬浮液浓度,调整至  $1 \times 10^7$  个/mL,接种于 PD 培养基,25 °C、180 r/min 振荡培养 48 h。

**1.2.2 固相培养阶段:** 按照表 1 中的配方,将配制好的培养基装入 300 mL 三角瓶中,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌

表 1 固体培养配方  
Table 1 Solid culture Recipe

编号 Treatments	配方及比例 Formula	料重 Dosage (g)	加水量 Water content (mL)
A	麦麸:稻壳=8:2	50	25
B	大米:麦麸:稻壳=5:4:1	50	25
C	玉米粉:麦麸:稻壳=5:4:1	50	25
D	麦麸:秸秆粉=8:2	50	25
E	大米:麦麸:秸秆粉=5:4:1	50	25
F	玉米粉:麦麸:秸秆粉=5:4:1	50	25
G	大米:稻壳=8:2	50	25
H	玉米粉:稻壳=8:2	50	25

30 min。然后,分别加入 5 mL 菌种液,初始 pH 调至 6.5,在 28 °C 的条件下培养产孢,每个处理重复 3 次。接种 10 d 后统计各组合的产孢量,筛选出产孢量最高的固体培养基。

**1.2.3 最佳固体培养的碳氮源补充优化:** 根据单因素试验,绿僵菌固体发酵培养基配方为玉米粉:稻壳=8:2。为了进一步提高已筛选的固体培养基的产孢水平,向固体培养基中加入不同浓度的碳源:葡萄糖、淀粉和蔗糖;氮源:硫酸铵、硝酸铵和蛋白胨;无机盐:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和 MgSO<sub>4</sub>;单因素试验筛选出最佳碳源、氮源、无机盐。

**1.2.4 响应面设计优化绿僵菌发酵条件:** 以单因素试验设计得到的结果为中心点,运用 Design Expert

7.0 软件针对主要因素碳源、氮源、无机盐及料水比使用中值组合重新编码,以绿僵菌的产孢量为响应值,设计 4 因素 3 水平的响应面试验(表 2),其因素与水平根据 Box-Beknhen 中心组合实验设计原理<sup>[8]</sup>,试验结果与分析见表 3。

表 2 响应面试验因素与水平表  
Table 2 Factors and levels of response surface experiment

因素 Factor	水平 Levels		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> 葡萄糖 Glucose (%)	1.2	1.0	0.8
X <sub>2</sub> 硫酸铵 Ammonium sulfate (%)	2.5	2.0	1.5
X <sub>3</sub> 磷酸二氢钾 Potassium dihydrogen phosphate (%)	1.2	1.0	0.8
X <sub>4</sub> 料水比 Water ratio	1:1	1:0.9	1:0.8

表 3 Box-Behnken 实验设计和结果  
Table 3 Design and results of Box-Behnken

试验号 Test number	X <sub>1</sub> 碳源 Carbon source (%)	X <sub>2</sub> 氮源 Nitrogen source (%)	X <sub>3</sub> 无机盐 Inorganic salt (%)	X <sub>4</sub> 含水量 Water content (%)	产孢量 Sporulation number (×10 <sup>9</sup> CFU/g)
1	-1	-1	0	0	4.27
2	1	-1	0	0	2.78
3	1	1	0	0	4.18
4	1	1	0	0	5.07
5	0	0	-1	-1	1.87
6	0	0	1	-1	5.78
7	0	0	-1	1	6.08
8	0	0	1	1	5.88
9	-1	0	0	-1	2.13
10	1	0	0	-1	5.38
11	-1	0	0	1	8.03
12	1	0	0	1	4.95
13	0	-1	-1	0	3.08
14	0	1	-1	0	3.65
15	0	-1	1	0	3.99
16	0	1	1	0	3.65
17	-1	0	-1	0	4.98
18	1	0	-1	0	2.93
19	-1	0	1	0	4.88
20	1	0	1	0	6.08
21	0	-1	0	-1	3.18
22	0	1	0	-1	3.05
23	0	-1	0	1	4.96
24	0	1	0	1	6.93
25	0	0	0	0	2.75
26	0	0	0	0	2.78
27	0	0	0	0	2.85

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

产孢量与碳源的关系,当添加 1%葡萄糖时,产孢量最大,为  $1.22 \times 10^9$  个/g。绿僵菌产孢量随着蔗糖浓度增加而增多,但最高产孢量  $1.21 \times 10^9$  个/g,低于 1%葡萄糖时的产孢量(图 1)。培养基中随着氮源含量的增加产孢量增加,产孢量在氮源为 1.5%硫酸铵时最大,为  $1.86 \times 10^9$  个/g (图 2)。绿僵菌产孢量随着所加无机盐含量的增加呈先增加后减少的趋势,产孢量在 1%磷酸二氢钾时最多,为  $1.22 \times 10^9$  个/g (图 3)。

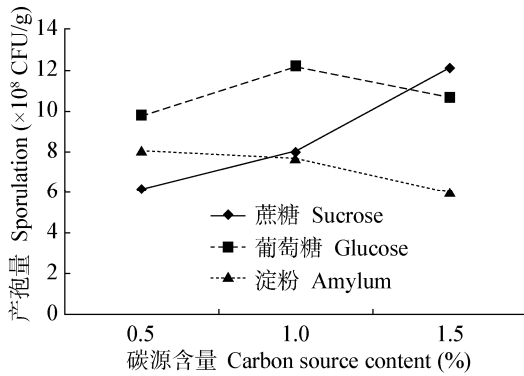


图 1 碳源对绿僵菌产孢量的影响

Figure 1 Effect of carbon source on spore production of *M. anisopliae*

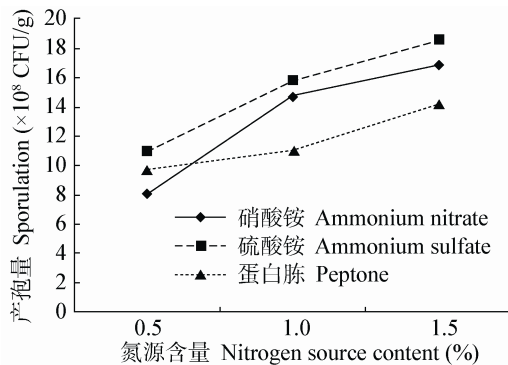


图 2 氮源对绿僵菌产孢量的影响

Figure 2 Effect of nitrogen source on spore production of *M. anisopliae*

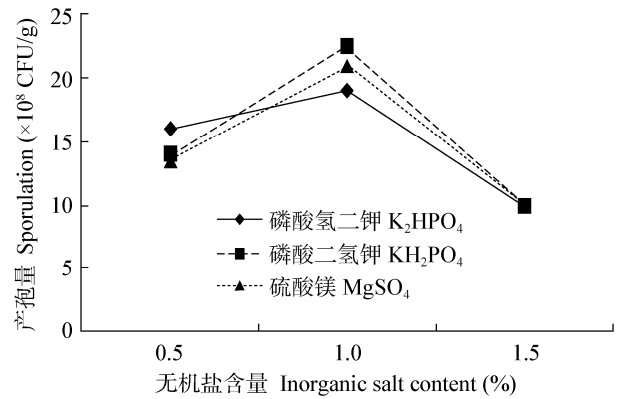


图 3 无机盐对绿僵菌产孢量的影响

Figure 3 Effect of inorganic salt on spore production of *M. anisopliae*

### 2.2 响应面试验结果与分析

应用回归分析对方程和各因子进行方差分析,结果见表 4。由表 4 可看出,以绿僵菌产孢量为响应值,回归方程显著性检测  $P < 0.0001$ ,表明该二次方程模型极显著,回归方程模型与实际试验拟合性较好,实验误差小,证明应用响应面法优化绿僵菌发酵条件是可行的,具有参考性。各因素对绿僵菌产孢量影响次序为:含水量 > 无机盐 > 氮源 > 碳源。经回归拟合后,方程为:  $Y = 2.79 - 0.11X_1 + 0.36X_2 + 0.64X_3 + 1.29X_4 + 0.59X_1X_2 + 0.81X_1X_3 - 1.58X_1X_4 - 0.23X_2X_3 + 0.52X_2X_4 - 1.03X_3X_4 + 1.07X_1^2 + 0.21X_2^2 + 0.72X_3^2 + 1.39X_4^2$ 。

根据回归方程,考察拟合响应曲面的形状,分析碳源、氮源、无机盐和含水量 4 个因素对产孢量的影响,结果见图 4。由图 4 可看出:  $X_4$  与  $X_1$ 、 $X_2$ ,  $X_2$  与  $X_1$ 、 $X_3$  交互作用显著;  $X_4$  与  $X_3$ ,  $X_1$  与  $X_3$  交互作用不显著。4 个因素中,葡萄糖和含水量对发酵后绿僵菌的产孢量影响最显著,这表现为等高线较其它因素的等高线陡峭,硫酸铵和磷酸二氢钾次之。为进一步确定最优点,通过 Design-Expect 软件分析,当绿僵菌固体发酵产孢量最大时,可求得各因素水平:  $X_1 = 0.8$ ,  $X_2 = 2.5$ ,  $X_3 = 0.8$ ,  $X_4 = 1.25$ ; 进行编码转化后得到最佳固体发酵培养基成分为

表 4 响应面回归方程方差分析  
Table 4 The ANOVA of regression equation on the response surface

来源 Sources	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean squares	F 值 F values	P>F	显著性 Significant
Model	59.83	14	4.27	22.12	<0.000 01	**
X <sub>1</sub>	0.14	1	0.14	0.17	0.417 0	Ns
X <sub>2</sub>	1.52	1	1.52	7.86	0.015 9	*
X <sub>3</sub>	4.90	1	4.90	25.37	0.000 3	**
X <sub>4</sub>	19.87	1	19.87	102.82	<0.000 1	**
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1.42	1	1.42	7.33	0.019 1	*
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2.64	1	2.64	13.67	0.003 1	*
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	10.02	1	10.02	51.84	<0.000 1	**
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.21	1	0.21	1.07	0.321 0	Ns
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	1.10	1	1.10	5.71	0.034 2	*
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	4.22	1	4.22	21.86	0.000 5	**
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	6.12	1	6.12	31.65	0.000 1	**
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.24	1	0.24	1.24	0.287 0	Ns
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	2.76	1	2.76	14.29	0.002 6	*
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	10.32	1	10.32	53.39	<0.000 1	**
残差 Residual	2.32	12	0.19			
失拟项 Lack of fit	2.31	10	0.23	87.85	0.051 3	
纯误差 Pure error	5.63E-03	2	2.63E-03			
总和 Cor total	62.15	26				

注：\*：差异显著( $P<0.05$ )；\*\*：差异极显著( $P<0.001$ )；Ns：不显著。模型的确定系数  $R^2=0.9627$ ；模型的调整确定系数  $R_{Adj}^2=0.9192$ 。  
Note: \*: Significant difference ( $P<0.05$ ); \*\*: Extremely significant; Ns: Non-significant. Determination coefficient is  $R^2=0.9627$ ; Adjusted determination coefficient is  $R_{Adj}^2=0.9192$ .

葡萄糖 0.8%，硫酸铵 2.5%，磷酸二氢钾 0.8%，料水比 1:0.8。在此条件下进行绿僵菌固体发酵，由回归方程预测，发酵后绿僵菌产孢量为  $7.45 \times 10^9$  个/g。

### 2.3 模型的验证

为了检验模型预测的准确性，在优化条件：玉米粉:稻壳=8:2，料重共 50 g；葡萄糖 0.8%，硫酸铵 2.5%，磷酸二氢钾 0.8%，料水比 1:0.8；300 mL 三角瓶中，pH 6.5，28 °C 条件下培养 10 d。共重复

4 次平行验证试验。

此条件下绿僵菌平均产孢量为  $6.94 \times 10^9$  个/g，与模型预测值  $7.45 \times 10^9$  个/g 相比无明显差异，证明了方程的可靠性和响应面分析方法的有效性。优化条件下产孢量与回归方程预测值虽无明显差异，但略有不同。分析其原因可能是由于培养基在发酵过程中温度、含氧量及 pH 会随着菌丝生长及产孢量的增加而改变，从而影响最终产孢结果，与预测值产生差异。

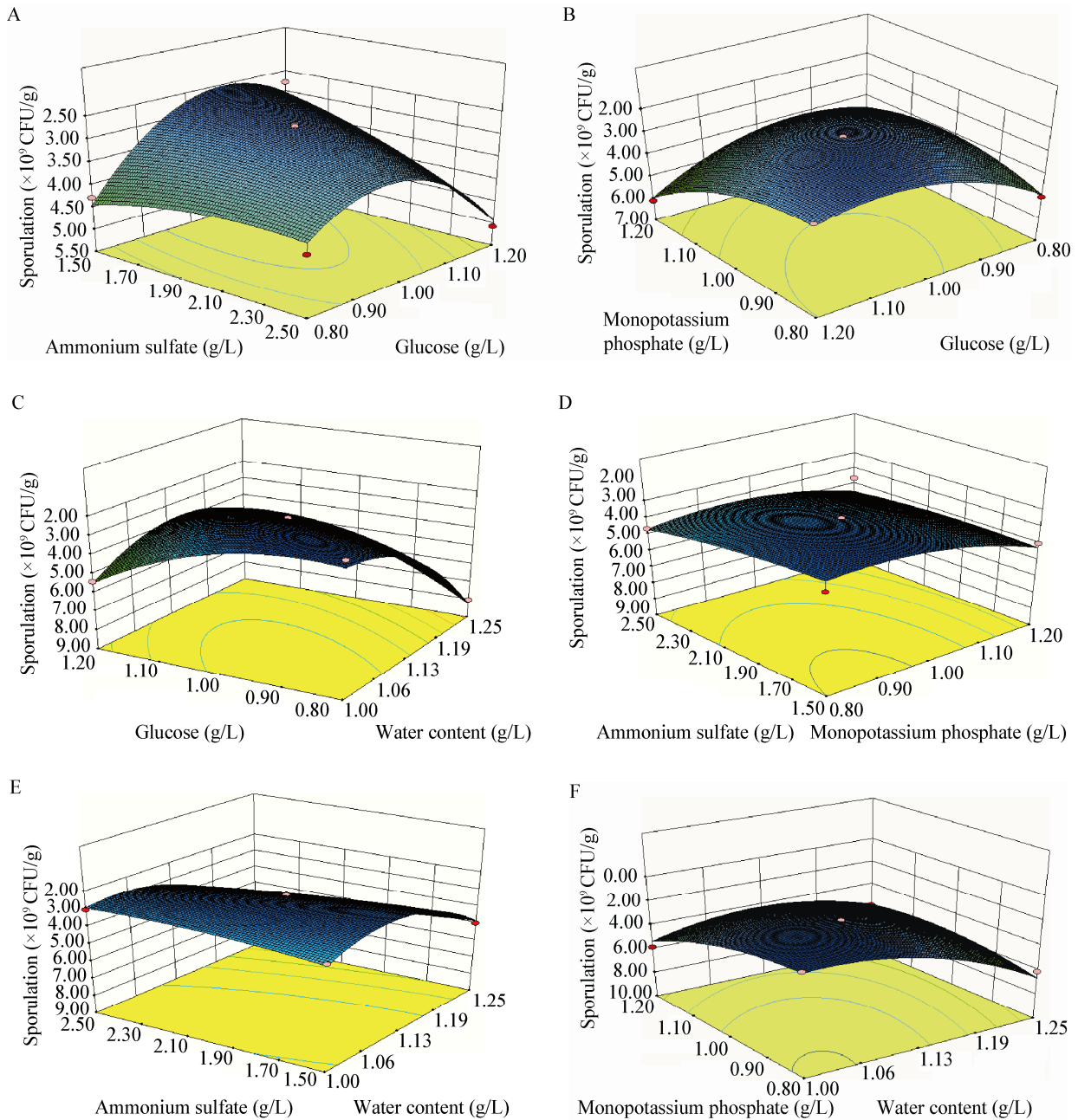


图4 二因素交互影响绿僵菌产孢量等高线图

Figure 4 The effect of two factor interactions on the formation of *M. anisopliae* conidium

### 3 结论与讨论

绿僵菌是一类重要的生防真菌,可寄生于200多种害虫,尤其在防治土栖害虫上有着良好的效果。本研究通过多因子响应面试验研究建立了生产绿僵菌高纯度分生孢子粉固相工艺体系。分别考察了碳源、氮源、无机盐及含水量等因素对绿僵菌产孢

量的影响。在此基础上,通过 Design-Expert 8.0 软件的 Box-Behnken 中心组合设计方法响应面实验和数据的分析,从而确定最优发酵条件。结果显示,最佳固体发酵培养基成分为葡萄糖 0.8%,硫酸铵 2.5%,磷酸二氢钾 0.8%,料水比 1:0.8。在第 10 天理论产孢量最高达到  $7.45 \times 10^9$  个/g,实际为  $6.94 \times 10^9$  个/g。

本试验发酵培养基优化的方法及结果为后续研究奠定了一定基础,但本试验只考虑到培养基的碳、氮养分及无机盐对孢子产量的影响,并没有在发酵条件如温度、培养时间上对其进行进一步优化研究。同时,实验室的环境并不能代表生产上的发酵条件,还需进行扩大培养试验来看是否能达到相应效果;还需要检测营养优化条件下所得的气生分生孢子与非优化条件下产生的气生分生孢子在杀虫活性和耐储性上的差异。

### 参 考 文 献

- [1] Schneider S, Widmer F, Jacot K, et al. Spatial distribution of *Metarhizium* clade I in agricultural landscapes with arable land and different semi-natural habitats[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 52: 20-28
- [2] Yang H, Yang EL, Zhang GY, et al. Advances in research and application of *Metarhizium*. sp against tobacco pests[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2015, 36(5): 101-107 (in Chinese)  
杨华, 杨恩兰, 张功营, 等. 绿僵菌防治烟田主要害虫的研究进展与展望[J]. *中国烟草科学*, 2015, 36(5): 101-107
- [3] Yi SY, Lü SX, Chen J, et al. Microecological relationship between *Metarizium* and *Trichoderma* in artificial medium and soil[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2012, 43(1): 53-57 (in Chinese)  
衣思瑶, 吕淑霞, 陈捷, 等. 培养基和土壤中木霉菌与绿僵菌微生物生态关系[J]. *沈阳农业大学学报*, 2012, 43(1): 53-57
- [4] Huang B, Fan MZ, Li ZZ. Advances in Classification of *Metarhizium*[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2002, 29(2): 169-172 (in Chinese)  
黄勃, 樊美珍, 李增智. 绿僵菌属系统分类的研究进展[J]. *安徽农业大学学报*, 2002, 29(2): 169-172
- [5] Behle RW, Jackson MA. Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2014, 107(2): 582-590
- [6] Ibrahim YB, Low W. Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*[J]. *International Journal of Pest Management*, 1993, 39(3): 288-292
- [7] Niu TG. *Technology of Food Microbiology Experiment*[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2002: 130-131 (in Chinese)  
牛天贵. *食品微生物学实验技术*[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 130-131
- [8] Wang W, Li JL, Zeng BQ, et al. Study on the Optimization technology of *polygonum cuspidatum* in the solid state fermentation by response surface methodology[J]. *Northern Horticulture*, 2011(13): 164-167 (in Chinese)  
王卫, 黎继烈, 曾柏全, 等. 响应面优化虎杖固态发酵工艺条件的研究[J]. *北方园艺*, 2011(13): 164-167