

应用响应面法优化武夷菌素发酵培养基^①

王立东¹, 张克诚², 石义萍², 谭万忠¹

1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715;

2. 中国农科院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094

摘要: 为了提高农用抗生素武夷菌素的效价, 应用响应面法对武夷菌素发酵培养基进行了优化. 首先应用部分因子设计法对武夷菌素发酵培养基中的淀粉、葡萄糖、玉米粉、豆饼粉、化合物 A、化合物 B、化合物 C、 $MgSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、 $NaCl$ 共 10 种营养成分进行了分析, 筛选出葡萄糖和豆饼粉为影响武夷菌素效价的关键因子, 然后通过最陡爬坡实验逼近最大响应区域, 应用中心组合设计法优化葡萄糖(X_2)和豆饼粉(X_4)的浓度, 得到武夷菌素效价(Y)的二次多项式优化拟合模型, 其为:

$$Y = 6\,643.78 + 687.42 X_2 + 275.13 X_4 - 824.69 X_2^2 - 122.45 X_2 X_4 - 620.94 X_4^2$$

由该模型求解可知, 当葡萄糖 27.2 g/L、豆饼粉 31.8 g/L 时武夷菌素效价有最大值. 于是按这 2 种关键因子的用量获得优化的培养基, 用菌株 S-40(原始效价 4 443 $\mu\text{g}/\text{mL}$)比较试验测定表明, 在优化的培养基上武夷菌素的效价可提高到 6 643 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

关键词: 不吸水链霉菌; 武夷菌素效价; 培养基成分; 葡萄糖; 豆饼粉; 用量优化

中图分类号: S482.2⁺8

文献标识码: A

武夷菌素是从不吸水链霉菌武夷变种(*Streptomyces ahyscopicus* var. *wuyiensis*)发酵代谢产物中产生的一种具有胞苷骨架的核苷类抗生素^[1], 可有效防治黄瓜白粉病、番茄灰霉病等多种作物的真菌病害. 该药剂在我国已投入工厂化生产, 但是, 目前工厂化生产中使用的武夷菌素产生菌效价较低, 导致药剂的生产成本高和产品缺乏市场竞争力等问题. 通过选育高产菌株和改进发酵工艺是目前解决以上问题的关键.

响应面法(Response surface methodology, RSM)是数学方法和统计方法结合的工程优化方法, 主要用于对所感兴趣的响应受多个变量影响的问题进行建模和分析, 其最终目的是优化该响应值. RSM 的应用领域不仅局限于化学工业, 在生物学、医学以及生物制药领域都得到了广泛应用^[2]. 本研究的目的是应用 RSM 对武夷菌素发酵培养基中有关各种营养成分用量进行优化, 以获得不吸水链霉菌最优培养基, 从而提高其武夷菌素效价.

1 材料与方法

1.1 菌株

生产菌为不吸水链霉菌武夷变种(*S. ahyscopicus* var. *wuyiensis*)经诱变后得到的高产菌株 S-40(采用原始培养基发酵其武夷菌素效价可达 4 443 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为指示菌测定武夷菌素的效价. 2 个菌株均由中国农业科学院植物保护研究所生物农药组提供.

① 收稿日期: 2006-10-10

作者简介: 王立东(1981-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 从事植物病理学研究.

通讯作者: 张克诚

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 培养基

菌种培养采用的是酵母膏葡萄糖培养基^[3];生物测定采用的是经过改进的PDA培养基^[3],其中琼脂为7 g/L;原始发酵培养基为淀粉10 g/L、葡萄糖15 g/L、玉米粉30 g/L、豆饼粉20 g/L、化合物A和B各3 g/L.

1.2.2 培养条件

将保存于甘油管中的孢子接到茄形瓶中的酵母膏葡萄糖培养基上,28℃恒温培养5~7 d.然后将茄形瓶中菌种切成1 cm²大小的菌块,接种到发酵培养基上,28℃,220 r/min摇床培养72 h.

1.3 效价的测定

采用上述PDA培养基,用管碟法中的剂量法^[4]测定武夷菌素的效价.

1.4 实验设计

1.4.1 培养基关键因子筛选

本实验利用部分因子设计法(Fractional Factorial Design, FFD)^[5]对淀粉、葡萄糖、玉米粉、豆饼粉、化合物A、化合物B、化合物C、MgSO₄、FeSO₄、NaCl共10种营养成分的主效应进行考察,以筛选影响武夷菌素效价的关键因子.

1.4.2 搜索重要影响因子的最优范围

根据部分因子设计法所得的结论,采用最陡爬坡法^[2]对关键因子进行考察.关键因子以部分因子实验中的-1水平为出发点,0.6%的浓度为步长,非重要影响因子取0水平值,考察发酵液效价变化趋势,逼近最大响应区域,确定重要影响因子的最优范围.

1.4.3 关键因子浓度优化

筛选出影响武夷菌素效价的关键因子后,根据JMP软件中的响应面设计模块程序,采用二因素五水平(共13组实验)的中心组合设计法(Central Composite Design, CCD)对关键因子进行优化,其中关键因子各取5个水平值,非关键因子取0水平值.根据实验所得数据进行二次多项式的回归拟和,预测武夷菌素效价最大值及其所对应的关键因子的浓度^[6,7].

1.4.4 响应面模型的验证

以多元二次方程所预测的最佳培养基为发酵培养基,进行3组发酵实验,以验证模型的有效性.

1.5 数据处理与分析

实验设计、数据处理、回归模型分析与数据作图等均是采用JMP软件包(version 5.1.2, SAS Institute Inc.)^[8]完成的.

2 结果与分析

2.1 部分因子设计法筛选培养基中的关键因子

采用部分因子设计法进行20组发酵实验,筛选对武夷菌素效价有显著影响的因子,其实验设计和20组发酵实验所得的武夷菌素效价见表1.对表1所列数据进行回归分析得到的结果见表2.所得的回归方程为:

$$Y = 2\,983.43 + 61.08 X_1 + 662.32 X_2 - 101.32 X_3 + 344.32 X_4 - 41.30 X_5 - 47.78 X_6 \\ + 46.67 X_7 - 40.72 X_8 + 182.86 X_9 - 31.64 X_{10} \quad (R^2 = 0.843\,4)$$

该回归模型中Y为武夷菌素产生效价, X₁、X₂……、X₁₀分别为培养基10种成分(淀粉、葡萄糖、玉米粉、豆饼粉、化合物A、化合物B、化合物C、MgSO₄、FeSO₄、NaCl)的量值.由决定系数R²可知武夷菌素效价变化中84.34%能被回归方程所解释,(P>F)=0.013说明回归方程是显著的.在考察的10种营养成分中,t检验为p<0.05的因素只有葡萄糖和豆饼粉,说明它们的浓度变化会显著的影响武夷菌素的效价,其它因素则影响不显著.由此确定葡萄糖和豆饼粉为影响武夷菌素效价的关键因子.

表 1 部分因子实验设计及武夷菌素效价的测定值

| 序号 | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₄ | X ₅ | X ₆ | X ₇ | X ₈ | X ₉ | X ₁₀ | 武夷菌素效价($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
|----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|--|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 887 |
| 2 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 3 176 |
| 3 | -1 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 2 021 |
| 4 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 2 986 |
| 5 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 2 921 |
| 6 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 3 743 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 2 978 |
| 8 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | 3 424 |
| 9 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 227 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 2 048 |
| 11 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 889 |
| 12 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 2 091 |
| 13 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 3 642 |
| 14 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 4 790 |
| 15 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 3 304 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 120 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 090 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 069 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 905 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 359 |

注: X₁(4, 8, 12)、X₂(8, 16, 24)、X₃(10, 20, 30)、X₄(10, 20, 30)、X₅(1.6, 3.2, 4.8)、X₆(1.6, 3.2, 4.8)、X₇(0.1, 0.2, 0.3)、X₈(0.1, 0.2, 0.3)、X₉(0.1, 0.2, 0.3)、X₁₀(0.1, 0.2, 0.3)中 X₁、X₂、……、X₁₀分别代表淀粉、葡萄糖、玉米粉、豆饼粉、化合物 A、化合物 B、化合物 C、MgSO₄、FeSO₄、NaCl, 括号内为各因子的-1, 0, 1 水平的实际值, 单位为 g/L.

表 2 部分因子实验设计回归分析结果

| 成分因子 | 参数估计 | t 值 | 大于 t 的概率 |
|-----------------|----------|-------|------------|
| 截距 | 2 983.43 | 29.65 | <.0001 |
| X ₁ | 61.08 | 0.54 | 0.600 4 |
| X ₂ | 662.32 | 5.89 | 0.000 2 |
| X ₃ | -101.32 | -0.90 | 0.391 3 |
| X ₄ | 344.32 | 3.06 | 0.013 6 |
| X ₅ | -41.30 | -0.37 | 0.722 |
| X ₆ | -47.78 | -0.42 | 0.681 |
| X ₇ | 46.67 | 0.41 | 0.688 |
| X ₈ | -40.72 | -0.36 | 0.725 8 |
| X ₉ | 182.86 | 1.63 | 0.138 5 |
| X ₁₀ | -31.64 | -0.28 | 0.784 9 |

$R^2=0.843 4$, $F\text{-value}=4.85$, ($P>F$)=0.013

注: 字母变量 X₁、X₂、……、X₁₀表示 10 种培养基成分(淀粉、葡萄糖、玉米粉、豆饼粉、化合物 A、B、C、MgSO₄、FeSO₄、NaCl)的量值.

2.2 最陡爬坡法确定关键因子的最优范围

在实验中变化葡萄糖和豆饼粉的浓度以逼近武夷菌素效价最大值(表 3). 由实验结果(表 3)可以看出, 随着葡萄糖和豆饼粉浓度的增加武夷菌素效价变化趋势先上升后下降, 葡萄糖在 26 g/L、豆饼粉在 28 g/L 浓度范围内武夷菌素效价有最大值, 因此在该浓度附近选择中心组合设计的 0 水平值.

表 3 最陡爬坡实验设计及实验结果

| 序 号 | $X_2/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | $X_4/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 武夷素效价/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|-----|------------------------------------|------------------------------------|---|
| 1 | 8 | 10 | 1 526 |
| 2 | 14 | 16 | 2 516 |
| 3 | 20 | 22 | 3 891 |
| 4 | 26 | 28 | 4 523 |
| 5 | 32 | 34 | 4 210 |
| 6 | 38 | 40 | 4 282 |
| 7 | 44 | 46 | 3 211 |
| 8 | 50 | 52 | 2 905 |
| 9 | 56 | 58 | 1 798 |

注: X_2 和 X_4 分别代表葡萄糖和豆饼粉用量值。

2.3 响应面法优化关键因子

根据 2.1 和 2.2 实验数据结果, 采用 2 因素 5 水平的中心组合设计法对葡萄糖和豆饼粉浓度进行优化, 共进行了 13 组发酵实验, 其实验设计方案和每组实验所得的武夷菌素效价见表 4。采用 JMP 软件对表 4 进行二次多项式的回归拟和, 建立武夷菌素效价对葡萄糖和豆饼粉的动态关系响应模型:

$$Y = 6\,643.78 + 687.42 X_2 + 275.13 X_4 - 824.69 X_2^2 - 122.45 X_2 X_4 - 620.94 X_4^2 \quad (R^2 = 0.899\,9)$$

式中 Y 为武夷菌素效价的预测值, X_2 和 X_4 分别为葡萄糖和豆饼粉的量值。回归方程的方差分析(表 5)结果 ($P > F$) = 0.002 2, 表明模型在 $\alpha = 0.01$ 水平上显著; 决定系数 $R^2 = 0.899\,9$, 说明仅有约 10% 的武夷菌素效价变化不能由该模型所解释, 由此认为回归模型拟合程度很好。对方程求偏导得出: 当 $X_2 = 0.40$, $X_4 = 0.18$ 时, Y 有最大值 6 807, 经编码转换后得: $x_2 = 27.2$, $x_4 = 31.8$ 。由此得到 S-40 菌株产武夷菌素最优培养基配方为: 淀粉 8 g/L、葡萄糖 27.2 g/L、玉米粉 20 g/L、豆饼粉 31.8 g/L、化合物 A 3.2 g/L、化合物 B 3.2 g/L、化合物 C 0.2 g/L、 MgSO_4 0.2 g/L、 FeSO_4 0.2 g/L、NaCl 0.2 g/L。

表 4 中心组合实验设计及实验结果

| 序 号 | X_2 | X_4 | 武夷菌素效价/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|-----|--------|--------|--|
| 1 | -1 | -1 | 4 263 |
| 2 | -1 | 1 | 5 130 |
| 3 | 1 | -1 | 5 308 |
| 4 | 1 | 1 | 5 685 |
| 5 | -1.414 | 0 | 3 717 |
| 6 | 1.414 | 0 | 6 475 |
| 7 | 0 | -1.414 | 5 165 |
| 8 | 0 | 1.414 | 5 843 |
| 9 | 0 | 0 | 6 982 |
| 10 | 0 | 0 | 6 564 |
| 11 | 0 | 0 | 6 088 |
| 12 | 0 | 0 | 6 793 |
| 13 | 0 | 0 | 6 793 |

注: X_2 和 X_4 分别代表葡萄糖和豆饼粉的编码值, 其由公式 $X_2 = (x_2 - 24)/8$ 和 $X_4 = (x_4 - 30)/10$ 转化而得, 公式中的 x_2 、 x_4 代表葡萄糖和豆饼粉的实际值^[9], 实际值的单位为 g/L。

表 5 二次方程的方差分析表

| 方差来源 | 自由度 | 平方和 | 均 方 | F 值 | 大于 F 值的 概率 $P > F$ |
|------|-----|------------|-----------|----------|-----------------------|
| 模型 | 5 | 11 042 297 | 2 208 459 | 12.589 8 | 0.002 2 |
| 误差 | 7 | 1 227 917 | 175 417 | | |
| 失拟 | 3 | 753 793.4 | 251 264 | 2.119 8 | 0.240 4 |
| 纯误差 | 4 | 474 123.6 | 118 531 | | |
| 所有项 | 12 | 12 270 214 | | | |

$R^2 = 0.899\,9$

葡萄糖和豆饼粉交互作用对武夷菌素效价的影响可通过响应面图直观反映出,通过图 1 可知:该方程存在最大值,且葡萄糖和豆饼粉存在着协同效应,由于葡萄糖和豆饼粉分别是培养基中主要的碳源和氮源,由此可知武夷菌素的合成需要合适的碳氮比。

2.4 多元二次方程及优化培养基的验证

采用模型预测的最优培养基对 S-40 菌株进行 3 次发酵实验,以检验模型的有效性。3 次实验所得武夷菌素效价分别为 $6\ 793\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $6\ 615\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $6\ 522\ \mu\text{g}/\text{mL}$,平均效价为 $6\ 643\ \mu\text{g}/\text{mL}$,模型方程预测值和实验验证值的平均相对误差为 2.4%。由此可以看出,该模型能很好的模拟武夷菌素效价随 2 种关键营养成分的变化动态规律。使用该模型推算得到 2 种主要营养成分的最佳浓度制成的优化发酵培养基,可以使 S-40 菌株产武夷菌素的效价比使用原来的培养基($4\ 443\ \mu\text{g}/\text{mL}$)提高约 50%。

3 结论与讨论

响应面分析方法将多因素实验中因素与实验结果的相互关系用多项式近似模拟,将因素与实验结果(响应值)的关系函数化,依此可研究因素与响应值之间、因素与因素之间的相互关系,并进行优化。响应面法已广泛应用于各种微生物培养基和发酵条件优化上^[10-12],但应用在农用抗生素发酵培养基上^[3]的报道比较少。

本文采用响应面法对武夷菌素发酵培养基中 10 种营养成分进行了优化,建立了二次响应模型,并对武夷菌素效价最大值进行了预测,经过实验验证,预测值与实际值之间相对误差仅为 2.4%,优化后武夷菌素的效价达到 $6\ 643\ \mu\text{g}/\text{mL}$,比原来 $4\ 443\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 有明显的提高。由此可见响应面法与单次单因子法、正交设计法和均匀设计法等传统的优化方法相比较,实验次数少、周期短,可大大节省时间和成本,而且可以通过二次方程模型的拟合及方差的分析,评价每个因子及其交互作用对所得产物的影响,快速、有效的预测多因子系统的最佳条件,这是传统方法所不能达到的。因此把 JMP 软件、优化设计和发酵实验相结合,可以更加科学和快速的优化发酵培养基,降低成本,提高经济效益,是微生物改进发酵工艺的一种可行的途径。

参考文献:

- [1] 韦日清,林德忻,陈志和. 农用抗生素 Bo-10 产生菌的鉴定[J]. 微生物学报, 1984, 24(4): 401-402.
- [2] 王云飞,王成国. 响应面法的理论及应用(J). 中央民族大学学报(自然科学版) 2005, 14(3): 236-240.
- [3] 王晓青. 农用抗生素 2-16 高产菌株选育及发酵优化组合研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2004: 32-39.
- [4] 周 启,王道本. 农用抗生素和微生物杀虫剂[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990: 83-86.
- [5] Fannin T E, Marcos M D, Anderson D A, et al. Use of fractional factorial design to evaluate interactions of environmental factors affecting biodegradation rates[J]. Appl Environ Microbiol, 1981, 42: 936-943.
- [6] Elibol M. Response surface methodological approach for inclusion of perfluorocarbon in actinorhodin fermentation medium[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(5): 667-673.
- [7] Adinarayana K, Ellaiiah P, Srinivasulu B, et al. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by Streptomyces marinensis under solid-state fermentation[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(11): 1565-1572.
- [8] Sau J, Lee C, Lehman A. JMP Start Statistics[M]. Thomson Learning, 2006: 110-118.
- [9] Wu J, Michael H. 试验设计与分析及参数优化[M]. 北京: 中国统计出版社, 2003: 342-345.
- [10] Murat E. Optimization of medium composition for actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3 (2) with re-

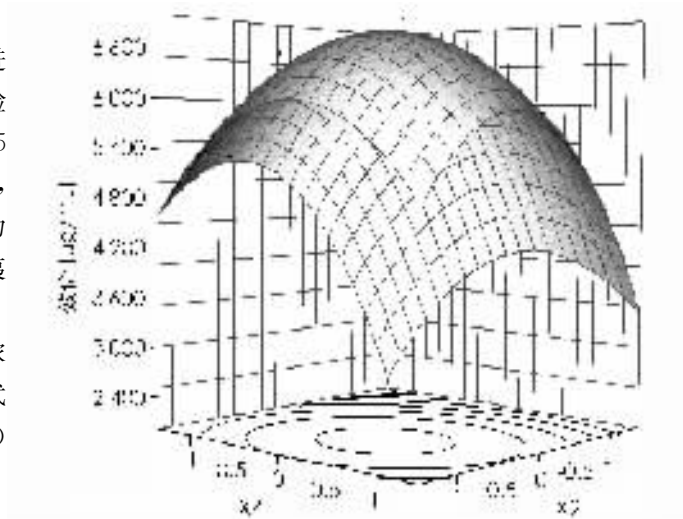


图 1 X_2 和 X_4 对 S-40 菌株产武夷菌素的效价响应面图

sponse surface methodology[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(9): 1057—1062.

[11] Gu X B, Zheng Z M, Yu H Q, et al. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 3196—3201.

[12] 胡永红, 沈树宝, 欧阳平凯. 响应面分析法用于微生物培养基浓度的优化[J]. 工业微生物, 2002, 32(1): 9—12.

Optimizing Medium Composition for Wuyiencin Production by *Streptomyces ahgrosopicus* var. *Wuyiensis* with Response Surface Methodology

WANG Li-dong¹, ZHANG Ke-cheng², SHI Yi-ping², TAN Wan-zhong¹

1. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China

Abstract: To improve the proficiency of Wuyiencin (an agricultural antibiotics) production by *Streptomyces ahgrosopicus*, an investigation was conducted to optimize the components of the fermentation medium in the laboratory using the response surface methodology (RSM). Fractional factorial design was employed to evaluate the effects of the ten medium components, viz. starch, glucose, corn flour, soybean cake powder, $MgSO_4$, $FeSO_4$, NaCl, compounds A, B, and C. Regression analysis was performed to determine the significant factors affecting the wuyiencin production and the glucose and soybean cake powder were found the most important components. Therefore, a five-level two-factor central composite design (CCD) was used to optimize the dosages of glucose (X_2) and soybean cake powder (X_1). The relation of Wuyiencin production (Y) to the two significant factors was fitted with data from the CCD experiment and a fitted model was:

$$Y = 6\,643.78 + 687.42 X_2 + 275.13 X_4 - 824.69 X_2^2 - 122.45 X_2 X_4 - 620.94 X_4^2.$$

Through calculations from this model, the maximum yield of Wuyiencin could be obtained when the concentrations of glucose and soybean cake powder were 27.2 g/L and 31.8 g/L, respectively. An optimized medium was thus formulated based on these results. This medium was tested in cultivating the 'high yielding' S-40 isolate of *S. ahgrosopicus* var. *wuyiensis* and Wuyiencin production was 6 643 $\mu\text{g/mL}$, an increase of about 50% based on the yield proficiency (4 443 $\mu\text{g/mL}$) of Wuyiencin of this isolate on the original medium.

Key words: *S. ahgrosopicus*; Wuyiencin production; medium components; glucose; soybean cake powder; dosage optimization

责任编辑 夏娟