

哈茨木霉发酵生产 Monocillin I 的培养基优化研究

姚琳^{1,2}, 杨谦^{1*}

(1. 哈尔滨工业大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:采用响应面分析法优化哈茨木霉菌发酵生产 Monocillin I 培养基。以 monocillin I 产量为指示,通过 HPLC/MS 测定其产量。在单因素试验基础上,选定麦芽糖、黄豆粉和磷酸二氢钾添加量 3 个因素做中心组合试验,建立二次回归方程,并用响应面分析法进行优化。结果表明:绿色木霉菌的最优碳源、氮源、磷源及其最优添加量分别为麦芽糖 4.162%、黄豆粉 0.253%、磷酸二氢钾 0.044 5%。在此条件下培养的哈茨木霉菌发酵产生 Monocillin I 产量达到 16.241 mg/L,表明响应面分析法非常适合优化 Monocillin I 发酵培养基,使产量提高了 34.5%。因此,培养基优化方法高效、简便、耗时少,为 Monocillin I 发酵奠定工业基础。

关键词:哈茨木霉;培养基;Monocillin I

中图分类号:S763.1

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2014)-02-0144-05

Optimization of the Media for the Culture of Monocillin I by *Trichoderma harzianum*

YAO Lin^{1,2}, YANG Qian^{1*}

(1. Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150001, China;

2. Key Laboratory of Molecular and Cytogenetics, Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025, China)

Abstract: Response surface methodology(RSM) was adopted to optimize the media for culturing monocillin I by *Trichoderma harzianum* 88. Monocillin I yield was determined by HPLC/MS. According to the single-factor experiments, three factors(amount of maltose, soyflour and KH_2PO_4) were selected for Box-Behnken designed to establish a quadric regression equation. The optimal carbon, nitrogen, and phosphorus resources and their adding amounts were established as maltose (4.162%), soyflour (0.253%), and KH_2PO_4 (0.044 5%). Under the optimal conditions, a yield of 16.24 mg/L was achieved, increased by 34.5%. The chosen method of medium optimization was efficient, simple and less time consuming, which laid a foundation of large-scale production Monocillin I.

Key words: *Trichoderma harzianum*; medium; Monocillin I

植物病虫害(包括病毒,细菌,线虫,昆虫,真菌)可引起全球农作物减产 30%~50%^[1-2]。其中植物病原真菌是引起植物疾病甚至死亡的主要因素,占植物疾病的 70%~80%。植物病原真菌能侵染寄主植物的果实、花器、茎秆、叶片等不同组织,如何预防和控制植物病原真菌的发生是亟待解决的问题。目前,在植物保护和农业生产过程中人们主要使用化学农药防治植物真菌疾病,但随着环保意识的增强,人们呼吁使用对环境友好的生物药类产品治理

植物真菌病害。因此开发具有对人畜安全,对生态环境影响小等特点的生物源抗真菌制剂成为研究热点之一。生物源抗真菌制剂主要来源于具有抑菌作用的生物活体或其代谢产物中具有抑菌活性的毒素等化合物,而植物内生真菌哈茨木霉菌(*Trichoderma harzianum*)则正是极具潜力的纯微生物杀菌剂来源。通过对哈茨木霉抑菌机制的分析,揭示了此菌株可通过重寄生作用和产生抗生素抑制植物病原

收稿日期:2013-10-20 修回日期:2013-11-21

基金项目:863 计划“真菌和代谢物杀菌剂研究与产品创新”项目(2011AA10A205)。

作者简介:姚琳,女,博士,讲师,研究方向:木霉生防菌。E-mail:yaolin329@163.com

* 通信作者:杨谦,男,博士,教授,研究方向:木霉生防菌。E-mail:yangian84@yahoo.com

真菌并促进植物生长和诱导植物防御^[3]。哈茨木霉产生的抗生素包括聚酮类、氨基酸及其衍生物以及萜烯类、咪唑类等^[4]，但还有大量的化合物没有被分离，例如热休克蛋白 90 (HSP₉₀) 抑制剂 Monocillin I^[5]。

Monocillin I 是具有 17 碳的二羟基苯甲酸内脂类衍生物(图 1)，能与热休克蛋白 90 (HSP₉₀) 结合并抑制其功能，可用于增强植物耐热性^[5]。研究发现 Monocillin I 也有抗真菌活性，于 1980 年从真菌 *Monocillium nordinii* 的发酵代谢物中分离^[6]，能有效地抑制玉米秆腐病菌 *Stenocarpella maydis*、德巴利腐霉菌 (*Pythium debaryanum*) 和立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)^[7]，具有很好的药用开发价值。但 Monocillin I 代谢的自然来源有限，目前只从植物内生菌 *M. nordinii*^[7]、*Paraphaeosphaeria quadriseptata*^[7-8]、*Chaetomium chiversii*^[9]、*Colleto-trichum graminicola*^[7] 和 *Beauveria bassiana*^[10]。制约对其体外活性评价及应用评价，如何开发其来源并提高其产量是一个亟待解决的问题。

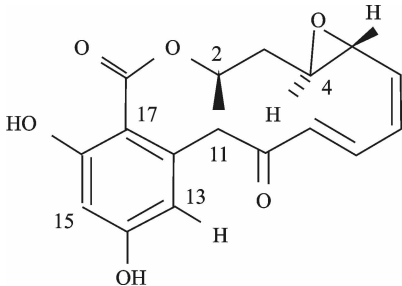


图 1 Monocillin I 的化学结构^[6]
Fig. 1 Chemical structure of Monocillin I

本研究从哈茨木霉 T88 菌株 (*T. harzianum* 88) 发酵液中分离 Monocillin I，以 Monocillin I 产量为指标，运用响应面分析法优化哈茨木霉培养基，研发的 Monocillin I 产量为其抗生物质的研究与应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

哈茨木霉 T88 (*T. harzianum* 88; CGMCC 5403; GenBank No. of ITS: JN579713) 由哈尔滨工业大学生命科学与工程系微生物实验室保存。Monocillin I 标准品购自香港 Angene Chemical 公司。其余试剂均从哈尔滨化学试剂有限公司购买。

发酵基础培养基：蔗糖 20 g/L，硝酸铵 4 g/L，磷酸二氢钾 1 g/L (0.1%)，七水硫酸镁 0.2 g/L，二水氯化钙 0.6 g/L，一水硫酸锌 0.002 8 g/L，六水

绿化钴 0.003 2 g/L，七水硫酸铁 0.01 g/L，pH 值 6.5。121℃ 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 Monocillin I 萃取及含量分析 50 mL 发酵基础培养基中接种孢子量为 10⁶ spores/L 的哈茨木霉 T88，30℃，150 rpm/min，暗培养 36 h；转到 11 发酵基础培养基中，30℃，150 r/min 暗培养 7 d，滤纸过滤发酵液，乙酸乙酯 500 mL (EtOAc) 萃取，共 3 次，每次 1 h，旋转蒸发仪 370℃ 浓缩萃取液。1 mL 乙醇溶解浓缩萃取液，3 000 r/min 离心 1 min，取上清，旋转蒸发仪浓缩，1 mL 的三氯甲烷 (CHCl₃) 溶解，3 000 r/min 离心 1 min，取上清，浓缩后用 1 mL 的二氯甲烷 (CH₂Cl₂) 混合 0.5% 甲醇 (MeOH) 溶解，3 000 r/min 离心 1 min，取上清，浓缩后用 20 μL CH₂Cl₂ 混合 0.5% MeOH 溶解，液质联用仪 (HPLC/MS) Agilent 1100 测定分析。

1.2.2 Monocillin I 标准曲线制作 配制 Monocillin I 梯度浓度的标准溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/L 和 1.0 mg/L。由液质联用仪 (LC/MS) Agilent 1100 测定。Agilent 公司的 C18 色谱柱，1.0 mm 内径 × 10 cm。洗脱条件：0~15 min，用 MeOH : H₂O = 60 : 40 做流动相，流速 1 mL/min，柱温为 20℃，紫外吸收波长为 220 nm。以所得的峰面积数 (y) 为纵坐标，以 Monocillin I 的质量浓度 (x, mg/L) 为横坐标，做标准曲线的回归方程 $y = 1 \times 10^6 x$ (线性回归系数 $R^2 > 0.99$)。用液质联用仪的液相色谱仪测定萃取后等同重量发酵浸膏中的 Monocillin I 峰面积百分比，根据标准曲线计算每 1 000 ml 中 Monocillin I 的含量 (mg/l)。

1.3 单因子试验

1.3.1 碳源对 Monocillin I 产量的影响

1) 发酵基础培养基的碳源 (2% 蔗糖) 分别用 2% 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉和乳糖代替。3 次重复。方法同 1.2.1。

2) 碳源添加量对 Monocillin I 产量的影响将发酵基础培养基中碳源用最优碳源替代，设置不同浓度，包括 1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%。3 次重复。方法同 1.2.1。

1.3.2 不同氮源对 Monocillin I 产量的影响

1) 发酵基础培养基的氮源 (0.4% 硝酸铵) 分别用 4 g/l 硝酸铵、硝酸钾、牛肉膏、蛋白胨、酵母提取物、黄豆粉代替。方法同 1.2.1。

2) 发酵基础培养基的氮源 (0.4% 硝酸铵) 分别用 30 mmol/L 的缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、亮氨酸和

丙氨酸代替。3 次重复。方法同 1. 2. 1。

3)氮源添加量对 Monocillin I 产量的影响。
将发酵基础培养基中氮源用最优氮源替代,设置不同浓度,包括 0. 05%、0. 1%、0. 15%、0. 20%、0. 25%、0. 30%、0. 35%。3 次重复。方法同 1. 2. 1。

1. 3. 3 磷酸二氢钾的不同浓度对 Monocillin I 产量的影响 将发酵基础培养基中 0. 1%的磷酸二氢钾分别用不同浓度的磷酸二氢钾代替,磷酸二氢钾浓度包括 0. 00%、0. 025%、0. 050%、0. 075%、0. 10%、0. 125%。3 次重复。方法同 1. 2. 1。

1. 3. 4 响应面优化试验 依据单因素试验结果和 Box-Behnken design(BBD)原理和方法^[11-12],设计以哈茨木霉菌发酵生产 Monocillin I 为指标,以碳源添加量(X_1)、氮源添加量(X_2)和磷酸二氢钾添加量(X_3)为自变量,按方程 $X_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码。式中 X_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的真实值, X_0 为试验中心点处自变量的真实值, ΔX 为自变量的变化步长。利用软件 Design-expert 7. 0 设计 3 因素 5 水平试验。共 16 组,每组试验 3 个平行,所得最优结果为 BBD 中心点。

2 结果与分析

2.1 碳源对 Monocillin I 产量的影响

结果如图 2 所示。麦芽糖作为碳源有利于发酵生产 Monocillin I ,产量高达 12. 52 mg/L。其次是可溶性淀粉,再次为蔗糖作为碳源,而用葡萄糖和乳糖作为发酵培养基的菌株产生的 Monocillin I 的产量是最低的,因此最适碳源为麦芽糖。

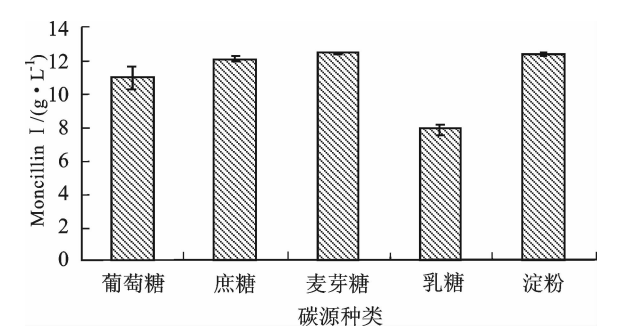


图 2 不同碳源对 Monocillin I 产量的影响
Fig. 2 Effect of carbon source on Monocillin I production during fermentation

选择麦芽糖为最适碳源,图 3 所示,随着碳源浓度的增加,Monocillin I产量增大,当添加浓度为 4%时 Monocillin I的产量达到最大。但由于麦芽糖浓度过大使菌体生长过于缓慢,其代谢产物随之减少,因此选择 4%麦芽糖添加量为最适氮源添加量。

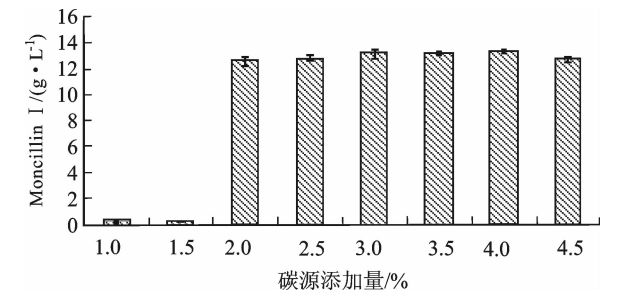


图 3 碳源添加量对哈茨木霉发酵生产 Monocillin I 的影响
Fig. 3 Effect of carbon source addition on yield of Monocillin I from *T. harzianum*

2.2 氮源对 Monocillin I 产量的影响

结果如图 4 所示,菌株生长在有机氮源迟效黄豆粉和蛋白胨培养基中 Monocillin I 产量最高,在无机氮源中的发酵产量次之。牛肉膏和酵母提取物属于有机速效氮源,利用此氮源菌体生长迅速但不利于 Monocillin I 合成。依据图 4 结果,选择黄豆粉为最适氮源。

氮源添加量试验表明(图 5),黄豆粉的添加量越多,Monocillin I 产量越高,当添加量为 0. 15%时产量达到最大,而继续添加产量稍微减少。因此最适 Monocillin I 发酵培养基的碳氮比例在 6 : 1 ~ 14 : 1 之间。

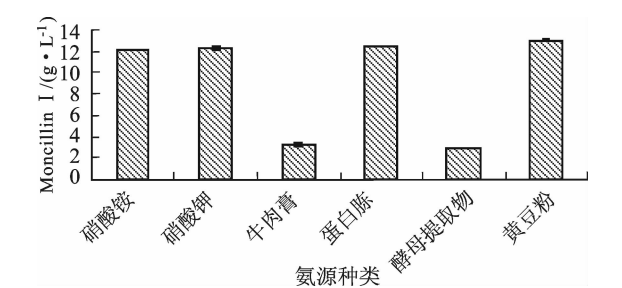


图 4 不同氮源对 Monocillin I 产量的影响
Fig. 4 Effect of nitrogen source on Monocillin I production during fermentation

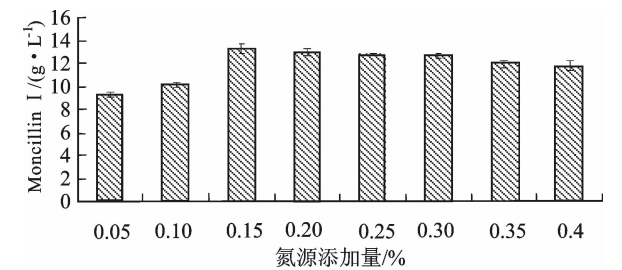


图 5 氮源添加量对哈茨木霉发酵生产 Monocillin I 的影响
Fig. 5 Effect of nitrogen source addition on yield of Monocillin I from *T. harzianum*

2.3 氨基酸对 Monocillin I 产量的影响

如图 6 所示,10 种氨基酸最适氮源的培养基中,最高 Monocillin I 产量只能到达 5. 197 mg/L,因此氨基酸不适合作为发酵培养基的氮源,不对其做最适氮源的添加量检测。

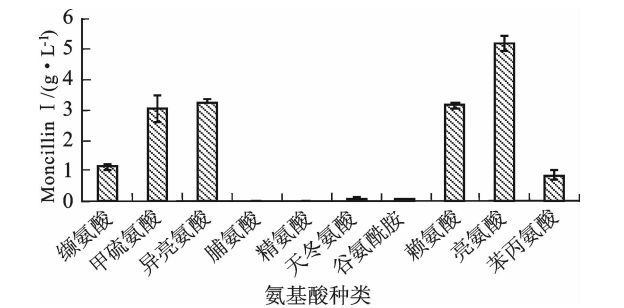


图 6 不同氨基酸对 Monocillin I 产量的影响
Fig. 6 Effect of amino acids medium on Monocillin I production during fermentation

2.4 磷酸二氢钾对 Monocillin I 产量的影响

结果如图 7 所示, Monocillin I 产量随着磷酸二氢钾的增加而增加。当磷酸二氢钾添加量为 0.05 % 时 Monocillin I 产量达到最大, 而磷酸二氢钾添加量继续增大 Monocillin I 产量却随之递减。一般情况下, 磷酸二氢钾除了对微生物的生长提供磷源外, 还具有稳定发酵液 pH 的作用, 偏高或偏低的 pH 值都不利于 Monocillin I 产量。本试验验证磷酸二氢钾的最适添加量为 0.05 %。

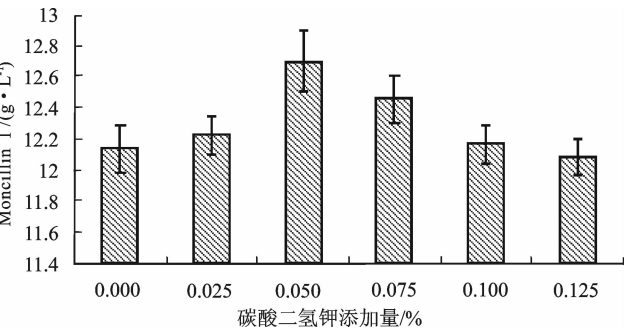


图 7 不同磷酸二氢钾添加量对 Monocillin I 产量的影响
Fig. 7 Effect of Monopotassium phosphate medium addition on Monocillin I production during fermentation

2.5 响应面优化结果分析

2.5.1 最陡爬坡试验 根据单因子发酵试验设计 3 个因子的取值及变化方向和步长, 结果见表 1。最优发酵结果在第 4 组附近, 确定以 4 % 麦芽糖、黄豆粉 0.3 %、0.04 % 磷酸二氢钾作为 Box-Behnken 试验设计的中心点。

表 1 最陡爬坡试验结果

Table 1 Experimental results of steepest ascent

序号	X ₁ 添加量/%	X ₄ 添加量/%	X ₅ 添加量/%	Monocillin I 产量 ±标准偏差/ (mg · L ⁻¹)
1	3.0	0.15	0.025	13.45 ± 0.098
2	3.6	0.20	0.030	14.09 ± 0.157
3	3.8	0.25	0.035	15.58 ± 0.204
4	4.0	0.30	0.040	15.85 ± 0.075
5	4.2	0.35	0.045	15.76 ± 0.114
6	4.4	0.40	0.050	15.74 ± 0.064

注: X₁: 麦芽糖, X₄: 黄豆粉, X₅: 磷酸二氢钾; 表中数据均为 3 次测量的平均值, 表 2、表 3 同。

2.5.2 响应面分析试验 基于最陡爬坡试验的分析结果, 参照 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验, 结果如表 2 所示。用软件 Design-Expert 7. 0. 0 分析试验结果显示, 中心组合的 Monocillin I 产量回归方程为:

$$Y=15.94+0.0625X_1+0.0475X_4-0.015X_5-0.08X_1\times X_4-0.11X_1\times X_5+0.04X_4\times X_5-0.115X_1^2-0.555X_4^2-0.215X_5^2。$$

X₁: 麦芽糖, X₄: 黄豆粉, X₅: 磷酸二氢钾。

试验数据方差分析及数据显著分析结果见表 2, 模型决定系数 R²=0.9918, 调整绝对系数 R_{Adj}²=0.9771, 表明模型方程与实际发酵拟合良好, 相对 CV%=0.31 很小, 在合理范围内, 说明模型可信度高, 证明模型可靠, 能说明 97.71 % Monocillin I 产量的变化^[10]。Prob>F 值<0.0001 表示模型项显著, 可用来进行响应值预测, 确定最佳培养基组成。

回归分析结果见表 3, “Prob>F”值表明该模拟二次方程具有高度显著性, 说明试验方法可靠, 可用该方程模拟真实的 3 因素 3 水平分析。X₁ 和 X₄ 对 Monocillin I 的产量呈显著正相关, 而 X₅ 的影响不显著。其中, X₁ X₄, X₁ X₅, X₁², X₄² 和 X₅² 对 Monocillin I 产量的影响非常显著。由此可见, 试验因素对于响应值的影响不仅仅是简单的线性关系, 二次项对响应值有更大的影响, 交互作用的影响也较大。此外, X₁ X₄、X₁ X₅ 的交互作用十分明显, 即麦芽糖和黄豆粉之间存在着显著的交互作用, 这之前得到的结论相同; 模型还表明麦芽糖和磷酸二氢钾之间也存在交互作用。

2.5.3 Monocillin I 发酵回归方程验证 利用回归方程对麦芽糖、黄豆粉和磷酸二氢钾的组合进行 Monocillin I 产量的优化预测。当 4.162 % 的麦芽糖、0.253 % 的黄豆粉和 0.0445 % 的磷酸二氢钾组合, 预计可得 Monocillin I 的最大产量为 15.8846 mg/l。通过试验验证显示, Monocillin I 实际产量为 16.241 mg/L, 与预测值 15.8846 mg/L 相近, 比原始发酵培养基提高 34.5 %, 证明回归模型与实际试验拟合好, 可信赖性强, 统计学分析科学, 为 Monocillin I 发酵提供了一个科学模型。

3 结论与讨论

微生物在生长后期会产生各种代谢产物, 这些代谢产物对环境条件非常敏感, 其产物的合成往往会因环境条件的变化而停止, 因此碳源、氮源和磷酸盐的种类和添加量都能成为次级代谢产物生物合成的调控元素。快效碳源例如葡萄糖等在菌体生长阶段能

被快速利用而阻遏次级代谢酶系的合成,抑制次级代谢产物合成,选择多糖等迟效碳源有利于维持代谢产物合成速度^[13]。本试验在同等时间内选择麦芽糖和可溶性淀粉为碳源发酵生产 Monocillin I 的产量高于选择其他碳源的产量符合这一规律。氮源的种类也是影响因素次级代谢物合成之一。有机迟效氮源如黄豆粉和蛋白胨需要降解成小分子氨基酸或肽才能被菌体利用,其利用速度慢,有利于促进菌体的次级代谢,选择有机迟效氮源发酵生产 MonocillinI 产量优于无机氮源。有机快效氮源例如氨基酸、牛肉膏和酵母浸膏能迅速被菌体利用促进生长,不利于 Monocillin I 积累^[14]。次级代谢物的另一调控因素即为培养基中的碳氮比例。例如 Lin^[15] 等研究表明,红色素

等聚酮类次级代谢化合物的合成过程中,C/N 比值尤为重要。氮限制可抑制蛋白转录和能量代谢相关酶,诱导糖酵解到三羧酸循环途径的代谢流,维持细胞能量动态平衡,抑制了色素类聚酮化合物的生物合成途径。因此 C/N 是一个很好的衡量聚酮化合物生产产量的指标,即过高的氮源比抑制聚酮类化合物产生,最适 C/N 比值为 20 : 1 则促进此类化合物的生产^[12]。本研究的试验结果也符合这一规律,当碳氮比在 6 : 1~14 : 1 时,Monocillin I 产量能达到最大,而高于这个比例,其产量显著下降。磷酸盐调控微生物次级代谢产物的合成^[16],从试验结果可知,低浓度的磷酸盐能提高 Monocillin I 产量,而高的浓度则抑制其合成。

表 2 Box-Behnken 设计表及 Monocillin I 产量
Table 2 Box-Behnken plan in coded value and Monocillin I production

序号	麦芽糖/%		黄豆粉/%		磷酸二氢钾/%		Monocillin I 产量/(Y, mg · L ⁻¹)	预测值/(mg · L ⁻¹)
	X ₁ 水平	X ₁	X ₄ 水平	X ₄	X ₅ 水平	X ₅		
1	-1	3.8	-1	0.25	0	0.04	15.12	15.06
2	1	4.2	-1	0.25	0	0.04	15.37	15.37
3	-1	3.8	1	0.35	0	0.04	15.33	15.34
4	1	4.2	1	0.35	0	0.04	15.26	15.30
5	-1	3.8	0	0.30	-1	0.035	15.41	15.45
6	1	4.2	0	0.30	-1	0.035	15.79	15.80
7	-1	3.8	0	0.30	1	0.045	15.65	15.64
8	1	4.2	0	0.30	1	0.045	15.59	15.55
9	0	4.0	-1	0.25	-1	0.035	15.18	15.18
10	0	4.0	1	0.35	1	0.045	15.24	15.19
11	0	4.0	-1	0.25	1	0.045	15.02	15.07
12	0	4.0	1	0.35	1	0.045	15.24	15.24
13	0	4.0	0	0.30	0	0.04	15.94	15.94
14	0	4.0	0	0.30	0	0.04	15.94	15.94
15	0	4.0	0	0.30	0	0.04	15.94	15.94

表 3 Box-Behnken 试验结果的方差分析
Table 3 Analysis of variance(ANOVA)for Box-Behnken design

类型	平方和	自由度	均方差	F 值	Prob>F
Model	1.39	9	0.15	67.27	0.000 1
X ₁	0.031	1	0.031	13.59	0.014 2
X ₄	0.081	1	0.018	7.85	0.037 9
X ₅	0.001 8	1	0.003	0.78	0.416 9
X ₁ X ₄	0.026	1	0.026	11.13	0.020 6
X ₁ X ₅	0.048	1	0.048	21.04	0.005 9
X ₄ X ₅	0.006 4	1	0.006 4	2.78	0.156 2
X ₁ ²	0.049	1	0.049	21.23	0.005 8
X ₄ ²	1.14	1	1.14	494.49	<0.000 1
X ₅ ²	0.17	1	0.17	74.21	0.000 3

根据单因子试验结果,本试验根据最陡爬坡试验找到各个显著因子的变化最优区域,即可利用二次多项式回归模型: $Y = 15.94 + 0.0625X_1 + 0.0475X_4 - 0.015X_5 - 0.08X_1 \times X_4 - 0.11X_1 \times X_5 + 0.04X_4 \times X_5 - 0.115X_1^2 - 0.555X_4^2 - 0.215X_5^2$ 确定影响因子顺序为麦芽糖添加量>黄豆粉添加量>磷酸二氢钾添加量,获得 4.162%的麦芽糖、0.253%的黄豆粉和0.044 5%的磷酸二氢钾为最优的营养元素组合。最终通过响应面的优化,本研究

得到转化子 T5 发酵 Monocillin I 的最高产量为 15.884 6 mg/L,为大规模的工业化生产奠定基础。

参考文献:

[1] PIMENTEL D. “Pesticides and pest control,”in integrated pest management: innovation-development process[J]. Springer, 2009:83-87.

[2] 陈川,唐周怀,李鑫. 果树害虫病原微生物的研究与应用概况[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(4): 133-136.

CHEN C, TANG Z H, LI X. Progress on studies and applications of entomopathogens to fruit insect pests[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2005, 20(4): 133-136. (in Chinese)

[3] DEGENKOIB T, VON D HEREN H, NIELSEN K F, *et al.* Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea* [J]. Chem. Biodivers, 2008, 5(5): 671-680.