

不同发酵条件对绿粘帚霉(RCEF4099)抗辣椒灰霉活性的影响

陈远友¹, 朱薇薇² (1. 安徽省石台县林业局, 安徽石台 245100; 2. 安徽省微生物防治重点实验室, 安徽合肥 230036)

摘要 [目的]为获得初步优化的发酵工艺条件及提高绿粘帚霉的发酵产量提供依据。[方法]通过单因子和正交试验研究了一系列主要培养条件(碳源、氮源、营养性因素、非营养性因素)对该菌株抗菌活性的影响。[结果]菌株 RCEF4099 最佳液体培养基配方为:40% 葡萄糖、0.5% 白砂糖、1.5% 干酵母、0.02% K_2HPO_4 ; 最佳培养条件为:装液量 40/100 ml (V/V), 接种量 10% (V/V), 培养时间为 5 d, 摇床转速 160 r/min。[结论]获得了初步优化的发酵工艺条件。

关键词 绿粘帚霉; 发酵条件; 抗辣椒灰霉活性

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)32-15887-03

Effect of different fermentation conditions on anti-*Botrytis cinerea* activity by *Gliocladium virens* L. RCEF4099

CHEN Yuan-you et al (Forestry Administration of Shitai County of Anhui Province, Shitai, Anhui 245100)

Abstract [Objective] The study was to obtain preliminary optimization of fermentation conditions and provide the reference for the improvement of fermentation yield of *Gliocladium virens*. [Method] Single factor and orthogonal experiments were used to study the effect of a series of culture conditions such as carbon, nitrogen, nutrient factors, non-nutritional factors on the antimicrobial activity of this strains. [Result] The optimum medium components were: 4% of glucose, 0.5% of commercial sugar, 1.5% of dry yeast, 0.02% of K_2HPO_4 ; the optimum culture conditions were: aeration rate was 40/100 ml (V/V), inoculation level was 10% (V/V), fermentation period was 5 d, rotation was at 160 r/min. [Conclusion] The preliminary optimization of fermentation conditions were obtained.

Key words *Gliocladium virens*; fermentation condition; anti-*Botrytis cinerea* activity

绿粘帚霉(*Gliocladium virens*)是一种受到广泛关注的生防真菌^[1],在世界范围内广泛存在,分布在几乎所有的土壤和自然环境中,特别是那些含丰富有机质的环境中。森林、草坪、潮湿的泥炭土、植物残体以及草莓根际土壤中均可分离到该菌^[2]。自发现绿色粘帚霉能防治苗期猝倒病以来,其拮抗作用得到了充分肯定^[3]。该菌不仅能产生多种抗生素,而且对多种植物病原真菌具有寄生作用。它不仅能抑制真菌,还对细菌有抑制作用,特别是对土传病害有很好的防治作用^[4-8]。

笔者对 1 株绿粘帚霉 RCEF4099 抗植物病原真菌的活性研究。测试发现,该株绿粘帚霉(RCEF4099)的代谢产物对辣椒灰霉有很强的抑菌活性。为此,笔者研究了培养基成分变化、发酵时间及发酵温度等培养条件变化对 RCEF4099 菌株抗菌活性的影响,为获得初步优化的发酵工艺条件、提高发酵产量提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 供试菌株及培养基。绿粘帚霉 RCEF4099 由安徽农业大学微生物防治省级重点实验室提供。病原指示菌辣椒灰霉(*Botrytis cinerea*)由安徽农业大学植保学院提供。斜面培养基为 SDAY 培养基及 PDA 培养基;液体培养基为 SDY 培养基。

1.2 方 法

1.2.1 绿粘帚霉液体培养。将培养好的绿粘帚霉斜面种子,按 5% 的接种量接种于装有 40 ml 液体培养基的 100 ml 三角瓶中,置于 120 r/min、25 °C 全温震荡培养箱中震荡培养 7 d。

1.2.2 杯碟法抑菌试验^[9-10]。将指示菌辣椒灰霉菌菌苔刮入无菌水后,配置成 1.0×10^8 cell/ml 的菌悬液。取该菌悬

液 200 μ l 均匀涂布于无菌 SDAY 固体平板培养基上。用镊子夹取无菌牛津杯放置平皿菌层上,加入定量样品于牛津杯内(样品与杯面齐平为准)。最后将平皿放入 25 °C 恒温培养箱中培养 24 h,用游标卡尺测量抑菌圈直径大小,以确定样品抑菌活性(牛津杯直径 7.64 mm)。

1.2.3 碳、氮源对菌株抑菌活性的影响。

1.2.3.1 供试材料。①碳源:蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、玉米粉、甘油、乳糖、白砂糖。(其中玉米粉煮沸 20 min,2 层纱布过滤)。②混合碳源:葡萄糖、白砂糖、葡萄糖+白砂糖。③氮源:(NH_4)₂SO₄、NaNO₃、酵母浸出粉、干酵母、黄豆粉、蛋白胨、蚕蛹粉(其中蚕蛹粉、黄豆粉煮沸 20 min,2 层纱布过滤。供试氮源在 1 L 培养基中的添加量均是各自相对于 10 g 蛋白胨的全氮量折合而成)。

1.2.3.2 培养基配制。碳源试验按 1% 蛋白胨、1% 酵母浸出粉及 4% 供试碳源相组合;混合碳源试验按葡萄糖 40 g/L、白砂糖 40 g/L、(葡萄糖 20 g/L + 白砂糖 20 g/L)用量与(10 g/L 蛋白胨 + 10 g/L 酵母浸出粉)组合;氮源试验按全氮含量 2% 的比例分别与(2% 葡萄糖 + 2% 白砂糖)相混合。40 ml 培养基装入 100 ml 三角瓶,按 7% 接种量分别接种,25 °C,120 r/min 的振荡培养箱培养 7 d,用牛津杯方法测定发酵液的抑菌活性。

1.2.4 营养性因素正交试验设计。选取葡萄糖(A)、白砂糖(B)、干酵母(C)、 K_2HPO_4 (D)、V_B(E)为变量,以抑菌活性为指标进行培养基浓度配比优化。设计正交试验 L₁₆(4⁵),各因素、水平如表 1。

1.2.5 非营养性因素正交实验设计。为综合确定种龄、装液量、接种量和培养箱转速的最佳配比,设计正交试验 L₉(3⁴),各因素、水平见表 2。

2 结果与分析

2.1 单一碳源对 RCEF4099 菌株抑菌活性的影响 由图 1 可知,7 种不同碳源对抗菌活性的影响不一,其中葡萄糖效果最好,其抑菌圈直径达到了 27.50 mm,白砂糖、蔗糖、麦芽糖

作者简介 陈远友(1971-),男,安徽石台人,工程师,从事林业经营及开发利用方面的研究。

收稿日期 2009-06-22

次之。

表1 营养因子配比因素水平

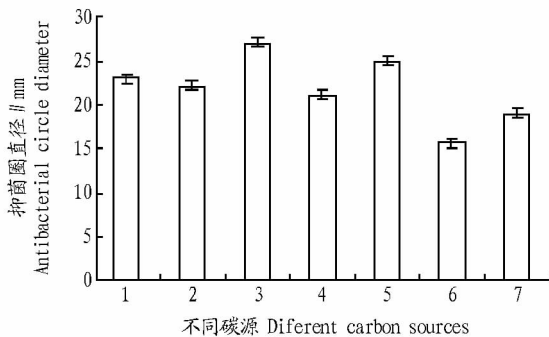
Table 1 List of factor and level indices for orthogonal analysis of medium ingredients

水平 Level	A 葡萄糖 Glucose	B 白砂糖 Sugar	C 干酵母 Dry yeast	D K ₂ HPO ₄	E V _B
1	2.5	0.5	1.5	0.02	0.01
2	3.0	1.0	2.0	0.05	0.02
3	3.5	1.5	2.5	0.08	0.03
4	4.0	2.0	3.0	0.11	0.04

表2 非营养因子配比因素水平

Table 2 List of factor and level indices for orthogonal analysis of non-nutrient factors

水平 Level	A 种龄//d Seed age	B 装液量//ml Liquid volume in flask	C 转速//r/min Rotational speed	D 接种量//% Inoculation amount
1	4	20	120	5
2	5	40	140	10
3	6	60	160	15



注:1 为蔗糖;2 为麦芽糖;3 为葡萄糖;4 为玉米粉;5 为白砂糖;6 为乳糖;7 为甘油。

Note:1. Sucrose; 2. Maltose; 3. Glucose; 4. Corn meal; 5. Sugar; 6. Lactose; 7. Glycerol.

图1 不同碳源对 RCEF4099 菌株抑菌活性的影响

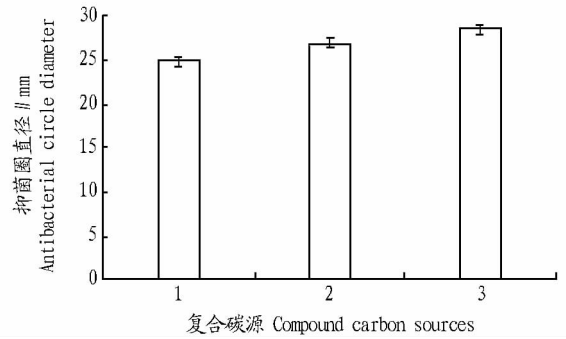
Fig.1 Effect of carbon sources on the antifungal activity of the fermentation products of strain RCEF4099

2.2 混合碳源对 RCEF4099 菌株抑菌活性的影响 葡萄糖和白砂糖对抗菌活性物质的生成都有明显的促进作用,故将两者结合起来,可能会对发酵有更强的促进作用。所以进行混合碳源的优化试验。

由图2可知,葡萄糖和白砂糖相结合的混合碳源的抑菌活性优于以葡萄糖或白砂糖为单一碳源的抑菌活性,所以最佳碳源为混合碳源:2%葡萄糖+2%白砂糖。

2.3 单一氮源对 RCEF4099 菌株抑菌活性的影响 由图3可知,7种不同氮源对抗菌活性的影响不一,干酵母效果最好,其抑菌圈直径达到了28.00 mm,黄豆粉、酵母浸出粉、蚕蛹粉对抗菌活性物质的产生也较有利。从目标产物和生产成本上考虑,应选择干酵母作为最佳氮源。

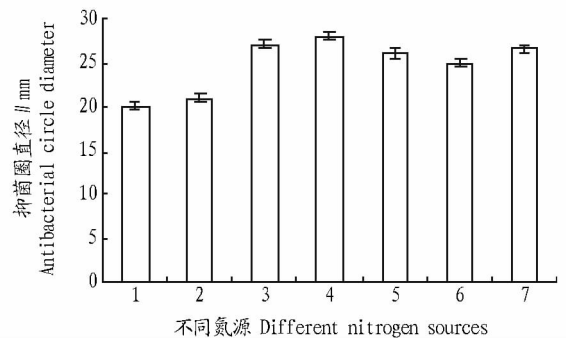
2.4 营养性因素对 RCEF4099 菌株抑菌活性的影响 通过 DPS 统计软件分析,由表3可知,A因素的极差最大,其次是B、C、D因素,E因素的极差最小。进一步考察各因素对



注:1 为白砂糖4%;2 为葡萄糖4%;3 为葡萄糖2%+白砂糖2%。
Note: 1. Sugar 4%; 2. Glucose 4%; 3. Glucose 2% + Sugar 2%.

图2 复合碳源对 RCEF4099 菌株抑菌活性的影响

Fig.2 Effect of combined carbon sources on the antifungal activity of strain RCEF4099



注:1 为(NH₄)₂SO₄;2 为NaNO₃;3 为酵母浸出粉;4 为干酵母;5 为黄豆粉;6 为蛋白胨;7 为蚕蛹粉。

Note:1. (NH₄)₂SO₄; 2. NaNO₃; 3. Yeast extraction powder; 4. Dry yeast; 5. Soybean flour 6. Peptone; 7. Silkworm pupa meal.

图3 不同氮源对 RCEF4099 菌株抑菌活性的影响

Fig.3 Effect of nitrogen sources on the antifungal activity of strain RCEF4099

RCEF4099 抑菌活性的影响,利用 DPS 统计软件进行正交设计方差分析(完全随机模型),在99%置信度下,A对抑菌活性的影响极显著($P < 0.01$),B、C、D的影响显著($P < 0.05$),E无显著影响。因此有利于 RCEF4099 菌株产生抗菌活性物质的最佳培养基配比是 A₄B₁C₁D₁,即:4%葡萄糖、0.5%白砂糖、1.5%干酵母、0.02%K₂HPO₄。

2.5 非营养性因素对 RCEF4099 菌株抗菌活性的影响 由表4可知,D因素的极差最大,其次是A、B、C因素。利用 DPS 统计软件进行正交设计方差分析(完全随机模型),在99%置信度下,D、A因素对抑菌活性的影响极显著($P < 0.01$),B、C因素的影响显著($P < 0.05$)。根据各因素k的变化率可以看出最佳因素搭配为 D₂A₂B₃C₂,即以抗菌活性为指标,RCEF4099 液体培养的最佳培养条件是:将培养5d的液体母种以10%的接种量,接种到装有40 ml液体培养基的100 ml三角瓶中,在160 r/min、25℃条件下培养。

3 结论

综合以上试验结果,有利于 RCEF4099 菌株产生抗菌活性物质的营养条件为4%葡萄糖、0.5%白砂糖、1.5%干酵母、0.02%K₂HPO₄;非营养条件为装液量40/100 ml(V/V),接种量10%(V/V),培养时间5d,摇床转速160 r/min。

表 3 以抑菌活性为指标的营养性因子正交试验分析

Table 3 Analysis of orthogonal nutrient factor experiment for fermentation conditions of strain RCEF4099 based on the anti-*Botrytis cinerea* activity

试验号 Experiment No.	因子与水平 Factors and levels					抑菌圈直径/mm			平均抑菌圈直径/mm
	A	B	C	D	E	Antibacterial circle diameter			Average antibacterial circle diameter
1	1	1	1	1	1	22.89	22.63	23.58	23.03 ± 0.49
2	1	2	2	2	2	20.98	16.24	17.98	18.40 ± 2.40
3	1	3	3	3	3	19.62	20.21	22.97	20.93 ± 1.79
4	1	4	4	4	4	18.01	14.64	19.95	17.53 ± 2.69
5	2	1	2	3	4	28.01	28.01	29.58	28.53 ± 0.91
6	2	2	1	4	3	30.99	31.18	26.03	29.40 ± 2.92
7	2	3	4	1	2	26.99	26.98	22.03	25.33 ± 2.86
8	2	4	3	2	1	26.97	24.64	26.99	26.20 ± 1.35
9	3	1	3	4	2	30.18	29.61	29.01	29.60 ± 0.59
10	3	2	4	3	1	28.89	26.98	25.03	26.97 ± 1.93
11	3	3	1	2	4	27.96	24.68	26.96	26.53 ± 1.68
12	3	4	2	1	3	26.84	22.08	24.98	24.63 ± 2.39
13	4	1	4	2	3	27.61	28.88	27.01	27.83 ± 0.95
14	4	2	3	1	4	27.97	30.96	27.07	28.67 ± 2.04
15	4	3	2	4	1	33.92	29.09	31.99	31.67 ± 2.43
16	4	4	1	3	2	29.58	28.61	29.01	29.07 ± 0.49
K_1	239.70	327.00	324.10	305.00	323.60				
K_2	328.40	310.30	309.70	296.90	307.20				
K_3	323.20	313.40	316.20	316.50	308.40				
K_4	351.70	292.30	293.00	324.60	303.80				
k_1	19.98	27.25	27.01	25.41	26.97				
k_2	27.37	25.86	25.81	24.74	25.60				
k_3	26.93	26.12	26.35	26.38	25.70				
k_4	29.31	24.36	24.42	27.05	25.32				
R	9.33	2.89	2.59	2.31	1.65				

表 4 以抑菌活性为指标的非营养性因子正交试验分析

Table 4 Analysis of orthogonal non-nutrient factor experiment for fermentation conditions of strain RCEF4099 based on the anti-*Botrytis cinerea* activity

试验号 Experiment No.	因子与水平 Factors and levels				抑菌圈直径/mm			平均抑菌圈直径/mm
	A	B	C	DE	Antibacterial circle diameter			Average antibacterial circle diameter
1	1	1	1	1	19.58	17.54	22.18	19.77 ± 2.32
2	1	2	2	2	31.96	28.06	30.18	30.07 ± 1.95
3	1	3	3	3	20.97	19.98	18.65	19.87 ± 1.16
4	2	1	2	3	19.31	22.96	26.13	22.80 ± 3.41
5	2	2	3	1	28.69	26.62	30.09	28.47 ± 1.75
6	2	3	1	2	29.21	29.58	29.21	29.33 ± 0.21
7	3	1	3	2	27.58	27.21	27.01	27.27 ± 0.29
8	3	2	1	3	20.23	20.22	21.15	20.53 ± 0.53
9	3	3	2	1	18.41	16.55	16.94	17.30 ± 0.98
K_1	209.10	209.50	208.90	196.60				
K_2	241.80	237.20	210.50	260.00				
K_3	195.30	199.50	226.80	189.60				
k_1	23.23	23.28	23.21	21.84				
k_2	26.87	26.36	23.39	28.89				
k_3	21.70	22.17	25.20	21.07				
R	5.17	4.19	1.99	7.82				

参考文献

- [1] 马贵珍, 暴增海, 王文娟, 等. 粘帚霉固体培养基筛选[J]. 吉林农业大学学报, 2005, 27(5): 490-493.
- [2] 郭江洪, 文成敬. 木霉和绿粘帚霉对柑桔青霉病菌的拮抗作用[J]. 西南农业学报, 2001, 14(3): 59-62.
- [3] 何迎春, 高必达. 立枯丝核菌的生物防治[J]. 中国生物防治, 2000, 16(1): 31-34.
- [4] MA G Z, WU X R, YANG W L. Inhibition of zymotic liquid from different isolates of *Gliocladium* spp. to three pathogenic fungi [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2004, 23(1): 96-99.
- [5] 董锦艳, 李铷, 张克勤, 等. 粘帚霉属真菌代谢物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 124-131.
- [6] 暴增海, 杨文兰, 吴学仁, 等. 粘帚霉(*Gliocladium* spp.) 不同菌株对几种病原菌的抑菌作用测定[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(4): 394-398.
- [7] 马桂珍, 高会兰, 张拥华, 等. 粘帚霉对核盘菌菌核的寄生作用及其细胞壁降解酶活性分析[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(6): 628-632.
- [8] 谯天敏, 朱天辉. 碳源和氮源对绿粘帚霉合成几丁质酶的影响[J]. 四川农业大学学报, 2006, 24(1): 29-36.
- [9] RAHALISON L, HAMBURGER M, HOSTETTSMANN K, et al. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher-plants[J]. Phytochemical Analysis, 1991, 2: 199-203.
- [10] 白秀峰. 生物药物分析[M]. 沈阳: 沈阳药科大学出版社, 1998.
- [11] LIANG YL, GUO JQ, CHEN XY, et al. Study on the fermentation conditions of a mucopolysaccharide-producing bacterium LVI[J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(2): 29-32, 46.