

# 响应面法优化 *Xenorhabdus nematophila* 发酵培养基的研究

王永宏, 张 强, 张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100)

**[摘 要]** **【目的】**提高 *Xenorhabdus nematophila* YL001 的抗菌活性, 为该菌株杀菌活性成分的提取分离及生物农药的开发应用奠定基础。**【方法】**以 YSG 培养基为基础, 采用单因子试验方法, 对最佳碳源和氮源进行筛选, 并采用全因子中心组合试验设计和响应面法对其最佳配比进行优化。**【结果】**YL001 菌株的最佳碳源为玉米粉, 氮源为豆饼粉, 培养基的最佳组成为: 玉米粉 9.69 g/L, 豆饼粉 76.50 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1.07 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.79 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.63 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.80 g/L,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1.25 g/L, 在此条件下, YL001 菌株抗菌活性达 268.9 U/mL。**【结论】**培养基优化后 YL001 菌株的抗菌活性与试验的预测值接近, 表明响应面法在培养基优化中十分有效, 相对简单, 且节省时间和材料。

**[关键词]** *Xenorhabdus nematophila*; 抗菌活性; 响应面法; 发酵培养基

**[中图分类号]** S476<sup>+</sup>.15

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2009)07-0140-07

## Enhanced antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* by fermentation medium optimization with response surface methodology

WANG Yong-hong, ZHANG Qiang, ZHANG Xing

(Biorational Pesticides Research and Service Center, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** **【Objective】** The study enhanced the antibiotics activity of *Xenorhabdus nematophila* YL001, and laid foundation for antibacterial active constituents separation of YL001 strain, development and application of such biological resource. **【Method】** YSG was employed as an original medium, and the best carbon and nitrogen sources were identified using one-factor-at-a-time approach. A full factorial composite experimental design and response surface methodology were used in the design of experiments and in the analysis of results. **【Result】** Corn flour and bean cake powder were identified as the best carbon. The optimal levels of medium components were: corn flour 9.69 g/L, bean cake powder 76.50 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1.07 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.79 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.63 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.80 g/L,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1.25 g/L. **【Conclusion】** The results strongly support the use of RSM for medium optimization. The chosen method of optimization of medium composition was efficient, relatively simple and time and material saving.

**Key words:** *Xenorhabdus nematophila*; antibiotic activity; response surface methodology; fermentation medium

嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus nematophila*)  
是一种革兰氏阴性细菌, 属肠杆菌科, 其与斯氏线虫

(*Steinernema*) 共生, 存在于侵染期线虫肠腔内, 侵  
染期线虫通过一些自然孔口进入寄主昆虫体内, 将

\* [收稿日期] 2008-09-22

[基金项目] 国家“863”计划项目(2003AA241140); 西北农林科技大学青年学术骨干项目(52211241); 西北农林科技大学科研专项

[作者简介] 王永宏(1968—), 男, 陕西凤翔人, 副教授, 博士, 主要从事生物农药及发酵技术研究。E-mail: yhwang@nwsuaf.edu.cn

共生菌释放到寄主昆虫血淋巴中,共生菌在血淋巴中大量繁殖,使寄主昆虫患败血症死亡<sup>[1]</sup>。嗜线虫致病杆菌(*X. nematophila*)能产生多种代谢产物,如 Xenocoumacins<sup>[2]</sup>、Nematophin<sup>[3]</sup>和 Xenematin<sup>[4]</sup>等,这些代谢产物不仅具有多种化学结构,而且在医药和农业上具有抗菌、杀虫、杀线虫、抗溃疡、抗肿瘤和抗病毒活性<sup>[5]</sup>,应用前景和商业潜力较大。

培养基是微生物生长、代谢的物质基础,其成分和对比对产物的发酵单位、发酵周期及提取分离工艺等都会产生很大影响<sup>[6]</sup>,因而发酵培养基的优化在发酵工业中具有十分重要的作用。培养基优化时最常用的策略是单次单因子(one-variable-at-a-time)法。但在考察的因素较多时,需要太多的试验次数和较长的试验周期,而且不能考察各因素间的交互作用,使得该方法的应用受到一定的影响。为了弥补单次单因子法的缺陷,数理统计优化法,如全因子试验法、正交设计法、Plackett-Burman 设计法、响应面优化设计法、均匀设计法等已成功地运用于微生物发酵培养基的优化<sup>[7]</sup>。目前,采用全因子中心组合试验设计和响应面法优化嗜线虫致病杆菌(*X. nematophila*)发酵培养基的研究,国内外尚未见文献报道。因此,本试验在前期研究的基础上,采用全因子中心组合试验设计和响应面法,对从陕西杨凌筛选的具有较高杀菌活性的共生菌 *X. nematophila* YL001<sup>[8-11]</sup>的发酵培养基进行了优化,以期为该菌株杀菌活性成分的提取分离及生物农药的开发提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 *X. nematophila* YL001(以下简称 YL001),由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心从采自陕西杨凌的线虫 *Steinernema* sp. YL001 中分离鉴定获得。

1.1.2 供试碳源、氮源 碳源:葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、淀粉、甘油、玉米粉、麸糠;氮源:胰蛋白胨、胨蛋白胨、大豆胨、蛋白胨、牛肉膏、豆饼粉、酵母提取物、棉饼粉、鱼粉及尿素,均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.1.3 培养基 斜面及平板培养基:NA 培养基,牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,营养琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 7.2~7.4。

共生菌鉴别培养基:NBTA 培养基,NA+氯化

三苯基四氮唑(TTC) 0.04 g+溴麝香草酚蓝(BTB) 0.025 g。

基础培养基:YSG 培养基,甘油 5 g,酵母提取物 15 g,1 mol/L  $\text{MgSO}_4$  5 mL,( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub> $\text{SO}_4$  2 g,1 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mL,1 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 mL,1 mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  10 mL,水 1 000 mL,pH 7.2~7.4。

### 1.2 方法

1.2.1 共生菌发酵液及无菌滤液的制备 取保种管保存的 YL001 菌株,划线接种于 NA 培养基平板上,28 ℃培养 24~48 h。挑取单菌落,划线接种于 NBTA 培养基平板上,28 ℃培养 48 h。挑取蓝色初生型单菌落,接种于摇瓶 YSG 培养基中,28 ℃、180 r/min 振荡培养 16 h 后,取培养物,以体积分数 5%的接种量转接于相同的发酵培养基中,28 ℃、180 r/min 培养 72 h,得共生菌发酵液。将发酵液在 14 000 r/min、4 ℃离心 10 min,取上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,得发酵液无菌滤液。

1.2.2 发酵液无菌滤液抗菌活性的测定 采用琼脂扩散法测定 YL001 菌株发酵液无菌滤液的抗菌活性。将熔化的 NA 培养基冷却至 45~50 ℃,按体积分数 1.5%加入指示菌摇匀,倒入培养皿,每皿( $d=9.0$  cm)15 mL,制好平板后,用打孔器(直径 7.5 mm)在平板上均匀打 3 个孔,每孔内加入 100  $\mu\text{L}$  共生菌发酵液无菌滤液,以 YSG 培养基为对照,在 28 ℃培养 24 h,从孔边缘测量抗菌圈直径。

YL001 菌株抗菌活性单位的定义:在上述测定条件下,1.0 mm 的抗菌圈定义为 1 个活性单位(U),即此发酵液无菌滤液活性为 10 U/mL 或 10 000 U/L。

1.2.3 最佳碳源、氮源的选择 以不同的碳源、氮源分别代替 YSG 培养基中相应的碳源(甘油)或氮源(酵母提取物),其他成分及含量不变,按 1.2.1 的方法培养 72 h,研究不同碳源、氮源对 YL001 菌株发酵液无菌滤液抗菌活性的影响。

1.2.4 试验设计及响应面优化 采用全因子中心组合试验设计(CCD)和响应面法(RSM)优化 YL001 菌株发酵培养基。以抗菌活性为响应值(Y),碳源( $X_1$ )、氮源( $X_2$ )和无机盐( $X_3$ )分别为自变量,其中碳源、氮源由 1.2.3 筛选获得,无机盐为 YSG 培养基中无机盐含量的总和(各成分间的比例不变)。发酵培养基优化试验的因素、水平设计见表 1。

表 1 YL001 菌株发酵培养基优化试验的因素和水平

Table 1 Experimental range and levels of the independent variables

| 水平<br>Level   | 因素/(g·L <sup>-1</sup> ) Variable |                                   |                            |
|---------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
|               | 碳源 X <sub>1</sub> Carbon source  | 氮源 X <sub>2</sub> Nitrogen source | 无机盐 X <sub>3</sub> Mineral |
| 步长 Step chang | 3.0                              | 20.0                              | 2.0                        |
| −1.682        | 5.0                              | 11.0                              | 3.0                        |
| −1            | 7.0                              | 24.5                              | 4.2                        |
| 0             | 10.0                             | 44.5                              | 6.2                        |
| 1             | 13.0                             | 64.5                              | 8.2                        |
| 1.682         | 15.0                             | 78.0                              | 9.4                        |

各因素质量浓度与其对应自变量的编码转化公式:

$$x_i = (X_i - \bar{X}_i) / \Delta X_i, i = 1, 2, 3, \cdots, k。$$

式中: $x_i$  为自变量的编码值, $X_i$  为自变量真值, $\bar{X}_i$  为自变量在中心点的值, $\Delta X_i$  为步长。

响应面优化模型选用二次方程:

$$Y = b_0 + \sum_i b_i x_i + \sum_i \sum_j b_{ij} x_{ij} + \sum b_{ii} x_i^2。$$

式中: $Y$  为抗菌活性单位, $b_0$  为常数项, $b_i$ 、 $b_{ij}$  和  $b_{ii}$  分别为一次项  $x_i$ 、交互项  $x_{ij}$  和二次项  $x_i^2$  的系数。

表 2 碳源和氮源对 YL001 菌株抗菌活性的影响

Table 2 Effect of various carbon and nitrogen sources on antibiotic activity of *X. nemaatophilus* YL001

| 碳源<br>Carbon source | 抗菌活性/(U·mL <sup>-1</sup> )<br>Antibiotic activity unit | 氮源<br>Nitrogen source  | 抗菌活性/(U·mL <sup>-1</sup> )<br>Antibiotic activity unit |
|---------------------|--------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------|
| 葡萄糖 Glucose         | 243.3 A                                                | 胰蛋白胨 Tryptone          | 260.0 A                                                |
| 果糖 Fructose         | 196.7 B                                                | 胨蛋白胨 Proteose peptone  | 260.0 A                                                |
| 蔗糖 Sucrose          | 213.3 C                                                | 大豆胨 Soyptone           | 256.7 B                                                |
| 乳糖 Lactose          | 223.3 D                                                | 蛋白胨 Peptone            | 253.3 C                                                |
| 麦芽糖 Maltose         | 233.3 E                                                | 牛肉膏 Beef extract       | 253.3 C                                                |
| 淀粉 Starch           | 220.0 F                                                | 豆饼粉 Bean cake powder   | 213.3 D                                                |
| 甘油 Glycerol         | 216.7 G                                                | 酵母提取物 Yeast extract    | 210.0 E                                                |
| 玉米粉 Corn flour      | 196.7 G                                                | 棉饼粉 Cotton cake powder | 186.7 F                                                |
| 麸糠 Bran             | 160.0 H                                                | 鱼粉 Fish meal           | 160.0 G                                                |
|                     |                                                        | 尿素 Urea                | 153.3 H                                                |

注:不同大写字母表示差异达极显著水平( $P < 0.01$ )。

Note:The same column followed by different letters was significantly different at the 1% level by Duncan’s multiple range test.

表 2 结果表明,以葡萄糖为碳源时共生菌的抗菌活性最高,其次为麦芽糖,玉米粉作为一种廉价的替代碳源也具有较好的抗菌活性。综合考虑价格因素等,YL001 菌株发酵培养基碳源以玉米粉为宜。以不同氮源代替 YSG 培养基中的酵母提取物,其他成分及含量不变,在摇床上培养 72 h 后,测定 YL001 菌株发酵液无菌滤液的抗菌活性。结果(表 2)表明,以胰蛋白胨和胨蛋白胨为氮源时抗菌活性最好;豆饼粉也具有较好的抗菌活性,这可能是由于豆饼粉不仅能提供丰富的氮源,还能供给较多的 B 族维生素和微量元素。因此,以豆饼粉作为 YL001 菌株发酵培养基的氮源较适合。

1.2.5 统计分析 应用‘STATISTICA 6.0’(StatSoft,Inc,Tulsa,USA)对试验数据进行拟合和方差分析。

2 结果与分析

2.1 碳源和氮源对 YL001 菌株抗菌活性的影响

以不同的碳源替代 YSG 培养基中的甘油,其他成分及含量不变,在摇床上培养 72 h 后,测定 YL001 菌株发酵液无菌滤液的抗菌活性,结果见表 2。

2.2 YL001 菌株发酵培养基的优化

在上述试验的基础上,以玉米粉为碳源,豆饼粉为氮源,YSG 培养基其他成分和含量不变,采用 RSM 对 YL001 菌株发酵培养基的配方进行优化,响应面设计及试验结果见表 3。

2.2.1 二次回归模型的拟合及方差分析 依据表 3 数据,拟合出响应值  $Y$  与各因素  $X_i$  的回归模型。

$$Y = 264.3678 + 9.0142x_1 + 27.5724x_2 + 4.6507x_3 - 11.6377x_1^2 - 9.2872x_2^2 - 2.8011x_3^2 - 7.4875x_1x_2 - 1.6625x_1x_3 - 4.1625x_2x_3。$$

回归模型的显著性检验及回归系数的检验结果见表 4 和表 5。

表 3 YL001 菌株发酵培养基 CCD 设计及试验结果  
Table 3 CCD plan in coded value the observed and predicted response

| 试验序号<br>Run | 碳源 $X_1$<br>Carbon source | 氮源 $X_2$<br>Nitrogen source | 无机盐 $X_3$<br>Mineral | 抗菌活性/(U·mL <sup>-1</sup> ) Antibiotic activity unit |                        |                |
|-------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------|------------------------|----------------|
|             |                           |                             |                      | 观测值<br>Observed value                               | 预测值<br>Predicted value | 残差<br>Residual |
| 1           | 1                         | 1                           | 1                    | 270.0                                               | 268.566 6              | 1.433 4        |
| 2           | 1                         | 1                           | -1                   | 270.0                                               | 270.915 2              | -0.915 2       |
| 3           | 1                         | -1                          | 1                    | 230.0                                               | 236.721 8              | -6.721 8       |
| 4           | 1                         | -1                          | -1                   | 213.3                                               | 222.420 5              | -9.120 5       |
| 5           | -1                        | 1                           | 1                    | 280.0                                               | 268.838 1              | 11.161 9       |
| 6           | -1                        | 1                           | -1                   | 273.3                                               | 264.536 7              | 8.763 3        |
| 7           | -1                        | -1                          | 1                    | 210.0                                               | 207.043 3              | 2.956 7        |
| 8           | -1                        | -1                          | -1                   | 186.7                                               | 186.092 0              | 0.608 0        |
| 9           | 1.682                     | 0                           | 0                    | 256.7                                               | 246.605 1              | 10.094 9       |
| 10          | -1.682                    | 0                           | 0                    | 203.3                                               | 216.281 2              | -12.981 2      |
| 11          | 0                         | 1.682                       | 0                    | 273.3                                               | 284.469 9              | -11.169 9      |
| 12          | 0                         | -1.682                      | 0                    | 200.0                                               | 191.716 4              | 8.283 6        |
| 13          | 0                         | 0                           | 1.682                | 260.0                                               | 264.265 6              | -4.265 6       |
| 14          | 0                         | 0                           | -1.682               | 250.0                                               | 248.620 7              | 1.379 3        |
| 15          | 0                         | 0                           | 0                    | 256.7                                               | 264.367 8              | -7.667 8       |
| 16          | 0                         | 0                           | 0                    | 260.0                                               | 264.367 8              | -4.367 8       |
| 17          | 0                         | 0                           | 0                    | 263.3                                               | 264.367 8              | -1.067 8       |
| 18          | 0                         | 0                           | 0                    | 276.7                                               | 264.367 8              | 12.332 2       |
| 19          | 0                         | 0                           | 0                    | 270.0                                               | 264.367 8              | 5.632 2        |
| 20          | 0                         | 0                           | 0                    | 260.0                                               | 264.367 8              | -4.367 8       |

表 4 回归模型的显著性检验  
Table 4 Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic model

| 变异来源<br>Source of variations | 自由度<br>DF | 平方和<br>Sum of squares | 均方<br>Mean square | F 值<br>F-value | P 值<br>P-value |
|------------------------------|-----------|-----------------------|-------------------|----------------|----------------|
| 回归 Model                     | 9         | 153.25                | 17.027 78         | 30.205 81      | 0.000 78**     |
| 剩余 Residual                  | 10        | 11.075 69             | 1.107 569         | 15.374 41      | 0.000 097**    |
| 失拟 Lack of fit               | 5         | 8.257 065             | 1.651 413         | 2.929 464      | 0.131 575      |
| 误差 Pure error                | 5         | 2.818 627             | 0.563 725 4       |                |                |
| 总变异 Total                    | 19        | 164.325 7             | 8.648 722         |                |                |

注:相关系数  $R=0.965\ 7$ ; 决定系数  $R^2=0.932\ 6$ ; 调整后的决定系数  $R^2=0.871\ 9$ ; \*\* 表示 1% 显著水平。  
Note: Coefficient of correlation  $R=0.965\ 7$ ; Coefficient of determination  $R^2=0.932\ 6$ ; Adjusted  $R^2=0.871\ 9$ ; \*\* Significant at 1% level.

表 5 回归系数及显著性检验  
Table 5 Model coefficients estimated by multiples linear regression (significance of regression coefficients)

| 模型参数<br>Model parameter | 参数估计值<br>Parameter estimate | t 值<br>Computed t-value | P 值<br>P-value |
|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------|
| $b_0$                   | 264.367 8                   | 61.592 08               | 0.000 00**     |
| $b_1$                   | 9.014 2                     | 3.165 52                | 0.010**        |
| $b_2$                   | 27.572 4                    | 9.682 57                | 0.000 00**     |
| $b_3$                   | 4.650 7                     | 1.633 17                | 0.133 48       |
| $b_{11}$                | -11.637 7                   | 4.198 74                | 0.001 83**     |
| $b_{22}$                | -9.287 2                    | 3.350 69                | 0.007 357**    |
| $b_{33}$                | -2.801 1                    | 1.010 59                | 0.336 038      |
| $b_{12}$                | -7.487 5                    | 2.012 34                | 0.071 894      |
| $b_{13}$                | -1.662 5                    | 0.446 81                | 0.664 532      |
| $b_{23}$                | -4.162 5                    | 1.118 71                | 0.289 416      |

注:\*\* 达 1% 的显著水平。  
Note:\*\* Significant at 1% level.

从表 4 可知,回归模型的  $F_1=2.929\ 464<F_{0.05}=3.37$ ,失拟检验表明,非试验因素对试验结果的影响不大; $F_2=30.205\ 81>F_{0.01}=3.36$ ,该模型在 99% 概率水平上回归显著,表明抗菌活性(Y)与实际情

况拟合较好,因而模型是充分的。该模型的决定系数  $R^2=0.932\ 6$ ,表明模型能解释 93% 抗菌活性的变化。调整后的决定系数  $R^2$  为 0.871 9,进一步说明模型具有较高的显著性。模型的相关系数  $R=0.965\ 7$ ,表明各变量间具有显著相关性。说明该模型较适合 YL001 菌株发酵培养基的筛选。

由表 5 可以看出,该模型的一次项  $b_1$  和二次项  $b_{11}$ 、 $b_{22}$  影响极显著,这表明玉米粉和豆饼粉质量浓度与 YL001 菌株的抗菌活性有直接关系,是主要的限制性因子,其质量浓度较小的变化可引起抗菌活性相当大的改变。 $b_{33}$  仅在 70% 概率水平显著,这可能是由于粗料中含有一定的无机盐,交互项  $b_{12}$  在

95% 的概率水平上显著, $b_{13}$ 、 $b_{23}$  不显著,说明玉米粉、豆饼粉与无机盐之间的相互作用对抗菌活性无显著影响。

2.2.2 响应面分析 响应面图形是响应值  $Y$  对应于试验因素  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  ( $X_1$  为碳源,  $X_2$  为氮源,  $X_3$  为无机盐)所构成的三维空间的曲面图及其在二维平面上的等高线图,其可以直观地反映各因素及它们之间的交互作用对响应值的影响。将一个因素固定在零水平,利用 STATISTICA 6.0 软件即可作出另外两因素交互作用的响应曲面图及其等高线图,结果见图 1~3。

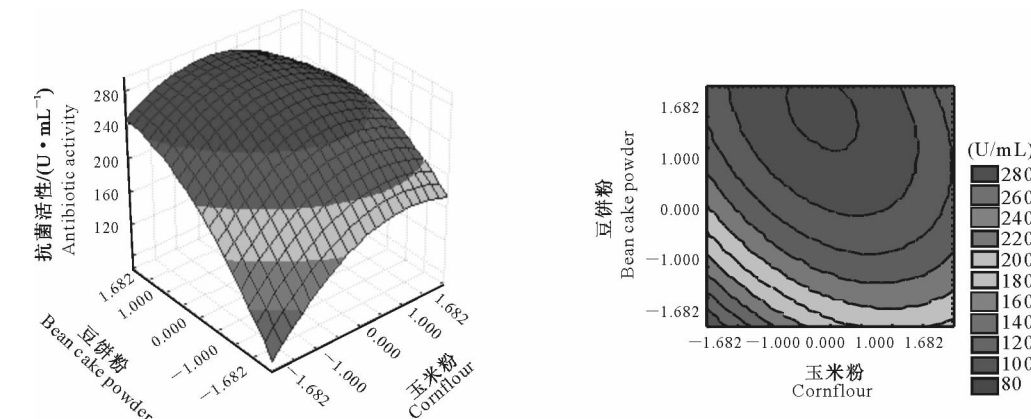


图 1 玉米粉和豆饼粉对 YL001 菌株抗菌活性的影响  
Fig.1 Effects of corn flour and bean cake powder on the antibiotic activity

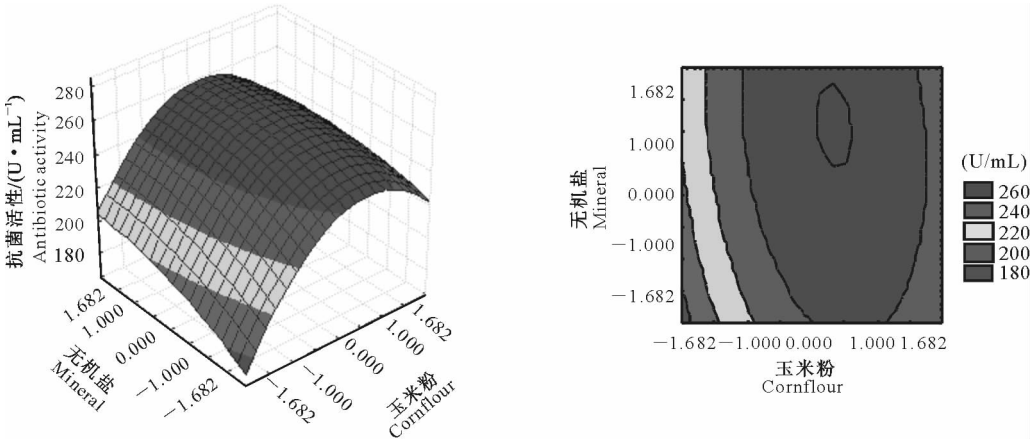


图 2 玉米粉和无机盐对 YL001 菌株抗菌活性的影响  
Fig.2 Effects of corn flour and mineral on the antibiotic activity

图 1 为固定无机盐为 6.2 g/L 情况下,不同质量浓度玉米粉和豆饼粉对 YL001 菌株抗菌活性的影响。从图 1 可以看出,豆饼粉质量浓度的影响非常显著,曲面较陡。玉米粉质量浓度不变,当豆饼粉质量浓度小于 70.0 g/L 时,随着豆饼粉质量浓度的增大,YL001 菌株抗菌活性逐渐增加;豆饼粉质量

浓度不变,当玉米粉质量浓度小于 10.0 g/L 时,随着玉米粉质量浓度的增加,YL001 菌株抗菌活性逐渐增加。从图 2 可见,玉米粉质量浓度不变,当无机盐质量浓度小于 8.2 g/L 时,随着无机盐质量浓度的增大,YL001 菌株抗菌活性逐渐增大。图 3 为固定玉米粉质量浓度为 10.0 g/L 情况下,不同质量浓

度的无机盐和豆饼粉对 YL001 菌株抗菌活性的影响。从图 3 可以看出,无机盐质量浓度不变,随着豆饼粉质量浓度的增大,YL001 菌株抗菌活性急剧增

加;豆饼粉质量浓度不变,随着无机盐质量浓度的增加,YL001 菌株抗菌活性也随之增加,但增加幅度较小。

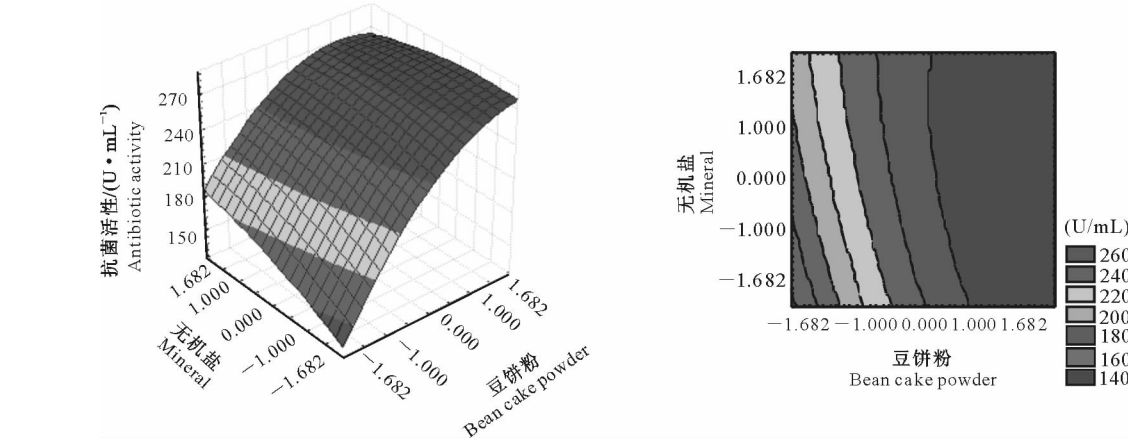


图 3 豆饼粉和无机盐对 YL001 菌株抗菌活性的影响

Fig. 3 Effects of bean cake powder and mineral on the antibiotic activity

考察所拟合响应曲面的形状可知,回归模型存在稳定点,且此模型的二次项系数均为负值,抛物面的开口向下,因而有极大值点。对回归模型求一阶偏导,并令其等于零,可以求得曲面的最大点。

$$0.9014 - 2.3275x_1 - 0.7488x_2 - 0.1663x_3 = 0,$$
$$2.7572 - 0.7488x_1 - 1.8574x_2 - 0.4163x_3 = 0,$$
$$0.4651 - 0.1663x_1 - 0.4163x_2 - 0.5602x_3 = 0.$$

解方程得: $x_1 = -0.10394$ ;  $x_2 = 1.59975$ ;  $x_3 = -0.32764$ 。

依此求得 Y 的最大估计值为:  $Y = 285.192$ 。

根据各因素与对应自变量的编码转化公式,可计算出 3 个主要因素的最佳水平值分别为碳源 ( $X_1$ ) 9.69 g/L,氮源 ( $X_2$ ) 76.50 g/L,无机盐 ( $X_3$ ) 5.54 g/L。

将无机盐转化为  $MgSO_4$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $K_2HPO_4$  和  $Na_2SO_4$  的含量,则发酵培养基的最佳配方为:玉米粉 9.69 g/L,豆饼粉 76.50 g/L,  $MgSO_4$  1.07 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  1.79 g/L,  $KH_2PO_4$  0.63 g/L,  $K_2HPO_4$  0.80 g/L,  $Na_2SO_4$  1.25g/L。

为了证实模型的预测值与实测值之间的拟合程度,进行摇瓶验证试验,摇瓶发酵 72 h 的结果见表 6。表 6 结果表明,YL001 菌株在优化后的发酵培养基培养时抗菌活性为 268.9 U/mL,与最大抗菌活性的预测值很接近,预测值与实测值之间具有良好的拟合性,表明所建模型的有效性,说明回归方程能较真实地反映各因素对共生菌抗菌活性的影响。

表 6 YL001 菌株发酵培养基验证试验结果

Table 6 Results of verification experiments

| 试验序号<br>Run          | 抗菌活性/(U · mL <sup>-1</sup> )<br>Antibiotic activity |
|----------------------|-----------------------------------------------------|
| 1                    | 276.7                                               |
| 2                    | 250.0                                               |
| 3                    | 263.3                                               |
| 4                    | 280.0                                               |
| 5                    | 283.3                                               |
| 6                    | 260.0                                               |
| 平均值<br>Average value | 268.9                                               |

3 结论与讨论

本试验通过单因子试验筛选出 *X. nematophila* YL001 发酵培养基的最佳碳源和氮源,并通过全因子中心组合试验设计和响应面法,对发酵培养基碳源、氮源和无机盐的最佳配比进行优化,获得了发酵培养基的最佳配方,通过摇瓶验证,实验值与预测值拟合良好。

抗菌物质的产生与共生菌的菌株和培养条件有关。*Xenorhabdus* spp. 在 1.0% 蛋白胨培养基中,不产生抗菌物质<sup>[12]</sup>,而在酵母提取物培养基<sup>[13-14]</sup>、LB 培养基<sup>[13]</sup>、海水培养基<sup>[15]</sup>和 TSB 培养基<sup>[3]</sup>中可以产生抗菌物质。由于抗菌物质产生菌的营养要求较复杂,不同菌种对营养物质的要求各不相同,同一菌种在不同生长阶段对营养的要求也不一样。而营养条件也能影响菌种固有的酶系统,从而改变其代谢途径,形成不同的代谢产物。因此了解菌种的营养特性,适当选择培养基的组成成分,是发酵的首要

任务。不同氮源和碳源对 YL001 菌株抗菌活性有较大影响,葡萄糖作为碳源时共生菌的抗菌活性最高,玉米粉作为一种廉价的替代碳源也具有较好的抗菌活性;有机氮源的抗菌活性较好,而无机氮源的抗菌活性较差。响应面分析表明,发酵培养基的不同组分对 YL001 菌株抗菌活性的影响有一定差异,其中氮源的影响最大,无机盐较小,且优化培养基的 C/N 较小。这可能是由于共生菌产生的抗菌物质主要是含氮的杂环类化合物,其产生与氮代谢密切相关,因而氮源对抗菌活性的影响较大。

[参考文献]

[1] Thomas G M,Poinar G O. *Xenorhabdus* gen. nov. , a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1979, 29(4): 352-360.

[2] McInerney B V, Taylor W C, Lacey M J, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity [J]. Journal of Natural Production, 1991, 54(3): 785-795.

[3] Ji D J, Yi Y K, Kang G H, et al. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophilus* against major plant-pathogenic bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 239(2): 241-248.

[4] Li J, Chen G, Webster J M. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(8): 770-773.

[5] Gaugler R. Entomopathogenic nematology [M]. Wallingford, UK: CAB International, 2002: 99-114.

[6] 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, 1995.

Zhou Q, Wang D B. Agricultural antibiotic and microbial insecticide [M]. Beijing: China Agricultural Publishing, 1995. (in Chinese)

[7] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件 [J]. 国外医药抗生素分册, 1999, 20(2): 58-60, 66.

Chu Y W. Opimization of media of microorganism and OPTI software [J]. World Notes on Antibiotics, 1999, 20(2): 58-60, 66. (in Chinese)

[8] 王永宏, 张 兴. 2 株昆虫病原线虫共生菌的分离与初步鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(12): 170-

184.

Wang Y H, Zhang X. Isolation and identification of symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2006, 34(12): 170-184. (in Chinese)

[9] 王永宏, 张 兴. 2 株昆虫病原线虫共生菌代谢产物的抗菌作用研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(2): 125-130.

Wang Y H, Zhang X. Studies on antimicrobial activity of metabolites of symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(2): 125-130. (in Chinese)

[10] 方香玲, 郭 琪, 易晓华, 等. 昆虫病原线虫共生细菌的分子鉴定及其培养特性 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(12): 200-204.

Fang X L, Guo Q, Yi X H, et al. Molecule identification and cultivation characteristic of the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2008, 36(12): 200-204. (in Chinese)

[11] 方香玲, 张武岗, 易晓华, 等. 三株昆虫病原线虫共生菌胞外产物的抑菌活性 [J]. 中国生物防治, 2008, 25(4): 354-358.

Fang X L, Zhang W G, Yi X H, et al. Antimicrobial activity of extracellular metabolites of 3 strains the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(4): 354-358. (in Chinese)

[12] Chen G, Maxwell P, Dunphy G B, et al. Culture conditions for *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* symbionts of entomopathogenic nematodes [J]. Nematologica, 1996, 42(1): 124-127.

[13] Sundar L, Chang F N. Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotic produced by *Xenorhabdus nematophilus* [J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(12): 3139-3148.

[14] Akhurst R J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. , bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae [J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128(12): 3061-3065.

[15] Paul V J, Frautschy S, Fenical W, et al. Antibiotics in microbial ecology: isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* [J]. Journal of Chemical Ecology, 1981, 7(3): 589-597.