

营养因子对苏云金芽胞杆菌 4.0718 产杀虫蛋白 Cry1 和 Cry2 的影响

刘 飞 夏立秋* 丁学知 易 勇 莫湘涛 魏 薇

(湖南师范大学生命科学学院 微生物分子生物学湖南省重点实验室 长沙 410081)

摘 要: 为了提高杀虫蛋白 Cry1 和 Cry2 产量, 首先采用 Plackett-Burman 设计筛选出发酵培养基中影响苏云金芽胞杆菌 4.0718 表达毒蛋白 Cry1 的显著性因子为黄豆饼粉和 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Cry2 的产量在该配方中无显著性影响因子。然后利用最速上升实验逼近 Cry1 最大产出区域, 找到后续试验中心点。最后通过响应面优化得到黄豆饼粉和 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的最佳浓度为 11.5 g/L 和 0.02 g/L, 使 Cry1 和 Cry2 产量分别达到 0.32 mg/mL 和 0.11 mg/mL, 比原优选配方产量提高了两倍多。该优化配方发酵液对棉铃虫的半致死浓度 (LC_{50}) 为 1.09 $\mu\text{L/mL}$, 杀虫活性比原优化配方显著提高。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, Cry1, Cry2, 实验设计, 发酵培养基, 响应面优化

Nutrition Factors Influence the Production of Insecticidal Crystal Proteins Cry1 and Cry2 from *Bacillus thuringiensis* 4.0718

LIU Fei XIA Li-Qiu* DING Xue-Zhi YI Yong MO Xiang-Tao WEI Wei

(College of Life Science, Hunan Normal University, Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, Changsha 410081)

Abstract: In order to increase the production of insecticidal crystal proteins Cry1 and Cry2, firstly, Plackett-Burman design was applied to evaluate the effectiveness of the related nutrition factors; it was found that the soybean powder and $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ were significant factors for Cry1 production, but the yield of Cry2 wasn't effected remarkably in such medium. Then the steepest ascent experiment was adopted to approach the optimal region of the medium composition. Lastly, the optimal concentration of the soybean powder and $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ was 11.5 and 0.02 g/L, obtained by response surface methodology (RSM). The final yields of Cry1 and Cry2 was 0.32 mg/mL and 0.11 mg/mL, increasing twice more than that in the medium optimized before. The median lethal concentration (LC_{50}) of optimal medium was 1.09 $\mu\text{L/mL}$. The toxicity to *Helicoverpa armigera* was significantly enhanced than the old one.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Cry1, Cry2, Design of experiments, Fermentation medium, RSM optimization

基金项目: 国家“863 计划”项目资助(No. 2006AA02Z187, No. 2006AA10A212); 国家自然科学基金资助(No. 30670052); 湖南省自然科学基金重点项目资助(No. 06jj2009)

* 通讯作者: Tel: 0731-8872298; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-12; 接受日期: 2008-01-16

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称Bt)为目前应用最广最有效的微生物杀虫剂, 在农林、仓储和卫生害虫防治以及绿色食品生产等各个方面发挥着重要作用。本实验室利用复合诱变的方法筛选出了Bt高毒力突变菌 4.0718(CCTCC NO: M200016)^[1], 对其杀虫功能基因^[2-4]、晶体蛋白组^[5]以及晶体结构^[6]进行了系统研究。研究证明Bt4.0718菌株在芽胞形成期间形成立方体型和双金字塔型 2 种杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal proteins, 简称ICPs), 经MALDI-TOF-MS分析, 鉴定出对鳞翅目(*Lepidoptera*)有特异毒性的Cry1(Cry1Ac)类和对鳞翅目及双翅目(Diptera)皆有较高毒性的Cry2(Cry2Aa)类ICPs^[5,7]。

在Bt杀虫活性与ICPs、芽胞关系的问题上, 一直存在着争议: i) 芽胞数和生物杀虫活性之间具有很好的相关性^[8]; ii) 芽胞数和ICPs产量以及毒力之间没有必然联系^[9]; iii) 最近研究表明ICPs的种类和含量决定了Bt杀虫特异性和活性高低^[10], 因为不同ICPs杀虫专一性差异大, 它们之间也可能存在协同作用^[11,12], 所以, 同样的晶体总量下因ICPs组成和含量差异, 杀虫活性大不相同。对于产多种ICPs的Bt菌株而言, 以各ICPs产量为指标, 考察影响各自表达的重要因子, 通过发酵条件优化增加有特异性ICPs(如Cry1Ac)的产量, 从而提高其对目标害虫(如鳞翅目)的毒杀效果, 并节约了成本。在已有的文献报道中, 大多数以芽胞数或生物效价为发酵优化指标, 很少以ICPs产量作为考察指标, 本研究首次以提高特异ICPs为目的, 并综合利用Plackett-Burman、最速上升、中心组合设计及响应曲面分析方法进行多指标优化, 探索影响Bt 4.0718 表达Cry1 和Cry2 的重要营养因子以及它们的最佳水平, 得到了对鳞翅目害虫有高毒力的发酵培养基。

1 材料和方法

1.1 菌株

Bt 4.0718 菌株(*Bacillus thuringiensis*)为本室选育和保藏(CCTCC No: M200016)。

1.2 培养基和培养方法

种子培养基: LB培养基(g/L): NaCl 10, 蛋白胨 10, 酵母抽提物 5。发酵培养基组成为: 淀粉、葡萄糖、黄豆饼粉、蛋白胨、MgSO₄·7H₂O、K₂HPO₄、FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O。

培养方法: 在 250 mL 锥形瓶中装 20 mL 培养基, 接种量为 4%(V/V), 培养温度为 30 ℃, 摇床转速为 200 r/min, 菌种培养 12 h 接种发酵培养基, 培养至大部分孢晶释放终止发酵。

1.3 Cry1 和 Cry2 含量测定

SDS-PAGE 测定 Cry1 和 Cry2 含量的方法参考文献[13]进行。

1.4 生物测定

棉铃虫虫卵由武汉病毒所养虫室提供, 测定方法参照行业标准。LC₅₀值计算由DPS数据处理系统完成。

1.5 发酵实验设计和统计分析

营养条件的优化需要选择合适的实验设计方法。Plackett-Burman 设计法^[14]是一种两水平实验设计方法, 它能用最少实验次数, 从众多考察因素中快速有效地筛选出主要影响因子, 因此被广泛地用于因子主效应的估计中。最速上升法是沿着响应有最大增量方向逐步改变试验因子, 以快速找到响应的最优点区域。响应曲面法^[15](Response Surface Methodology, RSM)是数学方法和统计学方法结合的产物, 用于对响应变量受多个因子影响的问题进行建模和分析, 以优化响应变量, 因此, 它可快速有效地确定生物过程的最佳条件, 该法已被广泛用于微生物发酵培养基优化实践中。

本发酵实验分为 3 步, 首先通过 Plackett-Burman 扫描设计筛选对 Cry1 和 Cry2 产量有重要影响的营养因子, 然后利用最速上升实验找到重要因子的最优区域, 最后通过中心组合设计(Central Composite Design, CCD)和响应面分析找到 ICPs 产量的最优点。所有实验设计矩阵生成和结果的统计分析由 Statistica 6.0 统计软件辅助完成。所有实验独立重复 3 次, 取平均值进行分析。

2 结果与分析

2.1 营养因子对 Cry1 和 Cry2 毒素形成的影响

以Cry1和Cry2的产量(即Y_{Cry1}和Y_{Cry2}, mg/mL发酵液, 下同)为响应变量, 根据本室原优化配方^[16]和预实验结果, 选定 8 个营养因子进行考察, 因子编码及其水平见表 1, 实验安排及结果见表 2。

利用 Statistica 6.0 软件的实验设计(DOE)模块对表 2 的数据进行分析, 获得各营养因子对 Cry1 和 Cry2 晶体蛋白产量影响的评估图(图 1, 图 2)。图上

表 1 Plackett-Burman 实验因子水平及编码			
Table 1 Level and code of factors chosen for Plackett-Burman design			
Factor(g/L)	Symbol	Coded levels	
		-1	1
Starch	X ₁	10	12.5
Glucose	X ₂	8	10
Soybean powder	X ₃	20	25
Peptone	X ₄	0	2.5
K ₂ HPO ₄	X ₅	2	2.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	X ₆	0.02	0.03
MnSO ₄ ·H ₂ O	X ₇	0.04	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	X ₈	0.2	0.25

数据说明在 8 个被考察的营养因子中, 对Cry1 晶体蛋白产量有显著性影响的营养因子为黄豆饼粉和

MnSO₄·H₂O, 而对Cry2 的产量无显著影响。氮源是细胞组成物质的重要来源, 碳氮比例对晶体形成有重要影响^[13], 下一步应减少黄豆饼粉含量使碳氮比例最佳, 以提高杀虫蛋白产量。Mn²⁺和Fe²⁺是Bt所需要的无机盐成分, 无机盐主要参与细胞结构组成、能量转移、物质代谢、调节胶体状态和细胞透性^[17], 它们浓度过低或过高都不利于晶体蛋白形成。

实验结果说明各营养成分对 Bt4.0718 产生 Cry1 和 Cry2 毒素的影响大小和方向是不一致的(图 1, 图 2), 由于 Cry2 的产量在本配方中不受显著影响, 因此, 进一步的优化应选择 Cry1 产量最大化方向进行, 以使发酵结果最优。

表 2 Plackett-Burman 实验设计及结果										
Table 2 Design and experimental results of the Plackett-Burman experiment										
Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y _{Cry1} (mg/mL)	Y _{Cry2} (mg/mL)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.04	0.19
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.30	0.20
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.11	0.19
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.04	0.15
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.26	0.15
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0.10	0.15
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	0.03	0.13
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0.03	0.16
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.26	0.15
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.23	0.12
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.19	0.11
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.26	0.14

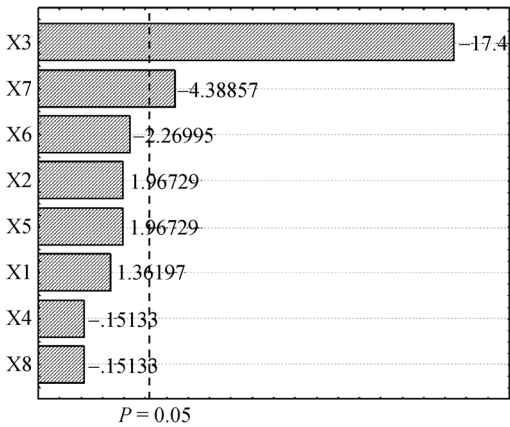


图 1 营养因子对Cry1 晶体蛋白产量Y_{Cry1}影响的评估
Fig. 1 Effect estimate of nutrition factors on Cry1 ICP yield: Y_{Cry1}

注: 图上数字代表对应因子作用大小, 正负号分别代表正效应和负效应, 超过 $P=0.05$ 所示虚线为显著性水平 0.05 下的显著性因子
Note: The numbers on figures represent the strength of effect of corresponding factors, positive and negative sign represent positive and negative effect respectively, the significant factors($P<0.05$) are those which pass the dotted line labelled with $P=0.05$

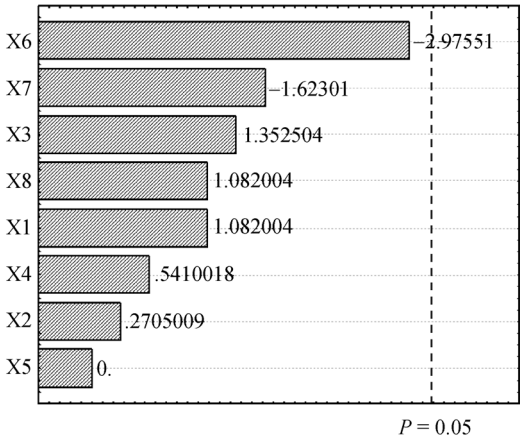


图 2 营养因子对Cry2 晶体蛋白产量Y_{Cry2}影响的评估
Fig. 2 Effect estimate of nutrition factors on Cry2 ICP yield: Y_{Cry2}

2.2 最速上升实验逼近 Cry1 毒素产量最优区

由图 1 知, 黄豆饼粉和 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 对Cry1 的形成有显著负效应, 所以最速上升实验应沿着黄豆饼粉和 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 浓度递减的方向进行, X_3 含量(g/L)从20开始以2为步长值递减到6, X_7 含量(g/L)从0.04开始以 0.005 为步长值递减到 0.005, 其他营养因子的水平固定为 $X_1=12$, $X_2=10$, $X_4=2.5$, $X_5=2.5$, $X_6=0.02$, $X_8=0.25$ (g/L)。实验结果(表 3)表明, 在黄豆饼粉 12 g/L, $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 为 0.02g/L附近区域 Y_{Cry1} 有最优值。

表 3 最速上升实验设计和Cry1 产量 Y_{Cry1} Table 3 The steepest ascent experiment and the yield of Cry1			
Run	Soybean powder(g/L)	$\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	Y_{Cry1} (mg/mL)
1	20	0.040	0.16
2	18	0.035	0.18
3	16	0.030	0.18
4	14	0.025	0.22
5	12	0.020	0.30
6	10	0.015	0.30
7	8	0.010	0.18
8	6	0.005	0.10

2.3 响应面法最优化 Cry1 毒素产量

根据最速上升试验结果(表 3), 对黄豆饼粉和 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 进行中心组合实验, 中心点、高低水平及星号臂的值见表 4。其他营养因子的水平维持为 (g/L): $X_1=12$, $X_2=10$, $X_4=2.5$, $X_5=2.5$, $X_6=0.02$, $X_8=0.25$ 。实验安排及结果见表 5。

对实验数据(表 5)进行回归分析, 得拟合二次经验模型为: $Y_{\text{Cry1}} = 0.314 - 0.016553 \times X_3 + 0.006857 \times X_7 - 0.14825 \times X_3 \times X_3 - 0.0075 \times X_3 \times X_7 - 0.05075 \times X_7 \times X_7$ 。模型决定系数 $R^2 = 93.18\%$, 模型方差分析 P 值为 0.0006, 说明模型与实际拟合较好且回归极显著。根据回归方程作出响应曲面图(图 3), 由图知响应变量 Y_{Cry1} 在中心点位置处存在极大值, 对回归方程求极值, 得 $X_3 = 11.48529$, $X_7 = 0.02$ 时 Y_{Cry1} 有最大值 0.314, 经 6 批次验证发酵, Cry1 平均产量为 $0.32 \text{ mg/mL} \pm 0.025 \text{ mg/mL}$, 说明此经验模型可靠, 可应用于生产预报。

表 4 中心组合设计实验因素水平及其编码表 Table 4 Level and code of factors for CCD						
Factor (g/L)	Sym-bol	Coded levels				
		-1.414	-1	0	1	1.414
Soybean powder	X_3	3.514	6	12	18	20.485
$\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	X_7	0	0.005	0.02	0.035	0.041

表 5 中心组合设计及Cry1 产量 Y_{Cry1} Table 5 CCD matrix of the factors and the yield of Cry1			
Run	X_3	X_7	Y_{Cry1} (mg/mL)
1	-1	-1	0.11
2	-1	1	0.11
3	1	-1	0.08
4	1	1	0.05
5	-1.414	0	0.06
6	1.414	0	0.03
7	0	-1.414	0.21
8	0	1.414	0.27
9	0	0	0.29
10	0	0	0.28
11	0	0	0.32
12	0	0	0.36
13	0	0	0.32

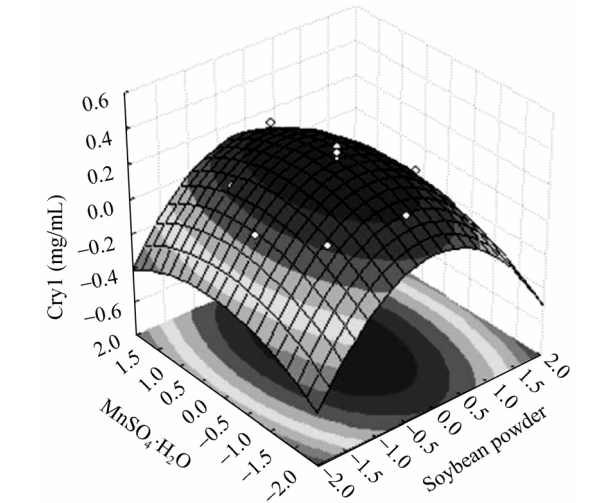


图 3 黄豆饼粉和 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 交互影响 Cry1 产量的响应曲面图
Fig. 3 Response surface plot showing the mutual effect of soybean powder and $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ on the yield of Cry1 when the other variables are held at zero level

2.4 优化后 Cry 毒素产量和毒力显著提高

本优化培养基与原优化培养基^[16]的Cry1 和Cry2 产量以及它们对棉铃虫的生测结果(表 6)说明, 经本实验优化后培养基固形物含量降低了, 而Cry1 和Cry2 产量分别提高了 2 倍多, 对棉铃虫 LC_{50} 值约为原来的 1/3, 毒力得到显著提高。原优化培养基是在单因子实验基础上, 以孢子数和致死率为指标, 通过正交设计实验优化获得。由于是初步优化并且考察因子多, 因子水平范围设置较大, 如豆饼粉为 10 g/L、25 g/L、40 g/L, 这可能导致未找到最优水平。本实验以Bt4.0718 主要活性产物Cry1 和Cry2 原毒素为考察指标, 综合利用各种实验设计方法, 优化了Cry1 和Cry2 的最佳营养条件, 在降低生产

表 6 优化前后 Cry1 和 Cry2 产量以及对棉铃虫的毒力
Table 6 The contrast of yields of Cry1 and Cry2 and the toxicity to *Helicoverpa armigera* between the control and optimal medium

Medium	Total solid of medium (g/L)	Y _{Cry1} (mg/mL)	Y _{Cry2} (mg/mL)	LC ₅₀ (μL/mL)	95% Confidence limits		Slope
					Lower	Upper	
Control medium	47.02	0.10	0.03	3.10	2.48	4.10	2.0±0.25
Optimal medium	38.79	0.32	0.11	1.09	0.92	1.30	1.94±0.19

成本的同时提高了发酵水平。

3 结论和讨论

以本室选育的能产多种 ICPs 高毒力突变株 Bt4.0718 为发酵菌株,考察了营养因子对其Cry1 和 Cry2 类毒素形成的影响,发现Cry2 在该配方中不受显著影响,黄豆饼粉和MnSO₄·H₂O对Cry1 产量有显著影响。

通过响应面优化法得到黄豆饼粉和MnSO₄·H₂O 的最佳浓度为 11.5 g/L和 0.02 g/L,使Cry1 和Cry2 产量分别达到 0.32 mg/mL和 0.11 mg/mL,对棉铃虫初孵幼虫半致死剂量(LC₅₀)为 1.09 μL/mL,优化后毒素产量和毒力显著提高。

在工业发酵中,培养密度一般达到了9%~10%^[18],本优化培养基的固形物含量仅为 3.88%,因此,以此优化配方为基础,通过补料分批高密度发酵,可将发酵水平进一步提高。

本研究结果也预示着一种生产Bt制剂的新方式:即通过发酵条件改变来调控Bt多种有效成分按预期产生,实现根据不同目标害虫生产出特异的杀虫制剂,达到提高杀虫效果和节约成本的目的。要实现该设想,需要从系统生物学的角度阐明营养因子等参数与菌体代谢及ICPs基因表达之间的关系,需要采用代谢工程、分子生物学及蛋白质组学等方法进行系统的研究^[19]。

参 考 文 献

[1] 丁学知,夏立秋. 苏云金杆菌高毒力菌株 4.0718 的快速选育. 中国生物防治, 2001, 17(4): 163-166.
[2] Sun Y, Wei W, Ding X, *et al.* Detection of chromosomally located and plasmid-borne genes on 20 kb DNA fragments in parasporal crystals from *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol*, 2007, 188(4): 327-332.
[3] Xia L, Sun Y, Ding X, *et al.* Identification of cry-type genes on 20-kb DNA associated with Cry1 crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol*, 2005, 51(1): 53-8.
[4] 丁学知,刘全兰,莫湘涛,等. 苏云金芽孢杆菌 4.0718 菌株的杀虫晶体蛋白基因分析. 微生物学报, 2003, 43(3): 413-417.
[5] 宋 晟,夏立秋,黄江丽,等. 苏云金杆菌 4.078 菌株

杀虫晶体蛋白的双向电泳-飞行时间质谱分析. 微生物学报, 2005, 45(3): 465-469.
[6] 夏立秋,孙运军,莫湘涛,等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白与 DNA 分子的相互作用. 微生物学报, 2003, 43(1): 127.
[7] Gajendra Babu B, Udayasuriyan V, Asia Mariam M, *et al.* Comparative toxicity of Cry1Ac and Cry2Aa δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (H.). *Crop Protection*, 2002, 21(9): 817-822.
[8] Pearson D, Ward OP. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnology Letters*, 1988, 10(7): 451-456.
[9] Bhattacharya PR. Hyper-production of insecticidal crystal protein (delta-endotoxin) by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is not related to sporulation-specific biochemical functions. *Curr Microbiol*, 2000, 41(3): 187-91.
[10] Sarrafzadeh MH, Guiraud JP, Lagneau C, *et al.* Growth, sporulation, delta-endotoxins synthesis, and toxicity during culture of *Bacillus thuringiensis* H14. *Curr Microbiol*, 2005, 51(2): 75-81.
[11] 陈中义,李丽华,张 杰,等. 双价苏云金芽孢杆菌 cry 基因载体构建及其在大肠杆菌中表达杀虫活性. 农业生物技术学报, 2002, 10(03): 272-277.
[12] 丁之铨,张 杰,宋福平,等. 双价杀虫蛋白基因在荧光假单胞菌中的表达及增效. 微生物学报, 2000, 40(6): 573-578.
[13] Farrera RR, Pérez-Guevara F, de la Torre M. Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 45(6): 758-765.
[14] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件. 国外医药. 抗生素分册, 1999, 20(02): 58-61.
[15] 蒙哥马利 DC 著,汪仁官等译. 实验设计与分析. 第三版. 北京: 中国统计出版社, 1998, pp.591-641.
[16] 丁学知,夏立秋,高必达. 苏云金杆菌 4.0718 高毒力杀虫菌株发酵条件的研究. 食品与发酵工业, 2003, 29(2): 26-29.
[17] 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990, pp.65-67.
[18] 陈在偲,吴继星,张志刚,等. 我国苏云金杆菌液体深层发酵研究十年进展(1990-2000). 中国生物防治, 2002, 18(1): 33-35.
[19] 张嗣良,储 炬,庄英萍,等. 鸟苷发酵过程的多尺度问题研究. 生物加工过程, 2004, 2(3): 23-29.