

球孢白僵菌 Bb III22 固态发酵条件的优化

邓小军, 周国英*, 刘君昂, 闫瑞坤, 陈春林, 杨枝林

(中南林业科技大学 林业生物技术湖南省重点实验室 湖南 长沙 410004)

摘要: 对球孢白僵菌 Bb III22 固态发酵条件进行优化, 选用单因素实验确定最佳基质配方及玉米粉含量、含水量、接种量、发酵温度、发酵时间的范围。采用 Box-Behnken 实验设计和响应面分析方法, 对球孢白僵菌 Bb III22 固态发酵条件进行优化, 得出最佳固态发酵条件为: 玉米粉 8.22 g/L, 水分 38%, 接种量 10.5%, 发酵温度 25.7 °C, 在此条件下球孢白僵菌 Bb III22 的产孢量达到了 10.578×10^9 个/g, 为优化前的 3 倍。

关键词: 固态发酵; 球孢白僵菌; 响应面分析

中图分类号: S476+.12 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)06-1228-08

Optimization of Solid-state Fermentation Conditions for *Beauveria bassiana* Bb III22

DENG Xiao-jun, ZHOU Guo-ying*, LIU Jun-ang,
YAN Rui-kun, CHEN Chun-lin, YANG Zhi-lin

(Hu'nan Provincial Key Laboratory of Forestry Biotechnology, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: The fermentation conditions for *Beauveria bassiana* Bb III22 were optimized. At first, the optimal matrix formula, corn flour concentration, water content, inoculation, fermentation temperature and fermentation time were determined by single factor experiments. By using Box-Behnken experimental design and response surface analytical methodology the optimum fermentation conditions were obtained: Corn flour 8.22 g/L, water content 38%, inoculation 10.5%, temperature 25.7 °C. Under these conditions, the sporulation of Bb III22 was 10.578×10^9 in per gram being increased by 2 times compared with that before optimization.

Key words: solid-state fermentation; *Beauveria bassiana*; response surface design methodology

球孢白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.] 作为森林生态系统重要的害虫天敌生物资源, 在我国被广泛应用于防控多种农林害虫, 其无公害不杀伤天敌及可贵的传染能力始终吸引着人们, 具广阔的应用前景^[1-5]。近年来世界各国已有 50 多种真菌杀虫剂登记注册, 其中有近 20 种来自白僵菌^[6-7]。

白僵菌生产用制剂主要有粉剂和液剂, 粉剂是常用剂型, 由于有关白僵菌液体制剂的生产存在一些问题, 如产孢量甚少等, 直接影响着白僵菌液体制剂的应用。我国早在 20 世纪 50 年代就开始了最初的白僵菌深层发酵研究, 尚无现代化程度很高的工业化固态方式生产, 而在当前真菌杀虫剂的生产中, 液固双相发酵法即种子阶段是液体发酵大规模培养是开放式固态发酵, 由于经济实用、易于操作和生产效率高而被广泛采用^[7-8]。白僵菌应用防治农林害虫具有应用范围广, 对人畜安全、无残毒、不杀伤天敌

收稿日期: 2011-09-20 修回日期: 2011-09-30

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201004003)

作者简介: 邓小军(1988—) 男, 硕士生, 主要从事林业应用微生物研究, E-mail: dengxiaojun2008@sina.com; * 通讯

作者: 周国英, 教授, 博士, E-mail: gyzhou2118@yahoo.com.cn。

等优点。随着害虫对化学农药的抗性日益增强和人们对环境保护认识日益深刻,白僵菌产品的需求量将不断上升,这就需要筛选出成本低、原料来源广、产孢量高的培养基材料,便于工厂化生产^[9-11]。

单纯以玉米渣、小米、麦麸为原料的三级固体培养,成本高、产孢量低,而且造成大量原料营养组分的浪费。为此本研究本着就地取材,寻找经济实用、来源广的配方,按不同比例进行三级固体培养料的配方试验,从中筛选出理想的固态发酵基质配合比例,并以 Box-Behnken 分析法优化其固态发酵条件,为白僵菌的大规模工业化生产提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试菌株为林业生物技术湖南省重点实验室选育的球孢白僵菌 Bb III 22 菌株。

一级平板菌种培养基: PDA 培养基,马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,无菌水 1 000 mL。二级液体摇瓶培养基: $\varphi = 10\%$ 麦麸浸出液,蛋白胨 1 g,酵母浸出粉 1 g,葡萄糖 4 g, K_2HPO_4 0.1 g, $MgSO_4$ 0.1 g, KCl 0.1 g, 无菌水 200 mL。三级固体培养料见表 1。

表 1 三级固体培养料配方及比例
Tab.1 Proportion of solid compost

编号 Number	配方及比例 Compost and proportion	料质量/g Weight	加水量/% Water content
A	谷糠	50	40
B	$m(\text{麦麸}) : m(\text{谷糠}) : m(\text{红壤}) = 2 : 4 : 4$	50	40
C	$m(\text{麦麸}) : m(\text{谷糠}) : m(\text{红壤}) = 1 : 3 : 6$	50	40
D	$m(\text{麦麸}) : m(\text{谷糠}) : m(\text{红壤}) = 3 : 3 : 4$	50	40
E	$m(\text{谷糠}) : m(\text{锯末}) : m(\text{红壤}) = 2 : 4 : 4$	50	40
F	$m(\text{谷糠}) : m(\text{红壤}) = 4 : 6$	50	40
G	$m(\text{谷糠}) : m(\text{麦麸}) = 4 : 6$	50	40

1.2 试验方法

1.2.1 二级菌种的培养 配制需要量的液体培养基,分装于 250 mL 三角瓶中,每瓶 50 mL,取斜面菌种,每支用 40 mL 灭菌水冲洗制得孢子液,每瓶液体培养基接 10 μ L 孢子悬浮液。于摇床上 170 r/min, 25 $^{\circ}$ C 条件下培养 96 h。

1.2.2 固态培养料的配制 配制好固态培养料,各瓶装入量疏松度和高度一致,以便保持相同的通气量。报纸封口 4 层后放入高压灭菌锅 121 $^{\circ}$ C 灭菌 30 min,设 3 个重复。

1.2.3 单因素实验 (1) 最佳配方的确定。取 5 个三角瓶,按照表 1 配方配置发酵培养基 50 g,加入适量玉米粉补充其氮源,加水 40%,以 10% 的接种量转入到 250 mL 罐头瓶中,置于 25 $^{\circ}$ C 恒温培养 9 d,发酵完成后,测定其产孢量,设置 3 个重复。(2) 最佳玉米粉添加浓度的确定。取 5 个三角瓶,以上述步骤中产孢量最高的配方作为发酵培养基,按照玉米粉添加量 5, 10, 15, 20, 25 g/L 分别补充氮源,后续操作相同。(3) 最佳含水量的确定。取 5 个三角瓶,根据上述步骤确定的最佳发酵培养基配方和最佳玉米粉添加浓度,分别加水 35%、40%、45%、50%、55%,后续操作相同。(4) 最佳接种量的确定。取 5 个三角瓶,根据上述步骤确定的最佳发酵培养基配方、最佳玉米粉添加浓度和最佳含水量,分别以 10%、15%、20%、25%、30% 的接种量转入 250 mL 罐头瓶中,后续操作相同。(5) 最佳发酵温度的确定。取 5 个三角瓶,根据上述步骤确定的最佳发酵培养基配方、最佳玉米粉添加浓度、最佳含水量和最佳接种量转入 250 mL 罐头瓶中,分别置于 23, 24, 25, 26, 27 $^{\circ}$ C 恒温培养,后续操作相同。(6) 最佳发酵时间的确定。取 5 个三角瓶,根据上述步骤确定的最佳发酵培养基配方、最佳玉米粉添加量、最佳含水量和最佳接种量转入 250 mL 罐头瓶中,置于步骤(5)确定的最佳温度下恒温培养,分别培养 6, 7, 8, 9, 10 d 后测定其产孢量。

1.2.4 响应面实验设计 根据单因素实验结果,确定响应面实验的因素与水平(表 2),进行 Box-Behnken 实验设计和响应面分析,以产孢量为实验考察目标,最终确定球孢白僵菌 Bb III 22 的最佳固态发酵条件。

表2 响应面实验因素与水平

Tab.2 Factors and levels of response surface experiment

水平 Levels	因素 Factors			
	A 玉米粉/(g·L ⁻¹) Corn flour	B 水分/% Water content	C 接种量/% Inoculum ratio	D 发酵温度/℃ Temperature
-1	5	30	5	23
0	10	40	15	25
1	15	50	25	27

1.2.5 检测方法 (1) 孢子含量的测定。用 1/1 000 电子天平每种称取 5 g 菌粉 放入 250 mL 的三角瓶 加入 150 mL 体积分数为 0.1% 吐温-80 中 ,用磁力搅拌器搅拌 然后逐步稀释 用血球计数板测定孢子含量。(2) 活孢率的测定。将待测孢子粉用体积分数为 0.1% 吐温-80 配制成悬浮液 镜检稀释至每个视野有 20~30 个孢子 在每个单凹载玻片上滴 40 μL ,25 °C 保湿培养 48 h 镜检萌发孢子数计算萌发率 其标准为可见芽管长度等于或者大于孢子直径。

1.3 实验设计与数据处理

应用 Design-Expert 8 进行实验设计 数据应用 DPS 数据处理系统进行统计分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 固体配方筛选试验 由表 3 可见 ,从整体上看 ,B、D、E 3 种配方产孢量较高 ,其产孢量分别为 1.367×10^9 个/g 2.634×10^9 个/g 1.163×10^9 个/g。其中 D 配方麦麸与谷糠糠混合加入适量红壤 ,产孢量最高 这与它的营养料充足且具有较好的透气性有关。C 配方中麦麸谷糠的浓度过低 ,营养物质不足 产孢量明显低于其他配方。A、F 类配方没添加麦麸 红壤与谷糠中的营养物质不足或者营养成分太单调 没有足够的 C 源、N 源和其它微量元素 ,所以没有菌丝生长 因此也就没有产生孢子。各配方的孢子萌发率都达 96% 以上无显著差异。

表3 发酵基质配方筛选实验

Tab.3 The filter of solid substrate fermentation

配方及比例 Compost and proportion	编号 Numbers	产孢量/($\times 10^9$ 个·g ⁻¹) Sporulation	活孢率/% Rate of spore survival
谷糠	A	—	—
m(麦麸):m(谷糠):m(红壤)=2:4:4	B	$1.367 \pm 0.101b$	$96.48 \pm 1.13a$
m(麦麸):m(谷糠):m(红壤)=1:3:6	C	$0.533 \pm 0.037c$	$98.33 \pm 0.08a$
m(麦麸):m(谷糠):m(红壤)=3:3:4	D	$2.634 \pm 0.081a$	$97.25 \pm 0.23a$
m(谷糠):m(锯末):m(红壤)=2:4:4	E	$1.163 \pm 0.042b$	$99.63 \pm 0.60a$
m(谷糠):m(红壤)=4:6	F	—	—
m(谷糠):m(麦麸)=4:6	G	$0.731 \pm 0.033c$	$98.50 \pm 0.81a$

表中同列数据后有不同字母者表示差异显著(P=0.01)。

Data in the table followed with different letters are significantly different at P=0.01.

2.1.2 玉米粉添加量对 Bb III22 产孢量的影响 以产孢量高的 D 配方作为发酵基质 ,调节玉米粉的添加量分别为 5 ,10 ,15 ,20 ,25 g/L 结果见图 1。当玉米粉添加量为 10 g/L 产孢量达到了 6.33×10^9 个/g 当添加量继续升高其产孢量变化不大但有一个缓慢的下降趋势 这可能是由于玉米粉添加量过高引起培养基酸碱的变化或者使培养基的疏松度下降而不适合菌株生长。故选取玉米粉的最佳添加量为 10 g/L。

2.1.3 不同含水量对 Bb III22 产孢量的影响 白僵菌固态发酵时基质内水分的含量决定了微生物对营养成分的利用情况 因此含水量对白僵菌的生长和产孢量至关重要。在培养基内添加不同水分发酵结果(图 2): 利于球孢白僵菌产孢丰富的最佳含水量为 40% 左右 水分过高产孢量反而下降这可能水分

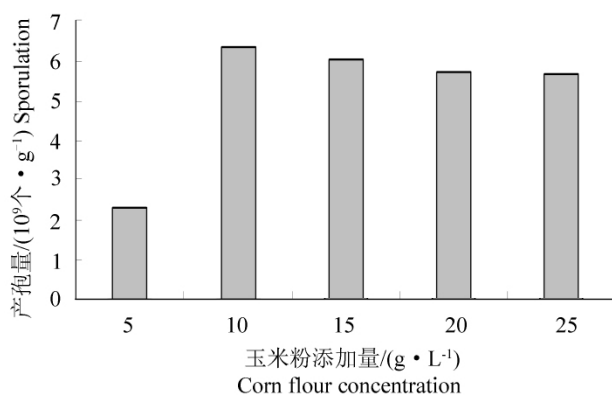


图1 玉米粉浓度对 Bb III 22 产孢量的影响

Fig. 1 Effect of corn flour concentration on sporulation of Bb III 22

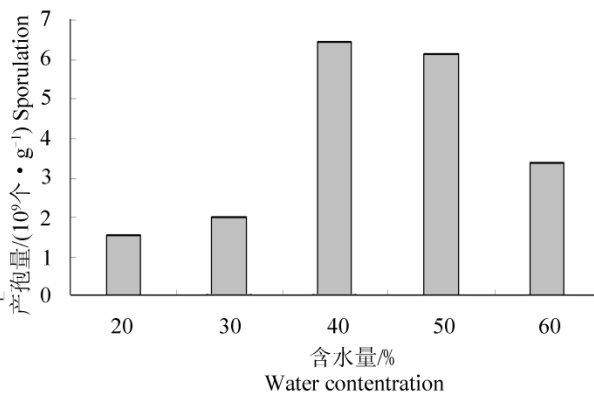


图2 含水量对 Bb III 22 产孢量的影响

Fig. 2 Effect of water concentration on sporulation of Bb III 22

太多造成透气性下降不利于菌丝体的生长。因此选择 40% 作为培养基适宜的基质含水量。

2.1.4 不同接种量对 Bb III 22 产孢量的影响 不同接种量对 Bb III 22 产孢量的影响的实验结果(图 3): 液体接种量和产孢量不呈直线相关从总体来看趋于平稳,接种量以固体培养料的 15% 为佳,产孢量为 7.28×10^9 个/g,高于其他接种量。这可能有两点原因:一是接种量少,无法满足生长要求;接种量太多孢子密度太大,也会影响孢子的萌发生长。因此选择 15% 作为最佳接种量。

2.1.5 发酵温度对 Bb III 22 产孢量的影响 在玉米粉添加量为 10 g/L,水分含量为 40%,接种量为 15% 条件下,按不同温度发酵,时间结果见图 4。发酵温度低于 23 °C 时产孢量极低,发酵温度高于 27 °C 时产孢量也不理想,发酵温度过低白僵菌生长代谢缓慢,过高则可能是其部分酶活降低产孢量降低。白僵菌产孢量丰富的最佳发酵温度为 25 °C。

2.1.6 发酵时间对 Bb III 22 产孢量的影响 在玉米粉添加量为 10 g/L,水分含量为 40%,接种量为 15%,发酵温度 25 °C 条件下,发酵不同时间,实验结果见图 5。发酵时间为 9 d 或以上产孢量明显高于其他处理,而当发酵时间超过 9 d 时产孢量开始下降。可能原因是发酵时间不足菌体不能充分产孢,因而产孢量不理想,而超过 9 d 产孢量差异不明显但延长了发酵周期,故选择 9 d 作为最佳发酵时间。

2.2 响应面实验结果与分析

Box-Behnken 法是响应面分析法中常用的设计方法之一,可以用较少的实验数量和时间对实验进行全面研究,通过对几个响应过程变量进行数学建模和分析来定向优化相应因子。在单因素实验结果的基础上,进行 Box-Behnken 实验设计,响应面实验结果见表 4,利用 Design-Expert 8 对表 4 中数据进行多元回归分析,得到 Bb III 22 固态发酵产孢量与玉米粉添加量、水分含量、接种量及发酵温度的二次多项回归方程为:

$$Y = 9.80 - 0.37A + 0.49B - 0.22C + 1.08D + 0.16AB + 2.12AC + 1.15AD + 2.50BC + 0.035BD - 1.35CD - 1.29A^2 - 1.70B^2 - 2.08C^2 - 1.79D^2$$

对拟合所得方程进行显著性检验及方差分析,再对回归方程进行方差分析,结果见表 5,模型 $P_r < 0.0001$,说明模型在 $\alpha = 0.01$ 水平达到极显著;方程相关系数 $R^2 = 0.9125$ 说明该方程模型实验数据有 91.25% 的符合度,拟合程度良好,其校正系数 $R_{Adj}^2 = 0.8251$ 表明方程模型具有很高的可信度,仅有

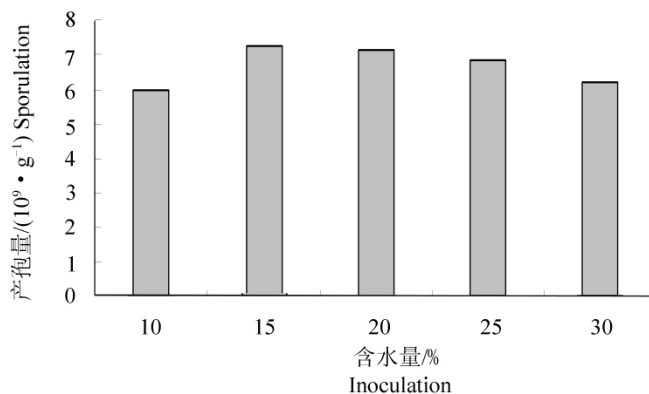


图3 接种量浓度对 Bb III 22 产孢量的影响

Fig. 3 Effect of inoculation on sporulation of Bb III 22

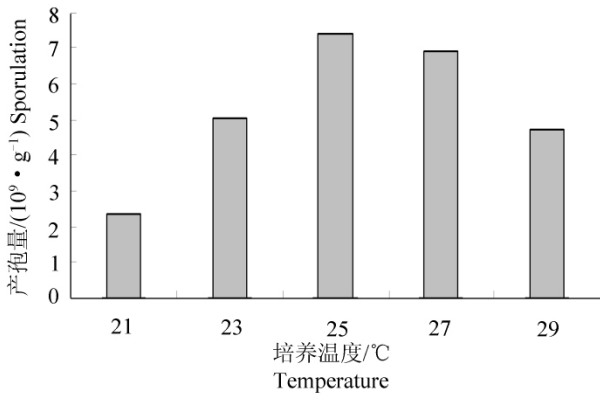


图4 发酵温度对 Bb III22 产孢量的影响

Fig.4 Effect of fermentation temperature on sporulation of Bb III22

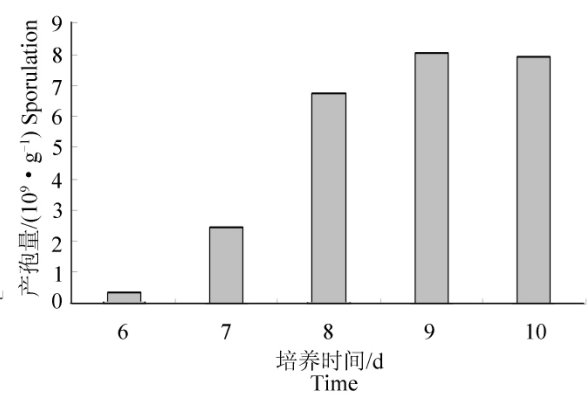


图5 发酵时间对 Bb III22 产孢量的影响

Fig.5 Effect of fermentation time on sporulation of Bb III22

表4 响应面实验设计和结果

Tab.4 Design and results of response surface experiments

编号 Number	A 玉米粉/(g·L ⁻¹) Corn flour	B 水分/% Water content	C 接种量/% Inoculum ratio	D 发酵温度/°C Temperature	Y 产孢量/(×10 ⁹ 个·g ⁻¹) Sporulation
1	-1	0	0	1	7.56
2	0	1	0	-1	5.51
3	-1	0	-1	0	8.82
4	0	0	-1	-1	3.85
5	1	0	-1	0	4.81
6	0	0	-1	1	7.43
7	0	0	0	0	9.69
8	-1	-1	0	0	6.77
9	1	-1	0	0	4.68
10	0	0	0	0	9.93
11	-1	1	0	0	7.16
12	0	0	0	0	9.84
13	0	0	0	0	9.78
14	-1	0	1	0	4.28
15	0	1	-1	0	4.55
16	0	-1	0	-1	4.27
17	0	0	1	-1	5.68
18	0	-1	-1	0	8.62
19	0	1	0	1	8.88
20	-1	0	0	-1	7.56
21	0	0	1	1	3.85
22	0	0	0	0	9.77
23	1	1	0	0	5.73
24	0	1	1	0	9.43
25	1	0	0	1	9.17
26	1	0	0	-1	4.57
27	0	-1	1	0	3.49
28	0	-1	0	1	7.5
29	1	0	1	0	8.73

17.49%的总变异不能由该模型进行解释。由表5可以看出,在实验水平范围内($P < 0.05$)显著的因素为一次项D,交互项AC、AD、BC和CD及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 和 D^2 。

表 5 回归方程模型方差分析
Tab. 5 ANOVA of quadratic polynomial model

来源 Source	平方和 Sum of squares	df	均方 Mean square	F 值 F Value	P 值 Prob > F	显著性 Significance
模型 Model	126.06	14	9.004 3	10.432 8	<0.000 1	**
A 玉米粉	1.657 6	1	1.657 6	1.920 6	0.187 5	
B 水分	2.930 4	1	2.930 4	3.395 3	0.086 7	
C 接种量	0.572 0	1	0.572 0	0.6628	0.429 2	
D 发酵温度	13.975 2	1	13.975 2	16.192 3	0.001 3	**
AB	0.108 9	1	0.108 9	0.126 2	0.7277	
AC	17.892 9	1	17.892 9	20.731 5	0.000 5	**
AD	5.290 0	1	5.29	6.129 2	0.026 7*	
BC	25.050 0	1	25.050 0	29.024 0	< 0.000 1	**
BD	0.004 9	1	0.004 9	0.005 7	0.941 0	
CD	7.317 0	1	7.317 0	8.477 8	0.011 4	*
A ²	10.824 9	1	10.824 9	12.542 1	0.003 3	**
B ²	18.703 7	1	18.703 7	21.670 9	0.000 4	**
C ²	28.045 1	1	28.045 1	32.494 3	<0.000 1	**
D ²	20.855 0	1	20.855 0	24.163 5	0.000 2	**
残差 Residual	12.083 1	14	0.863 1			
失拟 Lack of fit	12.051 2	10	1.205 1	151.207 3	0.000 1	**
纯误差 Pure error	0.031 9	4	0.008 0			
总和 Cor total	138.143 1	28				

$R^2 = 0.912 5$ $R_{Adj}^2 = 0.825 1$, * 为显著 ($P < 0.05$), ** 为极显著 ($P < 0.01$)。

* Significant at 0.05 level, ** significant at 0.01 level.

利用 Design-Expert 8 做出响应面等高线图(图 6), 每个响应面等高线图分别代表两个独立变量间的相互作用, 此时其他因素保持中心水平。由交互影响的响应面等高线图可看出, A、B、C、D 存在极值点, 对回归方程取一阶偏导数, 可以得到曲面的最大点, 即 4 个因子最优试验点(A、B、C、D)的编码值(-0.354、-0.191、-0.447、0.344) 即玉米粉 8.22%、水分 38.09%、接种量 10.53%、发酵温度 25.69 °C, 产孢量最高预测值为 10.817×10^9 个/g。为了便于生产控制取玉米粉浓度 8.22%、水分 38%、接种量 10.5%、发酵温度 25.7 °C。

2.3 验证试验

为检验响应面分析法可靠性, 在优化条件下进行 5 组固态发酵试验, 所得白僵菌发酵基质含孢量分别为 10.43×10^9 个/g、 10.48×10^9 个/g、 11.33×10^9 个/g、 10.26×10^9 个/g、 10.39×10^9 个/g, 平均产孢量为 10.578×10^9 个/g, 与模型预测值 10.817×10^9 个/g 非常接近, 表明该模型能很好的反应实际发酵情况。

3 结 论

对球孢白僵菌 Bb III 22 的固态发酵条件进行了研究, 单因素确定了最佳固态发酵基质为配方 D 配方 $m(\text{麦麸}) : m(\text{谷糠}) : m(\text{红壤}) = 3 : 3 : 4$, 并在配方 D 发酵基质上确定了玉米粉添加浓度、含水量、接种量及发酵温度为影响白僵菌产孢量的显著因素, 确定了其范围分别为 (5 ~ 15) g/L、30% ~ 50%、15% ~ 25% 和 (23 ~ 27) °C。

在单因素实验基础上, 采用 Box-Behnken 实验设计和响应面分析方法, 对球孢白僵菌 Bb III 22 固态发酵条件进行优化, 得出其产孢量丰富的最佳固态发酵条件为: 玉米粉添加量 8 g/L, 水分 38%, 接种量

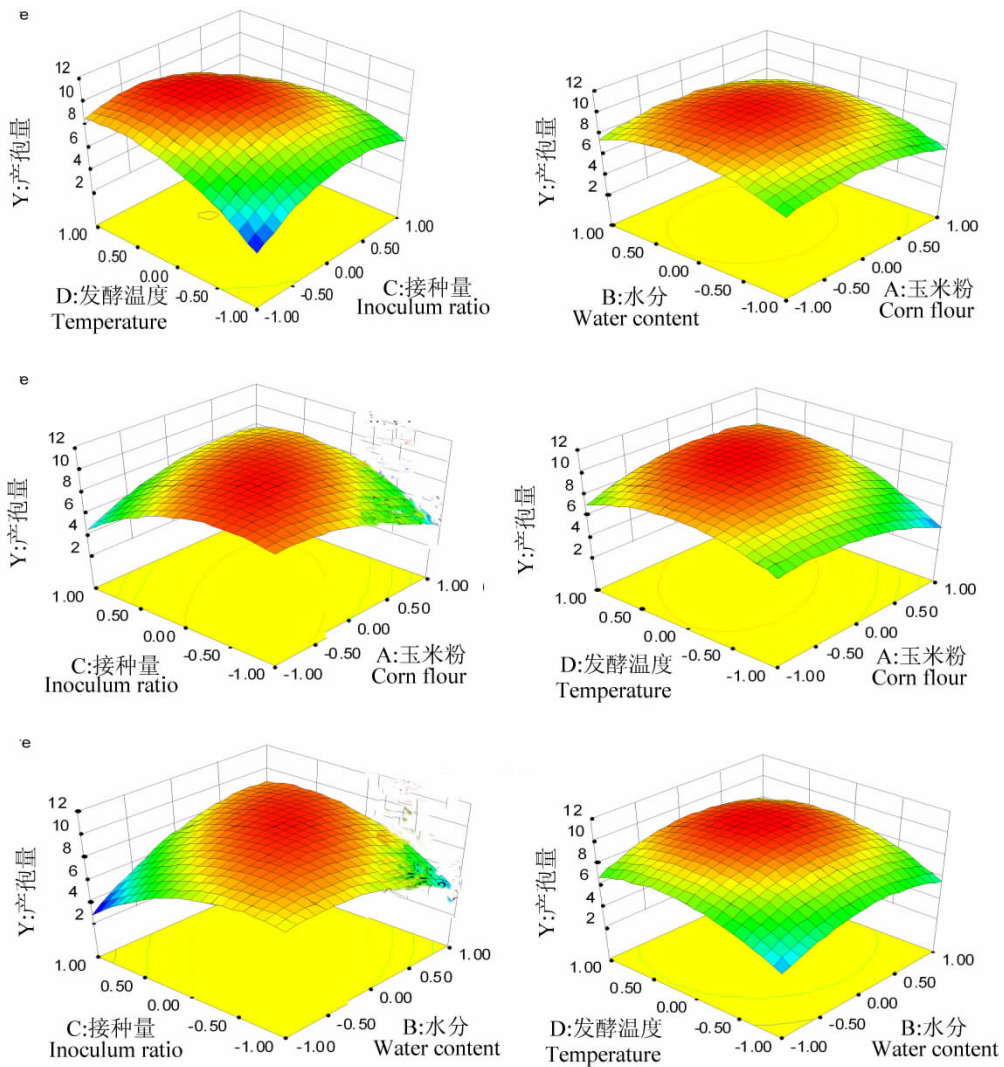


图 6 两因素交互影响孢子产量的响应面和等高线

Fig. 6 Response surface and contour map of spore output of two factors interaction

10.5% ,发酵温度 25.7 ℃ ,在最佳发酵条件下产孢量达到 10.578×10^9 个/g ,较优化前(2.634 ± 0.081) $\times 10^9$ 个/g 提高了 2 倍效果显著。

单纯的以谷糠或谷糠与麦麸的混合物为培养基质不能获得较高产孢量 ,以谷糠、麦麸及红壤组合成固态发酵基质 ,可增强培养基质营养及透气性 ,并且可以降低成本 ,扩大培养来源 ,增强白僵菌的产孢能力。麦麸、谷糠和红壤的混合物产孢量最高 ,达到充分利用了基质营养增加产孢量的目的 ,指标符合以麦麸和谷糠混合物为基础的固相发酵工艺所产孢子粉的生产企业标准。这种方法的产量显著高于谢翎等^[13] 研究利用大米发酵生产白僵菌的产量 4.16×10^9 个/g ,而且基质便宜经济实用 ,操作简便易用 ,同样高于其他同类型发酵基质的产量^[14-16] ,具有一定的推广应用价值。

参考文献:

[1]Castrillo L A , Vandenberg J D ,Wraight S P. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers [J]. Journal of Invertebrate Pathology 2003 82(2) : 77-80.

[2]李旻 ,王四宝 樊美珍 等. 森林生态系中球孢白僵菌遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 遗传 2006 28(8) : 977-983.

[3]Fan Yan-hua ,Fang Wei-guo ,Xiao Yue-hua. Directed evolution for increased chitinase activity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology ,2007 76(1) : 67-73.

[4]Fernandes éKK ,Bittencourt VREP. Entomopathogenic fungi against South American tick species [J]. Experimental and Applied Acarology ,2008 46(1/4) : 71-93.

- [5]李茂业,林华峰,刘苏,等. 提高布氏白僵菌产孢量的培养基及培养条件研究[J]. 生物技术通报, 2009(S1): 380-383.
- [6]程国华,舒静,丁克坚. 球孢白僵菌营养需求及培件研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(5): 365-368.
- [7]农向群,涂雄兵,张泽华,等. 绿僵菌 R8-4 菌株大量培养固相阶段的条件[J]. 中国生物防治, 2007, 23(3): 228-232.
- [8]孙明,任巧云,关贵全,等. 对蜂致病性球孢白僵菌培养条件的优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1022-1030.
- [9]Zhi W B, Deng Q Y, Song J G et al. One-step purification of α -amylase from the cultivation supernatant of recombinant *Bacillus subtilis* by high-speed counter-current chromatography with aqueous polymer two-phase systems[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1070(1-2): 215-219.
- [10]Socolovschi C, Doudier B, Pages F, et al. Ticks and human tick-borne diseases in Africa[J]. Médecine Tropicale, 2008, 68(2): 119-133.
- [11]Zhan J X, Burns A M, Liu M X. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum* [J]. Journal of Natural Products, 2007, 70: 227-232.
- [12]唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 488-491.
- [13]谢翎,陈红梅,樊美珍,等. 利用大米固态发酵生产球孢白僵菌的工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2007, 238: 85-88.
- [14]胡加付,李农昌,樊美珍,等. 白僵菌固态发酵试验研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32: 20-25.
- [15]Kang S W, Lee S H, Yoon C S et al. Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamond-back moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor[J]. Biotechnol Lett, 2005, 27: 135-139.
- [16]张丽靖. 球孢白僵菌孢子粉生产、制剂和贮存技术的改进及其淀粉酶特性测定[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.

(上接第 1205 页)

后再经细胞核移植就能获得转基因克隆小鼠。本研究采用脂质体法分别转染了 UHS-2S-pIRES2-EGFP 并通过筛选获得的最佳 G418 浓度(图 5)进行了筛选,其结果,获得转基因阳性细胞(图 7),PCR 检测显示,在小鼠成纤维细胞基因组中整合有 UHS-2S-pIRES2-EGFP(图 8)。采用该细胞通过体细胞核移植能否获得被毛中表达拖丝蛋白的转基因鼠有待于探讨。

参考文献:

- [1]Tirrell D A. Putting a new spin on spider silk[J]. Science, 1996, 271: 39-40.
- [2]王春生,原璐,罗芳,等. 拟蜘蛛拖丝蛋白基因人工合成及其原核表达[J]. 四川动物, 2010, 29(2): 184-188.
- [3]李昊,王春生,宁方勇,等. 小鼠超高硫角蛋白基因启动子的克隆及其表达活性分析[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(6): 471-474.
- [4]薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 128-472.
- [5]Xu M, Lewis R V. Structure of a protein super fiber: spider dragline silk[J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87: 7120-7124.
- [6]Scheller J, Guhrs K H, Grosse F, et al. Production of spider silk proteins in tobacco and potato[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19: 573-577.
- [7]Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, et al. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49(1): 31-38.
- [8]田保中,汪生鹏,王建南,等. 类蜘蛛丝素蛋白 SPF198 在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 蚕业科学, 2006, 32(2): 276-279.
- [9]Rima Menassa, Hong Zhu, Costas N. et al. Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: Accumulation and field production[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2: 431-438.
- [10]Palmiter R D, Norstedt G, Gelinias R E et al. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice[J]. Science, 1983, 222: 809-814.
- [11]Wang Xiaoming, Zinkel Sandra, Polonsky Kenneth, et al. Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: Prospects for gene therapy[J]. PNAS, 1997, 94(1): 219-226.
- [12]Pelletier J, Flynn M E, Kaplan G et al. Mutational analysis of upstream AUG codons of poliovirus RNA[J]. J Virol, 1988, 62(12): 4486-4492.
- [13]Wakayama T, Perry A C F, Zuccott M et al. Full-term development of mice fromenucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. Nature, 1998, 394: 369-374.
- [14]Oktay Kirak, Eva-Maria Frickel, Gijbert M Grotenbreg et al. Transnuclear mice with predefined T cell receptor specificities against *Toxoplasma gondii* obtained via SCNT[J]. Science, 2010, 328(5975): 243-248.