

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.01.022

张逍遥, 郭超, 王靖楠, 等. 常压室温等离子体诱变选育丁烯基多杀菌素高产菌株及培养基优化[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(1): 174-181.
ZHANG X Y, GUO C, WANG J N, et al. Breeding of butenyl-spinosyns producing strain by Atmospheric Room Temperature Plasma and optimization of culture medium[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(1): 174-181.

常压室温等离子体诱变选育丁烯基多杀菌素高产菌株及培养基优化

张逍遥^{1,2}, 郭超¹, 王靖楠¹, 刘艳丽², 王超¹✉

- (1. 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037;
2. 北京城市学院 MCMM 中心, 北京 100083)

摘要: 以 ASAGF 2-G4 为出发菌株, 进行常压室温等离子体与 2 mg/mL 亚硝基胍的复合诱变选育。结合 96 孔板发酵培养进行了初筛及摇瓶复筛后, 共得到高产突变菌株 5 株, 经复筛验证获得 1 株高产且稳定遗传菌株 2-A9, 其比出发菌株产量提高 30.92%。利用 Plackett-Burman 实验设计筛选发酵培养基中的影响因素, 得到葡萄糖、糊精、棉籽蛋白、玉米浆干粉为显著因素。利用 Box-Behnken 响应面实验设计优化 4 种影响因素, 获得最优培养基配方为 (g/L): 葡萄糖 60.0、糊精 25.0、棉籽蛋白 25.0、玉米浆干粉 12.5、脲化牛奶 10.0、MgSO₄ 1.0、NaCl 2.0、CaCO₃ 5.0。经重复实验验证后, 丁烯基多杀菌素平均产量与预测产量接近, 表明该模型可行有效。

关键词: 丁烯基多杀菌素; 常压室温等离子体; 亚硝基胍; 诱变; 培养基优化

中图分类号: S482.3+9 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2022)01-0174-08

Breeding of Butenyl-spinosyns Producing Strain by Atmospheric Room Temperature Plasma and Optimization of Culture Medium

ZHANG Xiao-yao^{1,2}, GUO Chao¹, WANG Jing-nan¹, LIU Yan-li², WANG Chao¹✉

- (1. Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China;
2. MCMM Center, Beijing City University, Beijing 100083, China)

Abstract: The original strain ASAGF 2-G4 was applied to undergo Atmospheric Room Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis of various doses and 2 mg/mL NTG compound mutagenesis of different action durations. Five high-yield mutant strains were obtained after preliminary screening through 96-orifice-plate fermentation and re-screening in shake flasks. At last, a high-yielding mutant strain 2-A9 was selected, which increased the yield by 30.92% compared with the original strain after genetic stability verification. A high-yield mutant ASAGF 2-A9 was applied as the starting strain, the experiment design Plackett-Burman was used to screen the factors affecting the fermentation media, with a conclusion that factor glucose, dextrin, cottonseed protein

收稿日期: 2021-10-18

基金项目: 粮油食品储藏运输环节危害物综合防控技术研究 (2017YFC1600604); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (JY2021)

Supported by: National key research and development program of China (NO.2017YFC1600604); The basic scientific research funds programs in national non-profit scientific research institutes (NO.JY2021).

作者简介: 张逍遥, 女, 1996 年出生, 在读研究生, 研究方向为中药学。E-mail: ilybye1007@163.com.

通讯作者: 王超, 男, 1981 年出生, 博士, 副研究员, 研究方向为微生物活性物质研发与应用。E-mail: wc@ags.ac.cn.

and corn starch is a significant factor affecting butenyl-spinosyns. The experimental design Box-Behnken was applied to optimize the factors significantly affecting the experiment Plackett-Burman. The optimal growing media components were deduced as follows (g/L): glucose 60.0, dextrin 25.0, cottonseed protein 25.0, coen steep dry powder 12.5, peptone milk 10.0, MgSO₄ 1.0, NaCl 2.0, CaCO₃ 5.0. It's verified that the average output of butenyl-spinosyns is close to the predicted value, indicating that the model is feasible and effective.

Key words: butenyl-spinosyns; ARTP; NTG; mutagenesis; medium optimization

储粮害虫为害是威胁我国粮食安全的因素之一, 害虫的爆发不仅会造成粮食损失, 它们的排泄物、尸体等还会使粮食发霉变质, 甚至产生人体有害的物质。因此我国储粮防治迫切需要新型、绿色、安全和高效的防治技术。

丁烯基多杀菌素 (butenyl-spinosyns) 是好氧型菌须糖多孢菌 (*Saccharopolyspora pogona*) 的次级代谢产物, 由糖苷配基和两侧糖基 (侧链糖基一般为鼠李糖基团和福乐糖胺基团) 构成的一种大环内酯类抗生素。其与美国陶氏益农公司上市的多杀菌素 (spinosyns) 结构相似且杀虫机制相同, 对多杀菌素难以控制的鳞翅目中烟青虫、苹果小卷叶蛾等, 鞘翅目中的马铃薯甲虫及半翅目中的苹果蠹蛾能有效毒杀, 是一种具有潜在应用价值的新一代多杀菌素类生物杀虫剂。

郭超^[1]等从 162 份土壤样品中, 分离得到 15 000 余株放线菌建立放线菌库, 利用蚊子幼虫生物测定法筛选产多杀菌素及其结构类似物, 获得 1 株产丁烯基多杀菌素的菌株, 并完成了 16 s RNA 鉴定、全基因组序列测定、理化诱变等研究工作。但从环境中筛选得到的野生型菌株存在着生长缓慢、生物量较低、发酵过程调控难等缺点, 导致菌株性能达不到工业化生产和应用需求。因此采用适当的选育手段筛选高产突变株并对其发酵工艺进行优化, 提高其发酵能力成为目前研究的重点。

常压室温等离子体 (Atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 诱变育种仪以氦气作为工作气体, 在大气压的作用下产生高浓度活性粒子的等离子体射流^[2], 使 DNA 单链或者双链发生断裂, 造成 DNA 损伤, 进而诱发细胞启动应急修复机制, 引起微生物突变^[3]。ARTP 诱变技术极大程度地加快了微生物诱变育种的进程, 在菌

种改良及微生物合成能力等方面有广泛应用。田萍萍等^[4]对阿维菌素进行 ARTP 诱变筛选, 结果证实 ARTP 技术能显著提高代谢产物产量。

由于培养基中的碳源对菌丝体生长及次生代谢产物合成有着重要作用。对发酵培养基的碳、氮源进行优化, 是提高丁烯基多杀菌素产量最行之有效的方法。借助响应曲面分析方法可通过较少的实验次数获得最优工艺参数, 从而有效的确定最优培养基配方。陈爽^[5]对发酵培养基中葡萄糖、可溶性淀粉、糊精和甘露醇复合搭配, 优化后使丁烯基多杀菌素产量提高 52.1%。夏立秋团队^[6]对 11 种常见碳源进行代谢途径分析, 以 5 g/L 的甘露糖作为单一碳源添加时, 显著提高了丁烯基多杀菌素产量 1.78 倍。这可能是因为甘露糖除能产生乙酰-CoA 外, 还能转化 GDP-D-rhamnose, 而鼠李糖正是形成细胞壁和丁烯基多杀菌素的重要前体。

目前国内外对于丁烯基多杀菌素高产菌株选育和发酵调控方面的研究较少, 但其结构类似物多杀菌素在菌株诱变选育^[7-9]、分子生物学改造^[10-12]、发酵培养基优化^[13-15]等方面的研究较为深入, 相信借鉴其研究经验对于丁烯基多杀菌素的提产具有重要意义。本文以 ASAGF 2-G4 作为研究对象, 对该菌株进行 ARTP 和 NTG 复合理化诱变选育, 筛选出稳定遗传且高产的突变菌株, 对其发酵培养基配方优化, 以期进一步提高丁烯基多杀菌素产量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 出发菌株

ASAGF 2-G4 由国家粮食和物资储备局科学研究院筛选和保藏。

1.1.2 培养基的配制和培养方法

(1) 固体产孢培养基 (g/L): 葡萄糖 4.0, 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 10.0, CaCO_3 2.0, 琼脂 20.0, pH7.2。(2) 摇瓶培养基 S2 及 96 孔板种子培养基 (g/L): 葡萄糖 10.0, FM888 30.0, 脲化牛奶 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0, KH_2PO_4 0.5, pH7.2。(3) 摇瓶及 96 孔板发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 10.0, 糊精 20.0, 玉米浆干粉 10.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 脲化牛奶 10.0, 棉籽蛋白 20.0, CaCO_3 5.0, NaCl 2.0, pH7.2。以上培养基均在 115 °C, 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

棉籽蛋白、玉米浆干粉: 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; FM888: 安琪酵母股份有限公司; 其他试剂: 国药集团化学试剂北京有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 制备孢子悬液

取培养成熟的新鲜菌种斜面, 加入 20 mL 0.02% 无菌葡萄糖溶液冲洗斜面, 将表面的孢子刮下后置于含 15~20 颗玻璃珠的无菌三角瓶中, 置于恒温恒湿摇床, 设置摇床转速为 160 r/min, 温度为 28 °C 培养 8~12 h, 孢子悬液浓度一般控制在约 10^8 个/mL。

1.2.2 ARTP 诱变

实验前预先将一定数量载片灭菌, 置于酒精灯外焰灼烧 30 s, 冷却后取 10 μL 孢子液均匀涂于载片。以氦气作为等离子体的工作气体, 以 ASAGF 2-G4 为出发菌株, 在电源功率 100 W, 照射距离 2 mm, 等离子体温度 <30 °C, 气流量 10 L/min 的条件下, 分别将孢子悬液处理进行等离子体照射 0、30、60、90、120、150、180、210、240、270、300 s。

1.2.3 NTG 诱变

配制 10 mg/mL 的 NTG 母液。取萌发好的孢子悬浮液于离心管中, 使诱变终浓度为 2 mg/mL。将孢子悬液分别处理 10、20、30、40、50、60 min, 14 000 r/min 离心 10 min 收集孢子, 无菌水重复洗涤三次。处理后的溶液移入饱和硫代硫酸钠溶液中。

1.2.4 稀释涂布

将经诱变处理的孢子悬液进行 10^{-2} ~ 10^{-6} 稀释, 取 100 μL 稀释液涂布于预先倒置好的平面培养基上, 于 30 °C 培养, 每日观察菌落的生长速度和菌落形态, 并拍摄特殊形态的菌落。

1.2.5 96 孔板高通量发酵培养

将 96 孔板的种子培养基和发酵培养基在无菌条件下, 使用美国 RAININ BenchSmart 96 半自动移液系统分装至 96 深孔板中, 装液量 600 μL 。用无菌牙签挑取生长速度快、形态特殊的单菌落于 96 孔板中, 盖上配套的三明治盖, 在恒温恒湿摇床上设置 240 r/min, 30 °C 进行 96 孔板种子培养, 培养 65 h 后转接二级种子液, 培养 48 h 后转接发酵摇瓶培养 9~10 d。

1.2.6 丁烯基多杀菌素测定法

向 96 孔板发酵液中, 加入 2 倍体积甲醇浸提丁烯基多杀菌素, 充分振荡后, 4 °C 静置过夜。以 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1 mL 至新的离心管管内, 以 10 000 r/min, 离心 10 min 后进行 HPLC 检测。分析条件为: 安捷伦 C18 反相柱; 流动相为 $V_{\text{乙腈}} : V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 45 : 45 : 10$ (含 0.05% 乙酸铵); 进样量设置 10 μL ; 流速设置 1.0 mL/min; 检测波长为 244 nm。根据积分面积, 计算产量。

1.2.7 丁烯基多杀菌素产量性状遗传稳定性实验

将获得的高产菌株连续划斜面试管进行摇瓶验证, 转接 3~4 次, 利用 HPLC 测丁烯基多杀菌素发酵产量, 转接几代后产量变化幅度不大的则认为遗传稳定性较好。

1.2.8 Plackett-Burman 实验设计

设计 PB 实验, 从发酵培养基中快速筛选出显著因素, 筛选设计了影响因素主要是葡萄糖、糊精、棉籽蛋白、玉米浆干粉、 MgSO_4 、脲化牛奶、 NaCl 和 CaCO_3 , 考察影响丁烯基多杀菌素含量的主导因素及交互作用, 筛选出主要因素。Plackett-Burman 实验各因素水平见表 1。

1.2.9 Box-Behnken 响应面设计优化

根据 Plackett-Burman 实验所得的回归方程系数与筛选到的影响显著因素, 确定响应面设计的考察因素与中心点。

表 1 Plackett-Burman 实验因素水平

Table 1 The factors and level of the Plackett-Burman design g/L

因素	编码	-1	0	+1
葡萄糖	A	60	80	100
糊精	B	15	20	25
玉米浆干粉	C	7.5	10	12.5
棉籽蛋白	D	15	20	25
MgSO ₄	E	0.75	1	1.25
脲化牛奶	F	7.5	10	12.5
NaCl	G	1.5	2	2.5
CaCO ₃	H	3.75	5	6.25

1.3 数据分析

数据处理采用 Origin 8.0、SPSS 22.0、Excel 等软件进行分析。在系统误差允许存在的情况下，当突变菌株丁烯基多杀菌素产量与出发菌株产量的比值不低于 110% 时，则菌株表现为正突变；当比值不高于 90% 时，则菌株表现为负突变；当比值介于两者之间时，则表示菌株未突变。

突变率 = 正突变率 + 负突变率；致死率 (%) = (未经诱变的总单菌落数 - 诱变后的总单菌落数) / 未经诱变的总菌落数 × 100%；丁烯基多杀菌素产量 (μg/mL) = (组分 A + 组分 D) / 8065.4032 × 稀释倍数；丁烯基多杀菌素相对产量 = 平均值 ± 标准偏差。

2 结果与分析

2.1 ARTP 与 NTG 复合诱变对 ASAGF 2-G4 的作用

2.1.1 ARTP 诱变时间对 ASAGF 2-G4 的影响

由图 1 可知，随着等离子体照射时间的不断延长，致死率逐渐增加，且致死效果非常显著，ARTP 处理 90 s 时，致死率已达到 98% 以上。对 2-G4 的突变率进行分析发现（如图 2），整体的正突变率趋势为逐渐升高，而负突变率则是随着诱变时间的延长不断减小，在 300 s 等离子体照射剂量下，筛选到的正突变菌株最多，当诱变时间高于 20 min 时没有正突变菌株出现。

2.1.2 ARTP 与 NTG 复合诱变对 2-G4 的影响

由图 3 可知，ARTP 和 NTG 复合诱变对 2-G4 的致死效应明显，当 2 mg/mL 的 NTG 处理 10 min 时 2-G4 的致死率已高达 98%。对 2-G4 的突变率进行分析发现（如图 4），在 10 min 和 20 min 诱变时间下，筛选到的正突变菌株较多。

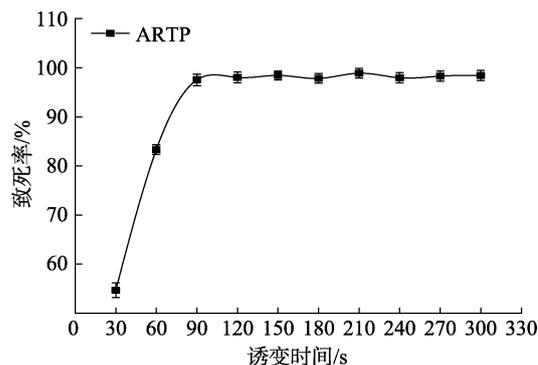


图 1 ARTP 对菌株 2-G4 诱变的致死率曲线

Fig. 1 The lethal rate of different time by ARTP on strain 2-G4

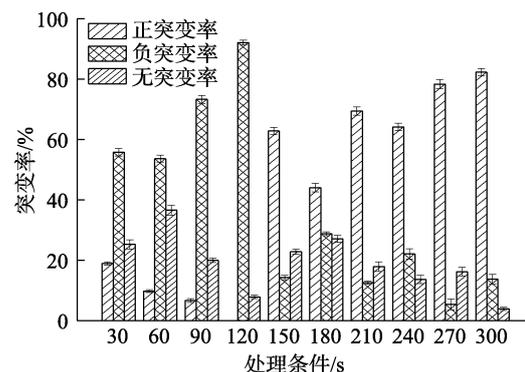


图 2 不同剂量 ARTP 对 2-G4 突变率的影响

Fig. 2 Mutation rate of 2-G4 when the strain was treated by ARTP radiation in different time

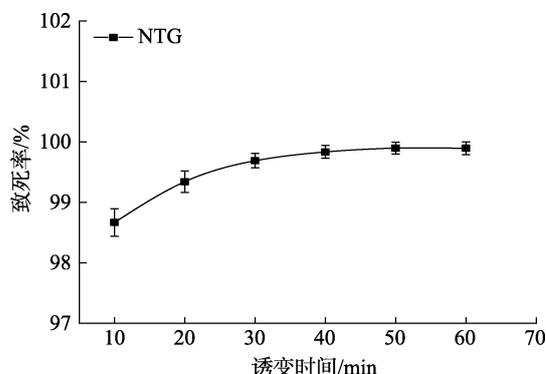


图 3 ARTP 与 NTG 复合诱变对菌株 2-G4 的致死率曲线

Fig. 3 The lethal rate of different time by ARTP and NTG compound on strain 2-G4

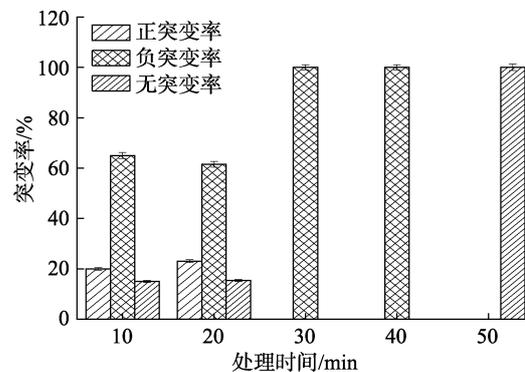


图 4 不同时间 ARTP 对 2-G4 突变率的影响

Fig. 4 Mutation rate of 2-G4 when the strain was treated by ARTP and NTG compound radiation in different time

2.1.3 高产突变株代谢曲线的考察

本研究以 2-G4 为出发菌株进行 ARTP 和 NTG 复合诱变, 挑取 870 余单菌落进行发酵培养, 经过摇瓶初筛和复筛, 丁烯基多杀菌素高产菌株编号及产量如表 2 所示。突变株在传代中可能出现表型延迟现象, 因此, 对 5 株高产菌株进行了遗传稳定性验证, 如图 5 所示。突变菌株 2-A9 经过 3 次转接传代后, 丁烯基多杀菌素相对产量分别降低了 10.03%、8.05%, 第 4 次转接产量较第 3 次提高了 0.68%; 与转接 1 次相比, 突变株 5-H12 转接 2、3、4 次分别降低了 35.29%、30.43%、12.51%, 产量变化幅度较大, 表明其遗传稳定性较差。其余菌株与 2-A9 菌株相比产量较低。ASAGF 2-G4 菌株经 ARTP 诱变处理 60 s 后筛选出 1 株发酵产量较高, 且稳定遗传的突变菌株 2-A9, 比出发菌株提高 30.92%。

表 2 高产突变株的丁烯基多杀菌素产量
Table 2 The butenyl-spinosyns production of the high yield mutant strain by shake flask culture %

菌株	复筛后丁烯基多杀菌素相对产量
2-A9	130.64±1.09
3-D10	116.65±1.82
5-H2	127.56±6.06
5-H12	141.04±0.86
7-A9	126.40±1.16

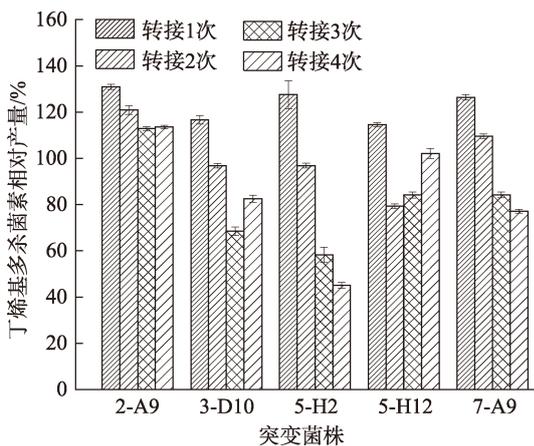


图 5 突变株的遗传稳定性验证
Fig. 5 The genetic stability of mutants

2.2 发酵培养基优化对 ASAGF 2-G4 的作用

2.2.1 Plackett-Burman 实验设计

利用 Design-Expert 软件进行优化处理, 结果如表 3 和表 4 所示。模型 F 值为 12.608 8, 模型极显著 ($P < 0.01$) 表明该模型具有重要意义,

$R^2_{Adj} = 0.885 573$, 说明该实验数据较好的用于模型解释。产量影响因素依次为 $A > D > C > B > F > E > H > G$, 其中 A、D 对产量影响极显著 ($P < 0.01$), B、C 对产量影响显著 ($P < 0.05$), 脲化牛奶对产量的影响接近显著水平。获得一次多元线性编码方程: $21.35 - 1.65A + 0.75B + 1.04C + 1.20D - 0.40E - 0.63F - 0.07G - 0.32H$ 。

表 3 Plackett Burman 实验设计结果
Table 3 Plackett-Burman experiment design and response values

组别	A	B	C	D	E	F	G	H	相对产量/%
1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	101.28±1.14
2	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	93.32±2.45
3	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	94.42±2.81
4	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	100.09±2.36
5	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	94.60±0.62
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	+1	118.47±3.66
7	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00±1.06
8	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	71.68±1.53
9	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	81.35±2.12
10	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	96.66±2.42
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	82.01±0.29
12	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	92.52±0.35
13	1	1	1	1	1	1	1	1	92.48±0.85

表 4 Plackett-Burman 实验设计方差分析
Table 4 Analysis of variance of Plackett-Burman design

来源	偏差平方和	自由度	F-值	P-值>F	显著性
模型	77.943 525	8	12.608 8	0.013 5	*
A	32.747 416	1	42.379 8	0.002 9	*
B	6.772 111	1	8.764 1	0.041 5	*
C	13.058 705	1	16.899 8	0.014 7	*
D	17.422 313	1	22.547 0	0.009 0	*
E	1.861 902	1	2.409 6	0.195 5	-
F	4.782 159	1	6.188 8	0.067 6	-
G	0.065 034	1	0.084 2	0.786 2	-
H	1.233 885	1	1.596 8	0.275 0	-
残差	3.090 849	4			
总和	81.034 374	12			
R^2	0.961 858	R^2_{Adj}	0.885 573		

注: *表示 $P < 0.05$, 显著。
Note: * indicates $P < 0.05$, significant.

因此, 选取葡萄糖、糊精、棉籽蛋白和玉米浆干粉 4 个因素进行响应面设计。

2.2.2 响应面法优化发酵培养基

2.2.2.1 响应面优化及分析 根据生成的 3D 图, 如图 6 所示, 其最佳浓度分别为: 葡萄糖 60 g/L、糊精 25 g/L、棉籽蛋白 25 g/L 和玉米浆干粉

表 5 回归模型方差分析
Table 5 Variance analysis of regression model

来源	偏差平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	553.42	14	39.53	2.79	0.032 2	*
A-葡萄糖	9.01	1	9.01	0.637 0	0.438 1	-
B-糊精	62.65	1	62.65	4.43	0.053 9	-
C-棉籽蛋白	101.38	1	101.38	7.17	0.018 1	*
D-玉米浆干粉	11.25	1	11.25	0.795 2	0.387 6	-
AB	0.02	1	0.02	0.001 3	0.971 9	-
AC	4.95	1	4.95	0.349 9	0.563 6	-
AD	71.91	1	71.91	5.08	0.040 7	*
BC	105.78	1	105.78	7.48	0.016 1	*
BD	25.20	1	25.20	1.78	0.203 3	-
CD	41.60	1	41.60	2.94	0.108 4	-
A ²	3.06	1	3.06	0.216 4	0.648 9	-
B ²	70.98	1	70.98	5.02	0.041 9	*
C ²	3.92	1	3.92	0.276 8	0.607 0	-
D ²	19.07	1	19.07	1.35	0.265 1	-
残差	198.07	14	14.15			
失拟项	193.77	10	19.38			
净误差	4.32	4	1.08			
总和	751.50	28				
R ²	0.736 4					
R ² _{Adj}	0.472 8					

注: *表示 $p < 0.05$, 显著。

Note: * indicates $p < 0.05$, significant.

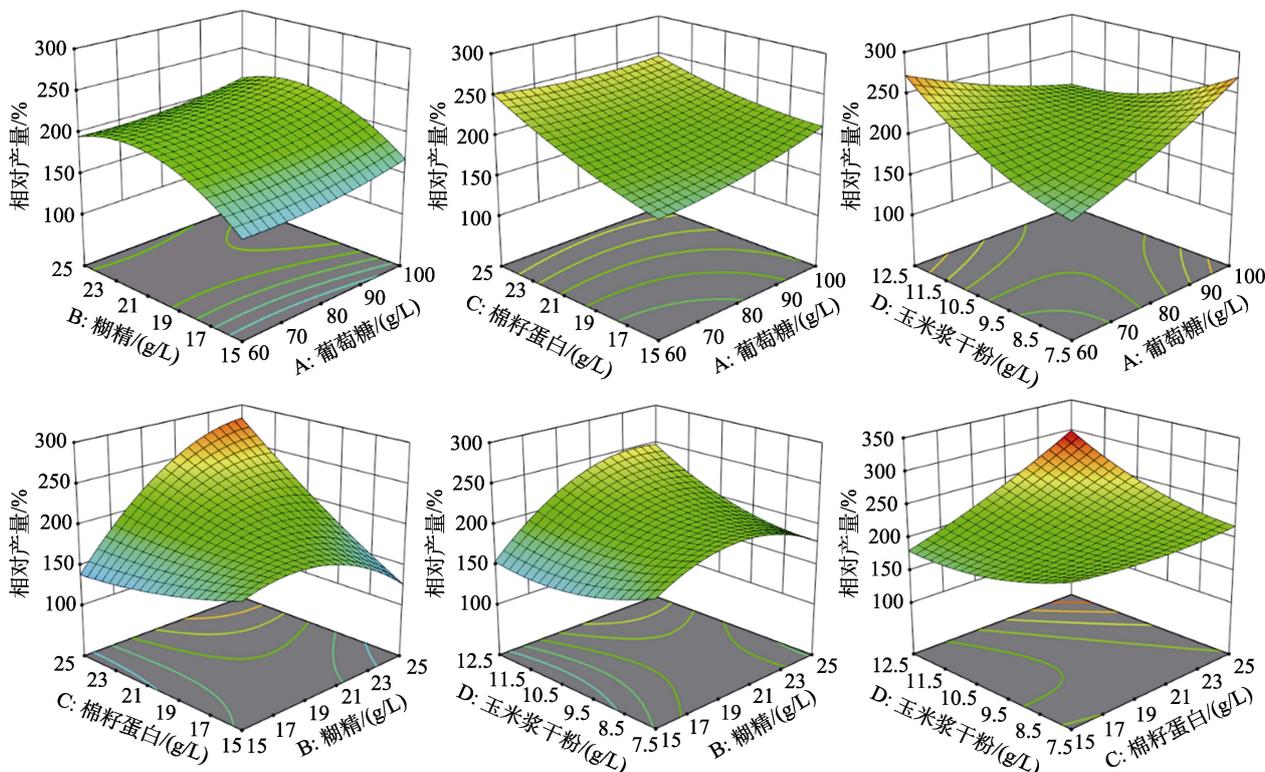


图 6 葡萄糖、糊精、玉米浆干粉、棉籽蛋白浓度交互作用对丁烯基多杀菌素产量影响的响应面

Fig. 6 Response surface plots of effects of interaction between of glucose、dextrin、corn steep solids and cottonseed protein content on the yield of butenyl-spinosyn

12.5 g/L, 预测得到丁烯基多杀菌素达最高值。

2.2.2.2 优化培养基的验证 为了确定实验结果的可靠性,对上述优化培养基进行重复实验验证,最终丁烯基多杀菌素平均产量与预测值接近,表明模型是可行有效的。

3 讨论

从环境中筛选得到的野生型菌株因目标物合成能力较差,达不到工业化生产需求。虽然有关须糖多孢菌的全基因组序列已完成解析,但丁烯基多杀菌素生物合成途径复杂且调控机制的研究较少,使得工程菌株的改造困难。通过常规诱变技术包括紫外(UV)诱变、NTG 诱变、⁶⁰Co-γ 诱变、ARTP 诱变等能够获得性能大幅提高的突变菌株。因此本研究采用 ARTP 和 NTG 复合诱变,并结合 96 孔板培养进行了初筛和摇瓶复筛,获得了产量较高且遗传稳定的 1 株突变菌株 2-A9 (ARTP 诱变时间 60 s),较出发菌株提高 30.92%。但常规的理化诱变技术存在着工作量大、筛选周期长等缺点,限制了其的应用。

种子是微生物发酵生产至关重要的一步,良好的培养条件是获得高产种子的关键。目前对于发酵条件优化最好的方式就是采用数理统计法,对发酵过程建立数学模型,通过适时调节发酵参数,实现对发酵过程的优化控制。目前常用方法包括:单因素实验法、响应面分析法、人工神经网络建模法等,徐瑶^[16]在单因素实验的基础上进行了 Plackett-Burman, 利用最陡爬坡及中心响应面方法最终确定了各个组分的最佳浓度,使得较原始培养基产量提高了 17.44%。本研究首先通过 Plackett-Burman 实验设计,分析了发酵培养基中影响显著的因素,结果表明葡萄糖、糊精、棉籽蛋白和玉米浆干粉为影响丁烯基多杀菌素发酵的显著因素,并利用响应面实验设计,以较少实验次数的 3D 图形更直观清楚地获得发酵培养基的最佳配比为(g/L):葡萄糖 60.0、糊精 25.0、棉籽蛋白 25.0、玉米浆干粉 12.5、酪化牛奶 10.0、MgSO₄ 1.0、NaCl 2.0 和 CaCO₃ 5.0。使得丁烯基多杀菌素产量得到提升。

碳源是培养基的重要组成部分,对菌丝体生长及次生代谢产物的生物合成有着重要作用,并

且碳源是构成菌体碳架材料与形成含氮产物的重要来源,发酵过程中对碳源的利用也会影响菌株对氮源的消耗。对发酵培养基的碳、氮源进行优化,是提高丁烯基多杀菌素产量最行之有效的办法。此外,适宜的外界环境也在一定程度上帮助次级代谢产物合成的提高。余龙江等^[17]将 10 天的发酵培养期按发酵特点不同分为四个阶段,分别采用不同浓度的溶氧量,使得同为好氧菌的刺糖多孢菌的代谢产物产量达 180 mg/L。发酵液的 pH 也在一定程度上影响微生物的生长与代谢。因此,陈纪龙^[18]和 Li^[19]等提出两阶段 pH 调控手段,使得发酵体系中的葡萄糖利用率增加且达到提产目的。植物油水解后会生成甘油以及短链脂肪酸,添加入培养基后不但可以缓解葡萄糖阻遏,还能够补充抗生素合成的前体物质,也可作为消泡剂。Huang 等^[20]在摇瓶中加入草莓籽油和山茶油,使多杀菌素产量提高了 80%以上。张瀚等^[21]在发酵 0 h 添加 15 g/L 的山茶油使菌株多杀菌素产量显著提升。

丁烯基多杀菌素生物合成受到多种因素影响,相信随着未来研究者的深入研究,丁烯基多杀菌素产生菌的合成能力可进一步提高。

参考文献:

- [1] 郭超, 赵晨, 黎琪, 等. 产丁烯基多杀菌素菌株的筛选及鉴定[J]. 粮油食品科技, 2019, 27(2): 55-60.
GUO C, ZHAO C, LI Q, et al. Screening and identification of the strain producing butenyl-spinosyns[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2019, 27(2): 55-60.
- [2] LU Y, WANG L, MA K, et al. Characteristics of hydrogen production of an enterobacter aerogenes mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (artp)[J]. Biochemical Engineering Journal, 2011, 55(1): 17-22.
- [3] 张雪, 吴亦楠, 马飞, 等. ARTP 诱变技术在食品和饲料加工生物催化剂改造中的应用进展[J]. 生物产业技术, 2019, 71(3): 13-24.
ZHANG X, WU Y N, MA F, et al. Application of ARTP mutagenesis in breeding of microbial biocatalysts for food and feed processing industry[J]. Biotechnology & Business, 2019, 71(3): 13-24.
- [4] 田萍萍, 曹鹏, 常传友, 等. 阿维菌素生产菌的常压室温等离子体诱变育种及培养基优化[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 150-160.
TIAN P P, CAO P, CHANG C Y, et al. Atmospheric and room temperature plasma breeding and medium optimization of avermectin producing strains[J]. Microbiology China, 2017,

- 44(1): 150-160.
- [5] 陈爽, 赵晨, 黎琪, 等. 丁烯基多杀菌素高产菌株的诱变选育及培养基优化[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 108-111.
CHEN S, ZHAO C, LI Q, et al. Mutation breeding and medium optimization of butenyl-spinosad producing strain[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(9): 108-111.
- [6] 何思颖, 柏丹, 夏伦, 等. 不同碳源对须糖多孢菌生长发育及丁烯基多杀菌素生物合成的影响[J]. 激光生物学报, 2019, 28(2): 136-143.
HE S Y, BAI D, XIA L, et al. Effects of different carbon sources on the growth development and butenyl-spinosyn biosynthesis of *saccharopolyspora pogona*[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2019, 28(2): 136-143.
- [7] 陈园. 多杀菌素高产菌株的诱变选育及快速筛选方法的研究[D]. 华南理工大学, 2013.
CHEN Y. Mutation breeding of spinosad high-producing strain and study of rapid screening method[D]. South China University of Technology, 2013.
- [8] 郭伟群, 邹球龙, 陈园, 等. 多杀菌素高产菌株的诱变选育及代谢曲线初步研究[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(4): 245-248.
GUO W Q, ZUO Q L, CHEN Y, et al. Screenig and breeding of high Spinosad producing strains and preliminary study on metabolism curve of mutation[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2014, 39(4): 245-248.
- [9] 王海霞, 陈园, 王超, 等. MPMS 诱变结合抗生素抗性选育多杀菌素高产菌株[J]. 粮油食品科技, 2017, 25(3): 82-86.
WANG H X, CHEN Y, WANG C, et al. Breeding of Spinosad high-producing strains through MPMS mutagenesis combined with antibiotics[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2017, 25(3): 82-86.
- [10] KUMAR J A, RAJ P A, KUMAR C A, et al. Metabolic engineering of rational screened *saccharopolyspora spinosa* for the enhancement of spinosyns A and D production[J]. Molecules and Cells, 2014, 37(10): 727-733.
- [11] 黄颖, 赵晨, 杨博磊, 等. 刺糖多孢菌高产菌株和野生型菌株多杀菌素生物合成基因簇(spn)在发酵过程中的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(11): 1337-1346.
HUANG Y, ZHAO C, YANG B L, et al. Expression analysis of spinosad biosynthetic gene cluster (spn) in hyperproducing and wild-type *saccharopolyspora spinosa* strains during fermentation [J]. Chinese journal of agricultural biotechnology, 2014, 22(11): 1337-1346.
- [12] WANG X Y, ZHANG C B, WANG M L, et al. Genome-scale metabolic network reconstruction of *saccharopolyspora spinosa* for spinosad production improvement[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 41.
- [13] YANG G, HE Y, JIANG Y, et al. A new medium for improving spinosad production by *saccharopolyspora spinosa*[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2016, 9(6): e16765.
- [14] 彭上. 刺糖多孢菌培养基成分优化和发酵条件研究[D]. 湖南师范大学, 2012.
PENG S. The optimization of fermentation medium and process of spinosad by *saccharopolyspora spinosa*[D]. Hunan Normal University, 2012.
- [15] 邹球龙, 郭伟群, 王超, 等. 多杀菌素补料发酵工艺的研究[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(3): 86-88.
ZUO Q L, GUO W Q, WANG C, et al. Study on the fed-batch fermentation process of spinosad[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2014, 22(3): 86-88.
- [16] 徐瑶. 基于常温常压等离子体(ARTP)诱变的阿维链霉菌工业菌株选育及发酵工艺优化[D]. 华东理工大学, 2019.
XU Y. Breeding of streptomycetes avermitilis based on artp mutagenesis and optimization of avermectins fermentation processes[D]. East China University of Science and Technology, 2019.
- [17] BAI Y, ZHOU P P, FAN P, et al. Four-stage dissolved oxygen strategy based on multi-scale analysis for improving Spinosad yield by *Saccharopolyspora spinosa* ATCC49460[J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(3): 561-568.
- [18] 陈纪龙, 朱莉, 高敏杰, 等. 一株耐受低 pH、高浓度硒菌株的筛选鉴定及两阶段 pH 调控高效除硒的研究[J]. 工业微生物, 2017, 47(3): 14-21.
CHEN J L, ZHU L, GAO M J, et al. Isolation and identification of a low-pH and selenium tolerant strain and research on efficient removal of selenium using two-stage pH control strategy[J]. Industrial Microbiology, 2017, 47(3): 14-21.
- [19] XIANG Y L, YE L, MING C, et al. Efficient production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* through integrating fed-batch culture with a two-stage pH control strategy[J]. Bioresource Technology, 2015, 181(4): 275-282.
- [20] YING H, XIAO L Z, CHEN Z, et al. Improvement of spinosad production upon utilization of oils and manipulation of β -oxidation in a high-producing *saccharopolyspora spinosa* strain[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2018, 28(2): 53-64.
- [21] 张瀚, 扶教龙, 张松, 等. 利用山茶油提高刺糖多孢菌 AEG3-1 发酵多杀菌素生产[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(1): 34-41.
ZHANG H, FU J L, ZHANG S, et al. Enhancement of spinosad production by *Saccharopolyspora spinosa* AEG3-1 using camellia oil[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2021, 46(1): 34-41. ㊞
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://llyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。