

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2019.03.007

低能等离子诱变选育杆菌肽高产菌株及发酵条件优化研究

张金峰^{1,2}, 文玥¹, 余宇², 柴小涛³, 任世英^{1,2}, 罗楚平^{1,2}, 李相前^{1,2}

(1. 江苏省生物质转化与过程集成工程实验室, 江苏 淮安 223003; 2. 淮阴工学院 生命科学与食品工程学院, 江苏 淮安 223003; 3. 江苏九阳生物制药有限公司, 江苏 盐城 224300)

摘要: 以杆菌肽产生菌地衣芽孢杆菌为出发菌株, 使用低能等离子注入诱变技术选育杆菌肽高产菌株并优化发酵条件。在诱变时间 15 s 时, 菌株致死率 80%, 正突变率达到 38%。经过多轮育种, 最终获得一株高产突变菌株 C15, 摇瓶产量达到 638.47 U/mL, 比出发菌株提高了 38.89%。通过单因素和正交实验优化培养基组成和发酵工艺条件, 确定了最优条件, 即碳源为 40.0 g/L 玉米淀粉、氮源为 80.0 g/L 豆饼粉、温度 37 ℃、初始 pH 7.0、转速 280 r/min, 优化条件下摇瓶产量达到 880.87 U/mL。在 50 L 发酵罐中进行验证, 突变菌株最终累积杆菌肽产量达到 927.36 U/mL。低能等离子注入诱变技术作为一种新兴的高效微生物育种手段, 在菌种改良领域具有广阔的应用前景。

关键词: 低能等离子注入育种; 地衣芽孢杆菌; 杆菌肽; 发酵条件优化; 培养基优化

中图分类号: TS205.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7561(2019)03-0036-10

Breeding of bacitracin high-producing strains by low-energy plasma implantation mutagenesis and optimization of fermentation conditions

ZHANG Jin-feng^{1,2}, WEN Yue¹, YU Yu², CHAI Xiao-tao³, REN Shi-ying^{1,2},
LUO Chu-ping^{1,2}, LI Xiang-qian^{1,2}

(1. Jiangsu Provincial Engineering Laboratory for Biomass Conversion and Process Integration, Huai'an Jiangsu 223003; 2. School of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an Jiangsu 223003; 3. Joyang Laboratories, Yancheng Jiangsu 224300)

Abstract: Bacitracin high-producing strains were bred by low energy plasma implantation mutagenesis and the fermentation condition was optimized with *Bacillus licheniformis* as original strain. When the mutagenesis time was 15 s, the lethal rate of the strain was 80%, and the positive mutagenesis rate was 38%. After several rounds of breeding, a high-yield mutant strain C15 was obtained, and the yield reached 638.47 U/mL, which was 38.89% higher than the original strain. The optimum conditions of fermentation were determined via single factor and orthogonal experiments: the carbon source was 40.0 g/L corn starch, nitrogen source was 80.0 g/L soybean cake powder, and the temperature, initial pH and rotating speed was 37 ℃, 7.0 and 280 r/min, respectively. Under the optimum conditions, the yield reached 880.87 U/mL. The verification test was carried out in a 50 L fermenter, and the final cumulative bacitracin yield of the mutant strain reached 927.36 U/mL. Low-energy plasma implantation mutagenesis, as a new and efficient microbial breeding method, has a wide prospect in the field of strain improvement.

收稿日期: 2018-10-25

基金项目: 淮安市科技项目 (HAC201604); 江苏省工程实验室开放课题 (JPELBCPL2014005); 淮安市科技计划指导项目 (HAGZ201603, HAGZ201604, HAGZ201605, HAGZ201606); 淮阴工院校级科学基金项目 (491714291)

作者简介: 张金峰, 1979 年出生, 男, 讲师.

通讯作者: 李相前, 1965 年出生, 男, 教授.

Key words: breeding by low-energy plasma implantation; *Bacillus licheniformis*; bacitracin; optimization of fermentation condition; optimization of medium

杆菌肽 (Bacitracin) 是由 *Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis* 等微生物通过次级代谢过程中非核糖体途径合成的多肽类抗生素, 可有效抑制革兰氏阳性菌和部分革兰氏阴性菌, 具有抗菌谱广、畜禽吸收量少、安全性评估良好、不产生耐药性等优良特性, 是 2001 年农业部 168 号文件《饲料药物添加剂使用规范》批准的、可在饲料中长期使用的两种药物添加剂之一, 第一代杆菌肽产品以杆菌肽锌为代表^[1-2]。2013 年 5 月第二代杆菌肽产品亚甲基水杨酸杆菌肽获得农业部药物添加剂批准文号, 获准在鸡、猪、鸭饲料中使用, 达到促进生长、改良饲料性能的作用。

国内外对杆菌肽的生物合成及分子调控机制的研究已经取得较大进展, 为工业生产育种及发酵工艺优化提供了理论基础^[3]。杆菌肽分子是由 12 个氨基酸残基组成的、含有噻唑环的多肽复合体, 其特有的组成与环状结构使其能抵抗生物体内各种蛋白酶的水解, 含 A、B₁、B₂、B₃、C₁、C₂、C₃、D、E、F、G 等多种组分, 以 A 组分 (分子式为 C₆₆H₁₀₃N₁₇O₁₆S, 分子量为 1 470 Da) 抗菌活性最高, A 和 B 组分的总活性占 95% 以上, 其中, F 组分具有肾毒性, 且基本无活性^[4-5]。近年来, 通过工业微生物诱变选育、次级代谢途径改造、生物合成分子调控等技术手段^[6-11], 国内杆菌肽生产规模已有较大水平的提高, 位于福建的蒲城绿康公司已成为国际上生产规模和产量最大的厂家^[2, 12-13]。多肽类抗生素大多来源于非核糖体肽合成途径, 通过非核糖体肽合成酶 (Nonribosomal peptide synthetase, 简称 NRPS), 不依赖于核酸模板, 以硫模板多聚酶机制进行生物合成, NRPS 能识别特定的氨基酸并缩合成肽, 然后经过甲基化、酰基化、糖基化、杂环化等后修饰过程, 最终合成产物。非核糖体多肽的生物合成受到较多合成酶及代谢酶类的影响, 多肽合成的前体氨基酸大多来源于微生物的 EMP 途径和 TCA 循环^[14], 因此, 通过在发酵过程中添加前提氨基酸或者增强 TCA 循环的方法, 研究产物与组成氨

基酸的关系, 可最终提高产物产量^[3, 15]。

等离子注入诱变技术是近些年发展起来的一项新育种方法, 成本低、能控制、操作方便、安全、效果好、对人无害、无环境污染、实用性强, 具有能量沉积、动量传递、质量沉积、电荷中和、交换联合作用等多重效应, 使遗传物质分子移位和重组, 比单一的物理化学诱变效果好, 突变株性状具有多发性和重复性, 可获得更高的突变率。采用等离子诱变育种技术具有突变频率高、突变谱广、细胞损伤小等优点^[16-17]。多功能等离子体诱变系统 (multifunctional plasma mutagenesis system, MPMS) 是将 N⁺、H⁺、Ar⁺ 等低能离子在特定的靶室内, 以脉冲的形式连续注入微生物细胞内, 融合了物理和化学诱变技术优势, 极大地提高了生物育种的突变频率和筛选效果。在高压交变电场作用下, 使空气介质形成含有氮正离子 (N⁺)、原子态氧 (O)、OH 自由基等活性成分的等离子体, 进入细胞后, 使微生物的细胞壁 (膜) 受损, 增加其通透性, 同时使 DNA 和蛋白质等生物大分子受损, 并激发细胞自身的修复机制^[18]。在此过程中, 微生物会产生大量随机性突变。因此这种新型育种技术非常适合应用于已达到常规育种“饱和”的工业生产菌株。自诞生之日起, 等离子注入育种技术^[19]已经吸引了无数微生物研究者的兴趣, 目前已经广泛应用于工业微生物改良^[20-22]、农业作物育种^[23-25]、医药微生物筛选^[26-28]等领域。王海霞等^[29]采用 MPMS 结合抗生素抗性筛选高产多杀菌素的刺糖多胞菌, 经过 5 轮复筛验证, 最终获得了一株产量较出发菌株提高 28.68%, 且遗传稳定的突变株 14-2。林桂珍等^[30]利用常温室压等离子体诱变技术对一株去甲金霉素金色链霉菌进行育种, 获得一株遗传稳定性良好的突变株, 去甲金霉素产量提高了 22.5%。本研究采用 MPMS 技术, 以一株产杆菌肽地衣芽孢杆菌为出发菌株, 将 N⁺ 注入地衣芽孢杆菌内, 筛选高产、稳定以及 A 组分含量高的杆菌肽突变株, 并在 50 L 半自动发酵罐水平上研究各发酵条件对

产量的影响,以期获得理想的大规模工业发酵优良菌株。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种与amp;主要试剂

出发菌株为杆菌肽产生菌地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* HJ326,测试菌为藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*,均由本实验室保存。杆菌肽与杆菌肽锌标准品购自阿拉丁试剂公司,其它试剂为市售分析纯或色谱纯试剂。

1.2 培养条件

种子培养基:胰蛋白冻 10.0 g/L,酵母提取物 5.0 g/L,NaCl 10.0 g/L,琼脂 20.0 g/L,pH 7.5。

发酵培养基:玉米淀粉 25.0 g/L,黄豆饼粉 80.0 g/L,轻质碳酸钙 10.0 g/L,硫酸铵 1.0 g/L,硫酸镁 0.02 g/L,泡敌 2.0 g/L,pH 7.5。

培养条件:从斜面挑取菌种接种至新鲜灭菌种子培养基中,30、200 r/min 恒温振荡摇床中培养 16 h,按照 5%的接种量接种至 50 mL 发酵培养基中,37、250 r/min 恒温振荡摇床中发酵 24~48 h。

50 L 发酵罐发酵条件:装液量 30 L,接种量 10%,罐温 37、600 r/min,罐压控制在 0.04±0.01 MPa,空气流量控制在 80 m³/h,发酵 48 h。

1.3 主要仪器

MANDELA 型多功能等离子体诱变育种仪:北京伟恩斯技术有限公司;PHS-3C 型 pH 计:上海雷磁;752 紫外光栅分光光度计:尤尼柯上海仪器有限公司;DH6000AB 型电热恒温培养箱:西安禾普生物科技有限公司;DHG-9420B 型电热鼓风恒温干燥箱:上海申贤恒温设备厂;HYG-C3 组合式全温振荡培养箱:苏州江东精密仪器;YM75Z 型高压灭菌锅:上海三申医疗器械有限公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪:安捷伦科技(中国)等。

1.4 实验方法

1.4.1 低能等离子体注入诱变

将培养好的新鲜种子液梯度稀释成浓度约为 10⁶ CFU/mL 的菌悬液,振荡混匀,取 20 μL 均匀涂在育种杯(10.0 mm×10.0 mm)的底部,无菌

环境下自然晾干,形成菌膜,随即放入已紫外灭菌 30 min 的 MANDELA 型多功能等离子体诱变育种仪中。以高纯氮气作为等离子体的工作气体,气体流量 12 slpm,功率 300 W,处理距离 5 mm,选择等离子注入时间分别为 5、10、15、20、25、30、35、40、45 s。诱变完成后,立即取出置于超净台中,并立即加入 1 mL 无菌水,用枪头不断地吹扫碗中的菌膜,取 100 μL 诱变菌液均匀涂在 LB 固体培养基中,于 37 °C 恒温培养箱中过夜培养。

1.4.2 突变株的筛选

初筛:用杯碟法测定杆菌肽含量。取 1 mL 活化好的 *M. luteus* 菌悬液至 200 mL 预热后约 50 左右的无菌 LB 固体培养基中,混合均匀,作为平板底层培养基,然后取约 10 mL 预热融化的 LB 固体培养基均匀倾覆在平板底层培养基上,将灭过菌的牛津杯(内径 6.0 mm,外径 7.5 mm,高 10.0 mm)轻轻放置在上层培养基表面,冷却。待凝固后,把刚培养好的突变菌株加在牛津杯内,37、培养 16 h,游标卡尺测量抑菌圈直径。

复筛:选取抑菌圈显著增加的正突变株培养 16 h,按 10%的接种量接种于发酵培养基中,37 摇床培养 48 h。取 5 mL 发酵液,10 000 r/min 离心 20 min,取上清液,用 0.22 μm 的针式过滤器进行过滤,采用 HPLC 检测杆菌肽各组分含量,选取杆菌肽 A 组分高的正突变株保存。

1.4.3 培养基组成及培养条件优化研究

碳源种类对突变菌株产杆菌肽的影响:仅改变发酵培养基的碳源种类,浓度均为 25.0 g/L,其它成分不变,进行发酵,研究不同碳源对突变菌株产杆菌肽的影响。碳源分别选用:葡萄糖、蔗糖、玉米淀粉、甘薯淀粉和小麦麸皮。

碳源浓度对突变菌株产杆菌肽的影响:确定了较优碳源种类后,配置含有不同浓度较优碳源的培养基,其它成分不变,进行发酵,研究碳源浓度对突变菌株产杆菌肽的影响。碳源浓度分别选用:10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、45.0、50.0 g/L。

氮源种类对突变菌株产杆菌肽的影响:确定好较优碳源的种类及浓度后,仅改变发酵培养基

中的氮源种类,浓度均为 50.0 g/L,其它成分不变,进行发酵,研究不同氮源对突变菌株产杆菌肽的影响。氮源分别选用:大豆蛋白胨、胰蛋白胨、豆饼粉、硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、乙酸铵、尿素。

氮源浓度对突变菌株产杆菌肽的影响:确定了较优氮源种类后,配置含有不同浓度较优氮源的培养基,其它成分不变,进行发酵,研究氮源浓度对突变菌株产杆菌肽的影响。氮源浓度分别选用:40.0、45.0、50.0、55.0、60.0、65.0、70.0、75.0、80.0 g/L。

温度的影响:选择 33、35、37、39、41 五种不同的发酵温度,研究温度对微生物生长和产杆菌肽的影响。

pH 值的影响:采用已确定的较优碳源和氮源的种类和浓度,用稀盐酸和氢氧化钠调节培养基的 pH 值分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,摇瓶发酵培养 48 h 后测定发酵液的杆菌肽产量,以确定最佳 pH 值。

摇床转速的影响:根据已确定的培养基组成和培养条件,选择不同的摇床转速,研究溶氧对突变菌株产杆菌肽的影响。分别选择转速为 150、180、210、250、280 r/min。

1.4.4 正交实验优化发酵工艺

基于培养基组成、发酵条件等单因素实验结果,选择影响杆菌肽 A 产量较明显的四个主要因素,选用 design-expert 7.0 软件,根据 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表配置 9 种发酵培养基,摇瓶发酵培养 48 h 后测定发酵液的杆菌肽产量。

1.4.5 遗传稳定性实验

将复筛后效价较高的突变菌株在斜面培养基上连续进行 10 次传代培养,进行摇瓶发酵培养,在 37、250 r/min 条件下,发酵 48 h,测定杆菌肽产量,研究突变株遗传稳定性。

1.4.6 50 L 发酵罐发酵验证

将培养成熟的突变菌株斜面接种于种子培养基中,250 r/min 恒温摇床培养 16 h 后,按照 10% 接种量,接种于 50 L 发酵罐中,发酵罐装液量 30 L,罐温 37,600 r/min,罐压控制在 0.04 ± 0.01 MPa;空气流量控制在 $80 \text{ m}^3/\text{h}$,发酵 48 h

后放罐,取样测定发酵单位,连续发酵三批。

1.5 分析方法

取 5 mL 发酵液,12 000 r/min 条件下离心 20 min,取上清液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后,HPLC 检测杆菌肽含量。每个样品检测三次,取平均值。

HPLC 参数:流动相为 V 甲醇 V 乙腈 V 磷酸钾缓冲液(50 mM, pH 6.0)=64 1 35,超声 30 min,色谱柱为 HyPersil ODSZC18($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm}$),波长 254 nm,进样量 $20 \mu\text{L}$,流速 1.0 mL/min,柱温 30。

杯碟法的测定:发酵完成后,取一定量发酵液,10 000 r/min 离心 20 min,取上清 100 μL 移至平板牛津杯中,静置 30 min 后,置恒温培养箱中 37 培养 16 h,游标卡尺测量抑菌圈直径。

菌体量的测定:取一定量发酵液,以空白培养基作为对照,在 600 nm 波长下,用分光光度计测量吸光度值。

2 结果与分析

2.1 低能等离子注入选育高产菌株

2.1.1 等离子注入诱变条件研究

为保持发酵菌种的高活力,开展多样化、新型的微生物育种工作对工业生产菌株具有重要的现实意义。贾锐等^[31]通过全基因组改组技术对地衣芽孢杆菌进行选育,通过紫外诱变、亚硝基胍诱变、常压室温等离子体(Atmospheric Room Temperature Plasma, ARTP)诱变等方法构建了突变库,最终筛选出 1 株优良菌株 F3,杆菌肽 A 产量达到 760 mg/L,是原始菌株的 1.7 倍。徐加兵等^[32]采用硫酸二甲酯、紫外及 Co60 射线对 *B. licheniformis* SIPI-669-3 进行诱变选育,并通过单因素和响应面法优化发酵培养基,筛得高产突变株 SIPI-93-14,产量提高了 81.4%,优化后的培养基组成为豆粕 10.0%、淀粉 5.71%、硫酸铵 0.15%,产量比优化前提高 14.5%。

本研究利用 MPMS 注入诱变,对平板上的菌落进行计数,以未经等离子注入的菌株为空白对照,计算致死率。实验结果(图 1)显示菌株的致死率随着辐照时间的延长逐渐上升,当照射时间为 5 s 时,致死率已达到 63%,表明低剂量的

等离子体即可使得生物大分子获得能量引起电子的跃迁,造成 DNA 等生物大分子键断裂或生物膜缺陷,使菌体致死率提高。在 10~20 s,随着等离子注入时间的延长、剂量的增加,等离子中的带电粒子运动活跃,引起周围正负电荷的局部集中,形成暂时的电场,避免等离子注入菌体内,某种程度上起到了保护细胞的作用。30~45 s 的时间内菌体几乎完全死亡,可能是因为随着等离子注入时间的继续延长,剂量进一步增加,使得菌体内不断积蓄能量。质量沉积和动量传递使菌体产生新的分子,自由基间接损伤,DNA 分子断裂、基因缺失等多重生物学效应,菌体难以进行自我修复最终导致菌体大量死亡,致死率升高^[33]。这一变化趋势符合辐射生物学中的单击曲线规律。根据实验结果,选择 10~25 s 作为后续等离子注入诱变的时间范围。

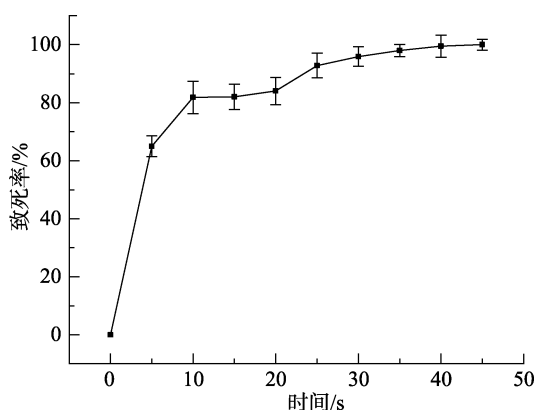


图 1 低能等离子注入时间对出发菌株致死率的影响

本研究定义抑菌效价超过对照菌株 10%以上的诱变株为正突变株,低于 15%的为负突变株。从图 2 可以看出,不同离子注入时间对菌株突变率有较大影响,在选择突变的时间范围内,负突变率最高达到 50%,诱变时间在 15 s 时获得了最高的正突变率,达到 38%,这对于工业生产菌株来说有较大提升。MPMS 诱变技术与传统的 UV、 γ -射线辐照、微波诱变技术在机理上有较大区别,能够获得较好的育种效果。实验中,负突变率与诱变处理时间没有明显的相关性,但是负突变率普遍高于 35%,说明离子注入诱变对微生物细胞的损伤还是较大的,同时正突变率在 15 s 时达到最高,随后下降,注入时间与正突变率之间存在

一定的正态分布,因此选择合适的诱变处理时间对于获得更高的正突变率和正突变株是非常重要的。从本研究结果来看,离子注入育种技术正突变率的大小和分布普遍优于传统的紫外、微波、辐照等诱变手段,因此可以推测,这一项新技术在微生物育种领域将有广阔的开发和利用空间。

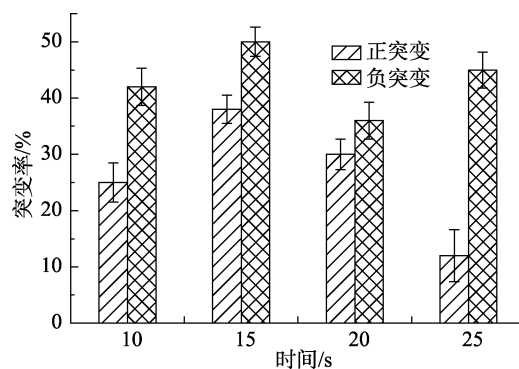


图 2 低能等离子注入时间对突变率的影响

2.1.2 筛选结果

出发菌株经过连续 3 轮离子注入诱变处理,每一轮选择 3 株产量最高的正突变株作为出发菌株进行下一轮诱变。结果发现,经过平板初筛获得的正突变菌株,菌落直径变化较大,显示其生长速率变大,同时菌落形态也发生改变,高产正突变株菌落表面更干燥,颜色呈白色,根据这一特征可筛选到更多的正突变株。表 1 中列出了部分突变株的相对发酵效价,以出发菌株发酵单位 460 U/mL 作为 100%对照,从表中可以看出最大正突变株 C15,发酵单位达到 638.47 U/mL,较出发菌株提高了 38.89%,后面将以 C15 突变株作为目的菌株,进行培养条件的优化。罗秀针等^[34]利用常压室温等离子体注入技术对海水养殖环境中分离的产杆菌肽菌株 ZZ061 进行诱变育种,获得的最大正突变株 SF1406 摇瓶效价提高 130%,达到 560 U/mL,采用正交实验优化后进一步提高 44%,达到 810 U/mL。张玉明等^[35]使用紫外线诱变技术选育淀粉酶分泌能力增强的杆菌肽产生菌种,以加快杆菌肽积累速率,最终获得的突变菌株 *B. licheniformis* Y8226A 发酵 48 h 达到最大产量 786.8 U/mL。倪志华等^[36]使用微波诱变技术选育产物耐受型高产杆菌肽生产菌株,得到 *B. licheniformis* Y8228X 突变株,产量达到 847.28 U/mL。

表 1 突变株筛选结果

菌株编号	透明圈直径/cm	菌落直径/cm	相对效价/%	菌株编号	透明圈直径/cm	菌落直径/cm	相对效价/%
对照	1.76±0.12	0.75±0.06	100.00	B10	2.15±0.12	0.30±0.01	122.16
A1	1.81±0.05	0.73±0.08	102.84	B11	2.28±0.10	0.14±0.01	129.55
A2	2.10±0.18	0.70±0.09	119.32	B12	2.14±0.15	0.14±0.01	121.59
A5	1.87±0.11	0.24±0.01	106.25	B14	2.40±0.21	0.10±0.01	132.36
A9	2.02±0.15	0.85±0.02	114.77	B15	1.83±0.03	0.42±0.05	103.98
A11	2.16±0.20	0.69±0.06	122.73	B16	1.96±0.14	0.32±0.02	111.36
A15	2.12±0.04	0.70±0.08	120.45	B18	1.94±0.21	0.22±0.01	110.23
A19	1.86±0.14	0.68±0.03	105.68	B19	1.84±0.16	0.33±0.02	104.55
A23	2.05±0.04	0.14±0.02	116.48	B20	2.27±0.18	0.30±0.02	128.98
A29	1.88±0.03	0.20±0.02	106.82	C 2	2.24±0.22	0.32±0.03	127.27
A33	1.96±0.13	0.25±0.01	111.36	C 3	2.15±0.11	0.33±0.02	122.16
A38	1.88±0.08	0.26±0.01	106.82	C 4	1.87±0.05	0.39±0.03	106.25
A44	1.98±0.12	0.22±0.01	112.50	C 9	2.34±0.20	0.28±0.01	132.95
B1	1.86±0.13	0.14±0.01	105.68	C 10	2.42±0.20	0.32±0.01	130.50
B2	1.94±0.15	0.19±0.02	110.23	C 11	2.25±0.15	0.30±0.02	127.84
B5	1.74±0.06	0.15±0.01	98.86	C 12	1.94±0.15	0.37±0.02	110.23
B6	2.15±0.08	0.23±0.01	122.16	C 15	2.55±0.19	0.23±0.02	138.89
B7	1.83±0.10	0.30±0.01	103.98	C 19	1.88±0.20	0.31±0.02	106.82
B8	2.33±0.25	0.20±0.01	122.39	C 25	1.99±0.21	0.24±0.02	113.07
B9	2.34±0.21	0.30±0.01	135.95				

注：n=3。

2.2 培养基组成及培养条件优化研究

微生物细胞经过物理、化学等手段诱变育种后，通常在细胞形态、生理特征、生长产酶、代谢调控等方面产生变异，因此有必要对诱变之后的高产突变菌株的发酵培养条件进行重新优化，以便找到更适宜突变菌株生长、产酶、代谢发酵等的培养成分及工艺条件。

2.2.1 发酵培养基中碳源对产杆菌肽的影响

不同微生物拥有不同的酶系，碳源的利用也会存在差异。本实验选择几种常见发酵碳源，研究其对高产突变菌株合成杆菌肽的影响。实验结果如图 3 所示，对于两种速效碳源（葡萄糖和蔗糖）来说，虽然可以获得更高的细胞量，但是最终的杆菌肽产量却最低，分析应是在发酵前期消耗了更多碳源，导致后期合成次级代谢产物时缺少相应的能量来源，而增加这两种碳源浓度，将导致稳定期更迟到来，以及因葡萄糖效应而导致抑制发生。另外三种碳源均能提供稳定的生长物质和能量来源，其中玉米淀粉作为单一碳源时获得了最高的发酵效价。

淀粉是一种重要的多糖，白色粉末，成本低廉，

来源广泛，植物中几乎都含有丰富的淀粉^[37]。淀粉在酶的作用下水解成葡萄糖，为微生物提供能量。

本研究选取不同浓度的玉米淀粉作为碳源，研究其对突变菌株发酵产杆菌肽的影响，以淀粉浓度为 40.0 g/L 时取得的最大产量作为对照 100%，其余产量与其比值作为相对效价。结果如图 4 所示，玉米淀粉添加量在 40.0 g/L 时，杆菌肽产量最大，继续增加浓度会导致培养基过于黏稠，溶氧量减少，菌体细胞膜通透性降低，干扰菌体正常代谢，从而抑制杆菌肽合成。

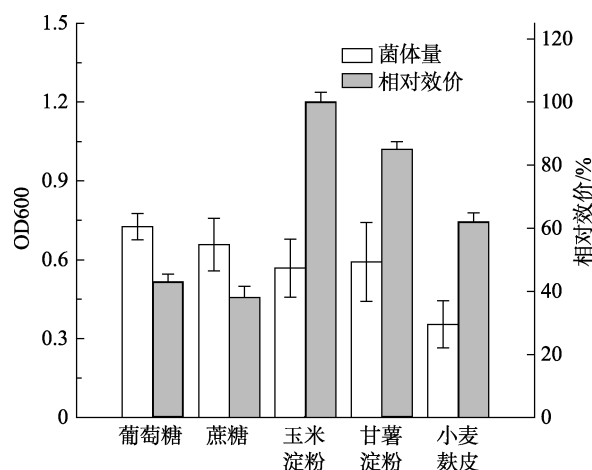


图 3 碳源种类对突变菌株产杆菌肽的影响

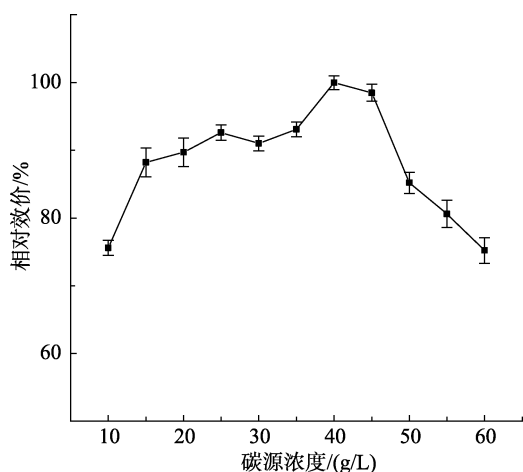


图 4 玉米淀粉浓度对突变菌株产杆菌肽的影响

刘道奇等^[38]在 10 L 发酵罐水平上研究了混合碳源对地衣芽孢杆菌生长、代谢特征以及对杆菌肽合成的影响,在发酵中期流加速效碳源葡萄糖可以促进细胞的二次生长和溢流物质的产生,但是有可能抑制杆菌肽的合成,认为葡萄糖不是杆菌肽补料发酵的最适碳源,这一结论也与本研究中的结果相吻合。在基料中添加乳糖能延长细胞的生长周期并维持杆菌肽的合成速率,适宜在补料发酵中添加。

2.2.2 发酵培养基中氮源对产杆菌肽的影响

本实验分别选择不同的有机氮源和无机氮源,考察其对突变菌株产杆菌肽的影响。结果如图 5 所示,有机氮源对于菌体生长和合成抗生素均有促进作用,综合考虑生产成本和发酵成效,选择豆饼粉作为氮源较为适宜工业发酵。

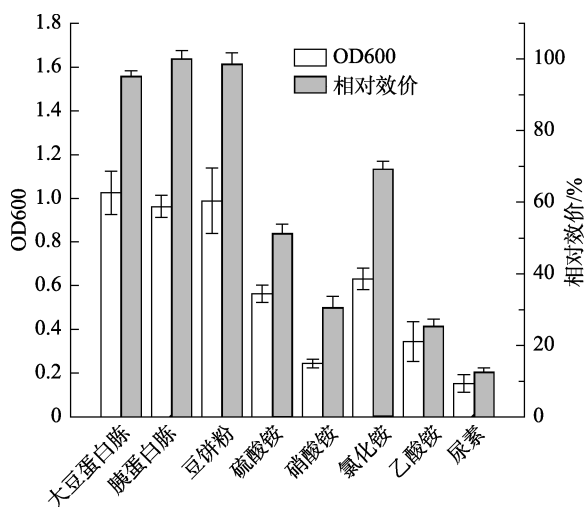


图 5 氮源种类对突变菌株产杆菌肽的影响

豆饼粉成分较复杂,含有丰富的氨基酸,含硫氨基酸尤为丰富,也含有一些细菌生长所需的

维生素和生长因子^[34, 39-40]。本研究分别选取不同含量的豆饼粉作为唯一氮源,研究其对突变菌株发酵的影响,以豆饼粉浓度为 80.0 g/L 时取得的最大产量 771.45 U/mL 为对照 100%,其余产量与其比值作为相对效价,结果如图 6 所示。随着豆饼粉浓度的升高,杆菌肽的产量增大,豆饼粉浓度为 80.0 g/L 时相对效价达到最高值,继续增加豆饼粉浓度,则发酵液非常黏稠,影响溶氧,因此本研究在现有发酵条件下,选择的最大氮源浓度为 80.0 g/L。

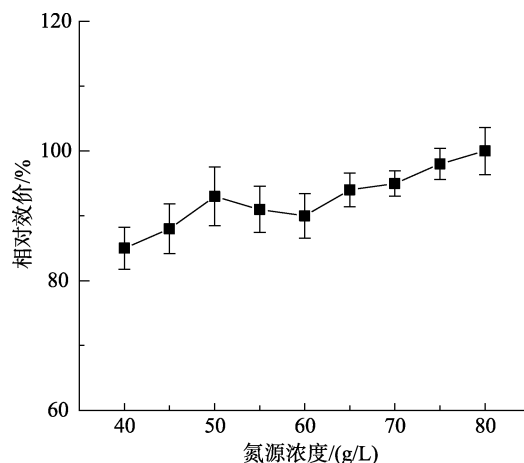


图 6 豆饼粉浓度对突变菌株产杆菌肽的影响

2.2.3 发酵温度对产杆菌肽的影响

工业发酵过程中,温度对于微生物的生长和生产非常重要,过高的温度会导致高耗能,增加生产成本,因此,本实验分别选取 33、35、37、39、41 5 个温度,对发酵温度进行优化,以 37 时取得的最大产量 658.50 U/mL 为对照 100%,其余产量与其比值作为相对效价,由图 7 可以看出,发酵温度对地衣芽孢杆菌产杆菌肽有较大影响,根据实验结果,选择培养温度 37 。

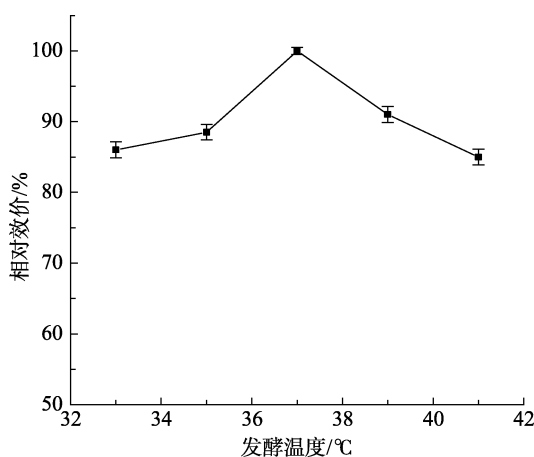


图 7 培养温度对产杆菌肽的影响

2.2.4 发酵培养基初始 pH 对产杆菌肽的影响

以 pH 7 时取得的最大产量 658.50 U/mL 为对照 100%，其余产量与其比值作为相对效价，由图 8 可知，发酵培养基初始 pH 为 5.0~6.0 时，杆菌肽产量相对较小，提高 pH 值，产量增加，在 pH 为 7.0 时达到最大值。当 pH 值大于 8.0 后，杆菌肽产量急剧下降。pH 偏高或偏低都会对杆菌肽发酵合成产生明显的影响。本实验确定初始发酵培养基 pH 为 7.0。

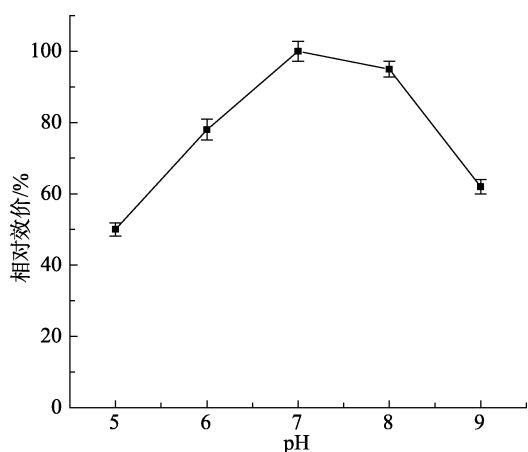


图 8 初始 pH 对产杆菌肽的影响

2.2.5 摇瓶发酵摇床转速对产杆菌肽的影响

地衣芽孢杆菌属于兼性厌氧型细菌，分别选取摇床转速为 150、180、210、250、280 r/min，其他发酵条件不变，通过改变摇床转速来调节发酵培养基中的溶氧量，研究转速对杆菌肽产量的影响。以 280 r/min 转速时取得的最大产量 783.85 U/mL 为对照 100%，其余产量与其比值作为相对效价，由图 9 可知，实验中摇床转速的大小直接影响发酵培养基中的溶氧量，转速越高，发酵培养基中的溶氧量越大，杆菌肽产量越大。在现有实验条件下，选择转速为 280 r/min。

2.2.6 正交实验结果分析

根据以上单因素实验结果，选择玉米淀粉浓

度 (30、40、50 g/L)，黄豆饼粉浓度 (40、60、80 g/L)，培养基初始 pH 值 (6.0、7.0、8.0)，摇瓶转速 (150、210、280 r/min) 四个因素及相应水平作为正交实验考察对象。

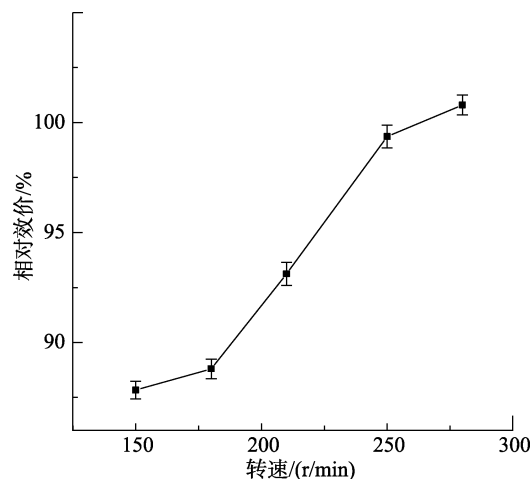


图 9 转速对产杆菌肽的影响

实验结果如表 2 和图 10 所示，可以看出最优条件是碳源浓度 40 g/L、氮源浓度 80 g/L、pH 7.0、转速 280 r/min。根据这一配方进行发酵验证，杆菌肽产量达到 880.87 U/mL，较优化前提高了 38%。

表 2 正交实验结果及分析

实验组	碳源 / (g/L)	氮源 / (g/L)	pH	转速 / (r/min)	产量 / (U/mL)
1	30	40	6	150	650.59
2	30	60	7	210	776.14
3	30	80	8	280	850.36
4	40	40	7	280	828.55
5	40	60	8	150	724.45
6	40	80	6	210	843.25
7	50	40	8	210	689.23
8	50	60	6	280	729.87
9	50	80	7	150	710.65
均值 1	759.030	722.790	741.237	695.230	
均值 2	798.750	743.487	771.780	769.540	
均值 3	709.917	801.420	754.680	802.927	
极差	88.833	78.630	30.543	107.697	

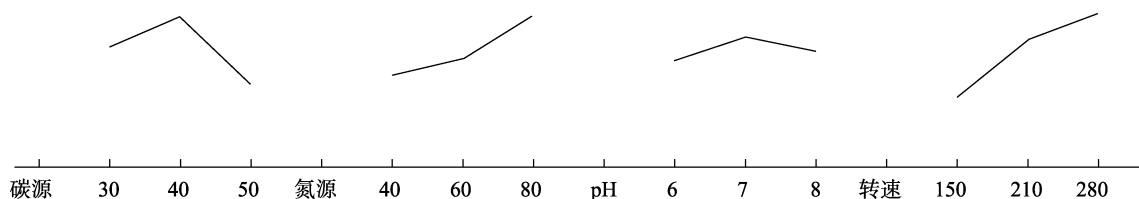


图 10 正交实验效应曲线图

2.2.7 遗传稳定性考察

对突变株 C15 进行生产能力及遗传稳定性实验考察, 在最优培养条件下, 经连续 10 代培养发酵, 以第一代菌种发酵单位作为 100% 对照, 其它结果与其比值作为相对效价, 结果如图 11 所示, HPLC 检测结果显示该菌株可以保持非常稳定的生产性能, 是一株符合工业化生产要求的高产菌株。

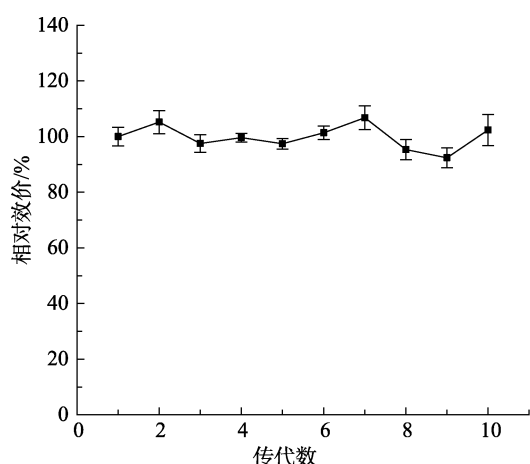


图 11 突变菌株遗传稳定性研究

2.2.8 50 L 发酵罐验证突变菌株生产性能

在 50 L 发酵罐中发酵高产突变菌株 C15, 实验结果见图 12。结果显示, 发酵在 10 h 开始合成杆菌肽, 突变菌株较出发菌株更早进入对数生长期, 生物量也较高, 说明在对碳源、氮源的利用能力上, 突变菌株具有更高的活力, 并且突变菌株在连续发酵 48 h 后仍具有一定的合成潜力, 而出发菌株自 40 h 后即出现抑制, 杆菌肽合成几乎停滞。因此, 对于一株工业生产菌株来说, 突变菌株 C15 具有非常好的应用潜力。

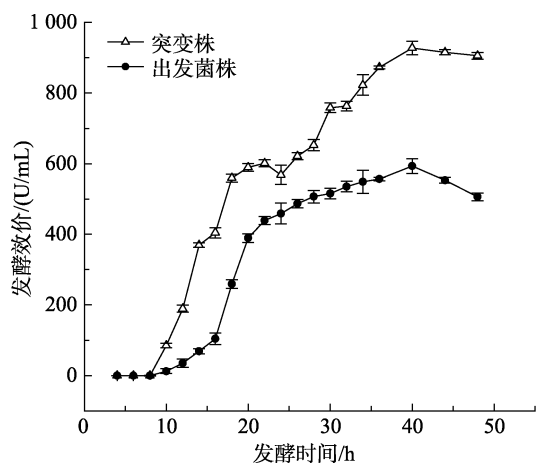


图 12 50 L 发酵罐验证实验结果

3 结论

本研究以一株产杆菌肽的地衣芽孢杆菌为出发菌株, 采用 MPMS 诱变技术进行微生物育种, 获得了多株高产突变株, 最终选取了一株遗传性状稳定的高产菌株。初步采用单因素分析和正交实验对高产突变菌的发酵条件进行了分析研究, 得到的相对较优发酵工艺参数为: 选择 40.0 g/L 玉米淀粉为碳源、80.0 g/L 豆饼粉为氮源, 在温度 37、初始 pH 7.0、转速 280 r/min 条件下, 获得的杆菌肽产量最大, 为 880.87 U/mL。在 50 L 发酵罐对出发菌株和突变菌株的生产性能进行对比, 验证结果表明突变菌株 C15 在生长特性和发酵能力方面均有较大幅度的提升, 可见, 利用 MPMS 技术对高产杆菌肽进行育种效果明显, 具有潜在的市场应用前景。

参考文献:

- [1] JOHNSON B A, ANKER H, MELENEY F L. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group[J]. Science, 1945, 102(2650): 376-377.
- [2] HAAVIK H I, VESSIA B. Bacitracin production by the high-yielding mutant *Bacillus licheniformis* strain AL: stimulatory effect of L-leucine[J]. Acta Pathol Microbiol Scand B, 1978, 86(2): 67-70.
- [3] 余清梅, 王明兹, 林清强, 等. 杆菌肽合成分子机制及高产策略[J]. 农产品加工(学刊), 2013(5): 28-33.
- [4] ISHIHARA H, SASAKI T, SHIMURA K. Biosynthesis of bacitracin. II. Incorporation of ¹⁴C-labeled amino acids into bacitracin by a cell-free preparation from *Bacillus licheniformis*[J]. Biochim Biophys Acta, 1968, 166(2): 496-504.
- [5] FROYSHOV O. The production of bacitracin synthetase by *Bacillus licheniformis* ATCC 10716[J]. FEBS Lett, 1977, 81(2): 315-318.
- [6] 刘钊远, 余文莉, 王勤, 等. 地衣芽孢杆菌中过表达丙酮酸羧化酶提高杆菌肽产量[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2019, 41(1): 15-21.
- [7] ZHU J, CAI D B, XU H X, et al. Enhancement of precursor amino acid supplies for improving bacitracin production by activation of branched chain amino acid transporter BrnQ and deletion of its regulator gene *trp* in *Bacillus licheniformis*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2018, 3(4): 236-243.
- [8] 王冬. 地衣芽孢杆菌中杆菌肽及普切明酸的合成调控研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.

- [9] 舒成城. 地衣芽孢杆菌 DW2 的基因组分析和转录组表达研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [10] 刘钊远. 增强地衣芽孢杆菌 TCA 循环代谢水平高产杆菌肽 [D]. 武汉: 湖北大学, 2018.
- [11] 李阳. 通过改造地衣芽孢杆菌支链氨基酸合成和转运途径提高杆菌肽产量 [D]. 武汉: 湖北大学, 2018.
- [12] HANLON G W, HODGES N A, RUSSELL A D. The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis* [J]. J Gen Microbiol, 1982, 128(4): 845-851.
- [13] SUPEK V, GAMULIN S, DELIC V. Enhancement of bacitracin biosynthesis by branched-chain amino acids in a regulatory mutant of *Bacillus licheniformis* [J]. Folia Microbiol (Praha), 1985, 30(4): 342-348.
- [14] WANG Q, ZHENG H, WAN X, et al. Optimization of inexpensive agricultural by-products as raw materials for bacitracin production in *bacillus licheniformis* DW2 [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2017, 183(4): 1146-1157.
- [15] 邓坤, 冀志霞, 陈守文. 溶氧对地衣芽孢杆菌 DW2 合成杆菌肽的影响 [J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(11): 664-668.
- [16] SU C, ZHOU W, FAN Y, et al. Mutation breeding of chitosanase-producing strain *Bacillus* sp. S65 by low-energy ion implantation [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33(12): 1037-1042.
- [17] GU S B, LI S C, FENG H Y, et al. A novel approach to microbial breeding—low-energy ion implantation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78(2): 201-209.
- [18] 余增亮, 邱励俭, 霍裕平. 离子注入生物效应及育种研究进展 [J]. 安徽农学院学报, 1991(4): 251-257.
- [19] 余增亮, 霍裕平. 离子注入生物学研究述评 [J]. 安徽农业大学学报, 1994(3): 221-225.
- [20] 戴剑滢, 张晓婷, 卢智黎, 等. 新型常压室温等离子体-紫外复合诱变选育埃莎霉素高产菌株 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(2): 182-188.
- [21] 李爽. 等离子体诱变生产 1, 3-丙二醇菌种的研究 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2007.
- [22] 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.
- [23] 陈红玉, 马光跃, 郝学金, 等. 等离子体注入枣树接穗的诱变试验 [J]. 山西农业科学, 2013, 41(1): 11-14.
- [24] 龚洪恩, 吕芳德. 离子束生物技术在植物育种中的应用 [J]. 经济林研究, 2008(1): 113-116.
- [25] 邵长勇, 王德成, 杨鹏, 等. 基于冷等离子体种子处理技术的首蓿表观遗传研究 [J]. 中国种业, 2015(3): 12-14.
- [26] 贾永峰. 盐霉素高效生产菌种的高通量选育 [D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [27] 宋冰, 付永平, 李丹, 等. 食药菌诱变育种研究进展 [J]. 微生物学通报, 2017, 44(9): 2201-2212.
- [28] 温利雪. 海洋药源真菌等离子体诱变育种研究 [D]. 大连: 大连交通大学, 2014.
- [29] 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.
- [30] 林桂真, 叶蕊芳, 程林同, 等. 常压室温等离子体诱变高产去甲金霉素金色链霉菌 [J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(11): 1026-1031.
- [31] 贾锐, 张充, 吕凤霞, 等. 基因改组选育高产杆菌肽地衣芽孢杆菌及改组菌株差异分析 [J]. 食品科学, 2016, 37(23): 135-140.
- [32] 徐加兵, 魏晓东, 那可, 等. 杆菌肽产生菌的诱变育种及培养基优化 [J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(5): 446-448.
- [33] 宋道军, 姚建铭, 邵春林, 等. 离子注入微生物产生“马鞍型”存活曲线的可能作用机制 [J]. 核技术, 1999(3): 129-132.
- [34] 罗秀针, 林燕燕. 杆菌肽产生菌的 ARTP 诱变育种及培养基优化 [J]. 福建农业学报, 2015, 30(7): 693-696.
- [35] 张玉明, 赵泽, 顾冀海, 等. 杆菌肽生产菌种选育及发酵新工艺研究 [J]. 科学技术与工程, 2015, 15(33): 137-141.
- [36] 倪志华, 张玉明. 微波诱变选育产物耐受型地衣芽孢杆菌以提高杆菌肽发酵水平 [J]. 科学技术与工程, 2016, 16(1): 119-125.
- [37] 孙仲奇, 裘娟萍, 陆建卫, 等. 碳源对多粘类芽孢杆菌生长和多粘菌素 E 合成的影响 [J]. 浙江农业学报, 2016, 28(8): 1343-1350.
- [38] 刘道奇, 陈守文, 李俊辉, 等. 混合碳源对地衣芽孢杆菌发酵合成杆菌肽的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 52-57.
- [39] 张红艳, 李忠玲, 张强, 等. 地衣芽孢杆菌 MYS68 的鉴定及发酵培养基优化 [J]. 粮食与饲料工业, 2018(2): 50-53.
- [40] 宋浩, 纪兆林, 陈夕军, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 菌株发酵培养基优化 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2015, 36(1): 87-91. ㊟