

# 多杀菌素生产菌的复合诱变选育及发酵优化

陈润杰<sup>1</sup>, 李云飞<sup>2</sup>, 张妍<sup>2</sup>, 张善飞<sup>1,2</sup>, 孙付保<sup>\*1</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 山东胜利生物工程有限公司, 山东 济宁 272000)

**摘要:** 生物农药多杀菌素的发酵水平限制了其产业化发展。为了提高多杀菌素产量, 以刺糖多孢菌 T1 (*Saccharopolyspora spinosa* T1) 为出发菌, 通过常压室温等离子体 (atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 诱变和硫酸二乙酯 (diethyl sulfate, DES) 诱变, 并以链霉素和鼠李糖作为筛选因子结合微孔板培养进行筛选, 获得高产菌株 *S. spinosa* F5; 发酵后其多杀菌素产量为 572.3 mg/L, 比出发菌提高 35.9%; 通过单因素实验和响应面实验确定柠檬酸钠、异亮氨酸的最适添加量分别为 0.46、0.10 g/L, 豆油的最适添加体积分数为 1.77%, 此时多杀菌素产量为 707.2 mg/L。在 5 L 发酵罐中进行分批发酵, 发酵 240 h 产量接近 800 mg/L; 进一步分批补料发酵 264 h, 多杀菌素产量达 1 175.5 mg/L。结果表明, ARTP 和 DES 复合诱变育种及添加外源诱导物可以显著提高多杀菌素产量。

**关键词:** 多杀菌素; 刺糖多孢菌; 复合诱变育种; 抗性筛选; 培养基优化

中图分类号: R 978.1 文章编号: 1673-1689(2024)05-0044-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20230412002

## Breeding of Spinosad Producing Strains by Combined Mutation and Optimization of Fermentation

CHEN Runjie<sup>1</sup>, LI Yunfei<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, ZHANG Shanfei<sup>1,2</sup>, SUN Fubao<sup>\*1</sup>

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Shandong Shengli Bioengineering Co., Ltd, Jining 272000, China)

**Abstract:** The fermentation yield of spinosad, a biological pesticide, limits its industrialization development. To enhance spinosad production, *Saccharopolyspora spinosa* T1 was mutagenized using atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and diethyl sulfate (DES). The high-yield strain, *S. spinosa* F5, was obtained by streptomycin and rhamnose as screening factors combined with microplate culture. After fermentation, the yield of spinosad was 572.3 mg/L, an increase of 35.9% compared to that of the parent strain. Through single factor experiment and response surface test, the optimum addition amounts of sodium citrate and isoleucine were determined to be 0.46 g/L and 0.10 g/L, while the optimum addition volume fraction of soybean oil was 1.77%. Under this condition, the spinosad production reached 707.2 mg/L, and batch fermentation in a 5 L fermenter showed a yield close to 800 mg/L after 240 h fermentation. Further batch-fed fermentation resulted in a production of 1 175.5 mg/L after 264 h fermentation. The results showed that the compound mutation combining

收稿日期: 2023-04-12 修回日期: 2023-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21776114)。

\* 通信作者: 孙付保 (1975-), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事大宗发酵过程优化与控制技术研究。E-mail: sunfubao@126.com

ARTP and DES breeding, along with the addition of exogenous inducers, could significantly increase the yield of spinosad.

**Keywords:** spinosad, *Saccharopolyspora spinosa*, compound mutation breeding, resistance screening, medium optimization

多杀菌素是由刺糖多孢菌经过有氧发酵生成的大环内酯类次级代谢产物,它能够有效防治鳞翅目、双翅目和鞘翅目等害虫<sup>[1]</sup>。与化学农药相比,多杀菌素具有靶向性强、用量少、持效时间长和易被生物降解等优点,所以它作为环境友好型的生物农药具有重要的研究价值<sup>[1-3]</sup>。美国陶氏益农公司工业化生产多杀菌素至今已有 20 多年,而我国对于多杀菌素相关产品的研发起步较晚,直到 2020 年才有多杀菌素产品正式投入生产<sup>[1,4]</sup>。因此,通过菌种改良技术和发酵工艺优化来提高多杀菌素产量对于多杀菌素在中国的产业化发展具有重要意义<sup>[5]</sup>。

诱变育种已被广泛运用到刺糖多孢菌的菌种改良中,其中复合诱变比单一诱变能产生更高的突变频率<sup>[6-7]</sup>。Jin 等将亚硝基胍和紫外复合诱变后的菌株进行原生质体融合,通过 4 轮基因组重排获得了一株多杀菌素产量达 547 mg/L 的高产菌株<sup>[8]</sup>。进一步在培养基中添加不同抗生素和前体物质作为筛选因子能显著提高筛选效率。王海霞等结合氯霉素、链霉素、利福平和庆大霉素抗性筛选,通过 ARTP 诱变使多杀菌素产量提高近 30%<sup>[9]</sup>。Liang 等将紫外诱变后的孢子液涂布到鼠李糖和丙酸钠抗性筛选平板上进行筛选,使多杀菌素产量提高近两倍<sup>[10]</sup>。在发酵条件方面,系统优化培养基成分也能显著提高发酵水平。扶教龙等通过响应面法对多杀菌素发酵培养基的碳氮源进行优化,使多杀菌素产量提高 10%<sup>[11]</sup>;Lan 等采用响应面法和人工神经网络建模对发酵培养基的成分进行优化,使多杀菌素产量最大值达到 401 mg/L<sup>[12]</sup>;Lu 等探究了氧载体对多杀菌素发酵产量的影响,发现添加体积分数为 0.5% 的正十二烷能使多杀菌素产量提高 44%<sup>[13]</sup>;王美玲探究了不同氨基酸对多杀菌素产量的影响,发现在发酵 72 h 向培养基中添加 0.3 g/L 的缬氨酸能使多杀菌素产量提高 20% 以上<sup>[14]</sup>。由此可见,通过诱变育种结合培养基优化可以有效提高多杀菌素产量。

以作者所在实验室保藏的刺糖多孢菌 *S. spinosa* T1 为出发菌,通过 ARTP-DES 复合诱变并

以链霉素和鼠李糖作为筛选因子结合微孔板培养进行筛选,通过系统优化考察柠檬酸钠、异亮氨酸和豆油对菌株合成多杀菌素的影响。最后在 5 L 发酵罐上进行分批实验和分批补料实验以进一步提高多杀菌素产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 菌株** 刺糖多孢菌 *S. spinosa* T1, 作者所在实验室保藏。

**1.1.2 主要试剂** 鼠李糖、链霉素和异亮氨酸:生工生物工程(上海)股份有限公司;1 000 g/L 多杀菌素标准品:北京坛墨质检科技有限公司;柠檬酸钠、色谱级甲醇、色谱级乙腈、色谱级乙酸铵:国药集团化学试剂有限公司;豆油:益海嘉里食品营销有限公司。

**1.1.3 培养基** 固体培养基:葡萄糖 10 g/L,牛肉提取物 1 g/L,NZ amine type A 2 g/L,酵母提取物 1 g/L,琼脂 20 g/L。配制后用 NaOH 调至 pH 7.3,121 °C 灭菌 20 min,于固体平板或斜面培养。种子培养基:葡萄糖 20 g/L,玉米淀粉 12 g/L,酵母提取物 10 g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 g/L,配制后用 NaOH 调至 pH 7.2,121 °C 灭菌 20 min。发酵培养基:葡萄糖 50 g/L,糊精 20 g/L,棉籽蛋白 20 g/L,NaCl 3 g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1 g/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g/L,CaCO<sub>3</sub> 1 g/L。配制后用 NaOH 调至 pH 7.2,121 °C 灭菌 20 min。

### 1.2 主要仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪:安捷伦科技有限公司;ARTP-IIS 诱变育种仪:无锡源清天木生物科技有限公司;9005A/T 发酵罐:上海万木春生物工程有限公司;SBA-40E 生物传感仪:山东省科学院生物研究院。

### 1.3 培养方法

**1.3.1 孢子悬液的制备** 将甘油管中保藏的菌种在平板培养基上划线,28 °C 培养 7 d,待孢子生长成熟后挑取单菌落划线于斜面培养基上,再于 28 °C 培

养 7 d。将 5 mL 无菌生理盐水注入长满孢子的斜面中,用无菌接种环刮净斜面上的孢子,将含有孢子的生理盐水倒入无菌的含有玻璃珠的三角瓶中,充分振荡以打碎菌丝和打散孢子,经无菌的 4 层擦镜纸过滤后得到孢子悬液,最后用无菌生理盐水将孢子悬液稀释至  $10^8$  个/mL。

**1.3.2 微孔板培养** 将平板培养基上的单菌落挑取到 24 孔板种子培养基中(每孔装液量 1.6 mL),于 28 °C、250 r/min 培养 48 h,再按 10%接种体积分数转接于 24 孔板发酵培养基中(每孔装液量 1.4 mL),于 28 °C、250 r/min 培养 240 h。

**1.3.3 摇瓶培养** 将斜面上的孢子制成孢子悬液,取 1 mL 孢子悬液接种于种子培养基中,500 mL 摇瓶装液量 50 mL,于 28 °C、220 r/min 培养 54 h;再按 10%接种体积分数转接于发酵培养基中,250 mL 摇瓶装液量 30 mL,于 28 °C、220 r/min 培养 240 h。

**1.3.4 5 L 发酵罐培养** 种子培养方法同 1.3.3 摇瓶发酵,发酵培养基为优化后的配方,发酵罐装液量 3 L,接种体积分数 12%,温度 28 °C,转速 180~300 r/min,通气量 5 L/min,溶氧体积分数控制在 35%左右。

## 1.4 诱变及筛选方法

**1.4.1 ARTP 诱变** 按 1.3.1 中的方法制备孢子悬液,取 10  $\mu$ L 孢子悬液涂布于无菌的金属载片上,将载片置于 ARTP 诱变仪的操作室内进行诱变,处理条件为:气量 10 SLM,功率 120 W,处理距离 2 mm,诱变时间分别设置为 0(空白对照)、20、40、60、80、100、120 s,诱变完成后将不同处理时间的孢子悬液稀释适当倍数,分别涂布在平板培养基上,28 °C 培养 7 d,观察菌落数,致死率计算见下式:

$$B = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

式中: $B$  为致死率,%; $A_1$  为空白对照平板上的菌落数,个; $A_2$  为诱变平板上的菌落数,个。

**1.4.2 DES 诱变** 将 ARTP 诱变筛选出的高产菌按 1.3.1 中的方法制备成孢子悬液,参照文献[15]中的方法进行 DES 诱变,将诱变时间调整为 0、10、20、30、40、50、60 min,诱变结束后计算致死率。

**1.4.3 筛选方法** 按 1.3.1 中的方法制备孢子悬液,将孢子悬液分别涂布在含有不同质量浓度链霉素(0、1、5、10、15、20 mg/L)和鼠李糖(0、0.5、1、5、10、15 g/L)的平板培养基上,28 °C 培养 7 d,观察菌落生长情况,确定筛选因子的最小抑制质量浓度,

在此质量浓度下进行筛选。将 ARTP 诱变后的菌株分别涂布在链霉素和鼠李糖抗性筛选平板上进行培养,而将 DES 诱变后的突变菌仅涂布在鼠李糖抗性筛选平板上进行培养。将抗性平板上生长出的单菌落挑到 24 孔板中进行发酵培养,结束后用酶标仪检测多杀菌素的吸光度,并以每轮诱变的出发菌作为阴性对照。将 24 孔板培养中多杀菌素吸光度较出发菌提升 20%的突变菌进行摇瓶发酵培养,结束后用 HPLC 测定多杀菌素产量,确定高产菌株。

## 1.5 培养基优化方法

**1.5.1 单因素实验** 探究了豆油体积分数(1%、2%、3%、4%、5%)、柠檬酸钠质量浓度(0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 g/L)和异亮氨酸质量浓度(0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 g/L)对菌株 *S. spinosa* F5 生物量和多杀菌素产量的影响。豆油在摇瓶发酵初始时添加,而柠檬酸钠和异亮氨酸均在发酵第 120 小时添加。在温度 28 °C、250 mL 摇瓶装液量 35 mL、接种体积分数 12%、转速 220 r/min 的条件下进行培养,在第 144 小时取样检测发酵液中生物量,第 240 小时取样检测发酵液中多杀菌素产量。

**1.5.2 响应面实验** 在单因素实验的基础上,对柠檬酸钠质量浓度( $A$ )、异亮氨酸添加的质量浓度( $B$ )和豆油体积分数( $C$ )采用 Box-Behnken 中心组合设计 3 因素 3 水平响应面分析及验证实验,以多杀菌素产量( $Y$ )为响应值确定 3 种成分的最适添加量,实验设计及结果见表 1。

## 1.6 发酵罐实验

为了进一步验证菌株 *S. spinosa* F5 的生产能力,在 5 L 发酵罐中进行了放大培养,发酵时间为 264 h。每隔 24 h 取样,测定发酵液中的多杀菌素产量、生物量、豆油质量浓度和葡萄糖质量浓度,记录 pH 和溶氧水平。为进一步提高菌株 *S. spinosa* F5 的产量,在 5 L 发酵罐中进行补料实验,在第 168 小时和第 216 小时同时补加质量浓度为 7 g/L 的葡萄糖和 3 g/L 的豆油。

## 1.7 检测方法

**1.7.1 多杀菌素酶标仪快速检测方法** 多杀菌素在 245 nm 处有最大吸收峰,且吸光度大小与多杀菌素质量浓度呈正比。在 24 孔板发酵结束后,10 000 r/min 离心 10 min 弃去上清液,每孔加入 1 mL 甲醇并混匀,先超声 20 min,再于 4 °C 静置提取 12 h,最后在 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 得到多

杀菌素粗提液,吸取 200  $\mu\text{L}$  粗提液于石英 96 孔酶标板中,在 245 nm 处测定吸光度。以每轮诱变的出发菌中提取的多杀菌素在 245 nm 处的吸光度作为阴性对照。

**1.7.2 多杀菌素质量浓度 HPLC 检测方法** 摇瓶发酵结束后,取 1 mL 发酵液,加入 4 mL 甲醇混匀,接 1.7.1 中超声静置和离心操作得到多杀菌素粗提液,再将粗提液用 0.45  $\mu\text{m}$  的有机系滤膜过滤至液相瓶中,利用 HPLC 检测多杀菌素的质量浓度。HPLC 检测条件为色谱柱:Agilent SB C18,流动相甲醇-乙腈-乙酸铵溶液(体积比 450.0:500.0:0.5);流量:1 mL/min;进样量:10  $\mu\text{L}$ ;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长:245 nm。

**1.7.3 葡萄糖质量浓度检测方法** 用生物传感分析仪测定发酵上清液中葡萄糖的质量浓度。

**1.7.4 生物量检测方法** 参照文献[16]中的步骤检测菌体干质量。

**1.7.5 豆油质量浓度检测方法** 参照文献[17]中的步骤检测豆油的质量浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 复合诱变及筛选

**2.1.1 链霉素和鼠李糖添加质量浓度的确定** 高质量浓度链霉素可以诱导编码核糖体 30S 亚基中 S12 蛋白的 *rpsL* 基因突变,该突变会使核糖体的结构发生改变,从而影响次级代谢产物的表达水平<sup>[18-19]</sup>。鼠李糖不仅是合成刺糖多孢菌细胞壁的重要成分,也是合成多杀菌素的重要前体,筛选耐高质量浓度鼠李糖的突变菌,可以使刺糖多孢菌利用更多的鼠李糖<sup>[20-21]</sup>。因此,获得对链霉素和鼠李糖具有抗性的突变菌株生产多杀菌素的水平可能会有所提高。如图 1 所示,筛选因子的添加质量浓度越大,对菌株 *S. spinosa* T1 生长的抑制作用越显著,当链霉素和鼠李糖的质量浓度分别为 20 mg/L 和 15 g/L 时,菌株 *S. spinosa* T1 生长完全受到抑制。因此,抗性平板中链霉素和鼠李糖添加的质量浓度分别为 20 mg/L 和 15 g/L。

**2.1.2 ARTP 诱变及筛选** ARTP 诱变是通过产生高活性粒子(氦原子、氮原子和氧原子等)的等离子体射流对细胞内的基因造成损伤,导致基因在修复过程中发生突变<sup>[22-23]</sup>。如图 2 所示,诱变致死率随处

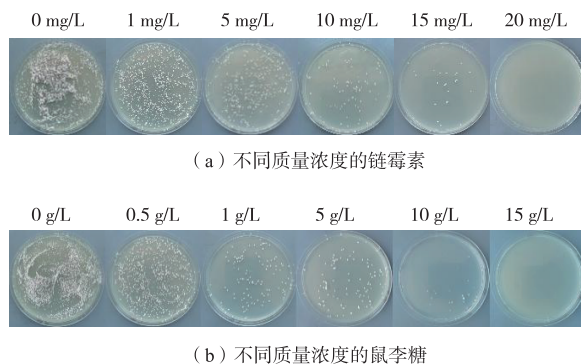


图 1 链霉素和鼠李糖对 *S. spinosa* T1 生长的影响  
Fig. 1 Effect of streptomycin and rhamnose on the growth of *S. spinosa* T1

理时间的增加而逐渐提高。当处理时间为 80 s 时,致死率为 86.64%,当处理时间为 100 s 时,致死率达到 100%。因此选择 ARTP 诱变的处理时间为 80 s。

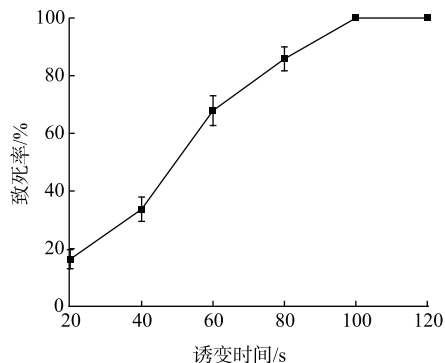


图 2 *S. spinosa* T1 的 ARTP 致死率曲线  
Fig. 2 ARTP lethality curve of *S. spinosa* T1

从链霉素和鼠李糖抗性筛选平板上共挑取 336 个长势较好的单菌落进行 24 孔板初筛,选择初筛中吸光度提高 20% 以上的突变菌进行摇瓶复筛,复筛结果见图 3。可以看出,突变菌 *S. spinosa* A19 的多杀菌素产量最高,达 510.92 mg/L,较出发菌株 *S. spinosa* T1 提高了 21.34%,因此选择突变菌 *S. spinosa* A19 进行后续诱变。

**2.1.3 DES 诱变及筛选** DES 是一种烷化剂,因其能够使基因中的部分碱基烷基化而广泛用于微生物的诱变育种<sup>[24]</sup>。如图 4 所示,诱变致死率随着处理时间的增加而逐渐升高。当处理时间为 40 min 时,诱变致死率为 84.37%,当处理时间为 60 min 时,诱变致死率达到 100%,因此选择的 DES 诱变时间为 40 min。

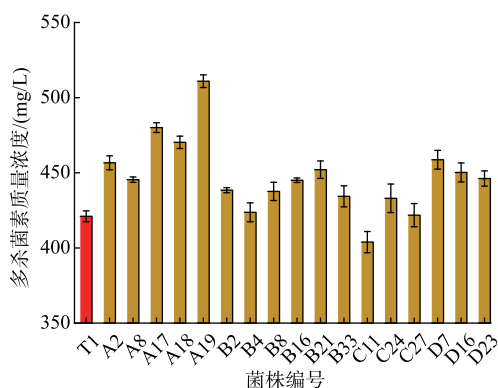
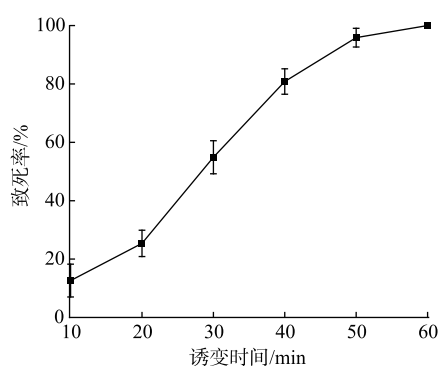


图3 ARTP 诱变菌株的复筛结果

Fig. 3 Rescreening results of ARTP mutagenic strains

图4 *S. spinosa* A19 的 DES 致死率曲线Fig. 4 DES lethality curve of *S. spinosa* A19

由于 *S. spinosa* A19 已具有链霉素抗性，所以此次筛选仅将诱变后孢子悬液涂布在鼠李糖抗性筛选平板上进行培养。从平板上挑取 288 个长势较好的单菌落进行 24 孔板初筛，选择初筛中吸光值提高 20% 以上的突变菌进行摇瓶复筛，复筛结果见图 5。突变菌 *S. spinosa* F5 的多杀菌素产量最高，达 572.31 mg/L，较 *S. spinosa* A19 提高了 12.02%，较 *S. spinosa* T1 提高了 35.92%。为了验证高产菌株 *S. spinosa* F5 的遗传稳定性，本实验对菌株 *S. spinosa* F5 进行连续 6 次传代培养，检测多杀菌素产量。传代第 2、4、6 次时，多杀菌素产量分别为 585.03、560.63、552.65 mg/L，总体变化幅度不大，表明菌株 *S. spinosa* F5 的遗传稳定性较好。

**2.1.4 高产菌株的发酵特性** 从图 6(a)可以看出，高产菌株 *S. spinosa* F5 和出发菌株 *S. spinosa* T1 生物量的变化趋势基本相同。0~24 h 为菌体的生长延滞期，24~120 h 为菌体的对数生长期，120~192 h 为菌体的生长稳定期。在此期间，菌株 *S. spinosa* F5 和 *S. spinosa* T1 均获得最大生物量，分别为 21.23 g/L

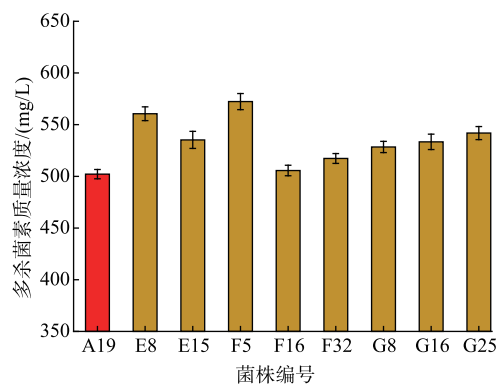


图5 DES 诱变菌株的复筛结果

Fig. 5 Rescreening results of DES mutagenic strains

和 18.25 g/L，提高了 16.32%，说明菌株 *S. spinosa* F5 的生长代谢更加旺盛。从图 6(b)可以看出，菌株 *S. spinosa* F5 的耗糖速度在发酵初期就明显快于菌株 *S. spinosa* T1，而且发酵结束时菌株 *S. spinosa* F5 发酵液中的残糖量明显低于菌株 *S. spinosa* T1，说明菌株 *S. spinosa* F5 利用葡萄糖进行糖代谢的能力得到增强。从图 6(c)中可以看出，菌株 *S. spinosa* F5 在发酵第 72 小时就有多杀菌素生成，比菌株 *S. spinosa* T1 提前了 24 h，随着发酵的进行，两株菌株的多杀菌素产量逐渐拉开差距，说明 *S. spinosa* F5 合成多杀菌素的能力有所提高。

## 2.2 多杀菌素合成诱导物的添加量优化

**2.2.1 单因素实验** 聚酮链的合成是多杀菌素生物合成的第一步，乙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 和甲基丙二酰辅酶 A 是聚酮链生物合成的重要前体<sup>[25-26]</sup>。柠檬酸钠能够转化为柠檬酸，在柠檬酸裂解酶的催化下产生乙酰辅酶 A，而乙酰辅酶 A 是多杀菌素合成的重要前体，因此探究了柠檬酸钠对菌株 *S. spinosa* F5 多杀菌素产量和生物量的影响。如图 7 (a)所示，当柠檬酸钠的质量浓度小于 0.3 g/L 时，生物量变化不大，但多杀菌素产量随着柠檬酸钠添加质量浓度的增加而增加，当柠檬酸钠的质量浓度为 0.3 g/L 时，多杀菌素产量达到最大值；当柠檬酸钠的质量浓度大于 0.3 g/L 时，生物量和多杀菌素产量均开始降低，因此选择柠檬酸钠添加的质量浓度为 0.3 g/L。

异亮氨酸可以转化为琥珀酰辅酶 A，并进一步产生甲基丙二酰辅酶 A，而甲基丙二酰辅酶 A 是多杀菌素合成的前体<sup>[14]</sup>，因此探究了异亮氨酸对菌株 *S. spinosa* F5 多杀菌素产量和生物量的影响。如图 7

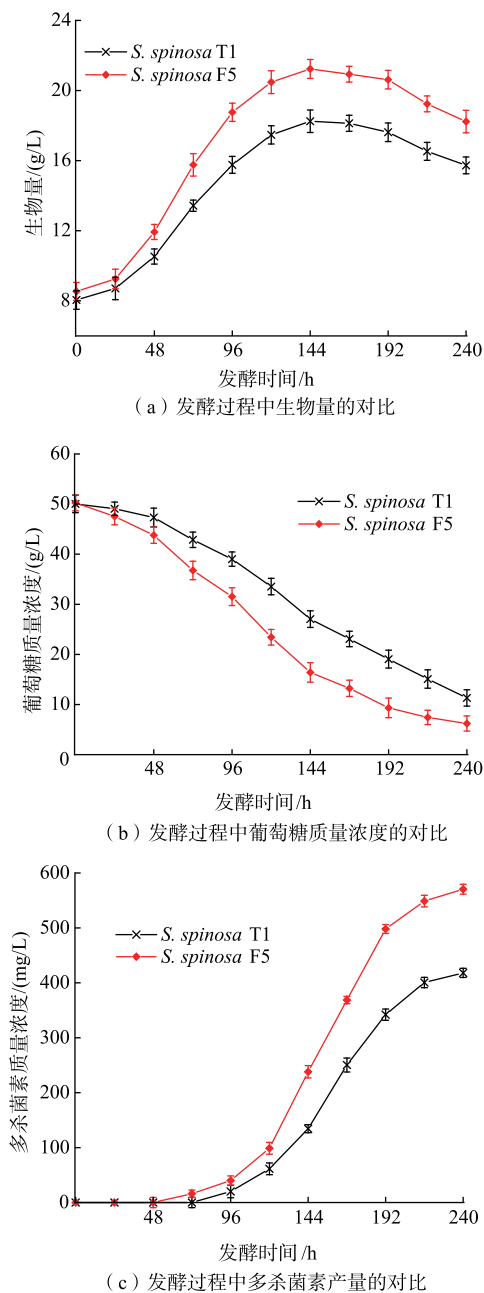


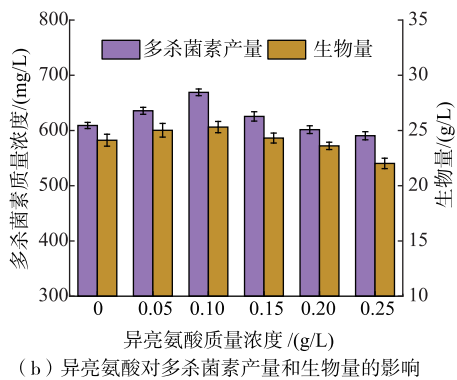
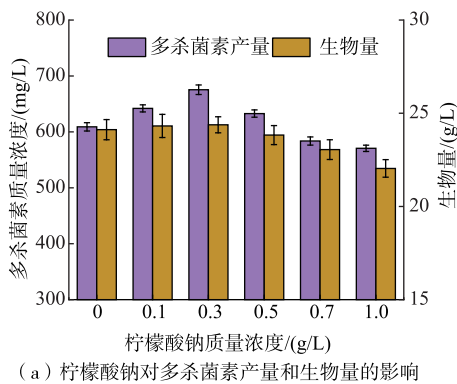
图 6 *S. spinosa* F5 与 *S. spinosa* T1 的摇瓶培养发酵过程参数

Fig. 6 Fermentation process parameters of *S. spinosa* F5 and *S. spinosa* T1 in shake flask culture

(b)所示,当异亮氨酸的质量浓度小于 0.10 g/L 时,生物量变化不大,但多杀菌素产量随着异亮氨酸添加质量浓度的增加而增加,当异亮氨酸的质量浓度为 0.10 g/L 时,多杀菌素产量达到最大值;当异亮氨酸的质量浓度大于 0.10 g/L 时,生物量和多杀菌素

产量均开始降低,这可能是由于过量的异亮氨酸会抑制细胞内丙酮酸羧化酶的活性,降低了细胞内乙酰辅酶 A 的浓度,对菌体的初级代谢和次级代谢产生不利影响<sup>[27]</sup>。因此选择异亮氨酸添加的质量浓度为 0.10 g/L。

豆油分解后可以产生大量脂肪酸,研究表明,在外源脂肪酸存在的情况下,刺糖多孢菌从头合成脂肪酸的转录显著下调,而脂肪酸 $\beta$ -氧化的转录显著上调,这可以为多杀菌素的生物合成提供大量酰基辅酶 A 类前体物质<sup>[25]</sup>。因此本实验探究了豆油对菌株 *S. spinosa* F5 多杀菌素产量和生物量的影响。如图 7(c)所示,多杀菌素产量和生物量均随豆油浓度的增加呈现先增加后减少的趋势,当豆油的体积分数为 2% 时,多杀菌素产量和生物量均达到最大值;继续添加豆油,多杀菌素产量和生物量反而下降,这可能是由于过量的豆油使发酵液的黏度增加,进而导致发酵液中溶氧水平降低,不利于菌体生长和生产多杀菌素<sup>[26]</sup>。因此选择豆油添加的体积分数为 2%。



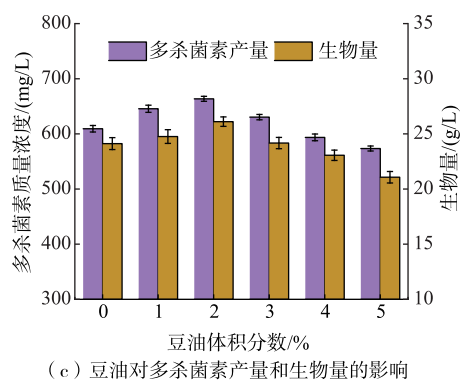


图7 不同质量浓度的柠檬酸钠、异亮氨酸和不同体积分数豆油对多杀菌素产量和生物量的影响

Fig. 7 Effects of different mass concentrations of sodium citrate, isoleucine and different volume fractions of soybean oil on the spinosad yield and biomass

**2.2.2 响应面实验** 在单因素实验的基础上进行响应面优化实验,结果见表1。采用软件Design-Expert 13 软件对表1的数据进行二次多项式拟合,得到回归模型为:

$$Y = 699.98 + 14.29A - 4.18B - 4.07C + 4.56AB - 7.97AC - 0.25BC - 10.26A^2 - 10.42B^2 - 21.99C^2$$

对表1的数据进行方差分析:模型的显著性  $P < 0.0001$ ,说明该方程具有较好的拟合度;失拟项为  $0.1678 > 0.05$ ,表明该模型有效;方程的决定系数  $R^2 = 0.9782$ ,表明该模型能够预测3种组分(柠檬酸钠、异亮氨酸和豆油)的添加量与多杀菌素产量之间的关系;方程的校正决定系数  $R^2_{Adj} = 0.9502$ ,表明该模型具有较高的可靠性,能够很好地描述实验结果。

根据上述模型,利用软件 Design-Expert 13 计算得出3种成分的最佳添加量分别为柠檬酸钠质量浓度  $0.46 \text{ g/L}$ 、异亮氨酸质量浓度  $0.10 \text{ g/L}$  和豆油体积分数  $1.77\%$ ,此条件下多杀菌素产量预测值为  $706.10 \text{ mg/L}$ 。按最佳添加量进行3组平行验证实验,得到多杀菌素产量为  $707.15 \text{ mg/L}$ ,与理论预测值相近,说明该模型能较好预测实验结果。

### 2.3 发酵罐实验

**2.3.1 分批发酵** 为了进一步验证菌株 *S. spinosa* F5 的生产能力,在  $5 \text{ L}$  发酵罐上进行了分批发酵实验,菌株 *S. spinosa* F5 的代谢过程参数如图8所示。可以看出,  $0 \sim 24 \text{ h}$  为菌体生长的延滞期,在此期间,菌体消耗氧气、葡萄糖和豆油较为缓慢,  $\text{pH}$  呈上升

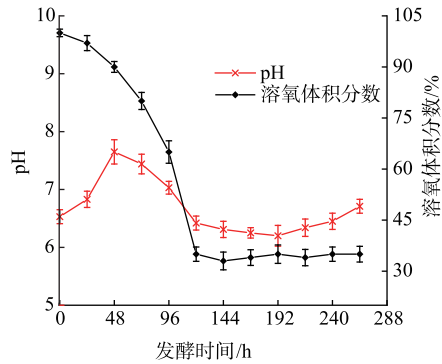
表1 响应面设计方案及实验结果

Table 1 Design scheme and experimental results of response surface methodology

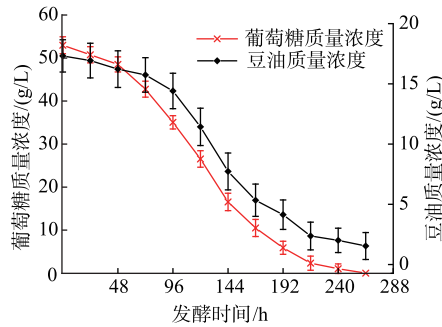
试验编号	A 柠檬酸钠 质量浓度/ (g/L)	B 异亮氨酸 质量浓度/ (g/L)	C 豆油 体积分数/ %	Y 多杀菌素 质量浓度/ (mg/L)
1	0.3	0.05	3	670.09
2	0.1	0.10	3	658.54
3	0.3	0.10	2	702.67
4	0.3	0.15	1	665.54
5	0.3	0.10	2	696.04
6	0.3	0.10	2	703.07
7	0.3	0.15	3	655.07
8	0.5	0.10	1	692.86
9	0.5	0.05	2	690.43
10	0.1	0.05	2	670.38
11	0.5	0.10	3	670.59
12	0.3	0.10	2	697.53
13	0.5	0.15	2	697.34
14	0.1	0.10	1	648.91
15	0.3	0.05	1	679.56
16	0.3	0.10	2	700.58
17	0.1	0.15	2	659.04

趋势,可能是菌体分解培养基中的氮源释放  $\text{NH}_4^+$  导致的;  $24 \sim 120 \text{ h}$  为菌体生长的对数期,菌体消耗氧气、葡萄糖和豆油的速度明显加快,菌体代谢产生大量酸性物质导致  $\text{pH}$  从  $48 \text{ h}$  开始下降,同时多杀菌素开始少量合成;  $120 \sim 192 \text{ h}$  为菌体生长的稳定期,发酵液中菌体的生物量达到最大值为  $31.07 \text{ g/L}$ ,在此期间多杀菌素大量合成;发酵  $192 \text{ h}$  后,发酵液中葡萄糖和豆油含量不足  $10 \text{ g/L}$ ,菌体进入衰亡期,多杀菌素合成速度明显减慢,直至  $240 \text{ h}$ ,多杀菌素停止合成,此时多杀菌素产量为  $785.56 \text{ mg/L}$ ,摇瓶发酵结果在  $5 \text{ L}$  发酵罐中得到了验证。

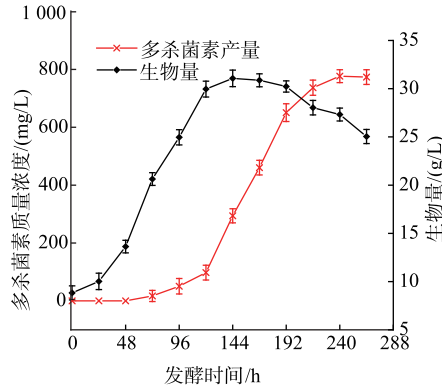
**2.3.2 分批补料发酵** 在发酵过程中适当补料可以缓解因营养物质不足而产生的菌体过早衰亡,延长菌体的生产期<sup>[28-29]</sup>。为了进一步提高多杀菌素产量,选择在发酵第  $168 \text{ h}$  和第  $216 \text{ h}$  进行补料实验。如图9所示,通过2次补料使葡萄糖质量浓度维持在  $10 \text{ g/L}$ ,豆油质量浓度维持在  $5 \text{ g/L}$ ,补料对  $\text{pH}$  和溶氧水平的影响不大,但延缓了菌体的衰亡,使多杀菌素的合成时间延长  $24 \text{ h}$ 。在发酵第  $240$



(a) 分批培养过程中pH值和溶氧变化



(b) 分批培养过程中葡萄糖和豆油质量浓度变化

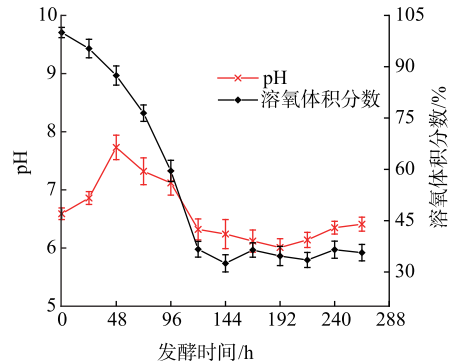


(c) 分批培养过程中多杀菌素产量和生物量变化

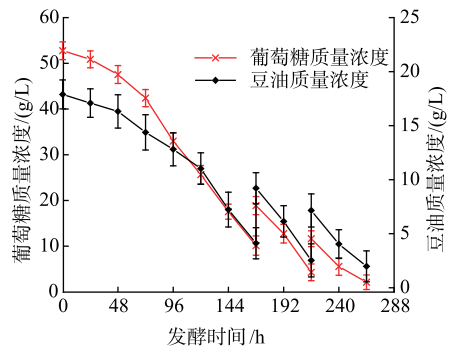
图8 发酵罐分批培养过程中的代谢参数

Fig. 8 Metabolic parameters during batch culture in fermentor

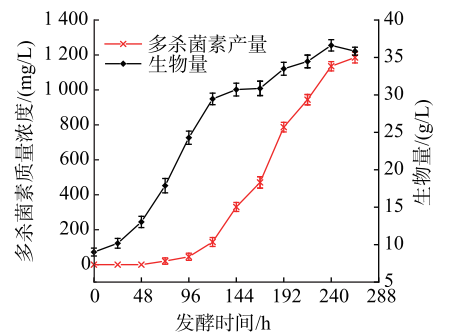
小时,生物量达到最大值为 36.97 g/L,比批发酵提高了 18.99%。在发酵第 268 小时,多杀菌素产量达到最大值为 1 175.45 mg/L,比批发酵提高了 49.63%,可见分批补料发酵可以明显提高多杀菌素产量。尽管如此,此产量与文献中报道的多杀菌素产量(2 155 mg/L)相比仍有一定差距<sup>[4]</sup>,可能是由于其使用的菌种遗传性能较为优良,而且发酵培养基中氮源种类非常丰富。因此后续实验可以围绕菌株 *S. spinosa* F5 遗传物质的进一步改造和发酵培养基中混合氮源的选择展开。



(a) 分批补料培养过程中pH值和溶氧水平变化



(b) 分批补料培养过程中葡萄糖和豆油质量浓度变化



(c) 分批补料培养过程中多杀菌素产量和生物量变化

图9 发酵罐分批补料培养过程中的代谢参数

Fig. 9 Metabolic parameters in fed-batch culture of fermentor

### 3 结语

作者通过 ARTP-DES 复合诱变结合链霉素和鼠李糖抗性筛选获得一株高产菌株 *S. spinosa* F5, 其多杀菌素产量较初始菌 *S. spinosa* T1 提高近 40%。通过系统优化得到柠檬酸钠和异亮氨酸多杀菌素合成诱导物的适宜添加质量浓度分别为 0.46 g/L 和 0.10 g/L, 豆油体积分数 1.77%, 此条件发酵多杀菌素产量可达 700 mg/L 以上。最后在 5 L 发酵罐中对高产菌株 *S. spinosa* F5 进行分批补料实验, 多杀菌素产量达到 1 100 mg/L 以上, 该研究对多杀菌素在中国产业化发展提供了一定的参考价值。



## 参考文献:

- [ 1 ] SANTOS V S V, PEREIRA B B. Properties, toxicity and current applications of the biolarvicide spinosad [J]. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews**, 2020, 23(1): 13-26.
- [ 2 ] SHALABY A, EL-SHEIKH E S, REFAAT A, et al. Residue analysis and associated risk assessment of hexythiazox and spinosad applied on strawberry plants[J]. **Egyptian Journal of Chemistry**, 2022, 65(11):489-498.
- [ 3 ] SISODIYA N, TILAK R, et al. Laboratory evaluation of spinosad as a potential larvicide against immature forms of *Aedes aegypti* [J]. **Journal of Marine Medical Society**, 2021, 23(2): 135-138.
- [ 4 ] 和富明, 田杰伟, 刘文林, 等. 多杀菌素发酵培养基优化及发酵工艺研究[J]. 天津农业科学, 2022, 28(11): 35-39.  
HE F M, TIAN J W, LIU W L, et al. Study on optimization of culture medium and fermentation process of spinosad[J]. **Tianjin Agricultural Sciences**, 2022, 28(11): 35-39. (in Chinese)
- [ 5 ] TAO H, ZHANG Y C, DENG Z X, et al. Strategies for enhancing the yield of the potent insecticide spinosad in actinomycetes[J]. **Biotechnology Journal**, 2019, 14(1): e1700769.
- [ 6 ] LI H G, LUO W, GU Q Y, et al. Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy ion beam implantation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine induction [J]. **Bioresource Technology**, 2013, 137: 254-260.
- [ 7 ] LI X Y, LIU R J, LI J, et al. Enhanced arachidonic acid production from *Mortierella alpina* combining atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and diethyl sulfate treatments[J]. **Bioresource Technology**, 2015, 177: 134-140.
- [ 8 ] JIN Z H, XU B, LIN S Z, et al. Enhanced production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by genome shuffling[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2009, 159(3): 655-663.
- [ 9 ] 王海霞. MPMS 诱变结合抗生素抗性选育多杀菌素高产菌[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2015.
- [ 10 ] LIANG Y, LU W Y, WEN J P. Improvement of *Saccharopolyspora spinosa* and the kinetic analysis for spinosad production[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2009, 152(3): 440-448.
- [ 11 ] 扶教龙, 徐敏强, 张松, 等. 多杀菌素产生菌复合诱变选育及发酵培养基优化[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(7): 824-830.  
FU J L, XU M Q, ZHANG S, et al. Breeding of spinosad producing strains by combined mutation and optimization of fermentation medium[J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2018, 43(7): 824-830. (in Chinese)
- [ 12 ] LAN Z, ZHAO C, GUO W Q, et al. Optimization of culture medium for maximal production of spinosad using an artificial neural network-genetic algorithm modeling[J]. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 2015, 25(4): 253-261.
- [ 13 ] LU C Z, YIN J, ZHANG C B, et al. Fed-batch fermentation for spinosad production in an improved reactor[J]. **Transactions of Tianjin University**, 2017, 23(6): 530-537.
- [ 14 ] 王美玲. 多杀菌素高产菌株的选育及发酵工艺的优化[D]. 天津: 天津大学, 2013.
- [ 15 ] 王德金. 多杀菌素产生菌菌种选育与发酵工艺的初步研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [ 16 ] 梁剑光, 栗波, 赵明霞, 等. 常压室温等离子体技术快速选育多杀菌素高产菌[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2021, 33(4): 30-40.  
LIANG J G, LI B, ZHAO M X, et al. Mutation breeding of a high doramectin producing strain by atmospheric pressure and room temperature plasma technology[J]. **Journal of Changzhou University (Natural Science Edition)**, 2021, 33(4): 30-40. (in Chinese)
- [ 17 ] 张旭, 王金龙, 胡江林. 聚醚类抗生素发酵液中残油含量的比色法检测[J]. 生物技术, 2007, 17(2): 47-49.  
ZHANG X, WANG J L, HU J L. Determination of oil in the broth of the polyether antibiotics fermentation by colorimetry[J]. **Biotechnology**, 2007, 17(2): 47-49. (in Chinese)
- [ 18 ] OCHI K. From microbial differentiation to ribosome engineering[J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2007, 71(6): 1373-1386.
- [ 19 ] OKAMOTO S, TAMARU A, NAKAJIMA C, et al. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria[J]. **Molecular Microbiology**, 2007, 63(4): 1096-1106.
- [ 20 ] 张昶, 扶教龙, 张瀚, 等. 多杀菌素生产菌诱变选育的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(10): 910-916.  
ZHANG Y, FU J L, ZHANG H, et al. Progress in mutation breeding of spinosad producing strains[J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2021, 46(10): 910-916. (in Chinese)

- [21] 胡海艳,黄魁英,杨冠东,等. 推理选育与抗性筛选在罗咪酯肽高产菌的育种研究[J]. 中国抗生素杂志,2016,41(5):340-343.  
HU H Y, HUANG K Y, YANG G D, et al. Rational selection and resistance screening on the romidepsin high yield bacteria's breeding research[J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2016, 41(5):340-343. (in Chinese)
- [22] 黎青华,堵国成,李江华,等. 红曲色素高产菌的诱变选育与发酵优化[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(11):18-24.  
LI Q H, DU G C, LI J H, et al. Mutation breeding and fermentation optimization of the strain with high-yield of Monascus red pigment[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2020, 39(11):18-24. (in Chinese)
- [23] 杨自名,薛正莲,王洲,等. 基于 ARTP 技术选育维生素 K<sub>2</sub> 优势菌株及发酵培养基优化[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(11):56-64.  
YANG Z M, XUE Z L, WANG Z, et al. Screening of high-yield vitamin K<sub>2</sub> strain based on ARTP technology and optimization of fermentation medium[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2020, 39(11):56-64. (in Chinese)
- [24] 袁超,袁丹丹,赵建刚,等. 硫酸二乙酯与紫外线复合诱变选育糖化酶高产菌株的研究[J]. 食品与药品,2018,20(3):219-223.  
YUAN C, YUAN D D, ZHAO J G, et al. Breeding of glucoamylase high-yield strains using compound mutagenesis induced by diethyl sulfate and ultraviolet rays[J]. **Food and Drug**, 2018, 20(3):219-223. (in Chinese)
- [25] ZHANG Y P, LIU X M, YIN T, et al. Comparative transcriptomic analysis of two *Saccharopolyspora spinosa* strains reveals the relationships between primary metabolism and spinosad production[J]. **Scientific Reports**, 2021, 11(1):14779.
- [26] HUANG Y, ZHANG X L, ZHAO C, et al. Improvement of spinosad production upon utilization of oils and manipulation of  $\beta$ -oxidation in a high-producing *Saccharopolyspora spinosa* strain[J]. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 2018, 28(2):53-64.
- [27] 李桢林,江维,王永红,等. Val、Ile 及 Leu 对必特螺旋霉素生物合成的影响[J]. 中国抗生素杂志,2007,32(11):660-668.  
LI Z L, JIANG W, WANG Y H, et al. Effect of valine, isoleucine and leucine on the biosynthesis of biotechspiramycin[J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2007, 32(11):660-668. (in Chinese)
- [28] 王云龙,刘松,冯岳,等. L-天冬酰胺酶的补料分批发酵[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(3):1-8.  
WANG Y L, LIU S, FENG Y, et al. Fed-batch fermentation of L-asparaginase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2020, 39(3):1-8. (in Chinese)
- [29] 唐群芳,李江华,刘龙,等. 耐有机溶剂  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的补料分批发酵研究[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(1):12-18.  
TANG Q F, LI J H, LIU L, et al. Enhanced production of solvent-stable alpha glycosidase from *Bacillus licheniformis* JXC-1 by an optimal feeding strategy[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(1):12-18. (in Chinese)

(责任编辑:张馨文)