

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.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.024

# 丁烯基多杀菌素高产菌株的诱变选育及培养基优化

陈爽<sup>1,2</sup>, 赵晨<sup>2</sup>, 黎琪<sup>2</sup>, 王超<sup>2</sup>, 张晓琳<sup>2</sup>, 张云鹏<sup>2</sup>, 李金萍<sup>3</sup>, 方俊<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128; 2. 国家粮食局科学研究院, 北京 100037; 3. 北京市植物保护站, 北京 100029)

**摘要:**利用不同剂量的亚硝基胍(nitroso-guanidin, 简称 NTG)对须糖多孢菌(*Saccharopolyspora pogona*) ASAGF58 诱变处理不同时间,通过 96 孔板发酵培养结合生物检测进行高通量筛选;利用单因素试验和正交试验,对高产菌株产丁烯基多杀菌素的发酵培养基进行碳源、氮源优化。结果表明,从 5 mg/mL NTG 诱变处理 50 min 的突变株中,筛选出 1 株遗传稳定且丁烯基多杀菌素产量明显提高的突变菌株 2-G4,该菌株丁烯基多杀菌素发酵产量比出发菌株提高 86.7%;优化获得的最佳培养基配方为 100.00 g/L 葡萄糖、50.00 g/L 糊精、20.00 g/L 玉米浆干粉、80.00 g/L 棉籽蛋白、5.00 g/L NaCl、5.00 g/L CaCO<sub>3</sub>、1.02 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 值为 7.2。2-G4 菌株在该优化培养基中的丁烯基多杀菌素产量比优化前提高 52.1%。

**关键词:**丁烯基多杀菌素;亚硝基胍;须糖多孢菌;诱变;正交试验;培养基优化

**中图分类号:**S482.3<sup>+</sup>9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)09-0108-04

丁烯基多杀菌素(butenyl-spinosyns)<sup>[1-3]</sup>是由土壤放线菌须糖多孢菌(*Saccharopolyspora pogona*)代谢产生的一类与多杀菌素结构类似、杀虫机制相同的大环内酯类杀虫剂<sup>[4-5]</sup>。其杀虫谱比多杀菌素更为广泛,对多杀菌素无法控制的烟青虫<sup>[6]</sup>、苹果蠹蛾、马铃薯甲虫等均有较好的杀虫活性<sup>[7-9]</sup>。其杀虫机制与多杀菌素相同,通过作用于昆虫的神经系统,致其非功能性的肌肉收缩、衰竭,并伴随颤抖和麻痹,最终导致死亡<sup>[10-12]</sup>。此外,丁烯基多杀菌素比多杀菌素具有更多的衍生物,到目前为止,已检测到 30 多种丁烯基多杀菌素衍生物<sup>[1]</sup>,丁烯基多杀菌素作为一种新型的生物农药在防治害虫方面有良好的应用价值和广阔的市场前景。

通过理化诱变筛选丁烯基多杀菌素高产菌株和培养基优化是提高其发酵产量的主要方法<sup>[13]</sup>。目前,常规的诱变选育方法仍然是获得高产菌株的有效手段之一<sup>[14-15]</sup>,其中亚硝基胍(nitroso-guanidin, 简称 NTG)是一种超诱变剂,应用广泛,能与 1 个或几个酸碱基反应,引起 DNA 复制时碱基配对的转换而发生遗传变异<sup>[16]</sup>。本研究利用 NTG 对前期筛选到的

ASAGF58 菌株进行诱变,拟筛选丁烯基多杀菌素稳定高产突变株,并通过单因素试验和正交试验对高产突变株的发酵培养基进行优化,以期获得高产丁烯基多杀菌素的配方。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 须糖多孢菌(*S. pogona*) ASAGF58 由国家粮食局科学研究院发酵生物技术实验室筛选和保藏。

1.1.2 生测幼虫 埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)由中国疾病预防控制中心提供。

1.1.3 培养基 产孢培养基:10.00 g/L 葡萄糖,5.00 g/L 酪蛋白胨,5.00 g/L 酵母提取物,5.00 g/L 牛肉膏,0.74 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O,15.00 g/L 琼脂,pH 值为 7.2。诱变种子培养基:30.0 g/L 胰蛋白大豆肉汤,3.0 g/L 酵母提取物,2.0 g/L MgSO<sub>4</sub>,10.0 g/L 葡萄糖,pH 值为 7.2。诱变发酵培养基:64.80 g/L 葡萄糖,54.60 g/L 糊精,15.00 g/L 酵母膏,9.00 g/L 酵母提取物,15.00 g/L 胨化牛奶,1.20 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,3.00 g/L NaCl,0.05 g/L FeSO<sub>4</sub>,1.00 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH 值为 7.2。种子培养基:10.0 g/L 糊精,30.0 g/L 酪蛋白胨,3.0 g/L 酵母提取物,2.0 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,pH 值为 7.2。发酵培养基:60.00 g/L 葡萄糖,20.00 g/L 玉米浆干粉,5.00 g/L NaCl,5.00 g/L CaCO<sub>3</sub>,1.02 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,pH 值为 7.2。以上培养基均于 115 ℃ 灭菌 25 min。

术研究与示范——公益性行业(农业)科研专项“小菜蛾可持续防控技术与示范”进展[J]. 应用昆虫学报,2011,48(2):247-253.

[16]张贵云,张丽萍,刘珍,等. 山西十字花科小菜蛾种群消长动态及几种杀虫剂的触杀毒性比较[J]. 应用昆虫学报,2011,48(2):260-266.

[17]周晓榕,常静,庞保平,等. 内蒙古小菜蛾种群数量动态及抗药性监测[J]. 应用昆虫学报,2013,50(1):173-179.

收稿日期:2017-12-07

基金项目:北京市科技重大专项(编号:Z171100001317014)。

作者简介:陈爽(1991—),女,四川宜宾人,硕士研究生,主要从事微生物菌种改良的研究。E-mail:296430441@qq.com。

通信作者:方俊,博士,教授,主要从事农业废弃物资源化利用方面的研究。E-mail:363884835@qq.com。

*maculipennis*(Curt.)[J]. Nature,1966,210(5032):217-218.

[13]Hardy J E. *Plutella maculipennis* Curt., its natural and biological control in England[J]. Bulletin of Entomological Research,1938,29(4):343-372.

[14]Talekar N S,Shelton A M. Biology,ecology,and management of the diamondback moth[J]. Annual Review of Entomology,1993,38:275-301.

[15]冯夏,李振宇,吴青君,等. 小菜蛾抗性治理及可持续防控技

1.1.4 主要试剂与仪器  $\text{CH}_3\text{OH}$ 、 $\text{CH}_3\text{CN}$  均为色谱纯,均购自德国 Merck 公司;碳源均为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司;氮源均为分析纯,均购自英国 Oxoid 公司。

Waters 515/2487 型高效液相色谱仪,购自美国 Waters 公司;全自动移液工作站 epMotion 5070,购自德国 Eppendorf 公司;ISF12X 恒温恒湿摇床,购自瑞士 Adolf Kuhner 公司;HPS400 生化培养箱,购自哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;离心机,购自德国 Eppendorf 公司;96 孔细胞培养板,购自美国 BD 公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 制备孢子悬浮液 将出发菌株在产孢培养基上于 28~30℃ 培养 6~8 d,用 0.08% 葡萄糖溶液冲洗斜面,用无菌竹签将成熟孢子轻轻刮下,将孢子液移入含有玻璃珠的三角瓶中,振荡。打散后的孢子液于孢子过滤器中进行过滤,收集孢子悬浮液在 28~30℃ 孵育 8 h,孢子萌发后用血球计数板计数,孢子悬浮液浓度约控制在  $10^8$  个/mL。

1.2.2 NTG 诱变 取萌发好的孢子悬浮液分别分装于含有 2、3、4、5 mg/mL NTG 溶液的 Eppendorf 管中,充分混匀,分别处理 10、20、30、40、50、60 min 后,于 4 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用生理盐水洗涤 3 次后,取 100  $\mu\text{L}$  孢子悬浮液进行 10 倍梯度稀释涂平板,每个梯度设 3 个重复;取未经 NTG 诱变的孢子悬浮液进行稀释涂布,每个稀释度设置 3 个重复,作为对照组。将平板置于 29℃ 培养 6~8 d,形成单菌落。

1.2.3 生测初筛 向 96 孔板发酵液中加入 2 倍体积的甲醇浸提丁烯基多杀菌素,振荡,4 000 r/min 离心 15 min,取 100  $\mu\text{L}$  上清液于新的 96 孔板中,避光条件下将有机溶剂挥发干净,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  去离子水复溶丁烯基多杀菌素,再向每孔加入 5~8 头埃及伊蚊幼虫,每隔 1 h 观察记录 1 次试验结果。每组试验设置 3 个重复<sup>[17]</sup>。

1.2.4 培养条件 96 孔板种子培养:接种量为 15%,温度为 29℃,摇床转速为 280 r/min,一级种子培养 60 h,二级种子培养 48 h。96 孔板发酵培养:接种量为 15%,温度为 29℃,摇床转速为 280 r/min,培养 8~10 d。种子摇瓶培养:300 mL 三角瓶接种量为 10%,温度为 29℃,摇床转速为 240 r/min,培养 48 h。发酵摇瓶培养:300 mL 三角瓶接种量为 10%,温度为 29℃,摇床转速为 240 r/min,培养 7 d。

1.2.5 发酵液测定方法 丁烯基多杀菌素发酵产量的测定:取 2 mL 发酵液,加入 4 mL 甲醇浸提 15 min,振荡混匀,4 000 r/min 离心 15 min,取 1 mL 上清液,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography,简称 HPLC)分析。HPLC 分析条件:Waters515 型高效液相色谱仪,安捷伦 XDB-C18 反向色谱柱,流动相中甲醇、乙腈、水的体积比为 45:45:10(0.05% 乙酸铵用水溶解后与有机试剂混合组成流动相),流速 1.0 mL/min,检测波长为 244 nm。根据积分面积,计算产量。

生物量测定:取 8 mL 发酵液,4 000 r/min 离心 15 min,计算固体沉淀占发酵液的质量分数。

1.2.6 发酵培养基优化 单一碳源:以葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、糊精、甘油、可溶性淀粉等作为单一碳源,添加量均为 60 g/L,基础发酵培养基中其他组分不变。复合碳源:60 g/L 葡萄糖分别与 10、20、30、40、50 g/L 可溶性淀粉、

糊精、甘露醇等搭配。速效氮源:玉米浆干粉、牾化牛奶、酵母膏、牛肉膏;迟效氮源:以棉籽蛋白、大豆饼粉、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、酵母提取物、乳清蛋白等作为单一氮源,添加量均为 20 g/L,其他组分不变。复合氮源:20 g/L 玉米浆干粉分别与 20 g/L 棉籽蛋白、大豆饼粉、乳清蛋白等搭配。正交试验:将葡萄糖、糊精、玉米浆干粉、棉籽蛋白等进行 4 因素 4 水平正交试验。

1.2.7 数据处理 数据采用 Excel、Origin 8.0、SPSS 16.0 for Windows 等软件进行分析。

致死率 = [(诱变前总菌落数 - 诱变处理后的总菌落数) / 诱变前总菌落数] × 100%; 突变率 = 正突变率 + 负突变率。

## 2 结果与分析

### 2.1 NTG 诱变对须糖多孢菌的作用

2.1.1 NTG 对 ASAGF58 菌株的诱变效应 由图 1 可知,不同浓度的 NTG 对 ASAGF58 菌株的致死率均随着诱变时间的延长而增大,其中高浓度的 NTG 诱变效果明显强于低浓度。据报道,致死率为 80.0%~90.0% 时,正突变菌株较多,致死率为 90.0%~99.9% 时,负突变菌株较多<sup>[14]</sup>。NTG 浓度为 2、3 mg/mL 时,最大致死率不足 50%,因此不进行统计分析。对 ASAGF58 菌株的正负突变率进行分析,由图 1、图 2 可知,当 NTG 浓度为 4 mg/mL 时,诱变 50 min 时致死率为 85%,此时正突变率最大,为 29%;当 NTG 浓度为 5 mg/mL 时,诱变 30 min 时致死率为 88%,此时正突变率最大,为 25%,这与何新舟等的研究结果<sup>[14]</sup>一致。挑取 1 500 株单菌落经初筛、复筛后,得到 28 株丁烯基多杀菌素产量提高 20% 以上的突变菌株,7 株产量提高 30% 以上的突变菌株。其中,7 株高产菌株对应不同的 NTG 浓度和时间,说明 NTG 诱变对丁烯基多杀菌素产量的影响是随机的。

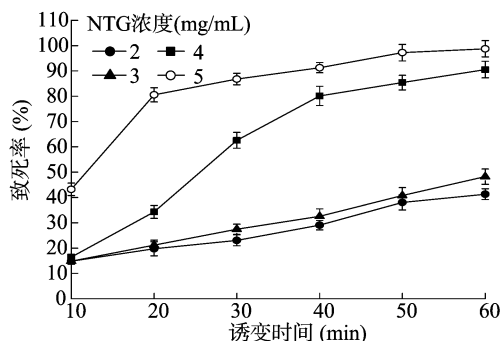


图1 NTG 浓度和诱变时间对须糖多孢菌致死率的影响

2.1.2 高产菌株遗传稳定性验证 由于突变菌株自身携带修复机制以及遗传不稳定性等特点,在进行菌种转接过程中可能会出现表型延迟现象,导致突变株发酵产量下降<sup>[18]</sup>。因此,须要对筛选出的 7 株高产突变菌株进行遗传稳定性验证。由图 3 可知,2-G4 突变株转接 3、4 次后丁烯基多杀菌素发酵产量与转接 2 次相比,分别提高 3.2%、1.08%;与转接 2 次相比,9-H11 突变株在转接 3 次时产量下降 5.3%,转接 4 次时产量提高 10.53%,产量变化幅度超过 10%,表明 9-H11 菌株的遗传稳定性较差;此外,其余 5 个菌株与 2-G4 菌株相比相对产量较低。ASAGF58 菌株经 NTG 诱变后筛选

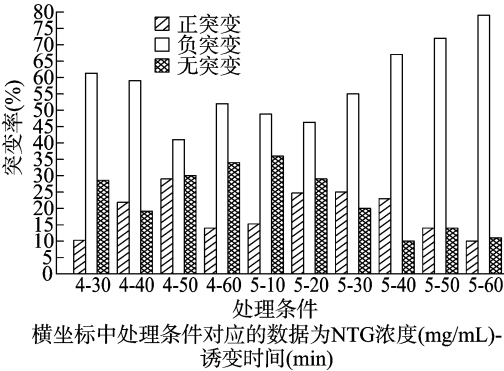


图2 不同 NTG 浓度和诱变时间对须糖多孢菌突变率的影响

出 1 株发酵产量较高,且遗传稳定的突变菌株 2 - G4 (5 mg/mL NTG 诱变 50 min),与出发菌株相比,其丁烯基多杀菌素产量提高 86.7%。

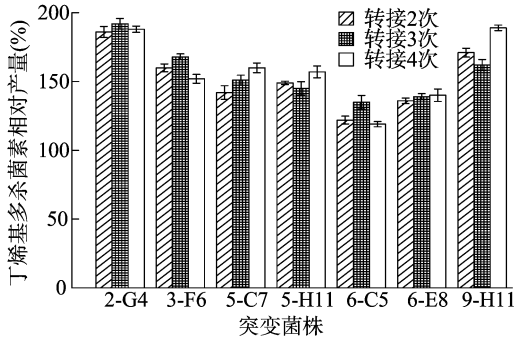


图3 突变菌株的遗传稳定性

2.2 发酵培养基优化

2.2.1 碳源筛选 碳源、氮源是培养基的重要组成部分,同时严重影响菌体生长及微生物次级代谢产物的产量。以高产菌株 2 - G4 作为出发菌株,前期预试验结果显示,除葡萄糖、甘露醇外,突变菌株 2 - G4 在其余几种单一碳源培养基中丁烯基多杀菌素的产量均为 0,而以葡萄糖作为单一碳源时,丁烯基多杀菌素发酵产量和生物量都优于甘露醇。因此,选择葡萄糖作为碳源进行下一步的优化试验。由表 1 可知,培养 7 d 后菌体的生物量均有所增加,尤其当葡萄糖与 30 g/L 糊精搭配时生物量达到最大值,为 6.53%;同时,大部分复合碳源发酵后均有利于丁烯基多杀菌素产生,其中当糊精加入量为 50 g/L 时,相对产量达到最大值,为 111.6%,其次是糊精加入量为 40 g/L 时。可能是葡萄糖作为速效碳源,前期容易被菌体很好地吸收利用,而作为迟效碳源的糊精在发酵过程中缓慢分解成葡萄糖被利用。因此,选择 60 g/L 葡萄糖和 50 g/L 糊精进行下一步培养基优化试验。

2.2.2 氮源筛选 由表 2 可知,大多数单一有机氮源的添加均有利于 2 - G4 突变菌株产丁烯基多杀菌素,特别是含有玉米浆干粉的培养基,突变菌株经发酵后丁烯基多杀菌素的相对产量最高,为 110%,酪化牛奶作为氮源时次之。从菌体生长情况来看,以酪化牛奶作为单一氮源时所获得的菌体生物量最高,为 6.4%,玉米浆干粉次之。考虑到培养基成本等因素,发酵培养基中添加 20 g/L 玉米浆干粉对丁烯基多杀菌素的生成有明显的促进作用。

由图4可知,玉米浆干粉与棉籽蛋白、大豆饼粉搭配时,

表 1 不同碳源对菌体生长和丁烯基多杀菌素合成的影响

| 复合碳源             | 生物量 (%)     | 丁烯基多杀菌素相对产量 (%) |
|------------------|-------------|-----------------|
| GS <sub>10</sub> | 4.24 ± 0.12 | 92.1 ± 1.73     |
| GS <sub>20</sub> | 4.78 ± 0.05 | 94.3 ± 2.14     |
| GS <sub>30</sub> | 4.84 ± 0.10 | 106.4 ± 2.69    |
| GS <sub>40</sub> | 5.01 ± 0.16 | 102.1 ± 3.98    |
| GS <sub>50</sub> | 5.12 ± 0.11 | 105.8 ± 4.80    |
| GD <sub>10</sub> | 5.24 ± 0.09 | 98.2 ± 2.75     |
| GD <sub>20</sub> | 5.33 ± 0.11 | 104.3 ± 3.75    |
| GD <sub>30</sub> | 6.53 ± 0.08 | 106.9 ± 2.31    |
| GD <sub>40</sub> | 6.11 ± 0.04 | 107.5 ± 2.39    |
| GD <sub>50</sub> | 5.57 ± 0.07 | 111.6 ± 1.19    |
| GM <sub>10</sub> | 3.62 ± 0.02 | 100.5 ± 1.66    |
| GM <sub>20</sub> | 3.04 ± 0.13 | 103.9 ± 3.59    |
| GM <sub>30</sub> | 4.37 ± 0.18 | 105.3 ± 4.14    |
| GM <sub>40</sub> | 4.52 ± 0.14 | 96.8 ± 2.47     |
| GM <sub>50</sub> | 4.79 ± 0.08 | 98.6 ± 1.43     |

注:G 代表 60 g/L 葡萄糖;S 代表可溶性淀粉;D 代表糊精;M 代表甘露醇;字母下标数字代表相应的碳源含量,单位为 g/L。以 2 - G4 菌株在以葡萄糖作为单一碳源时丁烯基多杀菌素的产量作为 100%。

表 2 单一有机氮源对菌体生长和丁烯基多杀菌素合成的影响

| 单因素氮源 | 生物量 (%)    | 丁烯基多杀菌素相对产量 (%) |
|-------|------------|-----------------|
| 玉米浆干粉 | 6.0 ± 0.19 | 110.0 ± 4.12    |
| 酪化牛奶  | 6.4 ± 0.07 | 106.7 ± 2.92    |
| 乳清蛋白  | 5.4 ± 0.04 | 105.2 ± 4.38    |
| 大豆饼粉  | 4.5 ± 0.18 | 103.0 ± 3.26    |
| 酵母提取物 | 5.5 ± 0.13 | 101.3 ± 3.47    |
| 酵母膏   | 5.0 ± 0.08 | 99.7 ± 1.94     |
| 大豆蛋白胨 | 5.8 ± 0.09 | 85.5 ± 1.95     |
| 棉籽蛋白  | 4.2 ± 0.11 | 84.6 ± 2.11     |
| 酪蛋白胨  | 4.7 ± 0.10 | 71.9 ± 2.85     |

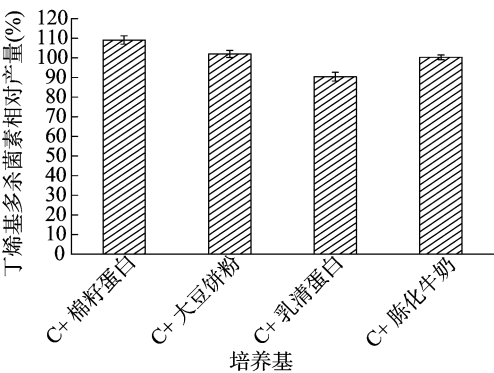
注:以 2 - G4 菌株在 60 g/L 葡萄糖、50 g/L 糊精为碳源的基础培养基中丁烯基多杀菌素的产量作为 100%。

丁烯基多杀菌素的相对产量明显高于它与乳清蛋白、酪化牛奶搭配时的产量。可能因为玉米浆干粉与棉籽蛋白、大豆饼粉搭配作氮源时,其氨基酸的种类及含量更适合丁烯基多杀菌素的产生。2 - G4 突变菌株在含棉籽蛋白的培养基中丁烯基多杀菌素的相对产量比含大豆饼粉的高 8%,因此,选择玉米浆干粉和棉籽蛋白作为复合氮源。

2.2.3 正交试验 根据单因素试验结果,设计 4 因素 4 水平的正交试验。由表 3 可知,各因素对丁烯基多杀菌素生成的影响表现为 C(玉米浆干粉用量) > A(葡萄糖用量) > B(糊精用量) > D(棉籽蛋白用量)。通过方差分析可知,突变菌株 2 - G4 产丁烯基多杀菌素的发酵培养基最佳碳源、氮源组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>4</sub>,即 100 g/L 葡萄糖、50 g/L 糊精、20 g/L 玉米浆干粉、80 g/L 棉籽蛋白。验证试验表明,突变菌株在该培养基中丁烯基多杀菌素的产量比优化前提高 52.1%。

3 讨论

以 ASAGF58 作为出发菌株进行不同 NTG 浓度 (2、3、4、



C代表玉米浆干粉；以突变菌株 2-G4在碳源、单一氮源优化后的培养基中丁烯基多杀菌素产量作为100%  
图4 复合有机氮源对丁烯基多杀菌素产量的影响

5 mg/mL)和不同作用时间(10、20、30、40、50、60 min)的诱变,通过 96 孔板发酵培养结合生物检测进行初筛、摇瓶复筛后,丁烯基多杀菌素产量提高 30% 以上的突变株有 7 株,经遗传稳定性验证后最终获得 1 株高产菌株 2-G4(5 mg/mL NTG 诱变 50 min),与出发菌株相比,其丁烯基多杀菌素产量提高 86.7%。其中,5 mg/mL NTG 比其他浓度的致死率高,负突变率也相对较高,而正突变率偏低,但筛选出的高产菌株大多数来自该浓度,表明诱变效果与致死率、突变率无明显相关性。说明 NTG 对丁烯基多杀菌素产量的影响是随机的。

表 3 正交试验结果

| 编号             | A:葡萄糖<br>用量<br>(g/L) | B:糊精<br>用量<br>(g/L) | C:玉米浆<br>干粉用量<br>(g/L) | D:棉籽<br>蛋白用量<br>(g/L) | 丁烯基多<br>杀菌素相对<br>产量(%) |
|----------------|----------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1              | 80                   | 50                  | 20                     | 40                    | 119.2±1.98             |
| 2              | 100                  | 60                  | 20                     | 60                    | 112.0±4.02             |
| 3              | 100                  | 40                  | 40                     | 80                    | 109.0±1.70             |
| 4              | 80                   | 60                  | 60                     | 80                    | 106.5±2.84             |
| 5              | 120                  | 50                  | 40                     | 60                    | 105.8±3.11             |
| 6              | 60                   | 40                  | 20                     | 20                    | 103.3±3.59             |
| 7              | 120                  | 70                  | 20                     | 80                    | 102.4±2.99             |
| 8              | 100                  | 50                  | 60                     | 20                    | 97.6±1.48              |
| 9              | 120                  | 40                  | 60                     | 40                    | 92.7±2.31              |
| 10             | 60                   | 50                  | 80                     | 80                    | 89.8±2.99              |
| 11             | 100                  | 70                  | 80                     | 40                    | 86.9±1.67              |
| 12             | 60                   | 70                  | 60                     | 60                    | 83.2±2.01              |
| 13             | 120                  | 60                  | 80                     | 20                    | 72.4±2.15              |
| 14             | 80                   | 70                  | 40                     | 20                    | 68.9±1.83              |
| 15             | 80                   | 40                  | 80                     | 60                    | 61.4±3.43              |
| 16             | 60                   | 60                  | 40                     | 40                    | 46.8±2.14              |
| k <sub>1</sub> | 80.8                 | 91.6                | 109.2                  | 85.6                  |                        |
| k <sub>2</sub> | 89.0                 | 103.1               | 82.6                   | 86.4                  |                        |
| k <sub>3</sub> | 101.4                | 84.4                | 95.0                   | 90.6                  |                        |
| k <sub>4</sub> | 93.3                 | 85.4                | 77.6                   | 101.9                 |                        |
| R              | 82.4                 | 74.7                | 126.4                  | 65.5                  |                        |

注:以 2-G4 菌在优化后的培养基中发酵产量为 100%。

以突变菌株 2-G4 为出发菌株,进行碳源、氮源单因素优化试验,结果显示,当培养基中加入葡萄糖、糊精、玉米浆干粉、棉籽蛋白时均能有效促进突变菌株的生长和丁烯基多杀菌素产量的提高。其中,葡萄糖作为速效碳源能被迅速分解利用参与生长代谢,糊精作为迟效碳源易被菌体水解为单糖后再利用,用于维持菌体代谢和产物合成;玉米浆干粉含有较为丰富

的蛋白质和生长因子,作为速效氮源能有效促进菌体生长,而棉籽蛋白的添加更有利于生产丁烯基多杀菌素。在此基础上进行 4 因素 4 水平正交试验,得到优化后的发酵培养基配方为 100.00 g/L 葡萄糖、50.00 g/L 糊精、20.00 g/L 玉米浆干粉、80.00 g/L 棉籽蛋白、5.00 g/L NaCl、5.00 g/L CaCO<sub>3</sub>、1.02 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,pH 值为 7.2。突变菌株 2-G4 在优化后的培养基中丁烯基多杀菌素的产量比优化前提高 52.1%。

参考文献:

[1]Lewer P, Hahn D R, Karr L L, et al. Discovery of the butenyl – spinosyn insecticides; novel macrolides from the new bacterial strain *Saccharopolyspora pogona*[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2009, 17(12):4185–4196.

[2]Hahn D R, Gustafson G, Waldron C, et al. Butenyl – spinosyns, a natural example of genetic engineering of antibiotic biosynthetic genes [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33(2):94–104.

[3]Hahn D R, Jackson J D, Bullard B S, et al. Biosynthetic genes for butenyl – spinosyn insecticide production; W002079477[P]. 2002 – 03 – 28.

[4]Huang K X, Xia L, Zhang Y, et al. Recent advances in the biochemistry of spinosyns [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(1):13–23.

[5]Chio E H. Spinosyn insecticides; part I. Blockbuster products from a remarkable discovery[J]. Formosan Entomol, 2011, 31(1):1–13.

[6]刘 佳,王 毅,郭线茹,等. 棉铃虫与烟青虫雌性信息素合成进展[J]. 农药, 2016, 10(55):703–706, 780.

[7]殷怀生,张文军. 苹果蠹蛾绿色防治药剂筛选试验[J]. 中国园艺文摘, 2017, 33(2):64–65.

[8]Millar N S, Denholm I. Niotinic acetylcholine receptors; targets for commercially important insecticides[J]. Invertebrate Neuroscience, 2007, 7(1):53–66.

[9]寿佳丽,袁娟萍. 新型生物农药——丁烯基多杀菌素[J]. 农药, 2011, 50(4):239–243, 272.

[10]Raymond – Delpech V, Matsuda K, Sattelle B M, et al. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides [J]. Invertebrate Neuroscience, 2005, 5(3/4):119–133.

[11]Kirst H A. The spinosyn family of insecticides; realizing the potential of natural products research[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(3):101–111.

[12]华乃震. 绿色环保生物杀虫剂多杀霉素和乙基多杀菌素的述评[J]. 农药, 2015, 54(1):1–5.

[13]郭 洋,徐 妙,罗林根,等. 丁烯基多杀菌素高产菌株的巴龙霉素抗性筛选[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(1):106–114.

[14]何新舟,查东风,黄汉峰,等. 亚硝基胍诱变丙酸杆菌选育高产抑菌物质菌株[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(2):18–20.

[15]李 丽. 多杀菌素高产菌株的诱变育种和发酵工艺优化[D]. 天津:天津科技大学, 2009.

[16]雷肇祖,钱志良,章 健. 工业菌种改良述评[J]. 工业微生物, 2004, 34(1):39–51.

[17]陈 园,熊 健,王 超,等. 多杀菌素高产菌株快速筛选方法的研究[J]. 粮油食品科技, 2013, 21(4):99–102.

[18]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.