

# 复合诱变选育表面活性素(surfactin)高产菌株

郭芳芳, 李金良, 陆兆新, 别小妹, 张 充, 吕凤霞\*

(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

**摘 要:** 为筛选抗菌脂肽表面活性素高产菌株, 以枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* fmbJ224 为出发菌株, 先后采用氯化锂(LiCl)、亚硝基胍(NTG)、甲基磺酸乙酯(EMS)和链霉素(streptomycin)进行复合诱变。结果表明: 经初筛、复筛选育得到 1 株高产抗菌脂肽菌株 LN2-3, 其 Surfactin 产量达到 239.2mg/L, 比出发菌株 *Bacillus subtilis* fmbJ224 (5.25mg/L)提高了 44.56 倍, 且该菌株具有良好的遗传稳定性。提示采用 LiCl-NTG 复合诱变能较大幅度的提高诱变率, 可以获得抗菌脂肽高产菌株。

**关键词:** 芽孢杆菌; 亚硝基胍(NTG); LiCl; 复合诱变; 表面活性素

## Breeding of High-yield Surfactin-producing Strain by a Combined Mutagenesis Approach

GUO Fang-fang, LI Jin-liang, LU Zhao-xin, BIE Xiao-mei, ZHANG Chong, LÜ Feng-xia\*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In order to breed a high-yield surfactin-producing strain, *Bacillus subtilis* fmbJ224 was used as the start strain and mutagenized sequentially with lithium chloride (LiCl), nitrosoguanidine (NTG), ethyl methane sulphonate (EMS) and streptomycin. The preliminary and secondary screening results showed that strain LN2-3 had high ability to produce surfactin, with a yield of 239.2 mg/L, which revealed a 44.56-fold increase compared with the original strain. Meanwhile, the strain had good genetic stability. This study demonstrates that the mutation rate of the original strain could be raised greatly by the combined use of LiCl and NTG.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; nitrosoguanidine (NTG); LiCl; combined mutagenesis; surfactin

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0270-07

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是自然界中广泛存在的一种非致病性细菌, 在生长代谢过程中能够产生多种抗菌物质, 包括非核糖体合成的脂肽类抗生素(lipopeptide antibiotics)、核糖体合成的羊毛硫抗生素(lantibiotics)和抗菌蛋白等<sup>[1-2]</sup>。目前发现的抗菌脂肽主要有表面活性素(surfactin)、芬芥素(fengycin)、伊枯草菌素(iturin)和杆菌霉素(bacillomycin)、抗霉枯草菌素(mycosubtilin)、制磷脂菌素(plipstatin)等<sup>[3]</sup>。Surfactin 具有很强的表面活性、抗细菌、抗病毒、抗支原体、抗肿瘤及溶纤作用的功效<sup>[4]</sup>, 在农业、医药、食品、化妆品等领域具有广阔的应用前景。然而较低的产量和较高的生产成本限制了抗菌脂肽的工业化生产及应用。因此, 寻找抗菌脂肽高产菌株, 提高抗菌脂肽产量, 降低生产成本是目前亟待解决的问题。

通过遗传改良选育高产菌株, 以及通过代谢调控策

略来提高抗菌脂肽的产率是实现抗菌脂肽高效生产的关键。虽然利用基因工程、代谢工程手段定向设计改造菌株, 使菌株选育速度显著加快<sup>[5-7]</sup>, 但需要建立在了解产物生物合成的分子基础和遗传调控机制的基础上, 才能实现在分子水平上对产物生物合成代谢的人工调控。传统诱变育种因其成本低廉、方法简便、效果显著等优点, 至今仍在生产实践中广泛应用。近几年来, 本课题组发现了 1 株 *Bacillus subtilis* fmbJ 产生的抗菌物质具有很广的抑菌谱<sup>[8]</sup>, 对食品中主要的革兰氏阳性菌(蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌)、革兰氏阴性菌(荧光假单胞菌、大肠杆菌)和霉菌(黑根霉、黑曲霉、点青霉和总状毛霉)都具有显著的抑制效果, 并对其抗菌物质进行分离纯化, 经 HPLC-ESI-MS 分析鉴定出抗菌物质为 Surfactin 和 Fengycin<sup>[9]</sup>。但该菌的发酵水平低, 难以实现工业化生产。目前, 利用复合诱变芽孢杆菌

收稿日期: 2011-09-30

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD23B05); 国家自然科学基金项目(30871753)

作者简介: 郭芳芳(1987—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: 2011108030@njau.edu.cn

\* 通信作者: 吕凤霞(1963—), 女, 教授, 博士, 主要从事酶工程研究。E-mail: lufengxia@163.com

选育抗菌脂肽高产菌株的报道甚少。本研究以 *Bacillus subtilis* fmbJ224 为出发菌株, 采用复合诱变育种技术选育 Surfactin 高产菌株, 并对其发酵特性作初步研究, 从而达到提高 Surfactin 产量和降低生产成本的目的, 为进一步工业化生产应用提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种、培养基与试剂

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* fmbJ224、大肠杆菌 (CMCC(B)44103 南京农业大学酶工程研究室保藏。

斜面、平板培养基: 牛肉膏 3g、NaCl 5g、蛋白胨 10g、琼脂 18g、蒸馏水 1000mL, pH7.0~7.2。种子培养基: 牛肉膏 3g、NaCl 5g、蛋白胨 10g、蒸馏水 1000mL, pH7.0~7.2。液体发酵培养基<sup>[10]</sup>(Landy 培养基): 葡萄糖 20.0g、L- 谷氨酸钠 5.0g、MgSO<sub>4</sub> 0.5g、KCl 0.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g、FeSO<sub>4</sub> 0.15mg、MnSO<sub>4</sub> 5.0mg、CuSO<sub>4</sub> 0.16mg, 蒸馏水 1000mL, pH7.0~7.2。

氯化锂(LiCl) 广东汕头市西陇化工厂; 亚硝基胍 (NTG) 南京化成工业株式会社; 甲基磺酸乙酯(EMS) 上海劲马生物科技有限公司; 链霉素(Streptomycin) 上海信然生物技术有限公司; 表面活性素(Surfactin)标准品美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

HT6029 超净工作台 苏州进化设备有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; PYX-DHS 隔水电热式恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂; HYG-A 全温摇瓶柜 太仓实验设备厂; 5840R 冷冻高速离心机 德国 Eppendorf 公司; Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 培养条件

指示菌株、出发菌株活化: 将菌株转接于斜面培养基后置于 37℃ 培养箱中恒温培养 18~24h。

种子液制备: 挑取一环已活化的菌株接种于 50mL/250mL 种子液培养基中, 37℃、180r/min 振荡培养 14~16h 至对数期备用。

发酵液制备: 将培养好的种子液以 5% 的接种量接入 50mL/250mL 发酵培养基, 37℃、180r/min 振荡培养 72h。

#### 1.3.2 初筛

取 1mL 诱变处理后的稀释菌液与 19mL 培养基混合倒平板, 37℃ 培养 36h, 菌落计数。用灭菌的牙签挑取单菌落于 37℃ 培养 48h。无菌打孔器在菌落周围打孔, 牙签挑取琼脂块于大肠杆菌平板<sup>[11-14]</sup>上, 设置两个平行, 37℃ 培养 12h 后, 测量抑菌圈直径, 从中挑选抑

菌圈大的菌株作为复筛菌株, 并计算出存活率、正突变率<sup>[15]</sup>。

$$\text{存活率}/\% = \frac{N'}{N} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{正突变率}/\% = \frac{N''}{N'} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $N$  为对照组单菌落数/CFU;  $N'$  为诱变处理样品单菌落数/CFU;  $N''$  为正突变菌落数/CFU。

#### 1.3.3 复筛

将初筛得到的菌株摇瓶发酵, 发酵液于常温 5000r/min 离心 15min, 获得上清液待测。在大肠杆菌平板上等距离放置 8 片直径为 6mm 的滤纸片<sup>[16]</sup>, 吸取 20μL 上清液加入上述放好的纸片中, 设置两个平行, 37℃ 恒温培养 16~18h, 测量抑菌圈直径, 选择抑菌圈直径大的菌株保存。

#### 1.3.4 单因素诱变试验

##### 1.3.4.1 LiCl 诱变处理

取 1mL 对数期种子液与 1mL LiCl 处理液混合均匀, 37℃ 保温 30min, 生理盐水稀释 50 倍终止反应, 取 1mL 稀释后菌液与 19mL 营养琼脂培养基混合倒平板, 37℃ 培养、挑单菌落、初筛、复筛。对照组用超纯水处理种子液, 筛选方法与实验组相同。LiCl 最终处理质量浓度分别为: 0、0.25、0.5、1.5、2.5、5、7.5、10g/mL。

##### 1.3.4.2 EMS 诱变处理

取 1mL 对数期种子液与 1mL EMS 处理液混合均匀, 37℃ 保温 30min, 生理盐水稀释 50 倍终止反应, 取 1mL 稀释后菌液与 19mL 营养琼脂培养基混合倒平板, 37℃ 培养、挑单菌落、初筛、复筛。对照组用 pH7.0 磷酸缓冲液处理种子液, 筛选方法同实验组。EMS 最终处理浓度分别为: 0、0.025、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.4、0.5mol/L。

##### 1.3.4.3 NTG 诱变处理

取 1mL 对数期种子液与 1mL NTG 处理液混合均匀, 37℃ 保温 30min, 生理盐水稀释 50 倍终止反应, 取 1mL 稀释后菌液与 19mL 营养琼脂培养基混合倒平板, 37℃ 培养、挑单菌落、初筛、复筛。对照组用 pH6.0 磷酸缓冲液处理种子液, 筛选方法与实验组相同。NTG 最终处理质量浓度分别为: 0、50、125、250、400、500、600、750、1000 μg/mL。

##### 1.3.4.4 链霉素诱变处理

取 1mL 稀释 10<sup>-5</sup> 倍的对数期种子液与 1mL 链霉素处理液混合, 并与 18mL 营养琼脂培养基混合均匀倒平

板, 37℃培养、挑单菌落、初筛、复筛。对照组用超纯水处理种子液, 筛选方法同实验组。链霉素最终处理质量浓度分别为0、0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0、10 μg/mL。

### 1.3.5 复合诱变

#### 1.3.5.1 第1轮复合诱变

出发菌株的选择: 将单因素诱变、初筛、复筛获得的高产菌株作为第1轮复合诱变的出发菌株。

最佳诱变剂及浓度的选择: 通过单因素诱变试验, 计算LiCl、EMS、NTG、链霉素的致死率、正突变率确定复合诱变剂的种类及浓度。

诱变处理: 对数期种子液依次与诱变剂1:1混合, 37℃处理30min后, 将诱变剂处理的菌液稀释, 取1mL菌液与19mL营养琼脂培养基混合倒平板, 37℃恒温培养, 单菌落挑选、初筛、复筛和高效液相色谱检测Surfactin含量选出高产菌株。将筛选出的高产菌株保存并作为下轮复合诱变的出发菌株。对照组则依次用各诱变剂所对应的溶剂处理对数期种子液, 流程同诱变处理的步骤。

#### 1.3.5.2 第2轮复合诱变

第1轮复合诱变筛选出的高产菌株作为第2轮复合诱变的出发菌株。诱变剂及浓度的选择其诱变处理同第1轮复合诱变。

### 1.3.6 遗传稳定性实验

将诱变筛选出的高产菌株进行传代培养, 每隔24h传代1次, 共传8代, 从中选取2、4、6、8代进行摇瓶发酵, 根据抑菌圈直径大小检测菌株的传代稳定性。

### 1.3.7 高产菌株发酵特性的初步研究

将复合诱变最终筛选出的高产菌株进行摇瓶发酵, 发酵温度分别为30、33、37℃, 发酵时间为96h。每隔12h取样1次, 分别测定抑菌圈直径。

### 1.3.8 Surfactin含量的测定

样品处理<sup>[8]</sup>: 发酵上清液用浓HCl调节pH值至2.0, 4℃静置过夜, 10000r/min离心30min收集沉淀, 用5mL甲醇溶解沉淀, 调pH值至7.0静置过夜, 10000r/min离心10min收集上清液, 即得抗菌脂肽甲醇粗提物。

色谱条件<sup>[17]</sup>: 色谱柱: RP-C<sub>18</sub>柱(250mm×4.6mm, 5 μm); 紫外检测波长: 210nm; 柱温3℃; 流动相A: 水(0.1%三氟乙酸), 流动相B: 乙腈(0.1%三氟乙酸); 流速: 0.84mL/min; 进样量: 20 μL; 洗脱过程: 0~9min: A 40%~7%, B 60%~93%; 9~20min: A 7%~7%, B 93%~93%。

Surfactin含量计算: Surfactin标准样品高效液相色谱

谱如图1所示, 出峰时间为: 14~15min、16~17.5min、18~19.5min。按公式(3)计算Surfactin含量。

$$\text{Surfactin 含量}/(\text{mg/L}) = 0.1302 \times M - 23.578 \quad (3)$$

式中:  $M$  为各出峰时间峰面积之和。

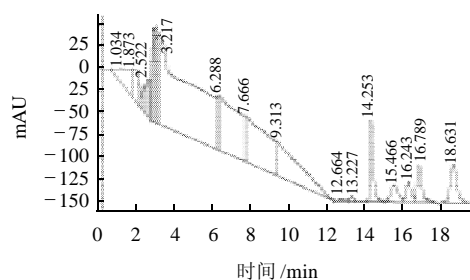


图1 Surfactin标准样品的HPLC图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of surfactin standard

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素诱变试验结果

#### 2.1.1 LiCl诱变效应

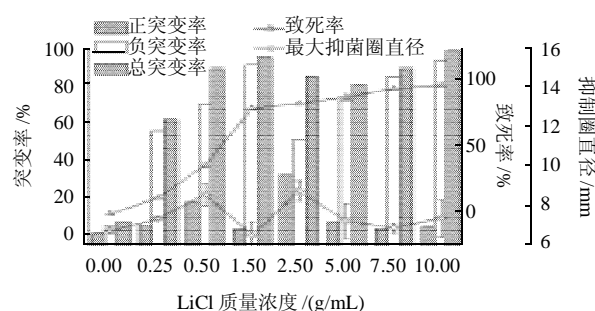


图2 LiCl诱变处理结果

Fig.2 LiCl-induced mutation results

由图2可知, 在LiCl质量浓度范围内, 正突变率在质量浓度较低条件下不断增大, 当LiCl质量浓度为2.5g/mL时最大, 此时负突变率最小。致死率在LiCl质量浓度1.5g/mL范围内递增, 超过该质量浓度后则上升趋势缓慢; 抑菌圈直径与正突变率呈现正相关性。鉴于LiCl是一种碱金属卤化物, 其本身并无诱变作用, 但有报道在诱变育种中与一些诱变因子具有协同作用<sup>[18-19]</sup>。本研究中当LiCl质量浓度为2.5g/mL时其正突变率最大, 且致死率适中, 因此选择2.5g/mL的LiCl溶液作为后续诱变的辅助诱变剂, 此时Surfactin产量为6.76mg/L。将筛选出的菌株发酵, 其高效液相检测图谱如图3所示。

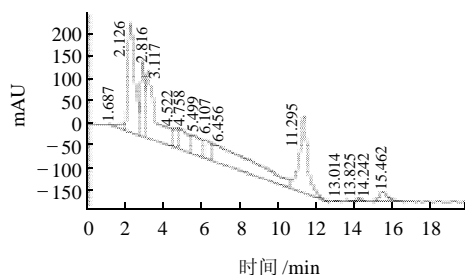


图3 LiCl突变株的Surfactin HPLC图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of the surfactin produced by LiCl-induced mutant

## 2.1.2 EMS 诱变效应

表1 EMS 诱变处理结果

Table 1 EMS-induced mutation results

EMS 浓度 / (mol/L)	致死 率 /%	正突变 率 /%	负突变 率 /%	总突变 率 /%	最大抑菌圈 直径 /mm
0	0	0	6.25	6.25	7.12 ± 0.19
0.025	50.67	6.25	77.08	83.33	7.75 ± 0.59
0.05	60.92	45.83	41.67	87.50	9.27 ± 0.15
0.1	84.09	22.92	62.50	85.42	8.61 ± 0.98
0.15	85.02	8.33	75.00	83.33	7.66 ± 1.00
0.2	89.43	11.11	68.75	79.86	7.94 ± 0.18
0.25	90.11	10.42	77.08	87.50	7.64 ± 0.28
0.4	93.61	2.08	85.42	87.50	6.46 ± 0.67
0.5	98.18	2.78	79.17	81.95	6.28 ± 0.85

由表1可知,随EMS浓度的升高,正突变率不断增大,并在EMS浓度为0.05mol/L时达最大,随后呈现下降趋势;负突变率基本都在60%以上,可看出此诱变是负突变占主导作用;抑菌圈直径与正突变率成正相关。对菌株进行大量筛选,获得抑菌效果较好的E-24菌株,其发酵液的高效液相色谱检测图谱见图4,EMS浓度0.05mol/L时,Surfactin产量为1.64mg/L,结果发现Surfactin含量很少,但依旧有抑菌效果,分析其原因,可能是诱变提高了Surfactin同系物的产量。由于EMS对提高Surfactin的诱变效应不大,因此后续复合诱变不采用此诱变剂,若要研究Surfactin的同系物,可对该机制作进一步研究。

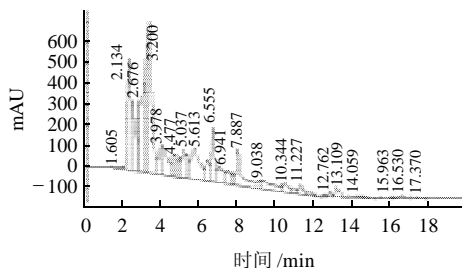


图4 突变株E-24的Surfactin HPLC图谱

Fig.4 HPLC chromatogram of the surfactin produced by EMS-induced mutant E-24

## 2.1.3 NTG 诱变效应

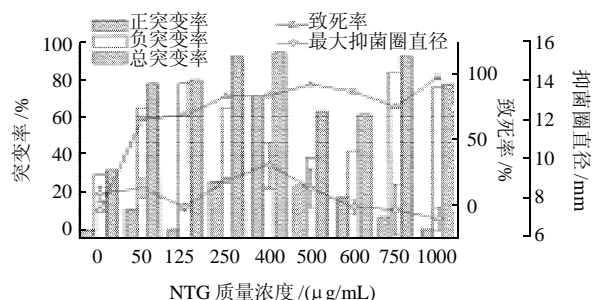


图5 NTG 诱变处理结果

Fig.5 NTG-induced mutation results

由图5可知,随着NTG质量浓度的升高,正突变率整体呈现先上升后下降的趋势,并在NTG质量浓度为400 μg/mL时最大;致死率随诱变剂质量浓度增加到一定程度后上下波动;抑菌圈直径与正突变率表现为正相关,并在正突变率为72.92%时达最大。上述结果表明,最大抑菌圈直径总是出现在正变率最大时。将筛选出的一株高产菌株命名为N-22,并进行高效液相色谱检测(图6),计算Surfactin产量为130.27mg/L,较出发菌株提高了23.81倍。可以得出NTG诱变效应较LiCl、EMS好,因此把400 μg/mL的NTG作为复合诱变的主要诱变剂。

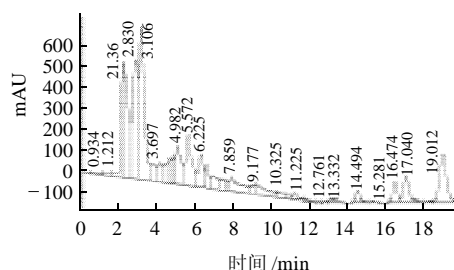


图6 突变株N-22的Surfactin HPLC图谱

Fig.6 HPLC chromatogram of the surfactin produced by NTG-induced mutant N-22

## 2.1.4 链霉素诱变效应

由表2可见,致死率随链霉素质量浓度增加而上升,当链霉素质量浓度为5 μg/mL时致死率为100%,说明该菌对链霉素敏感。正突变率在链霉素质量浓度为0.5 μg/mL时达12.5%,且此时致死率适中。由于通常微生物的抗生素抗性基因与产物合成基因呈紧密连锁分布<sup>[20-21]</sup>,并且可通过诱导表达,故通过抗生素抗性突变有望选择性地提高菌株产量的阳性突变率。本研究选择致死率较低的0.5 μg/mL链霉素作为复合诱变的诱变剂。

将筛选出的菌株发酵, 发酵液的高效液相色谱检测结果见图7, 计算 Surfactin 产量为 13.25mg/L, 表明链霉素确实提高了阳性突变率, 至于是否还能进一步提高有待于后续研究。

表2 链霉素诱变处理结果  
Table 2 Streptomycin-induced mutation results

链霉素质量浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	致死率/%	正突变率/%
0	0	2.78
0.1	11.37	5.56
0.2	21.40	4.17
0.5	34.76	12.5
1.0	59.45	3.33
1.5	92.28	5.00
2.0	95.01	8.33
3.0	99.25	13.89
5.0	100	0
10.0	100	0

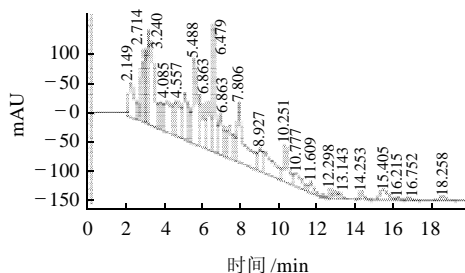


图7 链霉素突变株的 Surfactin HPLC 图谱

Fig.7 HPLC chromatogram of the surfactin produced by streptomycin-induced mutant

## 2.2 复合诱变

### 2.2.1 第1轮复合诱变

将单因素诱变初筛、复筛获得的 N-22 作为出发菌株。经 LiCl、NTG、链霉素分别处理后混匀倒平板, 37℃ 培养, 挑单菌落、初筛、复筛, 计算菌落, 结果如图8所示。不同的诱变处理方法中, LiCl + NTG 处理时正突变率最高, 达 58.33%, 且此条件下抑菌圈直径最大; 而 LiCl + NTG + 链霉素与链霉素单独处理的正突变率普遍不高, 可能是因为经 LiCl + NTG 复合处理过的菌株对链霉素的敏感性降低。从 288 株菌中筛选出一株高产菌 LN1-1, Surfactin 产量达 154.6mg/L, 证明 LiCl 在诱变育种中与一些诱变因子具有协同作用, 使产量进一步提高。菌株 LN1-1 发酵液的高效液相色谱检测结果见图9。

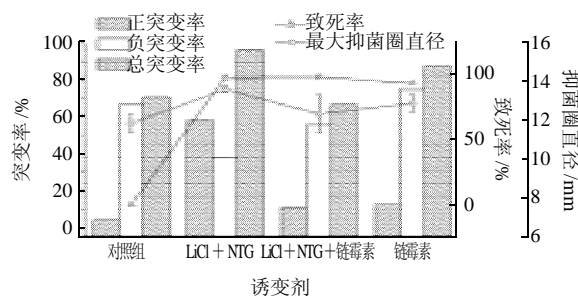


图8 第1轮复合诱变筛选结果

Fig.8 Screening results after the first cycle of mutagenesis

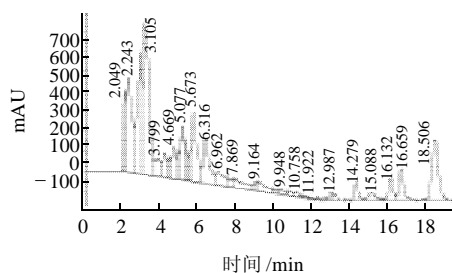


图9 突变株 LN1-1 的 Surfactin HPLC 图谱

Fig.9 HPLC chromatogram of the surfactin produced by mutant LN1-1 resulting from the first cycle of mutagenesis

### 2.2.2 第2轮复合诱变

LN1-1 作为第2轮复合诱变的出发菌株, 复合诱变筛选结果见图10。第2轮复合诱变依然发现 LiCl + NTG 处理正突变率最高, 达 33.33%。从中筛选出高产菌 LN2-3, Surfactin 产量为 239.2mg/L, 较 *Bacillus subtilis* fmbJ224 提高了 44.56 倍。从结果可看出, 第2轮复合诱变的正突变率低于第1轮复合诱变, 但依旧筛选出 Surfactin 产量更高的菌株 LN2-3, 可能是相同诱变剂处理使菌株的敏感性降低; 诱变剂可能具有一定的累积效应, 在前面诱变的基础上产量依然有提高。LiCl + NTG + 链霉素与链霉素单独处理后大部分是负突变, 进一步说明: LiCl + NTG 与链霉素可能产生了拮抗作用, 使得正突变率和产量大幅度下降; 说明链霉素不适宜与 LiCl、NTG 复合处理该菌株。菌株 LN2-3 发酵液的高效液相色谱检测结果见图11。

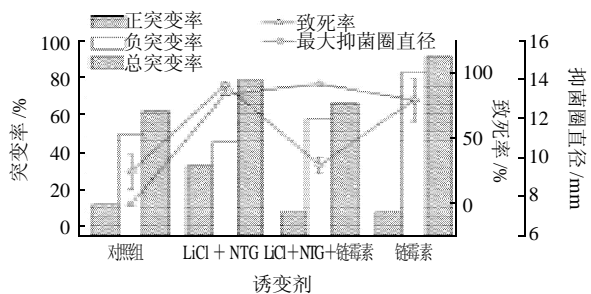


图10 第2轮复合诱变筛选结果

Fig.10 Screening results after the second cycle of mutagenesis

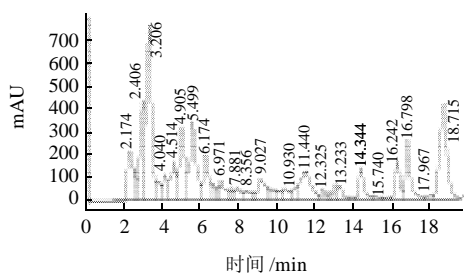


图 11 突变株 LN2-3 的 Surfactin HPLC 图谱  
Fig.11 HPLC chromatogram of the surfactin produced by mutant LN2-3 resulting from the second cycle of mutagenesis

### 2.3 遗传稳定性分析

将单因素诱变、第 1 轮复合诱变、第 2 轮复合诱变筛选出的高产菌株 N-22、LN1-1、LN2-3 及出发菌株 *Bacillus subtilis* fmbJ224 摇瓶发酵,连续传代培养,将它们每隔 24h 传 1 代,共传代 8 次,通过测定效价来测定其稳定性。结果见表 3。结果发现:LN2-3 抑菌圈直径一直高于其他 3 株菌,在传代 6 代抑菌圈直径都维持在相对稳定的范围,能够较稳定遗传。说明诱变提高了 Surfactin 产量;复合诱变比单因素诱变效果好。

表 3 突变株遗传稳定性

Table 3 Genetic stability of the original strain and the 3 mutants screened during two cycles of mutagenesis

菌株编号	抑菌圈直径/mm			
	第 2 代	第 4 代	第 6 代	第 8 代
<i>Bacillus subtilis</i> fmbJ224	10.97 ± 0.29	10.24 ± 0.97	9.86 ± 1.11	8.86 ± 0.56
N-22	12.87 ± 0.09	12.83 ± 0.24	12.66 ± 0.28	12.15 ± 1.03
LN1-1	13.14 ± 0.16	12.99 ± 0.12	13.08 ± 0.68	12.45 ± 0.12
LN2-3	13.33 ± 1.08	13.20 ± 0.40	13.22 ± 0.54	12.46 ± 0.59

### 2.4 高产菌株 LN2-3 的发酵特性

为了检测筛选到的高产菌株的抗菌物质含量,了解高产突变株 LN2-3 的培养特性,进行摇瓶发酵培养。图 12 结果表明,30℃ 发酵培养时,36~60h 培养时间内抑菌圈直径维持在较大的范围内,其中在 48h 最大;33℃ 发酵培养时,48~72h 抑菌圈直径较大,并于 48h 达最大;37℃ 发酵培养时,24~48h 内抑菌圈直径较大,且在 36h 时抑菌效果最好。这可能是因为抗菌脂肽是次级代谢产物,其积累的过程主要发生在稳定期,发酵温度高时,菌体生长速度快,很快就进入稳定期合成产物,超过一定发酵时间,营养耗尽,菌体自溶,产物被分解,含量下降;发酵温度较低时,菌体生长缓慢,较长时间才会进入稳定期,产物合成时间延长。比较不同发酵温度、发酵时间对产物合成的影响,发

现 LN2-3 在发酵温度为 30℃、发酵时间 48h 时 Surfactin 产量最高达 217.3mg/L,高效液相色谱检测如图 13 所示,这与第 2 轮复合诱变筛选结果趋势一致,说明建立复合诱变选育方法可行,能够用于高产突变株的筛选。

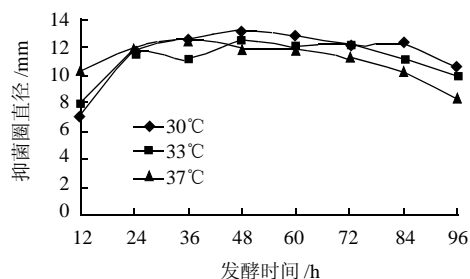


图 12 高产 Surfactin 的突变株 LN2-3 发酵特性  
Fig.12 Fermentation performance of mutant strain LN2-3

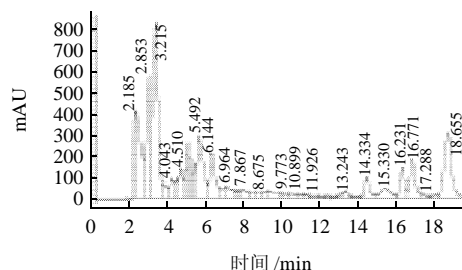


图 13 高产菌株 LN2-3 的 Surfactin HPLC 图谱  
Fig.13 HPLC chromatogram of the surfactin produced by mutant strain LN2-3

## 3 讨论

通过比较 LiCl、EMS、NTG、链霉素 4 种不同诱变剂单独和复合诱变对 *Bacillus subtilis* fmbJ224 产 Surfactin 的影响,结果表明,单一的诱变手段难以获得活性较高的菌株,经常存在着突变株对单一诱变剂钝化的情形。而多因子复合诱变能有效改变菌株对诱变因素的敏感性,提高变异率,具有大规模提高生产菌株产量的潜力。沈娟等<sup>[8]</sup>采用 N<sup>+</sup>注入诱变芽孢杆菌,抗菌物质产量是出发菌株的 1.96 倍,方传记等<sup>[15]</sup>利用低能 N<sup>+</sup>注入淀粉液化芽孢杆菌,脂肽含量提高了 15.2%。而本研究运用化学因素复合诱变,相比出发菌株 *Bacillus subtilis* fmbJ224 而言, Surfactin 产量提高了 44.56 倍。本实验的结果表明:复合诱变处理的正向突变率更高,突变株的生产能力提高幅度更大,证明了利用化学因素复合诱变选育获得高产菌株的可行性。

Surfactin 产量提高与多种因素有关,除了菌种自身的遗传改造外,发酵工艺条件的优化控制也起着重要的作用<sup>[22-24]</sup>。同时,利用代谢调控提高 Surfactin 的产量还有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] MOYNE A L, CLEVELAND T E, TUZUN S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234(1): 43-49.
- [2] ZHOU Xiaohong, LU Zhaoxin, LÜ Fengxia, et al. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain fmbj on the postharvest pathogen *Rhizopus stolonifer*[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(5): M254-M259.
- [3] 唐群勇, 周小虹, 陆兆新, 等. *Bacillus subtilis* fmbJ 产 Fengycin 对 *Rhizopus stolonifer* 呼吸链及营养物质利用的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 248-254.
- [4] HENRY G, DELEU M, JOURDAN E, et al. The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses[J]. Cellular Microbiology, 2011, 13(11): 1824-1837.
- [5] 刘文, 唐功利. 以生物合成为基础的代谢工程和组合生物合成[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(1): 1-5.
- [6] STEPHANOPOULOS G, ALPER H, MOXLEY J. Exploiting biological complexity for strain improvement through systems biology[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(10): 1261-1267.
- [7] STEPHANOPOULOS G, ALPER H. Metabolic engineering challenges in the post-genomic era[J]. Chemical Engineering Science, 2004, 59(22): 5009-5017.
- [8] 沈娟, 别小妹, 陆兆新, 等. N<sup>+</sup> 注入诱变芽孢杆菌选育高产抗菌物质菌株[J]. 核农学报, 2006, 20(4): 296-298.
- [9] 别小妹, 吕凤霞, 陆兆新, 等. *Bacillus subtilis* fmbJ 脂肽类抗菌物质的分离和鉴定[J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 644-649.
- [10] LANDY M, WARREN G H, ROSENMAN S B. Bacillomycin an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1948, 67(4): 539-541.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 XI; 附录 XIV.
- [12] IRWIN P, MARTIN J, NGUYEN L H, et al. Antimicrobial activity of spherical silver nanoparticles prepared using a biocompatible macromolecular capping agent: evidence for induction of a greatly prolonged bacterial lag phase[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2010, 8(34): 1186-1196.
- [13] ANNA H, RAMON B, JOHN S, et al. Mediator release assay for assessment of biological potency of German cockroach allergen extracts[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009, 123(4): 949-954.
- [14] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 111-113.
- [15] 方传记, 陆兆新, 孙力军. 等. 低能 N<sup>+</sup> 离子注入选育抗菌脂肽高产菌及其发酵的研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, 24(6): 333-336.
- [16] 廖爱芳, 陈昆, 张华. 纸片法快速测定庆大霉素发酵液生物效价[J]. 药物生物技术, 2004, 11(3): 187-189.
- [17] 艾嘉. 芽孢杆菌发酵液中抗菌脂肽的定量检测方法及应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [18] CHEN Hueili, JUANG Rueyshin. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 38(1): 39-46.
- [19] 陈义光. 新型物理诱变方法及其在微生物诱变育种中的应用进展[J]. 长江大学学报, 2005, 2(5): 46-50.
- [20] 王付转, 梁秋霞, 李宗伟, 等. 诱变和筛选方法在微生物育种中的应用[J]. 洛阳师范学院学报, 2002, 21(2): 95-99.
- [21] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 118.
- [22] RAMKRISHNA S. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1997, 68(3): 263-270.
- [23] WEI Yuhong, WANG Lifan, CHANG Joshu, et al. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 96(2): 174-178.
- [24] YEH Maosung, WEI Yuhong, CHANG Joshu. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(8): 1799-1805.