

高产抗菌脂肽Fengycin芽孢杆菌的诱变育种和发酵条件优化

陈尚里, 于福田, 沈圆圆, 刘小玲

Mutation Breeding and Optimization of Fermentation Conditions of *Bacillus* Highly Producing Antimicrobial Lipopeptide Fengycin

CHEN Shangli, YU Futian, SHEN Yuanyuan, and LIU Xiaoling

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020239>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高产几丁质酶菌株的诱变选育及发酵条件的优化

Yield improvement in a chitinase-producing strain by mutation breeding and optimization of fermentation conditions

食品工业科技. 2018, 39(9): 88-95 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.09.016>

暹罗芽孢杆菌LW-1产 γ -聚谷氨酸发酵培养基的优化

Optimization of Fermentation Medium for γ -Polyglutamic Acid Production by *Bacillus siamense* LW-1

食品工业科技. 2021, 42(16): 163-170 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110269>

重离子束辐照选育高产细菌素植物乳杆菌

Study on Mutation Breeding of High-Yield Bacteriocin *Lactobacillus plantarum* by Heavy Ion Beam Irradiation

食品工业科技. 2021, 42(15): 139-143 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030234>

降解玉米赤霉烯酮菌株的鉴定及其发酵条件优化

Identification of Degradation Zearalenone Strain and Its Fermentation Conditions Optimization

食品工业科技. 2018, 39(21): 119-123 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.21.022>

一株产几丁质脱乙酰酶海洋细菌的筛选、鉴定及发酵优化

Screening and identification of a marine bacteria producing chitin deacetylase and optimization of its fermentation conditions

食品工业科技. 2017(18): 129-134 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.18.025>

枯草芽孢杆菌固态发酵产脂肽培养基优化及脂肽的初步鉴定

Optimization of Lipopeptide Production Medium by Solid-State Fermentation of *Bacillus subtilis* and Preliminary Identification of Lipopeptide

食品工业科技. 2019, 40(6): 198-204 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.033>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

陈尚里, 于福田, 沈圆圆, 等. 高产抗菌脂肽 Fengycin 芽孢杆菌的诱变育种和发酵条件优化 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 134-143. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020239

CHEN Shangli, YU Futian, SHEN Yuanyuan, et al. Mutation Breeding and Optimization of Fermentation Conditions of *Bacillus* Highly Producing Antimicrobial Lipopeptide Fengycin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 134-143. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020239

· 生物工程 ·

高产抗菌脂肽 Fengycin 芽孢杆菌的诱变育种和发酵条件优化

陈尚里, 于福田, 沈圆圆, 刘小玲*

(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

摘要: 为了提高 Fengycin 产量, 以芽孢杆菌 YA-215 为出发菌, 通过复合诱变 (紫外诱变、ARTP-LiCl 诱变) 育种来获取高产 Fengycin 突变体。通过单因素实验和响应面法确定最佳发酵工艺优化。结果表明, 复合诱变选育获得一株高产 Fengycin 突变株 UA397, 全基因组测序结合 16S 进化样本分析显示为 *Bacillus* 芽孢杆菌。其最佳发酵工艺条件为: 蔗糖 25 g/L、蛋白胨 30 g/L、发酵温度 37.7 °C、发酵时间 37.8 h、接种量 5.01%。在此发酵条件下, 暹罗芽孢杆菌 UA-397 的 Fengycin 产量为 517.09 mg/L, 是野生型在未进行发酵条件优化时 Fengycin 产量 113.02 mg/L 的 4.575 倍。研究结果为抗菌脂肽 Fengycin 应用于食品、医药和生物防治等领域奠定了产量基础。

关键词: 暹罗芽孢杆菌, Fengycin, 诱变育种, 响应面, 发酵优化

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0134-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020239



本文网刊:

Mutation Breeding and Optimization of Fermentation Conditions of *Bacillus* Highly Producing Antimicrobial Lipopeptide Fengycin

CHEN Shangli, YU Futian, SHEN Yuanyuan, LIU Xiaoling*

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: In order to increase the yield of Fengycin, *Bacillus* YA-215 was used as the starting strain in this study to obtain high-yield Fengycin mutants through compound mutagenesis (UV mutagenesis, ARTP-LiCl mutagenesis) breeding. The optimum fermentation conditions were determined by single-factor experiment and response surface methodology. The results showed that a high-yielding Fengycin mutant strain UA397 was obtained through compound mutagenesis, and the whole genome sequencing combined with 16S evolution sample analysis showed that it was *Bacillus siamensis*. The optimum fermentation process conditions were: Sucrose 25 g/L, peptone 30 g/L, fermentation temperature 37.7 °C, fermentation time 37.8 h, inoculum size 5.01%. Under these conditions, the Fengycin yield of *Bacillus siamensis* UA-397 was 517.09 mg/L, which was 4.575 times the Fengycin yield of 113.02 mg/L of the wild type without optimizing the fermentation conditions. This study laid the yield basis for the application of antibacterial lipopeptide Fengycin in the fields of food, medicine and biological control.

Key words: *Bacillus siamensis*; Fengycin; mutation breeding; response surface; fermentation optimization

Fengycin 是一种由芽孢杆菌产生的环状脂肽分子, 包括 10 个氨基酸和一个 C₁₄~C₁₈ 脂肪酸链, 同时具有亲水性和亲脂性, 这也导致其具有出色的生物表

面活性剂活性和多种生物活性^[1-2]。Fengycin 的疏水性能与微生物细胞膜的磷脂双分子层相互作用, 改变其结构和通透性, 从而杀死病原类微生物^[3]。各种病

收稿日期: 2023-02-23

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901003); 广西科技重大专项 (桂科 AA20302019-7)。

作者简介: 陈尚里 (1995-), 男, 硕士, 研究方向: 生物活性肽, E-mail: chensgli@163.com。

* 通信作者: 刘小玲 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质功能与活性肽, E-mail: liuxling@gxu.edu.cn。

原体,尤其是真菌病害,正在对全球食品安全构成越来越大的风险,Fengycin 具有抗菌范围广、安全降解性高和溶血性低等特点,在食品、医药和生物防治等方面拥有广阔的应用前景^[4-5]。

目前,Fengycin 昂贵的生产成本,是限制其进一步商业化和产业化的关键。近年来,许多策略被用来提高微生物脂肽类次级代谢物的产量,包括诱变育种、基因工程(启动子工程、基因组和转录组学分析)和发酵优化^[6-8]。紫外诱变、常压室温等离子体(ARTP)诱变、化学诱变是用于提高微生物脂肽类次级代谢产物产量简单且经济有效的方法^[9-10]。诱变育种中物理、化学因素导致微生物的 DNA 碱基损伤,引起三联体突变,这些突变可以通过影响蛋白质合成对微生物代谢产生重大影响,最终导致次级代谢产物产量的提升^[6,11-13]。Ameri 等^[14]报道,在紫外线诱变后,与野生型相比,萎缩芽孢杆菌 FSHM₂ 的嗜热碱性脂肪酶活性增加了 2 倍。在微生物诱变选育过程中,单一诱变往往会产生“疲劳效应”,采用多种诱变选育相结合的复合诱变通常能够获得更加高产的菌株,Beacham 等^[15]报告的微拟球藻在经过 EMS 和紫外线诱变后,脂肪酶产量提升了 3 倍。通过响应面优化发酵条件,也是提高微生物脂肽类次级代谢产物产量的有效方法,李光月等^[16]通过响应面法优化枯草芽孢杆菌 FHYB201030 的发酵工艺,使其表面活性素产量提升 480 mg/L,较优化前提高 34.56%。

本文以本实验团队前期从北部湾红树林筛得的芽孢杆菌 YA-215 为基础,通过复合诱变育种(紫外诱变、ARTP 诱变、化学诱变),获取高产 Fengycin 突变株。采用高通量测序手段对突变株进行扫描图测序和完成图测序(扫描图利用目前使用最广泛的二代测序平台 Illumina Hiseq×10 平台,完成图采用二代+三代即 Illumina Hiseq+PacBio 的测序方式),结合 NCBI 数据库进行对比,探究突变株 UA397 的分类地位。在单因素实验上,通过基于 Box-Behnken 模型的响应面试验设计获取最优发酵工艺,以期解决 Fengycin 产量低的问题,为 Fengycin 在医药、食品、农业等领域的研究及产业化应用奠定产量基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

芽孢杆菌(*Bacillus*)YA-215 本课题组实验室分离保藏;LB 肉汤培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0 g,酵母浸粉 5.0 g,氯化钠 10.0 g 北京索莱宝科技有限公司;LB 琼脂培养基:胰蛋白胨 10.0 g,酵母浸粉 5.0 g,氯化钠 10.0 g,琼脂 15 g 北京索莱宝科技有限公司;血球计数板、乙腈(色谱纯)德国默克公司;Fengycin 标准品 Sigma 公司;;氯化钠、无水乙醇、蔗糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、可溶性淀粉、蛋白胨、酵母提取物、玉米浆粉、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl 或 NaNO₃ 等其他试剂 均为国产分析纯。

SW-CJ-2F 洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;SUNRISE 酶标仪 帝肯(上海)有限公司;UV-6100 紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;ZQZY-85CS 振荡培养箱 上海知楚仪器有限公司;DHP-9082 电热恒温培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司;GI80TW 高压蒸汽灭菌锅 致微(厦门)仪器有限公司;CR21N 高速冷冻离心机 日立公司;UV-254 暗箱式紫外透射仪 北京鼎国生物技术的发展中心;ARTP- II 常压室温等离子体诱变仪 无锡源清天木生物科技有限公司;E2695/2998PDA 高效液相色谱(包括 2998 二极管阵列检测器,Empower3 Pro 色谱工作站) 美国 Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的活化与菌悬液制备 菌株的活化与菌悬液制备参照孟兆丽等^[17]的方法改进,取-80℃保藏菌种采取平板划线法接种于 LB 固体培养基上,37℃、70%湿度的条件下倒置培养 24 h。挑取单菌落,接种于 100 mL 的 LB 肉汤培养基中,200 r/min、37℃、70%湿度振荡培养箱培养 24 h(一级活化)。从一级活化的菌悬液中取 1 mL(1%接种量)接种至 100 ml 的 LB 肉汤培养基中,200 r/min、37℃、70%湿度振荡培养箱培养 24 h(二级活化)。采用稀释涂布平板法测定二级活化的菌悬液中的活菌数,用无菌生理盐水调节菌悬液浓度至 10⁸ CFU/mL。

1.2.2 诱变方法

1.2.2.1 紫外诱变方法 紫外诱变的方法参照辛磊等^[18]的方法改进,打开紫外灯(25 W)照射诱变仪内部空间 20 min 灭菌后,取芽孢杆菌 YA-215 菌悬液(1×10⁸ CFU/mL)5 mL 和灭菌转子添加至无菌培养皿(90 mm),开启磁力搅拌器。使用紫外灯(25 W)照射,照射时间分别为 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 s,照射距离 20 cm。将照射后的菌悬液用无菌生理盐水稀释 10⁷ 倍,取 100 μL 均匀涂布于 LB 琼脂培养基,以照射时间 0 s 的为空白对照。避光倒置于恒温培养箱,37℃,70%培养 24 h 后计菌落,并绘制致死率曲线(公式 1)。挑取单菌落发酵培养 24 h 后,取上清液进行 Fengycin 产量测定,以 Fengycin 产量较出发菌株 YA-215 增大 10% 的菌株为正突变菌株,计算正突变率(公式 2)。选择最佳正突变率的时间进行诱变。

$$\text{致死率}(\%) = \frac{\text{空白对照平板菌落数} - \text{诱变后平板菌落数}}{\text{空白对照平板菌落数}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

$$\text{正突变率}(\%) = \frac{\text{正突变菌落数}}{\text{诱变后平板菌落数}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.2.2 ARTP-化学复合诱变方法 ARTP-化学复合诱变的方法参照杨心萍等^[19]的方法改进,将紫外诱变得到的高产突变株菌悬液(1×10⁸ CFU/mL)10 μL 添加至灭菌后的玻璃载片,并均匀涂布。将玻璃载片

放入 ARTP 诱变仪中, 诱变处理时间分别为 0、20、40、60、80、100、120、140、160、180 s。将照射后的菌悬液用无菌生理盐水稀释至 10^7 倍, 取 100 μ L 均匀涂布于添加浓度为 0.3% 的 LiCl 溶液的 LB 琼脂培养基, 以处理时间 0 s 的为空白对照。避光倒置于恒温培养箱, 37 $^{\circ}$ C, 70% 湿度培养 24 h 后计数菌落, 并绘制致死率曲线(公式 1)。挑取单菌落发酵培养 24 h 后, 取上清液进行 Fengycin 产量测定, 以 Fengycin 产量较出发菌株增大 10% 的菌株为正突变菌株, 计算正突变率(公式 2)。选择最佳正突变率的的时间进行诱变。

1.2.3 突变菌株的筛选 对诱变后平板中的菌落编号, 挑取单菌落依次接种至 10 mL LB 肉汤培养基中, 200 r/min、37 $^{\circ}$ C、70% 湿度振荡培养箱培养 24 h, 取发酵上清液, 4 $^{\circ}$ C、8000 r/min 的条件下离心 10 min, 测定 Fengycin 产量, 挑选发酵液中 Fengycin 产量高的菌株。

1.2.4 Fengycin 产量测定 取 1 mL 发酵上清液, 4 $^{\circ}$ C、8000 r/min 的条件下离心 10 min, 采取高效液相色谱检测, 在波长 200~350 nm 内进行紫外吸收扫描, 按照 Gancel 等^[20]的方法, 采用 C_{18} 分析柱, 流动相为超纯水和乙腈, 流速为 0.6 mL/min; 进样量为 5 μ L, 采用梯度洗脱方式, 40 min 内乙腈相由 45% 上升至 55%。

1.2.5 菌株鉴定 菌株的全基因组测序及鉴定交给美吉生物进行, 测序方式为 de novo 测序, 结果在 Majorbio 云平台(www.majorbio.com)在线平台进行分析。

1.2.6 单因素实验 通过单因素实验对不同碳源、不同碳源添加量、不同的氮源、不同氮源添加量、不同接种量、不同发酵温度、不同发酵时间等因素进行探究, 挑选出最优发酵工艺, 单因素实验设计如表 1 所示。

1.2.7 Box-Behnken 试验设计 在单因素实验基础上, 以接种量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)为自变量, 以 Fengycin 产量(Y)为响应值进行 Box-Behnken 试验设计(BBD), 以评估它们对所选突变体产生表面活性素的综合影响。试验因素与水平编码如表 2 所示。

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次, 结果用平均值 \pm 标准差表示; 采用 SPSS Statistics 26.0 软件对每一组数据进行单因素方差分析(ANOVA), 然后进行显著性检验, $P < 0.05$ 认为具有显著性差异; 采用 Mega 6.0 软件选择 NJ(Neighbor-Joining)法构建系统进化树; 采用 Design-Expert 12.0 软件设计组合试验和利用 Origin 9.8 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变

2.1.1 紫外诱变致死率和正突变率 对芽孢杆菌 YA-215 进行紫外诱变, 紫外诱变致死率和正突变率如图 1 所示。可以看出, 随着紫外照射时间的延长, 芽孢杆菌 YA-215 的致死率不断增加; 当照射时间达到 110 s 后致死率达到 100%。正突变率随着紫外照射时间的延长不断提高, 当照射时间为 90 s 时, 正突变率变达到最高点 13.2%; 当紫外照射时间超过 90 s 后, 正突变率迅速下降, 这可能是因为为紫外照射剂量过大, 对芽孢杆菌的遗传物质造成了不可修复的损害, 这与 Yu 等^[21]的研究一致, 同时致死率迅速增加至 100% 也证明了这一点。因此本实验选择紫外照射时间 90 s, 致死率 90.23%, 正突变率 13.2% 的条件进行紫外诱变。

2.1.2 紫外诱变筛选 UV 诱变后, 共筛选出 589 个正突变株, 图 2 为 Fengycin 产量最高的八个突变株:

表 1 发酵工艺单因素实验因素水平

Table 1 Factors and levels of single factor experiment of fermentation condition

单因素	单因素不同水平	其他条件
碳源种类	蔗糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、可溶性淀粉	碳源 20 g/L, 酵母提取物 20 g/L, 接种量 4%, 温度 37 $^{\circ}$ C, 发酵时间 24 h
蔗糖添加量(g/L)	10、15、20、25、30、35	酵母浸粉 20 g/L, 接种量 4%, 温度 37 $^{\circ}$ C, 发酵时间 24 h
氮源种类	蛋白胨、酵母提取物、玉米浆、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 、 $NaNO_3$	25 g/L 蔗糖, 氮源 20 g/L 接种量 4%, 温度 37 $^{\circ}$ C, 发酵时间 24 h
蛋白胨添加量(g/L)	15、20、25、30、35、40	25 g/L 蔗糖, 接种量 4%, 温度 37 $^{\circ}$ C, 发酵时间 24 h
接种量(%)	1、3、5、7、9	25 g/L 蔗糖, 30 g/L 蛋白胨, 温度 37 $^{\circ}$ C, 发酵时间 24 h
发酵温度($^{\circ}$ C)	31、34、37、40、43	25 g/L 蔗糖, 30 g/L 蛋白胨, 接种量 5%, 发酵时间 24 h
发酵时间(h)	12、24、30、36、42、48	25 g/L 蔗糖, 30 g/L 蛋白胨, 接种量 5%, 温度 37 $^{\circ}$ C

表 2 Box-Behnken 试验因素与水平

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken tests

因素	编码水平		
	-1	0	1
A 接种量(%)	3	5	7
B 发酵温度($^{\circ}$ C)	34	37	40
C 发酵时间(h)	24	36	48

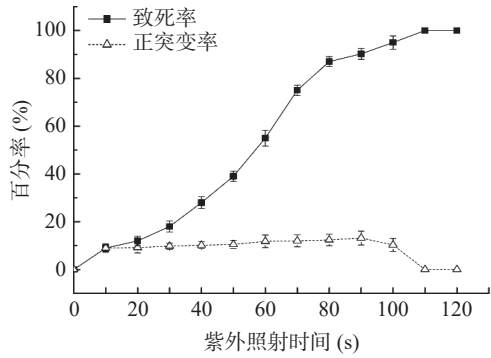


图1 紫外诱变致死率和正突变率

Fig.1 UV mutagenesis lethality and positive mutation rate

mutUV99(200.28 mg/L)、mutUV133(204.25 mg/L)、mutUV184(199.35 mg/L)、mutUV197(209.33 mg/L)、mutUV225(215.04 mg/L)、mutUV354(206.77 mg/L)、mutUV472(217.34 mg/L)、mutUV503(221.39 mg/L)与野生型 YA-215(113.02 mg/L)的对比。其中突变菌株 mutUV503 的 Fengycin 产量最高为 221.39 mg/L, 是野生型 YA-215 的 1.95 倍; 沙见宇等^[22]通过紫外诱变选育获得一株高莫纳克林 K 菌株, 其莫纳克林 K 产量较紫外诱变前提高了 27%。因此选择突变菌株 mutUV503 继续进行 ARTP-LiCl 诱变。

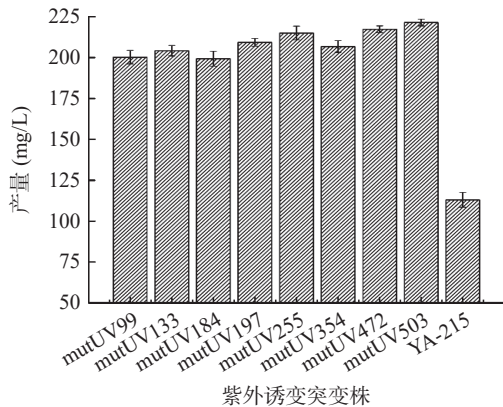


图2 紫外诱变突变株的 Fengycin 产量

Fig.2 Fengycin production of UV mutagenesis mutants

2.2 ARTP-化学诱变

2.2.1 ARTP-化学诱变致死率和最佳正突变率 对突变株 mutUV503 进行 ARTP-化学诱变, ARTP-化学诱变致死率和正突变率如图 3 所示。与紫外诱变相似, 随 ARTP 的处理时间的延长, 致死率不断上升, 处理时间超过 160 s 时, 致死率达 100%。ARTP 中的活性能量粒子能够改变芽孢杆菌的 DNA 序列, 长时间的 ARTP 处理引起基因过度损伤, 不能诱发细胞的修复机制^[23]。因此本实验选择 ARTP 处理 120 s, 致死率 91.2%, 正突变率 11.35% 的条件进行诱变。

2.2.2 ARTP-化学诱变诱变筛选结果 ARTP-LiCl 诱变后共筛选出 893 个正突变菌株, 图 4 为 Fengycin 产量最高的 5 个复合诱变突变株: mutUA397 (388.34 mg/L)、mutUA112(355.34 mg/L)、mutUA244

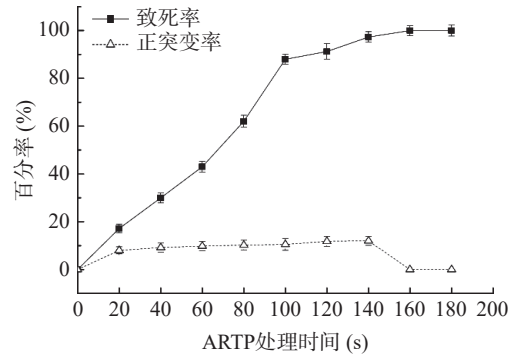


图3 ARTP-化学诱变致死率和正突变率

Fig.3 ARTP-chemical mutagenesis lethality and positive mutation rate

(327.78 mg/L)、mutUA362(362.51 mg/L)、mutUA558 (370.92 mg/L)与紫外诱变突变株 mutUV503 (221.39 mg/L)的对比。其中突变体 mutUA397 的 Fengycin 产量最高为 388.34 mg/L, 较未经 ARTP-化学诱变前提升了 75.4%; 童凡等^[24]通过 ARTP 诱变育种, 使得产淀粉酶菌株酶活提升了 78%。紫外诱变后的突变体经 ARTP-化学诱变后, Fengycin 产量再次大幅提升, 这是由于同一菌株经单一诱变处理, 会产生“疲劳效应”, 从而影响细胞的生长、代谢等, 造成诱变效果不理想, 因此采用多种手段对菌株进行复合诱变, 更容易获得高产突变株^[25]。因此, 选择突变菌株 mutUA397(命名为 UA397)进行下进一步的实验。

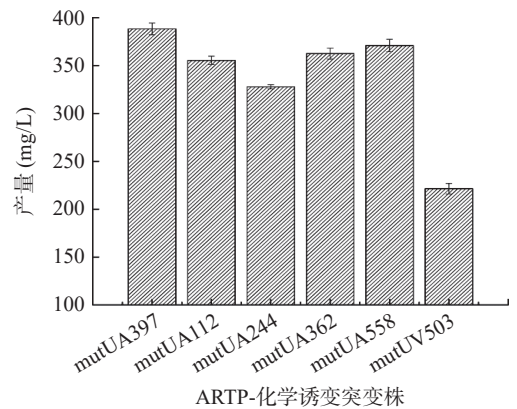


图4 ARTP-化学诱变突变株 Fengycin 产量

Fig.4 Fengycin production of ARTP-chemical mutagenesis mutants

2.3 突变体鉴定和基因簇分析

将突变株 UA397 基因序列与 NCBI 数据库对比, 16S 比对结果如表 3 所示, 结果显示突变株 UA397 与暹罗芽孢杆菌 *Bacillus siamensis*.GCF_000262045.1 最为接近, 序列相似度为 99.871%, 比对覆盖率 100%。通过 Mega 6.0 软件选择 NJ(Neighbor-Joining)法, 基于 20 株与突变株 UA397 在种属水平上最接近菌种的核心序列构建系统进化树, 如图 5 所示。根据系统临近进化树, 突变株 UA397 被归为暹罗芽孢杆菌。

表 3 突变株 UA397 的 16S 比对详情

Table 3 16S comparison details of mutant UA397

样本名称	Hit ID	物种	序列一致性(%)	比对序列覆盖度(%)	可靠性的评价	比对得分
UA397	GCF_000262045.1	<i>Bacillus_siamensis</i>	99.871	100	0	2846
UA397	GCF_004570425.1	<i>Blastococcus_sp004570425</i>	99.677	100	0	2830
UA397	GCF_000196735.1	<i>Bacillus_amyloliquefaciens</i>	99.677	100	0	2830
UA397	GCF_001584325.1	<i>Bacillus_nakamurai</i>	99.612	100	0	2824
UA397	GCF_000009045.1	<i>Bacillus_subtilis</i>	99.612	100	0	2824
UA397	GCF_000507145.1	<i>Bacillus_tequilensis</i>	99.418	100	0	2808
UA397	GCA_000332645.1	<i>Bacillus_inaquosorum</i>	99.417	100	0	2800
UA397	GCF_001969815.1	<i>Bacillus_swezeyi</i>	97.878	100	0	2606
UA397	GCF_000724485.1	<i>Bacillus_Z_methanolicus_A</i>	95.281	99.87	0	2449
UA397	GCF_000262755.1	<i>Bacillus_Z_methanolicus</i>	95.09	99.81	0	2435
UA397	GCF_002734215.1	<i>Bacillus_Q_onubensis</i>	94.839	99.68	0	2412
UA397	GCF_002563635.1	<i>Anaerobacillus_A_sp002563635</i>	94.277	99.49	0	2366
UA397	GCA_002243685.1	<i>Bacillus_A_thuringiensis</i>	94.254	99.74	0	2362
UA397	GCF_002577405.1	<i>Bacillus_A_cereus_AU</i>	94.19	99.74	0	2357
UA397	GCF_001683825.1	<i>Zeaxanthinibacter_sp001683825</i>	94.194	99.68	0	2357
UA397	GCF_000007825.1	<i>Bacillus_A_cereus</i>	94.194	99.68	0	2357
UA397	GCF_002578045.1	<i>Bacillus_A_cereus_AK</i>	94.19	99.74	0	2355
UA397	GCF_002200015.1	<i>Bacillus_A_cereus_AZ</i>	94.129	99.68	0	2351
YA215	GCF_001455345.1	<i>Bacillus_A_thuringiensis_N</i>	94.129	99.68	0	2351
YA215	GCF_001042485.2	<i>Bacillus_paralicheniformis</i>	98.643	100	0	2348

注: 可靠性的评价, 值越小, 越可信; 比对得分的值越高, 两个序列的同源性越高。

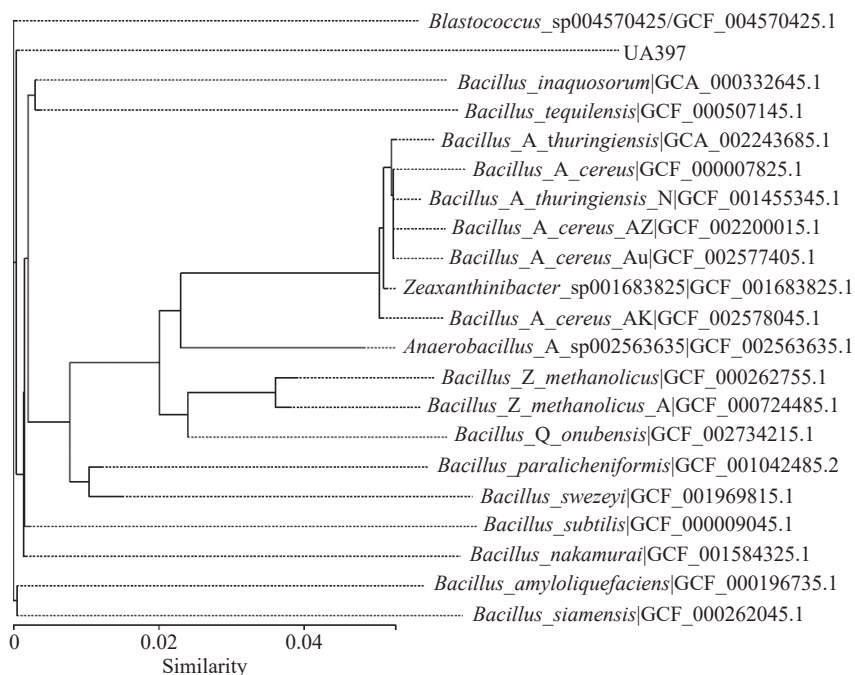


图 5 系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree

暹罗芽孢杆菌 UA397 的基因组 Clusters of Orthologous Groups of Proteins 注释分析如图 6 所示, 突变株 UA397 中共有 3086 个基因得到了 COG 注释, 占基因组中 81.10% 的基因共具有 23 个 COG 功能分类, 其中 19.9% 的基因没有功能特征。涉及氨基酸转运与代谢的基因为第一大类, 共注释 304 个基因; 次级代谢产物基因簇分析中发现 Fengycin 合成基因簇, 如图 7 所示。

2.4 发酵工艺优化

2.4.1 单因素实验

2.4.1.1 不同碳源对 Fengycin 产量的影响 图 8 显

示了不同碳源(蔗糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、可溶性淀粉)对暹罗芽孢杆菌 UA397 的 Fengycin 产量的影响。结果表明, 当蔗糖为单一碳源时, Fengycin 产量最高; 葡萄糖为单一碳源时, Fengycin 产量最低。相较于葡萄糖等单糖, 双糖和多糖更有利于促进暹罗芽孢杆菌 UA397 发酵过程中脂肽类次级代谢产物 Fengycin 产量的提高, 这也与冒鑫哲等^[26]的研究一致, 因此选择蔗糖为最佳碳源。

2.4.1.2 碳源添加量对 Fengycin 产量的影响 图 9

显示了最佳单一碳源蔗糖不同添加量(10、15、20、25、30、35 g/L)对 Fengycin 产量的影响。结果表

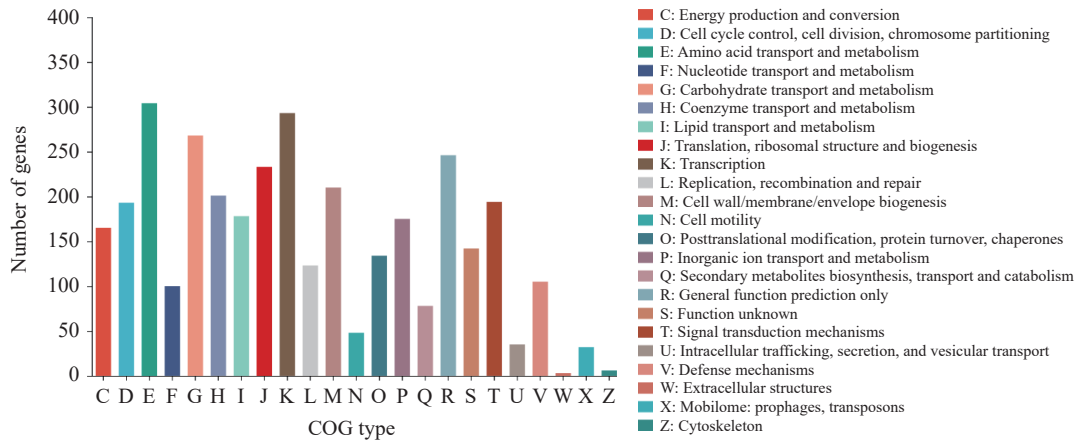


图 6 COG 功能注释

Fig.6 COG functional notes

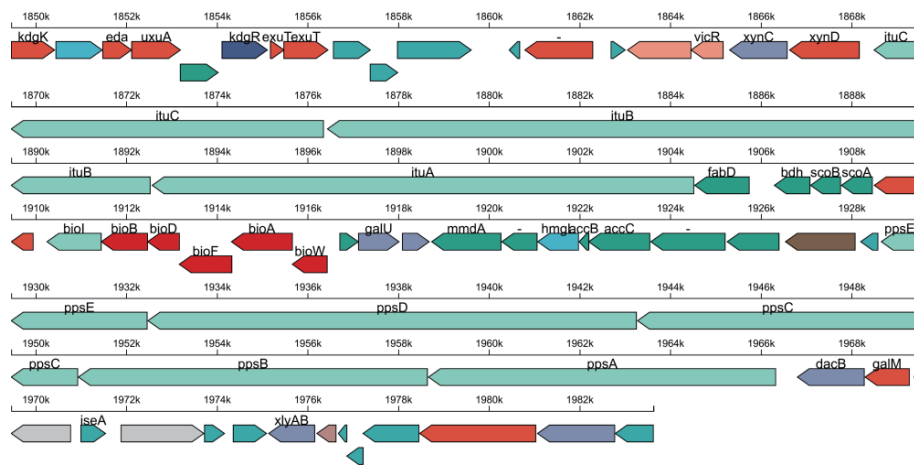


图 7 Fengycin 合成基因簇线性图谱

Fig.7 Linear map of Fengycin synthetic gene cluster

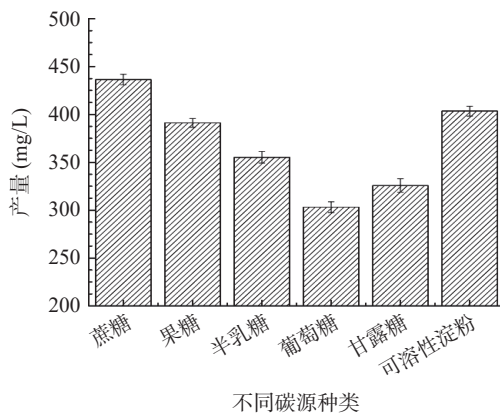


图 8 不同碳源种类对 Fengycin 产量的影响

Fig.8 Effects of different carbon sources on the yield of Fengycin

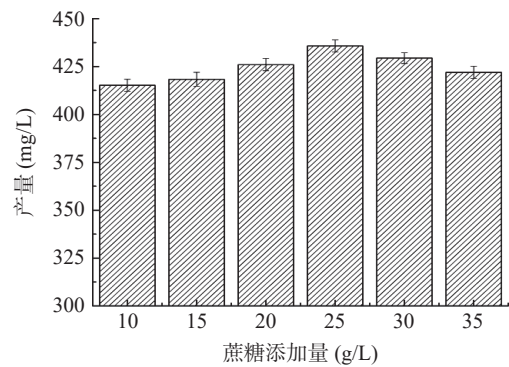


图 9 不同蔗糖添加量对 Fengycin 产量的影响

Fig.9 Effects of different sucrose additions on the yield of Fengycin

明,随着蔗糖添加量的不断增加, Fengycin 产量呈现先上升后下降的趋势,当蔗糖添加量为 25 g/L 时,获得了最高的 Fengycin 产量 435.75 mg/L。当蔗糖添加量较低时,不足以满足暹罗芽孢杆菌 UA397 的生长繁殖,会导致 Fengycin 产量下降。韩唱等^[27]报道了蔗糖添加量过高时,会导致液体培养基中溶氧量不足与渗透压增大,影响芽孢杆菌的生长和多肽类次级代谢物的产量。因此选择 25 g/L 为最佳碳源添加量。

2.4.1.3 不同氮源对 Fengycin 产量的影响 图 10 显示了不同氮源(蛋白胨、酵母提取物、玉米浆、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 、 $NaNO_3$)对 Fengycin 产量的影响。结果表明,氮源的种类对 Fengycin 产量有极大的影响,当蛋白胨作为氮源时,获得了最佳的 Fengycin 产量 438.44 mg/L。蛋白胨、酵母提取物、玉米浆等有机氮源相较于无机氮源更加有利于芽孢杆菌的生长与多肽类次级代谢产物的产生^[27]。因此选择蛋白胨作为最佳氮源。

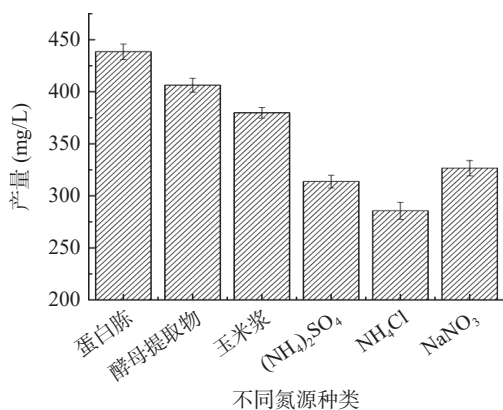


图 10 不同氮源种类对 Fengycin 产量的影响

Fig.10 Effects of different nitrogen sources on the yield of Fengycin

2.4.1.4 不同氮源添加量对 Fengycin 产量的影响

图 11 显示了最佳氮源蛋白胨不同添加量(10、15、20、25、30、35 g/L)对 Fengycin 产量的影响。结果表明,随着蛋白胨添加量的增加,Fengycin 产量不断提升。当蛋白胨添加量到达 30 g/L 以后,随着蛋白胨添加量的增加,Fengycin 产量达到 450.01 mg/L 后不再提升,这也冒鑫哲等^[26]的研究一致。出于节约成本方面的考虑,选择最佳蛋白胨添加量为 30 g/L。

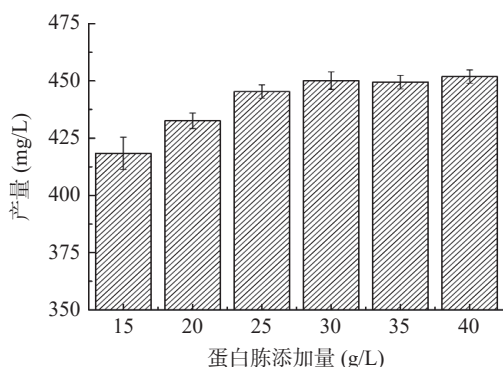


图 11 不同蛋白胨添加量对 Fengycin 产量的影响

Fig.11 Effects of different peptone additions on the yield of Fengycin

2.4.1.5 不同接种量对 Fengycin 产量的影响

图 12 显示了不同接种量(1%、3%、5%、7%、9%)对 Fengycin 产量的影响。结果表明,随着接种量的增加,Fengycin 产量呈现先上升,后下降的趋势,在接种量为 5% 时,Fengycin 产量达到最大值 475.35 mg/L。接种量过大时,导致后期发酵液中菌体浓度过大,菌体利用培养基中的营养生长发育,最终导致多肽类次级代谢产物 Fengycin 产量下降^[28-29]。因此响应面 Box-Behnken 试验设计选取的水平为 3%、5%、7%。

2.4.1.6 不同发酵温度对 Fengycin 产量的影响

图 13 显示了不同发酵温度(31、34、37、40、43 ℃)对 Fengycin 产量的影响。结果表明,随着发酵温度的增加,Fengycin 产量呈现先上升,后下降的趋势,在发酵温度为 37 ℃ 时,Fengycin 产量达到最大值 475.75 mg/L。过高过低的发酵温度都不利于菌

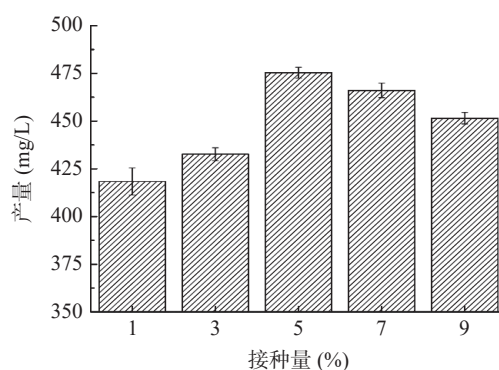


图 12 不同接种量对 Fengycin 产量的影响

Fig.12 Effects of different inoculations on Fengycin yield

体的生长繁殖,从而导致多肽类次级代谢产物 Fengycin 的产量下降,冒鑫哲等^[26]报道了 37 ℃ 为最适宜芽孢杆菌生产的温度。因此响应面 Box-Behnken 试验设计选取的水平为 34、37、40 ℃。

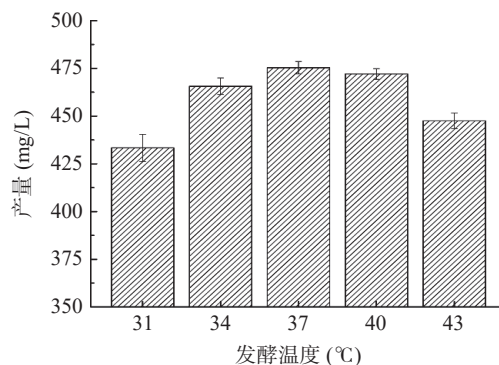


图 13 不同发酵温度对 Fengycin 产量的影响

Fig.13 Effects of different fermentation temperatures on the yield of Fengycin

2.4.1.7 不同发酵时间对 Fengycin 产量的影响

图 14 显示了不同发酵时间(12、24、36、48、60 h)对暹罗芽孢杆菌 UA397 的 Fengycin 产量的影响。结果表明,随着发酵时间的延长,Fengycin 产量呈现先上升,后下降的趋势,在发酵时间为 36 h 时,Fengycin 产量达到最大值 513.64 mg/L。发酵时间不到 24 h 时,菌体还在对数生长期,未能进入平稳期,因此,Fengycin 产量极低;发酵时间过长,发酵液中营养物质不足,菌体将次级代谢产生的多肽 Fengycin 用于

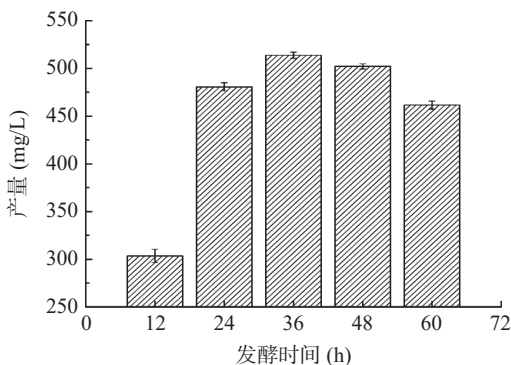


图 14 不同发酵时间对 Fengycin 产量的影响

Fig.14 Effect of different fermentation time on the yield of Fengycin

生长繁殖, 从而导致 Fengycin 产量下降^[30-31,20]。因此响应面 Box-Behnken 试验设计选取的水平为 24、36、48 h。

2.4.2 响应面试验设计 在单因素实验的结果的基础上, 以 A(接种量)、B(发酵温度)、C(发酵时间) 3 个对 Fengycin 产量有重要影响的因素为自变量, 以 Y(Fengycin 产量)为响应值, 采用 Design Expert 8.0.6 软件设计了三因素三水平的响应面试验, Box-Behnken 试验设计与结果见表 4。

表 4 Box-Behnken 试验设计与结果
Table 4 Design and results of Box-Behnken experimental design

实验号	A 接种量 (%)	B 发酵温度 (°C)	C 发酵时间 (h)	Fengycin 产量 (mg/mL)
1	3	34	36	448.35
2	7	34	36	463.23
3	3	40	36	472.67
4	7	40	36	478.67
5	3	37	24	438.56
6	7	37	24	463.67
7	3	37	48	476.35
8	7	37	48	451.67
9	5	34	24	465.21
10	5	40	24	473.31
11	5	34	48	480.65
12	5	40	48	488.67
13	5	37	36	513.31
14	5	37	36	507.96
15	5	37	36	517.64
16	5	37	36	516.33
17	5	37	36	514.35

对 A(接种量)、B(发酵温度)、C(发酵时间) 3 个单因素进行二次多项式回归拟合, 构建响应值 Y(Fengycin 产量)的回归模型方程表示为:

$$Y=513.92+2.66A+6.99B+7.07C-2.22AB-12.45AC-0.02BC-33.79A^2-14.40B^2-22.56C^2$$

对回归模型进行方差分析和差异显著性检验如表 5 所示, 回归模型 F 值为 43.39 ($P<0.0001$), 极其显著; 失拟项的 F 值为 3 ($P=0.1583$), 不显著, 表明该模型拟合良好。确定系数 R^2 为 0.9824, 表明 Fengycin 产量的预测值与真实值具有较高的一致性。此

外, $R^2_{Pre}=0.7965$ 和 $R^2_{Adj}=0.9598$, 表明该模型具有较好的拟合度和可信度, 能够准确地预测响应值 Fengycin 产量与模型中各个因素之间的关系。其中接种量(A)对 Fengycin 产量影响不显著($P>0.05$), 发酵温度(B)和发酵时间(C)对 Fengycin 产量影响极显著($P<0.01$); 交互项 AB、BC 对 Fengycin 产量影响不显著($P>0.05$), AC 对 Fengycin 产量影响极显著($P<0.01$); 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对 Fengycin 产量影响极显著($P<0.01$)。

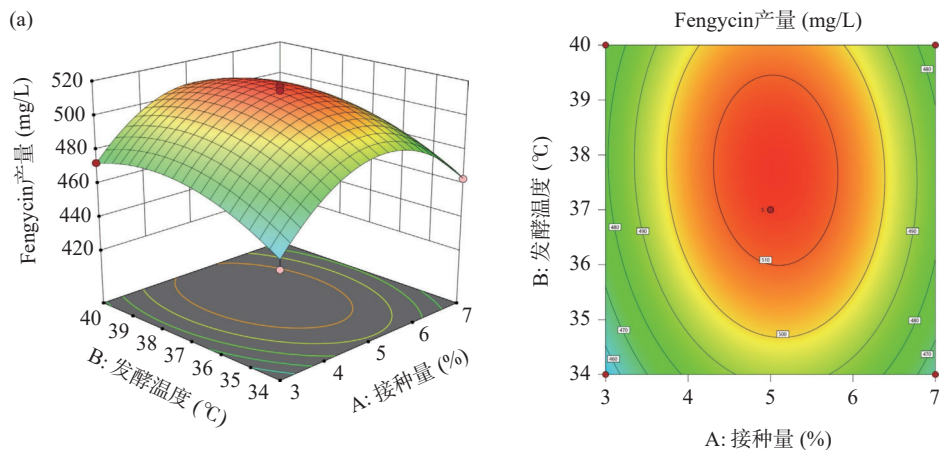
表 5 回归模型方差分析
Table 5 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	10097.67	9	1121.96	43.39	<0.0001	**
A	56.76	1	56.76	2.2	0.182	-
B	390.32	1	390.32	15.1	0.006	**
C	400.3	1	400.3	15.48	0.0056	**
AB	19.71	1	19.71	0.7624	0.4115	-
AC	619.76	1	619.76	23.97	0.0018	**
BC	0.0016	1	0.0016	0.0001	0.9939	-
A^2	4808.21	1	4808.21	185.96	<0.0001	**
B^2	872.52	1	872.52	33.74	0.0007	**
C^2	2143.49	1	2143.49	82.9	<0.0001	**
残差	180.99	7	25.86	-	-	-
失拟项	125.27	3	41.76	3	0.1583	不显著
误差项	55.73	4	13.93	-	-	-
总和	10278.67	16	-	-	-	-

注: *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$)。

响应面三维曲面图(图 15)可直观反映 A(接种量)、B(发酵温度)、C(发酵时间)各个因素之间的交互作用对 Fengycin 产量的影响。通过 3D 曲面坡度的变化趋势, 可以直观地看出各个因素对响应值 Fengycin 产量的影响, 等高线中的最小椭圆的中心点即是 Fengycin 产量的最高点。由图可以看出, 3 个因素对 Fengycin 产量影响的显著性顺序为 C(发酵时间)>B(发酵温度)>A(接种量)。

2.4.3 最佳发酵条件的确定及验证 从回归模型中, 预测到的最佳发酵条件为, 蔗糖 25 g/L、蛋白胨 30 g/L、接种量 5.006%、发酵温度 37.727 °C、发酵时间 37.873 h, 预测的 Fengycin 产量为 515.32 mg/L。



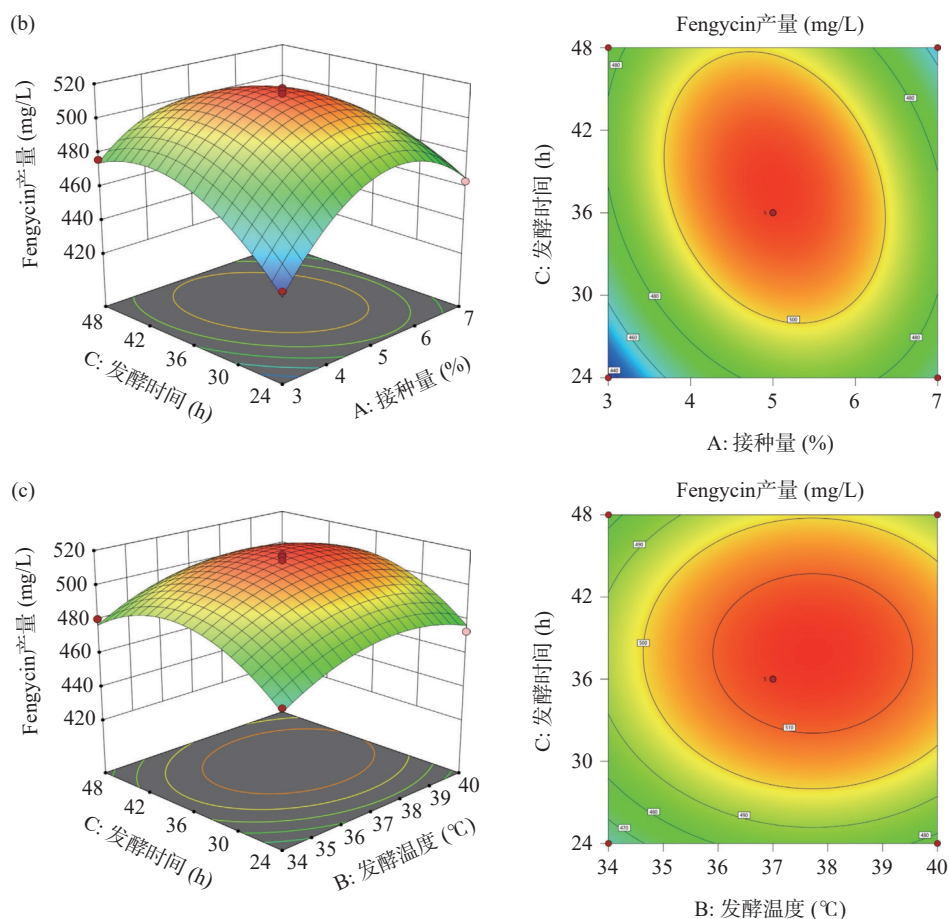


图 15 因素间交互作用对 Fengycin 产量影响的响应面及等高线图

Fig.15 Response surface and contour lines of the interaction of various factors on Fengycin production

为了验证响应面试验所确定的回归模型结果的准确性,并考虑到实际实验条件的限制,设置发酵条件为:蔗糖 25 g/L、蛋白胨 30 g/L、接种量 5.01%、发酵温度 37.7 °C、发酵时间 37.8 h,进行验证试验。验证实验所得 Fengycin 产量为 517.09 ± 1.78 mg/L。

3 结论

本研究通过 UV 和 ARTP-化学诱变选育相结合的方法获得了一株高产的 Fengycin 的暹罗芽孢杆菌 UA397,其 Fengycin 产量是野生型芽孢杆菌 YA-215 的 3.436 倍。此外通过基于 Box-Behnken 模型的响应面设计确定了暹罗芽孢杆菌 UA397 的最佳发酵条件:蔗糖 25 g/L、蛋白胨 30 g/L、接种量 5.01%、发酵温度 37.7 °C、发酵时间 37.8 h,在此条件下, Fengycin 产量为 517.09 mg/L,是出发菌株在未优化发酵工艺时产量的 4.57 倍。本实验为通过复合诱变育种和发酵工艺优化提高芽孢杆菌脂肽类次级代谢产物的产量提供一定的理论基础,同时也为 Fengycin 在医药、食品、农业等领域的产业化应用奠定产量基础。

参考文献

- [1] CAROLIN C F, KUMAR P S, NGUEAGNI P T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 407: 124827.
- [2] KASPAR F, NEUBAUER P, GIMPEL M. Bioactive sec-

ondary metabolites from *Bacillus subtilis*: A comprehensive review [J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(7): 2038–2053.

[3] FAZLE RABBEEM, BAEK K H. Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(21): 4973.

[4] DONG L, WANG P, ZHAO W, et al. Surfactin and fengycin contribute differentially to the biological activity of *Bacillus subtilis* NCD-2 against cotton verticillium wilt[J]. *Biological Control*, 2022, 174: 104999.

[5] GAO W, YIN Y, WANG P, et al. Production of fengycin from D-xylose through the expression and metabolic regulation of the Dahms pathway[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(7): 2557–2567.

[6] LI Y, LI J, YE Z, et al. Enhancement of angucycline production by combined UV mutagenesis and ribosome engineering and fermentation optimization in *Streptomyces dengaensis* XZHG99 (T)[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(2): 173–182.

[7] ZHANG N, ZHU X, YANG D, et al. Improved production of the tallysomyin H-1 in *Streptoalloteichus hindustanus* SB8005 strain by fermentation optimization[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1345–1353.

[8] ZHU X, ZHANG W, CHEN X, et al. Generation of high rapamycin producing strain via rational metabolic pathway-based mutagenesis and further titer improvement with fed-batch bioprocess optimization[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(3): 506–515.

[9] SHAKIBAIE M, AMERI A, GHAZANFARIAN R, et al. Statistical optimization of kojic acid production by a UV-induced mu-

- tant strain of *Aspergillus terreus*[J]. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 2018, 49(4): 865–871.
- [10] TOSCANO L, GOCHEV V, MONTERO G, et al. Enhanced production of extracellular lipase by novel mutant strain of *Aspergillus niger*[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2011, 25(1): 2243–2247.
- [11] LIN C Y, ZHANG Y, WU J H, et al. Regulatory patterns of *crp* on monensin biosynthesis in *Streptomyces cinnamonensis*[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 271.
- [12] ALVES I R, VÊNICO R Z, GALHARDO R S. Whole genome analysis of UV-induced mutagenesis in *Caulobacter crescentus*[J]. *Mutation Research*, 2022, 825: 111787.
- [13] SUGIYAMA T, CHEN Y. Biochemical reconstitution of UV-induced mutational processes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(13): 6769–6782.
- [14] AMERI A, SHAKIBAIE M, SOLEIMANI-KERMANI M, et al. Overproduction of thermoalkalophilic lipase secreted by *Bacillus atrophaeus* FSHM2 using UV-induced mutagenesis and statistical optimization of medium components[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2019, 49(2): 184–191.
- [15] BEACHAM T A, MACIA V M, ROOKS P, et al. Altered lipid accumulation in *Nannochloropsis salina* CCAP849/3 following EMS and UV induced mutagenesis[J]. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 2015, 7: 87–94.
- [16] 李光月, 李雪玲, 祁姣姣, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌表面活性素的发酵工艺[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(12): 146–154. [LI Guangyue, LI Xueling, QI Jiaojiao, et al. Optimization of fermentation conditions of surfactin from *Bacillus subtilis* by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(12): 146–154.]
- [17] 孟兆丽, 丛丽娜, 曾国洪, 等. 枯草芽孢杆菌 HS-A38 高产抗菌肽突变株的筛选及其抑菌机理的研究[J]. *工业微生物*, 2018, 48(2): 23–28. [MENG Zhaoli, CONG Lina, ZENG Guohong, et al. Screening of high yielding antibacterial peptide mutants from *Bacillus subtilis* HS-A38 and action mechanism of antibacterial peptides[J]. *Industrial Microbiology*, 2018, 48(2): 23–28.]
- [18] 辛磊, 安慧, 覃国乐, 等. 枯草芽孢杆菌 XL05 菌株的紫外诱变及发酵配方优化[J]. *发酵科技通讯*, 2020, 49(3): 142–146. [XIN Lei, AN Hui, QIN Guole, et al. The mutagenesis of *Bacillus subtilis* XL05 by UV radiation and optimization of fermentation medium formula[J]. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2020, 49(3): 142–146.]
- [19] 杨心萍, 宋词, 张伟豪, 等. 常压室温等离子体与 5-溴尿嘧啶复合诱变及快速选育腺苷高产菌株[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(9): 73–77. [YANG Xinpeng, SONG Ci, ZHANG Weihao, et al. Combined mutagenesis of ARTP and 5-BU for improving production of adenosine in *Bacillus subtilis*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(9): 73–77.]
- [20] GANCEL F, MONTASTRUC L, TAO L, et al. Lipopeptide overproduction by cell immobilization on iron-enriched light polymer particles[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(9): 975–978.
- [21] YU G, PENG H, CAO J, et al. Avilamycin production enhancement by mutagenesis and fermentation optimization in *Streptomyces viridochromogenes*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2022, 38(3): 50.
- [22] 沙见宇, 裴欢, 刘曦, 等. 高产 Monacolin K 红曲霉的诱变选育及其与酿酒酵母共酵培养[J]. *中国酿造*, 2023, 42(2): 189–192. [SHA Jianyu, PEI Huan, LIU Xi, et al. Mutagenesis of high-yield Monacolin K *Monascus* strains and co-fermentation culture with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *China Brewing*, 2023, 42(2): 189–192.]
- [23] 吴亦楠, 邢新会, 张翀, 等. ARTP 生物育种技术与装备研发及其产业化发展[J]. *生物产业技术*, 2017(1): 37–45. [WU Yinan, XING Xinhui, ZHANG Chong, et al. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma(ARTP) biobreeding technology, instrumentation and its industrialization[J]. *Biotechnology & Business*, 2017(1): 37–45.]
- [24] 童凡, 黄家琪, 范坚强, 等. 常压室温等离子体诱变选育淀粉酶菌株及其酶学特性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(20): 137–143. [TONG Fan, HUANG Jiaqi, FAN Jianqiang, et al. Selection of amylase producing strain by atmospheric and room temperature plasmas and its enzymological properties[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(20): 137–143.]
- [25] 杨小冲, 陈忠军. 新型物理诱变技术在微生物育种中的应用进展[J]. *食品工业*, 2017, 38(3): 242–245. [YANG Xiaochong, CHEN Zhongjun. Application progress of new microorganism physical mutation breeding technology[J]. *The Food Industry*, 2017, 38(3): 242–245.]
- [26] 冒鑫哲, 彭政, 周冠宇, 等. 枯草芽孢杆菌高产角蛋白酶发酵条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(17): 138–144. [MAO Xinzhe, PENG Zheng, ZHOU Guanyu, et al. Optimized fermentation for improving keratinase production by *Bacillus subtilis* WB600[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(17): 138–144.]
- [27] 韩唱, 宿玲恰, 吴敬. *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 麦芽寡糖基海藻糖合成酶在 *Bacillus subtilis* 中的重组表达和发酵优化[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(7): 162–168. [HAN C, SU L Q, WU J. Recombinant expression and fermentation optimization of *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 maltotriose synthase in *Bacillus subtilis*[J]. 2017, 33(7): 162–168.]
- [28] 王莹, 包怡红, 康宁. 混菌固态发酵榛仁粕制备降血压肽工艺优化研究[J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(12): 35–41. [WANG Luan, BAO Yihong, KANG Ning. Optimization of antihypertensive peptide preparation by mixed solid fermentation of hazelnut meal[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2018, 33(12): 35–41.]
- [29] LI Y, CHEN Y, TIAN X, et al. Advances in sophorolipid-producing strain performance improvement and fermentation optimization technology[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(24): 10325–10337.
- [30] 鞠兴荣, 王雪峰, 王立峰, 等. 混菌固态发酵菜籽粕制备菜籽肽的菌种筛选[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(9): 104–108. [JU X R, WANG X F, WANG L F, et al. Study on screening of strains used for preparing rapeseed peptide from rapeseed meal by mixed fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(9): 104–108.]
- [31] ZHANG X, CHEN X, QIAO X, et al. Isolation and yield optimization of lipopeptides from *Bacillus subtilis* Z-14 active against wheat take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*[J]. *Journal of Separation Science*, 2021, 44(4): 931–940.