

研究报告

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

田萍萍 曹鹏 常传友 胡栋 张健 高强*

(工业发酵微生物教育部重点实验室 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

摘要:【目的】通过诱变筛选技术选育阿维菌素高产突变株,对其发酵培养基进行响应面优化,提高阿维菌素产量。【方法】采用常压室温等离子体(ARTP)诱变技术,结合链霉抗性和卡那霉素抗性筛选法及96深孔板高通量筛选法,筛选阿维菌素高产株。在单因素实验的基础上,应用响应面分析法对其发酵培养基进行优化,最后确定最佳培养基配方。【结果】获得一株遗传性状稳定的阿维菌素高产株K-1A6,其阿维菌素产量达到4.22 g/L,比出发菌株9-39提高了23.4%,在最佳培养基中阿维菌素产量达到5.36 g/L,较优化前提高了27.01%。【结论】通过对阿维链霉菌9-39菌株进行ARTP诱变筛选及发酵培养基优化研究能显著提高阿维菌素的产量。

关键词: 阿维菌素, 常压室温等离子体诱变技术, 抗性筛选, 高通量筛选, 响应面分析法

Atmospheric and room temperature plasma breeding and medium optimization of avermectin producing strains

TIAN Ping-Ping CAO Peng CHANG Chuan-You HU Dong ZHANG Jian GAO Qiang*

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: [Objective] To improve avermectin yield, mutants of *Streptomyces avermitilis* 9-39 were screened and the fermentation medium was optimized. [Methods] Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) technology was used to treat the spores of *S. avermitilis* 9-39. The method of streptomycin and kanamycin resistance combined with 96 deep-well plate screening was used for high-throughput screening of high-yielding mutants. Furthermore, based on single factor experiments, the fermentation medium for mutants was optimized by response surface methodology. [Results] A stable avermectin high-producing mutant K-1A6 was obtained and its avermectin production reached 4.22 g/L, 23.4% higher than that of the parent strain 9-39. Under the optimized medium fermentation, the yield of avermectin reached 5.36 g/L, 27.01% higher than that before optimization. [Conclusion] The yield of avermectin can be increased by ARTP mutagenesis, screening and fermentation medium optimization.

Foundation item: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB734004); National Natural Science Foundation of China (No. 31370075, 31471725)

*Corresponding author: Tel: 86-22-60602715; E-mail: gaoqiang@tust.edu.cn

Received: May 17, 2016; Accepted: July 25, 2016; Published online (www.cnki.net): August 31, 2016

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(No. 2013CB734004); 国家自然科学基金项目(No. 31370075, 31471725)

*通讯作者: Tel: 86-22-60602715; E-mail: gaoqiang@tust.edu.cn

收稿日期: 2016-05-17; 接受日期: 2016-07-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-08-31

Keywords: Avermectin, Atmospheric and room temperature plasma (ARTP), Resistance selection, High-throughput screening, Response surface methodology

阿维菌素(Avermectin, AVM)是由阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)产生的高效低毒生物杀虫剂,以其独特的作用机制、残留低等特点越来越受人们的关注^[1]。随着 Satoshi Ōmura 教授和 William C. Campbell 博士因阿维菌素的应用荣获 2015 年诺贝尔生理与医学奖,阿维菌素有望迎来其发展的第二个黄金时代^[2]。虽然目前我国阿维菌素原料产量已占国际市场的 100%,但原有生产菌株的发酵产量偏低,高能耗、高污染、片面追求生产规模的粗放型发展模式已经阻碍了低碳经济的持续快速发展^[3],要想从根本上解决该问题,就必须筛选出阿维菌素高产菌株并对其发酵工艺进行优化。

常压室温等离子体诱变系统(Atmospheric and room temperature plasma, ARTP)通过射频辉光放电产生各种高能活性粒子,引起微生物的突变。该高能粒子不会破坏细胞的物理结构,但能使细胞壁和细胞膜的通透性发生改变,影响细胞内蛋白质的活性,并且使细胞内的 DNA 受到损伤,通过控制离子体射流的强度,可以形成 4 万-10 万个突变体^[4-5]。很多实验结果表明,ARTP 诱变技术是一种高效、安全、操作简便、成本低的微生物诱变育种技术,能够快速地突变细菌、真菌、酵母等微生物,并获得多种突变型^[6-8]。根据分子育种中关于抗生素产生菌抗性基因与抗生素合成的结构基因和调控基因紧密连锁从而容易发生共突变的理论,采用抗生素抗性筛选法,很大程度上减少了抗生素高产菌筛选的盲目性和不定向性,极大地提高了筛选效率^[9]。此外,响应面优化设计法是一种实验条件寻优的统计学分析方法,它克服了传统优化方法的缺点,在优化反应条件和加工工艺参数方面都取得了良好的效果^[10-12]。

本研究对中国科学院微生物研究所提供的 *S. avermitilis* 9-39 菌株进行 ARTP 诱变处理,经抗性筛选法及高通量筛选法选育出阿维菌素高产突变

株,并对该高产突变株的发酵培养基进行优化,以期进一步提高阿维菌素的产量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*) 9-39 菌株由中国科学院微生物研究所张立新研究员提供。

1.1.2 主要试剂和仪器: 可溶性淀粉、豆粕粉、酵母粉、酵母膏与麦芽膏,北京奥博星生物技术有限责任公司; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、PEG6000、 CaCO_3 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COONa}$ 、甘露醇、甲醇与维生素 B_1 ,天津市北方天医化学试剂厂;阿维菌素标品(纯度 $\geq 99.9\%$),美国 Sigma 公司。

ARTP-II 诱变系统,北京思清源生物科技有限公司; Agilent 1200 高效液相色谱仪(High Performance Liquid Chromatography, HPLC),美国安捷伦科技有限公司;LRH-250A 生化培养箱,韶关市泰宏医疗器械有限公司;ZWYR-D2403 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 培养基的配制和培养方法

活化培养基 MS (g/L): 豆粕粉 20.0,甘露醇 20.0,琼脂 20.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

产孢培养基 YMS (g/L): 酵母膏 4.0,可溶性淀粉 4.0,麦芽膏 10.0, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005,琼脂 20.0, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

种子培养基(g/L): 淀粉液化液 30.0,黄豆饼粉 8.0,花生饼粉 10.0,酵母粉 4.0, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.03, pH 6.86-6.90, 1×10^5 Pa 灭菌 25 min^[13]。

发酵培养基(g/L): 淀粉液化液 150.0,黄豆饼粉 28.0,酵母粉 9.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.022, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 3, CaCO_3 0.8, PEG6000 2.0, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COONa}$ 2 mmol/L, pH 7.45-7.50, 1×10^5 Pa 灭菌 25 min; 维生素 B_1 0.1 g/L 过滤除菌后加入到已灭菌的培养基中。菌种

活化、种子培养和摇瓶发酵培养方法见文献[13]。

1.3 诱变方法

1.3.1 常压室温等离子体诱变方法: ARTP-II 型育种机以氦气作为工作气体, 氦气流量 10 L/min; 处理功率 115 W; 样品与等离子体发生器出口距离 2 mm; 处理样品为 10 μ L 浓度为 1×10^8 个/mL 的孢子悬液。

1.3.2 诱变初筛: 将经过诱变和抗性筛选的菌株用灭菌牙签点接在含有 400 μ L 固体发酵培养基的 96 深孔板中, 28 $^{\circ}$ C 培养 10 d 后, 每孔中加入 1 mL 甲醇, 超声清洗机中超声提取 20 min, 0.22 μ m 滤膜过滤提取液, HPLC 测阿维菌素产量。

1.3.3 诱变复筛: 以出发菌株 *S. avermitilis* 9-39 菌株为对照(CK), 选取初筛产量高出 15% 以上的突变株, 逐个进行摇瓶发酵, 测定阿维菌素的产量。

1.3.4 突变株稳定性试验: 将经过诱变复筛得到的阿维菌素高产突变株在 YMS 培养基平板上转接 10 代, 分别取第 2、4、6、8、10 代斜面菌株进行摇瓶发酵试验, 测定阿维菌素的产量, 检测菌株的遗传稳定性。

1.4 分析方法

1.4.1 阿维菌素的产量测定方法: HPLC 法检测^[14]。

1.4.2 诱变致死曲线的测定: 刮取成熟的阿维链霉菌孢子, 用无菌水配制成的浓度为 1×10^8 个/mL 的单孢子悬液, ARTP 分别诱变 10、30、60、100、150 s, 分别涂布于含 1.6 mg/L 链霉素或含 0.4 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基平板上, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 4 d。为了寻找最佳的诱变处理时间, 首先利用活菌计数法(CFU)计算不同诱变时间对孢子的致死率, 根据阿维菌素产量变化计算正突变率。

致死率=(对照组菌落数-诱变组菌落数)/对照组菌落数 \times 100%;

正突变率=诱变组阿维菌素高产菌株数/诱变组测定菌株数 \times 100%。

1.4.3 抗性平板中链霉素和卡那霉素浓度的确定: 取制备好的 1×10^8 个/mL 孢子悬液, 涂布于含有不同浓度的链霉素或卡那霉素的 MS 培养基平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 4 d 后进行菌落计数, 计算存活

率。根据微生物诱变育种理论, 致死率在 90%–95% 范围内的正突变率最高, 因而选取阿维链霉菌存活率低于 5% 的抗生素浓度为筛选阿维链霉菌突变株的最适浓度。

1.5 发酵培养基的优化

1.5.1 Plackett-Burman 设计: 在单因素实验的基础上, 采用 Plackett-Burman 两水平法对影响阿维菌素的 11 种因素(另设 4 个虚构因素估计误差进行考察), 筛选出对阿维菌素的产量有显著作用的因素。使用 Minitab 16.0 软件进行 Plackett-Burman 实验设计, 试验因素水平及编码见表 1。

1.5.2 最陡爬坡试验: 由于响应面拟合多项式模型只有在所考察的紧接邻域之内才能充分近似真实情形, 为了更快地获得最佳优化区域, 设计最陡爬坡实验。

1.5.3 Box-Behnken 试验: 通过最陡爬坡试验获得阿维菌素最大产量区域后, 根据中心点确定显著因子的高、中、低水平, 分别以 -1、0、1 编码(表 2),

表 1 Plackett-Burman 试验因素水平及编码
Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

代码 Code	因素 Factors	水平 Levels		
		-1	0	1
X_1	CH ₃ CH ₂ COONa (mmol/L)	1.4	2.0	2.6
X_2	PEG6000 (g/L)	1.4	2.0	2.6
X_3	维生素 B ₁ (g/L)	0.07	0.10	0.13
X_5	黄豆饼粉 Soya flour (g/L)	20.0	28.0	36.0
X_6	酵母粉 Yeast extract (g/L)	6.3	9.0	11.7
X_7	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (mg/L)	15.4	22.0	28.6
X_9	MnSO ₄ ·H ₂ O (mg/L)	1.61	2.30	3.00
X_{10}	CoCl ₂ (mg/L)	14.0	20.0	26.0
X_{11}	CaCO ₃ (g/L)	0.56	0.80	1.04
X_{13}	淀粉液化液 Corn starch (g/L)	113	150	187
X_{14}	(NH ₄) ₂ SO ₄ (mg/L)	175	250	325

表 2 Box-Behnken 试验因素水平及编码
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design

代码 Code	因素 Factors	水平 Levels		
		-1	0	1
X_1	酵母粉 Yeast extract (g/L)	4.9	6.2	7.6
X_2	黄豆饼粉 Soya flour (g/L)	16.0	20.0	24.0
X_3	淀粉液化液 Corn starch (g/L)	160	180	200
X_4	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	0.140	0.175	0.215

并使用 Minitab 16.0 软件进行响应面实验设计。

2 结果与分析

2.1 抗性平板中链霉素和卡那霉素浓度的确定

由图 1 可知, 随着链霉素浓度的增加, 阿维链霉素的存活率下降, 当链霉素浓度达到 1.6 mg/L 时, 链霉菌存活率为 3%, 因此选择 1.6 mg/L 的链霉素为阿维链霉菌突变株的筛选浓度。阿维链霉菌对卡那霉素极度敏感, 0.2 mg/L 的卡那霉素能使阿维链霉菌致死率达到 85%, 当卡那霉素浓度达到 0.4 mg/L 时, 阿维链霉菌存活率为 3%, 因此选择 0.4 mg/L 的卡那霉素为阿维链霉菌突变株的筛选浓度。

2.2 ARTP 诱变

2.2.1 ARTP 诱变时间的确定: 从图 2 可以看出, 以链霉素进行抗性筛选时, ARTP 诱变时间为 30 s

时正突变率最大, 达到 35% 以上, 因此选择 30 s 为该条件下阿维链霉菌最适诱变时间。以卡那霉素进行抗性筛选时, ARTP 诱变时间为 60 s 时正突变率最大, 达到 25% 以上, 因此选择 60 s 为该条件下阿维链霉菌 9-39 菌株的最适诱变时间。

2.2.2 链霉素抗性突变株初筛: 取制备好的 1×10^8 个/mL 孢子悬液, ARTP 诱变 30 s 后涂布于含 1.6 mg/L 链霉素的 MS 培养基平板上培养, 挑选出菌落形态规整、褶皱均匀的菌落(73 株), 利用研究建立的高通量筛选方法对其进行初筛。如图 3 所示, 有 45 株诱变株产量高于出发菌株 9-39 (CK), 正向突变率达到 61.64%, 其中阿维菌素产量提高 15% 以上的有 9 株, 占正突变株的 20%。

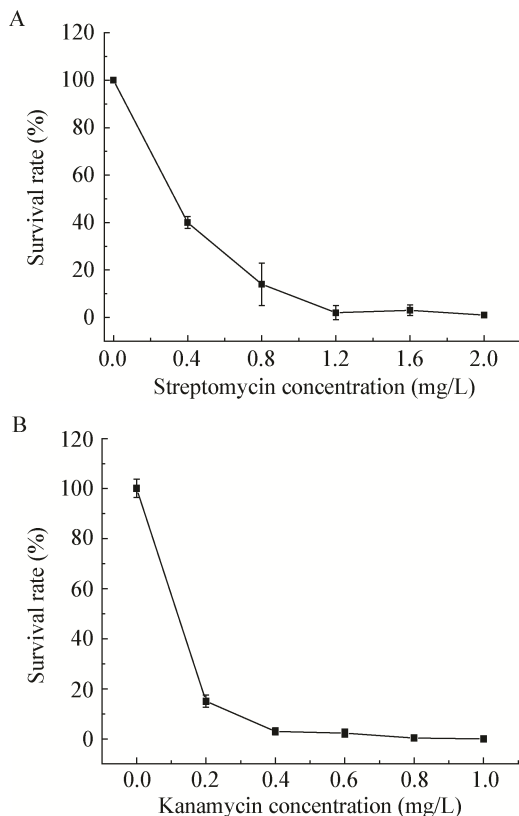


图 1 链霉素(A)和卡那霉素(B)对阿维链霉素的致死曲线
Figure 1 The lethality rate curves at different streptomycin (A) and kanamycin (B) concentrations

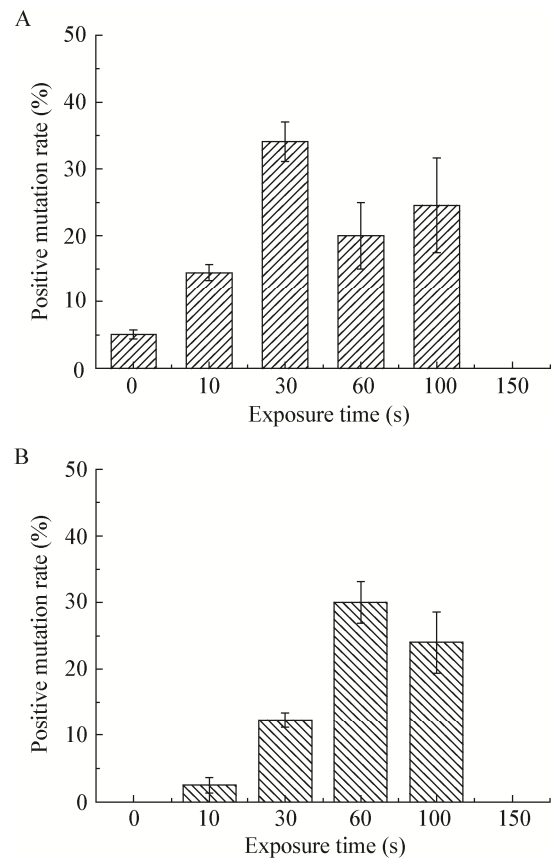


图 2 不同诱变时间抗性筛选的正突变率
Figure 2 Positive mutation rate at different mutagenesis times
注: A: 链霉素抗性筛选; B: 卡那霉素抗性筛选。

Note: A: Streptomycin resistant screening; B: Kanamycin resistant screening.

2.2.3 卡那霉素抗性突变株初筛：取制备好的 1×10^8 个/mL 孢子悬液，ARTP 诱变 60 s 后，涂布于含 0.4 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基平板上培养，挑选菌落形态规整、褶皱均匀的菌落 52 株，利用

研究建立的高通量筛选方法进行初筛。如图 4 所示，有 37 株诱变株产量高于出发菌株 96-39 (CK)，正向突变率达到 71.15%，其中阿维菌素产量提高 15% 以上的有 7 株，占正突变株的 18.9%。

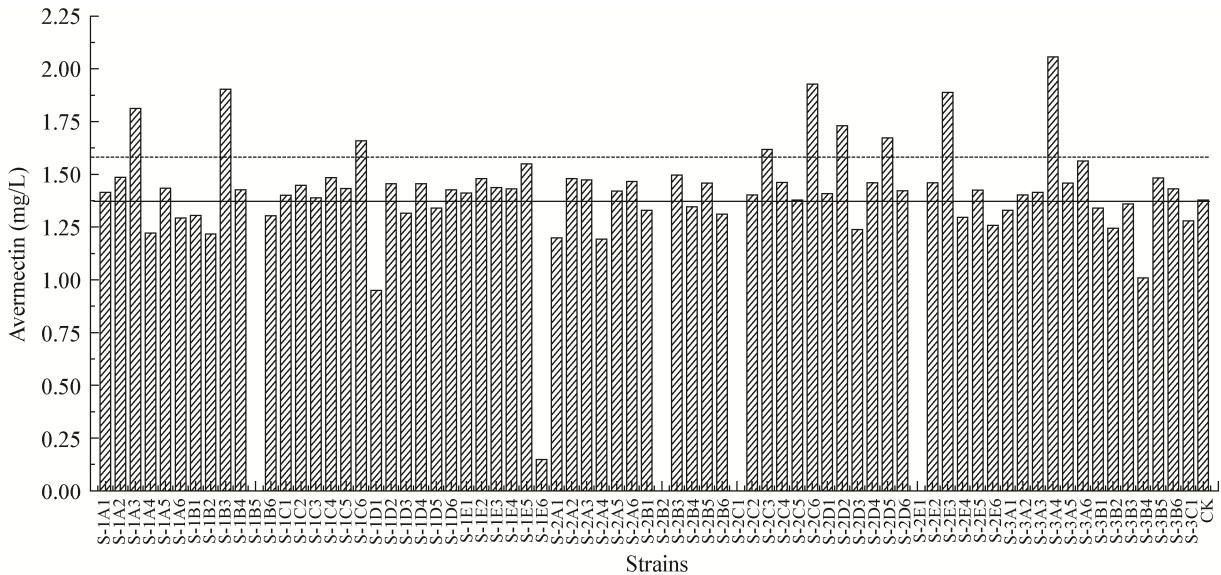


图 3 链霉素抗性突变株和出发菌株 96 深孔板培养 10 d 阿维菌素产量

Figure 3 Avermectin production of the streptomycin resistant mutants and original strain in 96 deep-well plate by 10 d cultivation

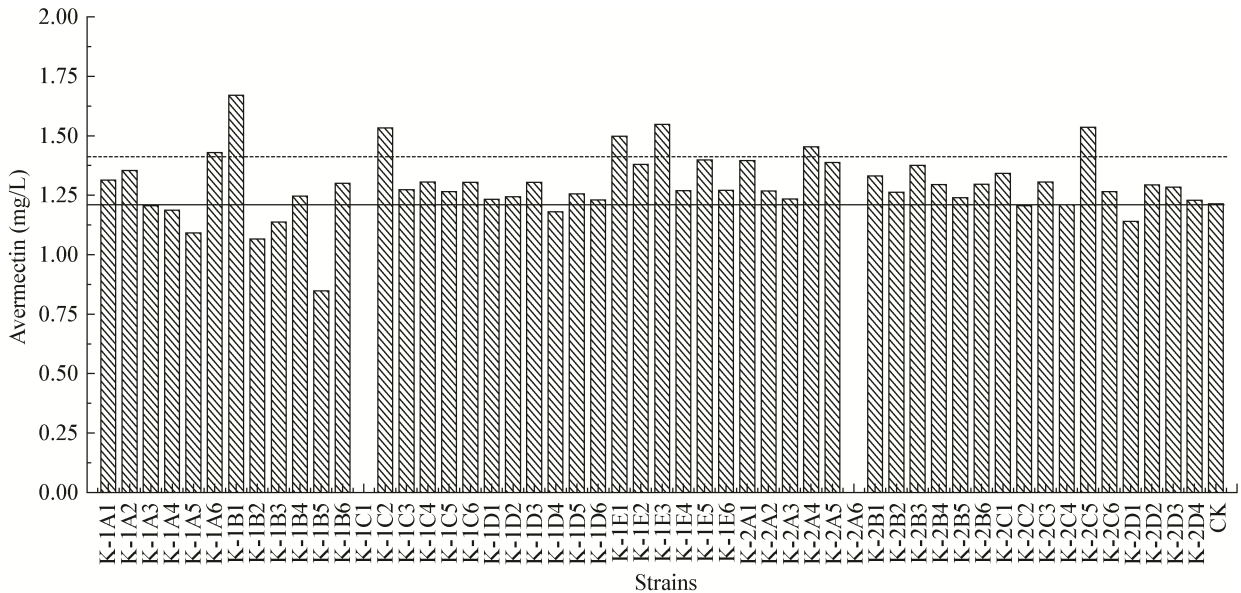


图 4 卡那霉素抗性突变株和出发菌株在 96 深孔板培养 10 d 的阿维菌素产量

Figure 4 Avermectin production of the kanamycin resistant mutants and original strain in 96 deep-well plate by 10 d cultivation

2.2.4 高产菌株复筛: 对初筛得到的 9 株高产阿维菌素的链霉素抗性突变株和 7 株卡那霉素抗性突变株进行摇瓶复筛, 并以出发菌株 9-39 作对照 (CK)。根据图 5A 复筛结果, 选出产量最高的两株链霉素抗性突变株 S-2C3 和 S-2D2; 根据图 5B 复筛结果, 选出产量最高的两株卡那霉素抗性突变株 K-1A6 和 K-1C2 用于下一步实验。

2.2.5 突变株遗传稳定性: 对筛选出的 4 株高产突变株 S-2C3、S-2D2、K-1A6 和 K-1C2 进行遗传稳定性实验, 每株菌连续传代 10 代, 测定其第 2、4、6、8、10 代阿维菌素摇瓶发酵产量, 并以出发菌株 9-39 作对照 (CK)。如图 6 所示, 突变株 K-1C2

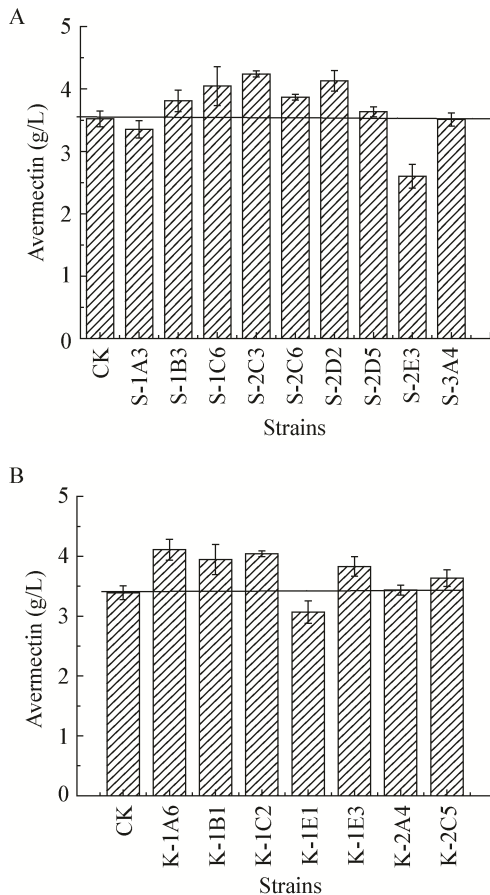


图 5 阿维菌素高产突变株的复筛
Figure 5 Rescreening of avermectin overproduction mutants

注: A: 链霉素抗性突变株; B: 卡那霉素抗性突变株。
Note: A: Streptomycin resistant mutants; B: Kanamycin resistant mutants.

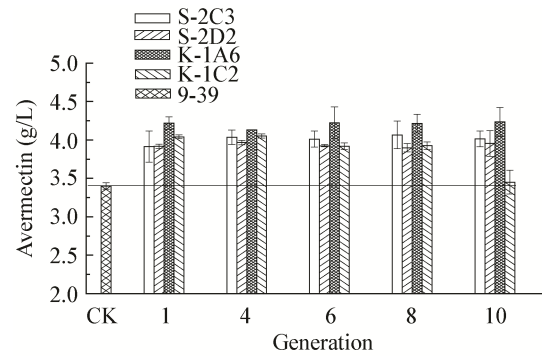


图 6 突变株 S-2C3、S-2D2、K-1A6 和 K-1C2 遗传稳定性

Figure 6 The genetic stability of the mutants S-2C3, S-2D2, K-1A6 and K-1C2

前 8 代遗传稳定, 但到第 10 代时产量急剧下降, 遗传不稳定被舍弃。筛选出的高产株 S-2C3 和 K-1A6 的阿维菌素产量分别达到了 4.06 g/L 和 4.22 g/L, 比出发菌株 9-39 分别提高了 18.8% 和 23.4%。由于突变株 K-1A6 的阿维菌素产量最高, 因此使用该菌株进行发酵培养基优化实验。

2.3 发酵培养基的优化

2.3.1 Plackett-Burman 设计筛选显著性因素: Plackett-Burman 试验因素和水平见表 1, 试验设计见表 3。利用 Minitab 16.0 软件对试验结果进行回归分析, 得到了回归方程以及各影响因子的显著性结果 (表 4)。由表 4 可知, 淀粉液化液、酵母粉、黄豆饼粉和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对阿维菌素的产生具有显著性影响, 选取这 4 个因素作为显著因素, 其它对结果影响不大的因素取中间水平 (表 1), 进行最陡爬坡实验分析。

2.3.2 最陡爬坡试验: 根据 Plackett-Burman 实验结果的效应分析, 结合试验的实际需要, 设计最陡爬坡试验中对阿维菌素产量影响显著的因素的变化方向、步长和具体取值, 试验结果见表 5。

表 5 表明, 第 3 组的阿维菌素产量最高, 达到了 5.28 g/L。由此可以初步确定, 实验最优点就在第 3 组附近, 因此以第 3 组的实验条件作为响应面因素水平的中心点进行下一步的实验。

表3 Plackett-Burman 设计的各因素水平及响应表

Table 3 Experimental design and response results of Plackett-Burman design

运行序 Run serial number	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	阿维菌素产量 AVM (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.50
2	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	5.17
3	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	3.19
4	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	4.79
5	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	2.06
6	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	2.66
7	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	5.47
8	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	2.65
9	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1.96
10	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1.21
11	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1.40
12	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1.90
13	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	2.15
14	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	5.30
15	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1.02
16	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	4.77
17	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	2.73
18	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	2.11
19	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1.36
20	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	4.96

表4 Plackett-Burman 试验因素水平及效应分析

Table 4 Factor levels and effect estimates of Plackett-Burman design

代码 Code	因素 Factors	t 值 t value	P 值 P value	显著 Significant
X_1	CH ₃ CH ₂ COONa (mmol/L)	-0.52	0.629	NS
X_2	PEG6000 (g/L)	-0.99	0.376	NS
X_3	维生素 B ₁ (g/L)	-0.69	0.525	NS
X_4	虚拟变量	-0.26	0.805	NS
X_5	淀粉液化液 Corn starch (g/L)	4.61	0.010	+
X_6	酵母粉 Yeast extract (g/L)	-4.37	0.012	+
X_7	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (mg/L)	0.89	0.423	NS
X_8	虚拟变量	1.78	0.150	NS
X_9	MnSO ₄ ·H ₂ O (mg/L)	1.49	0.210	NS
X_{10}	CoCl ₂ (mg/L)	-2.31	0.082	NS
X_{11}	CaCO ₃ (g/L)	-1.99	0.118	NS
X_{12}	虚拟变量	0.04	0.970	NS
X_{13}	黄豆饼粉 Soya flour (g/L)	-3.27	0.031	+
X_{14}	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	-4.95	0.008	+
X_{15}	虚拟变量	1.20	0.295	NS

注：+：显著性($P < 0.05$)；NS：不显著。Note: +: Significant ($P < 0.05$); NS: Not significant.

表 5 最陡爬坡试验设计和结果
Table 5 Experimental design and results of steepest ascent experiments

序列 Serial number	酵母粉(X_1) Yeast extract (g/L)	黄豆饼粉(X_2) Soya flour (g/L)	淀粉液化液(X_3) Corn starch (g/L)	硫酸铵(X_4) (NH_4) ₂ SO ₄ (g/L)	阿维菌素产量 AVM (g/L)
1	8.9	28	150	0.250	4.27
2	7.5	24	165	0.210	4.81
3	6.2	20	180	0.175	5.28
4	4.9	16	195	0.140	4.66
5	3.5	12	210	0.100	3.77

2.3.3 Box-Behnken 试验设计: 根据最陡爬坡试验得到的显著性因素的中心点设计响应面实验, 水平自变量编码和因素水平见表 2, 试验结果见表 6。

根据表 6 试验结果, 利用 Minitab 16.0 软件对结果进行二次回归分析, 获得的回归方程为:

$$Y = 5.45920 + 0.05263X_1 - 0.14118X_2 + 0.19730X_3 + 0.02326X_4 - 0.02457X_1X_2 - 0.01498X_1X_3 - 0.02501X_1X_4 + 0.09058X_2X_3 - 0.03591X_2X_4 + 0.01178X_3X_4 - 0.00642X_1^2 - 0.9591X_2^2 - 0.15160X_3^2 - 0.015X_4^2$$

回归模型方差分析的显著性检验结果表明(表 7), 失拟分析项的 P 值为 0.201, 大于 0.05 表明差异不显著, 残差由随机误差引起; $R^2=93.37\%$, 可以判定该模型与样本具有较高的相关性, 回归方程的拟合度较好, 试验结果和预测值之间具有较好的一致性。根据表 8 的 P 值剔除不显著项, 得到优化方程为: $Y = 5.45920 + 0.05263X_1 - 0.14118X_2 + 0.19730X_3 + 0.09058X_2X_3 - 0.09591X_2^2 - 0.15160X_3^2$ 。

2.3.4 响应面交互作用分析及最佳培养基的确定: 由表 8 显著性检验可以发现, 黄豆饼粉(X_2)和淀粉液化液(X_3)的交互作用对阿维菌素的产量影响比较显著($P < 0.05$), 通过 Minitab 16.0 软件作响应曲面图和等高线图(图 7)。在试验条件范围内, 黄豆饼粉含量的降低和淀粉液化液浓度的升高都可增加阿维菌素的产量。

通过对回归方程分析计算, 得到阿维菌素产量预测值最大时的因素水平为: 淀粉液化液 192.2 g/L, 酵母粉 4.1 g/L, 黄豆饼粉 16.5 g/L,

(NH_4)₂SO₄ 0.245 g/L。通过验证性实验得到阿维菌素的产量为 5.36 g/L, 与预测值 5.44 g/L 基本吻合, 因此该模型是合理可靠的。优化后阿维菌素产量较优化前的 4.22 g/L 提高了 27.01%。

表 6 Box-Behnken 试验设计及响应
Table 6 Experimental design and response of Box-Behnken design

序列 Serial number	X_1	X_2	X_3	X_4	阿维菌素产量 AVM (g/L)
1	1	0	0	-1	5.500
2	0	1	0	-1	5.167
3	0	-1	0	-1	5.444
4	-1	1	0	0	5.215
5	0	1	0	1	5.092
6	-1	0	1	0	5.400
7	0	0	0	0	5.410
8	1	1	0	0	5.240
9	-1	0	-1	0	4.930
10	1	0	1	0	5.550
11	1	0	0	1	5.550
12	1	0	-1	0	5.130
13	0	0	1	1	5.500
14	0	1	1	0	5.400
15	0	1	-1	0	4.860
16	0	-1	1	0	5.480
17	1	-1	0	0	5.520
18	-1	0	0	1	5.530
19	0	0	-1	-1	5.080
20	0	-1	0	1	5.510
21	0	0	0	0	5.460
22	0	0	1	-1	5.440
23	-1	-1	0	0	5.390
24	0	0	0	0	5.490
25	-1	0	0	-1	5.380
26	0	0	-1	1	5.090
27	0	-1	-1	0	5.310

表 7 Box-Behnken 试验回归模型方差分析
Table 7 Variance analysis for regression model of Box-Behnken design

变异来源 Source	自由度 Degrees of freedom	平方和 Sum of squares	均方差 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	14	0.953 51	0.068 107	12.06	<0.001
失拟 Lack of fit	10	0.064 77	0.006 477	4.35	0.201
残差 Residual	12	0.067 74	0.005 645		
误差 Pure error	2	0.002 98	0.001 490		
合计 Cor total	26	1.021 26			

$R^2=93.37\%$ $R_{adj}^2=85.63\%$

表 8 Box-Behnken 试验回归系数显著性检验
Table 8 Significant test for regression coefficients of Box-Behnken design

模型 Model	回归系数 Regression coefficients	标准误差 Standard errors	t 值 t value	P 值 P value
常数项 Constant terms	5.459 21	0.045 66	125.847	<0.001
X_1	0.052 63	0.021 69	2.427	0.032
X_2	-0.141 18	0.021 69	-6.509	<0.001
X_3	0.197 30	0.021 69	9.096	<0.001
X_4	0.023 26	0.021 69	1.073	0.305
X_1^2	-0.006 42	0.032 53	-0.197	0.847
X_2^2	-0.095 91	0.032 53	-2.948	0.012
X_3^2	-0.151 60	0.032 53	-4.660	0.001
X_4^2	-0.015 00	0.032 53	-0.461	0.653
X_1X_2	-0.024 57	0.037 57	-0.654	0.525
X_1X_3	-0.014 98	0.037 57	-0.399	0.697
X_1X_4	-0.025 01	0.037 57	-0.666	0.518
X_2X_3	0.090 58	0.037 57	2.411	0.033
X_2X_4	-0.035 91	0.037 57	-0.956	0.358
X_3X_4	0.011 78	0.037 57	0.313	0.759

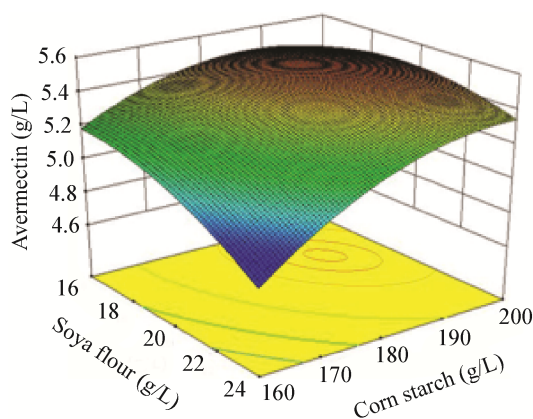


图 7 淀粉液化液与黄豆饼粉交互影响阿维菌素产量的响应面图

Figure 7 The response surface plot for the effects of soya flour and corn starch on the yield of AVM

3 讨论

常温室压等离子体诱变作为一种新兴的诱变方法，在一定程度上较好地弥补了传统诱变方法的缺陷。短乳杆菌、光滑球拟酵母、三孢布拉霉、红色糖多孢菌、凝结芽孢杆菌、木葡糖醋酸杆菌、酿酒酵母等微生物通过 ARTP 诱变筛选获得了相应的高产突变株^[4,15-20]。但是本研究中采用的 ARTP 诱变结合抗性筛选和高通量筛选的育种方法并未见相关的文献报道，抗性筛选方法是根据微生物的耐药性发展起来的育种筛选方式，根据最近发现抗生素基因合成簇与抗生素生产菌抗性基因紧密连锁并易发生共突变的理论，抗生素耐药性微生物的突变株可能具有高产新的次级

代谢产物的能力^[9,21-22]。为了验证该理论,本研究在对阿维链霉菌进行 ARTP 诱变之后,选用链霉素和卡那霉素作为抗性筛选指标。结果表明,这两种抗性筛选方式适用于阿维菌素高产突变株的筛选,同时也非常高效。此外,本研究在抗性筛选的基础上采用了 96 深孔板高通量筛选方法,与摇瓶发酵筛选方式相比,节省了大量的材料、时间和摇床设备。通过 ARTP 诱变、抗性筛选及高通量筛选,有效地富集了阿维菌素正向突变株,得到产量较高且遗传性状稳定的突变株 K-1A6,阿维菌素产量达到了 4.22 g/L,具有较好的工业化应用潜力。

除了各种诱变育种方法,国内外提高阿维菌素产量的方法更多地关注于基因重组及基因的异源表达研究^[23-27]。由于阿维链霉菌易受外界环境条件的影响,且表现出明显的菌株特异性,为了提高阿维菌素的产量并降低生产成本,本研究利用响应面优化法从营养条件着手,在单因素的基础上,用最少实验次数精确地估计试验因素的主效应。培养基优化后的阿维菌素产量较优化前(4.22 g/L)提高了 27.01%。获得的最佳培养基配方和初始培养基配方相比,主要是提高了碳源含量并降低了氮源的含量,进一步说明碳源和氮源的比例是影响阿维菌素产量的重要因素。主要原因可能是培养基中碳氮比对阿维链霉菌前期的菌丝体的形态影响很大,进而影响菌体生长速率和发酵过程中的碳氮代谢的流向^[27]。同时,前期菌丝形态的巨大差别会引起发酵液流变性的差别,进而影响发酵液中营养物质的传质过程,最终调控阿维菌素的合成。

致谢:感谢中国科学院微生物研究所张立新研究员对本研究的大力支持!

参 考 文 献

- [1] Burg RW, Miller BM, Baker EE, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1979, 15(3): 361-367
- [2] Shen B. A New Golden Age of natural products drug discovery[J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1297-1300
- [3] Liu ZJ, Wang J, Liu ZJ. The present status & analysis of the future market of abamectin[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2005, 34(4): 45-46 (in Chinese)
- [4] 刘政军, 王军, 刘志俊. 阿维菌素生产现状及未来发展评析[J]. *山东化工*, 2005, 34(4): 45-46
- [5] van Gessel AFH, Hrycak B, Jasiński M, et al. Temperature and NO density measurements by LIF and OES on an atmospheric pressure plasma jet[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2013, 46(9): 095201
- [6] Bartis EAJ, Graves DB, Seog J, et al. Atmospheric pressure plasma treatment of lipopolysaccharide in a controlled environment[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2013, 46(31): 312002
- [7] Si XG, Guo G, Wang XX, et al. Rapid breeding of a high pyruvate production mutant by atmospheric room temperature plasma[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(20): 241-243 (in Chinese)
- [8] 司晓光, 郭刚, 王小霞, 等. 常压室温等离子体快速诱变选育丙酮酸高产菌株[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(20): 241-243
- [9] Jin LH, Fang MY, Zhang C, et al. Operating conditions for the rapid mutation of the oleaginous yeast by atmospheric and room temperature plasmas and the characteristics of the mutants[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27(3): 461-467 (in Chinese)
- [10] 金丽华, 方明月, 张翀, 等. 常压室温等离子体快速诱变产油酵母的条件及其突变株的特性[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(3): 461-467
- [11] Wang LY, Huang ZL, Li G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3): 851-858
- [12] Sun YW, Cui CB. Antibiotic-resistance mutation technique in microorganism breeding[J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2008, 35(3): 213-217 (in Chinese)
- [13] 孙玉雯, 崔承彬. 抗生素抗性筛选在微生物菌株选育中的作用[J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35(3): 213-217
- [14] Deepak V, Kalishwaralal K, Ramkumarandian S, et al. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(17): 8170-8174
- [15] Liu GQ, Wang XL. Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(1): 78-83
- [16] Cheng G, Xu JZ, Guo YF, et al. Breeding and fermentation optimization of L-arginine producing strains[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(2): 360-369 (in Chinese)
- [17] 程功, 徐建中, 郭燕风, 等. 常压室温等离子体诱变选育 L-精氨酸生产菌及发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(2): 360-369
- [18] Gao H, Liu M, Liu JT, et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(17): 4012-4016
- [19] Guo G, Tian PP, Tang D, et al. Metabolomics analysis between wild-type and industrial strains of *Streptomyces avermitilis* based on gas chromatography-Mass spectrometry strategy[M]//Zhang TC, Nakajima M, eds. *Advances in Applied Biotechnology-Proceedings of the 2nd International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2014)-Volume II*. Berlin Heidelberg: Springer, 2015, 333: 477-485
- [20] Shi XF, Ji ZC, Chang CY, et al. Rapid screening of a high yield γ -aminobutyric acid mutant by multifunction plasma mutagenesis system[J]. *China Brewing*, 2016, 35(4): 127-130 (in Chinese)

- 石秀峰, 纪曾春, 常传友, 等. 利用多功能等离子体诱变系统快速诱变选育 γ -氨基丁酸高产菌株[J]. 中国酿造, 2016, 35(4): 127-130
- [16] Cai C, Jiang T, Zheng ZJ, et al. Improved xylose utilization of *Bacillus coagulans* by atmospheric and room temperature plasma mutation for production of lactic acid[J]. Food Science, 2014, 35(1): 125-129 (in Chinese)
蔡聪, 姜婷, 郑兆娟, 等. 等离子体诱变凝结芽孢杆菌提高木糖利用能力高产 L-乳酸[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 125-129
- [17] Zhang GC, Jia SR, Yan L, et al. Mutation screening of a high bacterial cellulose-producing strain by plasma ion implantation[J]. Modern Food Science & Technology, 2010, 26(12): 1354-1357 (in Chinese)
张桂才, 贾士儒, 闫林, 等. 等离子体注入诱变选育细菌纤维素高产菌株[J]. 现代食品科技, 2010, 26(12): 1354-1357
- [18] Kang FS, Yan B, Lü NQ, et al. Mutation breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with low purine by atmospheric and room temperature plasma[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(2): 188-191 (in Chinese)
康富帅, 颜兵, 吕南拳, 等. 低嘌呤酿酒酵母的 ARTP 法诱变育种[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 188-191
- [19] Wang Q, Feng LR, Wei L, et al. Mutation breeding of lycopene-producing strain *Blakeslea trispora* by a novel atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(1): 452-460
- [20] Shen XJ, Zhang P, Shi YP. A mutant strain with high erythromycin yield obtained by using novel atmospheric and room temperature plasmas and UV mutation[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(1): 19-23 (in Chinese)
沈小静, 张萍, 石彦鹏. 常压室温等离子体结合紫外诱变筛选红霉素高产菌株[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(1): 19-23
- [21] Wang GJ, Inaoka T, Okamoto S, et al. A novel insertion mutation in *Streptomyces coelicolor* ribosomal S12 protein results in paromomycin resistance and antibiotic overproduction[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(3): 1019-1026
- [22] Nishimura K, Hosaka T, Tokuyama S, et al. Mutations in *rsmG*, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(10): 3876-3883
- [23] Zhang R, Xia HY, Xu QY, et al. Recombinational cloning of the antibiotic biosynthetic gene clusters in linear plasmid SCP1 of *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 345(1): 39-48
- [24] Kim ES, Hong HJ, Choi CY, et al. Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(7): 2198-2203
- [25] Chen JS, Liu M, Liu XT, et al. Interrogation of *Streptomyces avermitilis* for efficient production of avermectins[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2016, 1(1): 7-16
- [26] Chen JS, Liu M, Zhang LX. Avermectin, from winning the Nobel Prize to 'innovation in China'[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(3): 543-558 (in Chinese)
陈金松, 刘梅, 张立新. 从阿维菌素获得诺贝尔奖到中国创造[J]. 微生物学报, 2016, 56(3): 543-558
- [27] Chen N, Wang YH, Chu J, et al. Effect of medium composition and feeding strategy on morphology of *Streptomyces avermitilis* in avermectin fermentation[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2007, 26(4): 496-501 (in Chinese)
陈凝, 王永红, 储炬, 等. 培养基成分和补料对阿维菌素发酵过程中除虫链霉菌菌丝形态的影响[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(4): 496-501