

文章编号: 1674-9057(2018)03-0537-05

doi:10.3969/j.issn.1674-9057.2018.03.025

光照等条件对 G03 菌株繁殖及其 ZwA 合成的影响

陈圣怡, 李霞, 刘建国, 温心遥, 程桂阳, 郝再彬

(桂林理工大学 a. 广西高校食品安全与检测重点实验室; b. 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 以苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) G03 菌株为对象, 研究光照、碳源、氮源、无机盐、培养基初始 pH 和培养温度等条件对该菌株繁殖及其代谢产物杀虫晶体蛋白和 Zwittermicin A(ZwA) 活性的影响。结果表明, G03 菌株发酵培养基的最适碳源为葡萄糖, 最适氮源为酵母粉, 最适无机盐为氯化钠, 最适培养温度为 30 ℃, 最适的初始 pH 为 7~7.5; ZwA 的最适合成条件与之相同, 但是其最适初始 pH 为 8.0; 菌株在 4 000 lux 下发酵 40 h 时繁殖量最大; 杀虫晶体蛋白积累量在 4 000 lux 下发酵 55 h 时最大; 黑暗条件下 ZwA 的积累量较 2 000 lux 光强下的大。

关键词: 苏云金芽胞杆菌(Bt); G03 菌株; 光照强度; 杀虫晶体蛋白; Zwittermicin A(ZwA)

中图分类号: TQ920

文献标志码: A

0 引言

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一类在自然界中广泛分布的革兰氏阳性细菌, 它在生长代谢中形成芽胞产生杀虫晶体蛋白, 部分菌株还产生双效菌素 Zwittermicin A(ZwA), 也称为抗生素。常见的 ZwA 分子量为 396 Da, 是线性氨基多元醇结构^[1]。该抗生素能够与苏云金芽胞杆菌产生的杀虫晶体蛋白协同起作用, 对杀虫效果增效明显^[2-3], 增效作用可达 1.5~1 000 倍^[4]。

自 1994 年 ZwA 被 Silo-Sub 等^[5]发现以来, 国内外对高产杀虫晶体蛋白的 Bt 发酵条件优化的研究成果颇丰。Minler 等^[6]发现在基本培养基中加入苹果酸和丙酸作为碳源时, 菌株 UW85 产 Zwittermicin A 的量最大, 可提升至 40%。Icgen 等^[7]发现葡萄糖、麦芽糖等只能促进细菌生长, 不能促进芽胞和晶体的形成; 而蔗糖、乳糖等不能促进细菌的生长, 但是能够促进芽胞和晶体的形成。而当只有单一葡萄糖碳源, 缺乏其他氮源的情况

下, 细胞蛋白的合成会受影响, 导致无芽胞或无晶体情况的产生^[8]。用含有单一氨基酸的培养基对 HD-1 进行培养, 发现只有少量晶体; 而用含有多种氨基酸的培养基时, HD-1 能正常生长。HD-1 在同时含有精氨酸、谷氨酸及天门冬氨酸 3 种氨基酸的培养基中培养时, 其芽胞和晶体的产量最高。李欣等^[9]发现培养基中氮源的不同存在形式会对 Bt 亚种 D1-23 菌体繁殖和其次级代谢产物 ZwA 的合成有不同程度的影响, 当培养基中含有用中性蛋白酶处理过的蛋白质时, ZwA 的产量最高。宋春旭等^[10]通过 ZwA 基因缺失突变体 ZwA5A 来识别并活化 2,3-二氨基丙酸合成 ZwA, 推断出了 ZwA 生物合成的直接前体物。李洋等^[11]从土壤样品中筛选出高产 ZwA 的 Bt 菌株 A164, 并对此菌株的发酵条件进行了优化。综上, 有关发酵条件对 ZwA 产量影响的研究报道甚少, 因此本文以 G03 菌株为对象, 研究培养条件尤其是光照对该菌株繁殖速度、杀虫晶体蛋白含量和 ZwA 活性的影响, 通过优化发酵条件来提高 ZwA 的产量。

收稿日期: 2017-02-24

基金项目: 植物病虫害生物学国家重点实验室项目(SKLOF201404); 广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118134)

作者简介: 陈圣怡(1992—), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物化学, chenshengyi930@163.com。

通讯作者: 郝再彬, 博士, 教授, haozaibin2010@126.com。

引文格式: 陈圣怡, 李霞, 刘建国, 等. 光照等条件对 G03 菌株繁殖及其 ZwA 合成的影响 [J]. 桂林理工大学学报, 2018, 38(3): 537-541.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试验菌：苏云金芽胞杆菌 G03 (*Bacillus thuringiensis*)；指示菌：草生欧文氏杆菌 LS005 (*Erwinia herbicola*)，均由中国农业科学院植物保护研究所提供。

种子培养基 (LB)：酵母膏 5.0 g，蛋白胨 10.0 g，氯化钠 10.0 g，pH 7.0 ~ 7.2，定容至 1 L，121 ℃ 灭菌 30 min 备用。

指示菌活化培养基 (BP)：牛肉膏 5.0 g，蛋白胨 10.0 g，氯化钠 5.0 g，pH 7.0 ~ 7.2，定容至 1 L，121 ℃ 灭菌 30 min 备用。

主要仪器：DL-5-B 型飞鸽离心机，上海安亭科学仪器厂；PB-20 标准型 pH 计，北京赛多利斯仪器有限公司；LRH-150-Z 振荡培养箱，珠江医疗器械；ZHJH-C 系列智能安全型超净工作台，上海智城分析仪器有限公司；Carry 50 型紫外可见分光光度计，美国 VARIAN；YSQ-LS-30SII 型立式压力蒸汽灭菌器，上海博迅仪器有限公司。

1.2 培养基成分的优化

① 分别在无碳源的培养基中添加葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、玉米粉各 16 g/L，30 ℃ 恒温下培养 48 h，摇床的转速 200 r/min，平行试验 3 次，测量其 OD_{600} 和发酵培养液的抑菌活性^[12]；② 分别在无氮源的培养基中添加大豆蛋白、蚕蛹蛋白、胰蛋白、酵母粉、牛肉膏、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 和尿素各 20 g/L，30 ℃ 恒温下培养 48 h，摇床的转速 200 r/min，平行试验 3 次，测量其 OD_{600} 和发酵培养液的抑菌活性；③ 在培养基中分别加入 $Fe_2(SO_4)_3$ 、 $CaCO_3$ 、 $MnSO_4$ 、 $AlCl_3$ 、 $MgSO_4$ 、 $NaCl$ 各 0.1 g/L，在 30 ℃ 恒温下培养 48 h，摇床的转速 200 r/min，测量其 OD_{600} 和发酵培养液的抑菌活性；④ 采用优化后的培养基，加入 2% 的 G03 种子液，分别调节初始 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0，在 30 ℃ 恒温下培养 48 h，摇床的转速 200 r/min，测量其 OD_{600} 值和发酵培养液的抑菌活性；⑤ 采用优化后的培养基，加入 2% 的 G03 种子液，分别调节培养温度为 24、26、28、30、32、34 和 36 ℃ 下恒温培养 48 h，摇床的转速 200 r/min，测量其 OD_{600} 值和发酵培养液的抑菌活性。

1.3 光照强度对 G03 繁殖及代谢产物的影响

采用优化后的培养基，加入 2% 的 G03 种子液。分别设置黑暗、2 000、4 000 lux，照射距离为 20 cm。除光照以外，其他条件均一致。发酵 72 h，每隔 4 h 取 2 mL 发酵液，冷藏待测，测量其 OD_{600} 值。重复上述实验，考马斯亮蓝法测定样品蛋白含量^[13]。采用优化后的培养基，加入 2% 的 G03 种子液，分别设置黑暗和 2 000 lux，有光照的培养箱内照射距离为 20 cm，在 30 ℃ 恒温下培养 60 h，摇床的转速 200 r/min，测量其抑菌直径。

2 结果与分析

2.1 最佳碳源的选择

分别选择葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、玉米粉作为碳源对 G03 进行培养。其中，葡萄糖为单糖；乳糖、麦芽糖、蔗糖为二糖；淀粉为多糖；玉米粉为复合糖类。由图 1 可知，6 种碳源下，以葡萄糖为碳源时，菌株的 OD_{600} 最大；二糖类的乳糖、麦芽糖、蔗糖次之；而淀粉、玉米粉作为碳源时 OD_{600} 相对较小， OD_{600} 越大说明菌繁殖密度越大。从抑菌效果中看，单糖、双糖和多糖并没有表现出明显的规律性，其中，以麦芽糖、葡萄糖和淀粉作为碳源时，抑菌效果良好，且相差不大。综合以上两个指标，选择葡萄糖为发酵培养基的最佳碳源。

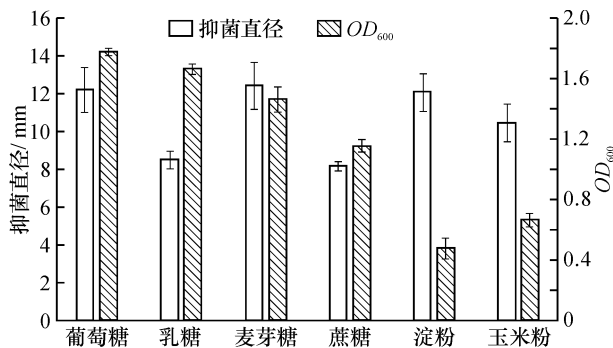


图 1 不同碳源下菌株的生长量和抑菌直径

Fig. 1 Growth and bacteriostatic diameter of G03 under different carbon sources

2.2 最佳氮源的选择

分别选择大豆蛋白、蚕蛹蛋白、胰蛋白、酵母粉、牛肉膏、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 和尿素作为氮源培养。大豆蛋白、蚕蛹蛋白、胰蛋白为大分子蛋白有机氮源；牛肉膏、酵母粉均为混合蛋白有机氮源；

硫酸铵、氯化铵和尿素为无机氮源。由图 2 可知，有机氮源的菌液 OD_{600} 值明显高于无机，说明有机氮源比无机氮源更易被菌株利用，其中以酵母粉为氮源时的 OD_{600} 最高；在无机氮源培养下的菌液没有抑菌性，而有机氮源中，酵母粉为氮源时菌液的抑菌性最好，因此酵母粉为发酵培养基的最佳氮源。

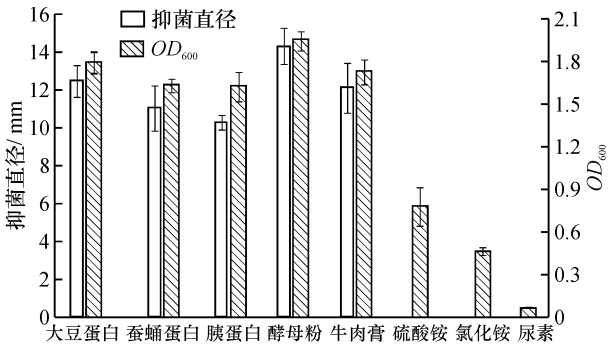


图 2 不同氮源下菌株的生长量和抑菌直径
Fig. 2 Growth and bacteriostatic diameter of G03 under different nitrogen sources

2.3 无机盐的影响

在培养基及其他培养条件相同的前提下，分别添加 NaCl 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 CaCO_3 、 MnSO_4 、 AlCl_3 、 MgSO_4 、 ZnSO_4 进行培养。由图 3 可知，添加不同无机盐时，菌株的生长情况差异不明显，其中添加 NaCl 时略优于添加其他几种无机盐的情况，而添加 NaCl 时菌株的抑菌性最强的。因此， NaCl 是菌株的最优无机盐。

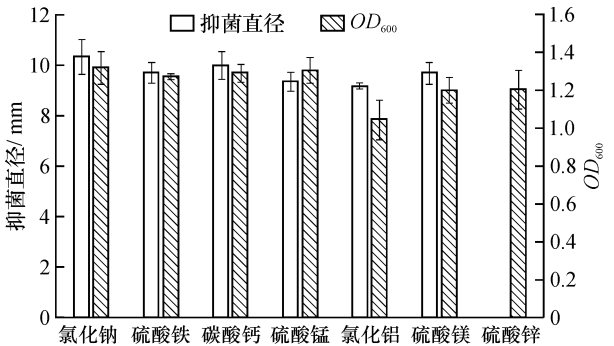


图 3 不同无机盐下菌株的生长量和抑菌直径
Fig. 3 Growth and bacteriostatic diameter of G03 under different inorganic salt

2.4 发酵温度的选择

在培养基及其他培养条件相同的前提下，分别在 24、26、28、30、32、34 和 36 $^{\circ}\text{C}$ 下培养菌株，并测量其 OD_{600} 值。由图 4 可知，随着温度的上升

OD_{600} 增加、抑菌活性先升高；抑菌活性与菌株生长变化呈现一定的平行性，出现最大值，即最适温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

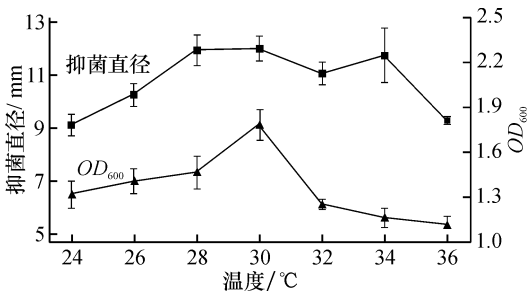


图 4 不同温度下菌株的生长量和抑菌直径
Fig. 4 Growth and bacteriostatic diameter of G03 under different temperatures

2.5 初始 pH 的选择

在培养基及其他培养条件相同的前提下，分别设定初始 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0。由图 5 可知，在 pH 为 7.5 时，菌株的生长代谢最旺盛，随着 pH 继续升高到 9.0，逐渐下降，碱性不利于菌株繁殖。而随着 pH 的升高，菌株的抑菌活性逐渐增强，在 pH 8.0 达到最大，随后降低。可见，菌株适合在偏碱性 (pH 7.0 ~ 7.5) 的条件下生长，抑菌活性物质产生的最佳 pH 比菌株生长最佳 pH 略高。

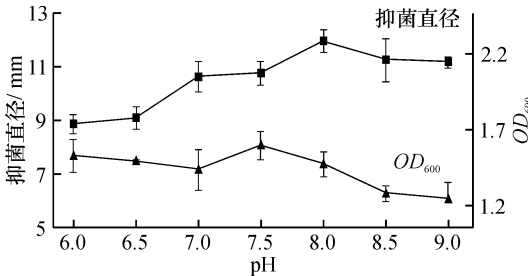


图 5 不同初始 pH 下菌株的生长量和抑菌直径
Fig. 5 Growth and bacteriostatic diameter of G03 under different initial pH

2.6 光照和时间对菌株生长的影响

在不同光照强度下培养菌株，每 4 h 测量其 OD_{600} 值，并绘制菌株的生长曲线，如图 6 所示。前期为调整期，后期进入对数期，其中黑暗下，发酵 48 h 时菌体数量达到最高值；2 000 lux 光照条件下，发酵 44 h 时达到最高；4 000 lux 光照条件下，发酵 40 h 达到最高。可见，菌株发酵时采取不同的光照条件会影响生长；而且在一定范围内，其生长速率随着光照强度的增强而增大。因此，大

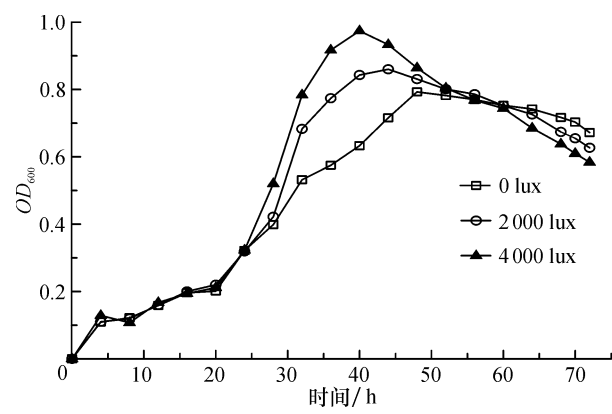


图6 光照对菌株生长的影响
Fig. 6 Effect of light on G03 growth

批量生产中，可以增加光照缩短发酵周期。

2.7 光照和时间对蛋白积累量的影响

考马斯亮蓝法检测蛋白的标准曲线， OD_{595} 与蛋白浓度呈线性关系， $y = 0.1573x - 0.0004$ ，($R^2 = 0.99897$)。由图7可知，随着时间的增加，蛋白含量逐渐增多，在52~64 h时先后达到最高积累量；继续培养，蛋白含量反而呈减少趋势，可能是菌株生长后期产生酶使蛋白降解。比较不同光照下的蛋白积累量，发现杀虫晶体蛋白代谢在光照的影响下，会提前从芽胞内裂解出，4 000和2 000 lux光照分别比无光照条件下提前8、4 h左右。光照可诱导菌体发育，改变芽胞释放的生物钟，加快芽胞裂解时间。

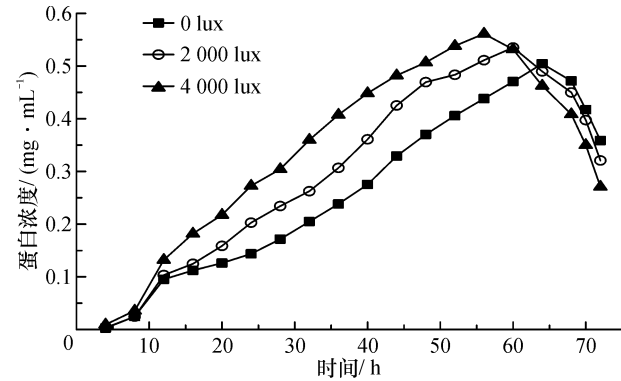


图7 光照和时间对发酵液蛋白浓度的影响
Fig. 7 Effect of light and time on protein concentration in fermentation broth

2.8 光照强度对ZwA的影响

黑暗下菌株代谢产生的ZwA含量较2 000 lux光强下的多(图8)。在20~52 h区间,随着培养时间的延长,抑菌活性越来越大;之后抑菌活性逐渐

降低(图9)。可见,G03菌株发酵产生ZwA宜采取暗发酵,且培养的最佳时间为52 h。具体为什么暗培养有利于ZwA产生,还需要进一步研究。

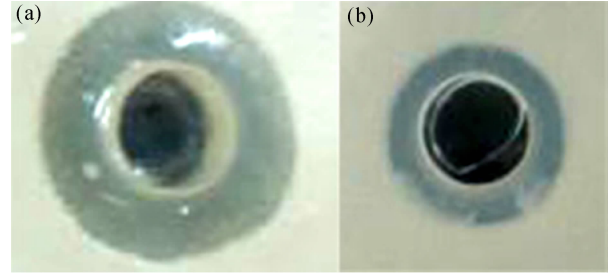


图8 遮光(a)与光照(b)下发酵液抑菌圈效果对比
Fig. 8 comparison bacteriostatic ring size of shading fermentation(a) and light fermentation(b)

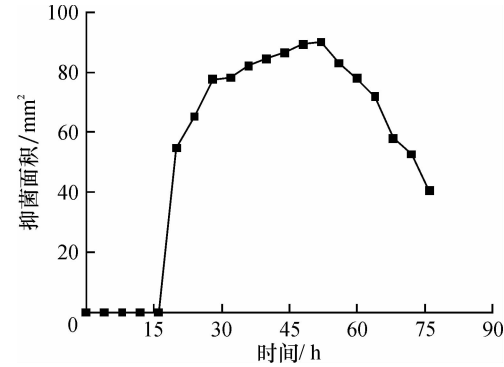


图9 不同发酵时段的发酵液的抑菌效果
Fig. 9 Bacteriostatic effect of fermentation broth in different fermentation time

3 结束语

本文对高产ZwA的G03菌株的培养基成分及培养条件进行优化,确定了G03菌株发酵培养基的最适碳源为葡萄糖,最适氮源为酵母粉,最适无机盐为氯化钠,最适培养温度为30℃,最适的初始pH为7~7.5;ZwA的最适合成条件与之相同,但是其最适初始pH为8.0;菌株在4 000 lux下发酵40 h时繁殖量最大;杀虫晶体蛋白积累量在4 000 lux下发酵55 h时最大;黑暗条件下ZwA的积累量较2 000 lux光强下的积累量大。实验表明外界条件影响菌株的生长及杀虫蛋白和ZwA的产量。就光照强度而言,应该根据所需要的目标产物来设置光照强度。然而,由于实验条件的限制,本文仅设置了黑暗和2 000 lux条件下ZwA产量的比较,后续应继续研究其他光照强度对ZwA产量的影响。

参考文献：

[1] Silo-Suh L A, Lethbridge B J, Raffel S J, et al. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85 [J]. Applied and environmental microbiology, 1994, 60 (6): 2023 – 2030.

[2] Broderick N A, Goodman R M, Raffa K F, et al. Synergy between zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) [J]. Environmental entomology, 2000, 29 (1): 101 – 107.

[3] 陈丽珍, 林毅, 张杰. 苏云金芽胞杆菌杀虫蛋白增效物质与增效机理 [J]. 植物保护, 2009, 35 (1): 8 – 12.

[4] Manker D C, Lidster W D, Macintosh S C, et al. Potentiator of *Bacillus* pesticidal activity; U S. Patent 6406691 [P]. 2002.

[5] He H, Silo-Suh L A, Handelsman J, et al. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus* [J]. Tetrahedron letters, 1994, 35 (16): 2499 – 2502.

[6] Milner J, Raffel S, Lethbridge B, et al. Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin A by *Bacillus cereus* UW85 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43 (4): 685 – 691.

[7] Içgen Y, Içgen B, özcengiz G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*; II. Effects of carbon and nitrogen sources [J]. Research in microbiology, 2002, 153 (9): 605 – 609.

[8] Sachidanandham R, Jenny K, Fiechter A, et al. Stabilization and increased production of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* in steady-and transient-state continuous cultures [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47 (1): 12 – 17.

[9] 李欣, 陈守文, 冀志霞, 等. 豆粕的不同酶解液发酵苏云金芽胞杆菌对 Zwittermicin A 产量的影响 [J]. 国外医药 (抗生素分册), 2008, (1): 24 – 27.

[10] 宋春旭, 赵昌明, 喻子牛, 等. Zwittermicin A 合成基因簇中腺苷酰化功能域的预测, 表达与活性验证 [J]. 微生物学报, 2008, 48 (9): 1260 – 1265.

[11] 李洋, 蒋泽军, 刘红艳, 等. 高产抗生素 Zwittermicin A 苏云金芽胞杆菌 A164 发酵条件的优化 [J]. 青岛科技大学学报 (自然科学版), 2012, 33 (1): 47 – 53.

[12] Hao Z B, Yan L, Liu J G, et al. Extraction of antibiotic zwittermicin A from *Bacillus thuringiensis* by macroporous resin and silica gel column chromatography [J]. Biotechnology and applied biochemistry, 2015, 62 (3): 369 – 374.

[13] 侯明, 陈国勇, 梁福晓, 等. 碱法提取枸杞植物叶中的蛋白质 [J]. 桂林理工大学学报, 2014, 34 (3): 515 – 518.

Light intensity effect and other factors on metabolism growth and ZwA synthesis of G03

CHEN Sheng-yi, LI Xia, LIU Jian-guo, WEN Xin-yao, CHENG Gui-yang, HAO Zai-bin

(a. Guangxi College and University Key Laboratory of Food Safety and Detection; b. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract: In this paper the effect of light intensity, carbon source, nitrogen source, inorganic salt, temperature and initial pH on the metabolism growth of G03 is discussed by detecting the growth rate of G03 and the biological activity of metabolite Zwittermicin A. The accumulation of insecticidal crystal protein and ZwA under different light intensity is detected traceably. Consequently, the optimal carbon source of G03 for fermentation is glucose, the optimal nitrogen source is yeast extract, the optimal inorganic salt is NaCl, the optimal temperature is 30 °C and the optimal initial pH is 7 ~ 7.5. The optimal condition of ZwA is the same with fermentation, but the optimal initial pH is 8.0. The bacterial density has a maximum accumulation at 40 h under 4 000 lux light intensity. And the insecticidal crystal proteins have a maximum accumulation at 55 h under 4 000 lux light intensity. The accumulation of ZwA under dark condition is more than 2 000 lux.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; G03; light intensity; insecticidal crystal protein; Zwittermicin A