

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.11.09

基于核糖体工程技术的泰乐菌素高产菌株的选育研究

牛春, 丁亚莲, 张萍*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司, 银川 750101)

[收稿日期] 2022-04-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2022)11-0062-07 [中图分类号] S859.796

[摘要] 为进一步提高泰乐菌素的产量满足生产需求,从生产实践中选出一株优良菌株 T19-805,利用多次引入抗生素的核糖体工程育种技术,选用的 7 种抗生素中有 4 种抗生素(林可霉素、硫链丝菌素、链霉素与遗传霉素)对泰乐菌素产量有了大幅度提高。经过三轮抗性筛选获得一株含 4 重抗生素的高产突变株 Tltsg-69,泰乐菌素产量达到 16507 $\mu\text{g}/\text{mL}$,将原始出发菌株 T19-805(12000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)提高了 37.6%,该菌株连续培养 5 代,其化学效价基本稳定,具有较好的遗传稳定性。结果表明,利用核糖体工程育种方法能有效地提高泰乐菌素产量。

[关键词] 核糖体工程;泰乐菌素;高产菌株;抗生素;选育

Study on the Breeding of High-yield Strain of Tylosin Based on Ribosome Engineering Technology

NIU Chun, DING Ya-lian, ZHANG Ping*

(Ningxiatairui Pharmaceutical Co Ltd Strains Institute, Yinchuan 750101, China)

Corresponding author: ZHANG Ping, E-mail: chun.niu@tairuiworld.com

Abstract: In order to further improve the yield of tylosin, we pick out one good strains T19-805 from production practice. Four from seven antibiotics were identified with high mutation to the original strain T19-805 with ribosome engineering. So, lincomycin, thioestrepton, streptomycin and geneticin were selected as the resistance marker of mutagenesis. The highest-yield mutant Tltsg-69 was generated after three rounds of screening, the tylosin chemical titer reached 16507 $\mu\text{g}/\text{mL}$, increased 37.6% than the original strain T19-805. After continuously cultured for 5 generations the strain had basically stable chemical titer and better hereditary stability. In conclusion, the method of ribosome engineering may be effective as one of the strategies to enhance production of tylosin.

Key words: ribosome engineering; tylosin; high-yield strain; antibiotic; screening

作者简介: 牛春, 从事微生物发酵菌种选育工作。

通讯作者: 张萍, E-mail: chun.niu@tairuiworld.com

泰乐菌素是一类大环类酯类抗生素,在弗氏链霉菌中发现^[1]。泰乐菌素主要由泰乐菌素 A、B、C、D 四个组分组成,其中泰乐菌素 A 为主要组分,并且生物活性最强^[2]。泰乐菌素 A 的主体结构上有三个脱氧糖苷配基性质决定了这类药物的药理学特性^[3]。泰乐菌素是一种用于畜禽的抗菌药物,其抑菌机制是阻止肽酰基 tRNA 从 mRNA 的移位,使氨酰基 tRNA 不能结合到原位点,使细菌蛋白质合成受阻^[4]。泰乐菌素对畜禽有明显的促生长作用,又不与人类产生交叉耐药性,在养殖业市场中需求较大,因此应用空间较为广阔^[5]。在抗生素发酵产业中,有三项重要工艺,即菌种选育、发酵工艺与产品提纯工艺,其中菌种选育是源头工作,最为主要。核糖体工程育种技术主要作用于细胞的核糖体与 RNA 聚合酶,微生物次级代谢产物开始产生时,反应中 ppGpp(鸟苷-5'-二磷酸-3'-二磷酸)才有明显积累,抗生素的抗性突变可激活依赖 ppGpp 积累来启动的菌体产生抗生素能力^[6-7]。

核糖体对微生物次级代谢产物的合成有重要的调控作用,使用核糖体工程技术筛选高产突变株,其原理是利用作用于核糖体上的抗生素为药物标记,使核糖体蛋白或 rRNA 发生定向突变导致蛋白质合成能力的改变^[8-9]。这种靶向核糖体或 RNA 聚合酶的自发抗药性突变改变了菌落形态而引起发酵产量的改变^[10]。刘华等利用核糖体工程技术将阿维拉霉素的产量提高了 1.8 倍^[11]。Wang 等用了 7 或 8 种药物的耐药性获得产生了大量的聚酮类放线菌素抗生素,比野生型产生的水平高出 180 倍^[12]。本文使用核糖体工程技术筛选泰乐菌素高产突变株,在泰乐菌素高产菌的选育过程中,采用递推的方式,从单一抗性突变株到多重抗性突变株,使泰乐菌素的产素能力有了很大的提高。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 泰乐菌素产生菌株 T19-805,由宁夏泰瑞制药股份有限公司技术中心提供。

1.1.2 试剂 链霉素、庆大霉素、夫西地酸、硫链丝菌素、林可霉素、遗传霉素、巴龙霉素,以上抗生

素均购于 Sigma 公司。

1.1.3 培养基及培养条件 斜面 and 分离平板培养基(g/L):淀粉 2.5、蛋白胨 2.0、氯化镁 0.5、硫酸亚铁 0.1、硫酸锌 0.1、琼脂 2。调节 pH 值为 7.0~7.2,培养温度 28 ± 1 °C,培养湿度 35%~45%,培养周期 9~15 d。

种子培养基(g/L):黄豆饼粉 4、酵母抽提粉 2.5、玉米浆 3、碳酸钙 4、豆油 4。调节 pH 值为 7.6~7.8,培养温度 28 ± 1 °C,培养湿度 35%~45%,摇床转速 220 r/min,培养周期 46~48 h。

发酵培养基(g/L):玉米淀粉 15、玉米蛋白粉 15、棉籽蛋白粉 13、甜菜碱盐酸盐 0.62、磷酸氢二铵 0.5、氯化钾 1.2、氯化钠 1.1、碳酸钙 20、豆油 45。调节 pH 值为 7.6~7.8,培养温度 28 ± 1 °C,培养湿度为 35%~45%,摇床转速 220 r/min 条件下,培养周期 6~7 d。

1.2 方法

1.2.1 单孢子悬液的制备 取出发菌株 T19-805 新鲜斜面孢子,放入带有玻璃珠的三角瓶中,加适量的生理盐水,于 28 °C,150 r/min 振荡 15~20 min,使孢子充分分散,经脱脂棉过滤,制得单孢子悬液,用血球计数板计数,控制孢子浓度为 $10^8 \sim 10^{10}$ cfu/mL 备用。

1.2.2 抗生素最小抑制浓度(MIC)的确定 取 1.2.1 项制备好的单孢子悬浮液 0.1 mL 分别涂布于含有不同浓度的 7 种抗生素(链霉素、庆大霉素、夫西地酸、硫链丝菌素、林可霉素、遗传霉素、巴龙霉素)分离平板上,以不含抗生素的培养基平板为对照, 28 ± 1 °C 培养 15~18 d。观察并记录不同平板上的菌落生长状况,未长菌落的抗生素最小浓度即为抗生素对该菌的最小抑制浓度(Minimum inhibition concentration, MIC)。并统计致死率与正突变率。

致死率(%) = (对照组菌落数 - 抗生素处理后的菌落数) / 对照组菌落数 $\times 100\%$, 正突变率(%) = 效价高于对照的正突变菌株数 / 所测菌株总数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 单重抗药性突变株的选育 挑取临界 MIC

的抗生素平板上长出的单菌落 30 株,划在含同等剂量抗生素的试管斜面中,28 ± 1 °C 培养 9 ~ 15 d。将生长起来的斜面孢子用无菌接种铲刮取适量接种于种子培养基,28 ± 1 °C 培养 46 ~ 48 h,以 15% 的接种量转入发酵培养基(500 mL 的三角瓶,装量为 45 mL),28 ± 1 °C 培养周期 6 ~ 7 d,放瓶提取发酵产物检测效价,筛选高产突变株保藏备用。

1.2.4 双重抗药性突变株的筛选 以 1.2.3 项获得的单重抗性高产突变菌株为出发菌株,按 1.2.2 项制备成孢子菌悬液,稀释后涂布在含两种临界浓度抗生素平板上,28 ± 1 °C 培养 9 ~ 15 d,生长出的菌落即为双重抗性突变株。待菌落长成后挑取划在含同等剂量的双重抗生素斜面上。发酵摇瓶验证筛选高产突变株保藏备用。

1.2.5 多重抗药性突变株的筛选 以 1.2.4 项获

得的双重抗性高产突变菌株为出发菌株,按 1.2.1 项制备成孢子菌悬液,稀释后涂布在含四重临界浓度抗生素平板上,28 ± 1 °C 培养 9 ~ 15 d,生长出的菌落即为四重抗性突变株。待菌落长成后挑取划在含同等剂量的四重抗生素斜面上。发酵摇瓶验证筛选高产突变株保藏备用。

1.2.6 高产菌株遗传稳定性试验:将泰乐菌素高产菌株连续培养 5 代,摇瓶发酵后测定泰乐菌素的化学效价,验证其是否具有遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 抗生素最小抑制浓度的确定 以不含抗生素的空白平板上菌落数和菌落外观为对照,与含不同抗生素浓度平板菌落进行对比,不同抗生素浓度对出发菌株 T19 - 805 孢子最小抑制浓度的测定,结果见表 1。

表 1 不同抗生素的致死率和正突变率

Tab 1 The death and positive variable rate by different antibiotics

抗生素	不同抗生素的致死率和正突变率					
链霉素/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.0	1.4	1.8	2.2	2.6	3.0
致死率/%	75.5 ± 1.6	83.6 ± 2.4	93.3 ± 1.4	98.0 ± 3.1	100	100
正突变率/%	15.5 ± 1.6	21.6 ± 2.4	25.1 ± 1.8	27.3 ± 2.7	0	0
庆大霉素/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8	3.2
致死率/%	60.5 ± 1.9	73.5 ± 2.3	85.5 ± 2.5	94.9 ± 1.8	100	100
正突变率/%	14.9 ± 1.6	22.3 ± 2.4	24.5 ± 2.4	23.6 ± 2.1	0	0
夫西地酸/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0
致死率/%	65.4 ± 2.2	76.6 ± 2.4	89.1 ± 1.8	97.4 ± 2.6	100	100
正突变率/%	13.7 ± 2.7	19.3 ± 2.4	23.4 ± 3.4	24.2 ± 1.5	0	0
硫链丝菌素/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
致死率/%	77.7 ± 1.7	83.6 ± 2.1	91.3 ± 1.9	98.2 ± 2.3	100	100
正突变率/%	16.5 ± 1.8	23.4 ± 2.0	27.1 ± 1.0	28.3 ± 2.2	0	0
林可霉素/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
致死率/%	55.5 ± 1.7	65.3 ± 2.4	84.9 ± 3.4	94.6 ± 2.5	100	100
正突变率/%	16.3 ± 1.2	20.6 ± 2.6	24.1 ± 1.1	28.5 ± 2.3	0	0
遗传霉素/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
致死率/%	68.4 ± 1.6	75.2 ± 2.4	87.0 ± 1.8	96.4 ± 1.9	100	100
正突变率/%	15.5 ± 1.6	18.6 ± 2.4	23.5 ± 1.8	26.1 ± 1.9	0	0
巴龙霉素/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
致死率/%	58.3 ± 1.9	69.2 ± 2.4	87.9 ± 1.3	97.0 ± 2.2	100	100
正突变率/%	14.4 ± 3.1	18.3 ± 4.4	21.3 ± 3.7	24.6 ± 3.8	0	0

由表 1 结果可知,几种抗生素对泰乐菌株都有一定的抑制作用,不同抗生素对其抑制的最小浓度不同。随着抗生素浓度的不断增加,菌株在筛选平板上的单菌落数逐渐减少,菌落外观也逐渐变化,在抗生素浓度较小时对菌落形态影响较小,菌落大、边缘整齐、孢子白润丰富;第二次增加一个梯度的抗生素浓度平板上的菌落稍小、孢子较干、菌落成典型的馒头型、边缘整齐;第三次增加一个梯度的抗生素浓度菌落较小,挑取时发现是一层不易划碎的结皮;第四次加大抗生素浓度,平板上的菌落很少,而且都是基质,没有白孢子形成。第五次与第六次加大抗生素浓度时,平板上都没有单菌落形成,全部死亡。所以链霉素、庆大霉素、夫西地酸、硫链丝菌素、林可霉素、遗传霉素与巴龙霉素的最小抑制浓度分别为 2.6、2.8、2.7、0.35、4.0、0.25、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。正突变率分别约为 27.3%、23.6%、24.2%、28.3%、28.5%、26.1% 与 24.6%。从正突变率分析不同抗生素对泰乐菌株产生效果由高到弱的顺序依次为林可霉素、硫链丝菌素、链霉素、遗传霉素、巴龙霉素、夫西地酸与庆大霉素。

2.2 单重抗性突变株筛选结果 在临近最小抑制浓度的每种抗生素平板上挑取单菌落划在含同等浓度的抗生素试管斜面上,7 种抗生素每种挑取 30 株,共 210 株,斜面孢子培养至成熟。经发酵摇瓶验证,结果见图 1。

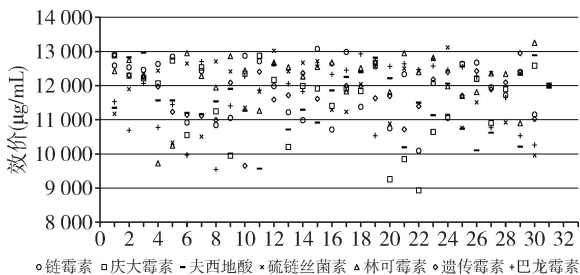


图 1 不同抗生素突变株的筛选结果

Fig 1 The selection of high-yield mutants by different antibiotics

由图 1 可知,210 株中有 3 株菌的效价达到 13000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,分别是林可霉素、硫链丝菌素与链霉素的单重抗性突变株,菌株号及效价分别为

Tlin-30 (13256 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、Ttsp-24 (13118 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、Tstr-15 (13077 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。其中 Tlin-30 (13256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 效价最高,将出发菌株 T19-805 (12000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 提高了 10.5%。以 Tlin-30 为菌源进行双重抗生素选育。

2.3 双重抗生素突变株筛选结果 以 Tlin-30 为出发菌株,分离在含林可霉素与硫链丝菌素最小抑制浓度的双重抗生素平板上,等菌落长成后挑取单菌落 30 株进行验证,结果见图 2。

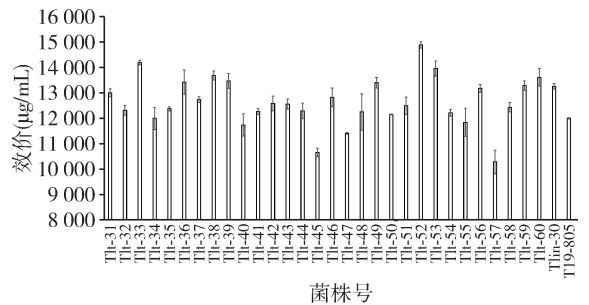


图 2 双重抗生素突变株的筛选结果

Fig 2 The selection of high-yield mutants by double antibiotics

由图 2 可知,含林可霉素与硫链丝菌素双重抗生素突变株中有 3 株菌的效价达到 14000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,其中 Tlt-52 (14885 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 效价最高,将单重抗生素标记菌株 Tlin-30 (13256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 提高了 12.3%,将原始出发菌株 T19-805 (12000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 提高了 24.0%。所以选菌株 Tlt-52 进行多重抗生素突变株的筛选。

2.4 多重抗生素抗性突变株的筛选 随着抗生素种类不断增加,筛选获得的突变株耐药性逐渐增强,所以本轮筛选同时多增加了两种抗生素,按正突变率由高到低顺序选用链霉素与遗传霉素两种抗生素,结果见图 3。随着不同抗生素的逐级添加,抗性突变株的效价也逐步增高,结果见图 4。

由图 3 可知,在含四种抗生素的突变株中有 1 株菌的效价明显高于其他菌株,菌种号为 Tltsg-69,效价达到 16185 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由图 4 可知,原始出发菌株 T19-805 经林可霉素单重抗生素突变,逐级增加硫链丝菌素、链霉素与遗传霉素,高产突变株

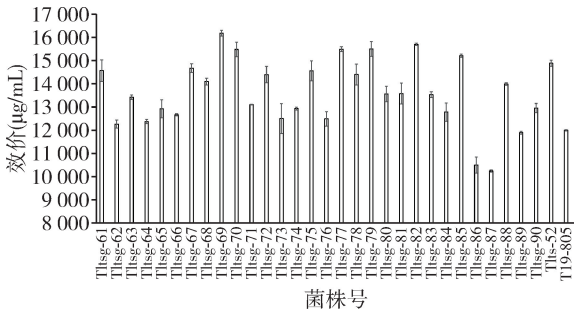


图 3 四重抗生素突变株的筛选结果

Fig 3 The selection of high-yield mutants by quadruple antibiotic

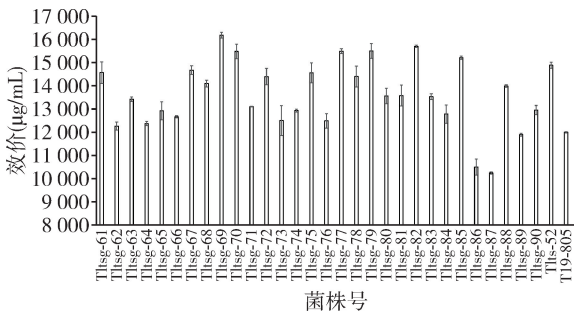


图 4 出发菌株 T19-805 逐级增加抗生素时泰乐菌素产量不断增长

Fig 4 Hierarchical increase of antibiotic production by introducing combined drug-resistance mutations in industrial strain T19-805, which produces a high amount of tylosin

的效价不断增加。突变株 Tltsg - 69 (16185 μg/mL) 将单重抗生素标记菌株 Tlin - 30 (13256 μg/mL) 提高了 22.1% , 将双重抗生素标记菌株 Tlt - 52 (14885 μg/mL) 提高了 8.7% , 将原始出发菌株 T19 - 805 (12000 μg/mL) 提高了 34.9% 。

2.5 高产突变株的遗传稳定性分析 将筛选到的高产菌株在斜面上连续培养 4 代, 各代菌种经行摇瓶发酵培养测其化学效价, 结果见表 2。

表 2 Tltsg - 69 菌株遗传稳定性实验

Tab 2 Experimental results on the stability of strain Tltsg - 69

菌株编号	化学效价 / (μg · mL ⁻¹)	各代斜面的相对稳定性/%				
		F1	F2	F3	F4	F4
Tltsg - 69	16185	100	100.1	99.9	99.8	99.5

由表 2 结果可知, 突变株 Tlpsg - 69 前四代的化学效价基本稳定, 具有较好的遗传稳定性, 第五代开始稳定性较差, 为了保证生产质量, 一般选取前两代斜面使用。

2.6 高产突变株与出发菌株的菌丝形态比较 种子液的菌丝用美兰染色, 用光学显微镜, 在 100 倍的油镜下观察, 结果见图 5。

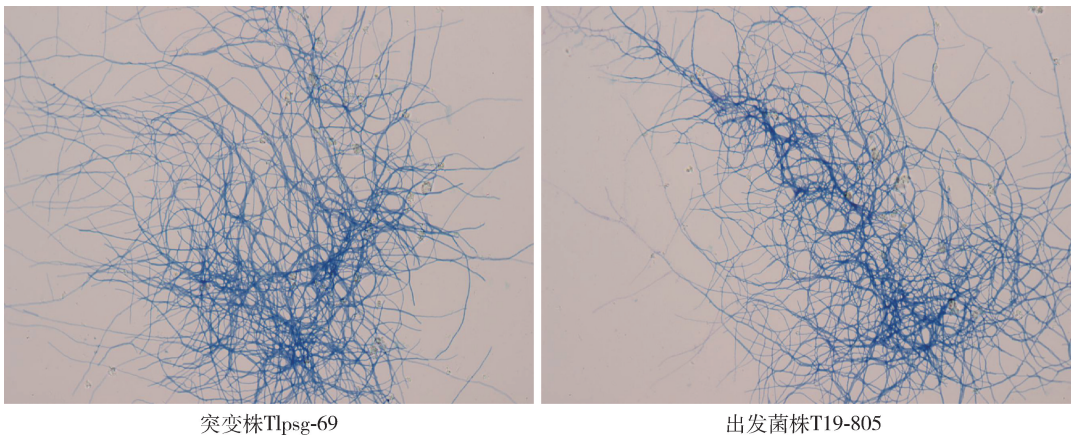


图 5 出发菌株 T19 - 805 与四重抗性突变株 Tlpsg - 69 在种子液中指数增长时期的菌丝形态特征

Fig 5 Morphological appearance of original strain T19 - 805 and quadruple mutant strain Tlpsg - 69 during exponential growth in liquid medium

由图 5 可知,将突变株与出发菌株同时培养,观察指数生长期种子液(发酵罐所需的最佳种子液)的菌丝形态,四重抗性突变株 Tltsg-69 的菌丝较粗、圆润、着色深、舒展,网织稍疏松但不紧密,末端菌丝伸展有力,芽枝较长连成网织,菌丝网成大垛生长。出发菌株 T19-805 的菌丝较弯曲、稍细,末端菌丝舒展程度差,菌丝芽多较短。所以,四重抗性突变株的菌丝特征明显优于原始出发菌株的菌丝,菌丝形态的改善是发酵产量明显提高的有力保障。

2.7 豆油加量对泰乐菌素发酵产量的影响 在实验过程中,发现高产稳定突变株 Tltsg-69 的发酵液中豆油的利用率较差,发酵结束后发酵液中含有较多的油脂,而原始菌株发酵液对豆油利用较充分。所以,推断突变株对豆油的消耗较低(图 6)。

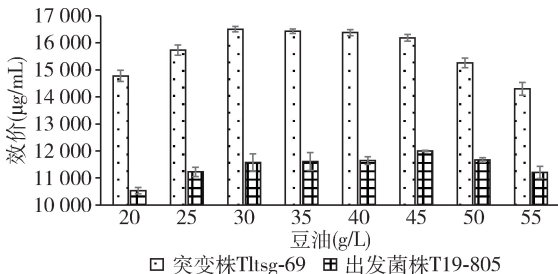


图 6 豆油加量对泰乐菌素发酵产量的影响

Fig 6 Effects of different concentration of soybean oil on tylosin fermentation

由图 6 可知,豆油加量对发酵产量影响较为明显,随着豆油加量不断增大,发酵产量先升高后降低。豆油的加量为 30 g/L 时突变株 Tltsg-69 的产量最高为 16507 μg/mL,而豆油的加量为 45 g/L 时出发菌株 T19-805 的产量最高为 12000 μg/mL。所以突变株 Tltsg-69 的发酵液中豆油最适加量为 30 g/L,对豆油消耗减少了 33.3%,这样就降低了原材料的成本。最终突变株 Tltsg-69 产量达到 16507 μg/mL,将原始出发菌株 T19-805 (12000 μg/mL) 提高了 37.6%,具有很好的工业化生产价值。

3 小结与讨论

本研究共选用了 7 种已报道对链霉菌突变有

效的抗生素,分别是链霉素、庆大霉素、夫西地酸、硫链丝菌素、林可霉素、遗传霉素与巴龙霉素。这 7 种抗生素对泰乐菌株都有一定的抑制作用。最小抑制浓度分别为 2.6、2.8、2.7、0.35、4.0、0.25、0.5 μg/mL。正突变率分别约为 27.3%、23.6%、24.2%、28.3%、28.5%、26.1%、24.6%。从正突变率分析对泰乐菌株产量有明显提高作用的抗生素有 4 种,分别为林可霉素、硫链丝菌素、链霉素、遗传霉素。

在单重抗生素突变株中共挑选了 210 株菌,以其中 1 株高产突变株 Tlin-30 (13256 μg/mL) 为出发菌株进行双重抗生素抗性突变株的筛选,获得双重抗生素高产突变株 Tlt-52 (14885 μg/mL),再以其进行四重抗生素突变株的筛选,在含四种抗生素的突变株筛选中获得 1 株高产突变株 Tltsg-69,效价达到 16185 μg/mL,将单重抗生素标记菌株 Tlin-30 (13256 μg/mL) 提高了 22.1%,将双重抗生素标记菌株 Tlts-52 (14885 μg/mL) 提高了 8.7%,将原始出发菌株 T19-805 (12000 μg/mL) 提高了 34.9%。突变株 Tltsg-69 前四代的化学效价基本稳定,具有较好的遗传稳定性。从种子液指数生长期的菌丝形态特征分析,四重抗性突变株 Tltsg-69 的菌丝明显好于原始出发菌株的菌丝,种子液菌丝形态的改善是发酵产量明显提高的有力保障。

豆油加量对发酵产量影响较为明显,随着豆油加量不断增大,发酵产量先升高后降低。豆油的加量为 30 g/L 时突变株 Tltsg-69 的产量最高为 16507 μg/mL,而豆油的加量为 45 g/L 时出发菌株 T19-805 的产量最高为 12000 μg/mL。所以突变株 Tltsg-69 的发酵液中豆油最适加量为 30 g/L,对豆油消耗降低了 33.3%,这样就降低了原材料的成本。最终突变株 Tltsg-69 产量达到 16507 μg/mL,将原始出发菌株 T19-805 (12000 μg/mL) 提高了 37.6%,所以利用核糖体工程育种方法有效的提高泰乐素产量。

微生物次级代谢的调控基因可能被激活,提高次级代谢产物的合成能力,是一种遗传性改变^[13]。

研究发现,抗性突变是由于编码核糖体蛋白 S12 的 rpsL 基因或其它基因发生突变导致核糖体或核糖体蛋白发生改变而产生^[14]。井冈霉素^[15],去甲基万古霉素^[16]利用带链霉素抗性标记均筛到产素较高的菌株。核糖体工程育种技术需要的时间、成本较少,在菌株改良方面应用较为简便。虽然本文应用核糖体工程技术选用了几种抗生素处理泰乐菌素产生菌株,经过大量发酵摇瓶筛选出高产突变菌株,但对于编码核糖体蛋白的基因、突变位点的研究较少,有关的诱导机制需继续加强学习研究。

参考文献:

- [1] Hamill R L, Haney M E, Stamper M, *et al.* Tylosin, a new antibiotic. II. Isolation, properties, and preparation of desmycosin, a microbiologically active degradation product[J]. *Antibiotics & Chemotherapy*, 1961, 11: 328 - 334.
- [2] Mcguire J, Boniece W, Higgins C, *et al.* Tylosin, a new antibiotic; I. Microbiological studies[J]. *Antibiotics & Chemotherapy*, 1961, 11(5): 320 - 327.
- [3] Stark W M, Daily W A, Mcguire J M. A fermentation study of the biosynthesis of tylosin in synthetic media[J]. *Scientific Reports of the Istituto superiore di sanita*, 1961, 1: 340 - 354.
- [4] 刘鑫. 木糖葡萄球菌对泰乐菌素和氟苯尼考交叉耐药机制的研究[D]. 东北农业大学, 2019.
Liu X. Study the Cross - resistance Mechanism of Tylosin and Florfenicol against *Staphylococcus xylosum*[D]. Northeast Agricultural University, 2019.
- [5] 何翔宇. 泰乐菌素生物合成的异源表达及其改造[D]. 天津大学, 2020.
He X Y. Heterologous expression and modification of tylosin biosynthesis[D]. Tianjin University, 2020.
- [6] Artsimovitch I, Patlan V, Sekine S, *et al.* Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp[J]. *Cell*, 2004, 117(3): 299 - 310.
- [7] Tamemiro Norimasa, Hosaka Takeshi, Xu Jun, *et al.* Innovative Approach for Improvement of an antibiotic - overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6412 - 6417.
- [8] Ochi K, Okamoto S, Tozawa Y, *et al.* Ribosome engineering and secondary metabolite production[J]. *Advances in applied microbiology*, 2004, 56: 155 - 184.
- [9] Ochi, K. From Microbial differentiation to ribosome engineering [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2007, 71(6): 1373 - 1386.
- [10] 谢运昌,姚仕杰,李炜,等. 放线菌核糖体工程的发展与应用[J]. *生物工程学报*, 2019, 27(7): 1322 - 1330.
Xie Y Ch, Yao Sh J, Li W, *et al.* The development and application of ribosome engineering in actinomycetes[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021: 1 - 18.
- [11] 刘华华,陈宇航,陈敏. 核糖体工程技术选育阿维拉霉素高产菌株[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(7): 1322 - 1330.
LIU H H, Chen Y H, Chen M. Breeding of High Avilamycin - producing Strains by Ribosome Engineering[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(7): 1322 - 1330.
- [12] Wang G, Hosaka T, Ochi K. Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(9): 2834 - 2840.
- [13] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, *et al.* Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3 (2) [J]. *J Bacterial*, 1996, 178(24): 7276 - 7284.
- [14] 刘永娟. 基于核糖体工程技术的 ϵ - 聚赖氨酸高产菌株选育及高产机制解析[D]. 江南大学, 2020.
Liu Y J. Screening of ϵ - poly - L - lysine high strain of based on ribosome engineering technology and analysis of its high - yield mechanism[D]. Jiangnan University, 2020.
- [15] 牛莉娜,葛翠凤,葛绍荣. 链霉素抗性筛选井冈霉素高产菌株的研究[J]. *安徽农业科学*. 2007, 35(28): 8930 - 8932.
Niu L N, Ge C F, Ge Sh R. Study on the streptomycin resistance screening of high - yield strain of Jinggangmycin[J]. *Journal of Anhui Agri. Sci*, 2007, 35(28): 8930 - 8932.
- [16] 王耀耀,刘云清,朱研研,等. 组合链霉素和利福平抗性突变去甲基万古霉素高产菌株的选育[J]. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(4): 243 - 246.
Wang Y Y, Liu Y Q, Zhu Y Y, *et al.* Screening of high yield norvancomycin producing strain by streptomycin and rifampicin resistant mutation[J]. *Chin J Antibiotics*, 2006, 31(4): 243 - 246.

(编辑:侯向辉)