

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.5.06

多拉菌素的复合诱变及发酵条件优化

张会萍¹, 张萍, 牛春*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司, 银川 750100)

[收稿日期] 2020-08-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021)05-0044-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为通过诱变获得遗传性状稳定的多拉菌素高产菌株, 对多拉菌素产生菌 RDL19-1 进行多种诱变处理包括常压室温等离子 (ARTP) 诱变, 紫外 (UV) 诱变, 及 ARTP-UV 复合诱变。该菌株接种瓶后于 28 ℃ 摇床培养 32 h, 以 10% 的接种量转入装量为 35 mL/300 mL 发酵瓶中, 在 28 ℃ 条件下发酵培养 14 d, 多拉菌素发酵产量达到了 1390 μg/mL, 相较于诱变前提高了 4 倍。通过对多拉菌素产生菌 RDL19-1 进行 ARTP-UV 复合诱变, 获得了一株遗传性状稳定的高产菌株。

[关键词] 多拉菌素; 复合诱变

Compound Mutagenesis of Doramectin and Optimization of Fermentation Conditions

ZHANG Hui ping, ZHANG Ping, NIU Chun*

(Ningxiatairui Pharmaceutical Co Ltd Strains Institute, Yinchuan 750100, China)

Corresponding author: NIU Chun, E-mail: chun.niu@tairuiworld.com

Abstract: To obtain a high-yield doramectin strain with stable genetic traits by mutagenesis, the doramectin-producing strain RDL19-1 was subjected to various mutagenesis treatments such as atmospheric room temperature plasma (ARTP) mutagenesis, ultraviolet (UV) mutagenesis, and ARTP-UV combined mutagenesis. After inoculating the flask, the strain was cultured on a shaker at 28 ℃ for 32 hours, and transferred to a 35 mL/300 mL fermentation flask with 10% of the inoculum, and fermented and cultured at 28 ℃ for 14 days. The fermentation yield of doramectin reached 1390 μg/mL, which is 4 times higher than that before mutagenesis. By ARTP-UV compound mutagenesis of doramectin-producing strain RDL19-1, a high-yielding strain with stable genetic characteristics was obtained.

Key words: doramectin; compound mutagenesis

多拉菌素 (Doramectin) 20 世纪 90 年代由美国辉瑞公司研制开发的新一代大环内酯类抗寄生虫

药, 化学名称为 25-环己烷基-5-O-去甲基-25-去(1-甲基丙酸)阿维菌素 B1, 分子式为

作者简介: 张会萍, 主要从事菌种选育工作。

通讯作者: 牛春。E-mail: chun.niu@tairuiworld.com

$C_{50}H_{74}O_{14}$, 分子量为 899.11, 易溶于有机溶剂, 如甲醇、乙醇、丙酮、二甲基亚砷、乙酸乙酯、乙酸异丙酯和己烷等有机溶剂^[1-2]。多拉菌素是阿维链霉菌突变株在发酵过程中添加环己烷羧酸得到的产物^[3], 抗寄生虫的范围更广, 效果更明显, 预防寄生虫再感染的时间更长, 多拉菌素对畜禽的毒性较小, 安全性更好, 对环境友好^[4], 是阿维菌素类抗生素中最据开发潜力的抗寄生虫兽用药^[5]。

对多拉菌素出发菌进行常温室压等离子 (ARTP) 诱变、紫外 (UV) 诱变和 ARTP + UV 复合诱变, 筛选出一株高效价的多拉菌素突变株, 又对该突变株进行发酵培养条件优化, 包括培养温度, 发酵装量, 种龄, 培养时间等进行优化, 菌株的生产能力和遗传稳定性都有很大的提升, 为以后工业化生产提供可靠的工艺参数。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 出发菌株 RDL19-1 (效价为 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 由宁夏泰瑞制药股份有限公司菌种保藏室保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂: 多拉菌素标准品 (纯度 $\geq 99\%$), 环己烷甲酸 (分析纯, $\geq 99\%$), 蔗糖 (分析纯), 硫酸镁 (分析纯), 磷酸二氢钾 (分析纯)

主要仪器: ARTP 诱变系统 ARTP-2-026, 北京思源清源科技有限公司; PHS-3C 酸度计, 上海精密科学仪器有限公司; 紫外诱变箱和 78-1 型磁力搅拌器, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; BSA3202S-CW 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; 超净工作台, 无锡市荣丰净化空调设备厂; XG1-Y 型普通卧式压力蒸汽灭菌器, 山东新华医疗器械股份有限公司; DHZ-2001B 恒温恒湿培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; AS3120A 型超声波清洗机。

1.1.3 培养基和培养条件

1.1.3.1 培养基 斜面及分离培养基: 蔗糖、可溶性淀粉、琼脂粉, pH7.0。

种子培养基: 玉米淀粉、黄豆饼粉、棉籽饼粉, pH7.1-7.3。

发酵培养基: 玉米淀粉、黄豆饼粉、棉籽饼粉、硫酸镁、磷酸氢二钾、碳酸钙、微量元素, pH7.1-7.3。培养基灭菌条件均为 121 $^{\circ}\text{C}$, 30 min。

1.1.3.2 培养条件 斜面培养: 培养温度 28 ± 1 $^{\circ}\text{C}$, 培养时间 8 d。

种子培养: 取长势良好的斜面, 做成单孢子悬液, 接入种子培养基中, 种瓶装量为 30 ml (300 ml 三角瓶), 培养温度 28 ± 1 $^{\circ}\text{C}$, 摇床转速 240 rpm/min, 培养时间 20~36 h。

发酵培养: 将培养好的种子液在无菌条件下转入发酵瓶中, 摇瓶装量为 30 mL (300 mL 三角瓶), 接种量为 10%, 培养温度 28 ± 1 $^{\circ}\text{C}$, 摇床转速 240 rpm/min, 培养时间 12-15 d。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 吸取 10 mL 无菌生理盐水到培养好的新鲜斜面中, 用无菌的铲子刮洗斜面孢子, 将洗脱液移入无菌的装有玻璃珠的三角瓶中, 震荡 5 min 打散, 用塞有二层擦镜纸的无菌漏斗过滤菌悬液到 EP 管中, 得到单孢子悬液待用。

1.2.2 常压室温等离子 (ARTP) 诱变处理^[6] 将无菌铁片装在无菌培养皿中, 在超净工作台中吸取 20 μL 菌悬液滴在无菌铁片上, 用无菌镊子夹取铁片放入 ARTP 诱变系统的载物台上, 诱变参数为: 电源功率 100 W, 氦气流量 10 L/min, 照射距离 2 mm。分别照射 10、20、30、40、50 和 60 s, 照射结束后将铁片夹入装有 5 mL 无菌生理盐水的 EP 管中避光存放, 洗脱菌体, 吸取 1 mL 洗脱液用无菌生理盐水按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度稀释, 取 0.1 mL 稀释液涂布双碟, 28 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养, 稀释未诱变的菌悬液涂布双碟作为对照组, 单菌落计数, 计算 ARTP 不同照射时间的致死率和正突变率 (菌株效价 \geq

对照菌株 20% 即为正突变),挑取单菌落斜面进行摇瓶初筛,选育高产菌株。

1.2.3 紫外(UV)诱变处理^[7] 在装有磁力搅拌转子的无菌培养皿中加入 5 mL 菌悬液,黑暗处 15 W 紫外灯下,距离 30 cm 处分别照射 30、60、90、120、150 和 180 s,吸取 1 mL 照射后的孢子悬液用无菌生理盐水按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度稀释,取 0.1 mL 涂布平板, 28 ± 1 °C 避光培养,稀释未诱变的菌悬液涂布双碟作为对照组,计算紫外照射不同时间的致死率和正突变率(菌株效价 \geq 对照菌株 20% 即为正突变),挑取单菌落斜面进行摇瓶初筛,选育高产菌株。

1.2.4 ARTP-UV 复合诱变处理^[8] 吸取 20 μ L 菌悬液到无菌铁片上,ARTP-W100 照射 30 s,诱变后将铁片放入装有 5 mL 无菌生理盐水的 EP 管中避光存放,洗脱菌体后,吸取 5 mL 菌悬液到装有磁力搅拌转子的无菌培养皿中,在 15 W 紫外灯距离 30 cm 处搅拌照射 120 s,稀释菌悬液涂布平板,在 28 ± 1 °C 避光培养,计算致死率和正突变率(菌株效价 \geq 对照菌株 20% 即为正突变),未诱变的菌悬液涂布双碟作为对照组,挑取单菌落斜面进行摇瓶初筛,筛选高产菌株。

1.2.5 复筛 根据初筛结果选取效价高的斜面进行复筛,种子液以 10% 的接种量转入发酵瓶,在温度 28 ± 1 °C,转速 240 rpm/min 条件下摇瓶培养 12 d,培养结束后用高效液相色谱法测定多拉菌素效价。

1.2.6 遗传稳定性 复筛选出的高产菌株进行连续 5 代的传代培养,发酵摇瓶检测效价,验证高产菌株的遗传稳定性。

1.2.7 甘油管保藏法 用 20% 的甘油与孢子悬液 1:1 混合制备甘油管,冷冻于 -20 °C 冰箱保存。

1.2.8 HPLC 测定

1.2.8.1 样品处理方法 吸取 1 mL 发酵液,加入

4 mL 甲醇,超声 10 min,静置过夜,3000 r 离心,吸取上清液进行 HPLC 检测。

1.2.8.2 高效液相色谱条件 LC-20AT 型高效液相色谱仪;C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);检测波长 245 nm;流动相为甲醇:乙腈:水(体积比)810:10:120;进样 20 μ L;流速 1 mL/min;根据积分面积,对照多拉菌素标准品曲线计算多拉菌素产量。

2 多拉菌素高产菌发酵条件优化

2.1 发酵温度试验 分别在 25 °C、28 °C、30 °C 对多拉菌素进行发酵摇瓶,其他条件不变,培养结束后测定多拉菌素的产量,确定最佳发酵温度。

2.2 发酵摇瓶装量试验 300 mL 摇瓶分别装量 25、30、35、40、50 mL 发酵培养基,其他条件不变,培养结束后测定多拉菌素的产量,判断发酵摇瓶装量对多拉菌素的产量的影响,确定最佳发酵摇瓶装量。

2.3 种龄实验 将培养 16、24、32、40、48 h 的种子液以 10% 的接种量转入发酵摇瓶中,进行发酵培养,其他条件不变,培养结束后测定多拉菌素的产量,确定种子培养的最佳时间。

2.4 发酵培养时间对多拉菌素产量的影响 种子液转入发酵瓶后,发酵瓶分别培养 12、13、14、15 d 放瓶检测多拉菌素的效价,确定最佳放瓶周期。

3 结果与分析

3.1 菌种诱变结果

3.1.1 ARTP 诱变的作用结果 原始菌株经 ARTP 诱变处理后,共挑得单菌落 200 个,不同 ARTP 诱变时间的致死率和正突变率如表 1 所示,随着诱变时间延长,菌株的致死率明显增加,正突变率先随着致死率的增加而增加,诱变 40 s 后致死率增加正突变率减少,选择 ARTP 最佳诱变时间为 30 s,此时致死率为 70.3%,正突变率最高 31.7%,有利于筛选高产菌株。

表 1 不同 ARTP 诱变时间菌种的致死率与正突变率

Tab 1 Fatality rate and positive mutation rate of different ARTP mutagenesis time strains

ARTP 诱变时间/s	致死率/%	正突变率/%
10	20.6	10.8
20	53.1	14.2
30	70.3	31.7
40	72.7	24.5
50	80.8	18.9
60	95.8	13.6

3.1.2 UV 诱变的作用结果 原始菌株经 UV 诱变处理后,共挑得单菌落 200 个,如表 2 所示菌株孢子的致死率随着 UV 诱变的时间增加而增加,紫外诱变 150 s 时,致死率为 90.6%,正突变率最高为 33.5%。由于致死率过高,还要进行复合诱变,所以确定 UV 最佳诱变时间为 120 s,致死率为 75.9%,正突变率为 29.3%。

3.1.3 ARTP + UV 复合诱变的作用结果 原始菌株经复合诱变处理后,共挑得单菌落 200 个,如表 3 所示孢子悬液经 ARTP30 s + UV60 s 诱变后,菌株致死率为 97.4%,正突变率为 52.8%。筛选

出一株高产菌株,摇瓶效价在 1085 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比出发菌株提高了 4 倍,其含量测定的液相色谱图见图 1 ~ 图 3。

表 2 不同 UV 诱变时间菌种的致死率与正突变率

Tab 2 Fatality rate and positive mutation rate of different UV mutagenesis time strains

UV 诱变时间/s	致死率/%	正突变率/%
30	17.3	13.7
60	25.7	25.8
90	67.4	27.7
120	75.9	29.3
150	90.6	33.5
180	98.2	19.4

表 3 ARTP 和 UV 复合诱变的致死率和正突变率

Tab 3 Mortality and positive mutation rate of ARTP and UV combined mutagenesis

组合方式	致死率/%	正突变率/%
ARTP30 s	70.3	31.7
UV120 s	75.9	29.3
ARTP30 s + UV60 s	97.4	52.8

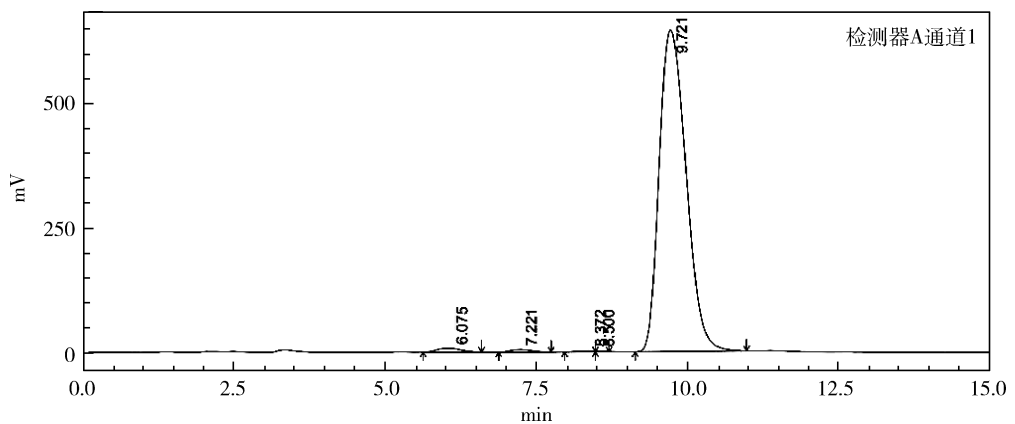


图 1 多拉菌素标准品液相色谱图

Fig 1 Liquid chromatogram of doramectin standard

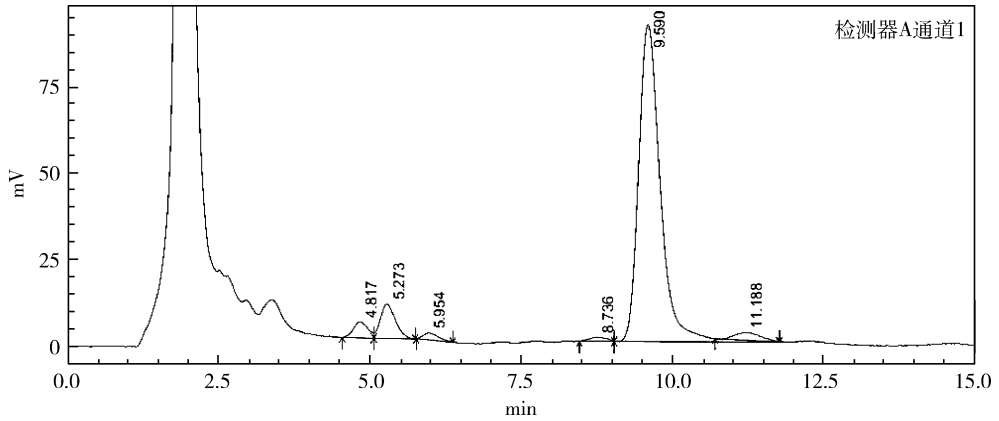


图 2 原始菌株液相色谱图

Figure 2 Liquid chromatogram of original strain

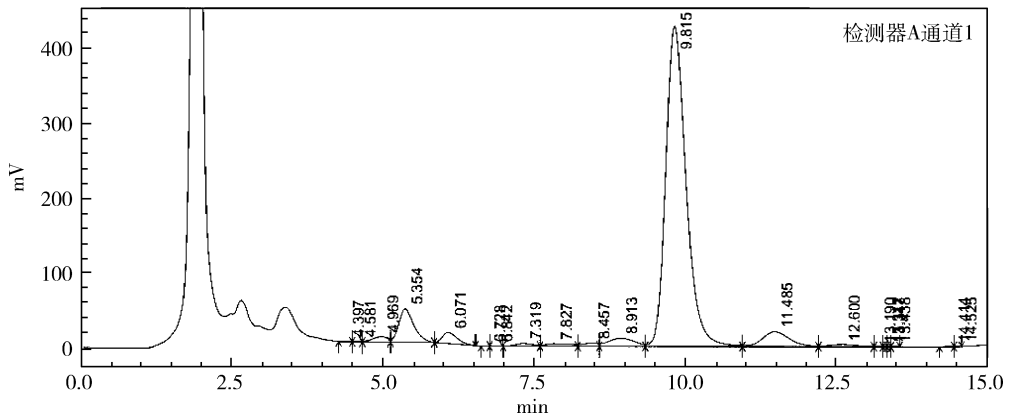


图 3 高效价菌株液相色谱图

Fig 3 Liquid chromatogram of high titer strain

3.2 菌种稳定性结果 对效价为 1085 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高产菌株连续进行 5 次传代,验证菌种传代稳定性,结果如表 4 所示,传到四代斜面时,效价有小幅下降,五代斜面有明显的降低,说明筛选的多拉菌素高产菌株的遗传稳定性高。

表 4 高产菌株的稳定性验证

Tab 4 Stability verification of high - yielding strains

传代次数	相对效价/%
1	100
2	99.1
3	97.4
4	95.7
5	90.6

3.3 发酵条件优化结果

3.3.1 发酵温度的确定 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、28 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 培养温度下分别培养种瓶发酵瓶,检测结果如表 5,不同温度下多拉菌素的产量变化较大,种瓶与发酵瓶的最适培养温度均为 28 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.3.2 发酵摇瓶装量的影响 由表 6 所示,发酵装量为 35 mL 时,摇瓶效价最高,装量 40 mL 以上时效价明显降低,所以确定最佳发酵装量为 35 mL/300 mL。

表 5 不同发酵温度对多拉菌素发酵产量的影响

Tab 5 Effect of different fermentation temperature on fermentation yield of doramectin

培养温度	效价一/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	效价二/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	效价三/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	平均效价/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)
25 °C 种瓶 25 °C 发酵	646	575	528	583
25 °C 种瓶 28 °C 发酵	914	896	952	921
25 °C 种瓶 30 °C 发酵	732	696	753	727
28 °C 种瓶 25 °C 发酵	556	588	574	573
28 °C 种瓶 28 °C 发酵	1203	1180	1057	1147
28 °C 种瓶 30 °C 发酵	788	864	821	824
30 °C 种瓶 25 °C 发酵	510	636	631	592
30 °C 种瓶 28 °C 发酵	985	913	1005	968
30 °C 种瓶 30 °C 发酵	741	698	757	732

表 6 摇瓶装量对多拉菌素发酵产量的影响

Tab 6 Influence of shake bottle volume on fermentation yield of doramectin

装量(ml)	效价一/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	效价二/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	效价三/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	平均效价/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)
25	1003	1142	1120	1088
30	1257	1248	1231	1245
35	1307	1248	1365	1307
40	921	984	1011	972
50	884	843	857	861

3.3.3 种龄结果

分别将培养了 16、24、32、40、48 h 的种子液按 10% 的接种量转到发酵瓶中,28 °C 培养 12 d,检测

多拉菌素效价。由下表可知,种瓶培养 32 h 时检测效价最高。

表 7 种龄对多拉菌素发酵产量的影响

Tab 7 Effect of seed age on fermentation yield of doramectin

种龄(h)	效价一/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	效价二/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	效价三/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	平均效价/($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)
16	877	842	851	857
24	1120	1053	1140	1104
32	1342	1288	1369	1333
40	1203	1198	1268	1223
48	1007	1154	1167	1109

3.3.4 发酵培养时间对多拉菌素产量的影响 种子液接入发酵瓶后,发酵瓶分别培养 12、13、14、

15 d 放瓶检测多拉菌素的效价,如表 8 所示,发酵摇瓶 14 d 时效价最高,确定发酵时间为 14 d。

表 8 发酵培养时间对多拉菌素产量的影响

Tab 8 The influence of fermentation time on the production of doramectin

摇瓶天数(d)	效价一/ ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	效价二/ ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	效价三/ ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	平均效价/ ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)
12	964	927	987	959
13	1025	1046	1158	1076
14	1342	1358	1469	1390
15	1107	1254	1138	1166

4 讨论与结论

实验室保藏的菌株由于生产能力低,不具备工业化生产的条件^[9],诱变技术可以实现短时间内筛选出高产菌株,目前生产所用菌种多为诱变菌种,为企业节约了成本和时间。其中复合诱变技术的利用,可以获取较多的突变菌株。朱皖宜^[10]等 UV、SP 等的复合诱变,有效地改变菌种对诱变剂的敏感度,获得的高产突变株其生产能力比出发株提高了 127%。吴婕^[11]对孢子悬液进行紫外诱变、DES 诱变和紫外-DES 复合诱变、NTG 诱变均表现出较好效果。本实验以 RDL19-1 为出发菌株,通过 ARTP-UV 复合诱变,获得一株高产菌,摇瓶效价可达 1085 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比出发菌株提高了 4 倍,连续传代 5 次遗传性状稳定。同时对获得的多拉菌素高产菌株发酵进行条件优化,考察了发酵温度、摇瓶装量、种龄、发酵培养时间等方面的影响,结果表明:种瓶在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 32 h,以 10% 的接种量转入装量为 35 mL/300 mL 发酵瓶中,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下发酵培养 14 d,多拉菌素发酵产量最高,平均最高效价可达 1390 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

多拉菌素是阿维链霉菌突变株在发酵过程中添加环己烷羧酸得到的产物,在发酵过程中前体物质含量过多过少都会影响代谢活动,造成多拉菌素发酵产量低,适量的前体物质可以提高菌种代谢活动,缩短合成周期,提高发酵产量。杨世红^[3]等考察了不同前体对多拉菌素生物合成的作用,以及有效前体的最佳添加浓度和添加时间,丙酸钠是多拉菌素合成的最佳前体,在发酵 96 h 时添加 0.1% 的丙酸钠,多拉菌素产量达 139.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比对照组提高了 38.2%,前体物质对多拉菌素的生物合成影

响显著。刁金娜^[1]通过对前体添加时间和浓度的研究,在发酵第一天和第六天分别添加 0.1% 和 0.06% 前体环己烷甲酸钠能促进多拉菌素产素。在接下来的研究中,通过对前体物质添加浓度和添加时间的控制,以期提高多拉菌素的发酵产量。

参考文献:

- [1] 刁金娜. 多拉菌素产生菌基因组重排育种[D]. 东北农业大学. 2011
Diao J N. Improvement of doramectin-producing strain by genome shuffling[D]. Northeast Agricultural University. 2011.
- [2] 关丽辉. 多拉菌素高产菌株的选育[D]. 东北农业大学. 2009.
Guan L H. Improve the production of doramectin by screening strains [D]. Northeast Agricultural University. 2009.
- [3] 杨世红, 李能成, 郭伟, 等. 前体对多拉菌素生物合成的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(11).
Yang ShH, Li NCH, Guo W, *et al.* Effects of precursors on doramectin biosynthesis[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011, 36(11).
- [4] 张颖, 李坤林. 多拉菌素的研究进展及应用[J]. 动物保健, 2006(8): 36-37.
Zhang Y, Li K L. Research progress and application of doramectin[J]. Animal Health, 2006(8): 36-37.
- [5] 刘振. 多拉菌素产生菌株的构建及发酵条件的优化[D]. 华中农业大学. 2015.
Liu Zh. The construction of a strain producing doramectin and the optimization of fermentation conditions [D]. Huazhong Agricultural University. 2015.
- [6] 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.
Shen X J, Zhang P, Shi Y P. A mutant strain with high erythromycin yield obtained by using novel atmospheric and room tem-

- perature plasmas and UV mutation[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2015, 49(1): 19-23.
- [7] 毕国东, 牛春, 黄文福, 等. 三重复合诱变选育林可霉素高产菌株[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(11): 22-26.
Bi G D, Niu Ch, Huang W F, *et al.* Triple breeding of lincomycin producing strain[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 50(11): 22-26.
- [8] 张会萍, 牛春, 王燕, 等. 雄烯二酮高产菌的复合诱变选育[J]. 中国抗生素杂志, 2020(01).
Zhang H P, Niu Ch, Wang Y, *et al.* Compound mutagenesis and breeding of a high androstendione - producing mutant [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2020(01).
- [9] 唐文力, 张祝兰. MW + NTG 复合诱变组合抗性突变筛选埃波霉素高产菌[C]. 宜昌: 2015 年中国微生物学会学术年会论文摘要集, 2015: 229.
Tang W L, Zhang ZhL. Screening of high - producing epothilone bacteria by MW + NTG compound mutagenesis combination[C]. Yichang: Abstracts of 2015 Chinese Society for Microbiology Annual Conference, 2015: 229.
- [10] 朱皖宜, 任敏, 王冬梅, 等. 多拉菌素产生菌的诱变及其发酵研究[J]. 生物学杂志, 2016, 33(5).
Zhu W Y, Ren M, Wang D M, *et al.* Mutation breeding of doramectin mutant strain and study on fermentation [J]. Journal of Biology, 2016
- [11] 吴婕. 多拉菌素产生菌的诱变育种及培养条件的优化[D]. 华中农业大学. 2010.
Wu J. Strains breeding and grooming conditions' optimization of the doramectin bacteria[D]. Huazhong Agricultural University. 2010

(编辑:陈希)