

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.04.05

常温常压等离子体诱变选育安普霉素高产菌株

张鄂¹, 王海波^{1*}, 王洛菊¹, 李敏¹, 孟敏¹, 田伟波¹, 赵国毅¹, 李继安²

(1. 山东齐发药业有限公司, 济南 250400, 2. 上海医药工业研究院有限公司, 上海 200000)

[收稿日期] 2022-11-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 04-0034-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 安普霉素作为一种广谱兽用抗生素,对多种革兰氏阴性菌、阳性菌和某些支原体具有较好的抗菌作用。本论文利用常温常压等离子体(ARTP)技术结合抗性筛选方法,对安普霉素产生菌黑暗链霉菌进行诱变选育,以期得到高产菌株。以 AP-520 为出发菌,进行 ARTP 诱变处理,ARTP 最佳诱变时间是 70 s,处理后的菌液在潮霉素平板上进行抗性筛选,单菌落经过 48 孔板大量筛选后再进行摇瓶初筛和复筛,共进行 8 轮筛选试验,得到一株高产菌株 AP-6023,摇瓶效价达到 $11444 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$,较对照提高 29%,经过 10 次传代培养后仍能保持产抗能力,30 L 发酵罐效价为 $10920 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$,较对照提高 23%。突变株 AP-6023 的获得,大大提高了安普霉素的生产水平,证实了 ARTP 诱变技术的有效性,试验方法为其它工业微生物的育种提供了解决思路。

[关键词] 安普霉素;常温常压等离子体(ARTP);抗性筛选;高产菌株

Breeding of High-yielding Strains of Apramycin by Atmospheric and Room-temperature Plasma

ZHANG E, WANG Hai-bo^{1*}, WANG Luo-ju¹, Li Min¹, MENG Min¹, TIAN Wei-bo¹,
ZHAO Guo-yi¹, LI Ji-an²

(1. Shandong Qilu King-Phar Pharmaceutical CO., LTD., Jinan 250400, China;

2. State Pharmaceutical Administration of Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200000, China)

Corresponding author: WANG Hai-bo, E-mail: haibo.wang@qilu-pharma.com

Abstract: As a broad-spectrum veterinary antibiotic, apramycin has a good antibacterial effect on a variety of Gram-negative bacteria, positive bacteria and some mycoplasmas. In order to obtain high yield strains, we used the technology of atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) combined with resistance screening method, to mutagenesis and breeding of apramycin producing bacteria streptomyces tenebrarius. AP-520 was used as the starting bacterium for ARTP mutagenesis. The optimal mutagenesis time of ARTP was 70 s. The treated bacterial solution was screened for resistance on hygromycin plate. After a large number of single colonies were screened by 48-well plates and then subjected to primary screening and re-screening in shake flasks. A

作者简介: 张鄂, 硕士, 助理工程师, 从事微生物菌种选育工作。

通讯作者: 王海波。E-mail: haibo.wang@qilu-pharma.com

total of 8 rounds of screening tests were conducted, and a high - yield strain AP - 6023 was obtained. The titer of shaking flask reached $11444 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$, which was 29% higher than that of the control. After 10 subcultures, AP - 6023 could still maintain the ability to produce antibiotics, and the titer of the 30 L fermenter was $10920 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$, which was 23% higher than the control. The acquisition of mutant strain AP - 6023 greatly improved the production level of apramycin, and confirmed the effectiveness of ARTP mutagenesis technology. The test method provides a solution for the breeding of other industrial microorganisms.

Key words: Apramycin; Atmospheric and room - temperature plasma (ARTP); resistance screening; high - yielding strains

安普霉素,又名阿泊拉霉素,是由美国礼来公司于 1976 年在黑暗链霉菌(*Streptomyces tenebrarius*)中发现的一种广谱抗生素。安普霉素作为氨基糖苷类抗生素,其具有特有的辛二糖结构^[1],因此对多种氨基糖苷类抗生素耐药菌都具有抑制和杀灭作用,在使用中不易产生交叉耐药性,并且具有低毒、低残留量、高效、快速等特点,广泛应用于由大肠杆菌、沙门氏菌等引起的畜禽急慢性腹泻、肠炎等疾病的预防和治疗。另外,安普霉素能明显促进增重和提高饲料转化率,因此,作为药物型饲料添加剂广泛应用于畜禽养殖业。此外,安普霉素还可作为分子生物学或基因工程中重组体筛选的选择性标记^[8]。

常压室温等离子体(atmospheric and room - temperature plasma, ARTP)技术是近年来新兴的微生物育种技术,较紫外诱变和化学诱变有更高的突变率,突变株遗传稳定性更好,且具有操作简易、安全、成本低等特点,该技术已经广泛应用于细菌、放线菌、微藻、真菌、酵母等微生物,以提高对培养基成分的耐受性,增加细胞生长和细胞生物质的产生,增强酶活性,并增加各种化学品的生产。例如,吴晓英等人利用 ARTP 技术,降低了巴氏杆菌膜通透性,致使乙酸产量较出发菌株提高 385.7%^[14];王会会等人采用 ARTP 技术,对一株他克莫司产生菌进行诱变,得到了一株稳定的高产菌,其摇瓶发酵单位提高了 162%。

抗代谢结构类似物在微生物生长过程中可以起到反馈抑制的作用,可用来筛选解除反馈抑制作用的突变株,即可以在终产物浓度较高情况下仍能

持续积累目标产物的突变株。为了提高安普霉素工业发酵化发酵水平,本研究以黑暗链霉菌 AP - 520 为出发菌,采用 ARTP 诱变技术结合抗代谢结构类似物潮霉素作为定向抗性筛选技术,经过多轮诱变和筛选,得到一株安普霉素高产菌株 AP - 6023,其发酵摇瓶单位较出发菌提高 29%,并考察了该菌株在 30 L 发酵罐中的表现,试验表明发酵罐效价达 $10920 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$,效价提高 23%,明显降低了安普霉素的生产成本。本试验也为其他工业微生物的研究提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 出发菌:黑暗链霉菌 AP - 520(*Streptomyces tenebrarius*),山东齐发药业有限公司保藏菌种;检定菌:枯草芽孢杆菌。

1.1.2 试剂 葡萄糖(分析纯,天津大茂化学试剂厂),黄豆饼粉及胰蛋白胨(北京鸿润宝顺科技有限公司)、玉米浆(试剂级,阿拉丁),牛肉膏及琼脂(生物试剂,国药集团化学试剂有限公司),豆粕(益海嘉里)可溶性淀粉、 NH_4Cl 、 MgSO_4 、 ZnSO_4 、 FeSO_4 、 CaCO_3 、 KNO_3 、 NaCl (天津光复科技发展有限公司)。

1.1.3 培养基 固体培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):可溶性淀粉 25, NaCl 0.5, MgSO_4 0.5, 牛肉膏 1, 琼脂 18。

种子培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):葡萄糖 10, 黄豆饼粉 12, 玉米浆 3, 胰蛋白胨, CaCO_3 1。

发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):葡萄糖 35, 黄豆饼粉 35, 酵母粉 1, 玉米浆 10, 豆粕 10, NH_4Cl 4, MgSO_4 6, ZnSO_4 0.03, FeSO_4 0.1, CaCO_3 5。

48 孔板培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):同发酵培养基。

检定培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):胰蛋白胨 4,牛肉膏 4,琼脂 15,pH 7.8。

1.1.4 仪器与设备 ARTP II 型 ARTP 诱变系统(无锡源清天木生物科技有限公司);TDL-80-2E 型离心机(上海安亭科学仪器厂);30 L 自动发酵罐(上海百仑生物科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 斜面活化培养 在无菌环境下将保藏菌液 0.1 ml 接种于斜面培养基,避光条件下 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 9 天。

1.2.2 菌悬液的制备 用适量无菌水将培养好的斜面孢子洗下,转移到含有玻璃珠的三角瓶中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $220\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床打散 15 min,制成单孢子菌悬液。

1.2.3 ARTP 诱变 在无菌环境下将金属载片灼烧 30 s 后放入玻璃平板中,冷却后取 $10\text{ }\mu\text{l}$ 菌悬液均匀涂布于载片上,然后将载片放入 ARTP 诱变平台上,按照操作流程进行照射。ARTP 诱变条件为 100 W , 10 SLM , 2 mm ,照射梯度为 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110 s,照射完成后将载片放入 E_p 管中,用无菌生理盐水振荡洗脱,洗脱液依次稀释到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,取 $100\text{ }\mu\text{l}$ 稀释后的诱变菌液涂布于平板培养基上,观察平板单菌落生长情况并计算致死率,致死率计算如公式(1)所示:

$$\text{致死率}/\% = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{诱变组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100 \quad (1)$$

1.2.4 潮霉素抗性筛选 在菌种选育中,抗性筛选可以利用微生物对某些抗生素的耐药作用对大量突变株进行有目的的筛选,因其操作简便、有效提高产物产量而在微生物菌种选育中得到广泛应用。本试验选取氨基糖苷类抗生素潮霉素作为抗性压力筛选安普霉素高产菌。将孢子悬液适当稀释后涂布于潮霉素浓度为 1.5 、 2.0 、 2.5 、 $3.0\text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的平板培养基上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 9 天。

1.2.5 初筛 将潮霉素抗性平板上的单菌落挑到

48 孔板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $200\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 2 天,利用管碟法测量孔板中每个单菌落的产抗能力,以抑菌圈直径大小为指示。从平板培养基上挑取相应的高产单菌落,同时接种到斜面培养基和发酵摇瓶中,斜面培养基培养 9 天,发酵摇瓶培养 6 天。

1.2.6 复筛 根据初筛水平,选取高产菌对应的斜面进行两轮复筛。斜面挖块至种子培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $200\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 15 h,然后转接发酵摇瓶, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $200\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 6 天,检测发酵水平,最后综合评价初筛和复筛结果,选取高产且稳定的菌株保藏。

1.2.7 分析检测方法 利用管碟法检测发酵液中安普霉素效价水平。

1.2.8 30 L 发酵罐培养 按 5% 的比例将摇瓶种子液接入 10 L 种子罐,通入无菌空气, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 350 rpm ,培养 14 h,然后按照 10% 的比例转入 30 L 发酵罐培养,通入无菌空气, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 350 rpm ,培养 6 天放罐。

2 结果与分析

2.1 ARTP 致死曲线 以 AP-520 作为出发菌株进行 ARTP 诱变,致死率曲线如图 1 所示,随着诱变处理时间的增加,致死率逐渐升高。当诱变时间为 60 s 时致死率为 77%,诱变时间增加到 70 s 时致死率达到 89%,100 s 时无存活菌株。

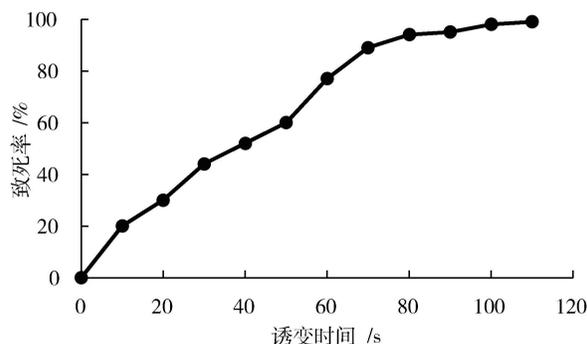


图 1 ARTP 诱变致死曲线

Fig 1 ARTP mutagenic lethal curve

2.2 潮霉素抗性菌株的筛选 首先考察了潮霉素对出发菌 AP-520 的临界致死浓度,结果如表 1。黑暗链霉菌对潮霉素较为敏感,当潮霉素单位浓度达

到 $2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,仅有少量单菌落长出。由此推断潮霉素对黑暗链霉菌的临界致死浓度为 $2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

表 1 潮霉素临界致死浓度的确定

Tab 1 Critical concentration of Hygromycin resistance

| 潮霉素/($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) | 0 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 |
|---|---|-----|---|-----|---|-----|---|
| 菌体生长情况 | + | + | + | + | + | - | - |

注: + + :生长; + :生长一般; + - :少量生长; - :不生长

2.3 多轮诱变筛选 按照 1.2.3 提到的方法,对

AP-520 进行多轮次 ARTP 诱变处理,诱变菌液涂布于含有 $1.5、2、2.5、3 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的潮霉素平板上,再经过初筛和复筛筛选高产菌株,每次诱变以上一轮的高产菌株为出发菌,并保藏本轮次高产菌株,表 2。总共经历 8 轮诱变,筛选并保藏 26 株高产菌株,为了提高实验数据的可靠性,将 26 株高产菌株重复进行产抗能力验证,结果如图 2 所示,产量最高的菌株 AP-6032 效价为 $11444 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$,较出发菌产量提高 29%。

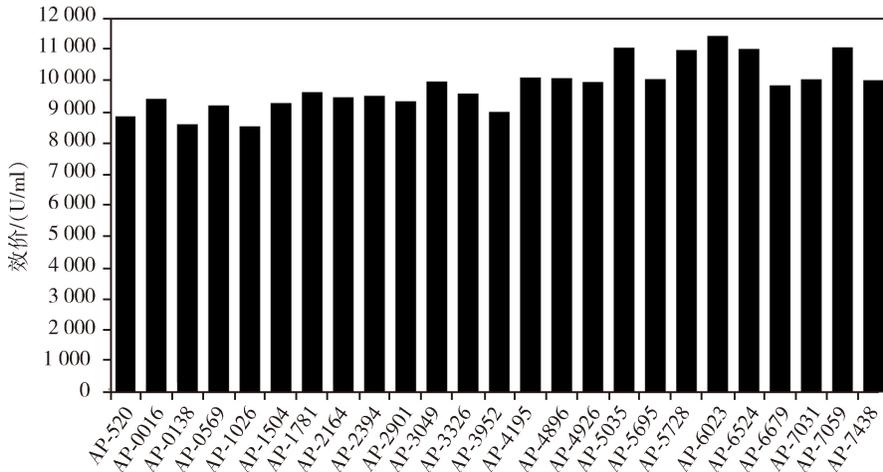


图 2 不同菌株的效价水平

Fig 2 The titer levels of different strains

表 2 诱变选育过程

Table 2 Process of four rounds of mutagenesis breeding

| 诱变轮次 | 出发菌株 | 高产菌株 |
|------|---------|-------------------------|
| 1 | AP-520 | AP-0016、AP-0138、AP-0569 |
| 2 | AP-0016 | AP-1026、AP-1504、AP-1781 |
| 3 | AP-1781 | AP-2164、AP-2394、AP-2901 |
| 4 | AP-2394 | AP-3049、AP-3326、AP-3952 |
| 5 | AP-3049 | AP-4195、AP-4896、AP-4926 |
| 6 | AP-4896 | AP-5035、AP-5695、AP-5728 |
| 7 | AP-5035 | AP-6023、AP-6524、AP-6679 |
| 8 | AP-6023 | AP-7031、AP-7059、AP-7438 |

AP-6032 具有良好的产抗能力和遗传稳定性。

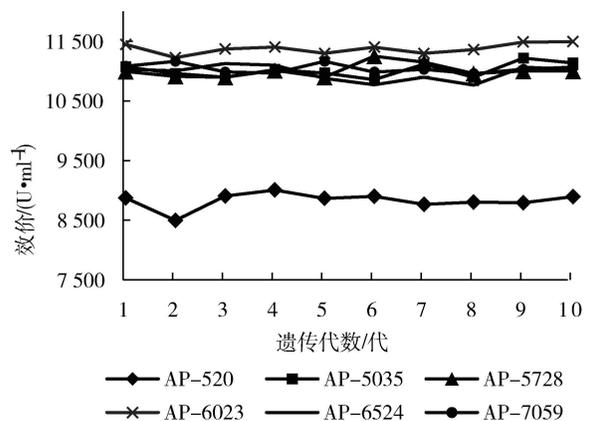


图 3 遗传稳定性试验

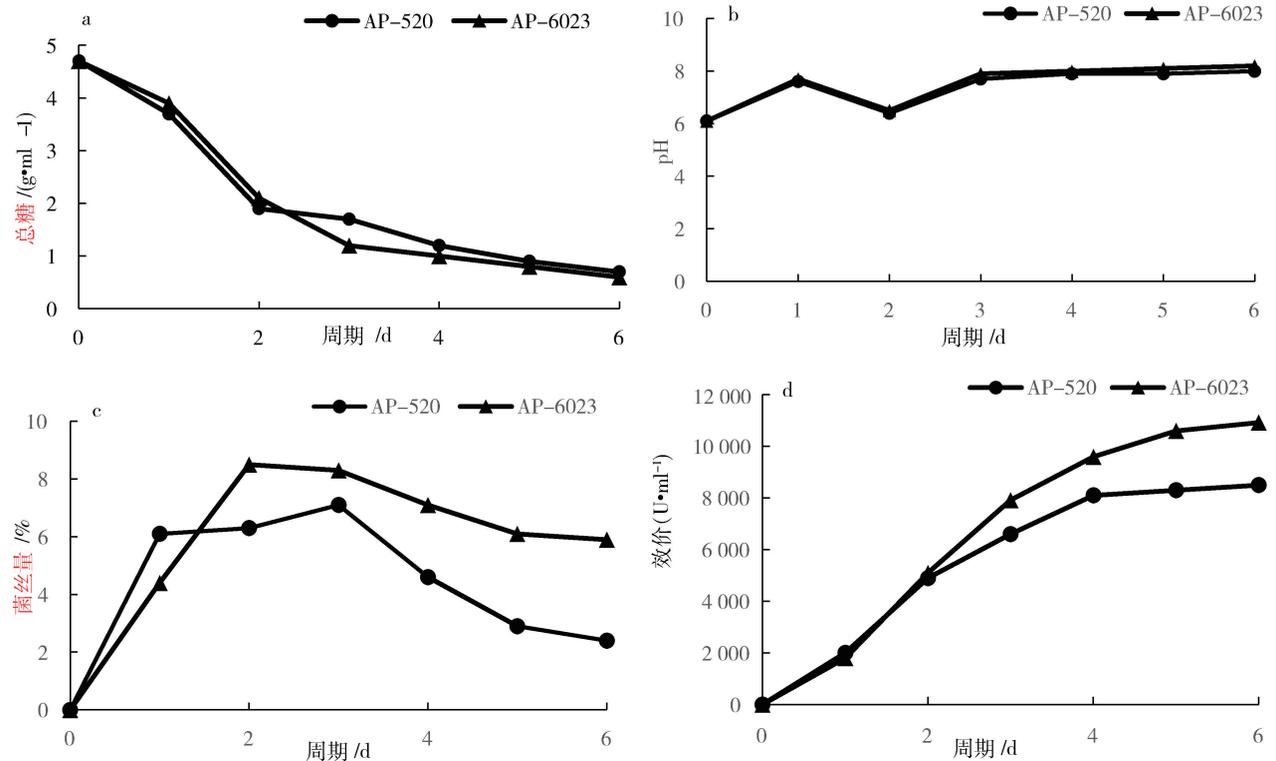
Fig 3 determination of genetic stability

2.4 突变菌株的遗传稳定性 为了检验 2.3 中选出的 5 株优秀菌株能否保持稳定的遗传特性,将它们连续传代培养 10 代,取第 10 代菌株进行摇瓶验证,检验安普霉素产量高低。如图 3 所示,菌株

2.5 放大试验 为了验证 AP-6023 在工业生产中的产抗潜力,首先在 30 L 发酵罐上进行放大试验,以 AP-520 为对照,结果如图 4 所示,发酵前期

AP-6023 总糖和菌丝量较 AP-520 稍低,但差别不大,pH 几乎没有区别。发酵培养至 2 天后,AP-6023 的 pH 和总糖消耗量较 AP-520 持续升高,菌

丝量始终高于 AP-520,效价开始发生明显差距,发酵终点时,AP-6023 效价较 AP-520 提高 23%。



a - 总糖随时间变化趋势;b - pH 随时间变化趋势;c - 菌丝量随时间变化趋势;d - 效价随时间变化趋势

图 4 黑暗链霉菌 30 L 罐发酵代谢曲线

Fig 4 The metabolism curve of *Streptomyces tenebrarius* fermentation in 30 L fermentor

3 讨论与结论

安普霉素因其良好的耐药性、低毒和高效性成为一种广泛应用的兽用抗生素和饲料添加剂,其高产菌株的获得对工业发酵水平的提高显得尤为重要。由于安普霉素生物合成机理并不明晰,所以通过基因工程手段提高其发酵水平并不容易。目前,主要通过诱变育种和工艺优化手段来提高安普霉素发酵水平。2019 年,金鑫强^[16]等人,通过配比优化和发酵过程中补加葡萄糖手段使安普霉素发酵水平达到 12200U/ml。近年来,随着诱变技术的发展,ARTP 技术作为一种新兴的高效诱变方法越来越多的被应用在菌种改良领域。本研究首次利用 ARTP 诱变选育技术结合抗性筛选技术,对安普霉素产生菌进行选育。在试验中,利用 48 孔板筛选单菌,大大增加了筛选数量。ARTP 最佳诱变时间

为 70 s,潮霉素筛选浓度为 $1.5 \sim 3 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$,总共经历 8 轮诱变处理和抗性筛选,获得 26 株具有工业生产潜力的菌株,对其中 5 株优势菌株做遗传稳定性试验,结果表明 AP-6023 号菌株产抗能力高且遗传稳定,第 10 代效价为 $11490 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$,较对照菌株 AP-520 效价提高 29%。在 30 L 发酵罐上检验突变株 AP-6023 产抗能力,AP-6023 前期较对照菌生长稍慢,后期葡萄糖利用率逐渐高于对照菌,发酵终点时葡萄糖利用率为 85%,pH 达到 8.13,对照菌葡萄糖利用率为 82%,pH 为 8.03,AP-6023 放罐效价达到 $10920 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$,较对照菌提高了 23%。综上所述,高产菌株 AP-6023 的获得降低了工业化生产成本,ARTP 诱变结合抗性筛选克服了筛选的盲目性和不确定性,另外在选育过程中建立的高通量筛选方法大大提高了筛选效率,

减少了工作量,本研究方法在菌种选育领域具有较强的实际应用价值,为选育其他种类次级代谢产物的高产菌种提供了技术指导。

参考文献:

- [1] O'Connor S, Lam L K, Jones N D, Chaney M O. Apramycin, a unique aminocyclitol antibiotic [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1976, 41 (12): 2087 - 2092.
- [2] Ishikawa M, Garcia - Mateo N, Cusak A, *et al.* Lower ototoxicity and absence of hidden hearing loss point to gentamicin C1a and apramycin as promising antibiotics for clinical use[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9 (1): 2410.
- [3] Becker K, Aranzana - Climent V, Cao S, *et al.* Efficacy of EBL - 1003 (apramycin) against *Acinetobacter baumannii* lung infections in mice [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2021, 27 (9): 1315 - 1321.
- [4] 张淑华, 李蓉川, 廖承勇. 国产妥布霉素和阿普拉霉素对绿脓杆菌体外抗菌活力的研究[J]. *抗生素*, 1986, (03): 239.
- Zhang S H, Li R C, Liao C Y. Study on antibacterial activity of Tobramycin and apramamycin against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro[J]. *Antibiotics*, 1986, (03): 239.
- [5] Matt T, Ng C L, Lang K, *et al.* Dissociation of antibacterial activity and aminoglycoside ototoxicity in the 4 - monosubstituted 2 - deoxystreptamine apramycin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109 (27): 10984 - 10989.
- [6] Meyer M, Freihofer P, Scherman M, *et al.* In vivo efficacy of apramycin in murine infection models[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58 (11): 6938 - 6941.
- [7] 姚浪群. 安普霉素对仔猪蛋白质营养、内分泌和低温应激影响的研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2000.
- Yao L Q. Effect of Apramycin on Protein Nutrition, Endocrine and Cold Stress of Piglets [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2000. [8] Paget E. Davies J. Apramycin resistance as a selective marker for gene transfer in mycobacteria [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (21): 6357 - 6360.
- [9] Ottenheim C, Nawrath M. Wu J C. Microbial mutagenesis by atmospheric and room - temperature plasma (ARTP): the latest development[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5 (1).
- [10] 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, (01): 37 - 45.
- Wu Y N, Xing X H, Zhang C, *et al.* ARTP biological breeding technology and equipment research and development and industrialization development [J]. *Biotechnology & Business*, 2017, (01): 37 - 45.
- [11] 李小坤, 王旺, 林影, 等. 常压室温等离子体 (ARTP) 诱变选育高核酸酿酒酵母 [J]. *现代食品科技*, 2018, 34 (12): 137 - 144 + 238.
- Li X K, Wang W, Lin Y, *et al.* Screening of High - yield Nucleic Acid *Saccharomyces cerevisiae* Strain by Atmospheric and Room - temperature Plasma (ARTP) Technique [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34 (12): 137 - 144 + 238.
- [12] 马霞, 李路遥, 何艳, 等. 发酵鲜湿米粉的优良菌种选育及品质研究[J]. *食品科学*, 2017, 38 (02): 98 - 103.
- Ma X, Li L Y, He Y, *et al.* Strain Screening and Quality Evaluation of Fermented Fresh Rice Noodles [J]. *Food Science*, 2017, 38 (02): 98 - 103.
- [13] 田萍萍, 曹鹏, 常传友, 等. 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 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44 (01): 150 - 160.
- Tian P P, Cao P, Chang C Y, *et al.* Atmospheric and room temperature plasma breeding and medium optimization of avermectin producing strains [J]. *Microbiology China*, 2017, 44 (01): 150 - 160.
- [14] 吴晓英. 耐乙醇巴氏醋杆菌选育及其耐受机制[D]. 天津:天津科技大学, 2015.
- Wu X Y. Screening ethanol tolerance *Acetobacter pasteurianus* and its mechanism of tolerance [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015.
- [15] 王会会, 秦丽娜, 刘雨, 等. 常压室温等离子体诱变选育他克莫司高产菌株及发酵条件优化 [J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43 (12): 1488 - 1492.
- Wang H H, Qin L N, Liu Y, *et al.* Screening of a high - yielding tacrolimus producing strain using atmospheric room temperature plasma and optimization of fermentation conditions [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2018, 43 (12): 1488 - 1492.
- [16] 金鑫强. 一种高水平发酵生产安普霉素的方法: 中国, 201811486785 .2 [P]. 2019 - 04 - 09.
- Jin X Q. A method for high level fermentation to produce amprimycin: China, 201811486785 .2 [P]. 2019 - 04 - 09.