

ARTP-DES 复合诱变结合前体耐受性 选育达托霉素高产菌株

褚帅北¹, 胡文婷¹, 惠丰立^{1,2*}

(1. 南阳师范学院 生命科学与农业工程学院, 河南 南阳 473061; 2. 南阳师范学院 农业生物质资源化河南省高校工程技术中心, 河南 南阳 473061)

摘要: 为提高玫瑰孢链霉菌 AN-126 的达托霉素产量, 对菌株 AN-126 进行常压室温等离子体-硫酸二乙酯 (ARTP-DES) 复合诱变, 并结合癸酸钠耐受性筛选, 最终获得一株达托霉素高产菌株 RR-447, 摇瓶产量为 (101.41±0.37) mg/L, 是出发菌株的 2.44 倍。对高产菌株 RR-447 进行平板传代、菌落形态及 BOX-PCR 多态性分析。结果表明, 高产菌株 RR-447 高产性能稳定遗传, 与出发菌株的菌球形态有明显差异, 且高产菌株 RR-447 基因组 DNA 在 1.50~2.00 kb 之间存在一条特异性条带。在 5 L 发酵罐中通过分阶段补加癸酸钠溶液评价了菌株 RR-447 的发酵性能, 达托霉素产量达到 512.64 mg/L。ARTP-DES 复合诱变结合癸酸钠耐受性是选育达托霉素高产菌株的一种有效育种手段, 为达托霉素工业微生物育种以及其他菌株改良提供了技术参考。

关键词: 达托霉素; 常压室温等离子体-硫酸二乙酯复合诱变; 菌株选育; 发酵; 癸酸钠; 生物工程

中图分类号: TQ927; Q815 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 09-1969-07

Selective breeding of high daptomycin-producing strain by ARTP-DES complex mutagenesis combined with precursor tolerance

CHU Shuaipei¹, HU Wenting¹, HUI Fengli^{1,2*}

(1. College of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China; 2. Research Center of Henan Provincial Agricultural Biomass Resource Engineering and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China)

Abstract: In order to increase daptomycin production of *Streptomyces roseosporus* AN-126, a high daptomycin producing strain RR-447 was obtained from the complex mutagenesis of strain AN-126 induced by atmospheric and room temperature plasma-diethyl sulfate (ARTP-DES) and sodium caprate tolerance screening. The mutant strain RR-447 with a yield of (101.41±0.37) mg/L was obtained, which was 2.44 times that of the strain AN-126. The high yield strain RR-447 obtained was then subjected to plate passage, colony morphology and BOX-PCR polymorphism analysis. The results showed that the mutant strain RR-447, with a morphology different from the original strain, showed high yield and stable heredity. And there was a specific band found between 1.50 kb and 2.00 kb in the genomic DNA of RR-447 strain. The fermentation performance of strain RR-447 was evaluated by adding sodium caprate solution in batches in a 5 L fermentation tank, and the yield of daptomycin reached 512.64 mg/L. ARTP-DES complex mutagenesis combined with sodium caprate tolerance was an effective breeding method for high-yield daptomycin strains, which provided a technical reference for industrial microbial breeding of daptomycin and other strain improvement.

Key words: daptomycin; atmospheric and room temperature plasma-diethyl sulfate complex mutagenesis; strain breeding; fermentation; sodium caprate; bioengineering

收稿日期: 2023-02-06; 定用日期: 2023-04-03; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230068

基金项目: 国家自然科学基金 (31570021)

作者简介: 褚帅北 (1998—), 男, 硕士生, E-mail: 121975810@qq.com。联系人: 惠丰立 (1965—), 男, 教授, E-mail: huifl@126.com。

达托霉素(DPT)是由玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*)产生的环脂肽类抗生素,是由1个环状肽链通过N-末端的色氨酸连接1个十碳烷侧链而成,相对分子质量为1620.67^[1]。达托霉素易溶于水和小分子有机溶剂,在碱性溶液和pH>3.5的酸性溶液中可以大量溶解。当pH<2或>9时,达托霉素容易发生不可逆的变性^[2-3]。达托霉素对革兰氏阳性菌具有广谱抗性,能够杀死临床上分离得到的绝大多数革兰氏阳性菌,包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐万古霉素肠球菌和耐青霉素的肺炎链球菌等^[4-5]。独特的抗菌机制使达托霉素与其他抗生素很难产生交叉耐药性问题^[6-8]。因此,达托霉素在耐药菌感染治疗方面有很好的临床应用前景。

目前,诱变是选育达托霉素高产菌株的主要手段。常用的物理诱变剂有常压室温等离子体(ARTP)、紫外线(UV)和激光等。例如:卢文玉等^[9]采用激光诱变结合链霉素抗性筛选,选育出突变菌株LC-54,其达托霉素产量是出发菌株的1.39倍;高芳霞等^[10]先后采用ARTP诱变和UV诱变,选育获得了一株达托霉素高产菌株Q12-63,该高产菌株的达托霉素发酵产量比出发菌株提高了37%。常用的化学诱变剂有亚硝基胍(NTG)、硫酸二乙酯(DES)和硫酸二甲酯(DMS)等。如吴远杰等^[11]通过NTG和DMS化学诱变,使突变菌株的达托霉素产量比出发菌株提高了108.4%。但传统的单一物理诱变或单一化学诱变有突变概率低、突变位点少等缺点。利用物理诱变剂与化学诱变剂对菌株进行复合诱变,能够同时引起DNA上多个不同的基因位点发生突变,协同效应更好,可以得到多种突变类型的菌株^[12]。席志文等^[13]通过对小白链霉菌进行ARTP-DES复合诱变,最终获得了一株 ϵ -PL高产菌株,产量为出发菌株的2.1倍。徐加兵等^[14]采用DMS-UV复合诱变使地衣芽孢杆菌的杆菌肽产量较出发菌株提高了81.4%。张昊月^[15]采用UV-NTG复合诱变选育出一株达托霉素高产菌株GS-2-30,该高产菌株的达托霉素产量较出发菌株提高了1.59倍。然而,复合诱变仍存在基因突变随机性强、筛选效率低的问题。癸酸作为达托霉素的前体物质,对达托霉素的产生极为重要^[16],将癸酸作为菌株筛选压力加入到选育过程中将在很大程度上提高筛选效率。卢文玉等^[17]以癸酸为筛选压力,最终获得了一株对癸酸具有良好耐受性的达托霉素高产菌株,其达托霉素产量比出发菌株提高了37.2%。郭朝江等^[18]采用癸酸缓释颗粒作为达托霉素发酵的前体物质,优化癸酸缓释颗粒补加工艺可使达托霉素发酵效价达到121.8 mg/L。癸酸对玫瑰孢链霉菌毒性较大,微量癸酸就能抑制该菌的生长^[19],而癸酸盐相对于癸酸毒性较低,因此

可将癸酸盐作为筛选压力来筛选达托霉素高产菌株。周剑等^[20]以癸酸铵和甘氨酸为筛选压力筛选到了一株达托霉素高产菌株,通过流加补料癸酸铵溶液使高产菌株在100 L发酵罐中的发酵效价达到了2276 mg/L。癸酸铵获取难度大、价格较高,而癸酸钠作为一种常见的癸酸盐,具有毒性低、价格便宜、性质稳定等优点,更适合作为达托霉素的发酵前体物质。

本研究拟通过对达托霉素产生菌AN-126进行ARTP-DES复合诱变,并结合癸酸钠耐受性选育达托霉素高产突变菌株,最后利用5 L发酵罐模拟工业化生产,从而检验高产突变菌株的发酵潜力。本研究旨在为达托霉素工业微生物育种以及其他菌株改良提供技术参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

葡萄糖(分析纯)、六水合硫酸亚铁铵(分析纯)、碳酸钙(分析纯)、草酸(分析纯)、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯),天津市科密欧化学试剂有限公司;六水合氯化镍(分析纯)、二水合钼酸钠(分析纯),天津永晟精细化工有限公司;麦芽粉、酵母粉、蛋白胨,分析纯,英国OXOID公司;麦芽糊精、琼脂粉、糖蜜、黄豆饼粉、硫酸链霉素,分析纯,北京索莱宝科技有限公司;硫辛酸(分析纯)、维生素B₁₂(分析纯)、三氟乙酸(色谱纯),上海麦克林生化科技股份有限公司;达托霉素标准品,色谱纯,上海源叶生物科技有限公司;双蒸水(ddH₂O)、2X San Taq PCR Mix 酶、细菌DNA抽提试剂盒、BOX-PCR引物5'-CTACGGCAAGGCGACGCTG ACG-3',上海生工生物工程有限公司。无特殊说明,实验用水均为无菌水,即经过高压灭菌锅进行高压灭菌后的蒸馏水。

ZWYR-D2403型恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;KQ-250DE医用数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;DW-86L338J海尔医用低温保存箱,青岛海尔生物医疗股份有限公司;MJ-54A高压灭菌锅,施都凯仪器设备(上海)有限公司;ARTP诱变育种系统,无锡源清天木生物科技有限公司;LC-20A高效液相色谱仪,岛津仪器(苏州)有限公司。

1.2 方法

所用玫瑰孢链霉菌(*S. roseosporus*, AN-126),实验室保藏。所用碳源氮源基础(DT)固体培养基(均为质量浓度):葡萄糖4.0 g/L、麦芽粉10.0 g/L、酵母粉4.0 g/L、碳酸钙2.0 g/L、琼脂粉20.0 g/L,

pH 7.0。所用胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 液体培养基 (均为质量浓度): TSB 30.0 g/L, pH 自然。所用种子培养基 (均为质量浓度): 葡萄糖 5.0 g/L、麦芽糊精 15.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、酵母粉 10.0 g/L, pH 7.0。所用发酵培养基 (均为质量浓度): 葡萄糖 10.0 g/L、麦芽糊精 80.0 g/L、糖蜜 5.0 g/L、黄豆饼粉 30.0 g/L、麸质粉 5.0 g/L、碳酸钙 2.0 g/L、六水合氯化镍 0.2 g/L、二水合钼酸钠 0.1 g/L、六水合硫酸亚铁铵 0.66 g/L、草酸 4.0 g/L、硫辛酸 0.005 g/L、维生素 B₁₂ 0.002 g/L, pH 7.5。

1.2.1 单孢子悬液的制备

将甘油管保藏的原始菌株 AN-126 的单孢子悬液 ($1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ CFU/mL) 从 -80 °C 超低温保存箱中取出, 解冻后用无菌水稀释 100 倍后取 200 μ L 涂布于 DT 平板中, 30 °C 培养 8~10 d。挑取单菌落划线扩大培养 8~10 d, 待孢子成熟后, 用无菌水将孢子冲洗至 10 mL 离心管中, 涡旋振荡 10 min 后用 4 层滤纸过滤, 最终制成的单孢子悬液浓度约为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ CFU/mL。

1.2.2 癸酸钠最小抑制浓度 (MIC) 的测定

配制含有不同癸酸钠质量浓度梯度 (0、2、4、6、8、10 g/L) 的 DT 固体培养基。取 200 μ L 单孢子悬液涂布于含有不同癸酸钠质量浓度的 DT 平板中, 30 °C 培养 8~10 d, 确定癸酸钠的 MIC。

1.2.3 ARTP 诱变致死率曲线的测定

取 10 μ L 单孢子悬液于直径 1 cm 的圆形铁片上, 以氦气为工作气体, 功率设定 110 W, 工作气流 10 L/min, 照射距离 2 mm, 设置照射时间 15、30、45、60、75、90、105、120 s, 以时间为诱变梯度进行诱变, 诱变后涂布平板。培养皿 30 °C 倒置培养 6~8 d, 以未经 ARTP 处理的单孢子悬液涂布的平板作为对照, 制作致死率曲线。致死率按式 (1) 计算:

$$R/\% = \frac{A-D}{A} \times 100 \quad (1)$$

式中: R 为致死率, %; A 为未经诱变的平板中长出的菌落数, 个; D 为诱变后的平板中长出的菌落数, 个。

1.2.4 DES 诱变致死率曲线的测定

取菌株 AN-126 经 ARTP 诱变后得到的 2 mL 孢子悬液加入到 18 mL 磷酸缓冲液 (pH 为 7) 中, 然后分别再加入 40、80、120、160、200 μ L DES 原液, 使 20 mL 反应体系中 DES 的体积分数分别为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%, 30 °C 反应 20 min, 反应结束后加质量分数为 25% 的硫代硫酸钠水溶液 1 mL 终止反应, 以未加 DES 诱变的孢子悬液涂布的平板作为对照, 制作致死率曲线。

1.2.5 ARTP-DES 复合诱变选育高产菌株

选取 ARTP 诱变致死率在 70%~80% 的照射时间为 ARTP 诱变条件, 以 1.2.3 节方法对出发菌株的单孢子悬液进行 ARTP 诱变处理, 得到经 ARTP 诱变后的孢子悬液。用 pH 为 7 的磷酸缓冲液将 ARTP 诱变后的孢子悬液稀释至 20 mL, 再加入合适浓度的 DES, 30 °C 反应 20 min, 反应结束后加入质量分数为 25% 的硫代硫酸钠水溶液 1 mL 终止反应, 得到 ARTP-DES 诱变孢子悬液。将 ARTP-DES 诱变孢子悬液用无菌水稀释 100 倍后涂布于 DT 平板中, 长出的单菌落扩大培养后进行摇瓶培养发酵, 采用高效液相色谱法测定达托霉素产量。

1.2.6 ARTP-DES 结合癸酸钠耐受性选育高产菌株

将 1.2.5 节中得到的 ARTP-DES 诱变菌悬液稀释后涂布于 1 MIC 癸酸钠的 DT 平板上, 将长出的单菌落扩大培养后进行摇瓶培养发酵, 采用高效液相色谱法测定达托霉素产量。

1.2.7 摇瓶培养发酵

用一次性接种环将在 24 孔板中生长待测的菌株刮取一满环, 接入装有 20 mL 种子培养基的 100 mL 锥形瓶中, 30 °C、250 r/min 培养 2 d, 然后按照 10% 的接种量用移液器吸取 2 mL 种子液移至装有 18 mL 发酵培养基的 100 mL 锥形瓶中 30 °C、250 r/min 培养 6 d。

1.2.8 发酵液中产物的分析

发酵液处理办法: 取发酵液 10 mL 于 15 mL 离心管中, 12000 r/min 下离心 10 min; 取 1 mL 上清液至新的 15 mL 离心管中, 加入 4 mL 无水乙醇, 超声波清洗器混匀振荡 10 min, 再在 12000 r/min 下离心 10 min; 用一次性无菌注射器 (1 mL) 吸取 1 mL 上清液, 经 0.22 μ m 有机系滤膜过滤至 HPLC 取样瓶中待测。

HPLC 操作条件: 分析柱为 InertSustain C18 (4.6 mm \times 250 mm \times 5.0 μ m); 流速 1.0 mL/min; 采用 220 nm 可见光紫外检测器; 柱温 40 °C; 进样量 10 μ L; 将 450 mL 乙腈和 550 mL 体积分数为 0.1% 的三氟乙酸水溶液进行混合制成流动相; 等度洗脱, 采集信号 20 min。

采用 HPLC “标准品+样品”法定性分析发酵液中达托霉素。用甲醇溶解达托霉素标准品, 得到达托霉素标品; 按上述发酵液处理方法得到发酵液样品; 将标品与样品以体积比 2:8 混合得到“标准品+样品”。按上述 HPLC 操作条件分别处理标品、样品、标准品+样品, 分析达托霉素出峰时间, 对发酵液中的物质进行定性分析。

1.2.9 达托霉素产量的测定

用甲醇溶解达托霉素标准品, 分别配制质量浓

度为 20、40、80、140、240、360 mg/L 的达托霉素标品,按照 1.2.8 节 HPLC 操作条件进行标品峰面积测定,得到峰面积(y)与达托霉素质量浓度(x , mg/L)的标准曲线方程为: $y=12022x+1.2083$, $R^2=0.998$ 。根据达托霉素的峰面积,代入标准曲线公式,计算出达托霉素在发酵液中的产量。

1.2.10 高产菌株遗传稳定性测试

将复筛得到的高产菌株进行平板传代,传 5 代,每代均用 1.2.7、1.2.8 节方法进行达托霉素产量测定。

1.2.11 高产菌株的形态学特征测试

将 AN-126 和高产突变菌株的单孢子悬液稀释涂布于 DT 平板中,观察菌落形态、孢子颜色、产孢量以及孢子生长速率。

1.2.12 高产菌株的 BOX-PCR 多态性测试

将原始菌株 AN-126 与高产突变菌株分别接入装有 20 mL TSB 培养基的 100 mL 锥形瓶中,30 °C、250 r/min 培养 2 d。12000 r/min 条件下离心 2 min 离弃上清液,将菌体倒入研钵后加入液氮研磨,之后用细菌 DNA 抽提试剂盒提取菌株的 DNA,所得 DNA 于 -20 °C 保存或直接进行下一步实验。

PCR 反应体系: DNA 模板 1 μ L、2X San Taq PCR Mix 酶 12.5 μ L、引物 2 μ L、ddH₂O 补足至 25 μ L。

PCR 扩增体系: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

1.2.13 高产菌株 5 L 发酵罐发酵过程

以 10% 的接种量将种子液接种到 5 L 搅拌式发酵罐,罐中总装液量为 3.5 L,控制发酵温度为 30 °C,通气量为 0.8 m³/h, pH 控制在 7.0。通过转速来调控溶氧量,发酵开始时溶氧量(DO)设置为 100%,发酵过程中 DO 控制在 35% 左右。发酵开始 30 h 后,开始每隔 6 h 往发酵罐中补加 25 mL 质量浓度为 40 g/L 的癸酸钠水溶液,培养 72 h 后,每隔 12 h 往发酵罐中补加 25 mL 质量浓度为 40 g/L 的癸酸钠溶液直至发酵结束。发酵过程中每隔 6 h 取样测定菌体干重、氨氮含量、总糖含量以及达托霉素产量。

1.2.14 分析方法

菌体干重测定: 将滤纸在 85 °C 烘箱中烘干至恒重,称重后备用。取 10 mL 发酵液,12000 r/min 离心 10 min,去离子水洗涤两次后置于滤纸上过滤,然后在烘箱中 85 °C 烘干至恒重,按照式(2)计算单位体积发酵液中菌体干重:

$$M = \frac{m}{V} \quad (2)$$

式中: M 为单位体积发酵液中菌体干重, g/L; m 为所取的发酵液离心烘干后菌体的质量, g; V 为所取发酵

液的体积, L。

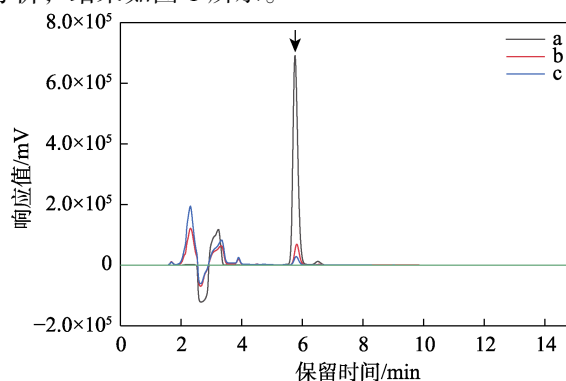
总糖测定: 蒽酮比色法^[21]。

氨氮测定: 靛酚蓝反应法^[22]。

2 结果与讨论

2.1 发酵液中产物分析

发酵培养基成分复杂,加上玫瑰孢链霉菌在发酵过程中会产生除达托霉素以外的其他产物,因此有必要对发酵液中的达托霉素进行定性分析。按照“标准品+样品”法对发酵液中的达托霉素进行定性分析,结果如图 1 所示。



a—达托霉素标品; b—标准品+样品; c—发酵液样品

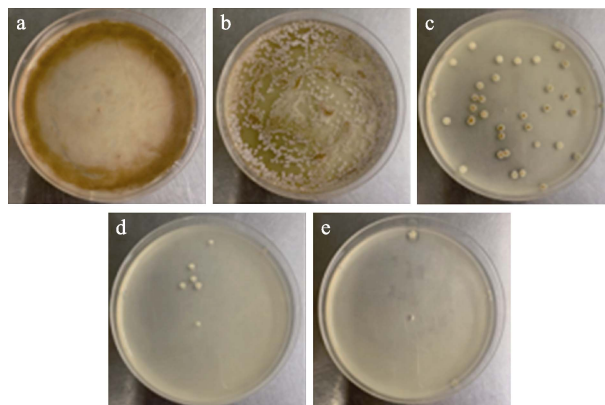
图 1 发酵产物的 HPLC 谱图分析

Fig. 1 HPLC analysis of fermentation products

由图 1 可知,达托霉素标品、发酵液样品以及标准品+样品均在保留时间为 5.8 min 左右出现响应值,表明发酵液中存在达托霉素。

2.2 癸酸钠 MIC 的确定

为考察癸酸钠质量对出发菌株的影响,将出发菌株 AN-126 的单孢子悬液涂布在含有不同质量浓度的癸酸钠的 DT 平板上,30 °C 培养 8 d,结果见图 2。



a—0 g/L; b—2 g/L; c—4 g/L; d—6 g/L; e—8 g/L

图 2 出发菌株在含有不同质量浓度癸酸钠的 DT 平板中生长情况

Fig. 2 Growth of strain AN-126 on DT plate with different mass concentrations of sodium decanoate

由图 2 可以看出, 出发菌株在癸酸钠质量浓度为 2 g/L 的平板中生长较好, 随着癸酸钠质量浓度的增加, 平板上生长菌落数逐渐减少, 当癸酸钠质量浓度为 6 g/L 时, 平板上基本无菌株生长。因此, 选择质量浓度为 6 g/L 的癸酸钠为出发菌株的筛选压力。

2.3 ARTP 诱变致死率曲线

图 3 为出发菌株的 ARTP 诱变致死率曲线。

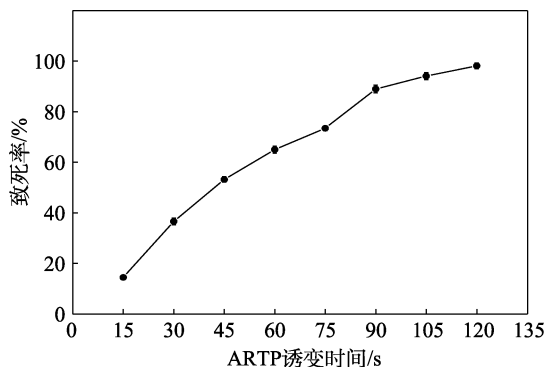


图 3 出发菌株的 ARTP 诱变致死率曲线

Fig. 3 Lethal rate curve of strain AN-126 treated by ARTP

由图 3 可知, 随着 ARTP 诱变时间的延长, 出发菌株的致死率逐渐增大, 当诱变的时间为 120 s 时, 致死率为 98.3%, 接近于 100%。根据育种经验, 一般采用致死率 70%~80% 作为最佳的诱变时间^[23]。当 ARTP 诱变的诱变时间为 75 s 时, 玫瑰孢链霉菌的致死率为 73.6%。因此选择 75 s 作为 ARTP 的最佳诱变时间。

2.4 DES 诱变致死率曲线

出发菌株的 DES 诱变致死率曲线如图 4 所示。

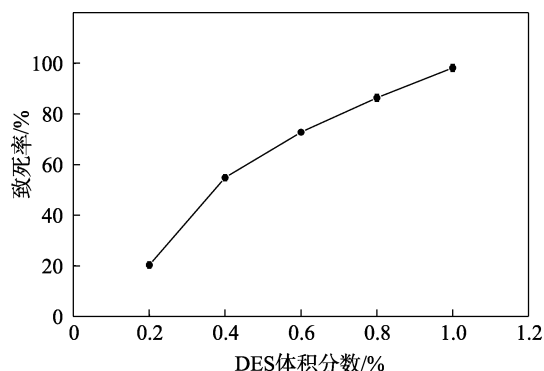


图 4 出发菌株的 DES 诱变致死率曲线

Fig. 4 Lethal rate curve of strain AN-126 treated by DES

由图 4 可知, 随着 DES 体积分数的增加, 出发菌株的致死率逐渐增大。当 DES 体积分数为 1.0% 时, 致死率达到 98.2%, 接近 100%。当 DES 体积分数为 0.6% 时, 致死率为 72.8%。因此, 选择体积

分数为 0.6% 的 DES 作为最佳诱变剂量。

2.5 ARTP-DES 复合诱变选育高产菌株

ARTP 诱变时间设为 75 s, DES 诱变剂量设为体积分数 0.6%, 经 ARTP-DES 复合诱变后, 将诱变得到的 240 株突变菌株进行摇瓶发酵, 通过高效液相色谱法测定其达托霉素产量, 结果如图 5 所示。

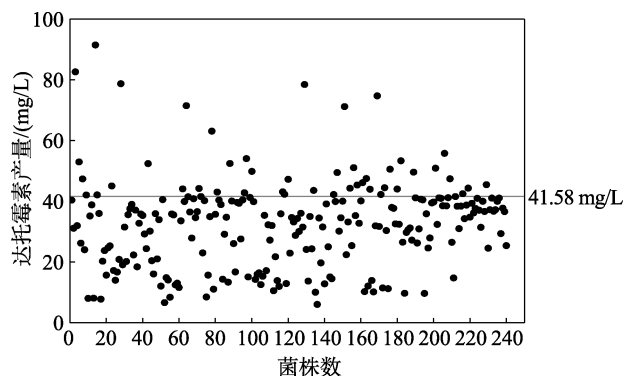


图 5 复合诱变初筛结果

Fig. 5 Preliminary screening results of compound mutagenesis mutants

由图 5 可知, 以出发菌株 AN-126 的达托霉素产量 41.58 mg/L 为指标, 经 ARTP-DES 复合诱变后, 共获得了 41 株正突变菌株, 正突变率为 17.1%, 其中菌株 AD-117 达托霉素产量最高, 为 91.52 mg/L。经摇瓶复筛, 41 株正突变菌株的达托霉素产量均有所下降, 没有产量在 90 mg/L 以上的突变菌株。

2.6 ARTP-DES 复合诱变结合癸酸钠耐受性选育高产菌株

ARTP 诱变时间设为 75 s, DES 诱变剂量设为体积分数 0.6%, 经过 ARTP-DES 复合诱变, 癸酸钠 DT 平板筛选, 共获得 213 株生长良好的突变菌株。对 213 株突变菌株进行摇瓶初筛, 结果如图 6 所示。

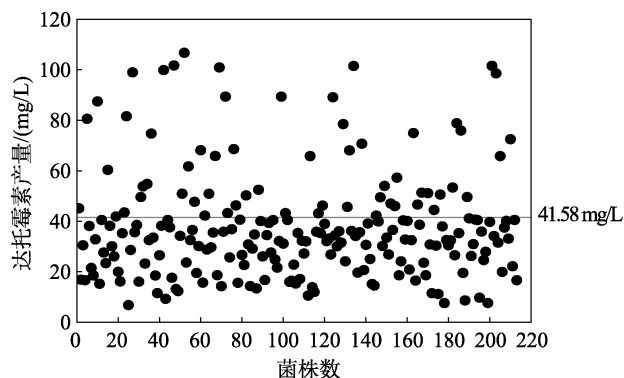


图 6 复合诱变结合癸酸钠耐受性初筛结果

Fig. 6 Preliminary screening results of compound mutagenesis combined with sodium decanoate tolerance

由图 6 可知, 以原始菌株 AN-126 的达托霉素产量 41.58 mg/L 为指标, 共获得了 58 株正突变菌

株，正突变率为 27.2%，比不经过癸酸钠压力筛选条件下约高出 10%，其中有 15 株突变菌株的达托霉素产量 >90 mg/L。

对 58 株正突变菌株进行复筛，每株菌设置 3 组平行实验，结果见图 7。由图 7 可知，最终得到 6 株产量 >90 mg/L 的高产突变菌株 RR-449、RR-408、RR-392、RR-436、RR-447 和 RR-451，摇瓶产量分别为 (92.88±0.51)、(94.47±1.31)、(98.10±0.57)、(99.72±0.20)、(101.41±0.37) 和 (104.37±0.91) mg/L。

2.7 高产菌株遗传稳定性分析

对复筛得到的 6 株产量较高的癸酸钠耐受突变菌株进行遗传稳定性实验，结果如表 1 所示。

由表 1 可知，菌株 RR-408、RR-436、RR-451 传至第五代时产量比第一代分别约降低了 23.2%、23.3%、17.1%，高产性能不稳定。菌株 RR-449、RR-392、

RR-447 高产性能相对稳定，其中，菌株 RR-447 达托霉素产量最高，摇瓶产量为 (101.41±0.37) mg/L，是出发菌株的 2.44 倍。

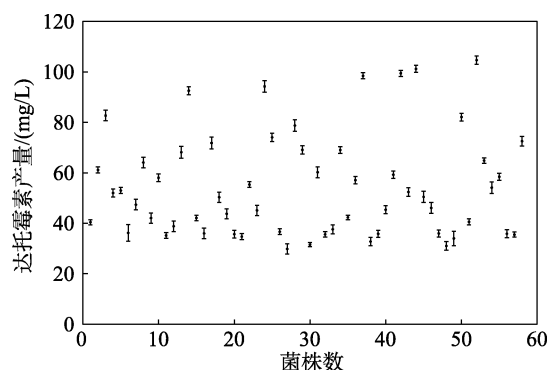


图 7 复合诱变结合癸酸钠耐受性复筛结果
Fig. 7 Re-screening results of compound mutagenesis combined with sodium decanoate tolerance

表 1 达托霉素高产菌株遗传稳定性

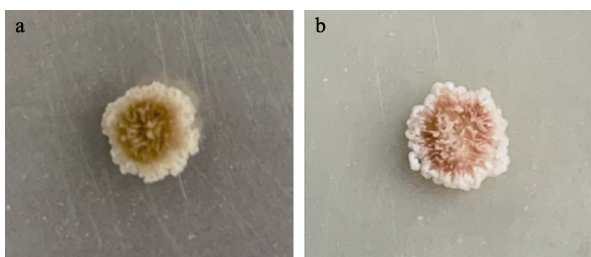
Table 1 Genetic stability test of high yield strains of daptomycin

菌株	第一代产量/(mg/L)	第二代产量/(mg/L)	第三代产量/(mg/L)	第四代产量/(mg/L)	第五代产量/(mg/L)
RR-449	92.88±0.51	90.31±1.07	91.64±1.62	91.73±0.73	90.96±1.10
RR-408	94.47±1.31	90.11±0.22	80.19±0.82	82.38±0.39	72.57±1.25
RR-392	98.10±0.57	99.07±0.34	98.19±1.27	97.54±1.20	96.43±0.66
RR-436	99.72±0.20	89.44±0.39	86.29±0.94	80.57±0.53	76.49±1.12
RR-447	101.41±0.37	100.62±1.12	102.72±0.46	101.85±0.51	101.37±0.28
RR-451	104.37±0.91	103.86±1.31	102.76±0.53	95.49±0.80	86.52±0.92

2.8 高产菌株的形态学特征

2.8.1 菌落形态

原始菌株 AN-126 与高产菌株 RR-447 的菌落形态如图 8 所示。



a—AN-126; b—RR-447

图 8 AN-126 与 RR-447 的菌落形态

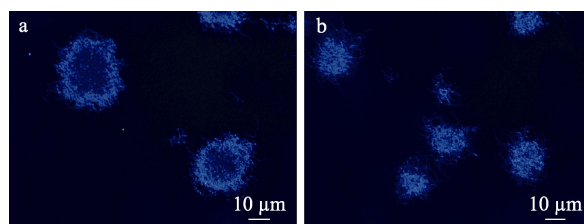
Fig. 8 Colony morphology of strains AN-126 and RR-447

由图 8 可知，菌株 AN-126 产生浅绿色色素，而高产菌株 RR-447 产生的色素呈粉红色，说明经过复合诱变后，菌株的菌落形态发生明显变化。

2.8.2 菌丝球形态

原始菌株 AN-126 与高产菌株 RR-447 的菌丝球形态如图 9 所示。由图 9 可知，在显微镜下观察菌株的菌丝球形态发现，菌株 AN-126 的菌丝球菌丝

缠绕较为紧密，而 RR-447 的菌丝球菌丝较为松散。松散的菌丝球可以增加细胞间氧气传递效率，致使其代谢旺盛，从而提高达托霉素的产量。



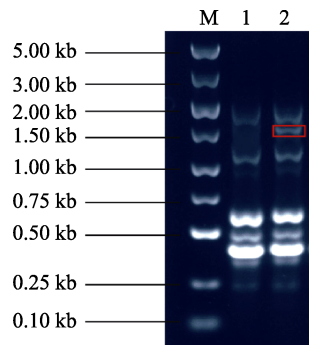
a—AN-126; b—RR-447

图 9 AN-126 和 RR-447 的菌丝球形态

Fig. 9 Mycelial morphology of strains AN-126 and RR-447

2.9 高产菌株的遗传学特征

BOX-PCR 指纹谱图分析技术是检测微生物多态性的一种方法，可以反映菌株之间的基因组 DNA 水平上的差异^[24]。采用 BOX-PCR 对出发菌株 AN-126 和高产菌株 RR-447 进行多态性分析，结果如图 10 所示。由图 10 可见，BOX 引物扩增出的条带均在 0.25~2.00 kb 之间，但高产菌株 RR-447 在 1.50~ 2.00 kb 之间存在一条特异性条带，说明经过复合诱变后，菌株在基因水平发生突变。



M—DL5000 DNA marker; 1—Strain AN-126; 2—Strain RR-447

图 10 菌株 AN-126 和 RR-447 的 BOX-PCR 谱图

Fig. 10 BOX-PCR profiles of strains AN-126 and RR-447

2.10 高产菌株 RR-447 分批发酵

为进一步考察高产菌株 RR-447 的工业发酵性能, 按照 1.2.13 节实验条件, 在 5 L 发酵罐中进行分批发酵, 发酵结果如图 11 所示。

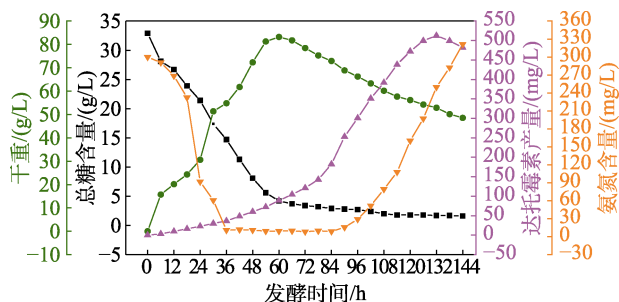


图 11 菌株 RR-447 在 5 L 发酵罐中的发酵过程

Fig. 11 Fermentation process of strain RR-447 in 5 L fermenter

由图 11 可知, 在发酵前 30 h, 罐内未补加癸酸钠溶液, 碳源、氮源消耗迅速, 菌体生长旺盛。在发酵 30~72 h 内, 每隔 6 h 补加 25 mL 癸酸钠溶液, 在癸酸钠的作用下, 菌体生长受到抑制, 生长速率逐渐变缓。发酵 60 h, 生物量(干重)达到最大值, 罐内营养物质消耗殆尽, 菌体开始进行次生代谢, 达托霉素产生速率逐渐增高。发酵 72 h 后, 为减小癸酸钠对罐内菌体的毒性, 改为每隔 12 h 补加 25 mL 癸酸钠溶液, 既保证了罐内有足够的达托霉素前体物质, 又减小了癸酸钠对菌体生长的影响。发酵 114 h 后, 罐内菌体开始自溶, 氨氮含量逐渐增高, 达托霉素产生速率降低, 发酵进入最后阶段。发酵 132 h, 达托霉素产量达到最大值, 为 512.64 mg/L。

3 结论

(1) 通过 ARTP-DES 复合诱变结合癸酸钠耐受性筛选, 选育出一株遗传稳定的达托霉素高产菌株 RR-447, 摇瓶产量为 (101.41 ± 0.37) mg/L, 是出发菌株的 2.44 倍。在 5 L 发酵罐中流加前体物质癸酸钠,

达托霉素最高产量达到 512.64 mg/L;

(2) ARTP-DES 复合诱变后, 经过癸酸钠耐受性筛选得到突变菌株, 其正突变率较未经癸酸钠耐受性筛选得到的突变菌株高约 10%, 且未经过癸酸钠压力筛选得到的突变菌株产量 < 90 mg/L, 而经过癸酸钠耐受性筛选得到的突变菌株中有 6 株的达托霉素产量 > 90 mg/L, 说明复合诱变结合癸酸钠压力筛选是选育达托霉素高产菌株的一种有效育种手段;

(3) 在 5 L 发酵罐中分阶段补加癸酸钠溶液, 既能保证菌体前期的正常生长, 又能保证在达托霉素合成阶段有充足的前体物质, 同时还减小了发酵后期菌株受癸酸钠毒性的影响, 是一种有效的前体物补加方法;

(4) ARTP-DES 复合诱变结合癸酸钠耐受性筛选虽然可以有效选育达托霉素高产菌株, 但诱变过程中仍然存在突变随机性问题。后期可通过比较转录组学技术来对比高产菌株与原始菌株在基因表达量上的差异, 寻找与高产达托霉素有关的关键性基因, 从而为未来通过基因工程手段定向改造菌株奠定基础。

参考文献:

- [1] OSORIO C, GARZON L, JAIMES D, *et al.* Impact on antibiotic resistance, therapeutic success, and control of side effects in therapeutic drug monitoring (TDM) of daptomycin: A scoping review[J]. *Antibiotics*, 2021, 10(3): 263.
- [2] LIAO G J, SHI T Y, XIE J P. Regulation mechanisms underlying the biosynthesis of daptomycin and related lipopeptides[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, 113(3): 735-741.
- [3] TÓTOLI E G, GARG S, SALGADO H R N. Daptomycin: Physicochemical, analytical, and pharmacological properties[J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2015, 37(6): 699-710.
- [4] MATSUO T, MORI N, SAKURAI A, *et al.* Effectiveness of daptomycin against infective endocarditis caused by highly penicillin-resistant viridans group streptococci[J]. *IDCases*, 2021, 24: e01113.
- [5] JUNG D, ROZEK A, OKON M, *et al.* Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin[J]. *Chemistry & Biology*, 2004, 11(7): 949-957.
- [6] LIU W T, CHEN E Z, YANG L, *et al.* Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 156: 104915.
- [7] NG I S, YE C M, ZHANG Z X, *et al.* Daptomycin antibiotic production processes in fed-batch fermentation by *Streptomyces roseosporus* NRRL11379 with precursor effect and medium optimization[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37(3): 415-423.
- [8] ZUTTON F, COLOM A, MATILE S, *et al.* High-speed atomic force microscopy highlights new molecular mechanism of daptomycin action[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 6312.
- [9] LU W Y (卢文玉), WEN J P (闻建平), FAN J H (范晶华), *et al.* Screening of high daptomycin-producing strain by He-Ne laser irradiation and streptomycin resistance method[J]. *Microbiology China (微生物学通报)*, 2006, (3): 114-117.
- [10] GAO F X (高芳霞), YU Y Q (俞岩青), WANG K R (王昆蓉), *et al.* Breeding of high daptomycin-producing strain by ARTP and UV mutagenesis[J]. *Chinese Journal of Antibiotics (中国抗生素杂志)*, 2016, 41(6): 425-428.

(下转第 2002 页)