文章编号：1001-8689(2018)11-1384-05

恩拉霉素高产菌株选育的研究

丁亚莲　李春玲　牛春　张萍 *
(宁夏泰瑞制药股份有限公司，银川 750101)

摘要：目的　进一步提高恩拉霉素发酵生产水平。**方法**　对杀真菌链霉菌 RN16-7 进行 ARTP(常压室温等离子体) 等离子与庆大霉素复合处理。**结果**　经大量筛选，得到了恩拉霉素高产突变株 RN16-242，其遗传性状稳定，发酵效价达 7423u/mL，比出发菌株 RN16-7(4703u/mL) 提高了 57.8%。菌株保存，采用甘油管低温保藏法、沙土管保藏法和冷冻真空干燥保藏法进行了比较，结果是甘油管低温保藏法最好。

关键词：恩拉霉素；杀真菌链霉菌；菌种选育；抗生素
中图分类号：R978.1　　**文献标志码**：A

Breeding of high yield strain of enramycin

Ding Ya-lian, Li Chun-ling, Niu Chun and Zhang Ping
(Ningxiatairui Phamaceutical Co Ltd Strains Institute, Yinchuan 750100)

Abstract　**Objective**　In order to improve the productive ferment level of the enramycin. **Methods**　In this research, the original strain RN16-7 of *Streptomyces fungicidicus* was mutated by the combination of ARTP and gentamicin. **Results**　The mutant RN16-242 was obtained with a high enramycin yield at 7423u/mL, which was up to 57.8% from the original RN16-7 (4703u/mL) and also of good stability. This article used methods of microbiological preservation: Glycerol cryopreservation, carrier preservation and freeze-drying/vacuum-drying. The results showed that the glycerol cryopreservation was best way.

Key words　Enramycin; *Streptomyces fungicidicus*; Strain screening; Antibiotic

恩拉霉素 (enramycin)，又名恩来霉素、安来霉素、持久霉素，是由杀真菌素链霉菌 (*Streptomyces fungicidicus* NO. B5477) 经发酵获得的次级代谢产物。1966 年，日本武田药品工业株式会社的研究人员，从日本兵库县西宫市的土壤中分离得到。其代谢产物为多肽类抗生素，由 13 种氨基酸的 17 个单体组成，其结构特征是包括巨大内酯环与脂肪酸侧链，通过酰胺键连接而成，属脂肽类化学物质。根据末端脂肪酸种类的不同，主要成分为恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B，还有少量的 C 和 D 组分 [1-5]。恩拉霉素杀菌作用强，可以促进动物生长，改善饲料利用率，还因其毒性低、药物残留少，长期使用不易产生耐药性等特点，而被许多国家当作抗生素促生长剂使用，是一种较好的饲料添加剂 [6-7]。

ARTP 通过射频辉光放电产生各种高能活性离子能使细胞壁和细胞膜的通透性发生改变，损伤到细胞内的 DNA，引起菌株突变 [8-9]。田萍萍等 [10] 用等离子体结合抗性试剂将阿维菌素产生菌的发酵水平提高了 23.4%。选育高产菌株，对药物研发及其产业化具有重要意义 [11]，恩拉霉素产生菌作为产业化菌种，不断提高其生产能力，具有现实性意义。

本文采用等离子诱变，结合抗性压力筛选，得

收稿日期：2017-11-28

作者简介：丁亚莲，女，生于 1985 年，学士，从事微生物菌种培养、选育研究，E-mail: dingya.lian@163.com
* 通讯作者，E-mail: 18995018336@163.com

到了恩拉霉素高产菌。同时探索了较合适的菌株保藏法，取得了显著效果，为进一步开展恩拉霉素高产菌株选育提供一定的理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株

杀真菌链霉菌 (*Streptomyces fungicidicus*)RN16-7，由宁夏泰瑞制药股份有限公司菌种室提供。

1.1.2　试剂

链霉素、庆大霉素和利福平，购于 Sigma-Aldrich(上海) 贸易有限公司，分析纯。

1.1.3　培养基及培养条件

种子培养基：玉米粉、玉米浆、棉子饼粉、氯化铵、磷酸氢二钾、碳酸钙。调节 pH 值为 6.8~7.0，培养温度为 (28±0.5)℃，湿度为 30%~40%，摇床转速为 220r/min，时间为 23~28h。

发酵培养基：糊精、玉米淀粉、玉米浆、玉米蛋白粉、氯化铵、氯化钠、氯化锌、硫酸镁、豆油、碳酸钙。调节 pH 值为 7.0~7.2，培养温度为 (28±0.5) ℃，湿度为 30%~40%，摇床转速为 220r/min，发酵周期为 6~7d。

1.2　方法

1.2.1　单孢子悬液的制备

取 RN16-7 菌株新鲜斜面，用无菌接种铲刮取孢子，放入事先加好无菌生理盐水的带有玻璃珠的三角瓶中，将铲子左右轻轻摇晃洗下孢子，于 28℃，230r/min 振荡 25~30min，使孢子分散活化，用 8 层擦镜纸过滤，制得单孢子悬液，经血球计数板计数，控制孢子浓度为 10^8 个 /mL，备用。

1.2.2　紫外线诱变合适剂量的确定

取 10mL 单孢子悬液，于直径为 10cm 的无菌平皿中，打开皿盖，用磁力搅拌器搅拌，在紫外灯下进行诱变 (紫外灯功率 15W，波长 253.7nm，照射距离 30cm)，照射时间分别为 60、80、100、120 和 140s，红光下适当稀释涂布于培养皿 , 同时取未经紫外照射的孢子悬液作对照，28℃避光培养 6~8d，对各剂量组进行活菌计数，计算致死率。

1.2.3　等离子诱变合适剂量的确定

取单孢子悬液 15~20μL 于芯片上，在无菌状态下吹干，将芯片放入室温等离子诱变器的芯片槽中，诱变处理距离为 5mm，等离子诱变时间分别为 15、25、35、45、65 和 75s，然后用无菌水洗下诱变处理过的孢子，稀释至 10^2~10^4 倍后涂布于固体培养皿上，27.5~28.5℃培养 7~8d，挑取生长良好的菌落划在斜面培养基中，27.5~28.5℃培养 7~8d。

1.2.4　抗生素最小抑菌浓度的考察

将制备好的孢子悬液，分别涂布于含不同浓度的链霉素、庆大霉素、利福平的培养基培养皿，28℃避光培养 6~8d。观察并记录不同培养皿上的菌落生长状况，未长菌落所对应的抗生素浓度，即为抗生素对该菌的最小抑制浓度。

1.2.5　检测方法

HPLC 定量检测 [12]，流动相为乙腈 :50mmol/L 磷酸二氢钾 =30:70，色谱柱 C_{18} 250mm×4.6mm, 5μm，检测波长为 267nm，流速 0.8mL/min，进样量 20μL，柱温为室温。

1.2.6　高产菌株遗传稳定性的测定

对获得的高产突变菌株，经连续培养 4d，每次传代后，进行摇瓶发酵，检测发酵单位，作为生产力的验证。恩拉霉素发酵水平变化不大的菌株，为遗传性状稳定的高产菌株。

1.2.7　菌株保藏

菌株保藏分别采用沙土管保藏法，甘油管低温保藏法和冷冻真空干燥保藏法，具体操作参见文献 [13-14]。

2　结果与分析

2.1　UV 处理菌株死亡率与正突变关系的研究

由表 1 可以看出，当紫外线照射时间为 120s 时，菌体的死亡率为 100%。一般选致死率达 85%~95% 的时间为紫外线诱变最适剂量，所以选用紫外线照射 100s，作为恩拉霉素产生菌紫外诱变的处理时间。

表 1　UV 诱变的致死率和正突变率

Tab. 1　The death and positive variable rate by UV

紫外处理时间 /s	60	80	100	120	140
致死率 /%	58±1.46	82±2.33	95±1.87	100	100
正突变率 /%	22±2.22	32±1.32	40±1.12	0	0

2.2　ARTP 处理菌株死亡率与正突变关系的研究

由表 2 可以看出，随着 ARTP 诱变照射时间延长，菌体致死率逐渐上升，菌种的正突变率也逐渐升高，当 ARTP 诱变照射 65s 时，致死率为 100%。为了便于筛选到有效菌种，选择 ARTP 诱变照射 45s 为合适诱变处理时间，正突变率高达 61%。

2.3　抗性压力最小抑制浓度与菌株正突变关系的研究

由表 3 可知，链霉素的最小抑制浓度为 1.2μg/mL，正突变率约 51%；庆大霉素的最小抑制浓度为

表 2　ARTP 诱变的致死率和正突变率

Tab. 2　The death and positive variable rate by ARTP

处理时间 /s	15	25	35	45	65	75
致死率 /%	75.6±1.83	90.2±2.03	95.8±1.77	98.9±1.67	100	100
正突变率 /%	33±1.13	47±1.35	52±1.33	61±1.58	0	0

表 3　链霉素 / 庆大霉素 / 利福平的抑制率和正突变率

Tab. 3　The inhibition and positive variable rate by streptomycin/gentamicin/rifampicin

链霉素 /(μg/mL)	抑制率 /%	正突变率 /%	庆大霉素 /(μg/mL)	抑制率 /%	正突变率 /%	利福平 /(μg/mL)	抑制率 /%	正突变率 /%
0.6	61.6±1.81	36±1.12	1.2	75.6±1.83	39±1.14	0.2	75.6±1.83	25±1.73
0.8	82.6±1.43	43±1.53	1.6	75.6±1.83	51±1.21	0.4	85.6±1.83	39±1.67
1.0	99.1±1.24	51±1.33	1.8	98.6±1.83	65±1.39	0.8	97.9±1.83	48±1.53
1.2	100	0	2.0	100	0	1.0	100	0
1.4	100	0	2.2	100	0	1.2	100	0

2.0μg/mL，正突变率约 65%；利福平的最小抑制浓度为 1.0μg/mL，正突变率约 48%。其中庆大霉素的正突变率最高，所以选庆大霉素为菌种的处理试剂，便于筛选菌种的剂量为 1.8μg/mL。

2.4　ARTP 与庆大霉素复合处理菌株效果的研究

ARTP 与庆大霉素复合处理。以 RN16-7 为出发菌株，ARTP 诱变处理 45s 后，红光下适当稀释涂布于含庆大霉素浓度为 1.8μg/mL 培养皿上 , 同时取未经处理的孢子悬液，稀释涂布于不含庆大霉素的培养皿，作为对照，(28±1)℃避光培养 6~8d，挑取单菌落 81 株。将这 81 株菌经发酵摇瓶检测后，进行统计，结果见表 4。最后获得 6 株高产突变株，结果见表 5。

由表 4 可知，将挑选的 81 株菌经发酵摇瓶验证效价提高 50.1%~57.8% 的菌株有 6 株，占总数的 7.4%，具有正突变性的菌株数为 58 株，所以正突变率为 71.6%。将 6 株效价提高最大的突变株进行生产力复测，结果见表 5。

由表 5 可知，经 ARTP 等离子处理，结合庆大霉素压力筛选后，筛选获得 6 株恩拉霉素高产菌株，效价均将原始菌株提高 50% 以上，其中 RN16-

表 4　恩拉霉素高产菌发酵水平统计

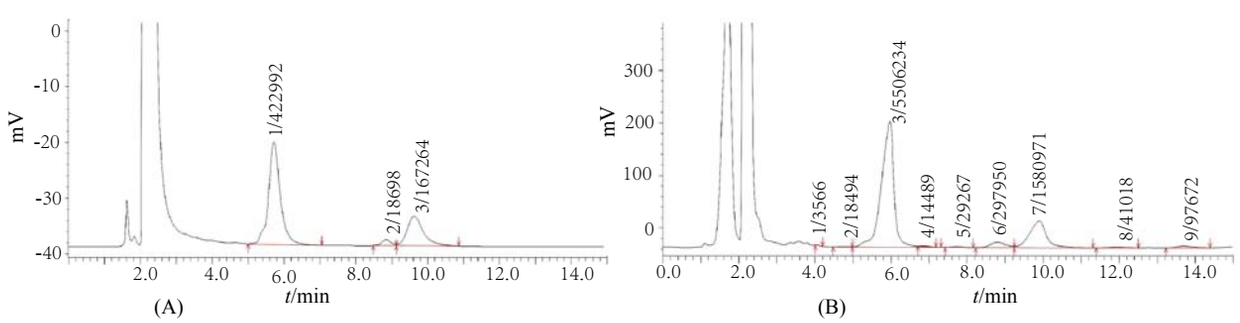
Tab. 4　Statistics of ferment level of high yield strain of the enramycin

菌落总数 / 株	菌数 / 株	效价提高率 /%	占总菌数 /%	正突变率 /%
81	6	50.1~57.8	7.4	71.6
	10	40.7~48.3	12.3	
	17	31.2~39.7	21.0	
	25	0~29.9	45.7	
	23	-23.8~0	13.6	

表 5　高产菌株摇瓶发酵效价

Tab. 5　The high yield strain fermentation in flask potency

菌种号	效价 1/(u/mL)	效价 2/(u/mL)	平均效价 /(u/mL)	提高率 /%
RN16-242	7491	7355	7423	57.8
RN16-245	7234	7594	7414	57.6
RN17-32	7902	6872	7387	57.1
RN17-60	7205	7355	7280	54.8
RN17-77	7018	7113	7066	50.2
RN17-80	7428	6688	7058	50.1
对照 RN16-7	4896	4509	4703	0.0



(A): enramycin; (B): the pruduct from the mutant RN16-242

图 1　恩拉霉素标准品与高产菌发酵液的 HPLC 图

Fig. 1　HPLC chromatogram of the standard sample and the product from enramycin .

242(7423u/mL) 的效价最高，比出发菌株 RN16-7(4703u/mL) 提高了 57.8%。

突变高产菌的代谢产物，经 HPLC 检测 (图 1)，以恩拉霉素标准品作对照，结果是恩拉霉素 A，B 的保留时间，均对应于 5.7 和 9.6min，说明代谢产物没有发生变化，且恩拉霉素发酵单位为 7423u/mL。

2.5　菌落形态与发酵单位关系的考察

不同的菌落形态有不同的斜面孢子外观，不同的斜面孢子外观有不同的发酵单位，数据见表 6。

由表 6 可知，第一种菌落形态 (中间灰，边缘有白色线围绕) 的效价最高，效价达到 7400u/mL，第二种、第三种和第四种菌落平凡出现，在挑选单菌落时注意避免，第五种菌落比较少，经检测，效价约 2000u/mL 左右。所以菌落形态不同，斜面孢子外观也明显不同，效价差异很大，高产菌株属第一种菌落形态。

2.6　高产菌株遗传稳定性的考察

由表 7 可知，前 3 个高产菌株，经稳定性传代检测，RN16-242 的 F_2、F_3 代稳定性降幅比较缓慢，具有较好的遗传稳定性。因此，传代以 3 代以内为宜。

2.7　菌株保藏法的考察

恩拉霉素高产菌株 RN16-242 保存方法的考察。选择甘油管保藏法、沙土管保藏法和冻干管保藏法进行比较。对每种保藏法，进行两种不同状态的菌体同时进行摇瓶发酵检测 (第一种是保藏的菌株；第二种是用保藏菌株划的斜面菌体)，结果汇总于表 8。

由表 8 可知，保藏方法对高产菌株生产力的稳定影响很大，用甘油管低温保藏的菌种直接接摇瓶发酵，效价区间为 7100~8200u/mL，效价稳定在 95%~110% 之间，能最好地保持高产菌种的高产特性。如果用沙土管保藏法和冷冻真空干燥保藏法保藏的菌体只能维持原始摇瓶效价的 30% 左右。不管用哪种保藏方法的菌株传斜面，斜面外观或多或少都有白斑，经验证发酵水平都低。

表 6　菌落形态与发酵单位的关系

Tab. 6　Relationship between colonial morphology and fermentation unit

菌落形态	斜面孢子	效价范围 /(u/mL)
①中间灰，边缘有白色线围绕	浅灰色均匀的菌层	6000~7400
②浅灰小馒头型	灰色均匀的菌层	5500~6000
③深灰，表层孢子丰富成小粉粒	深灰色、菌层厚	4800~5300
④灰色馒头型表面有小白斑	灰色，白色小颗粒斑点多	3500~4200
⑤白馒头型	白色，菌层薄	1000~1800

表 7　高产菌株传代次数及相对效价 (%)

Tab. 7　The passage number and relative potency of the high yield strain (%)

传代数	RN16-242	RN16-245	RN17-32
1	100	100	100
2	96.3	90.1	91.9
3	91.2	82.3	83.1
4	82.8	73.4	72.6

3　小结与讨论

表 8　菌种保藏法比较

Tab. 8　The comparison of preservation methods of microbiological strains

保藏方法	第一种效价范围 /(u/mL)	效价波动 /%	第二种菌体斜面外观	第二种效价范围 /(u/mL)	效价波动 /%
甘油管	7100~8200	95~110	灰色，稍微有白斑	6500~7200	80~90
沙土管	2500~3000	33~40	白斑多	2100~2600	28~35
冻干管	2200~2700	29~36	白色斜面，菌层薄	1800~2400	10~32

为了提高恩拉霉素的发酵水平，采用经典的诱变育种方法，对出发菌株 RN16-7 进行选育，经紫外诱变，正突变率达 40%；ARTP 处理正突变率达 61%。抗性筛选，抗链霉素压力的菌株，正突变率达 51%；耐庆大霉素压力的菌株，正突变率达 65%；耐利福平压力的菌株，正突变率达 48%。ARTP 与庆大霉素复合处理，经大量筛选，获得 3 株恩拉霉素高产菌株，比出发菌株效价提高 50% 以上，其中 RN16-242(7423u/mL) 的效价最高，比出发菌株 RN16-7(4703u/mL) 提高了 57.8%，且具有较好的遗传稳定性。

保藏方法对恩拉霉素产生菌的保存至关重要。经比较，甘油管低温保藏法最好。

本文的不足之处是选育获得的菌株，第三代开始遗传稳定性开始下降。而牟慧艳等 [15] 利用定点突变技术，将菌体中核糖体 S12 蛋白 (对应基因为

rpsl) 上的第 43 位赖氨酸 (Lys)，替换成天冬氨酸或精氨酸，结果得到了恩拉霉素高产菌株 L-M1-2 与 L-M2-1，这两株菌传 4 代，对恩拉霉素的发酵水平没有明显的影响，这对后续的遗传稳定性研究具有指导意义。

参 考 文 献

[1] Higashide E. Enduracidin, a new antibiotic-1-*Streptomyces fungicidcius* No.B5477,an enduracidin producing organism[J]. *J Antibiot*, 1968, 21: 127-137.

[2] Mccafferty D G, Cudic P, Frankel B A, *et al*. Chemistry and biology of the ramoplanin family of peptide antibiotics[J]. *Biopoly*, 2010, 66(4): 261-284.

[3] Kawakami M, Nagai Y, Fujii T, *et al*. Anti-microbial activities of enduracidin (enramycin) *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Antibiot*, 1971, 24(9): 583-586.

[4] Iwasaki H, Horii S, Asai M, *et al*. Enduracidin, a new antibiotic. VIII. Structures of enduracidins A and B[J]. *Chem Pharmaceut Bullet*, 2008, 21(6): 1184-1191.

[5] Shibata M, Higashide E, Hatano K, *et al*. Antibiotic enduracidin process for the production thereof: US, 3786142[P]. 1974.

[6] 张子臣 , 张翠芬 , 刘宪军 , 等 . 恩拉霉素的最新研究进展 [J]. 中国抗生素杂志 , 2013, 38(3): 185-190.

[7] 叶婷婷 , 陈方龙 , 曹丹 , 等 . 饲料添加剂恩拉霉素的研究进展 [J]. 饲料研究 , 2011, (6): 25-26.

[8] Van Gessel A F H, Hrycak B, Jasiński M, *et al*. Temperature and NO density measurements by LIF and OES on an atmospheric pressure plasma jet[J]. *J Phys D Appl Physics*, 2013, 46(46): 095201.

[9] Jason M, Byrne D G. Atmospheric pressure plasma treatment of lipopolysaccharide in a controlled environment[J]. *J Physics D App Physics*, 2013, 46(31): 467-473.

[10] 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(1): 150-160.

[11] 田敏 , 余蓉 . 多因素多层面复合诱变选育抗生素抗性突变克拉维酸高产菌株 [C]. 全国抗生素 , 2009.

[12] 金萍 . 恩拉霉素生产菌的选育及其发酵条件优化 [D]. 杭州 : 浙江工商大学 , 2011.

[13] 吕红线 , 郭利美 . 工业微生物菌种的保藏方法 [J]. 齐鲁工业大学学报 , 2007, 21(1): 52-55.

[14] 米翠平 , 黄周阳 . 工业生产中菌种的常用保藏方法 [J]. 山东化工 , 2017, 46(2): 76-76.

[15] 牟慧艳 , 刘扬 , 王应东 , 等 . 恩拉霉素生产菌株的遗传改造 [J]. 微生物学通报 , 2017, 44(1): 126-132.