

## 遗传育种与生物合成

## 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

王会会<sup>1</sup> 秦丽娜<sup>2</sup> 刘雨<sup>2</sup> 赵建辉<sup>2</sup> 张雪霞<sup>1,\*</sup>

(1 微生物药物国家工程研究中心, 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心, 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 石家庄 050015; 2 华北制药华胜有限公司, 石家庄 050015)

**摘要:** **目的** 选育他克莫司高产菌株, 提高发酵单位。**方法** 采用常压室温等离子体 (ARTP) 技术对一株他克莫司出发菌株 FK13-2-14 进行诱变, 对高产菌株的种子瓶接种量、异亮氨酸的添加量及添加时间等发酵条件进行优化。**结果** 获得 1 株稳定的突变高产菌株 FK18-1-56, 摇瓶发酵单位提高了 162%; 优化后种子瓶接种量为 1.5cm<sup>2</sup>/40mL, 异亮氨酸添加时间为 48h, 添加量为 3.0g/L。高产菌株在优化后的发酵条件下, 100L 罐发酵单位达到 997μg/mL, 比出发菌株提高了 128%。**结论** 利用常压室温等离子体诱变技术得到他克莫司高产菌株, 经发酵工艺优化后, 大幅度提高了他克莫司的工业发酵水平。

**关键词:** 他克莫司; 常压室温等离子体诱变; 筑波链霉菌; 发酵优化

**中图分类号:** R979.5 **文献标志码:** A

## Screening of a high-yielding tacrolimus producing strain using atmospheric room temperature plasma and optimization of fermentation conditions

Wang Hui-hui<sup>1</sup>, Qin Li-na<sup>2</sup>, Liu Yu<sup>2</sup>, Zhao Jian-hui<sup>2</sup> and Zhang Xue-xia<sup>1</sup>

(1 National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei industry Microbial Metabolic Engineering & Technology Research Center, New Drug Research & Development Company of NCPC, Shijiazhuang 050015; 2 Huasheng Company of NCPC, Shijiazhuang 050015)

**Abstract Objective** To obtain a high-yielding tacrolimus producing strain using mutation methods to improve the fermentation unit. **Methods** The primitive strain FK13-2-14 was treated using an atmospheric and room temperature plasmas (ARTP) technology. Fermentation conditions were optimized, such as the inoculation of seed bottles, the additive amount of isoleucine and the addition time. **Results** A high-yielding mutant, designated FK18-1-56, was successfully selected. Its fermentation production was 162% higher than that of the original strain in flask culture. The optimum fermentation conditions were determined as follows: the inoculation amount of seed bottles was 1.5cm<sup>2</sup>/40mL, the addition amount of isoleucine was 3.0g/L, and the addition time was 48h after fermentation. In a 100L fermenter, the production of tacrolimus reached 997μg/mL under the optimized conditions by the strain FK18-1-56. It was 128% higher than that of the original strain. **Conclusion** The high-yielding tacrolimus producing strain selected by ARTP will further substantially improve the industrial production of tacrolimus under the optimized conditions.

**Key words** Tacrolimus; Atmospheric and room; Temperature plasma; *Streptomyces tsukubaensis*; Fermentation optimization

收稿日期: 2018-07-28

作者简介: 王会会, 女, 生于 1984 年, 工程师, 从事微生物遗传育种及发酵工艺研究, E-mail: ahui841225@163.com

\* 通讯作者, E-mail: zhangxuexiazxx @163.com

他克莫司 (tacrolimus) 又名 FK506, 是一种由筑波链霉菌 (*Streptomyces tsukubaensis*) 产生的 23 元大环内酯类免疫抑制剂<sup>[1]</sup>, 具有抑制抗体、白细胞介素 IL-2、IL-3 和干扰素 IFN- $\gamma$  的产生, 以及抗移植物的排斥作用<sup>[2]</sup>, 属于第四代免疫抑制剂。他克莫司的免疫抑制作用比环孢素 A(CsA) 强 50~100 倍<sup>[3]</sup>, 因而大大降低了临床使用剂量, 同时不良反应也明显降低, 用于心脏、肺脏移植, 效果良好。

他克莫司菌种选育, 目前主要采用紫外诱变、化学复合诱变和原生质体融合等技术, 操作过程复杂。常压室温等离子体 (ARTP) 技术是近年来新兴的菌种诱变育种技术, 具有可控性强、操作简便、操作过程安全、获得的突变体性状稳定等特点<sup>[4]</sup>, 目前已成功应用于多个产抗生素工业品种上, 取得了良好效果<sup>[5-7]</sup>。本研究采用常压室温等离子体技术对产他克莫司产生菌进行诱变, 筛选得到 1 株高产菌株, 其摇瓶发酵单位比出发菌株提高了 162%。通过对接种量及前体氨基酸等发酵条件进行优化, 结果在 100L 实验罐中发酵效价达到 997 $\mu$ g/mL, 为工业化生产奠定了良好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 出发菌株

链霉菌 (*Streptomyces tsukubaensis*)FK13-2-14, 华北制药集团华胜公司保存。

#### 1.1.2 培养基

平板及斜面培养基: 麦芽粉 2.0%, 液体玉米浆 1.0%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%, 琼脂 1.6%, pH7.0。

种子培养基: 糊精 1.0%, 葡萄糖 1.0%, 甘油 2.5%, 酵母粉 1.0%,  $\text{CaCO}_3$  0.2%, pH7.0。

发酵培养基: 糊精 8.0%, 葡萄糖 2.0%, 固体玉米浆 0.2%, 酵母粉 2.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{CaCO}_3$  0.2%, pH7.0。

#### 1.1.3 主要仪器

ARTP-IIS 等离子诱变仪, 无锡源清天木生物科技有限公司; e2695 型高效液相色谱仪, Waters 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 单孢子悬液的制备

取出发菌株 FK13-2-14 的新鲜斜面一支, 加入 2mL 无菌水, 用接种针刮下, 吸入盛有 10mL 无菌水的三角瓶中, 玻璃珠打散, 过滤吸管过滤, 制成

单孢子悬液。

### 1.2.2 等离子诱变处理

取 10 $\mu$ L 孢子悬液涂于直径 1cm 的金属载片上, 设置仪器电源功率 110W, 工作气流量 10L/min, 照射距离为 2mm, 以照射时间为变量, 各组处理时间分别为 0、10、20、40、60 和 80s。将处理的孢子悬液进行梯度稀释后涂布于平板培养基上培养, 考察照射强度与致死率的关系。根据致死率, 以 20s 照射时长为诱变选择条件, 重复等离子体照射, 梯度稀释后涂布平板, 培养 10d, 挑取单菌落进行摇瓶初筛和复筛。

### 1.2.3 培养条件

摇瓶培养: 将斜面挖块 1.5cm<sup>2</sup> 接种于装有 40mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中, 28 $^{\circ}\text{C}$ , 220r/min 震荡培养 24h, 然后以 10% 的接种量接入 40mL/250mL 的发酵培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ , 220r/min 震荡培养 7d, 放瓶。

100L 罐发酵培养采用两级发酵, 种子瓶以 5% 接种量接种至 10L 种子培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ , 搅拌转速 375r/min, 通气比 1:1vvm, 培养 24h, 然后以 10% 的接种量接种至 60L 发酵培养基中, 搅拌转速 600r/min, 通气比 1:1.5vvm, 发酵 48h 时, 添加 3.0g/L 的异亮氨酸, 培养 7d 放罐。

### 1.2.4 发酵产物含量的测定

#### (1) 发酵样品处理

取一定量的发酵液置于离心管中, 12000r/min 离心 5min, 倒掉上清, 加入 2 倍体积发酵液的无水乙醇, 浸泡 30min, 再次离心取上清液进行 HPLC 检测, 即为他克莫司产物含量。

#### (2) HPLC 检测

色谱柱: Agilent C<sub>18</sub>(4.6mm $\times$ 250mm, 5 $\mu$ m); 流动相: 水 - 四氢呋喃 - 磷酸 (3000:600:0.8) 为溶液 A, 乙腈 - 四氢呋喃 - 磷酸 (3000:600:0.8) 为溶液 B, 以溶液 A 和溶液 B(49:51) 为流动相; 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 210nm; 进样量: 20 $\mu$ L。

## 2 结果

### 2.1 ARTP 诱变效果

#### 2.1.1 等离子诱变剂量的选择

将等离子诱变后的菌悬液梯度稀释后涂布于平板培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$  培养 10d, 以未经照射的作为对照, 统计致死率。图 1 所示, 随着照射时间的延长, 菌落生长数量呈减少趋势, 照射时间为 20s 时, 致死率 72.6%, 照射 60s 以上时, 菌落完全不生长。诱变处理时间与致死率之间存在明显的正效应关系。根

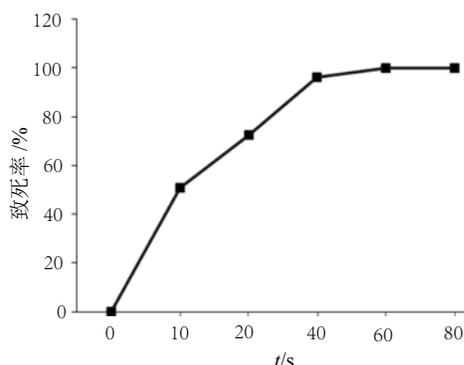


图 1 ARTP 诱变时间对菌株 FK13-2-14 致死率的影响

Fig. 1 Effect of ARTP irradiation time on lethal rate

据致死率曲线, 确定 20s 为他克莫司 FK13-2-14 菌株 ARTP 的最佳处理时间。

### 2.1.2 突变株筛选

以菌株 FK13-2-14 为出发菌株, 等离子诱变处理 20s 后的菌悬液经梯度稀释后涂布于平板培养基上, 挑选 127 株单菌落进行摇瓶效价比较, 以出发菌株的发酵相对效价为 100, 计算突变株的发酵相对效价, 结果 26 株为正突变菌株 (相对效价在 110 以上), 20 株为未突变菌株 (相对效价在 90~110), 81 株为负突变菌株 (相对效价在 90 以下), 正突变率超过 20%(表 1)。

对 26 株正突变菌株进行多次复筛, 得到 4 株产他克莫司能力较高的突变菌株, 其发酵水平平均提高 50% 以上, 其中最高的突变株 FK18-1-56 比出发菌株提高了 162%, 放瓶效价达到 1147 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 2)。

### 2.2 高产突变株遗传稳定性研究

将高产菌株 FK18-1-56 连续传代 4 次, 5 代斜面同时进行摇瓶发酵培养, 以验证其传代稳定性(表 3)。

表 1 他克莫司突变株初筛结果

Tab. 1 Results of preliminary screening test

| 相对效价/% | 菌株数 | 分布频率/% |
|--------|-----|--------|
| 90 以下  | 81  | 63.8   |
| 90~110 | 20  | 15.7   |
| 110 以上 | 26  | 20.5   |

表 2 突变高产菌株的摇瓶发酵情况

Tab. 2 Shake flask fermentation result of high yield mutant strains

| 菌株         | 放瓶效价/ $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 相对效价/% |
|------------|-------------------------------|--------|
| FK13-2-14  | 438                           | 100    |
| FK18-1-32  | 780                           | 178    |
| FK18-1-63  | 858                           | 196    |
| FK18-1-56  | 1147                          | 262    |
| FK18-1-106 | 1064                          | 243    |

表 3 菌株 FK18-1-56 的传代稳定性

Tab. 3 Stability of the mutant strain FK18-1-56

| 传代数     | F <sub>1</sub> | F <sub>2</sub> | F <sub>3</sub> | F <sub>4</sub> | F <sub>5</sub> |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 种子菌丝量/% | 14             | 13             | 14             | 15             | 14             |
| 种子 pH   | 7.34           | 7.28           | 7.36           | 7.39           | 7.30           |
| 相对效价/%  | 100            | 103.2          | 101.5          | 105.8          | 98.7           |

表 3 结果可以看出, 突变株 FK18-1-56 从 F<sub>1</sub> 到 F<sub>5</sub> 代, 种子瓶培养 24h 时, 菌丝量均在 10% 以上, pH 均稳定在 (7.30 $\pm$ 0.2), 且摇瓶发酵效价稳定, 说明该菌株具有良好的遗传稳定性, 有利于工业化生产。

### 2.3 高产菌株发酵条件优化

#### 2.3.1 种子瓶接种量的影响

成熟的斜面采用挖块法分别接入 0.5、1.0、1.5 和 2.0 $\text{cm}^2$  于种子培养基中, 按照“1.2.3”项培养条件进行摇瓶培养, 考察接种量对发酵效价的影响(表 4)。

由表 4 结果可见, 种子瓶接种量越大, 培养 24h 后菌丝量越高, 但 pH 呈升高又下降的势。当菌丝量为 14%, pH 为 7.37 时, 达到最高放瓶效价 1124 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。说明当种子瓶接种量为 1.5 $\text{cm}^2$ , 培养 24h 后,

表 4 不同接种量的摇瓶发酵情况

Tab. 4 Shake flask fermentation result of different inoculum concentration

| 接种量/ $\text{cm}^2$ | 菌丝量/% | pH   | 放瓶效价/ $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
|--------------------|-------|------|-------------------------------|
| 0.5                | 4     | 6.89 | 865                           |
| 1.0                | 8     | 7.12 | 906                           |
| 1.5                | 14    | 7.37 | 1124                          |
| 2.0                | 17    | 7.16 | 832                           |

正好达到菌种的对数生长期, 菌种的生长能力最好, 此时移种摇瓶效价最高。因此, 种子瓶的培养周期为 24h 时, 最佳接种量为 1.5 $\text{cm}^2/40\text{mL}$  种子培养基。

#### 2.3.2 前体氨基酸添加量及添加时间的优化

研究发现, 他克莫司发酵过程中添加异亮氨酸能显著增加发酵液中丙酸 (Pro) 的浓度, 可以促进丙酰 CoA 等前体物质的合成, 提高他克莫司产量, 本研究考察了不同的异亮氨酸添加量及添加时间对他克莫司合成的影响, 结果见图 2~3。

由图 2 可见, 异亮氨酸作为前体物质, 最佳添加量为 3.0 $\text{g}/\text{L}$ , 若添加过量, 产生反馈抑制, 抑制丙酰 CoA 等物质的合成, 影响他克莫司的产量; 当添加 3.0 $\text{g}/\text{L}$  时, 最佳添加时间为 48h, 此时菌丝进入次级代谢过程, 添加前体物质有利于转化为他克莫司。

### 2.4 发酵放大试验

高产菌种 FK18-1-56 放大试验在 100L 发酵罐进

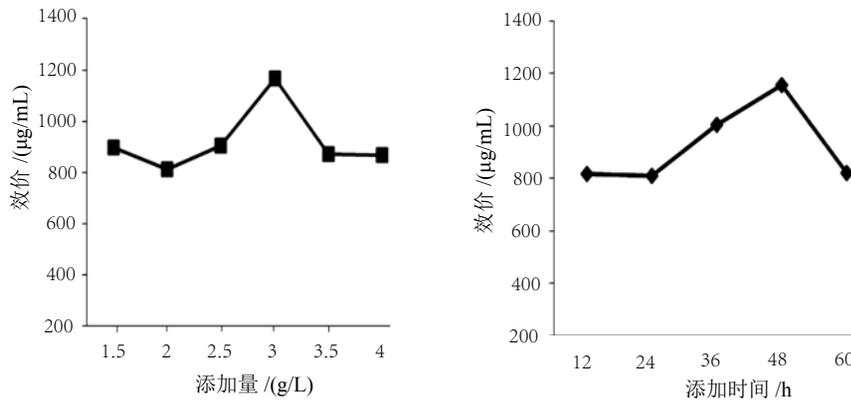


图2 异亮氨酸添加量和添加时间的影响

Fig. 2 Effect of different isoleucine concentration and different addition time on tacrolimus fermentation

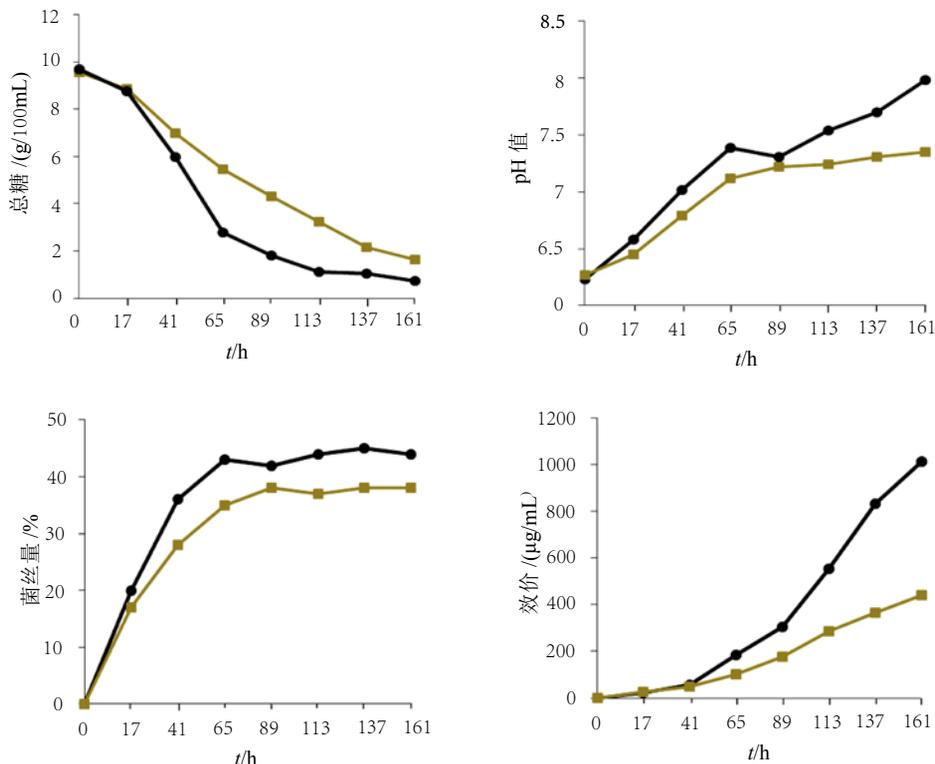


图3 他克莫司 100L 罐发酵代谢曲线

Fig. 3 The metabolism curve of tacrolimus fermentation in 100L fermentor

行，采用两级发酵。生长成熟斜面按照 1.5cm<sup>2</sup>/40mL 接入种子瓶中，28℃，220r/min，震荡培养 24h 后接入种子罐，按照“1.2.3”项进行发酵培养，发酵 48h 时补入 3.0g/L 的异亮氨酸前体，培养 7d 放罐，测他克莫司产量，结果见表 5。

从表 5 可见，连续 3 批放罐效价分别为 996、1014 和 982µg/mL，平均效价达到 997µg/mL，比出发菌株摇瓶效价提高了 128%。

从图 3 可见，在 100L 发酵罐上，突变菌株 FK18-1-56 较出发菌株 FK13-2-14 利用总糖较彻底，

表 5 菌株 FK18-1-56 的 100L 罐发酵

Tab. 5 Fermentation result of the mutant strain FK18-1-56 in 100L fermentor

| 发酵批数         | 第一批 | 第二批  | 第三批 | 平均  |
|--------------|-----|------|-----|-----|
| 效价 / (µg/mL) | 996 | 1014 | 982 | 997 |

发酵结束时总糖降到 1.0g/mL 以下，pH 回升到 7.5 以上。突变菌株 FK18-1-56 在发酵开始 65h 后菌丝量维持在 40% 以上，效价增长速率远高于出发菌株。

### 3 讨论

本研究采用 ARTP 技术对他克莫司产生菌进行

诱变处理, 以 20s 为选择照射时间, 从初筛的 127 株菌株中得到 4 株高产的诱变菌株, 其中 FK18-1-56 较出发菌株提高了 162%, 且连续传 4 代稳定。通过对种子瓶接种量、前体异亮氨酸添加量及添加时间等发酵条件进行优化, 确定优化后的发酵条件为: 种子瓶接种量为  $1.5\text{cm}^2/40\text{mL}$ , 异亮氨酸的添加量为  $3.0\text{g/L}$ 、添加时间为发酵开始 48h。高产菌株 FK18-1-56 在优化条件下进行 100L 罐试验, 发酵单位达到  $997\mu\text{g/mL}$ , 比原菌株提高了 128%。该菌株具有良好的遗传稳定性, 可用于他克莫司工业化生产。

### 参考文献

- [1] Hatanaka H, Kino T, Asano M, *et al.* FK-506 related compounds produced by *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1989, 42(4): 620-622.
- [2] 黄金沐, 池慧琼, 张忠阳, 等. 他克莫司研究概况 [J]. 海峡药学, 2010, 22(11): 148 -150.
- [3] 叶启发, 沙波, 宫念樵, 等. 他克莫司在 20 例肝移植中的应用 [J]. 中华器官移植杂志, 2000, 21 (4): 245 -247.
- [4] Li H, Wang P, Li G, *et al.* Manipulation of lipase activity by the helium radio-frequeney atmospheric-pressure glow discharge plasma jet[J]. *Plas Proc Polym*, 2011, 8(3): 224-229.
- [5] 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, 27(1): 150-160.
- [6] 任林英, 张祝兰, 唐文力, 等. 常压室温等离子体诱变选育替考拉宁高产菌株 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 40(3): 46-50.