

紫外分光光度法快速测定庆大霉素 C_{1a} 含量在高通量筛选中的应用

田江涛 李敏超 杭海峰* 郭美锦 储炬 庄英萍
(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: **目的** 探索庆大霉素 C_{1a} 含量的快速检测方法, 实现诱变菌株的高通量筛选。**方法** 以紫外分光光度法作为检测庆大霉素 C_{1a} 含量的手段, 对庆大霉素 C_{1a} 单组分生产菌株进行 ARTP、LiCl、微波和 ARTP+LiCl 诱变, 通过高通量筛选获得高产菌株, 并在 5L 发酵罐中对高产稳定性菌株进行验证。**结果** 紫外分光光度法和高效液相色谱法对发酵液中庆大霉素 C_{1a} 含量进行测定, 最大相对误差为 3.98%; 筛选获得了 10 株高产菌株, 其中 AL324 菌株与出发菌株相比, 摇瓶效价提高了 52%; 通过稳定性传代实验, 获得了 4 株高产稳定性菌株。5L 发酵罐验证实验表明 AL324 与出发菌株相比效价提高了 81.3%。**结论** 紫外分光光度法可以快速检测发酵液中庆大霉素 C_{1a} 含量, 该方法应用于高通量筛选中, 获得了高产菌株, 筛选结果表明 ARTP+LiCl 复合诱变方法的正突变率较高, 是一种有效的庆大霉素 C_{1a} 高产菌株诱变方式。

关键词 庆大霉素 C_{1a} ; 分光光度法; ARTP; 高通量筛选

中图分类号: R978.1+5 **文献标志码:** A

UV spectrophotometric determination of the concentration of gentamicin C_{1a} in the application of high throughput screening

Tian Jiang-tao, Li Min-chao, Hang Hai-feng, Guo Mei-jin, Chu Ju and Zhuang Ying-ping
(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract Objective To explore the rapid detection method for the content of gentamicin C_{1a} during high throughput screening. **Methods** In this paper, a rapid and simple detection method for GM C_{1a} in the broth was established and integrated into the high throughput screening model. Four different mutation methods of atmospheric room temperature plasma (ARTP), microwave, LiCl, and ARTP+LiCl with above mentioned high throughput cultivating and detecting systems were used. Furthermore, the high yield strain AL324 was tested in the 5L fermentation. **Results** Comparing to the results of high performance liquid chromatography (HPLC) detection, a maximum deviation of 3.98% was found in this rapid detection method. Among them, a mutant of AL324 could enhance the titer by 52% in the shake flask, compared to the parent strain. After the following rescreening and genetic stability verification processes, only 4 mutants still had better fermentation performances. Moreover, the titer improvement further reached to 81.3% in the 5 L fermentation. **Conclusion** This rapid detection method can be used to detect the GM C_{1a} titer and integrated into the high throughput screening model. The screening results illuminate the ARTP+LiCl is an effective method for producing high yield strains of GM C_{1a} .

Key words Gentamicin C_{1a} ; Spectrophotometry method; ARTP; High throughput screening

收稿日期: 2018-02-09

基金项目: 科技部国家重大科学仪器设备开发专项 (No. 2012YQ15008706)

作者简介: 田江涛, 男, 生于 1986 年, 在读硕士研究生, 研究方向为育种选育与发酵过程优化, E-mail: tjtony@126.com

* 通讯作者: Email: hanghaifeng@ecust.edu.cn

庆大霉素 (gentamicin, GM) 属于氨基糖苷类抗生素, 对革兰阳性菌和阴性菌具有广谱抗菌活性^[1]。庆大霉素 C_{1a} 是庆大霉素单组分之一, 是合成依替米星 (etimicin, ETM) 的重要前体物质^[2], 依替米星具有抗菌活性高、疗效好、低毒性等优点而备受关注^[3-6]。目前庆大霉素 C_{1a} 主要通过庆大霉素多组分分离纯化得到, 本实验室利用生产庆大霉素单组分 C_{1a} 的绛红小单孢菌工程菌株, 可发酵产出单一组分且含杂质较少的庆大霉素 C_{1a}。但该菌株产量较低, 菌种稳定性差, 影响发酵效益。

高通量筛选技术常用于药物筛选、微生物作用机理研究、酶制剂定量分析等^[7-10]。在高通量筛选技术筛选庆大霉素 C_{1a} 诱变菌株过程中, 庆大霉素 C_{1a} 的快速检测是影响高通量筛选效率的瓶颈。由于庆大霉素 C 组分的分子结构中不含共轭双键, 无紫外吸收峰, 不能使用常规的方法进行检测, 目前应用庆大霉素的检测方法来测定庆大霉素 C_{1a} 的含量^[11]。庆大霉素检测方法有浊度法、生物法、高效液相色谱法、薄层层析法等。实验室常用的检测方法是柱前 OPA 衍生样品, 使该样品具有官能团, 然后通过高效液相色谱法测定其含量。在高通量筛选诱变菌株过程中, 需要对多个样品进行处理, 常规的检测方法不利于大量样品的快速检测, 需要建立庆大霉素 C_{1a} 的快速检测方法。

提高抗生素发酵生产效价的源头是获得高产菌株, 近年来关于成功获得高产菌株的报道很多^[12-15], 但是关于庆大霉素单组分 C_{1a} 生产菌诱变和高通量筛选的相关文献很少。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

绛红小单孢菌 (*Micromonospora purpurea*) 由河南仁华生物科技有限公司 (平顶山) 提供。

1.1.2 培养基

(1) 斜面培养基组成 (g/L): 淀粉 10, KNO₃ 1, K₂HPO₄·3H₂O 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, L- 天冬酰胺 0.02, CaCO₃ 1, 麸皮 17, 琼脂粉 14, pH7.8, 121℃ 高压湿热灭菌 30min。

(2) 种子培养基 (g/L): 玉米粉 15, 淀粉 10, 葡萄糖 1, 低温豆粉 10, 蛋白胨 2, KNO₃ 0.5, CaCO₃ 5, 121℃ 高压湿热灭菌 30min。

(3) 发酵培养基 (g/L): 玉米粉 15, 淀粉 31, 葡

萄糖 5, 高温豆粉 31, CaCO₃ 1, 羽毛粉 2, KNO₃ 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.6, CoCl₂·6H₂O 0.01, 121℃ 高压湿热灭菌 30min。

(4) 平板培养基 (g/L): 淀粉 10, KNO₃ 1, K₂HPO₄·3H₂O 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, L- 天冬酰胺 0.02, CaCO₃ 1, 麸皮 17, 琼脂粉 14, pH7.8, 121℃ 高压湿热灭菌 30min。

1.1.3 试剂

庆大霉素 C_{1a} 标准品 (河南仁华生物科技有限公司, 纯度为 91.59%); 硼酸 (分析纯); 硫酸 (分析纯) 配制成质量分数为 50% 的溶液; 磷钨酸钠 (分析纯) 配制成 1×10⁻²g/mL 水溶液; 庆大霉素 C_{1a} 标准溶液浓度为 1000u/mL。

1.2 方法

1.2.1 庆大霉素 C_{1a} 含量测定 (紫外分光光度法)

(1) 发酵液预处理: 将一定质量的草酸加入发酵液中, 玻璃棒搅拌, 测得 pH 值为 4.0~5.0, 用胶头滴管滴加 50% 硫酸溶液, 使 pH 值为 1.5~1.7 之间。40℃ 水浴锅中反应 1h。将酸化的发酵液加入 10mL 离心管, 放入低速离心机中, 转速为 4000r/min, 离心 10min, 取上清液, 待用。

(2) 检测波长确定: 分别取 1.5mL pH 值为 3 的磷钨酸钠水溶液与 1.5mL pH 值为 3 的酸化后发酵液上清液, 加入 100mL 的容量瓶中, 混合均匀, 定容至 100mL。各取 200μL 样品加入 96 孔石英酶标板中, 在酶标仪中进行光谱扫描, 测定不同波长条件下磷钨酸钠溶液和发酵上清液的吸光值。通过特征吸收峰的最大吸光值确定检测波长。

(3) 反应温度和反应时间的确定: 在 100mL 容量瓶中加入 1.5mL 磷钨酸钠溶液与 1mL 庆大霉素 C_{1a} 标准品溶液, 定容至 100mL。将反应温度设置为 15、25 和 30℃。在波长为 248nm 条件下, 测定反应时间为 2、4、8、16、30 和 60min 的上清液吸光值。

(4) 标准工作曲线的建立: 分别取 0.1~2mL 效价为 1000u/mL 的庆大霉素 C_{1a} 标准溶液, 放置于 100mL 容量瓶中, 加入 1.5mL 浓度为 1×10⁻²g/mL 的磷钨酸钠水溶液, 定容至 100mL, 静置 0.5h, 取 200μL 上清液, 置于 96 孔石英酶标板中, 在 248nm 的波长条件下测定上清液的吸光值。以庆大霉素 C_{1a} 效价为横坐标, 吸光值为纵坐标, 制作磷钨酸钠吸光度与庆大霉素 C_{1a} 效价的标准曲线。

1.2.2 庆大霉素 C_{1a} 含量测定 (高效液相色谱法)

按照中国药典 2015 年版, 高效液相色谱法 (通则 0512) 测定庆大霉素 C 组分含量的方法测定其含量^[11]。

1.2.3 菌种的不同诱变方法

(1)ARTP 诱变: 通过血球计数板对孢子悬浮液进行计数, 制备 10^8 个/mL 的单孢子悬浮液。用移液枪取 20 μ L 均匀涂布在铁环中央, 在诱变距离为 2mm 条件下, 参考 ARTP 诱变的相关文献 [16], 设定诱变时间为 30、60、90、120、150、180 和 300s, 对照组不进行照射诱变。取 980 μ L 的无菌水, 将铁环的孢子清洗至 1.5mL 离心管中, 分别将对照组和实验组的孢子悬浮液进行梯度稀释, 取每个浓度梯度 100 μ L 菌液均匀涂布于筛选平板中, 每个浓度梯度做 3 组平行实验。在 36 $^{\circ}$ C, 湿度 40%~60% 条件下, 培养 10d。培养结束后, 对同浓度梯度培养皿中的菌落数进行计数, 计算诱变致死率。将对照组的单菌落与诱变菌株单菌落分别接入含有种子培养基的 24 孔板中, 设置温度为 36 $^{\circ}$ C, 湿度 40%~60%, 摇床转速为 250r/min, 培养 48h; 以 10% 的接种量, 接入对应的 24 孔板发酵培养基中, 设置温度为 36 $^{\circ}$ C, 湿度 40%~60%, 摇床转速为 250r/min, 培养 96h。对发酵产物进行酸化处理, 通过紫外分光光度法, 快速测定样品的含量。对数据进行统计分析, 计算正突变率, 确定 ARTP 诱变时间。

(2)微波诱变: 在超净工作台中, 取 100 μ L 的 10^8 个/mL 单孢子悬浮液置于 1.5mL 的 EP 管中, 放入微波炉中, 设定功率为 600W, 参考微波诱变的相关文献 [17], 设定诱变时间为 30、60、90、120、150、180 和 300s。取 900 μ L 的无菌水将诱变菌株洗出, 将未诱变孢子悬浮液和不同诱变时间的菌体进行梯度稀释, 每个梯度的悬浮液取 100 μ L 均匀涂布于筛选平板中, 每个浓度梯度做 3 组平行实验。在 36 $^{\circ}$ C, 湿度 40%~60% 的条件下, 培养 10d。培养结束后, 对同浓度梯度培养皿中的菌落数进行计数, 计算诱变致死率。将单菌落接入 24 孔板中进行培养, 测定庆大霉素 C_{1a} 的含量, 统计获得正突变株的个数, 计算微波诱变的正突变率, 确定微波诱变时间。

(3)LiCl 诱变: 在超净工作台中, 在 1.5mL 的 EP 管中加入 500 μ L 浓度为 20% 的氯化锂溶液和 500 μ L 孢子数为 10^8 个/mL 的单孢子悬浮液。诱变时间分别为 5、10、15 和 20min。吸取 100 μ L 不同诱变时间的单孢子悬浮液, 涂布于筛选培养基中, 通过培养获得单菌落, 计算致死率。单菌落在 24 孔板培养, 测

定样品含量, 计算正突变率, 从而确定 LiCl 诱变时间。

(4)ARTP 和 LiCl 复合诱变

将 500 μ L 浓度为 10% 的氯化锂溶液加入 500 μ L 孢子数为 10^8 个/mL 的单孢子悬浮液中, 振荡混合 5min, 取 20 μ L 的 LiCl 诱变的单孢子悬浮液进行 ARTP 诱变, 诱变时间为 60、90、120、150 和 180s。通过梯度稀释的方式将复合诱变的单孢子悬浮液稀释至 10^3 个/mL, 取 100 μ L 加入筛选培养基中。计算致死率和正突变率。确定 ARTP 和 LiCl 复合诱变的条件。

1.2.4 高通量筛选诱变菌株

(1)初筛: 将浓度为 10^8 个/mL 的单孢子悬浮液, 通过不同方式进行诱变。稀释一定倍数, 分散涂于平板培养基中进行培养。挑选生长旺盛, 面积小且突起的孢子, 接入 24 孔板中进行种子培养 43h。一方面以 10% 的接种量接入 24 孔板发酵培养基进行发酵培养; 另一方面取 100 μ L 种子液, 接入孔板斜面中, 进行斜面培养。通过紫外分光光度法, 快速检测 24 孔板中发酵液效价, 标注产量高于对照组的菌株所对应的孔板斜面, 进行复筛。

(2)复筛: 将初筛获得的高产菌株与对照组菌株的斜面接入 500mL 三角瓶中, 进行摇瓶培养。通过紫外分光光度法检测摇瓶中庆大霉素 C_{1a} 的含量, 筛选含量高于对照组效价 10% 的菌株进行下一步的菌株稳定性实验。

(3)稳定性验证: 将高产的菌株进行传代培养, 连续培养 5 代, 记录每一代的效价变化。挑选稳定性好且效价高的诱变菌株。将活化的种子, 按照 10% 的接种量, 加入发酵摇瓶中进行第一代培养。发酵进行 48h 时, 在超净工作台中, 取出对数期的种子液, 按照 10% 的接种量, 加入发酵摇瓶中, 进行第二代培养。第一代发酵培养 96h 后, 检测发酵产物效价, 连续进行五代培养。

1.2.5 高产稳定性菌株 5L 发酵罐培养

在 5L 发酵罐中, 对高产稳定性菌株和出发菌株进行分批发酵。通过测定菌浓、残糖量、摄氧率 (oxygen uptake rate, OUR)、溶氧和产物效价等过程参数, 考察诱变菌株的代谢特性, 初步分析高产原因。

2 实验结果与讨论

2.1 庆大霉素 C_{1a} 快速检测方法的建立

2.1.1 反应上清液 pH 对吸光度的影响

通过滴加 H₂SO₄ 和 NaOH 溶液调节磷酸钠溶

液与庆大霉素 C_{1a} 标准液的反应上清液的 pH 值。不同 pH 磷钨酸钠反应上清液吸光值的光谱扫描图如图 1 所示。

实验结果表明, pH 为 1 时吸收峰在 265nm 处; 当 pH 为 2 时, 吸收峰在 255nm 处; pH 在 3~7 的范围内, 反应上清液吸收峰在 248nm; 当 pH 值大于 7 时, 上清液无特征吸收峰, 庆大霉素 C_{1a} 与磷钨酸钠溶液反应不产生白色沉淀物质。上述结论与 pH 对紫外分光光度法检测庆大霉素波长的影响基本一致^[18]。另一方面 pH 在 3~6 时, 特征吸收峰在 248nm 的反应体系比较稳定, 特征峰的吸光值和波长变化不大。当样品与磷钨酸钠反应后 pH 值为 3~6 时, 该方法可适用于反应体系的检测。

2.1.2 检测波长确定

对 pH 值为 3 的磷钨酸钠溶液和发酵上清液进行光谱扫描, 根据磷钨酸钠溶液的特征吸收峰来确定检测波长。实验结果如图 2 所示。

实验结果表明在波长为 240~260nm 范围内, 磷钨酸钠溶液具有特征吸收峰, 发酵上清液则没有吸收峰。并且在波长为 248nm 时, 磷钨酸钠与发酵液的吸光

度差值最大。因此确定合适的测定波长为 248nm。

2.1.3 反应时间和反应温度对吸光值的影响

反应时间和温度是影响化学反应达到平衡的两个重要因素。庆大霉素 C_{1a} 与磷钨酸钠溶液反应, 生成白色沉淀物质。在反应过程中反应速度与反应温度有关, 产物稳定性与反应时间相关。实验结果如表 1 所示, 在相同反应时间条件下, 不同温度的吸光度数值无明显变化, 可以将室温 (25℃) 作为反应温度。在一定温度条件下吸光度随着时间的增加而逐渐减小, 在 30min 时, 吸光值趋于恒定值。在最初的几分钟, 吸光值下降较快, 说明溶液快速反应, 反应体系不稳定, 在 30min 之后, 吸光值保持一定值, 溶液稳定。综上所述, 确定反应液的反应温度为室温 (25℃), 反应时间为 30min。实验结果与相关文献报道结果相同^[18]。

2.1.4 庆大霉素 C_{1a} 标准工作曲线

在波长为 248nm 条件下测定磷钨酸钠与庆大霉素 C_{1a} 反应上清液的吸光值。以庆大霉素 C_{1a} 效价为横坐标, 上清液的吸光度为纵坐标, 绘制庆大霉素 C_{1a} 的标准工作曲线。

由图 3 可知, 当庆大霉素 C_{1a} 浓度为 0~20u/mL 时, 庆大霉素 C_{1a} 浓度与在波长为 248nm 时的吸光度有较高的线性关系。庆大霉素 C_{1a} 的含量越高时,

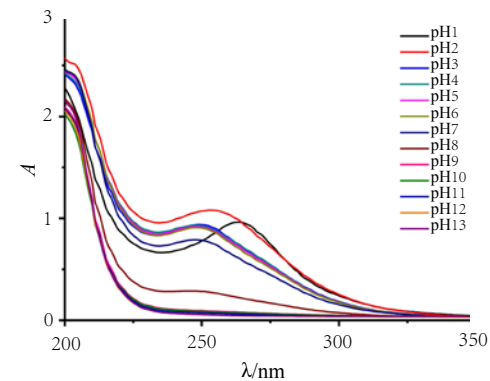


图 1 不同 pH 条件下反应上清液的光谱扫描图

Fig. 1 The spectra of the supernatant with different pH values

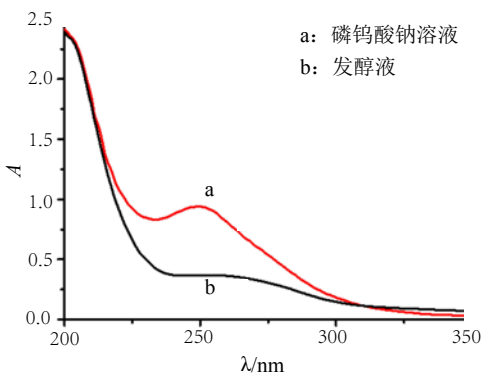


图 2 不同波长条件下的吸光度

Fig. 2 The absorbance at different wavelengths

表 1 温度和时间反应变化对吸光度的影响

Tab.1 The effects of temperature and reaction time on absorbance							
T/℃	t/min	2	4	8	16	30	60
15		0.732	0.712	0.704	0.544	0.546	0.545
25		0.722	0.713	0.709	0.547	0.548	0.549
35		0.728	0.718	0.710	0.545	0.544	0.543

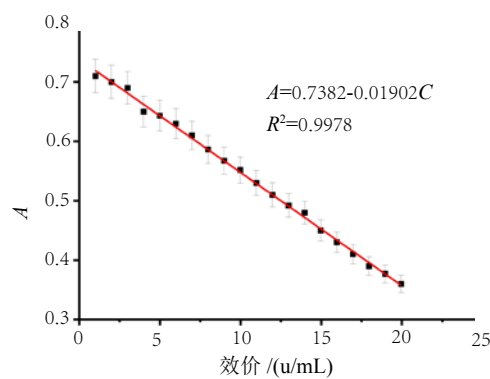


图 3 分光光度法庆大霉素 C_{1a} 测定标准曲线

Fig. 3 The standard curve of gentamicin C_{1a} detection by spectrophotometry

上清液的吸光度越小。线性方程式如式 (1) 所示, 其中 C 为庆大霉素 C_{1a} 的浓度 u/mL , A 为与磷钨酸钠反应后上清液吸光度, 相关系数为 0.9978。在波长为 248nm 时, 通过测定反应上清液的吸光度, 可以计算庆大霉素 C_{1a} 的浓度。

$$A=0.7382-0.01902C \quad (1)$$

2.1.5 高效液相色谱法与紫外分光光度法的比较

通过高效液相色谱法与紫外分光光度法分别测定发酵液中庆大霉素 C_{1a} 的含量。两种不同检测方法的实验结果如表 2 所示, 最大相对误差为 3.98%。两种不同的检测方法具有一致性。紫外分光光度法具有较高的准确性, 检测速度快, 可以应用于高通量筛选和诱变菌株的稳定性实验。

2.2 菌株的不同诱变方式

2.2.1 ARTP 诱变

使用常温室压等离子体仪器对绛红小单孢菌进行诱变, 在其等离子体发射源与单孢子悬浮液的距离, 气体流速, 输出功率等参数一定的条件下, 通过改变诱变时间, 进行诱变实验。诱变使用的工作气体为高纯氮 (99.99%), 产生的等离子体温度控制在 25~35℃ 之间。通过计算菌体致死率, 确定诱变时间。

实验结果如图 4 所示: 随着诱变时间的增加, 孢子致死率增加, 90s 之前 ARTP 对孢子的诱变效果明显。在 120s 时, 致死率高达 95%, 180s 后孢子致死率达到 100%, 选择诱变时间为 120s。

2.2.2 微波诱变

表 2 高效液相色谱法和分光光度法测定发酵液中庆大霉素 C_{1a} 含量的比较

编号	效价 $/(u/mL)$		相对误差 $/\%$
	高效液相色谱法	紫外分光光度法	
1	908.5±26.1	924.8±24.1	1.79
2	852.3±17.9	820.5±18.6	-3.73
3	831.5±21.5	810.6±22.3	-2.51
4	802.3±13.2	812.5±16.9	1.27
5	817.2±18.2	849.7±15.6	3.98
6	752.4±19.6	780.6±15.8	3.75
7	802.9±21.6	789.7±20.7	-1.64
8	735.6±7.5	752.8±8.3	2.34
9	772.8±16.3	800.4±12.3	3.57
10	726.4±12.3	751.2±11.7	3.41
11	605.3±9.3	625.7±9.6	3.37

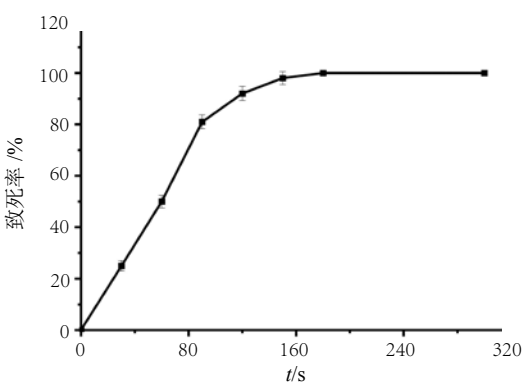


图 4 ARTP 诱变孢子致死率
Fig. 4 Lethality rate of the spores by ARTP

在一定功率条件下, 通过改变诱变时间, 对单孢子悬浮液进行微波诱变, 获得高产诱变单菌落。通过计算诱变致死率, 确定微波诱变时间。

微波诱变实验结果如图 5 所示, 随着诱变时间增加, 致死率升高, 在 150s 之后致死率接近于 100%。当诱变致死率达到 90% 时, 微波诱变时间为 135s。

2.2.3 氯化锂诱变

使用 20% 氯化锂诱变试剂与庆大霉素 C_{1a} 单孢子悬浮液作用, 随着作用时间的增加, 突变率增大。如图 6 所示, 当诱变时间为 20min 后, 菌体致死率只有 10%, 远远小于 ARTP 和微波诱变方式的致死率。说明通过氯化锂单一诱变方式诱变庆大霉素 C_{1a} 菌种, 致死率低, 产生高产菌株的概率小。可以采取 ARTP + LiCl 的复合诱变方式, 对菌株进行诱变。

2.2.4 复合诱变

通过 ARTP 与 LiCl 复合诱变的方式, 对庆大霉素 C_{1a} 单孢子悬浮液进行诱变。通过计算致死率, 确定复合诱变时间。如图 7 所示, 样品菌种致死率随着诱变时间的增加而提高, 当诱变时间为 120s 时,

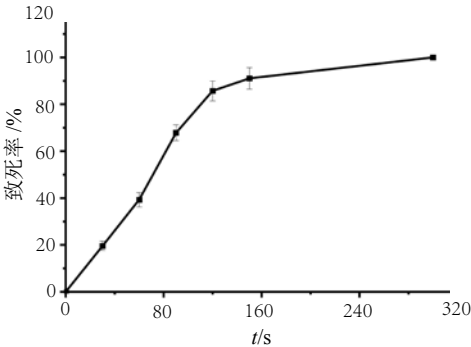


图 5 微波诱变孢子致死率
Fig. 5 Lethality rate of the spores by microwave

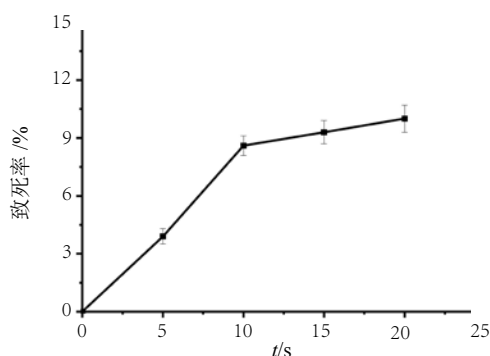


图6 氯化锂诱变孢子致死率

Fig. 6 Lethality rate of the spores by LiCl

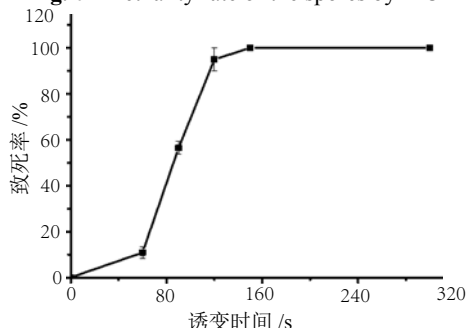


图7 ARTP 和 LiCl 复合诱变孢子致死率

Fig. 7 Lethality rate of the spores by the combination of ARTP and LiCl

致死率高达 98%，150s 时，致死率为 100%。

诱变时间的确定：当致死率达到 90% 时，ARTP 诱变时间在 90s 到 120s 之间。复合诱变过程中加入化学试剂 LiCl，可以提高菌体致死率，在 90s 之前高致死率的现象明显，确定诱变时间为 110s。

2.3 诱变菌株高通量筛选

2.3.1 初筛

通过快速检测的方法测定发酵液效价，标记高产菌株。通过不同诱变方式获得 2336 株诱变菌株，经过 24 孔板培养进行初步筛选，测定结果如图 8 所示。其中含量高于对照组诱变菌株共计 475 株，效价高于对照组 10% 的高产菌株有 221 株，其中最高效价为 925u/mL，该高产菌株是通过 LiCl 和 ARTP 复合诱变获得，多数诱变菌株发酵的效价低于对照组 (625.7u/mL)。

2.3.2 复筛

对初筛高于对照组效价 10% 的诱变菌株进行编号。其中编号为 A101-A140 和 A201-A250 是 ARTP 诱变方式的高产菌株，共计 90 株；W101-W130 和 W201-W228 为微波诱变方式的高产菌株，共计 58 株；L1-L8 为 LiCl 诱变方式的高产菌株，共计 8 株；AL101-AL120、AL201-A220 和 AL301-AL325 为 ARTP+LiCl 复合诱变方式的高产菌株，共计 65 株。对初筛获得的 221 株高产菌株进行摇瓶复筛，结果如图 9 所示，得到高于对照组效价 10% 以上的突变株 10 株。其中复筛最高效价为 950u/mL，编号为 AL324。

2.3.3 庆大霉素 C_{1a} 初筛、复筛实验数据汇总

通过上述 4 种不同诱变方式，共计获得 2336 株诱变菌株，如表 3 所示，其中 ARTP 诱变方式为 841 株，微波诱变方式为 623 株，LiCl 诱变方式为 452 株，ARTP 和 LiCl 复合诱变 420 株。正突变率分别为 23%、20%、4% 和 33%，高产菌分别为 193 株、125 株、

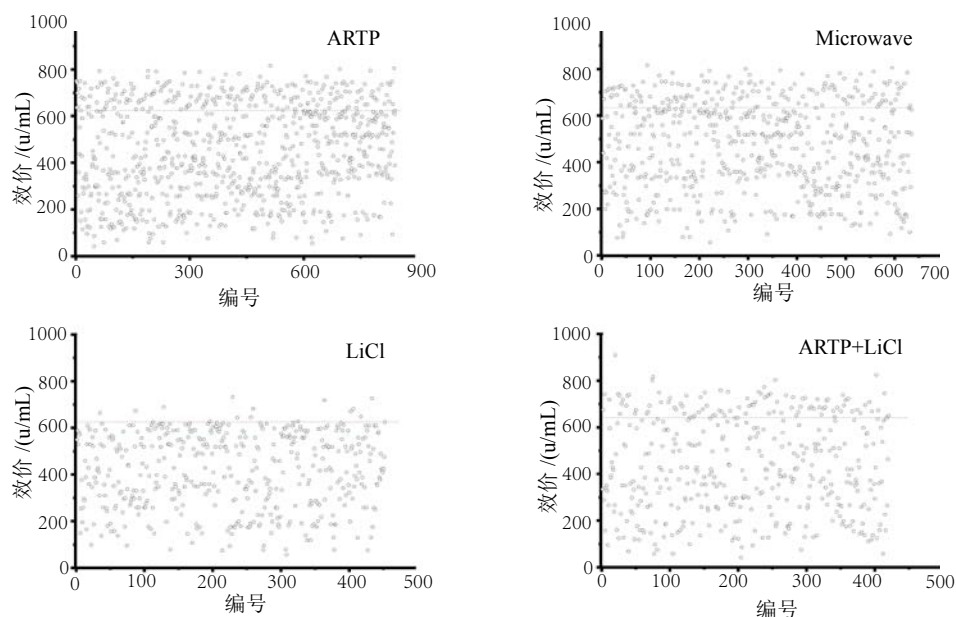


图8 4种不同诱变方式的24孔板初筛结果

Fig. 8 The results of 4 different mutation methods with 24 MTPs in preliminary screening process

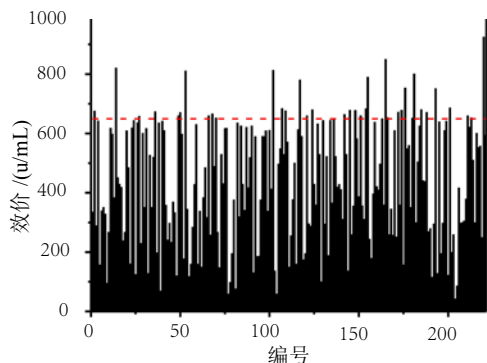


图 9 4 种不同诱变方式的摇瓶复筛结果
Fig. 9 The results of 4 different mutation methods with shake flask in rescreeing process

表 3 不同诱变方式的初筛数据
Tab. 3 The data summary of different mutation methods in preliminary screening process

诱变方式	致死率/%	正突变率/%	诱变菌株数	效价/(u/mL)	提高量/%
ARTP	92	23	841	821±12.6	36
微波	90	20	623	793±16.9	30
LiCl	10	4	452	732±12.8	25
ARTP+LiCl	90	33	420	925±24.1	48

18 株和 139 株, 共计 475 株。含量高于对照组含量 10% 的菌株为 221 株。其中 LiCl 诱变方式致死率最低, 致死率仅为 10%。实验结果表明, 在庆大霉素 C_{1a} 菌种诱变中, LiCl 只能作为辅助诱变剂使用且正突变最低。不同诱变方式的正突变株的最高效价分别为 821、793、732 和 925 u/mL, 通过 ARTP 和 LiCl 复合诱变方式获得的突变菌效价最高, 与对照相比产量提高 48%。采用复合诱变 (ARTP+LiCl) 的方式诱变菌株, 正突变率较高。王风芹等^[19]通过 ARTP 和亚硝基胍对兼性厌氧产丁醇芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*) C_2 菌株进行复合诱变, 获得了高产菌株。

通过摇瓶复筛筛选出 10 株效价高于对照组 10% 效价的诱变菌株。其中 ARTP 诱变方式为 2 株, 微波诱变方式为 2 株, LiCl 诱变方式为 1 株, ARTP+LiCl 复合诱变方式为 5 株。通过摇瓶培养进行复筛实验, 在 10 株高产诱变菌株中, ARTP+LiCl 复合诱变方式获得的菌株最高效价 950 u/mL, 编号为 AL324, 比出发菌株提高了 52%, 该诱变方式可以较大概率获得高产菌株。这 10 株诱变菌株编号分别为 A114、A213、W112、W127、L7、AL109、AL120、AL205、AL217 和 AL324。

2.4 高产菌株稳定性验证实验

将复筛得到的 10 株高产菌株进行稳定性验证实

验。将种子培养液按照 10% 的接种量加入发酵摇瓶中进行连续 5 代的培养实验, 验证菌株的稳定性。通过紫外分光光度法快速测定发酵液效价, 结果如图 10 所示: AL324、AL120、AL205 和 AL217 在培养 5 代过程中, 产物效价比较稳定, 可以作为高产菌株进行后续相关研究。A114、A213、W112、W127、L7 和 AL109 在培养 2~3 代之后, 产物效价有大幅度的减少, 其中 A114、A213、W112、AL109 效价与对照组效价 (600 u/mL) 接近, 而 W127、L7 低于对照组效价, 这可能是由于在连续培养过程中菌种产生回复突变造成的^[20]。

2.5 高产菌株 5L 发酵罐验证

由摇瓶复筛的结果可知, AL324 菌株的发酵单位最高, 经过 5 次传代稳定性考察, 产物浓度基本保持在 900 u/mL 以上。而 AL120、AL205、A217 经过 5 次传代虽然发酵效价保持在 800 u/mL, 但是明显低于 AL324 高产菌株。鉴于此, 在 5L 发酵罐上进行验证实验采用出发菌株作为对照组 (control), AL324 作为实验组, 考察高产菌株代谢性能变化。

图 11 为高产菌株与出发菌株过程参数对比曲线图, 分别对比了在 5L 发酵罐培养过程中的菌浓、残糖、OUR、溶氧和庆大霉素 C_{1a} 的发酵单位。由图 11A 可知, 出发菌株与高产菌株在发酵过程中菌浓并没有明显差异; 图 11B 中可知, 高产菌株残糖下降速率明显高于出发菌株, 而在过程曲线图 11C 中也明显看到高产菌株耗氧能力明显强于出发菌株, 在 40h 前高产菌株的 OUR 明显高于出发菌株; 从图 11E 中可以看出 C_{1a} 含量 AL324 菌株明显高于出发菌株, 发酵 96h 后 AL324 效价能达到 1193 u/mL, 比对照组效价提高了 81.3%。综合各曲线图分析表明, 高产菌株 AL324 代谢活性要高于出发菌株。

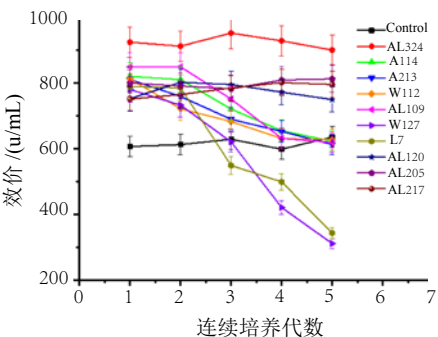


图 10 高产稳定性菌株验证实验
Fig. 10 The genetic stability verification with high yield GM C_{1a} mutants

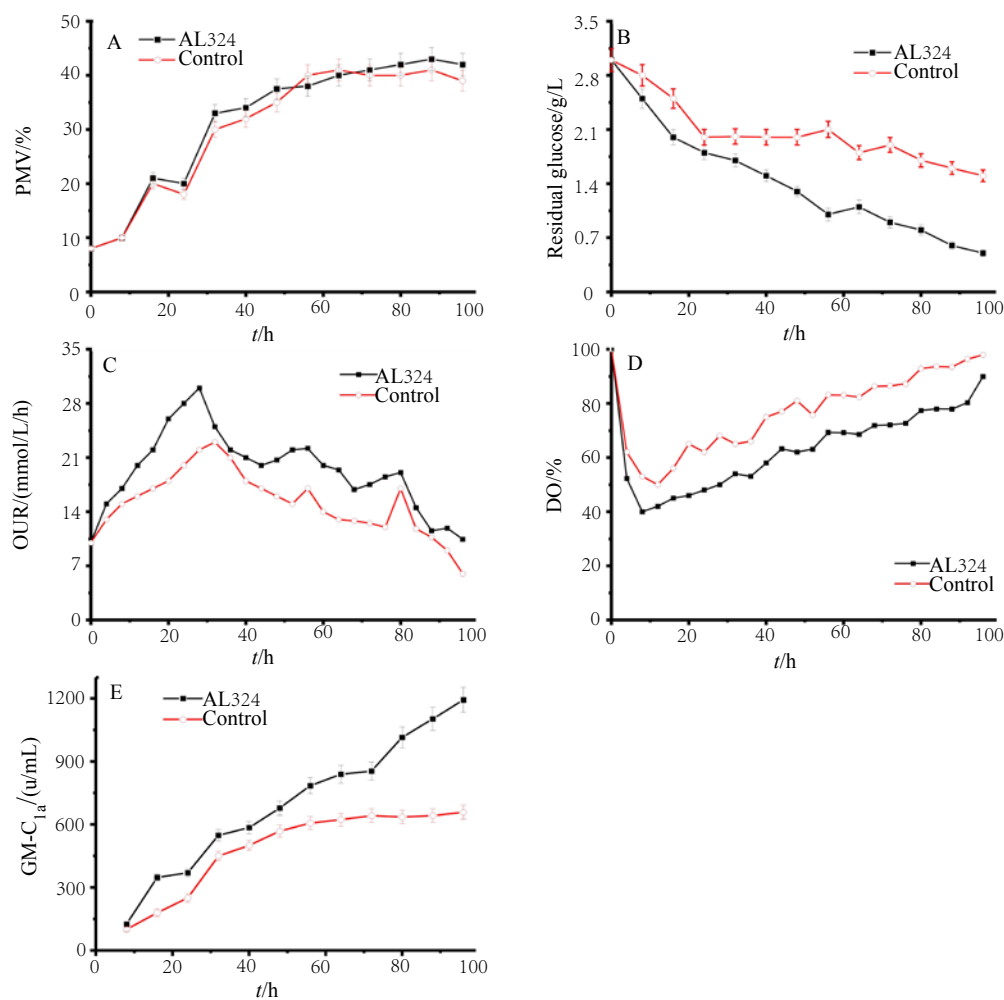


图 11 高产菌株 AL324 与出发菌株过程参数对比图
Fig. 11 The comparison of the process parameter between the high yield mutant of AL324 and the parent strain

3 结论

为了得到高产的庆大霉素 C_{1a} 生产菌株，本论文建立了庆大霉素 C_{1a} 的快速检测方法，在此基础上采用 ARTP 等诱变方法和高通量筛选技术获得了高产稳定的菌株。

(1) 建立了紫外分光光度法测定庆大霉素 C_{1a} 含量的快速检测方法。磷钨酸钠在 248nm 紫外波长条件下有特征吸收峰，磷钨酸钠与庆大霉素 C_{1a} 能发生反应生成白色沉淀物质，通过测定反应上清液的吸光值，可以计算庆大霉素 C_{1a} 的含量。结果表明，反应上清液吸光值与庆大霉素 C_{1a} 效价具有线性关系，相关系数为 0.9978。与高效液相色谱法对比，该方法的相对误差为 3.98%，说明本文建立的庆大霉素 C_{1a} 快速检测方法的有效性。

(2) 考察了庆大霉素 C_{1a} 菌株的不同诱变方法 (ARTP、微波、LiCl 和 ARTP+LiCl)，并通过高通量

筛选获得了高产稳定的菌株。通过对 2336 株菌株的初筛，获得了 221 株产量提高 10% 以上的菌种，通过摇瓶复筛获得了 10 株菌株，其中 ARTP+LiCl 复合诱变产生的 AL324 菌株摇瓶效价提高了 52%，复合诱变的正突变率较高。然后进行稳定性传代实验，获得了 4 株高产稳定性菌株。在 5L 发酵罐验证实验中，AL324 菌株效价比出发菌株提高了 81.3%。

参考文献

[1] Houghton J L, Green K D, Chen W J, *et al.* The future of aminoglycosides: The end or renaissance[J]. *Chembiochem*, 2010, 11(7): 880-902.

[2] 丁碧粉, 张韬, 李继安, 等. 庆大霉素 C_{1a} 生产过程中不同样品的 HPLC 法检测 [J]. *中国医药工业杂志*, 2016, 47(3): 310-315.

[3] 李家泰, 刘健, 张华, 等. 新氨基糖苷类抗生素 89-07 体

- 外抗菌作用研究 [J]. 中国抗生素杂志, 1995, 20(6): 407-411.
- [4] 张淑华, 欧珍蓉, 赵敏, 等. 抗生素 89-07 的体内抗菌作用 [J]. 中国抗生素杂志, 1995, 20(6): 420-424.
- [5] 李兴启, 方耀云, 孙建和, 等. 抗生素 89-07、庆大霉素和阿米卡星的耳毒性比较 [J]. 中国抗生素杂志, 1995, 20(6): 442-447.
- [6] 李培忠, 郑得琪, 沈加弟, 等. 抗生素 89-07 多次给予大鼠的毒性 [J]. 中国抗生素杂志, 1995, 20(6): 459-463.
- [7] Hermann R, Lehmann M, Buchs J. Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 81(2): 178-186.
- [8] Suchland R J, Stamm W E. Simplified microtiter cell culture method of rapid immunotyping of *Chlamydia trachomatis* [J]. *J Clin Microbiol*, 1991, 29(7): 1333-1338.
- [9] Anaissie E, Paetznick V, Bodey G. P. Fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*: Microtiter method that is independent of inoculum size, temperature, and time of reading[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 35(8): 1641-1646.
- [10] Anandi M, Mirtha C, Portaels F, et al. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(11): 3616-3619.
- [11] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 [S]. 北京: 中国医药科技出版社. 二部. 2015: 1325-1326.
- [12] 侯英敏. 等离子体诱变生产 1, 3- 丙二醇菌种的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2006.
- [13] 郑明英, 蔡友华, 陆最青, 等. 常压室温等离子体快速诱变筛选高脯氨酸产率突变株 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(1): 36-40.
- [14] 温利雪, 张翼, 穆军, 等. 产孢海洋真菌等离子体诱变活性突变株筛选改进 [J]. 大连交通大学学报, 2014, 35(4): 87-93.
- [15] 李永泉, 翁醒华. 微波诱变结合化学诱变选育酸性蛋白酶高产菌 [J]. 微生物学报, 1999, 39(2): 181-184.
- [16] 范新蕾, 肖成建, 顾秋亚, 等. ARTP 诱变选育葡萄糖氧化酶高产菌株及发酵条件优化 [J]. 工业微生物, 2015, 45(1): 15-19.
- [17] 陈红, 王春魁, 郭娜, 等. 微波诱变法选育四环类抗生素菌株的探索和应用 [J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(11): 706-707.
- [18] 刘本发, 吴兆亮, 郝冬霞, 等. 紫外分光光度法快速测定庆大霉素发酵液中庆大霉素浓度及其机理 [J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(3): 166-169.
- [19] 王风芹, 原欢, 谢慧, 等. 丁醇高产菌株诱变育种及发酵条件优化研究 [J]. 中国酿造, 2011, 30(5): 84-86.
- [20] 郑佳. 粟酒裂殖酵母编码 Trna^{3'} 末端加工酶基因 *trzl* 回复突变基因的研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2012.