

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.01.04

# 具有万古霉素高产能的东方拟无枝酸菌诱变株的选育研究

陈德刚,牛春,李春玲\*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,银川 750101)

[收稿日期] 2021-09-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 01-0019-08 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 为提高万古霉素(Vancomycin)发酵生产水平,选育出其发酵生产的优良菌株,以东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*)菌株 V1806 作为原始菌株,利用 EMS(甲基磺酸乙酯)、UV(紫外诱变)和 ARTP(常压室温等离子体诱变)等单一诱变、复合诱变的方法,选育出 1 株遗传稳定性好、且对万古霉素耐受性强的菌株 Vua-15,其中试发酵效价达到 7863 mg/L,比原始菌株提高了 74.3%。研究表明,复合诱变对东方拟无枝酸菌菌种选育的效果优于单一诱变,更易选育出符合预期的优良菌株。研究不仅对万古霉素工业化发酵生产具有重要意义,而且为其他产品发酵菌种的选育提供了一定借鉴。

**[关键词]** 万古霉素;高产菌株;诱变;选育

## Screening of *Amycolatopsis orientalis* Mutation Strain for High Vancomycin Yield

CHEN De-gang, NIU Chun, LI Chun-ling\*

(Ningxia Tairui pharmaceutical Company Limited, Yinchuan 750101, China)

Corresponding author: LI Chun-ling, E-mail: chun.niu@tairuiworld.com

**Abstract:** In order to improve the production level of vancomycin fermentation and select the excellent strains for vancomycin fermentation, the strain *Amycolatopsis orientalis* V1806 was used as the original strain, and was treated with EMS mutation, UV mutation, ARTP mutation and compound mutation, respectively. A strain Vua-15 with stable heredity and strong resistance to vancomycin was screened. The test fermentation titer reached 7863 mg/L, which was 74.3% higher than the original strain. The results showed that the effect of compound mutation on the breeding of *Amycolatopsis orientalis* was better than that of single mutation, and it was easier to select excellent strains that met the expectation. This study was not only of great significance to the industrial fermentation of vancomycin, but also provided a reference for the breeding of fermentation strains of other products.

作者简介: 陈德刚,工程师,主要从事微生物发酵等研究工作。

通讯作者: 李春玲。E-mail: chun.niu@tairuiworld.com

**Key words:** vancomycin; high yield strain; mutagenesis; screening

万古霉素(vancomycin)属于糖肽类抗生素,由 McCormick 等于 1956 年从东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*)的发酵液中分离得到,其分子结构由糖基  $\alpha$ -o-vancosamine- $\beta$ -o-glucosul 和肽基(中心七肽核)两部分组成,分子式为  $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}^{[1-2]}$ 。万古霉素具有抗革兰氏阳性菌作用,是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等引起严重感染病症的首选药物,被誉为“人类对付顽固性耐药菌株的最后一道防线”和“王牌抗生素”,在临床上存在广泛的应用<sup>[3-5]</sup>。万古霉素依靠工业化发酵生产,而发酵生产受发酵菌株性能、发酵条件(温度、PH 值、无机盐等)等多种因素的影响,其中发酵菌株在发酵生产过程中起着至关重要的作用,是保障发酵生产产量和质量的前提条件<sup>[6-8]</sup>。

目前,国内万古霉素发酵生产中普遍存在产率不高、质量不稳定等问题,根本原因在于缺少优良的发菌菌株<sup>[9-11]</sup>。因此,亟待开展万古霉素发酵高产菌株的选育研究。阮丽军等<sup>[12]</sup>通过 UV(紫外)诱变,选育出一株效价、万古霉素抗性得到显著提高的突变菌株 *A. orientalis* 6-21。陈代杰等<sup>[13]</sup>运用 UV 诱变、激光诱变、NTG 诱变及其复合诱变,结合卡那霉素、万古霉素和甘油抗性筛选,选育出生产能力极大提高的高产突变株。虽然万古霉素发菌菌株选育已取得长足进步,发酵效价达到 4000  $\mu\text{g/L}$ ,但与发达国家约 10000  $\mu\text{g/L}$  效价水平还存在较大差距,菌株发酵特性还有待进一步提升。鉴于此,本研究以引进保存的产万古霉素的(*Amycolatopsis orientalis*)V-1806 菌株作为原始菌株,利用 EMS(甲基磺酸乙酯)、UV 以及 ARTP(常压室温等离子体诱变)、激光诱变及其复合诱变的方法,对菌株进行诱变处理,选育出优良发菌菌株,以期提升万古霉素发酵水平。根据《中华人民共和国农业农村部公告第 250 号》,万古霉素及其盐、酯在食品动物中禁止使用,此研究亦可为其他产品发菌菌株的选育提供借鉴。

## 1 材料

1.1 材料 原始菌株为万古霉素的东方拟无枝酸

菌(*Amycolatopsis orientalis*)菌株,由本实验室保藏。试剂为国产和国外分析纯;恒温振荡摇床(武汉科学仪器厂,编号:HQL150C)、恒温恒湿培养箱(江苏杰瑞尔电器有限公司,编号:LHP160)、ARTP 等离子体生物育种机(北京思清源生物科技有限公司,编号:ARTP-II 型)、紫外分光光度计(编号:BECKMANDU-600)、高效液相色谱仪(Waters)。

1.2 培养基及培养条件 斜面 and 分离培养基(g/L):葡萄糖 5,麦芽提取物 1,酵母提取物 1,琼脂 20, pH 6.0, 26  $^{\circ}\text{C}$ , 培养 10 d<sup>[7]</sup>。

种瓶培养基(g/L):淀粉 10,葡萄糖 10,蛋白胨 5,酵母粉 3,氯化钠 2,碳酸钙 2, pH7.0,斜面挖块接种于种子培养基中,250 mL 的三角瓶装量 40 mL,置于 26  $^{\circ}\text{C}$  摇床,220 rpm 振荡培养 26 h<sup>[6]</sup>。发酵瓶培养基(M/V):黄豆饼粉 3%,玉米浆 3%,葡萄糖 6%,硫酸铵 0.1%,磷酸氢二钾 0.1%,碳酸钙 0.4%,pH 自然,装量为 500 mL 锥形瓶装量 80 mL,26  $^{\circ}\text{C}$ ,220 rpm 振荡培养<sup>[9]</sup>。

中试(500 L)培养基(g/L):淀粉 20,蔗糖 53,玉米浆 98,酵母粉 10,硫酸铵 4,磷酸二氢钾 1,氯化钙 2,碳酸钙 0.5,纯水 1 L, pH 自然,培养温度 26  $^{\circ}\text{C}$ ,培养湿度 36%,培养时间 7 d<sup>[10]</sup>。

## 2 方法

2.1 孢子液的制备 参考文献<sup>[14]</sup>的方法。取成熟斜面孢子,用 4.5 mL 无菌水冲洗,将冲洗的孢子液用研磨器研磨,然后将菌液用滤纸过滤,离心管收集滤液,稀释至  $1 \times 10^{-6}$  浓度备用。

### 2.2 菌株诱变方法

2.2.1 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变 取 20 mL 的孢子液于灭菌三角瓶(50 mL)中,加入 EMS(终浓度 0.2%),放在摇床上振荡培养,诱变处理时间分别为 1、2、4、6、8、10 h,然后将孢子液均匀涂布于分离培养基上,以未经 EMS 处理的孢子液作为对照,于 26  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 10 d。

2.2.2 紫外线(UV)诱变 取 2 mL 制备好的孢子液放入置有圆形磁片的培养皿中(直径为 9 cm),打开预热 15 W 紫外灯(波长 253.7 nm)30 min,将

离紫外灯管置于培养皿垂直高度 35 cm 处,然后打开皿盖,分别采用照射 0 s(对照)、20 s、40 s、60 s、80 s、100 s 进行处理,盖上皿盖,诱变处理过程在黑暗条件下进行。诱变结束后,再将培养皿在黑暗处条件下放置 2 h,然后吸取孢子液,均匀涂布于分离培养基上,同时取未经诱变的孢子悬液作为对照,于 26 °C 培养箱中培养 10 d,统计致死率。

**2.2.3 常压室温等离子体(ARTP)诱变** ARTP 的工作气体为纯度为 99.99% 的氦气,处理功率为 80 W,等离子体发生器待处理样品与出口之间的距离为 4 mm,气体的流量 9.0 L/min。将准备好的 50  $\mu$ L 孢子液均匀涂布于载片上,然后进行照射,照射的时间分别为 0 s(对照)、50 s、100 s、150 s、200 s、250 s,用 50  $\mu$ L 无菌水冲洗,将照射后的菌液洗脱倒入平皿中,反复洗脱 4 次,均匀涂布在平皿中,同时取未经诱变的孢子悬液作为对照,在 26 °C 培养箱中培养 10 d,统计致死率。

**2.2.4 激光(Laser)诱变** 将 0.5 mL 的孢子悬液倒入专用玻璃小瓶(内有磁力搅拌转子),然后用波长 532 nm、50 mJ/pulse/s 的 YGA 倍频脉冲激光仪照射各小瓶,照射次数分别为 200、400、600、800、1000。对不同照射次数的悬液梯度稀释后涂布平板,同时取未经诱变的孢子悬液作为对照,在 26 °C 培养箱中培养 10 d,统计致死率。

**2.2.5 EMS + UV 诱变** 取 20 mL 的孢子液于灭菌三角瓶(50 mL)中,加入 EMS(终浓度 0.2%),放在摇床上振荡培养,诱变处理 6 h,然后从中取 2 mL 制备好的孢子液放入置有圆形磁片的培养皿中(直径为 9 cm),打开预热 15 W 紫外灯(波长 253.7 nm)30 min,将离紫外灯管置于培养皿垂直高度 35 cm 处,然后打开皿盖,照射 80 s,盖上皿盖,诱变处理过程在黑暗条件下进行。诱变结束后,再将培养皿在黑暗处条件下放置 2 h,然后吸取孢子液,均匀涂布于分离培养基上,同时取未经诱变的孢子悬液作为对照,于 26 °C 培养箱中培养 10 d,统计分析致死率。

**2.2.6 UV + Laser 诱变** 取 2 mL 制备好的孢子液放入置有圆形磁片的培养皿中(直径为 9 cm),

打开预热 15 W 紫外灯(波长 253.7 nm)30 min,将离紫外灯管置于培养皿垂直高度 35 cm 处,然后打开皿盖,照射 80 s,盖上皿盖,诱变处理过程在黑暗条件下进行。诱变结束后,再将培养皿在黑暗处条件下放置 2 h,然后吸取 0.5 mL 的孢子悬液倒入专用玻璃小瓶(内有磁力搅拌转子),然后用波长 532 nm、50 mJ/pulse/s 的 YGA 倍频脉冲激光仪照射各小瓶,照射次数 1000,同时取未经诱变的孢子悬液作为对照,在 26 °C 培养箱中培养 10 d,统计致死率。

**2.2.7 UV + ARTP 诱变** 取 2 mL 制备好的孢子液放入置有圆形磁片的培养皿中(直径为 9 cm),打开预热 15 W 紫外灯(波长 253.7 nm)30 min,将离紫外灯管置于培养皿垂直高度 35 cm 处,然后打开皿盖,照射 80 s,盖上皿盖,诱变处理过程在黑暗条件下进行。诱变结束后,再将培养皿在黑暗处条件下放置 2 h,然后从中将取 50  $\mu$ L 孢子液均匀涂布于载片上,然后进行照射,照射的时间分别为 0 s(对照)、50 s、100 s、150 s、200 s、250 s,用 50  $\mu$ L 无菌水冲洗,将照射后的菌液洗脱倒入平皿中,反复洗脱 4 次,均匀涂布在平皿中,同时取未经诱变的孢子悬液作为对照,在 26 °C 培养箱中培养 10 d,统计致死率。

**2.3 致死率和正突变率** 每个诱变处理 36 孔培养皿,重复 3 次,以未经诱变处理的孢子液为对照,致死率等于(对照处理平皿菌落 - 诱变处理平皿菌落)/对照处理平皿菌落  $\times$  100%;正突变率等于诱变处理效价高于对照 6% 的菌株数/诱变处理的菌株总数  $\times$  100%。利用 SPSS\_21.0 软件(独立样本 T 检验)进行统计分析。

**2.4 菌株遗传稳定性测定** 参考文献<sup>[6]</sup>的方法,将选育出的高产菌株以斜面形式保存,产生孢子后取少许孢子转入另一斜面,此为一代,连续传代 3 次,使用摇瓶检测法测定每一代菌株的万古霉素效价,分析其遗传的稳定性。

**2.5 菌株万古霉素抗性测定** 孢子悬液稀释后涂布于含有 5000、10000、15000 mg/L 万古霉素的平板上,于 29 °C 培养箱倒置培养 18 d,检测菌株的万

古霉素抗性。

2.6  $\text{Cu}^{2+}$  浓度对发酵效价的影响 在摇瓶发酵过程中,向培养基中分别添加 10、20、30、40、50 mg/L 的  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  或  $\text{CaCl}_2$ , 分析不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  对菌株发酵效价的影响。

2.7 HPLC 测定 定量吸取发酵液,加入 7 倍体积的无水乙醇,充分振荡 0.5 h,5000 r/min 离心 15 min,过滤,取上清液,利用 HPLC 测定效价。HPLC 测定的条件:色谱柱 Agilent Extend - C 18 (4.6 mm × 250 mm);流动相:甲醇:0.1% 醋酸 (80:30);检测的波长为 250 nm;柱子温度为 40 °C。MPA 对照品为 Sigma 公司的产品<sup>[8]</sup>。

### 3 结果与分析

3.1 原始菌株的复壮筛选 将引进保存的 12 株菌株进行复壮,经过传代 3 次,结果发现编号 V - 1806 菌株发酵效价最高,为 4402 mg/L,而且菌株的遗传稳定性较好,作为后续诱变处理的原始菌株(表 1)。

表 1 原始菌株的效价及遗传稳定性

Tab 1 Potency and inheritance stability of the rejuvenation strains

菌株编号	代数及效价 (mg/L)		
	第一代	第二代	第三代
V - 1801	4210	3588	3543
V - 1802	3235	3277	2936
V - 1803	3041	2469	2147
V - 1804	3315	2667	2531
V - 1805	4380	2967	2090
V - 1806	4458	4320	4402
V - 1807	3984	3853	3964
V - 1808	4029	3675	3831
V - 1809	3428	2966	3059
V - 1810	4569	3460	3431
V - 1811	4329	4153	3995
V - 1812	4428	4375	4033

### 3.2 菌株诱变及筛选

3.2.1 EMS 诱变 V - 1806 菌株经 EMS 诱变处理,结果发现随着处理时间的增加,菌体致死率呈现升高的趋势,处理时间为 1 h 时,致死率为 24.7%,正突变率为 5.6%;处理时间为 2 h 时,致

死率为 37.2%,正突变率为 6.3%;处理时间为 4 h 时,致死率为 68.5%,正突变率为 13.7%;处理时间为 6 h 时,致死率为 78.5%,正突变率为 19.6%;处理时间为 8 h 时,致死率为 88.5%,正突变率为 14.7%;处理时间为 10 h 时,致死率为 96.4%,正突变率为 16.3%(图 1)。综合考虑,确定诱变处理适宜时间为 6 h。采用 EMS 诱变处理 6 h,初筛出 22 株正突变菌株,经摇瓶效价检测复筛,得到 3 株效价显著升高的菌株(编号为 Ve - 1、Ve - 18、Ve - 21),其效价分别为 4956、5145、5174 mg/L。

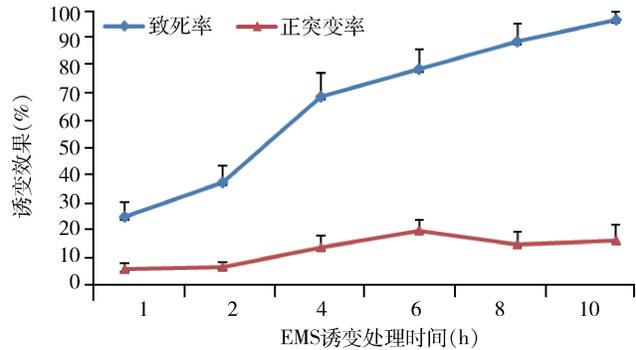


图 1 EMS 诱变不同处理时间的致死率和正突变率

Fig 1 Lethal rate and positive mutation rate of EMS mutagenesis at different treatment times

3.2.2 UV 诱变 V - 1806 菌株经 UV 诱变处理,结果发现随着处理时间的增加,菌体致死率呈现升高的趋势,处理时间为 20 s 时,致死率为 10.9%,正突变率为 2.3%;处理时间为 40 s 时,致死率为 22.3%,正突变率为 5.8%;处理时间为 60 s 时,致死率为 58.5%,正突变率为 17.9%;处理时间为 80 s 时,致死率为 85.8%,正突变率为 20.6%;处理时间为 100 s 时,致死率为 93.1%,正突变率为 19.2%(图 2)。综合考虑,确定诱变处理适宜时间为 80 s。采用 EMS 诱变处理 80 s,初筛出 15 株正突变菌株,经摇瓶效价检测复筛,得到 2 株效价显著升高的菌株(编号为 Vu - 5、Vu - 13),其效价分别为 5256、5533 mg/L。

3.2.3 ARTP 诱变 V - 1806 菌株经 ARTP 诱变处理,结果发现随着处理时间的增加,菌体致死率呈现升高的趋势,处理时间为 50 s 时,致死率为

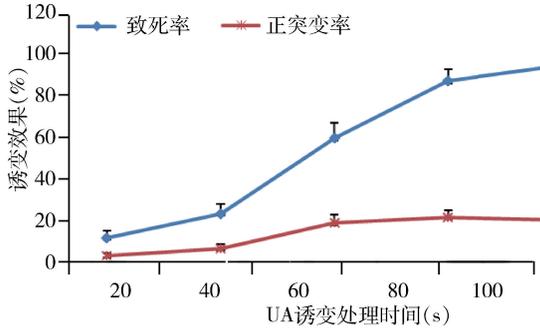


图 2 UV 诱变不同处理时间的致死率和正突变率

Fig 2 Lethal rate and positive mutation rate of UV mutagenesis at different treatment times

8.1%, 正突变率为 32.4%; 处理时间为 100 s 时, 致死率为 32.4%, 正突变率为 12.7%; 处理时间为 150 s 时, 致死率为 58.7%, 正突变率为 12.9%; 处理时间为 200 s 时, 致死率为 88.6%, 正突变率为 20.3%; 处理时间为 250 s 时, 致死率为 90.4%, 正突变率为 16.5% (图 3)。综合考虑, 确定诱变处理适宜时间为 200 s。采用 ARTP 诱变处理 200 s, 初筛出 16 株正突变菌株, 经摇瓶效价检测复筛, 得到 2 株效价显著升高的菌株 (编号为 Va-10、Va-12), 其效价分别为 4856、5424 mg/L。

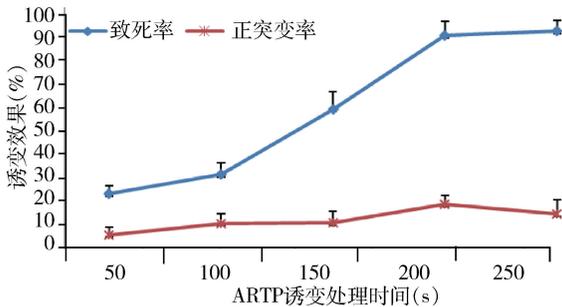


图 3 ARTP 诱变不同处理时间的致死率和正突变率

Fig 3 Lethal rate and positive mutation rate of ARTP mutagenesis at different treatment times

3.2.4 Laser 诱变 V-1806 菌株经激光诱变处理, 结果发现随着照射次数的增加, 菌体致死率呈现升高的趋势, 照射次数为 200 时, 致死率为 14.5%, 正突变率为 3.1%; 照射次数 400 时, 致死率为 23.6%, 正突变率为 7.7%; 照射次数为 600 时, 致死率为 55.6%, 正突变率为 8.9%; 照射次数 800 时, 致死

率为 68.6%, 正突变率为 15.3%; 照射次数为 1000 时, 致死率为 88.4%, 正突变率为 16.5%; (图 4)。综合考虑, 确定诱变照射次数为 1000 次。采用 ARTP 诱变处理 1000 次, 初筛出 18 株正突变菌株, 经摇瓶效价检测复筛, 得到 3 株效价显著升高的菌株 (编号为 Vl-4、Vl-13、Vl-17), 其效价分别为 5044、5438、5103 mg/L。

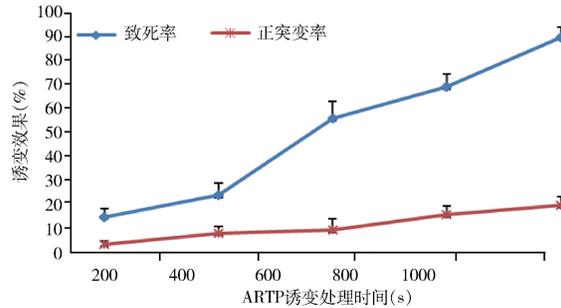


图 4 Laser 诱变不同处理时间的致死率和正突变率

Fig 4 Lethal rate and positive mutation rate of Laser mutagenesis at different treatment times

3.2.5 EMS + UV 诱变 V-1806 菌株经 EMS + UV 复合诱变处理, 菌体致死率为 91.4%, 正突变率为 13.6%。通过初筛出 13 株正突变菌株, 经摇瓶效价检测复筛, 得到 2 株效价显著升高的菌株 (编号为 Veu-4、Veu-12), 其效价分别为 5562、5621 mg/L。

3.2.6 UV + Laser 诱变 V-1806 菌株经 UV + Laser 复合诱变处理, 菌体致死率为 92.9%, 正突变率为 8.6%。通过初筛出 11 株正突变菌株, 经摇瓶效价检测复筛, 得到 1 株效价显著升高的菌株 (编号为 Vul-4), 其效价为 5684 mg/L。

3.2.7 UV + ARTP 诱变 V-1806 菌株经 UV + Laser 复合诱变处理, 菌体致死率为 89.7%, 正突变率为 14.2%。通过初筛出 17 株正突变菌株, 经摇瓶效价检测复筛, 得到 2 株效价显著升高的菌株 (编号为 Vua-4、Vua-15), 其效价分别为 5742、5751 mg/L。

比较分析不同诱变方法的诱变效果, 结果发现, 复合诱变的致死率显著高于单一诱变, 而正突变率低于单一诱变, 但其筛选出的正突变菌株的最高效价显著高于单一诱变。

表 2 不同诱变方法诱变效果的比较

Tab 2 Comparison of mutagenic effects of different mutagenic methods

诱变方法	处理方式	致死率/%	正突变率/%	最高效价 (mg/L)
EMS	6 h	78.5 <sup>e</sup>	19.6 <sup>b</sup>	5174 <sup>e</sup>
UV	80 s	85.8 <sup>d</sup>	20.6 <sup>a</sup>	5533 <sup>c</sup>
ARTP	200 s	88.6 <sup>c</sup>	20.3 <sup>a</sup>	5424 <sup>d</sup>
Laser	1000 次	88.4 <sup>c</sup>	16.5 <sup>c</sup>	5438 <sup>d</sup>
EMS + UV	6 h + 80 s	91.4 <sup>b</sup>	13.6% <sup>e</sup>	5621 <sup>b</sup>
UV + Laser	80 s + 1000 次	92.9 <sup>a</sup>	8.6% <sup>f</sup>	5684 <sup>b</sup>
UV + ARTP	80 s + 200 s	91.7 <sup>b</sup>	14.2% <sup>d</sup>	5751 <sup>a</sup>

同列数据上标字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

3.3 选育菌株遗传稳定性的检测 对获得的优良菌株的遗传稳定性及生长特性进行检测,结果发现菌株 Ve - 21、Vu - 13、Va - 12、Veu - 4、Vua - 4、Vua - 15 的遗传稳定性较好(表 3)。而且 Ve - 21、Veu - 4、Vua - 4、Vua - 15 菌落直径明显增大,呈白色“褶皱”状(表 3、表 4、图 5)。

表 3 优良菌种遗传稳定性分析

Tab 3 Inheritance stability analysis of the excellent strains

菌株编号	代数及效价 (mg/L)		
	第一代	第二代	第三代
Ve - 1	4956	3587	3744
Ve - 18	5154	4089	4039
Ve - 21	5174	5321	5167
Vu - 5	5256	4264	4204
Vu - 13	5533	5479	5466
Va - 10	4856	3372	3369
Va - 12	5424	5465	5375
Vl - 4	5044	3654	3088
Vl - 13	5438	3662	3455
Vl - 17	5103	4654	3699
Veu - 4	5562	5622	5544
Veu - 12	5621	3874	2933
Vul - 4	5684	2966	2702
Vua - 4	5742	5598	5627
Vua - 15	5751	5799	6011

表 4 优良菌种生长特性分析

Tab 4 Analysis of growth characteristics of excellent strains

菌株编号	菌落形态	菌落直径 (mm)	菌落中心颜色
V - 1806	扁平	5.1	灰白色
Ve - 21	白色,褶皱状	6.4	白色
Vu - 13	扁平	4.9	灰白色
Va - 12	扁平	5.3	灰白色
Veu - 4	白色,褶皱状	6.6	白色
Vua - 4	白色,褶皱状	6.8	白色
Vua - 15	白色,褶皱状	6.3	白色



图 5 万古霉素优良菌种菌落形态

Fig 5 Colony morphology of excellent strains for vancomycin yield

3.4 选育菌株万古霉素抗性检测 对菌株 Ve - 21、Vu - 13、Va - 12、Veu - 4、Vua - 4、Vua - 15 的万古霉素进行检测,结果发现,与原始菌株相比, Ve - 21、Veu - 4、Vua - 15 菌株在含万古霉素浓度 5000、10000、15000 mg/L 的培养基上均能较好生长,表明这三株菌株具有较好的万古霉素抗性(表 5)。

3.5  $\text{Cu}^{2+}$  对菌株发酵效价的影响 在摇瓶发酵过程中,向培养基中分别添加不同浓度的  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,结果发现 Ve - 21、Veu - 4、Vua - 15 菌株在发酵效价均有所提高, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  浓度为

40 mg/L 时,这三株菌株发酵效价增加最大(表 6)。

表 5 菌种万古霉素耐受性检测

**Tab 5 Vancomycin tolerance test of excellent strain**

万古霉素浓度 (mg/L)	菌株的编号及其菌落形态						
	V - 1806	Ve - 21	Vu - 13	Va - 12	Ve - 4	Vua - 4	Vua - 15
5000	+++	+++	++	++	+++	++	+++
10000	+	++	+	+	+	-	+
15000	-	+	-	-	+	-	+

+++表示菌落生长非常好,++表示菌落生长的较好,+表示菌落生长的一般,-表示未见菌落生长。

表 6 Cu<sup>2+</sup>对发酵效价的影响

**Tab 6 Effect of Cu<sup>2+</sup> on fermentation potency**

CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O 浓度	菌株的编号及效价(mg/L)		
	Ve - 21	Ve - 4	Vua - 15
0	5240 <sup>d</sup>	5485 <sup>d</sup>	5986 <sup>e</sup>
10	5336 <sup>e</sup>	5589 <sup>d</sup>	6177 <sup>d</sup>
20	5741 <sup>b</sup>	5866 <sup>e</sup>	6458 <sup>e</sup>
30	5815 <sup>b</sup>	6014 <sup>b</sup>	6824 <sup>b</sup>
40	6477 <sup>a</sup>	6942 <sup>a</sup>	7165 <sup>a</sup>
50	5322 <sup>e</sup>	5788 <sup>e</sup>	6534 <sup>e</sup>

同列数据上标字母表示差异显著(p < 0.05)。

3.6 菌株 SA-2 中试发酵性能的检测 以原始菌株 S-225 为对照,对菌株 Ve-21、Ve-4、Vua-15 的中试发酵性能检测进行,结果发现菌株 Vua-15 的效价最高,为 7863 mg/L,较出发菌株 V-1806 的效价 4512 mg/L,提高了 74.3%;而且显著高于 Ve-21、Ve-4 的效价。Vua-15 的发酵液菌丝呈现“舒展网密”,表明其具有较好的发酵生长性能(表 7)。

表 7 菌株中试性能检测

**Tab 7 Pilot fermentation performance of strain**

菌株编号	发酵效价(mg/L)	菌丝形态
V - 1806	4402 <sup>d</sup>	舒展网稀
Ve - 21	6885 <sup>e</sup>	舒展网状
Ve - 4	7244 <sup>b</sup>	舒展网状
Vua - 15	7863 <sup>a</sup>	舒展网密

同列数据上标字母表示差异显著(p < 0.05)。

#### 4 讨论与结论

诱变技术是选育万古霉素优良发酵菌种的主要途径,但目前仅见 UV 诱变、激光诱变相关报道<sup>[12-13]</sup>。本研究采用 EMS、UV、ARTP、Laser 单一诱

变,以及 EMS + UV、UV + Laser、UV + ARTP 复合诱变的方法,选育出了优良东方拟无枝酸菌菌株 Vua-15,极大的提高了菌株发酵效价。就选育效果而言,复合诱变选育的菌株性能明显高于单一诱变,这与陈代杰等<sup>[13]</sup>研究结果类似。其可能的原因是复合诱变产生的突变更多,正突变率更高,其对应的表型可能更丰富,更容易选育出符合预期的优良菌株<sup>[15]</sup>。

东方拟无枝酸菌菌株在发酵过程中易受万古霉素的反馈抑制,因此万古霉素的抗性是其关键选育指标。Vua-15 具有较强的万古霉素抗性,适应发酵过程中万古霉素的积累浓度。同时,Cu<sup>2+</sup>等无机盐离子可以有效的提升东方拟无枝酸菌菌株的万古霉素发酵效价<sup>[16]</sup>。本研究对 Cu<sup>2+</sup>的浓度进行了筛选,确定了 40 mg/L 为适宜的添加浓度,这与陈代杰等<sup>[13]</sup>、彭哲<sup>[16]</sup>的研究结论较一致。研究对菌株 Vua-15 的中试发酵性能进行了初步评价,表明 Vua-15 具有较好的生产应用潜能,后续还需对该菌株的性能开展深入研究,以期为其他产品发酵菌种的选育提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Ramakrishnan N. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(4):605.
- [2] James J M, Alan T B, Alan W B. Vancomycin production in batch and continuous culture[J]. Biotechnology and Bioengineering. 1996, 49(4): 412-420.
- [3] 汪泽卿,高凯旋,沈润博,等. 最后一道防线——万古霉素市售制剂的研究进展[J]. 沈阳药科大学, 2021, 38(1): 95-100.  
Wang Z Q, Gao K X, Shen R P, et al. The last line of defense: recent advances in the research on commercial preparations of vancomycin[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2021, 38(1): 95-100.
- [4] Jovetic S, Zhu Y, Marcone G L, et al. β-Lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense? [J]. Trends in Biotechnology, 28(12): 596-604.
- [5] Jose B, Antoci V, Zeiger A R, et al. Vancomycin covalently bonded to titanium beads kills *Staphylococcus aureus* [J]. Cell

- Chemical Biology, 12(9): 1041 – 8.
- [6] Mertz F P, Doolin L E. The effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of vancomycin[J]. Canadian Journal of Microbiology, 19(2): 263 – 70.
- [7] Reddy G, Padma P N, Rao A B. Selection of micronutrients for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis* using plackett – burman design[J]. European Journal of Pharmaceutical and Medical Research, 2015, 2(3): 737 – 745.
- [8] Zeng X H, Wang S L, Jing K J, *et al.* Use of biodiesel – derived crude glycerol for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis* XMU – VS01[J]. Engineering in Life Sciences, 13(1): 109 – 116.
- [9] 宋盼, 邓佩佩. 万古霉素研究现状及发展[J]. 河北化工, 2012, 35(4): 20 – 22, 34.
- Song P, Deng P P. Status and development of the study of *vancomycin*[J]. Hebei Chemical Industry, 2012, 35(4): 20 – 22, 34.
- [10] 章名春, 张恋英, 王欣, 等. 超低温保藏去甲基万古霉素产生菌的研究[J]. 微生物学报, 1991, 31(1): 82 – 84.
- Zhang M C, Zhang L Y, Wang X, *et al.* Study on ultralow temperature preservation of the *demethyvancomycin* producing strain[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1991, 31(1): 82 – 84.
- [11] 赵颖, 戴梦, 章丽, 等. 去甲万古霉素生产菌株 *Amycolatopsis orientalis* 遗传操作体系的建立[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(6): 35 – 39.
- Zhao Y, Dai M, Zhang L, *et al.* The establishment of genetic manipulation system for *norvancomycin* producing strain *Amycolatopsis orientalis*[J]. Journal of Microbiology, 2016, 36(6): 35 – 39.
- [12] 阮丽军, 赵成建, 金志华, 等. 万古霉素产生菌的选育与发酵培养基优化[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(3): 134 – 136, 143.
- Ruan L J, Zhao C J, Jin Z H, *et al.* Improvement of *vancomycin* producing strain and optimization of the fermentation medium[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2003, 28(3): 134 – 136, 143.
- [13] 陈代杰, 李继安, 邹韵华, 等. 万古霉素的研究开发[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(1): 8 – 10, 56.
- Chen D J, Li J A, Zou Y H, *et al.* Process development of *vancomycin*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2004, 29(1): 8 – 10, 56.
- [14] 李春玲, 丁亚莲, 谢文静, 等. 螺旋霉素高产菌株的选育[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(3): 31 – 37.
- Li C L, Ding Y L, Xie W J, *et al.* Screening of high yield strain for *spiramycin*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(3): 31 – 37.
- [15] 李春玲, 丁亚莲, 谢文静, 等. 不同诱变方法对 TL – 15028 菌株产泰乐菌素相关性能的影响[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(12): 29 – 33.
- Li C L, Ding Y L, Xie W J, *et al.* The effect of different induction mutation method on production performance for *tylosin* in TL – 15028 strain[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(12): 29 – 33.
- [16] 彭哲, 张嗣良. 中心组合设计优化东方拟无枝酸菌发酵生产万古霉素的微量金属离子[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(4): 65 – 69.
- Peng Z, Zhang S L. Optimization of trace metal ions for *vancomycin* – production fermented from *Amycolatopsis orientalis* V – 0704 by central composite design[J]. Chemistry & Bioengineering, 2011, 28(4): 65 – 69.

(编辑:陈希)