

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(7):758-765; 4 July 2013
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

常规诱变结合高通量筛选选育可利霉素高产菌株

刘新星¹, 李萍¹, 赵小峰¹, 王永红², 张嗣良²

¹上海同联医药技术有限公司, 上海 200231

²华东理工大学生物工程学院, 上海 200237

摘要:可利霉素是通过基因工程定向育种技术获得的新型大环内酯类抗生素,是国家一类新药。【目的】为满足工业化生产需要,其工程菌株的发酵水平有待提高。【方法】多种常规诱变技术交替处理和高通量筛选方法选育可利霉素高产菌株,处理方法包括原生质体紫外诱变、DES(硫酸二乙酯)诱变、紫外光复活诱变、缬氨酸抗性筛选和正突变菌株的富集。【结果】高产菌株 WSJ-1-7-49-133-82-43 的摇瓶生物效价比出发菌株 WSJ-1-7-49 提高 56%,500L 中试发酵罐突变菌株效价较出发株高 61%。【结论】说明多轮常规诱变育种结合高通量的筛选方法可以用于工业生产菌株的高效筛选。

关键词:可利霉素,诱变,高通量筛选,缬氨酸抗性

中图分类号:Q815 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2013)07-0758-08

可利霉素(原名必特螺旋霉素,生技霉素)是一种新型的十六元大环内酯类抗生素,它是利用基因工程技术将克隆自碳霉素产生菌的 4'-O-异戊酰基转移酶基因整合到螺旋霉素链霉菌 (*Streptomyces spiramyceticus*) F-21 的染色体上,构建出基因工程菌 WSJ-1-195,通过工程菌细胞内表达的 4'-O-异戊酰基转移酶催化,在螺旋霉素的 4'-O 位置上接入一系列酰基形成的一族多组分酰化螺旋霉素^[1]。组分中异戊酰螺旋霉素比螺旋霉素或其他酰化螺旋霉素有更高的生物活性和稳定性。可利霉素的三期临床研究已经结束,正在向国家食品药品监督管理局申报可利霉素新药证书和试生产批文。

过去十多年来基于工程菌 WSJ-1-195 广泛开展了可利霉素生产和组分优化的发酵过程^[2]和分离纯化技术研究^[3],形成了一套完整的制备工艺路

线,但发酵水平仍然不高,与螺旋霉素发酵相比存在明显差距。选育高产菌株是进一步提高可利霉素发酵水平的根本。目前微生物育种技术已经从诱变、推理、重组技术发展代谢工程、系统生物学和异源生物合成等方法,但传统诱变育种由于其诸多优势仍然是工业生产菌株选育中的最常用的标准方法,如方法简单易行,不需要运用分子生物学工具、不需要代谢模型、不需要知道其遗传或生化背景,只需要有效的突变库获得和精确的定向筛选就可以获得目的表型,但其缺点是耗时和费力、随机性大、容易造成优良特性菌株的漏筛。

Laakel 等^[4]报导在螺旋霉素发酵培养基中添加缬氨酸可以促进其产量增加。江维等^[5]对可利霉素进行添加缬氨酸研究,发现在合成培养基中添加后效价可以增加 45.3%。添加缬氨酸可以促使胞

基金项目:国家重大科技专项(2012YQ15008709)

作者简介:刘新星(1976-),女,湖北蒲圻人,工程师,研究方向为抗生素高通量筛选。Tel: +86-21-54824913; E-mail: 446595315@qq.com

收稿日期:2012-11-30; **修回日期:**2013-02-26

内生成的丙酮酸转化为草酰乙酸, 而草酰乙酸参与丙二酰 CoA 和甲基丙二酰 CoA 的合成, 提供了内酯环合成所需要的三碳前体。缬氨酸是可利霉素产生菌的一种初级代谢产物, 在细胞内受反馈抑制作用, 我们设计了缬氨酸抗性筛选实验, 通过筛选缬氨酸抗性菌株来提高效价。

菌种高通量筛选技术的出现弥补了常规育种的不足, 高通量筛选与常规诱变相结合, 特别适用于以提高次级代谢产物产量为目标的工业生产菌株选育研究。因为次级代谢产物合成产量性状属于数量性状, 受多基因决定, 再加上代谢网络的复杂性和多节点特性, 决定了诱变后的正突变频率相当低, 而且一次突变难有大幅度提高, 只有经多轮处理后才能逐步积累高产性状。因此, 常规诱变育种方法必需要有大规模筛选数量作保证, 甚至为了尽可能减少漏筛现象发生, 要将所有诱变后的样品进行“毫无保留”的彻底筛选。基于上述考虑, 本文设计了多种常规方法交替诱变, 结合高通量筛选技术、缬氨酸抗性模型以及富集正突变株的方法, 对可利霉素工业生产菌开展了大规模筛选研究, 最终获得了满意的工业生产菌株。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基和培养方法: 出发菌株可利霉素基因工程菌 WSJ-1-7 为含异戊酰基转移酶基因的整合型的螺旋霉素链霉菌 (*Streptomyces spiramyceticus*)。培养基: 斜面培养基, 种子培养基, 发酵培养基, 按文献[5]配置; 培养方法按文献[2]。

1.1.1 主要试剂和仪器: 黄豆饼粉来自于沈阳抗生素厂, 淀粉来自河北康欣药业, 鱼粉来自于浙江正大, 缬氨酸, 溶菌酶来自于上海源聚生物科技有限公司。微量培养中用到的 48 孔板, 板盖, 96 孔板购于上海甘薇生物科技有限公司, 孔板离心机为上海安亭科学仪器厂, 孔板培养摇床购于上海离心机械研究所有限公司, Thermo multiskan MK3 酶标仪购于 Thermo Fisher Scientific, FUS-500L 发酵罐为上海国强生化工程设备有限公司。

1.2 缬氨酸抗性菌株筛选

1.2.1 缬氨酸抗性浓度确定: 在分离平皿中分别添加浓度为 0、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1% 和 2% 的缬氨酸, 计算不同浓度缬氨酸对可利霉素产生

菌的致死率, 确定缬氨酸致死浓度。

1.2.2 缬氨酸抗性菌株筛选: 将诱变后的菌悬液涂到添加致死浓度的缬氨酸分离平皿上, 待单菌落长出来后进行筛选, 挑选效价较高, 形态正常的菌落作为下步出发菌株。

1.3 诱变方法

1.3.1 原生质体紫外诱变: 用溶菌酶处理菌丝体, 过滤得到原生质体。将制备得到的原生质体调整到 1000 个/mL, 在紫外灯下照射后稀释涂在再生平板上。

1.3.2 硫酸二乙酯 (DES) 诱变: 斜面菌体刮下打碎后过滤, 加入等体积的 10% 的 DES, 摇床上震荡处理后稀释涂在分离平板上。

1.3.3 紫外光复活诱变: 紫外灯照射 30 s 后光复活 30 s, 交替多次。

1.4 正突变株富集方法

将新鲜菌悬液进行紫外光复活诱变。把诱变后的菌悬液用无菌水稀释后的菌悬液接种到种子液中培养, 28℃ 培养 3d 后 (因接种量较低, 所以种子培养延长 1 天时间), 接种到发酵板中, 其中每个孔中装 1.5 mL 发酵培养基, 发酵板放在摇床上 30℃, 220 r/min 培养 4 d。将培养好的发酵孔板于孔板离心机中离心力 1610 × g 离心 10 min, 上清测可利霉素效价。

正突变株筛选途径: 诱变后菌液 → 接入孔板种子液中 → 转发酵的同时将种子液接入固体培养基孔板上 → 酶标仪分析发酵液效价 → 挑选效价高的菌株。

1.5 高通量深孔板筛选

1.5.1 高通量深孔板筛选过程: 将分离平皿上长好的单菌落接种到 48 孔板中培养 (种子板), 每块板可以筛选 48 个菌落, 种子板培养两天后接发酵板 (考察生产力), 接发酵板的同时接斜面板 (保种)。培养好的发酵板离心取上层发酵液, 在 96 孔板中用比浊法原理测定效价。每块发酵板选 4 株左右菌株传二代斜面, 共 100 株左右, 利用摇瓶进行复筛。

采用的筛选方法是: 自然分离 → 平皿单菌落 → 接入孔板种子液中 → 转发酵的同时将种子液接入固体培养基孔板上 → 酶标仪分析发酵液效价 → 挑选效价高的种子传二代试管斜面 → 用摇瓶进行复筛实验。

1.5.2 可利霉素高通量深孔板筛选操作方法: 将分

离平板上的单菌落用竹针挑入孔板中,其中每个孔中装 1 mL 种子培养基,在摇床上 30℃,220 r/min 培养 48 h,用六通道移液枪每个孔中取 150 μ L 接种到发酵板中,其中每个孔中装 1.5 mL 发酵培养基,同时取 50 μ L 到斜面板上。发酵板放在摇床上 30℃,220 r/min 培养 4 d,斜面板放在培养箱中 37℃ 培养 10 d。

1.5.3 深孔板筛选可利霉素菌株效价的检测方法:根据比浊法原理制作标准曲线。取可利霉素的标准品适量,精密称定,用乙醇溶解再用灭菌水制成 500U/mL 的溶液。用去离子水稀释为 20、16、12、10、8 和 4 U/mL 的溶液。取 30 μ L 标准品加入 270 μ L 细菌培养基中,此培养基已接入 10% 枯草杆菌悬液,使标准品最终浓度分别为 0.4、0.8、1.0、1.2 和 2.0 U/mL。96 深孔板 37℃,220 r/min 培养 4 h 后 630 nm 测定吸光值。以剂量浓度 (C) 的对数为横坐标,吸光度 (A) 为纵坐标,绘制标准曲线。

样品检测:将培养好的发酵孔板于孔板离心机中离心力 1610 \times g 离心 10 min。将上清稀释十倍。取 30 μ L 稀释后上清加入检测培养基中,96 深孔板 37℃,220 r/min 培养 4 h 后 630 nm 测定吸光值。根据吸光值计算可利霉素效价。

1.6 发酵罐中试

新鲜斜面接入种子培养基中,装量为 50 mL/500 mL 摇瓶,28℃,220 r/min 培养 48 h 后合并种子液,接 3 L 种子到 70 L 种子培养基中,在 100 L 自控发酵罐里培养,控制温度为 28℃,pH 自然,搅拌转速为 350 r/min。培养 48 h 后接入 300 L 发酵培养基中,在 500 L 自控发酵罐中培养,从 16 h 开始测定效价和过程代谢数据。

2 结果

2.1 缬氨酸抗性高产菌株诱变筛选总流程图

出发菌株 WSJ-1-7 筛选流程图见图 1。

出发菌株通过紫外诱变先获得缬氨酸抗性菌株 WSJ-1-7-49,缬氨酸抗性株 WSJ-1-7-49 进行原生质体紫外诱变后,筛选得到菌株 WSJ-1-7-49-133,再进行硫酸二乙酯诱变,筛选得到菌株 WSJ-1-7-49-133-82。

菌株 WSJ-1-7-49-133-82 在紫外光复活诱变后进行微量培养,将优势菌株富集,然后将每一个微孔

中的培养液当成一个菌株,进行高通量筛选,复筛得到菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18,从理论上讲菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18 为混合菌株,将其进行自然分离,最后筛选得到高产菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18-43,该菌株生产代谢稳定,满足工业生产需要。

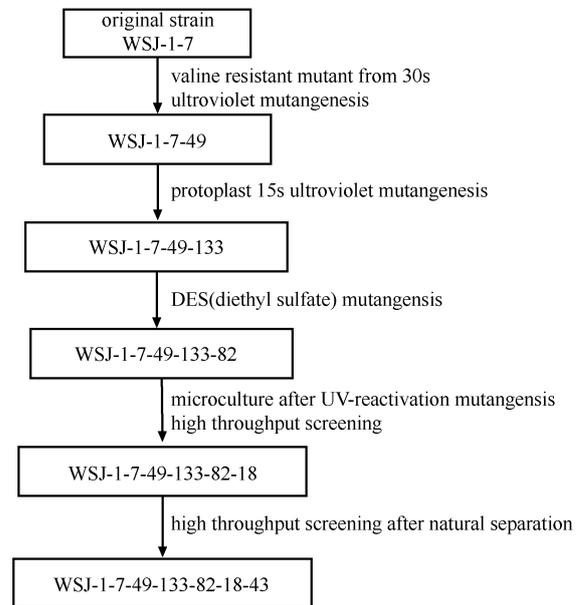


图 1. 菌株诱变筛选流程图

Figure 1. The flow-chart of mutagenesis and screen.

2.2 可利霉素缬氨酸抗性生产菌株的诱变和高通量深孔板筛选

2.2.1 缬氨酸抗性浓度实验:在分离平板中添加不同浓度的缬氨酸,计算可利霉素产生菌的致死率。如表 1 所示,在 1% 缬氨酸的培养基上,可利霉素产生菌的致死率 82.2%,在含 2% 缬氨酸的培养基上,可利霉素产生菌的致死率为 97.2%,可以确定缬氨酸致死浓度为 2%。

表 1. 不同浓度缬氨酸对可利霉素产生菌的致死率

Table 1. The fatal rate of the kelimycin producing strain with different concentrations of valine

Concentration/%	Cfm * 100	Fatality rate/%
0	180	
0.01	157	12.8
0.05	112	37.8
0.1	96	46.7
0.5	67	62.8
1	32	82.2
2	5	97.2

以可利霉素基因工程菌 WSJ-1-7 为出发株,紫外诱变 60s 后涂在缬氨酸浓度为 2% 的抗性平板

上,筛选到抗性株 WSJ-1-7-49,其生长特性和外观与出发株接近。

2.2.2 可利霉素高产菌株多轮诱变筛选:紫外诱变得到的抗性菌株很容易产生回复突变,我们继续通过原生质体紫外诱变和硫酸二乙酯 (DES) 诱变方法,进行多轮诱变筛选,得到性状稳定的缬氨酸抗性菌株。

(1)原生质体紫外诱变和菌株筛选:没有了细胞壁的原生质体会对诱变剂更加敏感,常规的原生质体再生也会产生突变株。将缬氨酸抗性株 WSJ-1-7-49 进行原生质体紫外诱变后,在含缬氨酸 2% 的抗性平板上培养,初筛抗性菌株 200 株,从中挑选 50 株进行复筛,再从 50 株中选出 4 株,其中 WSJ-1-7-49-133 作为第二次出发菌株。

(2)硫酸二乙酯 (DES) 诱变和菌株筛选:DES 处理时间为 30 min 进行诱变实验。DES 诱变初筛菌株 200 株,从中挑选 50 株进行复筛,再从 50 株中选出 4 株,其中 WSJ-1-7-49-133-82 作为下次出发菌株。

2.3 紫外光复活诱变后缬氨酸抗性菌株富集筛选和高通量筛选实验

2.3.1 缬氨酸抗性菌株富集和筛选:在富集培养过程中,可观察到种子液逐渐变得浑浊,说明菌丝开始生长,抗性菌株开始富集。培养 96h 后,抗性菌株在深孔板中富集。

筛选富集培养后的菌株数量为 1000 株,以出发菌株 WSJ-1-7-49-133-82 的效价为对照,计算筛选后的菌株的突变率,做菌株突变率分布散点图 (图 2-A)。

从 1000 株菌株中挑选 20 株进行复筛,最后得到高产菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18。

2.3.2 高产量抗性混合菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18 自然分离:从理论上讲,菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18 为混合菌株,要进行自然分离筛选实验,进一步获得单克隆生产菌株,有利于高效菌株在生产上的稳定性。

此次初筛是通过高通量深孔板进行分离筛选。将菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18 进行平皿自然分离,在平皿培养基中培养得到单菌落,挑选 1000 株单菌落。

仍以菌株 WSJ-1-7-49-133-82 的效价为对照,计算筛选后的菌株的,来做菌株突变率分布散点图

(图 2-B)。

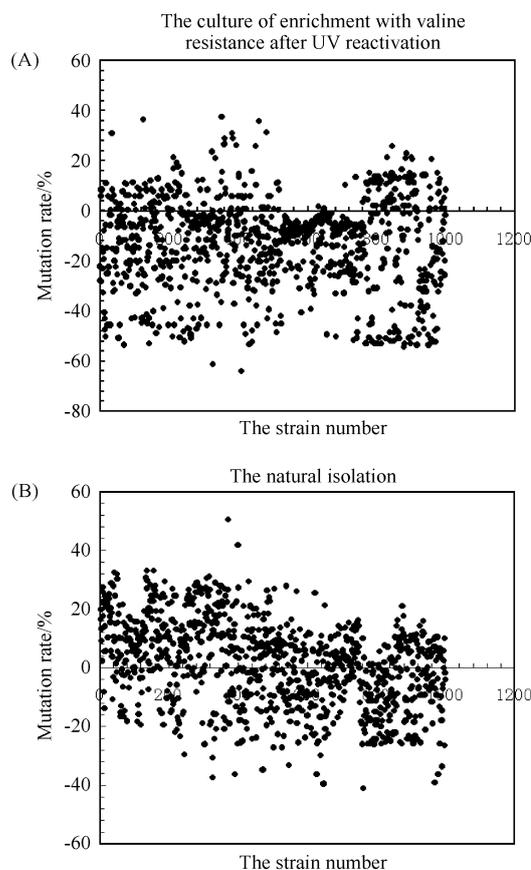


图 2. 深孔板初筛后菌株突变率散点图

Figure 2. Scatter diagram of the strain mutation rate in deep-well plate.

从图 2-A 可以看出,菌株 WSJ-1-7-49-133-82 经过紫外光复活诱变微量培养后,负突变率的菌株比正突变率的菌株要多,且突变率突变幅度较大,大部分在 40%,而正突变率的菌株大部分在 20% 范围内。

通过高通量筛选得到效价较高,形态正常的菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18,对其进行自然分离,从平皿中挑选 1000 株单菌落进行筛选。初筛数据如图 2-B。自然分离的单菌落效价分布大部分都在 WSJ-1-7-49-133-82 菌株效价的周围,效价变化幅度大部分在 20% 左右。

由此可以看出诱变和富集培养可以增加菌株的突变率,导致菌株的生产效价变化幅度较大。

2.3.3 复筛考察:从 WSJ-1-7-49-133-82-18 自然分离初筛菌株 1000 株中挑选出 100 株传到固体试管斜面上进行摇瓶筛选。最后挑选出 10 株连续传代 3 次做稳定性考察。生产性状表现稳定的菌株比较

适合生产。

10 个菌株 3 次传代考察稳定性, 各代效价比较见图 3。从图 3 可知 WSJ-1-7-49-133-82-18-43, WSJ-

1-7-49-133-82-18-49 菌株适合生产。其它几个菌株在第 1 代时效价较高, 继续传代后效价下降, 不适合生产。

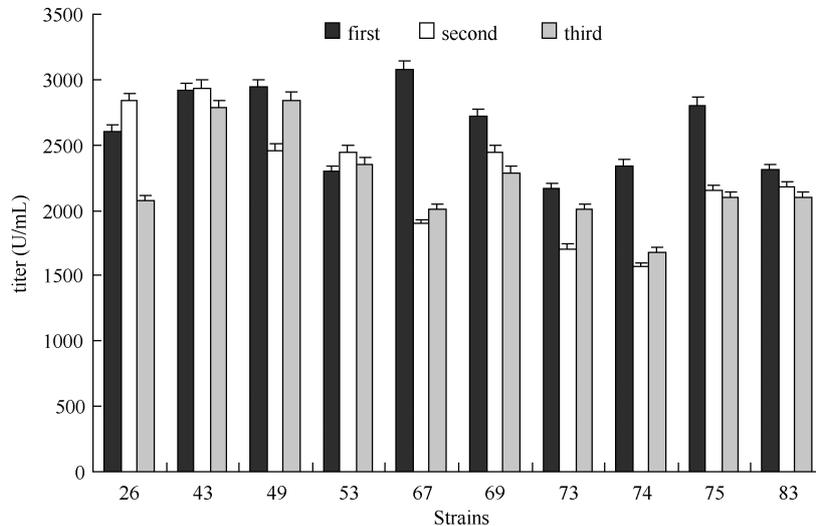


图 3. WSJ-1-7-49-133-82-18 自然分离后复筛菌株稳定性考察

Figure 3. The stability of the rescreen strains after the natural isolation.

2.4 突变株重复验证和 500 L 发酵罐实验

2.4.1 突变株验证: 图 4 比较了菌株 WSJ-1-7-49 到 WSJ-1-7-49-133-82-18-43 各代筛选菌株的摇瓶复筛效价。

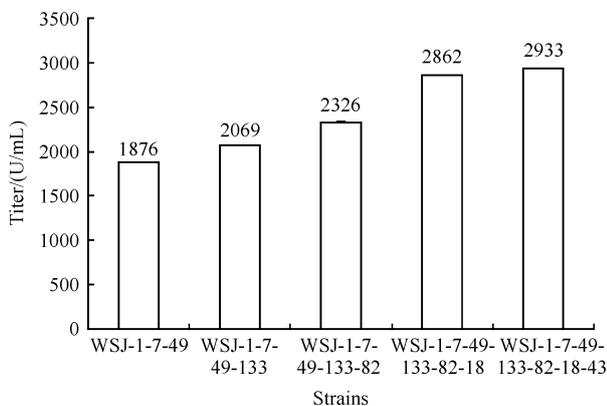


图 4. 菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18-43 各代的复筛效价

Figure 4. The rescreen titer of the different generation strains.

从图 4 可以看出, 缬氨酸抗性菌株 WSJ-1-7-49 经过多轮次诱变和筛选, 效价有了大幅度的提高。菌株 WSJ-1-7-49-133-82-18-43 的摇瓶效价比出发菌株提高了 56%。

第 1 次原生质体紫外诱变后效价提高了 10%, 第 2 次 DES 诱变效价提高了 12.4%, 第 3 次紫外光复活诱变后效价又提高了 23%。最后一次自然分

离效价提高 2%。自然分离主要是为了筛选稳定性菌株。尤其是第 3 次诱变结合了优势菌株富集培养和孔板高通量筛选, 获得高产菌株的机率增大, 而且高产菌株的效价生产力提高幅度为 23%, 比前 2 次的诱变筛选提高幅度要大。

2.4.2 500 L 发酵罐实验: 对出发株 WSJ-1-7-49 与突变株 WSJ-1-7-49-133-82-43 在 500 L 发酵罐中发酵过程参数进行了比较。

从图 5 可以看出, 发酵 112 h 时, 出发株 WSJ-1-7-49 的效价是 1632 U/mL, 突变株 WSJ-1-7-49-133-82-43 的效价是 2629 U/mL, 效价提高了 61%。

从图 5 的氨基氮变化曲线可以看出。突变株在发酵前 40 h 内氨基氮值下降很快, 从 72 mg/100 mL 下降到 20 mg/100 mL 左右。此时大量的氨基氮用来提供菌体生长所需的氮源, 在 52 h 后氨基氮值轻微下降, 此时菌体已经停止生长进入次级生长阶段, 从产物曲线也可以看出, 此时可利霉素合成增长迅速。因此突变株在 40 h 前其氨基氮利用比出发株要快, 而且其最终氨基氮平衡值比出发株要略低, 说明突变株利用氮源的能力比出发株要强。

从图 6 可以看出两者的糖耗和 pH 曲线有很大差别。从糖耗曲线来看, 突变株在 28 h 前糖耗迅速, 从 6.32 g/L 下降到 4.02 g/L。说明突变株利用

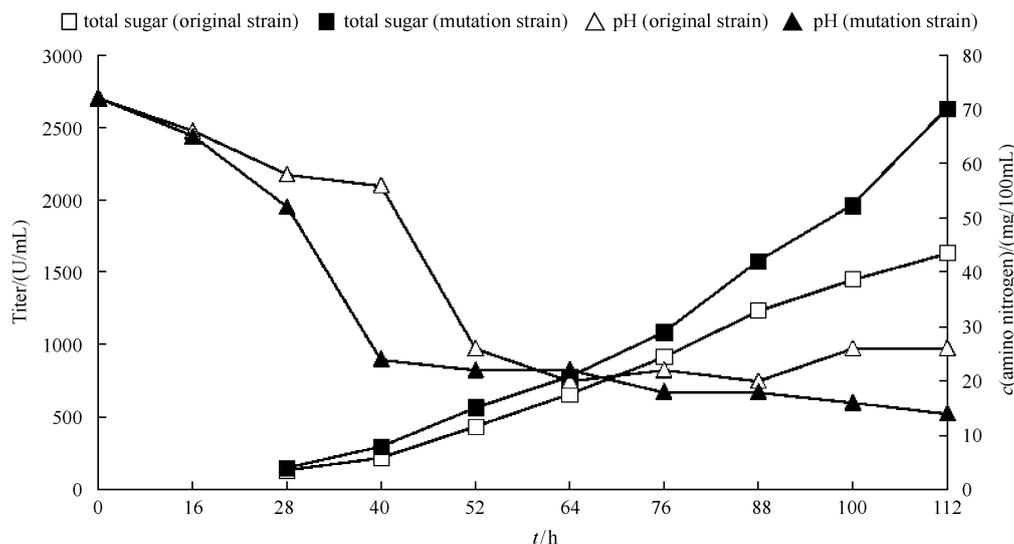


图 5. 出发株和突变株在 500L 发酵罐中的效价和氨氮曲线

Figure 5. Profiles of ammonia nitrogen and potency of the original strain and the mutation strain in the 500L pilot fermenter.

碳源能力比出发株要强。突变株发酵时的 pH 值比出发株要高。

从两个菌株的生产代谢曲线来看,突变株在前期

对碳源和氮源的利用比出发株要强,发酵液的 pH 比出发株要高,效价比出发株提高了 61%。有条件可以进一步研究两个菌株内缬氨酸的含量及代谢图谱。

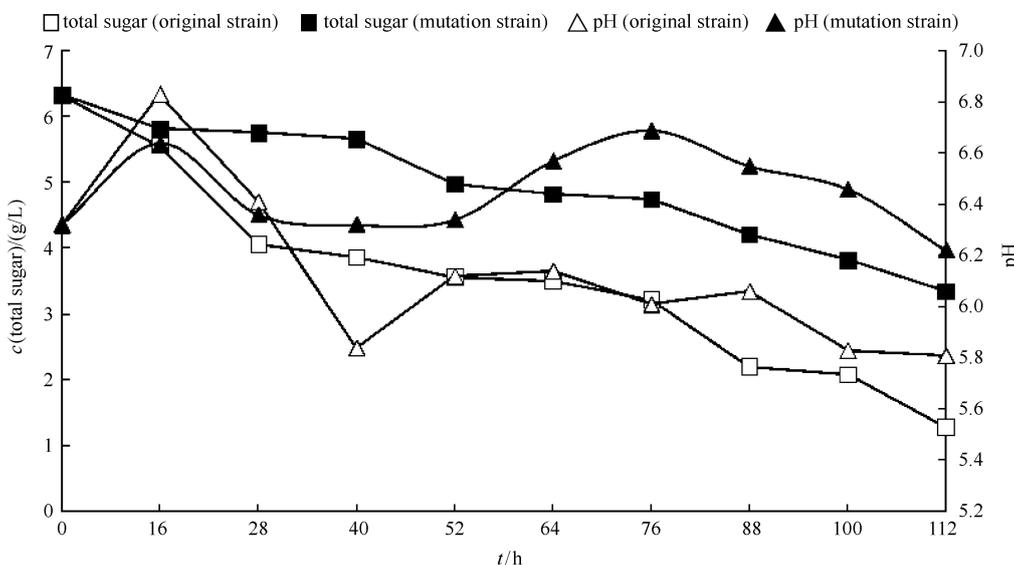


图 6. 出发株和突变株在 500 L 发酵罐中的 pH 和糖耗曲线

Figure 6. Profiles of pH and total sugar of the original strain and the mutation strain in 500L pilot fermenter.

3 结论和讨论

从 Luria 等^[6]的波动实验证明了突变结果和原因的不对应性,如果每份菌液中只含有一个菌落时,

菌落的差异性就可以体现出来了。根据上面的实验原理,我们设计了缬氨酸抗性菌株富集实验。把诱变后的菌悬液尽量细分后接种到种子液中培养,这样菌悬液中具有缬氨酸抗性的菌株就会成为优势菌株。把每个孔板里的菌液当成一个菌株,进行初筛。

同时将培养好的种子液接种到固体培养基上,进一步增殖优势菌株。固体培养基上效价高的菌株作为出发,进行自然分离,得到具有缬氨酸抗性的高产菌株。

从发酵罐上的生产曲线可以看出突变株和出发株在 76 h 前的生产能力相差并不大,但从 76h 后,突变株的生产能力增长很快。该菌株是通过缬氨酸抗性筛选出来的,在缬氨酸代谢途径中,缬氨酸是缬氨酸合成代谢途径的第一个酶——草酰乙酸合酶的反馈抑制剂,如果能够解除反馈抑制,就能增加 L-缬氨酸的浓度。在甲基丙二酰 CoA 转羧基酶途径中,甲基丙二酰 CoA 转羧基酶将缬氨酸分解生成丙酰 CoA 和丁酰 CoA,它们是合成内酯环所需要的直接三碳前体。因此三碳前体供给的增加可能是效价提高的主要原因。

Wolfgang 等^[7]在 96 孔板中研究了链霉菌的生长和次级代谢情况,结果证明链霉菌在 1 mL 微量培养时的生物量生长及次级产物代谢情况和摇瓶发酵罐相似。我们对可利霉素生产菌在 48 孔板中培养情况进行考察,研究表明深孔板可以用来培养链霉菌。在多轮诱变的筛选中,多次使用到了深孔板培养,并进行筛选,提高了筛选量。

通过对缬氨酸抗性出发株 WSJ-1-7-49 进行一系列的诱变和筛选,总共初筛菌株数量为 2400 株左右,最后获得产量提高达 50% 以上的优良菌。突变株 WSJ-1-7-49-133-82-43 比出发株摇瓶效价提高了 56%,500 L 中试发酵罐上生产能力提高了 61%。这表明通过常规的诱变育种结合理性设计的筛选方法是可以得到生产能力大幅提高的基因工程菌突变菌株。本研究利用遗传学的经典实验波动原理作为设计筛选方法的基础。在各培养小孔中,只要其中一个细胞具有所需要的抗性基因,进行培养就能使该细胞获得增殖优势。常规实验用的摇瓶做不到这一点,因为摇瓶的装量大,如果只接几个细胞进去的话是很难生长起来的,也很难做到对诱变所获得的细胞库进行完全无漏筛选。另外,育种工作中的筛选通量也是决定育种结果的关键。在第 3 轮筛选实验中利用到的深孔板筛选是进行高通量筛选的基础,也是现在国内外高通量研究的热点。本实验研究结果说明利用深孔板进行微生物次级代谢产物生产菌株筛选是可行的。当然要真正达到国外的高通量筛选工作站筛选通量还有很多工作要做^[8-9]。

致谢 本项目得到中国科学院上海生命科学研究院植物生态研究所郝玉有老师的支持,以及同联药业的蒋智慧、武桂华、杨忠国等人在实验中的帮助,再次表示感谢!

参考文献

- [1] Shang G, Dai J, Wang Y. Construction of stable bioengineered strain of biotechmycin. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1999,15(2):171-175. (in Chinese)
尚广东,戴剑滢,王以光. 生技霉素稳定型基因工程菌的构建. *生物工程学报*, 1999,15(2):171-175.
- [2] Dai J, Wang Y, Liu Y, Xiao C, Tong Z, Chu J, Zhang S, Lv G, Wang Y. Study on the fermentation of genetically engineersd strain of biotechmycin in fermentor. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2005, 30(6): 324-327. (in Chinese)
戴剑滢,王永红,刘玉伟,肖慈英,佟祖佑,储炬,张嗣良,律光耀,王以光. 必特螺旋霉素基因工程菌发酵参数的研究. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(6): 324-327.
- [3] You X, Chen K, Zhu J. Effect of temperature and pH value on the stability of Bitespiramycin in the process of separation and purification. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2008, 31(9): 12-14. (in Chinese)
游旭,陈葵,朱家文. 分离纯化过程中温度和 pH 对必特螺旋霉素稳定性的影响. *中国医药工业杂志*, 2008, 31(9): 12-14.
- [4] Laakel M, Lebrihi A, Lebrihi A, khaoua S, Schneider F, Lefebvre G, Germain P. Relationship between valine, fatty acids, and spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1994; 40(8): 672-676.
- [5] Jiang W, Wang Y, Zhuang Y, Hao Y, Chu J. Effect of valine on the biosynthesis of biotechspiramycin in chemically defined culture. *Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2008, 34(1): 53-57. (in Chinese)
江维,王永红,庄英萍,郝玉有,储炬. 缬氨酸对必特螺旋霉素生物合成的影响. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2008, 34(1): 53-57.
- [6] 周德庆. *微生物学教程*. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 204-205.
- [7] Minas W, James E Bailey, Duetz W. *Streptomyces in micro-cultures: Growth, production of secondary*

- metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 78: 297-305.
- [8] Godfrey WL, Ford D Berry. Automation of fermentation, sample preparation and assay of recombinant microorganisms. *Advances in Laboratory Automation Robotics*, 1989, 5:101-113.
- [9] Godfrey OW, Landis P, Raas A. The application of a robotic workstation to the handling of microbial colonies. *Advances in Laboratory Automation Robotics* 1988, 6:161-174.

Rational screen of high Kelimycin-producing strain by combined conventional mutagenesis and high-throughput screen method

Xinxing Liu^{1*}, Ping Li¹, Xiaofeng Zhao¹, Yonghong Wang², Siliang Zhang²

¹Shanghai Tonglian Pharmaceutical Technology Company Limited, Shanghai 200231, China

²East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Kelimycin, is a new macrolide antibiotic drug obtained through genetic engineering approaches. With 4"-*O*-isovalerylspiramycins as the major components, was produced by genetically engineered *Streptomyces spiramyceticus* transformed with 4"-*O*-acyltransferase gene from *S. mycarofaciens*. [**Objective**] Improve the efficiency of strain fermentation, to meet the needs of industrial production. [**Methods**] The enhanced kelimycin-producing strain was obtained by applying various conventional mutagenesis approaches, and high-throughput screen methods, including protoplast mutagenesis by ultraviolet, mutagenesis by diethyl sulfate and UV-reactivation, valine content resistance screen and enrichment of improved strains. A strategy for positive mutant enrichment was developed after mutagenesis and before high-throughput screen. [**Results**] Finally, the high-producing strain WSJ-1-7-49-133-82-18-43 was obtained and its potency in shake flask increased by 56% compared to the original strain. The potency in 500 L pilot fermenter increased by 61%. [**Conclusion**] This study shows that the screening industrial production strains can be enhanced effectively by combining multiple conventional mutagenesis and high-throughput screen methods.

Keywords: kelimycin, mutagenesis, high-throughput screen, valine resistance

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Science and Technology Major Projects (2012YQ15008709)

* Corresponding author. Tel: +86-21-54824913; E-mail: 446595315@qq.com

Received: 30 November 2012/Revised: 26 February 2013