

庚基灵菌红素高产菌株 *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072 的常压室温等离子体诱变(ARTP)选育*

苏志维,卢天梅,赵美婷,李艳梅,刘玉英,高程海**,刘永宏**

(广西中医药大学海洋药物研究院,广西南宁 530200)

摘要:为了获得稳定高产庚基灵菌红素(Heptylprodigiosin, HPG)的优势突变菌株,利用常压室温等离子体(Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP)诱变处理海洋细菌 *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072,结合单菌落的颜色、形态及菌体生物量 OD_{600} 进行初筛,再依据突变菌株的庚基灵菌红素产量、生物量及比生长速度,筛选出最佳突变菌株,并对其进行遗传稳定性测试。最终筛选得到一株高产庚基灵菌红素的突变菌株 B13,其庚基灵菌红素产量为 748.91—756.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比出发菌株(384.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$)增加 94.9%,且突变菌株 B13 具有良好的遗传稳定性。本研究表明 ARTP 诱变可明显提高海洋细菌 *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072 的庚基灵菌红素产量,且突变菌株的遗传稳定性较好。

关键词:庚基灵菌红素 常压室温等离子体(ARTP) 诱变育种 分光光度法 筛选鉴定

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2020)05-0503-06

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20201214.001

0 引言

灵菌红素类色素是一类由微生物次级代谢所产生的,具有3个吡咯环母核结构的天然红色素的总称^[1],根据其侧链烷基的长短及环化位置不同可分为多种结构类似物,包括灵菌红素、庚基灵菌红素、十一烷基灵菌红素、环烷基灵菌红素、间环丙菌素、链玉红菌素B等^[2]。灵菌红素是三吡咯类微生物色素的典

型代表,研究人员已分离到很多产灵菌红素类物质的微生物,其中沙雷氏菌^[3]、假单胞菌^[4]、河氏菌^[5]、弧菌^[6]等是主产灵菌红素的菌属。庚基灵菌红素是灵菌红素的结构类似物,其区别仅在于吡咯C环的3-位烷基侧链被庚基取代。目前,仅有为数不多的菌株如 *Pseudovibrio denitrificans*^[7]、*P. magnesorubra*^[8] 和 *Vibrio gazogenes*^[9] 被报道可产庚基灵菌红素,且产量极低,如主产灵菌红素的细菌 *P. mag-*

* 广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281146),广西重点研发计划(桂科 AB19259010),广西八桂学者专项和广西中医药大学校级项目(2017BS042,2018ZD005-A08,2018MS011)资助。

【作者简介】

苏志维(1985—),女,副研究员,主要从事海洋天然产物化学生物学研究。

【**通信作者】

高程海(1979—),男,研究员,主要从事海洋天然药物化学/海洋药用微生物种质资源研究,E-mail:1178740043@qq.com;刘永宏(1972—),男,研究员,主要从事海洋生物活性物质研究,E-mail:yonghongliu@scsio.ac.cn。

【引用本文】

苏志维,卢天梅,赵美婷,等.庚基灵菌红素高产菌株 *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072 的常压室温等离子体诱变(ARTP)选育[J]. 广西科学,2020,27(5):503-508.

SU Z W, LU T M, ZHAO M T, et al. Screening of High-production-heptylprodigiosin Strain from *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072 by ARTP [J]. Guangxi Sciences, 2020, 27(5): 503-508.

nesiorubra, 其产生的庚基灵菌红素的比例仅占总代谢物的 1%^[7]。现代药理研究发现, 灵菌红素及其类似物具有广泛的生物活性, 在医药、化妆品、环境治理、纺织染料等领域具有广阔的应用前景和市场价格^[1,2,10-13]。

目前针对产灵菌红素菌株诱变改良的方法较多, 包括利用紫外或微波技术处理的物理诱变法^[4,14]、用 EMS 处理的化学诱变法^[5] 和复合诱变法^[15] 等。张德伟等^[16] 采用常压室温等离子体 (Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP) 诱变筛选灵菌红素生产菌突变株, 使灵菌红素产量比诱变前提高 1.23 倍。与其他诱变育种手段相比, 利用 ARTP 进行微生物诱变育种可造成 DNA 多样性损伤, 且具有操作简便、成本低、无有毒有害物质参与诱变过程、突变率高等优点, 并易获得遗传稳定性良好的突变株^[17]。目前尚未有关于使用 ARTP 诱变筛选庚基灵菌红素高产菌株的方法报道。前期研究发现一株非致病性的海洋细菌 *Notoacmeibacter* sp. BGM-RC2072 (简称 C9), 其主要代谢产物为庚基灵菌红素, 对高温、紫外线照射具有较强的抗性^[18]。为了使海洋细菌 C9 能更高效、大量合成庚基灵菌红素, 本研究以 C9 为出发菌株, 利用 ARTP 进行诱变, 并结合遗传稳定性测试, 筛选稳定高产庚基灵菌红素的菌株, 为庚基灵菌红素的生产发酵、现代药理研究提供理论依据和技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

酵母粉、麦芽提取粉、葡萄糖和琼脂 (广州环凯微生物科技有限公司), 海盐 (广东盐业集团有限公司), 甲醇、丙酮和盐酸 (国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.2 菌种

海洋细菌 C9 来源于广西防城港怪石滩的海绵, 经 16S RNA 测序鉴定为 *Notoacmeibacter* 属的一个种, 本实验室选育保藏, 编号为 BGMRC2072。

1.1.3 培养基

改良 ISP2 液体培养基 (1 L): 酵母粉 0.2%, 麦芽提取粉 0.2%, 葡萄糖 0.2%, 海盐 3%, 加水溶解后 121℃ 高压灭菌 20 min。固体培养基在此基础上添加 1.3% 琼脂。

1.1.4 主要仪器

高压灭菌锅 (日本 PHCbi, 型号: MLS-371L-

PC), 万分之一电子分析天平 (广州梅特勒, 型号: ML204T), DHG-9246A 电热鼓风干燥箱和 SHP-250 生化培养箱 (上海精宏实验设备有限公司), 可见分光光度计 (上海精科电子有限公司, 型号: 721G), 常温等离子诱变育种仪 (无锡源清天木有限公司, 型号: APTR-lls), 台式高速离心机 (立日本日), 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司, 型号: SW-CJ-2F), 纯水机 (四川优普超纯科技有限公司, 型号: UPH-II-JDZB), 手动移液枪 (艾本德国际贸易有限公司, 型号: Eppendorf-100/1000 型), 恒温振荡器 (苏州精骐有限公司, 型号: IS-RDS3)。

1.2 方法

1.2.1 菌体干重及比生长速率测定

结合 Tu 等^[19] 和 Cao 等^[20] 的方法, 利用分光光度法测定 600 nm 处的光密度值 (OD_{600}) 及菌体干重 (CDW) 来衡量菌体的生长情况。收集待测菌液加入离心管中, 10 000 r/min 快速离心 5 min 收集菌体, 弃上清, 菌体用蒸馏水清洗 3 遍, 100℃ 干燥至恒重。

菌体的比生长速率 $\mu = (\ln W_t - \ln W_0) / T$,

其中, W_0 和 W_t 分别代表进入对数生长期的菌体 OD_{600} 初始值和最终值, T 代表培养时间 (h)。

1.2.2 ARTP 诱变处理方法

(1) ARTP 诱变致死曲线

将菌种从 -80℃ 超低温冰箱中取出, 转接至改良 ISP2 固体培养基平板上, 28℃ 培养 2—3 d 后, 挑取单菌落转接至改良 ISP2 液体培养基中, 于 28℃、180 r/min 培养 30—40 h 至对数生长期。收集菌液, 10 000 r/min 快速离心 5 min, 弃上清, 用 5% 甘油生理盐水重悬, 分光光度计测量菌悬液 OD_{600} 为 0.6—0.8。取 10 μ L 菌悬液至 ARTP 诱变金属载片上进行诱变, 以 99.99% 氦气作为工作气体 (流量 10 mL/min), 在电源功率 115 W 的条件下分别诱变处理 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 105 s。诱变结束后用 5% 甘油生理盐水稀释, 分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 3 个浓度的菌液 100 μ L 涂布于改良 ISP2 固体培养基平板上, 置于 28℃ 培养 2—3 d 后记录每皿菌落数, 计算诱变致死率, 绘制致死率曲线。

$$\text{致死率}(\%) = \frac{\text{对照菌落数} - \text{诱变菌落数}}{\text{对照菌落数}} \times$$

100%。

(2) 诱变时间确定

结合张德伟等^[16] 和 Cao 等^[20] 的方法, 综合考虑不同生长阶段的正负突变率及比生长速率, 确定最佳

诱变时间。若突变菌株的考察指标值(菌落形态、颜色、 OD_{600} 、比生长速率等)高于原始菌株视为正突变,反之则视为负突变。

$$\text{正突变率}(\%) = \frac{\text{正突变菌株数}}{\text{对照菌株数}} \times 100\%$$

1.2.3 突变菌株的筛选

在最佳处理时间下诱变后,根据平板上菌落的生长状况挑取生长大而丰满、色泽鲜艳、菌落直径较大的单菌落,接种于装有 50 mL 改良 ISP2 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃、180 r/min 培养 34 h。利用分光光度法测定菌体的 OD_{600} 并观察菌体颜色、形态进行初筛,再通过测定初筛突变菌株的庚基灵菌红素含量进行复筛,最后将复筛得到的突变菌株接种发酵,以菌体生物量为指标筛选优势突变菌株。

1.2.4 庚基灵菌红素的提取与检测

取 1 mL 培养至 34 h 的菌体发酵液,加入 9 mL 酸性甲醇(pH=3),震荡破壁,10 000 r/min 快速离心 5 min,至菌体基本无色,取上清液稀释至合适浓度后,用分光光度计检测 536 nm 处的吸光值。庚基灵菌红素含量的计算公式为

$$\text{庚基灵菌红素含量}(\mu\text{g/mL}) = (19.076 \times OD_{536} + 0.800) \times D \times V,$$

其中, D 为色素浸提液的稀释倍数, V 为发酵液的体积(mL)。

1.2.5 突变菌株的稳定性

将复筛得的突变菌株接种于改良 ISP2 固体培养基上,连续培养 10 代,再分别转接到改良 ISP2 液体培养基中发酵培养,并测定 10 代菌种的庚基灵菌红素产量,考察突变菌株的遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 ARTP 诱变致死曲线

如图 1 所示,致死率随着诱变时间的增加而增大,当处理时间延长到 40 s 后,ARTP 诱变导致的菌株致死率上升缓慢;当处理时间延长到 50 s 后,菌株的致死率达 90% 以上且趋于平缓;诱变时间大于 60 s 后致死率小幅度回落。现代育种研究表明,致死率达到 90% 以上时,菌株正突变概率大大增加^[21]。但由于在只知致死率大小的情况下,无法判断 50, 60, 70 s 中哪个处理时间点造成正突变的概率最大,因此还需结合这 3 个时间段的正负突变率来综合考虑最终选择的诱变处理时间。

2.2 最佳突变时间

选择菌体生长初始期、对数生长期及稳定期 3 个

阶段综合考察菌体突变情况,结果如图 2 所示,当处理 50 s 时,对数生长期的正突变率最高,但初始期的正突变率较低;当处理 70 s 时,初始期的正突变率最高,但对数生长期的正突变率最低;只有处理时间为 60 s 时,初始期、稳定期、对数生长期的正负突变率都较均衡。经综合考虑,最终选择 60 s 作为突变处理时间。

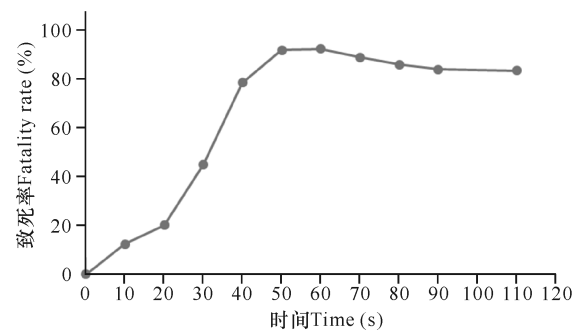


图 1 ARTP 诱变致死率曲线

Fig. 1 Fatality rate curve of ARTP mutagenesis

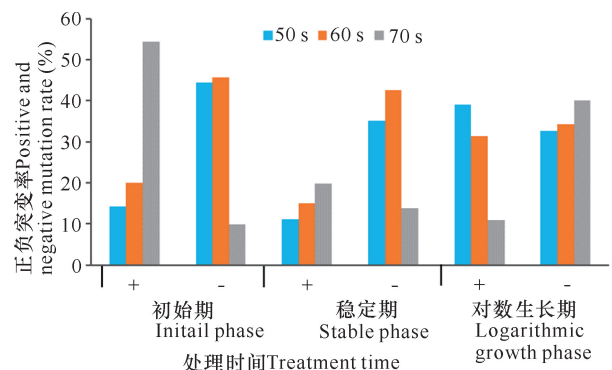


图 2 不同处理时间的正负突变率

Fig. 2 Positive and negative mutation rates at different treatment time

2.3 突变菌株筛选

A、B 两组出发菌株经 ARTP 平行诱变处理 60 s 后,根据菌落生长情况挑取生长大而丰满,色泽鲜艳的菌落,接种发酵后测定菌液 OD_{600} ,并观察菌体颜色深浅,初筛得到 35 株 OD_{600} 高于出发菌株且发酵颜色较深的突变株,测定其庚基灵菌红素含量进行复筛,结果如图 3 所示。根据文献[20],选择与出发菌株相比产量增加 20% 以上的菌株作为正突变筛选范围,可以看出庚基灵菌红素产量超过 20% 的菌株有 A6、A7、A10、A11、A13、B4、B5、B6、B10、B13 共 10 株。

将上述筛选的 10 株突变菌株接种发酵,以生物量为指标筛选优势突变菌株,如图 4a 所示,大多数突变菌株在稳定期 OD_{600} 与比生长速率无较大差别,而

A11 和 B10 这两株突变菌株在稳定期 OD_{600} 和比生长速率明显低于其他平行突变菌株, 生长稳定性欠佳。结合突变菌株菌体生物量(图 4b), 除了突变菌株 A10 的菌体生物量显著性高于出发菌株及其他突变菌株外, 其余的菌株菌体生物量无较大差别, 其中

B5、B13 这 2 株突变菌株略高于出发菌株。综合菌落形态、庚基灵菌红素产量和菌体生物量等因素, 最终选择 B5、B13 这 2 株突变菌株进行下一轮的遗传稳定性复筛。

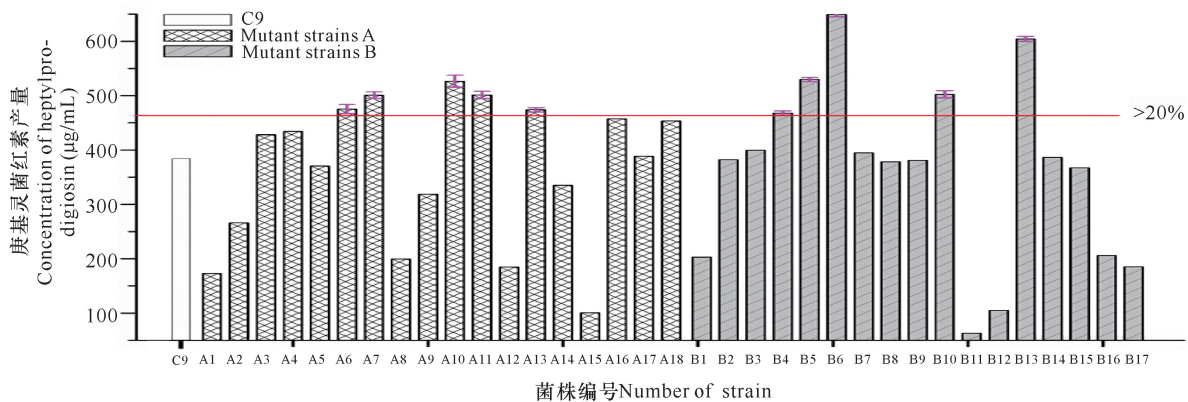
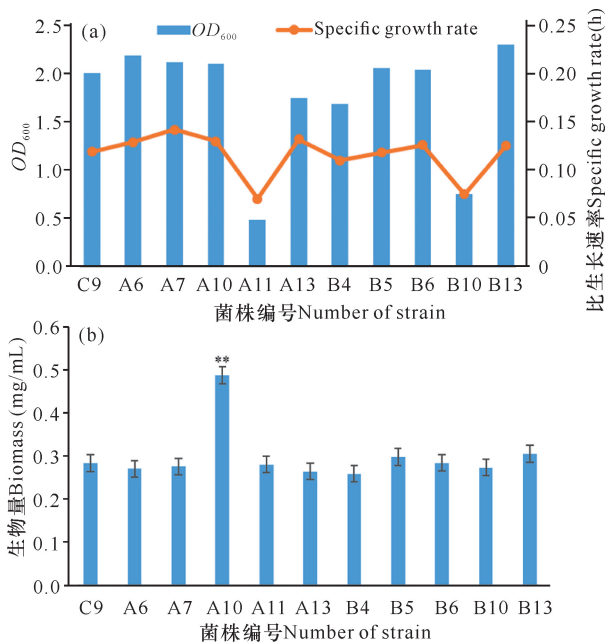


图 3 突变菌株的庚基灵菌红素产量

Fig. 3 Heptylprodigiosin production of mutant strain



** 表示突变菌株 A10 菌体生物量显著高于其他水平突变株
** indicates that the biomass of mutant A10 is significantly higher than that of other mutant strains

图 4 突变菌株的稳定期 OD_{600} 、比生长速率(a)和生物量(b)

Fig. 4 Specific growth rate (a) and biomass (b) of mutant strain

2.4 突变菌株的稳定性

突变菌株 B5 在传代 3 代后菌株的庚基灵菌红素产量开始下降(图 5a), 推测突变菌株 B5 的遗传不稳定; 而突变菌株 B13 的庚基灵菌红素产量相对稳

定在 $748.91\text{--}756.27\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 没有随着传代数的增加而下降(图 5b), 所以最终确定突变菌株 B13 为最佳突变菌株。

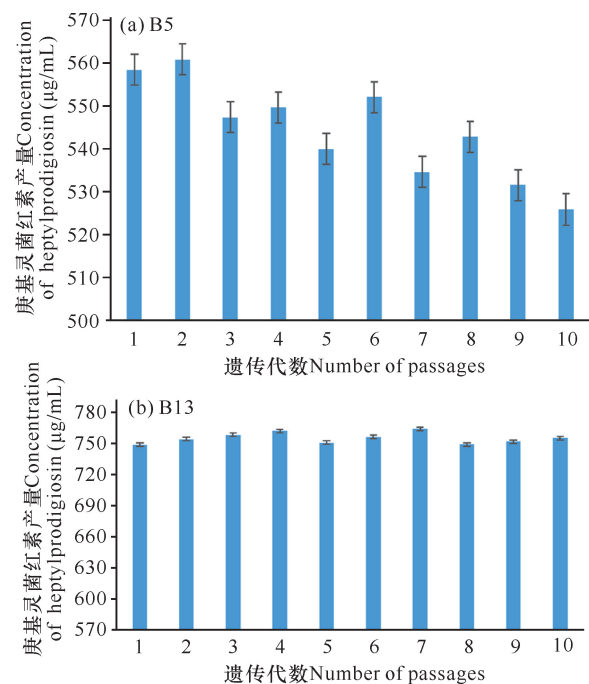


图 5 B5 和 B13 的遗传稳定性

Fig. 5 Genetic stability of B5 and B13

3 讨论

海洋细菌 *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072 代谢过程中主要累积庚基灵菌红素, 尽管生物合成途径未明确, 但课题组前期研究发现庚基灵菌红素在对数

生长期前期产量极低, 培养 16—32 h 菌体进入稳定期后开始大量合成, 并于接种后 40 h 达到最大值, 约为 (384.27 ± 13.25) mg/L, 且这类灵菌红素对高温、紫外线照射具有较强的抗性^[18], 因此提高海洋细菌 *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072 的庚基灵菌红素生产能力具有重要的研究意义。利用 ARTP 诱变技术得到的突变菌株存在正突变和负突变, 为了快速高效地筛选到有利的菌株, 结合菌株生长形态和生物量 (OD_{600}) 进行快速初筛。金玮玥等^[22]通过测定 OD_{600} 并观察菌株颜色深浅进行初筛, 最终结合实验筛选到一株高产类胡萝卜素的菌株。Cao 等^[20]综合考虑菌体密度、比生长速率、菌体干重、脂肪酸产率等最终获得一株总脂肪酸含量明显提高的突变株, 该方法显著提高 ARTP 诱变突变株的筛选效率。本研究通过观察单菌落的形态及颜色, 结合细菌生物量 OD_{600} 进行初筛, 得到 35 株突变株, 再通过测定初筛菌株的庚基灵菌红素的产量, 获得 10 株庚基灵菌红素产量高于出发菌株产量 20% 的突变株, 最后以生物量为指标筛选优势突变菌。结果表明突变菌株的菌体生物量和庚基灵菌红素产量均高于出发菌株, 进一步证明通过菌体生物量、单菌落个体大小及菌体颜色深浅能够提示菌株发生了正突变。

为了更好地发酵生产庚基灵菌红素, 下一步还需对突变菌株开展培养条件优化、发酵罐发酵培养等, 并对突变菌株进行全基因测序分析, 明确庚基灵菌红素的生物合成分子调控机理, 为实现庚基灵菌红素的产业化生产奠定基础。

4 结论

本实验以海洋细菌 *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072 为出发菌株, 利用常压室温等离子体 (ARTP) 进行诱变, 得到一株高产庚基灵菌红素的突变菌株 B13, 其庚基灵菌红素产量为 $748.91 \mu\text{g/mL}$, 而出发菌株为 $384.27 \mu\text{g/mL}$, 突变菌株 B13 比原始菌株的庚基灵菌红素产量增加了 94.9%, 且突变菌株 B13 具有良好的遗传稳定性。

参考文献

[1] STANKOVIC N, SENEROVIC L, ILIC-TOMIC T, et al. Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(9): 3841-3858.
[2] NISHA N, KUMAR K, KUMAR V. Prodigiosin alkaloids: Recent advancements in total synthesis and their

biological potential [J]. RSC Advances, 2015, 5(15): 10899-10920.
[3] WILLIAMSON N R, FINERAN P C, LEEPER F J, et al. The biosynthesis and regulation of bacterial prodigiosins [J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(12): 887-899.
[4] LIU X X, WANG Y J, SUN S Q. Condensing enzyme used in biosynthesis of prodigiosin; CN102653732A [P]. 2012-09-04. <http://d.wanfangdata.com.cn/patent/CN201110051722.6>.
[5] KIM D, LEE J S, PARK Y K, et al. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(4): 937-944.
[6] HARRIS A K, WILLIAMSON N R, SLATER H, et al. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation [J]. Microbiology, 2004, 150(Pt11): 3547-3560.
[7] LAZARO J E H, NITCHEU J, PREDICALA R Z, et al. Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial in vivo and non-mutagenic in vitro [J]. Journal of Natural Toxins, 2002, 11(4): 367-377.
[8] SERTAN-DE G A A, PREDICALA R Z, BERNARDO E B, et al. *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate [J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 277(2): 188-196.
[9] ALIHOSSEINI F, LANGO J, JU K S, et al. Mutation of bacterium *Vibrio gazogenes* for selective preparation of colorants [J]. Biotechnology Progress, 2010, 26(2): 352-360.
[10] SURYAWANSHI R K, PATIL C D, BORASE H P, et al. Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens [J]. International Journal of Cosmetic Science, 2015, 37(1): 98-107.
[11] YANG F, WEI H Y, LI X Q, et al. Isolation and characterization of an algicidal bacterium indigenous to lake Taihu with a red pigment able to lyse *Microcystis aeruginosa* [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2013, 26(2): 148-154.
[12] CHAUHAN K, DALSANIYA P, PATHAK H. Optimization of prodigiosin-type biochrome production and effect of mordants on textile dyeing to improve dye fastness [J]. Fibers and Polymers, 2015, 16(4): 802-808.
[13] GACEM M A, OULD-EL-HADJ-KHELIL A, BOUDJEMAA B, et al. Antimicrobial and antioxidant effects of a forest actinobacterium V002 as new producer of

- spectinabilin, undecylprodigiosin and metacycloprodigiosin [J]. *Current Microbiology*, 2020, 77 (10): 2575-2583.
- [14] TAO J L, WANG X D, SHEN Y L, et al. Strategy for the improvement of prodigiosin production by a *Serratia marcescens* mutant through fed-batch fermentation [J]. *World Journal of Microbiol Biotechnology*, 2005, 21(6/7): 969-972.
- [15] 陶金莉, 沈亚领, 魏东芝, 等. 产灵菌红素沙雷氏菌的诱变育种[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 45-48.
- [16] 张德伟, 薛正莲, 王洲, 等. 一株产灵菌红素菌的筛选及其等离子体诱变[J]. *安徽工程大学学报*, 2016, 31(1): 10-15.
- [17] XIANG J, YANG Y, DABBOUR M, et al. Metabolomic and genomic profiles of *Streptomyces albulus* with a higher ϵ -polylysine production through ARTP mutagenesis [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 162: 107720. DOI:10.1016/j.bej.2020.107720.
- [18] 李小群. 海洋细菌 *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072 鉴定及其次级代谢产物研究[D]. 南宁: 广西大学, 2018.
- [19] TU R J, JIN W B, WANG M, et al. Improving of lipid productivity of the biodiesel promising green microalga *Chlorella pyrenoidosa*, via low-energy ion implantation [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(4): 2159-2166.
- [20] CAO S, ZHOU X, JIN W B, et al. Improving of lipid productivity of the oleaginous microalgae *Chlorella pyrenoidosa* via atmospheric and room temperature plasma (ARTP) [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244(Pt2): 1400-1406.
- [21] WANG L Y, HUANG Z L, LI G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3): 851-858.
- [22] 金玮玥, 宋明凯, 矫文豪, 等. 常压室温等离子体诱变选育类胡萝卜素高产菌株及其性质研究[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(12): 249-255.

Screening of High-production-heptylprodigiosin Strain from *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072 by ARTP

SU Zhiwei, LU Tianmei, ZHAO Meiting, LI Yanmei, LIU Yuying, GAO Chenghai, LIU Yonghong

(Institute of Marine Drugs, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China)

Abstract: In order to obtain a superior mutant strain which could steadily produce high-yielding heptylprodigiosin, the marine bacteria *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072, were mutagenized by Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP). Combining the color, shape and biomass OD_{600} of a single colony for preliminary screening, then according to the heptyl prodigin yield, biomass and specific growth rate of the mutant strain, the best mutant strain was screened out and tested for genetic stability. In the final screening, a mutant strain B13 with high production of heptylprodigiosin was obtained. The production of heptylprodigiosin was 748.91–756.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was 94.9% higher than the original strain (384.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and the mutant strain B13 has good genetic stability. This study shows that ARTP mutagenesis can significantly increase the heptylprodigiosin production of marine bacterium *Notoacmeibacter* sp. BGMRC2072, and the genetic stability of the mutant strain is better.

Key words: heptylprodigiosin (HPG), atmospheric room temperature plasma, selection by mutation, spectrophotometry, screening and identification

责任编辑: 陆雁