

抗真菌抗生素高产菌株的推理选育 及其发酵调控研究*

李淑彬, 杨劲松, 刘 阳, 钟英长, 陈 倩

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 探讨海洋霉菌 M182 菌株对自身次生代谢产物—抗真菌抗生素 M182A 抗性与该抗生素产量的关系; 通过亚硝基胍、亚硝基胍加紫外线复合处理, 选育到对该抗生素抗性有明显提高和抗生素发酵相对效价提高到 244% 的高产突变菌株。稳定性实验表明该突变株遗传稳定性良好。在液体发酵中, 利用天然有机营养物质发酵效果优于合成化合物。合适的温度刺激能促进该物质的形成。

关键词: 抗真菌抗生素; 自身次生代谢产物抗性; 诱变

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 04-0013-04

M182A 是从海洋青霉 M182 中分离出的一种次生代谢产物, 该代谢产物对酵母类真菌、丝状污染真菌及植物病原真菌均具有强烈的抑制作用^[1], 具有良好的开发前景。但原始出发菌株产量较低, 通过遗传育种选育高产菌株, 优化发酵条件, 有利于此类代谢产物的进一步研究和开发利用。

传统的遗传育种方法仍然是微生物育种中行之有效的方法, 但该方法存在工作效率低、随机性大等缺点。近年来, 许多学者提出, 针对代谢产物生物合成途径和发酵调控机制采用理性和半理性的方法进行菌种选育, 可提高筛选效率, 缩短筛选周期, 这在抗生素高产菌株的育种中亦有较多应用^[2,3], 但这些研究多见于抗细菌抗生素(如庆大霉素、四环素、杆菌肽等)产生菌的研究中, 有关抗真菌抗生素产生菌的推理选育报道很少。本文以对自身次生代谢产物抗性作为筛选策略, 来选育抗真菌抗生素 M182A 高产菌株, 并对其发酵调控进行了初步的研究。

1 材料和方法

1.1 菌 种

青霉 (*Penicillus* sp., 编号为 M182) 由中山大学生化系微生物室从大亚湾海底沉积物中分离并鉴定。

1.2 主要化学试剂

M182A: 由菌株 M182 发酵液分离提纯, 经

高效液相色谱分析为纯品。亚硝基胍: Sigma 公司。

1.3 主要培养基

(1) 合成培养基 (g/L): 葡萄糖 20, KNO_3 2, K_2HPO_4 1, NaCl 0.5, MgSO_4 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 无离子水 1 L, pH 6.7, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

(2) 发酵培养基: 在 (1) 中加入 $\rho = 0.1\%$ 的带鱼蛋白胍、 $\rho = 2\%$ 的海带抽提物。

(3) 抗性选择培养基: 在 (2) 中加入适量的 M182A。

(4) 效价测定培养基: 沙堡弱氏培养基 (g/L): 葡萄糖 40, 蛋白胍 10, 无离子水 1 L, pH 自然, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

1.4 敏感测试菌

白色假丝酵母 (*Candida albicans*), 购自中山医科大学。

1.5 亚硝基胍 (NG) 诱变处理

亚硝基胍 (NG) 诱变剂终质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 作用时间 1 h (37 $^{\circ}\text{C}$)。诱变前孢子悬液密度为 2.5×10^6 个孢子/mL。

1.6 亚硝基胍加紫外线复合处理

紫外灯功率 30 W, 照射距离 30 cm, 照射时间 30 s, 照射后于黑暗中 28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 再用亚硝基胍处理。方法同 1.5。

1.7 抗性菌株的分离

取 0.5 mL 经上述诱变处理的孢子液分别涂

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (001214)

收稿日期: 2000-11-02; 作者简介: 李淑彬 (1965-), 女, 博士。

布于含高质量浓度($40\text{ }\mu\text{g/mL}$)和较高质量浓度($24\text{ }\mu\text{g/mL}$)的M182A选择平板上,每个处理每个质量浓度各涂布20皿,28℃倒置培养,待菌落长出后,于斜面上保存。

1.8 抗性菌株相对效价的检测

生物测定法,见文献[4]。

2 实验结果

2.1 M182A对原始出发菌株M182的最小抑制质量浓度(MIC)的测定

采用琼脂扩散法测定M182A对原始出发菌株M182的MIC为 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$,故选定选择平板上M182A的质量浓度为 $24\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $48\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 抗性菌株摇瓶发酵结果

在80个选择平板上共获得45株抗性菌株,对这45个菌株分别进行摇瓶一级发酵,测定其相对效价。结果如表1。

表1 菌株M182诱变结果

Tab.1 Results of mutation of strain M182

M182A 相对效价/%	< 100	100 ~ 150	151 ~ 200	> 200
菌株数	6	26	8	5
百分比/%	13	58	18	11

45株抗性菌株中,M182A摇瓶发酵抗白色假丝酵母(*C. albicans*)相对效价高于出发菌株的正变株有39株,正变率达到87%,其中效价提高50%以上的菌株有13株,占所筛选菌株总数的29%,效价提高100%以上的菌株有5株,其中编号为M182-47的突变株发酵相对效价提高到244%。诱变后,在高质量浓度(含 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的M182A)的选择培养基上,共获得19株抗性菌株,在这19个菌株中,除2株相对效价低于原始菌株外,其余均有不同程度的提高。其中,相对效价在150%以上的菌株有10株,占52.6%。在低质量浓度(含 $24\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的M182A)的选择培养基上,共获得26株抗性菌株,其中有4株相对效价低于原始菌株,其余各株均有不同程度的提高,但提高幅度低于从高浓度选择培养基上所分离的菌株,相对效价在150%以上的仅3株,占11.5%。以上结果说明M182自身代谢产物抗性与其抗真菌抗生素产量存在一定的正相关。

2.3 高产菌株的稳定性试验

对诱变后相对效价提高幅度最大的菌株M182-47进行稳定性试验。连续摇瓶发酵5次,每次均以出发菌株作为参照,测定相对效价。相对效价保持稳定。

2.4 高产菌株M182-47发酵的代谢调控

2.4.1 培养时间对菌株M182-47生长和抗真菌抗生素M182A合成的影响 在发酵培养基中,接种一满环新鲜斜面孢子,28℃,180 r/min振荡,每隔12 h,拿出一瓶测定菌丝体干质量、M182A相对效价及pH变化。结果如图1。

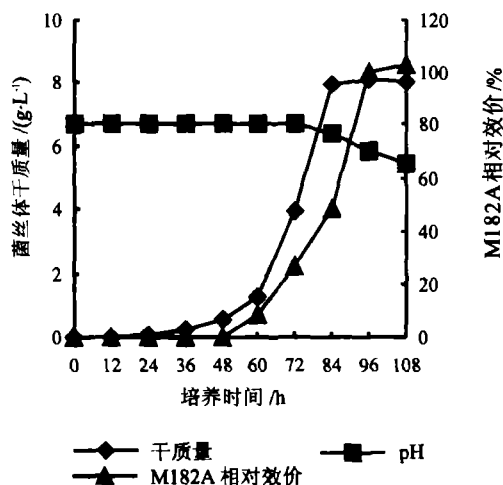


图1 突变高产菌株M182-47的生长曲线

Fig.1 The growth curve of mutated strain M182-47

发酵过程中,特别是大型发酵罐中,罐批发酵条件不容易控制,发酵pH变化、及菌丝体形态特征变化可以作为定时追踪发酵情况,确定合适放罐时间的主要参数。

2.4.2 不同碳源对菌株M182-47生长和抗真菌抗生素M182A合成的影响 在合成培养基中,加入 $w=2\%$ 的不同碳源,研究其对M182-47生长和发酵的影响。结果如图2。该菌株能利用多种碳源进行生长。但在抗真菌代谢产物合成中,天然有机碳源麸皮等优于合成化合物。在对糖类的利用中,还原糖优于非还原糖。

2.4.3 不同氮源对菌株M182-47生长和抗真菌抗生素M182A合成的影响 在合成培养基中,加入 $w=0.2\%$ 的不同氮源,研究其对M182-47生长和发酵的影响。图3的结果表明,与对碳源的利用情况相类似,该菌株能利用多种氮源如硝态氮、胺态氮、蛋白氮及天然有机氮进行生长。但在发酵中,天然有机氮、蛋白氮等优于无机氮。

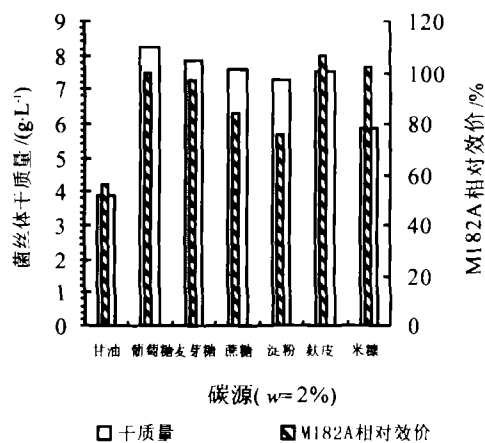


图2 不同碳源对突变株 M182-47 生长和抗真菌抗生素 M182A 合成的影响

Fig.2 Effect of different kinds carbon sources on the growth of strain M182-47 and the production of M182A

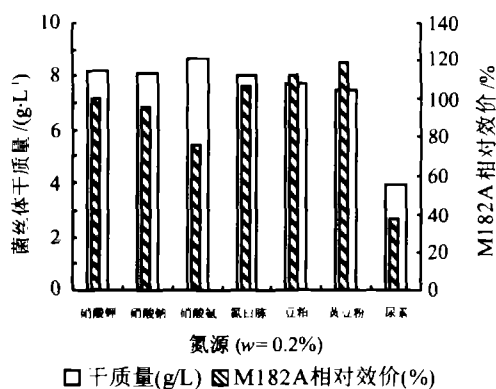


图3 不同氮源对突变株 M182-47 生长和抗真菌抗生素 M182A 合成的影响

Fig.3 Effect of different kinds nitrogen sources on the growth of strain M182-47 and the production of M182A

2.4.4 温度对菌株 M182-47 生长和抗真菌抗生素 M182A 合成的影响 图4的结果表明该菌生长温度范围较宽. 其最适生长温度为 32 ℃; M182A 合成的最适温度为 28 ℃.

在有些微生物代谢产物发酵过程中, 适当的温度变化可以提高其发酵效率; 有一些突变属于温度敏感型突变, 某些基因在较高的温度刺激下, 才能表达或高效的表达. 我们尝试了在不同的培养时间后给予高温刺激, 发现培养 60 h 后在 42 ℃下培养 4 h, 再转入正常培养, 发酵相对效能提高 34%. 如在发酵早期高温处理, 将

影响到菌丝的生长, 菌丝体干质量减少, 效价降低. 在发酵 72 h 后处理, 对效价影响不明显.

3 讨论

在抗生素高产菌株选育过程中, 经典的诱变育种方法尽管存在很大的盲目性、随机性, 但仍是目前常用的行之有效的育种手段. 但要从大量的突变菌株中, 筛选出正变菌株和高产菌株, 如没有有效的筛选手段, 工作量相当巨大.

在四环素、新生霉素和链霉素研究中, 人们发现这些产生菌对自身次生代谢产物的耐受程度与其所产抗生素水平有一定直接关系. 1984 年, Thompson 等^[5]提出抗生素生产限速因素之一是菌株对该抗生素的耐受力. 两年后 Cramer 等^[6]据此通过扩增抗性基因提高了氨基糖苷类抗生素产量. 我们通过用亚硝基胍及亚硝基胍和紫外线复合处理等方法获得能具较高抗自身次生代谢产物的抗性菌株, 进一步发现此菌株抗真菌抗生素产量与其对自身次生代谢产物抗性之间存在着一定的正相关, 并选育到数株相对效价提高两倍以上的高产菌株. 稳定性试验表明, 这些高产菌株性能能稳定遗传. 用自身次生代谢产物抗性筛选抗生素高产菌株是一种简单、快速、有效的筛选模式. 如通过不断的诱变育种, 则可望获得抗性更大的菌株, 从而用较小的工作量、较短的时间获得产量更高的菌株.

抗生素工业是一门古老的微生物发酵工业, 有关抗生素发酵调控机理的研究亦已进入到比较深入的水平. 但这些研究多集中于抗细菌抗生素 (如青霉素、庆大霉素、杆菌肽等) 的研究^[7]. 近年来, 由于真菌感染疾病的急剧上升^[8], 对新的低毒、高效、广谱抗真菌药物的需求日益迫切, 使寻求新的抗真菌抗生素的研究成为一个热点, 但关于抗真菌抗生素发酵调控机制研究报导非常之少. 本文初步探讨了抗真菌代谢产物 M182A 的发酵调控. 研究发现, 在 M182A 的发酵中, 无论是碳源还是氮源, 天然有机物质如麸皮、蛋白胨、豆粕、黄粉均优于纯净的单糖、双糖及无机营养物质. 原因可能是因为天然成分中含有一种或几种能促进其生长和生物合成的生长因子; 或含有其合成的前体. 另外, 天然有机营养物质如豆粕、黄粉多为颗粒状, 逐步被分解利用, 这样可避免由于菌体生长过量而抑制抗生素的产生.

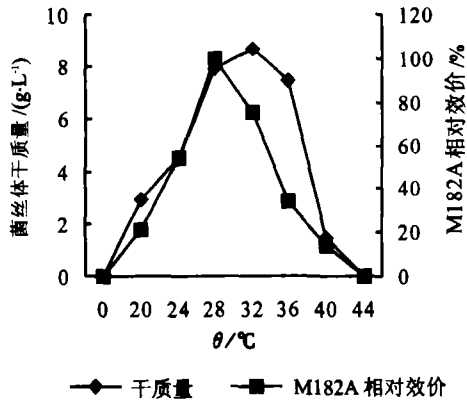


图4 温度对菌株 M182-47 生长和抗真菌抗生素 M182A 合成的影响

Fig.4 Effect of temperature on the growth of strain M182-47 and the production of M182A

在培养一定的时间后,给予适当的高温刺激能提高突变株抗生素产量,在已有的文献报到中较为罕见。这个结果提示我们在进行抗生素菌种推理选育中,利用筛选温度敏感突变株和抗性突变株相结合,应该是一种新的思路。

参考文献:

- [1] 李淑彬,钟英长,戴欣,等.海洋霉菌抗真菌作用的研究 I.具广谱抗菌活性的海洋霉菌 M182 的分离[J].海洋通报,2000,19(6):29-33.
- [2] 赵敏,范瑾,胡小玲,等.庆大霉素单组分产生菌的筛选和研究[J].中国抗生素杂志,1997,22(1):12-15.
- [3] 胡立勇,宋有礼,童村.杆菌肽产生菌的推理选育[J].中国抗生素杂志,1988,13(6):396-398.
- [4] 张治铨.抗生素药品检验[M].北京:人民卫生出版社,1987.44-52.
- [5] 顾觉奋.应用基因工程改进抗生素产量的研究进展[J].国外医药抗生素分册,1999,20(5):193-197.
- [6] CRANRI R, DAVIAS J E. Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes[J]. J Antibiot, 1986, 39:128-134.
- [7] 武兵元.抗生素生物合成的分子调节[J].国外医药抗生素分册,1993,14(2):81-86.
- [8] PFALLER M A, WENZEL P. The impact of changing epidemiology of fungi infections in the 1990s[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992, 11:287-291.

Rational Selection of High Productivity Strains of Antifungal Antibiotic and Studing of Fermentation Condition

LI Shu-bin, YANG Jin-song, LIU Yang, ZHONG Ying-chang, CHEN Qian
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The paper studied the relation between the biosynthesis of antifungal antibiotic M182A produced by marine mold strain M182 and the resistance of self-secondary metabolites. By UV and UV + NG complex mutation, The high resistance strains against M182A was obtained and whose relative potency increased to 244%. Subculture test indicated that the heredity character of the high productivity strains was stable. The test of liquid fermentation showed natural organ nutrient substances were advantageous to synthesis compounds. Certain temperature shock could improve the yield of M182A.

Keywords: antifungal antibiotic; mutation; resistance of self-secondary metabolites