

多轮复合诱变选育抗真菌抗生素高产菌株及其发酵条件研究*

Complex Mutagenesis and Screening of High Productivity Strains of Antifungal Antibiotic and Their Fermentive Conditions

李淑彬 王军** 钟英长**

Li Shubin Wang Jun Zhong Yingchang

(华南师范大学生命科学学院 广州 510631)

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong, 510631, China)

摘要 对抗真菌抗生素 Terreic acid-179M (简称 179M) 产生菌黄柄曲霉 (*Aspergillus flavipes*) 进行紫外线、亚硝基胍、紫外线加亚硝基胍多轮复合诱变, 以对自身次生代谢产物抗性作为筛选策略, 选育到对自身抗生素抗性提高且发酵相对效价提高到 383% 的高产菌株。菌落形态观察发现在 Sabouraud (SBD) 培养基上产孢子丰富且形成黄色孢子和黄色菌丝的 179M 产量较高。179M 最佳发酵温度为 28℃, 培养基最适起始 pH 值为 6

关键词 抗真菌抗生素 诱变 自身次生代谢产物抗性 发酵条件

中图法分类号 Q936

Abstract *Aspergillus flavipes* produced by antifungal antibiotic of Terreic acid-179M (designated as 179M), was treated by UV, NG and UV+ NG in sequence. The mutated strains were selected by self-secondary metabolites. The microorganism with relative potency of 179M increased to 383% and increasing resistance to 179M were obtained. It was found that the strain 179M has high productivity with abundant yellow spores and hyphas in the medium Sabouraud. The favor temperature to the fermentation of 179M was 28℃ and the favor initial pH value was 6.

Key words antifungal antibiotic, mutagenesis, resistance of self-secondary metabolites, fermentive conditions

近年来, 由于广谱抗生素、激素、细胞毒等药物的大量使用, 器官移植引起的免疫抑制及艾滋病感染、空气恶化等使条件性致病真菌感染的发病率显著上升^[1]。这已引起医学界极大地关注, 但无论浅部皮肤真菌感染还是深部条件性致病真菌感染, 目前均缺少副作用小、广谱高效的抗真菌抗生素^[2]。而植物病原真菌感染仍然是影响农作物生产的重要因素。

我们在研究微生物抗真菌作用时, 从大亚湾海底沉积物中分离出 1 株海洋霉菌 (编号为 179), 该菌株对酵母类真菌、皮肤感染真菌及植物病原真菌均具有强烈的抑制作用。对其代谢产物单分, 经核磁、红外、

紫外及质谱分析, 证实此种抗真菌抗生素为 Terreic acid, 为一种醌类化合物。体外试验表明 Terreic acid-179M (以下简称为 179M) 对酵母类真菌的 MICs 为 0.78~12.5 μg/ml, 对皮肤感染真菌 *Microspore gypseum* 的 MIC 为 1.56 μg/ml。同时对多种植物病原真菌有强烈的抑制作用, 具有较好的开发前景^[3]。但原始出发菌株 179M 产量较低, 我们通过紫外线、亚硝基胍对其多轮复合诱变, 同时以对自身次生代谢产物 179M 抗性作为筛选策略, 定向选育到相对效价提高到 383% 的高产菌株。同时研究发现其菌落形态变化与产量变化之间存在一定的相关性, 这将为此类抗真菌抗生素高产菌株的进一步选育和开发利用提供一定的参考。此外, 还对其发酵条件进行了初步的研究。

2003-01-15 收稿, 2003-02-28 修回。

* 广东省自然科学基金 (No. 001214) 和国家自然科学基金资助项目 (No. 30270021)。

** 中山大学生命科学院 广州 510275 (College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou, Guangdong, 510275, China)

1 材料和方法

1.1 实验菌种

黄柄曲霉 (*Aspergillus flavipes*, 编号为 179) 由本实验室从大亚湾海底沉积物中分离并鉴定

1.2 主要培养基

本实验设计了 3 种不同的培养基。(1) Sabouraud (SBD) 培养基 (g/LH₂O): 葡萄糖 40, 蛋白胨 10, pH 值自然, 115°C 灭菌 30 min 固体培养基加入 2% 的琼脂。(2) 查氏培养基 (g/LH₂O): 葡萄糖 20, NaNO₃ 2, K₂HPO₄ 1, KCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄ 0.01, pH 值自然, 灭菌 30 min 固体培养基加入 2% 的琼脂。(3) 查氏-海带汁培养基。海带洗净后, 60°C 烘 2 h, 称重, 切碎后加水煮沸 30 min, 过滤, 定容使滤液海带含量终浓度为 2% (克干重/升), 以 2% 海带汁代替水配制查氏培养基。查氏培养基作产孢培养基。(4) PDA 培养基。(5) SBD-海带汁培养基。以 2% 海带汁代替水配制 SBD 培养基。

1.3 敏感测试菌

白色假丝酵母 (*Candida albicans*), 购自中山大学。

1.4 出发菌株对自身代谢产物 179M 的抗性实验

在 SBD 培养基平板上分别添加不同浓度 ($\mu\text{g/ml}$): 0 50 100 150 200 250 300 的 179M, 待平板稍干后, 涂布 179 孢子悬液, 28°C, 培养 96h, 观察培养结果, 以确定选择培养基中所用的 179M 浓度。

1.5 亚硝基胍 (NG) 诱变处理

挑出发菌株 179 斜面孢子环, 用无菌生理盐水制成浓度为每毫升 2.5×10^5 个孢子的悬液。取 5 ml 孢子悬液加入适量的亚硝基胍, 使亚硝基胍的终浓度为 $200 \mu\text{g/ml}$ 。用黑纸包裹后, 在 200 rpm 37°C 振摇 1 h 在含有自身抗真菌代谢产物 179M 的选择平板上筛选抗性菌株, 并进行产抗真菌代谢产物 179M 的初筛。

1.6 紫外线诱变处理

挑取经上述亚硝基胍诱变后对 179M 抗性和抑菌圈直径有明显提高的菌株, 在产孢培养基斜面上培养后, 取斜面孢子制成每毫升 2.5×10^5 个孢子的悬浮液, 取 5 ml 至无菌培养皿中, 打开皿盖, 在紫外灯下进行诱变。紫外灯功率为 30W, 照射距离 30cm, 照射时间 60s。在含有自身代谢产物 179M 且浓度加大的选择平板上筛选抗性菌株, 同时进行产抗真菌代谢产物 179M 的初筛。

1.7 亚硝基胍加紫外线复合处理

取经 1.6 处理后通过筛选对 179M 抗性和抑菌圈直径进一步提高的菌株进行亚硝基胍加紫外线复合处理, 具体方法参见 1.5 和 1.6

1.8 179M 高产菌株的初筛——琼脂块法^[4]

将原始出发菌株和上述诱变后菌株的孢子悬液, 适当稀释后, 涂布于 SBD 平板, 28°C, 培养 72h, 用打孔器 (ϕ 为 6mm) 打下 1 块, 紧贴于表面涂布有敏感测试菌白色假丝酵母的 SBD 平板, 28°C 培养 24h, 测定抑菌圈直径。

1.9 179M 高产菌株的复筛

采用摇瓶一级发酵。以未诱变原始出发菌株作为参比, 以白色假丝酵母为测试菌株, 琼脂扩散法——二剂量法测定相对效价^[5]。

1.10 抗性菌株相对效价的检测——生物测定法^[5]

(1) 3 种培养基均分装在 500 ml 三角瓶中, 每瓶装量为 150 ml, 每瓶接种 1 满环新鲜 179-49 孢子, 28°C, 180 rpm 振摇 96 h, 测定菌丝体干重和 179M 相对效价。

(2) 500 ml 三角瓶中装入 150 ml SBD 培养基, 接入 1 满环新鲜 179-49 孢子, 28°C, 180 rpm 振摇, 每隔一定时间, 取出测定菌丝体干重和 179M 发酵相对效价。

(3) 500 ml 三角瓶中装入 150 ml SBD 培养基, 接入 1 满环新鲜 179-49 孢子, 在不同温度下, 180 rpm 振摇 96 h, 测定菌丝体干重和 179M 发酵相对效价。

1.11 菌体生长量的测定

一定体积的发酵液过滤后, 收集菌体, 105°C 烘干至恒重, 称干重, 换算成克干重/升。

2 结果与分析

2.1 出发菌株的抗性实验结果

当培养基平板含 179M 的量 $\leq 200 \mu\text{g/ml}$ 时, 179 菌株生长情况与对照相近; 当浓度为 $250 \mu\text{g/ml}$ 时, 菌落数骤减; 当浓度为 $300 \mu\text{g/ml}$ 时, 该平板无菌落长出, 继续培养到第 7 天才 1 个菌落生长。故确定选择平板上 179M 的初浓度为 $350 \mu\text{g/ml}$ 。

2.2 突变株的选育

第一次亚硝基胍诱变后, 在选择平板上共获得 16 株抗性菌株, 初筛时发现抑菌圈直径有明显增大的有 1 株, 正变率达 68.7%。其中编号为 179-1 的菌株抑菌圈直径由 24.3 mm 增加到 27.2 mm, 因而选取 179-2 作为第二轮诱变的出发菌株。在第二轮紫外线诱变中, 共获得 2 株抗性菌株, 初筛结果正变率为 65.4%, 其中编号为 179-1 的菌株抑菌圈直径由 24.3 mm 提

高到 30.2 mm 第三轮复合诱变以 179-19 作为出发菌株, 共获得 2 株抗性菌株, 正变菌株为 1 株, 正变率为 54.5%。编号为 179-29 179-32 179-4 的菌株的抑菌圈直径从 24.3 分别提高到 32.3 mm 33.4 mm 33.5 mm 在第三轮亚硝基胍加紫外线处理后, 正变率有所下降, 可能是由于亚硝基胍加紫外线处理后, 对 DNA 损伤太大或仅引起抗性基因发生改变, 使抗性增大而产量基因并未发生改变。

上述高产菌株于发酵培养基中进行摇瓶复筛的结果与初筛结果基本保持一致 详见表 1

高产菌株连续发酵 5 次, 相对效价保持稳定。

表 1 179M 高产菌株的诱变结果

Table 1 Screening results of the high productivity strains of 179M

菌株 Strains	抑菌圈直径 Diameter of inhibition Zone (mm)	相对效价 Relative potency (%)
179 (control)	24.3	100
179-2	27.2	176
179-19	30.2	245
179-29	32.3	326
179-32	33.4	342
179-49	33.5	383

2.3 突变菌株的形态变异与产量相关性

原始出发菌株 179 在 SBD 培养基上生长迅速, 气生菌丝发达, 菌落较厚, 产孢子很少。经诱变后, 突变菌株菌落形态发生了很大改变。一共产生 5 类不同特征的菌落: (1) 与原始出发菌株相同, 单菌落近圆形, 白色, 中央凸起, 有凹凸沟纹, 气生菌丝发达, 产孢子很少; (2) 菌落较厚, 气生菌丝发达, 黄白色, 孢子较多; (3) 气生菌丝较发达, 黄色, 中央凸起有皱折, 孢子丰富, 黄色; (4) 气生菌丝较发达, 黄红色, 中央凹陷, 有皱折, 呈花朵状, 孢子丰富, 黄红色; (5) 气生菌丝稀少, 菌落扁平, 孢子较少, 红色。

考察突变菌株的形态与产量相关性发现, (2)、(3) 类正变者居多, 且正变频率大, (4) 类次之, 而 (5) 类为负变菌落。这些结果表明 179M 的代谢能力与菌株产孢子能力有一定的相关性, 且以产黄色菌丝和黄色孢子影响更大。其原因可能是由于黄色素基因与 179M 形成基因位位置相邻, 受共同的调节基因控制, 其准确机制有待于进一步研究

2.4 高产菌株 179-4 发酵条件的研究

2.4.1 179-4 发酵最佳培养基的选择

179-49 在 5 种培养基中均能很好的生长, 查氏培养基、PDA 培养基、SBD 培养基更适合该菌株抗真菌代谢产物 179M 的形成; 添加 2% 的海带汁能在一定程度上促进该菌株的生长和抗真菌代谢产物的形成, 但提高幅度较小 详见图 1

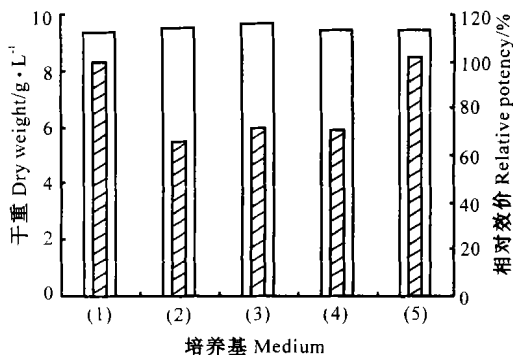


图 1 不同培养基对菌株 179-4 生长和 179M 合成的影响

Fig. 1 The effect of the different kinds of medium on the fermentation of 179-49 and the synthesis of 179M

(1) SBD 培养基 SBD medium; (2) 查氏培养基 Zapek medium; (3) 查氏-海带汁培养基 Zapek-sea tent juice medium; (4) PDA 培养基 PDA medium; (5) SBD-海带汁培养基 SBD-sea tent juice medium

□ 干重; ▨ 相对效价 □ Dry weight, ▨ Relative potency.

2.4.2 培养时间对 179-4 发酵的影响

突变株 179-4 生长速度很快, 在培养 24 h 即进入对数期生长, 且抗真菌代谢产物 179M 对数期就开始合成, 84 h 接近最高峰 见图 2

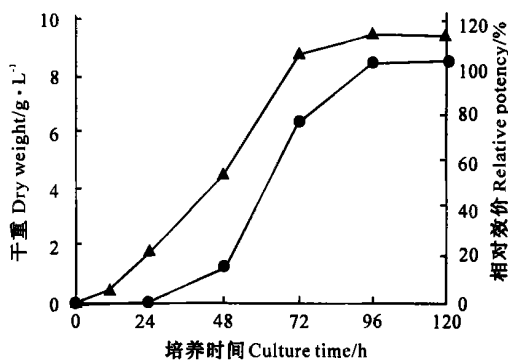


图 2 培养时间对菌株 179-49 代谢产物和 179M 合成的影响

Fig. 2 The effect of culture time on the fermentation of 179-49 and the synthesis of 179M

▲ 干重; ● 相对效价 ▲ Dry weight, ● Relative potency.

2.4.3 温度对 179-4 发酵的影响

突变株 179-4 生长温度范围很宽, 当温度达 40°C 时, 该菌株仍然能旺盛的生长, 当温度小于 36°C 时, 生长量随温度增高而增多, 其最适生长温度为 36°C; 抗真菌代谢产物 179M 最佳发酵温度为 28°C, 见图 3

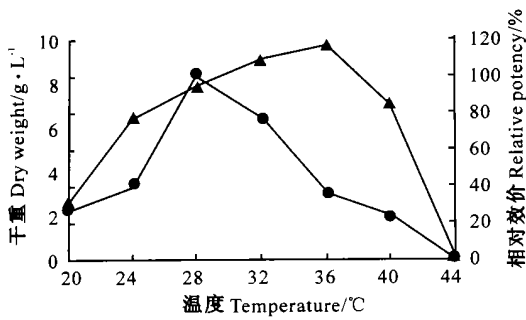


图3 温度对菌株 179-49 生长和 179M 合成的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the fermentation of 179-49 and the synthesis of 179M

▲干重; ●相对效价 ▲ Dry weight, ● Relative potency.

2.4.4 初始 pH 值 179-49 菌株发酵的影响

突变株 179-49 在 pH 值为 4~8 时均能很好地生长,其最适生长 pH 值为 6。抗真菌代谢产物 179M 发酵的最适 pH 值也为 6 如图 4 所示。

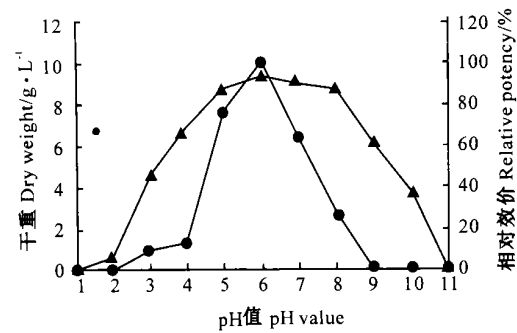


图4 pH 值对菌株 179-49 生长和 179M 合成的影响

Fig. 4 The effect of pH value on the fermentation of 179-49 and the synthesis of 179M

▲干重; ●相对效价 ▲ Dry weight, ● Relative potency.

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。

我们采用自身抗真菌抗生素 179M 作为初筛选选择平板,通过诱变-抗性平板分离-琼脂块法初筛-高产菌株-下一轮诱变筛选-摇瓶复筛的多轮复合诱变程序,在较短的时间内获得了抗自身抗生素抗性提高且发酵相对效价提高到 383% 的高产菌株。同时研究中发现 179M 的产量与其菌落形态变化亦具有一定的相关性,因而利用这两种相关性,可为 179M 的进一步育种提供一种简单、快速、有效的筛选模式。

与原始出发菌株 179 相比,突变株 179-49 延迟期缩短且抗真菌代谢产物 179M 在对数生长期即大量合成。其原因可能是由于突变以后,其固有的代谢调控机制被打破,某一个专一代谢途径调控基因强制在对数生长期表达,使相应的生物合成结构基因提前转录,因而抗生素的合成提前到对数生长期。其详细机制有待进一步的研究。

179-49 兼具海洋和陆地两类生物的生理特性,这表明原始出发菌株 179 虽然分离自海底沉积物,但不是海洋原生菌。

参考文献

- 1 Pfaller M A, Wenzel P. The impact of changing epidemiology of fungi infections in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1992, 11: 287~291.
- 2 张红, 白东鲁. 抗真菌药物的研究进展. *中国药物化学杂志*, 1997, 26(4): 303~309.
- 3 李淑彬, 王军, 钟英长. 抗真菌抗生素 Terreic acid 产生菌的分离和生物学性质研究. *菌物系统*, 2001, 20(3): 362~367.
- 4 屈毅, 杜继昭等编译. 现代医用抗生素学. 成都: 四川科学出版社, 1987.
- 5 张治锁编著. 抗生素药品检验. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 44~52.

(责任编辑: 邓大玉 曾蔚茹)

信息

《广西科学》自 2001 年荣获中国期刊方阵“双效”期刊和广西“十佳”科技期刊后,今年又成为中国核心期刊(遴选)数据库和美国《化学文摘》(CA)的收录期刊。

本刊讯