

尼日利亚菌素高产菌株的选育

肖琳 黄为一

(南京农业大学资源与环境学院 南京 210095)

摘要: 通过对致死率和正负突变率的测定, 确定了紫外线、亚硝酸、紫外线加吡啶橙 3 种诱变方式对吸水链霉菌 NND-52 的 29 号菌株进行诱变处理的合适剂量, 并采用复合诱变得到了一株脱葡萄糖阻遏的高产菌株 A19, 其尼日利亚菌素的摇瓶产量比出发菌株提高了 128%。传代结果表明, 在传代的同时结合自然分离, 可以保持稳定的产抗特性。

关键词: 尼日利亚菌素、复合诱变、脱葡萄糖阻遏

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0059-05

IMPROVEMENT OF NIGERICIN PRODUCTION IN *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* NND-52 BY COMBINATION MUTANT

XIAO Lin HUANG Wei-Yi

(College of resource and environment, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

Abstract: Based on the lethal rate, positive and negative mutation rate, the optimal doses of UV, HNO_2 , UV + AO treating *S. hygroscopicus* NND-52-29 were determined. The mutant strain A19 that was obtained showed the derepressive property to glucose and the nigericin yield of A19 could be increased by 128%. When it was subcultured combined with natural screening, its stability was rather satisfied.

Key words: Nigercin, Combination mutant, Glucose derepressive

吸水链霉菌 NND-52 是本研究室分离得到的一株抗生素产生菌, 它能产生多种抗生素。尼日利亚菌素 (Nigericin) 是继除莠霉素 A (Herbimycin A)^[1] 和阿扎霉素 B (Azalomycin B)^[2] 之后在该菌中发现的第三种抗生素。近年来研究表明, 尼日利亚菌素具有较好的单独或协同其它药物抗耐药性菌^[3]、抗病毒^[4] 和抑制肿瘤细胞^[5] 的作用。但尼日利亚菌素在发酵产物中含量太低, 限制了对它的研究和利用。本文采用复合诱变, 仅通过 3 轮诱变就得到一株脱葡萄糖阻遏的尼日利亚菌素高产菌株, 其摇瓶效价较出发菌株提高了 128%。该菌株的稳定性实验表明, 在传代的同时结合自然分离, 可以保持稳定的产抗性能。

1 材料与方法

1.1 菌种

诱变出发菌株吸水链霉菌 29 号和指示菌由本实验室保藏。

1.2 培养条件

斜面和平板培养基: 蔗糖 20g, 可溶性淀粉 10g, 酵母膏 5g, 琼脂 20g, 定容 1L, 调 pH 7.2~7.4。

固体发酵培养基: 葡萄糖 30g, 可溶性淀粉 5g, 黄豆粉 5g, 蛋白胨 4g, 酵母膏 5g,

收稿日期: 2001-04-26, 修回日期: 2001-07-20

氯化钠 2g, 硫酸镁 0.5g, 碳酸钙 3g, 琼脂 20g, 定容 1L, 调 pH 7.5。

液体种子培养基: 葡萄糖 50g, 黄豆饼粉 30g, 酵母膏 5g, 碳酸钙 7g, 定容 1L, 调 pH 7.5。

发酵培养基: 同固体发酵培养基, 只是缺少琼脂。

所有培养均在 28℃ 进行, 液体发酵采用二级发酵, 摇床转速 200r/min, 接种量 10%。种液培养 48h, 发酵培养 96h。

1.3 菌株诱变

1.3.1 紫外线诱变: 单孢子悬液涂布平板后, 15W 紫外灯 30cm 照射一定时间后, 避光培养至菌落长出。

1.3.2 亚硝酸诱变: 见参考文献 [6]。

1.3.3 吡啶橙与紫外线复合诱变: 培养基冷至 60℃ 时加入一定量的吡啶橙水溶液倒平板, 涂布单孢子悬液, 培养 48h 后用紫外线诱变。

1.3.4 诱变筛选^[7]: 出发菌株的单孢子悬液诱变处理后, 经过初筛和复筛, 选取产量最高的 3 株菌转接斜面, 待长至孢子丰满后, 收集孢子制成悬液, 进行下一轮诱变。不断重复以上操作, 直至得到理想菌株。

1.4 筛选方法

1.4.1 初筛: 琼脂块移菌法, 菌落在分离培养基上长出后, 用牙签挑至 $\Phi = 6\text{mm}$ 的固体发酵培养基琼脂柱上, 28℃ 培养 48h 后移至以 *C. albicans* 为指示菌的双层平板上, 培养 24h 后测量抑菌圈的大小作为指标。

1.4.2 复筛: 发酵后, 取 3mL 菌液离心, 弃上清, 加入 3mL 无水乙醇, Vortex 打散菌体, 浸提 24h 后离心, 取上清 2 μL 薄层层析, 氯仿: 甲醇 = 10: 1 展层后以 *B. subtilis* 为指示菌做生物显影, 以斑点的大小为指标。

2 结果与分析

2.1 3种理化诱变剂的诱变效果

一种诱变剂和诱变剂量是否合适, 最主要的是考察它的正变率和产量提高幅度。现在一般认为正突变较多的出现在偏低剂量中, 而负突变则较多的出现于偏高剂量中^[8-9]。目前诱变剂的处理剂量一般为菌株出现 70% ~ 80% 的致死率时的剂量。测定紫外线 (UV)、亚硝酸 (HNO_2) 以及吡啶橙 (AO) 在不同的剂量下对 29 号菌株的致死率, 发现 UV 处理 15s 和亚硝酸处理 20min (致死率分别为 89.45% 和 76.49%) 是比较合适的剂量。AO 在 1mg/L 时的致死率为 39.4%, 3mg/L 的致死率为 54%, 5mg/L 的致死率为 83%, 在复合诱变中考虑到 UV 和 AO 的复合效应, 故采用较低的剂量 (表 1)。

从表 1 结果可知, UV 和 UV + AO 复合诱变都是一种有效的诱变剂, 正变率较高而且产量提高幅度大。而对亚硝酸, 尽管正变率较低, 但它的产量最大提高率比较高,

故我们也选择它作为进一步实验的诱变剂。

2.2 形态变异与产量之间的关系

为了提高筛选的效率, 用琼脂块移菌法, *B. subtilis* 为指示菌考查诱变后出现的五种典型菌落

表 1 不同诱变剂的诱变效果

诱变剂	剂量或时间	正变率 (%)	负变率 (%)	产量最大 提高率 (%)
UV	15s	11.56	68.21	31.81
AO + UV	1mg/L + 10s	27.27	7	76.83
HNO_2	20min	0.5	82.5	44.84

类型——光秃型、不规则型（角变）、大、中、小型菌落的效价情况，总结出低产型菌落和高产型菌落的一般特征，这样通过目测就可以筛除大量的低产型菌落，以降低筛选的工作量（如图 1）。中型菌落的菌株的效价不论是最大值，还是平均值均较高于其它类型菌落的菌株，而大型菌落尽管个别菌株的产量也较高，但变异幅度大，大多数菌落的抗生素产量都比较低。故以中型菌落作为初筛的对象。

2.3 诱变筛选结果

采用不同的诱变剂，每次诱变后挑取菌落大小中等，气生菌丝丰富的菌落 200 个初筛。选取产量比较高的 3 株进行下一轮诱变。所采用的诱变方式依次为紫外线 15s→亚硝酸 20min→紫外线 10s + 1mg/L 吡啶橙，每一次诱变均结合自然分离，最后获取了一株高产菌株 A19。其摇瓶效价可达 136mg/L，比原出发菌株提高了 128%，并发现它已部分解除了葡萄糖的分解代谢阻遏（表 2）。

表 2 葡萄糖对不同菌株效价的影响

菌 株	抑菌圈 (mm)			
	葡萄糖 (3%)		乳糖 (3%)	
	Azalomycin B	Nigericin	Azalomycin B	Nigericin
出发菌株 29 号	6.00	-	8.68	4.34
诱变菌株 A19	4.50	10.90	4.79	12.00

如上结果表明，在乳糖培养基中，两菌株均有合成尼日利亚菌素的能力，但在含较高浓度的葡萄糖培养基中，出发菌株的尼日利亚菌素的合成能力明显受到阻遏，而 A19 菌株尼日利亚菌素的产量仅稍低于以乳糖为碳源时的产量。这说明 A19 能够部分去除葡萄糖的阻遏作用，有利于以后尼日利亚菌素的发酵生产。

2.4 高产菌株 A19 的稳定性试验

把 A19 菌株不断进行斜面传代，测其摇瓶效价，A19 菌株的摇瓶效价为 136 mg/L，传至第 3 代时摇瓶效价为 125 mg/L，到第 5 代则只有 103mg/L。从传代结果来看，当 A19 传到 3 代以后，其产量下降的趋势就比较明显，并且在试管传代中还发现伴随着产孢能力的下降的现象，这说明此菌株同别的抗生素产生菌一样都存在着遗传不稳定性问题。为了解决这个问题，我们在对 A19 传代的同时结合自然分离，自然分离亦采用初筛和复筛方法进行。第 1 次自然分离后测定的摇瓶平均效价为 139mg/L，当自然分离进行 5 次以后，菌株的摇瓶效价可达 146mg/L。

从如上结果我们可以看出，在传代的同时结合自然分离，不仅可以解决多次传代造成的产抗性能下降的问题，而且还可以继续提高菌株的产抗能力。自然分离对保持抗生素产生菌菌株的特性起到了很好的作用，可以防止由于传代过程中的自然变异而引起的生产性能的下降。

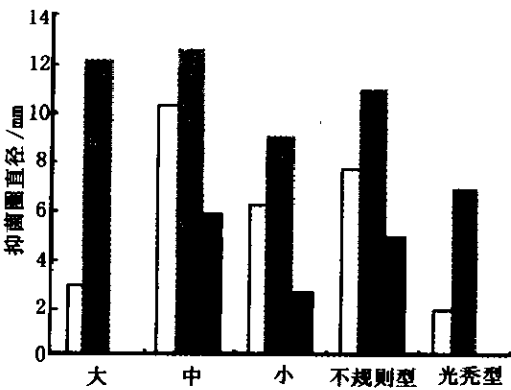


图 1 菌落形态与产量的关系

□平均值, ■最大值, ▨最小值

3 讨论

抗生素是一类次级代谢产物,其合成涉及到初级和次级代谢中的多种酶系。现在,尽管利用基因工程的方法在抗生素的菌种选育上有不少成功的报道,但是经典的诱变育种仍是目前主要应用的育种手段,对于遗传背景不很清楚的菌株,诱变育种更是可行的有效手段。尽管诱变剂所造成的突变是随机的,对于一种菌来说,由于基因组的结构是相当稳定的,所以对不同的诱变剂会有其突变热点。本文依次采用 UV、 HNO_2 、UV + AO 3 种诱变方式进行复合诱变,同时结合形态变异与产量之间的相关关系,大大减少了目标菌株筛选的工作量,仅通过 3 次诱变,每次挑取 200 个菌株即将尼日利亚菌素的摇瓶效价提高了 128%。这说明采用复合诱变可以避免在短期内因为多次诱变而造成的诱变效果下降的现象,能够在短时间内达到提高目标产物的效果,提高诱变育种的工作效率。

另外,菌株存在着自然变异的问题,且一般以负变居多^[9]。由于抗生素是多基因控制合成的次级代谢产物,其生产能力的下降尤为明显^[9]。本文从单纯传代和传代同时结合自然分离两种方式的比较,说明通过自然分离,一方面能不断淘汰产孢能力低、生产性能差的菌株而保留较好的菌株,尚也能将自然变异产生的高产菌株保留下来,对保持菌株的优良特性是有效的。

参考文献

- [1] 王世梅,黄为一,武济民. 南京农业大学学报, 1994, 17 (4): 54~59.
- [2] 王世梅,黄为一,崔凤元. 微生物学通报, 2001, 28 (1): 64~67.
- [3] Mates S M, Eisenberg E, Mandel I J, *et al.* Proc Natl Acad Sci U. S. A 1982, 79 (21): 6693~6697.
- [4] Seibert G, Raether W, Winkler I, *et al.* E. P. 358, 177.
- [5] Hasuda K, Lee C, Tannok I F. Oncol Res, 1994, 6 (6): 259~268.
- [6] 白毓谦主编. 微生物实验技术. 济南: 山东大学出版社, 1987.
- [7] 徐志南, 刘 刚, 柯世省, 等. 中国抗生素杂志, 1999, 24 (3): 175~177.
- [8] 工业技术资料汇编 (第四辑). 微生物的选种和育种. 上海: 上海人民出版社, 1972.
- [9] 陈代杰, 朱宝泉. 工业微生物菌种选育与发酵控制技术. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995.