

链霉素抗性突变——纳他霉素高产菌株的选育研究*

杨东靖 陈冠群 陈 巍 王 敏 杜连祥

(天津科技大学食品科学与生物工程学院 天津 300222)

摘要:应用链霉素抗性筛选法,将经过紫外线诱变处理的纳他霉素生产菌——褐黄孢链霉菌 (*Streptomyces gilvosporeus*) ATCC13326 的孢子涂布在含有链霉素最小抑制浓度 ($0.6\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养基平板上,获得了 122 株链霉素抗性突变株。其中纳他霉素产量高于出发菌株的有 13 株,产量阳性效率达到 10.6%,同时获得了产抗生素能力为出发菌株 1.46 倍的突变株 SG-56。

关键词:褐黄孢链霉菌,链霉素抗性筛选法,诱变,纳他霉素

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0029-04

STREPTOMYCIN RESISTANCE MUTATION——A STUDY ON THE BREEDING OF HIGH NATAMYCIN-PRODUCING STRAIN

YANG Dong-Jing CHEN Guan-Qun CHEN Wei WANG Min DU Lian-Xiang

(School of Food science & Bioengineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222)

Abstract: A method of streptomycin resistance screening was applied to improve the productivity of Natamycin by *Streptomyces gilvosporeus* (ATCC13326). The spores treated with UV light were regenerated on agar plates containing $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. 122 streptomycin-resistant (str) mutants were obtained. The Natamycin yields of 13 mutants were higher than the original strain. The mutants with high Natamycin productivity were screened at a high frequency (10.6%). The highest one that demonstrated 1.46 times that of the original strain in Natamycin productivity was obtained.

Key words: *Streptomyces gilvosporeus*, Method of streptomycin resistance screening, Mutagenesis, Natamycin

纳他霉素是一种多烯大环内酯类抗真菌抗生素^[1], 主要由 3 种链霉菌产生, 它们是

* 天津市自然科学基金资助项目 (No.013609511)

收稿日期: 2002-08-12, 修回日期: 2002-09-30

恰塔努加链霉菌 (*Streptomyces chattanovgensis*), 纳塔尔链霉菌 (*Streptomyces natalensis*) 和褐黄孢链霉菌 (*Streptomyces gilvosporeus*)。纳他霉素具有广谱、双效的抗真菌作用。它既可以抑制各种霉菌、酵母的生长, 又能抑制真菌毒素的产生^[2]。1982年6月, 美国食品与药品管理局 FDA (Food and Drug Administration) 正式批准纳他霉素可用作食品防腐剂。目前, 我国尚无纳他霉素的研究和生产, 随着人们对化学合成食品防腐剂安全性认识的提高, 纳他霉素作为高效、广谱的绿色生物食品防腐剂将会拥有良好的市场前景。由于纳他霉素生产菌的发酵效价偏低, 导致生产成本很高, 因此选育高产菌成为研究工作的主要目标。

目前在抗生素高产菌株选育中, 诱变育种仍然是普遍应用并且十分有效的方法^[3]。但是由于化学或物理的诱变方法所产生的突变是随机的, 尽管其突变频率较高, 但突变无方向性, 导致目标菌株筛选工作量大, 直接影响了诱变育种的工作效率。我们在进行纳他霉素高产菌株选育时, 根据分子育种中关于抗生素产生菌抗性基因与抗生素合成基因以及调控基因紧密连锁而容易发生共突变的理论^[4], 利用链霉素抗性筛选法作为诱变育种的辅助筛选手段, 结合传统紫外线诱变, 大大增加了育种的方向性, 加快了菌种选育的进程, 提高了筛选的工作效率。本文报道这一研究成果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 褐黄孢链霉菌 (*Streptomyces gilvosporeus*) ATCC13326, 本校应用微生物研究室保存。

1.1.2 培养基: 种子培养基: 葡萄糖 20.0g, 蛋白胨 6.0g, 酵母粉 6.0g, NaCl 10.0g, 定容至 1L, pH7.0。发酵培养基: 大豆蛋白分离物 19.5g, 酵母粉 4.5g, 葡萄糖 40.0g, 定容至 1L, pH7.0。平板分离培养基、斜面培养基: 葡萄糖 10.0g, 蛋白胨 5.0g, 酵母粉 3.0g, 麦芽浸粉 3.0g, 琼脂粉 15.0g, 定容至 1L, pH7.0。

1.1.3 硫酸链霉素 (Streptomycin sulfate): 上海生工生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 制备单孢子悬液: 取 ATCC13326 菌株新鲜斜面, 用无菌水制成孢子悬液, 脱脂棉过滤, 收集单孢子悬液, 调整浓度为 10^8 个/mL。

1.2.2 孢子的链霉素最小抑制浓度测定: 将制备好的孢子悬液分别涂布于含有不同浓度链霉素的培养基平板上, 29℃培养 8~10d。观察不同平板上的菌落生长情况, 记录未长菌落的链霉素最低作用浓度, 即确定链霉素对该菌的最小抑制浓度。

1.2.3 紫外线诱变最适剂量的确定: 将浓度为 10^8 个/mL 的孢子悬液置于 15W 的紫外灯下照射, 距离 30cm, 时间分别为 5、10、20、30、40、60、80、100、120s, 稀释涂皿, 29℃避光培养。

1.2.4 链霉素抗性突变株的分离: 将经过紫外线诱变的孢子悬液稀释后分别涂布于含最小抑制浓度的链霉素培养基平板上, 29℃培养 10d, 生长出的菌落即为链霉素抗性突变株。

1.2.5 摇瓶发酵实验: 斜面接种于装有 30mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中, 29℃, 200r/min 振荡培养 26h, 使菌体处于迅速生长期。然后以 2% 的接种量接种种子液到装液量为 50mL 的 500mL 三角瓶中, 29℃、200r/min 回转式摇床发酵 96h。

1.2.6 纳他霉素含量的测定：高效液相色谱法 (HPLC)^[1]。

2 结果

2.1 链霉素最小抑制浓度的测定

链霉素对 ATCC13326 菌株的最小孢子抑制浓度为 0.6μg/mL。

2.2 紫外线照射剂量与致死率的关系

见图 1。由图 1 可知，紫外线的照射时间与 ATCC13326 菌株的致死率之间存在明显的剂量效应关系。随着照射时间的延长致死率逐渐提高，照射时间超过 40s 时，致死率超过 90%，因此选用 40s 作为紫外线最佳诱变剂量。

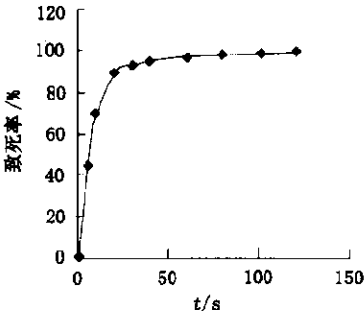


图 1 紫外线诱变的致死曲线

2.3 链霉素抗性突变株的筛选

在链霉素培养基平板上分离到 122 株抗性菌株，通过摇瓶发酵实验分别检测其纳他霉素产量，其中有 13 株的纳他霉素产量高于出发菌株 ATCC13326。结果见表 1。

表 1 13 株链霉素抗性突变株发酵实验结果

菌株	发酵产量 (g/L)	相对产纳他霉素 水平 (%)
ATCC13326	1.65	100
SG-13	2.03	123
SG-25	1.97	119
SG-32	2.15	130
SG-34	2.18	132
SG-45	2.11	127
SG-56	2.41	146
SG-62	1.89	115
SG-80	2.06	125
SG-89	1.75	106
SG-103	2.10	127
SG-112	2.24	136
SG-118	2.35	142
SG-121	1.85	112

由表 1 可见，利用链霉素抗性基因突变筛选法获得高产菌株的几率较高，大约 10% 左右的链霉素抗性菌株是纳他霉素产量获得提高的菌株。最高产量为出发菌株的 1.46 倍。

3 讨论

紫外线诱变是工业生产中最常用的诱变方法之一^[5]。在本实验的菌种选育中，利用紫外线对出发菌株 ATCC13326 进行诱变处理后，通过采用 0.6μg/mL 链霉素最小抑制浓度作为标记，筛选出大量链霉素抗性基因突变株，然后通过摇瓶发酵复筛纳他霉素高产菌株，不仅获得了纳他霉素产量达到 2.41g/L 的高产菌株 SG-56，并且极大提高了菌种选育的工作效率 (10.6%)。

链霉菌产抗生素能力与链霉素抗性基因之间的对应关系是目前抗生素科研领域的一个研究热点。抗生素的生物合成通常在营养生长和形态分化的过渡期内进行，菌体形态分化和产抗生素的开始往往伴随鸟苷四磷酸 (ppGpp) 的激增。这充分表明 ppGpp 是次级代谢起始的优势信号因子，对抗生素生产的启动具有重要作用^[6]。近来通过对几种链霉菌的 *relC* 基因突变分析显示，*relC* 突变株失去的产抗能力可以通过获得链霉素抗性突变而得到恢复，而没有伴随 ppGpp 的积累。进一步 DNA 测序显示该链霉素抗性突变与编码核糖体蛋白 S12 的 *rpsL* 基因发生改变有关^[7]。这种核糖体特定位点的突变导致核糖体结构发生改变，从而使菌体能够在无需 ppGpp 的情况下，经过一个尚不明确途径最终提高次级代谢产物的产量^[8]。在本实验中，我们将链霉素抗性筛选法结合传统诱变第一次应用于多烯大环内酯类抗生素产生菌的选育中，结果不仅证明了

该方法的广泛有效性, 并且获得了产量提高了 46% 的高产菌株 SG-56。

参 考 文 献

- [1] Brik H. *Analytical Profiles of Drug Substances*, 1994, 10: 514 ~ 557.
- [2] 尤 新主编. 功能性发酵制品. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.350 ~ 361.
- [3] 王世梅, 黄为一, 崔凤元. 微生物学通报, 2001, 28 (1): 64 ~ 67.
- [4] Chater K F, Bruton C J. *EMBO J*, 1985, 4: 1893 ~ 1897.
- [5] 王 敏, 路福平, 王建玲, 等. 中国抗生素杂志, 2000, 25 (2): 97.
- [6] Ochi K. *J bacteriol*, 1987, 169: 3608 ~ 3616.
- [7] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, *et al.* *J Bacteriol*, 1996, 178: 7276 ~ 7284.
- [8] Hesketh A, Ochi K. *J antibiot*, 1997, 50: 532 ~ 535.