

氢化可的松高产菌株新月弯孢霉的选育*

卢文玉 陈泮成 郭亚文 王 敏 杜连祥

(天津科技大学食品科学与生物工程学院制药工程系 天津 300222)

摘要:应用酮康唑抗性筛选法,将经过紫外线诱变处理的菌株11 β -羟基化菌株——新月弯孢霉的原生质体倾注在含有酮康唑最小抑制浓度(10 μ mol/L)的再生培养基平板上,再生出136株酮康唑抗性突变株。其中氢化可的松转化率高于出发菌株的有14株,正向突变率达到10.3%,同时获得了氢化可的松转化率为出发菌株1.42倍的遗传稳定突变株KA-91。

关键词:新月弯孢霉,酮康唑抗性筛选法,诱变,氢化可的松

中图分类号:Q93.331 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2003)06-0026-04

KETOCONAZOLE RESISTANCE MUTATION—A STUDY ON THE BREEDING OF STEROIDS 11 β -HYDROXYLATION STRAIN-CURVULARIA LUNATA

LU Wen-Yu, CHEN Pan-Cheng, GUO Ya-Wen, WANG Min, DU Lian-Xiang

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

Abstract: A method of ketoconazole resistance screening was applied to improve the conversion rate of hydrocortisone by *Curvularia lunata* (C-114). The protoplasts treated with UV light were regenerated on regenerated medium plates containing 10 μ mol/L ketoconazole. 136 ketoconazole-resistant mutants were obtained. The conversion rate of hydrocortisone of 14 mutants were higher than the original strain. The mutants with high conversion rate of hydrocortisone were screened at a high frequency (10.3%). The best one (KA-91) which was 1.42 times higher than the original strain in conversion rate of hydrocortisone was obtained.

Key words: *Curvularia lunata*, Method of ketoconazole resistance screening, Mutagenesis, Hydrocortisone

氢化可的松是重要的甾体激素类药物,除作为生产许多皮质激素类药物的前体外,其本身也具有很大的临床应用价值,有影响糖代谢、抗炎、抗过敏等作用,主要用于肾上腺皮质功能减退症的替代性治疗,并可治疗葡萄糖、血糖过多症等疾病。

目前氢化可的松的生产以RSA为底物,利用微生物产生的羟化酶在C₁₁- β 位引入羟基得到。国外采用新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)进行转化,收率达到55%~60%^[1,2]。在我国已经开展了对该菌的研究工作^[3,4],主要集中在菌种的筛选及发酵条件的改造等方面,力求能最终替代现有的氢化可的松生产菌——蓝色梨头霉(*Absidia coerulea*),改变其羟化酶专一性差,副产物多,氢化可的松收率仅为43%~45%的落后现状。选育高产新月弯孢霉菌株仍是当前研究工作的主要目标。

目前在高产菌株的选育中,诱变育种仍然是普遍应用并十分有效的方法。但是由于化学或物理诱变方法所产生的突变是随机的,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。

在微生物菌种的选育中,利用抗药性筛选法作为诱变育种的辅助手段,大大增加

* 教育部科技研究重点项目 (No. 天津 01004)

天津市重大科技攻关项目 (No. 023180211)

收稿日期: 2002-10-22, 修回日期: 2003-04-02

了育种的方向性,提高了筛选的工作效率。Katarzyna paraszkievicz 等通过诱变获得的新月弯孢霉高产菌株,其抗酮康唑 (Ketoconazole) 能力提高了 2.5 倍,氢化可的松产量提高了 4.4 倍^[5]。本文尝试采用诱变突变结合酮康唑抗性筛选的方法,探讨在氢化可的松转化菌的选育中,筛选高产菌株的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) C-114, 本校应用微生物研究室保存。

1.1.2 试剂:酮康唑为 Sigma 公司产品。

1.1.3 培养基:斜面培养基:PDA 培养基;发酵培养基:葡萄糖 20g, 酵母膏 5g, 蛋白胨 5g, 黄豆粉 10g, pH6.5, 定容至 1L;原生质体再生培养基:(下层)葡萄糖 10g, 酵母膏 4g, 琼脂 15g, 0.6mol/LKCl, (上层)琼脂 6g, 其余同下层, 两层均以 6°Bx 麦芽汁定容至 1L。

1.2 方法

1.2.1 原生质体制备与再生:原生质体制备与再生按参考文献 [6] 方法进行。将制备好的原生质体悬浮于含有 6mol/LKCl 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH7.0) 高渗缓冲液中, 稀释至 1.0×10⁶ 个/mL。

1.2.2 酮康唑最小抑制浓度的测定:吸取 0.1mL 原生质体悬液与含有不同浓度酮康唑的 4mL 上层再生培养基混合, 倾注于下层再生培养基平板上, 28℃培养 5d。观察不同浓度酮康唑平板上的菌落生长情况, 未生长菌落的酮康唑最低作用浓度即为酮康唑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:取浓度为 1.0×10⁶ 个/mL 的原生质体悬液 10mL 于 φ75 的无菌培养皿内, 于 15W 的紫外灯下, 距离 30cm 照射, 时间分别为 15、30、45、60、75、90、105、120、150s, 取 1mL 适当稀释后倾注于再生培养基上, 28℃避光培养 2~3d, 计数再生菌落。计算原生质体存活率, 存活率 (%) = (诱变后原生质体再生菌落数) / (诱变前原生质体再生菌落数)。

1.2.4 酮康唑抗性突变株的分离:将经诱变处理的原生质体悬液适当稀释, 吸取 0.1mL 与含有最小抑制浓度酮康唑的 4mL 上层再生培养基混合, 倾注在下层再生培养基平板上, 28℃培养 5d, 生长良好的菌落即为酮康唑抗性突变株。

1.2.5 摇瓶发酵实验:诱变菌株斜面用无菌水制成 3×10⁶ 个/mL 的孢子悬液, 脱脂棉过滤, 取 1mL 接种于盛有 30mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中, 28℃、180r/min 摇床振荡培养 24h, 调节 pH 为 6.5, 投入 0.1% 的 RSA, 再继续培养 48h。

1.2.6 氢化可的松转化率测定:高效液相色谱 (HPLC) 法进行^[3]。

2 结果与讨论

2.1 酮康唑最小抑制浓度的测定

由表 1 结果可知, 酮康唑对新月弯孢霉 C-114 菌株最小抑制浓度为 10μmol/L。

表 1 酮康唑最小抑制浓度的确定

酮康唑含量 (μmol/L)	4	6	8	10	12	14	16	20
菌体生长情况	+	+	±	-	-	-	-	-
+ 代表生长良好, ± 代表微弱生长, - 代表不生长								

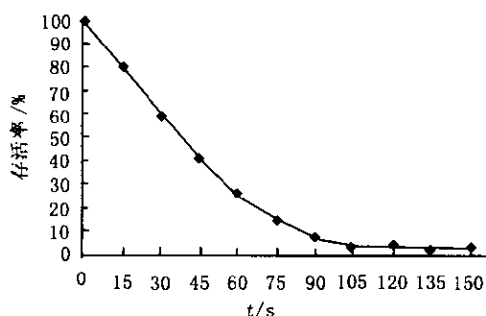


图1 紫外线诱变存活率曲线

表2 14株酮康唑抗性突变株发酵实验结果

菌株	转化率(%)	相对产抗水平
C-114	47.89	100
KA-05	54.60	114
KA-08	66.09	138
KA-18	51.72	108
KA-26	56.03	117
KA-29	57.47	120
KA-35	62.74	131
KA-44	60.83	127
KA-49	56.99	119
KA-57	58.90	123
KA-64	66.57	139
KA-73	59.86	125
KA-80	59.38	124
KA-91	68.05	142
KA-112	60.34	126

表3 菌株遗传稳定性

传代代数	第1代	第2代	第3代	第4代	第5代
转化率(%)	68.05	69.03	68.0	67.07	65.96

2.2 紫外线照射剂量与致死率的关系

由图1可知,紫外线的照射时间与新月弯孢霉 C-114 菌株的存活率之间存在明显的剂量效应关系,随着照射时间的延长存活率逐渐降低。据报道当存活率在 10%~20% 时可以获得较高的突变率^[7]。诱变时间为 75s 和 90s 时的存活率分别为 15.2% 和 7.2%, 选择 75s 作为诱变时间。

2.3 酮康唑抗性突变株的筛选

在含酮康唑的再生培养基平板上分离到 136 株抗性菌株,通过摇瓶发酵实验分别检测其氢化可的松转化率,其中有 14 株氢化可的松转化率高于出发菌株,结果如表 2 所示。

由此可见,利用酮康唑抗性突变筛选法获得高产菌株的几率较高,大约 10% 的酮康唑抗性株是氢化可的松高产菌株。最高产量为出发菌株的 1.42 倍,转化率达到 68.05%。

2.4 遗传稳定性实验

为考察酮康唑抗性菌株的传代稳定性,将产抗水平最高的 KA-91 菌株在 PDA 斜面连续转接 5 代,然后在同一条件下进行摇瓶发酵,每 1 菌株做 3 个平行样,结果如表 3 所示。从表中数据看出,转接前 4 代氢化可的松转化率下降不超过 1.5%,第 5 代的转化率比第 1 代低 3.1%。说明菌株的氢化可的松高产特性稳定。

3 讨论

紫外线诱变是工业生产中最常用的诱变方法之一。本实验利用紫外线对出发菌株原生质体进行诱变处理后,筛选出酮康唑抗性突变株,然后通过摇瓶发酵复筛氢化可的松高产菌株,极大地提高了诱变菌株的正变频率(10.3%),提高了菌种筛选的工作效率,高产菌株遗传性状稳定。

实验中对萌发的孢子和菌丝进行诱变处理时不能获得良好的突变效果(数据未列出)。可能由于新月弯孢霉孢子和菌丝壁厚且具有多核结构,尚未突变核会对已发生有益突变的核进行“补救性”修复^[8],影响诱变效果。新月弯孢霉原生质体具有单核结构^[1],通过对其进行诱变可以获得较高的突变频率。

在新月弯孢霉代谢 RSA 产生氢化可的松过程中,底物 RSA 被吸引进入细胞后,在 11 β 羟化酶的作用下实现 β 位羟基化,生成目标产物氢化可的松。目前人们已知 P450 酶是 11 β 羟基酶的关键酶, P450 酶的活性强弱直接影响着菌株的转化能力^[5,9]。实验也证明新月弯孢霉细胞色素 P450 酶含量与产氢化可的松速率成正相关性(另文发表)。

酮康唑是一种细胞色素 P450 抑制剂, 能够抑制真菌细胞膜基本组成成分——麦角甾醇的合成, 从而引起细胞膜结构和功能的改变^[10]。1998 年 Katarzyna paraszkiwicz 等报道通过诱变获得的新月弯孢霉高产菌, 其抗酮康唑的能力比亲株提高了 2.5 倍, 突变株的 P450 酶含量比亲株高出至少 3 倍, 转化率提高了 4.4 倍^[5]。1993 年 Kenzi suzuki 等报道酮康唑对新月弯孢霉 P450 酶活性具有抑制作用, 进而影响氢化可的松的产量^[9]。本文通过筛选酮康唑抗性突变株可以有效地提高突变株的正变频率。这些研究均表明新月弯孢霉酮康唑抗性与其甾体 11 β 羟化能力之间有一定的相关性。

由于细胞色素 P450 酶分布在细胞膜或线粒体膜上, 可能酮康唑抗性突变菌株 P450 酶结构发生改变后引起酶活性的变化, 或者膜结构和通透性的改变对底物吸收或产物分泌产生影响, 关于此方面的研究我们正在深入进行。

参 考 文 献

- [1] Wilmanska D, Milczarek K, Rumijowska A, *et al.* Appl Microbiol Biotech, 1992, **37** (5): 626 ~ 630.
- [2] Chen K C, Wey H C. Enzyme Microbiol Technol, 1990, **12** (4): 305 ~ 308.
- [3] 曾本秀, 陈树群, 陈伯林. 中国医药工业杂志, 1993, **24** (12): 529 ~ 532.
- [4] 黄淑惠, 徐诗伟, 法幼华. 微生物学报, 1989, **29** (1): 68 ~ 71.
- [5] Paraszkiwicz K, Dlugonski J. J Biotech, 1998, **65**: 217 ~ 224.
- [6] 王 敏, 路福平, 蒋 岳, 等. 微生物学杂志, 2000, **20** (3): 36 ~ 37.
- [7] 杜连祥. 工业微生物学实验技术. 天津: 天津科学技术出版社, 1992.
- [8] Rowlands A R. Industrial fungal genetics and strain improvement. Arnold London, 1983, 346.
- [9] Suzuki K, Sabga K, Chikaoka Y, *et al.* Biophysica Biophysica Acta, 1993, **1203**: 215 ~ 223.
- [10] Kaufmats C A, Carver P L. Acta Pharmaral, 1997, **39**: 143.