

利用特比萘芬抗性筛选赤霉素高产菌株 及相关发酵特性的研究

王卫^{1,2} 黎继烈¹ 黄卫文^{2*} 李忠海^{2*} 曾柏全¹

(1. 中南林业科技大学 生命科学与技术学院 湖南 长沙 410004)

(2. 中南林业科技大学 食品科学与技术学院 湖南 长沙 410004)

摘要:【目的】诱变、筛选赤霉素高产菌株,并明确该菌遗传稳定性及部分发酵特性。【方法】利用亚硝基胍、⁶⁰Co-γ射线以及复合诱变的方法,结合抑真菌剂-特比萘芬抗性筛选,定向选育赤霉素高产突变株;通过琼脂斜面传代实验确定遗传稳定性;发酵罐培养了解其部分发酵性状。【结果】藤仓赤霉菌单细胞悬液先后经过终浓度为300 mg/L亚硝基胍30 min和⁶⁰Co-γ射线300戈瑞下复合诱变,得到抗120 μg/L特比萘芬的赤霉菌突变株。摇瓶复筛,确定赤霉素突变菌株的赤霉素合成能力,其中ZNL13-3菌产赤霉素效价为2 215±35 mg/L,较之诱变前发酵效价平均提高了11.87%。ZNL13-3菌株经连续15次试管斜面传代考察,菌株赤霉素合成的稳定性较好,能维持原发菌株93.2%,具有良好的遗传稳定性和生产应用前景。5 L发酵罐培养,比较菌丝浓度和产物浓度随发酵时间变化趋势,ZNL13-3菌比生产速率优于原发菌株。【结论】赤霉菌抗特比萘芬的变异特性与赤霉素高产之间存在某种对应关系,为进一步定向优化筛选优良菌株提供参考。

关键词:突变,赤霉素,特比萘芬

Screening and identification of high gibberellin-producing strain from terbinafine resistant mutants

WANG Wei^{1,2} LI Ji-Lie¹ HUANG Wei-Wen^{2*} LI Zhong-Hai^{2*} ZENG Bo-Quan¹

(1. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology,
Changsha, Hunan 410004, China)

(2. College of Food Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology,
Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: [Objective] The high gibberellins-producing strains were screened and identified. Meanwhile, studies on characterization of genetic stability and fermentation in the bioreactor were also carried out. [Methods] Used the NTG, ⁶⁰Co-γ rays and composite mutagenesis methods, high-yield mutant strains were isolated directionally in the medium including the antifungal

基金项目: 国际先进林业科技引进项目(No. 2012-4-17)

*通讯作者: Tel: 86-731-85623432; 信箱: hww5626@163.com

收稿日期: 2013-12-02; 接受日期: 2014-02-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-17

agents-terbinafine. The genetic stability of mutant strain was determined by the several generations on the agar slants. The part of its fermentation characteristics were studied in the fermentation tank. **[Results]** The strains suspension was treated with the mutagens including a final NTG concentration 200 mg/L for 30 min, followed by ^{60}Co gamma ray (300 Gy). The mutant strains were isolated on the PDA plate containing 120 $\mu\text{g/L}$ terbinafine. After further shaking flask experiments, potentials of the mutant strains were determined. The fermentation titer of strain ZNL13-3 was $2\ 245\pm 35$ mg/L, increased 11.87% compared with the primary strains. The ZNL13-3 has a good genetic stability and value of application. Fermentation performance of ZNL13-3 is better than the primary strains, compared with the time trends of mycelia concentration and gibberellin acid concentration in the 5 L bioreactor. **[Conclusion]** The high-yield strains of gibberellin acid could be found and its ability to produce gibberellin acid could be affected by the terbinafine resistance.

Keywords: Mutants, Gibberellin, Terbinafine

赤霉素是重要的植物生长激素,被广泛地应用于园林、园艺和农业杂交水稻制种等诸多领域。工业生产赤霉素 GA_3 主要采用丧失了产孢能力的藤仓赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*)突变株,经液态深层发酵而获得。虽已在发酵过程优化方面采用静息态赤霉菌产赤霉素能力的研究,阐明了固定菌丝发酵与大孔树脂吸附耦合发酵的特征,有效的降低赤霉素 GA_3 的生产成本^[1-3]。然而筛选高产菌株、改善单位菌丝产率一直是研究的热点,各种技术手段不断被应用,如:李武军等^[4]对菌体原生质体进行诱变,原生质体融合重组选育;构建携带血红蛋白基因的藤仓赤霉菌工程株^[5]及代谢分析诱变^[6]等,其中抗性筛选因具有代谢定向特性而倍受重视。张金儿等^[7]应用氯霉素抗性筛选法,获得赤霉素产量高于出发菌 20%的阳性氯霉素抗性突变株。本研究组采用制霉菌素抗性筛选也获得产赤霉素能力提高 16.8%的菌株^[8],但筛选新的与高产相关抗性标记仍具有重要理论指导和生产意义。

特比萘芬,烯丙胺类抗真菌药,抑制真菌细胞麦角甾醇合成过程中的鲨烯环氧化酶,并使鲨烯在细胞中蓄积而起杀菌作用。而菌内合成麦角固醇和赤霉素是同一前体物——鲨烯,抗致死浓度特比萘芬的赤霉菌突变株有可能获得高通量的赤霉素 GA_3 合成代谢。 ^{60}Co - γ 射线和亚硝基胍(NTG)是超诱变剂,细胞可以诱发一次至多次突变,在适合条件下,死亡率低而正诱变率高^[9-10]。在实际生产中多采用几种诱变剂复合处理、交叉使用的方法进

行菌株诱变。因此,本研究选择最佳 ^{60}Co - γ 射线、亚硝基胍诱变剂量以及两者复合诱变筛选抗特比萘芬的赤霉菌突变菌株,以期获得具有稳定性状的赤霉素高产菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

1.1.1 菌种:藤仓赤霉菌978[#],湖南亚华种业有限公司提供,为无孢子突变株。

1.1.2 培养基配方:(1)斜面种培养基:PDA培养基;(2)初筛培养基:PDA培养基的基础上加入适量的特比萘芬。(3)种子培养基(g/L):葡萄糖 15.0,糊精 10.0,花生饼粉 15.0, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, KH_2PO_4 1.0, pH 自然。(4)发酵培养基(g/L):淀粉 80.0,谷粉 25.0,黄豆饼粉 3.0,花生饼粉 10.0, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7, KH_2PO_4 1.2, pH 自然。培养基均在 1×10^5 Pa 饱和湿热蒸汽下灭菌 20 min。

1.2 赤霉菌培养方法

1.2.1 种子培养:300 mL 摇瓶装液量为 60 mL,摇床转速 180 r/min, 28 $^\circ\text{C}$ 培养 48 h。

1.2.2 摇瓶发酵培养:300 mL 摇瓶装液量为 80 mL,接种量 8%,摇床转速 180 r/min, 28 $^\circ\text{C}$ 培养 198 h。

1.2.3 赤霉菌细胞悬液的制备:采用玻璃珠机械法打碎对数生长期赤霉菌菌丝,参见文献[6]。

1.3 特比萘芬对原发赤霉菌致死浓度测定

将过滤除菌的特比萘芬加入已灭菌冷却至 50 $^\circ\text{C}$ 左右的种子培养基中,混合至特比萘芬终浓度为 200 $\mu\text{g/L}$,倒平皿,斜置,凝固后再在上层水

平平铺固体种子培养基,制成特比萘芬 0–200 $\mu\text{g/L}$ 的浓度梯度平皿,并作浓度梯度标记。在特比萘芬的浓度梯度平皿内,涂布赤霉菌悬液,28 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中观察特比萘芬对赤霉菌的抑制作用,即高浓度一侧没有菌落长出,低浓度一侧长满菌落,菌落分界线所在特比萘芬浓度即为大致的赤霉菌致死浓度。再以该浓度为中心浓度上下浮动制成系列梯度平皿,精确测定特比萘芬对赤霉菌的致死浓度。

1.4 诱变及筛选方法

1.4.1 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线诱变: 提前处理稀释的赤霉菌细胞悬液 20 mL 置于 50 mL 无菌三角瓶中。分成 6 组剂量梯度,每组 3 个平行,利用 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线,在 100–800 戈瑞(Gy)的辐射剂量范围对其进行辐射诱变处理。

1.4.2 亚硝基胍(NTG)诱变: 用丙酮将亚硝基胍配制成浓度为 3.0 g/L。取适宜体积上述母液与赤霉菌细胞悬液混合至 NTG 终浓度为 50–300 mg/L,置于直径 6 cm 的培养皿内,开启磁力搅拌器,诱变处理 30 min 后,用 0.2 mol/L pH 8.0 的 PBS 稀释终止反应。考察 NTG 剂量对赤霉菌体的致死率和抗性突变率。

1.4.3 NTG+ $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线复合诱变: 取经过 200 mg/L NTG 浓度处理 30 min 的赤霉菌细胞悬液 5 mL,放入 50 mL 三角瓶,在 300 戈瑞 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线进一步复合诱变。处理后,细胞悬液平皿涂布,置 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3–5 d,计数各平皿菌落数,并计算致死率及特比萘芬抗性突变率。每次试验测定结果都采用 3 个平行组,测试结果为各重复样的平均值。

1.4.4 突变株初筛: 利用抗特比萘芬的特性定向高效筛选赤霉菌突变株,将诱变后的菌悬液涂布于含致死浓度特比萘芬 PDA 平皿和不含抗生素的平皿,28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 3–5 d,平皿菌落计数。

1.4.5 突变株复筛: 将初筛得到各突变株接于种子培养基,并转接至发酵摇瓶,测定其赤霉素合成能力。

1.5 菌株遗传稳定性

将复筛得到的菌株在 PDA 斜面上连续传代 15 次,每次传代后在发酵培养基中培养测定赤霉素含量。以原菌株发酵所产赤霉素含量为 100%,其他

各代与之比较,考察遗传稳定性。

1.6 赤霉菌生物量(DCW)和麦角固醇含量的测定

将发酵液离心,用蒸馏水洗涤 2 次,弃上清液后于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干至恒重,称重。

精密称取干菌体 0.3 g (空白不加)置于 100 mL 磨口三角瓶中,加入 24 mL 50% NaOH,40 mL 甲醇,85–90 $^{\circ}\text{C}$ 皂化 1.5 h,再加 8 mL 95%乙醇继续皂化 1.5 h,冷却后加蒸馏水 16 mL,正庚烷 16 mL,振荡 30 s,静置 30 min 分层。取上层清液 0.5 mL,加 4.5 mL 95%乙醇,紫外分光光度计测定 282 nm 的吸光度值^[11]。

1.7 赤霉素 GA_3 检测方法

采用高效液相色谱法^[12]。

1.8 赤霉素菌株发酵特性

将预备好的赤霉菌种子培养液按 8% 的接种量,接入 5 L 全自动发酵罐(上海保兴),分时取罐内样测定菌丝浓度(干重)和赤霉素浓度,以考察所筛选菌 ZNL13-3 株的发酵过程变化。在菌株发酵代谢特征考察过程中,为避免培养条件对其发酵过程影响,进行补酸碱液维持发酵体系 pH 在 3.0–3.5 之间,搅拌转速与溶氧电极 Do 值联动维持发酵液的氧含量不低于饱和溶氧量的 15%。

2 结果与讨论

2.1 特比萘芬致死浓度的确定

赤霉菌悬液涂布于不同特比萘芬浓度梯度的 PDA 平皿内,培养 3 d 后,菌落计数,以不含特比萘芬平皿为 100%。由图 1 可知:随着浓度增加,赤霉菌菌落数逐步降低,在特比萘芬浓度 20–75 $\mu\text{g/L}$ 时,杀菌效果明显;至浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 时,赤霉菌菌落数仅为不含特比萘芬平皿菌落数的 4.6%。为提高后续筛选的有效性,选择特比萘芬对赤霉菌的最低致死浓度为 120 $\mu\text{g/L}$,并以此作为突变菌株抗性筛选浓度。

2.2 诱变剂剂量的选择与复合诱变

2.2.1 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线剂量的选择: 赤霉菌对 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线的辐射较为敏感,当其辐射剂量为 450 Gy 时,

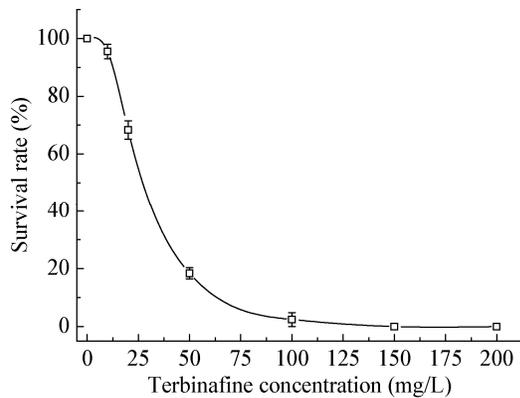


图1 特比萘芬对赤霉菌生长抑制效果

Figure 1 Effect on the growth of *Gibberella fujikuroi* restrained by the terbinafine

菌致死率即达到 90.5%，这应该与参与诱变的菌为营养细胞的形态相关。抗性突变株的变化与单调上升的菌致死率不同，存在极值，变化趋势见图 2。由图 2 可知，当选择致死率在 75%–80%之间，即 ^{60}Co - γ 射线的辐射强度为 300 Gy 时，抗特比萘芬的突变株比率较大。由此，我们将 ^{60}Co - γ 射线的诱变剂量选择为 300 Gy。

2.2.2 亚硝基胍(NTG)剂量的选择: 化学超诱变剂 NTG 通过烷化作用，使菌体的碱基直接发生变化，从而改变菌体的生理性状。在 NTG 浓度为 50–300 mg/L 下处理赤霉菌致死率和突变率，如图 3 所示。当 NTG 浓度为 300 mg/L 时，悬液中赤霉菌几乎完全致死(致死率为 $98.6\% \pm 0.5\%$)。与 ^{60}Co - γ 射线诱变类似，突变率在所考察的 NTG 浓度范围存在极值。因此，本试验选定 NTG 浓度 200 mg/L 作为适宜诱变剂量(致死率为 $88.7\% \pm 1.8\%$)，对赤霉菌进行 NTG 诱变。

2.3 ^{60}Co - γ 射线-NTG 复合诱变

将初筛获得的突变株通过摇瓶发酵培养进行

复筛，经 HPLC 定量分析后，赤霉素产量高于出发菌株 978[#] 的突变株即为正变株。为比较单一诱变与复合诱变的效果，菌株死亡率、抗性突变率和正突变率变化列入表 1。复合诱变在抗性突变率和正突变率均优于单一诱变，而且由于菌死亡率较高，为 $92.6\% \pm 1.4\%$ ，这降低了筛选工作量，使得高产株的检出更高效。

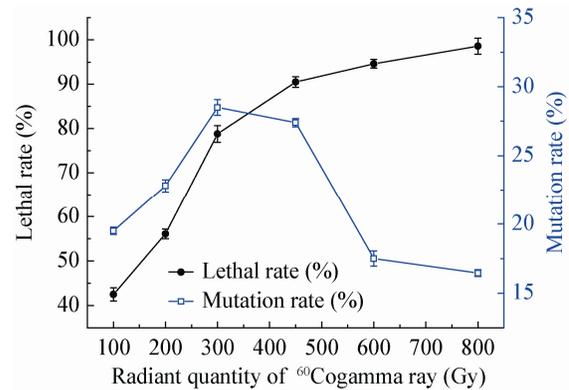


图2 ^{60}Co - γ 射线辐射强度对赤霉菌诱变效果

Figure 2 The lethal rate and mutating rate of *Gibberella fujikuroi* induced by ^{60}Co gamma ray

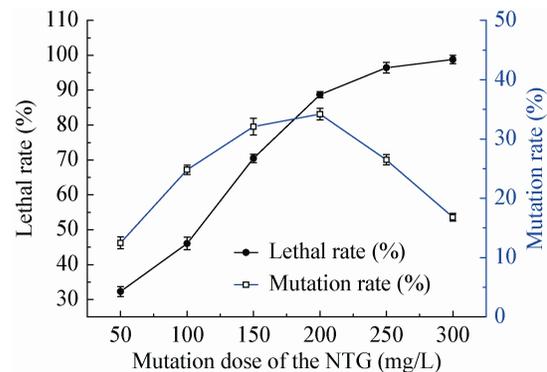


图3 NTG 剂量对赤霉菌诱变结果

Figure 3 The effect of sterilization and mutation by NTG dose

表1 诱变方式对赤霉菌变异影响

Table 1 The effects of the mutagenesis methods on *Gibberella fujikuroi* 978[#]

诱变方式 Mutagenesis method	诱变剂量 Mutation dose	菌死亡率 Lethal rate (%)	抗性突变率 Resistance mutation rate (%)	正突变率 Positive mutation rate (%)
^{60}Co - γ	300 Gy	78.1 ± 1.9	28.50 ± 0.58	35.5
NTG	200 mg/L	88.7 ± 0.9	34.20 ± 0.99	31.5
^{60}Co - γ +NTG	300 Gy+200 mg/L	92.6 ± 1.4	39.10 ± 0.41	41.7

选出 3 株赤霉素产量提高幅度较大的菌株,其中经复合处理的抗性平板上获得一株突变株 ZNL13-3 的赤霉素产量提高最大,经定量分析,该诱变株发酵液中赤霉素含量为 $2\,215 \pm 35$ mg/L,较出发菌株发酵效价平均提高了 11.87%,单位菌丝赤霉素合成率提高 13.24%。同时测定了突变株细胞膜麦角固醇含量,均较出发菌株有所提高,说明麦角固醇量与高产呈正相关性,数据见表 2。

2.4 菌株 ZNL13-3 遗传稳定性

对菌株 ZNL13-3 连续传代培养,摇瓶发酵结果见图 4,传代 15 次产赤霉素量稳定,维持在 93.2% 以上,表明该突变株遗传稳定性较好。试验经 3 次重复均得出了较为一致的结果,证明该突变株赤霉素合成量具有可靠的稳定性,可作为潜在的生产菌株。

2.5 菌株 ZNL13-3 发酵特性研究

筛选菌 ZNL13-3 与原发菌株 978[#]发酵过程变

化趋势见图 5。由图 5 可知,原发菌株 978[#]与筛选株 ZNL13-3 在菌丝量和赤霉素浓度的发酵变化趋势基本一致,均在发酵 45–60 h 后,菌丝量达到峰值,并在此时发酵液中赤霉素被检测出,但在赤霉素产生变化趋势上略有不同。为获得单位菌丝的生长速度和生产速度,采用 Origin 8.0 对发酵进程中的菌浓度和赤霉素浓度的数值进行微分运算,获得两者在相应发酵时刻的比生长速率 μ 与比产物合成速率 q_p ,变化差异见图 6。比生长速率 μ 的最大值均出现在接种 10 h 左右,但 ZNL13-3 菌株的最大比生长速率值为 0.210 h^{-1} ,是原发菌株最大值的 111.1%;在比产物合成速率 q_p 方面,ZNL13-3 菌株的极值出现得比 978[#]菌株早,在发酵 70 h 左右,为 $3.16\text{ (mg}\cdot\text{h)/g}$,978[#]菌株 q_p 极值出现在发酵 100 h,为 $2.88\text{ (mg}\cdot\text{h)/g}$,将两条比产物合成速率 q_p 曲线采用 Origin 软件数值积分后,可推出发酵过程平均 q_p 值,ZNL13-3 菌株为 $1.12\text{ (mg}\cdot\text{h)/g}$,978[#]菌株

表 2 抗性突变株中赤霉素合成能力与麦角固醇含量变化关系
Table 2 The relativity in production ability of resistant mutant and ergosterol content

菌号 Strain	发酵效价 Fermentation value (mg/L)	单位菌丝赤霉素合成量 Production capacity in unit mycelium (mg/g)	相对变化率 Relative change rate (%)	麦角固醇含量 Ergosterol content (mg/g)	相对变化率 Relative change rate (%)
978#	1 980	48.18	—	15.41	—
ZNL13-3	2 215	54.56	13.24%	18.11	17.52%
ZNL13-4	2 176	52.69	9.36%	17.47	13.37%
ZNL13-6	2 200	52.76	9.51%	17.58	14.05%

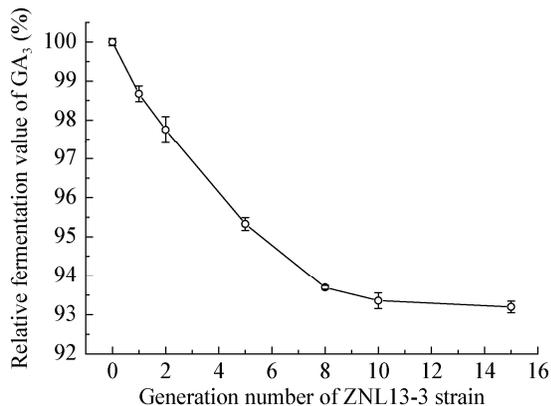


图 4 菌株 ZNL13-3 的遗传稳定性

Figure 4 Results of genetic stability of the ZNL13-3 strain

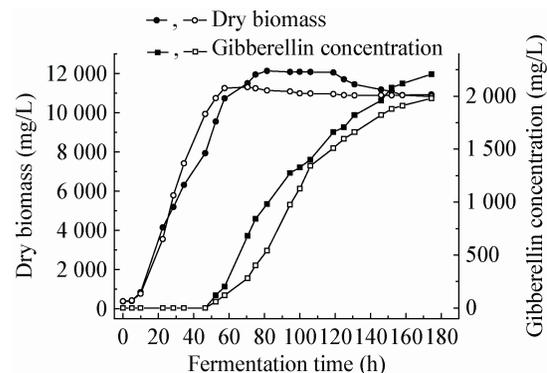


图 5 发酵罐菌丝干重与赤霉素浓度变化曲线

Figure 5 The curve of dry biomass and gibberellin concentration on the fermentation

注:实心图标为 ZNL13-3 菌株,空心图标为 978[#]菌株。

Note: Solid icon represents ZNL13-3 strain, hollow icons are 978[#] strain.

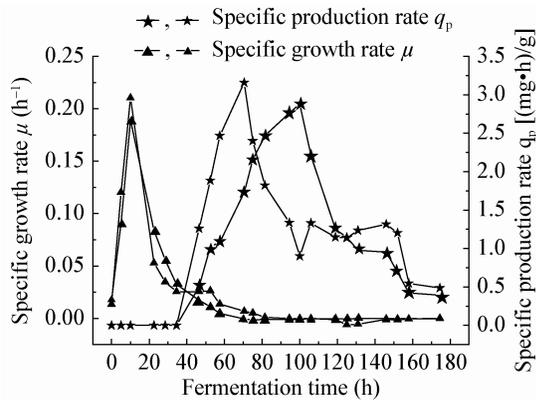


图6 比生长速度与比产物合成速率变化曲线

Figure 6 The curve of specific growth rate and specific production rate in GA₃ fermentation

注: 实心图标为 ZNL13-3 菌株, 空心图标为 978[#] 菌株。

Note: Solid icon represents ZNL13-3 strains, hollow icons are 978[#] strains.

为 1.06 (mg·h)/g, 这显示菌株 ZNL13-3 单位时间产素强度高于原发菌株, 可缩减发酵周期, 提高生产效率。其中 ZNL13-3 菌株赤霉素高产的特性是否与发酵 10–40 h 的比生长速率 μ 的变化存在直接关联, 有待进一步研究, 但熊强等^[12]在液体深层发酵过程中, 指出丝状真菌其生长形态与产物种类及产量间存在重要关联, 可采用数学模型解释丝状真菌的形态发育与调控机制, 将形态生理学和形态工程学引入相关研究中。

3 结论

作为赤霉素 GA₃ 的生产菌——*Gibberella fujikuroi* 978[#], 因其为不产孢子突变株, 在高产菌株诱变实践过程中存在筛选困难以及遗传性状不稳定, 寻求高产筛选标记具有重要现实意义。同时, 随着生物代谢网络信息工程的建立, 双萜类物质的合成途径已可方便查阅、下载, 如: KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg>), 为高产菌株筛选设计提供便捷。特比萘芬作为抑真菌抗生素, 其作用位点在真菌胞内鲨烯环氧化酶, 导致细胞膜成分麦角固醇合成所需中间体——鲨烯的缺失而使菌灭活。赤霉菌抗特比萘芬突变株将绕开抑制鲨烯合

成的代谢调控, 导致中间体的积累, 在一定程度上改善赤霉素合成途径的通量, 从而实现高产, 其中 ZNL13-3 突变株发酵效价较之前提高了 11.87%, 且赤霉素合成的遗传性状稳定。5 L 发酵实验进一步测试 ZNL13-3 突变株发酵特性。此类定向抗性筛选为获得赤霉素高产菌株提供了有益的尝试。在此基础上, 我们将针对突变株与原发株在发酵中后期代谢通量进行分析、比对, 阐明高产株遗传调控机制, 为将来进一步优化发酵配比和工艺条件指导方向, 并为类似双萜物质生物合成的代谢工程研究工作提供参考。

参考文献

- [1] 王卫, 吴耀辉, 黎继烈, 等. 静息培养条件下赤霉菌菌丝产素能力的研究[J]. 工业微生物, 2012, 42(2): 33-37.
- [2] 王卫, 李忠海, 黎继烈, 等. 海藻酸钙固定赤霉菌菌丝产素的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 36-41.
- [3] 王卫, 李忠海, 黎继烈, 等. 赤霉素发酵与大孔树脂吸附过程耦合工艺优化[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(11): 70-74.
- [4] 李武军, 郑幼霞. 赤霉素生产菌-藤仓赤霉菌融合重组的研究[J]. 微生物学报, 1995, 35(4): 271-274.
- [5] 庄木坤. 赤霉素高产菌株改造与发酵研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2007.
- [6] 王卫, 李忠海, 黎继烈, 等. 以脂肪酶为指标筛选赤霉素高产菌株的研究[J]. 工业微生物, 2011, 41(1): 51-54.
- [7] 张金儿, 朱江萍, 刘义雄, 等. 从氯霉素抗性突变株筛选赤霉素高产菌株[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(5): 301-303.
- [8] 王卫, 郭珺, 曾柏全, 等. 利用制霉菌素抗性筛选赤霉素高产菌株的研究[J]. 北方园艺, 2011, 254(23): 121-124.
- [9] Parekh S, Vinci VA, Strobel RJ. Improvement of microbial strains and fermentation processes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(3): 287-301.
- [10] 魏培莲. 土曲霉固态发酵产洛伐他汀的关键技术和新工艺探索[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2007.
- [11] Castillo G, Martinez S. Reversed-phase C₁₈ high performance liquid chromatography of gibberellins GA₃ and GA₁[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 782(1): 137-139.
- [12] 熊强, 徐晴, 顾帅, 等. 丝状真菌形态控制及其在发酵过程优化中的应用[J]. 生物工程学报, 2012, 28(2): 178-190.