

产克拉维酸的棒状链霉菌突变株的选育*

王艳萍,张永生,张 阳,左志晗

(天津市食品营养与安全重点实验室,天津科技大学食品工程与生物技术学院,天津,300457)

摘 要 以棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*), B71 为出发菌株,通过紫外线诱变育种,采用琼脂块法初筛和摇瓶发酵复筛,选育出 2 株甘油耐受性正向突变株 *S. clavuligerus* B71-14 和 *S. clavuligerus* B71-49,在摇瓶条件下,其克拉维酸产量与出发菌株 *S. clavuligerus* B71 相比,分别提高了 90.6% 和 88.8%,并具有良好的遗传稳定性。

关键词 棒状链霉菌,紫外诱变,耐甘油,克拉维酸

克拉维酸(clavulanic acid,简称 CA),是一种天然的 β -内酰胺类抗生素,虽然它本身的抗菌活力很弱,但是它是一种强力、广谱且不可逆的 β -内酰胺酶抑制剂,与 β -内酰胺类抗生素,如阿莫西林、替卡西林分别联合,制成酶抑制剂联合制剂,可在不同程度上保护与其联合的 β -内酰胺类抗生素不被 β -内酰胺酶灭活,从而提高该抗生素对产酶耐药菌的抗菌活性,提高临床疗效^[1]。

作为目前所了解的最优秀的 β -内酰胺酶抑制剂——克拉维酸,对较好地解决抗生素青霉素的抗药性起到了巨大作用。但是目前我国的克拉维酸生产效率比较低,不具备国际竞争力。主要问题就是缺少高产、且性状优良的菌株,以及工业化生产方法比较落后,需要进一步改进。

Kwang-Pil C 等^[5]经紫外线和 NTG 诱变筛选出比原始菌株 *S. clavuligerus* NRRIJ 3585 克拉维酸产量高出 10 倍的突变株 CKD111,又将经上面诱变过程得出的 Arg 营养缺陷型菌株和 Cys 缺陷型菌株进行原生质体融合,得到比原始出发菌株克拉维酸产量高出 30 倍的高产菌株 *S. clavuligerus* CKD1386。Elson 等^[3]通过标记前体化合物研究了掺入克拉维酸的前体物,结果表明,酯酸盐可形成克拉维酸分子的一部分五碳骨架(碳 2, 3 及 8, 9, 10);甘油可提供 β -内酰胺环(碳 5, 6, 7)的碳骨架^[4],做为克拉维酸合成的前体。孟勇等^[7]在克拉维酸高产菌的选育过程中,应用解除终产物结构类似物抑制作为选择压力,有效地除去了低效价菌株,提高了高产菌株的检出率,筛选到 1 株抗 20×10^{-3} g/mL 舒巴坦钠的突变株 my51,该菌株产克拉维酸能力比出发菌株提高了 1.18 倍,且传代稳定。

文中的实验是根据代谢控制育种的原则,采用推理筛选的方法,用紫外线对棒状链霉菌 *S. clavuligerus* B71 进行诱变处理,以克拉维酸的前体物质甘油作为诱变菌株的选择压力,采用琼脂块法初筛和摇瓶复筛得到 2 株克拉维酸高产菌株 *S. clavuligerus* B71-14 和 *S. clavuligerus* B71-49。它们在摇瓶条件下,其克拉维酸的产量分别比出发菌株提高了 90.6% 和 88.8%。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

出发菌种:棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*) B71,由天津科技大学食品生物技术研究室保藏。

检测菌:肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC 29665,天津科技大学食品生物技术研究室保藏。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 平板分离培养基

(1) ISP-agar(g/L):ISP 8;琼脂 20,pH7.3。

(2) YMGA 培养基(g/L):酵母粉 4;麦芽提取物 10;葡萄糖 4;琼脂 20,pH7.3。

1.1.2.2 活化液体培养基:

ISP-liquid(g/L):ISP 8,pH 7.3。

1.1.2.3 指示菌斜面培养基:

LB(g/L):蛋白胨 10;酵母粉 5;琼脂 20;NaCl 10,pH7.0。

1.1.2.4 种子培养基(g/L)

TSB:TSB30;淀粉 10,pH6.8~7.0。

以上所有培养基灭菌条件:121℃,20min。

1.1.3 相关溶液的配制

(1)咪唑溶液,克拉维酸标准溶液,青霉素溶液

第一作者:博士,教授。

*天津市 2004 年自然科学基金资助项目(043802711)

收稿日期:2006-10-18, 改回日期:2007-01-25

(Amp⁵⁰)的配制见参考文献[11]。

(2) Nash 试剂,高碘酸钠溶液,0.1% L-鼠李糖及甘油标准溶液的配制见参考文献[10]。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬液的制备^[5]

加适量的无菌水于培养好的孢子斜面上,用接种环刮取孢子,悬浮后用吸管将孢子悬液转移入装有玻璃珠的三角瓶中,剧烈振荡,使孢子链分散,用过滤器过滤菌丝体,3 500 r/min 离心 10 min,并用生理盐水洗涤 3 次,最后弃上清液,加入生理盐水调整孢子液至合适浓度备用。

1.2.2 紫外线诱变处理

将培养好的 *S. clavuligerus* B71 孢子斜面按上述方法制备孢子悬液,取孢子悬液 5 mL 于无菌平板中,于 30 W 紫外灯下 30 cm 处照射,恒速搅拌下分别照射不同时间,取照射后的孢子液 0.1 mL 涂布于含甘油的 YMGA 平板上,28℃避光培养 7d。以不含甘油的 YMGA 平板培养物为对照。

1.2.3 突变菌株的筛选方法

1.2.3.1 琼脂块法初筛^[6]

1.2.3.2 摇瓶复筛

种子培养:用竹签从初筛保存的斜面上挖取约为 1 cm×1 cm 的 *S. clavuligerus* 菌丝体,连同培养基接于装有 25 mL ISP 培养基的 250 mL 挡板三角瓶中,于 180 r/min,28℃培养 48 h,然后转接于装有 50 mL TSB 培养基的 500 mL 挡板三角瓶,于 180 r/min,28℃培养 36 h。

摇瓶发酵培养:将培养好的种子液按 5% 的接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 挡板三角瓶中,于 180 r/min,28℃,培养 96~144 h。分别取样测定克拉维酸的效价。

1.2.4 甘油含量的测定^[7]

1.2.5 克拉维酸效价的测定

1.2.5.1 生物检测法

将生物检测法作为定性方法。将无菌滤纸片贴在制备好的双碟平板上,用加样枪精密吸取处理后的发酵液 3 μL 于滤纸片上,待纸片稍干后置于 37℃ 培养箱培养过夜,测量抑菌圈的直径。

1.2.5.2 紫外分光光度检测法^[8]

2 结果与讨论

2.1 紫外法测定克拉维酸含量的标准曲线

利用克拉维酸与咪唑的衍生物在 312 nm 下具

有特征吸收的原理,采用紫外分光光度法测定克拉维酸标样和发酵液中的含量,以吸光度为纵坐标 (y),对应的标样浓度为横坐标 (x , mg/L) 绘制标准曲线,所得的方程为 $y = 0.0181x + 0.0964$,相关系数 $r^2 = 0.9965$ 。在 20~80 mg/L 呈良好的线性关系 (图 1)。

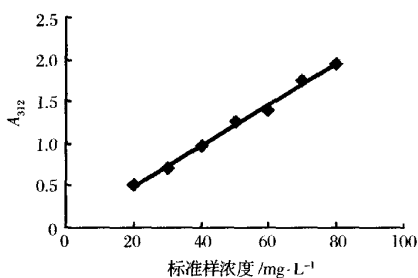


图 1 紫外分光光度法测定克拉维酸的标准曲线

2.2 出发菌株的选择

将保藏的 39 株 *S. clavuligerus* 菌株分别划线接种于 YMGA 培养基上,28℃培养 7d,其中 22 个平板生长旺盛,从中每板随机挑选 3 株单菌落进行摇瓶发酵,用紫外法测定克拉维酸的效价,结果如表 1 所示。其中有 11 株效价大于 200 mg/L,对这些菌株进行摇瓶复筛,最后筛出 1 株编号为 *S. clavuligerus* B71 的菌株作为本次紫外诱变的出发菌株 (其产量为 282.25 mg/L)。

表 1 *S. clavuligerus* 菌株效价分布

效价/mg · L ⁻¹	菌株数量/株	所占比例/%
<100	19	28.7
100~200	36	54.6
>200	11	16.7

2.3 出发菌株甘油耐受量的测定

按 1.2.1 中的培养条件,将适当浓度的孢子悬液涂布于不同甘油浓度的 YMGA 平板进行培养,结果如表 2,出发菌株 *S. clavuligerus* B71 在含 12% 甘油的平板上无菌落出现,说明其甘油耐受浓度为 10%,最低抑菌浓度为 12%。

表 2 甘油耐受度实验结果

甘油浓度/%	2	4	6	8	10	12	14
生长情况 ¹⁾	++	++	++	++	+	-	-

注:1)生长良好:++;生长:++;不生长:-。

2.4 紫外线对 *S. clavuligerus* B71 的存活率曲线

按 1.2.2 所述方法,以照射时间为横坐标,以存活率为纵坐标,绘制存活率曲线,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,出发菌株 *S. clavuligerus* B71 对紫外线较敏感,照射时间为 30~45 s 时,其致死率已达

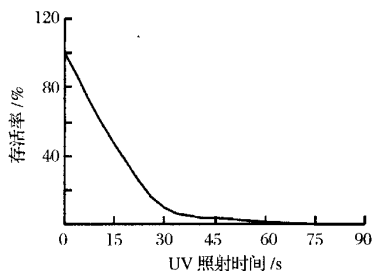


图2 UV照射细胞的存活率曲线

到98%,结合实验结果,选取30 s和45 s作为照射时间。

2.5 琼脂块法初筛的结果

按1.2.3所述方法,在含12%甘油浓度的平板上,挑取约600株单菌落,进行初步筛选,结果如表3和图3所示。

表3 琼脂块法初筛的统计结果

范围	突变株抑菌圈直径/出发菌株抑菌圈直径			
	< 1.00	1.00~1.50	1.51~2.00	>2.00
突变株数目/株	66	415	109	10
所占例/%	11	69.1	18.2	1.7

由表3看出,在含12%甘油的YMGA平板中生长的突变株中,绝大部分突变株的产量均不同程度地高于出发菌株*S. clavuligerus* B71,正突变率高达89%。其中有10株的产量较出发菌株*S. clavuligerus* B71提高了1倍,占1.7%。从比出发菌株提高50%以上的119株突变株中选取37株进行斜面培养,进行摇瓶复筛。

图3中372,373,374为突变株,B71为出发菌株。

2.6 摇瓶复筛结果

按1.2.3所述方法,进行摇瓶复筛,结果如表4所示。经过摇瓶复筛测定克拉维酸效价,发现有2株突变株的发酵液中克拉维酸的效价比出发菌株*S. clavuligerus* B71提高了80%以上。分别编号*S. clavuligerus* B71-14与*S. clavuligerus* B71-49。

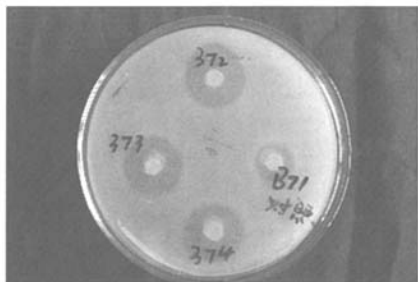


图3 出发菌株抑菌圈与突变株抑菌圈比较

表4 甘油耐受性突变株相对效价分布

范围	突变菌株相对效价分布/%				
	<100	100~125	126~150	151~175	>175
突变株数目/株	6	11	8	7	5
所占复筛菌株比例/%	16.2	29.7	21.6	18.9	13.5

对*S. clavuligerus* B71-14和*S. clavuligerus* B71-49再次进行摇瓶发酵试验,结果如表5所示。这2株突变株分别比出发菌株*S. clavuligerus* B71的克拉维酸产量提高了90.65%和88.8%。

表5 高产突变菌株摇瓶发酵的实验结果

菌株	<i>S. clavuligerus</i> B71	<i>S. clavuligerus</i> B71-14	<i>S. clavuligerus</i> B71-49
产量/mg·L ⁻¹	282.25	538.20	532.98
正变幅度/%	0	90.65	88.80

2.7 高产突变株*S. clavuligerus* B71-14,*S. clavuligerus* B71-49的甘油耐受浓度的测定

取高产突变株*S. clavuligerus* B71-14,*S. clavuligerus* B71-49及出发菌株*S. clavuligerus* B71的孢子,制成孢子悬液,分别涂布于含有0%、10%、2%、14%、16%及18%甘油浓度的YMGA平板上28℃培养7d,观察菌株生长情况,结果见表6。

表6 高产突变株B71-14,B71-49的甘油耐受浓度考察

甘油浓度/%	10	12	14	16	18	20
<i>S. clavuligerus</i> B71-14	+++	++	++	+	-	-
<i>S. clavuligerus</i> B71-49	+++	++	++	+	-	-
<i>S. clavuligerus</i> B71	+	-	-	-	-	-

注:+++;生长良好;++;生长;+,微生长;-;不生长。

由表6可知,突变株*S. clavuligerus* B71-14,*S. clavuligerus* B71-49的甘油耐受浓度均达到了16%,比出发菌株的甘油耐受浓度明显提高。

2.8 *S. clavuligerus* B71-14的形态学观察及遗传稳定性考察

在含12%甘油的平板上,*S. clavuligerus* B71-14生长缓慢,菌落形态小,和出发菌株相比显得光秃,培养后较易挑取;在不含甘油的YMGA平板上培养时,*S. clavuligerus* B71-14菌落形态也发生改变,表现为菌落小、光秃,进一步在显微镜下观察,发现和出发菌株相比,*S. clavuligerus* B71-14的菌丝比较细。

将突变株*S. clavuligerus* B71-14进行传代实验,摇瓶发酵后测定克拉维酸的效价,结果如表7所示。

表 7 突变株 *S. clavuligerus* B71-14 的遗传稳定性

传代次数	1	2	3	4	5	6	7
克拉维酸效价变化率/%	-1.8	-2.0	-5.5	-4.3	-7.0	-6.3	-10.0
甘油耐受浓度/%	16	16	16	16	14	14	14

通过传代试验,发现 *S. clavuligerus* B71-14 在 4 代之内遗传稳定性较好,只有 1.8%~5.5% 降低,但如果继续传代,则菌种的生产性能下降较多,可达 10%,所以应尽量控制传代次数在 5 代以内。

3 结 论

克拉维酸高产菌株的选育主要以其代谢的生物化学理论为依据,采用传统的菌种诱变或现代的分子生物学手段来筛选,但对那些代谢相关酶系的基因不明确的菌种进行选育,采用基因工程的方法尚不能实现。通过本试验证明,采用由 Elander^[13] 提出的推理筛选的方法,在不十分清楚克拉维酸生物合成及调控机制的情况下,用传统的育种方法改良菌种是行之有效的提高克拉维酸产量的方法。取得了良好的结果,试验证实,采用以克拉维酸合成的前体物甘油作为耐受性底物取得了较高的正向突变菌株数,占 89%,且产生菌的克拉维酸效价提高 90.6%,体现了该方法具有定向性强,工作量低,效率高的优点。同时须指出,其菌种改良的关键技术在于理性化筛选方法,为此本试验从理论上分析入手,采用的甘油耐受性菌株的筛选,达到了预期的目的,为我们深入研究克拉维酸的调控机理奠定了基础,也同时对目前在分子育种中,尚未了解代谢控制基因的菌种的微生物育种提供了参考。

参 考 文 献

1 孟 勇,张国华,王忠彦,等. β -内酰胺酶抑制剂克拉维酸

研究进展[J]. 中国抗生素杂志,2003,28(1):60~64

- 2 Liras P, Rodriguez-Gracia A. Clavulanic acid, a β -lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54: 46
- 3 俞文和. 新编抗生素工艺学[M]. 北京:中国建材工业出版社, 1996. 9
- 4 Higgins C E, Kastner R E. *Streptomyces clavuligerus* sp. Nov, a-lactam antibiotic producer [J]. Int J Syst Bacteriol, 1971, 21: 326
- 5 Kwang-Pil C, Kyung-Hwan K, J ung-Woo K. Strain Improvement of clavulanic acid producing *Streptomyces clavuligerus* [A]. Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes [C]. Beijing, 1997
- 6 李丹丹. 棒状链霉菌甘油耐受量与克拉维酸合成的关系[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(1): 14~15
- 7 孟 勇. 克拉维酸高产菌的选育[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2003, 40(3): 557~560
- 8 Tkieser David, A Hopwood. Practical *Streptomyces*. Genetics[M]. England: The John Innes Foundation, 2000
- 9 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京:科学出版社, 1984
- 10 张永生,高 辉,王艳萍,比色法测定克拉维酸发酵液中甘油的含量[J]. 天津科技大学学报, 2006, 21(1): 15
- 11 左志晗,高 辉,宋诗莹,等. 王艳萍 紫外分光光度法测定发酵液中克拉维酸含量的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, (2): 135~137
- 12 王艳萍,左志晗,张建等,高效液相色谱法(HPLC)测定发酵液中克拉维酸含量的研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, (5): 102
- 13 Elander R P. Proc 3rd Inter Symp Genet Microorganisms[M]. Washington D C: Am Soc Microbiology, 1979. 21~25

Breeding of *Streptomyces clavuligerus* Mutant with Glycerol Resistance

Wang Yanping, Zhang Yongsheng, Zhang Yang, Zuo Zhihan

(Tianjin The Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Faculty of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT The original strain *Streptomyces clavuligerus* B71 was treated with UV light, and methods including an agar column solid fermentation model and the shake-flask model were used for primary and further selection. Finally, *S. clavuligerus* B71-14 and *S. clavuligerus* B71-49 with high glycerol-resistant were obtained and their clavulanic acid yield increased 90.6% and 88.8% compared with *S. clavuligerus* B71. This character can be inherited stably.

Key words *Streptomyces clavuligerus*, ultraviolet mutagenesis, glycerol-resistant, clavulanic acid