

高启禹,徐光翠,张文博,等.褐黄孢链霉菌高产纳他霉素的诱变选育[J].江苏农业科学,2013,41(8):360-362.

褐黄孢链霉菌高产纳他霉素的诱变选育

高启禹¹,徐光翠²,张文博¹,刘涌涛¹

(1.新乡医学院生命科学技术学院/河南省遗传性疾病与分子靶向药物重点实验室培育基地,河南新乡 453003;

2.新乡医学院公共卫生学院,河南新乡 453003)

摘要:采用紫外线及微波对纳他霉素产生菌褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*, SG-71)进行诱变,并结合链霉素抗性筛选选育高产菌株。原始菌株经活化后,分别采用紫外线照射 SG-71 孢子悬液 25 s、800 W 微波处理 30 s 进行诱变,以链霉素选择培养基筛选纳他霉素高产菌株。通过链霉素抗性筛选获得了 136 株链霉素抗性突变株,其中正突变株 SGUM33 的纳他霉素产量达到 2.47 g/L,较出发菌株提高了 1.59 倍。表明紫外线及微波诱变结合链霉素抗性筛选对产纳他霉素的链霉菌菌株能进行有效的选育,且筛选的菌株遗传性状稳定。

关键词:纳他霉素;褐黄孢链霉菌;诱变育种

中图分类号: Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0360-03

纳他霉素(natamycin)又称匹马菌素(pimaricin)或游链霉素(pimaricin),分子式为 $C_{33}H_{47}NO_{13}$,是一种多烯大环内酯类真菌抗生素,可抑制各种霉菌、酵母的生长,能阻止丝状真菌中黄曲霉毒素的形成,也能抑制真菌毒素的产生。相比于其他抗生素,纳他霉素对哺乳动物细胞的毒性极低,是目前国际上唯一由 FAD 批准的一种高效、广谱、安全的抗真菌生物食品防腐剂^[1-2]。由于其优良的抗菌性能,目前除在调味品、焙烤食品、乳酪制品、果蔬汁原浆、易发霉食品和肉制品加工等食品行业的应用外^[3-4],同时在医药工业、饲料工业等领域也得到了越来越多的重视,临床上现已将纳他霉素与伏立康唑混合制成霜剂或软膏用于治疗皮肤真菌感染疾病^[5]、真菌性眼角膜炎^[6]等。纳他霉素主要由恰塔努加链霉菌^[7](*Streptomyces chattanovgensis*)、纳塔尔链霉菌^[8](*Streptomyces natalonso*)和褐黄孢链霉菌^[9](*Streptomyces gilvosporeus*)等产生菌经发酵过程产生。目前在选用系列不同的纳他霉素生产菌的过程中发现,野生型菌种的发酵效价普遍偏低、遗传不稳定,因而严重影响着纳他霉素的生产成本及规模化生产。本试验以褐黄孢链霉菌为产生菌,通过紫外线和微波诱变、链霉素抗性筛选育种的方法,获得了理想的纳他霉素高产菌株,并探讨了其生产及遗传性能,为纳他霉素的进一步工业化生产提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种及主要试剂 褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*) ATCC13326,由新乡医学院发酵与酶工程研究室提供;纳他霉素(≥50%)为兰州伟日生物工程有限公司产品。

1.1.2 培养基 斜面培养基:葡萄糖 10 g、蛋白胨 5 g、酵母粉 3 g、麦芽浸粉 3 g、琼脂 1.5%、蒸馏水 1 000 mL, pH 值

7.0。平板分离培养基:葡萄糖 10 g、蛋白胨 5 g、酵母粉 3 g、麦芽浸粉 3 g、琼脂 1.5%、蒸馏水补至 1 000 mL, pH 值 7.0。种子培养基:葡萄糖 20 g、蛋白胨 6 g、酵母粉 6 g、NaCl 10 g、蒸馏水补至 1 000 mL, pH 值 7.0。发酵培养基:可溶性淀粉 4.0 g、大豆饼粉 0.5 g、蛋白胨 0.5 g、葡萄糖 3.0 g、NaCl 0.2 g、CaCO₃ 0.5 g、蒸馏水补至 1 000 mL, pH 值 7.6。

1.2 仪器与设备

2HWY-2102 新型恒温培养摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司);DHG-9030 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);752N 型紫外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);AY120 电子分析天平(沈阳龙腾电子有限公司);ZDX-35SNI 型座式自动电热压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);TGL-20M 高速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.3 试验条件

1.3.1 孢子悬液的制备 将孢子生长良好的斜面保藏菌株用适量无菌水冲洗,收集孢子悬液并置于装有玻璃珠的三角瓶中,充分振荡打散。采用细胞计数及稀释的方法,适当调整孢子浓度达到 10^8 CFU/mL。

1.3.2 紫外线诱变剂量的确定 取浓度为 10^8 CFU/mL 的孢子悬液 10 mL 置于无菌培养皿中,在磁力搅拌作用下距 15 W 紫外灯 25 cm 处分别进行 10、15、20、25、30、35 s 的照射处理,对每个处理进行系列稀释,取 0.1 mL 涂布于平板培养基上,28 ℃ 培养,10 d 后统计菌落数,计算致死率并确定诱变剂量。

1.3.3 微波诱变剂量的确定 取经紫外线诱变筛选的正突变菌株进行二次培养,取浓度为 10^8 CFU/mL 的孢子悬液 5 mL 置于无菌培养皿中,在微波功率 800 W 下对菌悬液分别进行 10、20、30、40、50、60 s 处理(为避免微波炉的热效应,处理时将培养皿置于冰上)。处理后对每个处理进行系列稀释,取 0.1 mL 涂布于平板培养基上,28 ℃ 培养,10 d 后统计菌落数,计算致死率并确定诱变剂量。致死率计算方法:

$$\text{致死率} = (D - E) / D \times 100\%$$

式中: D 为未处理再生培养基平板上菌落数; E 为处理后再生培养基平板上菌落数。

收稿日期:2013-03-06

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:112102310336)。

作者简介:高启禹(1979—),男,甘肃会宁人,硕士,讲师,研究方向为酶与酶工程。E-mail:gaog345@163.com。

通信作者:刘涌涛,硕士,副教授,研究方向为微生物育种。

1.3.4 链霉素抗性突变株的筛选 取含量为 10^8 CFU/mL 的孢子悬浮液 5 mL 置于无菌平板中,打开皿盖,选择 90% 致死剂量进行紫外线-微波处理。然后取 0.1 mL 诱变处理液,涂布于含 10^8 CFU/mL 的链霉素选择培养基平板上,29 ℃ 培养 3 d。将分离得到的链霉素抗性突变菌株单菌落活化并转接斜面保存,29 ℃ 避光培养 3 d。

1.3.5 突变菌株的纳他霉素发酵 在 25 mL 灭菌的种子培养基中接种突变菌株的孢子悬浮液,在 180 r/min、29 ℃ 下振荡培养 26 h,再将 2% 的种子液接种于发酵培养基中,在 180 r/min 下于 29 ℃ 回旋式摇床发酵 96 h。

1.3.6 纳他霉素标准曲线的制作 准确称取 0.01 g 标准纳他霉素标样,溶于含 5% 冰乙酸的甲醇中,定容至 100 mL,振荡溶解,配成纳他霉素标准母液。分别取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 纳他霉素标准母液,用含 5% 冰乙酸的甲醇稀释至 10 mL,分别配制成 1、2、3、4、5、6、7、8 mg/L 的纳他霉素标准溶液,用紫外分光光度计于 303 nm 处测吸光值,得纳他霉素标准曲线(图 1)。以吸光度对溶液中纳他霉素浓度进行回归分析,得线性回归方程: $y=0.0438x+0.0071$, $r^2=0.9999$ 。

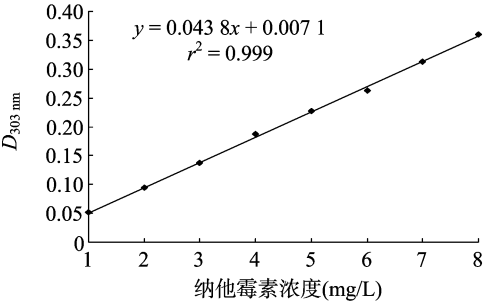


图1 纳他霉素标准曲线

1.3.7 发酵液中纳他霉素含量的测定 取 1.0 mL 发酵液于刻度试管中,加入含 5% 冰乙酸的甲醇提取试剂 9.0 mL,充分摇匀试样,振荡器充分振荡后 4 000 r/min 离心 25 min,除去菌丝体及培养基中杂质,所得上清液再用提取试剂稀释 1~2 倍,用紫外分光光度计在波长 303 nm 处测定吸光值,通过纳他霉素标准曲线计算发酵液中纳他霉素质量浓度,并计算纳他霉素含量。

1.3.8 遗传稳定性的测定 将复筛选出的菌株在斜面培养基上连续转接 5 代,挑取各代菌株进行摇瓶发酵试验,测定其纳他霉素发酵产量。

2 结果与分析

2.1 紫外线诱变剂量的确定

为提高菌株的正突变效果,通常以 90% 致死剂量作为衡量参数,本试验通过对 SG-71 菌种的紫外诱变处理发现(图 2),菌株存活率受紫外线照射时间的影响明显,随着照射时间的增加,菌株存活率降低,当照射时间延伸为 25 s 时,存活率不足 10%。此时选择 25 s 作为 90% 致死剂量的最佳处理时间。

2.2 微波诱变剂量的确定

因单一的紫外线诱变对菌株产纳他霉素的效果较差,故结合微波诱变处理。通过图 3 可以看出,微波处理时间在 30 s 时,菌体存活率接近于 10%,故选择 30 s 为菌株微波诱变再处理时间。

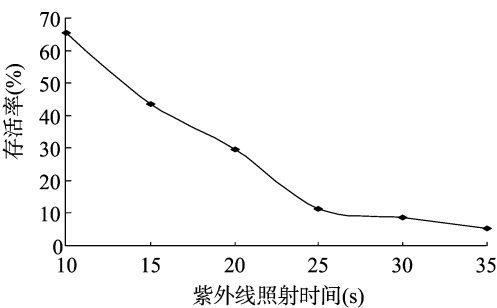


图2 紫外线致死率曲线

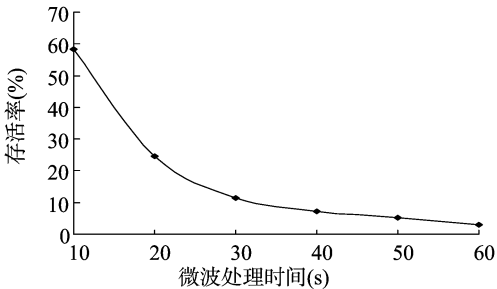


图3 微波致死率曲线

2.3 突变株的筛选

通过链霉素选择培养基的筛选,分离获得了 136 株抗性菌株,将抗性菌株在纳他霉素摇瓶发酵条件下发酵培养,筛选到 7 株较高产的正突变菌株,其产纳他霉素效价结果见表 1。由表 1 可见,产纳他霉素相对水平最高的为 SGUM33,较原始菌株的生产能力提高了 1.59 倍。

表 1 7 株正突变菌株的纳他霉素产量结果

菌株	纳他霉素产量 (g/L)	产纳他霉素相对水平
SG-71	1.55	1.00
SGUM3	1.94	1.25
SGUM19	2.25	1.45
SGUM33	2.47	1.59
SGUM79	2.14	1.38
SGUM81	1.80	1.16
SGUM116	2.03	1.31
SGUM125	1.97	1.27

2.4 正突变菌株 SGUM33 的遗传稳定性分析

采用斜面传代的方法将 SGUM33 菌株进行连续 5 代的培养,再分别将活化的各代菌株在 29 ℃ 回旋式摇床内发酵培养 96 h,其纳他霉素产量基本稳定在 2.30 g/L 左右,说明其生产性能稳定(表 2)。

表 2 正突变菌株 SGUM33 的遗传稳定性

传代次数(次)	纳他霉素产量(g/L)
1	2.47
2	2.41
3	2.36
4	2.29
5	2.25

3 结论

从自然界分离的野生型菌种通常需要诱变育种来改善其

产品质量,诱变育种的优点主要体现在能提高有效产物的产量、改善菌种特性、提高产品质量、开发新品种等^[10]。目前微生物的诱变方法包括物理诱变、化学诱变、生物诱变及复合诱变,其中常用的诱变方法有紫外线、微波及各种射线照射、烷化剂处理等^[11]。进入 21 世纪以来,微生物诱变在空间诱变领域也进行了积极探讨,并取得了系列成果^[12],但各种育种方法都存在盲目性,优良诱变菌株只能经过大量的正突变筛选才可获得,因此,如何通过有效措施,对菌株进行有效的定向诱变将是后期菌种诱变选育的重点。

本试验通过对褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*)原始菌株 SG-71 依次采用紫外线及微波诱变处理,并采用链霉素抗性筛选分离获得了 136 株抗性菌株,摇瓶发酵复筛得到产纳他霉素最优的正突变菌株 SGUM33,其纳他霉素产量达到 2.47 g/L,较出发菌株提高了 1.59 倍,并通过连续 5 代遗传稳定性试验发现,各代纳他霉素产量无明显变化,说明其遗传性能稳定。但因摇瓶发酵对微生物的发酵效果存在明显的影响,因此为探讨 SGUM33 的发酵性能,需对其进行进一步的扩大化培养及发酵条件的优化,以满足工业化生产的实际需要。

参考文献:

- [1] 李 东. 生物食品抗真菌剂——纳塔霉素[J]. 中国食品添加剂, 1995(4): 26-27.
- [2] Bhatta R S, Chandasana H, Chhonker Y S, et al. Mucoadhesive nano-
particles for prolonged ocular delivery of natamycin; *In vitro* and pharmacokinetics studies[J]. Elsevier, 2012(432): 105-112.
- [3] 王春艳, 刘树立. 纳他霉素的研究概况及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2007(2): 169-173.
- [4] Davidson P M, Doan C H. Natamycin[C]//Antimicrobials in foods. New York, Basel and Hong Kong: Marcel Dekker Inc, 1993: 395-407.
- [5] Yan X, Guang R P, Chuan W G, et al. *In vitro* comparison of the efficacies of natamycin and silver nitrate against ocular fungi[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(4): 1636-1638.
- [6] Venkatesh N P, Prajna S L, Jeena M, et al. Natamycin and voriconazole in *Fusarium* and *Aspergillus keratitis*; subgroup analysis of a randomised controlled trial[J]. B J of Ophthalmology, 2012, 96(11): 1440-1441.
- [7] 魏宝东, 王亚男, 宋晓娣. 纳他霉素高产菌株的选育[J]. 食品科技, 2012, 37(2): 20-23.
- [8] 刘变芳, 岳田利, 李 卓, 等. 纳他霉素高产菌株的诱变选育[J]. 西北农业学报, 2010, 19(8): 180-184.
- [9] 骆健美, 金志华, 岑沛霖. 培养条件对褐黄孢链霉菌发酵合成纳他霉素的影响[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2005, 39(2): 296-300.
- [10] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [11] 郑凤娥, 孟宪军, 李颖畅, 等. 纳他霉素产生菌的诱变育种研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(8): 159-161.
- [12] 张玲华, 田兴山. 微生物空间诱变育种的研究进展[J]. 核农学报, 2004, 18(4): 294-296.
- [13] 李 东. 生物食品抗真菌剂——纳塔霉素[J]. 中国食品添加剂, 1995(4): 26-27.
- [14] Bhatta R S, Chandasana H, Chhonker Y S, et al. Mucoadhesive nano-
particles for prolonged ocular delivery of natamycin; *In vitro* and pharmacokinetics studies[J]. Elsevier, 2012(432): 105-112.
- [15] 王春艳, 刘树立. 纳他霉素的研究概况及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2007(2): 169-173.
- [16] Davidson P M, Doan C H. Natamycin[C]//Antimicrobials in foods. New York, Basel and Hong Kong: Marcel Dekker Inc, 1993: 395-407.
- [17] Yan X, Guang R P, Chuan W G, et al. *In vitro* comparison of the efficacies of natamycin and silver nitrate against ocular fungi[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(4): 1636-1638.
- [18] Venkatesh N P, Prajna S L, Jeena M, et al. Natamycin and voriconazole in *Fusarium* and *Aspergillus keratitis*; subgroup analysis of a randomised controlled trial[J]. B J of Ophthalmology, 2012, 96(11): 1440-1441.
- [19] 魏宝东, 王亚男, 宋晓娣. 纳他霉素高产菌株的选育[J]. 食品科技, 2012, 37(2): 20-23.
- [20] 刘变芳, 岳田利, 李 卓, 等. 纳他霉素高产菌株的诱变选育[J]. 西北农业学报, 2010, 19(8): 180-184.
- [21] 骆健美, 金志华, 岑沛霖. 培养条件对褐黄孢链霉菌发酵合成纳他霉素的影响[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2005, 39(2): 296-300.
- [22] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [23] 郑凤娥, 孟宪军, 李颖畅, 等. 纳他霉素产生菌的诱变育种研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(8): 159-161.
- [24] 张玲华, 田兴山. 微生物空间诱变育种的研究进展[J]. 核农学报, 2004, 18(4): 294-296.
- [25] 叶 春, 王云鹏. GIS 支持的珠江三角洲农业面源污染时空分析[J]. 农机化研究, 2007(2): 40-43.
- [26] 陆开宏, 晏维金, 苏尚安. 富营养化水体治理与修复的环境生态工程——利用明矾浆和鱼类控制桥墩水库蓝藻水华[J]. 环境科学学报, 2002, 22(6): 732-737.
- [27] 刘 玲. 人工湿地污水处理技术[J]. 襄樊职业技术学院学报, 2004, 3(5): 21-23.
- [28] 丁疆华. 广州市畜禽粪便污染与防治对策[J]. 环境科学研究, 2000, 13(3): 57-59.
- [29] 李荣刚, 夏源陵, 吴安之, 等. 江苏太湖地区水污染物及其向水体的排放量[J]. 湖泊科学, 2000, 12(2): 147-153.
- [30] 李玉娥, 饶敏杰. 动物废弃物源甲烷排放量的初步估算与减缓技术选择[J]. 农村生态环境, 1995, 11(3): 8-10.
- [31] 郑 好, 梁成华. 我国农村生活垃圾现状及管理对策研究[J]. 北方园艺, 2010(19): 223-226.
- [32] 何晶晶, 张春燕, 杨 娜, 等. 我国村镇生活垃圾处理现状与技术路线探讨[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(11): 2049-2054.
- [33] 杨荣金, 李铁松. 中国农村生活垃圾管理模式探讨——三级分化有效治理农村生活垃圾[J]. 环境科学与管理, 2006, 31(7): 82-86.
- [34] 白永刚, 吴浩汀. 太湖地区农村生活污水处理技术初探[J]. 电力环境保护, 2005, 21(2): 44-45, 61.
- [35] 王焕升, 王凯军, 崔志峰, 等. 中国农村地区生活污染调查及控制模式探讨[J]. 中国给水排水, 2008, 24(20): 20-22, 30.
- [36] 章力建, 朱立志. 农村环境污染问题及对策[J]. 农业环境与发展, 2007, 24(6): 1-6.
- [37] 李仰斌, 张国华, 谢崇宝. 我国饮用水源保护与监测相关法规和技术标准编制现状[J]. 中国农村水利水电, 2008(1): 45-47, 50.

(上接第 359 页)

- [8] 朱汝雄. RUSLE 在农业非点源污染量化中的应用分析[C]// 水工渗流研究与应用进展——第五届全国水利工程渗流学术研讨会论文集. 郑州: 黄河水利出版社, 2006: 477-481.
- [9] 程 艳. 流域非点源污染特征识别方法研究——以洱海弥苴河流域为例[D]. 北京: 中国水利水电科学研究院, 2008.
- [10] 王礼先. 我国水土保持的理论与方法[J]. 中国水利, 2006(12): 16-18, 24.
- [11] 陈 雪, 蔡强国, 王学强. 典型黑土区坡耕地水土保持措施适宜性分析[J]. 中国水土保持科学, 2008, 6(5): 44-49.
- [12] 彭 鸿, 张海峰, 廖纯艳, 等. 南水北调中线水源预防保护区不同立地下土壤侵蚀与非点源污染初步研究——以宁陕县寨沟小流域为例[C]//中国水土保持探索与实践——小流域可持续发展研讨会论文集. 北京: 中国水利水电出版社, 2005: 103-107.
- [13] 李 硕, 孙 波, 曾志远, 等. 遥感和 GIS 辅助下流域养分迁移过程的计算机模拟[J]. 应用生态学报, 2004, 15(2): 278-282.
- [14] 熊丽君, 刘 凌, 徐祖信, 等. 张家港西南片地区非点源的计算研究[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(8): 3-5, 23.
- [15] 易志刚. 农业面源污染及其防治策略研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(24): 7589-7590.
- [16] 宋秀杰, 陈 博. 北京市农药化肥非点源污染防治的技术措施[J]. 自然生态保护, 2001(9): 30-32.
- [17] 胡连伍, 王学军, 罗定贵, 等. 基于 SWAT-2000 模型的流域氮营养环境自净效率模拟——以杭埠-丰乐河流域为例[J]. 地理与地理信息科学, 2006, 3(2): 35-38.
- [18] 陈国湖. 农业非点源污染模型 AGNPS 及 GIS 的应用[J]. 人民长江, 1998, 4(4): 20-22.
- [19] 万 超, 张思聪. 基于 GIS 的潘家口水库面源污染负荷计算[J]. 水力发电学报, 2003(2): 62-68.