

粘杆菌素高产菌株的选育

周希贵 戴鹏高 邢维玲 章红

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘要: 用亚硝基胍对多粘类芽胞杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) AS1.541 进行诱变, 采用其自身次生代谢产物粘杆菌素进行筛选时正突变率为 32.3%, 获得一株粘杆菌素发酵单位比出发菌株提高 106% 的菌株。对发酵单位最高的一株菌再次诱变, 用甲硫氨酸结构类似物乙硫氨酸筛选时正突变率为 46.9% 并得到一株产量提高 57% 的菌株。

关键词: 粘杆菌素, 亚硝基胍诱变, 乙硫氨酸, 抗性筛选

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0049-03

MUTATION BREEDING OF HIGH COLISTIN PRODUCTION STRAINS

ZHOU Xi-Gui DAI Peng-Gao XING Wei-Ling ZHANG Hong

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: A colistin producing strain *Paenibacillus polymyxa* AS1.541 was treated by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) for increasing yields of the antibiotic colistin. High-yield strains were obtained by selection of deregulated mutant which grow on media containing colistin, a self second metabolite, and ethionine, an analogue of methionine. Some of these mutants have higher yield of colistin than that of the parent strain.

Key words: Colistin, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine mutation, Ethionine, Resistance selection

粘杆菌素 (Colistin) 是多粘类芽胞杆菌 (*P. polymyxa*) 产生的一种多肽类多粘菌素族抗生素, 具有良好的抗革兰氏阴性细菌的活性, 由于其毒性低, 残留少, 不易产生抗药性, 因而广泛应用于饲料中作为添加剂提高饲料利用率和防止集约化畜禽生产中的细菌污染。但是目前全世界只有日本垄断生产, 限制了它的应用。

80 年代以来, 抗生素定向育种技术已经广泛应用于高产突变株的筛选过程中, 经典的诱变育种方法较之遗传工程方法尽管存在很大的盲目性和随机性, 但仍是目前常用的行之有效的育种手段。我们采用常规诱变手段诱变一株产生粘杆菌素的多粘类芽胞杆菌, 经自身次生代谢产物和氨基酸结构类似物进行筛选, 获得几株高产菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种

P. polymyxa AS1.541 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基: 蛋白胨 10.0g, 牛肉膏 3.0g, 葡萄糖 5.0g, NaCl 5.0g, 蒸馏水定容至 1L, pH 7.0

1.2.2 基本培养基: MgSO₄ · 7H₂O 0.25g, KH₂PO₄ 4.5g, K₂HPO₄ · 3H₂O 10.5g,

(NH₄)₂SO₄ 1.0g, 柠檬酸三钠 1.0g, 葡萄糖 1.0g, 蒸馏水定容至 1L, pH7.0~7.2, 灭菌后加入 10⁴μg/L 的生物素。

1.2.3 发酵培养液: 玉米浆 0.03L, 淀粉 10.0g, (NH₄)₂SO₄ 8.0g, CaCO₃ 10.0g, 蒸馏水定容至 1L, pH7.0~7.2。

1.3 诱变处理

采用亚硝基胍 (NTG) 诱变, 在已涂布好菌液的完全培养基平板中央直接加入 NTG 粉末, 30℃ 培养 8h 后将透明圈周围的菌苔刮下, 稀释涂布于选择平板上。用自身次生代谢产物筛选时采用含约 3 倍发酵单位粘杆菌素的完全培养基; 用氨基酸结构类似物筛选时采用含 50mg/L 乙硫氨酸 (ET) 的基本培养基。

1.4 发酵单位测定

双碟扩散法测定发酵单位, 指示菌为 *Escherichia coli* CMCC44103。

1.5 高产菌株的筛选

在选择平板上长出的菌落, 用接种环挑至发酵培养液的试管中, 30℃ 摇床培养 24h 后转接至 0.5L 摇瓶中, 装量 0.025L, 30℃ 摇床培养 38h, 用大板粗测发酵单位, 挑选出发酵单位比出发菌株高的菌株进行单胞分离, 摇瓶复筛, 测定发酵单位。

2 结果

2.1 抗自身次生代谢产物法筛选粘杆菌素高产菌株

出发菌株经 NTG 诱变处理后, 在选择平板上随机挑选出 65 个菌株, 摇瓶初筛后有 21 株的发酵单位比出发菌株高, 高产菌株经单胞分离获得 10 株比出发菌株粘杆菌素产量提高 20% 以上的高产菌株。它们的产量分布见图 1。

2.2 抗氨基酸结构类似物——乙硫氨酸法筛选粘杆菌素高产菌株

将经自身次生代谢产物筛选得到的高产菌株, 以传代遗传稳定的 N20a 菌株为出发菌株, 再次用 NTG 诱变, 经 ET 筛选后随机挑取 64 个菌株, 摇瓶初筛后得到 30 株产量比出发菌株粘杆菌素发酵单位高的菌株, 有 17 株的发酵单位与出发菌株没有差异, 另有 17 株的发酵单位比出发菌株低。对粘杆菌素发酵单位较高的菌株经单胞分离, 摇瓶复筛后获得 12 株粘杆菌素发酵单位比出发菌株高的菌株 (见图 2), 其中最高的 N18 菌株粘杆菌素产量提高 57%。

从以上结果可以看出, 在 *P. polymyxa* AS1.541 中, 菌株对自身次生代谢产物粘杆菌素的耐受与其粘杆菌素产生水平有一定的内在联系, 对氨基酸结构类似物抗性也有类似的特点, 将它们用于高产菌株筛选时有较高的正突变率 (见表 1)。

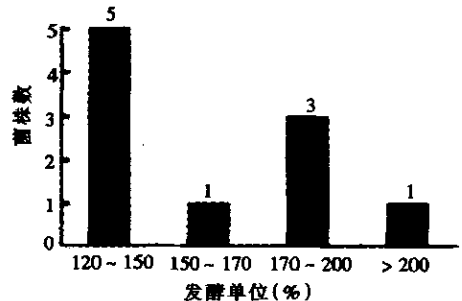
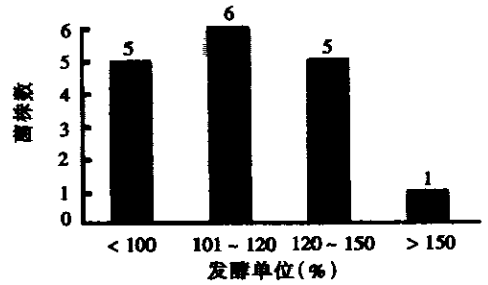


图 1 粘杆菌素抗性筛选高产菌株产量分布
出发菌株 N20a 效价为 100

表1 两种筛选方法的突变率

筛选方法	自身次生代谢产物法	氨基酸结构类似物法
筛选菌株数	65	64
正突变菌株数	21	30
正突变率(%)	32.3	46.9

图2 氨基酸结构类似物筛选高产菌株产量分布
出发菌株 N20a 效价为 100

3 讨论

尽管基因工程技术已经开始用于工业生产高产菌株的构建,但是应用物理、化学诱变因子如紫外线、高频电子流、亚硝基胍等仍然是遗传育种不可或缺的手段。为了提高诱变后高产菌株的筛选效率,人们设计了各种筛选方案,如川市设计了琼脂块法^[1], Elander R P. 等人提出利用前体及结构类似物抗性的筛选方法^[2],它们在菌种选育中取得了较好的效果。Trehina G A. 等人则发现产生菌对自身次生代谢产物的耐受程度与所产抗生素水平有直接关系^[3]。Mikiko Ito 等人报道产生粘杆菌素的菌株 *Bacillus colistinus* var. Koyama 在发酵培养基和不产粘杆菌素的培养基中,菌体氨基酸的种类和含量存在明显差异^[4]。

本实验中,粘杆菌素作为 *P. polymyxa* 的次生代谢产物,它对产生菌可能存在抑制作用,从而导致产生菌不能大量合成粘杆菌素。另外,来自甲硫氨酸的甲酰甲硫氨酸是细菌蛋白质合成所必须的,L-甲硫氨酸可以活化粘杆菌素合成有关的基因,从而获得高产菌株。乙硫氨酸作为甲硫氨酸的结构类似物,在乙硫氨酸培养基上仍然正常生长的突变株有可能是去甲硫氨酸调节的高产菌株;粘杆菌素生物合成中涉及转酯过程,这中间需要有硫模板的参与^[5],而甲硫氨酸则可以通过影响硫代谢来影响粘杆菌素的合成;此外,粘杆菌素结构中有较多的苏氨酸,而甲硫氨酸和苏氨酸存在共同的合成途径,打破甲硫氨酸合成的反馈调节有可能使苏氨酸大量合成,从而为粘杆菌素生物合成提供足够的苏氨酸底物。因此我们设计了利用诱变因子处理菌株后,采用自身次生代谢产物粘杆菌素和甲硫氨酸结构类似物乙硫氨酸筛选后摇瓶复筛的筛选方案。以较短的时间和较小的工作量,摇瓶发酵筛选出 129 株菌,从中得到几株粘杆菌素发酵单位提高一倍以上的菌株。实践证明这两种筛选方案对于筛选粘杆菌素高产菌株是行之有效的。

同时在研究中我们也发现不能用一种筛选方案重复使用,否则筛选效率会急剧下降,甚至不起作用,这一特点与杆菌肽高产菌株选育中的情况相似^[6]。因此,在选育过程中应交叉采用不同的筛选方案及不断采用新的筛选模式才能取得较好的效果。

参考文献

- [1] Ichikawa T, Date M, Ishikura T. *Folia Microbiol*, 1971, 16: 218.
- [2] Elander R P, Mabe J A, Hamill T L, et al. *Folia Microbiol*, 1971, 16: 157.
- [3] Trehina G A, Trutneva E M. *Antibioti*, 1966, 11: 770.
- [4] Mikiko Ito, Kô Aida, Teijiro Uemura. *Agr, Biol. Chem.* 1969, 33 (2): 262.
- [5] Komura S, Kurahashi K. *J. Biochem.*, 1985, 97: 1409.
- [6] 胡立勇,宋友礼,董村. *中国抗生素杂志*, 1988, 13 (6): 389.
- [7] 仓都祥行,桜井季,犬塚惠一. *日本特许公报*, 昭 63 - 7759.