



应用原生质体融合技术选育克拉维酸高产菌株

张 阳, 张 恺, 郭金体, 王艳萍
(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘 要: 采用棒状链霉菌种内原生质体融合技术, 选育克拉维酸高产菌株. 该实验选用舒巴坦钠耐受性高产菌株 *Streptomyces clavuligerus* B71-3-10 和甘油耐受性高产菌株 *Streptomyces clavuligerus* B71-14 为亲株, 优化了原生质体制备条件和融合条件, 最终得到遗传稳定性良好的融合子 F14. 该融合子的克拉维酸产量提高到 650.35 mg/L, 分别比亲株 *S.clavuligerus* B71-3-10 和 *S.clavuligerus* B71-14 的克拉维酸产量高 36.77% 和 20.84%. 将原生质体融合技术应用到棒状链霉菌克拉维酸高产菌株的选育中, 证明了其可行性、高效性及成效显著性.

关键词: 棒状链霉菌; 克拉维酸高产菌株; 原生质体融合

中图分类号: Q 813.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2008) 03-0021-05

Breeding of Clavulanic Acid High-Production Strain by Using Protoplast Fusion Technique

ZHANG Yang, ZHANG Kai, GOU Jin-ti, WANG Yan-ping

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Breeding the clavulanic acid high-production strain of *Streptomyces clavuligerus* by using interspecific protoplast fusion technique was studied. In this study, sulbactam sodium resistant high-production mutant *S.clavuligerus* B71-3-10 and glycerin resistant high-production mutant *S.clavuligerus* B71-14 obtained by the lab in the prophase research were chosen as the parental strains. After the optimization of the protoplast formation and fusion conditions, a genetically stable fusant F14 with higher clavulanic acid production of 650.35 mg/L was obtained finally. The clavulanic acid production of the fusant was 36.77% and 20.84% higher than the parental strain *S.clavuligerus* B71-3-10 and *S.clavuligerus* B71-14, respectively. The results shows that using protoplast fusion technique in the breeding of clavulanic acid high-production strain of *Streptomyces clavuligerus* is feasible, efficient and prominent.

Keywords: *Streptomyces clavuligerus*; clavulanic acid high-production strain; protoplast fusion

克拉维酸是棒状链霉菌产生的天然 β -内酰胺类抗生素, 它本身的抗菌活性很弱, 但它不论在体外或体内都能同耐药的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌所产生的 β -内酰胺酶生成牢固不可逆的结合物, 从而抑制耐药性细菌对 β -内酰胺类抗生素的分解作用, 恢复青霉素类及头孢菌素类抗生素对许多产生 β -内酰胺酶的耐药菌的抗菌活性^[1].

1976 年, 英国 Beecham 公司 Brown 首次从棒状链霉菌 (*Streptomyces Clavuligerus*) 发酵液中发现了第

一个具有临床价值的 β -内酰胺酶抑制剂克拉维酸 (clavulanic acid, 简称 CA, 又称棒酸)^[2]. 至今, 在临床上使用的奥格门汀 (Augmentin)、泰门汀 (Timentin) 等克拉维酸与阿莫西林等的联合制剂每年具有数十亿美元的销售额. 但目前国内克拉维酸发酵效价并不高, 因而产量低, 成本高. 为了提高克拉维酸的生产水平, 降低生产成本, 满足国内克拉维酸的原料药市场需求, 进行克拉维酸产生菌的菌种改良迫在眉睫.

收稿日期: 2007-11-19; 修回日期: 2008-01-03

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (043802711)

作者简介: 张 阳 (1983—), 女, 湖北人, 硕士研究生; 通讯作者: 王艳萍, 博士生导师, ypwang@tust.edu.cn.

在还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略.通过诱变方法选育克拉维酸高产菌株的报道较多,但是至今尚未见到应用原生质体融合的方法提高棒状链霉菌克拉维酸产量的相关报道.本文将本实验室前期推理选育得到的两株具有不同抗性性状的高产菌株进行原生质体融合,以得到基因互补的克拉维酸高产菌株.

1 材料与方法

1.1 菌种

亲株 A: 棒状链霉菌舒巴坦钠耐受性高产菌株 (*Streptomyces clavuligerus* B71-3-10, 后简称 B71-3-10), 天津科技大学食品生物技术研究室选育、保藏.

亲株 B: 棒状链霉菌甘油耐受性高产菌株 (*Streptomyces clavuligerus* B71-14, 后简称 B71-14), 天津科技大学食品生物技术研究室选育、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.

1.2 主要试剂

克拉维酸标准品, 中国药品生物制品检定所; 注射用舒巴坦钠, 山西普德药业有限公司; PEG1000, 上海生物工程公司; PEG4000、PEG6000, BBI 公司.

1.3 培养基

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.

发酵培养基 (g/L): 黄豆粉 30, 甘油 21.5, KH_2PO_4 1, pH7.5.

菌丝制备培养基 (YEME^[3]) (g/L):

以培养亲株A的菌丝体制备培养基为例: 酵母粉 3, 蛋白胨 5, 麦芽提取物 3, 葡萄糖 10, 蔗糖 100, 调pH至 7.2, 121 °C 灭菌 20 min后加入灭菌后的以下各溶液: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.5 mol/L) 2 mL/L (终浓度 5 mmol/L), 浓度为 1 g/mL的甘氨酸至终浓度 3 g/L.

而培养亲株 B 的菌丝体制备培养基中蔗糖浓度为 150g/L, 甘氨酸的终浓度为 6 g/L.

再生培养基 (R2YE): 参考文献[3].

1.4 相关溶液

咪唑溶液、克拉维酸标准溶液、青霉素溶液 (Amp⁵⁰), 参考文献[4].

P buffer: 首先配制以下基本溶液. 蔗糖 103 g,

K_2SO_4 0.25 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.02 g, 痕量成分溶液 (参见 R2YE 培养基) 2 mL, 加水溶解并定容至 800 mL, 调pH至 6.8 ~ 7.0, 80 mL/瓶分装于 150 mL 三角瓶中, 121 °C 灭菌 20 min, 使用前按顺序依次加入以下各灭菌溶液: KH_2PO_4 (0.5%) 1 mL, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.68%) 10 mL, TES buffer (5.37%, pH7.2) 10 mL.

PEG 溶液: 准确称取 6.0 g PEG1000, 装入刻度悬盖试管, 121 °C 灭菌 20 min, 加入配制好的 P-buffer 至 10 mL 刻度. 使用前温浴融化, 混合均匀.

1.5 方法

1.5.1 菌体的培养

取 100 μL 亲株孢子悬液 (10^8 mL^{-1}), 接入装有 50 mL YEME 液体培养基的 500 mL 的挡板三角瓶中, 26 °C, 160 r/min 培养. 亲株 A 的菌丝体培养时间为 47 h; 亲株 B 的菌丝体培养时间为 45 h.

1.5.2 原生质体制备及再生

参考文献[5]方法制备.

用血球计数板观察, 计算形成的原生质体数.

将原生质体悬液分别用 P-buffer、无菌水进行一系列稀释. 分别取 0.1 mL 稀释液涂布于预干燥的 R2YE 再生培养基上, 26 °C 培养 5 ~ 10 d, 统计再生的菌落数. 再生率按如下公式计算:

$$\text{再生率} = (\text{P buffer 稀释后的再生菌落数} - \text{无菌水稀释后的再生菌落数}) \div \text{镜检计数的原生质体总数} \times 100\%.$$

1.5.3 原生质体融合

参考文献[6]方法.

筛选融合子采用琼脂块法初筛和摇瓶复筛^[7,8].

1.5.4 克拉维酸效价的测定

采用生物检测法^[7]、高效液相色谱法^[9].

2 结果与讨论

2.1 原生质体制备条件的优化

2.1.1 蔗糖浓度对亲株菌丝体生长的影响

用于培养制备链霉菌原生质体的培养基 YEME 中含有高浓度的蔗糖, 其作用是保持链霉菌菌丝体在培养液中的分散状态, 以便溶菌酶作用菌丝. 蔗糖浓度过低起不到分散菌丝体的作用, 但是蔗糖浓度过高, 会致使菌体在代谢过程中产生过多的有机酸, 造成 pH 过低, 抑制菌体的生长^[5]. 因此考察了不同浓度蔗糖对亲株菌丝体生长的影响. 前期实验中测得两亲株在普通 YEME 培养基中 48 h 左右进入稳定期, 故

采用测定培养 48 h 的培养液的吸光度值来确定蔗糖浓度对菌体生长的影响. 结果如图 1 所示.

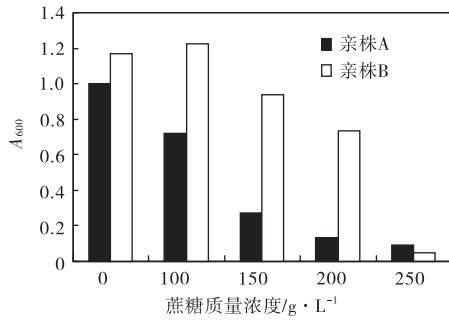


图 1 蔗糖浓度对亲株菌丝体生长的影响

Fig. 1 Influence of sucrose on the growth of parental strains

由图 1 可知,对于亲株 A,100 g/L 的蔗糖浓度可以保证菌体的正常生长,且能保证菌丝的一定分散程度. 对于亲株 B,可能由于其具有较强的蔗糖耐受力,100 g/L 的蔗糖浓度对其生长无特大影响,并且可能由于蔗糖的添加,使菌丝体分散,导致测定的值比不添加蔗糖组的值略大一些. 而 150 g/L 的蔗糖可以起到更好的菌丝体分散作用.

2.1.2 甘氨酸浓度对亲株菌丝体生长的影响

甘氨酸加入到链霉菌培养液中有利于原生质体的释放. 因为甘氨酸错误的代替分子结构相类似的丙氨酸而干扰细胞壁网状结构的合成,使酶液趁机而入,有助于瓦解细胞壁. 甘氨酸浓度过低,培养后菌丝细胞壁结构相对较完整,影响溶菌酶的作用,所需酶解时间长,使原生质体脱壁不完全,降低原生质体的质量. 而甘氨酸的浓度过大,会干扰菌体的生长,使菌体量过低,最终影响原生质体的得率. 本文考察了不同浓度甘氨酸对亲株菌丝体生长的影响,同样也是通过测定培养 48 h 的培养液的吸光度值确定. 结果如图 2 所示.

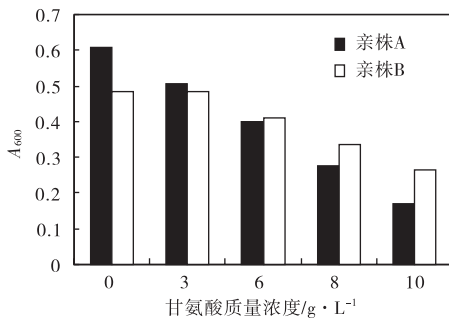


图 2 甘氨酸浓度对亲株菌丝体生长的影响

Fig. 2 Influence of glycine on the growth of parental strains

由图 2 可知,对于亲株 A 和亲株 B,分别添加 3 g/L 和 6 g/L 的甘氨酸在易于破壁的同时,又可获得足够量的用于制备原生质体的菌丝体.

2.1.3 亲株对数生长曲线的测定

原生质体化与再生受菌体生理状态的影响很大. 大多数研究表明,最适菌龄为对数生长期或对数生长后期,此时的细胞生长、代谢旺盛,细胞壁对酶解作用最敏感,处于该时期的菌体细胞器及内含物较均匀,且再生能力强. 由这些细胞分离原生质体,形成率高,其后的再生率也高. 测定两亲株在以上优化后的菌丝体培养基中的生长曲线,结果如图 3.

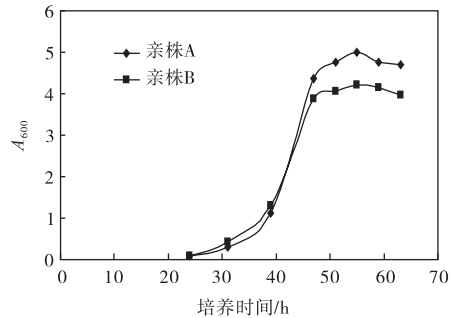


图 3 亲株对数生长曲线

Fig. 3 Growth curves of parental strains

由图 3 可以看出,亲株 A 从 40 h 开始进入对数生长期,50 h 结束对数生长期,选择培养 47 h 时的菌丝体制备原生质体. 亲株 B 从 38 h 开始进入对数生长期,47 h 结束对数生长期,选择培养 45 h 的菌丝体制备原生质体.

2.1.4 溶菌酶浓度及处理时间对原生质体形成和再生的影响

溶菌酶的浓度及处理时间对原生质体形成和再生密切相关,本文考察了不同浓度溶菌酶分别对亲本菌丝体处理不同时间,对其原生质体形成数和再生率的影响,结果如表 1、表 2.

表 1 溶菌酶浓度及处理时间对亲株 A 原生质体形成和再生的影响

Tab. 1 Influence of lysozyme concentration and action time on protoplast formation of parental strains A

酶浓度/ mg · mL ⁻¹	酶解 30 min		酶解 45 min	
	形成数/ 10 ⁶ mL ⁻¹	再生率/ %	形成数/ 10 ⁶ mL ⁻¹	再生率/ %
1.0	1.215	0.108	1.070	0.324
1.5	0.670	0.186	0.760	0.250
2.0	0.450	0.164	0.701	0.102

表2 溶菌酶浓度及处理时间对亲株 B 原生质体形成和再生的影响

Tab. 2 Influence of lysozyme concentration and action time on protoplast formation of parental strains B

酶浓度/ mg · mL ⁻¹	酶解 30 min		酶解 45 min	
	形成数/ 10 ⁶ mL ⁻¹	再生率/ %	形成数/ 10 ⁶ mL ⁻¹	再生率/ %
1.0	1.112	0.154	1.098	0.033
1.5	1.214	0.134	1.401	0.084
2.0	1.068	0.112	1.209	0.099

综合考虑原生质体形成数和再生率,即原生质体生成数与再生率的乘积. 选定用 1.0 mg/mL 的溶菌酶处理 45 min 为亲株 A 的溶菌酶处理条件; 1.0 mg/mL 的溶菌酶处理 30 min 为亲株 B 的溶菌酶处理条件.

2.2 原生质体融合

文献报道 40%的 PEG 浓度为进行原生质体融合的最高有效浓度,但是随着浓度的增加,PEG 对原生质体的毒性增加,并且过高浓度的 PEG 会使原生质体间的水分过快的脱去,形成过大的团块,反而不利于原生质体的融合. 故选择 30%、40%、50%、60%和 70%的 PEG1000 作融合,对融合后的原生质体悬液镜检. 发现 30%的 PEG 处理后的原生质体仍然均匀分散,而 70%的 PEG 处理后的原生质体形成很大的团块,都不利于原生质体的融合.

文献报道链霉菌原生质体融合所用 PEG 的相对分子质量多为 1 000、4 000、6 000,其中 1 000 毒性最小,但是也有报道 4 000 融合效果最好. 故选择这三种分子量的 PEG 分别进行原生质体融合,浓度分别为 40%、50%和 60%. 原生质体在经过不同浓度的 PEG1000 处理后再生菌落数没有明显的变化,而经过不同浓度的 PEG4000 和 6000 处理后,随着浓度的增加,再生菌落数也随之减少,证明 PEG4000 和 6000 对原生质体的毒性较大,故选择 PEG1000 做原生质体融合.

进一步实验显示,70% PEG1000 的处理 12 min 后,再生率仍然较高,能保证一定数量的融合子. 证明该厂家的 PEG1000 对原生质体的毒性很小. 为达到较好的融合效果,采用 60%的 PEG1000 在 30 °C 下处理原生质体 12 min. 融合方法见 1.5.3.

2.3 高产融合子的筛选

本文采用的融合双亲分别具有高浓度的舒巴坦钠和甘油抗性,故采用间接法进行融合子筛选,即待所有原生质体和融合子在再生平板上生长出以后,刮取孢子,对融合子的孢子进行抗性筛选. 为确定融合筛选平板,测定舒巴坦钠和甘油对亲株 A 和 B 的最低抑菌浓度,结果见表 3.

低抑菌浓度,结果见表 3.

表3 舒巴坦钠和甘油对菌株的最低抑菌浓度

Tab. 3 The minimal inhibition concentration of sulbactam sodium and glycerol to the strains

菌株	最低抑菌浓度	
	舒巴坦钠/mg · mL ⁻¹	甘油/g · L ⁻¹
亲株 A	16	140
亲株 B	12	160

通过上述试验结果确定融合子筛选平板为含有 16 mg/mL 的舒巴坦钠和 160 g/L 的甘油的 YMGA 平板,但多次融合后将再生平板上的生长出的菌落刮下,涂布到筛选平板上,均未生长出菌落,推测因为制成原生质体后又进行融合,菌株比较脆弱,直接给予高抗性筛选,会杀死菌株,故而得不到融合子. 进而制作低浓度抗性筛选平板,舒巴坦钠和甘油浓度均选择亲株 A 和 B 的出发菌株 *Streptomyces clavuligerus* B71 的最低抑菌浓度,即含有 6 mg/mL 的舒巴坦钠和 100 g/L 的甘油的 YMGA 平板,将融合过程中形成的负突变菌株剔除. 再将初筛抗性平板上长出的菌落刮下,稀释到合适浓度,涂布到筛选平板上. 方法见 1.5.3. 初筛和复筛结果见表 4.

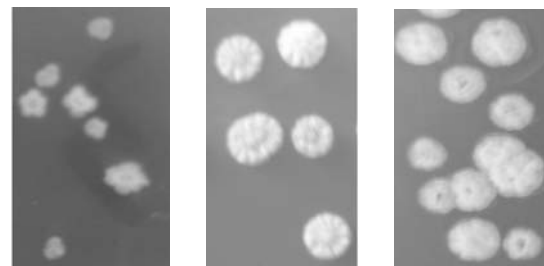
表4 融合子筛选统计结果

Tab. 4 Result of fusants screening

筛选	测试菌株数	突变株克拉维酸相对产量		
		低于较低产亲株 A	介于两亲株产量之间	高于较高产亲株 B
初筛	50	24	22	6
复筛	28	1	23	4

其中融合子 F14 克拉维酸产量最高,其克拉维酸产量提高到 650.35 mg/L,分别为亲株 A 和 B 克拉维酸产量的 136.77%和 120.84%.

其菌落形态较为接近亲株 B,菌落边缘比较平滑,表面呈放射状褶皱,产灰白色孢子,见图 4.



(a) 亲本 A (b) 亲本 B (c) 融合子 F14

图4 菌株菌落形态

Fig. 4 Colony morphous of strains

2.4 融合子的遗传稳定性

连续接种 5 次,每次均做摇瓶发酵,并测定舒巴坦钠和甘油耐受性,数据见表 5。

表 5 高产融合子 F14 的遗传稳定性
Tab. 5 Hereditary stability of F14

接种次数	克拉维酸产量/ mg · L ⁻¹	舒巴坦钠耐受性/ mg · mL ⁻¹	甘油耐受性/ g · L ⁻¹
1	650.35	16	160
2	652.21	16	160
3	651.27	16	160
4	649.88	16	160
5	650.73	16	160

结果显示, F14 产量和耐受性稳定,证明其具有良好的遗传稳定性。

3 结 论

(1) 优化亲株原生质体制备条件. 即对于亲株 A, 为在含有 100 g/L 蔗糖和 3 g/L 的甘氨酸的 YEME 培养基中培养 47 h, 菌体用 1 mg/mL 的溶菌酶在 30 °C 下处理 45 min; 对于亲株 B, 为在含有 150 g/L 蔗糖和 6 g/L 的甘氨酸的 YEME 培养基中培养 45 h, 菌体用 1 mg/mL 的溶菌酶在 30 °C 下处理 30 min。

(2) 将两亲株原生质体用含有 60% (质量、体积比) PEG 的 P buffer 30 °C 下处理 12 min, 进行融合. 得到的再生菌落, 经过两次抗性筛选, 琼脂块法初筛和摇瓶复筛, 最终得到一株遗传稳定性良好的克拉维酸高产菌株 F14, 其克拉维酸产量进一步提高到

650.35 mg/L, 分别为亲本 A 和 B 克拉维酸产量的 136.77% 和 120.84%。

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] Brown A G, Butterworth D, Cole M, et al. Naturally occurring lactamase inhibitors with antibacterial activity [J]. Journal of antibiotics, 1976, 29: 668—671.
- [3] Tobias Kieser, Mervyn J Bibb, David A. Hopwood, et al. Practical *Streptomyces* Genetics [M]. England: The John Innes Foundation, 2000.
- [4] 左志晗, 高辉, 宋诗莹, 等. 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, 26 (2): 135—137.
- [5] 邱荔, 孟春, 郭养浩, 等. 金色链霉菌原生质体的制备 [J]. 福州大学学报, 2001, 29 (2): 124—127.
- [6] 程骥, 洪文英, 苏建章, 等. 黑暗链霉菌与卡那链霉菌原生质体融合研究 [J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2003, 231 (1): 111—115.
- [7] 王艳萍, 张永生, 张阳, 等. 产克拉维酸的棒状链霉菌突变株的选育 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33 (5): 9—12.
- [8] 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.
- [9] 王艳萍, 左志晗, 张建, 等. 发酵液中克拉维酸含量的测定方法 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31 (5): 102—105.

《天津科技大学学报》2009 年征订启事

《天津科技大学学报》是公开发行的自然科学学术期刊, 主要刊登轻工技术与工程、食品工程与生物技术、材料科学与化学工程、机械及自动化、海洋科学与工程等学科的理论及应用的研究论文、研究报告, 已被国内多家数据库全文收录。2009 年, 本刊刊期将由季刊改为双月刊, 逢双月末 25 日出版, 国内定价 5.00 元/期 (全年 30 元), 其邮发代号 6—196。欢迎读者通过邮局订阅。

未及时订阅本刊者, 可向本刊编辑部联系订阅事宜。

电 话: (022) 60273316

电子信箱: tjkdx@tust.edu.cn

本刊编辑部