

离子注入选育霉酚酸高产菌株及其发酵条件研究

刘 梅^{1,2}, 张 鹏^{*1}, 崔晓兰², 任 晓², 张 华²

(¹ 北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029)

(² 华北制药集团新药研究开发中心国家微生物药物工程研究中心 石家庄 050015)

摘 要 离子注入技术是 20 世纪 80 年代兴起的一种综合诱变技术,其应用于生物工程已取得了丰硕成果,但在霉酚酸产生菌的诱变育种中的应用还未见报道。短密青霉菌(*Penicillium brevicompactum*) M-51 是从土壤中分离得到的 MPA 产生菌 F-663 经过紫外线、微波等诱变处理得到的。为获得霉酚酸的高产工业菌株,进一步对该菌株进行了离子注入诱变处理。用 15keV 氮离子分 5 个剂量进行处理,结果显示,随离子注入剂量增加,存活率呈现较明显的下降-上升-下降的“马鞍型”变化趋势。在剂量为 $140 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm² 时,菌株变异率及正变率均最高,分别达到 88.9% 和 63.4%。用 HPLC 定量测定发酵液中霉酚酸的含量,筛选到产霉酚酸能力提高 30.1% 的突变株 M-163。经过连续传代试验,其遗传性状稳定。对发酵条件的优化结果显示最佳种龄为 24h,用正交试验方法对发酵培养基中的碳、氮源进行优化,得到较优配方。突变株 M-163 在最优发酵条件下,霉酚酸摇瓶发酵单位可达 2819 μ g/mL。野生菌株 F-663 的 MPA 产量为 133 μ g/mL,经过 5 代诱变育种及发酵条件优化,产量提高了 20.2 倍。

关键词: 离子注入; 霉酚酸; 短密青霉菌; 选育

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)05-0816-04

霉酚酸(mycophenolic acid, MPA)最初是由青霉菌分离得到的有机化合物,其 2-乙基酯类衍生物霉酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF)作为第 3 代免疫抑制剂,于 1998 年 10 月获得 FDA 批准上市,主要用于肾脏、肝脏及心脏移植术后器官排斥的预防。霉酚酸酯在体内快速水解为霉酚酸,可高效、选择性、非竞争性、可逆性地抑制次黄嘌呤核苷酸脱氢酶,抑制 T 细胞、B 细胞中嘌呤的经典合成途径,还通过直接抑制 B 细胞增殖来抑制抗体形成^[1],发挥免疫抑制作用。据美国专利^[2]对短密青霉菌种进行诱变育种,得到 MPA 高产菌株。摇瓶振荡培养,发酵单位 2.3mg/mL,静置培养,发酵单位 3.6mg/mL。据世界专利^[3]应用亚硝基胍对青霉菌属的菌株进行诱变处理,得到 MPA 高产菌株。摇瓶振荡培养,发酵单位 3.1mg/mL。Sadhukhan 等报道,在固态发酵(SSF)中,霉酚酸产量可达到 3286mg/kg 麸皮^[4]。秦泰田等报道经紫外线诱变和自然分离纯化,在 10L 发酵罐上 MPA 产量可以达到 1600 μ g/mL^[5]。

离子注入技术是 20 世纪 80 年代兴起的一种综合诱变技术,其效应除了有能量传递以外,还有生物质量沉积及电荷交换等,具有损伤轻,突变率高,突变谱广等特点,其应用于生物工程已取得了丰硕成果^[6-8]。

本文报道利用低能离子注入技术,对本实验室自行筛选得到的霉酚酸产生菌(*Penicillium brevicompactum*)进行诱变育种,获得遗传稳定的高产突变株。并使用正交试验等方法对突变株进行优化发酵条件研究的试验结果。

基金项目: 国家 863 计划(2002AA2Z343D)

* 通讯作者。Tel: 86-10-64434778; E-mail: zhangpeng@mail.buct.edu.cn

作者简介: 刘 梅(1968-),女,河北人,高级工程师,硕士研究生,研究方向为微生物资源及菌种选育。

其他作者: 金 莹², 单越琦², 董悦生², 石 英², 贺建功²

收稿日期: 2005-11-01 接受日期: 2005-11-21 修回日期: 2006-02-10

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 霉酚酸产生菌(*Penicillium brevicompactum*) M-51。本室自土壤中分离的野生型菌株,经几代诱变育种得到。

1.1.2 培养基: ①斜面培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)北京双旋微生物培养基制品厂。②种子培养基: 每升含淀粉 10g, 葡萄糖 10g, 蛋白胨 5g, 酵母粉 3g, 氯化钠 2g, 碳酸钙 2g, 自来水 1L, pH7.0。③发酵培养基: 每升含淀粉 20g, 葡萄糖 10g, 蛋白胨 10g, 酵母粉 15g, 氯化钠 2g, 碳酸钙 2g, pH7.0。

1.1.3 主要试剂和仪器: ①霉酚酸标准品(Mycophenolic acid)购自 Sigma 公司。②离子注入机为中科院等离子体物理研究所研制。③HPLC 检测仪器: Waters 泵 515(双泵)检测器: 996PAD; 进样器: 7725i; 色谱柱: Kromasil ODS C18 Φ 4.6 \times 250mm。

1.2 菌体的培养方法

1.2.1 斜面培养: 30 $^{\circ}$ C 4~7d。平板培养同斜面培养。

1.2.2 种子培养: 斜面挖块接种于种子培养基中, 250mL 的三角瓶装量 40 mL, 置于 30 $^{\circ}$ C 摇床, 220r/min 振荡培养 28 h。

1.2.3 发酵培养: 250mL 三角瓶中装入 40mL 的发酵培养基, 并将培养好的种子液按 5% 的比例接种到发酵培养基中, 置于 30 $^{\circ}$ C 摇床, 220r/min 振荡培养 4d。

1.3 低能离子注入方法

7~10 mL 生理盐水洗下生长好的新鲜斜面的孢子, 用

无菌滤纸过滤得到无菌丝体的孢子悬液,取稀释 10 倍的孢子悬液 0.1mL 均匀涂布于无菌平皿,风干后进行离子注入。用 15keV 氮离子, 2.6×10^{13} ions/cm² 剂量率,分 $20 \times$, $60 \times$, $100 \times$, $140 \times$, $180 \times$ 等 5 个剂量进行处理。注入后的样品用 1mL 无菌生理盐水洗涤,将洗脱液稀释到 $10^{-1} \sim 10^{-5}$, 后取 0.1mL 涂布于平板上,培养后挑取单菌落进行初筛,复筛。变异率为摇瓶单位低于出发菌株 90% 和摇瓶单位高于出发菌株 110% 的菌株比例。正变率为摇瓶单位高于出发菌株 110% 的菌株比例。

1.4 分析方法

发酵液中霉酚酸的定量测定:发酵液用等体积的乙醇浸泡 4h,离心 10000r/min,1~2min。取上清液用 HPLC 测定霉酚酸含量。洗脱条件:MeOH:H₂O (3:4 V/V) (0.4% CH₃COOH),流速:1mL/min。检测波长 250nm。

2 结果和讨论

2.1 菌种诱变谱系

野生型菌株 F-663 的 MPA 产量为 133μg/mL,经紫外线、微波等诱变育种筛选到菌株 M-51,其 MPA 产量达 1951μg/mL,又经 N⁺ 注入诱变育种,MPA 产量达到 2538μg/mL (图 1)。

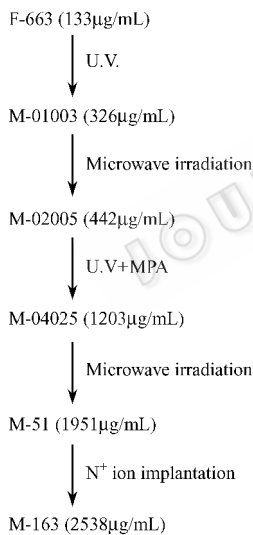


图 1 短密青霉菌 F-663 诱变谱系

Fig. 1 Genealogy of mutant strains derived from *Penicillium brevicompactum* F-663.

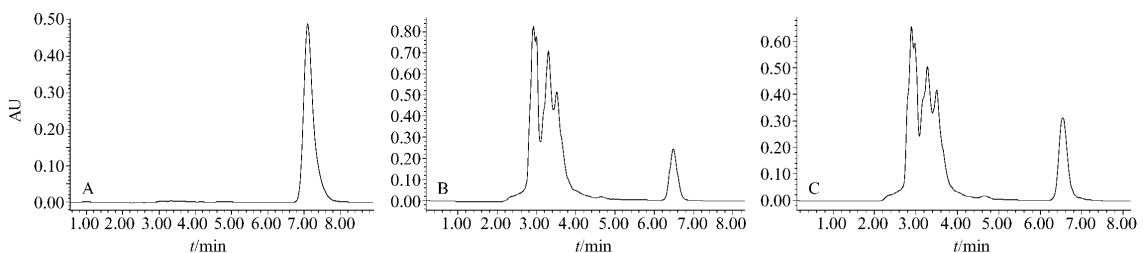


图 3 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram. A: Standard of MPA; B: Strain M-51; C: Strain M-163.

2.2 低能离子诱变

设定菌株 M-51 抽真空时的存活率为 100%。随离子注入剂量增加,存活率呈现较明显的先降后升再降的“马鞍型”变化趋势,如图 2-A 所示,这与吕树娟等人在氧化葡萄糖杆菌中的诱变结果类似,这种特有的“马鞍型”变化被认为是能量、动量作用下的损伤效应和质量、电荷作用下的保护和刺激综合作用的结果^[9]。在本实验中,平台期的剂量只有 $140 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions/cm²,可能是由于各注入剂量之间差别较大。在该平台期菌株的变异率及正变率均最高,分别达到 88.9% 和 63.4%,这在我们对该菌株的多代、多方法的诱变育种中,是效果较显著的(图 2-B)。

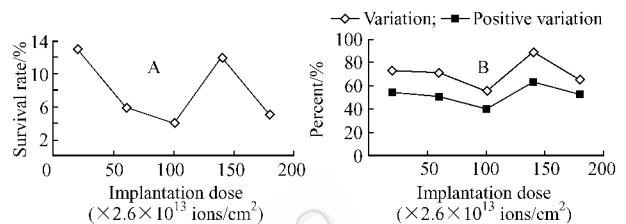


图 2 N⁺ 辐照的存活效应 (A) 和变异效应 (B)

Fig. 2 Survival fraction (A) and variation fraction (B) of *P. brevicompactum* after N⁺ ion implantation.

2.3 产物的鉴定

采用 HPLC 对发酵液进行测定,结果显示(图 3)诱变后的菌株 M-163 的霉酚酸产量增加,没有增加其它杂峰。

2.4 突变株传代稳定性研究

对 M-163 菌株连续传代 5 次,分别进行发酵培养,测得霉酚酸产量的结果见表 1。可看出传代 5 次后, M-163 菌株生产能力保持稳定。这与报道的离子注入诱变后,菌株获得的优良性状可稳定遗传^[10]一致。

表 1 M-163 遗传稳定性

Table 1 Genetic stability of M-163

Generations	Yield of MPA(μg/mL)	Comparison of yields/%
F1	2547	100
F2	2514	98.7
F3	2588	101.6
F4	2616	102.7
F5	2595	101.9

2.5 发酵条件的优化研究

2.5.1 接种龄的确定:在菌株次级代谢产物的发酵中,接种

龄会对发酵结果产生较大的影响。菌丝量随种子培养时间的延长而增加,但是当菌丝繁殖到一定程度后,随养分耗竭及代谢产物积累,菌丝量不再增加而是趋于老化。通常,接种龄以菌丝处于生长旺盛的对数生长期为宜。为考察接种龄对霉酚酸发酵单位的影响,取不同种龄的种子液接入发酵瓶,并测定种子液的菌浓,经发酵后,测定霉酚酸产量。以种龄 28h 的种子为对照,结果见表 2。根据实验结果,确定最佳种龄为 24h。

表 2 种龄对霉酚酸产量的影响

Table 2 Effect of seed growth time on yield of MPA

Seed growth time/h	Biomass (V/V%)	Yield of MPA ($\mu\text{g/mL}$)	Comparison of yields/%
16	19	1935	76.7
20	23	2303	91.3
24	28	2697	106.9
28	29	2523	100
32	29	2147	85.1

2.5.2 发酵培养基配方优化:为提高霉酚酸产量,对发酵培养基中的碳源、氮源进行正交优化,结果见表 3。从 R 值分析结果可知,影响霉酚酸发酵单位的各因素的主次顺序为:淀粉、蛋白胨、酵母粉、葡萄糖。经过对正交实验结果的验证,确定了最佳培养基配比为:淀粉 2.5%,葡萄糖 1.5%,蛋白胨 0.8%,酵母粉 2.0%。

表 3 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Table 3 Result of orthogonal design

No.	Factors				Yield of MPA ($\mu\text{g/mL}$)
	Starch	Glucose	Peptone	Yeast extract	
1	2%	0.5%	0.8%	1.5%	2492
2	2%	1.0%	1.0%	2.0%	2545
3	2%	1.5%	1.2%	2.5%	2527
4	2.5%	0.5%	1.0%	2.5%	2763
5	2.5%	1.0%	1.2%	1.5%	2462
6	2.5%	1.5%	0.8%	2.0%	2819
7	3%	0.5%	1.2%	2.0%	2383
8	3%	1.0%	0.8%	2.5%	2532
9	3%	1.5%	1.0%	1.5%	2445
K1	7564	7638	7843	7399	
K2	8044	7539	7753	7747	
K3	7360	7791	7372	7822	
R	684	252	471	423	

MMF 是目前临床上广泛应用的新一代免疫抑制剂。作为 MMF 的前体,MPA 产生菌的诱变育种是许多人关注的热点。但是在 MPA 诱变育种中应用离子注入方法的研究还未见报道。我们的研究表明,离子注入处理 MPA 产生菌,可获得遗传稳定的高产突变株,结合其发酵条件优化,可提高 MPA 产量 44.5%。我们从土壤中分离得到的 MPA 产生菌 F-663 经过 5 代包括离子注入等方法的诱变育种及发酵条件优化,产量从初始的 $133\mu\text{g/mL}$ 提高至 $2819\mu\text{g/mL}$ 。提高了 20.2 倍,显示了该菌株的高产潜力。并且该菌株发酵产物组分比较单一,发酵液经乙酸乙酯初步提取,提取物中霉酚酸的含量可达到 80%,给分离纯化带来了极大的便利,大大减少了纯化成本。该菌株经进一步优化已经在华北制药集团用于霉酚酸的产业化生产,取得了可观的经济效益。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所刘志恒教授对论文修改提供的帮助。感谢中国科学院等离子物理研究所的张束清老师、李市场博士在菌株离子注入方面给予的帮助。

参考文献

- [1] Fulton B, Markhan A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical research in renal transplantation. *Drugs*, 1996, **51**(2):278-298.
- [2] Takao K, Takehiko I, Hiroshiro S. Method for production of mycophenolic acid by fermentation. United States patent: 4,452,891. 5 Jun. 1984.
- [3] Barta István, Boros Sándor, Ambrus Gábor, et al. Process for the preparation of mycophenolic acid and derivatives thereof. World Intellectual Property Organization: WO 01/21607. 29 March 2001.
- [4] Sadhukhan AK, Muvthy MVR, Kumav RA, et al. Optimization of mycophenolic acid production in solid state fermentation using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, **22**:33-38.
- [5] 秦泰田,许永峰,程赵兵.麦考酚酸产生菌的诱变育种及发酵的研究.中国抗生素杂志,2005, **30**(7):426-427.
- [6] 袁成凌,余增亮.低能离子束在生物技术中的应用研究.生物工程杂志,2003, **23**(4):57-61.
- [7] 葛春梅,古绍彬,姚建铭,等. L-乳酸高产菌株的选育和产酸条件的研究.微生物学通报,2004, **31**(5):5-8.
- [8] 李市场,白爱枝,姚建铭,等.低能离子注入木聚糖酶产生菌黑曲霉(*Aspergillus niger*)育种中参数的优化.激光生物学报,2003, **12**(5):377-380.
- [9] 吕树娟,王军,姚建铭,等.离子注入氧化葡萄糖酸杆菌的诱变效应.激光生物学报,2003, **12**(5):382-385.
- [10] 惠友权,黄建新,孔碳贤.离子注入选育 α -乙酰乳酸脱氢酶菌株.西北大学学报,2001, **31**(3):251-254.

Studies on the breeding by ion implantation and cultivation of mycophenolic acid producing strain

LIU Mei^{1,2}, ZHANG Peng^{1*}, CUI Xiao-lan², REN Xiao², ZHANG Hua²

(¹ College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

(² New Drug R&D Co., Ltd of North China Pharmaceutical Group Co. Ltd, National Microbial Medicine Engineering & Research Center, Shijiazhuang 050015, China)

Abstract Mycophenolic acid is produced by aerobic fermentation of several *Penicillium* species. It has a broad spectrum of activity like antitumor activity, antiviral, anti-psoriatic, immunosuppressive and anti-inflammatory activity. It also exhibits antibacterial and antifungal activities. The immunosuppressive effect of MPA has been important in treatment of organ rejection after organ transplant surgery.

There is a continuous need to find improved process for efficiently obtaining superior MPA producing mutants. In recent years, the ion implantation technique has been widely applied in many fields and has been drawn more concern. However there is no report in the field of mutational breeding of MPA producing strain.

Penicillium brevicompactum M-51 was derived from MPA producing strain F-663 by varied mutational methods including U.V. and microwave irradiation. In the process of increasing the production of MPA from *P. brevicompactum* M-51, a mutant strain M-163 was obtained by means of N⁺ ion implantation. An decline-increase-decline tendency of strain survival rates was observed when the strain was implanted by N⁺ ion with dose from 20.26 × 10¹³ ions/cm² to 180 × 2.6 × 10¹³ ions/cm² under implantation energy 15keV. It apparently appeared "saddle shape". And under the implantation dose of 140 × 2.6 × 10¹³ ions/cm², the variation rate and the positive variation rate of the strain had reached the highest values 88.9% and 63.4%, respectively. The HPLC results showed that MPA yield of *P. brevicompactum* M-163 was improved by 30.1%, and its productivity was rather stable through successive transfer of cultures. The effect of seed growth time on yield of MPA was studied, and the best seed age was 24h after incubation. In the mean time, the fermentative condition of M-163 was studied through orthogonal design. The major ingredients being investigated included carbon and nitrogen sources. Finally the optimized fermentation medium was obtained. The yield of MPA reached 2819g/mL in the optimized submerged fermentation progress.

In conclusion, N⁺ ion implantation had been proven to be effective for mutational breeding of *P. brevicompactum* M-51. By means of N⁺ ion implantation and optimizing the fermentative condition, the yield of MPA was increased by 20.2 times than the wild-type strain F-663.

Keywords: Ion implantation; Mycophenolic acid; *Penicillium brevicompactum*; Breeding