

用自身次生代谢产物抗性筛选宁南霉素高产菌株^{*}

陈家任 陈 弘^{**} 胡厚芝

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

关键词 宁南霉素, 抗性筛选

分类号 Q939.92

宁南霉素是诺尔斯链霉菌西昌变种产生的一种胞嘧啶核苷肽型新抗生素,它对多种病毒、细菌和真菌引起的作物病害都有较好的防治效果,毒性低、残留量小,无蓄积作用,具有良好的应用前景。然而它的原始菌株 16A-6 发酵单位仅 700U/ml~1 000U/ml,严重阻碍了它的推广应用。

80 年代发展起来的原生质体融合技术已应用在某些抗生素、有机酸的菌种选育中,经典的诱变育种方法尽管存在很大盲目性、随机性,但仍是目前常用的行之有效的育种手段。前几年,我们分别采用³²P 反复诱变原始菌株和原生质体融合重组技术,将宁南霉素的摇瓶发酵单位提高到约 16 000U/ml^[1]。为了进一步提高效价,我们用常规因子诱变原生质体再生菌株,经自身次生代谢产物进行抗性筛选,获得几株高产菌株,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

FR-5 菌株是诺尔斯链霉菌西昌变种经原生质体融合选育得到的融合子。保存于淀粉、花生饼粉的琼脂斜面。

1.2 培养基

斜面培养基和发酵培养基均以淀粉、花生饼粉为主要成份,参照前文^[2]。

1.3 原生质体制备和再生

FR-5 原生质体制备和再生参照文献^[1]程序进行。

1.4 诱变处理

再生菌株的紫外线诱变按文献^[1]进行。亚硝基胍(NTG)诱变除使用 1.0mg/ml NTG 溶液,室温下处理 30min 外,同时采用在已涂布好菌悬液的营养琼脂平皿中央直接加入 NTG。选择培养基是在普通营养琼脂中加入原始菌株发酵单位的 1.0~2.0 倍量的自身次生代谢产物。

1.5 发酵单位测定

双碟扩散法测定发酵单位,指示菌是蜡样芽孢杆菌。

1.6 高产菌株的筛选

选择培养基上长出的成熟菌落,用牙签挑取点种到固体发酵培养基,参照文献^[5]方法,用琼脂挖块

^{*} 国家“九·五”科技攻关项目部分内容。

^{**} 重庆建筑大学学生。

收稿日期: 1997-02-17

法对菌落初筛,挑取抑菌圈大的菌落转接到斜面培养基,28℃培养,待孢子成熟后接入摇瓶发酵培养基进行复筛。250ml三角摇瓶装量30ml,在旋转式摇瓶机上28℃振荡培养60h,测定发酵单位,挑选高单位菌株。

2 结果

2.1 紫外线照射原生质体化菌株的产量变化

经原生质体化处理的菌株,用紫外线照射后,在选择培养基上随机挑取50个菌落,接种斜面,28℃培养,待孢子成熟,进行摇瓶发酵实验,结果如表1。从表1可以看出,加入较低剂量代谢产物后,在选择培养基上形成的菌落,负变菌株出现的频率较小,经摇瓶发酵复筛的50株菌,有80%以上菌株的发酵单位等于或大于原始菌株,其中有2株菌的发酵单位提高了20%。

表1 紫外线照射原生质体化菌株的结果

相对产量*(%)	<100	100~105	106~110	111~120	>120
出现菌株数	7	17	18	6	2
占测定菌株总数百分率	14	34	36	12	4

* 原始菌株FR-5的效价为100。

2.2 亚硝基胍诱变处理

以紫外线照射、抗性筛选的2株菌经2次传代、选择孢子丰富、成熟较早的发酵单位为18 000U/ml的菌株U-21作为亚硝基胍诱变的原始菌株。经原生质体化菌株进行亚硝基胍处理,在抗性培养基上生出菌落,先用琼脂块初筛,从中挑取72株抑菌圈大的菌株进行摇瓶发酵实验复筛,结果见表2。从表2看

表2 亚硝基胍处理原生质体化菌株的结果

相对产量*(%)	<100	100~150	151~200	201~225	>225
出现菌株数	7	34	24	5	2
占测定菌株总数百分率	9.7	47.2	33.3	6.9	2.8

* 原始菌株U-21的效价为100,发酵单位为18 000U/ml。

出,用亚硝基胍诱变原生质体化的菌株,经高浓度自身次生代谢产物抗性平皿筛选,琼脂块初筛后,经摇瓶发酵实验仍发现不少的优良菌株,其中发酵单位高达200%的有7株。说明在诺尔斯链霉菌西昌变种中,菌株对自身次生代谢产物的耐受程度与其产生抗生素水平有一定的内在联系。这与Dolezilova L^[8]报道的十分相似。

3 讨论

用原生质体融合、基因重组构建工业生产高产菌株的研究过程,与其相伴随的原生质体制备和再生技术也可直接用于提高抗生素的发酵单位^[3],用物理、化学因子诱变原生质体或再生菌株,可提高正变频率,为筛选高产菌株提供了更多的机会,但要从中选出高产菌株,仍需进行大量的摇瓶筛选工作。为了提高筛选工作效率,川市设计了琼脂块筛选法^[5],同期,Elander R P等人提出前体及类似物抗性筛选方法^[6],在菌种选育中取得了预期的结果。在四环素、新生霉素、链霉素和制菌霉素研究中,人们发现这些产生菌对自身次生代谢产物的耐受程度与其所产抗生素水平有一定直接关系^[7]。借助前人经验,作者设计了原始菌株—原生质体化—物理化学因子处理—自身次生代谢产物抗性筛选—琼脂块初筛—摇瓶发酵复筛的模式,在较短时间,用较小工作量,摇瓶实验共筛选123株菌,选出几株发酵单位提高一倍以上

的高产菌,这是选育宁南霉素高产菌种的一条捷径。

参 考 文 献

- [1] 陈家任, 胡厚芝, 陈 弘等. 微生物学报, 印刷中.
- [2] 胡厚芝, 陈家任, 向固西等. 微生物学报, 1993, 33(6): 446~453.
- [3] 朱建伟, 刘颐屏, 朱宝泉等. 生物工程学报, 1988, 4(4): 304~309.
- [4] Ikeda H, Inoue M, Omura S, et al. *J Antibiot*, 1983, 36(3): 283.
- [5] Ichikawa T, Date M, Ishikura T. *Folia Microbiol*, 1971, 16: 218.
- [6] Elander R P, Mabe J A, Hamill R L, et al. *Folia Microbiol*, 1971, 16: 157.
- [7] Trenina G A, Trutneva E M. *Antibioti*, 1966, 11: 770.
- [8] Dolezilova L, Spizek J, Trutenva M et al. *J Gen Microbiol*, 1965, 39: 305.

SELECTION OF NINGNANMYCIN OVERPRODUCTION STRAINS BY RESISTANCE OF SELF-SECONDARY METABOLITES

Chen Jiaren Chen Hong Hu Houzhi

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract The *S. noursei* var. *xichangensis* FR-5 protoplasted was treated by UV, NTG sequencely, and the mutated strains were selected by use of self-secondary metabolites, the microorganisms were isolated by fermentation after agarblock rational method. The seven strains of microorganisms which were one fold production higher than that of original strain were obtained from 122 mutants. The method should be a simple, high speed selection model of breed Ningnanmycin overproduction strains of microorganisms.

Key words Ningnanmycin, Resistance selection