替考拉宁产生菌的抗性筛选及发酵条件研究

胡海艳,赵培静,梁淑娃,秦 鹏,刘燕珠,夏枫耿*　(广州市微生物研究所,广东广州 510663)

摘要　[目的]通过对替考拉宁产生菌的菌种选育及发酵工艺的研究,提高其对自身代谢产物的耐受性,进而提高替考拉宁的产量。[方法]以替考拉宁产品本身为筛选剂,利用紫外诱变,对替考拉宁产生菌进行耐自身抗性的筛选。将筛选得出的高产菌进行发酵研究,在发酵起始将不同型号的大孔树脂加入培养基中以吸附发酵过程中释放的替考拉宁,发酵结束后用浓度80%甲醇洗涤树脂,用微生物管碟法测其洗脱液效价。[结果]通过抗性筛选的方法,获得比亲株发酵水平提高18%的菌株。在发酵液培养基中添加7%(*w*/*V*)的吸附树脂Diaion HP-20能有效消除替考拉宁对自身菌体的抑制作用,使得替考拉宁产量提高3.52倍。[结论]通过对替考拉宁的抗性筛选及向发酵液中加入吸附树脂能有效提高菌体对自身的耐受性,为进一步的工业化生产提供理论依据。

关键词　替考拉宁;游动放线菌;抗性变株;吸附树脂
中图分类号　S188⁺.8　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　0517 - 6611(2014)15 - 04561 - 02

Resistance Screening of Teicoplanin-Producing Strains and Fermented Condition

HU Hai-yan, XIA Feng-geng et al　(Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510663)

Abstract　[Objective] Strain selection and fermentation technology research were studied to limit self repression, so as to increase teicoplanin production. [Method] Taking teicoplanin itself as the selective agent, resistance screening was made on the teicoplanin-producing strain *Actinoplanes teichomyceticus* through ultraviolet mutagenesis. Fermented condition was studied by adding various adsorbent resins to the culture broth for teicoplanin adsorption. The adsorbed teicoplanin was extracted from the resins via 80% methanol after fermentation. Antibiotic activity was quantified by the cylinder plate method. [Result] The fermentation level of the obtained strain was 18% higher than that of parent strain. Diaion HP-20 was the most effective adsorbent resin when added at the concentration of 7% (*w*/*V*) in the inoculation stage, with a 3.52-fold increase in the quantities of teicoplanin. [Conclusion] It is feasible to limit self repression by using resistance screening and adding adsorbent resin into fermentation broth. The results of this study can provide theoretical basis for the industrial production of teicoplanin.

Key words　Teicoplanin; *Actinoplanes teicomyceticus*; Resistant mutant; Adsorbent resin; Diaion HP-20

替考拉宁(Teicoplanin)又称肽可霉素(Teicomycin A2),是Parenti等于1978年发现的一种新的糖肽类抗生素,由游动放线菌(*Actinoplanes teichomyceticus*)产生[1]。它是继万古霉素之后的又一目前临床治疗多重耐药菌感染的重要抗生素。大量研究表明,替考拉宁对革兰氏阳性菌尤其对多重耐药(MDR)的金黄色葡萄球菌(MRSA)和肠球菌具有强大的抗菌活性[2-3]。万古霉素和替考拉宁是目前仅有的能有效作用于MRSA的有效药物。MRAS的世界性问题导致万古霉素和替考拉宁的需求量增加[4]。与万古霉素相比,替考拉宁因其毒副作用更低,在体内半衰期更长而更具有优势[5]。

为了提高替考拉宁的产量,学者们致力于对其进行菌种筛选和发酵工艺的改良。金志华等[6]以缬氨酸氧肟酸为筛选剂,筛选出一株每升发酵液能产生1.8 g替考拉宁的突变株,其产量比出发菌株提高了50%。Lee[7]通过优化培养基,使得替考拉宁产量提高到1.5 g/L。Jung[8]等通过紫外诱变筛选优势菌和优化上罐发酵条件,使得替考拉宁产量最终达到2.8 g/L。进一步的研究表明,替考拉宁对自身菌体具有一定的反馈抑制作用[4,9]。Lee等[10]在接种时向培养基中加入0~200 mg/L替考拉宁以考察其对*A. teicomyceticus* ATCC 31121菌株发酵的影响。研究表明,当添加的替考拉宁浓度为10 mg/L时,替考拉宁的形成几乎被完全抑制。笔者通过对替考拉宁的抗性筛选及向发酵液中加入吸附树脂以吸附一部分产物替考拉宁,从菌体和发酵条件2个方面提高菌体对自身产物的耐受性,进而提高替考拉宁产量。

1　材料与方法

1.1　菌种与培养基

1.1.1　菌种。替考游动放线菌由广州市微生物研究所中心实验室保藏。

1.1.2　培养基。固体培养基组成为:葡萄糖1.0 g/L,酵母粉2.0 g/L,K_2HPO_4 1.0 g/L,KCl 6.0 g/L,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g/L,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04 g/L,pH 7.0。种子培养基组成为:糊精4.0 g/L,可溶性淀粉24 g/L,酵母粉6.0 g/L,蛋白胨2.0 g/L,$CaCO_3$ 2.0 g/L,pH 7.4。发酵培养基组成为:糊精12 g/L,可溶性淀粉20 g/L,黄豆粉24 g/L,玉米浆16 g/L,$CaCO_3$ 2.0 g/L,pH 6.8。供试替考拉宁由广州市微生物研究所提取纯化,经HPLC测定发现其纯度和组分符合药典规定。

1.2　替考拉宁对自身菌体的抑制作用考察　将替考拉宁成品配制成一定浓度的溶液,过滤除菌后涂布到固体培养基上,将未处理的替考拉宁孢子悬液涂布于含有不同浓度的替考拉宁产品的平板培养基上,28 ℃培养箱培养,观察孢子生长情况。同时,将不同浓度的替考拉宁产品经过滤除菌后加入发酵培养基中,接种种子液(接种量10%),28 ℃,150 r/min摇床振荡培养一定时间后,取样,测定其效价,考察替考拉宁对发酵的影响。

1.3　抗性菌株选育　将紫外诱变后的孢子涂布于含特定浓度替考拉宁产品的平板培养基上,筛选抗性突变株。

1.4　发酵液中吸附树脂的加入

1.4.1　树脂的预处理。选取HZ 801(上海华震科技有限公司生产),Diaion HP-20(日本三菱公司生产)。XAD-16、FPA

作者简介　胡海艳(1985 -),女,湖南醴陵人,工程师,硕士,从事微生物发酵、酶方面的研究。*通讯作者,高级工程师,从事微生物发酵、食品添加剂、药物开发方面的研究。

收稿日期　2014-04-29

53、PLC 90、PLC 98(美国 Rohm and Haas 公司生产)为添加至发酵液中的吸附树脂。树脂在使用前,先用浓度 100% 甲醇浸泡 12 h,以除去其中的杂质,用纯化水洗至中性后,将树脂放入超声波清洗器中超声脱气,将处理后树脂加入未灭菌的发酵培养基中,121 ℃,30 min 灭菌。

1.4.2 发酵液中加入树脂的培养条件。从斜面上挖取成熟孢子接入 500 ml 装有种子培养基 50 ml 锥形瓶中,28 ℃,150 r/min 摇床振荡培养 48 h 后,移取 10 ml 种子液接入 500 ml 装有 100 ml 发酵培养基的锥形瓶中。发酵培养一定时间后取样,测定其效价。

1.5 组分及效价测定 组分测定采用 HPLC 法[11];效价测定采用微生物管碟法[12]。

2 结果与分析

2.1 替考拉宁对自身菌体的抑制作用 配制一定浓度的替考拉宁成品溶液,微膜过滤除菌,吸取 150 μl 涂布在倒有固体培养基的平皿上,将未经处理的替考拉宁孢子悬液涂布其上,培养并观察菌落的生长。

从表 1 可以看出,随着涂布在平板表面的替考拉宁浓度的增加,孢子开始生长的时间越长,且生长速度缓慢,当涂布有 0.012 g 替考拉宁时其自身孢子几乎不生长。

表 1 替考拉宁产品对自身菌体生长的影响

每平皿表面涂布替考拉宁的量//g	菌落开始生长时间//d	菌落生长情况
0	3	较好
0.004	6	菌落生长较缓慢
0.008	8	生长速度缓慢,菌落小
0.012	–	几乎不生长
0.016	–	几乎不生长

为了进一步考察替考拉宁产生菌在发酵过程中是否受自身代谢产物的抑制,接种时向发酵液中加入 0 ~ 30 mg/L 替考拉宁成品,发酵培养 8 d 后测其效价。从图 1 可以看出,不加替考拉宁的效价为 521.32 U/ml;当替考拉宁的添加浓度为 5 ~ 15 mg/L 时,替考拉宁的效价呈缓慢增加趋势;当替考拉宁的添加浓度为 20 mg/L 时,最终替考拉宁的效价为 306.70 U/ml,下降了 41%;当替考拉宁的添加浓度为 30 mg/L 时,最终效价仅有 116.62 U/ml,其形成受到严重的抑制作用。

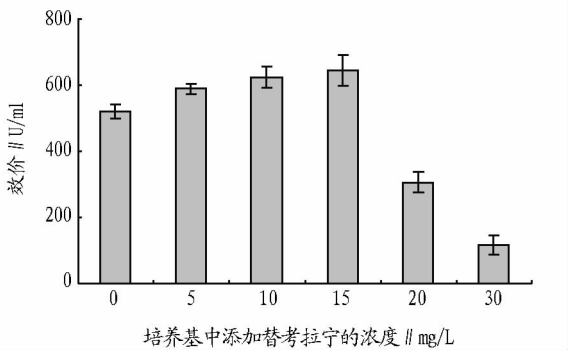

图 1 接种时发酵液中加入替考拉宁对终产物的反馈阻遏作用

2.2 抗性菌种的选育 以替考拉宁放线菌(*Actinoplanes teichomyceticus*)为出发菌株,制成一定浓度的菌悬液,紫外照射 120 s,暗培养 2 h,稀释涂布含有 0.012 g 替考拉宁的平板上,28 ℃培养箱培养。挑选一定数量的菌落划线斜面,比较其发酵水平。通过一定数量的筛选,获得一株比出发菌株生产能力高 18% 的菌株,菌株编号为 GWT-12-043。群体传代显示,该菌连传 10 代,其效价水平波动较小。

2.3 发酵液中加入吸附树脂的发酵培养 取 HZ 801、Diaion HP-20、XAD-16、FPA 53、FPL 90、FPL 98 6 种经预处理的树脂,加入发酵培养基中,加入树脂量为 5%(*W*/*V*)。121 ℃,30 min 灭菌,向其中接入种子液,28 ℃,150 r/min 摇床振荡培养 8 d 后,4 000 r/min,10 min 离心,取上清液,测定效价,其沉淀用等体积 80% 甲醇静态解析 30 min 后,测定解析液效价。

由表 2 可知,树脂 HZ 801、树脂 Diaion HP-20 和 XAD-16 均能明显地提高发酵液中替考拉宁的效价,分别是不添加树脂发酵液的 1.66、3.28 和 2.07 倍;FPA 53、FPL 90 和 FPL 98 的效果较差。吸附效果最好的树脂 Diaion HP-20,其发酵液上清液的效价为 66.30 U/ml,吸附率达到 96.45%。

表 2 不同树脂解析液和发酵液中替考拉宁的效价 U/ml

树脂型号	发酵液上清效价	树脂洗脱液效价
HZ 801	46.69	910.21
Diaion HP-20	66.30	1 798.68
XAD-16	98.32	1 134.67
FPA 53	无	33.84
FPL 90	无	120.85
FPL 98	无	68.84
对照(不加树脂发酵液)	547.89	–

为了探索加入发酵液中吸附树脂的最适比例,分别选取价格最低廉的树脂 HZ 801、吸附能力最好的树脂 Diaion HP-20,按不同比例加入发酵液中,接种培养 8 d 后测定其效价。由表 3 可知,添加 7% 树脂 HZ 801 时吸附效果最好,替考拉宁的效价最高;当添加 7% 树脂 Diaion HP-20 时,其树脂洗脱液效价达到 2 173.20 U/ml,吸附率达到 97.88%,已经逼近 Jung 等[8]所报道的 2.8 g/L。

表 3 培养基中加入不同浓度树脂 HZ 801 和 Diaion HP-20 的效果

U/ml

树脂浓度	HZ 801		Diaion HP-20	
%	上清液	树脂洗脱液	上清液	树脂洗脱液
0	563.72	–	617.34	–
1	446.98	472.17	542.69	246.24
3	193.80	625.60	558.21	805.84
5	67.67	890.85	82.23	1 865.97
7	50.69	1 104.42	47.11	2 173.20
10	43.91	360.66	42.52	883.27

虽然树脂 Diaion HP-20 对产替考拉宁的吸附量最大,但价格较昂贵,工业用价格约为 200 元/L,而国产树脂 HZ801

(下转第 4575 页)

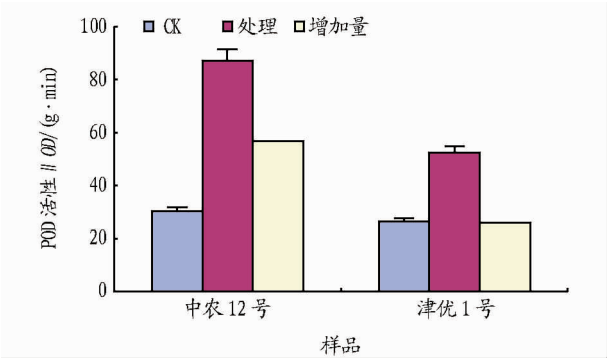

图 6　盐胁迫对不同黄瓜品种幼苗叶片 POD 活性的影响

自由基的平衡,从而保护植物能够正常的代谢和生长。

3　讨论

已有研究人员进行了黄瓜抗盐性的研究,但大多是以土壤栽培为基础,再浇灌盐溶液[4-5]。该法中由蒸发引起的盐浓度误差较难消除。采用营养液水培的方法,可较严格地控制黄瓜根系的盐浓度。另外,前人的研究多在黄瓜植株 4 叶以后进行盐胁迫,而生产中多在 1 ~ 2 真叶苗龄进行移栽,因而该试验在黄瓜第 1 真叶展开时进行盐胁迫,更能指导生产实际。研究表明,盐胁迫后黄瓜株高、茎粗与壮苗指数均降低,干物质含量增加。这与许耀照等[10-11]研究结果一致。同时,盐胁迫后黄瓜幼苗的根系活力和叶绿素含量下降,MDA、游离脯氨酸含量和POD活性均有升高。这也与王素平等[2,4-5]研究结果一致。

2 个品种间的对比结果表明,中农 12 号抗盐性强于津优 1 号。这与门立志[9]利用珍珠岩基质培养的黄瓜试验得出的结论一致。因此,在盐渍化严重的地块选种中农 12 号黄瓜品种,在无盐害的地块 2 个品种均可种植。

参考文献

[1] 朱虹,祖元刚,王文杰,等. 盐碱地的植被恢复与盐碱地改良方法的评述[J]. 吉林林业科技,2007,36(5):14 -27.
[2] 王素平,郭世荣,李璟,等. 盐胁迫对黄瓜幼苗根系生长和水分利用的影响[J]. 应用生态学报,2006,17(10):1883 -1888.
[3] 魏国强,朱祝军,方学智,等. NaCl 胁迫对不同品种黄瓜幼苗生长、叶绿素荧光特性和活性氧代谢的影响[J]. 中国农业科学,2004,37(11):1754 -1759.
[4] 周青,王纪忠,陈新红,等. 持续盐胁迫对耐盐性不同的两个黄瓜品种幼苗生长和生理特性的影响[J]. 北方园艺,2013(18):24 -26.
[5] 张景云,吴凤芝. 盐胁迫对黄瓜不同耐盐品种叶绿素含量和叶绿体超微结构的影响[J]. 中国蔬菜,2009(10):13 -16.
[6] 内蒙古农牧业厅. 乌兰察布市蔬菜品种介绍[EB/OL]. (2007 -04 -23) http://www.nmagri.gov.cn/fwq/pzzy/sccpz/17392.shtml.
[7] 内蒙古农牧业厅:黄瓜选择优良品种[EB/OL]. (2011 -06 -02) http://www.nmagri.gov.cn/fwq/syjs/zzy/43198.shtml.
[8] 张志良,瞿伟菁,李小芳. 植物生理学实验指导[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2009:21,70,134,123.
[9] 门立志,王毅,曹云娥,等. 不同黄瓜品种苗期耐盐性指标筛选与评价体系构建[J]. 中国蔬菜,2013(22):20 -26.
[10] 许耀照. 高温和水杨酸对黄瓜种子萌发和幼苗的影响[D]. 兰州:甘肃农业大学,2005:59.
[11] 郎志红. 盐碱胁迫对植物种子萌发和幼苗生长的影响[D]. 兰州:兰州交通大学,2008:22.

(上接第 4562 页)

价格仅在 10 元/L 左右。采用哪种型号的树脂,还需根据实际情况进行具体分析。

3　讨论

抗生素产生菌对其自身所产抗生素的耐受能力不同,高产菌株的耐受能力大于低产菌株[13]。该研究通过用自身抗生素替考拉宁结合紫外诱变来筛选高产菌株,替考拉宁效价提高 18%。在发酵过程中,替考拉宁的积累会抑制自身菌体的生长[4]。为了减弱发酵液中替考拉宁对自身菌体生长的抑制作用,在接种前向培养基中加入吸附树脂与菌体一起发酵培养。研究表明,离子交换树脂 Diaion HP-20 的吸附作用最好,其吸附率达到 96% 以上,只有不到 4% 的替考拉宁分布于发酵液中,大大降低了发酵液中替考拉宁的浓度,从而减轻了对自身菌体的抑制作用,进一步提高替考拉宁的产量。

徐波等[14]利用放线菌次级代谢产物产生菌的基因重排育种技术,筛选出一株使替考拉宁产量提高 65.3% 的融合菌株。在下一步的工作中,将继续进行菌种的筛选工作,并且尝试新的选育方法,以提高菌体对替考拉宁的耐受性,甚至实现不需要通过向发酵液中加入树脂即可以达到高产量的目的。

参考文献

[1] PARENTI F,BERETTA G,BERTI M,et al. Teichomycins,new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* Nov. Sp. I. Description of the producer strain,fermentation studies and biological properties[J]. The Journal of Antibiotics,1978,31(4):276 -283.
[2] BARDONE M R,PATERNOSTER M,CORONELLI C. Teichomycins,new antibiotics from *Actinoplanes teicomyceticus* nov. sp[J]. Antibiot,1978,31:170 -177.
[3] BROGDEN R N,PETERS D H. Teicoplanin. A reappraisal of its antimicrobial activity,pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy[J]. Drugs,1994,47:823 -854.
[4] HEYDORN A,TRINE S J,NIELSEN J. Growth and production kinetics of a teicoplanin producing strain of *Actinoplanes teicomyceticus*[J]. J Antibiot,1999,52:40 -44.
[5] WOOD M J. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin[J]. Antimicrob Chemother,1996,37:209 -222.
[6] JIN Z H,WANG M R,CEN P L. Production of teicoplanin by valine analogue- resistant mutant strains of *Actinoplanes teichomyceticus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2002,58:63 -66.
[7] LEE J C,MIN J W,PARK D J,et al. Large-scale fermentation for the production of teicoplanin from a mutant of *Actinoplanes teichomyceticus*[J]. Microbiol Biotechnol,2005,15:787 -791.
[8] JUNG H M,KIM S Y,PRABHU P,et al. Optimization of culture conditions and scale-up to plant scales for teicoplanin production by *Actinoplanes Teichomyceticus*[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2008,80:21 -27.
[9] FAZELI M R,COVE J H,BAUMBERG S. Physiological factors affecting streptomycin production by *Streptomyces griceus* ATCC 12475 in batch and continuous culture[J]. FEMS Microbiology Letters,1995,126:55 -62.
[10] LEE J C,PARK H R,PARK D J,et al. Improved production of teicoplanin using adsorbent resin in fermentations[J]. Letters in Applied Microbiology,2003,37(3):196 -200.
[11] 蒋沁,倪会敏,石磊,等. HPLC 法快速检测发酵液中替考拉宁含量[J]. 天津药学,2006,18(2):21 -23.
[12] CHEN Y,WANG S Y,HU G Y. Determination of teicoplanin in injection by bioassay[J]. Chinese Pharmaceutical Journal,2002,37(4):302 -304.
[13] 白芳静,左良成,尤春静,等. 替考拉宁产生菌耐自身抗性变株的选育[J]. 畜牧与饲料科学,2011,32(7):98 -99.
[14] 徐波,王明蓉,夏永杨,等. 应用基因组重排育种新方法筛选替考拉宁高产菌[J]. 中国抗生素杂志,2006,31(4):237 -242.