

棘白霉素B脱酰基酶高产菌株的选育及转化条件优化

郝丽萍 王小连 马婕 钱思宇 代明伟 张炜*

(华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 微生物药物国家工程研究中心, 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心, 石家庄 050015)

摘要: **目的** 为提高棘白霉素B脱酰基酶产生菌的转化率。**方法** 采用常压室温等离子体诱变复合链霉素抗性筛选转化高产菌株; 对新菌株转化棘白霉素B的底物溶剂、转化温度和转化时间等条件进行优化。**结果** 获得稳定突变株ZH-6-78比出发菌的转化率提高了26.7%; 优化后转化条件为: 转化温度35℃, 转化时间24h。**结论** 高产菌种在优化的转化条件下, 转化率达到90%, 比出发菌原工艺提高了50.0%, 为工业化生产奠定基础。

关键词: 棘白霉素B; 脱酰基酶; 转化; 优化

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Screening of high echinocandin B deacylase-producing strain and optimization of biotransformation conditions

Qie Li-ping, Wang Xiao-lian, Ma Jie, Qian Si-yu, Dai Ming-wei and Zhang Wei

(NCPC New Drug Research and Development Co., Ltd., National Engineering; Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering & Technology Research Center, Shijiazhuang 050015)

Abstract **Objective** To enhance the efficiency of the conversion of the echinocandin B deacylase-producing strain. **Methods** The echinocandin B deacylase-producing strain was treated by ARTP, followed by resistance selection with streptomycin; Biotransformation conditions including the solvent of precursor, temperature, and time were optimized to increase the transformation ratio of echinocandin B. **Results** A stable mutant strain ZH-6-78 was obtained and its conversion efficiency was 26.7% higher than that of the original strain. The optimum conversion conditions were determined as follows: the conversion temperature was 35℃, and the conversion time was 24h. **Conclusion** The biotransformation percentage of echinocandin B for the new strain was 90% under the optimized conversion conditions. It was 50% higher than that of original strain under the initial conversion conditions, which laid the foundation for the industrial production.

Key words Echinocandin B; Deacylase; Biotransformation; Optimization

棘白霉素新型抗真菌药物通过非竞争性抑制真菌细胞壁上1,3-β-D-葡聚糖的合成, 导致真菌细胞壁合成受阻, 发挥抑菌功能^[1]。由于其特殊的作用机制使该类药物对人体的毒性大大降低, 同时药物相互作用减少。棘白霉素类药物主要包括卡泊芬

净(caspofungin)、米卡芬净(micafungin)和阿尼芬净(anidulafungin)。

目前阿尼芬净的主要合成路线如图1所示。其中关键中间产物棘白霉素B母核主要通过棘白霉素B(ECB)脱酰基酶催化ECB获得^[2]。化学方法去除酰基, 反应

收稿日期: 2017-05-03

基金项目: 河北省科技条件建设项目(No. 169676404G); 河北省引进留学人员资助项目(No. CL201617)

作者简介: 郝丽萍, 女, 生于1974年, 高级工程师, 从事生物制药研究, E-mail: qieliping1993@163.com

*通讯作者, E-mail: wzhang1971@sina.com

条件剧烈，选择性差；微生物转化方法具有条件温和，环境友好等化学反应所不具备的优势^[3]。目前众多学者对酰化酶开展了多方位的研究^[4-5]。

本研究以提高一株产脱酰基酶的链霉菌转化阿尼芬净中间体的转化率为目的，利用等离子诱变的手段，结合链霉素抗性理性化选育，筛选高产突变株提高脱酰基酶的产量，并优化了全细胞的转化体系，从而达到提高转化效率的目的，为工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

链霉菌(*Streptomyces pulverzceus*)ZH-4-35，本实验室保存。

1.1.2 培养基

斜面及平板培养基(g/L)：葡萄糖4，酵母粉4，复合维生素B 0.005，微量盐1mL，琼脂粉16，蒸馏

水配制，pH7.2，28℃，培养8~10d。

种子培养基(g/L)：葡萄糖15，糊精10，玉米浆8，酵母粉4，K₂HPO₄ 0.5，MgSO₄·7H₂O 0.5，自来水配制，pH7.2。

发酵培养基(g/L)：糊精10，蔗糖20，酵母粉5，热炸豆饼粉10，MgSO₄·7H₂O 0.3，自来水配制，pH6.5。

1.1.3 主要仪器

ARTP-IIS，等离子诱变仪(无锡源清天木生物科技有限公司)；岛津2010高效液相色谱仪。

1.1.4 试剂

硫酸链霉素(华北制药，规格739u/mg)。

1.2 方法

1.2.1 孢子悬液的制备

取ZH-4-35菌的新鲜斜面1支，加入10mL无菌生理盐水，用接种针刮下，玻璃珠打散，过滤，制成单孢子悬液，孢子浓度达到10⁷/mL。

1.2.2 等离子诱变

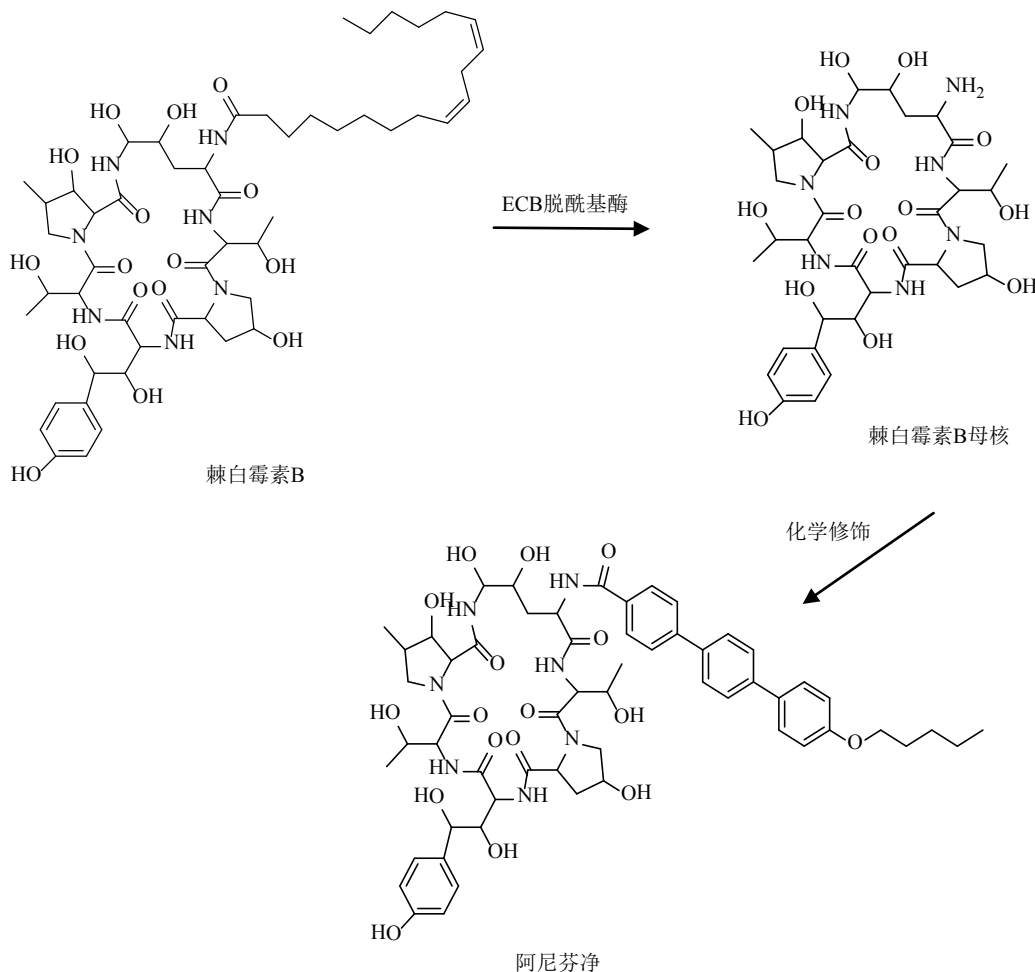


图1 阿尼芬净的合成过程
Fig. 1 Synthetic profiles of anidulafungin

ARTP诱变参数^[5]: 出发菌株ZH-4-35制备好的单孢子悬液, 取10 μ L滴加在无菌平皿内的不锈钢载片上, 将载片放在正确的位置上按预设时间进行照射, 照射完毕立即将载片投入装有1mL无菌水的EP管中, 使用涡旋混合器将孢子振荡1min洗下, 用镊子将载片夹出。孢子液稀释, 分离。

1.2.3 链霉素抗性实验

制备0、1、2、3、4和5mg/L的链霉素平皿, 分别涂布ZH-4-35制备好10⁻³和10⁻⁴的单孢子液0.1mL, 不含链霉素平皿培养4d后计数, 含链霉素平皿培养7d后计数。

1.2.4 等离子诱变复合链霉素抗性突变株筛选

等离子处理后的孢子悬液, 涂布于含链霉素的抗性平板中, 培养7~9d后, 菌落转移至正常斜面培养7~8d, 进行摇瓶初筛与复试。

1.2.5 培养条件

摇瓶培养: 将斜面菌种挖块0.5cm \times 1cm接种于种子培养基中(30mL/250mL三角瓶), 28 $^{\circ}$ C, 200r/min振荡培养42~48h, 然后以5%的接种量移种到发酵培养基中(40mL/250mL三角瓶), 28 $^{\circ}$ C, 200r/min振荡培养, 第4天补入已知浓度的ECB底物, 培养基中底物终浓度为2400 μ g/mL, 继续200r/min振荡培养, 第6天放瓶。

50L罐发酵培养: 采用三级发酵方式。中管斜面菌种挖块0.5cm \times 6cm接种于种子培养基中(150mL/1000mL三角瓶), 28 $^{\circ}$ C, 200r/min振荡培养42h。然后以2%接种量接种至10L种子培养基, 28 $^{\circ}$ C, 搅拌转速300r/min, 通气比10L/min, 培养24h。最后以10%的接种量接种至50L发酵培养基中, 转速300r/min, 通气30L/min, 96h后开始流加已知浓度的ECB底物, 培养基中底物终浓度为1500 μ g/mL, 转化温度35 $^{\circ}$ C, 转化时间为24h。

1.2.6 发酵液组分测定

取发酵液2mL, 加入1%的乙酸溶液8mL稀释, 3000r/min离心10min, 取上清液, 经0.45 μ m水膜过滤, HPLC分析。

HPLC条件: C₁₈ 4.6mm \times 250mm, 5 μ m; A相: 0.2%三氟乙酸900mL+乙腈100mL; B相: 0.2%三氟乙酸, A:B=25:75; λ : 210nm, 温度: 40 $^{\circ}$ C, 流速 0.8mL/min 进样量 5 μ L, 保留时间: 12min, 采集时间: 17min。

1.2.7 转化率的计算

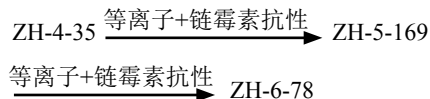
转化率(%)=生成ECBN摩尔数/底物ECB摩尔数 \times 100%

2 结果

2.1 菌种选育系谱

2.2 等离子诱变剂量的选择

将等离子诱变的菌悬液涂布在普通平板培养基



上28 $^{\circ}$ C, 培养7d, 以未经诱变的菌液作为对照, 统计致死率; 选取不同时间处理的菌落进行摇瓶筛选, 统计正负突变率(表1)。

由表1可知, 随着处理时间的延长, 致死率逐渐升

表1 等离子处理效果的考察

Tab. 1 Streptomyces pulverzeus treated by ARTP

ARTP处理时间/s	致死率/%	正变率/%	负变率/%
0	0	1.6	6.8
15	60.6	2.7	14.3
20	72.3	7.9	15.7
25	87.6	14.3	13.6
30	98.2	9.8	15.4
35	99.6	3.7	21.2
40	100.0	-	-

注: “-”代表无法统计

高; ARTP处理25s时, 正变率最高(产量提高10%以上称为正变), 因此确定25s作为ARTP的最佳处理时间。

2.3 链霉素抗性实验

在链霉素浓度为0~5mg/L范围内的平皿中观察菌落的存活情况(表2)。从表2可知, 随链霉素浓度的增加, 存活菌落逐渐变少。当链霉素的浓度达到4mg/L时, 抗性平板上无菌落生长。由此确定4mg/L链霉素浓度为抗性筛选的浓度。

2.4 等离子诱变复合链霉素抗性突变株筛选

两轮ARTP复合链霉素抗性处理后, 摇瓶筛选共计398株。ARTP复合链霉素抗性处理后, 正突变率达到28.9%, 比单纯的ARTP处理有了显著提高(表3)。复筛后获得一株高产菌株ZH-6-78, 其转化率比

表2 链霉素对ZH-4-35菌株生长的影响

Tab. 2 Growth of the strain ZH-4-35 grown on plate with streptomycin

链霉素浓度/(mg/L)	致死率/%
0	0
1	55.3
2	86.1
3	99.2
4	100
5	100

出发菌提高26.7%。高产菌与出发菌的菌落特征及代谢pH比较见表4。新菌株单菌落皱褶较多，表面颜色变浅，孢子量有所下降；代谢pH在补料前和放罐时有所下降。

2.5 高产菌的传代稳定性实验

对新菌株进行斜面传代实验，摇瓶验证其传代

表3 ARTP复合链霉素抗性处理结果

Tab. 3 Result of ARTP combined with streptomycin resistance selection

处理方法	致死率/%	正突变率/%
ARTP	87.6	14.3
ARTP+链霉素	93.2	28.9

表4 菌落特征及代谢特征比较

Tab. 4 Compare of colony and metabolic characters of mutants

项目	ZH-4-35	ZH-6-78
菌落形态	皱褶少	皱褶较多
孢子量	丰富	较丰富
菌落表面颜色	灰黑色	灰白色
补料前pH	6.15	5.80
发酵放瓶pH	5.85	5.50

稳定性。连续传代5次，F5代菌株的转化效率也很稳定，说明新菌株具有稳定的遗传特征，适合工业化生产(表5)。

2.6 转化条件的优化

表5 菌株ZH-6-78传代对ECB转化率的影响

Tab. 5 Conversion of ECB of strain ZH-6-78 after 5 passages

传代数	相对发酵转化率/%
F1	100.0
F2	101.3
F3	99.7
F4	101.0
F5	98.1

2.6.1 底物ECB助溶剂、泡敌对转化率的影响

根据ECB的溶解特性，比较了助溶剂甲醇、乙醇浓度对转化效率的影响。以能够充分溶解补加的底物，并且不会对脱酰基酶有负效应为目的。结果显示，发酵液中溶剂的含量达到7.5%时无论甲醇、乙醇都对转化率有负效应。5%时无论甲醇、乙醇对转化率均无影响。因此溶剂含量控制在5%以下为最优。考虑工业生产的安全性，选择乙醇作为助溶剂。基于75%的乙醇有灭菌消毒的作用，实验用75%的酒精对底物进行溶解，效果良好，同时还能对ECB底物有灭菌消毒的作用，减少底物补加对发酵

瓶引入的染菌风险。实验还研究了控制发酵泡沫的泡敌的添加对转化率的影响，结果显示添加3%泡敌对转化率影响不明显(表6)。

2.6.2 转化温度的考察

实验考察了补加底物后，不同的转化温度，不

表6 甲醇、乙醇、泡敌对ECB的转化率的影响

Tab. 6 Influence of Methanol、Ethanol and anti-foam on ECB conversion

	甲醇 5%	甲醇 7.5%	乙醇 5%	乙醇 7.5%	泡敌 3%	无泡 敌
转化率/%	83	74	80	73	80	81

同转化时间对转化率的影响。结果显示，随着温度的提高，最高转化率也略有提高，达到最高转化率的转化时间逐渐缩短。当转化温度为35℃时，24h达到最高的转化率。温度再提升后，最高转化率呈下降趋势。因此确认全细胞脱酰基酶的最佳反应温度为35℃(表7)。

表7 新菌株在不同转化温度和转化时间的转化率

Tab. 7 The conversions rate in different biotransformation temperatures and time of the new strain

转化时间/h	转化温度/℃					
	25	28	30	35	37	40
8	8	11	22	36	42	29
16	15	17	38	65	68	44
24	29	36	60	90	87	54
32	40	48	71	89	85	47
40	44	57	83	82	72	37
48	48	80	79	73	67	30
56	54	77	74	60	48	18
64	59	76	65	49	32	6
72	56	74	55	36	25	0

2.7 50L罐小试验证

新菌种ZH-6-78采用新工艺，二级种子进行50L罐小试验证，进罐工艺见“1.2.5”项。发酵第4d流加75%乙醇溶解的转化底物，罐温由28℃提升到35℃，转化24h后放罐，HPLC检测ECBN。连续3批的转化率分别为89%、85%和91%，平均值比出发菌原工艺，提高了47.2%。新菌种新工艺与出发菌原工艺的发酵参数比较，表现为菌丝量提高了20%，补底物前即放罐的pH有所下降，与摇瓶变化表现一致。

3 讨论

等离子诱变育种的原理是等离子体中的活性粒子作用于微生物，能够使微生物细胞壁或膜的结构

及通透性改变, 并引起基因损伤, 进而使微生物基因序列及其代谢网络显著变化, 最终导致微生物产生突变。等离子诱变育种在多个工业品种上普遍应用, 取得了良好的效果^[7-8]。链霉素抗性突变株的筛选, 具有广谱性, 正突变率高和增产百分率高的特点, 因此不失为首选的抗生素^[9]。链霉素抗性作为推理育种的选择压力, 核糖体工程的建立在抗生素及免疫抑制剂的产生菌上得到成功应用^[10-11], 我们首次把等离子诱变结合链霉素抗性应用到生物转化酶工程上, 取得很好的效果。

本研究利用等离子体诱变结合链霉素抗性进行推理育种, 增大了获得高产突变株的概率, 大大缩短了菌种选育的工作周期, 同时取得良好效果, 两轮次育种就获得转化率提高了26.7%的新菌株, 提高显著。对全细胞转化的发酵培养基成分, 底物溶剂及温度等进行了优化, 获得了新工艺。新菌种在新工艺下, 转化率达到90%, 比原始条件提高50%, 50L小罐3批验证成功, 为工业化生产奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] Sucher A J, Chahine E B, Balcer H E. Echinocandins: The newest class of antifungals[J]. *Ann Pharmacother*, 2009, 43(10): 1647-1657.
- [2] Pound M W, Townsend M L, Drew R H. Echinocandin pharmacodynamics: Review and clinical implications[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, (65): 1108-1118.
- [3] 穆云龙, 丁彦博, 蔡超靖, 等. 棘白菌素B脱酰基酶产生菌N07W61的分类鉴定[J]. *河北师范大学学报*, 2014, 38(6): 622-627.
- [4] 邹树平, 廖思行, 牛坤, 等. 棘白霉素B脱酰基酶工程菌的构建及酶学性质研究[J]. *浙江工业大学学报*, 2016, 44(1): 99-103.
- [5] 崔建卫, 邹树平, 郑裕国. 棘白菌素B脱酰基酶的研究[J]. *生物技术通讯*, 2016, 27(4): 592-595.
- [6] 王耀耀, 朱研研, 付美红, 等. 那他霉素产生菌的ARTP诱变育种及发酵工艺优化[J]. *中国医药工业杂志*, 2016, 47(8): 999-1004.
- [7] 田萍萍, 曹鹏, 常传友, 等. 阿维菌素生产菌的常压室温等离子体诱变育种及培养基优化[J]. *微生物学通报*, 2017, 27(1): 150-160.
- [8] 秦婷婷, 冯昆达, 张涛, 等. 原生质体诱变筛选高产组莫康定B₀的菌株[J]. *中国抗生素杂志*, 2016, 41(3): 212-217.
- [9] 孙玉雯, 崔承彬. 抗生素抗性筛选在微生物菌株选育中的作用[J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35(3): 213-217.
- [10] 陈宏, 张祝兰, 孙菲, 等. 链霉素抗性突变理性筛选新霉素高产菌株[J]. *生物技术通报*, 2014, 12: 173-176.
- [11] 袁晖, 张新宜, 王欣荣, 等. 抗性突变他克莫司高产菌株的选育[J]. *微生物学杂志*, 2014, 34(5): 81-86.