

阿扎霉素 B 产生菌吸水链霉菌 NND-52 的诱变筛选*

王世梅 黄为一 崔凤元

(南京农业大学微生物学系 南京 210095)

摘要:用紫外线,紫外线加氯化锂(LiCl)、吖啶橙 3 种诱变方式对阿扎霉素(Azalomycin)B 产生菌 *Streptomyces hygroscopicus* NND-52 菌株进行诱变处理,确定了它们的最佳诱变剂量,获得了数株 Azalomycin B 产量较出发菌株提高 3 倍以上的高产菌株,编号 A13 的菌株摇瓶产量达 1100mg/L,且传代稳定。经过对 3 种诱变方式的比较,发现后两种诱变方式对产量的提高更为有效。

关键词:吸水链霉菌,诱变,阿扎霉素 B

中图分类号:Q939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-064-05

MUTAGENESIS OF *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* NND-52 PRODUCING AZALOMYCIN B

WANG Shi-Mei HUANG Wei-Yi CUI Feng-Yuan

(Department of Microbiology Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

Abstract: *Streptomyces hygroscopicus* NND-52 producing Azalomycin B was treated with UV, UV + LiCl, acridine orange, the best treatment dose was determined. The yields of several strains which were obtained were more than three times that of CK, and the yield of strain A13 was 1100mg/L, they were stable. Through comparing the treating methods, it was shown that the later two methods were more effective

Key words: *Streptomyces hygroscopicus* NND-52, Mutagenesis, Azalomycin B

我们从江苏省宿迁土壤中分离到一株放线菌,经鉴定为吸水链霉菌,菌株代号为 NND-52,经研究发现该菌株产生的分泌型抗生素为除秀霉素 A^[1],近期研究发现胞内积累的抗生物质为阿扎霉素 B^[2]。1959 年 Arcamone 等人从生孢链霉菌中首次分离得到阿扎霉素 B,命名 Elaiophylin^[3],后在其他链霉菌中也相继发现,1960 年重新定名阿扎霉素 B。1981 年确定其化学结构,是一个具有双重旋转对称的不饱和的非典型大环内酯抗生素^[4]。阿扎霉素 B 为白色针状晶体,溶于甲醇、氯仿、乙醇,微溶于丙酮、乙酸乙酯,不溶于苯、醚、水。其生物学功能有:(1)抑制 G⁺ 细菌,包括一些临床致病菌^[2]。(2)抗线虫^[5],口服 5.0mg/kg 对于感染捻转血毛线虫和蛇毛圆线虫的羊羔治愈率分别达 89.3% 和 73.8%,与化学药剂相比,安全性高,治疗效果好,进一步扩大研究范围,可能为治疗其它线虫和寄生虫提供新型药物。(3)免疫抑制^[6],其强烈地抑制脂多糖介导的 B 细胞的敏化和由 NO 刺激的鼠淋巴细胞的激增,可能成为强的免疫抑制剂。(4)促进反刍动物生长^[7],实验表明其效果高于聚醚类的拉沙里菌素。(5)专一性抑制 P-ATPase,可用来判断 ATPase 的类型^[8]。阿扎霉素

* 高等学校博士点基金资助项目

收稿日期:1999-08-20,修回日期:2000-03-31

B具有良好的应用前景,目前国际上 Azalomycin B 的研究处于初级阶段,尚未进行工业化生产,提高 NND-52 菌株产阿扎霉素 B 的能力,获得高产稳定的菌株,将为进一步的应用研究提供条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:吸水链霉菌 NND-52 菌株^[1](本实验室保藏)

1.1.2 培养基:斜面、平板培养基:淀粉,黄豆粉,酵母膏,琼脂;种子培养基:葡萄糖,黄豆粉,酵母膏, CaCO₃;发酵培养基:葡萄糖,淀粉,黄豆粉,蛋白胨,酵母膏,无机盐等。

1.2 方法

1.2.1 制备单孢子悬液:取 NND-52 菌株新鲜斜面,以生理盐水制成孢子悬液,脱脂棉过滤,收集单孢子悬液,调整其浓度为 10⁷ 个/mL。

1.2.2 诱变处理:(1)紫外线诱变:系列稀释孢子悬液,取不同浓度的孢子,置于 15W 的紫外灯下照射,距离 30cm,时间分别为 5、10、15、20、30、40、50、70、100s,稀释涂皿,避光培养。(2)UV+LiCl 复合诱变:分别吸取 10⁻³ 孢子悬液 0.1mL 涂布于含 0.1% ~ 0.6% LiCl 的平板上,在紫外灯下分别照射 10、15、20、30s。(3)吡啶橙诱变:将一定浓度的孢子悬液分别涂布在含有 1、3、5、7、10、15μg/mL 吡啶橙的平板上。28℃ 培养,菌落长出后,计数,求各处理组的致死率。致死率达 80% 以上的平板上各自挑取有代表性的菌落,转接斜面,培养后备用。

1.2.3 Azalomycin B 含量测定^[2]:Azalomycin B 的乙醇溶液,经紫外扫描,在 λ=253nm 处有一最大吸收峰, E_{1%¹cm} = 625, 根据朗伯-比尔定律 A = abc, C (%) = A/625, 据此换算出 C (mg/L) = A/0.0625。将上述挑出的 3 组菌株上摇瓶发酵。每株取一环孢子接入装液量为 30/250mL 的三角瓶中, 28℃, 96h。取一定体积的发酵液,离心,去上清得菌体,加适量无水乙醇浸泡菌体 24 h,离心取酯相。并用乙醇适当稀释,测定其在 λ=253nm 处的吸光度 A 值,换算出发酵液中 Azalomycin B 的含量 C (mg/L)。正突变的高产菌株经两次摇瓶重复试验获得一致结果后作稳定性传代。

2 结果

2.1 各诱变剂的剂量与致死率的关系

2.1.1 UV 照射与致死率的关系:见图 1。

从图 1 可见:紫外线的照射时间与 NND-52 菌株的致死率之间存在明显的剂量效应关系,随着照射时间的延长致死率逐渐提高,照射 20s 时致死率超过 80%,照射超过 70s 致死率 100%,故单一用 UV 照射时间控制在 20~50s 之间,可达到预期的致死率。

2.1.2 UV+LiCl 复合诱变对菌株的影响:见表

表 1 UV+LiCl 复合处理对菌株的致死率

LiCl (%)	菌株的致死率 (%)			
	UV 照射时间 (s)			
	10	15	20	30
0.1	77.9	85.5	91.6	100
0.2	80.9	83.2	92.5	100
0.3	78.9	84.6	91.6	100
0.4	77.8	83.5	90.9	100
0.5	96.3	98.4	99.7	100
0.6	97.3	98.8	99.6	100

应用 UV+LiCl 复合处理时, NND-52 菌株对紫外线更加敏感。用同一浓度 LiCl 处理与 UV 照射时间存在剂量效应,照射 30s 致死率 100%。LiCl 浓度为 0.1% ~ 0.4% 时,用 UV 照射相同的时间,致死率相差不大,但当 LiCl 含量超过 0.5%。无论 UV 照射多久,致死率均在 90% 以上而且全部分为光秃型菌落(光秃型菌落属负突变,后面论述)。总的来看 NND-52 菌株与 UV+LiCl 联合

诱变的剂量不存在显著的效应关系,可能是两种诱变剂交互作用所致。LiCl 本身没有诱变作用,但在抗生素产生菌的诱变育种中,与一些诱变因子具有协同作用。用 LiCl 和紫外线复合处理较单独使用紫外线诱变处理,正突变率增加,且发生回复突变的几率小。这种复合诱变效应,已在土霉素、麦迪霉素、西索米星等产生菌的诱变育种中得到应用^[9]。实验中发现 NND-52 菌株只能适应 0.1%~0.3% 的 LiCl 剂量,并且取得了较好的处理效果。故作者认为 UV+LiCl 联合诱变处理时,应以 LiCl 低浓度,UV 短时间照射为好。理想的剂量为:0.1%~0.3%LiCl,UV10~15s。

2.1.3 不同浓度的吡啶橙对菌株 NND-52 的影响:见图 2。

从图 2 可见吡啶橙处理剂量大于 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时致死率超过 80%,应属于筛选对象,此时绝大部分菌落为光秃型属负突变,故应取 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度作为诱变处理剂量。

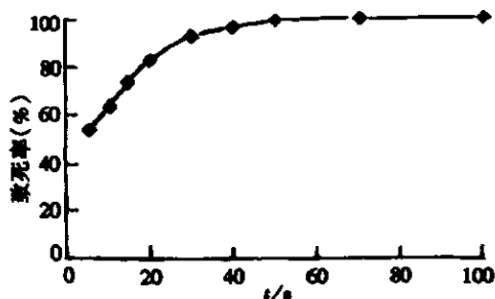


图 1 UV 处理的致死率

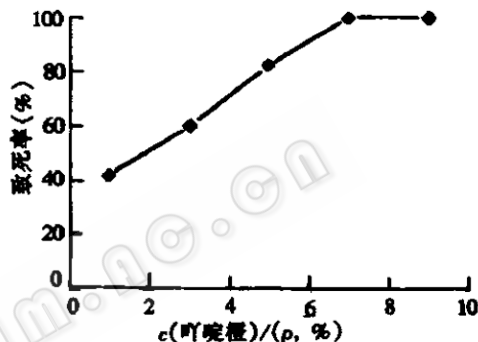


图 2 吡啶橙处理 NND-52 菌株的致死率

2.2 诱变后菌落形态的变异

经紫外线照射形成的菌落形态与出发菌株相近,菌落突起,孢子丰富,边缘整齐,基丝褐色,直径 1mm~3mm。经 UV+LiCl 复合处理和吡啶橙处理后形成的菌落,经显微镜观察有 3 种类型: I 同出发菌株相近。II 菌落扁平型,表面多褶皱,孢子和气生菌丝稀少,基丝颜色浅,直径小于 1mm,边缘不整齐。III 光秃型,菌落凸起,气生菌丝稀少,基丝颜色浅,菌落边缘整齐,表面光滑,不产孢子,直径 1mm~2mm,这种类型菌落出现的比率随 LiCl、UV、吡啶橙剂量加大而增加。将各种类型的菌落转接平板上,发现 I 型菌落则生长良好,II、III 型菌落基本不生长。诱变后产生的 II、III 型菌落,可能属基因型变异,这种变异的基因含有控制孢子形成的机制,陈代杰等^[10]认为,具有气生菌丝的抗生素产生菌负突变型菌落一般特征为:光秃型;生长势衰退;或生长势过于旺盛,直径特别大,孢子量特别丰富,故作者认为菌落扁平型、光秃型属负突变。

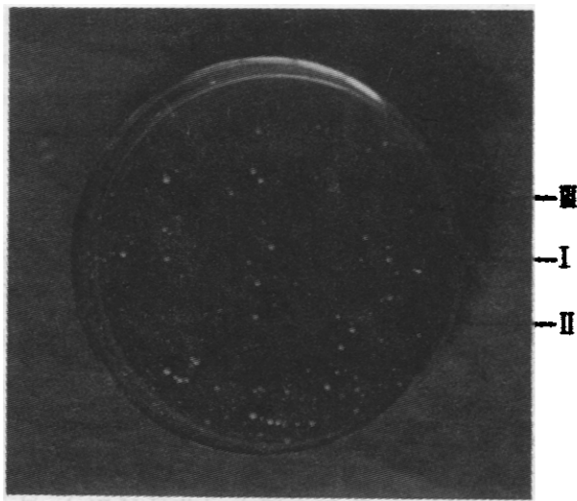


图 3 诱变后 3 种菌落的形态
3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吡啶橙处理

变异后的菌落如图3。

2.3 筛选结果

3种方式诱变处理后共挑选菌落830个,其中紫外线诱变,UV+LiCl联合诱变,吡啶橙处理分别挑选菌落270,260,300个。出发菌株产量在240mg/L,UV诱变后产量大于300mg/L的正突变株有8株,最高达453mg/L,UV+LiCl复合处理,正突变株产量大于500mg/L有6株,且最高达668mg/L,吡啶橙诱变产量大于500mg/L的正突变株有14株,最高达1100mg/L,3组处理各选6株产量最高的正突变株列于表2。

从表2中可见紫外线诱变获得的正突变株产量虽然较出发菌株提高80%以上,但产量仍然不高。UV+LiCl联合诱变获得的正突变株菌株的产量较出发菌株的产量均提高100%以上,吡啶橙处理正突变菌株较多,其中产量超过750mg/L的有7株,最高产量达到了1100mg/L,A7,A13传代3、4、5次后测产量均在1000mg/L左右,A7传到第9代产量900mg/L,A13传到第9代产量1030mg/L,仍较稳定。从表2可以看出3种诱变方式对NND-52菌株产量的提高都有一定的效果,但后两种方式产量提高幅度更大。

3 讨论

常规诱变育种的方法简便有效,至今仍是工业微生物菌种选育的主要手段,本实验中采用紫外线照射,UV+LiCl联合诱变,吡啶橙诱变处理3种方式对菌株诱变,从以上结果看出NND-52菌株非常娇嫩,对紫外线,LiCl,吡啶橙很敏感,一般文献报道放线菌诱变育种紫外线照射时间2min左右,LiCl剂量为0.5%,吡啶橙剂量为20 μ g/mL以上,而NND-52菌株紫外线照射时间20s,吡啶剂量大于5 μ g/mL时致死率已超过80%,并且大部分菌落为光秃型。本实验室用A13菌株进行10L自控发酵罐发酵,装液量70%,28 $^{\circ}$ C,转速230r/min,通气量8L/min,72h,发酵产量达1300mg/L,500L发酵罐发酵,产量达1400mg/L,比摇瓶产量高出27%,探求原因,可能是发酵罐通气量大,溶解氧高,菌体生长快,产素率高所致。本实验获得了较理想的诱变剂量,为该菌株以后的诱变筛选工作提供了条件。

参 考 文 献

- [1] 王世梅,黄为一,武济民. 南京农业大学学报,1994,17(4):54~59.
- [2] 抗菌素生物理化特性编写组抗菌素生物理化特性(第一分册). 北京:人民卫生出版社,1977,526~527.
- [3] Arcamone F, Bertazzoli C, Ghione M. J. Antibio, 1959, 7:46~51.
- [4] Piedler H, Wernor W, Zaner H J. Antibio, 1981, 34:1107~1118.
- [5] Patent EP-0297523, Biotechnology Abstracts, 1989, 8(7):89~03872.
- [6] Lee S, Hong S D, Kim M S, et al. J. Microbiol. Biotechnol, 1997, 7(4):278~281.
- [7] Liu C M, Westley J. J. Antibio, 1993, 46(20):350~352.
- [8] Bwleznay Z, Zachowski A, Devaux P F. Euro. J. of Biochem. ,1997, 243:59~65.
- [9] 朱坚屏,倪雍富,荣洁. 中国抗和素杂志,1998,23(2):129~132.
- [10] 陈代杰,朱宝泉. 工业微生物菌种选育与发酵控制技术. 上海:上海科学技术文献出版社,1995,124~125.

表2 3种方式诱变获得正突变菌株的产量

UV 诱变		LiCl+UV 联合诱变		吡啶橙诱变	
菌株号	产量 (mg/L)	菌株号	产量 (mg/L)	菌株号	产量 (mg/L)
U1	453	L1	618	A3	746
U2	437	L2	584	A4	761
U3	346	L3	568	A7	1050
U5	435	L4	618	A8	851
U8	427	L6	668	A11	782
U9	403	L7	653	A13	1100
CK	240	CK	240	CK	240