

新型抗生素 AGPM 产生菌藤黄灰链霉菌的诱变育种*

张建勇 牛晋阳 陈贵斌 元英进** 胡宗定

(天津大学化工学院制药工程系 天津 300072)

摘要: 从土壤中分离得到一株藤黄灰链霉菌的新菌株 099, 该菌株能产生一种具有显著抗肿瘤活性的新型抗生素 AGPM。产生菌经紫外线单因子诱变、紫外线加氯化锂 (LiCl) 复合诱变等两种诱变方式诱变处理后, 其 AGPM 产量达到了 $18.7 \mu\text{g}/\text{mL}$, 较出发菌株提高了 1.2 倍。研究发现最优的紫外辐射时间和氯化锂浓度分别是 30 ~ 60s 和 0.05 ~ 0.09 mol/L, 并且由于氯化锂的协同效应, 菌株在经氯化锂处理后, 对紫外线的敏感性明显增强了。30 L 发酵罐发酵试验表明, 利用高产突变株发酵, AGPM 产量能达到 $18.5 \mu\text{g}/\text{mL}$; 而利用出发菌株发酵, AGPM 产量仅为 $8.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词: 藤黄灰链霉菌, 抗肿瘤抗生素, 紫外线, 协同效应

中图分类号: Q939.92 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 02-0024-05

MUTAGENICITY OF *STREPTOMYCES REGENSIS* PRODUCING A NOVEL ANTIBIOTICS AGPM

ZHANG Jian-Yong NIU Jin-Yang CHEN Gui-Bin YUAN Ying-Jin HU Zong-Ding

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract: 099 of *Streptomyces regensis* was isolated from soil to produce a novel antibiotic AGPM of a strong biological activity of antitumor. The strain was irradiated by UV after treatment with LiCl to give a AGPM yield of $1.87 \times 10^{-2} \text{ mg}$

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863”项目) (No. 2001AA214081)

Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development (No. 2001AA214081)

** 联系人 Tel: (022) 27401149, Fax: (022) 27403888, E-mail: yjyuan@public.tpt.tj.cn

收稿日期: 2002-05-09, 修回日期: 2002-06-31

mL^{-1} , 2.2 times higher than that of the original strain. The optimum UV irradiation time was 30~60 s and the best LiCl concentration was 0.05~0.09 mol/L. The fermentation of AGPM was conducted in a 30 L stirred tank, the maximum yield of AGPM using the mutants reached $1.85 \times 10^2 \text{ mg mL}^{-1}$, while that using the original strain was only $0.85 \times 10^2 \text{ mg mL}^{-1}$.

Key words: *Streptomyces regensis*, Antitumor antibiotics, UV irradiation, Synergism

在利用化学疗法治疗肿瘤中,抗肿瘤抗生素起了举足轻重的作用,如阿霉素,道诺霉素^[1],链黑菌素^[2,3]。从土壤中筛选得到一株放线菌,经鉴定为藤黄灰链霉菌编号为099,研究发现该菌株能产生一种新型抗生素AGPM。对AGPM的抗肿瘤活性研究表明,AGPM对小鼠白血病细胞L1210,非小细胞肺癌细胞PG-49的细胞毒性 IC_{50} 值分别小于 10^{-11} mol/L 、 10^{-12} mol/L ,比同条件下测定紫杉醇和紫杉替尔的活性高出10~100倍^[4];具有显著抗肿瘤活性。然而,由土壤中筛选得到出发菌株的抗生素生产能力是很低的,因此,为了开展进一步的研究,有必要提高微生物生产抗生素的能力。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株:藤黄灰链霉菌099菌株^[4]。

1.1.2 培养基:固体培养基,可溶性淀粉20.0 g,葡萄糖5.0 g,蛋白胨2.0 g,玉米浆2.0 mL, K_2HPO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g,琼脂20.0 g,蒸馏水定容至1,000 mL。种子培养基:可溶性淀粉40.0 g,葡萄糖5.0 g,蛋白胨4.0 g,玉米浆2.0 mL, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g,蒸馏水定容至1,000 mL。发酵培养基:可溶性淀粉40.0 g,葡萄糖5.0 g,黄豆饼粉16 g,玉米浆2.0 mL, K_2HPO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g,淀粉酶0.05 g,水定容至1,000 mL。灭菌前,调pH到6.5, $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 灭菌20 min。

1.2 方 法

1.2.1 培养方法:菌株以孢子悬液形式保存于 -20°C 。每次使用时,将孢子悬液涂布于琼脂平板上, 28°C 恒温培养7~10 d,以使孢子长出来。将5 mL无菌水倒于平板上,轻轻刮取孢子。离心收集孢子,然后用蒸馏水洗涤两次。接种前,将孢子置于超声浴中10 min。孢子浓度调到 2×10^9 个/mL。0.5 mL孢子悬液接于50 mL培养基中。250 mL摇瓶装50 mL培养基,于 28°C , 210 r/min摇床上恒温培养。

发酵在30 L德国贝朗发酵罐中进行,装液量20 L。 $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 灭菌25 min。消泡剂加入量为0.01%。发酵条件:温度, 28°C ; 搅拌转速, 500 r/min; 通气量, 1.0 vvm^{-1} ; 发酵时间, 96 h。

1.2.2 细胞干重:生物量用称重法测定。取30 mL发酵液, 4,800 r/min离心10 min,上清液冷藏备用,细胞沉淀用去离子水洗涤,离心收集恒温干燥(105°C)至恒重,干燥器中冷却,然后称重。

1.2.3 诱变处理:(1)诱变处理前,孢子接于50 mL培养基中,然后 28°C , 210 r/min摇床恒温培养6 h。然后,离心收集孢子,蒸馏水洗涤2次。然后孢子浓度调到 10^8 个/mL。吸取孢子悬浮液10 mL于直径为9 cm内有磁力搅拌子的无菌平皿中,将平皿置于磁力搅拌器上,然后于15 W紫外灯下,距离30 cm照射,进行平皿表面消毒。一定时

间后，打开皿盖，并开启磁力搅拌器，进行诱变处理，处理时间分别为 0、15、30、45、60、90 s，处理完毕后，稀释涂平板，避光培养。(2) 紫外线 (UV) + LiCl 复合诱变：同前法取得孢子后，将孢子分别重新悬浮于经灭菌的 0.02 ~ 0.12 mol/L LiCl 溶液中，浸泡 2 h 后孢子悬液再经紫外诱变，稀释后，涂平板，避光培养。

1.2.4 高效液相色谱 (HPLC) 法测定发酵液中 AGPM 含量：取 10 mL 发酵液调 pH 到 7.0，然后加入 3 mL 丙酮，并用 5 mL 乙酸乙酯在 20 mL 萃取器中萃取 3 次。合并乙酸乙酯萃取液，然后蒸发掉溶剂，残余物溶于 1 mL CH₃OH 中。即得到样品 10 倍浓缩液。

采用 Waters 液相色谱仪分析，色谱柱为 Hypersil®，ODS2，5μm，250 × 4.6mm。流动相为甲醇：水：离子对试剂 = 72：25.5：2.5，流速为 1mL/min。紫外检测器检测，检测波长为 330 nm。

2 结果与讨论

2.1 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：从图 1 可见，紫外线的处理时间与藤黄灰链霉菌 099

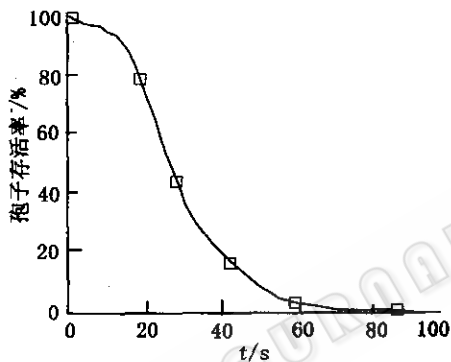


图 1 UV 辐射与致死率的关系

菌株的致死率之间存在明显的剂量效应关系，随着紫外处理时间的延长，存活率逐渐降低。紫外分别处理 30、45s 时，存活率分别低于了 40% 和 20%。处理 90s 时，存活率降为 0。对紫外诱变育种的研究表明，正变较多的出现在偏底的剂量中，而负变则较多的出现在偏高的剂量中。因此，紫外线单因素处理的时间控制在 30 ~ 60s 之间，可达到预期的致死率。

2.1.2 UV + LiCl 复合诱变对藤黄灰链霉菌 099 菌株的影响：表 1 为在不同浓度 LiCl 协同作用下，不同的 UV 照射时间下菌株的致死率。由表

表 1 UV + LiCl 复合诱变对菌株的致死率

LiCl (mol/L)	菌株的致死率 (%)			
	UV 照射时间 (s)			
	20	30	40	50
0.02	78.1	85.6	92.0	100
0.05	79.8	84.1	92.7	100
0.07	79.1	85.0	91.3	100
0.09	78.2	84.1	90.5	100
0.12	97.1	98.5	99.2	100

中数据不难发现，孢子经 LiCl 浸泡后，对紫外线的敏感性明显增加。在 LiCl 浓度低于 0.12 mol/L 时，同一 LiCl 浓度处理与 UV 照射时间存在明显剂量效应，随着照射时间延长，致死率也逐步增加，UV 照射 50s 时，致死率达到 100%；相同 UV 照射时间，不同 LiCl 浓度时，孢子的致死率相差不大。但当 LiCl 浓度达 0.12

mol/L 时，不管 UV 照射时间多长，孢子致死率都在 95% 以上。LiCl 本身没有诱变作用，但在诱变育种中，与一些诱变因子具有协同作用^[5]。实验中发现，LiCl + UV 复合诱变处理较单一 UV 诱变处理，正突变率增加，且很少发生回复突变；当菌株经 0.05 ~ 0.09 mol/L LiCl 浸泡后，再经 UV 诱变处理不超过 30s 可取得较好诱变效果。

2.2 AGPM 高产菌株的选育

以藤黄灰链霉菌 099 为出发菌株，经 UV，UV + LiCl 诱变方式诱变处理后，选育出一株 AGPM 高产株，其摇瓶产量可达 18.7 μg/mL。较出发菌株提高了 1.2 倍。表 2 为分

别经紫外诱变和紫外线加氯化锂复合诱变结果。可见,菌株经紫外诱变处理后,生产能力提高了30.6%;而经复合诱变处理后,生产能力提高了1.2倍,从而体现了复合诱变在诱变育种上的优势。

2.3 高产突变株的传代稳定性实验

将菌株斜面传代,然后接入发酵培养基中,28℃震荡培养96h,取发酵液HPLC分析。表3为高产突变株的传代稳定性实验,结果表明,该菌株具有良好的传代稳定性,AGPM产量稳定在18.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右。

2.4 菌株生长和抗生素AGPM生产间的关系

摇瓶分批发酵生物质和AGPM生产曲线示于图2。生长曲线显示了传统的3个生长阶段:生长阶段、静止阶段和衰亡阶段。在生长阶段,有微量AGPM产生。在静止阶段和衰亡阶段,AGPM被过量合成。最大生物量和AGPM含量分别达到了8.47 mg/mL和18.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这可能是在生长阶段,AGPM合成酶开始表达,但其活性受到抑制,而在生长阶段转为静止阶段时,AGPM合成酶的抑制得到解除。抗生素合成酶的活性在生长阶段受到抑制的情况见于链霉胍、泰乐菌素、放线菌素和短杆菌肽S的生物合成中^[6]。

2.5 出发菌株和高产突变株在30 L发酵罐中的发酵比较

出发菌株和高产突变株的发酵过程示于图3和图4中。由图3,4比较可见,在经诱变处理后,AGPM的含量明显提高,并且在生长阶段突变株的生长要快于出发菌株的生长。最大生长速率分别是0.144 mg/(mL·h)和0.197 mg/(mL·h);最大生物量均在8.0 mg/mL左右,而AGPM的最大产量分别为8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和18.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;并且和出发菌株相比,突变株的AGPM产生时间略有提前。

3 结论

随着分子生物学方法的不断进步,近年来出现了一些新的菌种选育的方法,比如,重组DNA技术。但利用传统的理化因子诱变育种的方法,因其具有简单、快速、有效等优点^[7],至今仍被广泛使用。本文对UV、UV + LiCl对新型抗生素产生菌藤黄灰链霉

表2 AGPM高产突变株的选育

诱变方法	AGPM产量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
未经诱变处理	8.5
紫外诱变	11.1
紫外线加氯化锂诱变	18.7

表3 高产突变株遗传稳定性试验

代数	1	2	3	4	5	6
AGPM产量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	18.4	18.7	18.8	18.6	18.5	18.6

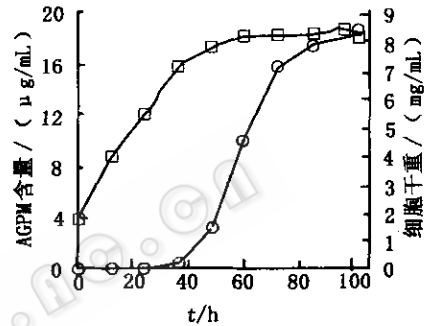


图2 菌株生长和抗生素合成的关系
□细胞干重, ○AGPM产量

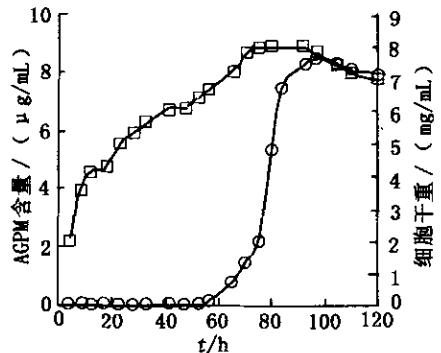


图3 出发菌株的AGPM产量和生长间的关系
□细胞干重, ○AGPM产量

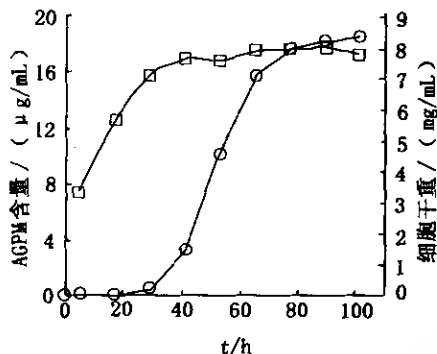


图4 高产突变株的AGPM产量和生长间的关系

□ 细胞干重, ○ AGPM 产量

菌 099 菌株的诱变效果进行了研究。发现, 在 LiCl 的协同效应下, 菌株对 UV 的敏感性大大增加; 并且在 LiCl 浓度低于 0.07 mol/L, 较低的诱变剂量处理下, 菌株可获得较为理想的诱变效果, 产量提高幅度较大。菌株经一系列诱变处理后, 得到一株高产菌株, 其 AGPM 产量最高可达 18.8 $\mu\text{g/mL}$, 经传代实验表明, 其产量可稳定在 18.6 $\mu\text{g/mL}$ 左右, 比出发菌株 AGPM 产量有很大提高。

参 考 文 献

- [1] Barbieri A, Matzanke B F, Di Liegro I, *et al.* J Inorg Biochem, 1995, 59: 201.
- [2] Alejandro D B, Martha S B. Mutation Research, 2001, 488: 25 ~ 37.
- [3] Helena S S, Roberto E C, Tran L, *et al.* Biochimica Et Biophysica Acta, 1997, 1335: 305 ~ 314.
- [4] 元英进, 石炳兴, 胡宗定, 等. 发明专利申请公开说明书, 2001, 01141443. X.
- [5] 袁琳. 宁夏医学杂志, 2001, 22 (6): 340 ~ 341.
- [6] Aharonow Y. Ann Rev Microbiol, 1980, 34: 209 ~ 233.
- [7] William R S. Metabolic Engineering, 2001, 3: 4 ~ 14.