

产灵菌红素沙雷氏菌的诱变育种

陶金莉¹ 沈亚领^{1*} 魏东芝^{1*} 周劲松² 王梁华³

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 生物化学研究所 上海 200237)¹

(上海海尔生物技术有限公司 上海 200336)² (解放军第二军医大学 200433)³

摘要: 通过紫外线-氯化锂复合处理灵菌红素生产菌沙雷氏菌 (*Serratia* sp.) W 0206, 用高浓度葡萄糖为碳源的选择性平板定向筛选抗葡萄糖分解代谢物阻遏的高产株, 筛得高产突变株 B-20, 相对于原始菌株, B-20 摇瓶发酵灵菌红素产量提高了 3 倍, 5 L 反应器上的产量提高了 63%。

关键词: 灵菌红素, 沙雷氏菌, 诱变, 紫外

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0045-04

MUTAGENICITY OF *SERRATIA* SP. W0206 PRODUCING PRODIGIOSIN

TAO Jin-Li¹ SHEN Ya-Ling¹ WEI Dong-Zhi¹ ZHOU Jing-Song² WANG Liang-Hua³

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237)¹

(Shanghai Trail Bio-technical Co., Ltd., Shanghai 200336)² (Second Military Medical University, 200433)³

Abstract: A prodigiosin producing strain *Serratia* sp. W0206 was treated by UV-LiCl for increasing the yield of prodigiosin and the high concentration glucose was selected as the carbon source in selective plate to screen the high-production strain which can resisted the glucose catabolite repression. The results showed that the prodigiosin yield of the post-mutation strain B20 was 200% up in flask and 63% up in 5L bioreactor compared with the origin strain.

Key words: Prodigiosin, *Serratia* sp., Mutation, UV irradiation

灵菌红素族 (Prodigiosins) 是一个天然红色素家族的总称, 包括 Prodigiosin, Prodigiosin 25-C, Metacycloprodigiosin, Uncedlyprodigiosin 等, 可以由多种放线菌和细菌产生。这一族色素通常都具有甲氧基吡咯的骨架结构, 具有一定的免疫抑制性质。

近年, 研究人员的注意力都集中在由沙雷氏菌产生的灵菌红素潜在的临床应用上面。灵菌红素 (Prodigiosin) 是一种很有潜力的抗肿瘤药物, 灵菌红素对人结肠腺癌细胞 DLD-1 与 SW-620 及人胃癌细胞株 HGT-1 的实验均证实其对这些肿瘤细胞有诱导凋亡作用。美国国立癌症研究所 (NSI) 证实灵菌红素在平均 IC_{50} 为 $2.1 \mu\text{mol/L}$ 时对 57 种不同的人癌细胞有抗性作用, 在相同的作用剂量下, 对正常细胞无任何毒害作用。本实验以沙雷氏菌 W 0206 为出发菌株, 通过对氯化锂前处理过的细胞进行紫外诱变, 以含高浓度葡萄糖的培养基筛选得到一株灵菌红素的高产突变株 B-20。

1 材料与方法

1.1 菌株

沙雷氏菌 (*Serratia* sp.) W 0206, 本实验室保藏。

* 联系人

收稿日期: 2003-07-07, 修回日期: 2003-10-20

1.2 培养基

筛选培养基: 蛋白胨 10.0g, 酵母粉 10.0g, 葡萄糖 40.0g, 琼脂粉 20.0g, 水定容至 1.0L。摇瓶培养基: 种子培养基, 蛋白胨 2.0g, 酵母粉 1.0g, 硫酸铵 6.0g, 硫酸镁 0.5g, 磷酸氢二钾 10.0g, 氯化钠 0.5g, 水定容至 1.0L; 发酵培养基: 甘油 10.0g, 蛋白胨 10.0g, 水定容至 1.0L。灭菌前调 pH 到 7.2, 0.75×10^5 Pa 灭菌 20min。反应器培养基: 初始培养基, 葡萄糖 2.0g 蛋白胨 10.0g, 水定容至 1.0L; 过程流加 0.56mol/L 葡萄糖至对数生长期结束, 停滞期起流加 2.7mol/L 甘油诱导色素生成。

1.3 方法

1.3.1 菌种纯化: 平皿划线法。

1.3.2 氯化锂前处理过的菌株紫外诱变: 在无菌条件下挑取自然选育得单菌落于盛有无菌生理盐水(含 0.12mol/L 氯化锂)及玻璃珠的三角瓶中振荡 1h 制得单细胞悬液, 转入磁力搅拌器上装有转子的小烧杯中, 在距紫外灯 30cm 处搅拌照射 20s, 红光下或黑暗中涂布于初筛培养基上, 28℃ 培养 36h。

1.3.3 筛选方法: 取稀释后的单细胞悬浮液 0.1mL 涂布于初筛培养基平板上培养, 挑取红色且颜色较深单菌落传代两次后, 选取产红色素稳定株涂布于复筛培养基平板上, 同样挑取生长较快、红色且颜色较深单菌落。

1.3.4 摇瓶培养: 筛选出来的菌株在摇瓶种子培养基培养 9h 接入发酵培养基培养 24h (250mL 摇瓶装液 50mL, 28℃, 220r/min)。

1.3.5 反应器试验: 德国 B. Braun 5L 反应器, 装液 3L, 28℃, 通气量 3.0vvm^{-1} , 调整转速控制溶氧, 过程调 pH。

1.3.6 灵菌红素的检测: 灵菌红素溶于酸性甲醇溶液做全波长扫描, 得最大吸收波长为 535nm。选 535nm 作为检测波长, 分离得灵菌红素纯品作灵菌红素浓度- OD_{535} 标准曲线。1mL 发酵液加 9mL 酸性甲醇 (pH 3) 萃取后测 OD_{535} 值, 即可知色素产量。

2 结果与讨论

2.1 诱变剂量与致死率的关系

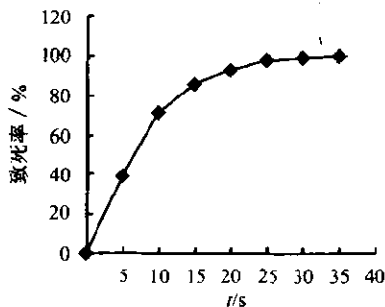


图1 紫外照射时间与致死率的关系

单细胞悬浮液置于紫外灯下照射不同时间, 得剂量与致死率的关系 (图 1), 由致死曲线选择照射时间为 20s。在该照射时间下添加适量氯化锂, 发现氯化锂加入对于致死率没有影响, 但正突变率有所提高。原因可能是氯化锂经过前处理进入细胞, 吸收紫外线能量后, 与 DNA 分子结合而增强了紫外线的诱变效应, 提高了正突变率。

2.2 抗葡萄糖抑制的高产菌株的选育

分解代谢物的调节对许多抗生素的生物合成起着至关重要的作用, 最典型的例子是青霉素发酵过程中的葡萄糖效应。6-磷酸葡萄糖脱氢酶是灵菌红素合成的一个关键酶, 它对分解代谢物阻遏作用很敏感, 所以灵菌红素的生产同样存在葡萄糖效应, 葡萄糖的浓度试验亦证实了这一点 (图 2), 可见随葡萄糖浓度的增加, 色素产量明显下降。

尽管在发酵过程中可通过流加工艺或以缓慢利用的碳源来克服葡萄糖效应, 但如

能从菌种选育的角度筛选抗分解代谢物阻遏的突变株，则更能满足工业生产的需要和提高发酵单位。

实验通过高葡萄糖浓度培养基初步筛选得 8 株高产菌株，进一步经摇瓶复筛，产量比较见表 1。

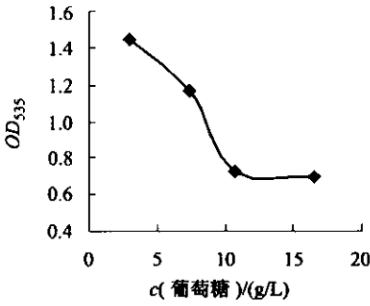


图 2 葡萄糖浓度对 PC 产量的影响

表 1 初筛得 8 个菌株摇瓶复筛产量比较

菌株	OD ₅₃₅	菌株	OD ₅₃₅
1	2.12	5	2.24
2	2.08	6	2.45
3	2.38	7	2.35
4	2.04	8	2.20

注：第 6 株为筛选出高产菌株 B-20

2.3 高产突变株 B-20 性的传代稳定性实验

有些经人工诱变处理得到的高产突变株遗传基因型不稳定，易发生回复突变或复筛产量下降等问题，故需验证其传代稳定性后，再选择连续传代后产量不下降的菌株用于以后的生产。

将诱变得到的高产株 B-20 移种到平板上进行活化，该菌种作为第一代，以后每隔 2d 传代，共传五代。隔代摇瓶二级发酵测其产量 (250mL 三角瓶装液 30mL)，在 220r/min 旋转式摇床 28℃ 培养 24h，结果如表 2 所示。可见，突变株 B-20 有较好的产色素稳定性。

表 2 高产突变株传代稳定性试验

代数	1	2	3
OD ₅₃₅	2.40	2.39	2.52

2.4 出发菌株和高产突变株的产量比较

2.4.1 平板上的形态观察：如图 3 所示，出发菌株和高产突变株均接于含 0.22mol/L 葡萄糖的平板上，突变株显现鲜红色而出发菌株几乎无色素生成。

2.4.2 摇瓶产量比较：由表 3 可见，高产突变株的菌体量是出发菌株的一半，灵菌红素产量却比出发菌株高出 3.2 倍，即菌种产色素能力得到了很大提高。

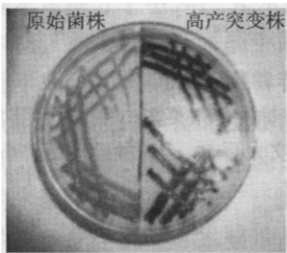


图 3 菌株诱变前后平板形态对照

表 3 出发菌株与突变菌株的摇瓶产量比较

菌株	12h		24h	
	OD ₅₃₅	湿重 (g/L)	OD ₅₃₅	湿重 (g/L)
出发菌株	0.408	0.094	0.686	0.129
突变株 B-20	2.265	0.059	2.90	0.066

2.4.3 反应器上的产量比较：实验过程中发现甘油对灵菌红素的生成有诱导作用，加入甘油后很快即产生灵菌红素。由于灵菌红素的生物合成为

终产物抑制，当灵菌红素的浓度增加后，即会抑制其进一步合成。所以实验先采用葡萄糖为碳源，待菌体量达到一定数量后，加入甘油，即诱导灵菌红素的大量合成。此发酵策略经摇瓶实验验证，发现灵菌红素产量果然有了很大的提高，是以往摇瓶最高

产量的1.5倍；此项结果在反应器上亦得到证实，产量提高也达到原反应器上最高产量的1.5倍。

5L反应器上按此操作条件对原始菌株和诱变后菌株进行培养比较，结果如图4所示，诱变后菌株的灵菌红素产量有较大幅度的提高，最大产量为诱变前的1.63倍，且发酵周期缩短，具有较大的生产应用潜力。

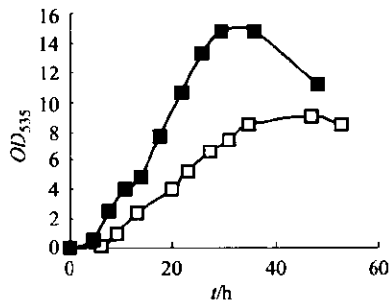


图4 诱变前后菌株5L反应器
培养过程比较

□ 诱变前， ■ 诱变后

基因工程构建高产菌株已普遍用于工业生产中，但应用物理、化学诱变方法改进菌种品质、提高菌株的生产能力仍是代谢控制发酵育种中最基本、应用最广泛的技术。本实验中原始菌株由于菌体生长及产物生成均受到分解代谢物的抑制，产量不高。经紫外诱变及高浓度碳源培养基筛选得到的高产突变株克服了这些限制，原本在培养基中含0.027mol/L葡萄糖的摇瓶中无灵菌红素生成的原始菌株经诱变后在含0.22mol/L葡萄糖的培养基中亦有0.1mmol/L的灵菌红素生成。比较原始菌株及高产突变株在同样条件下前期利用葡萄糖得到菌体，停滞期利用甘油诱导色素生成的发酵产量，可见利用高产突变株生产，灵菌红素产量得到了很大的提高，且突变株的灵菌红素生产能力(g灵菌红素/g菌体)也远远高于原始菌株。

参考文献

- [1] Haddix P L, Werner T F. Gene Expression, 2000, 26: 3~13.
- [2] Hearn W R, Williams R H, Burgus R C. Appl Microbiol, 1972, 24: 591~59.
- [3] Montaner B. Life Science, 2001, 68: 2025~2036.
- [4] Katsumi N, Kumpei K. 1981, USP 4266028.
- [5] Pryce L, Haddix E, Paulsen T, et al. Bioscene, 2000, 26: 17~21.
- [6] 曾春民, 林国强, 沈鹤琴, 等. 中国海洋药物 1996, 2: 5~7.
- [7] 陈代杰, 朱宝泉. 工业微生物菌种选育与发酵调控技术. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1994.