

微波对阿维拉霉素产生菌诱变效应的研究

朱传合 贺亚男 路福平 杜连祥

(天津科技大学生物工程学院, 天津市工业微生物重点实验室 天津 300222)

摘要: 阿维拉霉素产生菌 SV 微波诱变效应的研究发现: 菌株 SV 对微波敏感(微波处理 60s, SV 菌株存活率低于 10%), 菌落形态变化大。微波诱变处理最佳作用方式为培养皿不加盖、快速冰上冷却, 最佳处理时间为 50s(其正突变率 25.3%)。通过微波诱变处理、阿维拉霉素推理筛选, 最终获得一株稳定性良好, 阿维拉霉素产量达到 21.5mg/L, 较出发菌株提高 119.4% 的突变株 SV-15。

关键词: 微波; 阿维拉霉素; 诱变效应

A Study on Mutagenic effects of Avilamycin-producing Strain Induced by Microwave Irradiation

ZHU Chuan-he, HE Ya-nan, LU Fu-ping, DU Lian-xiang

Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300222 China

ABSTRACT: To investigate Mutagenic effects of Avilamycin-producing Strain induced by microwave irradiation. The experimental results indicated that the capacity of SV strain to microwave irradiation was sensitive (its survival rate was under 10% for 60s radiation). Not sealing the culture dish and fast cooling it was the optimal irradiation mode of microwave, and 50 seconds was the optimal irradiation time of microwave (positive mutation rate, 25.3%). To obtain high-yield avilamycin-producing strain, 50s microwave irradiation and screening of avilamycin-rational mutant is used for the study on screening mutation. SV-15 mutants were obtained, and the mutant could produce 21.5mg/L avilamycin, which was 2.194 times as much as the potency of original strain by flake fermentation.

Key words: Microwave; Avilamycin; Mutagenic effects

微波辐射属于一种低能电磁辐射, 能刺激水、蛋白质、核苷酸、脂肪、碳水化合物等极性分子快速震动^[1]。生物效应的频率范围在 300MHz~300GHz, 现在一般多采用 2450MHz。在 2450MHz 频率作用下, 水分子能在 1s 内 180° 来回转动 24.5 亿多次, 强烈的震动和摩擦使得细胞内 DNA 分子氢键和碱基堆积化学力受损, 最终引起 DNA 分子结构变化导致菌株发生遗传变异; 而且微波所具有的传导作用和极强的穿透效应使细胞壁内外的水分子产生剧烈震动和摩擦, 改变了其通透性, 更易使细胞内代谢物分泌出来。这些生理生化方面的变化会使得生物体产生一系列的突变效应^[1]。因此, 微波被广泛用于多个领域的诱变育种, 如农作物育种、禽兽育种和工业微生物育种^[2,3]。

阿维拉霉素是由绿色产绿链霉菌(*Streptomyces Viridochromogenes*) 经过发酵而得。它属于正糖霉素族的寡糖类抗生素, 是一种特殊的蛋白质合成抑制剂^[4], 通过与细菌核糖体结合来抑制蛋白质的合成, 从而达到抑菌的目的。它主要抑制革兰氏阳性菌, 而对革兰氏阴性菌效果较差^[5,6]。阿维拉霉素作为代谢终产物对其产生菌的调节作用可能有两个方面: 一是作为终产物对参与其合成的有关酶进行反馈调节; 二是对产生菌本身具有抑制、杀死作用。因此, 随着自身代谢终产物耐受性的提高, 产生菌合成阿维拉霉素的能力也将得到提高^[7]。本研究采用微波对菌株 SV 进行诱变, 辅以阿维拉霉素(自身代谢产物)推理筛选获得了一株稳定性良好的高产 SV-15 突变株。

作者简介: 朱传合, 男, 1978 山东鄄城人, 博士研究生

现从事工业微生物育种和微生物制药方面的研究工作。

科学基金资助项目: 横向合作。Email: chuanhezhu@yahoo.com.cn.

通讯作者: 杜连祥, 电子信箱: dk@tust.edu.cn, 电话: 022-60270037

(收稿日期: 2006-04-03 接受日期: 2006-04-23)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 出发菌株: 绿色产绿链霉菌(*Streptomyces Vinidochromogen*)SV, 本研究室保存; 敏感菌株: 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)10209 中国工业微生物菌种保藏中心(保藏号为: CICC10209)。

1.1.2 培养基 斜面培养基: 高氏一号合成琼脂培养基^[8];
平板分离培养基: 高氏一号合成琼脂培养基^[8];
种子培养基(g/L): 麦芽汁 10、酵母浸粉 4、葡萄糖 4、CaCl₂ 0.1, pH 7.2;

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20、酵母浸粉 16、缬氨酸 2.3、CaCl₂ 0.11pH 7.2;

敏感菌活化培养基: 营养琼脂;

生物检测培养基(g/L), 上层: 酵母膏 3、蛋白胨 10、牛肉膏 5、葡萄糖 10、氯化钠 5、琼脂 10, pH 7.2 下层: 素琼脂 20。

以上培养基灭菌条件: 121℃, 15~20min。

1.2 方法

1.2.1 分析方法 阿维拉霉素含量采用 HPLC 法^[9]。

1.2.2 单孢子悬液制备 将新鲜斜面孢子用适量生理盐水洗下, 转移到有玻璃珠的无菌三角瓶中振荡打散, 用无菌脱脂棉过滤, 调整孢子浓度为 10⁸ 个/mL。

1.2.3 微波诱变处理 取制备好的单孢子悬液 5mL 于培养皿内, 放入家用微波炉(微波源为 2450MHz 850W)中, 中等强度辐射。辐射分四种方式: 培养皿加盖不冷却; 加盖冷却; 不加盖冷却; 不加盖不冷却。加盖不冷却及不加盖不冷却, 辐射时间分别为 10、20、30、40、50、60、80、100、120s, 各取 0.1mL 适当稀释涂布。加盖冷却及不加盖冷却, 辐射 10s, 冰上快速冷却 10s 再辐射, 辐射时间累计分别为 10、20、30、40、50、60、80、100、120s, 各取 0.1mL 适当稀释涂布。37℃培养 4d。

1.2.4 出发菌株阿维拉霉素最小抑制浓度测定 将制备好的孢子悬液分别涂布于含有不同浓度阿维拉霉素的培养基平板上, 37℃培养 3~5d 记录平板上未长菌落的阿维拉霉素最低抑制浓度(MIC), 即确定为阿维拉霉素对该菌的最小抑制浓度(MIC)。

1.2.5 初筛 琼脂柱法: 用Φ8 打孔器打出若干单菌落, 对其进行敏感菌检测, 利用抗生素效价测量仪测量抑菌圈直径。以琼脂柱抑菌圈直径大小作为初筛标准。

1.2.6 复筛 摇瓶发酵复筛: 选取抑菌圈直径较大的菌落进行摇瓶发酵, 发酵结果采用 HPLC 法测定阿维拉霉素产量。

1.2.7 发酵方法

1.2.7.1 摇瓶种子培养 用适量无菌水洗下斜面孢子, 充分振荡, 制备成孢子悬浮液, 计数并调整孢子悬浮液的孢子浓度为 108 个/mL。吸取适量孢子悬浮液于装有 30mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中, 28℃, 180r/min 振荡培养至对数生长期。

1.2.7.2 摇瓶发酵 将摇瓶种子培养液以 2% 的接种量转接到装液量为 50mL 的 250mL 三角瓶中, 28℃、180r/min 回转式摇床发酵 72h。

2 结果与分析

2.1 微波诱变对 SV 菌株存活率的影响

取制备好的单孢子悬液 5mL 于培养皿内, 放入家用微波炉中, 根据试验设计进行中等强度辐射。计算其存活率, 绘制存活率曲线如图 1。

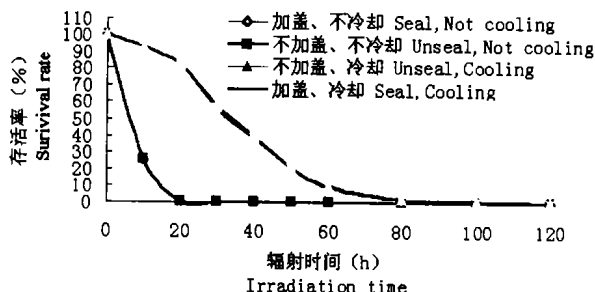


图 1 微波诱变对 SV 菌株存活率的影响

Fig. 1 The survival rate of SV strain by microwave

从图 1 可以看出, 加盖不冷却及不加盖不冷却的微波辐射, 在微波辐射 20s 后, 菌株全部死亡, 其主要原因是由于微波辐射的热效应使孢子悬液的温度快速升高, 高温使孢子迅速死亡。两种辐射方式对菌株存活率影响基本上没有差别, 其主要原因不加盖的散热速率远远低于其温度升高速率。加盖冷却及不加盖冷却两种辐射方式的菌株存活率曲线基本一致, 其菌株存活率均随着辐射时间的延长而降低, 微波辐射时间为 120s 时, 其存活率均趋近于零。菌株存活率逐渐降低的原因是微波效应有热效应和非热效应, 非热效应也有致死作用, 虽然我们通过冰上快速降温尽可能减少其热效应, 但是也不可能完全消除热效应的影响, 微波辐射的非热效应及极少部分热效应的累积使菌株逐渐死亡, 造成其存活率逐渐下降。10s 短时间不加盖散热远远低于冰上热交换降低热效应作用是造成两种辐射方式菌株存活率曲线基本一致的原因。

2.2 微波诱变对 SV 菌株突变率及正突变率的影响

根据 2.1 可知, 在 SV 菌株微波诱变中主要是利用其非热效应。虽然不加盖散热作用与冰上冷却相比微不足道, 但是, 为了尽可能降低其热效应, 我们选择微波辐射方式为不加盖、冷却。采用琼脂柱法检测每个辐射时间下的菌落抑菌圈变化情况, 规定抑菌圈直径高于对照株(SV)1% 的突变株称为正突变, 小于 1% 的为负突变, ±1% 之间的为未突变。试验结果图 2。

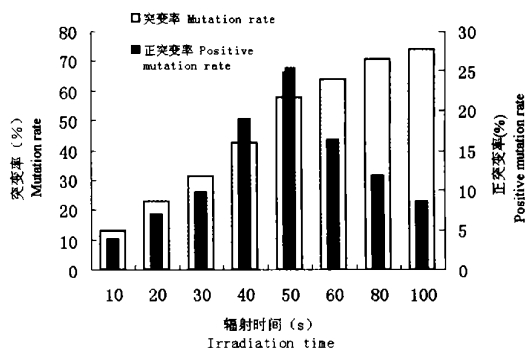


图 2 微波诱变对 SV 菌株突变率及正突变率的影响

Fig. 2 Mutation rate & positive mutation rate SV strain by the microwave

图 2 可知, 随着微波辐射时间的增加, 菌株突变率随之增加; 在辐射时间低于 50s 时, 其正突变率随着辐射时间的增加而增加, 辐射时间在 50s 时, 菌株的正突变率到达最高(25.3%), 此时菌株存活率为 20.7%(图 1)。辐射时间超过 50s 以后, 菌株的突变率继续增加, 但其正突变率呈现降低的趋势。分析原因, 可能是由于短时间辐射对菌株造成生理生化效应不足以引起菌株大量的突变, 且容易发生回复突变, 而长时间的辐射, 由于微波的非热效应和极少部分的热效应的累积引起较剧烈的生理生化效应使 DNA 及生物膜等生物大分子的损伤严重, 从而导致较高的突变率和低的正变率。微波辐射时间为 50s 左右时, 非热效应和极少部分的热效应的累积引起的生理生化效应比较温和, DNA 的损伤不很严重, 所以菌株的正突变率较高的。

2.3 微波辐射对 SV 菌株菌落形态的影响

微波诱变阿维拉霉素产生菌形态变异高于自然分离情况, 出现多种变异形态。①单菌落边缘不整齐、绿色孢子、表面孢子稀少; ②单菌落全部为绿色孢子, 无白边、菌落扁平、表面孢子稀少; ③圆形凸起、单菌落全部为绿色孢子, 无白边、表面孢子稀少; ④草帽型, 凸起部分为绿色, 边缘白色、表面孢子稀少; ⑤草帽型、全部为绿色孢子、表面孢子稀少; ⑥菌落扁平, 表面出现油滴状, 灰色; ⑦同心圆、全部为白色孢子、表面孢子丰富; ⑧同心圆、中间为绿色孢子、边缘为白色孢子、表面孢子稀少; ⑨同心圆、全部为绿色孢子、表面孢子稀少; ⑩圆形菌丝凸起, 没有孢子。

2.4 高产菌株的筛选

2.4.1 阿维拉霉素对 SV 菌株孢子致死浓度测定 分别取浓度为 108 个/mL 的孢子悬浮液 0.1 涂布于含有不同浓度的阿维拉霉素培养皿中, 结果见表 1。由表 1 可知, 阿维拉霉素对 SV 菌株孢子最小致死浓度(MIC)为 150μg/mL。

表 1 阿维拉霉素对 SV 菌株孢子致死浓度测定
Table 1 the SV strain MIC of avilamycin

阿维拉霉素(μ g/mL) Ailamycin(μ g/mL)	50	80	100	120	130	140	150	160	170	180
菌落生长情况 The growth of strain	++++	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—

注: + 为有菌落生长, — 为无菌落生长 Note: + Growth, — Not growth

2.4.2 高产菌株的筛选 在最佳辐射时间下(50s)下进行微波诱变处理, 适当稀释涂布于含阿维拉霉素高氏培养基平板上, 挑选菌落形态不同菌株的 1800 株阿维拉霉素菌落转入另一不含阿维拉霉素的高氏培养基中, 待菌落长成后, 进行琼脂柱初筛。选取抑菌圈直径大 9.0mm 的 20 株高产菌进行复筛, 取三次试验的平均值, 结果如表 2。

表 2 高产突变株复筛结果
Table 2 the results of mutation second screening

菌株 Stain	发酵产量(mg/L) Fementation yield	相对产量(%) Rate	菌株 Stain	发酵产量(mg/L) Fementation yield	相对产量(%) Rate
SV	9.8	100	SV— 10	19.4	198.0
SV— 1	20.3	207.1	SV— 11	16.8	171.4
SV— 2	16.8	171.4	SV— 12	17.1	174.5
SV— 3	17.8	181.6	SV— 13	21.8	222.4
SV— 4	19.3	196.9	SV— 14	16.9	172.4
SV— 5	19.2	195.9	SV— 15	21.5	219.4
SV— 6	20.4	208.2	SV— 16	19.3	196.9
SV— 7	17.3	176.5	SV— 17	20.0	204.1
SV— 8	16.9	172.4	SV— 18	18.2	185.7
SV— 9	20.4	208.2	SV— 19	17.6	179.6
SV— 20	18.7	190.8			

2.4.3 高产菌株的稳定性试验
根据 2.4.2 试验结果, 我们选择阿维拉霉素产量在 20.0mg/L 以上的 5 菌株, 用群体传代的方法考察其的斜面稳定性, 进行反复传代 5 代。取三次试验的平均值, 结果如表 3。

表 3 菌株 SV 稳定性实验结果
Table 3 the experimental results of SV strain stability

代数 Generation	阿维拉霉素产量(mg/L) Avilamycin yield(mg/L)				
	SV— 1	SV— 6	SV— 9	SV— 13	SV— 15
1	20.3	20.4	20.4	21.8	21.5
2	20.5	19.7	20.2	19.8	21.8
3	19.8	16.4	19.8	18.3	20.8
4	20.1	15.5	20.1	15.9	21.1
5	19.7	13.1	20.0	14.7	19.9

由表 3 可知, 在上述 5 株具高产突变株中, 突变株 SV— 1、SV— 9 及 SV— 15 连续移种 5 代斜面后, 高产性能遗传特征稳定, 阿维拉霉素产量分别稳定在 19.7~20.5mg/L、19.8~20.4mg/L 及 19.9~21.8mg/L 范围内。而 SV— 6 及 SV— 13 传代生产性能不稳定稳定, 随着传代次数增加, 其产量下降迅速, 生产上不可行。

3 结论

微波诱变对 SV 菌株存活率的影响研究发现, 在进行微波诱变处理时, 主要是利用其非热效应。
最佳辐射时间(50s)下进行微波辐射诱变处理, 阿维拉霉素推理筛选, 最终获得一株稳定性良好, 阿维拉霉素产量高达

21.5mg/L, 较出发菌株提高 119.4% 的突变株 SV— 15。
微波诱变技术和阿维拉霉素推理筛选法成功应用于阿维拉霉素产生菌的选育中。在微波进行诱变的基础上, 阿维拉霉素推理筛选方法大幅度地浓缩了突变型, 在很大程度上克服了诱变随机筛选的不定向性, 提高了菌种选育的工作效率。实践证明, 微波处理是一种行之有效的菌种诱变方法。

参考文献

[1] 李豪, 车振明. 微波诱变微生物育种的研究[J]. 山西食品工业, 2005 (2): 5~6, 14

[2] 贾红华, 周华, 韦萍. 微波诱变育种研究及应用进展[J]. 工业微生物, 2003, 33(2): 46~49

[3] 雷肇祖, 钱志良, 章健. 工业菌种选育述评[J]. 工业微生物, 2004, 34(1): 39~51

[4] Aarestrup F M, Jensen L B. Presence of variations in ribosomal protein L16 corresponding to susceptibility of enterococci to oligosaccharides (avilamycin and evemimicin). Antimicrob [J]. Agents Chemother, 2000, 44: 3425~3427

[5] Giba Linted. New antibiotic and process for its manufacture [P]. Switzerland. Patent specification. 948 238. 1964

[6] Wright E. D. The orthosomycins: a new family of antibiotics [J]. Tetrahedron. 1979, 35: 1207~1236

[7] 金志华. 抗生素发酵的若干微生物及工程问题研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2001: 19

[8] 杜连祥. 工业微生物学实验技术[M]. 第一版, 第一次. 天津: 天津科学技术出版社, 1992: 279

[9] 张秀英. 阿维霉素预混剂的含量测定[J]. 中国兽药杂志, 2000, 35 (3): 21~23