

UV+ARTP 复合诱变筛选子囊霉素高产菌株

任林英¹, 张祝兰^{1*}, 王德森^{1,2}, 杨煌建¹, 连云阳¹

(1. 福建省微生物研究所福建省新药(微生物)筛选重点实验室, 福建福州 350007; 2. 福建科瑞药业有限公司, 福建福州 350007)

摘要: 采用紫外(UV)与常压室温等离子体(ARTP)复合诱变技术对子囊霉素产生菌吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 进行诱变处理, 结合摇瓶发酵初筛和复筛, 以 HPLC 法检测子囊霉素的含量, 结果获得 1 株遗传性状良好的子囊霉素高产菌株 *S. hygroscopicus* FIM-38-24, 其产子囊霉素能力较出发菌株提高 4 倍以上, 发酵单位达 568.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

关键词: 子囊霉素; 吸水链霉菌; 常压室温等离子体; 复合诱变

中图分类号: TQ465.92 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2018)02-0181-05

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.02.010

子囊霉素(ascomycin, **1**)系大环内酯类免疫抑制剂, 此外还具有抗真菌、抗疟疾、神经保护与再生及抗痉挛等多种生物活性^[1-4], 文献报道其衍生物在治疗皮肤病、器官移植排异与自身免疫疾病的预防、神经退行性病变、哮喘等方面都有不同程度的疗效^[5]。**1** 不仅自身应用前景广阔, 其衍生物也值得深入研究。但因产率低、成本过高而限制了**1**的使用, 须提高其发酵水平以降低生产成本^[6-8]。课题组前期在筛选微生物代谢生物活性物质过程中获得产**1**的吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) FIM-0416 菌株, 但该菌种产**1**能力低, 不适合工业化生产使用。因此本研究拟应用紫外(UV)与常压室温等离子体(ARTP)复合诱变技术对该菌株进行菌种改良, 期望获得稳定的**1**高产菌株。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

ARTP-M 型常压室温等离子体诱变育种仪(无锡源清天木生物科技有限公司); MIR-253 型微生物培养箱(日本

Sanyo 公司); ZHWY-2102 型大型恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司); LC-20A 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司)。

葡萄糖(秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司); 酵母粉(广东江门生物技术开发中心有限公司); 蛋白胨(福建省仙游三和生物科技有限公司); 糊精(山东西王糖业有限公司); 黄豆粉(福建省宝佳有限公司); 玉米浆粉(上海缘肽生物技术有限公司); 燕麦粉(广西桂林荔波食品有限公司); 琼脂(江苏强盛功能化学股份有限公司); **1** 对照品(上海齐奥化工科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 菌种与培养基

吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*) FIM-0416(福建省微生物研究所保藏)。

分离平板、斜面培养基/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: 燕麦粉 20, 琼脂 20; pH 自然。

种子培养基/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: 葡萄糖 5, 燕麦粉 10, 酵母粉 2, 蛋白胨 1.5, 氯化钠 2; pH 7.0。

发酵培养基/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: 糊精 55, 黄豆粉 20, 玉米浆粉 5, 酵母粉 2, 蛋白胨 3, 磷酸氢二钾 1, 碳酸钙 0.5; pH 7.0。

2 方法与结果

2.1 单孢子悬液的制备

取生长良好的吸水链霉菌新鲜成熟斜面, 加入无菌生理盐水 10 ml, 轻轻刮下孢子, 用玻璃珠(直径 5 mm)打散, 过滤, 制成单孢子悬浮液($D_{600}=0.6\sim 0.8$), 备用。

2.2 发酵培养

收稿日期: 2017-07-31

基金项目: 福建省属公益类研究所基本科研专项(2015R1009-8)、福建省化药技术重大研发平台(2014Y2001)、福州市科技计划项目(2016-G-69)和福清市科技计划项目(融科2016(21))

作者简介: 任林英(1964—), 女, 高级工程师, 主要从事生物药物研发。

E-mail: rlymary@aliyun.com

通信联系人: 张祝兰(1966—), 女, 研究员, 主要从事生物药物研究。

E-mail: jessylan9963@sina.com

分别将培养好的单菌落斜面菌苔接种于装有 60 ml 种子培养基的 500 ml 三角瓶, 28 °C 振荡 (230 r/min) 培养 48 h, 然后转接于装有 60 ml 发酵培养基的 500 ml 三角瓶, 28 °C 振荡 (230 r/min) 发酵培养 120 h, 收获发酵液。

2.3 测定方法

2.3.1 效价测定

取发酵液适量, 加入 3 倍体积的无水乙醇, 充分振荡、静置、离心, 取上清液过滤后进行 HPLC 检测。色谱条件: 色谱柱 C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 乙腈: 0.1%磷酸 (62 : 38); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 215 nm; 柱温 60 °C; 进样量 10 μl。利用外标法计算发酵效价。

2.3.2 菌体生长量测定

取发酵液 10 ml 置离心管中, 离心 (2 850×g) 10 min, 计算固形物体积占发酵液的比例。

2.4 突变株 FIM-38 的筛选

2.4.1 UV 诱变处理与分离

取生长良好的吸水链霉菌新鲜成熟斜面, 加入无菌生理盐水 10 ml, 轻轻刮下孢子, 用玻璃珠 (直径 5 mm) 打散, 过滤, 制成单孢子悬浮液 ($D_{600}=0.6 \sim 0.8$)。在红光或避光条件下无菌操作, 取制备好的新鲜单孢子悬液 8 ml, 置直径 9 cm 的带无菌搅拌子平皿中, 在距离 30 cm 的紫外灯 (30 W) 下, 边搅拌边照射不同时间 (15、30、45、60、90、120、150 和 180 s)。经诱变处理后的单孢子悬液按 10 倍稀释法稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 后, 分别取 100 μl, 涂布于分离培养基平板上, 同时将未诱变的单孢子悬液也稀释涂布于分离平板上作为对照。28 °C 培养 10 d 后, 挑取单菌落划线接种于斜面培养基上, 28 °C 继续培养 10 d。

2.4.2 UV 诱变效应

统计生长菌落数, 并计算相应致死率, 按 “2.2” 项下方法进行摇瓶发酵培养, 检测发酵效价, 结果表明诱变处理剂量与 FIM-0416 菌株致死率之间存在明显的量效关系, 致死率随着处理时间的延长而不断升高, 直至处理 180 s 后未见菌落生长, 致死率达 100% (图 1)。以发酵效价高于出发菌株

110% 或低于出发菌株 90% 的诱变菌株标示为突变株, UV 处理 90 s, 正突变率最高, 故选择 UV 处理 90 s 作为适宜诱变剂量。

2.4.3 突变株 FIM-38 的获得

FIM-0416 菌悬液经 UV 照射 90 s 后, 稀释涂布于分离平板上进行培养, 根据菌落颜色和形态 (包括大小、圆满和丰度), 挑选一定数量的菌株进行生物合成 1 能力比较, 以出发菌株 FIM-0416 的相对效价为 100%, 结果见表 1。结果表明菌株 FIM-0416 通过自然分离可以得到复壮, UV 诱变菌株的合成 1 能力显著高于自然分离菌株。经过初筛与复筛, 得到产 1 能力较好的 UV 诱变突变株 FIM-38, 其相对效价为 (205.8±5.9)%, 菌体量 [(26.5±5.3)%] 较出发菌株 [(21.0±4.5)%] 高约 26%。

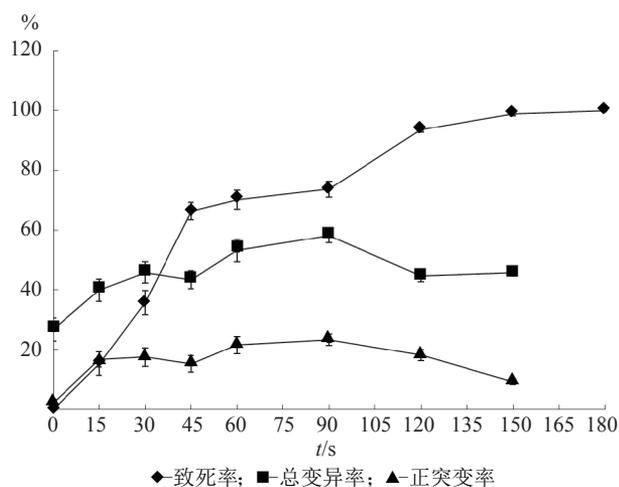


图 1 UV 辐射时间对菌株 FIM-0416 致死率与突变率的影响 (n=3)

Fig.1 Effects of Different UV Irradiation Time on Lethal Rates and Mutation Rates (n=3)

表 1 自然分离菌株、UV 诱变菌株初筛结果

Tab.1 Results of Preliminary Screening Test

菌株类别	菌株数	平均相对效价/%	最高相对效价/%
自然分离菌株	53	103.6	110.7
UV 诱变菌株	69	115.9	216.5

2.5 ARTP 诱变效应

2.5.1 ARTP 诱变处理及分离

对 FIM-38 菌悬液应用 ARTP 射流 (入射功率 120 W, 氦气量 10 SLM) 处理不同时间 (10、15、30、60 和 90 s), 分别将辐照前后的菌悬液适当稀释后均匀涂布在平板培养基上, 28 °C 培养 10 d, 观察菌落生长情况。挑取单菌落划线接种于斜面培养基, 28 °C 继续培养 10 d。

2.5.2 ARTP 诱变效应

菌株 FIM-38 在 ARTP 处理前生长良好, 菌落生长数量随着 ARTP 射流处理时间的增加呈减少趋势。经 ARTP 辐照 15 s 以上的菌株生长受到明显抑制, 平板上只有少数菌落生长, 易于挑选单菌落; 处理 90 s 后菌落完全不生长, 致死率达 100%。将 ARTP 处理后培养所获得的单菌落按“2.2”项下方法进行摇瓶发酵培养, 收获发酵液, 检测其发酵效价。以发酵效价高于出发菌株 110% 的诱变菌株标示为正突变株, 低于出发菌株 90% 的诱变菌株标示为负突变株, 结果见图 2。结果显示 ARTP 处理 15 s, 正突变率较高, 故选择 ARTP 处理 15 s。

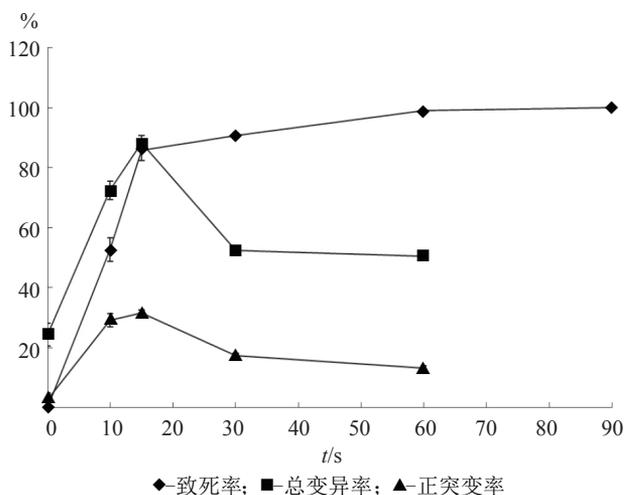


图 2 ARTP 射流时间对菌株 FIM-38 致死率与突变率的影响 (n=3)

Fig.2 Effects of Different ARTP Jet Time on Lethal Rates and Mutation Rates of Strain FIM-38 (n=3)

2.5.3 复合诱变 1 突变株的筛选

菌株 FIM-38 菌悬液经 ARTP 照射 15 s 后, 稀释涂布于分离平板上进行培养, 根据菌落颜色和形态 (包括大小、圆满和丰度) 挑选 88 株单菌落菌

株进行 1 生物合成能力的比较。以 FIM-0416 的相对效价为 100%, 结果所分离菌株的平均相对效价为 253.2%, 最高相对效价达 538.3%, 表明通过 ARTP 诱变获得的菌株合成 1 的能力明显高于出发菌株 FIM-0416; 有 8 株突变株显示出较强的产 1 能力, 其中 2 株突变株 FIM-38-24 和 FIM-38-80 的发酵水平均较出发菌株提高了 4 倍。结果表明出发菌株 FIM-0416 通过 UV+ARTP 复合诱变取得了很好的效果, 见表 2。

表 2 部分高产突变菌株的摇瓶发酵情况

Tab.2 1 Producing Ability of Partial High Yield Mutants

菌株	相对效价/%
FIM-38-02	480.2
FIM-38-14	493.5
FIM-38-18	435.1
FIM-38-15	409.3
FIM-38-24	528.4
FIM-38-49	467.0
FIM-38-57	438.4
FIM-38-80	506.3

2.6 菌株 FIM-38-24 和 FIM-0416 的发酵培养曲线

根据上述结果, 选择突变株 FIM-38-24 进行发酵培养, 以出发菌株 FIM-0416 为对照, 绘制菌株生长及合成 1 的曲线 (图 3)。结果显示, 随着发酵时间的延长, pH 值均呈先升后降再持续升高的趋势。在发酵初期菌体大量生长, 生长平衡后维持一定的稳定期。其中, 突变株 FIM-38-24 菌体生长量高于出发菌株 FIM-0416, 且生长速率更快, 发酵 72 h 菌体量已基本平衡, 次级代谢产物 1 的生成量显著增加, 发酵 48 h 时已合成一定的 1, 中后期大量合成 1, 发酵 120 h 时 1 产量较高, 可达 570.3 μg/ml; 出发菌株 FIM-0416 发酵培养 96 h, 菌体量基本达到平衡, 发酵培养 144 h 时 1 的产量较高, 为 110.2 μg/ml。可见, 突变株 FIM-38-24 产 1 的能力显著高于出发菌株 FIM-0416。

2.7 突变株 FIM-38-24 发酵水平的验证

将突变株 FIM-38-24 与出发菌株 FIM-0416 连续进行 4 批次的发酵培养, 结果显示突变株 FIM-38-24 合成 1 的能力较出发菌株 [发酵效价 (107.5±5.5) μg/ml] 大幅度提高, 发酵效价达

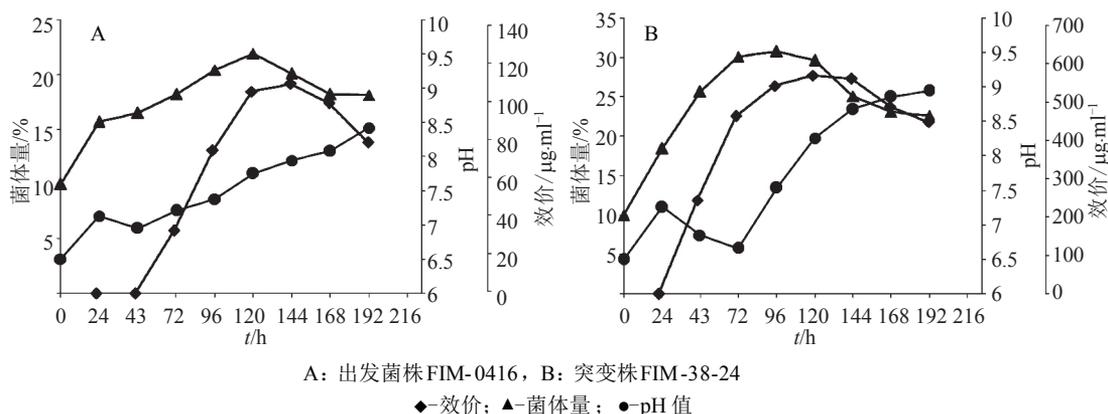


图3 菌株生长及合成 1 时间曲线

Fig.3 Time Curves of Strain Growth and 1 Production

(568.0±4.9) μg/ml, FIM-38-24 和 FIM-0416 的菌体量分别为 (30.3±3.1)% 和 (21.4±5.2)%。

2.8 高产菌株斜面保藏对发酵效价的影响

将高产突变株 FIM-38-24 转接于斜面培养基上, 待生长成熟后置 4 °C 保藏 (7 ~ 120 d), 然后进行摇瓶发酵培养, 比较 4 °C 保藏不同时间后突变株的发酵效价。以生长良好的第一代菌株的新鲜斜面为对照 (相对效价 100%), 结果 (表 3) 表明突变株斜面在 4 °C 保藏 3 个月仍较稳定。

表 3 4 °C 时保藏时间对突变株 FIM-38-24 生物合成 1 的影响 (n=3)

Tab.3 Effect of Storage Time at 4 °C on

1 Biosynthesis by Mutant Strain FIM-38-24 (n=3)

保藏时间/d	7	30	60	90	120
相对效价/%	106.2±1.5	102.5±2.1	99.8±1.3	101.1±1.6	93.5±2.6

2.9 高产突变株传代稳定性试验

对高产突变株 FIM-38-24 连续传代 5 次, 各平行 3 次, 经摇瓶发酵培养后测定发酵效价, 以生长良好的原代菌株 (F0) 为对照 (相对效价 100%), 计算 F1 ~ F5 的相对效价。结果见表 4。结果显示突变株 FIM-38-24 传代 4 次 1 的发酵水平基本稳定。

3 讨论

传统的理化因子诱变育种方法因简单、快速、有效等优点, 至今仍被广泛使用 [9-10]。ARTP 产生的等离子体富含各种化学活性粒子, 对菌株细胞产

表 4 突变株 FIM-38-24 的传代稳定性 (n=3)

Tab.4 Genetic Stability of Mutant Strain FIM-38-24

(n=3)

菌株代数	F1	F2	F3	F4	F5
相对效价/%	103.2±1.2	101.4±1.6	98.8±2.3	98.3±2.1	90.6±1.8

生多重作用, 如造成遗传物质的损伤、引起细胞膜通透性和蛋白质结构的改变等 [11], 细胞启动 SOS 修复机制, 在修复过程中产生种类丰富的错配位点, 最终稳定遗传进而获得大量突变株, 已成功运用于多种工业微生物的菌种选育中 [12-15]。本研究首次采用 UV+ARTP 复合诱变技术筛选吸水链霉菌高活性突变株, 并得到良好的诱变效果。经摇瓶发酵培养, 优选获得 1 株产 1 能力较出发菌株提高 4 倍以上的突变菌株 *S. hygroscopicus* FIM-38-24, 其遗传性能良好。得到高产菌株后, 须进一步优化筛选适合菌体生长和生物代谢的最佳条件, 以最大限度地发挥菌株的优良性能, 进一步提高 1 的产量。

参考文献:

[1] Arai T, Kouama Y, Suenaga T, et al. Ascomycin, an antifungal antibiotic [J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1962, 15(6): 231-232.
 [2] Monaghan P, Fardis M, Reville WP, et al. Antimalarial effects of macrolactones related to FK520 (ascomycin) are independent of the immunosuppressive properties of the compounds [J]. *J Infect Dis*, 2005, 191(8): 1342-1349.
 [3] Reville WP, Voda J, Reeves CR, et al. Genetically engineered

- analogs of ascomycin for nerve regeneration [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, **302** (3): 1278—1285.
- [4] Sierra-Paredes G, Sierra-Marcuño G. Ascomycin and FK506: pharmacology and therapeutic potential as anticonvulsants and neuroprotectants [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2008, **14** (1): 36—46.
- [5] 吴绍熙, 郭宁如. 大环内酯类免疫抑制剂研究进展[J]. 中国新药杂志, 2001, **10** (8): 566—569.
- [6] 罗婷, 林永勉, 郑孝贤, 等. 子囊霉素产生菌营养生物合成和化学合成限定培养基的建立[J]. 中国抗生素杂志, 2013, **38** (1): 26—31.
- [7] 刘菲, 魏继福, 孟玲, 等. 大环内酯类免疫抑制剂的研究进展[J]. 药学与临床研究, 2014, **22** (1): 61—66.
- [8] 穆云龙, 余旭亚, 孟庆雄, 等. 莽草酸对子囊霉素生物合成的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2008, **33** (7): 83—84.
- [9] 冀彦锡, 吴焱鑫, 李杰. 阿维菌素高产菌的育种研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, **39** (18): 10929—10931.
- [10] 王瑶函, 胡永红, 杨文革, 等. N^+ 低能离子注入与亚硝酸钠复合诱变筛选子囊霉素高产菌株的研究[J]. 中国酿造, 2012, **31** (4): 137—140.
- [11] Li H, Wang L, Li G, *et al.* Manipulation of lipase activity by the helium radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharge plasma jet [J]. *Plasma Proc Polym*, 2011, **8** (3): 224—229.
- [12] 章丽, 戴梦, 郑桂珍, 等. 离子体-紫外复合诱变选育四羟基环孢菌素衍生物高产菌株[J]. 微生物学杂志, 2014, **34** (1): 68—71.
- [13] 林桂真, 叶蕊芳, 程林同, 等. 常压室温等离子体诱变高产去甲金霉素金色链霉菌[J]. 中国医药工业杂志, 2014, **45** (11): 1026—1031.
- [14] 陈双喜, 张二超, 张乐乐, 等. γ -聚谷氨酸生产菌株的常压室温等离子体诱变选育[J]. 中国医药工业杂志, 2015, **46** (9): 960—963.
- [15] 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.

Screening of High-yield Ascomycin-producing Strain by UV Combined with ARTP Mutation

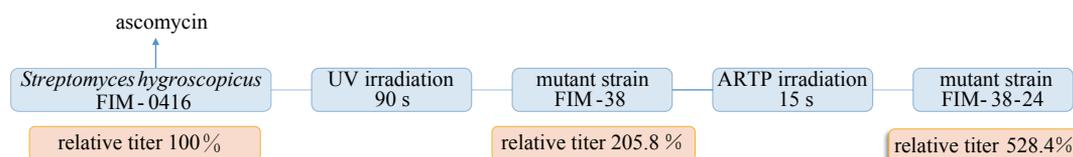
REN Linying¹, ZHANG Zhulan^{1*}, WANG Desen^{1,2}, YANG Huangjian¹, LIAN Yunyang¹

(1. Fujian Provincial Key Lab. of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007;

2. Fujian Kerui Pharmaceutical Co., Ltd., Fuzhou 350007)

ABSTRACT: The spore suspension of ascomycin producing strain *Streptomyces hygroscopicus* was mutated by ultraviolet (UV) and atmospheric and room temperature plasma (ARTP), and a high-yield mutant strain *Streptomyces hygroscopicus* FIM-38-24 was obtained through primary screening and rescreening by flask shaking fermentation. The content of ascomycin was determined by HPLC. The results showed that the ascomycin production capacity of the mutant FIM-38-24 (568.0 $\mu\text{g/ml}$) was 4 times of that of the original strain.

Key Words: ascomycin; *Streptomyces hygroscopicus*; atmospheric and room temperature plasma; composite mutation



Mutation Breeding of High-yield Ascomycin-producing Strain