

阿维菌素高产菌株的选育及阿维菌素 B₁ 的鉴定

宋 渊 曹贵明 陈 芝 李季伦

(中国农业大学生物学院微生物学系 北京 100094)

摘 要 自阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis* ATCC31272) 中分离出了 3 种不同类型的菌株, 其中只有产灰色孢子的菌株能产生阿维菌素 (Avermectins), 摇瓶发酵单位约 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。经高频电子流诱变和对发酵培养基的改进, 选育出 Sa-76 菌株, 其摇瓶发酵单位可达 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。从其菌丝体中提取纯化了阿维菌素 B₁ 晶体, 其紫外吸收光谱、红外吸收光谱、核磁共振谱 (¹H-NMR 和 ¹³C-NMR) 和质谱与国外报道的一致。Sa-76 菌株又经 2 次亚硝基胍诱变, 筛选出发酵单位 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上的 Sa-76-8 菌株。在此基础上, 再次用亚硝基胍对 Sa-76-8 菌株进行了诱变, 获得 Sa-76-9 菌株, 结合发酵条件的优化, 其发酵单位可高达 3500~4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词 阿维链霉菌, 菌种诱变, 阿维菌素 B₁, 鉴定

中图分类号 Q344⁺.13 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0031-05

1975 年, 日本北里研究所 (Kitasato Institute) 从日本静冈县伊东市川奈 (Kawana) 地区的土壤样品中分离得到一株链霉菌, 其发酵液对肠道寄生虫有很高的驱虫活性。后来这株菌被送到美国默克 (Merck) 公司进一步研究, 经鉴定是链霉菌的一个新种, 定名为 *Streptomyces avermitilis*。其产生的有驱虫活性的物质, 经结构鉴定是一族结构相似的大环内脂类抗生素, 共有 8 个组份, 分别命名为 A_{1a}、A_{1b}、A_{2a}、A_{2b}、B_{1a}、B_{1b}、B_{2a} 和 B_{2b}。其中小 a 组份含量在 80% 以上, 小 b 组份含量在 20% 以下。该组化合物被统称为阿维菌素 (Avermectins)^[1,2]。阿维菌素 B₁ 的驱虫活性最强, 但毒性较大。如在 B₁ 的 22, 23-C 之间的双键加氢还原为 22, 23-C 双氢阿维菌素 B₁, 毒性可降低 1 倍, 称为伊维菌素 (Ivermectin)。将其制成 1% 的注射液用于畜用杀虫和杀螨剂, 非常有效, 美国 Merck 公司于 80 年代初投放市场, 由于它具有高效、广谱和低毒的特点, 很快占领了国际市场。90 年代初又将阿维菌素 B₁ 制成 1.8% 乳剂, 称为爱比菌素 (Abamectin), 用于杀灭植物的害虫和螨类^[3,4]。

本文报道阿维菌素高产菌株选育和阿维菌素 B₁ 理化鉴定的结果。我们以阿维链霉菌 ATCC31272 为出发菌株, 通过高频电子流和亚硝基

胍诱变, 最终筛选获得 Sa-76-9 菌株, 摇瓶发酵单位达到 3500~4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。采用溶媒萃取法从阿维链菌丝体中抽提并纯化出阿维菌素 B₁ 晶体, 经紫外吸收光谱、红外吸收光谱、核磁共振谱 (¹H-NMR 和 ¹³C-NMR) 和质谱测定, 结果与国外报道的一致。

1 材料和方法

1.1 菌种

Streptomyces avermitilis ATCC31272, 由 ATCC 引进, Sa-76 由 ATCC31272 经高频电子流诱变获得; Sa-76-7 由 Sa-76 经亚硝基胍诱变获得; Sa-76-8 由 Sa-76-7 经亚硝基胍诱变获得; Sa-76-9 由 Sa-76-8 经亚硝基胍诱变获得。

1.2 培养基

1.2.1 斜面和平板培养基 (g/L): 淀粉 20, 酵母膏 2.0, KNO₃ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, NaCl 0.5, FeSO₄ 0.01, pH 7.2~7.4。

1.2.2 种子培养基 (g/L): 淀粉 30, 豆饼粉 20, 酵母粉 2.0, CoCl₂·6H₂O 0.0005, pH 7.0~7.2。

1.2.3 发酵培养基 (g/L): 淀粉 50, 玉米粉 10, 酵母粉 10, 豆饼粉 10, CaCO₃ 2.0, CoCl₂·6H₂O 0.0005, pH 7.0~7.2。

1.3 诱变和筛选方法

1.3.1 高频电子流诱变: ATCC31272 斜面菌种于

28℃培养 7d,用无菌水洗下和离心收集孢子。将孢子悬浮于 0.2% 的葡萄糖溶液中,浓度约为 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL。经 28℃摇床振荡培养 8h,分装于薄壁指形管中,用高频电子流处理。处理条件为: $f = 50\text{Hz}$, $I = 100\text{Hz}$,处理时间分别为 30、40、50、60、80 和 100s。

1.3.2 亚硝基胍(NTG)诱变:(1)Sa-76 斜面菌种于 28℃培养 7d,用 0.1mol/L Tris 与 0.1mol/L 顺丁烯二酸等量混合的缓冲液(pH 8.0)洗下孢子并离心收集。孢子重悬于该缓冲液中,浓度约为 $10^8/\text{mL}$ 随即加入亚硝基胍溶液,使其终浓度为 1.0mg/mL。因为阿维链霉菌比较耐亚硝基胍^[3],处理时间分别为 15、30、45、60、75 和 90min。处理后,离心除去亚硝基胍,用无菌水反复洗涤孢子备用^[5]。(2)Sa-76-7 和 Sa-76-8 的诱变方法与 Sa-76 的一致,只是亚硝基胍的处理时间为 60min。

1.3.3 分离和筛选:常规稀释平板法分离单菌落,挑选灰色丰满的菌落进行摇瓶发酵初筛。经初筛得到的高产菌株,再进行单菌落分离后进行复筛。初筛未做重复,复筛每个菌株设 3 个重复。

1.4 摇瓶发酵

4℃冰箱保存的菌种,用稀释平板法分离出灰色丰满的单菌落,转接于斜面,28℃培养 7~10d,待长出丰富的灰色孢子后,转接于种子培养液,经 28℃摇床培养 1d,接种 2% 于发酵培养液(500mL 三角瓶,装 100mL 发酵液)28℃摇床(转速 200r/min,偏心距 4.0cm)培养 8~10d,放瓶测定^[2,6]。

1.5 测定方法

1.5.1 菌丝体干重测定:取 50mL 发酵液,离心收集菌丝体,105℃烤至恒重。

1.5.2 发酵单位测定:采用 HPLC 法^[10]。取 1.0mL 发酵液,加入 4.0mL 的甲醇,充分振荡 30min 后,离心取上清液进行 HPLC 分析。分析条件为:北京分析仪器厂 SY5000 型高压液相色谱仪; C_{18} 反相柱,柱长 15cm,柱内径 4.6mm;流动相为甲

醇:水 = 85:15;流速为 1.0mL/min;检测波长为 246nm。根据各组份的积分面积,对照标准曲线计算其含量,各组份之和即为总发酵单位。

1.6 阿维菌素 B_1 的纯化

参考有关文献 6~10 和根据阿维菌素的性质,设计了以下适合实验室操作比较简便的提取和纯化技术:发酵液经过滤后,收集菌丝体,用约 6 倍体积的丙酮分 3 次浸泡(用量为 3:1.5:1.5),合并浸提液,经减压浓缩后,用二倍体积的乙酸乙酯萃取 2 次,经 1% 活性炭脱色后,减压浓缩得黄色油状物。加热油状物使其溶解,趁热滴入 85% 的正己烷乙醇液中,并不断搅拌,使阿维菌素的浓度达到 50000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,并可加入少量晶种,静置冷却过夜,在此条件下,只有阿维菌素 B_1 结晶^[2]。抽滤收集阿维菌素 B_1 的粗结晶,用乙酸乙酯溶解,脱色过滤,减压浓缩得到白色阿维菌素 B_1 重结晶。

1.7 光谱分析

1.7.1 紫外光谱:将样品溶于无水甲醇中,用岛津 Vis-UV-190 型分光光度计进行 200~400nm 区域的扫描。

1.7.2 红外光谱:将样品溶于四氯化碳中,点样于 KBr 盐片上,用 5DX 傅里叶变换红外光谱仪进行 400~4000 cm^{-1} 区域扫描。

1.7.3 核磁共振谱:将样品溶于氘代氯仿中,氢谱进行 0~8ppm 区域的扫描,碳谱进行 0~180ppm 区域扫描。

1.7.4 质谱测定:采用 GC-MS 质谱仪 FAB 法测定。

2 试验结果

2.1 阿维链霉菌 ATCC31272 的分化现象

ATCC31272 在平板培养基上不断分化出灰色、白色和光秃型菌落,后两种菌株经多次传代培养都稳定保持原有特征,但它们都不产生阿维菌素。灰色菌株能产生阿维菌素,但经多次分离纯化,仍不断出现白色和光秃型的菌株。它们的培养特征见表 1。

表 1 ATCC 31272 自然分化菌株的培养特征*

Table 1 The differentiation of *Streptomyces avermitilis* ATCC 31272

Type of colony	Spore mass	Aerial mycelia	Substrate mycelia	Morphology of colony
Powdery grey	Grey and plenty	White	Yellowish brown	Grey circle
White	No spore	Whith	Yellow	White circle
Bald	No spore	Non	Yellow	Yellow circle

* Cultivated 7~10d at 28℃

2.2 诱变育种

2.2.1 高频电子流诱变 ATCC31272 : 从各处理中挑取了 593 个突变株进行摇瓶发酵初筛,得到发酵单位高于出发菌株的突变株 32 株,它们大多分布在处理 50s 和 60s 的区段内(致死率为 99.6% ~ 99.7%)。经复筛后发酵单位仍高于出发菌株的有 6 株,将该 6 株菌连续传代 5 次后,进行摇瓶发酵,选出了发酵单位达 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右的 Sa-76 菌株,其中 B₁ 组份占 37%,略高于出发菌株(B₁ 组份占 34%)。

2.2.2 亚硝基胍诱变 Sa-76 菌株 : 从各处理中共挑取了 356 个突变株,它们主要分布在处理 45 ~ 75min 的区段内(致死率 98.9% ~ 99.9%)。初筛时发酵单位比 Sa-76 提高 10% ~ 40% 的有 16 株,经复筛,发酵单位仍高于 Sa-76 菌株的有 5 株。将这 5 株菌连续传代 5 次后,再进行发酵实验,从中选出了一株菌,编号 Sa-76-7,其发酵单位可达 1400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其中 B₁ 组份占 45%,比 Sa-76 菌株提高了 8%。

2.2.3 亚硝基胍处理 Sa-76-7 菌株 : 用 1.0mg/mL 的亚硝基胍处理 Sa-76-7 菌株 60min,致死率为 99.9%,初筛时发酵单位高于 Sa-76-7 的有 32 株,将这 32 株菌连续进行了 3 次复筛,最终选出一株编号为 Sa-76-8 的菌株,发酵单位达到 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,B₁ 组份占 45%。

2.2.4 亚硝基胍处理 Sa-76-8 菌株 : 再次用 1.0mg/mL 的亚硝基胍处理 Sa-76-8 菌株,初筛时发酵单位高于 Sa-76-8 的有 16 株。将这 16 株菌又连续进行 3 次复筛,选出一株发酵单位可达到 3500 ~ 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的菌株,其中 B₁ 组份占 45%,该菌株编号为 Sa-76-9。

2.3 Sa-76、Sa-76-8 与 Sa-76-9 菌株摇瓶发酵比较

通过对 Sa-76、Sa-76-8 与 Sa-76-9 菌株的摇瓶发酵状况的比较,发现 Sa-76-8 菌株的干重在发酵过程中高于 Sa-76 菌株 20%,发酵过程中发酵液残糖和 pH 的变化趋势基本一致,但进一步用正交试验优化 Sa-76-8 菌株的发酵培养基,当提高发酵培养基的淀粉和酵母粉的用量后,反而造成菌丝干重下降,发酵液变粘、发红,几乎不产生阿维菌素。Sa-76-9 菌株在相同的发酵培养基上,摇瓶发酵单位仅比 Sa-76-8 菌株提高 4% ~ 17%,但在斜面培养基上 Sa-76-9 菌株明显比 Sa-76-8 菌株生长强壮,采用正交试验进行 Sa-76-9 菌株发酵培养基的优化试验,当提高了发酵培养基的淀粉和酵母粉含量后,Sa-76-9 菌株的菌丝体干重上升,发酵单位提高可达

3500 ~ 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比 Sa-76-8 菌株提高了近 1 倍。表 2 是 Sa-76、Sa-76-8 与 Sa-76-9 的摇瓶发酵单位和菌丝体干重比较。

表 2 Sa-76、Sa-76-8 与 Sa-76-9 菌株的摇瓶发酵比较

Table 2 Comparison of the fermentation in shaking flask between Sa-76, Sa-76-8 and Sa-76-9

Strain	Titer ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	B ₁ %	B _{1a} /B _{1b}	Dry weight/ (g/100mL)
Sa-76	964	37	85/15	1.11
Sa-76-8	2065	45	85/15	1.36
Sa-76-9	3506	45	85/15	4.00

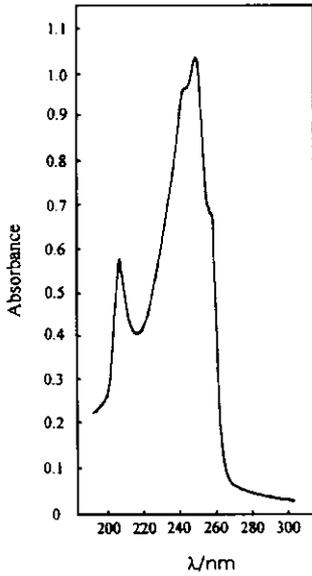
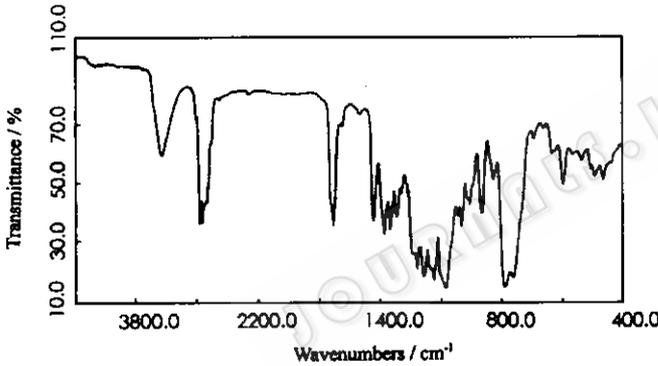
2.4 阿维菌素 B₁ 的提取和纯化

Sa-76 菌株发酵液 20L,发酵单位 870 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其中 B₁ 占 36.4%。过滤收得菌丝体 2400g,测得菌丝体效价为 6887 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。第一次加入 8000mL 丙酮,60 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌浸提 4h,过滤收得丙酮滤液 6700mL,测得滤液效价为 1564 $\mu\text{g}/\text{mL}$,浸提率为 63.4%。第二次加入 85% 丙酮 3000mL,60 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌浸提 2h,过滤收得丙酮滤液 2900mL,测得效价为 1196 $\mu\text{g}/\text{mL}$,浸提率为 21.0%。第 3 次加入 85% 丙酮 3000mL,60 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌浸提 2h,过滤收得滤液 3200mL,测得效价为 537 $\mu\text{g}/\text{mL}$,浸提率为 11.0%,3 次浸提的总浸提率为 95.4%。合并 3 次浸提液,60 ~ 70 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至约 3000mL,用 6000mL 乙酸乙酯萃取 2 次,加入活性炭脱色后减压浓缩得黄色油状物。加热融化黄色油状物,趁热滴加入 100mL 85% 的正己烷乙醇溶液中,搅拌均匀,置于冰箱中过夜结晶 B₁。第二天抽滤得微黄色粗结晶 4.7g,经 HPLC 测定 B₁ 纯度为 90%。用 200mL 乙酸乙酯重溶 B₁ 粗结晶,经活性炭脱色,减压浓缩得 4.1g 白色 B₁ 重结晶,B₁ 纯度达 97%,B_{1a} 占 85%,B_{1b} 占 15%,阿维菌素 B₁ 的总提取收率为 64.8%。

2.5 光谱、核磁共振和质谱分析

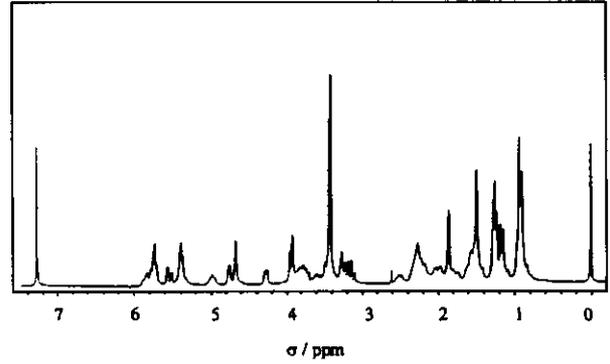
将阿维菌素 B₁ 结晶分别进行了紫外(UV)、红外(IR)、核磁共振(¹H-NMR 和 ¹³C-NMR)和质谱分析,结果均与文献所报道的相符合^[12,6](图 1,2,3;表 3)。质谱测得其 M + Na 的 m/z 为 896,故阿维菌素 B₁ 的分子量为 873,与计算值及文献报道值一致。文献中只报道了阿维菌素 B_{2a} 的紫外吸收光谱,经我们验证阿维菌素 B 各组份的紫外吸收光谱都是相同的。

3 讨论

图1 阿维菌素 B₁ 紫外吸收光谱Fig. 1 UV absorption spectrum of avermectin B₁图2 阿维菌素 B₁ 红外吸收光谱Fig. 2 IR absorption spectrum of avermectin B₁

不同菌落形态的分化菌株中,其中产灰色孢子的菌株占大多数,能产生阿维菌素;只有气生菌丝的白色菌株和只有基内菌丝的光秃型菌株占少数,但不产生阿维菌素。我们发现即使经单孢子选出的灰色菌落经传代后,仍会分化出白色和光秃菌落,而它们却是比较稳定的,一般不会恢复产生孢子。因此,在实验室和发酵生产中如不注意菌种的选择,常会出现发酵单位不稳定的现象,这在有些链霉菌中也经常

出现。这种遗传性不稳定的机制,目前尚不明了,有待研究。此外,由于阿维菌素主要存在于菌丝体中,因此在进行高产菌株选育时,需要配合发酵培养基和通气条件的改进,才能满足新菌株获得较高菌丝干重和发酵单位。

图3 阿维菌素 B₁ 核磁共振氢谱Fig. 3 ¹H-NMR spectrum of avermectin B₁表3 阿维菌素 B₁ ¹³C-NMR 的化学位移Table 3 Chemical shifts of ¹³C-NMR of avermectin B₁

Sample of avermectin B ₁					
12.0	12.9	15.1	16.4	17.7	18.4
19.9	20.2	27.5	30.5	31.1	31.2
34.4	35.2	36.6	39.8	40.5	45.7
56.3	56.5	67.2	67.7	68.1	68.1
68.3	68.3	74.9	76.1	78.2	79.1
79.3	80.3	80.3	81.8	94.9	95.7
98.5	117.9	118.3	120.3	124.7	127.8
135.1	136.2	137.9	137.9	139.6	173.7
Data from reference ^[12]					
12.0	12.9	15.1	16.4	17.7	18.4
19.9	20.2	27.5	30.6	34.3	34.3
34.3	35.2	36.6	39.8	40.5	45.7
56.4	56.4	67.3	67.8	68.2	68.2
68.4	68.4	75.0	76.1	78.3	79.4
79.4	80.5	80.5	82.0	95.0	95.8
98.5	118.1	118.4	120.4	124.8	127.9
135.2	136.2	137.9	137.9	139.6	173.7

参 考 文 献

- [1] Albers-Schonberg G, Arison B H, Chabala J C *et al.* *J. Am Chem Soc*, 1981, **103**(14): 4216~4221
- [2] Burg R W, Miller B M, Baker E E *et al.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1979, **15**(13): 361~376
- [3] Campbell W C (ed.), *Ivermectin and Abamectin*, Springer-Verlag, 1990

- [4] Fisher M H. *Pure Appl Chem* ,1990 **62** (7):1231~1240
- [5] 章名春 . 工业微生物诱变育种 . 北京 科学出版社 .1984
- [6] Miller T W ,Chaiet L ,Cole D J *et al* . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ,1979 **15** (13) 368~371
- [7] Cole D ,Goegelman R T. U S Patent 4 ,160 ,861 ,1979
- [8] Cole L J. U S Patent 4 ,160 ,083 ,1979
- [9] Goegelman R T ,Treibr L R. U S Patent 4 ,399 ,274 ,1983
- [10] Miller T W ,Wilson K E ,Ormond R E. U S Patent 4 ,160 ,084 ,1979
- [11] Mattews F J. U S Patent 5 ,077 ,398 ,1991
- [12] Albers-Schonberg G , Wallick H , Ormond R E *et al* . U S Patent 4 ,310 ,519 ,1982.

Selection of High Avermectins Producing Strain and Identification of Avermectin B₁

SONG Yuan CAO Gui-min CHEN Zhi LI Ji-lun

(*Department of Microbiology ,China Agricultural University ,Beijing 100094*)

Abstract Three types of colony , powdery gray , white and bald , were isolated from *Streptomyces avermitilis* ATCC31272. Among them , only the powdery grey one produces avermectins. Sa-76 strain was selected from the powdery grey strain by mutation with high energy electric flow , and its avermectins titer attained 100 μ g/mL in shaking flask. Avermectin B₁ was extracted and purified from the mycelia of Sa-76 , and identified by UV , IR , ¹H-NMR , ¹³C-NMR and mass spectra. After Sa-76 strain was treated twice with NTG , a strain named Sa-76-8 was selected with avermectins titer over 2000 μ g/mL. The Sa-76-8 strain was treated with NTG once again , and a high avermectins producing strain named as Sa-76-9 with avermectins titer up to 3500~4000 μ g/mL was selected.

Key words *Streptomyces avermitilis* , mutation , avermectins