

# 福堤霉素产生菌小单孢菌sp. SIPI4812原生质体的再生及其产量的提高

朱建伟 刘颐屏 朱宝泉 童 村

(上海医药工业研究院, 上海)

以福堤霉素产生菌——小单孢菌 (*Micromonospora*) sp. SIPI4812为材料进行的研究表明, 0.05%以上甘氨酸能抑制它的孢子发芽, 适当培养的菌丝体在含有消色肽酶和溶菌酶的溶菌系统中可分离原生质体达 $10^9$ /ml以上, 该菌的原生质体在营养成分相对贫乏的高氏一号合成培养基(补充高渗剂)上再生, 再生频率可达5%以上。再生菌落的产量分布较自然分离分散, 其中一株达到原株生产能力的280%。

**关键词** 小单孢菌; 福堤霉素产生菌; 原生质体再生; 菌种选育

小单孢菌 (*Micromonospora*) 是一属产生多种具有重要临床价值抗生素的微生物, 正在越来越引起抗生素研究工作者的兴趣。然而, 小单孢菌遗传学的研究仍然处于刚刚起步的阶段, 国内外仍很少有小单孢菌原生质体分离、再生、融合、以及转化等文献报道, 许多基础性的工作有待于完成。本文选择福堤霉素 (Fortimicins), 一种新近上市的毒性较小的氨基糖苷类抗生素<sup>[1]</sup>的产生菌——小单孢菌 sp. SIPI4812<sup>[2]</sup> (*Micromonospora* sp. SIPI4812, 简称M.sp SIPI4812)作为材料, 研究原生质体的分离和再生, 以及再生菌落的产量提高, 为进一步原生质体融合、DNA转化等研究工作打下基础。

## 材料与方 法

### (一) 菌种

1. M.sp SIPI4812系上海医药工业研究院从云南土壤中分离得到的一株福堤霉素产生菌。

2. 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)

ATCC6633作为福堤霉素生物效价检定菌。

### (二) 培养基

1. 斜面培养基: 高氏一号合成培养基<sup>[3]</sup>。

2. 菌丝体培养基(%) : 可溶性淀粉2, 葡萄糖0.5, 大豆蛋白胨0.5, Tryptone 0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1, pH7.0。

3. 原生质体稳定液(P稳定液) : 参照文献[4]。

#### 4. 再生培养基

R-1再生培养基: 高氏一号合成培养基 + 0.025mol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  + 0.025mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 0.2mol/L蔗糖。

R-2再生培养基(%) : Tryptone 1, NaCl 0.25, 蛋白胨0.25, 葡萄糖0.5, 蔗糖7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.37,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.57, 琼脂1.5。

R-3再生培养基: 菌丝体培养基 + 0.025mol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  + 0.025mol/L

本文于1987年9月8日收到。

本院抗生素生物检定小组陈宝莲、王晓玉协助检定福堤霉素效价, 特此致谢。

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 0.2\text{mol/L}$  蔗糖。

R-4 再生培养基: R-1 再生培养基 + Casamino acids 0.01% + 微量元素溶液<sup>[4]</sup> 0.2ml/100ml。

R-5 再生培养基: 高氏二号合成培养基<sup>[18]</sup> + 0.025mol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  + 0.025mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 0.2mol/L 蔗糖。

下列培养基等均按文献配制: R<sub>2</sub>培养基<sup>[4]</sup>, R<sub>3</sub>培养基<sup>[6]</sup>, R<sub>2</sub>YE培养基<sup>[6]</sup>, MR培养基<sup>[12]</sup>, 16<sup>+</sup>培养基<sup>[8]</sup>。

### (三) 溶菌酶

1. 溶菌酶(1): 上海禽蛋二厂产品, 活力为  $10000 \pm 2000\text{u/mg}$ 。

2. 溶菌酶(2): 上海东风生化试剂厂产品, 活力为  $10000 \pm 2000\text{u/mg}$ 。

3. 溶菌酶(3): SIGMA 公司产品, 活力为  $59200\text{u/mg}$ 。

4. 消色肽酶(Achromopeptidase): 日本和光纯药工业株式会社产品, 活力为  $1000\text{u/mg}$ 。

### (四) 原生质体的分离纯化

在装有菌丝体培养基的摇瓶(250ml)中接入孢子悬浮液, 使浓度达到  $10^6 - 10^7/\text{ml}$ , 经  $30^\circ\text{C}$ 、40—44h 振荡培养后, 收集菌丝体, 离心沉淀后( $3500\text{r/min} \times 10\text{min}$ ), 10% 蔗糖溶液洗涤 2 次, 再用 P 稳定液洗涤 2 次, 然后悬浮于含有溶菌酶的 P 稳定液中, 置  $37^\circ\text{C}$  酶解适当时间, 一定的时间间隔取样, 相差显微镜观察, 摄影。酶解结束后, 离心( $500\text{r/min} \times 3\text{min}$ ), 吸出原生质体悬浮液, 弃去离心试管底部的残留菌丝碎片。原生质体悬浮液经  $4000\text{r/min}$  离心 10min, 再用 P 稳定液洗涤 2 次, 以清除酶液, 最后悬浮于 P 稳定液中备用。

### (五) 原生质体的再生

将上述纯化了的原生质体分别用 P 稳定液和水作适当稀释后, 涂布于再生培养

基上, 置  $28^\circ\text{C}$  恒温培养。再生频率按下式计算:

再生频率(%) =

$$\frac{\text{P 稳定液稀释后长出的菌落数} - \text{水稀释后长出的菌落数}}{\text{涂布前原生质体镜检数}}$$

### (六) 菌丝体干重测定方法

参照文献[9]。

### (七) 福堤霉素效价检定

参照文献[10]。

## 实验结果

### (一) 菌丝体的培养

1. 孢子悬浮液与菌丝体培养: 接种孢子使其悬浮液的终浓度分别达  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7/\text{ml}$  等不同浓度, 置  $30^\circ\text{C}$  培养, 定时取样, 测定菌丝干重, 得到图 1 的生长曲

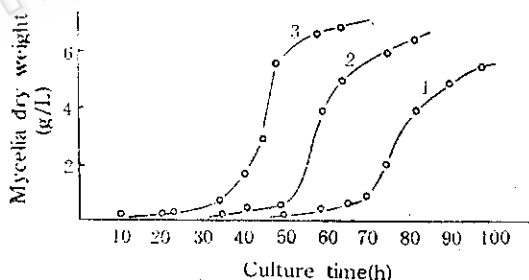


图 1 孢子浓度与菌丝生长的关系

Fig.1 Effects of the spore conc. on the growth of mycelia

孢子浓度 Spore conc. 1.  $10^5/\text{ml}$  2.  $10^6/\text{ml}$  3.  $10^7/\text{ml}$

线。由曲线可见, 少于  $10^6/\text{ml}$  菌丝生长明显缓慢, 当达到  $10^7/\text{ml}$  左右时, 40—48h 处于对数生长期, 这即所谓的微生物生长初期的“种内互助”现象。

2. 斜面孢子与菌丝体的培养: 分别取  $30^\circ\text{C}$  培养 7 天, 即孢子尚未完全成熟的斜面孢子, 培养 14 天, 即新鲜的成熟孢子, 以及在  $4^\circ\text{C}$  冰箱中贮存了 30 天左右的成熟孢子, 接种于菌丝体培养基中培养。

前两种孢子 40h 左右进入对数生长期, 菌丝体容易分离原生质体, 尤以第一种孢子, 几乎全部长成菌丝体。而第三种经贮存的孢子生长缓慢, 且相当大量的孢子不发芽, 培养得到的菌丝体中混有大量孢子, 不易与以后形成的原生质体分开, 因此, 应选择新鲜培养好的斜面作为材料。

3. 甘氨酸对孢子发芽的影响: 在菌丝体培养基中分别添加 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5% 等不同量的甘氨酸用于菌丝体培养, 孢子发芽受到不同程度的抑制 (图 2)。添加 0.1% 以上甘氨酸, 孢子发芽完全抑制。

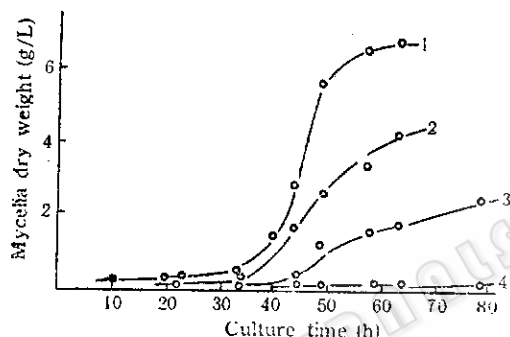


图 2 甘氨酸浓度对菌丝生长的影响

Fig.2 Effects of glycine conc. on the growth of mycelia

甘氨酸浓度 Glycine Conc. (%) 1. 0 2. 0.02  
3. 0.05 4.  $\geq 0.1$

## (二) 原生质体的分离

用相差显微镜观察原生质体分离过程, 可分为三个阶段 (照片略)。

1. 菌丝收缩阶段: 菌丝悬浮于含有溶菌酶的 P 稳定液后, 10—30min 内可观察到明显的菌丝顶端或中间的收缩现象。

2. 收缩后的菌丝开始释放原生质体阶段: 30min 后, 菌丝顶端可见细胞壁溶解, 原生质体流出。此时稍加摇动, 原生质体即可与菌丝分离。有的菌丝中间细胞壁溶解以致释放原生质体后, 菌丝断裂成碎片。

3. 大量释放原生质体阶段: 60min

后大量释放原生质体, 此时, 菌丝体悬浮液开始分层, 上层为原生质体悬浮液, 下层是残留菌丝碎片及细胞壁残余物, 此阶段持续 1h 后, 大部分菌丝被酶解。

## (三) 影响小单孢菌 sp. SIPI4812 原生质体分离的因素

1. 菌丝体生长阶段的影响: 用对数生长期前后的菌丝体进行酶解, 酶解后的原生质体悬浮液用镜检计数, 由图 3 曲线可见, 对数生长期中期 44h 以前的菌丝容易分离出原生质体, 而对数生长期后期以及静止期的菌丝体, 产生原生质体数急剧下降, 甚至不产生原生质体。

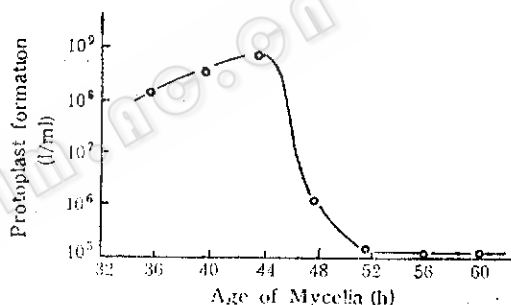


图 3 不同菌龄菌丝的原生质体形成

Fig.3 Effect of age of mycelia on protoplast formation

2. 溶菌酶对原生质体分离的影响: 我们收集了溶菌酶 1、2、3 以及消色肽酶, 配成不同浓度及各种组合, 对生长至 44h 的菌丝体进行酶解, 观察对原生质体分离的效果。图 4 表明, 单一消色肽酶或单一溶菌酶均不能有效地酶解, 而 0.5mg/ml 的消色肽酶加 1.0mg/ml 的溶菌酶则可得  $10^8$ — $10^9$ /ml 的原生质体。

3. 二级生长的菌丝体对原生质体分离的效果: 由于在菌丝培养基中添加了甘氨酸后会抑制孢子萌发, 我们采用在不含甘氨酸的菌丝体培养基中预培养 36—40h, 然后以 10% 的接种量接到含甘氨酸 0.05% 的菌丝体培养基中培养 24h。这种经二级

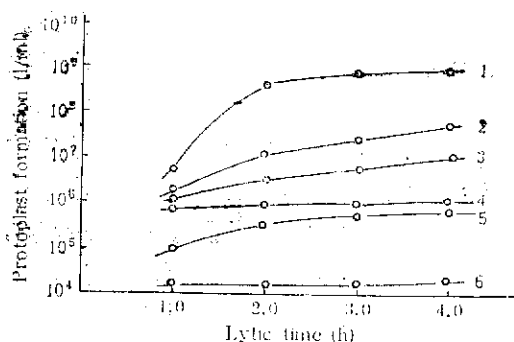


图4 不同溶菌酶对原生质体形成的影响

Fig.4 Effect of different enzymes on protoplast formation

1. 0.5mg Achromopeptidase + 1.0mg Lysozyme 3/ml
2. 0.5mg Achromopeptidase + 1.0mg Lysozyme 2/ml
3. 0.5mg Achromopeptidase + 1.0mg Lysozyme 1/ml
4. 2mg Lysozyme 3/ml
5. 2mg Lysozyme 2/ml
6. 2mg Achromopeptidase/ml

生长培养后的菌丝体对溶菌酶的敏感性大为增加, 在含有 2mg/ml 溶菌酶的酶解液中可分离原生质体达  $10^8$ — $10^9$ /ml。

#### (四) 原生质体的再生

##### 1. 原生质体再生过程的延缓现象:

纯化后的原生质体涂布于再生培养基上, 观察到原生质体再生成菌落的速度一般较孢子慢, 在 28—30℃ 下培养, 用孢子接种 5—7 天能出现菌落, 10—14 天完全长好。而原生质体再生至少要 10 天才能出现菌落, 17—20 天左右才能成熟。

##### 2. 透渗压对原生质体再生的影响:

在高氏一号合成培养基中加入 0.025mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 再分别加入 0.1、0.2、0.3、0.4mol/L 蔗糖, 观察它们对再生频率以及孢子萌发的影响。在 0.3mol/L 蔗糖浓度以上的培养基中, 无论是孢子萌发或原生质体再生均受到抑制, 0.1—0.2mol/L 蔗糖浓度时原生质体能够比较正常地再生, 再生频率达到 1.8—5.2%。在不含蔗糖的培养基上仍有 0.07% 的再生频率。孢子在 0.2mol/L 蔗糖浓度以下能正常萌发, 生长。

3. 再生培养基成分对原生质体再生的影响: 再生频率往往受再生培养基成分的变化而表现出甚大差异, 令人费解的是几乎所有的营养成分较为丰富的再生培养基, 如含有有机氮源蛋白胨、tryptone 的  $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_2\text{YE}$ 、 $\text{R}$ 、 $\text{MR}$ 、 $\text{R}-2$ 、 $\text{R}-4$ 、 $\text{R}-5$  和 16\* 再生培养基均不能使 *M. sp* SIPI4812 原生质体再生, 而营养相对贫乏的无机培养基高氏一号合成培养基在添加高渗稳定剂后, 即  $\text{R}-1$ 、 $\text{R}-4$  再生培养基上却能分别以 9.4% 和 0.4% 的频率再生。

4. 再生菌落的福堤霉素产量的变化: 在再生菌落中随机地挑选 50 个菌落进行摇瓶发酵试验, 并检定其福堤霉素效价。同时用孢子自然分离形成的菌落作对照。结果发现自然分离的菌落产量分布相对集中, 正变率为 40% 左右, 而经原生质体再生的菌落其产量分布分散, 正变率近 60%, 个别菌落的效价可达到原株的 280% (图 5)。

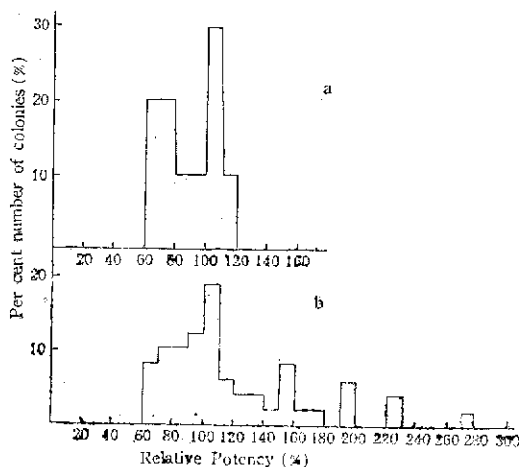


图5 自然分离菌落和原生质体再生菌落的产量分布

Fig.5 Distribution of fortimicins productivity of spore formed colonies and protoplast regenerated colonies

a. 自然分离 Spore formed colonies

b. 原生质体再生 Protoplast regenerated colonies

## 讨 论

1. 菌种鉴定表明, *M.sp.SIPI4812* 与文献报道的福堤霉素产生菌—橄榄星孢小单孢菌(*M.oliverastarspora*)相近,但在碳源利用等方面有一些差异<sup>[2]</sup>。苏联 Trenin<sup>[11]</sup>曾报道橄榄星孢小单孢菌 ATCC 21819 的原生质体分离再生方法,在菌丝体培养、酶解条件、再生条件等诸方面均与本文的实验结果有较大的差异,再生频率为 0.2—0.4%。而本文的实验条件下再生频率可达 5% 以上。本文的实验结果和 Kim<sup>[7]</sup>等报道的蔷薇小单孢菌(*M.rosaria*)的分离和再生条件相似。

2. 放线菌中原生质体分离方法研究较多的是链霉菌。小单孢菌原生质体分离再生过程和链霉菌相类似,但也有明显差异,如本文的 *M.sp.SIPI4812* 和其他一些小单孢菌对甘氨酸较为敏感,0.1% 以上几乎已经完全抑制孢子发芽。溶菌酶对小单孢菌的酶解效果较差,而绝大多数链霉菌对溶菌酶敏感,这可能是由于两者细胞壁组成上的差异所致。Kawamoto 等报道<sup>[13]</sup>,小单孢菌具有与其他微生物不同的肽聚糖结构。本文的实验表明:由溶性无色杆菌产生的消色肽酶对小单孢菌的这

种特殊细胞壁结构有着很好的酶解效果。蔗糖作为渗透压稳定剂,其浓度对小单孢菌的原生质体再生亦有明显的影响,*M.sp.SIPI4812* 在高于 0.2mol/L 蔗糖浓度的培养基上不能再生,此结果和其他小单孢菌是类似的<sup>[7,14,15]</sup>,而 0.3—0.5mol/L 蔗糖是链霉菌再生的渗透压稳定浓度。

3. 经原生质体再生可提高抗生素产生菌的生产能力,这在大环内酯类抗生素的产生菌中已有报道<sup>[16]</sup>,福堤霉素产生菌经再生后,产量分布分散,类似于诱变后产量分布为两个正态的混合分布,推测原生质体再生过程具有诱变作用或可能对再生细胞壁的结构及抗生素生物合成有影响。最近 Hotta<sup>[17]</sup>的实验已经证明,原生质体再生过程具有对抗生素产生菌的诱变作用,并引起某个酶基因的扩增。与一般的诱发突变不同的是,再生菌落的正变率较高。我们认为,这也可能是原生质体再生过程中有一个优存劣亡的筛选作用从而使正变率提高,也即是初级代谢和次级代谢产物合成途径代谢旺盛的原生质体得以再生,而引起次级代谢产物的产量正变率提高,这一推测还有待于实验证明。本文的实验结果显示原生质体再生可以同其它育种方法一样,作为菌种改良的一种手段。

## 参 考 文 献

- [1] Kyowa HAKKO, *Drugs Fut.*, 11(5):416, 1986.
- [2] 马加生等: 抗生素, 11(2):131, 1986.
- [3] 阮继生编著: 放线菌分类基础, 科学出版社, 北京, p.139, 1977.
- [4] Okanish, M.et al., *J.Gen.Microbiol.*, 80:389, 1974.
- [5] Shirahama, T.et al., *Agr.Biol.Chem.*, 45:1271, 1981.
- [6] Thompson, C.T.et al., *Nature*, 286:525, 1980.
- [7] Kim, K.S.et al., *Enzyme Microb.Technol.*, 5:273, 1983.
- [8] 朱建伟等: 医药工业, 18(3):108, 1987.
- [9] 章名春编著: 工业微生物诱变育种, 科学出版社, 北京, p.29, 1984.
- [10] 马加生等: 待发表
- [11] Trenon, A.C.et al., *AHTNB.*, 29:572, 1984.
- [12] Qgawa, H.et al., *J.Antibiot.*, 36:184, 1983.
- [13] Kawamoto, I.et al., *J.Bacteriol.*, 146(2):627, 1981.

- [14] Szvoboda, G. et al., Adv. in Protoplast Research Proceedings of the 5th. International Protoplast Symposium, Szeged Hungarg Budapest 1980.
- [15] 郑幼霞等: 全国第一次原生质体学术讨论会论文摘要, 杭州, 1984.
- [16] Ikeda, H. et al., J. Antibiot, 36(3):283, 1983.
- [17] Hotta, K., Material of Workshop on Biotechnol. of Actinomycetes in Shanghai, 1987.
- [18] Гаузе, Г.Ф.: Пути изыскания Новых Антибиотиков, издательство Академии Наук СССР Москва, 49, 1968.

## PROTOPLAST FORMATION, REGENERATION, AND STRAIN IMPROVMENT OF FORTIMICINS-PRODUCING *MICROMONOSPORA* sp. SIPI4812

Zhu Jianwei · Liu Yiping · Zhu Baoquan · Tong Cun  
(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai)

*Micromonospora* is a genus of *Actinomycetes* producing a number of important antibiotics being used in clinic chemotherapy. In this paper, growth, of mycelia, factors affecting protoplast formation, the microscopic observation of the process of protoplast formation, regeneration and the distribution of Fortimicins productivity among the protoplast regenerated colonies were investigated.

The results showed that the germination of spores was inhibited by more than 0.05% glycine in mycelium culture medium, the mycelia got from suitable culture became susceptible to Achromopeptidase mixed with Lysozyme, and more than  $10^6$ /ml protoplasts were isolated from the lytic solution. The protoplasts were regenerated with the frequency of not less than 5% as well as the distribution of fortimicins productivity of the protoplast regenerated colonies was more dispersive than that of the colonies formed from spores. The productivity of one regenerated colony was as 280% as that of starting strain SIPI 4812.

### Key words

*Micromonospora*; fortimicins-producing; protoplast regeneration; strain breeding