

抗菌素 3719 的发酵条件研究

韩宝玲 谭素琴 于益强 姚恩泰

(中国医学科学院药物研究所抗菌素系, 北京)

经鉴定,供试菌株的生物学特征与 1970 年日本发现的核糖苷链霉菌(*Streptomyces ribosidificus* strain SF-733)近似。而其代谢产物抗菌素 3719 经鉴定与核糖霉素(Ribostamycin)^[1]相同。它是具有一般氨基糖苷类抗菌素特征的广谱抗菌素,具有临床价值。由于它对耳及肾脏较安全,因而近年来在日本引起广泛的重视^[2]。

为了尽快地使其应用于医疗实践,必须提高抗菌素 3719 的产率,故进行了产抗菌素发酵条件的研究。现将结果报告如下:

材 料 和 方 法

一、孢子斜面培养基(%)

麦麸 6,琼脂 2.0—2.5,用 1/15 克分子磷酸盐缓冲液(pH7.0)配制。

二、培养基

培养基见表 1。

在温度试验中 I 为种子和发酵培养基。在

碳、氮源选择试验中, I 为种子培养基。其它试验中均以 II 为种子培养基, III 为发酵培养基。发酵试验采用 500 毫升摇瓶装 100 毫升培养基, 120℃, 30 分钟灭菌。

三、分析方法

1. pH 的测定: 用 pH 计测定 pH。

2. 糖的测定: 发酵液和等体积的 4N 盐酸混合煮沸 20 分钟,用 Folin-Malmros 法^[3]测定发酵液中的糖含量。

3. 发酵液中氮氮的测定: 用 Johnson 法^[4]测定发酵液中的氮氮。

4. 菌丝量的测定:

干重法: 取一定体积的发酵液离心去上清液,用 0.01N 的盐酸洗涤二次,离子交换水洗涤一次,然后烤干至恒重称量,以毫克/毫升表示。

体积法: 取一定体积的发酵液于刻度离心管中离心,速度为 2800 转/分,离心 10 分钟,记下菌丝体积(毫升),以百分比表示。

5. 发酵液效价的测定: 用杯碟法,检定菌为枯草芽胞杆菌 63501。以维他霉素(Vistamycin)硫酸盐为标准样品,其效价为 630 微克/毫克。

四、培养方法

将冷冻干燥管保藏的菌种接种到麦麸斜面上, 37℃ 培养 7 天,挖块接种在种子培养基中培养 48 小时,以 2% 的接种量转至发酵培养基中,发酵高峰在 144 小时至 168 小时。种子和发酵均在 225—230 转/分的旋转摇床上, 32℃ 进行培养(除温度试验外)。

表 1 培养基的组成和配比

成份 名称	I	II	III
花生饼粉	1.5	-	-
蛋白胨(上海产)	0.4	-	-
黄豆饼粉	-	2	2.5
淀粉	2	2	2
葡萄糖	1	2	1
硫酸铵	0.2	0.3	0.1
磷酸二氢钾	0.01	0.01	0.01
氯化钠	0.2	0.2	0.2
碳酸钙	0.3	0.3	0.3
pH	7.0	自然	自然

结果与讨论

一、温度对抗菌素合成的影响

据秋田英一等报道^[5], SF-733 菌的发酵温度从 25—40℃ 均可生长,其中以 35℃ 最适宜。我们采用 32℃ 和 28℃ 进行对比试验,结果说明,抗菌素 3719 产生菌的生长和抗菌素 3719 的合成适宜温度为 32℃ (见表 2)。

表 2 温度对比试验

温度 (℃)	试验项目 时间(小时)	发酵单位(微克/毫升)			
		48	72	96	120
28		12.1	160	490	500
32		13.5	535	965	1250

二、碳、氮源的种类和配比的选择

由于培养基 I 中的蛋白胨质量差异较大,而花生饼粉来源不稳定,所以选择了培养基 II 代替 I,发酵单位由 1430 微克/毫升提高到 1800 微克/毫升,为了选择较优的碳氮配比,在这个基础上进行了碳、氮、磷、氯化钠等六个因素、三

个水平的正交设计试验(见表 3)。

在 27 组培养基中,发酵单位达 2000 微克/毫升以上的有 4 组(见表 4)。而第二组和第三组发酵单位相近,在后来的摇瓶补糖试验中,第三组比第二组发酵单位提高的更明显,所以选择了培养基的第三组(即培养基 III)各营养成分的配比。其发酵单位达 2430 微克/毫升。

三、发酵过程中菌体代谢与抗菌素合成的关系

抗菌素 3719 的生物合成与总糖的利用,菌体体积和效价之间的关系(见图 1)。

从图 1 中看出:

1. 72 小时以前,菌体生长从迟滞到加速,糖利用由较慢到快,总糖迅速下降。此时菌体大量积累,体积可达 29%。由于菌体生长,24 小时前,氮含量因被利用较快而下降,24 小时后,在菌体外酶的水解作用下,将培养基中的含氮物质转化为氨氮,出现氨氮量回升,之后又随着菌体的大量摄取,氨氮下降。

2. 从 24 小时开始,发酵液中有抗菌素合成。

3. 72 小时以后残糖只有 1.1% 左右,以后变化不大,96 小时菌丝由恒定期转入自溶, pH 和氨氮回升,发酵单位在 144 小时达到高峰。

表 3 正交设计 (L_{27})

浓度(%) 水平	葡萄糖	淀粉	黄豆饼粉	硫酸铵	氯化钠	磷酸二氢钾
1	1	1	1.5	0.1	0.2	0.01
2	2	2	2	0.2	0.4	0.05
3	3	3	2.5	0.3	0.6	0.1

表 4 高发酵单位的发酵培养基配比

组别	浓度(%) 成分	葡萄糖	淀粉	磷酸二氢钾	黄豆饼粉	硫酸铵	氯化钠	碳酸钙	发酵单位(微克/毫升)		
									120 (小时)	144 (小时)	168 (小时)
1		1	3	0.01	1.5	0.3	0.4	0.3	1520	2140	2100
2		2	1	0.1	2	0.3	0.2	0.3	2505	2505	1910
3		1	2	0.01	2.5	0.1	0.2	0.3	2240	2430	1990
4		1	3	0.1	2.5	0.1	0.6	0.3	900	1670	2060
对照		2	2	0.01	2	0.3	0.2	0.3	2107	1778	1805

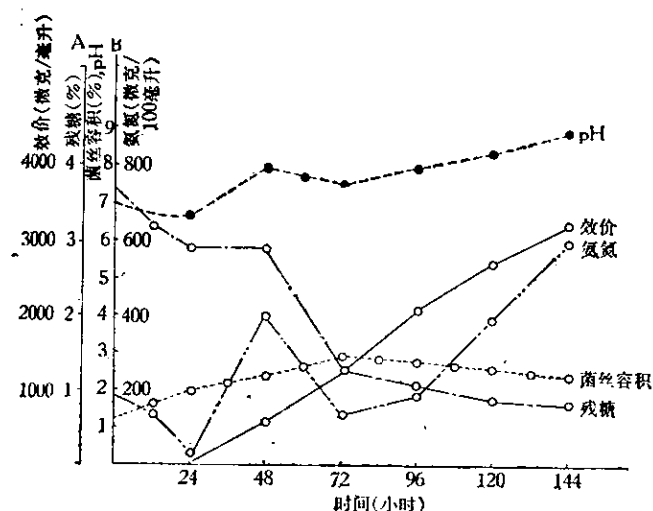


图1 抗菌素3719的发酵过程

分析此过程,正如文献所报道^[6],抗菌素合成是在生长期終了或近于終了。抗菌素3719单位则由2890微克/毫升对照上升到4042.5微

产生菌的抗菌素合成期是自72小时开始的。

据文献报道,次级代谢物合成对培养条件要求严格^[7],所以控制抗菌素3719产生菌合成期的发酵条件可能增加抗菌素的积累。

四、改变抗菌素合成期的培养条件对抗菌素合成的影响

1. 补加葡萄糖、酵母膏,硫酸对抗菌素合成的影响:一般认为葡萄糖是氨基糖苷类抗菌素生物合成的前体^[8],如果合成期加入一定量的葡萄糖,则可提高抗菌素的产量。我们在72小时和96小

表5 发酵过程中补加营养物质试验

组 别	补 加 营 养 物			发酵单位(微克/毫升)		
	种 类*	时间(小时)	用量(毫升)	120 小时	144 小时	168 小时
1	葡萄糖	48	2	900	1338	1805
2	葡萄糖	72	2	965	1850	2900
3	葡萄糖	96	2	1215	2100	1885
4 **	葡萄糖	72 96	1 1	—	2469	4042.5
5	葡萄糖 酵母膏	72	2 1	1000	2100	1570
6	葡萄糖 硫酸铵	72	2 1	1225	2200	2360
对照**				1450	2986	2890

* 各营养物的浓度均为50毫克/毫升。均用水配制。113℃,20分钟灭菌。
 ** 第四组和对照组168小时的数据统计处理为: $T = 2.24$; 自由度=10; $0.02 < P < 0.05$ 。

表6 发酵液稀释试验

组 别	瓶 装 量 (毫升)	加 水 量 (毫升)	发酵单位(微克/毫升)		
			120 小时	144 小时*	168 小时
试 验 组	90	10	2250	2714	2884
对 照 组	100	—	2497	2497	2618

* 144小时的数据处理: $T = 2.2$; 自由度=14; $0.02 < P < 0.05$ 。

克/毫升,提高了 39%,而在发酵过程中补加酵母膏,硫酸,提高产量的效果不明显。结果见表 5。

2. 发酵液稀释试验: 3719 的菌株发酵温度是 32℃,发酵周期长,所以发酵过程中菌丝大量积累,从而使发酵液粘度较大。

据文献^[9]报道,在抗菌素合成期于发酵液中加水稀释以降低粘度,可达到提高抗菌素产量的目的。

试验是用 500 毫升摇瓶分别装 90 和 100 毫升培养基,培养到 72 小时加无菌水 10 毫升,继续发酵至 120 小时,取样测定效价。结果见表 6。

表 6 表明试验组在节约原料的情况下,发酵单位提高了 11%。

参 考 文 献

- [1] Shomura, T., N. Ezaki, T. Tsuraoka et al.: *J. Antibiot.*, **23**:155—161, 1970.
- [2] 山田造一: 発酵と工業, **34**:(9), 681—685, 1976.
- [3] Folin, O., and H. Malmros: *J. Biol. Chem.*: **83**: 115, 1929.
- [4] Johnson, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **137**:575, 1941.
- [5] 秋田英一、鶴岡崇士、仁井田太郎: 特许公报, 昭-19584, 1971.
- [6] Demain, A. L.: *Lloydia.*, **31**:(4), 395, 1968.
- [7] 中山清: 微生物通报, **5**:(3), 18—32, 1978.
- [8] Kenneth, L. Rinehart Jr. and M. R. Slroshaea: *Antibiot.* **29**: (4), 319, 1976.
- [9] Ryu, D. Y. and A. E. Humphrey: 発酵工学雑誌 **50**:(6) 424—431, 1972.