

# 红霉素链霉菌 13-123、9-203 菌株的选育和发酵研究

张筱玉 邹美云 俞学琴

(上海第三制药厂, 上海)

陈孝康\*

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

红霉素是大环内酯类抗生素中最早生产的一种。我们采用快中子、 $\text{CO}_2$  激光诱变, 得到了 13-123、9-203 二株菌, 并通过研究发现, 它们对前体和无机磷等有特殊要求, 现将实验结果报道如下。

## 材 料 和 方 法

### 一、出发菌株

*Streptomyces erythreus* 1-36

### 二、培养基

1. 斜面培养基 (%): 玉米浆 1, 淀粉 1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3,  $\text{NaCl}$  0.3,  $\text{CaCO}_3$  0.25,  $\text{pH}$  7.0-7.2。

2. 分离培养基: 同上。

3. 种子培养基 (%): 淀粉 4, 糊精 2, 葡萄糖 1, 黄豆饼粉 1.5, 蛋白胨 0.5,  $\text{NaCl}$  0.4,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.25,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02,  $\text{CaCO}_3$  0.6, 自然  $\text{pH}$  6.8。

4. 发酵培养基 (%): 黄豆饼粉 4, 葡萄糖 5, 淀粉 4,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05,  $\text{CaCO}_3$  0.6, 自然  $\text{pH}$  7.0 左右。前体为 1% 丙醇, 当种子培养液接入发酵培养基时一次加入。

种子培养基在旋转式摇床上培养 48 小时, 以 8% 接种量接入发酵培养基,  $28^\circ\text{C}$  培养 8 天, 用生物检定法测定效价, 检定菌为金黄八叠球菌 (*Sarcina aurescens*) PC1001。

### 三、诱变因素和处理方法

1. 快中子处理: 以生理盐水制成单孢子悬液, 置小试管内, 以不同剂量的快中子处理。

2.  $\text{CO}_2$  激光处理: 选择大小相似的单菌

落, 以  $\text{CO}_2$  激光在一定距离下直接照射不同时间, 然后取孢子进行分离。处理后的孢子在分离培养基上  $37^\circ\text{C}$  培养 10 天, 挑选部分菌落进行摇瓶筛选。

## 结 果 与 讨 论

### 一、13-123、9-203 菌株的选育

(一) 快中子对红霉素链霉菌的诱变效应

我们比较了快中子与紫外线对红霉素链霉菌的致死作用, 结果见表 1。

表 1 快中子、紫外线对红霉素链霉菌致死作用的比较

快 中 子		紫 外 线	
剂量(千拉得)	孢子死亡率(%)	剂量(秒)	孢子死亡率(%)
120	99.86	150	99.7
60	97.49	120	93.3
40	96.00	90	84.6
30	91.8	60	69.5
15	68.9	45	57.1
10	57.7	30	37.8
4	7.1	15	26.7
2	1.2		

结果表明, 随着快中子处理剂量的提高, 孢子死亡率也升高, 至 30 千拉得 (Krad) 死亡率达 91.8%, 但继续增加剂量, 孢子死亡率增高甚微。紫外线处理引起的孢子死亡率随剂量的增加而升高。

不同剂量快中子处理后的孢子, 经摇瓶筛选比较, 以 15 千拉得处理过的孢子产量变异幅度较大, 正变株占的比例较多, 见图 1。从中得

\* 参加本试验的部分工作。

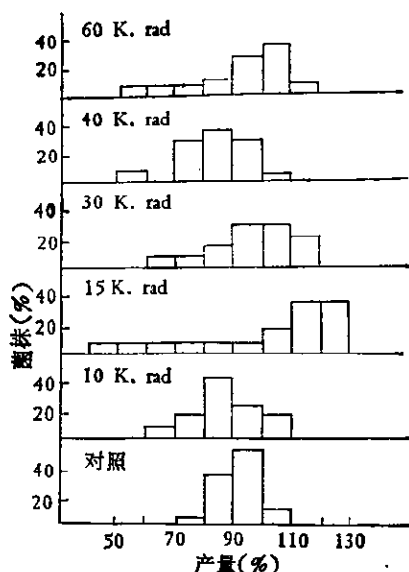


图1 快中子诱变红霉素链霉菌产量分布图

到的13-123菌株,产量较出发菌株高26%。

## (二) CO<sub>2</sub>激光对红霉素链霉菌的诱变效应

CO<sub>2</sub>激光对红霉素链霉菌有明显的致死作用,结果见表2,对产量的影响亦较显著,见图2,从照射3分钟后得到的9-203菌株较生产菌株高26%。

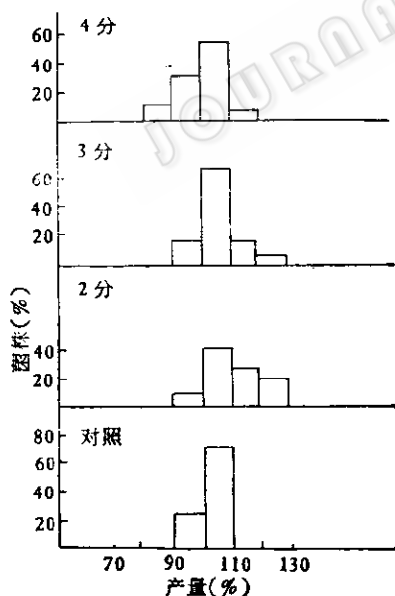


图2 CO<sub>2</sub>激光诱变红霉素链霉菌产量分布图

## 二、丙酸对红霉素发酵的影响

红霉素发酵,长期采用丙酸作前体,并以丙

表2 CO<sub>2</sub>激光对红霉素链霉菌引起的致死作用

CO <sub>2</sub> 激光照射时间(分)	孢子浓度(个/毫升)	死亡率(%)
1	$1.59 \times 10^3$	20.7
2	$1.04 \times 10^3$	48.0
3	$5.76 \times 10^2$	71.2
4	$4.13 \times 10^2$	79.35
对照	$2.0 \times 10^3$	—

酸原液分次加入,因而引起pH剧烈的变化,培养液的浓度亦有下降趋势。针对上述问题,采用稀释丙酸的方法,用不同浓度的丙酸作前体,比较红霉素产量,结果见表3。

结果表明,当丙酸稀释至16%及8%并分别添加至0.5%时,其效价分别为丙醇的60.8—85.5%,如再多加菌丝要自溶。以丙醇为前体的菌体生长正常,发酵液很稠。而1-36菌株与此相比,在以丙酸原液及稀释成50%加入时,菌丝自溶较上二菌株少,因此有效价产生,但效价仍以丙醇最高。

Holyiva等<sup>[1]</sup>研究了红霉素链霉菌高、低

表3 不同浓度的丙酸对红霉素产量的影响

效价(%)	稀释度和 加入量						
		菌株	加1%丙酸	加0.2%丙酸原液	50%丙酸加0.2%	16%丙酸加0.5%	8%丙酸加0.5%
	9-203	100	0	<5	60.8	85.5	
	13-123	100	0	<5	77.7	80.0	
	1-36	100	<10	30.5	57.3	62.5	

产菌株利用丙醇的速度和丙酸酯激酶的活性存在明显差异。高产菌株的丙醇利用率为低产菌株的4—5倍。由于高产菌株的丙酸酯激酶活性高,因而高产菌株的丙醇利用速度与红霉素形成速度都快。Brinberg等<sup>[2]</sup>用气-液色层法研究了红霉素生物合成过程中丙醇消耗的动力学指出,红霉素生物合成与培养基成分及其中的丙醇含量有关,丙醇的合适浓度又与培养基的成分有关。我们选育出的13-123、9-203两个菌株均对丙酸很敏感,利用丙酸的速度及丙酸酯激酶的活性是否亦存在上述差异,有待进一

步研究。

### 三、磷酸盐浓度对红霉素发酵效价的影响

根据摇瓶试验结果,磷酸盐浓度对红霉素产量有很大影响。13-123、9-203 及 1-36 菌株

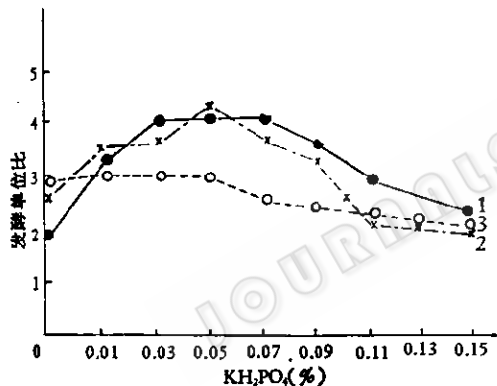


图3 三个菌株在不同磷酸盐浓度下发酵的效价比  
1为13-123菌株;2为9-203菌株;3为1-36菌株。

在发酵培养基中添加不同浓度的磷酸盐发酵效价比的变化,见图3。

图3表明,13-123、9-203菌株在缺乏 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 时,效价明显降低。过量的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 又使效价急剧下降,以9-203尤为明显。二菌株以添加0.05%左右的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 较为适宜。但如果培养基中成分改变或原材料中无机磷含量有增减,则 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 的添加量必须作相应的调整。而1-36菌株对此影响较小。在13-123、9-203菌株投产过程中根据其特性改进工艺,使新菌株用于生产,明显地提高了产量。

### 参 考 文 献

- [1] Holyivac, M. and Vlasic, D.: Abstracts of papers fifth international symposium, 145, 1976.
- [2] Brinberg, L. S. et al.: *Antibiotiki*, 21(1): 27-30, 1976.