

小诺霉素单组份菌种选育及发酵条件研究

杨 丽¹ 刘亦凡¹

周清莲² 王繁业²

(青岛化工学院化工系 青岛 266042)¹

(青岛第二制药厂 青岛 266021)²

摘要: 以棘孢小单孢菌 A-23 为出发菌株, 用常规诱变育种为主, 结合综合处理方法, 如原生质体, 紫外线照射, 电融合再生, 激光照射, 在 8-甲氧基补骨脂素存在下用近紫外光照射, 氯化锂和紫外线复合处理等方法, 以及自然分离纯化, 经多代选育, 得到高产菌株 MS-116, 其发酵后小诺霉素主组分含量为 85% 以上; 同时研究了最佳发酵条件和培养基配方, 进行了 30t 发酵罐放大试验。

关键词: 小诺霉素, 单组份, 突变株, 发酵

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-04-0257-04

BREEDING OF SINGLE COMPONENT SAGAMICIN-PRODUCING STRAIN AND STUDIES ON FERMENTATION CONDITIONS

YANG Li¹ LIU Yi-Fan¹ ZHOU Qing-Lian² WANG Fan-Ye²

(Chemical Engineering Dept., Qingdao University of Chemical Technology, Qingdao 266042)¹

(Qingdao No.2 Pharmaceutical Factory, Qingdao 266021)²

Abstract: Micromonospora echinospora A-23 was screened through protoplast UV-ray, electrofusion regeneration, near ultraviolet light in presence of 8-methoxypsoralen, combined treatment of LiCl and UV-ray, etc, and isolated single colonies with natural selection. A high and stable sagamicin-producing strain MS-116 was obtained through several-decade generations of the treatment. The main component content increased to over 85%. The culture medium and the effective factors on fermentation was also studied. Trial-production by 30 ton-fermentor indicated that the strain is high and stable is high and stable sagamicin-producing strain for industrial production.

Key words: Sagamicin, Single component, Mutants, Fermentation

小诺霉素(Sagamicin)是由棘孢小单孢(Micromonospora echinospora)突变株在代谢过程中产生的氨基糖甙类抗生素,它是一种抗菌作用强,毒性低的广谱抗生素,主要用于治疗绿脓杆菌、变形杆菌、沙门氏菌引起的病症,如败血症、支气管扩张、肺炎、脑膜炎、肾盂炎、膀胱炎等,且对耐卡那霉素等药物的大肠杆菌、荚膜杆菌、肠道细菌等球菌有效。小诺霉素菌种发酵得到小诺霉素组份(6'-N-甲基庆大霉素 C_{1a}, 又称 C_{2b})和 C_{1a} 组份^[1], 91 年投产时, C_{1a} 副产

物组份含量在 50% 左右, 经多年诱变育种及发酵工艺调控, 小诺霉素主要组份 C_{2b} 含量逐步上升, 为进一步提高小诺霉素生产水平, 在原有基础上运用原生质体紫外线照射、电诱导融合、再生、激光照射、化学物质诱变等复合方法进行选育, 筛选出不仅发酵效价高且主组份含量亦高的菌株, 简化分离工艺, 使之成为单组份菌株; 同时对该菌株进行了工艺条件优化研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

棘孢小单孢 (*Micromonospora echinospora*) A-23.

1.2 培养基

斜面 and 分离培养基: 可溶性淀粉 10g, 氯化钠 0.5g, 磷酸氢二钾 0.3g, 硝酸钾 1g, 天冬素 0.02g, pH7.5, 定容 1L.

种子培养基: 黄豆饼粉 15g, 葡萄糖 1g, 玉米粉 20g, 鱼粉 2g, 淀粉 40g, pH7.5, 定容 1L.

发酵培养基: 葡萄糖 5g, 淀粉 40g, 玉米粉 15g, 黄豆饼粉 25g, 蛋白胨 2g, 硫酸铵 0.5g, pH7.2, 定容 1L.

再生培养基: 斜面培养基添加蔗糖 68g, 氯化镁 10g, 定容 1L.

P 稳定液: 见文献 [2].

1.3 试剂

溶菌酶: 上海东风生化试剂厂产品.

8-甲氧基补骨酯素 (8-MOP): 美国 Sigma 公司产品.

1.4 原生质体的制备 + UV 诱变 + 电融合再生

将试验菌株 A-23 的孢子接种到补充 0.3% 甘氨酸的种子培养液中, 34℃ 摇床: 230r/min, 培养 65h 至对数生长期, 离心收集菌丝体, 用 0.3mol/L 蔗糖溶液洗涤一次, 用 P 稳定剂洗涤一次, 菌丝悬于 P 稳定液中, 加入溶菌酶, 用量 5mg/L, 溶菌温度 34℃, 保持 3h, 用 253.7nm 的 UV 照射不同时间后, 放置于 100V/cm 高频交流电场, 脉冲处理加 PEG 诱导融合, 涂布再生斜面, 培养后分离筛选^[3].

1.5 诱变处理方法

1.5.1 8-MOP + NUV 诱变^[4]: 8-MOP 适量与试验菌种孢子悬液混合放置 1h 后, 置于 366nm 近紫外光下照射.

1.5.2 氯化锂 + UV 诱变: 供试菌株孢子悬液, 用 0.3mol/L LiCl 浸泡处理用 253.7nm 的 UV 照射, 红灯下稀释分离.

1.5.3 激光诱变^[5]: 利用波长 632.8nm, 30mw 的

激光照射试验菌株的孢子悬浮液, 照射斑直径 1.0cm, 吸取不同照射时间的孢悬液, 涂斜面分离.

1.5.4 其他化学诱变方法: 分别用 0.3mol/L 甲基磺酸乙脂 (EMS) 和 3mol/L 亚硝基胍 (NTG) 与试验菌株孢悬液混合振荡, 稀释后涂斜面分离, 挑选菌落测效价.

1.6 组分测定

见文献 [6].

2 结果与讨论

2.1 A-23 菌株选育谱系

以 A-23 为出发菌株, 经过一系列复合诱变, 选育出主要组分 C₂₆ 占 86.6%, 摇瓶效价 1320U/mL 的菌株 MS-116, 从图 1 可以看出, 试验菌株经生成原生质体、UV 照射后电融合再生, 菌种生产能力提高最大.

菌株	C ₂₆ 组分 (%)	效价 (U · mL ⁻¹)
A-23	50.0	950
↓ UV, NTG NS		
MS-04	55.0	1090
↓ LASER MSE NS		
MS-28	63.4	1170
↓ 原生质体 + UV + 电融合再生		
MS-32	77.5	1200
↓ LiCl + UV, NS		
MS-43	82.3	1260
↓ 8-MOP + NUV, NS		
MS-116	86.6	1320

图1 菌种A-23诱变育种谱系

2.2 甘氨酸对菌龄及原生质体形成的影响

正常生长的棘孢小单孢菌丝体, 难以用溶菌酶消化细胞壁, 加入甘氨酸后, 菌丝生长受到一定抑制, 且浓度越大, 抑制作用越强, 图 2 显示加入 0.3% 的甘氨酸后, 菌丝的对数生长期推迟约 20h, 正常菌丝的对数期出现在 40~50h, 因而在 65~70h 时加入溶菌酶, 此时易形成原生质体.

2.3 菌株 MS-116 遗传稳定性实验

将 MS-116 接种到斜面培养基上进行传代, 挖块接入发酵培养基中, 34℃ 振荡培养 6d, 取

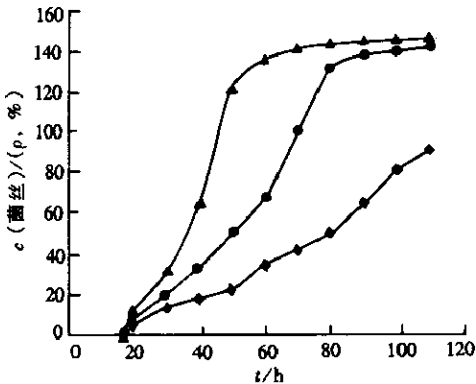


图2 甘氨酸对菌丝生长速度的影响
—▲— 不加甘氨酸, —●— 0.3%甘氨酸,
—◆— 0.4%甘氨酸

表1 MS-116菌株遗传稳定性

代数	1	2	3	4	5	6	7	8
生物效价($U \cdot ml^{-1}$)	1300	1360	1340	1320	1280	1330	1290	1280
C_{2b} 组分(%)	86.6	85.2	86.3	85.5	86.7	85.8	85.7	86.2

表2 MS-116菌株在不同温度下发酵的情况

温度($^{\circ}C$)	30	32	34	36	38
生物效价($U \cdot mL^{-1}$)	1000	1230	1330	980	700
C_{2b} 组分(%)	80.8	83.5	85.7	70.2	50.0

黄豆饼粉是小诺霉素发酵过程中主要氮源,由于原料供应问题,做了在发酵培养基中使用溶媒萃取和热榨黄豆饼粉对 MS-116效价和组分影响的考察试验,见图 3、图 4。从图中可以看出黄豆饼粉对菌株效价和组分的影响显著,合适的比例应为 3.0%,应使用热榨黄豆饼粉,溶媒萃取黄豆饼粉可能残留部分溶媒,对 MS-116

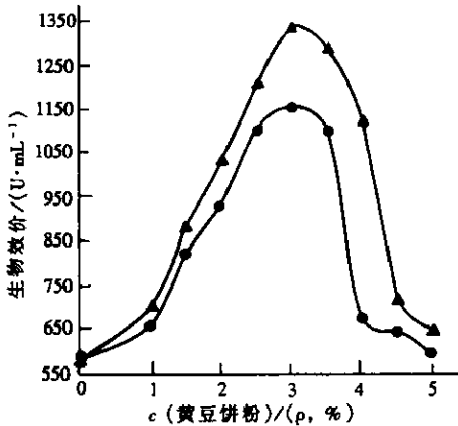


图3 黄豆饼粉对MS-116效价的影响
—▲— 热榨黄豆饼粉, —●— 溶媒萃取黄豆饼粉

发酵液测生物效价及 C_{2b} 有效组分含量,表 1 结果说明 MS-116遗传性较稳定, C_{2b} 组分维持 85% 以上。

2.4 菌株 MS-116发酵条件研究

2.4.1 温度对 MS-116发酵的影响: MS-116 在不同温度下进行发酵,结果见表 2,发现温度在 30~34 $^{\circ}C$ 能正常产生小诺霉素,且主要组分含量较高,超过 36 $^{\circ}C$,效价迅速下降,组分发生变化,可能是由于温度升高,促使产物合成酶系及 N-甲基化作用酶系受到影响所致^[7]。因而小诺霉素发酵温度应控制在 32~34 $^{\circ}C$ 。

2.4.2 黄豆饼粉对 MS-116效价及组分的影响:

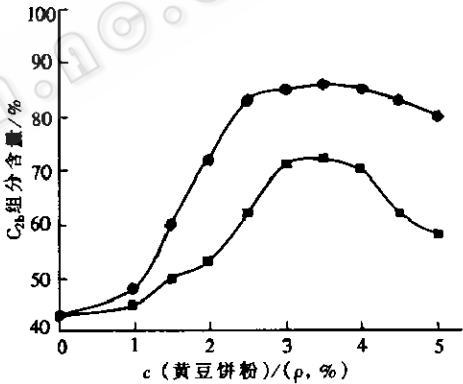


图4 黄豆饼粉对MS-116组分的影响

—●— 热榨黄豆饼粉, —■— 溶媒萃取黄豆饼粉
发酵造成影响。

2.4.3 葡萄糖对 MS-116效价及组分的影响:在发酵培养基中改变葡萄糖浓度进行实验,结果见图 5,葡萄糖浓度在 0.2% 时,MS-116效价达 1330u/mL, C_{2b} 组分含量为 85.5%,而随葡萄糖浓度的升高,主要组份含量下降迅速,具体机理尚不清楚,有待进一步研究,可能与葡萄糖效应有关。

2.4.4 供氧对 MS-116发酵的影响:用 500mL 三角烧瓶在其它条件相同的情况下,仅装量不同进行发酵试验,结果见表 3,表明 MS-116对氧的需求较高,这与产量高的菌种代谢旺盛,需氧量相应增加相一致,在实际生产过程中应注

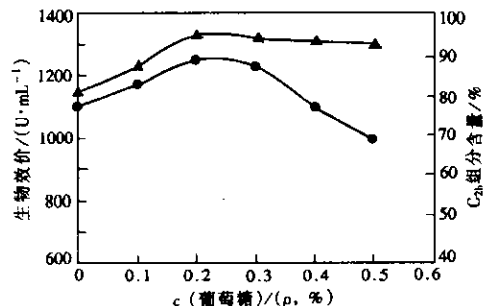


图5 葡萄糖对MS-116发酵的影响

—▲— 生物效率, —●— C_{2b}组分含量

表3 不同摇瓶装量对MS-116发酵的影响

装量(mL)	生物效率(U·mL ⁻¹)	C _{2b} 组分(%)
40	1256	88.0
60	989	65.3
80	0	0

意改善供氧状况。

2.5 30t 发酵罐试验

使用单组份菌株 MS-116, 在原工艺基础上根据以上发酵条件的研究, 对发酵工艺及培养基进行优化及调整, 经 30t 罐 5 批生产考察, 结果见表 4, 菌株 MS-116 产小诺霉素 C_{2b} 组份经高压液相色谱分析为 85.6%, 比出发菌株提高 71.2%, 效价提高 32.3%, 发酵指数提高 38.2%。

表4 菌株MS-116和A-23 30t发酵罐发酵水平比较

菌种	MS-116	A-23
放罐平均效价(U·mL ⁻¹)	1257	950
发酵周期(h)	144	144
放罐体积(m ³)	23.5	22.5
C _{2b} 组分(%)	85.6	50.0
发酵指数(10 ² ·U·h ⁻¹ ·m ⁻³)	0.0684	0.0495

3 结论

原生质体形成, 配合物理、化学因素诱变后融合再生, 可明显提高菌株的优良性状。这主要是因为, 在细胞壁脱除后, 对外界理化因子较敏感, 通过定向筛选, 可以获得目的产物合成酶系活力较高的菌株; 而且新菌株细胞壁的通透性可能会发生改变, 这样既增加了外界诱变因子的敏感性, 又有利于产物向菌体外分泌; 减少体内积累, 解除产物抑制, 获得高产的单组分菌株。

筛选出的 MS-116 菌株生理特性与出株有所不同, 对其发酵条件进行研究, 认为最适宜温度应控制在 34℃, 其对氧的需求量较大, 应注意改善供氧状况; 培养基中应使用热榨黄豆粉饼, 浓度为 3.0%; 葡萄糖浓度为 0.2%。

30t 发酵罐试验小诺霉素 C_{2b} 组份经高压液相色谱分析为 85.6%, 已达到 85% 卫生部颁标准, 这将使小诺霉素生产工艺大幅简化, 提高收率、降低成本, 带来较大的社会效益和经济效益。

参 考 文 献

- [1] 赵敏, 范瑾, 胡小玲等. 中国抗生素杂志, 1997, 22(1): 12~15.
- [2] 王洪洲, 郑幼霞. 遗传学报, 1982, 9(3): 172~179.
- [3] Ogawa H, Imai S, Statoh A et al. J. Antibiot, 1983, 36(2): 184~188.
- [4] 还连栋, 柳君科, 庄增辉等. 抗生素, 1987, 12(2): 120~126.
- [5] F. T. 阿克雷主编. 激光器. 激光手册编译组. 科学出版社, 1980, 23~48.
- [6] 朱金山等. 医药工业, 1979, 9: 5~10.