

# 去甲基金霉素发酵的研究

刘若莹 韩宝玲

吴 铨

陈耀鸿

(中国医学科学院药物研究所) (北京药品生物制品检定所) (华北制药厂抗菌素研究所)

我们在1971年用紫外光照射处理金霉素链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*) 38, 获得颜色变株38-2, 经鉴别证明此菌株除产生金霉素和四环素外, 还产生去甲基金霉素。

同年开始进行去甲基金霉素试制研究, 由38-2菌株的原始发酵单位100—150单位/毫升出发, 通过一系列发酵试验, 改进了有机氮源, 采用甲基化抑制剂——磺胺嘧啶和改善发酵条件, 则显著地提高了发酵单位, 一般平均能稳定在1000—1500单位/毫升与此同时, 用紫外线处理38-2, 获得变株38-2-14, 经过一系列鉴别结果, 确定变株38-2-14不产生金霉素, 仅产生去甲基金霉素和去甲基四环素, 对此变株, 我们也进行了一些发酵研究, 现报告如下。

## 试验材料和方法

### (一) 菌种

金霉素链霉菌38-2号(*Streptomyces aureofaciens*) 38-2及其变株38-2-14号。检定菌为蜡样杆菌(中检63509)。

### (二) 培养基成分及培养条件

1. 孢子培养基 麸皮5%, 琼脂2%, 另加0.005%,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 自然pH, 用砂土孢子接种, 在37℃培养4天到5天。

#### 2. 种子母瓶培养

培养基成分: 淀粉4%, 黄豆饼粉2%, 酵母粉0.5%, 盐0.2%, 蛋白胨0.5%, 硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  0.5%, 磷酸二氢钾 $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$  0.02%, 硫酸镁 $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$  0.025%, 碳酸钙 $(\text{CaCO}_3)$  0.4%, 自然pH, 120℃灭菌30分钟。

培养条件: 摇瓶装量: 750毫升三角烧瓶装量120毫升, 由斜面菌块接种, 在28℃振荡培养42—48小时, 镜检: 二级菌丝约50—80%, 原生质大部分已分化, 培养液呈深红棕色或深棕色即可转种。

### (三) 发酵

#### 1. 基础培养基<sup>[1]</sup>

棉子饼粉4.5%, 淀粉4.5%, 氯化铵 $(\text{NH}_4\text{Cl})$  0.15%, 酵母粉0.15%, 碳酸钙1%, 自然pH, 自来水。

#### 2. 培养条件

(1) 摇瓶培养: 750毫升三角烧瓶装量120毫升, 种龄42—48小时, 接种量6%—12%, 培养温度27—28℃, 培养时间96—120小时, 摇床式样为迴旋式。

(2) 发酵罐发酵条件: 温度27—28℃, 通气量0—24小时内1:0.6或1:0.9, 24小时以后1:1.1或1:1.4, 搅拌连续式, 种龄40—48小时, 发酵周期: 120—144小时, 装置: 种子罐和发酵罐各装1/2。

#### 3. 发酵中间分析

(1) 抗菌素检定: ①化学法。发酵液的总效价(含金霉素和去甲基金霉素)测定, 将发酵液加6N HCl于沸水浴中加热处理, 用72型分光光度计在520毫微米测光密度计算。去甲基金霉素测定: 先将发酵液用稀酸在沸水浴中加热处理, 用同样方法由光密度计算出金霉素的含量, 二者相减即得去甲基金霉素。②生物法。检定菌为蜡样杆菌, 用杯碟法测定。总效价直接用发酵液测, 去甲基金霉素的测定则将发酵液先用稀酸在沸水浴中水解, 破坏金霉素后测定; 如不含金霉素, 则可直接用发酵液测定。

(2) 其他分析: 金霉素与去甲基金霉素的鉴别, 用纸层测Rf值<sup>[2]</sup>, 菲林氏法测定总糖, 甲醛法测定氨基氮, 电极用pH计测pH, 菌丝形态用美兰染色后在显微镜下观察。

## 结果与讨论

### (一) 不同氮源对去甲基金霉素产生的影响

根据资料报道<sup>[1]</sup>, 去甲基金霉素发酵, 一般采用棉子饼粉, 为了提高去甲基金霉素的产量, 我们以棉子饼

表1 不同氮源对产生去甲基金霉素的影响

氮源	第一次试验			第二次试验		
	pH	化学效价 (单位/毫升)		pH	化学效价 (单位/毫升)	
		总	去甲 基金 霉素		总	去甲 基金 霉素
黄豆饼粉 4.5%	6.86	1190	315	6.71	940	295
花生饼粉 4.5%	6.98	760	335	6.78	725	315
棉子饼粉 4.5%	7.14	540	140	6.82	425	240

粉培养基作为基础培养基,用 38-2 进行菌株比较了三种氮源,结果如表 1。

由表 1 可以看出,三种氮源中其总效价和去甲基金霉素的产量,都以棉子饼粉为最低,在总效价中,则以黄豆饼粉为氮源最佳,由此可以认为黄豆饼粉为氮源,有利于四环素族抗菌素之合成。

## (二) 种龄与接种量对去甲基金霉素产生的影响

为了观察种子瓶的种龄和接种量对发酵中去甲基金霉素产生的影响,我们用 38-2 菌株试验母瓶的不同生长时间,和不同的接种量,在以黄豆饼粉—淀粉培养基作发酵培养基进行试验,结果如表 2。

表 2 母瓶种龄和接种量对产生去甲基金霉素的影响

处理	pH	化学效价 (单位/毫升)		生物效价 (单位/毫升)	
		总	去甲基金霉素	去甲基金霉素	
种龄 (小时)	24	6.90	1320	440	293
	36	6.89	1400	400	286
	48	6.89	1570	450	284
	72	6.96	1570	310	316
接种量 (%)	3	7.00	1230	350	321
	10	6.98	1230	300	316
	20	7.03	1520	444	335
	30	6.98	1750	550	367

从表 2 的结果看,种龄在 24 小时到 72 小时的范围内效价没有太大的影响,但由菌丝形态看来,24—48 小时为菌丝生长第二阶段(即二级菌丝生长阶段),一般以此时接种较好。至于接种量,则以 3%—20% 都可以用。

## (三) 消沫剂的种类及用量对去甲基金霉素产生的影响

文献报道<sup>[3]</sup>,在去甲基金霉素发酵过程中,一般加猪油或米糠油,具有消沫和刺激去甲基金霉素产生的作用。我们用 38-2 菌株,加不同种类和不同量的消沫剂于棉子饼粉作氮源的培养基中试验,结果如表 3(摇瓶试验)。

由表 3 看出猪油和米糠油不具有特殊刺激作用。我们在罐上采用玉米油作消沫剂。

## (四) 不同浓度的磺胺嘧啶(SD)对去甲基金霉素产生的影响

文献指出<sup>[4]</sup>,加磺胺嘧啶(SD)于金霉素发酵培养基中,可以抑制金霉素的甲基化作用。由于 SD 干扰 1-碳(1-C)运转机制的结果,有可能促使形成去甲基

金霉素。为了提高去甲基金霉素在发酵中的效价,我们用 38-2 菌株,并选用有利于合成金霉素总效价之氮源黄豆饼粉为氮源的培养基,加不同量的 SD 进行试验,

表 3 消沫剂的种类和用量对 38-2 菌株产生去甲基金霉素的影响

消沫剂 V/V	第一次试验			第二次试验		
	pH	化学效价 (单位/毫升)		pH	化学效价 (单位/毫升)	
		总	去甲基金霉素		总	去甲基金霉素
粗米糠油 3%	6.75	1775	375	7.02	1025	325
细米糠油 3%	6.69	1800	300	6.98	1910	460
玉米油 3%	6.75	1840	350	6.98	1940	590
玉米油 5%	6.66	1270	325	6.97	1900	590
玉米油 7%	6.61	1255	295	6.95	1900	665
合成消沫剂 0.03%	6.88	1765	325	6.91	1940	705
合成消沫剂 0.06%	6.91	1225	350	6.93	1225	400
猪油 3%	—	—	—	6.98	1725	425
对照(不加)	6.95	1740	465	7.01	1810	575

表 4 不同浓度的 SD 对 38-2 菌株产生去甲基金霉素的影响(摇瓶试验)

磺胺嘧啶浓度 (微克/毫升)	试验一				试验二			
	pH	生物效价 (单位/毫升)		pH	生物效价 (单位/毫升)			
		总	去甲基金霉素		总	去甲基金霉素		
30	6.95	1215	728	7.29	1462	1229		
50	7.40	1213	817	7.58	1292	1045		
100	7.31	1129	701	7.30	1156	1076		
200	7.14	547	381	7.20	611	552		
500	7.15	432	304	6.90	405	262		
750	6.96	442	302	6.90	435	348		
1000	6.89	372	262	6.92	526	367		
2000	7.42	375	217	7.28	704	571		
5000	7.00	598	366	7.00	397	286		
对照(不加)	7.41	1522	509	7.59	1065	921		

结果如表 4。

从表 4 的结果看出,加 SD 于黄豆饼粉—淀粉培养基中,对 38-2 菌株产生去甲基金霉素有刺激作用,其适宜浓度为(30—100 单位/毫升),如磺胺嘧啶浓度在 200 单位/毫升以上,则效价显著下降。

## (五) 黄豆饼粉—淀粉培养基中加 SD 40 微克/毫升在发酵罐上的试验

进一步扩大这一条件试验,所得结果如表 5。

表 5 的结果说明,摇瓶发酵与发酵罐扩大试验的结果是一致的,这就充分说明,黄豆饼粉作氮源能显著

提高金霉素与去甲基金霉素的总产量,在此基础上添加一定浓度的SD后,由于抑制了甲基化,而使去甲基金霉素的产量大大提高。

表5 SD对去甲基金霉素产量的影响

条 件	生物效价 (单位/毫升)		化学效价 (单位/毫升)	
	总	去甲基金霉素	总	去甲基金霉素
棉子饼粉 4.5%	796	336	859	437
黄豆饼粉 4.5%	3647	619	2800	900
黄豆饼粉 4.5%+SD40 微克/毫升	2602	1334	2800	1520
黄豆饼粉 4.5%+SD40 微克/毫升	2206	1696	3120	1920

### (六) 去甲基金霉素发酵过程中培养液的化学变化

我们利用38-2菌株,在黄豆饼粉—淀粉培养基中,以及在该培养基中加磺胺嘧啶40微克/毫升进行发酵罐发酵,在不同生长时间内取样,观察形态变化和培养液中的化学变化,结果如下。

关于去甲基金霉素的发酵,根据观察结果,大体可分为三个阶段:第一阶段0—14小时,由种子罐接种于发酵罐后,发酵2小时到4小时,开始由老菌丝长出新芽,随即形成初生菌丝(一级菌丝),此时在培养液中的化学变化是:总糖与氨基氮直线下降,pH变化不大,抗菌素产生极少。第二阶段14—72小时,14小时

观察,次生菌丝(二级菌丝)发育逐渐形成网状,至23小时以后,次生菌丝开始分化,菌丝体中出现美兰着色较深的颗粒,48小时次生菌丝已有50—80%分化。72小时观察,二级菌丝几乎全部分化,此时总糖继续下降,氨基氮则在24小时以后,维持一定的水平。pH仍变化很小(一直在6.5左右)。抗菌素则在24小时以后直线上升。第三阶段:72—144小时。菌丝老化,出现空泡后,随即空泡逐渐增多。到144小时放罐时菌丝尚无显著自溶现象。至于总糖量、氨基氮及pH等,则维持一定水平,抗菌素继续上升。

培养液中的化学变化如图1。

表6 38-2-14菌株的发酵试验  
(用不同斜面 and 不同砂土管在发酵罐试验)

罐 批	项 目	去甲基金霉素 (单位/毫升)		备 注
		生物 效价	化学 效价	
52—8	38-2-14	417	1060	*20砂土管
52—9	38-2-14	1298	2425	*24砂土管
52—10	38-2-14	1238	2380	*24砂土管
52—11	38-2-14	532	1230	*24砂土管另一支斜面
对 照 (加SD40微 克/毫升)	38-2	1455	2907	

### (七) 38-2-14菌株试验

在我们研究38-2菌株的发酵中,用紫外线处理38-2,获得新变株38-2-14,其特点系不产生金霉素。用黄豆饼粉—淀粉培养基,在摇瓶中发酵,试验了种龄接种量及氮碳源,结果看出该菌所需的发酵条件与38-2菌株相似,但稳定性较差,效价波动很大,如表6。

由表6的结果可以看出,38-2-14菌株进行发酵,必须严格控制斜面,如斜面控制得好,如52—9和52—10两批效价,基本上能达到38-2菌株加抑制剂的单位水平。

### 参 考 资 料

- [1] Goodman, J. J.: U. S. Pat., 3, 145, 154, Aug. 18, 1964.
- [2] McCormick, J. R. D.: U. S. Pat., 2, 878, 289, Mar. 17, 1959.
- [3] Szumski, S. A.: U. S. Pat., 3, 012, 946, Dec. 12, 1961.
- [4] Goodman, J. J.: *J. Bact.*, 82: 615, 1961.
- [5] *Med. upom. CCCP*, 6: 51—3, 1965.

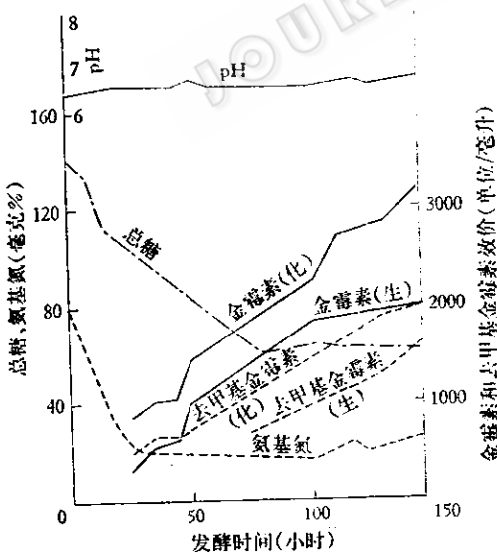


图1 去甲基金霉素在发酵过程中培养液的化学变化