

螺旋霉素发酵的研究*

王以光 徐小敏 刘书香 刘若莹

(中国医学科学院抗菌素研究所, 北京)

抗菌素是微生物的次级代谢产物, 就大多数抗菌素的深层发酵而言, 一般可划分为两个阶段, 即菌丝生长阶段和抗菌素合成阶段^[1,2]。这二个阶段对营养的需求是有区别的^[3,4]。本文主要报道螺旋霉素合成期对碳源、氮源、磷源的需要, 以及通过补加营养物质来提高螺旋霉素产量的研究结果。

材料及方法

一、菌种

从我国土壤中分离到的螺旋霉素产生菌

Streptomyces sp. 799。

二、培养基及培养条件

将孢子接种在含麦麸 6%, 琼脂 2% 的培养基上, 28℃ 培养 2—3 周。液体种子培养基成分为(%): 黄豆饼粉 2; 淀粉 4; NaCl 0.4; CaCO₃ 0.5; pH 自然。500 毫升三角瓶中装液量为 100 毫升, 摇床的偏心距为 2.5 厘米, 转速为 220 转/分。在 28℃ 培养 48 小时。发酵培养基成分为(%): 可溶性淀粉 6; 鱼脲(上海产) 2; NH₄NO₃

* 本文承方纲教授指导。

0.6; NaCl 1.0; 玉米浆 1; CaCO₃ 0.5; MgSO₄ 0.1; KH₂PO₄ 0.05; pH 7.0。500 毫升三角瓶装液量为 50 毫升。接种量为 5% (体积/体积), 发酵温度为 28℃。

三、测定方法

- 1. pH: 用成都仪器厂生产的 pH 计测定。
- 2. 菌丝干重: 取 5 毫升发酵液离心, 弃去上清液, 用 0.01 N HCl 洗涤菌丝二次, 再用无离子水洗涤菌丝一次。置烘箱中, 于 100—105℃, 烘干至恒重, 然后称量。
- 3. 效价: 采用生物测定法, 测定菌用藤黄色八叠球菌 PC₁1001。
- 4. 还原糖: 用 Folin 法测定^[5]。
- 5. 无机磷: 用 Tansky 等介绍的方法^[6]。
- 6. 氨基氮: 用甲醛法测定^[7]。

四、洗涤菌丝的制备

取培养 72 小时的发酵液 15 毫升, 经离心弃去上清液, 用 0.85% 的生理盐水洗涤菌丝二次, 然后转入装有 25 毫升待试培养基的 250 毫升三角瓶中, 整个过程须无菌操作。然后在摇床上培养 72 小时。

螺旋霉素的产生菌在上述实验条件下, 不同时间的菌体增长率以 μ 表示

$$\left(\mu = \frac{dW}{dt} \cdot \frac{1}{W_a}\right),$$

单位为小时⁻¹, 螺旋霉素产率以 θ 表示

$$\left(\theta = \frac{du}{dt} \cdot \frac{1}{W_a}\right),$$

其单位为微克/毫克/小时。上二式中, dW 表示一定时距中菌丝增长值 (毫克/毫升); dt 表示时距 (小时); W_a 表示二个时间中菌丝干重的平均值 (毫克/毫升); du 表示一定时距中效价的增值 (微克/毫升)。

结果与讨论

一、螺旋霉素发酵一般代谢的研究

为了研究螺旋霉素发酵中二个不同阶段的情况, 我们测定了用淀粉-鱼肝发酵培养基培养

的发酵液 pH 的变化, 糖、氮、磷的消耗, 菌丝生

表 1 不同发酵时间菌体增长率和螺旋霉素产率的关系

时 距 (小时)	菌体增长率 (小时 ⁻¹)	螺旋霉素产率 (微克/毫克/小时)
0—24	0.08	0.53
24—48	0.06	0.52
48—72	0.03	0.40
72—96	0.0038	0.75
96—120	-0.002	-0.01

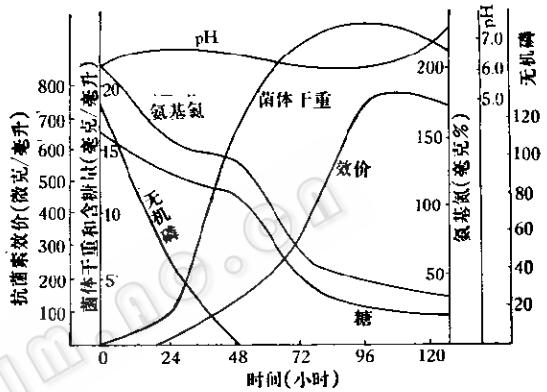


图 1 螺旋霉素产生菌发酵过程代谢曲线

由表 1 及图 1 可见, 螺旋霉素发酵过程中, 在 24—48 小时的菌丝变化和某些抗菌素发酵时相同, 菌体增长率较高, μ 值为 0.08, 糖、氮的消耗速度也快, 而无机磷在 48 小时就已被耗尽。48 小时后, 菌丝生长速度减慢, 至 72 小时菌体干重达最高值, 96 小时以后菌丝开始自溶, 菌体干重下降。在菌丝生长期抗菌素合成以较低速率进行, θ 值为 0.4—0.5, 而抗菌素合成速率的高峰在 72—96 小时之间, θ 值为 0.75 微克/毫克/小时, 96 小时以后其合成速率显著下降。因此可以认为在上述实验条件下, 螺旋霉素发酵的过程也可划分为两个阶段, 即 72 小时前为生长期, 72 小时后为抗菌素合成期, 96 小时抗菌素产率达最高峰。

二、螺旋霉素合成期的营养

将在淀粉-鱼肝发酵培养基中培养 72 小时后得到的菌丝, 经洗涤后接种到含有不同碳源

及氮源的培养基中，观察不同营养条件对抗菌素产率的影响，结果见图 2。

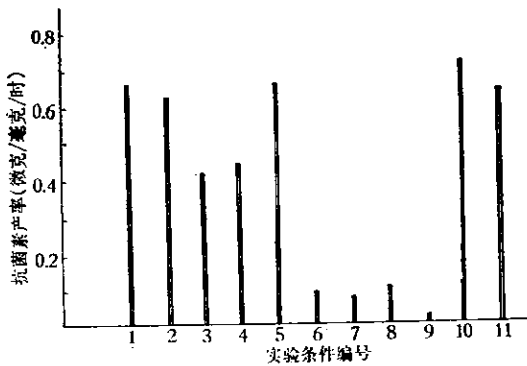


图 2 不同营养条件对螺旋霉素产率的影响*

* 实验的基础培养基组分为(%)：MgSO₄0.1；KH₂PO₄0.05；CaCO₃0.5；NaCl 1。各实验号的培养基组分中的不同营养条件为(%)：1 号：淀粉2；2 号：葡萄糖2；3 号：鱼肝 0.5；4 号：玉米浆1；5 号：鱼粉1；6 号：NH₄NO₃0.3；7 号：(NH₄)₂SO₄0.5；8 号：NH₄Cl 0.4；9 号：NaNO₃0.3；10 号：鱼粉 0.7，玉米浆 0.3；11 号：鱼粉 0.6，玉米浆 0.25，NH₄NO₃0.15。

图 2 表明，对于螺旋霉素的合成来说，用葡萄糖做碳源的产率与淀粉相同，而用有机氮源抗菌素的产率远远超过用无机氮源，其中以鱼粉为氮源对产螺旋霉素最有利。在此基础上，我们又研究了淀粉和鱼粉的不同配比对螺旋霉素产率及菌体增长率的影响，结果见表 2。

从表 2 可以看出，螺旋霉素发酵的合成期对碳、氮配比是有一定要求的。在不同配比条件下，菌丝增长率的差别不大，而抗菌素产率在合成期差别较大。这说明在不同营养条件下菌丝产生抗菌素的能力有差别。在氮源、碳源配比维持在 0.5:1 的情况下，如用鱼粉-淀粉配合，菌丝产抗菌素的能力最高。

在抗菌素发酵过程中，过量的磷酸盐对许多抗菌素的合成都有抑制和阻遏作用^[3]。我们在实验中曾观察到，发酵早期加入过量的无机磷酸盐后，菌体生长旺盛，而产生的抗菌素单位较低。为了了解抗菌素合成期对磷酸盐需要的情况，我们试验了不同的磷酸盐量对抗菌素产率和菌体增长率的影响，结果见表 3。

表 2 淀粉和鱼粉的不同配比对螺旋霉素产率及菌丝增长率的影响

实验编号	鱼粉 (%)	淀粉 (%)	菌体增长率 (小时 ⁻¹)	螺旋霉素产率 (毫克/毫升/小时)
1	0.5	0.5	0.012	0.43
2	0.1	1.0	0.013	0.17
3	0.5	1.0	0.015	0.66
4	0.75	1.0	0.019	0.56
5	1.0	1.0	0.021	0.53
6	0.75	1.5	0.017	0.70
7	0.1	2.0	0.009	0.25
8	0.5	2.0	0.014	0.43
9	0.75	2.0	0.016	0.52
10	1.0	2.0	0.018	0.70
11	1.5	2.0	0.021	0.61
12	0.5	3.0	0.014	0.28
13	0.75	3.0	0.018	0.33
14	1.0	3.0	0.022	0.42
15	1.5	3.0	0.023	0.46

表 3 说明，在螺旋霉素合成期仍然需要磷酸盐。其最适磷酸盐量为 0.05—0.2% 之间，在加入 0.1% 磷酸盐时螺旋霉素产率最高。

表 3 不同量的磷酸盐对菌体增长率和螺旋霉素产率的影响

KH ₂ PO ₄ 加入量 (%)	菌体干重 (毫克/毫升)	螺旋霉素 (毫克/毫升)	菌体增长率 (小时 ⁻¹)	螺旋霉素产率 (毫克/毫升/小时)
0.01	20.3	174	0.019	0.31
0.05	20.0	237	0.019	0.45
0.1	18.2	281	0.017	0.64
0.2	19.6	256	0.019	0.51
0	17.6	92.4	0.015	0.14
内源	11.6	37.4		

三、在发酵过程中补加营养物质以提高螺旋霉素产率

根据螺旋霉素产生菌的代谢情况，我们在发酵至 96 或 120 小时以 1:0.5 的比例补加葡萄糖-鱼粉或葡萄糖-玉米浆和磷酸盐 (0.05—0.1%)，实验结果见表 4。

结果表明，不补料的对照组较补料的实验组平均效价低 35%，即补料后提高了 35%。经显著性分析计算，表明在小型试验中进行补料控制，抗菌素效价有提高的趋势，但效果不甚显

表 4 不同规模的发酵补料试验结果

试验规模	对照组效价* (微克/毫升)	补料组效价* (微克/毫升)	自由度	标准差(S)	标准误 ($S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}$)	t 值**
小型	1930	2670	8	585	409	1.8
扩大试验	972.5	1680	6	307.5	249	2.84

* 为一定批数试验之平均值。

** $t_{0.1} = 1.86$; $t_{0.01} = 3.14$; $t_{0.05} = 2.45$, $0.05 < P < 0.1$

著。以同样实验条件的扩大试验,补料控制组的抗菌素效价比对照组平均高 70%,经显著性分析计算,t 值小于 0.05 而大于 0.02,说明补料效果在扩大试验规模进行比较显著。

讨 论

实验中反映出,在螺旋霉素的生物合成中控制适当的糖、氮、磷浓度并选用适当的碳、氮源,有利于螺旋霉素的生物合成。据报道^[8],葡萄糖参与大环内酯类抗菌素氨基糖部分的生物合成。实验表明在合成期补加葡萄糖有利于螺旋霉素的生物合成。但过早加入葡萄糖,则有明显的抑制作用,这可能是由于葡萄糖是快速利用的碳源,其代谢产物在早期对抗菌素的合成酶有抑制作用。Hockenhull^[9]曾报道,在红霉素的发酵中,只有应用于菌丝生长的氮源耗尽后,糖才能用于抗菌素的合成。实验说明只有按一定的氮、碳配比并适时地补加氮、碳源,才

能控制菌丝的增长,而促进抗菌素的产生。因此认为,在合成期,合适的碳、氮比对螺旋霉素产生菌的生长与抗生素的生物合成可能起着调节作用。此外,一定量的无机磷在螺旋霉素的合成期是需要的。它可能在调节糖类代谢途径中起一定的作用。

参 考 文 献

- [1] Bullock, J. D.: *Essays in Biosynthesis and Microb. Development* New York, 1967.
- [2] Borrow, A.: *Can. J. Microbiol.*, 7: 227, 1961.
- [3] Martin, J. F.: *Adv. Biochem. Bioeng.* 6: 105, 1977.
- [4] Унитер Г. Д.: *АМТ.* 12: 1089, 1973.
- [5] Folin, O. and H. Malmros: *J. B. C.*, 83: 115, 1929.
- [6] Tansky, H. H. et al.: *J. B. C.*, 2: 202, 1953.
- [7] 上海医药工业研究院编著: 抗菌素工业分析, 化学工业出版社, 北京, 1960.
- [8] Martin, T. F.: *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 13, 1977.
- [9] Hockenhull, D. J. D.: *Progress in Industrial Microbiol.*, 3: 211, 1961.