

用尿素及柠檬酸铵为氮源的争光霉素发酵研究*

虞 悝 许永寿 李妙儿 叶其本

(上海第三制药厂, 上海)

发酵培养基中的天然有机氮源, 能够显著地改变争光霉素组份 A_2 及 A_5 , A_2 及 B_2 的百分比^[1]。探讨造成这种改变的原因将有助于这些问题的进一步研究。在试验中我们用尿素及柠檬酸铵为氮源, 进行争光霉素发酵的研究。现报道如下。

材 料 和 方 法

1. 使用菌株: 轮枝链霉菌平阳变种的高产变株 70-5-8、54 号。(得自争光霉素协作组)

2. 培养基及培养条件: 种子培养基及摇瓶试验条件均同前文^[1]。发酵培养基的各个成分均用化学纯规格, 接种量 10% (体积/体积), 28℃ 发酵 7—8 天。培养基组成见表 1。

3. 测定方法: 争光霉素组份的薄层层析, 效价测定均同前文^[1]

试 验 结 果

1. 预备试验结果: 在预备试验中, 70-5-8 菌株使用 1 号培养基, 菌量极低, 添加柠檬酸铵, 未能提高菌量, 却提高了生物效价, 即达到 25 微克/毫升。发酵液的 pH 值为 4.5。

2. 氮源选择试验: 70-5-8 菌株在使用尿素的试验中, 随着不同量尿素的使用, 菌量提高与尿素的添加量在一定范围内成正比, 发酵液 pH 值亦随之升高, 生物效价提高到 40 微克/毫升, 而 54 号菌株可达到 70 微克/毫升。

3. 不同培养基对争光霉素产量的影响: 正交试验的结果表明, 使用 2 号培养基, 争光霉素产量达 200 微克/毫升, 使用 3 号培养基, 争光霉

* 本工作完成于 1977 年初。

表 1 研究过程中使用的几种培养基

名称	用量(%)	编号	预备试验用 1	正交试验过程结果		4	5
				2	3		
葡萄糖			0.5	0.5-1	1.5-2.5	1	1
糊精			5	3-5	6	7	7
尿素			-	0.4	0.6	0.6	-
柠檬酸铵			-	0.6	0.6-1.2	1.2	1.2
KNO ₃			0.3	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄			0.2	0.2-0.3	0.7-0.9	0.7	0.7
NaCl			0.3	0.3	0.1-0.3	0.1	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O			0.1	0.1	0.05	0.05	0.05
ZnSO ₄ ·7H ₂ O			0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
CuSO ₄ ·5H ₂ O			0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O			0.003	0.003	-	-	-
pH			6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

表 2 54 号菌株的发酵情况

结果	发酵时间 (小时)	0	40	64	88	112	136	160	184	208	232	256
pH		6.9	5.96	6.17	5.09	5.72	6.25	7.05	7.23	7.52	7.5	7.83
总糖(%)		8.26	7.45	4.69	3.08	-	2.68	2.54	2.43	-	2.63	2.58
菌体干重 (毫克/5毫升)		19	46	151	-	185	188	161	160	147	-	134
争光霉素生物效价 (微克/毫升)				21	34	91	124	206	318	-	342	445

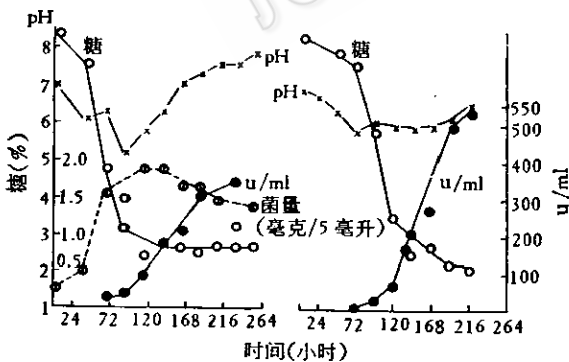


图 1 54 号菌株在发酵过程中的代谢变化

素产量可达 300—400 微克/毫升。

4. 54 号菌株在 4 号培养基中的发酵情况: 54 号菌株的发酵情况见表 2 和图 1。

结果表明, 54 号菌株在发酵时, 其争光霉素效价可达 445—545 单位/毫升。

5. 添加尿素对产争光霉素效价的影响: 比较尿素添加与否对争光霉素发酵单位的影响, 结果见表 3。

结果说明, 不加尿素发酵液 pH 值显著降低, 72 小时下降至 4.4, 此后一直维持在 5.0 以下, 争光霉素效价于发酵 216 小时为 97 微克/

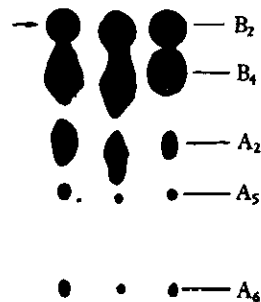


图 2 发酵液薄层层析的生物显影结果

表3 添加尿素对争光霉素效价的影响

培养基 配方	结果 测定项目	发酵时间 (小时)									
		0	24	48	72	96	120	144	168	192	216
4 (加尿素)	pH	—	6.67	6.29	5.72	6.02	5.9	5.82	5.92	6.23	6.6
	总糖(%)	8.33	8.54	7.91	7.72	5.85	3.53	—	2.78	—	2.4
	争光霉素生物效价 (微克/毫升)				17	35	73	211	273	5.8	532
5 (不加尿素)	pH	—	5.97	5.13	4.4	4.64	4.62	—	4.72	4.7	4.97
	总糖(%)	8.31	8.38	7.38	6.36	6.33	6.24	5.88	5.81	4.86	4.89
	争光霉素生物效价 (微克/毫升)				9	12	20	27	56	58	93

毫升,而添加尿素的试验组中,发酵过程中保持pH 6.0左右,发酵至216小时,其争光霉素效价为532微克/毫升,说明该生理条件较为合适。

6. 发酵液中争光霉素的组分:经硅胶G薄层层析的结果见图2。(54号菌株之发酵液)。

结果说明,含量最高的组份对坂口反应呈阳性,属争光霉素 B_2 , A_5 含量甚低。

讨 论

试验中发现,除了尿素与柠檬酸铵之间有着最适的配比外,磷酸盐量亦起一定作用,于单独观察磷酸盐的作用时,发现磷酸盐量与尿素之间亦有相关性。

在发酵培养基中添加尿素,可大幅度提高争光霉素效价,至于进一步观察尿素的添加方式,了解最适pH与争光霉素产生的关系,或用氨的形式补充氮源,则有待以后的工作。

在发酵过程中,会有较长延滞期出现,这可

能与缺乏必需的生长因子有关,说明进一步研究生长必需的物质,对缩短延滞期是十分必要的。

在发酵产物中,含有较多的争光霉素 B_2 。在培养基4中也排除了天然有机氮源的微量前体末端胺带入发酵培养基,影响发酵组份的可能性。争光霉素 B_2 的末端胺为胍基丁胺,大肠杆菌中,胍基丁胺尿素水解酶使胍基丁胺转变成尿素及腐胺(1,4-丁二胺)^[2,3]。腐胺为精脞的前体,争光霉素 A_5 的前体是精脞,在培养基4中发酵得较多争光霉素 B_2 ,这可能与使用较多量尿素有关,因此提示了前体末端胺之间存在代谢调节的可能性。

参 考 文 献

- [1] 虞愷等:有机氮源对争光霉素发酵组份改变的影响,微生物学通报,7(4):1980。
- [2] Møller, V.: *Acta pathol. microbiol. scand.*, **36**: 158, 1955.
- [3] Morris, D. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **241**: 3129, 1966.