

用洗涤菌丝法研究核糖霉素的生物合成

韩宝玲 谭素琴

(中国医科院抗菌素研究所, 北京)

核糖霉素是由新霉胺和核糖以糖甙键联结在一起的氨基糖甙类抗生素。

本文使用洗涤细胞法, 通过 C、N 源及金属离子的选择等研究链霉菌 3719 菌株合成核糖霉素的最佳条件。

材 料 和 方 法

一、菌种和培养

1. 菌种: 链霉菌(*Streptomyces* 3719D-318)
3719D-318 菌株。

2. 培养: ①孢子斜面: 链霉菌 3719D-318

菌株接种在培养基 I* 斜面上, 37℃ 培养 7 天, 5℃ 保存, 间隔一个月转种一次。②种子培养液: 长好的孢子斜面挖块接种到培养基 II** 中, 32℃ 培养 48 小时, 摇床 225—230rpm。③洗涤前菌丝培养: 2% 的种子液再转种到培养基 II 中, 32℃ 培养 72 小时, pH8, 生物效价 1500μg/ml 以上。④洗涤菌丝的制备: 将上述培养液离心, 除去上层发酵液, 菌丝体悬浮于 0.85% 消毒的氯化钠盐水中洗涤, 离心, 反复三次后把湿菌丝定量转种到含有 10 ml 预测成分, 预测液 pH 自然(约 6—6.5), 容量为 25ml 的三角瓶中, 32℃ 培养 24 小时后测定生物效价。

二、生物效价测定(杯碟法^[1])

三、菌丝内核糖毒素的测定

洗涤菌丝用 0.5N 的氢氧化钠沸腾回流半小时, 然后将提取液冷却, 用盐酸中和 pH7—8, 离心后测定上清液的生物效价。

四、菌丝湿重的测定

洗涤后的菌丝进行 2800rpm 离心 10 分钟, 去上清液, 称取菌丝的重量。

五、pH 的测定(玻璃电极 pH 计)

结果和讨论

一、不同碳源对核糖毒素产生的影响

结果如表 1 所示, 麦芽糖能刺激核糖毒素的合成, 甘油、核糖、果糖、葡萄糖、乳糖、肌醇等碳水化合物没有明显的影响。在以木糖为碳源的培养基中核糖毒素的效价低于其它碳源培养基, 这和文献[2]的结果相符。在有机培养基中使用麦芽糖可使核糖毒素产量提高 37%。葡萄糖的效果不能肯定, 因为多次试验结果数据统计 $P > 0.05$, 但在有机发酵培养实验中, 间歇加入葡萄糖可以提高核糖毒素产量。

二、金属离子对核糖毒素产生的影响

结果见表 2。洗涤菌丝(细胞内核糖毒素含量约 20μg/ml) 悬浮在对照培养基中(含有 1.5% 的麦芽糖), 核糖毒素产量上升到 123μg/ml 左右, 加入 0.01% 硫酸镁效价提高到 145μg/ml, 结果说明硫酸镁对核糖毒素合成有刺激作

表 1 不同碳源对核糖毒素产生的影响*

碳源 (1.5%)	核糖毒素 (μg/ml)	碳源 (1.5%)	核糖毒素 (μg/ml)
对照(内源)	85	麦芽糖	130
甘油	76	蔗糖	67
葡萄糖	91	乳糖	76
核糖	50	糊精	74
果糖	48	可溶性淀粉	67
木糖	47	肌醇	82

麦芽糖与对照组的数据统计 $T = 2.8$, 自由度 18, $P < 0.02$

* ①用洗涤菌丝法, 湿菌丝重为 1.5—2.0g。

②培养基成分: 对照培养基(0.85%氯化钠盐水)+1.5%碳源

用, 其他微量的金属离子 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 等加入到培养基中, 对核糖毒素合成都有抑制作用。堀田等人^[1]曾指出: 镁离子能干扰抗菌素进入细胞内, 并能从菌丝中释放结合的抗菌素, 还指出, 在链霉菌形成过程中的链霉素激酶和碱性磷酸酶以及新霉素的碱性磷酸酶的活力随镁离子的增加而加强, 认为镁离子是一种能量代谢的重要因素, 作用和 sclerin 相似。在实验中我们曾初步看到镁离子对核糖毒素产生菌的碱性磷酸酶活力有增强效果。

表 2 金属离子对核糖毒素产生的影响*

金属离子 (%)	核糖毒素 (μg/ml)	金属离子 (%)	核糖毒素 (μg/ml)
对照	123	Zn^{2+} 0.001	107
Mg^{2+} 0.01	145	Mn^{2+} 0.0001	116
Fe^{2+} 0.001	107	Co^{2+} 0.0001	114
Fe^{3+} 0.001	92		

其中含镁离子与对照组数据统计 $T = 3.39$, 自由度为 14, $P < 0.01$

* ①用洗涤菌丝, 湿菌丝重 1.5—2g。

②培养基成分: 对照培养基(含 0.85%氯化钠+1.5%麦芽糖)+金属离子(%)

三、氨基酸对核糖毒素产生的影响

因氨基酸即是氮源又是碳源, 故在培养基

本文承蒙刘若莹副教授指导, 谨致谢意。

* 培养基 I(%): KNO_3 0.1, $NaCl$ 0.05, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 可溶性淀粉 2, 琼脂 1.7, 冷开水 100ml, pH7。

** 培养基 II(%): 淀粉 4, 蛋白胨 0.8, 麦芽糖 2, KH_2PO_4 0.02, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4, $NaCl$ 0.4, $CaCO_3$ 0.6, 自来水 100ml, pH7。

中未加碳源,结果如表 3。9 种氨基酸中除 0.1% 的白氨酸对抗菌素产生稍有刺激作用外,其余的氨基酸没有作用,氨基葡萄糖效果不明显。Majumdar 等人^[4]用洗涤菌丝法研究新霉素时指出,葡萄糖氨刺激新霉素产生。但在 3719 菌株实验中葡萄糖氨对核糖霉素的产生并没有这样

表 3 氨基酸对核糖霉素产生的影响*

氨基酸 (0.1%)	核糖霉素 ($\mu\text{g/ml}$)	氨基酸 (0.1%)	核糖霉素 ($\mu\text{g/ml}$)
对照	84	谷氨酸	55
白氨酸	91	天门冬氨酸	64
天冬氨酸	54	肌酸	78
酪氨酸	51	氨基乙酸	64
精氨酸	65	氨基葡萄糖	86

* ①用洗涤菌丝法,湿菌丝重 1.5—2g。②培养基成分:对照培养基 (0.85%氯化钠)+0.1%氨基酸。

的效果。

另外实验中发现磷酸盐对 3719 菌株的特殊作用。在洗涤菌丝实验中磷酸二氢钾含量超过 0.1% 对核糖霉素合成有抑制作用,但是在培养基中磷的含量低于 21.4r/ml,这种洗涤菌丝无论置换到哪种预测培养基中都没有合成核糖霉素的能力,所以磷酸盐在 3719 菌株的代谢中是不可缺少的,这种生理现象尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 韩宝玲等:微生物通报,6(3): 13,1979。
- [2] Kojima, M. et al.: *J. antib.*, 28 (1): 48,1975。
- [3] 奈良高: 醱酵と工业, 37: 735,1979。
- [4] Majumdar, M. K. and S. K. Majumdar: *Folia microb.*, 16: 285, 1970。