

# 产生妥布拉霉素的 ER-16 突变株的选育

章 慧 德

(中国科学院微生物研究所,北京)

**摘要** 以妥布拉霉素产生菌暗黑链霉菌 AS 4.1098(410-II) 为出发菌株,经高温和亚硝基胍处理,获得 6 株无色突变株,对其中的 W1028-M5 用亚硝基胍及甲基磺酸乙酯继续处理,得到突变株 E228,再经抗自身代谢终产物妥布拉霉素抗性株的选育,得到 ER-16 和 ER-21 等高产菌株。所产抗生素仅含两个组份,即氨甲酰妥布拉霉素和阿普拉霉素。不再含氨甲酰卡那霉素。测定的几项主要理化性质与出发菌株以及文献报道的数据完全一致。

**关键词** 暗黑链霉菌;氨甲酰妥布拉霉素;妥布拉霉素;氨甲酰卡那霉素

第二代氨基糖甙类抗生素妥布拉霉素是世界医学临床上广泛使用的抗生素之一<sup>[1]</sup>,我国虽已开始试制、生产,但抗生素效价与国外报道有很大差距<sup>[4,5]</sup>。我们于 1986 年选育出的 W1028-M5 变异株,所产抗生素组分为氨甲酰妥布拉霉素和阿普拉霉素,不再含有氨甲酰卡那霉素,抗生素效价为 1250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>[2,3]</sup>。该菌株虽比出发菌株 410-II 提高效价 30%,并减少了一个不需要的组份,但效价仍与国外报道的有较大差距。为此,我们采用诱变剂亚硝基胍(NTG)和甲基磺酸乙酯(EMS)处理 W1028-M5 的孢子,从大量突变株中选育出 ER-16、ER-21 等变异株,所产抗生素效价比出发菌株 410-II 提高 100—150%,达 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  左右。下面报道选育过程及由 ER-16 所产妥布拉霉素的理化性质。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌种

出发菌株为本实验室筛选的暗黑链霉菌(*Streptomyces tenebrarius*) AS 4.1098 (410-II)<sup>[3]</sup>。

### (二) 培养基

同文献[2]。

### (三) 抗生素效价测定和组份的检定

同文献[2]。

## (四) 诱变方法

1. 孢子悬浮液的制备: 将待处理菌株于 37℃ 培养 7—10 天,用 pH 5.5、0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液洗下孢子,过滤到盛有玻璃珠的无菌小三角瓶中,振荡 15 分钟,孢子液浓度为  $2 \times 10^8/\text{ml}$ 。

2. 高温处理: 将孢子液在 50℃ 水浴中加热处理数分钟,离心 (3000 r/min) 15 分离,稀释后涂皿或进一步进行诱变处理。

3. NTG 处理: 先将孢子液在 37℃ 水浴中保温使孢子萌发,再加入 NTG (使最终浓度为 1 mg/ml),继续在 37℃ 水浴中保温一定时间,用 pH 6.0 柠檬酸缓冲液稀释涂皿。

4. EMS 处理: 取 7 支含新鲜孢子的大斜面菌种,用少量 1/15 mol/L pH 7.5 磷酸缓冲液洗下孢子,高浓度的孢子液在 37℃ 保温,使孢子萌发,加入 EMS (终浓度为 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) 混匀后 37℃ 振荡反应 40 分钟,加入 10 ml 无菌水,离心 (10000 r/min) 15 分钟。弃上清液,将孢子悬浮在 10 ml 无菌水中,直接在含高浓度妥布拉霉素的本氏培养基上及含高浓度的阿普拉霉素的本氏培养基上涂皿。

5. 抗自身代谢终产物抗生素突变株的选

微生物所姜淑珍同志参加部分 16L 生产上发酵及提取工作,刘肃同志审阅本稿并提出宝贵意见;<sup>13</sup>C-NMR 及质谱由中国科学院化学研究所测定,特此一并致谢。

育：将制备好的孢子液涂布在含妥布拉霉素的本氏培养基上。

6. 摇管试验：各种方法得到的突变株，首先采用 2 cm × 20 cm 的大试管进行发酵试验，37℃ 振荡培养 5 天，测定所产抗生素效价及组份。从中选出效价高，组份好的菌株再进行摇瓶发酵。

结果和讨论

(一) 筛选系谱

出发菌株 410-II 产生抗生素的总效价为 800—1000 μg/ml，主要含三个组份，各占 1/3，并含有可溶性紫色素，经三代处理后，得到不含可溶性紫色素的突变株，并且不再含有出发菌株 410-II 所含的氨甲酰卡那霉素，只产生氨甲酰妥布拉霉素和阿普拉霉素。W1028-M5 效价达 1250 μg/ml，比 410-II 提高 30% 以上。用 NTG 处理 W 1028-M5 的孢子，经摇瓶发酵选出突变株 N-876 效价达 1488 μg/ml，继续用 EMS 处理突变株 N-876 的孢子，获得突变株 E228，总效价为 1743 μg/ml。该菌经抗自身代谢终产物妥布拉霉素的抗性选育，得到 ER-16，ER-21 等，效价达到 2000 μg/ml 左右，比出发菌 410-II 提高 100—150%。选育系谱见图 1。

(二) 甲基磺酸乙脂和亚硝基胍诱变效果的比较

采用 NTG(1 mg/ml)和 EMS (10 μl/ml) 对突变株 W 1028-M5 进行诱变处理，分别任意选出 150 株左右进行摇瓶发酵，测定抗生素效价和组份，比较两种处理效果。

表 1 NTG 和 EMS 处理后的突变株所产抗生素组份变化

诱变剂	测定株数	抗生素组份*					
		2+5'		2+4+5'		4+5'	
		株数	%	株数	%	株数	%
NTG	164	121	73.8	38	23.2	5	3
EMS	143	133	93.0	7	4.9	3	2.1

\* 2：阿普拉霉素；4：氨甲酰卡那霉素；5'：氨甲酰妥布拉霉素

表 1 指出用 NTG 和 EMS 处理 W1028-M5 的孢子，所得突变株产生的抗生素组份仍以 2 和 5' 为主，但 EMS 处理所占比例更大，达 93.0%。经 NTG 处理后的突变株有 23.2% 恢复成三个组份 (2, 4 和 5') 而 EMS 处理仅有 4.9% 菌株恢复成三个组份。另外，经 NTG 处理的 164 株，摇瓶发酵测定抗生素含量，结果正变率占 7.5%，最高效价为 1488 μg/ml。而 EMS 处理后的菌株正变率更低，仅占 4.3%，最高效价为 1447 μg/ml，同时低效价菌株 (500—

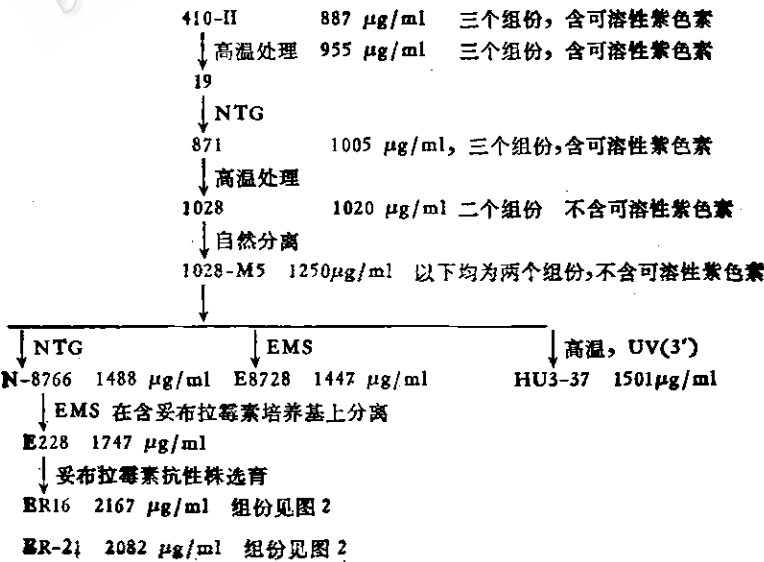


图 1 妥布拉霉素菌株选育系谱

表2 ER-16 和 ER-21 与出发菌株 410-II 摇瓶发酵合成抗生素能力的比较

批号 菌号	抗 生 素 效 价 ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	N01	N02	N03	N04	N05	平均值	%
410-II	772	809	886	999	858	855	100
W1028-M5	1241	1178	1160	1283	1378	1249	144.4
ER-16	2154	1913	2008	2385	2375	2157	250.5
ER-21	1820	1756	1	2421	2331	2082	240.7

1800  $\mu\text{g/ml}$ ) 较多, 占 23.3%。已知 EMS 和 NTG 同属于烷化剂, 可与 DNA 分子许多部位发生作用, 引起碱基错配或修复错误而诱发突变, 导致抗生素产量和组份发生不同改变。

### (三) 突变株 ER-16 和 ER-21 的发酵试验

分别将 ER-16 和 ER-21 的斜面孢子接种在含 40 ml 发酵培养基的 250 ml 三角瓶中, 37℃ 振荡培养 5 天 (220 r/min), 五次发酵所产生的抗生素效价的测定结果列于表 2, 所产抗生素组份见图 2。

表 2 指出突变株 ER-16 和 ER-21 所产抗生素的总效价比初发菌 410-II 提高 140% 以上。

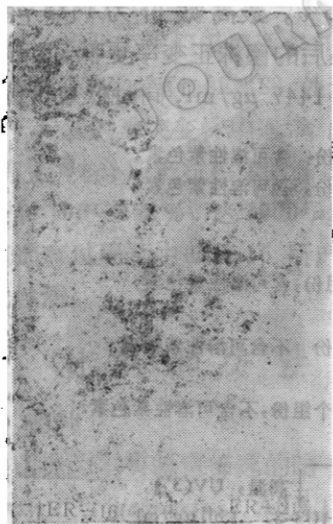


图2 ER-16 和 ER-21 摇瓶发酵所产抗生素复合物的生物自显影

上方点: 氨甲酰妥布拉霉素; 下方点: 阿普拉霉素

图 2 表明, ER-16 和 ER-21 两突变株所产抗生素基本上不含氨甲酰卡那霉素, 只产生

氨甲酰妥布拉霉素和阿普拉霉素, 含量比值约为 3:2。

### (四) 突变株 ER-16 所产妥布拉霉素理化性质的鉴别

新选育出的妥布拉霉素高产菌株 ER-16, 在我所发酵工厂提供的 SF-116 型标准发酵罐 (16 立升, NBS 公司生产) 进行发酵, 在优化条件下发酵 120 小时, 所产抗生素效价为 1910—1980  $\mu\text{g/ml}$ 。中性滤液通过羧酸型 110 树脂, 氨水洗脱, 合并活性物质高峰部分, 经碱水解后通过大孔羧酸树脂分离单组份, 合并妥布拉霉素高峰部分, 冷冻干燥, 得妥布拉霉素白色粉末。其薄层层析  $R_f$  值与国外妥布拉霉素样品一致。比旋值  $[\alpha]_D^{25} + 129.8^{[6]}$ , 质谱测定分子量为 467<sup>[7]</sup>,  $^{13}\text{C}$ -核磁共振谱 ( $^{13}\text{C}$ -NMR) 的化学位移值 (ppm) 等与文献报道值<sup>[8]</sup>及 410-II 和 W1028-M5 所产妥布拉霉素的测定值<sup>[2]</sup>基本一致。综上所述, 突变株 ER-16 和 ER-21 所产妥布拉霉素的性质并无改变。由于突变株 ER-16 合成抗生素的效价高, 又不含氨甲酰卡那霉素, 且氨甲酰妥布拉霉素所占比例大大提高, 因而使提取工艺简化。提取收率提高, 可达 25% 以上。ER-16 是适用于生产的菌株。

### 参 考 文 献

- [1] 刘诗通: 国外药学抗生素分册, 8 (5): 346—354, 1987。
- [2] 章慧德等: 微生物学报, 27 (4): 357—361, 1987。
- [3] 刘 肃等: 中国微生物学会 1979 年学术年会论文摘要汇编, 第 121—122 页, 1979 年。
- [4] Ott Istvan et al: Ger. Offen. 2921022, 1979。
- [5] Tomita Koji et al: U. S. 4032404, 1977。
- [6] Kock, K. P. et al: Antimicrobial Agents and Chemo-

*therapy*, 1970: 309—313, 1971.

**[ 7 ]** Berdy, J.: CRC Handbook of Antibiotic compounds,  
CRC press Inc., Boca Raton, Florida, 1: 164—167,

1980.

**[ 8 ]** Koch, K. F. et al.: *J. Org. Chem.*, 43: 1430—1433.  
1978.