

新霉素产生菌 *Streptomyces fradiae* 高效价菌株的选育

張筱玉 謝信媛 許文思

(国营上海第三制药厂, 上海)

新霉素(Neomycin)为 Waksman 等^[1]在发现链霉素后于 1949 年从 *Streptomyces fradiae* 培养液中提取得的抗菌素,当时发现它能抑止大肠杆菌的生长,称它为新链霉素。产生新霉素的菌株较常见,日本 Aiso 氏的 Flavomycin; 苏联 Гайзе 氏等的杀大肠菌素(Калимицин),麦希灵(Мицрин)等,现经证明,即系新霉素。

1957 年蔡潤生等^[2]自广东和武昌土壤中分离得到放线菌 956,它所产生的抗菌素即属于新霉素一类物质。由于新霉菌 956 菌株产生抗菌素的能力较低,经用紫外线处理,得到 U₁-19 菌株,这菌株自 1960 年投入生产以来,一般用丰富培养基培养时所产新霉素的效价为 1500 微克/毫升左右,产生抗菌素的能力仍较低,因此,原料耗用量大,成本高,必须进行新霉菌的选育,以期诱发突变获得高效价菌株。

一、試驗材料及方法

以 *Streptomyces fradiae* U₁-19 菌株为原种,用砂土孢子接种在肉膏、蛋白胨洋菜培养基上,在 28℃ 培养 7—8 天,成长的孢子用灭菌蒸馏水制成孢子悬液,分别用紫外线(以下简写 U. V.)及氮芥子气(以下简写 N. M.)进行单一及复合处理。分离培养基与斜面培养基相同,其成分为:

肉膏 0.5%, 蛋白胨 0.5%, 氯化钠 0.5%,
葡萄糖 1.0%, 洋菜 2.0%, pH 7.6。

经处理后成长的菌落鉴别,除观察菌落形态外,我们以摇瓶发酵产生抗菌素效价的高低为准。在转速 250 r. p. m. 的旋转式摇床上进行种子及发酵培养,培养温度均为 28℃,新霉素效价的测定采用生物检定法。

初筛及复试的培养基成分为:

种子培养基:

花生饼粉 2%, 葡萄糖 3%, 氯化钠 0.25%, 酵母粉 1%, 硫酸铵 0.1%,
磷酸氢二钠 0.1%, 碳酸钙 0.5%, 自然 pH。

发酵培养基:

花生饼粉 3%, 淀粉 2.5%, 酵母粉 0.5%, 糊精 2.5%, 氯化钠 0.4%,
硫酸铵 0.1%, 磷酸氢二钠 0.1%, 碳酸钙 0.8%, 自然 pH。

二、結果与討論

1. 誘变因素的选择

在进行大量处理之前,我们选择常用的誘变因素,即紫外线和氮芥子气及其复合处理

的方法, 对于这些诱变剂在 *S. fradiae* U₁-19 菌株中所引起的死亡率及以菌落形态的变异作为指标的变异率进行了比较。紫外线处理的死亡率及变异率较小; 当氮芥子气及紫外线复合处理时, 死亡率及变异率有明显的增加。在单一氮芥子气处理中, 如果延长处理的时间, 变异率及死亡率逐渐增加(如表 1 所示)。菌落的生长情况亦有较大的改变, 大部分菌落生长极为缓慢, 气生菌丝及孢子较贫乏。

表 1 不同的诱变因素对 *St. fradiae* U₁-19 菌株引起的死亡率及变异率

处 理 条 件	孢子数目/毫升	死亡率(%)	变异率(%)
U. V. 3' + 光恢复 30'	3.66×10^6	87.7	44.8
N. M. 2' + U. V. 3' + 光恢复 30'	9.65×10^6	96.75	60.0
N. M. 2'	9.15×10^6	69.2	39.1
N. M. 4'	4.99×10^6	83.2	60.6
N. M. 8'	1.33×10^6	95.5	65.1
对 照	2.97×10^7	—	—

除观察不同的诱变剂对 *St. fradiae* U₁-19 菌株所引起的死亡率及变异率外, 同时初步试验了部分菌株产生新霉素的情况, 我们发现经紫外线处理的大部分菌株产生新霉素的能力与原种相近, 经紫外线及氮芥子气复合处理的, 虽然死亡率及变异率有明显增加, 但高效价的菌株极少。在单一氮芥子气的处理中, 其中以氮芥子气作用 4' 为宜, 比原种效价高的菌株较多(表 2)。

表 2 *St. fradiae* U₁-19 菌株经诱变因素处理后, 初筛菌株为原种效价的分布百分数

处 理 条 件	初筛菌株效价为原种的百分率(以原种效价为 100%)								
	0	70—90	91—100	101—110	111—120	121—130	131—140	141—150	180—190
U. V. 3' + 光恢复 30'	10.3	10.5	20.6	24.2	17.2	10.3	6.9	0	0
N. M. 2' + U. V. 3' + 光恢复 30'	6.6	13.5	40.10	26.8	7.0	0	0	6.0	0
N. M. 2'	4.3	21.5	43.5	17.4	8.7	0	0	4.6	0
N. M. 4'	6.6	19.8	26.6	19.8	7.2	0	6.9	6.6	6.5
N. M. 8'	0	0	66.5	21.8	11.7	0	0	0	0

2. *St. fradiae* 61-7-12 菌株的获得

从诱变因素选择的试验中, 以氮芥子气作用 4' 为宜, 因而我们选择了这种处理的方法。氮芥子气作用时的浓度为每毫升 1 毫克。处理液经平板分离菌落生长成熟后, 我们大部分选择形态发生了变异的菌落进行初筛。在初筛的 122 个菌株中, 获得了 61-7-12 菌株, 比原种产生抗菌素的能力有明显的提高, 见表 3。

3. *St. fradiae* 61-7-12 菌株的培养特征

St. fradiae 61-7-12 菌株在综合培养基及几种合成培养基上的生长速度及菌落形态与 U₁-19 菌株有明显的不同。

(1) 肉膏、蛋白胨、洋菜培养基

61-7-12 菌株在此培养基上营养菌丝体呈橙色, 与培养基颜色近似, 气生菌丝体白

表 3 *St. fradiae* 61-7-12 菌株摇瓶发酵初筛及复试新霉素效价

初 筛			
试 验 菌 株	96 (小时/微克/毫升)	120 (小时/微克/毫升)	%
61-7-12	1590	2850	175.5
U ₁ -19	996	1603	100

复 试				
No.	试 验 菌 株	96 (小时/微克/毫升)	120 (小时/微克/毫升)	%
I	61-7-12	3000	4189	220
	U ₁ -19	1900	2071	100
II	61-7-12	3771	5620	210
	U ₁ -19	1902	2675	100
III	61-7-12	4001	5661	199.2
	U ₁ -19	1926	2945	100
IV	61-7-12	3500	4160	192.4
	U ₁ -19	1770	2110	100

色,孢子成粉状,贝壳红比 U₁-19 菌株稍深,孢子大部呈椭圆形或圆形,在 28℃ 培养 5—7 天后才出现白色的气生菌丝体,培养 12—14 天孢子成熟。如果降低培养基的 pH 至 7.1 (原为 7.6),有利于菌丝的生长及孢子的形成,可以缩短培养时间,10 天左右能长好。U₁-19 菌株在此培养基上,气生菌丝体生长均匀,培养 7 天即能长好。因此,61-7-12 菌株斜面孢子生长时间比原种慢 3—5 天。

(2) 合成一号洋菜培养基

61-7-12 菌株的气生菌丝体及营养菌丝体均生长贫乏,孢子颜色呈极淡的紫红色,须在 28℃ 培养 12 天孢子才生长成熟。U₁-19 菌株生长亦稍慢。

(3) 淀粉洋菜培养基

61-7-12 菌株较在其他几种培养基上生长快,培养 3 天,开始生长气生菌丝,孢子的形成亦较快,9 天左右长好,孢子颜色较深。U₁-19 菌株培养 2 天气生菌丝体生长很丰富,3 天已开始长孢子,6 天即生长成熟。

(4) 蔡氏洋菜培养基

61-7-12 菌株在此培养基上生长最为缓慢,营养菌丝体颜色极淡,气生菌丝体白色,须培养 14 天左右。U₁-19 菌株亦较在综合培养基上生长稍慢。

(5) 麸皮洋菜培养基

61-7-12 菌株的营养菌丝体呈金黄色,气生菌丝体白色,孢子的形成很缓慢。U₁-19 菌株在此培养基上较在综合培养基上生长贫乏。

在以上试验的几种斜面培养基上,61-7-12 菌株都较 U₁-19 菌株生长缓慢,在培养特征上有着不同的表现。

4. *S. fradiae* 61-7-12 菌株的生理特性

61-7-12 菌株对不同碳源的利用是与 956 及 U_1-19 两菌株同时进行比較的, 三者都能利用葡萄糖、淀粉、糊精、甘油, 都不利用阿拉伯糖、木糖、果糖、柠檬酸钠。在以甘油为碳源的培养基中, 956 菌株生长中等, U_1-19 及 61-7-12 菌株生长微弱, 在含有乳糖、蔗糖的斜面培养基上, 61-7-12 菌株生长最差, 如表 4 所示。

表 4 *St. fradiae* 61-7-12 与 *S. fradiae* 956 及 U_1-19 对不同碳源利用的比較

碳 源	試驗菌株	956	U_1-19	61-7-12
阿拉伯糖		—	—	—
木 糖		—	—	—
葡 萄 糖		+++	++	++
甘 露 糖		±	±	±
果 糖		—	—	—
乳 糖		+	+	±
蔗 糖		+	+	±
淀 粉		+++	+++	+++
糊 精		+++	+++	+++
甘 油		++	+	+
檸檬酸鈉		—	—	—
醋 酸 鉀		+	±	±

注: 基础培养基: NaNO_3 1.0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, K_2HPO_4 0.2%, CaCl_2 0.001%, 碳源 0.4%, 琼脂 1.5%。
“+++”生长良好, “++”生长中等, “+”生长微弱,
“±”生长极微弱, “—”不生长。

摘 要

我們試驗了常用的誘变因素紫外綫及氮芥子气对新霉菌所引起的死亡率及变异率的影响, 其中以氮芥子气引起的变异率較大。

从单一氮芥子气处理中, 获得 61-7-12 菌株比原种产生抗菌素的能力有明显提高。經初篩及复試, 在搖瓶发酵中較 U_1-19 菌株提高 100—120%。

61-7-12 菌株在綜合斜面培养基及几种合成斜面培养基上的生长速度及菌落形态与原种均有明显的区别: 生长极为緩慢, 在 28℃ 时須培养 10—12 天; 孢子顏色較 U_1-19 菌株稍深。在对不同碳源利用的生理特性比較中, 61-7-12 菌株亦与 U_1-19 菌株不同。

参 考 文 献

- [1] Waksman, S. A. & Lechevelier, H.: *Science* 109: 305—307, 1949.
- [2] 蔡潤生等: 科学通报, 1957 (24): 762—764.

SELECTION OF HIGH YIELDING STRAINS IN *STREPTOMYCES FRADIAE*

CHANG SHIAO-YU, SHIEN TSIN-NIN AND HSU WEN-SHIH

(The National Shanghai No. 3 Pharmaceutical Plant, Shanghai)

The killing and mutation rate of mutagenic agents u.v. and nitrogen mustard on *Streptomyces fradiae* were measured. Nitrogen mustard was shown to be a more potent mutagen than u.v.

A strain 61-7-12 obtained after nitrogen mustard treatment gave significantly higher yield of antibiotic than the original strain U₁-19; as high as 200—220% was achieved in shaker fermentation test.

The growth rate and colony morphology of 61-7-12 were quite different from the parent strain both on natural and synthetic media. It grew very slowly and required 10—12 days at 28°C to attain full growth on slants. It also differed from U₁-19 in being darker in spore colour and in the utilization of carbon source.