

不同氮源培养基对鏈霉素放綫菌 (*Act. streptomycini*) 的生长及 产生鏈霉素的影响

張 浩 王心田 陈潔芬 李家友 倪广平

(华北药厂, 石家庄)

Waksman^[1] 最初用蛋白胨和肉浸汁培养基制取鏈霉素, 并认为肉浸汁含有合成鏈霉素所必需的“前体物”。后来人們在不含肉浸汁和蛋白胨的培养基上也能得到鏈霉素。Dulaney^[2], Woodruff^[3], Шапошников^[4,5], Eiser^[6], Агатов^[7], Северин^[8] 等指出, 某些氨基酸等含氮化合物, 对鏈霉素产生菌的生长和鏈霉素的形成有刺激作用。但是对于鏈霉素的工业生产来讲, 仍以 Rake 和 Donovan^[9] 提出的用黄豆粉作氮源的培养基最有实际意义。

除蛋白質及其降解产物等有机含氮化合物以外, 某些无机含氮化合物也可作为鏈霉素放綫菌的生长和鏈霉素生物合成的氮源。Dulaney^[2] 指出, 对鏈霉素的生物合成来说, 以氨的磷酸盐最好, 硝酸盐状态的氮不能做为单一氮源。

为了进一步观察鏈霉素放綫菌在不同氮源培养基上的生长和鏈霉素的产生, 我們选用了黄豆粉、硫酸铵、碳酸铵、硝酸铵、氯化铵及尿素作为氮源进行比较。

材 料 和 方 法

所用菌种为 *Act. streptomycini* XS。用黄豆粉培养基制备种子。以 48 小时的培养物为接种材料, 接种量 5%, 发酵以 Северин^[10] 培养基为基础, 略为改良, 它的成分是葡萄糖 5%; KH_2PO_4 0.08%; NaCl 0.25%; CaCO_3 0.7%; 不同的氮源按总氮 0.18% 计配入培养基。当培养基中有黄豆粉时, KH_2PO_4 为 0.05%。当用无机氮源时加入 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%。500 毫升三角瓶装量为 50 毫升。摇床每分钟 210 转。培养温度 26°C。每次取 3—5 瓶合并, 用布氏漏斗过滤或离心分离。滤液进行各种分析: 用碱性醋酸铅沉淀蛋白质^[11], 用扩散法测定氨, 鏈霉素效价用杯碟法测定, 总氮用凯氏法, 还原糖用斐林法, 用尿酶法测定尿素, 尿酶是用 32% 丙酮从黄豆粉中抽提和沉淀的^[12], 蛋白酶的测定用酪蛋白为基质^[13]。菌絲用 5% 醋酸或 5% 盐酸、水、乙醇, 逐次洗涤, 然后在 105°C 烘干称重。今将 3—4 批的平均结果叙述于后。

結 果 及 討 論

首先为了明确无机氮与有机氮对菌絲生长及产生鏈霉素的影响而进行了下列三种培养基的比较: (1) 用硫酸铵为单一氮源, (2) 黄豆粉为单一氮源, (3) 硫酸铵与黄豆粉为混合氮源 (按总氮计各占 0.09%)。所得结果见表 1。由于用了黄豆粉后不能测定菌絲量, 因此只能从糖氮的消耗以及发酵液的稠厚状况加以估计。在黄豆粉培养基中, 因有大量

表 1 滤液中各种成分的分析

发酵时间 (小时)	糖 (%)			总氮 (毫克/100毫升)			蛋白氮 (毫克/100毫升)			氨 (毫克/100毫升)			链霉素 (微克/毫升)			菌丝量 (毫克/ 100 毫升)
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
48	3.78	3.36	3.96	102.2	100.0	154.8	64.4	18.6	3.2	1.7	55.0	130.4	403	671	175	488
96	2.46	1.96	2.05	92.5	94.6	110.7	55.7	26.6	7.7	1.7	13.0	57.9	1354	2387	1114	903
144	1.32	0.30	0.42	120.5	109.0	97.4	38.4	29.5	11.6	2.6	10.8	16.6	2010	3125	2723	1274
168	0.96	0.20	0.13	138.1	115.9	107.1	37.6	7.2	19.4	5.3	11.8	12.8	2375	3495	3231	1209

1. 黄豆粉培养基; 2. 混合培养基; 3. 硫酸铵培养基。

有机氮源可供利用,更重要的是由于缺少无机氮,所以糖的利用速度减慢,最后所剩的残糖较高。而氮的利用在 96 小时达到相当的高峯。由于培养基中有蛋白质及大量氨基酸存在刺激产生蛋白酶^[12],因此表现酶活力很高(见表 2)。但是此菌单单利用黄豆粉做为氮源不能形成正常菌丝。在发酵的第二天菌丝形成短段,并出现美蓝不能染色的“液胞”。因此虽然起步单位高,但最终单位很低。

表 2 发酵 96 小时每毫升滤液蛋白酶的活力

培养基氮源	黄豆粉	硫酸铵	两者混合
酶活力	78	3—13	49

注:酶活力单位为 10^{-5} 毫克当量酪氨酸/分。

在硫酸铵的培养基上,菌丝的积累初期较缓慢,因此表现起步单位低。但在后期,当菌丝一旦积累到一定的浓度就猛烈产生链霉素,生物合成在 144 小时以前达高峯。此时菌丝氮约占发酵液总氮的一半。而在滤液里为菌丝所合成的含氮化合物中链霉素的氮占去一半以上。发酵液在前期可溶性蛋白及其降解物很少,所以蛋白酶活力很低。在显微镜观察中,菌丝原形质均匀,嗜碱性强,分化的时间推迟,菌丝的青春期延长。由此可见,氨在链霉素放线菌生长和产生链霉素过程中的地位和重要性。

在混合培养基上,发酵液中氨的消失很快,由此可以证明,菌丝首先利用大量无机氮源合成菌丝。而有机氮起了良好的作用,因而造成菌丝积累快,起步单位高的特征。此菌所分泌的蛋白酶对蛋白质的水解能力是很强的,因此在培养基中可溶性蛋白质很少积累。

以上结果引起了我们对无机氮源的注意。单纯用硫酸铵做氮源明显的缺点是菌丝的积累较慢(与混合氮源相比较)。如果能够补救某些缺点,就有可能将链霉素发酵用的黄豆粉节省下来,这是一件很有经济意义的事情。因此我们认为有必要对无机氮源重新进行考查。我们就几种最普通的无机铵盐以及尿素进行了比较。使用下列几种化合物做为单一氮源:硫酸铵、硝酸铵(硝酸部分不计入氮源)、碳酸铵、尿素。结果见表 3。在链霉素的积累方面硫酸铵领先,而在菌丝的增长速度上尿素第一。为此,我们又对尿素作为单一氮源进行了观察。Waksman^[1]曾指出放线菌能利用尿素。Simon^[13], Ivanof^[14]均指出链霉素生产菌株有尿酶。关于尿素对抗菌素的生物合成的影响也有不同的报导。Dulaney^[2]和 Saunders^[15]指出尿素不能提高或反而降低链霉素产量。而 Ferguson^[16]和

表 3 比较几种氮源对菌丝生长及链霉素合成的影响

氮 源	菌 丝 量 (毫克/100 毫升)			链 霉 素 (微克/毫升)
	48 小时	96 小时	最 高 峰	
尿 素	544	982	1062	1590
碳 酸 铵	494	874	874	945—1547
硫 酸 铵	236	594	838	3597—3707
氨 化 铵	336	766	898	2840—3120
硝 酸 铵	244	516	556	1851—1963

Eropov^[17] 则认为尿素可以提高链霉素的产量。

在试验开始时，我们首先发现在发酵过程中 pH 升高能导致菌丝极少积累。因此在发酵过程中使用了盐酸调节 pH。结果见表 4，菌丝的积累很快，但自溶也很快，糖的利用极快是它的特点。可惜链霉素产量不高。在显微镜下观察菌丝形态也有显著特征，即菌发育异常，变粗，美蓝染色不均匀，并且出现大量“液胞”。以碳酸铵为氮源时，在利用糖的速度、菌丝积累、形态特征以及链霉素产量，都与以尿素为氮源相似。由于考虑到培养基 pH 升高的原因，可能是尿素被尿酶分解形成氨，所以我们测定了发酵过程中尿素的消失与氨的产生（见图 1）。由图中氨的产生与尿素消失的关系上看到链霉素放线菌利用尿素主要是通过尿酶水解尿素而获取氨。至于尿素何以能刺激菌生长有待进一步的研究。

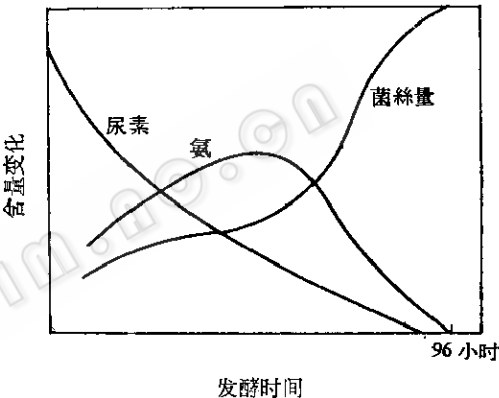


图 1 滤液中尿素、氨、菌丝量变化示意图。

表 4 以尿素作为单一氮源的发酵情况

培养时间 (小时)	糖 (%)	菌 丝 量 (毫克/100 毫升)	链 霉 素 (微克/毫升)	调节后的 pH
24	4.72	146	—	7.7
48	3.37	544	58	7.4
72	1.83	867	327	7.1
96	0.58	982	833	7.3
120	—	1062	1392	7.6
144	—	752	1590	7.9
168	—	529	1475	8.1

摘 要

本文考察了链霉素放线菌在各种不同氮源培养基中的生长及产生链霉素的情况。当用黄豆粉与硫酸铵进行比较时，肯定了无机铵对菌丝生长及产生链霉素的良好作用，缺点是菌丝积累较慢。而用黄豆粉为单一氮源时，菌丝发育不正常。在两者混合的培养基中，

链霉素产量较高。在进行几种无机氮源及尿素的比较时,看到氯化铵与硫酸铵相似,产生链霉素较多。而尿素与碳酸铵相似,菌丝积累及糖的消耗较快,但发育不正常,链霉素产量较低。并且认为此菌利用尿素主要是通过尿酶而进行的。

参 考 文 献

- [1] Waksman, S. A.: *The Actinomycetes, Their Nature, Occurrence, Activities and Importance*, Waltham, p. 38, 82, 1950.
- [2] Dulaney, E. L.: *J. Bact.*, **56**:305—313, 1948.
- [3] Woodruff, H. B. and Ruger, M.: *J. Bact.*, **56**:315—321, 1948.
- [4] Шапошников, В. Н., Казанская, Т. Б., Полтова, И. Т., *ДАН, СССР*, **128**, № 4, 840—842, 1959.
- [5] Шапошников, В. Н., Казанская, Т. Б., *ДАН, СССР*, **127**, № 5, 1117—1120, 1959.
- [6] Eiser, H. M., & McFarlane, W. D.: *Can. J. Research* **26c**, 164—173, 1948.
- [7] Агатов, П. А., Казанская, Т. Б.: *Антибиотики* **3**, (№ 5): 31—33, 1958.
- [8] Северин, В. А., Горская, С. В., Грачева, И. В.: *Вопр. Мед. Хими*, **5**: 448—457, 1959.
- [9] Rake, G. and Donovan, R.: *J. Bact.*, **51**: 596, 1946.
- [10] Северин, В. А., Горская, С. В.: *Антибиотики* **5**, (№ 5): 21—25, 1960.
- [11] Агатов, П. А., Казанская, Т. Б.: *Антибиотики* **3**, (№ 3): 28—30, 1958.
- [12] Иржи Халоунка: *Микробиология*, **27**(4): 422—428, 1958.
- [13] Simon, S.: *Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **3**:53—65, 1955.
- [14] Ivanof, A., Simiti, I., Liana Ivanof: *Stud. Cercetari. Med. (Cluj)* **11**(2):287—295, 1960.
- [15] Saunders, A. P.: *Ph. D. Thesis* Univ. Wisconsin, Madison, 1950.
- [16] Ferguson, J. H., Huang, H. T. and Davisson, J. W.: *Appl. Microbiol.*, **5**:339—343, 1957.
- [17] Игоров, Н. С.: *Антибиотики* **4**, (№ 3): 12—17, 1959.
- [18] 江上不二夫等著: *标准生化学实验*, 207 页, 1953.
- [19] Colowick & Kaplan: *Methods in Enzymology*, **2**:378, 1955.

THE INFLUENCE OF DIFFERENT NITROGEN SOURCES ON THE GROWTH AND STREPTOMYCIN PRODUCTION BY *ACTINOMYCES STREPTOMYCINI*

ZHANG HAO, WANG XIN-TIAN, CHEN JIE-FEN,

LI JIA-YOU AND NI GUANG-PING

(North China Pharmaceutical Industry, Shijia-Zhuang)

The effect of various nitrogenous substances on the mycelial growth and streptomycin synthesis by *Act. streptomycini* was investigated. Ammonium sulfate medium gave high streptomycin yield but slow mycelium growth. When soybean meal was used as the sole nitrogen source mycelial developed abnormally. The mixed medium of soybean meal and ammonium sulfate, gave higher yield of streptomycin. Comparing different inorganic compounds regarding their effect on growth and streptomycin synthesis, it was found that the ammonium chloride resembles ammonium sulfate in higher streptomycin production. Urea was similar to ammonium carbonate in the abnormal mycelial growth, quick sugar utilization and slow antibiotic production. The utilization of urea by the organism is believed to be due to the enzymatic action of urease.