

卡那霉菌在工业发酵过程中细胞的分化

刘颐屏* 袁朝辉 徐美娟 胡君辰

(华东师范大学生物系遗传教研室;上海)

本实验用相差观察方法,对照生化分析和有关数据,对卡那霉菌工业发酵过程中,卡那霉菌菌丝细胞在不同发育阶段的结构和功能的变化,进行了研究。提出卡那霉菌细胞分化过程,发育阶段划分的依据:卡那霉菌在摇瓶、一级种子罐、二级种子罐和发酵罐的不同培养条件下,有规律地进行了一系列的生活循环。在摇瓶、一级种子罐和二级种子罐内,各完成一个生活循环,在发酵罐内能完成三个生活循环。在每个生活循环中,又有规律地完成各个发育阶段。除摇瓶培养由于原始接种材料是从斜面培养转入浸没培养,存在着一个生活循环中五个发育阶段外,一级种子罐、二级种子罐和发酵罐中的每一个生活循环,都只有三个发育阶段,但是由于培养基成份和培养条件不同,完成每一发育阶段的时间有所不同。不同发育阶段的菌丝细胞具有不同的特征和特性,细胞的内外结构不同,生化功能也不同,结构和功能间有一定的相关性。

根据卡那霉菌菌丝细胞分化的规律,设计卡那霉素发酵的工艺流程,将可以缩短发酵周期,节约能源,选择最适平行接种或倒种材料,提高卡那霉素产量。

本实验也为进一步研究放线菌浸没发酵中分化的遗传控制创造了条件。

关键词 卡那霉菌;细胞;分化

链霉菌细胞的分化受遗传的控制,但与培养的条件有密切的关系^[1-8]。

为了弄清楚卡那霉菌 (*Streptomyces kanamyceticus*) 在卡那霉素工业发酵中四次移植和二百五十小时左右的浸没培养过程,菌丝细胞的分化,我们作了相差显微镜观察,发现在任何一个培养过程,都具有明显不同的菌丝发育阶段,对照培养过程的生化分析发现两者之间存在着一定的相关性。因此在卡那霉素的工业生产中,可以根据有规律的菌丝分化过程的不同发育阶段来设计合理的工艺流程,调节和控制卡那霉素的发酵。由于菌丝的分化受遗传的控制,因此也可以根据不同的发育阶段来研究浸没培养中菌丝的发育遗传。

材料与方 法

(一) 菌种

卡那霉菌 381 号 (*Streptomyces kanamyceticus* No. 381) 由无锡第一制药厂提供。

(二) 卡那霉素工业发酵流程

斜面孢子 $\frac{7 \text{ 天}}{27 \pm 0.5^\circ\text{C}}$ 摇瓶种子培养 $\frac{48 \text{ 小时}}{27 \pm 0.5^\circ\text{C}}$
一级种子罐 $\frac{52 \text{ 小时}}{27 \pm 0.5^\circ\text{C}}$ 二级种子罐 $\frac{48 \text{ 小时}}{27 \pm 0.5^\circ\text{C}}$
发酵罐 $\frac{110 \text{ 小时左右}}{27 \pm 0.5^\circ\text{C}}$ 放罐。

(三) 观察用的样品

从无锡第一制药厂卡那霉素车间,在卡那霉素发酵中四次繁殖和培养过程取样。在摇瓶、一级种子罐和二级种子罐培养过程每隔四小时取样一次,发酵罐发酵过程每隔六小时取样一次。

(四) 标本制作

样品取得后,用 4% 的乙醛稀释作相差显微镜观察用。将样品与乙醛在试管中混合。培养前

本文于 1982 年 8 月 23 日收到。

* 现在地址是上海第三制药厂抗菌素研究所。

本工作承无锡第一制药厂应允采集卡那霉素发酵过程的各级样品特此致谢。

期样品中菌丝浓度低, 用 1 (样品):3 (乙醚) 或 1:5 混合, 后期浓度较高, 用 1:9 混合。用 4% 的乙醚保存样品不但不影响菌丝细胞的内外结构, 而且可以长期保存, 随时制作标本。样品的一部分不用乙醚稀释, 直接作革兰氏染色标本作为相差观察的对照。

(五) 相差观察与照相

相差观察与照相是用 Carl Zeiss Jena 30-G048C 型显微镜, 接物镜是 PhV 100 \times 油镜, 照相目镜是 8 \times , 光源是 25W 卤素灯泡, 滤色镜浅绿色, 集光镜的镜口率 0.9, 照相用的胶卷是“上海”21 $^\circ$ 全色片, 曝光时间 2 秒。

革兰氏染色标本的观察与照相用的接物镜是 100 \times 油镜, 照相目镜是 8 \times , 滤色镜深绿色, 集光镜的镜口率 1.4, 其余与相差观察和照相相同。

结 果

(一) 摇瓶培养过程中菌丝分化的五个发育阶段

1. 萌发阶段: 摇瓶培养的接种材料来自长好的新鲜斜面, 用接种棒切取斜面小块, 它包含着营养菌丝、气生菌丝和分生孢子 (图版 I-1), 移殖于摇瓶。在新的培养基和培养条件下, 这些细胞开始生长和发育, 分生孢子和菌丝断片在 2—6 小时内分别萌发, 产生芽管的数目自 1—3 个不等 (图版 I-2)。

2. 一级分枝阶段: 由芽管逐渐延长而成为初级菌丝或主轴菌丝。在接种后 4—8 小时, 从初级菌丝的基部到顶端依次长出次生菌丝, 使整个菌丝体具有长短不等的分枝, 这种分枝称为一级分枝 (图版 I-3), 此时菌丝细胞外观粗壮, 内部原生质体均匀, 无横隔、空泡 (cross wall, vacuole)、厚膜孢子 (chlamydo-spore) 或分裂孢子 (fragmental spore) 等浸没孢子 (submerged spore) 出现。

3. 菌丝分节阶段: 摇瓶培养到 10 小时左右, 初级菌丝从基部到顶端依次分节

(segmentation) 和形成横隔, 部分一级分枝的基部也有分节现象, 节间距离近基部的短, 离基部的长 (图版 I-4)。分节说明细胞逐渐成长, 但此时两个节间之间的细胞质仍像上一阶段一样, 还见不到内部的分化现象。

4. 二级分枝阶段: 菌丝分节发生以后, 一级分枝逐渐延长, 培养到 24 小时左右, 在一级分枝上长出二级分枝 (图版 I-5), 二级分枝增殖结果使全部菌丝体形成一个疏松的菌丝团 (pellet)。

5. 厚膜孢子形成阶段: 培养到 36 小时, 一级和二级分枝的分节越来越多, 节间距离也越来越短, 部分原生质有收缩现象, 菌丝中出现直径比菌丝大的厚膜孢子 (内生孢子) (图版 I-6)。培养到 48 小时, 也就是摇瓶培养结束, 作为一级种子罐接种材料时, 菌丝在分化上没有明显进展, 不过分枝继续分化, 厚膜孢子增多 (图版 I-7), 菌丝细胞的总量增加。结束了具有五个发育阶段的一个生活循环。

(二) 一级种子罐中菌丝分化的三个发育阶段

1. 一级分枝阶段: 从摇瓶培养移种到一级种子罐后, 不但一级种子罐的接种材料的形态发生变化, 菌丝细胞的生活环境也发生了变化, 培养基和培养条件都与摇瓶培养不同, 在种子罐中在搅拌器的搅拌下, 移种物首先被充分分散, 厚膜孢子和分散菌丝分别发芽和分枝, 形成新的菌丝和菌丝体。经过约 10 小时的培养, 大部分菌丝体生长茁壮, 细胞内原生质均匀, 无空泡和内生孢子, 也无横隔出现, 一级分枝产生, 也可见个别二级菌丝 (图版 I-8)。

2. 二级分枝阶段: 从移种后 16 小时开始, 初级菌丝和一级分枝菌丝开始分节, 分节的顺序和摇瓶培养菌丝相仿, 也是由基部开始, 近基部的节间距离短, 远基部的

长。部分菌丝开始产生二级分枝(图版 I-9), 40 小时左右, 大部分菌丝都具有二级分枝, 并不断延长, 形成新的菌丝团。

3. 分裂孢子形成阶段: 培养至 48 小时左右; 分枝菌丝继续生长, 但外观比以前细长, 原生质开始收缩, 菌丝发生分裂而形成分裂孢子(图版 I-10), 至 52 小时, 大部分菌丝产生分裂孢子。这是一级种子罐中一个生活循环的三个发育阶段的最后一个阶段, 也是移殖二级种子罐的规定时间。

(三) 二级种子罐中菌丝分化的三个发育阶段

1. 菌丝增殖阶段: 从一级种子罐移殖至二级种子罐的菌丝细胞, 虽然换了一个新的环境, 但培养基成份和培养条件基本上与一级种子罐相仿, 因此种植以后, 接着就开始一个新的生活循环, 菌丝断片和分裂孢子萌发成新的菌丝, 菌丝体的数量迅速扩增, 培养至 8 小时, 尚存留有部分老菌丝及个别厚膜孢子(由一级种子罐移入的菌丝), 但大部分是较细长的新菌丝(图版 II-1)。新菌丝原生质均匀, 节间距离长, 个别厚膜孢子开始萌发。

2. 菌丝断裂阶段: 培养至 20 小时, 菌丝逐渐变粗, 分节增多, 节间距离缩短, 部分菌丝开始断裂, 产生游离菌丝片段。至 36 小时游离菌丝片段增多, 并有分裂孢子链和分裂孢子出现(图版 II-2)。

3. 分裂孢子形成阶段: 从 36 小时至 48 小时, 大部分菌丝开始自溶和断裂, 释放出大量分裂孢子, 在二级种子罐里完成了一个生活循环(图版 II-3), 成为发酵的接种材料。

(四) 发酵过程的三个生活循环

1. 第一生活循环: 第一生活循环逐步完成在 0—30 小时之间。由二级种子罐中的菌丝细胞移殖到发酵罐后, 培养基和培养条件又发生了一次变化, 而且是比较大

的变化, 移种后 3—9 小时, 接种材料生长迅速, 分裂孢子菌丝断片萌发成新菌丝, 并产生分枝, 相当于二级种子罐的菌丝增殖阶段。部分菌丝顶端可以看到如 *Caryajal*^[1] 所描述的呈棍棒状的结构 (clavate) (图版 II-4), 随后菌丝断裂分散(断裂阶段), 到 30 小时左右可以看到基本上全部菌丝都断裂成片段, 原生质体均匀, 无空泡(图版 II-5) (相当于分裂孢子形成阶段)。

2. 第二生活循环: 第二生活循环逐步完成在 31—75 小时之间。断裂的菌丝片段在 30 小时左右, 开始萌发芽管, 芽管从菌丝断片的顶侧发生, 数目自 1—3 个不等(图版 II-6)。逐渐延长再生成菌丝和菌丝体, 细胞内原生质体均匀。45 小时左右, 菌丝分节, 并有少数再生菌丝开始分裂, 产生分裂孢子, 但是大部分再生菌丝经分枝后形成菌丝团(图版 II-7), 相当于菌丝增殖阶段。培养到 57 小时左右, 菌丝中原生质体收缩, 节间距离缩短, 菌丝裂解又产生分裂孢子和孢子链, 以及菌丝片段(断裂阶段), 到 75 小时, 除少数菌丝继续生长分枝外, 大部分菌丝都变成断片, 完成了第二个生活循环(图版 II-8) (相当于分裂孢子阶段)。

3. 第三个生活循环: 第三个生活循环逐步完成在 76—110 小时之间。75 小时的菌丝断裂成片段后, 迅速再度发芽和形成再生菌丝和菌丝团(图版 II-9) (菌丝继续增殖阶段)。在 75 小时时未断裂的菌丝则继续断裂。到 93 小时左右, 大量菌丝几乎同时出现原生质体收缩, 菌丝又发生断裂(断裂阶段), 110 小时前, 即发酵液放罐之前, 菌丝体释放出大量分裂孢子和菌丝断片, 结束了第三个生活循环(图版 II-10)。

(五) 发酵过程生化变化与形态变化的关系

在发酵过程中, 定期从发酵罐中取样并分析卡那霉素生物效价、氨氮、糖含量以及 pH 值的变化, 结果如图 1 所示。

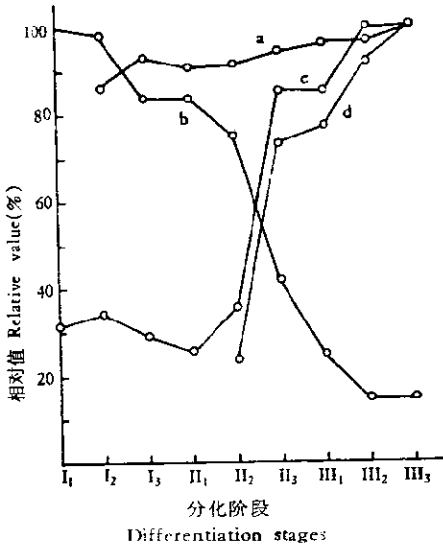


图 1 发酵过程生化变化与形态变化的关系

Fig. 1 The relations between chemical and morphological changes in fermentation

I. II. III 分别代表第一、第二、第三生活循环; 1. 2. 3. 分别代表第 1、第 2、第 3 阶段。

I. II. III are representatives of first, second and third life cycles respectively; 1. 2. 3 are representatives of first, second and third stages respectively.

a. pH b. 糖 Sugar c. 氨 Ammonia in nitrogen d. 生物效价 Titre

讨 论

在卡那霉素工业发酵过程中, 生产上对卡那霉菌菌丝形态描述, 缺乏有系统的实验依据, 因此存在着混乱和科学性的不足, 错误地认为在卡那霉素发酵过程中, 卡那霉菌菌丝的变化只有一个生活循环和五个发育阶段, 因此没有发现菌丝分化的真正规律, 更没有利用分化规律来指导生产, 提高产量。

我们经过对无锡第一制药厂卡那霉素发酵始末菌丝分化的相差显微镜连续观察和分析, 证实在不同的培养环境中存在着

一个和一个以上的生活循环, 在摇瓶、一级种子罐和二级种子罐中都只有一个生活循环。在发酵罐中有三个生活循环, 每一个生活循环基本上存在着三个发育阶段, 即孢子(包括分生孢子、分裂孢子和厚膜孢子)或菌丝断片的萌发阶段, 菌丝的分枝、分节和增殖阶段以及菌丝的分裂和浸没孢子的形成阶段。但是由于菌丝细胞的分化并不是同步的, 因此在任何时候任何环境中都可以看到三个发育阶段菌丝形态的交叉存在, 但是在比例上都有非常明显的差别, 同时在连续观察中可以看到发育阶段演变的趋向。正因为三个发育阶段菌丝形态的交叉存在, 所以, 如果不是经过有系统地观察和分析, 单靠局部的取样镜检就会得出错误的结论。

发酵过程菌丝的分化和生化的变化之间存在着一定的相关性。当二级种子罐培养完毕时(48 小时), 菌丝的分化处于第三发育阶段——菌丝分裂和浸没孢子形成阶段, 此时卡那霉素在培养液中的含量达 2000u/ml。在发酵罐中, 除 30 小时左右的第一生活循环的第三发育阶段时, 效价低于 2000u/ml 是因为菌丝浓度过稀外, 60 小时左右的第二生活循环的第三发育阶段的前后, 效价迅速上升, 氨氮也开始上升。90 小时左右的第三生活循环的第三发育阶段前后, 效价又一次迅速上升, 此时氨氮达最高点, 残糖至最低点, 并且都呈现稳定状态。

由于营养的消耗和自身代谢产物的反馈抑制作用, 菌丝的分化一般停止在第三发育阶段出现以后, 但是上述两个条件尚未达到极限之时, 菌丝的分化将继续循环下去, 发酵罐中菌丝的分化情况就是一个很好的证据。因此, 第三发育阶段的菌丝细胞是最适宜的, 可以用作倒种或平行接种的接种材料。假使在接种量上控制恰

当, 它的经济效果有可能超过常规培养的接种材料。基于菌丝细胞的分化有一定的规律, 以及发酵过程生化变化和菌丝变化之间有一定的相关性, 因此根据这种规律和相关性设计卡那霉素的发酵工艺, 或通过菌丝分化的遗传控制的研究, 选育出分化突变型, 适应浸没培养, 可以缩短发酵周期和节约能源, 必将会进一步提高卡那霉素的工业生产。

在我们的实验过程中未发现 Klieneberger-Nobel^[3] 和 Bisset^[5] 所描述的原始细胞, 这可能与菌种和培养条件的不同有关, 但我们确实见到了 Carvajal^[1] 所描述的棍棒状菌丝。这可能是放线菌浸没培养中的一个特征, 它的分化程度类似表面培养的气生菌丝。

参 考 文 献

- [1] Carvajal, F.: *Mycologia*, 39: 426—440, 1947.
- [2] Wilkin, G. D. and A. Rhodes: *Jour. Gen. Microbiol.*, 12: 259—264, 1955.
- [3] Klieneberger-Nobel, E.: *Jour. Gen. Microbiol.*, 1: 22, 1947.
- [4] Hopwood, D. A. and A. M. Glauert: *Jour. Biochem. Biophys. Cytol.*, 8: 257—266, 1960.
- [5] Bisset, K. A.: *Jour. Gen. Microbiol.*, 104: 157—159, 1978.
- [6] Wildermuth, H.: *Jour. Microbiol.*, 60: 43—50, 1970.
- [7] Wildermuth, H. and D. A. Hopwood: *Jour. Gen. Microbiol.*, 60: 51—59, 1970.
- [8] Chater, K. F.: *Jour. Gen. Microbiol.*, 72: 9—28, 1972.

DIFFERENTIATION OF *STREPTOMYCES KANAMYCETICUS* DURING INDUSTRIAL FERMENTATION

Liu Yiping* Yuan Chaohui Xu Meijuan Hu Junchen

(Teaching and Research Section of Genetics, Department of Biology, East China Normal University, Shanghai)

The structure and function of mycelia cells in different developmental stages of *Streptomyces kanamyceticus* during industrial fermentation were studied by phase contrast and Gram staining microscopy. Foundations for dividing developmental stages during submerged culture were discovered. In shaking flask, seed tank and fermentation tank cultures there were several rounds of life cycles respectively, according to morphological changes, every life cycle contained 3 to 5 developmental stages. Mycelia of different stages had their own characteristics including

inner and outer cellular structures and biochemical functions. Between structure and function there was a correlation. Therefore, it was possible to improve the technology of kanamycin fermentation by controlling the course of mycelial differentiation.

Key words

Streptomyces kanamyceticus; Cell; Differentiation

* Present address: Institute of Antibiotics Research, The Third Pharmaceutical Plant, Shanghai

图版 I 说明

1. 从斜面移植来的摇瓶接种材料 a. 分生孢子; b. 分子孢子链; c. 气生菌丝; d. 营养菌丝。 2. 孢子萌发, 长出 3 个芽管。 3. 从芽管产生的一级分枝生长初期。 4. 初级菌丝开始分节。箭头所指为分节处。 5. 二级分枝发生情况。a. 初级菌丝; b. 一级分枝; c. 二级分枝。 6. 厚膜孢子形成。箭头所指为菌丝内的厚膜孢子。 7. 摇瓶培养结束时, 在菌丝团中可以见到更多的厚膜孢子。 8. 一级种子罐培养初期的新菌丝。a. 初级菌丝; b. 一级分枝; c. 二级分枝。 9. 初级菌丝开始分节, 二级分枝增多。箭头所指为分节处。 10. 菌丝发生分裂, 形成分裂孢子。箭头所指为各级菌丝内的分裂孢子。

1. Inoculating material for shaking flask cultures from slants. a. Conidial spore; b. Spore chain; c. Aerial mycelium; d. Vegetative mycelium. 2. Germinating spore with three germ tubes. 3. First stage branches from germ tube. 4. Segmentation of primary mycelium. 5. Second stage branches grow out from the first stage branches. a. Primary mycelium; b. First stage branch; c. Second stage branch. 6. Formation of chlamydo spores in mycelium. 7. More chlamydo spores can be seen in mycelial pellets at the end of shaking flask culture. 8. New mycelia at the begining of 1st stage seed tank culture. a. Primary mycelium; b. 1st stage branch; c. Second stage branch. 9. Segmentation of primary mycelia. 10. Fragmentation of primary mycelia and formation of fragmental spores.

图版 II 说明

1. 二级种子罐培养初期的新菌丝, 菌丝细长, 分枝繁多。 2. 菌丝变粗, 并开始分裂, 形成分裂孢子。 3. 二级种子培养结束, 菌丝发生自溶, 释放出分裂孢子。 4. 发酵初期菌丝顶端的棍棒状结构。 5. 发酵过程中, 第一生活循环完成时, 几乎全部菌丝体断裂成片段。 6. 发酵过程中, 第二生活循环开始时, 菌丝断片发芽情况。 7. 由菌丝断片形成的菌丝团, 它与培养基中的圆形物缠结在一起。箭头所指为分裂孢子。 8. 第二生活循环结束时, 大部分菌丝又变成断片和分裂孢子。 9. 第三生活循环中, 重新形成的菌丝团。 10. 发酵结束时的菌丝断片和分裂孢子。

1. New mycelium at the 2nd stage seed tank culture. 2. Fragmentation and fragmental spores formed. 3. At the end of the 2nd stage tank culture, mycelia are lysed, fragmental spores are released. 4. Clavete at mycelial distal part. 5. At the end of the first life cycle during fermentation, almost all mycelia become fragments. 6. At the begining of the second life cycle fragments are going to germinate. 7. Pellets and solids of medium complex. 8. At the end of the second life cycle during fermentation, most mycelia become fragments and fragmental spores. 9. Pellets formed in the third life cycle during fermentation. 10. At the end of fermentation mycelia become fragments and fragmental spores.