

一株妥布拉霉素高产菌株特性的研究

章慧德 吴欣 刘肃

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用高温和 NTG 处理暗黑链霉菌 410-II (*Streptomyces tenebrarius* 410-II) 的孢子, 得到六株无色突变株。所产抗生素只有两个组分, 经分析为氨甲酰妥布拉霉素 (Carbamoyltobramycin) 和阿普拉霉素 (Apramycin), 不再含有出发菌株产生的氨甲酰卡那霉素 (Carbamoylkanamycin)。在适宜的发酵条件下, 所含两个组分的比例约为 1:1。突变株基本不产生可溶性紫色素, 发酵液离心所得上清液虽加入 Fe^{2+} , 也不变成紫色, 有利于提取工艺。六株突变株中 W1028-M5 所产抗生素总效价比原株 410-II 高 20% 以上, 发酵液中氨甲酰妥布拉霉素含量比 410-II 提高约 45—50%。由于组分减少, 提取分离效率提高, 在实验室用 10 升发酵液进行提取实验, 妥布拉霉素单组分的收率达到 25%。突变株 W1028-M5 是一株产量增高、收率提高、适用于生产的菌株。

关键词 暗黑链霉菌; 妥布拉霉素

妥布拉霉素 (Tobramycin) 是一个氨基糖甙类广谱抗生素, 临床效果优于庆大霉素。1976 年我们从安徽土壤中分离到一株链霉菌, 定名为暗黑链霉菌 410^[1]。该菌在沉没培养条件下产生多组分氨基糖甙类抗生素, 主要是阿普拉霉素、氨甲酰卡那霉素和氨甲酰妥布拉霉素三个组分。氨甲酰妥布拉霉素经碱水解得到妥布拉霉素。由于各组分结构近似, 不易分离, 是工艺上待解决的问题。生产上要求提高氨甲酰妥布拉霉素的含量, 减少或消除其它组分。为此曾用改变培养基成份、培养温度、pH 和通气量等方法来改变各组分之间的比例或对某种组分进行选择, 效果均不明显。为使菌株获得有效的生产能力, 利用诱变改变抗生素生产菌的遗传机制, 是一种有效的方法。本文采用物理的和化学的诱变方法, 即高温和 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NTG) 反复处理, 分离出六株无色突变株。它们只产生阿普拉霉素和氨甲酰妥布拉霉素, 而不再合成氨甲酰卡那霉素。采用大孔羧酸树脂进行单组分分离, 使妥布

拉霉素收率提高, 达到 25%。

材料和方法

(一) 菌种

出发菌株为本实验室的暗黑链霉菌 410-II (*Streptomyces tenebrarius* 410-II)

(二) 培养基

1. 斜面及平板分离培养基: 改良 Bennett 培养基。

2. 种子及发酵培养基^[3]。

(三) 抗生素效价和组分检定

1. 生物测定:

测定菌: 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) AS 1.339。

测定培养基(%) : 蛋白胨 0.5, 牛肉膏 0.3, 酵母浸膏 0.1, 琼脂 1.3, 用 1/30 mol/L pH7.5 磷酸缓冲液配制。(上、下层成分相同)。

测定方法: 二剂量法。

2. 组分检定: 采用硅胶 G 薄层测定发酵液

本文于 1987 年 3 月 19 日收到。

本文中 1H -NMR 及 ^{13}C -NMR 由中国科学院化学研究所代测, 质谱由中国军事医学科学院仪器中心研究室代测, 特此致谢。

中或提取液中活性物质的组份。

溶剂系统: 正丙醇: 甲醇: 浓氨水 = 2.5:2:2;
氯仿: 甲醇: 浓氨水 = 1:3:2。生物显影或茚三酮显迹。

结果和讨论

经高温和 NTG 反复处理, 从大量突变株中分离到六株无色突变株, 效价均高于原株。经连续三代斜面培养, 形态特征无改变, 也不产生可溶性紫色素。

(一) 突变株与出发菌株形态特征比较

六株突变株形态特征一致。突变株 W1028 在改良的 Bennett 培养基上生长良好, 气丝呈粉状, 浅桂皮淡棕色 (III52')^[2], 基丝呈淡鹿角棕 (III32'), 不产生可溶性色素。W1028 形态特征与 410-II 基本相同, 但 410-II 产生可溶性紫色素 (淡鸡冠紫 $1 \times 64'$)。将 W1028 及 410-II 分别接种在葡萄糖酵母膏琼脂、高氏合成 1 号琼脂、淀粉琼脂、纤维素生长培养基、葡萄糖天门冬素琼脂、甘油察氏琼脂、酪氨酸琼脂、燕麦琼脂上, 37℃ 培养 7 天和 14 天进行观察。W1028 和 410-II 两株菌的形态特征基本相同, W1028 除在酪氨酸琼脂、甘油察氏琼脂和燕麦琼脂上产生色素外, 在其它培养基中均不产生可溶性色素, 而 410-II 均产生深浅略有差异的可溶性紫色素。

(二) 突变菌株与出发菌株抗生素生物合成的比较

将斜面孢子接种摇瓶, 于 37℃ 进行振荡培养, 分别在 24、48、72、96、120 小时取样, 测定抗生素的产量及发酵液的 pH。突变株抗生素的产量与 410-II 的产量比较见表 1, 以 410-II 的同期产量作为 100。

从表 1 可以看出, 发酵至 120 小时六株突变株抗生素产量比出发株 410-II 提高

表 1 突变株与出发菌株抗生素生物合成的比较

Table 1 The comparison of antibiotic biosynthesis of mutants with parent strain 410-II

| 菌株 Strain | 抗生素产量 Yield of antibiotic(%) | | | |
|--------------|------------------------------|-----|-----|------|
| | 48h | 72h | 96h | 120h |
| 410-II | 100 | 100 | 100 | 100 |
| W1027 | 96 | 105 | 112 | 112 |
| W1028 | 87 | 98 | 116 | 122 |
| W1030 | 97 | 88 | 109 | 120 |
| W1032 | 110 | 93 | 108 | 115 |
| W1033 | 111 | 108 | 111 | 121 |
| W1034 | 99 | 94 | 97 | 113 |

12%—22%。其中 W1028、W1030、W1033 效价较高。用硅胶 G 薄层层析检定发酵液中的活性物质, 所有突变株都只产生两个组分, 不含 410-II 菌株所产的氨甲酰卡那霉素 (图 1)。在菌株 410-II 的发酵液经离心所得的上清液中加入少量硫酸亚铁溶液,

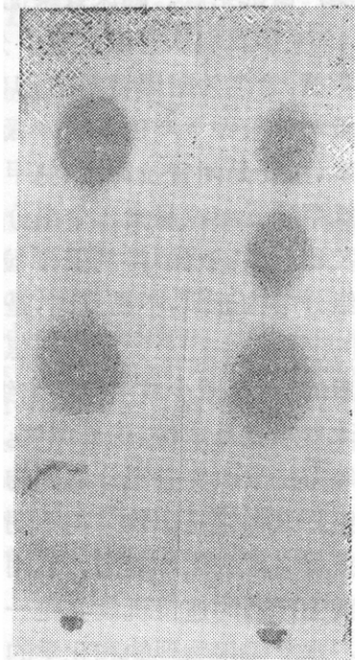


图 1 突变株 W1028 和出发株 410-II 的抗生素复合物的自显影

左: 突变株 W1028; 右: 出发菌株 410-II
Fig. 1 Bioautograph of antibiotic complex
Left: mutant W1028; Right: parent strain 410-II

(Fe²⁺ 最终浓度为 10 μ g/ml) 生成紫色,而六株突变株的上清液不生成紫色。这一现象说明,无色突变株在罐中发酵时,将不因管道中含微量铁,使发酵液变成紫色,有利于简化抗生素提取工艺。W1028 及 410-II 抗生素产量及 pH 变化见图 2。

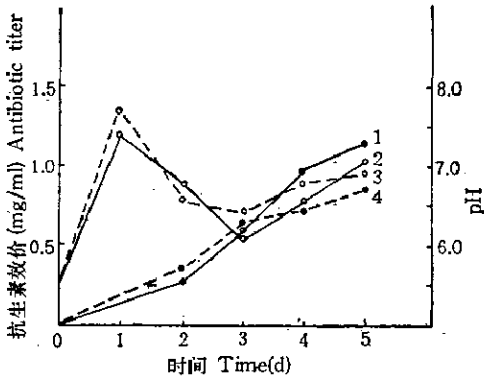


图 2 W1028 和 410-II 抗生素产量及 pH 变化的比较

1. W1028 抗生素效价; 2. W1028 pH; 3. 410-II pH; 4. 410-II 抗生素效价

Fig. 2 The comparison of the pH change and the antibiotic titer produced by W1028 and 410-II. The pH change of W1028 (2), 410-II (3), The antibiotic titer of W1028 (1), 410-II (4)

对 W1028 菌株进行自然分离,得到两种类型的菌落,圆凸型 (M) 和皱纹型 (Z)。分别随机挑出 10 个菌落进行摇瓶发酵,于 120 小时测其抗生素的产量 (表 2)。

表 2 指出,单菌落之间合成抗生素能力有较大差异。10 个圆凸型 (M) 单菌落产生抗生素能力平均为 124.9%,而 7 株皱纹型 (Z) 菌落平均产生抗生素能力为 122.6%,二者差异不明显,与 W1028 产抗生素能力 122% 近似。然而其中 M5 合成抗生素能力最强为 162%。

(三) 突变株 W1028-M5 抗生素提取、分离和理化性质

突变株 W1028-M5 在 37℃ 摇瓶发酵 120 小时,中性滤液通过 Amberlite IRC-50 (NH₄⁺) 阳离子交换柱,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分,用硅胶 G 薄层层析检定抗生素组分,将与国外妥布拉霉素样品 R_f 值相同的高峰部分合并,减压浓缩,冷冻干燥后得白色粉状物,即为妥布拉霉素。由于突变株 W1028-M5 发酵液

表 2 突变株 W1028 自然分离株抗生素的生物合成
Table 2 The antibiotic biosynthesis of natural isolated strains of mutant W1028

| 菌株 Strain | 410-II | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 | M9 | M10 | 平均值 Mean |
|------------------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------|
| 抗生素产量(%) Yield of antibiotic | 100 | 126 | 137 | 138 | 109 | 162 | 115 | 128 | 127 | 102 | 105 | 124.9 |
| 菌株 Strain | 410-II | Z1 | Z2 | Z3 | Z4 | Z5 | Z6 | Z7 | Z8 | Z9 | Z10 | 平均值 Mean |
| 抗生素产量(%) Yield of antibiotic | 100 | / | / | 137 | 131 | / | 130 | 119 | 123 | 97 | 121 | 122.6 |

中仅含两个组分,其总效价又比出发菌株提高 20% 以上,使氨甲酰妥布拉霉素比出发株提高约 40—50%,又因单组分分离时组分间交叉减少,使妥布拉霉素在实验室 (10 升发酵液) 的提取收率提高,达到 25%。所得妥布拉霉素 (游离碱) 效价为 924u/mg。

从 W1028-M5 发酵液中分离得到的妥布拉霉素易溶于水,稍溶于低级醇,不溶于其它有机溶剂。紫外光谱为末端吸收。在不同溶剂系统中薄层层析 R_f 值均与国外妥布拉霉素样品一致。比旋值 $[\alpha]_D^{25} + 128.7 (C = 1, H_2O)^{[4]}$, 由场解吸质谱测定的分子量为 467^[5], 均与 410-II 菌株所产妥

布拉霉素及国外妥布拉霉素样品一致。

图 3 为突变株 W1028-M5 及 410-II 所产的妥布拉霉素的红外光谱,表明其吸收特性与文献报道的图谱^[6]基本一致。

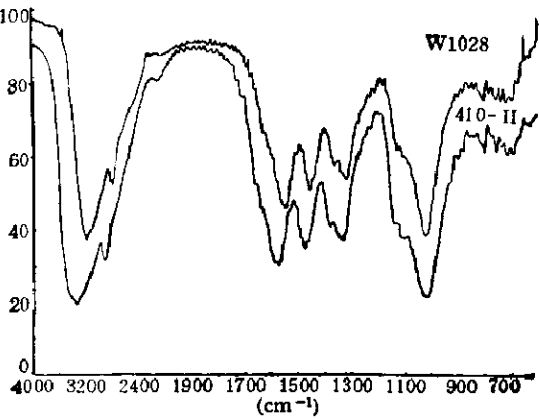


图 3 W1028-M5 和 410-II 所产妥布拉霉素红外光谱的比较

Fig. 3 The comparison of infrared spectra of tobramycin produced by W1028-M5 and 410-II

表 3 ¹³C-核磁共振化学位移值 (ppm)
Table 3 ¹³C-NMR chemical shifts (ppm)

| 碳编号 Number of carbon | W1028-M5 所产妥布拉霉素 Tobramycin produced by W1028-M5 | 国外托布拉霉素样品 Tobramycin sample | 文献值 ^[7] Literature |
|-------------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 51.2 | 51.2 | 51.2 |
| 2 | 36.2 | 36.2 | 36.5 |
| 3 | 49.9 | 50.0 | 49.9 |
| 4 | 86.7 | 86.8 | 87.3 |
| 5 | 75.5 | 75.5 | 75.3 |
| 6 | 88.9 | 88.9 | 88.7 |
| 1' | 100.0 | 100.1 | 100.4 |
| 2' | 50.3 | 50.3 | 50.2 |
| 3' | 35.5 | 35.5 | 35.8 |
| 4' | 67.0 | 67.0 | 67.0 |
| 5' | 73.7 | 73.8 | 74.5 |
| 6' | 42.2 | 42.3 | 42.6 |
| 1'' | 100.8 | 100.8 | 100.7 |
| 2'' | 72.6 | 72.6 | 72.6 |
| 3'' | 55.0 | 55.1 | 55.2 |
| 4'' | 70.0 | 70.1 | 70.2 |
| 5'' | 73.0 | 73.0 | 73.0 |
| 6'' | 61.1 | 61.2 | 61.3 |

图 4 为突变株 W1028-M5 所产妥布拉霉素和国外妥布拉霉素样品 ¹³C-核磁共振谱 (¹³C-NMR)。¹³C-核磁共振谱化学位移值 (ppm) 见表 3。

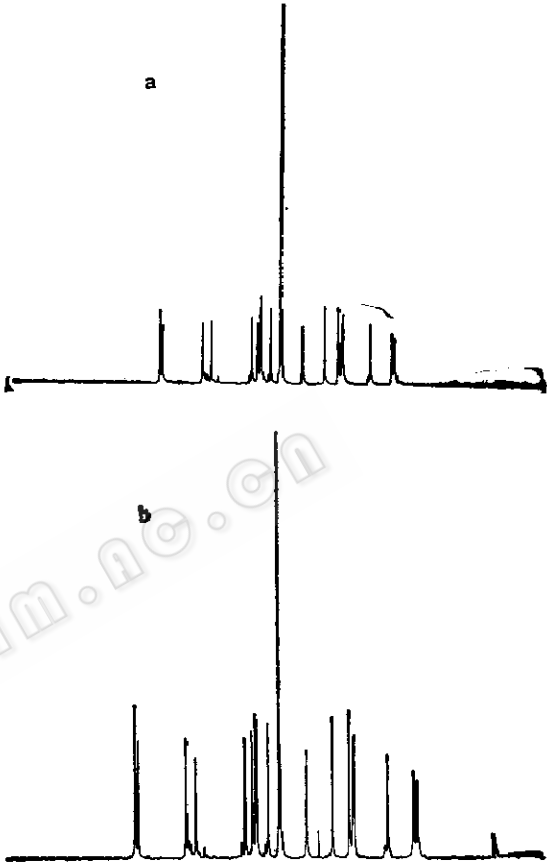


图 4 ¹³C-核磁共振谱的比较
a. 突变株 W1028-M5 所产妥布拉霉素 b. 妥布拉霉素样品

Fig. 4 Comparison of ¹³C-NMR
a. The tobramycin produced by mutant W1028-M5. b. Tobramycin sample

从图 4 及表 3 可以说明,由 W1028-M5 所产妥布拉霉素的 ¹³C-NMR 谱及化学位移值 (ppm) 与国外妥布拉霉素样品基本一致。

综上所述,突变株 W1028-M5 所产妥布拉霉素的薄层层析、旋光、红外光谱、质谱、¹H-NMR、¹³C-NMR 与 410-II 所产妥布拉霉素及国外妥布拉霉素样品的基本一致。说明经过高温及 NTG 反复诱变

处理后, 选出的 W1028-M5 所产妥布拉霉素性质并无改变。是一株产量较高、收率提高、适用于生产的菌株。

参 考 文 献

- [1] 刘 肃等: 中国微生物学会 1979 年学术年会论文摘要汇编, p. 121—122, 1979。
- [2] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组: 《链霉菌鉴定手册》, 科学出版社, 北京, 1975。
- [3] Stark, W. M. et al.: *Developments in Industrial Microbiology* 17: 61—76, 1975.
- [4] Koch, K. F. et al.: *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 1970: 309—313, 1971.
- [5] Be'rdy, J.: CRC Handbook of Antibiotic compounds, CRC press Inc., Boca Raton, Florida, 1: 164—167, 1980.
- [6] Thompson, R. Q. et al.: *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 1967: 332—340, 1968.
- [7] Koch, K. F. et al.: *J. Org. Chem.*, 43: 1430—1433, 1978.

STUDIES ON THE CHARACTERS OF A HIGHER TOBRAMYCIN PRODUCER

Zhang Huide Wu Xin Liu Su

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Spores of *Streptomyces tenebrarius* 410-II were treated with high temperature and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Six mutants without pigment were isolated. These mutants produce only two components, Carbamoyl-tobramycin and Apramycin, but no Carbamoyl-kanamycin. The ratio of the two components is 1:1. These mutants produce no pigment in agars. The filter broth is not turned purple colour when treated with FeSO₄ solution. It is an advantage for purification of the antibiotic. Total titer of antibiotic produced by mutant W1028-M5 is about 20% higher than ori-

ginal strain 410-II. Carbamoyl-tobramycin is increased about 45—50%. Due to lack of one component of antibiotic complex, the efficiency of isolation and purification of antibiotic is increased. The recovery efficiency of tobramycin was reached to 25%. Therefore the mutant W1028-M5 is an available producer of tobramycin.

Key words

Streptomyces tenebrarius; Tobramycin