

宁南霉素产生菌的选育和发酵条件研究

胡厚芝 陈家任 向国西

(中国科学院成都生物研究所,成都 610041)

徐生林 沈锁彬

(四川抗毒素工业研究所,成都 610051)

以诺尔斯链霉菌西昌变种(*Streptomyces noursei* var. *xichangensis*),作为原始菌株,利用紫外线,³²P、铯铍中子源复合因子处理,再经自然分离,获得一株纯化株 16A-6-146-7-98-6-5 (简称 16A-6-5)。此突变株在高氏一号琼脂等培养基上,其培养特征和形态特征与原始菌株有明显区别。在玉米粉、花生饼粉培养基中,起始 pH7.2,28℃,摇瓶振荡培养 72 小时,宁南霉素含量为 5 500u/ml,效价比原始菌株提高 6 倍,因此认为该突变株有工业应用前景。

关键词 宁南霉素产生菌;发酵条件

水稻白叶枯病是水稻生产上的三大病害之一,化学农药虽然有控制该病的作用,但造成环境和农产品污染,直接影响人、畜健康。宁南霉素为首次发现的胞嘧啶核苷肽型新抗生素,它是一种高效、低毒、低残留^[1]的广谱性农用抗生素。它对水稻白叶枯病^[2]平均相对防治效果为 70%左右,高的可达 90%,一般增产效果为 10—20%,高的可达 35%,另外它对小麦、蔬菜^[3]、花卉等白粉病的防病、增产效果都很显著,对水稻小球菌核病和油橄榄孔雀斑病、疮痂病也有良好的防治效果。现将宁南霉素产生菌的选育和发酵条件的研究结果报道如下。

材料与 方法

(一) 菌株

诺尔斯链霉菌西昌变种(*Streptomyces noursei* var. *xichangensis*)^[4]16A-6 菌株,作为诱变原始菌株。该菌株系中国科学院成都生物研究所从四川省西昌市的土样中分离得到。

(二) 培养基

1. 斜面培养基(%):

①玉米粉 2.0,花生饼粉 3.5,酵母粉 0.1,磷酸氢二钾 0.05,硫酸镁 0.025,CaCO₃ 0.05,NaCl 0.05,琼脂 2.0,pH7—7.2(灭菌前)。

②燕麦粉 6.0,酵母粉 0.25,K₂HPO₄ 0.07,KCl 0.05,MgSO₄·7H₂O 0.05,FeSO₄·7H₂O 0.001,琼脂 2.5,自然 pH。

本文于 1992 年 10 月 27 日收到。

朱荣秀、常淑玲、陈桥、龙通斌、夏从龙、俞定安、肖世弟等同志参加部分工作,特此致谢。

2. 平皿分离培养基: 上述斜面①号培养基和高氏一号培养基(略)。

3. 摇瓶培养基(%): 玉米粉 2.0, 淀粉 2.0, 葡萄糖 2.0, 黄豆饼粉 1.0, 花生饼粉 0.5, 酵母粉 0.1, MgSO_4 0.0025, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25, K_2HPO_4 0.02, NaCl 0.5, CaCO_3 0.5, pH7.2—7.4(灭菌前)。

4. 生物测定培养基(%): 牛肉膏 0.3, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.1, 蔗糖 1.0, 琼脂 2.5, pH7.2(灭菌前)。

(三) 培养条件

1. 平皿分离:

①经 ^{32}P 诱变处理的单孢悬浮液, 分离于平皿培养基上, 置 28℃ 培养 7 天左右, 置冰箱内保湿 30—60 天, 挑取单菌落。

②经紫外线(UV)处理的单孢悬浮液, 分离于平皿分离培养基上, 置 28℃ 培养 7 天左右, 挑取单菌落。

③经镅铍中子源处理 1—2 个月后的单孢悬浮液, 自平皿分离培养基上分离, 28℃ 培养 7 天, 挑取单菌落。

④自然分离的单孢悬浮液, 分离于平皿分离培养基上, 置 28℃ 培养 3 天左右, 用打孔器打菌落, 放另外消毒过的平皿中, 保湿培养于 28℃ 培养箱, 待菌落变灰色进行抑菌试验。

2. 斜面菌种: 将经抑菌试验选出的高活性单菌落移至斜面培养基上, 置 28℃ 培养箱内培养 7—10 天。

3. 摇瓶发酵条件试验: 将培养好的新鲜斜面菌种挑取一满铲接种至装量 30ml 发酵培养基的 250ml 三角瓶内, 在 28℃ 旋转式摇床上振荡培养 3—5 天, 转速 220r/min。

(四) 效价测定

采用生物检定法, 检定菌为水稻白叶枯病原菌(湖北菌种)。组份测定:

1. 薄层层析法: 采用硅胶 G 薄层紫外分光光度法和薄层扫描法测定。

2. 纸层析法: 采用纸层析, 茚三酮显影。

(五) 诱变剂

紫外线; ^{32}P ; 镅铍中子源。

结 果

(一) 优良菌株的选育

1. 突变型菌株选育及其系谱: 采用紫外线, ^{32}P 和镅铍中子源对 16A-6 菌株进行复合处理, 由平皿分离和摇瓶筛选得到 16A-6-146-7-98-6-5 突变株。该菌株的菌落呈银灰色, 圆形, 中间突出, 呈馒头状, 孢子银鼠灰色。该突变株经连续传代至第三代。再将一、二、三代斜面菌种分别经摇瓶发酵, 其发酵液效价均较稳定, 其中主要组份宁南霉素的比例也较稳定。

2. 突变株的自然分离: 为获得遗传稳定的个体突变株, 对 16A-6-146-7-98-6 突变株进行了自然分离。在自然分离的平皿上可观察到三种类型的菌落, 大部分菌落为一种类

型,保持了原突变株的基本遗传特性,而其他两个类型的菌落则在发酵产抗生素能力上与原始菌株有一定差异。第一种类型菌落中获得几株性能稳定的菌株,并对其中5号菌株进行了深入的研究。

3. 突变株 16A-6-146-7-98-6-5(以下简称 16A-6-5)的形态和培养特征:在高氏一号琼脂上孢子丝为紧螺旋形(图 1),孢子呈纺锤形 $0.45-0.5\mu\text{m}\times 0.75-0.85\mu\text{m}$,孢子表面带细刺(图 2),而原始菌株的孢子丝为敞螺旋形(图 3),孢子呈椭圆形 $0.9\times 1.3\mu\text{m}$,圆形直径 $1.2\mu\text{m}$,孢子表面带刺(图 4),两者有明显区别。在高氏一号琼脂培养基上生长丰茂,短绒状气生菌丝体由银鼠灰转浅鹤灰,基内菌丝体由肉色至桂皮淡棕,无可溶性色素,在各种培养基上的培养特征与原始菌株有明显区别(表 1)。

4. 突变株生长和发酵高峰期与原始菌株的比较:突变株在斜面培养基上生长很快,28℃-3 天菌丝生长丰茂,到第 4 天,孢子丰满且全部呈银鼠灰,而原始菌株则需 4-5 天以上。发酵高峰期突变株为 72 小时,而原始菌株为 120 小时。



图 1 16A-6-5 变株的孢子丝($\times 2000$)

Fig. 1 Sporophores of mutant 16A-6-5

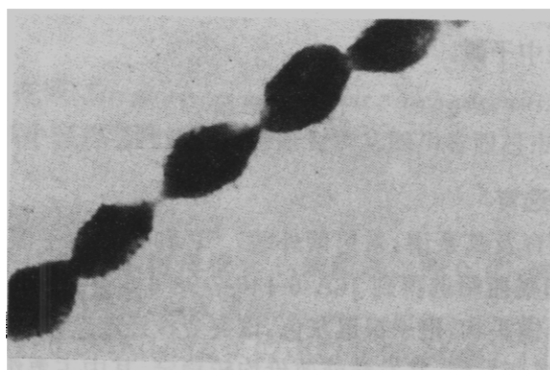


图 2 16A-6-5 变株的孢子($\times 20000$)

Fig. 2 Spores of mutant 16A-6-5

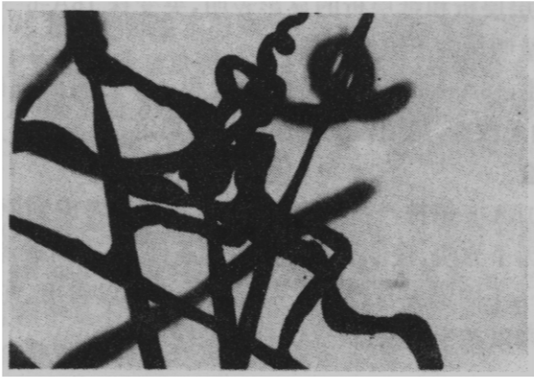


图 3 16A-6 菌株的孢子丝(×3 000)
Fig. 3 Sporophores of strain 16A-6



图 4 16A-6 菌株的孢子(×30 000)
Fig. 4 Spores of strain 16A-6

表 1 突变株 16A-6-5 与原始菌株培养特征的比较

Table 1 Comparson of culture characteristics of mutant 16A-6-5 with parent strain

| 培养基 Medium | 气生菌丝体 Aerial mycelium | | 基内菌丝体 Morphology in medium | | 可溶性色素 Soluble pigment | |
|---------------|--------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| | 原始菌株 Parent strain | 突变株 16A-6-5 | 原始菌株 Parent strain | 突变株 16A-6-5 | 原始菌株 Parent strain | 突变株 16A-6-5 |
| | 深蛛网灰转淡红灰 | 银鼠灰转淡鹤灰 | 淡黄灰 | 肉色转桂皮淡棕 | 无 | 无 |
| 高氏合成一号琼脂 | | | | | | |
| 葡萄糖天门冬素琼脂 | 淡灰 | 蚌肉白转银鼠灰 | 杏仁黄 | 乳白转象牙黄 | 无 | 无 |
| 葡萄糖酵母膏琼脂 | 杏仁黄 | 荔肉白转灰白 | 淡土黄 | 桂皮淡棕 | 无 | 无 |
| 马铃薯块 | 猴毛灰 | 灰白转银鼠灰 | 枯绿黄 | 咖啡色 | 无色到棕叶绿 | 无色到酱棕 |

注：色谱^[5]。

5. 代谢产物:经薄层层析和纸层析的显影表明,突变株 16A-6-5 的发酵产物中 16A-6-I 组份(宁南霉素)含量明显高于原始菌株。

6. 突变株的稳定性:16A-6-5 变株经连续传代和 4 个月斜面保存,其形态、培养特征以及产生抗生素能力均无改变,说明该变株遗传特性稳定。

(二) 发酵条件试验

1. 不同碳氮源对 16A-6 菌株产抗生素的影响:本试验考虑到原料成本,来源难易和产量等多种因素,用单因子方法,设计了在相同氮源条件下,不同碳源与产量关系,同样设计了在相同碳源条件下,不同氮源与产量关系。从结果可以看出,在多种碳源中,以玉米粉、淀粉为最好。氮源则以花生饼粉,黄豆饼粉为最好。

表 2 不同 C、N 组合、配比对 16A-6-5 突变株产抗生素的影响

$L_{16}(4)^5$ 正交试验结果

Table 2 Effects of constitution of various C and N on antibiotic production by mutant 16A-6-5

| 组合编号 No. | A 玉米粉 (g/50ml) Corn flour | B 淀粉 (g/50ml) Starch | C 黄豆饼粉 (g/50ml) Soybean cake flour | D 花生饼粉 (g/50ml) Peanut cake flour | E 酵母粉 (g/50ml) Yeast flour | 效价 (u/ml) Titre of antibiotics |
|---|------------------------------------|-------------------------------|--|---|--|---|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.025 | 4 100 |
| 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0.05 | 4 300 |
| 4 | 0 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 0.075 | 4 900 |
| 5 | 1 | 0 | 0.5 | 1 | 0.075 | 4 700 |
| 6 | 1 | 0.5 | 0 | 1.5 | 0.05 | 5 200 |
| 7 | 1 | 1 | 1.5 | 0 | 0.025 | 3 100 |
| 8 | 1 | 1.5 | 1 | 0.5 | 0 | 3 500 |
| 9 | 1.5 | 0 | 1 | 1.5 | 0.025 | 4 500 |
| 10 | 1.5 | 0.5 | 1.5 | 1 | 0 | 4 000 |
| 11 | 1.5 | 1 | 0 | 0.5 | 0.075 | 3 500 |
| 12 | 1.5 | 1.5 | 0.5 | 0 | 0.05 | 3 700 |
| 13 | 2 | 0 | 1.5 | 0.5 | 0.05 | 4 200 |
| 14 | 2 | 0.5 | 1 | 0 | 0.075 | 3 700 |
| 15 | 2 | 1 | 0.5 | 1.5 | 0 | 4 000 |
| 16 | 2 | 1.5 | 0 | 1 | 0.025 | 4 100 |
| 效价 (u/ml) Titre of antibiotics | K ₁ | 3 325 | 3 350 | 3 200 | 2 625 | 2 875 |
| | K ₂ | 4 125 | 4 250 | 4 125 | 3 825 | 3 950 |
| | K ₃ | 3 925 | 3 725 | 4 000 | 4 275 | 4 350 |
| | K ₄ | 4 000 | 4 050 | 4 050 | 4 334.45 | 4 200 |

2. 不同碳、氮源对变株产抗生素的影响：以玉米粉、淀粉、配合黄豆饼粉、花生饼粉、酵母粉为原料，进行正交试验结果见表 2。从表 2 看出，其中第 6 号培养基组合产抗生素最高，故最佳组合应为：玉米粉 2%，淀粉 1%，花生饼粉 3%，酵母粉 0.05%，无机盐按原用量 NaCl 0.5%，CaCO₃ 0.5%，MgSO₄ 0.0025%，(NH₄)₂SO₄ 0.25%，K₂HPO₄ 0.02% 不变。

3. 不同无机盐对变株产抗生素的影响：在确定 C、N 组合和配比基础上，用减法试验了不同无机盐对 16A-6-5 变株产抗生素的影响，结果见表 3。从表 3 看出，无机盐在变株生长和产抗生素过程中是不可缺少的，除磷酸盐外，其它 4 种无机盐对抗生素的生产均有较大的影响，其中氯化钠影响最大。

4. 发酵条件对变株产抗生素的影响：采用正交设计 L₉(3)⁴ 综合考察起始 pH、温度、通气量(装瓶量)培养时间对产抗生素的影响，结果见表 4。从表 4 看出，发酵条件以 1 号组合为最佳，当起始 pH 为 7.2，28℃，250ml 三角瓶装 30ml 培养基，培养 72 小时，产抗生素为 5 500u/ml。

表 3 不同无机盐对 16A-6-5 突变株产抗生素的影响
Table 3 Effects of various metal ions on antibiotic production by mutant strain 16A-6-5

| 编号 No. | g/100ml | | | | | | | | | 效 价 (u/ml) Titre of antibiotics |
|-----------|----------------------|---------------|---------------------------------|-----------------------|------|-------------------|-------------------|---|---------------------------------|--|
| | 玉米粉 Corn flour | 淀 粉 Starch | 花生饼粉 Peanut cake flour | 酵母粉 Yeast flour | NaCl | CaCO ₃ | MgSO ₄ | (NH ₄) ₂ SO ₄ | K ₂ HPO ₄ | |
| 1 | 2 | 1 | 3 | 0.05 | 0 | 0.5 | 0.0025 | 0.25 | 0.02 | 2 100 |
| 2 | 2 | 1 | 3 | 0.05 | 0.5 | 0 | 0.0025 | 0.25 | 0.02 | 2 500 |
| 3 | 2 | 1 | 3 | 0.05 | 0.5 | 0.5 | 0 | 0.25 | 0.02 | 3 200 |
| 4 | 2 | 1 | 3 | 0.05 | 0.5 | 0.5 | 0.0025 | 0 | 0.02 | 3 000 |
| 5 | 2 | 1 | 3 | 0.05 | 0.5 | 0.5 | 0.0025 | 0.25 | 0 | 4 500 |

讨 论

1. 利用紫外线、³²P 和镅铍中子源对宁南霉素产生菌进行复合诱变处理，得到的 16A-6-5 变株，能产生较多的 16A-6-1 组份(宁南霉素)抗生素，产量提高 6 倍以上，故认为复合诱变处理的效果较为理想。

表 4 发酵条件对 16A-6-5 突变株产抗生素的影响

L₉(3)⁴ 正交试验结果

Table 4 Effects of fermentation condition on antibiotic production by mutant strain 16A-6-5

| No. | A pH | B 温度(°C) Temperature | C 通气量(ml) Aeration | D 时间(h) Time | 效价(u/ml) Titre of antibiotics |
|-------------------------------------|----------------|----------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| 1 | 7.2 | 28 | 30 | 72 | 5 500 |
| 2 | 6.8 | 28 | 50 | 48 | 650 |
| 3 | 7.6 | 28 | 70 | 96 | 1 400 |
| 4 | 7.2 | 26 | 70 | 48 | 680 |
| 5 | 6.8 | 26 | 30 | 96 | 5 000 |
| 6 | 7.6 | 26 | 50 | 72 | 4 500 |
| 7 | 7.2 | 31 | 50 | 96 | 4 600 |
| 8 | 6.8 | 31 | 70 | 72 | 0 |
| 9 | 7.6 | 31 | 30 | 48 | 0 |
| 效价(u/ml) Titre of antibiotics | K ₁ | 1 883.33 | 3 393.33 | 3 500 | 443.33 |
| | K ₂ | 3 593.33 | 2 516.67 | 3 250 | 3 333.33 |
| | K ₃ | 1 966.67 | 1 533.33 | 693.33 | 3 666.67 |

2. 将 16A-6-5 变株,用筛选出的 6 号培养基进行振荡培养,72 小时产抗生素达到高峰期,比原始菌发酵时间缩短 48 小时。

3. 16A-6-5 变株产抗生素的能力高且稳定,如果对该菌株再进行诱变育种,并深入研究发酵条件,其产抗生素的能力会有大幅度的提高。

参 考 文 献

- [1] 林祖纶等:成都大学学报,(2):47-51,1988。
- [2] 胡厚芝等:植物保护学报,14(3)191-196,1987。
- [3] 朱建华等:中国蔬菜,(3):49-51,1985。
- [4] 陈昭蓉等:微生物学报,23(4)305-308,1983。
- [5] 中国科学院微生物研究所:链霉菌鉴定手册,科学出版社,北京,1975 年。

STUDIES ON THE SCREENING AND FERMENTATION OF HIGH PRODUCTION STRAIN OF NINGNANMYCIN

Hu Houzhi Cheng Jiaren Xiang Guxi

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610015)

Xu Shenglin Shen Soubin

(Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610051)

The high-yield Ningnanmycin producing mutant No. 16A-6-5 of *S. noursei* var. *xichangensis* was isolated after treating the parent strain with the complex effects of UV, ^{32}P , and LiCl.

The productive activity character of the high yield strain was further stabilized by using the single spore isolation technique.

The optimum fermentation condition was studied and confirmed; the optimum temperature for Ningnanmycin biosynthesis was 28°C, the ratio of aeration was 1:1.5 V/V, the agitation speed was 220 r/min, the titer of Ningnanmycin under these improved conditions was around 5 500 u/ml, that showed about 6-fold-higher yield than the control.

It was shown that the time course of fermentation of the new strain was shorter, temperature was normal, the genetic properties were stable. It was a high productive strain superior to parent strain.

Key words Ningnanmycin producing strain; Fermentation condition