

# 抗生素 M-90发酵条件的研究

王耀伟 王鲁燕 蔡 芳 顾觉奋

(中国药科大学微生物制药教研室, 南京 210009)

**摘 要** 为了提高野生菌株小单孢菌 M-90的发酵效价, 本文采用正交实验设计和单组分考察联合进行的方法, 研究小单孢菌 M-90的发酵条件, 确定了适合 M-90产抗生素的培养基, 接种量和 pH<sub>0</sub>与原配方在平行操作的情况下进行比较, 其效价相对提高 151.7%。

**关键词** 小单孢菌; 正交实验设计; 发酵

抗生素 M-90是一新的内酯类抗生素, 由于是野生菌, 发酵单位低。在诱变育种改变菌种遗传特性<sup>[1,2]</sup>, 提高发酵单位的基础上, 本文又通过考察培养基的组成对抗生素生物合成的影响, 进一步提高其发酵单位。在对培养基组分进行考察时, 采用正交实验设计法和单组分考察法联合进行。

## 1 材料

### 1.1 菌种

产生菌: 小单孢菌 *Micromonospora*-sp. 90, 简称 M-90, 本校微生物制药教研室提供。

指示菌: 藤黄八叠球菌 *Sarcina lutea*。

### 1.2 起始培养基

参考文献 [1]

## 2 方法与结果

### 2.1 考察孢子量对种子的影响

用挖块法分别接种 1/4, 1/2和 1个成熟斜面孢子于种子瓶中, 观察种子的生长情况。考察结果: 以 1个成熟斜面孢子量接入种子

瓶后, 经 43~ 48 h培养, 菌丝生长情况最好, 以 1/4个成熟斜面孢子量接入种子瓶中, 菌丝生长情况最差, 并且生长时间长。

### 2.2 斜面孢子接种和菌丝接种比较

用斜面菌丝和已生长成熟的孢子分别接入种子瓶, 定时镜检该两种种子液中的菌体生长情况。

斜面孢子接种后, 菌体在种子瓶中生长良好, 经 43~ 48 h培养产生大量菌丝, 种子液粘稠, 而斜面菌丝接入种子瓶后, 菌体生长情况不佳, 种子液始终不很粘稠。这说明: 斜面菌丝接入种子瓶后, 菌丝并不能快速生长, 而孢子进入种子瓶后能较快萌发, 菌丝大量繁殖, 缩短种子液的培养时间。

### 2.3 发酵培养基成分的改进

选出四种对小单孢菌 M-90生物合成影响较大的碳、氮源。如可溶性淀粉、玉米粉、蛋白胨、黄豆饼粉。依据起始培养基配方分为三个水平, 见表 1。采用四因素三水平的表头 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)进行正交实验设计和差极分析<sup>[3]</sup>。以合理地改变发酵培养基配方, 见表 2。

Tab 1. Table of level factor

Level	Factor			
	A(peptone)	B(soybean cake)	C(soluble starch)	D(corn meal)
1	0.25	1.0	2.0	0.5
2	0.5	2.5	3.5	1.5
3	1.0	4.0	5.0	2.5

Tab 2  $L_9(3^4)$  and polar margin analysis

Test No-	Factor				Potency\+ *
	D	A	B	C	
1	1	1	1	1	87.7
2	1	2	2	2	88.4
3	1	3	3	3	81.9
4	2	1	2	3	119.5
5	2	2	3	1	112.3
6	2	3	1	2	107.1
7	3	1	3	2	114.3
8	3	2	1	3	110.2
9	3	3	2	1	80.0
$k_1$	258.0	321.5	305.0	280.0	
$k_2$	338.9	310.9	287.9	309.8	
$k_3$	304.5	269.0	308.5	311.6	
$\overline{k_1}$	86.0	107.2	101.7	93.3	
$\overline{k_2}$	113.0	103.6	96.0	103.2	
$\overline{k_3}$	101.5	87.7	102.8	103.9	
R	27.0	19.5	6.8	10.6	

\* Relative potency of original medium 100%

从表 2 各个水平的均数差极来看,影响因素的主次顺序为: A> B> D> C 最佳培养基组成成分为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,因 C D是较次要因素,再考虑原料的价格及发酵条件控制等问题,选定最佳培养基组成成分为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,即蛋白胨 0.5%,黄豆饼粉 1%,可溶性淀粉 2%,玉米粉 1.5%。

2.4  $Fe^{+3}$  浓度对 M-90 生物合成的影响

无机盐类和微量元素对菌体的生长发育和抗生素生物合成的影响颇为复杂,一般在较低浓度时,对菌体生长及抗生素的生物合成有刺激作用,但浓度太高时,又会抑制菌体生长及抗生素的生物合成<sup>[4]</sup>。由于铁离子对某些抗生素的生物合成影响较大<sup>[5]</sup>,我们对其进行了考察,当  $Fe^{+3}$  浓度为 0.0%, 0.004%, 0.007%, 0.01%, 0.02%, 0.04% 时,相对效价分别为 100, 109.1, 120.0, 138.0, 132.1, 128.4

从此结果可看出,铁离子为抗生素 M-90 生物合成所需要,它在低浓度时,随浓度的升高,产生菌 M-90 的产抗生素能力有所增加,但当铁离子的浓度达到一定值如 0.01% 时,产抗生素能力达最高点,在此点后随铁离子浓度的增加,产生菌 M-90 产抗生素的能力

有所下降

2.5  $NH_4$  浓度对 M-90 生物合成的影响<sup>[6,7]</sup>

把六种不同浓度的  $(NH_4)_2SO_4$  加入培养基中,测定抗生素 M-90 的相对生物效价,考察  $NH_4$  浓度对发酵的影响,当  $NH_4$  浓度为 0.0%, 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 相对效价分别为 100, 160.9, 163.9, 180.5, 203.4, 105.9, 100.6

从上面数据可知,当  $NH_4$  浓度为 0.04% 时,相对效价最高,低于此浓度有刺激抗生素合成的作用,高于此浓度有抑制抗生素合成的作用。用  $NH_4Cl$  代替  $(NH_4)_2SO_4$  效果基本一致。确定最佳培养基为蛋白胨 0.5%,黄豆饼粉 1%,可溶性淀粉 2%,玉米粉 1.5%,葡萄糖 0.5%,  $KH_2PO_4$  0.1%,  $FeSO_4$  0.01%,  $NaCl$  0.2%,  $MgSO_4$  0.05%,  $(NH_4)_2SO_4$  0.04%。

2.6 比较最佳培养基与起始培养基在发酵过程中的时间—pH 时间—效价的关系曲线

把最佳培养基和起始培养基分为两组,以相同的装量各装入五个摇瓶中,250 r/min, 35℃ 培养 120h,从 12h 开始,每隔 12h 取样一次,测定发酵液的效价和 pH 值。结果见图 1 从图 1 可知,起始培养基比最佳培养基 pH 高,产生菌在最佳培养基上的产抗生素能力远远比起始培养基高。

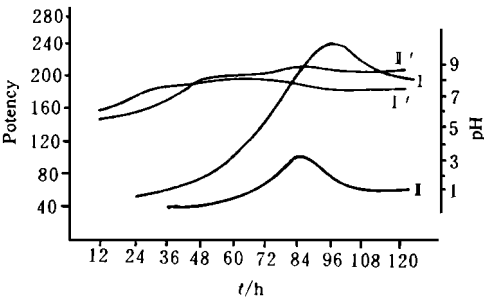


Fig 1. Relation curve of time-pH and time-potency  
I : The best medium relative curve of time-potency  
II : The original medium relative curve of time-potency  
I' : The best medium relative curve of time-pH  
II' : The original medium relative curve of time-pH

### 3 讨 论

1) 产生菌 M-90接种量很大,这可能与它的孢子萌发较慢有关。

2) 正交实验设计是一种使用正交表来安排多因素多水平,并利用普通的统计分析方法来分析实验结果的科学方法<sup>[3]</sup>,它能综合考察各因素、水平之间的综合效果,并具有考察全面、省时、省力等特点,是当前普遍使用的有效方法之一。而单组分考察法在对金属离子、pH等单一因素考察时,比较直观、简单,对照效果也比较明显。

3) 铁是过氧化酶类、细胞色素、细胞色素氧化酶等的组成部分,缺铁时这些酶类的合成和活力将受到影响。因此,铁也是菌体有氧代谢不可缺少的元素,对抗生素的生物合成有明显的影

此外, $Zn^{+1}$ 、 $Mg^{+1}$ 等离子是某些酶的辅基或激活剂,对菌体的生长及产抗生素的能力也有影响。

4) 由于抗生素 M-90是一新的大环内酯类抗生素,其结构中有一个二甲氨基,推测 M-90产抗生素时可能需要 NH<sub>3</sub>; M-90的次级代谢也受氮的调节控制。故加入适量的 NH<sub>3</sub>对 M-90的生物合成有利。

5) 最佳培养基比原始培养基产抗生素能力高,这除了与最佳培养基的组成及配比有关外,还可能与发酵过程中的 pH值有关。

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>是一种生理性酸性物质,既可以提供 NH<sub>3</sub>,有促进 M-90生物合成的作用,又可以在发酵过程中分解产生酸性物质,降低发酵液中的 pH。

M-90在两种培养基中所产生的抗生素效价均随时间的增长而增加,但达到某一点后,又随时间的延长而有所下降,造成这种特殊的效价~时间关系的原因,可能是菌体在发酵到某一阶段后产生一种破坏抗生素的酶,而酶活力与 pH值有一定关系。因此,要想使效价不在最高点时快速下降,还需要从筛选耐酶的突变株着手。

### 参 考 文 献

- 1 王耀伟,应杰. 小单孢菌 M-90育种. 现代应用药学, 1994, 11(2): 1
- 2 王耀伟,王鲁燕,王 骋. 小单孢菌 M-90诱变方法的研究. 中国药科大学学报, 1994, 25(5): 306
- 3 周怀梧. 医药应用概率统计. 上海: 百家出版社, 1990. 243~ 247
- 4 俞俊棠,顾其丰,叶 勤. 生物化学工程. 北京: 化学工业出版社, 1989. 18~ 22
- 5 邬行彦,熊宗贵,胡章助. 抗生素生产工艺学. 北京: 化学工业出版社, 1982. 57
- 6 Kwak J.W., Kim K.S., and Dewey D.Y. Production of Rosamicin Improvement of synthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(1): 350~ 353
- 7 Bittkner, B著,廖福荣译. 藤仓赤霉内赤霉素生物合成的氮调节. 国外医药. 抗生素分册, 1993, 14(1): 8

## The Study on the Fermentation Condition of M-90

Wang Yaowei, Wang Luyan, Cai Fang, Gu Juefen

Department of microbial Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

**Abstract** To promote the fermentation potency of Antibiotic M-90, the paper deals with the fermentation condition of M-90 by combined utilization of orthogonal experiment design and single component examination. We are sure of the culture medium formulation relatively suitable for fermentation of M-90, inoculation amount and pH. The potency is 151. 7% higher compared with the original formulation on the parallel operational basis.

**Key words** *Micromonospora*; Orthogonal experiment design; Fermentation