

伊尼奥小单孢工程菌 S₉₆ 培养特性研究

洪文荣*, 石贤爱, 林 娟, 程 骥

(福州大学生物工程系, 福州 350002)

【摘要】 目的: 对伊尼奥小单孢工程菌 S₉₆ 的培养特性进行研究。方法: 采用单亲灭活原生质体融合技术, 从伊尼奥小单孢菌融合的杂合体中筛选到的工程菌 S₉₆ 根据培养特征比较, 其菌丝形态特征, 斜面培养特征, 碳源利用特征和深层培养特征不同于出发菌株。结果: 工程菌 S₉₆ 几乎不产生色素, 不利用可溶性淀粉, 不产生孢子。但它在深层培养时, 生长快, 菌丝长, 易成网, 衰亡期大大推后, 稳定期明显延长, 可达 9d 之久。结论: 工程菌 S₉₆ 的新特征是出发菌所没有的, 是一株新的工程菌。

【关键词】 工程菌; 小单孢菌; 细胞融合; 西索米星; 抗生素; 培养

【中图分类号】 Q813 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)02-0177-04

伊尼奥小单孢菌是西索米星(sisomicin)^[1]的主要产生菌, 该菌是国家“七五”“八五”攻关项目。西索米星为氨基糖苷类抗菌素, 以抑制肺炎杆菌、肠球菌、变形杆菌及溶血性链球菌为最佳, 比庆大霉素、妥布霉素有效, 抗绿脓杆菌效果比庆大霉素强 2 倍, 抗变形杆菌效果优于丁胺卡那霉素, 主要用于治疗由革兰氏阴性菌引起的感染。西索米星经化学改造, 接上乙基后, 即为奈替米星^[2], 其制剂国际价格每十亿单位(约 1 kg)约 100 万元, 附加值极高。西索米星由伊尼奥小单孢菌等经发酵生产而得, 国内研究生产西索米星的出发菌株主要有两个, 伊尼奥小单孢菌(*M. inyoensis*)^[3]和橄榄星小单孢菌(*M. olivasterospora*)^[4], 前者为单组份, 后者为多组份。橄榄星小单孢菌由于产多组份, 需层析精制而不被工业化所接受, 因此改良伊尼奥小单孢菌, 获得单组份西索米星高产菌株, 是今后的研究方向。本研究采用原生质体融合技术^[5-9], 从伊尼奥小单孢菌获得了工程菌 S₉₆ 变种, 具有工业化价值, 本文报道对工程菌 S₉₆ 培养特性的研究。

1 材料与方法

1.1 菌 种

工程菌 S₉₆ 由伊尼奥小单孢菌 T₁₂₅ 经单亲灭活原生质体融合后, 筛选而得; 出发菌株伊尼奥小单孢菌 T₁₂₅ 为本室保存菌株。

1.2 培养基

斜面培养基: 葡萄糖 0.5%, 硝酸钾 0.1%, 硫酸镁 0.05%, 磷酸氢二钾 0.05%, 氯化钠 0.05%, 碳酸钙 0.3%, 麸皮 0.5%, 琼脂 1.5%, pH 7.5; 种子培养基: 葡萄糖 0.5%, 蔗糖 2.0%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.4%, 花生饼粉 0.5%, 碳酸钙 0.3%, pH 7.5。

1.3 培养条件及菌丝处理

斜面接种后, 于 36℃ 恒温静置培养 15 d; 菌丝浸没培养: 摇床转速为 220 r/min, 培养温度 35℃; 菌丝形态采用常规的美蓝染色于载玻片上, 用光学显微镜观察。

2 结果与讨论

2.1 工程菌 S₉₆ 深层培养菌丝形态特征

将工程菌 S₉₆ 和对照菌 T₁₂₅ 的成熟斜面, 分别刮下约 1 (cm)² 大小的菌苔, 依次接种于灭菌过、不同三角瓶中装有相同的种子培养基中, 于 35℃ 下进行纯培养, 250 ml 三角瓶分装 40 ml 种子培养基, 定期取样, 观察菌丝形态的变化趋势, 研究其生命周期, 比较两者之间的差异。在深层培养过程中, 不同时间的菌丝形态特征不同。工程菌在 20 h 已成小束; 25 h 小束已大大扩展; 30 h 已成大团; 35 h 已渐成网; 40 h 已成大网; 8 d 菌丝还未自溶。出发菌 25 h 菌丝呈小束, 菌团明显偏小; 30 h 菌丝有所

*【收稿日期】 2002-05-22 【*通讯作者】 Tel: 021-62479808-470

扩展; 35 h 有小团; 40 h 小团有所扩大; 60 h 菌团已萎缩衰老; 出发菌成熟斜面与工程菌成熟斜面显著不同。

工程菌 S₉₆斜面不产生黑色素, 仅呈乳状淡绿色, 因此易辨认。经驯化培养, 自溶期显著后延, 菌丝片断减少, 原生质体凝集现象得到改观, 染色均匀。驯化 20 d 后, 菌丝生长开始加快, 染色深, 生长旺盛, 最后潜伏期不到 25 h, 易成大网, 这是一个与出发菌显著不同的特征。出发菌在深层培养过程中无论如何传代, 菌丝只出现小束、小团, 然后开

始衰老溶解, 培养液很快就产生大量泡沫。

从工程菌 S₉₆的深层培养特征分析, 新菌株的基因组已经发生变化。工程菌菌丝长, 分支多, 菌落大, 随着培养时间的延长, 菌落能一直向四周不停地扩展, 表现为大皱折、高高隆起的圈圈状; 而出发菌株, 菌丝短, 分支少, 菌丝难成大网, 斜面显浓黑褐色, 微皱。

2.2 工程菌 S₉₆ 固态培养特性^[7, 8]

按小单孢菌 T₁₂₅ 菌种鉴定的相同培养方法^[9], 对工程菌 S₉₆ 的培养特征进行比较, 结果见表 1。

Tab 1. The culture character of engineering strain S₉₆ and Micromonospora strain T₁₂₅

Medium		T ₁₂₅	S ₉₆
Sucrose Czapek's Agar	Growth or no	Grow fair	Grow fair
	Spore layer	Grape purple	No color
	Substrate mycelia	Peony purple-dark purple-brown	No
	Soluble pigment	Light palm	No
Gorodkova's-Asparagine Agar	Growth or no	Grow fair	No growth
	Spore layer	Black	No
	Substrate mycelia	Deer brown-ochre dark	No
	Soluble pigment	Grey palm color	No
Starch Agar	Growth or no	Growth fair	No growth
	Spore layer	Brown dark	No
	Substrate mycelia	Grey ochre-coconut or camel brown	No
	Soluble pigment	Grey palm color	No
Glucose asparagine Agar	Growth or no	Grow-moderate	Poor
	Spore layer	Jar purple	No
	Substrate mycelia	Soil brown-ochre	No
	Soluble pigment	No	No
Bennett Agar	Growth or no	Grow moderate	Poor
	Spore layer	Goldfish purple	No
	Substrate mycelia	Jade pink-palm-purple	No
	Soluble pigment	Grey palm color	No
Emerson Agar	Growth or no	Grow-moderate	Grow fair
	Spore layer	Purple black	No
	Substrate mycelia	Colorless-rose red-brown	No
	Soluble pigment	Brownish colony	No
Tomato Wheat Slice Agar	Growth or no	Grow fair	Grow fair
	Spore layer	Purple black	No growth
	Substrate mycelia	Deer brown-purple brown	No growth
	Soluble pigment	Grey palm color	No growth
Glucose-Yeast Extract Agar	Growth or no	Grow moderate	Grow moderate
	Spore layer	Purple black	No
	Substrate mycelia	Cinder-rose red, purple dark	No
	Soluble pigment	Brownish colony	No
L-Tyrosine Agar	Growth or no	Grow Poor	No growth
	Spore layer	No	No
	Substrate mycelia	Grey deer brown-triton red	No
	Soluble pigment	No	No
Peptone Iron agar	Growth or no	Poor	Poor
	Spore layer	No	No
	Substrate mycelia	Colorless-palm	No
	Soluble pigment	No	No
Potato Slice	Growth or no	No growth	No growth
	Spore layer	No	No
	Substrate mycelia	No	No
	Soluble pigment	No	No
Potato Slice+ CaCO ₃	Growth or no	Growth fair	Growth fair
	Spore layer	Black	No
	Substrate mycelia	Soil yellow-palm dark	No
	Soluble pigment	No	No

从培养特性可以看出, 工程菌丧失了产色素的能力, 在以含淀粉作唯一碳源的培养基中不生长。

2.3 工程菌对碳源的利用特性

参照小单孢菌 T₁₂₅ 对碳源的利用特性进行比较, 采用 0.5% 酵母膏, 0.1% 碳酸钙, 1.5% 琼脂为基础培养基, 分别加入 1.0% 的不同碳源, 配成斜面培养基, 于 36℃ 下培养观察, 其结果是: 工程菌对碳源的利用, 除了对以可溶性淀粉做碳源不能生长外, 其余与小单孢菌 T₁₂₅ 相似, 工程菌不能利用可溶性淀粉做碳源, 是其又一特性 (见表 2)。

Tab 2. The carbohydrate utilization of *Engineering strain S₉₆* and *Micromonospora T₁₂₅*

Carbohydrate in medium	S ₉₆	T ₁₂₅	Carbohydrate in medium	S ₉₆	T ₁₂₅
D-Glucose	++	++	Raffinose	-	-
Sucrose	++	++	Mannitol	++	++
D-Levulose	-	-	Melitiose	-	-
L(+)Arabinose	-	-	Inositol	-	-
D-Xylose	-	-	Ducitol	-	-
L(+)Rhamnose	-	-	Ribose	+	+
D-Galactose	-	-	Glycerol	-	-
Lactose	+	+	Starch	-	++
Control	-	-			

++; Grow good; ++; Grow moderate; +; Grow poor; -: No grow

从在含淀粉作碳源的培养基中不能生长推测, 工程菌产淀粉酶的基因, 经热处理和原生质体融合、DNA 杂交重组整合后, 水解淀粉的相关酶基因已经遭到破坏。

2.4 工程菌 S₉₆ 冷藏回复培养特征研究

在对工程菌 S₉₆ 的驯化过程中, 已知其生长菌丝形态明显不同于出发菌, 生长速度、菌丝形态等比出发菌株优越。为借常规保藏法, 保持这种优势, 以供进一步研究, 特设计了四种有针对性的菌种保藏法。第一种, 液体菌丝冷藏: 将深层培养好的菌丝体, 直接保存于 4℃ 冰箱。第二种, 砂土干燥冷藏: 将成熟的斜面菌落刮到 5 ml 无菌水后, 振荡分散均匀, 然后每克砂土加菌悬液 0.2 ml, 真空抽干, 于 4℃ 冰箱冷藏。第三种, 斜面冷藏: 将培养成熟的斜面种子, 直接冷藏于 4℃ 冰箱。第四种, 石蜡油封存冷藏法: 将培养好的菌种斜面, 灌注石蜡油, 至淹没整个斜面后, 置 4℃ 冰箱保藏。回复培养时, 去掉石蜡油, 用无菌滤纸吸干菌丝表面上的石蜡油后, 接种培养。为防工程菌出现异常或死

亡, 采取了不停地回复培养观察的措施, 并将以上四种不同保藏方法的菌种, 以每 10d 的间隔进行深层回复培养。持续考察, 观察其特性保持效果。结果见表 3。

Tab 3. The character of back culture for *Engineering strain S₉₆* after cold storage

Cold-stored time (4℃, d)	10	20	30	40	50	60
In liquide	++	++	++	+	-	-
In drying sand-soil	++	++	+	-	-	-
In slant	++	++	++	+	-	-
Slant sealed by paraffin	++	++	++	++	++	++

++; Grow good; ++; Grow moderate; +; Grow poor; -: No grow

从四种低温保藏跟踪与回复培养考察结果可以看出, 前三种保藏方法均不能取得较好的保藏效果, 30 d 后冷藏菌种回复深层培养, 生长能力明显下降, 甚至不能生长。石蜡油封存保藏法, 效果好些, 但生长菌丝状态不好, 经分析认为, 其原因可能是在低温下保藏, 细胞内部的新陈代谢并非完全终止, 在没有隔绝氧的情况下, 生命活动仍然在缓慢进行。石蜡油封存法相对好些, 主要是隔绝了空气中的氧。因此认为, 隔绝氧是保藏工程菌 S₉₆ 较适宜的方法。回复培养菌丝质量不高, 应从解决回复培养的研究去探索。

2.5 工程菌 S₉₆ 回复培养的研究

工程菌 S₉₆ 长期冷藏后, 回复培养难以恢复到保藏前的优质菌丝状态, 设计的各种培养基均不能起到有效的复壮效果, 经反复探索, 发现废菌丝可较好地促进长时间冷藏的种子, 回复培养成优质的菌丝。将沉没培养好的菌丝或发酵液, 经滤纸或纱布过滤, 刮下菌丝渣, 风干去湿, 于冰柜中冻干, 即得废菌丝。在冷藏的种子回复培养时, 于种子培养基中加入 1.0% 的废菌丝, 回复培养出现了明显改善, 恢复培养快速回复到原先的优质状态 (见表 4)。

Tab 4. The back culture of *engineering strain S₉₆* stimulated by self-mycelium residue

Mycelium residue (%)	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0
Back culture	++	++	++	++	++
Contrast	++	++	++	++	++

++; Grow Good; ++; Grow poor

从实验结果可以看出, 加入 1.0% 的菌丝渣, 对冷藏种子回复培养的促进作用, 可以收到良好的

效果。原因可能是浸没培养时需要某些特殊生长因子^[1]。当生长因子量太少浓度太稀时,始终满足不了菌丝回复生长发育的需要,因此回复培养时,潜伏期长,难以长好。当在种子培养基中加入一定量的菌丝渣后,这些促进因子浓度达到了临界点,回复培养的菌丝,可很快恢复生长到原有的优质状态,该方法解决了工程菌 S₉₆常规保存的问题,可冷藏一年以上,而其优质特性仍可重现,取得了良好的效果。

3 结 论

采用单亲灭活原生质体融合技术,从伊尼奥小单孢菌融合的杂合体中筛选到的新菌株 S₉₆,是一株新的工程菌。

从研究实验结果可以看出,经连续跟踪考察和回复培养研究,认为采用石蜡油封存的低温冷藏法,添加一定量可能含有某种促进因子的菌丝体,结合合理的回复培养,工程菌 S₉₆可以稳定保藏一年以上,其原有的优质特性保持良好,没有丧失。

参 考 文 献

[1] Budavari S, Maryadele J. O' Neil, Ann Smith *et al.* *The Merck Index*, 9th ed[M]. Whitehouse Station, N J: Published by Merck Research Laboratories Division of Merck &Co. Inc. 1996. 1467.

[2] Budavari S, Maryadele J. O' Neil, Ann Smith *et al.* *The Merck Index*, 9th ed. Whitehouse Station, N J: Published by Merck Research Laboratories Division of Merck &Co. Inc. 1996. 1112.

[3] 廖爱芳(Liao AF), 程振泰(Cheng ZT), 陈久信(Chen JX), 等. 西索米星产生菌小单孢菌的诱变育种研究. 中国抗生素杂志(*Chin J Antibiot*), 1996, **21**(1): 5-8.

[4] 赵 敏(Zhao M), 范 瑾(Fang J), 刘 军(Liu J), 等. 产生西索米星菌的棘抱小单孢菌阻断型突变株 JIM-121 的筛选和研究[J]. 中国抗生素杂志(*Chin J Antibiot*), 1992, **17**(1): 16-20.

[5] Goldberg SL, Jorge GR, Yashwant MD. *J Antibiotics*, 1990, **43**(8): 992-999.

[6] 还连栋(Huang LD). 小单孢菌遗传研究进展[J]. 抗生素(*Antibiot*), 1986, **11**(4): 368-375.

[7] Holt JG, Noel RK, Peter HAS, *et al.* *Bergey's manual of determinative bacteriology*, the 9th Ed. Philadelphia Baltimore, New York, London Buenos Aires, Hongkong Sydney, Tokyo: Lippincott Williams & wilkins. 1994. 664-665.

[8] Weinstein MJ, Brunswick E, Luedemann GM, *et al.* *United States Patent*, 3907771, 1975.

[9] 陈久信(Chen JX), 程振泰(Cheng ZT), 高悟岩(Gao WY). 小单孢菌产生的氨基糖苷类抗菌素 T₁₂₅-I 的研究[J]. 抗生素(*Antibiot*), 1985, **10**(1): 1-4.

[10] 褚志义. 生物合成药物学[M]. 北京: 化学工业出版社. 2000. 256-258.

Studied on the Culture Characteristics of *Micromonospora In- yoensis* Engineering Strains S₉₆

HONG Wen-Rong, SHI Xian-Ai, LIN Juan, CHENG Ji
Department of Biotechnology, Fuzhou University. Fuzhou 350002, China

【ABSTRACT】 AIM: Engineering strain S₉₆ was isolated from protoplast cell-fusion of *Micromonospora strain* T₁₂₅ which produces antibiotics. **METHOD:** According to its mycelia morphology, slant culture characteristics, carbohydrate utilization and submerged culture, it was different from original strain at producing pigment, culture mycelia. **RE-SULT:** It can't utilize soluble starch. Its stable phase is double longer than *M. strain* T₁₂₅ in submerged culture. 9 days can be put off when decline phase appeared. But *M. strain* T₁₂₅ declined after 4 days. The spore can't be found in *engineering strain* S₉₆. Its hypha grow rapidly and net morphologic mycelia can be get after 40h under suitable condition. But *M. strain* T₁₂₅ has not these character. **CONCLUSION:** New strain S₉₆ coming from cell fusion has many advantages over original strain and was designated as a new engineering strain.

【KEY WORDS】 Engineering strain; *Micromonospora strain*; Cell fusion; Sisomicin; Antibiotics; Culture