

红霉素产生菌的诱变及培养基优化研究

左 勇, 李 杨, 任永利, 鞠 帅, 谢 晖, 祁 峰

(四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘 要:以红色糖多孢菌 08L 作为出发菌株进行诱变,选育高产菌株。结果表明,诱变得到的 UL5 菌株发酵水平比出发菌株提高 12.6%。再通过培养基优化,其组成为淀粉 3%,糊精 3%,葡萄糖 2%,黄豆饼粉 3%,玉米浆 1%,硫酸铵 0.15%,碳酸钙 0.6%,磷酸二氢钾 0.02% 的条件下,UL5 菌株在诱变的基础上,发酵水平再提高 15.2%。

关键词:红色糖多孢菌;诱变;正交实验;发酵
中图分类号:TQ465.5

文献标识码:A

红霉素(erythromycin, Er)是红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)的次级代谢产物,为十四元大环内酯类抗生素,包括 ErA ~ ErF^[1],ErA 的抑菌活性最高。它的抗菌谱和青霉素 G 相似,特别是对抗酸杆菌、革兰氏阳性细菌、大病毒及立克次氏体有抗菌活性,是治疗溶血性链球菌感染和耐药性金黄色葡萄球菌感染所引起疾病的首选药物,同时红霉素衍生物的生产,进一步刺激了母体红霉素的需求^[2-4]。

影响红霉素发酵的主要因素是菌种的质量,其优劣对红霉素发酵工业有极大的影响。目前,我国红霉素的发酵工业与国外相比还有较大的差距,现在国外红霉素发酵单位已达到 8 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,而国内大多企业红霉素发酵水平却一直在 4 000 ~ 5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右^[5]。因此,本文拟研究红霉素生产菌种的改良,在此基础上优化红霉素培养基组成,以达到提高红霉素发酵单位,降低红霉素生产成本,增强我国红霉素的国际市场竞争能力。

1 材料与方 法

1.1 出发菌株

红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*) 08L:实验室分离纯化得到。

1.2 培养基

改进高氏培养基:可溶性淀粉 2%,NaCl 0.05%,硝酸钾 0.1%,磷酸二氢钾 0.05%,硫酸镁 0.05%,硫酸亚铁 0.001%,重铬酸钾(70 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$),青霉素(2.5 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$),琼脂 1.5 ~ 2.5%,pH7.4 ~ 7.6(NaOH 调)。

发酵培养基:黄豆饼粉 3.0%,淀粉 4.0%,糊精 3.0%,硫酸铵 0.2%,碳酸钙 0.6%,葡萄糖 1.0%,磷酸二氢钾 0.04%,pH6.8(NaOH 调)。

改进斜面培养基:可溶性淀粉 1%,硫酸铵 0.3%,玉米浆 1.2%,NaCl 0.3%,碳酸钙 0.3%,琼脂 1.5 ~ 2.5%,重铬酸钾(70 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$),青霉素(2.5 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$),pH7.5(NaOH 调)。

种子培养基:淀粉 3.0%,黄豆饼粉 2.5%,蛋白胨 0.5%,糊精 3.0%,葡萄糖 1.0%,NaCl 0.4%,硫酸铵 0.75%,碳酸钙 0.6%,硫酸镁 0.025%,磷酸二氢钾 0.02%,pH7.5(NaOH 调)。

1.3 诱变方法

对红霉素产生菌的孢子进行超声波、氯化锂(分别采用在孢子悬液中加入适量的氯化锂和在培养基中加入适量的氯化锂两种方法^[6])单一诱变。在此基础上,将诱变得到的实验菌株用超声波、氯化锂进行复合诱变,选取高产菌株^[7-9]。

1.3.1 超声波诱变法

分别取 10 mL 出发菌株 08L 的菌悬液于 33 支

25 mL 的试管中,放入超声波清洗器中,水淹没至试管 2/3 左右,进行超声波处理,超声波功率分别为 200 W、300 W、400 W,诱变时间分别为 0 min、3 min、6 min、9 min、12 min、15 min、18 min、21 min、24 min、27 min、30 min。

1.3.2 氯化锂诱变法

方法 1:菌种在培养过程中诱变,分别取改进高氏培养基 90 mL 于 7 个 250 mL 的锥形瓶中,再分别加入 10 mL 浓度为 3.0%、6.0%、9.0%、12.0%、15.0%、18.0%、21.0% 的氯化锂溶液,灭菌后制成平板。

方法 2:菌种诱变后再培养,取 7 支 25 mL 的试管分别加入浓度为 0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%、1.8%、2.1% 的氯化锂溶液各 9 mL,再各加入孢子悬液 1 mL,在振荡培养箱中振荡 3~4 h。

1.3.3 超声波-氯化锂复合诱变

复合诱变采用四因素三水平正交表法,取 10 支 25 mL 的试管各加入 9 mL 菌悬液,然后按正交表加入灭菌的氯化锂溶液或无菌水,在振荡培养箱中振荡 3~4 h 后再进行超声波处理,最后涂布在相应的平板上。

1.4 培养条件

平板:33 ℃ 培养 7 d。斜面:33 ℃ 培养 7 d。种子摇瓶:33 ℃ 培养 2 d,摇瓶转速 220 r/min。发酵摇瓶:31 ℃ 培养 2 d,33 ℃ 培养 3 d,摇瓶转速都为 220 r/min。

1.5 红霉素生物效价测定

红霉素生物效价测定采用管碟法^[10]。

2 结果与讨论

2.1 诱变结果

2.1.1 超声波诱变结果

分别移取 10 mL 红色糖多胞菌孢子悬液装入容量为 25 mL 的无菌试管中,在不同功率的超声波处理后涂布于平板上,33 ℃ 恒温培养 3~4 d,观察各平板上菌落生长状况,统计菌落数,超声波诱变致死率见图 1。

由图 1 可知,随着超声波诱变时间的增长,红色糖多胞菌的致死率都在不断的增加;在 3 个不同功率的超声波诱变中,超声波功率为 200 W 时,随着诱变时间的增长,致死率上升得不明显,诱变效果不显著;超声波功率为 400 W 时,红色糖多胞菌很快就全部致死,反而没有达到诱变效果;超声波功率为 300 W 时,诱变时间 20 min,致死率接近 83%,且平板上的红色糖多胞菌菌落大小不均一,诱变效果较好。

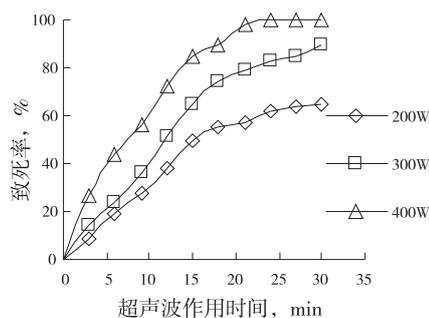


图 1 超声波诱变致死率曲线

2.1.2 氯化锂诱变结果

根据 1.3.2 氯化锂诱变法和 1.4 红色糖多胞菌培养条件进行诱变和培养,红色糖多胞菌诱变结果见图 2。

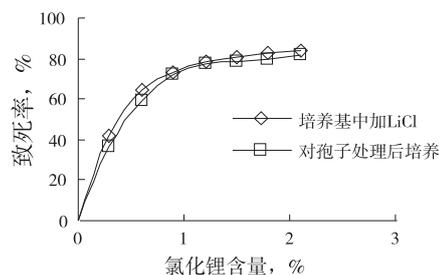


图 2 LiCl 诱变致死率曲线

从图 2 可见,氯化锂诱变中,方法 1 诱变能取得较好的致死效果,可能是因为在培养的过程中,由于平板中有氯化锂存在,对红色糖多胞菌起着长期诱变的作用,因此诱变效果更好。随着氯化锂浓度的提高,致死率随着提高,当氯化锂浓度超过 0.6% 时,红色糖多胞菌的致死率增加幅度不在显著,因此在诱变中氯化锂浓度确定为 0.6%。在正交实验中,氯化锂浓度分别选 0.4%、0.5%、0.6% 三个水平,并分别采用两种方法进行实验。

2.1.3 正交实验结果

根据单因素实验结果,超声波功率分别选用 200 W、250 W、300 W,诱变时间为 15 min、20 min、25 min,氯化锂浓度分别为 0.4%、0.5%、0.6%,采用不同的诱变方法进行正交诱变实验,其正交试验因素水平表见表 1,正交实验结果见表 2。

表 1 正交因素水平表

水平	A 超声波功率 (W)	B 诱变时间 (min)	C LiCl 浓度 (%)	D LiCl 使用方法
1	200	15	0.4	培养基中加 LiCl
2	250	20	0.5	孢子悬液处理 4h
3	300	25	0.6	同时处理

表2 正交试验结果

实验号	A	B	C	D	生物效价 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	1	1	1	1	4420
2	1	2	2	2	4484
3	1	3	3	3	3331
4	2	1	2	3	3090
5	2	2	3	1	4772
6	2	3	1	2	4649
7	3	1	3	2	3217
8	3	2	1	3	3717
9	3	3	2	1	3852
k1	4078	3575	4262	4348	
k2	4170	4324	3809	4116	
k3	3595	3944	3773	3379	
R	575	749	489	969	

注:以上均为三个平行实验的平均值。正交实验数据处理采用正交设计助手软件 iiv3.1 处理。

从表2的结果可以看出,在正交试验的4个因素中,其影响程度为:氯化锂使用方法 > 超声波诱变时间 > 超声波功率 > 氯化锂浓度。从表2中可以得到实验号为1、2、5、6的诱变菌株的相对效价较高,其中5号菌株诱变效果最好,其最佳诱变方法为 $A_2B_2C_3D_1$,将5号菌株命名为UL5,其发酵水平比出发菌株4 238 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高了12.6%。

2.2 发酵单因素实验

通过改进发酵培养基营养成分组成,研究培养基对发酵效果的影响,实验设计见表3。发酵培养条件,见1.4。

表3 单因素实验设计

实验编号	淀粉 (%)	糊精 (%)	葡萄糖 (%)	黄豆饼粉 (%)	玉米浆 (%)	硫酸铵 (%)	碳酸钾 (%)	磷酸二氢钾 (%)
1	/	3.0	1.0	3.0	1.0	0.2	0.6	0.04
2	4.0	/	1.0	3.0	1.0	0.2	0.6	0.04
3	4.0	3.0	/	3.0	1.0	0.2	0.6	0.04
4	4.0	3.0	1.0	/	1.0	0.2	0.6	0.04
5	4.0	3.0	1.0	3.0	/	0.2	0.6	0.04
6	4.0	3.0	1.0	3.0	1.0	/	0.6	0.04
7	4.0	3.0	1.0	3.0	1.0	0.2	/	0.04
8	4.0	3.0	1.0	3.0	1.0	0.2	0.6	/

注:“/”表示变量。

2.2.1 不同碳源对发酵结果的影响

按照实验设计(表3)中实验编号1、2、3进行实验,实验结果分别如图3、4、5所示。

图3~5是不同碳源对发酵结果的影响。由图3可知,随着淀粉含量的不断增加,相对效价先升高后下降。原因在于当淀粉含量过高时,发酵液的黏度增加,将影响红色糖多胞菌的生长,同时还会对后续的红霉素分离提取工作带来不利。由图4可知,当糊精含量增大时,

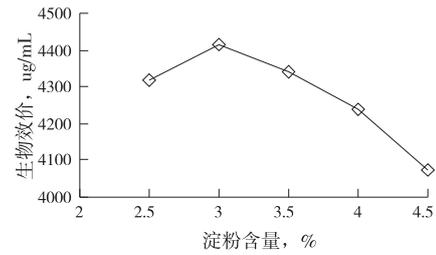


图3 不同淀粉含量对红霉素效价的影响

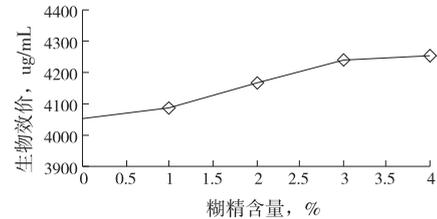


图4 不同糊精含量对红霉素效价的影响

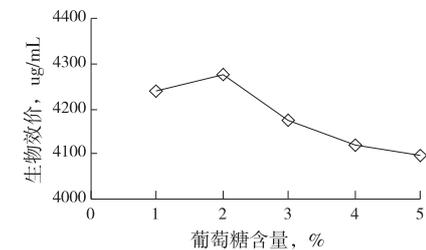


图5 不同葡萄糖含量对红霉素效价的影响

发酵水平提高不太明显。由图3和图5比较,淀粉和葡萄糖影响红霉素的效价显著,它们的趋势十分相似。在发酵过程中,红色糖多胞菌的发酵能力下降,可能是因为葡萄糖浓度过高增大了发酵液的黏度,影响发酵液的溶氧量,导致发酵效果不好;其次葡萄糖可以产生碳分解代谢物阻遏效应,影响红霉素的最终发酵单位效价。因此,取3.0%淀粉,3.0%糊精,2.0%葡萄糖,有利于提高发酵水平。通过单因素实验表明,单一碳源均不能很好的满足最佳发酵的需要,因此,在后续工作中复合碳源对发酵水平的影响有待进一步研究。

2.2.2 不同氮源对发酵结果的影响

按照实验设计(表3)中实验编号4、5、6进行实验,实验结果分别如图6、7、8所示。

黄豆饼粉在红霉素发酵过程前期中起着重要作用,当培养基中的淀粉水解速率供不应求时,菌体生长容易利用的碳源不足,而被迫利用黄豆饼粉。从图6可看出,随着黄豆饼粉含量增加,红霉素效价不再增大,且黄豆饼粉含量过高时会增大发酵液黏度对后续红霉素的提取带来不利。玉米浆是一种优质有机氮源有利于红

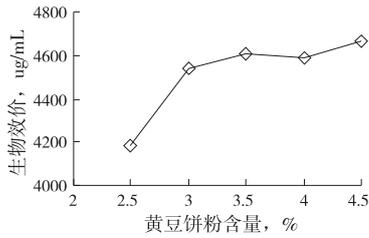


图 6 不同黄豆饼粉含量对红霉素效价的影响

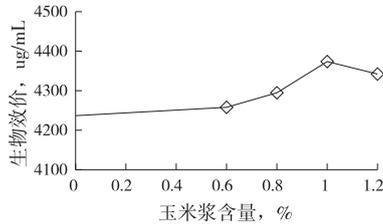


图 7 不同玉米浆含量对红霉素效价的影响

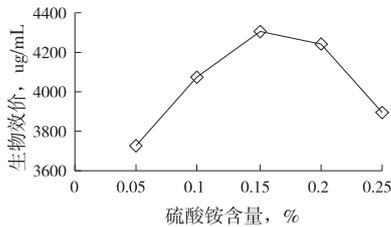


图 8 不同硫酸氨含量对红霉素效价的影响

霉素的合成,加入不同量的玉米浆后发酵单位都有所提高,但从图 7 中看出,在玉米浆含量为 1.2% 以上时生物效价有降低趋势,其可能是因为氮源浓度过高,前期菌丝体增殖过多导致后期一些红霉素合成成份不够,同时菌丝体浓度过高也会增大发酵液黏度,导致菌体自溶。硫酸氨作为一种微量成份,以氨离子的形式提供氮源,氨离子可能会参与红霉素的合成,但是过量的氨离子也可能对红色糖多胞菌内的一些酶类起到抑制作用,从而使红霉素的合成受阻,同时也直接影响发酵液的酸碱度,氨离子的存在对保持适宜的酸碱度在发酵过程中起着相当重要的作用。从上面三种氮源对红霉素效价影响可知,有机氮源含量适当提高,有利于红霉素的合成,无机氮源处于较低水平有利于发酵水平的提高。综上所述,取 3.0% 黄豆饼粉,1.0% 玉米浆,0.15% 硫酸铵,可达较高的发酵水平。由于不同氮源在不同的发酵时期起着不同的作用,为此,我们将继续研究复合氮源的对发酵结果的影响。

2.2.3 辅助因子对发酵结果的影响

按照实验设计(表 3)中实验编号 7、8 进行实验,实验结果分别如图 9、10 所示。

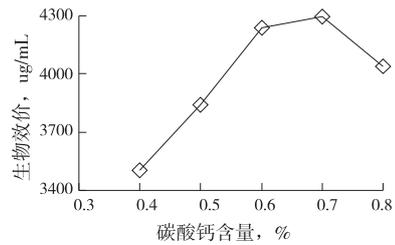


图 9 不同碳酸钙含量对红霉素效价的影响

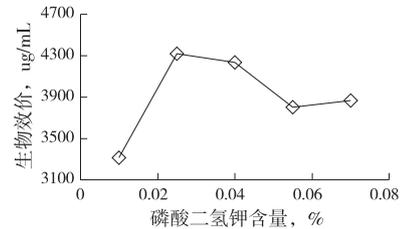


图 10 不同磷酸二氢钾含量对红霉素效价的影响

在微生物的培养中,作为辅助成分的碳酸钙和硫酸铵的作用相似,是一种无机碳源,其作用主要是保持微生物代谢产生的酸碱平衡,其浓度过低 pH 值会发生变化,导致红色糖多胞菌提前进入衰亡期。 KH_2PO_4 的浓度对红霉素效价有很大影响,在缺乏 KH_2PO_4 时,效价明显降低,但是过量的 KH_2PO_4 也会使效价下降,原因是因 KH_2PO_4 会对红色糖多胞菌菌体内的一种诱导酶起到诱导作用,而这种酶对红霉素的合成起着重要作用,但是当 KH_2PO_4 的用量太大时可能会抑制其他代谢的进行;因此必须控制好 KH_2PO_4 的浓度。因此,在发酵过程中,0.6% 的碳酸钙,0.02% 的 KH_2PO_4 有利于提高红霉素发酵水平。

2.3 单因素发酵验证

根据 2.2 发酵单因素实验,在发酵培养基组成为 3.0% 淀粉、3.0% 糊精、2.0% 葡萄糖、3.0% 黄豆饼粉、1.0% 玉米浆,0.15% 硫酸铵,0.6% 碳酸钙,0.02% 磷酸二氢钾,转速为 220 r/min,进行变温发酵:31 °C 条件下培养 2 d,33 °C 条件下培养 3 d,31 °C 条件下培养 2 d。UL5 的最终发酵液的平均效价提高到 5 497 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 结束语

红霉素出发菌株经过超声波-氯化锂复合诱变和改良培养基后,均大幅提高了发酵水平。其中经过诱变后的最优 UL5 菌株摇瓶发酵的效价最大提高了 12.6%。经过培养基优化后,UL5 的菌株摇瓶发酵的效价比原来提高了 15.2%。

参考文献:

- [1] Stassi D, Donadio S, Staver M J, et al. Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis[J]. *J Bacteriol*, 1993, 175(1):182-189.
- [2] 范代娣, 陈斌, 尚龙安, 等. 红霉素发酵工艺优化研究[J]. *生物工程学报*, 1999, 15(1):104-108.
- [3] 施敏敏. 红霉素发酵过程的控制技术[J]. *工业控制与应用*, 2009, 28(7):18-22.
- [4] 李啸, 陈长华, 李友元. 红霉素 A 发酵条件的优化[J]. *中国医药工业杂志*, 2006, 37(6):381-383.
- [5] 张金国, 刘翔. 红霉素发酵培养基优化研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(7):406-416.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [7] 吴梧桐. 生物制药工艺学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003.
- [8] 张金国, 王敏. 红霉素高产菌株的选育[J]. *中国抗生素杂志*, 2003, 28(3):181-182.
- [9] 刘峰, 周文娟, 陈国荣. 红霉素高产菌株 F2-4 的选育及摇瓶发酵工艺的优化[J]. *海峡药学*, 2004, 16(2):83-87.
- [10] 王颖. 红霉素产生菌的诱变和筛选[J]. *黑龙江医药*, 2008, 21(2):79-80.

Study on the Mutation of Erythromycin Productive Strain and Its Fermentation

ZUO Yong, LI Yang, REN Yong-li, JU Shuai, XIE Hui, QI Feng

(School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: The *Saccharopolyspora erythraea* 08L is used as the starting strain. Processed by ultraviolet mutagenesis, the fermentation product of the mutated strains was increased by 12.6%. In addition, under the optimized culture medium which consisted of starch 3%, dextrin 3%, glucose 2%, soybean meal 3%, corn steep liquor 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15%, CaCO_3 0.6%, KH_2PO_4 0.02%, the fermentation yield of UL5 strains was increased by 15.2%.

Key words: *Saccharopolyspora erythraea*; mutagenesis; orthogonal test; fermentation