

螺旋霉素产生菌的推理选育

金志华

(浙江新昌制药股份有限公司 新昌 312500)

螺旋霉素 (Spiramycin, 以下简称 SPM) 为十六元大环内酯类抗生素^[1]。内酯环 C-3 位上羟基酰化侧链片段构成 SPM 不同组分。C-3 位上羟基酰化酶的合成受葡萄糖的诱导, 该诱导作用受丁酸的抑制^[2]。SPM 的生物合成受高浓度铵离子的抑制。而支链氨基酸, 如缬氨酸, 经分解代谢可产生乙酸、丙酸、丁酸^[3], 作为 SPM 生物合成的前体。本文根据 SPM 的生物合成途径, 采用诱变和耐 L-缬氨酸、耐 α -氨基丁酸相结合的筛选方法, 获得了高产菌株。

1 材料和方法

1.1 出发菌株

采用本公司生产菌株螺旋霉素链霉菌 SPM'-248 为出发菌株。

1.2 培养基与培养条件

见文献[4]。

1.3 发酵效价的测定

杯碟法^[5], 检定菌为藤黄八叠球菌 (*Sarcina aurantiaca* Flügge) 28001。

1.4 诱变处理

加单孢子悬浮液 5ml 于无菌平板中, 置波长为 253.7nm、功率 30W 紫外灯下 30cm 处开盖、振荡照射 40s。

1.5 药物抗性菌株选育

选用药物为 L-缬氨酸 (L-Val) 和 α -氨基丁酸 (α -Abu), 将经诱变处理后的孢子液适当稀释后, 涂于含有一定量药物的平板培养基上, 以不经诱变处理的孢子液为对照, 28℃ 培养 15d 后, 把平板上的单菌落 (每组 30 株) 移种斜面, 经二级发酵后, 测定效价。

2 结果与讨论

2.1 L-缬氨酸抗性变种的筛选

L-缬氨酸为 SPM 生物合成前体, L-缬氨酸抗性变种能多产前体, 参与内酯环与 C-3 位上侧链的合成, 从而导致 SPM 增产, 结果见表 1。

表 1 L-缬氨酸抗性变种与非抗性变种的生产能力比较

| | 生产能力 | |
|----------|------|-----|
| | 平均 | 最高 |
| NS | 100 | 100 |
| UV | 90 | 105 |
| UV+L-Val | 120 | 124 |

表 1 结果表明: 诱变孢子耐受 L-缬氨酸变种, 合成 SPM 能力超过未突变菌株和诱变而不耐 L-缬氨酸菌株, 从前者选得 1 株 3-26, 其生产能力比自然分离最高者提高 24%。

2.2 α -氨基丁酸抗性变种的筛选

以菌株 3-26 为出发菌株, 选育 α -氨基丁酸抗性变种, 结果见表 2。

本文于 1993 年在第七届全国抗生素学术会议上报告交流。

本文于 1994 年 2 月 28 日收到。

表 2 α -氨基丁酸抗性变种与非抗性变种之生产能力比较

| | 生产能力 | |
|-------------------|------|-----|
| | 平均 | 最高 |
| NS | 100 | 100 |
| UV | 90 | 105 |
| UV+ α -Abu | 126 | 124 |

表 3 菌株 XC-533 与出发菌株 SPM^r-248 的发酵水平比较

| | XC-533 | SPM ^r -248 | 实际提高 |
|-------------------------------------|--------|-----------------------|--------|
| 发酵效价 (u/ml) | 3363 | 2115 | 73.19% |
| 周期 (h) | 117 | 88.5 | |
| 放罐体积 (m ³) | 5.9 | 5.75 | |
| 总亿 (hun·mil) | 212.12 | 121.61 | 74.43% |
| 发酵指数 (hun·mil/h·m ³) | 0.259 | 0.196 | 32.14% |

从表 3 可见, 菌株 XC-533 较出发菌株 SPM^r-248 发酵效价提高 73.19%, 发酵指数提高 32.14%, 经制成成品, 质量均符合成品标准。

致 谢: 本文承上海医药工业研究院宋友礼研究员审阅指导, 在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Omura S, Takeshima H, Nakagawa A *et al.* *Biochemistry*, 1977, 16: 2860~2866.
- [2] 王以光. 国外医药抗生素分册, 1985, 6 (4): 261~272.
- [3] Lebrhihi A, Lamsaif D, Lefebvre G *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992, 37: 328~387.
- [4] 金志华、宋友礼、黄纯农: 中国抗生素杂志, 1992, 17 (4): 265~270.
- [5] 鄂行彦、熊宗贵、胡章助主编: 《抗生素生产工艺学》, 北京: 化学工业出版社, 1982, 430~440.

Rational Selection of Spiramycin-producing Strain

Jin Zhihua

(Zhejiang Xinchang Pharmaceutical Company Ltd., Xinchang 312500)

Abstract The biosynthetic pathway of spiramycin were used for rational selection of spiramycin-producing strain. First, the L-valine-resistant mutant strains were selected, the productivity of the highest one of these strains increased 24%. Second the mutant strains resistant to α -aminobutyric acid were screened, the productivity of the highest one of these strains raised 26%. Finally, strain XC-533, whose genetics property of high productivity was stable, was gained by purification. The potency of the strain XC-533 had been increased 20% by production medium improvement. The fermentation of the new strain XC-533 was performed in 7m³ fermenter, and it made the potency and index of fermentation enhanced 73.19% and 32.14%, respectively.

Key words Spiramycin, biosynthetic pathway, rational selection.

表 2 结果指出: α -氨基丁酸抗性变种生产能力优于非抗性变种, 从前者选得 1 株 4-32, 其生产能力较自然分离最高者提高 26%。

α -氨基丁酸为 L-缬氨酸的类似物, 其抗性变种除能多产前体外, 还能解除铍离子对 SPM 生物合成的抑制作用和丁酸对酰化酶合成的抑制作用, 因此能进一步提高 SPM 产量。

2.3 高单位菌株的遗传稳定性与发酵培养基的改进

菌株 4-22 经一次自然分离, 获得菌株 XC-533。菌株 XC-533 经斜面传代至第五代和摇瓶传代至第五代, 发酵效价稳定, 说明 XC-533 的高产性能遗传特性稳定。经发酵培养基改进后, 菌株 XC-533 的发酵效价又提高 20%。

2.4 菌株 XC-533 与出发菌株放大比较

菌株 XC-533 与出发菌株 SPM^r-248 经 7m³ 发酵罐放大, 结果列表 3。