

· 工业药 学 ·

利福霉素产生菌1074-105*菌株的选育

浙江新昌制药厂(浙江省新昌县, 312500) 杨叶东 吴亚铭

利福霉素是Sensi, P. 等于1957年首次从地中海诺卡氏菌发酵液中分离出的一类抗生素, 其最显著的生物活性是对革兰氏阳性细菌和分枝细菌有抑制作用, 其半合成产物之一的利福平是治疗结核病的口服广谱抗生素。

我厂自1989年生产利福霉素以来, 生产菌株的SV发酵效价一直徘徊在4200 μ /ml左右。我们从90年9月份开始, 对原生产菌株进行紫外线诱变及抗自身代谢物突变筛选, 得到了产量正变株1074-105*。本文报道1074-105*菌株的选育过程及结果。

材料与方法

一、出发菌株1074-29*

系本厂生产菌株。

二、培养基

1. 斜面培养基: 主要成份为蔗糖、蛋白胨等。

2. 种子培养基: 主要成份为葡萄糖、蛋白胨、豆饼粉等。

3. 发酵培养基: 主要成份为葡萄糖、鱼粉、蛋白胨、豆饼粉等。

4. 分离培养基: 同斜面培养基。

三、培养条件

1. 斜面种子: 27℃, 6天。

2. 平四培养: 27℃, 12~14天。

3. 摇瓶种子: 27℃, 46~48小时, 旋转式摇床, 220转/分。

4. 摇瓶发酵: 接种量8%, 26~28℃, 144小时, 旋转式摇床, 220转/分。

四、诱变因素和处理方法

1. 诱变因素为紫外线(UV): 波长2537.10⁻¹⁰m, 功率为30W。处理时将单孢子悬液置紫外灯下30cm处照射一定时间, 照射时伴以磁力搅拌。

2. 紫外线处理后的菌悬液涂布于利福霉素浓度梯度平板筛选:

经UV处理后的菌悬液稀释到10⁻⁵涂布于一定浓度梯度的利福霉素平皿上, 恒温培养。培养毕挑取在平皿浓度高处长出的菌落接斜面。二级发酵, 测定效价。

五、筛选方法

常规摇瓶法。二级发酵。

六、测定方法

效价测定: 按利福霉素SV化学效价测定法测定。721型分光光度计。455nm波长。

结果与讨论

一、产量正变株的筛选

选育系谱图:

利福霉素产生菌1074-29*菌株^{UV, 利福}
霉素浓度梯度平皿^{NS}→1074-10*→1074-105*

将出发菌株1074-29*菌悬液经紫外线处理后进行耐利福霉素浓度梯度筛选, 得到不同变异菌株, 摇瓶发酵结果见表1。

表1 诱变处理后不同菌株发酵效价

菌株号	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	对照
发酵效价 (u/ml)	4999	4256	5088	5738	4431	4306	4669	4769	4994	6056	5623

将选到的1074-10*菌株进行自然分离,结果筛选到1074-105*菌株,初筛效价7450 μ /ml,复筛效价7362 μ /ml,比出发菌株1074-29*提高30%。

1074-105*菌株与出发菌株的菌落形态、色素、气生菌丝等皆无不同之处,唯1074-105*菌株砂土母斜菌落比出发菌株长得丰满。

二、1074-105*菌株的罐上培养

1074-105*菌株在20 m³罐中试验六批,平均SV效价5711 μ /ml,其中最高一批达7175 μ /ml,平均效价比原生产菌株提高25%以上。

在30 m³罐中试验九批,平均效价5500 μ /ml,比原生产菌株提高20%以上。

讨 论

1. 据报道^[1],利福霉素生产菌种是抗噬菌体突变株,突变后伴随着失去形成气生菌

丝和孢子的能力。由于利福霉素菌不产生孢子,诱变分离中使用的菌悬液内只有菌丝片断,且大小不一,无法用血球计数板进行总菌计数。另外,用LiCl结合紫外线进行复合处理时,由于菌丝片断对不良因素的抵抗力较弱,其结构基因受到不同程度破坏,表现在各菌落母瓶菌丝浓度和发酵效价都明显低于正常菌株。

2. 寻找利福霉素最低致死浓度过程中,有一种现象值得注意。即所有200 μ /ml以上的利福霉素浓度梯度平板上,菌落只在浓度最低的一侧长出,显然这是横向扩散的作用,只是影响之大出乎意料。

3. 选得高产菌株后,在发酵配比上须进行优化试验,并对罐上工艺培养温度作适当调整,使菌种的优良性能更好地体现,

参 考 文 献

- [1] 周家惠:国外药学(抗生素分册),1983,4(8):213.

Selective breeding of Rifamycin Producing Strain *Nocardia Mediterranea* 1074-105*

Yang Yedong Wu Yaming
(Xing Chang Pharmaceutical Factory)

Abstract

Rifamycin producing strain *Nocardia mediterranea* 1074-29* had degenerated obviously, and a superior strain 1074-105* was obtained from the parent strain 1074-29* after mutation with a series of treatment by UV and rifamycin.

In test production, compared with control strain, the potency of new strain increased by 20~30%.

The selection of new mutant and the result of test production was described in this article.

Key words Rifamycin, *Nocardia mediterranea*.