

· 工业药学 ·

影响卡那霉素及红霉素产生菌 孢子质量诸因素的探讨

湖南省制药工业公司 于心若

湖南制药厂 陈洁芬

抗生素生产的好坏与孢子质量密切相关。因此,在生产中,对影响孢子质量的因素必须严格加以控制。

有关链霉菌在固体培养基上孢子质量变异情况近年来文献报道不多,本文以卡那链霉菌及红霉素链霉菌为例,对影响孢子质量的因素及其控制办法进行初步探讨。

材料与方法

试验菌种 *Streptomyces Kanamyceticus* 沙11及该系统的其他菌株。

Streptomyces Erythreus 13—123,
14—74

斜面培养基

Str. *Kanamyceticus*: 牛肉膏0.3%, 蛋白胨0.5%, 氯化钠0.5%, 饴糖1.0~1.5%, 琼脂2.0%, pH 7.5。

Str. *Erythreus*: 淀粉1.0%, 玉米浆0.5%, 硫酸铵0.3%, 氯化钠0.3%, 碳酸钙0.25%, 琼脂2.4%, pH 7.3。

培养条件: Str. *Kanamyceticus*: 装量60 ml/250 ml 茄子瓶, 温度26.8~27℃。

Str. *Erythreus*: 装量50 ml/250 ml 茄子瓶, 温度37℃。

孢子接种按一般方法。

气生菌丝及孢子的观察采用贴片法, 标本用红外灯及固定液固定, 0.15%碱性美蓝

染色, 镜检。

产生抗生素能力的测定采用摇瓶发酵。效价测定采用微生物效价测定法。

实验结果与讨论

一、产孢子培养基对孢子质量的影响

孢子培养基是供菌种繁殖孢子使用的, 对这种培养基的要求是能使菌体生长快, 孢子的数量多而质量好, 并且不会引起菌种变异, 能保持菌种优良特性。因而选择一个适合本地条件能为生产应用的产孢子培养基是制备抗生素生产用孢子的基础, 而培养基中选择合适的碳源及氮源又是关键, 下面就培养基中各组份的影响进行初步的探讨。

(1) 碳源 采用葡萄糖作为卡那链霉菌孢子斜面的碳源, 斜面上营养菌丝生长快, 但营养菌丝与气生菌丝层薄, 因而上面只长一薄层白色孢子, 不呈龟裂状, 冰箱保存斜面变黄, 孢子明显减少, 出现自溶现象。试验采用饴糖作碳源, 培养24小时斜面上长出一厚层营养菌丝, 48小时开始显白色, 长出丰满的气生菌丝, 成熟时斜面孢子丰富, 粉状, 色雪白, 菌层厚, 龟裂状, 冰箱保存过程质量稳定, 延长了生产斜面孢子的使用期, 对生产水平的稳定起重要作用, 多年来生产实践证明饴糖是卡那链霉菌较理想的碳源。

不同批号的饴糖以及质量的波动对产孢

子斜面质量影响极大。陈旧的饴糖和酸度高的饴糖效果不佳,表现在斜面气生菌丝短,不产孢子或产孢子量少,因而斜面呈灰白色,菌落光秃,结构致密,前期生长过快,后期生长缓慢,产单位能力低,其影响因素估计与饴糖制备工艺,其中微量元素以及其他生长素含量有关,陈旧饴糖由于储存时间过长,储存条件不好,温度过高引起发酵变酸,产气及少量乙醇的产生从而大大影响饴糖的质量。

从菌落形态观察,饴糖代葡萄糖后斜面菌落大不相同,以葡萄糖作碳源时菌落皱褶多,呈花状,菌落上不生成孢子或只有极少量孢子,菌落软,易与培养基分离。而饴糖培养基卡那链霉菌菌落表面光秃,凸起,结构紧密而坚硬,边缘齿少,无放射纹,呈馒头状,不易与培养基分离,不易破碎,通过传代在饴糖培养基上却能得到孢子量丰富的二代斜面。

红霉素孢子斜面在采用何种碳源上曾进行过比较,结果如表1。

表 1

采用碳源		孢子生长情况
淀 粉	营养菌丝层与气生菌丝层较厚,粉状,孢子丰富	
葡 萄 糖	气生菌丝层薄,极不理想	
饴 糖	前期生长快,菌丝层薄,后期进展慢,孢子量少	

从表中可知,淀粉是红霉素链霉菌较理想的碳源,而饴糖效果却极为一般。

(2) 氮源 在卡那链霉菌上曾进行过上海产鱼粉脲与日本产多聚脲的比较,结果上海产鱼粉脲效果较差。斜面呈灰白色,孢子量少。而日本脲配制,斜面孢子色白,呈绒粉状。所以现场生产一直采用日本多聚脲。显然,不同来源的脲其内含氨基酸种类不同,无机盐及生长素种类及量也不相同,给孢子生长带来极大的影响。

牛肉膏是卡那霉素产生菌株生长中所需另一有机氮源,不同产地,不同批号的牛肉膏对斜面孢子质量影响较大,是关键性因素之一,即使同一工厂生产但不同批号其影响也极为明显,显然与其原料来源,加工方法以及每批操作条件有极大关系,正是由于这些原因而致牛肉膏中蛋白质含量,氨基酸种类等因素而左右卡那链霉菌的生长。使用质量差的牛肉膏发现成熟了的斜面色黄,孢子少,过早衰老及冰箱保存过程出现自溶等现象,因此牛肉膏批号的更换必须通过预试验并适当调整配方后才能使用。

红霉素产孢子斜面采用它作单一的有机氮源获得极为满意的效果。蛋白胨和牛肉膏虽然含有多多种氨基酸,但显然与玉米浆所含种类与数量不尽相同,因而在红霉素链霉菌生长上其效果也不相同,远远不如玉米浆,表现在孢子生长前期发芽慢,气生菌丝白。

但是,不同产地玉米浆对红霉素链霉菌的生长以及产单位能力都有影响。由于玉米浆成份复杂^[3],含量波动大,受玉米品种、产地、加工条件及浸泡过程中乳酸菌等因素影响较大,因而质量上波动也较大,曾以华北药厂、株洲湘红药厂、上海及湖南药厂的玉米浆作过比较,结果华北药厂的玉米浆最好,从孢子生长能力看,华北玉米浆略高于其他玉米浆。质量低劣的玉米浆配制斜面其孢子生长不佳,菌丝层薄,不产生基内色素,菌落小,斜面上不产单位或低单位的变异菌落(黑孢子)明显增多。此外,贮藏时间短的比贮藏时间长的好,总之,各地玉米品种、产地不同、加工条件等不同直接影响玉米浆中氨基酸种类和含量,以及磷酸盐等无机物含量不一样,因此,通过试验选择质量较好的玉米浆并储备一定量于冰箱保存是孢子制备中稳定的重要条件之一。

至于无机氮源由于分子结构较简单,质量较稳定且用量少,因而对斜面孢子生长影

响不大。

(3) 无机盐及微量元素 抗生素产生菌和其他微生物一样在生长过程中也需要无机盐和微量元素,放线菌通常需要不同量的磷、钾和镁、锌,这些物质对菌的生长有明显的影响,但其浓度要适当控制,否则会影响孢子的颜色。生产过程由于原材料批号的变动,水质也经常变化,因而无机盐和微量元素含量波动也大,生产中必须严格予以控制。卡那霉素斜面培养基更换饴糖批号时曾出现过营养菌丝层生长不良的现象,若在培养基中加入一定量的磷酸二氢钾后营养菌丝

明显长厚,但斜面成熟后呈灰黄色甚至带绿色,显然磷酸二氢钾的加入使孢子的颜色发生了变化。磷在菌体生长,繁殖和代谢过程中占有重要的地位,磷的存在直接影响到糖的代谢过程,磷酸盐是核酸、核蛋白等细胞物质的重要组成部份,又是各种酶及高能磷酸键的组成部份,因此在培养基中对磷酸盐的量必须适当的控制。

在红霉素生产孢子制备中由于采用玉米浆培养基,其磷量波动极大,产生了一定的影响。

表 2

菌 株 号	S.erythreus 13—123				S.erythreus 14—74		
	玉米浆用量						
	A	B	A	B	A	B	A
	0.5%	0.5%	1.0%	1.0%	0.5%	0.5%	1.0%
u/ml(%)	100	101.5	110.6	127.0	100	97.8	96.99

A: 华北药厂玉米浆 B: 株洲湘红药厂玉米浆

从表 2 看出,不同菌株对玉米浆需求量不一样,其生产能力也不相同。但配方中增加玉米浆后菌丝生长速度加快,菌落结构致密,不呈粉状,颜色灰白,显然与玉米浆中磷量增加有关。

增加适量钙盐在红霉素斜面孢子生长上效果也是明显的,结果见表 3:

表 3

孢 子 批 号	菌 株 号	增钙后单位w/ml (%)	对照 w/ml (%)
1	E—14—74	101.70	100
2	E—14—74	99.80	100
3	E—14—74	99.02	100
4	E—14—74	96.56	100
5	E—14—74	97.15	100

增钙后从产单位能力比较略低于对照,但从斜面培养上观察却有其较大的改变:营养菌丝层厚,菌落大,丰满,凸起,斜面生长快,成熟期一致,斜面成熟时呈粉状,孢

子色泽为浅粉红褐色,基内菌丝色素分泌较多,培养基呈玫瑰红色,斜面贴片观察孢子个大,呈椭圆形或圆形,成串或单个,沉没培养菌丝成网,粗壮,原生质丰满。

总之,为了使斜面质量保持稳定,随着原材料质量的变动,对无机盐及微量元素要慎重的及时调整,既考虑到斜面生长情况,也要考虑孢子生产能力的稳定,辩证的分析,最后选择最佳配方。

(4) 水的选择 培养基必须以水为介质,抗生素工业所用的水有深井水、河水、湖水。自来水及蒸馏水,由于水中含无机离子和其他杂质,井水水质可因地质情况、水源深度及环境不同而不同,而河水水质受环境污染的影响就较大,北方与南方的水质也不相同,因此,配制孢子培养基所用水也要引起注意,而且原材料的选择必须与水配合考虑。在制备卡那霉素生产斜面时曾对水作过比较,发现从上海采回的自来水与洞

庭湖水经沉降过滤处理后配制斜面,生长情况就不同,上海水的斜面菌落光秃,不长孢子,而洞庭湖水却生长良好。

在红霉素链霉菌上也曾对自来水、井水、蒸馏水及河水、湖水等作过比较,试验证明:浏阳河水及洞庭湖水基本上能满足培养基中 Mg^{++} 、 Fe^{++} 、 Zn^{++} 等微量元素的要求,因而斜面生长良好。当然,选择好水源后还必须时刻注意水质的稳定。

(5) 琼脂 生产实践证明琼脂牌号不同对孢子质量是有影响。不同产地的琼脂由于其原植物生长海域不同琼脂所含无机离子也不同,对孢子质量造成一定的影响,曾试验过青岛产海燕牌琼脂,福建乘风牌琼脂及海南岛产钻石牌琼脂,以青岛产海燕牌的效果最佳。故目前一般抗生素生产中皆采用此牌号的琼脂。

二、其他培养条件对孢子质量的影响

(1) 酸碱度 放线菌适宜在中性或微碱性条件下生长。pH 的变化会引起各种酶活力的改变,影响菌对基质代谢的速度,甚至改变菌的代谢途径及细胞结构。菌种不同,其要求的 pH 也不同,通过试验,无论是卡那链霉菌,还是红霉素链霉菌其生长最适 pH 以偏碱性为好,尤其是 *S. erythreus* 要求培养基灭菌后有较高的 pH 值。pH 偏低,斜面生产缓慢,菌落小,菌层薄,基内色素浅。为了控制好适宜的 pH,除考虑碳、氮源代谢产物影响外,作为培养基的介质——水的 pH 也是十分重要的影响因素,同时可考虑适当加入一定量的缓冲剂以保证孢子生长始终在适宜的 pH 环境。

(2) 孢子培养温度 培养期间温度的波动对孢子质量有明显的影响,特别是温度偏高时,能使孢子生长快,菌落干枯,扁平,易于衰老,冰箱难以保存;温度低时生长慢,菌苔薄,易于自溶。温度过高过低都会影响酶的作用,从而引起产生菌生物合

成能力的下降。

(3) 湿度 湿度主要是指孢子培养过程中恒温室的相对湿度和未接种前斜面湿度两方面。一般来说,任何菌种都有其生长最适湿度。夏天气温高,空气中湿度大,因此,夏天恒温室相对湿度大幅度上升,而冬天则相反。所以,冬天与夏天生长的斜面质量有所不同,再加上温度的影响,夏天斜面虽然生长较快而菌苔较薄,冬天则相反。至于培养基干湿度的影响则更明显,卡那链霉菌的斜面下部菌苔生长厚,丰满,地衣状,色雪白。上部菌苔薄,冰箱放置后上部出现菌丝自溶的现象。看来斜面培养基下面较厚,干湿度适宜,营养丰富,有利于营养菌丝与气生菌丝生长,上部培养基较薄,容易吹干,营养菌丝生长不良,孢子量则少。

红霉素链霉菌则宜用湿度较低的培养基,孢子成熟先从上部开始,逐渐往下部延伸直至整个斜面呈粉红褐色;培养基湿度大,生长缓慢,菌丝层薄,少长孢子或不长孢子;培养基过分干燥则菌落小,干瘦,不丰满。因而斜面湿度的控制就成为制备优良孢子斜面关键之一,生产中主要通过把空白培养基放置于 37℃ 恒温室,经一定时间水份蒸发后加以控制,不同菌种放置时间不同,夏天与冬天放置时间也不同,要通过实践加以确定。

三、孢子接种量的影响

制备 *S. erythreus* 的斜面孢子时,接种量要适中,不宜过稀或过密;过密菌落小,不丰满,同时易使低单位或不正常变异菌落在检查时难以发现;过稀则孢子量不足,影响种子罐的发芽率。因此,接种用孢子悬浮液浓度要严格控制,所接斜面菌落分布均匀,菌落不重叠但也不露出空白的培养基为宜,在这种条件下培养的斜面,菌落大、丰满、显微镜下观察孢子个大,质量好。

四、孢子龄及冷藏的影响

孢子龄对孢子质量有影响^[3], 过于年轻的孢子经不起冷藏, 过于衰老的孢子生产能力下降, 因此孢子龄应控制在孢子量多、孢子成熟、效价正常的阶段为宜。如卡那链霉菌的母瓶龄过短, 菌落小, 未成熟; 母瓶龄过长, 菌落长大, 但色发黄。子瓶龄过短, 孢子量少; 子瓶龄过长, 斜面发黄, 在冰箱保存过程容易产生自溶现象, 因此严格控制斜面龄和冷藏的温度, 斜面保存二个月以上孢子质量生产力不下降。试验结果见表4。

表4

批号	u/ml(%)	孢子	子
		新*	旧**
1	100.00%	100.00%	99.71%
2	100.00%	100.00%	124.57%
平均	100.00%	100.00%	112.14%

新: 指新制备的斜面孢子;

旧**: 指孢子龄适当的斜面冰箱保存二个月。

表5

批号	u/ml(%)	孢子龄				
		7天	7天半	8天	8天半	9天
1	100	95.84	96.96	105.96	105.96	99.18
2	100	97.33	102.44	102.87	105.22	105.22
3	100	103.89	98.36	105.62	106.15	106.15
4	100	105.57	104.12	107.57	103.35	103.35
5	100	98.54	102.64	102.73	99.78	99.78
平均	100	100.23	100.90	104.95	102.74	102.74

对红霉素链霉菌也进行同样试验, 考察不同孢子龄生产能力的变化, 结果见表5:

冰箱保存时间长短对孢子生产能力的影响见表6。

表6

孢子批号	1	2	3
保存时间	新鲜 三个月	新鲜 二个月	新鲜 一个月
u/ml(%)	100 95.72	100 103.11	100 99.96

试验表明, 红霉素链霉菌孢子龄偏老较好, 偏老的斜面呈灰红褐色, 这是孢子量多与孢子成熟的标志。冰箱保存二个月后生产能力不下降。但过老孢子及冰箱放置时间过长会影响孢子发芽时间, 因而选择合适的孢子龄及冷藏时间对保证孢子质量同等重要。

总之, 孢子质量与培养基所使用的原材料、水质、培养温度、湿度及pH、孢子龄、孢子量、色素等因素有关, 这些因素之间又相互关联, 相互制约, 因此对各种因素必须全面考虑, 认真加以控制。

参考文献

- [1] W. M. Stork, R. L. Lmiltc: 工业微生物进展(英文) Vol. 3. 1961
- [2] 华东化工学院、沈阳药学院合编: 抗生素工艺学。高等院校试用教材, 化学工业出版社, P15~25, P54~62, P.115, P121~126。
- [3] 章名春: 工业微生物诱变育种, 科学出版社 P20~27, P42~50.1984。

Approach of factors affecting the Quality of spore generating Kanamycin and Erythromycin

Yu Shin-Ruo

Chen Jie-Fen

(Hunan Pharmaceutic Industrial Co.)

(Hunan Pharmaceutic factory)

We studied STR. KANAMYCETICUS and STR. ERYTHREUS on solid medium, the quality of spore influenced by various factors. According to the current production using laboratory procedure we studied raw material, quality of water, temperature, humidity, pH, age of spore, quantity of spore, colour etc. All these factors are interrelated and inhibited with each other. We concluded that in the preparation on slope media all factors influencing the spore must be considered and strictly controlled. It can improve the quality of spore.