

# 抗氨基酸代謝抗菌素环絲氨酸产生 菌篩选方法的研究\*

沈麗君 方爱棣 蔡潤生

(中国科学院药物研究所, 上海)

D-环絲氨酸的化学結構与 D-丙氨酸相似<sup>[12]</sup>, 它是 D-丙氨酸的競爭性抑制物<sup>[3-5]</sup>, 因而能阻止 D-丙氨酸掺入金黄色葡萄球菌細胞壁的前体——尿嘧啶核苷酸粘肽內, 从而影响細胞壁的合成<sup>[6]</sup>。但当培养基中有足量的 D-丙氨酸或相当于 D-丙氨酸的物质存在时, 则 D-环絲氨酸的抑菌作用即受到競爭性的抵消<sup>[3, 4]</sup>。

抗菌素的篩选通常是以在含复杂的天然有机成分培养基中所表现的抗菌作用作为初步指标。在这类培养基上, 类似环絲氨酸的抗代謝抗菌素是不容易被发现的。方綱<sup>[7]</sup>曾探討了利用抗菌活性的特异性抵消試驗从发酵液中寻找抗核苷酸代謝物的可能性。我們认为在寻找新抗菌素过程中, 除了通常的篩选方法外, 利用某些抗菌素的抗代謝机制来进行抗代謝抗菌素的篩选, 将增加获得新抗菌物质的可能性。本文报导以 D-环絲氨酸对枯草杆菌的抗氨基酸代謝作用机制为依据, 来篩选抗氨基酸代謝抗菌素。

## 材 料 和 方 法

### 材料

1. 抗菌素: D-环絲氨酸片剂, 每片含 250 毫克(瑞士“Roche”厂产品)。抗菌素 E-2286 (本实验室提取)。实验前用 1/15M pH 7.0 的磷酸缓冲液配制新鮮溶液, 經玻璃滤器灭菌备用。

2. 試驗菌: 枯草杆菌 (*B. subtilis* 6633)

3. 培养基:

(1) 合成培养基: 氯化铵 0.1%; 硫酸镁 0.013%; 磷酸二氢钾 0.03%; 磷酸氢二钠 0.06%; 葡萄糖 0.4%; pH 7.2—7.4。加压蒸气灭菌, 再加味精 0.4% (113℃ 灭菌)。以上述成分加入琼脂 2%, 制成固体培养基, 傾注平板用。

(2) 天然培养基: 肉膏 0.3%; 蛋白胨 1%; 氯化钠 0.5%; 琼脂 2%; pH 7.2—7.4。

(3) 抗菌素发酵培养基: 黄豆餅粉 3%; 淀粉(工业用) 2%; 葡萄糖 2%; 硫酸镁 0.05%; 氯化钠 0.6%; 碳酸鈣 0.6%; pH 7.6—7.8 (灭菌前)。

### 方法

1. N-酰基氨基糖的測定: 依 Ciak 及 Hahn 的方法<sup>[6]</sup> 将枯草杆菌芽孢接种于合成培养基中, 經 28℃ 深层培养 18—22 小时后, 再以 1% 的接种量移种于盛有 45 毫升合成培养基的 250 毫升三角烧瓶中, 于 28℃ 繼續培养 10 小时。再将培养液分为“給药”、“抵消”及“对照”等三組。用无菌操作在“給药”組內加入 D-环絲氨酸或抗菌素 E-2286 30 微克/毫升。在“抵消”組內加入上述抗菌素的同时再加

\* 放线菌 E-2286 紙上层析資料承黃永昌供給。特此致謝。

本文为中国微生物学会 1963 年学术年会轉稿。

入 D-丙氨酸 300 微克/毫升。另以加入适量 1/15 M pH 7.0 的磷酸缓冲液作为对照组。然后将它们继续培养 15、45、75、105 及 135 分钟后取样,用 12000 转/分离心沉淀 15 分钟。菌体用 5% 冷的三氯醋酸抽提,以获得其酸溶部分。再用乙醚抽提 3 次,以除去三氯醋酸。然后在抽提液中加入 HCl 使其最后浓度为 0.1 N。于 100℃ 水浴中加热水解 15 分钟,冷却,用 0.5 N KOH 调节 pH 至 9。按 Reissig 等<sup>[8]</sup>方法测定 N-酰基氨基糖的含量。

2. D-丙氨酸对 D-环丝氨酸的特异性抵消试验:依照 Bondi<sup>[4]</sup>方法,用合成培养基在试管中测定 D-环丝氨酸对枯草杆菌的最低抑菌浓度 (MIC)。同时在同样培养基中加入不同浓度的 D-丙氨酸,再测定其对枯草杆菌的最低抑菌浓度。接种物为枯草杆菌菌体悬液 (约  $267 \times 10^5$  活菌/毫升),接种量为 1%。试管置 37℃ 静止培养 24 小时,观察结果。以 90—100% 的抑制作为最低抑菌浓度的终点。

3. 环丝氨酸产生菌的筛选方法: 抗菌素的抗菌试验及抵消试验都是用管碟法进行的。先测定发酵液在合成培养基中及天然培养基中对枯草杆菌的抗菌作用。选择在合成培养基中作用显著而在天然培养基中作用微弱的菌种来作进一步的氨基酸抵消试验。抵消试验用 9 厘米双皿。先倾注 12 毫升培养基作为底层。再于溶化的琼脂中加入所试之抵消物至所需浓度,同时加入适量枯草杆菌孢子悬液,定量倾注上层平板,每平板 4 毫升。发酵液经适当稀释后,用滴管滴入标准不锈钢管中,每管 0.4 毫升。平板置 37℃ 培养 18—20 小时。然后测定抑菌圈的直径。

## 实 验 结 果

### (一) D-环丝氨酸引起枯草杆菌菌体 N-酰基氨基糖的堆积

枯草杆菌与金黄色葡萄球菌一样<sup>[3,6]</sup>,其细胞壁的生物合成也受到 D-环丝氨酸的抑制,因而表现出细胞壁前体——N-酰基氨基糖的堆积。菌龄 10 小时的枯草杆菌菌液在加药 15 分钟后, N-酰基氨基糖在菌体内已有堆积, 75 分钟达到高峰。但在加入一定量 D-丙氨酸的“抵消”组中,其菌体内 N-酰基氨基糖的堆积就显著减少。另外,在不加 D-

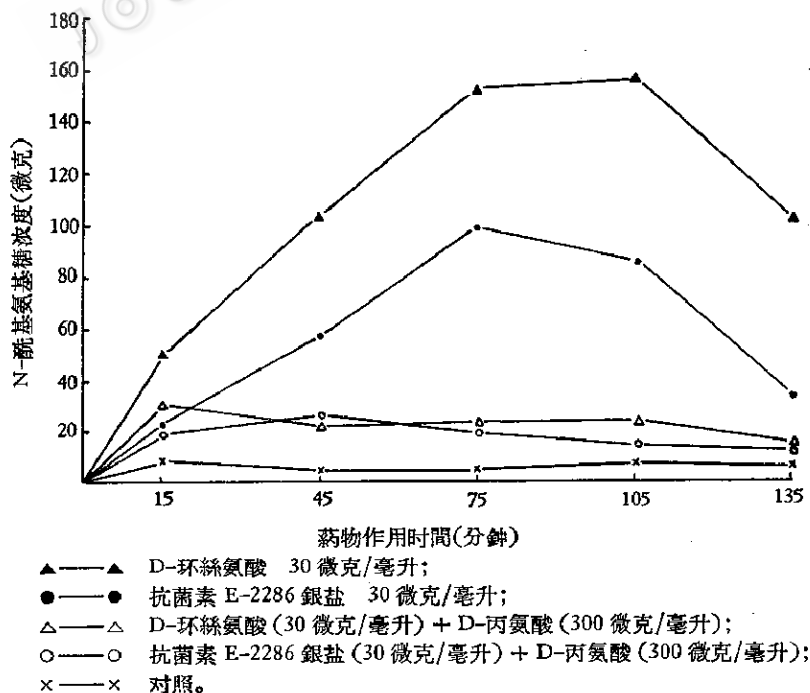


图 1 D-环丝氨酸在不同时间内引起枯草杆菌菌体 N-酰基氨基糖的堆积

环丝氨酸的“对照”组的正常菌体内,仅有少量 N-酰基氨基糖的堆积(图 1)。上述情况说明枯草杆菌细胞壁的生物合成受到干扰,这与 Strominger<sup>[9]</sup> 的报导相似。

(二) D-丙氨酸抵消 D-环丝氨酸对枯草杆菌的抑制作用

在合成培养基中加入 D-丙氨酸 10 微克/毫升 ( $1.1 \times 10^{-4} M$ ), 能使 10 微克/毫升 ( $1 \times 10^{-4} M$ ) 浓度的 D-环丝氨酸完全失去抑制枯草杆菌生长的能力。在培养基中增加 D-丙氨酸浓度, 则其所能抵消的环丝氨酸约按两者 (1:1 克分子) 的比例增高。当 D-丙氨酸浓度为 10 微克/毫升时, D-环丝氨酸的抑菌浓度为 20 微克/毫升。这浓度也随着 D-丙氨酸浓度的增加而相应增加(图 2)。这就说明 D-丙氨酸对 D-环丝氨酸抑菌作用的

抵消是竞争性的<sup>[10]</sup>。

此外,用同样方法测定 DL-苯丙氨酸、DL-甘氨酸、甘氨酸甘氨酸、D-丝氨酸、DL-丝氨酸及 D-苏氨酸等 6 种氨基酸对 D-环丝氨酸的抵消作用。同时将它们与 D-丙氨酸进行比较。当抵消物浓度为 50 微克/毫升时,除 DL-甘氨酸对 D-环丝氨酸的抑菌作用略有抵消外,其余均无抵消作用(表 1)。

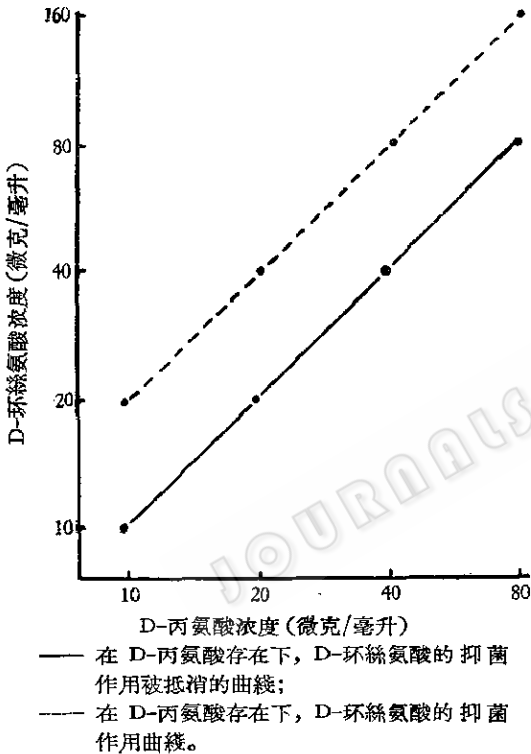


图 2 D-丙氨酸对 D-环丝氨酸抑菌作用的抵消

表 1 不同氨基酸对 D-环丝氨酸的抑制作用

氨基酸 (50 微克/毫升)	抑制 D-环丝氨酸的%*
D-丙氨酸	100
DL-苯丙氨酸	0
DL-甘氨酸	3
甘氨酸甘氨酸	0
D-丝氨酸	0
DL-丝氨酸	0
D-苏氨酸	0

\* 比较 D-环丝氨酸对枯草杆菌的最低抑制浓度。

(三) 环丝氨酸产生菌的筛选

根据上述试验结果, 我们设计以枯草杆菌为试验菌, 在合成培养基中加 D-丙氨酸或其他等价物为抵消物, 进行环丝氨酸产生菌的筛选。在 2,735 株放线菌株中, 我们发现放线菌 No. E-2286 的发酵液在合成培养基中对枯草杆菌的抑制作用可达 1:1600 以上; 而当培养基中加入 D-丙氨酸 100 微克/毫升时, 则其抑菌作用可被抵消 99.4%。在培养基中加入蛋白胨 (10 毫克/毫升), 牛肉膏 (3 毫克/毫升) 或血清蛋白 (10 毫克/毫升), 也都有一定的抵消作用。蛋白胨的抵消抑制作用最为显著, 可达 94%; 牛肉膏次之, 为 83%; 血清蛋白较差, 为 62% (图 3)。

(四) 放线菌 No. E-2286 发酵液的纸上层析

放线菌 No. E-2286 发酵液在 9 种溶媒系统中进行纸上层析后, 用合成培养基及枯草杆菌显影, 其纸层析谱与 D-环丝氨酸样品所得的结果相似<sup>[11]</sup> (图 4)。

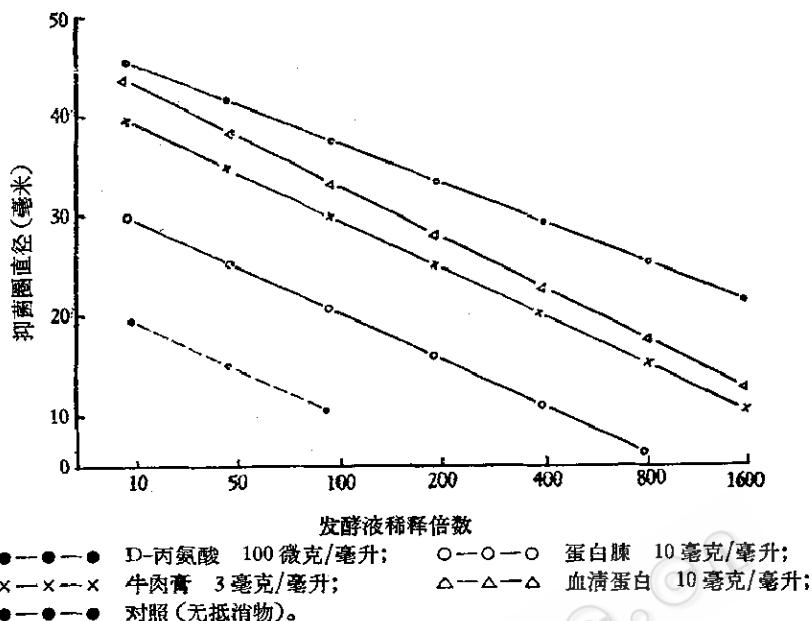
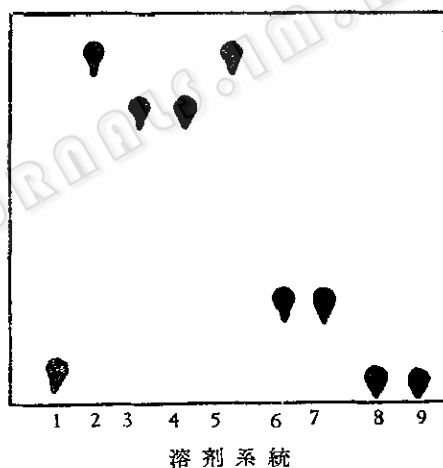


图 3 不同有机物对放线菌 E-2286 发酵液抑菌活性的抵消试验



1. 水饱和的正丁醇;
2. 3%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;
3. 80% 苯酚 (w/w);
4. 80% 苯酚含有 3%  $\text{NH}_3$ ;
5. 50% 丙酮;
6. 正丁醇: 甲醇: 水 = 40 毫升: 10 毫升: 50 毫升 + 1.5 克甲基橙;
7. 正丁醇: 甲醇: 水 = 40: 10: 50;
8. 苯: 甲醇 = 80: 20;
9. 磷酸缓冲液 (pH 8.67) 饱和的乙酸乙酯, 滤纸上用上述缓冲液处理。

图 4 放线菌 E-2286 发酵液的纸上层析谱

### (五) 抗菌素 E-2286 的提取及鉴定

放线菌 No. E-2286 经过深层发酵, 发酵液中活性物质效价可达 2,000—2,500 微克/毫升左右。发酵液用强酸型或强碱型交换树脂进行交换, 经酒精或异丙醇纯化, 得到白色结晶。它的纸层析谱、化学反应、紫外、红外吸收光谱及元素分析等与文献所报导的 D-环

絲氨酸相同<sup>[2,12,13]</sup>。元素分析:  $C_9H_6N_2O_2$ ; 計算值: C 35.29; H 5.90; N 27.44。实验值: C 35.27; H 6.10; N 27.46。这就証明抗菌素 E-2286 确系 D-环絲氨酸<sup>[14]</sup>。

以生物学方法測定抗菌素 E-2286 对枯草杆菌的作用机制, 証明抗菌素 E-2286 同样能影响枯草杆菌細胞壁前体——尿嘧啶核苷酸的堆积(图 1); 而在試管中加入 D-丙氨酸也能抵消抗菌素 E-2286 对枯草杆菌的抑制作用。这与 D-环絲氨酸的結果相符合。

## 討 論

D-环絲氨酸(D-4-氨基-3-噁唑烷酮)象青霉素一样,能引起金黄色葡萄球菌堆积細胞壁前体——尿嘧啶二磷酸-乙酰氨基葡萄糖-乳酰-(L)-丙氨酰-(D)-谷氨酰-賴氨酸<sup>[15]</sup>。但只有 D-环絲氨酸的抑菌作用能竞争性地被 D-丙氨酸所抵消<sup>[3,4]</sup>。我們以枯草杆菌进行試驗也获得相似的結果,因而可在丙氨酸或其他等价物存在的条件下,把抗菌作用的消失現象作为篩选环絲氨酸类型抗菌素的指标。我們用上述試驗从我国土壤的放綫菌中篩到环絲氨酸产生菌种——放綫菌 No. E-2286。它所产生的抗菌素在理化及生物性質上与 D-环絲氨酸相一致。

Campbell<sup>[16]</sup> 強調指出,在篩选有临床应用可能性的抗菌素时,应该选择抗菌作用不被血清类物质所抵消的抗菌素。常規篩选均以使用含有多種含氮化合物的天然培养基为主,这样就不易获得类似环絲氨酸的抗代謝抗菌素。我們认为利用某些临床上有效的抗菌素在作用机制上的特点,来設計篩选方法,作为常規方法以外的补充,对于定向寻找某些抗菌素产生菌是有一定意义的。

我們試驗出蛋白胨可以作为 D-丙氨酸的等价物来篩选环絲氨酸类抗菌素,但蛋白胨成分复杂,只可作为抵消物的总体。虽然蛋白胨取材方便,能适应大規模工作之需,但合理的专一性及特殊的对抗体試驗仍有必要进行。我們认为应用不同专一性的对抗体将有可能得到具有专一性作用的代謝产物和抗菌素以外的生物活性物质。

## 結 論

1. D-环絲氨酸能引起枯草杆菌堆积細胞壁前体——N-酰基氨基糖类物质。
2. D-环絲氨酸抑制枯草杆菌的作用能被 D-丙氨酸或其等价物蛋白胨所抵消。
3. 用枯草杆菌为試驗菌,以蛋白胨为抵消物在合成培养基中进行抗代謝抗菌素的篩选,发现了放綫菌 No. E-2286。它的发酵液的抗菌作用能被蛋白胨和 D-丙氨酸所抵消。放綫菌 No. E-2286 发酵液的紙层譜与 D-环絲氨酸的相似。經提取后,得到白色結晶,其理化及生物性質均与 D-环絲氨酸相一致。这就証明抗菌素 E-2286 确系 D-环絲氨酸。

## 参 考 文 献

- [1] Kuehl, F. A. et al.: J. A. C. S., 77:2344, 1955.
- [2] Harned, R. L., Harter, P. H. and Kropp, E.: Antib. Chemoth., 5:204, 1955.
- [3] Strominger, J. L., Threnn, R. H. and Scott, S. S.: J. A. C. S., 81:3803, 1959.
- [4] Bondi, A., Kornblum, J. and Forte, C.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96:270, 1957.
- [5] Shockman, G. D. et al.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 101:693, 1959.
- [6] Ciak, J. and Hahn, P. E.: Antib. Chemoth. 9:47, 1959.
- [7] 方 綱、許 津、張維西: 抗菌素研究—I, 上海科学技术出版社, 175—179 頁, 1962.

- [8] Reissig, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F.: *J. B.C.*, **217**:959, 1955.
- [9] Strominger, J. L.: *Physiol. Reviews*, **40**:55, 1960.
- [10] Woolley, D. W.: *A Study of Antimetabolites*, John Wiley & Sons, New York, 1952.
- [11] Ishida, N. and Miyazaki, J.: *J. Antib. ser. B*, **5**:484, 1952.
- [12] Sheji, J.: *J. Antib.*, **9**:164, 1956.
- [13] Shull, G. et al.: *Antib. Chemoth.*, **5**:398, 1955.
- [14] 包琴珠、方积年:上海市化学化工学会 1963 年年会报告摘要。
- [15] Park, J. T. and Strominger, J. L.: *Science*, **125**:99, 1957.
- [16] Campbell, A. H.: *British Med. Bull.*, **16**:82, 1960.

## SCREENING OF *ACTINOMYCES* PRODUCING THE AMINO ACID ANTIMETABOLITE CYCLOSERINE

SHEN LI-CHUN, FANG AI-TI AND TSAI JUN-SHENG

(*Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai*)

N-acetyl glucosamine complexes accumulated in cultures of *Bacillus subtilis* 6633 when D-cycloserine was present in the culture medium at a concentration of 30  $\mu\text{g/ml}$ .

The inhibitory action of D-cycloserine on *B. subtilis* in a synthetic medium could be reversed competitively by D-alanine or its suitable equivalent, such as peptone.

Isolates of soil actinomycetes were screened for producers of amino acid antimetabolites by testing the reversing action of peptone on their antibiotic activity against *B. subtilis* on synthetic medium. From among 2735 isolates studied, a strain designated E-2286 was selected. The inhibitory action shown by the fermentation broth of this strain was found to be reversed competitively by peptone or D-alanine. When examined by paper chromatography with various solvent systems, the antibiotic present in the fermentation broth of this strain behaved similarly as D-cycloserine. The antibiotic of this strain has been isolated and identified as D-cycloserine.