

# 放 綫 菌 素 K 的 研 究

## I. 新種 *Streptomyces melanochromogenes* 1779

### 放 綫 菌 素 K 的 來 源

蔡潤生 徐子淵 包琴珠 梁淑芳 庫里洛維奇\*

(中國科學院藥物研究所)

近年來大家認為放綫菌素 (Actinomycin) 有抑制某些瘤腫細胞的作用<sup>[6]</sup>, 在文獻中可以看到許多不同放綫菌所產生的放綫菌素<sup>[5,7]</sup>。Waksman 最初報告 *Streptomyces antibioticus* 產生放綫菌素 A, 後來在德國發現新種 *Streptomyces chrysomallus* 所產生的放綫菌素不同於前者, 因此稱之為 C (商品名稱 Sanamycin)<sup>[2,4]</sup>。在日本發現的稱為放綫菌素 J, 其產生菌為 *Streptomyces flaveolus*<sup>[1]</sup>。

根據菌所產生的色素, Waksman 將所有的放綫菌素產生菌區分為二個族<sup>[8]</sup>: *Streptomyces antibioticus* 族, 以 *Streptomyces antibioticus* 為代表, 此菌株主要產生放綫菌素 A; *Streptomyces flavusparvus* 族主要代表放綫菌素 C 及 D 的產生菌。Corbaz 則結合氣中菌絲顏色的特徵, 將放綫菌素產生菌分為四個組<sup>[3]</sup>。 *Streptomyces* 1779 菌株是由中國土壤分離得到的新種之一, 其形態、培養特性、以及生理上不同於文獻中已有的描述。本文為報告 No. 1779 菌株與其他有關菌株的生物學性質及放綫菌素的比較結果。包括放綫菌素的一般化學性質。

### 實 驗 材 料

*Streptomyces chrysomallus* 3657 由荷蘭真菌保藏局 (C.B.S.) 得到。為放綫菌素 C 的產生菌。 *Streptomyces parvullus* Z-8 來自蘇聯新抗生素研究所。該菌種產生放綫菌素 D。

*Streptomyces antibioticus* 8504 由英國國家工業細菌保藏處 (N.C.I.B.) 得到。

*Streptomyces* 23—31 為王嶽在福州土壤中分離的放綫菌素產生菌<sup>[9]</sup>。

*Streptomyces* 39 為中國科學院北京微生物研究室閻遜初分離得到。

*Streptomyces melanochromogenes* 1779 是我們在桂林分離得到的。

1957 年 10 月 4 日收到。

\* W. Kurylowicz 教授, 波蘭華沙衛生部抗生素研究所。

## 實驗結果

### (一) 生物性質

放綫菌 No. 1779 為實驗過程中由桂林地區土壤中分離出來，同一地區土壤標本中共分離出 45 株。一般特性為具有白或黃色乃至黃灰色氣中菌絲，能產生黑素(Melanin)。其營養菌絲於綜合培養基中為淡黃或檸檬黃色，依照放綫菌素生成的濃度不同使培養基染成淡黃至橙紅色。因而我們建議 *Streptomyces melanochromogenes* 為菌名，以菌株 1779 為標準菌種分別作下列特性描述：氣中菌絲於綜合培養基中最初為白色，成長後變黃色，最終為黃灰色而夾雜有白色斑點；氣中菌絲形長，開始為直分枝，成熟後微有彎曲，但不產生螺旋體；氣中菌常密集成棉茸狀。孢子圓球形，較其他有關菌株的孢子為大(圖 1)。

色素形成：No. 1779 菌株於胰或胰蛋白胰存在時產生大量黑素(Melanin)，此外於綜合或澱粉無機鹽瓊脂中產生鮮黃色乃至橙紅色色素。

蛋白質反應：明膠液化能力中等，僅發現於接近生表長面上有液體現象。Löffler 氏血清液化程度極微或不液化。牛乳中胰化快。

*Streptomyces melanochromogenes* 1779 與其他有關菌種的培養生理比較結果看出有很大的差別，表 1 試驗結果中可以看出 No. 1779 菌株的特點。

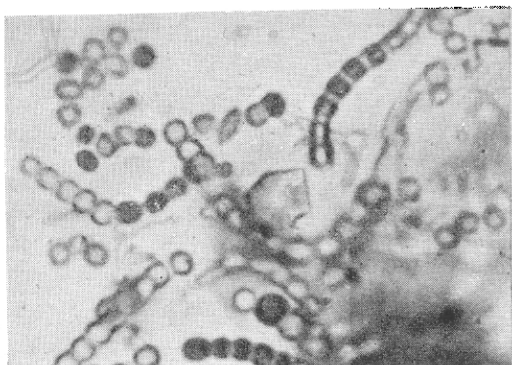
*Streptomyces melanochromogenes* 1779 在黑素生成和明膠液化性質上頗接近於 *Streptomyces antibioticus*；而不同培養基上的培養特徵却接近於 *Streptomyces chrysomallus*。在分類地位上看來，No. 1779 菌株好像是二者的中間型菌種。

在固體綜合培養基中對單獨碳氮源的利用比較看出除 *Streptomyces parvullus* 未做全面試驗外其餘所有試驗菌種均能利用葡萄糖、麥芽糖、澱粉及糊精。而不能利用蔗糖、d(+)木糖、棉子糖及衛矛醇。氮源試驗中均能利用硫酸銨、氯化銨、d-葡萄糖氨、尿素、l-賴氨酸、l-天門冬酸、l-精氨酸、β丙氨酸、dl-苯丙氨酸、L-胱氨酸、dl-穀氨酸、dl-亮氨酸、dl-異亮氨酸、dl-絲氨酸、dl-蘇氨酸、dl-組氨酸、d-纈氨酸、dl-色氨酸、半胱氨酸；在胸腺嘧啶和尿嘧啶氮源培養基上不生長，黃嘌呤有促進孢子發芽作用因而特別生長旺盛，亞硝酸鈉則抑制所有菌種的生長。但無論如何各菌株的碳氮源利用性質在表 2 的若干碳源中看出差別。

在免疫學觀點上比較結果發現 *Streptomyces melanochromogenes* 1779 和 *Streptomyces* 39 的免疫血清與 *Streptomyces chrysomallus*, *Streptomyces antibioticus* 均無交叉現象，與其他非放綫菌素產生菌比較同樣的看出沒有任何親屬關係(表 3)。綜合上述形態、培養、生理、血清學等特性比較結果，*Streptomyces melanochromogenes* 1779 為不同於 Waksman 分類系統中的任何一種，而是應該佔有獨立的分類地位。

### 放綫菌素的產生

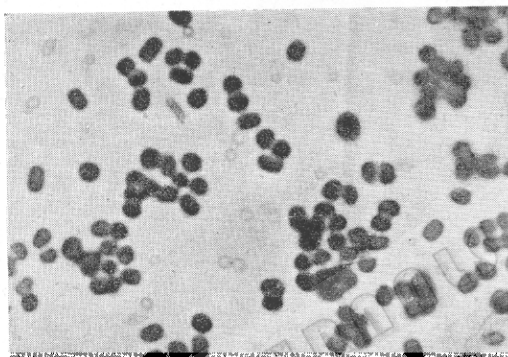
*Streptomyces melanochromogenes* 1779 與其他有關菌株於搖瓶及醱酵罐中均能產生放綫菌素，菌株於醱酵培養基中所形成的黃或橙紅色色素依各菌種的放綫菌素含量多少而異，產量高者常呈橙紅色，低者為淡黃色。試驗菌中以 *Streptomyces melanochromogenes* 的放綫菌 K 含量最高，每立升培養液中可分離得到 440 毫克；*Streptomyces*



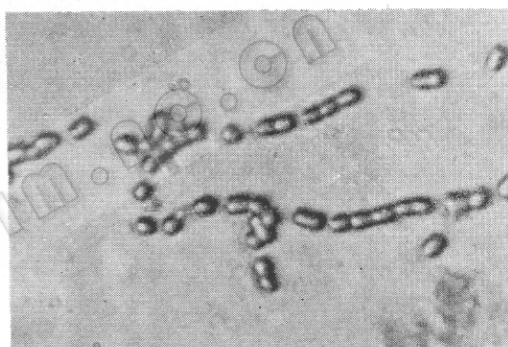
1



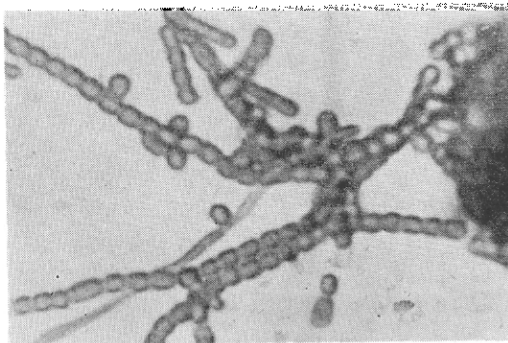
2



3



4



5

- 1 *S. melanochromogenes* 1779
- 2 *S. 39*
- 3 *S. 23-21*
- 4 *S. chrysomallus* 3567
- 5 *S. antibioticus* 8504

圖 1 不同放綫菌素產生菌的成熟孢子(×2500)

表 I 六個放綫菌素產生菌的培養與生理特性

培 養 基	特 性	試 驗 菌 株					
		<i>Strep. chrysomallus</i> 3657	<i>Strep. melanochromogenes</i> 1779	<i>Strep.</i> 23—21	<i>Strep.</i> 39	<i>Strep. antibioticus</i> 8504	<i>Strep. parvullus</i> Z-8
洋山芋塊	生長情況	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	孢子產生	—	+	+++	+	+	+++
葡葡糖肉湯	氣中菌絲	無	黃	金黃	金黃	灰	淡灰
	可溶色素	黃	黃	黃	淡黃	黑棕	淡棕
葡天門	生長情況	+++	++++	++++	+++	+++	+++
	孢子產生	+++	+++	+++	+	+	+
菊冬糖素	氣中菌絲	黃	黃灰	淡黃	黃	稀少灰	灰黃
	可溶色素	淡黃	金紅	金黃	黃	棕	棕
澱粉	生長情況	++	+++	+++	++	++	+++
	孢子產生	++++	++++	++++	++	+++	++
肉湯固體	氣中菌絲	微黃	黃 金黃	淡黃	淡黃	灰	灰
	可溶色素	微黃	金紅	淡黃	淡黃	無色而帶黑點	淡黃
明膠	生長情況	++	+++	+++	+++	+++	+++
	孢子產生	++++	++++	++	+	+++	++
Löffler 血清	氣中菌絲	白	灰	淡黃	白	淡灰	灰白
	可溶色素	無	黃	黃	無	無色而帶黑點	無
牛奶	生長情況	+	+	+	+	+	+
	孢子產生	—	—	—	—	—	—
澱粉溶液	氣中菌絲	無色	無色 淡黃	無色	無色	無色淡棕	無色
	可溶色素	無	淡棕	無	無	棕	無
胰蛋白酶	液 化	+++	++ 僅限明膠上部	+++	+++	—	—
	可溶色素	無	棕	無	無	棕	無
牛奶	液 化	+++	(±)	+++	+++	(±)	(±)
	胰 化	+++	+++	+++	+++	+++	+++
胰蛋白酶	糖 化 力	+++	++	+++	+++	+++	+++
	黑素產生	—	++	—	—	+	—

表 2 \*六個放綫菌素產生菌對不同炭源及氮源的利用

炭 氮 源	<i>Strep. melanochromogenes</i> 1779	<i>Strep. chrysomallus</i> 3657	<i>Strep. antibioticus</i> 8504	<i>Strep. parvullus</i> Z-8	<i>Strep.</i> 39	<i>Strep.</i> 23—21
鼠李糖 l-Rhamnose	-	+++	+++	+++	+++	++
半乳糖 d-Galactose	+++	+++	+++	+++	+++	+++
乳糖 d-Lactose	++	+	+	+++	++	++
山梨醇 d-Sorbitol	+	-	(±)	+	(±)	+
甘露醇 d-Mannitol	+++	+++	+	+++	+++	+++
醋酸鈉 Na-acetate	-	-	+++	-	+	+
檸檬酸鈉 Na-citrate	-	+	-	+	-	-
琥珀酸鈉 Na-Succinate	-	-	-	++	+++	+++
水楊苷 Salicin	-	++	-	+++	+++	++
賴氨酸 l-Lysine	++	-	-	+++	+++	-
酪氨酸 l-Tyrosine	(+)	-	+++	+++	+++	-

\* 培養二週後觀察結果。

表 3 放綫菌素產生菌與其他放綫菌的血清反應

抗 原	免疫血清	<i>Strep. melanochromogenes</i> 1779	<i>Strep.</i> 39	<i>Strep. chrysomallus</i> 3657	<i>Strep. griseus</i> 6111	<i>Strep. rimosus</i> 8229	正常血清 (對照)
<i>Strep. melanochromogenes</i> 1779		1:2560	—	—	1:40	—	—
<i>Strep.</i> 39		—	1:640	—	—	—	—
<i>Strep. chrysomallus</i> 3657		—	—	1:640	—	—	—
<i>Strep. griseus</i> 6111		—	—	—	1:320	—	—
<i>Strep. rimosus</i> 8229		—	—	—	—	1:640	—
<i>Strep. antibioticus</i> 8504		—	—	—	—	—	—

註：數字代表絮狀反應的效價。

39 產量為 86 毫克/立升；*Streptomyces* 23—21 為 43 毫克/立升；而 *Streptomyces chrysomallus* 所產生的放綫菌素 C 及 *Streptomyces antibioticus* 所產生的放綫菌素 A 的產生極微，因而後二者未作計算<sup>[10]</sup>。

放綫菌素 K 結晶的熔點為 250—252°C，而放綫菌素 C 的熔點却為 232—233°C。在結晶體的紙上層析上看出放綫菌素 K 所含的二個主要成分比率上不同於其他放綫菌素，其中最特殊的為放綫菌素 D 只含一個成分<sup>[10]</sup>。結晶體的水解物的氨基酸比較中看到放綫菌素 K、C、23—21，均含有五個氨基酸即蘇氨酸 (dl-threonine)、甲氨基乙酸 (Sarcosine)、脯氨酸 (Proline)、纈氨酸 (d-Valine) 及還有一個可能是異亮氨酸 (dl-Isoleucine)。結晶的紫外光吸收光譜也看不出差異。

放綫菌素 K 結晶於體外體內試驗的結果看出有顯著的 Ehrlich 氏腹水瘤抑制作用<sup>[11,12]</sup>。

## 總 結

放綫菌 No. 1779 菌株是由廣西省桂林附近土壤中分離得到，由於菌絲體菌背呈黃色和能生成黑素的性質而定名為 *Streptomyces melanochromogenes*。

該種在形態、生理、血清反應以及放綫菌素若干化學性質上與 *Streptomyces antibioticus*、*Streptomyces chryso-mallus*、*Streptomyces parvullus*、*Streptomyces* 39 以及 *Streptomyces* 23—21 有差別。

*Streptomyces melanochromogenes* 1779 特點為不能利用 1+鼠李糖、醋酸鈉、檸檬酸鈉、琥珀酸鈉以及水楊苷。血清反應結果也說明 *Streptomyces melanochromogenes* 為中國土壤中分離得到的一支新種。

鄭之新同志也參加此研究工作，特致謝意。並感謝謝遜初先生供給我們二個中國分離的放綫菌 23—21 及 39。

## 參 考 文 獻

- [1] Atsushi Nishibori: *J. antibiotics ser. A*, **9**: 31—41, 1956.
- [2] Brockmann, H., Grubhofer, N., Kass, W. and Kalbe H.: *Chem. Ber.*, **84**: 260—284, 1951.
- [3] Corbaz, R., Ettliger, L. Keller-Schierlein, W. und Zahner, H.: *Archiv Mikrobiol.*, **26**: 192—208, 1957.
- [4] Lindenbein, W.: *Arch. Mikrobiol.*, **17**: 361—383, 1952.
- [5] Pfenning, N.: *Arch. Mikrobiol.*, **18**: 321—341, 1953.
- [6] Pugh, L. H., Datz, E. and Waksman, S. A.: *J. Bacteriol.*, **72**: 660—665, 1956.
- [7] Schmidt Kastner, G.: *Naturwissenschaften*, **43**: 131—132, 1956.
- [8] Waksman, S. A. and Francis Gregory, J.: *Antib. and Chemotherapy*, **4**: 1050—1056, 1954.
- [9] Wang yueh, Fang I-cheng, Pei Yu-chien, Chin Chang-hsu, Chang Yao-gung and Sung Chia-chi: Reports on three antibiotics. Conference on Antibiotic Research, Academia Sinica, Peking pp. 160—161, 1955.
- [10] 蔡潤生、符 彬、庫里洛維奇等：放綫菌素 K——一種抑制癌的物质，科學通報 No. 23, 717—718, 1957.
- [11] 沈麗君、吳淑雲、蔡潤生、庫里洛維奇：放綫菌素 K 的研究 II. 放綫菌素 K 在試管中的制菌作用及對 Ehrlich 腹水瘤細胞的抑制作用。微生物學報，**6**: 158—160, 1958.
- [12] 符 彬、吳德政、劉明章、曲鈞慶、庫里洛維奇：抗生素 23—21 和抗生素 1779 對小白鼠腹水瘤的作用。實驗生物學報，**5**: 525—534, 1957.

## **STREPTOMYCES MELANOCHROMOGENES N. SP., THE SOURCE OF ACTINOMYCIN K**

TSAI JUNG-SHENG, SU TSU-YUAN, PAO CHEN-CHU, LIAN SHU-FONG, and  
W. KURYLOWICZ

(Institute of Materia Medica, Academia Sinica)

During a screening programme for new antibiotics, a strain of *Streptomyces* (No. 1779) was isolated from soil in Kweilin, China. Morphology and physiology of this culture has been studied in comparison with reference cultures of *Strep. antibioticus* 8504, *Strep. chryso-mallus* 3657 and *Strep. parvullus*

Z-8 as well as two other strains *Strep.* 23—21 and *Strep.* 39 previously isolated from soils of different regions in China.

*Streptomyces* No. 1779 was identified as a new species, and its name is proposed as *Streptomyces melanochromogenes*.

This culture is characterized by producing somewhat long aerial mycelium, straight in the early stage of growth, becoming slightly curled when aged, but not in regular spirals. The spores are spherical (Fig. 1). It produces brilliant yellow or golden red soluble pigment (actinomycin K) depended on the substrates used, and forms melanin type of coloring substance in the presence of tryptone or peptone. The colonies are round, covered by white to yellow mycelia mixed with those of grey color.

Physiological and cultural characteristics of this new species as compared to the other. Known cultures are listed in Tab. 1 and 2. It is obvious that *Strep. melanochromogenes* appeared to be related to *Strep. antibioticus* by formation of brown pigment in nutrient agar, weak liquifaction of Löffler's serum, but markedly differed from this species in its proteolytic action on gelatin, and in the production of yellow or golden pigment on most of the media observed.

In the test of assimilation of different carbon and nitrogen sources in well defined agar medium, it was established that all cultures tested gave positive growth response on dextrose, maltose, starch and dextrin, and negative response on d-xylose, sucrose, raffinose and ducitol. In the nitrogen assimilation test, all the observed cultures utilized ammonium sulphate, ammonium chloride, d-glucosamine, urea, l-lysine, l-aspartic acid, l-arginine,  $\beta$ -alanine l-cystine, l-glutamic acid, dl-leucine, dl-isoleucine, dl-serine, dl-threonine, dl-phenylalanine, dl-histidine, d-valine, dl-tryptophane and cysteine. Xanthine stimulated sporulation in all cultures, but growth was absent in thymine and uracil. Sodium nitrite inhibited the growth of all cultures. However, individual *Streptomyces* sp. can be distinguished according to the growth response on the substrates as shown in Tab. 2. Rhamnose, sodium acetate, sodium citrate, sodium succinate and salicin were not assimilated by *Strep. melanochromogenes* 1779.

In serological test it was found that *Strep. melanochromogenes* behaved differently in the flocculation reaction performed with rabbit immune sera (Tab. 3)

*Strep. melanochromogenes* 1779 produces high yield of actinomycin K under laboratory condition; from one batch of fermentation the overall yield of crystalline actinomycin K was estimated to be about 4.4 gm per 10 liters of broth.

Actinomycin K so produced is active in-vitro on Gram-positive bacteria, Ehrlich carcinoma cells and also active in-vivo against Ehrlich carcinoma in mice.

On the basis of different results obtained, it is clear that *Strep. melanochromogenes* 1779 is a new species, which occupies a new position in the genus of *Streptomyces*.