

从金霉素链霉菌 38 选育产生去甲基金霉素的突变株

许菊彦 姚天爵 李焕姿

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

用紫外线和乙烯亚胺处理四环素生产菌株金霉素链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 38 的孢子, 从棕红色的突变菌落中得到三株突变株: 金霉素链霉菌 38-2、38-14 和 38-42。在沉没培养条件下, 于产生金霉素的同时, 它们都能产生一定量的去甲基金霉素。

该菌株经诱变因子处理后, 能提高棕红色变异菌落的出现率。本实验的结果表明用紫外线照射, 棕红色突变菌落的出现率比用乙烯亚胺处理的显著提高。

近年来, 用遗传学与化学的方法改造四环素族抗菌素的结构, 取得了很大进展, 先后出现了各种疗效较好的新型四环素, 并已广泛地应用于临床。目前公认对已知抗菌素进行遗传学的与化学的改造, 已成为制备新抗菌素的重要途径之一。利用遗传学的手段来改变微生物代谢产物的结构, 不仅有实践的意义, 也为人们进一步控制微生物的遗传性状提供了实践基础。

金霉素的产生菌 (*Streptomyces aureofaciens*) Dugger A-377 经诱变得到的突变株, 可产生去甲基金霉素, 它是一个较好的广谱抗菌素, 其疗效与由土霉素出发经半合成而制得的甲烯土霉素相仿, 但剂量却较四环素为低, 已应用于临床。继而又由去甲基金霉素出发, 用化学方法制得了 7-二甲氨基-6-去氧-6-去甲基四环素 (简称二甲氨基四环素), 在临床上的应用范围与四环素基本相似, 但由于它对四环素的耐药菌如金黄色葡萄球菌等亦有较强的作用, 而且它的血清浓度高而持久, 毒性低而副作用小, 因此, 被认为是现有四环素族抗菌素中最好的品种之一。

关于去甲基金霉素的生产, McCormick 等于 1957 年^[1]曾报道, 可由产生金霉素的

菌株金霉素链霉菌 Dugger A-377 得到产生去甲基金霉素的变异菌株。继后又报道^[2], 该突变菌株在固体培养基上菌丝为棕红色。为了进行二甲氨基四环素的试制工作, 我们参考这一线索, 用四环素生产菌株金霉素链霉菌 *S. aureofaciens* 38 为材料, 通过诱发突变方法, 选育产生去甲基金霉素的变异菌株。现将工作结果报告如下:

材料和方法

一、菌株

实验用菌株为 *S. aureofaciens* 38 (以下简称 38) 系华北制药厂供给, 该菌株只产生四环素或金霉素 (当发酵培养基中含有氯离子时) 两种成分。

二、培养基

(一) 斜面培养基 麦麸 5%, 琼脂 2%, 蒸馏水自来水各一半, 另加 0.005% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 自然 pH (6.8—7.2)。

(二) 平皿分离培养基 蔗糖 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, KH_2PO_4 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.2%, 玉米浆 0.4%, 琼脂 2%, pH 6.5 (灭菌前)。

本文 1973 年 12 月 25 日收到。

(三)种子培养基 淀粉4%,酵母粉0.5%,黄豆饼粉2%,蛋白胨0.5%,NaCl 0.2%, KH_2PO_4 0.02%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, CaCO_3 0.4%,自然pH,灭菌前 pH约为6.0—6.5。

(四)发酵培养基 淀粉4.5%,棉子饼粉4.5%,酵母粉0.15%, NH_4Cl 0.15%, CaCO_3 1%,自然pH,灭菌前 pH约为6.0—6.5。

三、诱变方法

(一)紫外线照射

1. 紫外灯为15瓦普通长管型灭菌灯管。

2. 孢子悬液的制备:经37℃ 7—10天培养的孢子斜面,加入8毫升无菌水,用接种针刮下孢子,然后倒入灭过菌的、盛有玻璃珠的三角瓶中,手摇约5分钟以打碎孢子团,用滤纸过滤后,即得到孢子悬液。

3. 照射方法:取制备好的每毫升含70—100万个孢子的悬液5毫升,注入直径9厘米的无菌平皿内,将皿盖打开,暴露在距光源30厘米处照射1分钟,照射时用手摇动平皿,使孢子悬液均匀地接受照射。

4. 平皿培养:将照射后的孢子悬液,经无菌水适当稀释后,取0.1毫升加入平皿,用玻璃棒涂开,置37℃培养7—10天观察。同时,将未照射的孢子悬液作同样稀释与培养作为对照。紫外线照射后的全部操作过程用红色灯泡照明,以避免光复活作用。

(二)乙烯亚胺处理 将8毫升无菌水加入18×180毫米的无菌试管中,再加入1:100的乙烯亚胺1毫升,然后加入孢子悬液1毫升摇匀,此时乙烯亚胺的浓度为1:1000,孢子悬液加入后立即开始计算时间,置28℃静止处理1小时,经稀释后与对照同时作平皿培养,方法与紫外线照射的相同。

(三)突变菌株的选择 经处理的孢子,在平皿中培养后,选择产生颜色的突变菌落,主要是棕红色的菌落。将它们接种斜面,37℃培养7天后,供下一步试验。

四、发酵试验

将已经长好的颜色变株斜面,接种于种子瓶,振荡培养24小时,转种发酵瓶,接种量为5%,培养6天后测定发酵液中是否产生去甲基金霉素。种子和发酵培养均用500毫升三角瓶,内装100

毫升培养基,置每分钟270次的旋转摇床振荡培养,培养温度均为28℃。

五、去甲基金霉素的测定

(一)酸水解法 利用去甲基金霉素和去甲基四环素在酸碱溶液中比较稳定,而金霉素和四环素则在较弱的酸中能被降解破坏^[1]这一特性进行测定。方法为:用试管装入2N HCl 5毫升,加入1毫升过滤后的发酵液,置100℃水浴中煮沸15分钟,然后用浓NaOH调至pH 5—6后,加入pH 6.0的磷酸缓冲液,使总体积为10毫升,此时样品即已被稀释10倍。然后用杯碟法测定抗菌素的抗菌能力。

(二)纸层析法 用圆形平面扩散法。滤纸先用0.1M 乙二胺四醋酸(E、D、T、A)水溶液或pH 4.5的磷酸缓冲液处理,使滤纸增重60—70%时点样,立即放入层析器内进行层析,层析器用25厘米直径的干燥器。流动相为氯仿-吡啶(100:1)。展开后将滤纸取出吹干,滤纸再经氨气处理后,在紫外光灯下显示荧光,或将纸条切下作生物显迹,测定各个成分的 R_f 值。

六、抗菌素的测定

用杯碟法,检定菌为蜡状芽孢杆菌中检63509。金霉素与去甲基金霉素的测定方法相同。

试验结果

一、紫外线照射和乙烯亚胺处理的结果

在本实验用的培养基上金霉素链霉菌38的菌落呈圆形,表面扁平或略有隆起,表面盖有丰富的灰色分生孢子。从平皿反面观察,基内菌丝浅黄色,不扩散到培养基内,这类菌落占绝大多数,为正常型菌落。在菌落群体中出现极少数棕红色的颜色突变菌落,这一类菌落表面往往比正常型菌落隆起,有不规则的褶皱,分生孢子很少,甚至整个菌落呈菌丝型,菌丝呈棕红色。从平皿反面观察,基内菌丝棕红色,稍有扩散到菌落周围。这类颜色突变菌落,在未经处理的菌落群体中也有自发突变出现,但经紫外线或乙烯亚胺处理后颜色突变菌落

的出现频率，比未经处理的对照菌株显著提高。经紫外线照射后的突变菌落出现频率又比乙烯亚胺处理后的有较大提高。结果见表 1。

表 1 经紫外线和乙烯亚胺处理后颜色变异菌落的出现情况

诱 变 剂	观察的菌落总数	其中棕红色菌落数	棕红色菌落出现率(%)
紫 外 线	1915	17	0.88
乙 烯 亚 胺	19121	26	0.14
未经处理的对照	5800	2	0.03

二、去甲基金霉素的测定

(一)酸水解法 用作对照的金霉素标准品经酸水解后，稀释至每毫升含 100 微克时，即不出现抑菌作用，证明金霉素已被充分降解，因而完全失去抗菌活性。实验用原始菌株 38 和大部分颜色突变株的经过过滤后的发酵液水解后，稀释 10 倍时都出现抑菌圈，这可能是因为发酵液中金霉素的浓度较高，水解不充分，因而保留部分生物活性。样品再继续稀释至 100 倍时，则不出现抑菌现象。但其中有少数颜色突变株的发酵液当稀释达 300 倍时，都仍出现明显的抑菌圈。结果见表 2。

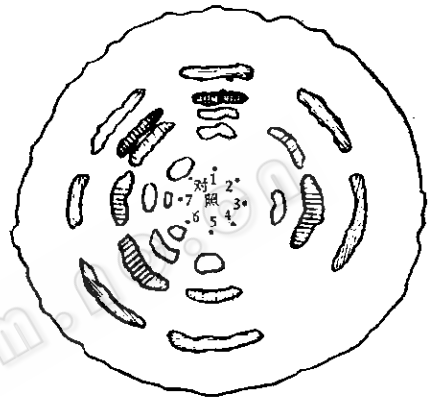
表 2 颜色变株的发酵液经酸水解后的抗菌活性

菌 株	抗菌活性(抑菌圈直径: 毫米)		
	稀释 10 倍	稀释 100 倍	稀释 300 倍
38-2	+	+	+
38-14	>25	19	15
38-42	25	18	15
38(对照)	17.2	—	—
金霉素标准品 1000 微克/毫升	—	—	—





注: +表示有抑菌作用, —表示无抑菌作用。

(二)纸层析鉴别 在本实验用的溶媒系统中,各个标准品的 R_f 值如下: 金霉素 0.57, 去甲基金霉素 0.40, 四环素 0.31。所用的颜色变株发酵液样品和标准样品近

原点处 R_f 值在 0.08—0.15 之间都出现荧光点,可能是四环素族抗菌素的差向异构体。有少数颜色变株的发酵液,在去甲基金霉素标准品的 R_f 值的相应位置上出现荧光点,做生物显迹试验时都具有生物活性。这几株颜色突变株的编号是: 38-2、38-14 和 38-42,至于它们是否含有去甲基金四环素,因为实验中未用该标准品作对照,故未作进一步研究。纸层析结果如图。



图例:

-  表示金霉素位置
-  表示去甲基金霉素位置
-  表示四环素位置
-  可能是四环素类的差向异构体

去甲基金霉素和其它各个成分的层析图谱

对照: 为金霉素、去甲基金霉素、四环素的标准样品混合物

1 为 38-42 变株的发酵液样品

2—7 分别为颜色变株 38-43、38-44、38-45、38-46、38-47 和 38-48 的发酵液样品

经过纸层析鉴别和酸水解法得到的结果证明,上述的几株颜色突变株均产生去甲基金霉素。其中 38-2、38-42 是用紫外线照射后得到的,38-14 是用乙烯亚胺处理得到的。它们都能产生去甲基金霉素,同时也产生金霉素和少量的四环素,至于去甲基金霉素的产量则菌株之间较为近似,约为发酵液中总效价的三分之一,在摇瓶发酵条件下,去甲基金霉素的产量可达

每毫升 400—500 微克以上。用 38-2 突变株作扩大培养, 制得去甲基金霉素结晶, 经化学鉴别它的熔点、紫外线吸收光谱、红外线吸收光谱等与商品去甲基金霉素作比较, 结果相符。测定结果将另文报道。

参 考 资 料

[1] McCormick, J. R. D. et al.: *J. Amer.*

Chem. Soc., 79:4561, 1957.

[2] McCormick, J. R. D. et al.: *Tetracycline Manufacturing Processes Section 1*, 367—379, 1969.

[3] Origoni, V. E. et al.: *Tetracycline Manufacturing Processes Section 1*, 385—386.

[4] Setlow, R. B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 51:226—231, 1964.

[5] Alikhanian, S. I. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 81:914, 1959.

SELECTION OF DEMETHYLCHLOROTETRACYCLINE PRODUCING MUTANTS FROM *STREPTOMYCES AUREOFACIENS* 38

Hsu Chu-yen, Yao Tien-chuch and Li Haun-lou

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

With ultraviolet irradiation and ethylene imine treatment of the tetracycline producing strain *Streptomyces aureofaciens* 38, three mutants were selected from reddish-brown colored colonies. They are designated as *S. aureofaciens* 38-2, 38-14

and 38-42 strains. Under submerged conditions, all of the strains produce chlorotetracycline and demethylchlorotetracycline simultaneously. UV irradiation seemed more efficient than ethylene imine for the induced formation of deep colored colonies.