

两性霉素 B 产生菌——链霉菌 AS 4.1006

上海第三制药厂 (上海)

中国科学院微生物研究所 (北京)

上海医药工业研究院 (上海)

链霉菌 AS 4.1006 是从我国西南采集的土样中分离出来的拮抗菌,它对真菌有很强的抑制作用。对此菌株的形态、培养特征和生理特性进行了系统研究,经鉴定命名为结链霉菌 AS 4.1006 (*Streptomyces nodosus* AS 4.1006)。此菌株产生两种抗菌素,其中主要成分,经提纯精制并测定其理化性质,证实此抗菌素是两性霉素 B。

链霉菌 AS 4.1006 对酵母类真菌有相当强的抑菌作用,在初筛时对啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AS 2.109, AS 2.1156, AS 2.399, AS 2.558, AS 2.980, AS 2.981;清酒酵母 (*Sacch. sake*) AS 2.126;热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) AS 2.564;白假丝酵母 (*Candida albicans*) 等均表现出很强的抑菌作用,对细菌无作用。

对链霉菌 AS 4.1006 的形态、培养特征和生理特性作了系统的观察,经鉴定命名为结链霉菌 AS 4.1006 (*Streptomyces nodosus* AS 4.1006)。此菌株产生两种抗菌素,用溶媒从菌丝中提取、精制得出黄色针状结晶。测定了它的各种理化性质,证实主要成分是七烯抗菌素——两性霉素 B。

一、链霉菌 AS 4.1006

的分类学研究

(一) 形态及培养特征

孢子丝相当短,紧密,螺旋形,1—3圈,孢子丝横隔分裂。电子显微镜下孢子表面光滑或粗糙(见图 1)。

在高氏合成一号、克氏合成一号琼脂

等七种培养基上的培养特征如表 1。

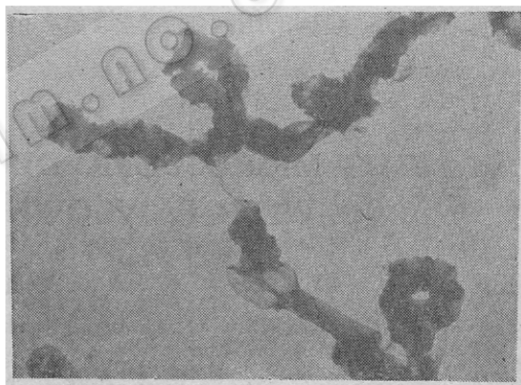


图 1 链霉菌 AS 4.1006 的孢子丝(7000×)

(二) 生理生化特性

明胶液化, 20 天良好;可溶性色素棕黄(暗风帆黄至槟榔棕)。牛奶凝固轻微,胨化良好,可溶性色素黄至棕黄。淀粉水解由于未生长而无结果,纤维素上生长少至中等。

(三) 碳源利用

链霉菌 AS 4.1006 能利用葡萄糖, D-果糖, L-鼠李糖, L-阿拉伯糖, D-木糖和内消旋肌醇;对 D-甘露醇利用可疑;不利用蔗糖和棉子糖。

本文于 1977 年 6 月 30 日收到。

表 1 链霉菌 AS 4.1006 的培养特征*

培养基	气 丝	基 丝	可溶性色素
高氏合成一号琼脂	不生长	不生长	—
克氏合成一号琼脂	不生长	不生长	—
察氏合成琼脂	不生长	不生长	—
葡萄糖天门冬素琼脂	很少, 白—浅灰—灰	浅淡黄褐转芒果棕至椰壳棕	琥珀黄, 浅淡赭
葡萄糖酵母膏琼脂	浅灰—中灰, 少, 绒斑状	风帆黄至芒果棕	淡咖啡至风帆黄
葡萄糖酵母膏燕麦粉琼脂	白灰—褐灰	黄褐变暗褐, 芒果棕至暗褐	芒果棕
马铃薯块	很少, 在薯块顶成小环	暗黄至丁香棕至暗灰驼后褐黑	鹿角棕至淡咖啡, 薯块初灰褐, 后为菌丝覆盖, 顶点芒果棕

* «色谱», 科学出版社, 1957。

(四) 链霉菌 AS 4.1006 的鉴定

链霉菌 AS 4.1006 的孢子丝, 孢子形态和气丝颜色与文献 [1, 2] 报道的结链霉菌 (*S. nodosus*) 是一致的。在有机培养基上不形成黑色素, 液化明胶, 胨化牛奶等生理特征以及在碳源利用方面, 不利用蔗糖及棉子糖的特性和文献报道的结链霉菌也是一致的。

但链霉菌 AS 4.1006 在察氏琼脂和淀粉琼脂上都不生长, 而 Trejo 菌株在察氏琼脂上生长良好, 水解淀粉强。此外, Trejo 和国际链霉菌计划^[3] 都肯定结链霉菌利用 D-甘露醇, 对 L-阿拉伯糖利用可疑, 这几点均和链霉菌 AS 4.1006 不一致。

综上所述, 链霉菌 AS 4.1006 与结链霉菌代表菌株 ISP-5109 近似, 可以归入该种, 但应加菌号以示为独特一株, 命名为结链霉菌 AS 4.1006 (*S. nodosus* AS 4.1006)。

二、链霉菌 AS 4.1006 的发酵

链霉菌 AS 4.1006 在葡萄糖酵母膏琼脂上, 28℃ 培养 10 天, 生长良好。

在此培养基上进行自然分离, 得 8-13 号菌株, 菌落表面平坦, 微隆起, 有皱褶, 气丝丰茂, 呈鹤灰色, 基丝褐色, 无可溶性色素, 连续培养 5 代, 效价稳定。

发酵培养基成份(%): 葡萄糖 1.6, 糊精 7.0, 棉子饼粉 1.6, 花生饼粉 1.4, 磷酸二氢钾 0.02, 硫酸铜微量, 碳酸钙 0.74。pH 5.3—5.5 (灭菌前)。

发酵 144 小时, 发酵液呈黄褐色, 发酵过程中 pH 变化不大。菌丝在 60 小时以后开始出现空胞, 以后发酵单位急剧上升, 发酵中通氧量对效价影响较大, 0—72 小时必须给以足够的空气否则影响效价的生长, 72 小时以后空气量的影响渐小。120—144 小时效价达到高峰。发酵过程中的代谢变化如图 2。

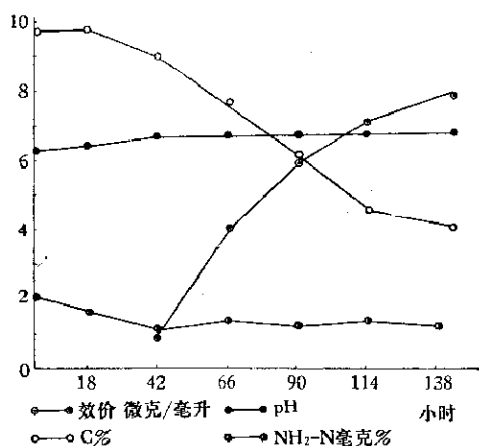


图 2 发酵过程中的代谢情况

链霉菌 AS 4.1006 产生两种抗菌素, 主要成分是七烯抗菌素, 发酵培养基组分的改变和发酵条件的变化都影响两种成分的比率, 培养基中使用混合碳源、混合氮源, 加入适量磷酸盐和少量钠盐, 都能使其

主要成分的含量增加。

三、链霉菌 AS 4.1006 所产 抗菌素的理化性质

此菌产生两种抗菌素,我们只对其主要成分进行了分离纯化,并对其理化性质进行了研究。

(一) 抗菌素的分离与纯化

链霉菌 AS 4.1006 所产生的抗菌素存在于菌丝中,用碱性乙醇温浸菌丝,过滤后,将滤液 pH 调成中性,冷却,活性物质沉淀析出,纯度约 600 微克/毫克。

取上述粗品溶于酸性二甲基甲酰胺,滤去不溶物,滤液加 4 倍量 70% 乙醇,再用 2% NaOH 乙醇液调 pH 至 5.0—5.5,活性物质析出,过滤,用丙酮洗涤,反复精制两次,可得纯度为 900 微克/毫克以上的精制品。

取上述精制品,用 70% 乙醇作成饱和溶液,保温,放置过夜,得黄色针状结晶,如图 3。

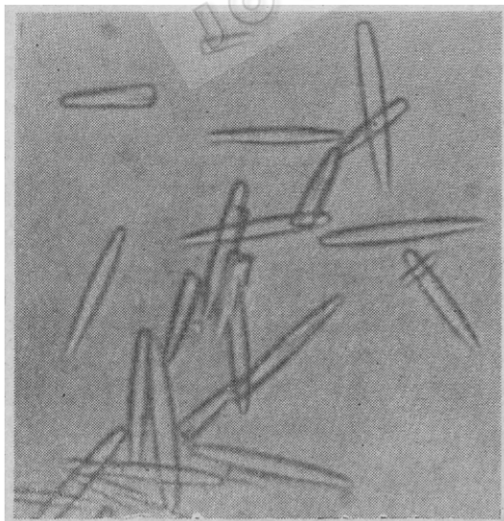


图 3 链霉菌 AS 4.1006 抗菌素结晶

(二) 理化性质

此抗菌素是黄色针状结晶,易溶于二

甲基亚砷、冰乙酸;溶于二甲基甲酰胺、异丙醇、含水低级醇;不溶于乙醚、甲苯、苯氯仿和水。

与浓硫酸呈深蓝色反应;使 $\text{Br}_2\text{-CCl}_4$ 迅速退色;使中性高锰酸钾退色;Molisch 反应阳性;Fehling 氏反应、茚三酮反应、双缩脲反应、三氯化铁反应等均为阴性。

根据上述性质,此抗菌素属七烯抗菌素,与两性霉素 B 近似,所以进一步进行纸层析和薄板层析对比试验,结果如表 2。

表 2 链霉菌 AS 4.1006 抗菌素和两性霉素 B
纸层析和薄板层析* 的比较

溶剂系统	Rf 抗 菌 素	纸 层 析		薄 板 层 析	
		链霉菌 AS 4.1006 抗菌素	两性霉 素 B**	链霉菌 AS 4.1006 抗菌素	两性霉 素 B**
乙醇:氨水:水:二噁烷 8:1:1:1		0.51	0.51	0.20	0.20
乙醇:乙酸:水 3:1:1		0.71	0.70	0.65	0.66
丁醇:吡啶:水 3:2:1		0.48	0.45	0.40	0.40
丁醇:吡啶:乙酸:水 15:10:3:12		0.76	0.78	0.76	0.74
丁醇:乙酸:水:二噁烷 6:2:2:1		0.62	0.62	0.60	0.66

* 薄板层析用硅胶 G, 厚度 0.1 毫米,用碘蒸气显色。

** 两性霉素 B 是用进口商品两性霉素 B 去氧胆酸钠复盐,作成两性霉素 B 碱,再精制而得。

由表 2 结果看出,两种抗菌素的纸层析和薄板层析的 Rf 值基本一致。因此进一步对其他理化性质作了对比,结果如表 3。

表 3 结果表明,链霉菌 AS 4.1006 所产生的抗菌素,在理化性质上与两性霉素 B 基本一致。

表 3 链霉菌 AS 4.1006 抗菌素和两性霉素 B 的理化性质

抗 菌 素 理化性质	链霉菌 AS 4.1006 抗菌素	两性霉素 B
性 状	黄色针状结晶	黄色针状结晶 ^[4]
熔 点 (°C)	175 (分解)	> 170 (分解) ^[4]
N-乙酰衍生物熔点 (°C)	158	160 ^[5]
中和当量	934	959 ^[6]
旋光度 $[\alpha]_D^{25}$	+420 (酸性 DMF)	+420 (酸性 DMF)*
元素分析		
C (%)	58.00	57.79 ^[7]
H (%)	8.00	8.00
N (%)	1.56	1.52
紫外吸收光谱 (毫 微米)	405, 382, 362, 345, 283, 273, 263 (sh), 225 (见图 4)	405, 382, 362, 345 ^[4] , 283, 273, 263 (sh), 225 (见图 5)
红外吸收光谱	(见图 6)	(见图 7)
液-色 谱	(见图 8)	(见图 8)

* 文献报道两性霉素 B 用酸性 DMF 作溶剂测定旋光度为 +333, 但我们用进口商品精制的两性霉素 B 测定时, 旋光度为 +410, 与链霉菌 AS 4.1006 抗菌素的测定结果一致。

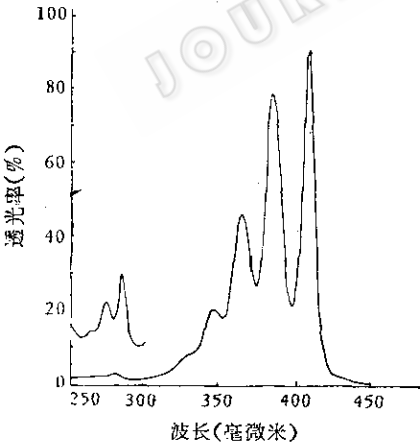


图 4 链霉菌 AS 4.1006 抗菌素的紫外吸收光谱

四、链霉菌 AS 4.1006 抗菌素的毒性

取此抗菌素的精制品作成去氧胆酸钠复盐, 测定小白鼠的 LD₅₀, 并与两性霉素

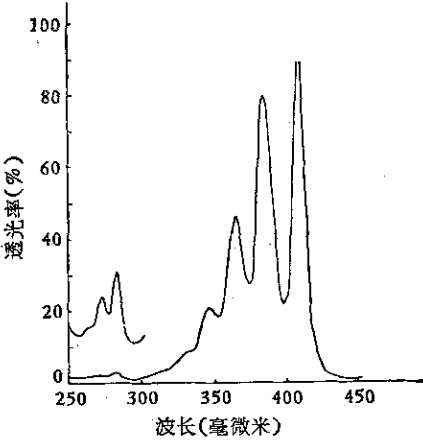


图 5 商品的两性霉素 B 的紫外吸收光谱

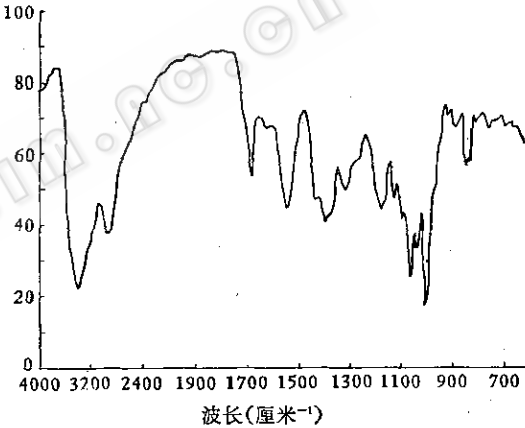


图 6 链霉菌 AS 4.1006 抗菌素的红外吸收光谱

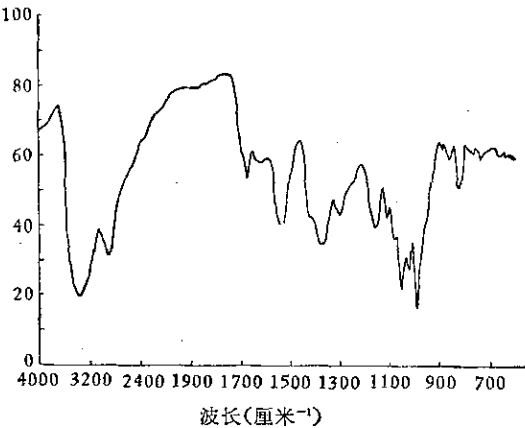


图 7 商品两性霉素 B 的红外吸收光谱

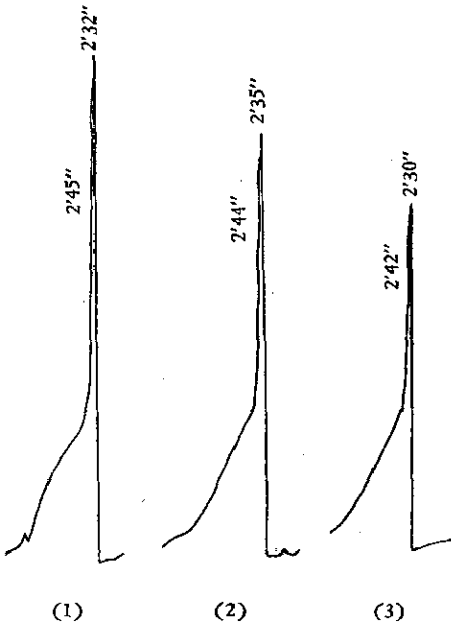


图8 链霉菌 AS 4.1006 抗菌素和两性霉素B的液-液色层谱

- (1) 1959年国际参考标准品
 (2) 美国 Squibb 产品
 (3) 链霉菌 AS 4.1006 抗菌素
 层析柱 Permaphase ODS
 填充剂 2.5 毫米×500 毫米玻璃柱
 流动相 含30%水的甲醇
 柱压 15 公斤/平方厘米
 流速 0.6 毫升/分
 柱温 室温
 鉴定器 氢焰
 样品 10 毫克, 0.5 毫升 DMSO 和 0.5 毫升 MeOH 溶解

B 去氧胆酸钠复盐比较, 结果如下:

链霉菌 AS 4.1006 抗菌素去氧胆酸钠复盐:

LD₅₀ (静脉) 3.31 ± 0.73 毫克/公斤

(腹腔) 48.18 ± 8.96 毫克/公斤

两性霉素 B 去氧胆酸钠复盐:

LD₅₀ (静脉) 3.13 ± 0.79 毫克/公斤

(腹腔) 44.73 ± 5.84 毫克/公斤

参 考 文 献

- [1] Waksman, S. A.: *The Actinomyces*, Vol. II, Classification, Identification, and Descriptions of Genera and Species, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1961, p. 250.
- [2] Trejo, W. and R. E. Bennett: *J. Bacteriol.*, 85: 436—439, 1963.
- [3] Shirling, E. B. and D. Gottlieb: *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, 18: 353—355, 1968.
- [4] Dutcher, J. D. et al.: *Antibiot. Ann.*, 1956—1957, 866—869.
- [5] Schaffner, C. P. and E. Berowski: US Patent 3,244,590, 1966.
- [6] 武田敬一: *J. Antibiot.*, 15: ser. B: 53—57, 1962.
- [7] ジョーン、ウランデブット: 特许公报, 昭 35-8100, 1960.

AN AMPHOTERICIN B PRODUCING ORGANISM, *STREPTOMYCES* AS 4.1006

Shanghai No. 3 Pharmaceutical Plant (Shanghai)

Institute of Microbiology, Academia Sinica (Beijing)

Shanghai Research Institute of The Pharmaceutical Industry (Shanghai)

A strain of *Streptomyces* producing antifungal antibiotics was isolated from a soil sample collected from the south-west of China. Its morphological, cultural characteristics and physiological properties was studied. After identification, this strain was designated as *Strep-*

tomyces nodosus AS 4.1006.

Streptomyces nodosus AS 4.1006 produced two antibiotics. From its physical and chemical properties as well as the biological activities, the major one is identical with amphotericin B.