

济南游动放线菌不同变异菌株产生的 创新霉素的组分的比较

许津 徐学瑛 马瑜 李元

(中国医学科学院药物研究所抗菌素系生物化学室、北京)

济南游动放线菌可以产生多种抗菌物质,目前知道的至少有创新霉素、创新霉素 B 成分和 C 成分等三种。

通过诱变剂处理,从济南游动放线菌中分离出两个变株 NT-11 和 B-1,它们在形态、培养特征、可溶性色素以及产生的抗菌物质成分方面均有显著的不同。变株 NT-11 仅产生创新霉素和创新霉素 C 成分,变株 B-1 产物中则以创新霉素 B 成分为主,同时还有多种色素类抗菌物质,但也产生一定量的创新霉素和创新霉素 C 成分。

本文报道了创新霉素 B 和 C 成分的理化性质和体外生物活性的数据。对创新霉素与 B 成分在生物合成方面的关系也进行了初步研究。

在创新霉素^[1]的发酵研究中,发酵液的颜色曾出现过明显的变化,有时呈浅黄色,有时则呈深紫色。呈浅黄色时,它的抗菌活力不强,但创新霉素的收率较高。呈深紫色时,它的抗菌活力较好,但创新霉素收率很低,有时甚至得不到结晶产品。为此我们使用诱变剂处理创新霉素产生菌的原株,获得两株产生色素比较稳定的变株 NT-11 和 B-1。其中变株 NT-11 是无色变株,发酵液经常呈浅黄色,变株 B-1 是紫色变株,发酵液经常是深紫色。通过创新霉素产生菌的原株与这些变株对比,观察它们产生色素和抗菌物质之间的关系。

材料和方法

(一) 菌种

济南游动放线菌原株(我室菌种组保存)^[2]。变株 NT-11, 变株 B-1。各菌株均制成牛奶冷冻干燥管保存。从冷干管接出后,用第 2、3 代斜面进行发酵试验。

(二) 培养基

1. 琼脂斜面培养基: 小麦片 6%, 琼脂 2%, 自来水,接种后在 28°C 温室中培养七天,取出在 10°C 冰箱中保存备用。

2. 种子培养基(%): 淀粉 3, 豆饼粉 1, 鱼粉 0.5, K_2HPO_4 0.05, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0001, $CaCO_3$ 0.5。自来水配制, pH 7.0—7.5。培养瓶为 500 毫升三角瓶,每瓶盛 100 毫升培养基。

3. 发酵培养基(%): 淀粉 5, 豆饼粉 1.5, 鱼粉 0.5, K_2HPO_4 0.1, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0001, $Na_2S_2O_8 \cdot 5H_2O$ 0.5, $CaCO_3$ 1.0, 自来水配制, pH 7.0—7.5, 培养瓶为 500 毫升三角瓶,每瓶盛 50 毫升培养基。

(三) 培养方法

保存在琼脂斜面上的菌种,用来接种种子瓶,种子生长 36—48 小时,再以 10% 的接种量转种于发酵瓶中。培养条件为 28°C, 旋转摇床 (200 次/分, 偏心距 2 厘米) 上培养 4—5 天。

(四) 测定方法

创新霉素的生物效价^[1,2]: 杯碟法, 枯草杆菌

本文于 1978 年 8 月 20 日收到。
分析测定工作分别由本所药理室、北京结核病研究所、本所分析室协助进行。

作检定菌,根据标准曲线计算创新霉素含量。

创新霉素的化学测定法: 取定量发酵滤液,用6N盐酸酸化至pH 2—3,加入等体积乙酸乙酯抽提,离心,取上层液1毫升放在50毫升容量瓶中,在沸水浴中加热五分钟,除去溶媒,加入0.25毫升2.5%的对二甲氨基苯甲醛试剂和0.1毫升2% NaNO₂溶液,立即加入14毫升浓盐酸(预先冰箱中冷却),在28℃水浴中放置12分钟,取出,用50%乙醇稀释到刻度,在600毫微米波长光下比色,根据光吸收的读数计算创新霉素的含量。

pH,用上海25型酸度计测定。

2.纸层析:溶媒系统:甲醇:3%氯化钠溶液=3:1,滤纸用5%Na₂SO₄处理,纸长25厘米,上行,创新霉素R_f值为0.65。

3.薄层层析:第一个溶媒系统:氯仿:乙酸乙酯:甲酸=70:30:0.5,用硅胶(青岛产品,200目以下,含15%CaSO₄)制板。

第二个溶媒系统:苯:乙二醇甲醚=9:1,硅胶(青岛产品,200目以下,含15%CaSO₄)加pH 7.6,0.1M磷酸缓冲液制板。

4.显迹方法:微生物法是用枯草杆菌作为检定菌,为了更确切地将创新霉素从其它抗菌成分中区别出来,使用了色氨酸抵消方法,方法是将相同的层析铺在两个显迹的盘子上,两个显迹的盘子所用检定菌与培养基完全相同,只是一个培养基中含有20微克/毫升色氨酸,由于色氨酸可以抵消创新霉素的抗菌作用^[4],对其它抗菌成分没有影响,因此可以准确的看出创新霉素在层析图谱上的位置。化学方法,是用Ehrlich试剂显色,创新霉素呈蓝色斑点。

5.创新霉素组分的分离精制方法:发酵液离心除去菌丝,酸化到pH 2,用等量乙酸乙酯提取,分出乙酸乙酯层,用pH 7.0,0.1M磷酸缓冲液抽提,水层中为创新霉素,分出乙酸乙酯层,减压蒸馏除去溶媒,即得粗制品。

粗制品用苯抽提,抽提液放置则析出黄色针状结晶,结晶溶于苯中,用无水硫酸钠脱水,活性炭脱色,再重结晶得黄色菱形结晶,称为创新霉素C成分。

经苯洗过的粗制品,用大量丙酮溶解,加硅胶(青岛产品,80—100目,用pH 7.6,0.1M磷

酸缓冲液处理过)吸附,吹去丙酮,装在硅胶柱的顶部,用苯:乙醇混合液=9:1推进,分出多种色带,收集其中深紫色部分,称为创新霉素B成分。浓缩至干,再溶于丙酮中,吸附到硅胶(青岛产品,小于200目,用pH 7.6,0.1M磷酸缓冲液处理过)上,装在硅胶柱顶部,重复进行层析,溶媒用苯:乙二醇甲醚=9:1,收集深紫色部分,吹干即得创新霉素B成分的精制品。

实验结果

(一) 菌株来源及培养特征

济南游动放线菌原株,在小麦片培养基上生长良好,菌落凸起,第三天后菌落呈深褐紫色,后期起皱,培养时间长有紫色可溶性色素。

变株 NT-11 是用100微克/毫升亚硝基胍处理5小时获得的变株,该菌株在小麦片培养基上生长良好,菌落凸起,后期菌落呈浅紫色,有皱褶,无可溶性色素。

变株 B-1 是用100微克/毫升创新霉素处理所获得的变株,该菌株在小麦片培养基上生长不太好,菌落平,不凸出,菌落从开始即呈紫色,晚期有皱褶,可溶性色素为深蓝色。

(二) 三菌株发酵情况

用上述发酵条件将三菌株进行发酵,于120小时取出,测定发酵液的pH,化学和生物效价,并将发酵液酸化到pH 2,用1/4体积的乙酸乙酯提取,分出乙酸乙酯提取液进行纸层析和薄层层析,观察三种发酵液的纸层析图谱和薄层层析图谱的差异,结果见表1,图1,2。

从纸层析图谱与薄层层析图谱看,创新霉素产生菌至少产生三个成分。第一个成分为创新霉素,无色、抑菌圈不甚清晰,且能被L-色氨酸抵消,在纸层析图谱上R_f值为0.65,在I号薄层层析溶媒系统中R_f值为0.6—0.8,在II号薄层层析溶媒系统中R_f值为0.3—0.5。

表 1 济南游动放线菌三菌株发酵情况比较

菌 株	第 一 次 试 验			第 二 次 试 验		
	pH	化学效价 微克/毫升	生物效价 微克/毫升	pH	化学效价 微克/毫升	生物效价 微克/毫升
原 株	7.95	317	204	7.80	329	238
变株 NT-11	7.98	333	242	7.70	339	273
变株 B-1	7.81	317	231	8.48	295	236

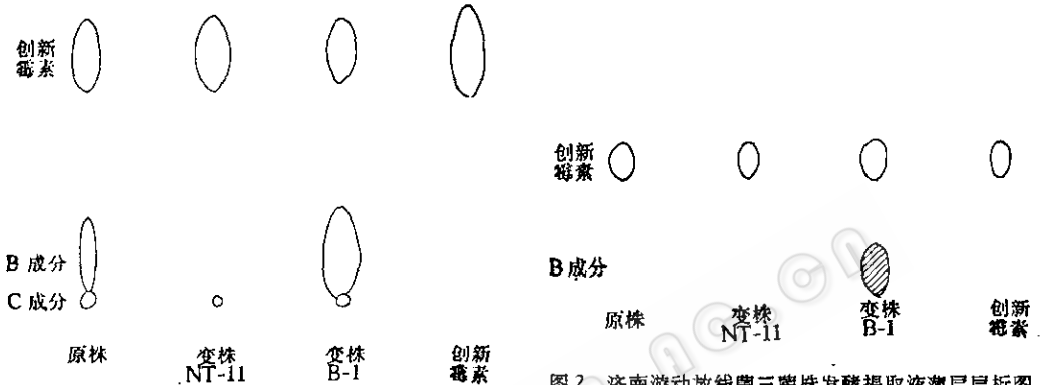


图 1 济南游动放线菌三菌株发酵提取液纸层析图生物显迹, 检定菌为枯草杆菌。

图 2 济南游动放线菌三菌株发酵提取液薄层析图 I 号溶媒系统, Ehrlich 试剂显色, 创新霉素蓝色, 创新霉素 B 本身为紫色。

第二个成分称为创新霉素 B 成分, 深紫色, 抑菌圈清晰, 在纸层析图谱上 R_f 值为 0.1, 在 I 号薄层层析溶媒系统中 R_f 值为 0.1—0.15, 在 II 号薄层溶媒系统中 R_f 值为 0.3—0.5, 在这个溶媒系统中它与创新霉素的抑菌圈常重叠, 但由于抑菌圈清晰程度不同可以分辨得出。另外创新霉素的抗菌作用可被 L-色氨酸抵消, 而创新霉素 B 成分则没有这个现象, 所以也可以利用 L-色氨酸的抵消作用来区分这两个成分。

第三个成分称为创新霉素 C 成分, 无色, 抑菌圈很不清晰, 在纸层析图谱上经常在原点, 在 II 号薄层溶媒系统中 R_f 值为 0.9—1.0。

(三) 色氨酸代谢的中间产物对创新霉素的几种成分生物合成的影响

创新霉素是吲哚的衍生物, 在过去工作中发现与色氨酸代谢相关的中间产物, 如邻氨基苯甲酸、吲哚、吲哚丙酮酸、色氨酸等均能提高创新霉素的产量。为了观察

表 2 四种色氨酸代谢中间物对 NT-11 和 B-1 生物合成的影响

	变株 NT-11			变株 B-1		
	pH	化学效价 微克/毫升	生物效价 微克/毫升	pH	化学效价 微克/毫升	生物效价 微克/毫升
对 照	8.12	324	269	7.79	279	246
+ 邻氨基苯甲酸	8.18	554	538	8.00	397	356
+ 吲哚	8.14	368	376	7.93	364	222
+ 色氨酸	8.20	904	375	7.87	654	355
+ 吲哚丙酮酸	8.33	488	409	7.96	381	296

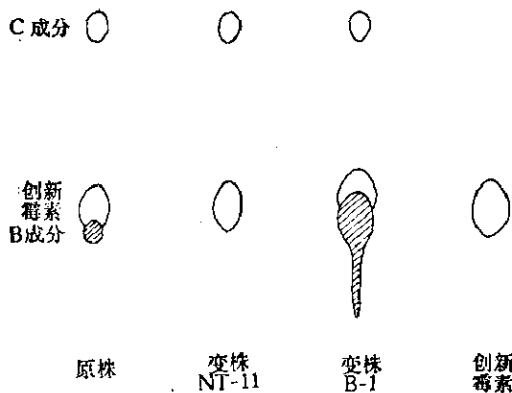


图3 济南游动放线菌三菌株发酵提取液薄层层析图 II号溶媒系统,微生物显迹。

创新霉素与B和C成分之间是否存在生源上的联系,我们在 NT-11 和 B-1 两菌株的发酵液中加入邻氨基苯甲酸、吡啶、吡啶丙酮酸和色氨酸四种前体(用量为 0.1%)观察它们对两个变株生物合成的影响,结果见表 2,图 3、4。

从实验结果看,加四种前体对两个菌株的抗菌效价均有一定程度的提高。从纸

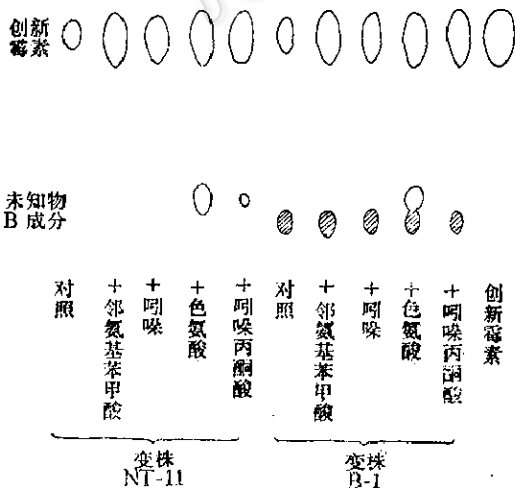


图5 NT-11 和 B-1 两变株发酵液中加不同前体后,发酵提取液的薄层层析图

I号溶媒系统,用 Ehrlich 试剂显色,创新霉素蓝色,创新霉素 B 成分本身为紫色。

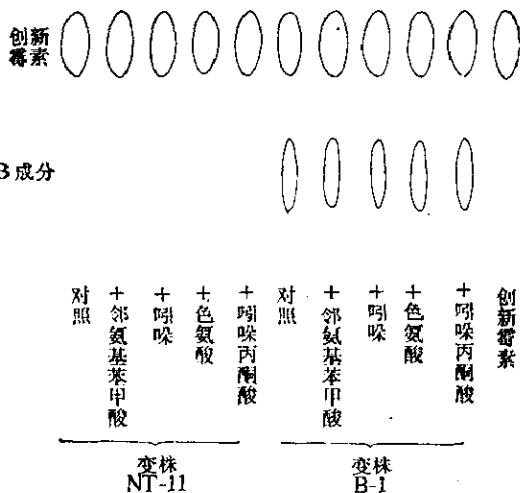


图4 NT-11 和 B-1 两变株发酵液中加入不同前体后发酵提取液的纸层析图

层析图谱上看,该二菌株加前体后,与对照组相比,组成上无明显的不同。在薄层层析图谱上,用 Ehrlich 试剂显色,可以看出凡是加前体的样品,创新霉素所现的蓝色斑点均变大,变深,而创新霉素 B 则无明显的不同。用色氨酸做前体时,发酵液的化学效价显著增加,但生物效价并不平行地增长,从薄层层析图谱上可以看出加色氨酸作前体时,用 Ehrlich 试剂显色,在 R_f 0.1—0.15 处总有一个深蓝色的斑点,它影响化学效价的测定,但无抗菌活性,所以造成生物效价与化学效价间显著的不平行。

(四) 创新霉素 B 成分和 C 成分的性质

济南游动放线菌 B-1 菌株的发酵液通过上述方法分离和精制,得到创新霉素 B 和 C 成分的纯品,其初步理化性质与生物活性见表 3、4。

从表中看出,创新霉素与创新霉素 B 成分和 C 成分在理化性质上完全不同,创新霉素 C 成分经质谱测定证明是硫的结晶 S_8 。在生物活性上三者也有显著的差异,说明它们在结构上是不相关的。

表 3 济南游动放线菌产生的三种抗菌物质的理化性质比较

	创新霉素	创新霉素 B	创新霉素 C
颜色	白色或浅黄色针状结晶	紫黑色粉末	淡黄色针状结晶
溶解性	溶于醇、酯、丙酮、乙醚, 二氧六环、四氢呋喃、吡啶、二甲基甲酰胺, 微溶于氯仿	溶于二甲基甲酰胺、乙二醇甲醚、丙酮。微溶于乙酸乙酯, 乙醇, 甲醇, 氯仿	溶于苯, 己烷
熔点	192—192.5℃	> 300℃	120℃
元素分析(%)	C62.33, H4.63, N5.61, O13.24, S13.74.	C70.10, H7.35, N2.12, O19.21, S1.22	
紫外光谱 λ_{max} 毫微米	228, 295, 306	255, 370, 388	
红外光谱(厘米 ⁻¹) (KBr)	3420, 3390, 1690, 1620, 1610, 1580, 1550, 1480, 1430, 1375, 1350, 1310, 1290, 1270, 1200, 1165, 1085, 1035, 920, 820, 770	3291, 2916, 2325, 1642, 1477, 1384, 1277, 1236, 1174, 1125, 1089, 1067, 1005.5, 936	
分子式	C ₁₂ H ₁₁ O ₄ NS	—	S ₆

表 4 济南游动放线菌产生的三种抗菌物质的体外抗菌活性

	创新霉素	创新霉素 B	创新霉素 C
金黄色葡萄球菌 209 P	3.125—6.25	<0.19	6.25
肺炎双球菌 31108	>100	1.56	25
流行性感胃杆菌 58530	3.125	3.125	6.25
副痢疾志贺氏菌 1	0.39	0.78	100
大肠杆菌 1515	3.125—6.25	1.56	>100
人型结核杆菌	—	—	0.39

讨 论

创新霉素发酵液出现的颜色变化是创新霉素产生菌可以产生多种抗菌物质的结果。从这项工作可以看出该菌产生的抗菌物质除创新霉素外, 尚有产量比较高的创新霉素 B 和 C 成分。此外通过硅胶层析还可以看到一系列色素类的抗菌物质。

济南游动放线菌可以通过诱变突变方法获得不产生色素的变株 NT-11, 该变株只产生创新霉素和创新霉素 C 成分, 不产生创新霉素 B 成分及其它色素类抗菌物质。B-1 变株则是产生以创新霉素 B 成分

为主的菌株, 同时产生多种色素类抗菌物质, 但也产生一定量的创新霉素和 C 成分。NT-11 和 B-1 两变株在形态、培养特征、可溶性色素以及抗菌素成分等方面均有明显的差异。但该二变株在琼脂斜面连续传代时, 两者间还存在着相互变异的现象。

创新霉素与创新霉素 B 成分在理化性质与生物活性上是完全不同的, 从前体试验中也可以看出色氨酸合成的中间产物可以促进创新霉素的合成, 对 B 成分则无明显的作用。因此我们认为对于创新霉素产生菌来说, 产生创新霉素与产生创新霉素 B 及其它色素类抗菌物质是两组不同的酶

系统,在变株 B-1 中它们可以共同存在,而在变株 NT-11 中则只有合成创新霉素的酶系统表现出来。

从已报道的资料看,还没有与创新霉素 B 成分性质完全相同的抗菌物质,因此创新霉素 B 有可能是一个新抗菌素。

参 考 文 献

- [1] Chuangxinmycin Research Group, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science: *Scientia Sinica*, 20: 106, 1977.
[2] 李群等; 微生物学报, 16: 102, 1976。

COMPARISON OF CHUANGXINMYCIN COMPONENTS PRODUCED BY MUTANTS OF *ACTINOPLANE TSINANENSIS*

Xu Jin Xu Xue-yin Ma Yu Li Yuan

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science, Beijing*)

Actinoplane tsinanensis can produce several antibiotic substances in broth. At present, at least three of them are known i.e., Chuangxinmycin, Chuangxinmycin B and C.

Two mutants, designated as NT-11 and B-1, were isolated from *Actinoplane tsinanensis* culture treated with mutagens. They differ evidently in their morphological and cultural characteristics, soluble pigments, and produced antibiotic substances. Mutant NT-11 produces Chuangxinmycin and Chuangxinmycin C whereas

mutant B-1 secretes Chuangxinmycin B as the main product, and a series of pigmental antibiotic substances as well as an amount of Chuangxinmycin and Chuangxinmycin C.

The data of physical and chemical properties and in vitro antimicrobial activities of Chuangxinmycin B and C are given in this paper. The relation between the biosyntheses of Chuangxinmycin and Chuangxinmycin B was also studied.