

灰绿链霉菌产生的新抗生素 X_a、X_b ——发现与发酵条件*

诸葛健 K. Q. Yang L. C. Vining

(无锡轻工业学院)

(加拿大 Dalhousie 大学)

摘要 在某些培养条件下,发现灰绿链霉菌除能产生已知的两种广谱低毒的大环肽类抗生素宜他霉素和灰绿霉素外,还能产生另两种新的广谱抗生素 X_a 和 X_b。

关键词 灰绿链霉菌; 抗生素; 薄层层析(TLC); 生物测定

宜他霉素(绿灰霉素)和灰绿霉素分别属于弗吉尼亚霉素(Virginiamycin)类抗生素的 B 和 A 型^[7]。1955 年^[1]首次报道灰绿链霉菌(*Streptomyces griseoviridis*)所产生的两种抗生素具有协同作用。它们对革兰氏阳性细菌和类菌质体具有很强的活性,而毒性则很低,所以被广泛用于动物饲料添加剂^[2]。我们在灰绿链霉菌对产生抗性的机制研究中,发现发酵滤液中的部分活性在 37℃ 保温处理 2h 后会丧失,而且证实这部分丧失的活性并非是宜他霉素和灰绿霉素。于是我们对这部分活性物质进行了深入研究,结果发现了 X_a 和 X_b 两种新抗生素,但仍不属于保温失活的那部分活性物质。这是两种至今尚未报道过的新抗生素,具有广谱的抗菌作用,它们的产量随培养条件而变化。新抗 X 部分在总抗菌效价中的比例与所用碳源很有关系。本文报道这两种新抗生素的发现及发酵条件。有关新抗 X 的检测方法的确立和分离纯化、结构鉴定等将另文报道。

1 材料与方法

1.1 菌种

灰绿链霉菌 400E-2 系经筛选的生产株,其亲株 P-D04955 系美国 Davis 公司提供。藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)用于生物测定敏感株,由本实验室提供。

1.2 抗生素与试剂

宜他霉素和灰绿霉素分别为 Sanraku-Ocean 公司的 Y. Okamura 博士和 Merck 公司的

* 本研究在加拿大 Dalhousie 大学完成。

收稿日期: 1991-05-31

E. Dulaney 博士所赠。硅胶薄层层析板(Kiessigdzof 245)为 Merck 公司产品。培养基的各种组分和使用的溶剂皆从市场购买。

1.3 抗生素效价的测定

培养滤液的抗生素活性测定采用以藤黄微球菌为敏感株的平皿纸片扩散生物测定法^[8]。方法如下: 一环敏感菌接入盛有 20ml 含 2% 甘油、0.8% 营养肉汁、0.3% 酵母浸出物和 0.5% K₂HPO₄ 的 150ml 三角瓶中, 27℃、250r/min 振荡培养 20h。取 3ml 该培养液加入到 40ml 融化的软琼脂上层培养基中(0.3 琼脂和 0.8% 营养肉汁), 此混合物倾于含有 150ml 底层培养基(0.4% 麦芽糖, 0.4% 酵母浸出物, 1% 麦芽浸出液和 1.5% 琼脂)的 25×25cm 的测试盘中, 直径为 6 或 13mm 的圆纸片(Schleicher & Schuell 公司产品)均等放置于测试盘的含测试菌的上层培养基上, 用定量加液器加待测样品及标准品 10ml 或 20ml 于纸片上, 30℃ 隔夜培养后量度抑菌圈大小, 根据标准曲线查出相应的宜他霉素相对含量。

1.4 薄层层析(TLC)操作

5ml 发酵滤液用 15ml 乙酸乙酯萃取, 萃取液蒸发至干, 加入 0.5ml 甲醇加以溶解, 取 15μl 甲醇溶解液点样作薄层层析。展开剂为乙酸乙酯-甲醇-水(90:10:10, 溶剂系统 1)或氯仿-甲醇(10:1, 溶剂系统 2)。灰绿霉素区带可以根据在紫外光(254nm)下呈暗黑色荧光检测, 宜他霉素可以在 366nm 的紫外线下呈黄绿色荧光被检测。所有这些在薄层层析板上分离出的抗生物质, 都采用生物测定法定量测定^[9]。

1.5 发酵条件

种子培养基(GYM)含有 0.4% 葡萄糖, 0.4% 酵母浸出物和 1% 麦芽浸出物, pH7.3, 120℃ 蒸气灭菌 15min。每 500ml 三角瓶装液量为 50ml, 接种一环灰绿霉素 400E-2 孢子。菌株斜面培养基配方为麦芽糖 0.3%, 酵母浸出物 0.3%, 麦芽浸出物 1.0%, 琼脂 1.5%。种子在 27℃, 250r/min 振荡培养 20—24h。发酵培养基含有 2% 葡萄糖, 3% 蔗糖, 0—2% 麦芽糖, 0.1—0.2% 酵母浸出物, 0.2% 麦芽浸出物, 0.3% 蛋白胨, 0—0.2% 豆粕粉和 0.1 mol/L 3-(N-吗啉代)-丙烷磺酸{MOPS(3[N-morpholino]propanesulfonic acid)}, pH 调至 7.3, 每 250ml 三角瓶装液 30ml。灭菌后, 每瓶接种液 1ml 或一环孢子, 培养温度 27℃, 250r/min 5—6d。生物量采用过滤后回收的细胞干重计算。

发酵采用 2L (BioFlo, New Brunswick Scientific Co. Inc. 产品)和 20L (NLF22, Bioengineering AG 产品)的发酵罐进行。除不采用 MOPS 缓冲液外, 培养基与培养条件与上述相似。发酵过程的过风量分别为 0.8V/V/min 和 0.5V/V/min, 搅拌速度为 450r/min, 接种量分别为 50ml 和 1L。

2 结 果

2.1 新抗生素 X_a 和 X_b 的发现

在宜他霉素、灰绿霉素和发酵滤液中分别加入宜他霉素分解酶(自变铅青链霉素(S. lividans)获得, K. Q. Yang, 未发表), 37℃ 处理 2h, 然后用乙酸乙酯萃取, 三种萃取物分别以生物测定法测定残留活性(表 1)。

结果指出灰绿霉素的生物活性未受影响, 发酵过滤液中的效价近 40% 消失, 而宜他霉素样品的效价则全部丧失。同样的萃取制备物采用 TLC 以溶剂系统乙酸乙酯-四氯化碳-水

表1 灰绿霉素、宜他霉素和灰绿链霉菌的发酵液
以宜他霉素分解酶处理后的残留效价

样品	抗生素效价(μg 宜他霉素/ml)*	
	处理前	处理后
灰绿霉素	1129	1129
宜他霉素	1000	0
发酵滤液	879	538

* 采用平皿纸片扩散测定法测定。酶解反应于 HEPES 缓冲液, pH7.6 中进行。萃取物蒸发后再溶于甲醇中。

(42.8-14-42.8, 溶剂系统 3^[9]) 展开, 结果任何样品在相应的宜他霉素 R_f 值区都无黄绿色荧光斑点, 说明宜他霉素确被分解失活。然而在发酵滤液样品的展开带上的相应宜他霉素 R_f 区, 将其凝胶粉刮下, 并进行生物测定时却仍显现活性, 而其余的两个样品则无, 说明采用溶

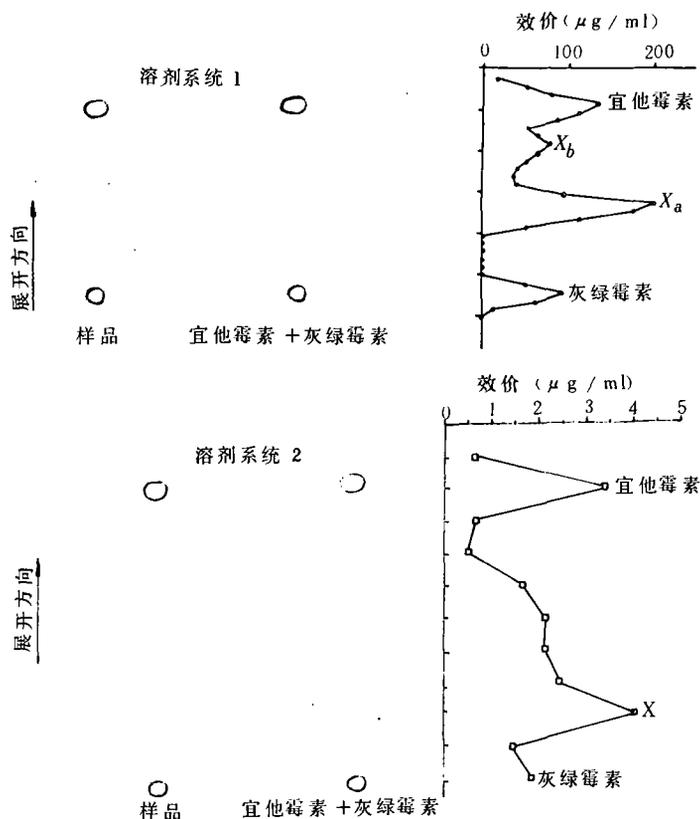


图1 灰绿链霉菌发酵滤液萃取物的薄层层析和生物测定

A. 为溶剂系统 1 B. 为溶剂系统 2

在灰绿霉素和宜他霉素之间的展开带被划分成 2mm(A)和 10mm(B)的区带, 将每一区带的凝胶粉刮下, 并测定其生物活性效价, 得出上述两组效价曲线图。

剂系统 3 展开时, 在宜他霉素 R_f 区还存在着另一种抗生物质。这个结果在采用溶剂系统 1

和溶剂系统 2 时得到了肯定。在用这两种溶剂系统展开时,新抗生素活性区介于灰绿霉素和宜他霉素 R_f 区之间,用宜他霉素分解酶处理的样品在展开后,相应于宜他霉素 R_f 值的区带则一概无生物活性。在灰绿霉素和宜他霉素的 R_f 区之间的生物活性区带还可以由于无黄绿色和暗黑色荧光而证明这确是新的抗生素区带。

从 20L 发酵罐得到的发酵滤液,用乙酸乙酯萃取后,采用两种溶剂系统展开进行薄层层析,结果如图 1 所示。采用系统 1,在灰绿霉素和宜他霉素之间有两个活性峰(暂取名 X_a 和 X_b,图 1A),相应的 R_f 值为 0.28(灰绿霉素),0.42(X_a),0.50(X_b)和 0.55(宜他霉素),4 种抗生素效价比例为 27.0%宜他霉素,12.6%灰绿霉素,40.6%X_a 和 19.6%X_b。采用溶剂系统 2,则只有一个活性峰(统称 X,图 1B)。这些抗生素效价之比例依培养基成分和培养条件而变化。

2.2 培养基成分对抗生素产量的影响

2.2.1 氮源

改变氮源的种类和数量对抗生素效价和抗生素种类的比例的影响试验,采用 2%葡萄糖和 3%蔗糖混合碳源,通过摇瓶进行。144h 发酵后,滤液进行总效价测定并用乙酸乙酯萃取。萃取物用 TLC 分离并进行生物测定以确定新抗 X 部分的比例。9 种培养基对总效价的 X 的比例结果见表 2。

表 2 氮源对灰绿链霉菌培养液中抗生素总效价及其中的新抗生素 X 部分比例的影响

氮源成分(%W/V)				抗生素效价	
酵母浸出物	麦芽浸出物	蛋白胨	豆粕粉	总效价(mg/ml)	X(%)
0.05	0.05	0.05	0.05	1.0	43
0.05	0.10	0.10	0.10	2.2	56
0.05	0.20	0.20	0.20	2.8	61
0.10	0.05	0.10	0.20	2.8	62
0.10	0.10	0.20	0.05	2.8	62
0.10	0.20	0.05	0.10	2.2	58
0.20	0.05	0.20	0.10	2.1	56
0.20	0.10	0.05	0.20	2.4	59
0.20	0.20	0.10	0.05	2.3	63

所有培养基含有 2%葡萄糖和 3%蔗糖作为碳源。培养基设计原则按参考文献[5]和[6]。

为了更清楚展示各氮源在本试验中的影响,以各氮源的用量作横坐标,以它们的效价的均值为纵坐标作出氮源种类与量对总效价影响的图(图 2)

综观表 2 与图 2,培养基中采用的氮源种类与数量对产生的抗生素总效价和种类是有影响的。但除第一种培养基外,其余的培养基对总效价的影响(2.1—2.8mg/ml)和 X 部分比例的影响(56%—62%)还不是很大。深入分析培养基中各氮源成分的影响,根据极差计算(文中未列)可知蛋白胨和豆粕粉的影响较为明显。考虑到发酵时泡沫的产生及发酵液的过滤过程不致太难,培养基的实际配料后来采取 0.1%酵母浸出物,0.2%麦芽浸出物,0.2%蛋白胨和 0.1%或更少豆粕粉。

2.2.2 碳源 不同葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖的浓度和组合对抗生素的总效价和 X 部分

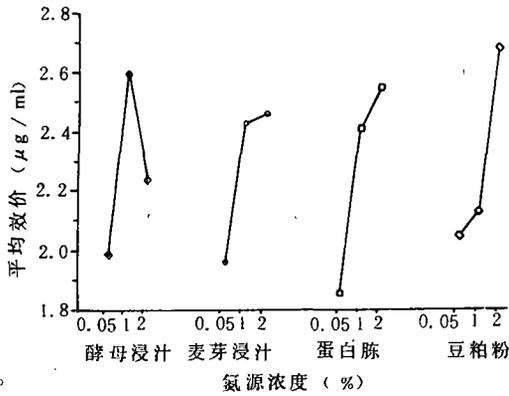


图2 各种氮源用量的均值对总效价的影响

比例的影响进行了类似氮源的试验。结果(表3,图3)显示,碳源的影响远大于氮源的影响。总效价可在 177—491μg/ml 之间变动,而对新抗 X 部分的影响的变化范围竟达到 25%—53%。从 4 种碳源的极差得知,对效价影响最大的是葡萄糖,其次相应为蔗糖、麦芽糖和乳糖。

根据各种碳源不同浓度的均值对总效价的影响,在后来试验的培养基采用的碳源浓度,葡萄糖 2%,蔗糖 4%。

表3 混合碳源对抗生素效价和 X 比例的影响

碳源成分(%W/V)				抗生素效价	
葡萄糖	蔗糖	乳糖	麦芽糖	总效价 (mg/ml)	X(%)
0	0	0	0	165	<10
0	2	2	2	177	39
0	4	4	4	165	<5
2	0	2	4	346	13
2	2	4	0	363	14
2	4	0	2	491	53
4	0	4	2	314	27
4	2	0	4	415	25
4	4	2	0	375	11

培养基均含有 0.1%酵母浸出物,0.2%麦芽浸出物和 0.3%蛋白胨作氮源。

2.3 起始 pH 对生物量、总效价和 X 部分的影响

试验结果如图 4。

从细胞形成量看,pH 稍高于 7 是合适的,低于 7,尤为低于 6 则细胞生成量很差,这就极大地降低了抗生素的形成量。就抗生素的合成,则以 pH7 最佳,但对 X₀ 和 X₁ 的形成其最适 pH 尚有差异,这可能是培养条件的变化促使 X 部分比例的变化的原因之一。有一点是共同的,即 pH 大于 8,则这 4 种抗生素的生成量都下降。虽然当起始 pH 大于 8,但由于

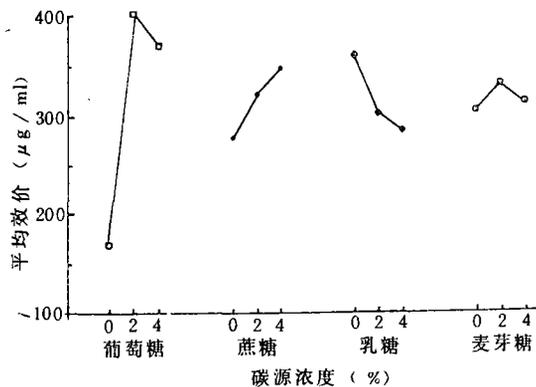


图3 碳源对灰绿链霉菌产生抗生素总效价的影响

细胞本身对环境 pH 有部分调节作用,实际最终 pH 还没有高于 pH8 的。但在 pH6.0,5.0 的起始情况下,最终 pH 仍低于 5.0,这是由于第一阶段糖的分解氧化致使 pH 下降,而菌体量不大,无法使 pH 回升,形成总效价很低的缘故。因此在发酵过程中,控制 pH 在 6.5—7.5 之间。

2.4 通风量对生物量、总效价和 X 部分生成的影响

通风量的影响采用相同体积三角瓶不等装液量来进行,结果见表 4。在所试验的范围内,通风量的影响似不明显。10ml 装液量的细胞干重和抗生素总活力较高与少量水分蒸发有关,但由于培养温度(27℃)较低,水分总蒸发量不大。实际上,从培养时间也可看出,从 96h 开始继续发酵,抗生素总效价增加并不大,X 部分的比例亦无明显变化。

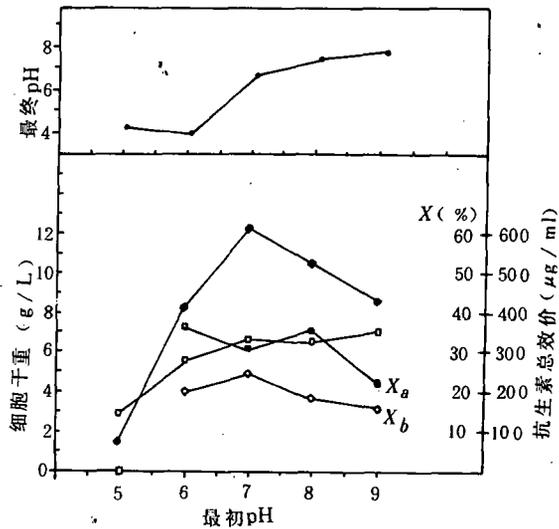


图 4 培养基起始 pH 对生物量和抗生素产生的影响
●—最终 pH ■—总效价 □—细胞干重

表 4 通风量和培养时间对抗生素生成和 X 部分的影响

培养时间 (h)	装液量 (ml/250ml)	细胞干重 (g/100ml)	总效价 (μg/ml)	X (%)
96	10	0.761	454	37
	20	0.662	410	30
	20	0.570	410	30
	40	0.516	454	34
	50	0.436	431	31
120	10	0.767	500	33
	20	0.687	410	37
	30	0.466	431	32
	40	0.435	431	34
	50	0.551	432	33
144	10	0.763	454	43
	20	0.626	410	38
	30	0.511	388	39
	40	0.474	368	38
	50	0.506	388	35

3 讨 论

链霉菌的一个种能产生多种抗生现象是较普遍的,但对于象灰绿链霉菌这种经过长期而广泛研究的链霉菌,在1954年发现它能产两种主要的抗生素宜他霉素和灰绿霉素以来的30作余年中只陆续发现它产一类同系物或类似的次要抗生素^[3,4,7]。这些抗生素生成量小,而且其特征都是在紫外线下具有一定的荧光。因此我们发现这两种新的,生成量大的,但无荧光反应的抗生素是值得重视的,因为这是一种非常规的发现新抗生素的途径。从这个意义上讲,要发现新抗生素,不仅可以从自然界发掘新菌种,通过变异获得产新抗的变异株,而且还可以通过本文的新途径发现,采用发酵条件的配合富集这种新抗的方法上进行探索。

在抗生素发酵条件的研究上,较多的还是从氮源的种类和量的选择或其他培养因子的影响上着眼,而我们的研究则从混合碳源的选择和配比上着手,结果得出了不仅对抗生素的总效价有明显影响而且对新抗生素的比例有重大作用。这是一个既有兴趣而易于忽略的例子。以前曾报道^[3]生成宜他霉素乳糖是最好的碳源,而本研究的结果与此相反,这与本实验中采用丰富培养基可能有关。

参 考 文 献

- 1 Ehrlich J. Coffry G L. Fisher W W. Galbraith M M. Knudson M P. Sarber R W. Schlingman A S. Smith R M. Weston J K. 1955 Griseoviridin and viridogrisein: biologic studies. *Antibiot Ann.* 1954/1955: 790—808
- 2 Okumura Y. Peptidolactones. In: *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics.* (Vining, L. C., ed.) Addison—Wesley Publishing Company. 1983: 147-178
- 3 Chopra C. Hook D J. Vining L C. Congeners of etamycin produced by *Streptomces griseoviridus*. *J Antibiotics.* 1979; 28: 392-401
- 4 Okumura Y. Okumura K. Takei T. Kouno K. Lein J. Ishikura T. Fukagawa Y. Controlled biosynthesis of neoviridogriseins. new homologues of viridogrisein I. Taxonomy and fermentation. *J Antibiotics.* 1979; 28: 575-583
- 5 Mead R. *The Design of Experiments.* Cambridge University Press. 1988: 130-181
- 6 Group of "Manual of Mathematics". *Manual of Mathematics (Chinese).* Hing Education Press. Beijing: 1979
- 7 Cocito C. Antibiotics of the virginiamycin family. inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol Reviews.* 1979; 145-198.
- 8 Hewill W. *Microbiology Assay.* Academic Press. Inc. 1977
- 9 Zollner N. Wolfram G. *Thin—Layer Chromatography.* (Egon Stahl, ed.). Springer—Verlay. Nwe York: 1969

Multiple Antibiotic Production by *Streptomyces Griseoviridis* —Discovery and Production

Zhuge Jian^o

K. Q. Yang L. C. Vining

(Wuxi Ins. of Light Ind.)

(Dalhousie University, Canada)

Abstract *Streptomyces griseoviridis* has been known to produce two broad spectrum antibiotics: griseoviridin and viridogrisein (etamycin). Two additional substances (X_a and X_b) are produced under certain culture conditions.

key words *Streptomyces*; Antibiotic; TLC; Bioassay