

产去甲基金霉素突变株的选育

I. 金霉素链霉菌 38-2-14 突变株的获得

程 惠 芳

(华北制药厂, 石家庄)

李 焕 姿

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

作为合成二甲胺基四环素的原料——去甲基金霉素(去甲基四环素), 可以通过发酵途径制备。出发菌株 *Str. aureofaciens* 38-2 在产生去甲基金霉素的同时, 还产生大量的金霉素。以 *Str. aureofaciens* 38-2 作为出发菌株, 采用紫外线、乙烯亚胺及二者复合等诱变处理, 根据菌株在固体培养基中菌丝体呈赤褐色, 并有可溶性色素分泌的特征, 挑选出 54 株变株, 在紫外线的处理中, 得到了一株颜色突变株, 编号为 38-2-14。经过纸谱层析、生物显影及紫外线吸收光谱等测定, 证明系一株仅产生去甲基金霉素和去甲基四环素, 而不产生金霉素的菌株, 在用培养基 (2) 时, 摇瓶培养 96 小时的生物效价测定, 发酵单位为 1075 微克/毫升。

二甲胺基四环素(7-二甲胺基-6-去氧-6-去甲基四环素)是一种新的半合成四环素, 抗菌作用强, 口服吸收快, 排泄慢, 具有疗效高, 毒副反应小等优点, 为一长效、高效的半合成抗菌素, 是以去甲基金霉素为母体, 再经化学合成制备的。去甲基金霉素的制备方法据资料报道^[1,2], 一是在金霉素发酵过程中, 加入甲基化抑制剂, 或其它干扰代谢过程中酶系统的试剂等方法, 能使金霉素链霉菌在产生金霉素同时可产生去甲基金霉素。但这种方法所得之产品系混合物, 需将金霉素进一步水解去除, 工艺较为复杂, 收率也很低。另一种方法是利用遗传学的手段来改造微生物, 使其代谢途径和代谢产物的结构发生改变, 产生原来不产的去甲基金霉素和去甲基四环素。遵照伟大领袖毛主席关于“中国人民有志气, 有能力, 一定要在不远的将来, 赶上和超过世界先进水平”的教导, 我们采用

诱变育种的方法, 获得了一株仅产去甲基金霉素和去甲基四环素的突变株 38-2-14。

材料与方法

一、出发菌株

金霉素链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 38-2 颜色变株 (简称 38-2)^[1]。该突变株的发酵液, 经纸层析鉴别, 表明可产生去甲基金霉素和去甲基四环素 300 微克/毫升, 金霉素为 500—700 微克/毫升, 总效价为 800—1000 微克/毫升。

二、培养基

(一) 斜面培养基 麸皮 5%, 琼脂 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.005%, 蒸馏水和常水各半配制, pH 值不调节。

(二) 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 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%,

本文 1973 年 7 月 8 日收到。

CaCO_3 0.4%, 常水配制, pH 值未调节。500 毫升三角烧瓶装量为 100 毫升。

(三) 发酵培养基

1. 淀粉 4.5%, 棉子饼粉 4.5%, CaCO_3 1%, 酵母粉 0.15%, NaCl 0.15%, 玉米油 3%, 常水配制, pH 值未调节。500 毫升三角烧瓶装量 50 毫升。

2. 除黄豆饼粉代替棉子饼粉外, 其余组成同上。

(四) 固体培养基 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(湿重) 0.4%, 琼脂 2%, 常水配制, pH 值为 6.3, 用 5N NaOH 调节。

上述培养基均经 121℃ 灭菌 30 分钟。

三、培养条件

斜面孢子培养及分离用固体培养温度均为 37℃。斜面培养 5 天, 分离固体培养 7 天。种子培养及发酵温度均为 28℃, 旋转式摇床转速为 200—220 转/分。种子生长 48 小时后, 以 5% 接种量接入发酵摇瓶, 培养 120 小时取样, 测定生物效价。

四、诱变因子和处理方法

(一) 孢子悬液的制备 挑取一接种环原始沙土菌种, 均匀涂布在麸皮斜面上, 于 37℃ 培养 5 天。加入灭菌蒸馏水 10 毫升, 将孢子刮下, 并移入盛有玻璃珠的灭菌瓶中, 摇动 10 分钟, 然后用普通滤纸过滤, 使成单孢子悬液, 再加 10 毫升灭菌蒸馏水, 稀释备用。

(二) 处理因子

1. 紫外线 取 5 毫升孢子悬液, 于直径 9 厘米无菌培养皿内, 置紫外灯下(功率 30 瓦, 波长 2537 Å), 距离为 42 厘米, 照射 2 分钟。照射时轻轻振荡培养皿, 以防止照射不均。照射后, 取出孢子悬液, 稀释至每个平皿约生长 10—20 个菌落, 涂布接种, 置 37℃ 培养 7 天, 观察形态变异, 并统计孢子死亡率。

2. 乙烯亚胺 取 5 毫升 0.2% 乙烯亚胺水溶液, 加入 5 毫升孢子悬液, 于室温放置处理 30 分钟, 用蒸馏水稀释至一定浓度, 涂布平皿, 控制每平皿菌落为 10—20 个。

3. 乙烯亚胺及紫外线复合处理 取经乙烯亚胺处理后的孢子悬液 5 毫升, 再用紫外线照射

30 秒, 然后稀释, 涂布平皿。

五、突变菌落的挑选

据报道^[6]产生去甲基金霉素的菌株分泌赤褐色色素。因此, 将经处理后的 38-2 菌株悬液, 于 37℃ 培养 7 天, 待菌落成熟后, 挑选到固体培养基上。如有基内菌丝呈赤褐色, 并有可溶性色素分泌, 使菌落周围形成赤褐色者, 作为在诱变处理后挑选产生去甲基金霉素菌株的依据。

六、鉴别方法

(一) 纸谱层析 取发酵液经草酸酸化至 pH 1—2, 离心分离, 取上清液作纸上层析。滤纸先用 pH 4.5 磷酸缓冲液处理, 含水分 60—70%, 点样后, 立即放入层析缸内进行层析。流动相为氯仿-吡啶(100:1)。展开后, 将滤纸取出吹干, 直至无吡啶味为止。滤纸再经氨气处理, 在紫外灯下(上海沪江仪器厂出品)检查, 如在金霉素的位置上不显示出荧光, 表示测定的变株不产生金霉素。如在去甲基金霉素和去甲基四环素标准品 R_f 值相应位置上有荧光斑点, 则表示产生去甲基金霉素和去甲基四环素。

(二) 生物显影 将纸谱层析的荧光点剪下, 取 2 毫米左右小条, 铺在加有蜡状芽孢杆菌的培养基平皿上, 37℃ 培养 18—20 小时, 观察在标准金霉素 R_f 值的同一位置上层析点是否有抑菌圈, 如无抑菌圈出现, 表示测定的变株不产生金霉素。

(三) 紫外线吸收光谱 用纸谱层析法分离发酵液的组分, 然后将去甲基金霉素和去甲基四环素的斑点剪下, 用 2 毫升 pH 4.5 缓冲液洗脱, 测定其紫外线吸收光谱。

试验结果

一、颜色变株及死亡率

经过紫外线、乙烯亚胺及乙烯亚胺和紫外线复合等诱变处理, 产生去甲基金霉素的颜色突变株及死亡率见表 1。

结果表明, 在处理因子中, 紫外线处理诱发颜色变株出现的频率比乙烯亚胺及乙烯亚胺复合紫外线为高。

二、生物效价测定

从初筛挑选出的 51 株颜色突变株中,

表 1 38-2 菌株的颜色变异和死亡率

处理因子	剂 量	总菌落数	颜色变株数	变株率(%)	死亡率(%)
紫 外 线	2 分钟	253	18	7.1	97.1
乙 烯 亚 胺	0.1% 30 分钟	660	10	1.5	90.9
乙烯亚胺+紫外线	0.1% 30 分钟+30秒	417	23	5.5	99.7

再挑选高产量的突变株进行纸谱层析, 在经紫外线诱变处理的 18 株变株中, 发现一株突变株只产生去甲基金霉素和去甲基

四环素, 不产生金霉素, 编号为 38-2-14。经过摇瓶复试, 以及在两种不同发酵培养基中进行的三次重复试验, 结果见表 2。

表 2 38-2-14 变株与出发菌株 38-2 产生金霉素 (CTC)、去甲基金霉素 (DMCTC) 与去甲基四环素 (DMTC) 能力的比较

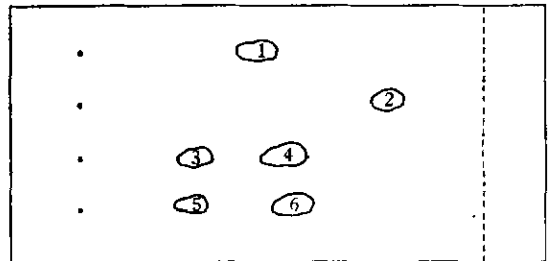
试验次数	培 养 基 (1)				培 养 基 (2)			
	(对照)38-2		38-2-14		(对照)38-2		38-2-14	
	CTC 微克/毫升	DMTC + DMCTC 微克/毫升	CTC 微克/毫升	DMTC + DMCTC 微克/毫升	CTC 微克/毫升	DMTC + DMCTC 微克/毫升	CTC 微克/毫升	DMTC + DMCTC 微克/毫升
1	835	303	0	718	684	516	0	1002
2	940	343	0	712	677	555	0	1213
3	920	386	0	620	920	540	0	1011
平 均	898	344	0	683	760	537	0	1075

上述结果表明, 38-2-14 不产生金霉素, 只产去甲基金霉素及去甲基四环素。摇瓶效价单位, 用培养基(1)培养时由出发菌株 38-2 的 344 微克/毫升提高至 683 微克/毫升; 用培养基(2)培养时, 由 522 微克/毫升提高至 1075 微克/毫升, 都比出发菌株 38-2 有较多的增长。

三、38-2-14 突变株发酵液中的产物测定

(一)纸谱层析 38-2-14 经摇瓶培养 96 小时, 发酵液的纸谱层析结果如图表明, 在金霉素的相应位置上不显示荧光, 即表示 38-2-14 不产生金霉素。在去甲基金霉素和去甲基四环素 R_f 的相应位置上, 显示荧光斑点, 说明 38-2-14 产生去甲基金霉素和去甲基四环素。

(二)生物显影 为了进一步证明



- 1. 盐酸四环素 $R_f = 0.441$
- 2. 盐酸金霉素 $R_f = 0.780$
- 3. 盐酸去甲基四环素 $R_f = 0.279$
- 4. 盐酸去甲基金霉素 $R_f = 0.515$
- 5, 6. 38-2-14 发酵液样品

$R_{f(5)} = 0.282, R_{f(6)} = 0.530$

标准样品和 38-2-14 发酵液的纸谱层析图

38-2-14 确实不产生金霉素, 又做了生物显影试验。结果证明, 在发酵液的纸谱层析时, 金霉素的 R_f 值相应位置上无抑菌圈出现, 证明该突变株不产生金霉素。

(三)紫外线吸收光谱 纸谱层析分

表 3 紫外吸收光谱

波长(毫微米) (nm)	标准品去甲基四环素	38-2-14
264	0.280	0.247
265	0.282	0.248
266	0.280	0.247
253	0.181	0.161
355	0.187	0.162
358	0.178	0.168
260	0.600	0.211
265	0.601	0.212
267	0.591	0.206
360	0.358	0.099
365	0.363	0.100
367	0.360	0.098

离的斑点洗脱后,进行紫外线吸收光谱测定,结果见表 3。

通过以上鉴别,表明 38-2-14 颜色突变株确实不产生金霉素,而只产生去甲基金霉素和去甲基四环素,系一株符合制备二甲氨基四环素所需要的菌株。

参 考 资 料

- [1] US Pat. 3,019,172 Jan. 30, 1962.
- [2] US Pat. 3,028,311 Apr. 3, 1962.
- [3] US Pat. 3,012,946 Dec. 12, 1961.
- [4] Brit. Pat. 1,140,872 Jan. 22, 1969.
- [5] Brit. Pat. 1,166,681 Oct. 8, 1969.
- [6] US Pat. 2,878,289 Mar. 17, 1959.

SELECTION FOR PRODUCER OF DEMETHYLCHLOROTETRACYCLINE

I. SELECTION OF DEMETHYLCHLOROTETRACYCLINE-PRODUCING STRAIN *STREPTOMYCES AUREOFACIENS*

CHENG HUI-FANG

(The North China Pharmaceutical Industry, Shihchiachuang)

LI HUAN-LOU

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

Minocycline (7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline) is one of the highly effective semisynthetic tetracyclines whose molecular nucleus (6-demethylchloro-tetracycline (DMCTC) and 6-demethyltetracycline (DMTC)) is produced by fermentation. *Streptomyces aureofaciens* 38-2 was inadequate for this purpose, for its concomitant formation of 7-chlorotetracycline (CTC) in the fermentation medium involves the difficulty of separation of DMTC and DMCTC and a loss in total

antibiotic potency.

By subjecting the spores of *S. aureofaciens* 38-2-14 to ethylene imine and irradiation with ultraviolet light, from among 54 isolates, a strain designated *S. aureofaciens* 38-2-14 is selected which imparts reddish brown pigment to the media. Paper chromatogram viewed under ultraviolet light showed that the novel mutant strain *S. aureofaciens* 38-2-14 produces virtually no CTC. The total yield of DMCTC and DMTC is 1075 $\mu\text{g/ml}$.