

# 灰黄霉素产生菌——展青霉白色突变株 B-53 的选育及其在生产中的应用

吴松刚 许艳萍 吴芷萍 戚晓玉  
郝家骥 虞萍\* 张源惠\* 鲍运森

(山西省生物研究所,太原)

灰黄霉素作为一种治疗皮肤浅层丝状真菌感染的抗真菌抗菌素,普遍应用于临床,疗效显著<sup>[1,2]</sup>。由于灰黄霉素产生菌需以乳糖、玉米浆为主要碳、氮源<sup>[3]</sup>,灰黄霉素发酵周期较长,是一个急待研究改进的问题。我们在从土壤中分离出野生型菌株的基础上,针对上述问题,参考 Alikhanian 的方法<sup>[4]</sup>,设计了以诱变育种为主要手段的定向选育试验,经连续多代选育,获得了较为理想的白色突变株,即投产菌株 B-53,并已在生产中使用。

## 材 料 和 方 法

### 一、测定菌和测定方法

拮抗性测定用琼脂块法,用须发癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) 和石膏状小孢菌 (*Microsporum gypsum*) 为测定菌,抑菌圈在 10 毫米以上者为有拮抗性菌株。

用纸片法测定发酵液上清液进行初筛。测定菌为脑状发癣菌 (*T. cerebriiform*)、石膏状小孢霉、絮状表皮癣菌 (*Epidermophyton floccosum*)、白假丝酵母 (*Candida albicans*)、长蠕孢菌 (*Helminthosporium* sp.) 和尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)。

用杯碟法测定发酵液上清液进行复筛。测定菌为舍恩莱发癣菌 (*T. schoenleinii*)、堇色发癣菌 (*T. violaceum*)、同心发癣菌 (*T. concentricum*)、红色发癣菌 (*T. rubrum*)、絮状表皮癣菌、羊毛状小孢霉 (*Microsporum lanosum*) 和石膏状小孢霉。

### 二、紫外光谱测定

根据灰黄霉素在波长 289—293 毫微米处有特殊吸收峰这一特点<sup>[6]</sup>,选择 240—320 毫微米波长进行紫外光谱测定。

### 三、培养及发酵条件

平板及斜面培养温度均为 28℃,培养时间为 7 天。摇瓶培养温度为 28—29℃,旋转式摇床振荡培养,转速为 220—230 转/分,种子种龄为 40—45 小时,接种量 10%,发酵周期 207 小时。

发酵罐培养温度为 28—29℃,通气量 1:1 (体积/体积),接种量 10%。

### 四、诱变剂的选择及剂量

为确定诱变剂,对几种主要诱变剂和因子进行单一及复合处理,所用种类及组合列于表 1。

经初试表明,以紫外线加氯化锂的诱变效果较好,在以后试验中连续使用,方法如下:

用 30 瓦紫外线灯,样品与灯相距 28 厘米,照射时间 3 分钟。氯化锂按 1% 于灭菌前加入培养基中。

本工作在上海医药工业研究院宋友礼指导下进行。先后参加本工作的还有江苏南通生物化学制药厂和山西太原味精厂。

\* 上海中华制药厂。

表 1 诱变因子的种类及其组合\*

单因子	UV, LiCl, NH <sub>2</sub> OH-HCl, NTG, DES, HNO <sub>2</sub> , FN
双因子	UV + LiCl, UV + NTG, NTG + LiCl, NTG + NH <sub>2</sub> OH-HCl, LiCl + NH <sub>2</sub> OH-HCl, UV + NH <sub>2</sub> OH-HCl, UV + DES, LiCl + DES, LiCl + HNO <sub>2</sub> , UV + HNO <sub>2</sub> , DES + HNO <sub>2</sub>
三因子	UV + NTG + LiCl, UV + NH <sub>2</sub> OH-HCl + LiCl, UV + NTG + NH <sub>2</sub> OH-HCl, UV + LiCl + DES, UV + LiCl + HNO <sub>2</sub> , LiCl + DES + HNO <sub>2</sub> , UV + DES + HNO <sub>2</sub>
四因子	UV + NH <sub>2</sub> OH-HCl + NTG + LiCl, UV + DES + HNO <sub>2</sub> + LiCl

\* 表中所用符号代表的诱变因子是: UV——紫外线, LiCl——氯化锂, NH<sub>2</sub>OH-HCl——盐酸羟胺, NTG——亚硝基胍, DES——硫酸二乙酯, HNO<sub>2</sub>——亚硝酸, FN——快中子。

## 结 果

### 一、不同土壤中分离的真菌菌株

从各地采集的 3181 份土样中,分离出以青霉为主,生长速度快的真菌菌株共 1232 株,其中主要来自森林土和菜园土,平均每十份土样分离四株,结果列入表 2。

表 2 不同土壤中分离的菌株数

土壤类别	分离菌株数	每十份土壤平均分离数
森林土	516	3
菜园土	469	4
果园土	46	6
公园土	85	7
农田土	25	4
植物园土	61	4
其他	30	6
总计	1232	4

### 二、不同土壤中拮抗性菌株分布

通过对分离出的 1232 株菌株的拮抗性测

表 3 不同土壤中拮抗性菌株分布

土壤类别	拮抗性菌株	
	数量(株)	占分离数(%)
森林土	72	14.0
菜园土	46	9.8
果园土	5	10.9
公园土	14	16.5
农田土	7	28.0
植物园土	9	14.7
其他	8	26.7
总计	161	13.1

定,表明对须发癣菌和石膏状小孢霉有抑制作用的共 161 株,占分离总株数的 13%。不同土壤的拮抗性菌株分布情况见表 3。

### 三、野生型灰黄霉素产生菌展青霉 4541 的获得

对 161 株拮抗性菌株进行初筛和复筛结果表明: 其中有一株真菌菌株其代谢产物的抗菌谱,纸层析图谱,紫外光谱和红外光谱均与灰黄霉素一致,菌种经分类鉴定为展青霉 (*Penicillium patulum*)\*。该土样系采自福建省厦门市前线公社莲坂大队油菜地,菌种编号为 4541。

### 四、白色突变株 B-53 的获得

以展青霉 4541 作为出发菌株,选择 UV + LiCl 作为诱变剂,设计了不用乳糖和玉米浆为碳,氮源的培养基配方,连续进行人工诱变,诱变谱系见图 1。诱变结果表明: 在第六代获得了产生白色孢子的突变株,该突变株不但适应不用乳糖和玉米浆的发酵条件,而且产量较原始菌株提高 6 倍多,进一步诱变,菌株产生白色孢子的特点相当稳定,而且产量明显增加,在第十一代,较原始菌株提高 36 倍,到第十三代提高近 60 倍,超过了现用灰黄霉素生产菌的摇瓶发酵水平。其白色突变株 B-53 的代谢产物经紫外光谱、红外光谱和核磁共振谱测定,证明与灰黄霉素为同一物质。代谢产物的理化性质,安全试验和含量符合药典规定。

\* 承中国科学院微生物研究所齐祖训先生鉴定。

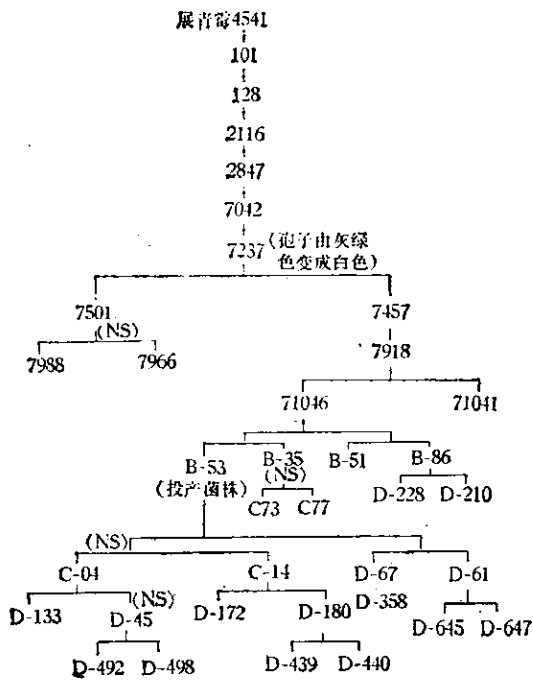


图1 展青霉4541的诱变谱系  
(除NS表示自然分离外,其余均用紫外线+氯化锂处理)

## 五、B-53 菌株在生产中的应用

经有关制药厂用变异菌株 B-53 进行中试后,用生产罐进行试生产。不用乳糖,玉米浆等作为碳、氮源,连续生产七罐,结果证明该变异菌株达到原定选育目标。经各有关工厂应用证明:该菌株遗传性状比较稳定,发酵单位较高,周期较短。以南通生化制药厂为例,1978 年全面推广使用 B-53 后,经多批生产,发酵单位为 1977 年平均水平的 217%,粮耗为 1977 年的 31%。

## 讨 论

1. 宋友礼等研究证明灰黄霉素产生菌的色素越深者,其产量越高<sup>[3]</sup>。而展青霉 4541 却是随着诱变次数的增加和产量的提高,色素反而

逐步变浅。这种色素与产量的关系,与宋友礼等的研究结果有所不同。

2. 用原粮直接发酵,有利于工业生产。白色变异菌株水解大米粉能力很强,在移种后 1—2 小时内 15% 之大米粉即可液化。有利于生产应用。

3. 紫外线加氯化锂复合处理,对展青霉 4541 菌株是一组高效率的诱变剂,有显著的诱变效果。Barnes 研究指出,灰黄霉素的结构中有  $\text{Cl}^-$ <sup>[7]</sup>,它被认为是灰黄霉素生物合成的前体物质。试验结果表明:发酵培养基中的氯离子,如 KCl 的浓度比原来提高了七倍,这与变异菌株经 LiCl 处理能够耐高浓度  $\text{Cl}^-$  而提高产量是一致的。

4. 展青霉 4541 菌株的营养要求均与过去国内外文献报道的利用中性发酵条件(pH6.6—7.2)的菌株不同<sup>[8]</sup>。其营养要求的特点在于高糖、低氮,且是在酸性发酵条件下(pH4.8—5.2)合成和积累灰黄霉素的。因此,进一步查明该菌的酶学过程,探讨其代谢途径和次级代谢产物合成机制,在生产上和理论上是有意义的。

## 参 考 文 献

- [1] Robinson, M. J. et al.: *Antibiot. Ann.*, 60:680, 1959.
- [2] Grove, J. F.: *Quarterly Reviews*, 17(1): 1, 1963.
- [3] 宋友礼等: 灰黄霉素遗传育种总结,《微生物育种学术讨论会文集(研究报告)》(微生物育种学术讨论会编), 科学出版社, 北京, 1975, 第 28—41 页。
- [4] Alikhanian, S. I.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 4:1, 1962.
- [5] Stauffer, J. F., L. J. Schwartz and L. Bradyc: *Develop. Indust. Microbiol.*, 7:104, 1966.
- [6] Paget, G. E. and A. L. Walpole: *Nature*, 182: 1320, 1958.
- [7] Barnes, M. J. et al.: *Biochem.*, 41:78, 1961.
- [8] Hockenhull, D. J.: *Brit. Patent*, 868 958, 1959.