

# 有机氮源对争光霉素发酵组份改变的影响\*

虞 悝 许永寿 李妙儿

(上海第三制药厂, 上海)

1969年中国医学科学院抗菌素研究所从链霉菌72号的发酵液中获得了争光霉素。后来将该菌鉴定为轮枝链霉菌平阳变种<sup>[1]</sup>,以后并分离得到了13个组份。近年来证明其主要组份A<sub>5</sub>的化学结构与博来霉素(bleomycin)A<sub>5</sub>相同,1978年命名为平阳霉素;其他组份中存在着与博来霉素A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>、A<sub>6</sub>一致或与博来霉素A<sub>2</sub>、B<sub>4</sub>相当的物质。以后又称之为争光霉素。

在争光霉素生产中,如何控制发酵组份是个重要问题。随着实际需要不同,对争光霉素组份的需要也不同,探讨各个组份的临床疗效时,要有不同规格的样品,用化学方法制备新争光霉素时,需从A<sub>2</sub>开始,虽然梅沢等<sup>[2]</sup>,高桥等<sup>[3]</sup>添加天然博来霉素末端胺前体,提高了相应博来霉素的含量,但在工业生产上的应用受到限制。在发酵条件研究的工作中,他们以玉米浆0.75%及黄豆饼粉3.5%作为有机氮源<sup>[3,4]</sup>,但各种有机氮源对博来霉素组份产生的影响却未见报道。通过我们的研究发现:发酵过程中补加玉米浆或改变基础培养基中有机氮源的种类及其使用方式,能使发酵液中的争光霉素组份A<sub>5</sub>、A<sub>2</sub>或A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>的百分比之间发生显著改变。

## 材 料 和 方 法

1. 使用菌株:轮枝链霉菌平阳变种原始菌株及其高产变异株70-5-8及54号,由争光霉素协作组提供,使用玉米浆斜面琼脂,28℃培养8天,保存于5—10℃冰箱中。

2. 摇瓶试验的种子培养基组成为(%):玉米浆3;黄豆饼粉2;酵母粉0.2;葡萄糖1;糊

精1;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1;ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05;CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.01;pH6.5。发酵培养基依试验条件而异,发酵试验使用容量为750毫升的三角瓶,装液量为150毫升,种子生长及发酵试验皆采用旋转式摇瓶机,转速为250转/分,于28℃培养。

3. 发酵罐试验条件:种子罐为120升不锈钢罐,搅拌转速为320转/分,其种子培养基与摇瓶试验不同的是:以棉籽饼粉代替黄豆饼粉,加豆油0.3%。以二瓶250毫升茄子瓶斜面上的孢子悬液,接种于灭菌后的培养基中,通气量2(体积/体积/分),28℃培养2天。

4. 发酵罐:容积为1.6立方米的不锈钢罐,搅拌转速240转/分,培养基装液量800升;0.8立方米不锈钢罐,搅拌转速320转/分,装液量500升,通气量1(体积/体积/分)。

5. 发酵液中争光霉素组份的定性薄层层析:滤液中的争光霉素经强酸阳离子交换树脂1×8(钠型)吸附,经洗脱,精制后,供点样和薄层层析用。薄层层析用硅胶G,溶剂系统为:甲醇:10%醋酸铵:10%NH<sub>4</sub>OH=10:9:1(体积/体积)<sup>[5]</sup>,层析后的干板,以枯草杆菌6633作生物显影,并用茚三酮反应及坂口反应作组份鉴别。争光霉素各组份的R<sub>f</sub>值分别为:0.054(A<sub>6</sub>)、0.25(A<sub>5</sub>)、0.42(A<sub>2</sub>)、0.51—0.57(B<sub>4</sub>及未鉴别组份)、0.64(B<sub>2</sub>)。

6. CM-Sephadex C-25柱梯度层析分离:根据本室提炼组的研究结果,滤液(pH 6.0—6.5)以强酸阳离子交换树脂1×8(钠型)吸附,20%NaCl水溶液:乙醇=1:1(体积/体积)洗

\* 本工作1977年初完成。

脱,洗脱液减压浓缩,中性氧化铝柱层析,用80% 甲醇展开,收集蓝绿色部份,减压浓缩去甲醇,用大孔吸附剂 GDX-1 × 4 树脂脱盐,浓缩得精制品,取 50 克,溶于 0.05 M 甲酸铵溶液中后,用 5 升体积 CM-Sephadex C-25 柱,作梯度层析分离,洗脱液 0.05 M 及 0.1 M 甲酸铵溶液,体积各为 25 升,分部收集于 250 毫升接收管中,各组份之洗脱液经硅胶 G 薄层层析鉴别,用 292 毫微米波长测定吸收值,并与上柱前之总吸收值相比,确定该组份之含量。

7. 抗菌素效价的测定: 采用杯碟法。测定菌为枯草杆菌 6633。

## 试验结果

在发酵过程中补加玉米浆,使争光霉素组份 A<sub>5</sub> 含量增加,组份 A<sub>2</sub> 含量降低。

1. 摇瓶试验: 争光霉素协作组在过去的工作中曾发现,补加玉米浆能提高发酵单位及 A 类组份含量。我们以 70-5-8 菌株作试验,在接种后第二天至第六天,每天补加玉米浆 1.5%,累积总量 7.5%,28℃ 发酵 8 天,使抗菌素效价可提高 141—256%,组份薄层层析定性结果表明,补加玉米浆显著地提高了 A<sub>5</sub> 组份的含量,而组份 A<sub>2</sub> 含量显著降低,详见表 1,图 1。

表 1 补加玉米浆对产抗菌素效价的影响\*

组别	基础配方中的有机氮源(%)	发酵过程中实验条件**	发酵 8 天的实验结果		
			pH	抗菌素效价(微克/毫升)	补加玉米浆使抗菌素效价提高的结果(%)
1	玉米浆 0.75	+	7.3	360	141
	黄豆饼粉 3.5	-	7.33	255	100
2	玉米浆 7	+	7.84	676	215
		-	7.3	315	100
3	黄豆饼粉 3.5	+	7.38	700	264
		-	6.51	263	100

\* 基础培养基(%): 葡萄糖 0.5, 淀粉 5, (α-淀粉酶液化), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, NaCl 0.3, NaNO<sub>3</sub> 0.2, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.01, pH6.5。

\*\* “+”为补加玉米浆,“-”为不补加。

## 2. 不同菌株的比较试验: 比较轮枝链霉菌

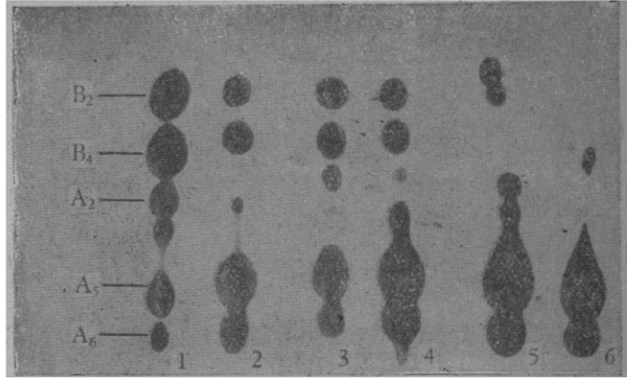


图 1 培养基有机氮源与玉米浆对争光霉素组份的影响\*

\* 图中, 1 号发酵过程不加玉米浆, 2 号发酵过程加 7.5% 玉米浆; 基础培养基有机氮源玉米浆 0.75%, 黄豆饼粉 3.5%; 3 号发酵过程不加玉米浆, 4 号发酵过程加 7.5% 玉米浆; 基础培养基为 3.5% 黄豆饼粉; 5 号发酵过程不加玉米浆, 6 号发酵过程加 7.5% 的玉米浆, 基础培养基氮源为 7% 玉米浆。所用菌株均为 70-5-8。

的平阳变种的原始菌株、70-5-8、54 号, 在同表 1 补加玉米浆的条件下, 所得抗菌素效价及组分的差别。结果见表 2 和图 2。

表 2 补加玉米浆对不同菌株产抗菌素效价的影响\*

菌株	发酵过程中的实验条件**	发酵至 7 天时的实验结果		
		pH	抗菌素效价(微克/毫升)	补加玉米浆使抗菌素效价提高的百分比(%)
轮枝链霉菌 平阳变种原始菌株	+	7.55	680	253
	-	7.8	269	100
70-5-8	+	7.45	690	208
	-	7.47	331	100
54 号	+	7.1	1255	267
	-	7.55	473	100

\* 基础培养基(%): 玉米浆 0.75, 黄豆饼粉 3.5, 葡萄糖 0.5, 淀粉 6 (α-淀粉酶液化), NaCl 0.3, NaNO<sub>3</sub> 0.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.01, pH6.5。

\*\* “+”为补加玉米浆,“-”为不补加。

结果说明: 以玉米浆 0.75% 及黄豆饼粉 3.5% 作有机氮源时, 抗菌素效价提高 208—267%, 并提高了抗菌素组份 A<sub>5</sub> 的含量, 降低了 A<sub>2</sub> 的含量。

3. 发酵罐试验: 70-5-8 菌株的基础培养基组成为(%): 玉米浆 0.5, 黄豆饼粉 3.2, 葡萄

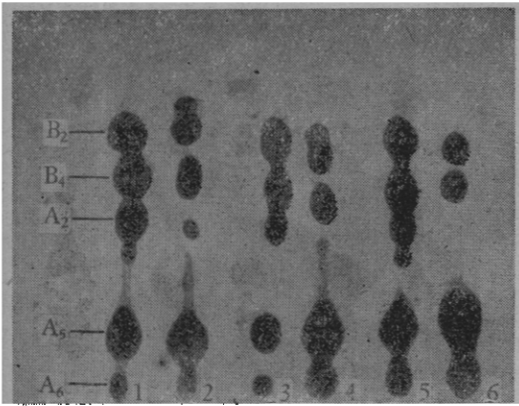


图2 补加玉米浆对不同菌株产生争光霉素组份的影响\*

\*图中,1号发酵过程不加玉米浆,2号发酵过程加7.5%玉米浆;用72号菌株。3号发酵过程不加玉米浆,4号发酵过程加7.5%玉米浆。所用菌株为70-5-8。5号发酵过程不加玉米浆,6号发酵过程加7.5%玉米浆。所用菌株为54号。

糖0.5,淀粉6(用 $\alpha$ -淀粉酶液化),NaCl 0.25, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01, pH 自然,共发酵10批。并用花生饼粉和蚕蛹粉代替玉米浆和黄豆饼粉作为有机氮源进行试验,结果见表3。

表3表明,用玉米浆和黄豆饼粉做氮源,不补加玉米浆,其抗菌素效价在33—246微克/毫升。补加玉米浆的发酵试验,抗菌素效价在295—800微克/毫升。而另一组试验,基础培养基成分为(%) : 葡萄糖0.5, 饴糖9, NaCl 0.3,  $\text{NaNO}_3$  0.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01。混合有机氮源为花生饼粉2.5%加蚕蛹粉1.25%,抗菌素效价为57—144微克/毫升;混合氮源改为花生饼粉2.5%加蚕蛹粉2.5%时,抗菌素效价为208—800微克/毫升。

4. 发酵罐试验中,不同有机氮源与争光霉素主要组分改变的关系: 以70-5-8菌株做实验菌株,在发酵罐试验规模,分别取50克提取物,作CM-Sephadex C-25柱梯度层析分离,结果见表4。

表4结果表明,用玉米浆和黄豆饼粉作氮源时,补加玉米浆后,发酵产生争光霉素组份 $A_5$ 的百分比,自14.3%提高到58.62%, $A_2$ 的

表3 不同有机氮源对抗菌素效价的影响

基础培养基中有机氮源 (%)	发酵过程补加玉米浆* (%)	发酵批数	发酵周期变化范围 (小时)	抗菌素效价变化范围 (微克/毫升)	平均抗菌素效价 (微克/毫升)
玉米浆 黄豆饼粉 0.5 3.2	0	10	115—141	33—246	190
0.5 3.2	7.5(1.5×5)	4	162—165	295—800	589
花生饼粉 蚕蛹粉 2.5 1.25	0	4	159—163	57—144	107
2.5 2.5	0	6	162—169	208—800	484

\* 自发酵44小时左右开始,以后每隔24小时一次。

表4 不同有机氮源与争光霉素主要组分改变的关系

有机氮源 (%)	争光霉素主要组分*(%)				
	$A_2$	$A'_2$	$B_2$	$A_5$	$B_5$
玉米浆0.5, 黄豆饼粉3.2	30.2	4.27	19.2	14.3	7.7
玉米浆0.5, 黄豆饼粉3.2 (发酵过程中作玉米浆补加,总量 $1.5 \times 5 = 7.5$ )	1.51	3.39	4.98	58.62	14.92
花生饼粉2.5, 蚕蛹粉1.25	43.98	8.33	17.47	7.17	15.99
花生饼粉2.5, 蚕蛹粉2.5	27.9	4.96	26.53	15.15	10.54

\* CM-Sephadex C-25 大柱梯度层析结果。

百分比则从 30.2% 下降到 1.51%。而用花生饼粉和蚕蛹粉做氮源时,组份  $A_2$  的百分比提高到 43.98%。随着蚕蛹粉用量增加,产生的争光霉素  $A_2/B_2$  的比率显著下降。

## 讨 论

本研究结果说明:通过对发酵培养基中有机氮源的选择和应用,能够有效地提高争光霉素发酵组分中  $A_5$ 、 $A_2$  或  $B_2$  的百分比,因此为争光霉素生产上控制所需组份提供了基础和方便。

因有机氮源的改变而造成发酵液中争光霉素组份改变的原因,可能是:有机氮源本身所含的微量末端胺起了前体作用;利用不同有机氮源时,菌丝生长期及争光霉素产生期的转变有差异;利用不同有机氮源时,生物合成的争光霉素的前体末端胺,存在着种类及数量上的改变,并涉及相互联系的代谢途径中的代谢调节。

天然博来霉素主要组份的末端胺含:二甲硫正丙胺 ( $A_2$ )、胍基丁胺 ( $B_2$ )、腐胺 ( $A_2a$ )、1,3-丁二胺 ( $A_2b$ )、组胺 ( $A_2c$ )、精脒 ( $A_5$ )、精胺 ( $A_6$ )。Ackerman 经过对蚕蛹中多胺的研究肯定了精脒、腐胺的存在,却并没有提及胍基丁胺<sup>[6]</sup>。花生饼粉及蚕蛹中存在二甲硫正丙胺的报道,至今没有见到。因此不是它们本身所含有的  $B_2$  或  $A_2$  的末端胺前体起着促进  $B_2$  或  $A_2$  百分比提高的作用。

实验中,从我们使用玉米浆补加的方式来看,与梅沢<sup>[7]</sup>研究精脒对博来霉素  $A_5$  产生影响时的添加方式有显著不同,在他的文章中是以 500 微克/毫升的精脒加于发酵起始时得 100%

博来霉素  $A_5$ , 加于第 4 天只能得到 40%  $A_5$ , 而本文得到 58.62% 的争光霉素  $A_5$ , 恐怕难以说明玉米浆中所含的精脒在其中起主要作用,何况按此种标准计算,玉米浆中应含 0.7% 左右的精脒,实际上可能性甚小。

开始补加玉米浆是在争光霉素产生时,并影响争光霉素产生及菌体生长之间的平衡,通常在次级代谢产物形成期间,与抗菌素生物合成有关的酶活力显著增高,在争光霉素产生期间,玉米浆补加可能影响了这些酶活力,可能导致与  $A_2$  前体合成有关的酶活力降低,促使组份  $A_5$  及  $A_2$  的末端胺前体发生数量上的改变,根据 E. Coli 的多胺代谢途径<sup>[8,9]</sup>,以及植物中甲基甲硫氨酸(维生素 U)的生物合成<sup>[10]</sup>,可能是 S-腺苷甲硫氨酸的去向决定  $A_2$  及  $A_5$  末端胺前体的百分比,在天然争光霉素或博来霉素发酵时,其主要组份的末端胺之间可能存在着代谢上的联系。

## 参 考 文 献

- [1] 赵仪英等:微生物学报, **19**: 361, 1979.
- [2] Umezawa, H. et al.: *Pure and Appl. Chem.*, **28**: 665, 1971.
- [3] Fujii, A. et al.: *J. Antibiot.*, **27**:73, 1974.
- [4] Umezawa, H. et al.: *J. Antibiot.*, **19**: 200, 1966.
- [5] Fujii, A. et al.: *J. Antibiot.*, **26**:396, 1973.
- [6] Ackerman, D.: *Hoppe-seyer Z. Physiol. Chem.*, **291**: 159, 1952.
- [7] Umezawa, H.: *Gann Monograph on Cancer Res.*, University of Tokyo press, No. 19, Fundamental and Chemical Studies of Bleomycin (ed. by S. K. Carter et al.), 1976, p. 3—36.
- [8] Tabor, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **233**: 907, 1958.
- [9] Morris, D. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **241**: 3129, 1966.
- [10] Karr, D. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**:732, 1967.