

微生物途径开发新抗生素

周家惠

(四川制药厂, 成都)

一个优良的新抗生素要求具备下列特点: 1. 抗微生物谱广, 能抑制已知抗生素不能抑制的微生物及耐药菌; 2. 有良好的化学治疗指数 (治疗剂量/安全剂量), 分解产物无毒; 3. 微生物对这种抗生素不易产生耐药性; 4. 能达到人体的各个部位; 5. 化学性质稳定。目前除常规的土壤筛选法发现新抗生素外, 还采用了一些新方法。本文探讨应用微生物学、生物化学和遗传学原理设计和制备新抗生素的方法。

一. 土壤筛选法的改进

为了继续寻找新抗生素, 世界上许多药厂和研究所以设计了庞大的筛选计划, 从土壤微生物中筛选出新的有用抗生素, 每年花费了大量资金、人力、物力, 多年来是有收获的。经典的筛选程序是从采集的土样中筛选能产生抗生活性物质的微生物, 鉴别此物质是新的还是已知的抗生素。如果是新的, 就要确定它在体内的活性, 应用价值, 生产工艺是否经济合理以及生产的可行性等。这种传统的测试方法是较粗放的, 而且易失误。例如因水溶性不良, 培养基不合适, 温度条件不适宜, 往往延迟了抗生素的形成, 使一些抗生素产生菌不能分泌其抗生物质; 有时即使产生了抗生素, 由于检测方法不当, 未能测出抗生活性。

新抗生素的土壤筛选法已应用了多年, 有关富集方法, 发展方向, 经验教训的论述, 已有不少文章可资借鉴^[1-3]。目前各试验室都采用比较合理的定向筛选方法, 就是根据已报道的抗生素产生菌的特性去定向筛选这类菌株。

1. 应用对 β -内酰胺抗生素超敏感突变株, 检测产生微量 β -内酰胺类抗生素的微生物^[4]。从细菌中分离获得单环、双环和脱乙酰氧基头孢菌素 C 等 β -内酰胺类抗生素^[5-7]。

2. 筛选培养基中加入微量欲获得的抗生素或其类似物。有报道在筛选培养基中加入 1—25 μg 的庆大霉素可定向筛选产氨基糖苷类抗生素的菌种, 筛出比率由未加时的 3.3—11.4% 提高到 30—78%^[8]。其原理是所要获得的抗生素产生菌对这种抗生素的耐受量比其它微生物大些。上述分离出的菌种, 抗革兰氏阴性菌的活性由 13.4% 增至 69.4%。

因此, 应用新的微生物学方法, 设计独特的筛选程

序, 可较快地获得所设想的新抗生素。而成功的关键在于检测方法、定向筛选某类菌和适当的培养方法 (培养基组成、发酵条件等) 三者有效的结合^[1]。

二. 应用微生物学、生物化学和遗传学方法获得新抗生素

近年来, 有许多新发现抗生素是已知抗生素的类似物或发酵产物中的其它组分。这表明抗生素结构的微小变化, 就能引起生物活性明显的改变。应用微生物学、生物化学和遗传学方法改造抗生素的结构或抗生素的遗传特性, 可得到优良的新抗生素。

1. 诱变法

应用放射性同位素研究生物合成力复霉素 B 的最后几步时, 发现力复霉素 SV 是力复霉素 B 的前体, 应用诱变剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG) 处理地中海诺卡氏菌获得了主要产生力复霉素 SV 的突变株, 供工业生产使用。力复霉素 SV 注射剂是高效的抗革兰氏阳性菌及结核分枝杆菌的抗生素。同时还分离到一失去甲基化酶系的阻断突变株, 发酵产生 27-脱甲氧基-27-羟基力复霉素 SV, 对某些革兰氏阴性菌的抑制效果较好。

这种缺失甲基化酶的阻断型突变株在金霉素产生菌金色链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 中也被分离得到。它只产生脱甲基金霉素和脱甲基四环素, 其抗菌活性比金霉素、四环素强, 血浓度高, 维持时间长, 还可用作合成二甲胺基四环素的中间体^[9]。

产生道诺红霉素 (daunorubicin) 的波赛链霉菌 (*S. peucetius*), 经亚硝基甲基胍 (NMU) 诱变获得产阿霉素 (doxorubicin) 的青灰色变株 (*S. peucetius* var. *caesiur*) 阿霉素即 14-羟道诺红霉素, 比道诺红霉素抗癌谱广, 毒性低。此法比用化学法改变 14 位- CH_3 基为- CH_2OH 的收率高。进一步应用其它诱变剂诱变波赛链霉菌, 可获得近 20 种新的道诺红霉素类似物, 如 13-二羟道诺红霉素^[10]。

将庆大霉素产生菌诱变处理, 获得一个支路阻断突变株, 棘孢小单孢菌 JIM-401 变株。它产生的抗生素主要组分为相模湾霉素和庆大霉素 C_{12} , 而不再产生庆大霉素主要组分 C_2 和 C_1 ^[11]。

利用诱变抗生素产生菌的方法, 获得突变株使之

产生中间代谢产物(新抗生素)或支路代谢物(新组分),这个有效途径在工业生产上取得的成就最显著。

2. 添加前体的生物合成法

用诱变剂处理抗生素产生菌,使它缺失合成中间代谢物的某个酶,由于不能合成这个中间前体,就不能继续合成这个抗生素。如果在这个突变株的发酵液中额外加入一个正常前体,例如2-脱氧链霉素(2-DOS),可恢复正常的氨基糖苷类抗生素的产生。而加入其它氨基环醇于发酵液中,就可产生氨基糖苷类抗生素的类似物(新抗生素)。有的文献将不能合成2-DOS的变株称为2-脱氧链霉素负变株,还称之为“特养型”(idiotroph)。因其必需特定的前体才能合成抗生素,而它对生长又非必需,故与营养缺陷型的含义不同。例如在庆大霉素产生菌的2-DOS特养型变株的发酵液中加入链霉素,发酵培养数天后进行提炼精制获得2-羟庆大霉素,它的毒性比庆大霉素低,对一些耐药菌有效。目前利用特养型突变株和添加前体的方法已获得许多新的氨基糖苷类、大环内酯类和 β 内酰胺类抗生素。但由于产量低还未达到工业化生产的工艺水平。

3. 遗传工程技术

应用DNA重组技术及原生质体融合、细胞杂交等方法研制新抗生素已崭露头角。例如由两个地中海诺卡氏菌株种内重组得到一些重组体菌株,可以产生一些新的力复霉素。其中以重组体菌株R-21产生的3-羟力复霉素S活性最强,它抑制革兰氏阴性菌的活力比力复霉素S强。种间重组亦有报导,吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*)和紫色链霉菌(*S. violaceus*)的重组体能产生新的环类抗生素 iremycin^[12]。

4. 生物转化

这里所说的生物转化(biotransformation)是用抗生素产生菌修饰抗生素。例如用不产庆大霉素的绛红小单孢菌突变株Y-41发酵24小时加入卡那霉素B,发酵结束后得到结合霉素B₁和B₂。如加入的是卡那霉素A则得到结合霉素A₁。这些新抗生素的特点是使卡那霉素分子的4'-C-甲基化,3',4'-二脱氧,对大肠杆菌和绿脓杆菌的抗菌活性更强^[13]。又如环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)生物合成丁酰甘菌素的最后一步是由核糖霉素和L(-)- α -羟基- γ -氨基丁酸(HABA),通过该菌分泌的酰胺化酶形成。卡那链霉菌(*S. kanamyceticus*)没有这个酶,因此当环状芽孢杆菌发酵8、24、48、72小时加入一定量的卡那霉素,发酵结束后可提炼获得丁胺卡那霉素(BBK-8)^[14]。它对一些耐药菌的活性比庆大霉素和卡那霉素强。

5. 定向发酵^[15]

定向发酵(directed fermentation)是通过改变发酵培养基组成及发酵条件,影响发酵产物的量和质,使原为微量抗生素组分的产量大为增加,即可获得一个

新抗生素。

(1) 发酵培养基中加入酶抑制剂。

添加L-甲硫氨酸于头孢霉发酵液中定向产生头孢菌素C,而抑制其他组份生长。加入磷酸、乙硫氨酸等抑制生物甲基化的抗代谢物于金色链霉菌发酵液中抑制金霉素合成,定向产生6-脱甲基金霉素;若加于林肯霉素发酵液中,可产生一新抗生素N-脱甲基林肯霉素。加抑制生物氯化作用的溴化钠、硫氰酸盐、硫尿、巯基苯并噻唑等于金霉素发酵培养基中,则抑制金霉素合成,可定向产生四环素。

(2) 发酵培养基中加入前体物质

发酵液中加入某些前体物质,可未经显著的改变,直接组成抗生素分子的一部分,能增加某组份产量或产生出新品种。众所周知,加苯乙酸于产青霉素的发酵液中产生青霉素G,加苯氧乙酸则产生可供口服的青霉素V,二者皆已工业生产多年。因此每当生产一个抗生素时,可以加一些前体物质于发酵液中试图获得新抗生素,这虽系一老的方法,但十分有用。如加精胺于博来霉素(商品主要组份是A₁)发酵液中,可100%产生博来霉素A₁(国产商品称为平阳霉素)。放线菌素发酵时,随加入不同的氨基酸可主要产生某种放线菌素组份,或产生新组份^[16]。用可链霉菌(*S. caecoi*)发酵多氧霉素时,加入5-氟尿嘧啶,形成5-氟多氧霉素,它能抑制细菌和真菌,而多氧霉素只能抑制植物致病真菌^[17]。

(3) 控制培养基的营养,定向获得抗生素的一定组份

远青链霉菌(*S. azureus*)发酵时,用糊精代替葡萄糖作碳源,可抑制两性霉素A的形成,而定向产生两性霉素B^[18]。钴离子对各种小单孢菌产生的抗生素的C-甲基化很重要。在庆大霉素发酵液中不加钴离子,主要产生脂溶性的庆大霉素A,加入钴离子后主要产生水溶性的庆大霉素C组份。

(4) 控制发酵时间

有些抗生素在发酵时随时间的延长而改变抗生素的组份。如放线菌素发酵时,开始形成放线菌素B₁最后转变为D类^[16]。

近年来,在筛选新抗生素工作中设计了一些新“筛孔”来充实经典的土壤筛选法,从各属种的细菌中分离获得各种 β -内酰胺抗生素。细菌还可产生毒性小,抗菌谱广的氨基糖苷类抗生素,如丁酰甘菌素和山梨菌素。这说明,不仅放线菌,细菌也有巨大的潜力产生各种新型结构的抗生素。

有些抗生素用化学方法改造时,控制其立体化学结构比较困难,而应用微生物学、遗传学等手段可以改造抗生素产生菌的遗传结构,或产生出全新的菌种,它们能产生已知抗生素的新类似物或全新的结构。用微生物途径获得新抗生素有着广阔的发展前景。

参 考 文 献

- [1] Iwai, Y. and S. Omura: *J. Antibiot.*, **35** (2): 123—141, 1982.
- [2] Nisbet, L. J.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32** (1): 251—270, 1982.
- [3] Berdy, J.: *Proc. Biochem.*, **15**(7): 28—35, 1980.
- [4] Wells, J. S. et al.: *J. Antibiot.*, **35** (7): 814—821, 1982.
- [5] 横田健 : *Jap. J. Antibiot.*, **34** (12): 1525—1533, 1981.
- [6] Parker, W. L. et al.: *J. Antibiot.*, **35** (6): 653—660, 1982.
- [7] Singh, P. D. et al.: *ibid*, **35** (10): 1397—1399, 1982.
- [8] Биби́кова, М. В. и др.: *Антибиотики*, **26** (7): 488—492, 1981.
- [9] 程惠芳, 李焕葵: *微生物学报*, **14**(1): 70—73, 1974.
- [10] Grein, A.: *Proc. Biochem.*, **16** (6): 34—35, 1981.
- [11] 赵敏等: *抗生素*, **8**(5): 285—289, 1983.
- [12] Ihn, W. et al.: *J. Antibiot.*, **33** (12): 1457—1461, 1980.
- [13] Oka, Y. et al.: *ibid*, **34** (6): 777—781, 1981.
- [14] Cappelletti, L. M. and R. Spagnoli: *ibid*, **36** (3): 328—330, 1983.
- [15] Perlman, D.: *Proc. Biochem.*, **8** (7): 18—20, 1973.
- [16] 周家惠: *科学通报*, **19**(12): 547—555, 1974.