

# 放线菌产生各种有用物质的初步探索

姜成林 徐丽华 郭光远 马俊

(云南省微生物研究所, 昆明)

**摘要** 从云南若干地区采集土样、12个湖泊采集湖底泥和水样。用多种培养基分离其中的放线菌。采用不同方法筛选了纤维蛋白酶等有用物质的产生菌。并对不同来源不同属的放线菌产生各种有用物质的规律作了初步探讨。

**关键词** 放线菌; 有用产物

放线菌产生的抗菌素曾经对人类的医疗保健事业做出过巨大的贡献。放线菌也是其它有用产品的生产者, 它产生的葡萄糖异构酶在生产上已广泛应用。云南是我国微生物资源最丰富的地区之一, 放线菌种类也十分繁多。发掘这些资源为四化服务是一项亟待解决的任务。我们从云南的若干地区和几个湖泊的样品中分离了大量放线菌, 并用各种方法筛选了有用菌, 现报告部分结果。

## 材料和方法

### (一) 菌株来源及发酵

从云南省的西双版纳、元江、昆明、哀牢山、文山、镇源、刁岭山、鸡足山及玉龙雪山采集森林、荒地、旱地及水田土样, 从滇池、洱海、程海、泸沽湖、抚仙湖、大屯海、异龙湖、杞麓湖、剑湖、星云湖、阳宗海及茈碧湖采集湖底泥样品。用甘油-门冬酰胺琼脂等加多种培养基分离放线菌<sup>[1-3]</sup>。按常规方法进行鉴定。用葡萄糖-黄豆粉等2—3种培养液摇瓶发酵不同时间, 按下述

方法进行筛选。

### (二) 酶活力及抗菌活性测定

葡萄糖异构酶活力用钼酸铵法<sup>[4]</sup>和旋光法<sup>[5]</sup>测定。

L-门冬酰胺酶活力用奈氏试剂法<sup>[6]</sup>测定。

溶菌酶活力用溶壁小球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)作试验菌进行琼脂平板测定, 用蛋溶菌酶作对照。

纤维蛋白酶活力按文献[6]的方法测定。

凝乳酶活力按 Arima 等<sup>[7]</sup>的方法测定。

用冻土毛霉(*Mucor hiemalis*)作试验菌测定抗真菌活性。

## 结果及讨论

### (一) 葡萄糖异构酶

葡萄糖异构酶已广泛应用于果葡糖浆的制造, 生产上所用的酶产生菌主要是米苏里游动放线菌(*Actinoplanes missouriensis*)<sup>[8]</sup>。最近

国家自然科学基金资助课题; 谢桂兰同志参加部分工作, 特此致谢。

Bok 等<sup>[9]</sup>从喜酸放线菌筛选酶产生菌,个别野生菌株的酶活力为 5000—10000u/l (1 单位=每分钟生产 1 $\mu$ mol 果糖的酶量)。我们筛选了 1226 株放线菌,其中不同属的一半以上的菌株产生葡萄糖异构酶,但仅有 0.7% 的菌株的酶活力超过了 8000u/l,这比目前生产上使用的菌种还有较大差距。

## (二) L-门冬酰胺酶

由大肠杆菌发酵生产的 L-门冬酰胺酶已用于治疗白血病,但它产生的是胞内酶,制备工艺比较复杂、收率低。因此寻找胞外酶产生菌是一个解决办法。我们筛选的 1445 株放线菌中仅 7.3% 的菌株产生这种酶,且酶活力普遍都很低,均不超过 10u/l。

程海是一个因周围森林遭受破坏,水源不足造成的死湖,湖水 pH 高达 9。来自程海的 144 株不同属的放线菌,几乎都不产生 L-门冬酰胺酶。我们曾经发现,来自程海的放线菌在硷性液体培养基内培养 4 天后,培养基的 pH 均降低<sup>[10]</sup>,显然在硷性条件下不利于 L-门冬酰胺酶的脱氨作用。

## (三) 溶菌酶

溶菌酶能断裂 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺间的  $\beta$ -1,4 糖苷键,在临床上可用于感染性疾病的诊断和治疗,目前主要来源是蛋清。链霉菌、高温单孢菌和高温放线菌都会产生这种酶<sup>[11]</sup>。我们筛选的 2169 株土壤放线菌中,有 8% 产生溶菌酶,主要集中在链霉菌、孢囊放线菌、小单孢菌和链孢囊菌等属。从元江土样分离的 423 株高温链霉菌有 94 株产生溶菌酶,从高原湖泊分离的 1607 株放线菌,仅 1.4% 的菌株产生溶菌酶。但总的来说酶活力都不高,最高的也不过 0.5u/ml。

## (四) 纤维蛋白酶

由于溶解纤维蛋白的酶具有重要的临床价值,多年来一直受到各国学者的重视。动物尿生产的尿激酶<sup>[12]</sup>、蛇毒生产的去纤酶<sup>[13-15]</sup>、细菌生产的链激酶<sup>[12]</sup>、葡激酶<sup>[12]</sup>均已应用于临床。但一般产量有限,价格昂贵,有的毒性较大。最近,Алб-Нурн<sup>[16,17]</sup> 从链霉菌寻找这类具有溶解

纤维蛋白能力的酶。

我们筛选了 4065 株放线菌,有 24% 的土壤放线菌产生纤维蛋白溶酶,从滇池、洱海及抚仙湖等分离的菌株仅有 18% 产生这种酶,其中程海的菌株有 39% 产生这种酶。

小单孢菌株 1538 号摇瓶发酵后用葡聚糖凝胶柱分离所得的酶粉,与尿激酶、链激酶、去纤酶对照做体内外试验,初步结果如下:

1. 1538 酶对酸敏感, pH3 就使其完全失活,而硷性 pH 的影响不大。60℃ 20 分钟对酶活力无多大影响,80℃ 20 分钟几乎完全失活。钙、镁、钾、铁等金属离子对酶活力无影响。

2. 用琼脂平板法测定,50 ppm 的 1538 酶液相当于 100ppm 的尿激酶及 150ppm 的链激酶的活力。

3. 1538 酶与纤维蛋白原、凝血酶保温,反应物的氨基酸水平并不增加。这说明 1538 酶对纤维蛋白的水解作用并非是将其全部水解成氨基酸。

4. 小鼠每公斤体重尾静脉注射 1mg 酶液,无异常反应,注射 25mg,10 分钟后死亡一半。大白兔、猴子注射 5mg/kg,无异常反应,对红细胞渗透脆性亦无影响。

## (五) 凝乳酶

凝乳酶是制造干酪的一种关键性酶,最初来源于小牛的胃,但产量很有限。60 年代末, Somkuti 等<sup>[18]</sup>和 Aunstrup<sup>[19]</sup> 分别从微小毛霉 (*Mucor pusilus*) 和 *M. miehei* 发现了凝乳酶,得到了广泛的应用。1980 年美国微生物凝乳酶的销售量达 1500 万美元。目前这种酶的世界市场供应紧张。

我们从昆明、元江、西双版纳等地分离的 1219 个菌株,有 162 株 (13%) 产生这种酶。有 0.8% 的菌株酶活力为 80u/ml,其中两株达 200 单位以上。从湖泊中分离的 908 个菌株,有 27% 的菌株产生这种酶,但活性比较低。

大多数产生凝乳酶的放线菌株都同时具有分解蛋白质的能力。只有凝乳酶活性高而蛋白分解能力低的菌株才有应用价值。

## (六) 抗毛霉活性

表 1 不同来源的放线菌产生的有用物质

| 属       | 葡萄糖异构酶 |     |     |     | L-天门冬酰胺酶 |    |     |      | 溶菌酶  |     |      |      | 纤维蛋白酶 |     |      |      | 凝乳酶  |     |     |      | 抗毛霉活性 |     |     |   |
|---------|--------|-----|-----|-----|----------|----|-----|------|------|-----|------|------|-------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|-----|---|
|         | 土壤     |     | 湖泊  |     | 土壤       |    | 湖泊  |      | 土壤   |     | 湖泊   |      | 土壤    |     | 湖泊   |      | 土壤   |     | 湖泊  |      | 土壤    |     | 湖泊  |   |
|         | T      | P   | T   | P   | T        | P  | T   | P    | T    | P   | T    | P    | T     | P   | T    | P    | T    | P   | T   | P    | T     | P   | T   | P |
| 链霉菌属    | 234    | 151 | 88  | 59  | 431      | 28 | 13  | 1752 | 163  | 588 | 12   | 1670 | 470   | 63  | 258  | 1041 | 150  | 451 | 228 | 1533 | 126   | 163 | 0   |   |
| 放线菌属    |        |     |     |     |          |    |     | 7    | 0    |     |      | 7    | 1     |     |      |      |      |     |     |      | 7     | 0   |     |   |
| 孢囊放线菌属  |        |     |     |     |          |    |     | 8    | 1    | 7   | 0    | 8    | 0     | 9   | 0    | 2    | 0    |     |     |      | 6     | 0   | 14  | 0 |
| 小单孢菌属   | 121    | 11  | 634 | 369 | 125      | 20 | 621 | 45   | 111  | 0   | 581  | 4    | 109   | 12  | 832  | 81   | 88   | 4   | 146 | 7    | 97    | 1   | 541 | 0 |
| 小双孢菌属   |        |     | 2   | 2   |          |    | 2   | 0    | 7    | 0   | 3    | 0    | 7     | 1   | 3    | 0    |      |     |     |      | 7     | 1   | 2   | 0 |
| 小多孢菌属   |        |     | 1   | 1   |          |    | 2   | 0    | 1    | 0   | 7    | 0    | 1     | 0   | 7    | 0    | 1    | 0   |     |      | 1     | 0   | 2   | 0 |
| 游动放线菌属  | 13     | 13  | 7   | 3   | 13       | 0  | 7   | 0    | 13   | 0   | 7    | 0    | 38    | 4   | 7    | 0    |      |     |     |      | 13    | 0   | 7   | 0 |
| 马杜拉放线菌属 | 20     | 5   | 5   | 5   | 20       | 4  | 8   | 0    | 65   | 0   | 268  | 0    | 85    | 7   | 276  | 0    | 28   | 4   | 264 | 0    | 63    | 1   | 12  | 0 |
| 链孢囊菌属   |        |     | 1   | 0   |          |    |     |      | 3    | 0   | 6    | 4    | 7     | 0   | 6    | 0    | 1    | 0   |     |      | 5     | 0   | 6   | 0 |
| 小四孢菌属   |        |     |     |     |          |    |     |      |      |     |      |      |       |     | 8    | 0    |      |     | 6   | 0    |       |     |     |   |
| 原小单孢菌属  |        |     |     |     | 4        | 0  | 1   | 0    | 16   | 0   | 2    | 2    | 5     | 2   | 1    | 0    |      |     |     |      |       |     | 1   | 0 |
| 诺卡氏菌属   | 43     | 3   | 24  | 17  | 43       | 0  | 27  | 4    | 85   | 0   | 21   | 0    | 95    | 3   | 32   | 0    | 15   | 3   | 6   | 0    | 37    | 0   | 18  | 0 |
| 糖多孢菌属   |        |     |     |     | 8        | 0  |     |      | 74   | 0   | 65   | 0    | 83    | 4   | 65   | 4    | 37   | 1   | 18  | 4    | 59    | 0   | 47  | 0 |
| 糖单孢菌属   |        |     |     |     |          |    |     |      |      |     |      |      |       |     | 4    | 2    |      |     | 2   | 2    |       |     |     |   |
| 红球菌属    | 8      | 0   | 25  | 11  |          |    | 35  | 2    | 10   | 0   | 33   | 0    | 6     | 0   | 33   | 0    | 6    | 0   |     |      | 6     | 0   | 35  | 0 |
| 高温放线菌属  |        |     |     |     |          |    |     |      | 16   | 0   | 14   | 0    | 20    | 0   | 14   | 2    |      |     |     |      |       | 14  | 2   |   |
| 总数      | 439    | 183 | 787 | 467 | 644      | 52 | 801 | 64   | 2169 | 164 | 1607 | 22   | 2141  | 504 | 1924 | 347  | 1219 | 162 | 908 | 243  | 1850  | 128 | 848 | 0 |
| 产生菌所占%  | 42     |     | 59  |     | 8        | 8  | 8   | 8    | 8    | 8   | 1.4  | 24   | 18    | 13  | 27   | 7    | 0    |     |     |      |       |     |     |   |

T: 试验菌株数; P: 产生菌株数。

过去几十年,虽然已从放线菌发现了几千种抗菌素,至今从放线菌寻找高效新抗菌素的努力还是经久不衰。寻找高效抗真菌抗菌素就是其中的一个重要方面。

表1的结果说明,来自土壤的放线菌有7%的菌株具有抗毛霉活性,几乎都是链霉菌。有8株的抑菌活性很高,抑菌圈直径达47mm,其中两株对白色念珠菌、黑曲霉、镰刀菌等20多种真菌都有抗菌活性,但从湖底泥来的菌株都没有抗毛霉活性。

### (七) 其它产物

测定了1926个菌株产生凝血酶的能力,仅4株具有微弱的活性。1425个菌株中,仅有4株对 $\alpha$ -淀粉酶具有微弱的抑制作用。从昆明、程海分离的573株放线菌,有29株(5%)产生 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂,但抑制作用都不强。

从上述结果,我们初步得出以下看法:

1. 链霉菌和小单孢菌不但是抗生素的重要生产者,它们还产生各种酶,特别是纤维蛋白溶酶、凝乳酶。

2. 不同属、不同来源的放线菌广泛产生葡萄糖异构酶,但从土壤链霉菌、游动放线菌属筛选出高活力菌株的可能性较大。

3. 从放线菌筛选L-门冬酰胺酶、溶菌酶的机率较小,但从土壤链霉菌寻找高酶活菌株的可能性是存在的。

4. 从土壤链霉菌筛选抗真菌(以毛霉为试验菌)的变活性菌株颇有前途,而水生放线菌则几乎找不到这类菌株。

研究放线菌的种类、来源与产生各类有用物质之间的关系不但具有重要的理论意义,也有重要的实用价值,而云南正好具备得天独厚的条件。我们对四千多株来源不同,种属各异的放线菌产生几种有用代谢产物的关系作了一些初步探索,初步看到一些规律,有关的工作尚待进一步扩大和深入。

### 参 考 文 献

- [1] 姜成林、徐丽华:微生物学论文集,科学出版社,北京, p. 53—57, 1985。
- [2] 姜成林、徐丽华:生态学报, 4: 316—320, 1984。
- [3] 姜成林、徐丽华:微生物学通报, 12: 218—220, 1985。
- [4] 中山大学生物系生化微生物教研室:生化技术导论,人民教育出版社,北京, p. 52—68, 1978。
- [5] 胡学智、史济平:微生物学通报, 9: 41—43, 1982。
- [6] 叶智彰等:动物学研究, 2: 33—40, 1981。
- [7] Arima, K. et al.: *Methods in Enzymology*, 19: 446—458, 1970。
- [8] 胡学智等:工业微生物, 4: 40—54, 1982。
- [9] Bok, S. H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 1212—1215, 1984。
- [10] 姜成林、徐丽华:水生生物学报, 9: 369—391, 1985。
- [11] 魏大典:发酵与工业, 41: 180—193, 1983。
- [12] Ablondi, F. B. and J. J. Hagan: *The Enzyme*, 2nd, ed., Academic Press, New York, 4: 176—192, 1960。
- [13] 张洪基等:动物学研究, 1: 163—170, 1980。
- [14] 王婉瑜等,动物学研究, 3: 145—152, 1982。
- [15] 杨靖华等:中华医学杂志, 62: 321—323, 1982。
- [16] Аль-Нури, М. А. и др.: *Микробиология*, 53: 387—390, 1984。
- [17] Аль-Нури, М. А. и др.: *Викробиология*, 53: 572—576, 1984。
- [18] Somkuitt, G. A. & F. J. Balogh: *J. Bacteriol.*, 95: 1407—1411, 1968。
- [19] Lunstrup, K.: *British Patent*, 1108287, 1968。