

全国第三次 抗菌素学术会议论文集

第二册

抗菌素生产工艺

童村 张为申 主编

科学出版社

全国第三次 抗菌素学术会议论文集

第二册

抗菌素生产工艺

童 村 张为申 主编

江苏工业学院图书馆
藏书章

科学出版社

1965

內 容 簡 介

《抗菌素生产工艺》是《全国第三次抗菌素学术会议论文集》的第二册,收載最近三年来国内抗菌素工业生产方面的研究論文和抗菌素进展、半合成青霉素、生物工程学等綜述。

本书包括抗菌素产生菌基因重組、菌种选育、抗菌素发酵工艺、抗菌素分离提純、抗菌素制品质量改进和半合成新青霉素制备方法等方面論文。很多論文密切結合生产实际,探討抗菌素产生菌的代謝途徑,改进抗菌素生产工艺。有的討論生物工程学与抗菌素工业生产。这些論文充分反映我国三年来抗菌素工业生产上的新成就。

本书可供高等院校抗菌素、微生物学、应用微生物学等专业的教师、研究生、高年級学生及抗菌素工厂、研究机构的技术人員参考。

全国第三次 抗菌素学术会议论文集

第 二 册

抗菌素生产工艺

童 村 张为申 主编

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳門内大街 117 号

北京市书刊出版业营业許可証出字第 061 号

上海新华印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店經售

*

1965 年 12 月 第 一 版

开本: 787×1092 1/16

1965 年 12 月 第一次印刷

印张: 22 2/8 插頁: 16

印数: 0001—2,300

字数: 542,000

統一书号: 13031·2153

本社书号: 3281·13—9

定价: [科七] 3.90 元

《全国第三次抗菌素学术会议论文集》编辑委员会

主 编

童 村 张为申

编 辑 委 员

(以姓名笔划为序)

马 誉 徽	王 徽	方 纲	张为申
张 昌 绍	陈 博 君	陈 澹 庆	吴 朝 仁
沈 其 益	罗 士 韦	阎 逸 初	童 村
鲍 克 雄	蔡 润 生	戴 自 英	

前 言

中国药学会、国家科委抗菌素专业组联合于 1964 年 9 月 2—10 日在大連召开全国第三次抗菌素学术會議，大会收到論文和报告 232 篇。會議首先傳達了彭加木同志的先进事迹，使大家認識到如何使科学研究工作更好地为人民服务；自始至終貫徹了“百花齐放，百家爭鳴”的方針，通过論文宣讀和热烈討論，起了总结和檢閱 1961 年 11 月全国第二次抗菌素学术會議以来我国抗菌素事业的成績，交流并推广經驗，加强学科間协作和探討今后研究与生产方向等作用。會議决定編輯出版《全国第三次抗菌素学术會議論文集》，全书分《新抗菌素》、《抗菌素生产工艺》、《抗菌素在医学上的应用》和《抗菌素在农牧业上的应用》四册，分別收載有关的論文和报告。各册书末有編后記，記述大会四个专业組的討論內容，供未能参加这次大会的抗菌素及其有关专业的工作者参考。

最近三年来，我国新抗菌素篩选研究，已扩展至土壤微生物以外。化学合成各种側鏈，与 6-氨基青霉烷酸縮合得到多种新青霉素，为新抗菌素的篩选工作在国内开辟了新領域。若干論文报告了体外对耐药金黄色葡萄球菌、結核杆菌、肿瘤和霉菌等敏感的各种新抗菌素，这些从我国土壤中找到新抗菌素有的已經投入生产，有的已具备作深入研究的条件，有的生物学性质研究較為深入，或經化学鉴定确証其与文献中的抗菌素相同。进一步开展对国内某些地区放綫菌类群分布調查、放綫菌分类、新抗菌素早期鉴别方法、抗病毒抗菌素篩选方法和抗菌素产生菌与抗菌素关系等方面的研究工作，为今后新抗菌素篩选的道路添筑了磚石。这些論文收編在第一册《新抗菌素》中。

十几种临床上常用的抗菌素，国外有的国内也有了。几年以前对耐青霉素、紅霉素的金黄色葡萄球菌感染，还缺乏十分有效的抗菌素，現在已有多种对耐药金黄色葡萄球菌有效的新青霉素。青霉素、鏈霉素、四环族抗菌素等几种主要抗菌素的发酵单位，三年来特别是最近一年以来，增长了一倍或一倍以上。这些成果足以說明我国抗菌素工业生产的技术水平；这些成果也足以說明党的方針政策的正确和三面紅旗的偉大。继 1961 年金霉素基因重組获得新变种后，进行了放綫菌种間基因重組、青霉素产生菌与灰黃霉素产生菌基因重組、 P^{32} 內照射等菌种选育方法研究。四环素产生菌发酵过程中續加葡萄糖获得显著增产效果的事实，还有助于研究金霉菌的生理生化。抗菌素化学提純方面的研究工作，对影响鏈霉素质量的緣由的闡明又前进了一步。这些

理论与生产实践密切联系的论文, 收载在第二册《抗菌素生产工艺》中。

第三册《抗菌素在医学上的应用》刊载的论文主要有金黄色葡萄球菌对抗菌素耐药性的分析, 各种新青霉素对耐药金黄色葡萄球菌感染的实验及临床治疗研究, 青霉素致敏机制的探讨, 青霉素皮肤试验的评价, 几种联合敏感试验方法的比较, 灰黄霉素治疗头癣方法的改进, 抗菌素治疗恶性肿瘤, 新生霉素临床应用和抗菌素药理学, 等等。有的论文为合理应用抗菌素提供依据; 有的探讨应用抗菌素的方法与给药途径, 获得提高药效、节约用药和减小副作用的效果; 有的报告抗菌素引起的药物热及其他副作用, 提出防止和治疗各种副作用的积极建议; 有的报道致病菌的生物学特性, 对一些抗菌素的应用作出新的估价。

第四册《抗菌素在农牧业上的应用》中, 应用抗菌素防治作物病害方面, 我国自制的农抗 101, 用于防治小麦秆锈病、赤霉病, 甘薯黑疤病, 茶树云纹叶枯病和其它作物病害, 有的已肯定效果, 有的为减轻药害正在研究施药方法。在强调植物内吸性能的基础上, 开展筛选植物内吸性强的抗菌素的方法探索, 同时获得了对小麦、洋麻种子和甘薯薯块具有内吸性能, 对小麦赤霉病、洋麻炭疽病和甘薯黑疤病具有一定防治效果的菌株。抗菌素促进家畜生长的研究中, 扩大并进一步肯定饲喂土霉素对猪的增重效果。此外, 还有抗菌素在兽医临床上的应用和应用抗菌素保藏鱼鲜等方面的论文。应当强调指出, 抗菌素在农牧食品业中有着非常广泛的用途, 值得深入研究和推广。

在全国第三次抗菌素学术会议上, 大家希望本书尽早出版。值此国内外大好形势的鼓舞下, 通过各方面的努力和协作, 终于在较短时间内与读者见面了。在编辑工作过程中, 限于编辑工作者的水平, 不免会有错误之处, 望读者指正。

童 村

一九六五年二月于上海

目 录

前言	(v)
六十年代抗菌素的进展	童 村、崔慧蓮 (1)
抗菌素和生物工程学	馬誉激 (14)
青霉素分子结构的改造——“半合成青霉素”	雷兴翰 (30)
十年来我国金霉菌菌种选育的进展	刘頤屏 (63)
用磷 ³² 处理 <i>Streptomyces erythreus</i> 获得新菌株 P ³² -102 的初步报告	俞定安、郑丽君 (70)
复合使用紫外綫氮芥对 <i>Streptomyces niveus</i> 的誘变作用	許菊彦、李煥葵 (74)
金霉菌“重組 2U-84”的培养特征和遺傳变异特性研究	刘頤屏、王惠貞 (80)
金霉菌氨基酸缺陷型的抗菌活性	刘頤屏、王惠貞 (92)
<i>Streptomyces niveus</i> 的异核現象与基因重組合	李煥葵 (98)
青霉素产生菌 <i>Penicillium chrysogenum</i> 与灰黄霉素产生菌 <i>Penicillium urticae</i> 种間杂交的初步报告	李煥葵、朱明珍 (103)
鏈霉菌自然变异的研究 I. 鏈霉菌变异类型	王蓉貞、章名春 (108)
冷冻干燥保存生产菌种的經驗	諸正清、童 村 (113)
高效价菌株 <i>Penicillium chrysogenum</i> 8-16 发酵生理研究	張筱玉、周清梅、許文思 (118)
青霉菌的糖代謝与其生物合成的关系 I. 青霉菌对四种糖的代謝	徐学瑛、王南金、張为申 (124)
青霉菌 <i>Penicillium chrysogenum</i> 的氮源代謝	曹国柔、石偉安 (137)
鏈霉素的生物学来源 I. 鏈霉菌轉脘基酶与鏈霉素生物合成的关系	李友荣、張嗣良、耿靜菁、陶树玉、杜荣生、楊胜利、郁定坤、戴惠珍 (142)
鏈霉素的生物学来源 II. 鏈霉菌轉脘基反应的研究	李友荣 (149)
不同氮源培养基上灰色鏈絲菌蛋白酶与鏈霉素生物合成的关系	顾 璆、陈淑章、刘树煌、赵进福 (156)
用氯化三苯四氮唑盐(TTC)研究鏈霉素发酵过程中的脫氫酶	張 浩、范德璽、李春林、卢淑霞、倪广平 (164)
鏈霉素产生菌 <i>Actinomyces streptomycini</i> Kras. 在浸沒培养过程中菌体形态变化与鏈霉素产量的关系	赵靜岩、虞明霞、孙健男 (167)
四环素发酵过程中續加葡萄糖的代謝研究	郝师曾、馮密云、刘 璞 (176)
四环素工业生产中的半溶性丰富培养基	虞 悝、郭志文、富維昱、傅丽珠 (186)
金霉菌 2U-84 和 A615 生理比較的研究	叶树深、毛振瑪、俞定安、陈瀟庆 (191)
磷酸盐及通气情况对 <i>Streptomyces aureofaciens</i> N-3 某些代謝活动的影响	俞定安、倪关林、陈瀟庆 (197)

- 植物油过氧化物对四环素发酵的影响……………叶树深、毛振玛、陈瀟庆 (201)
- 用磺胺噻唑作抗代谢物研究生物合成土霉素中甲基化的机制……………
……………許 津、顾灵玲、張为申 (207)
- 土霉菌代谢产物 3-羟基苯二甲酸及其与土霉素生物合成的关系 ……………
……………許 津、顾灵玲、張为申 (213)
- Actinomyces rimosus* 在固体培养基上生长发育周期研究……………姜靖美 (217)
- 磷对 *Actinomyces rimosus* T-1001 生长及生物合成土霉素能力的影响 II. 有机磷作用的初步考查 …… 郭連珍、何尊四、陈敏之、稅鴻先、楊淡云、姜立志 (221)
- Actinomyces rimosus* 沉沒培养下产生的淀粉酶活力及其实用意义 ……………
……………何尊四、稅鴻先 (224)
- 地衣形芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 产生杆菌肽的研究 ……………
…………… 黄和容、王大粗、翁嫻珍、强亚靜、施怀釗、刘 璞 (230)
- 原儿茶酸对 *Actinomyces aureus* A-94 制霉菌素生物合成的影响 ……………
……………朱关平、楊胜利、蔡潤生 (236)
- 金色放綫菌 A-94 对原儿茶酸的氧化降解途径……………蔡潤生、朱关平、楊胜利 (239)
- 放綫菌素 K 生物合成研究 I. 放綫菌素 K 色素团生物合成的有效中间体——
L-色氨酸……………曹可宗、蔡潤生 (243)
- 碳源对灰黄霉菌 76 号的生理与灰黄霉素生物合成的影响 ……………
……………刘若瑩、王彩芬、陈小蘅 (250)
- 灰黄霉素試制中发酵条件的研究…………… 范成典、王以光、解美玉、徐泉生 (259)
- 从鏈霉素硫酸盐中去除有毒杂质——二鏈霉胺的探討……………
…………… 孙壁如、孙德芳、刘敦荪、陈瀟庆 (265)
- 小白鼠生物差异性对鏈霉素急性毒性試驗的影响……………黄自芬、朱式欧、蔡丽清 (270)
- 应用两性树脂 HD-1 号提炼金霉素……………徐和德、黄建兴、馮百均 (275)
- 羧基树脂吸附鏈霉素的平衡常数……………鄧行彦、王元釗、譚瑞琳 (280)
- 鏈霉素精制过程中磺酸型 S1×25 树脂吸附无机离子的选择性与交换速度的研究……………
……………傅瑞良、王德敏、張鶴鏞 (286)
- 应用离子交换树脂提炼紅霉素的研究 I. 弱酸 125 树脂的合成及其性能探討
……………叶嬰齐 (293)
- 应用离子交换树脂提炼紅霉素的研究 II. 以弱酸 125 树脂分离提純紅霉素
(摘要)……………鮑竞雄、蔡順养、陈瀟庆 (299)
- 灰黄霉素的提炼研究……………葛韻璽、周杏华 (301)
- 灰黄霉素的化学合成……………謝毓元、陈芝雅 (306)
- 灰黄霉素同系物的研究 I. 5-偶氮-4-去甲基-灰黄霉素的制备 ……………
……………刘 潤、陈桂英、張致平、沈家祥 (312)
- 裂解芞青霉素为 6-氨基青霉烷酸研究的新发展 ……………
……………童 村、徐尙志、韓漪芸、丁曼丽 (316)
- 铁离子对細菌酰胺酶产生的影响……………唐擷萸、胡志新、王景田、赵治川、王先进 (320)

6-氨基青霉烷酸的提炼和精制	黄乐毅、朱汝锦、陈瀟庆	(324)
3-邻氯苯基-5-甲基-4-异恶唑青霉素的合成(摘要)	李育舜、沈文娟	(327)
2-乙氧基-萘基青霉素的合成(摘要)	何毓明、王文梅	(329)
α -氨基-苄基青霉素的合成(摘要)	何毓明、王文梅	(331)
Lg-Threo-1-对硝基苯基-2-氨基-1,3-丙二醇的消旋(摘要)		
	任秀娟、楊福秋、李潤蓀	(332)
Ls(+)-Threo-N-二氯乙酰基对硝基苯絲氨酸甲酯的还原(摘要)		
	楊福秋、沈文娟	(334)
101×4 离子交换树脂的流化特性	朱守一、奚一民、楊庆賢	(336)
溶解氧测定器及其用于抗菌素产生菌摄氧率测定的研究		
	俞俊棠、屠天强、朱錫甫、韓崇家、汪嘉梁、王佩賢	(346)
发酵过程中气-液(发酵液)界面傳质系数 K_{La} 的測定方法	李 楨	(355)
发酵液中溶解氧連續測量仪的研究	李 楨	(360)
編后記		(370)

六十年代抗菌素的进展

童 村 崔 慧 蓮

(化工部上海医药工业研究院, 上海)

临床使用青霉素的历史已有 20 多年, 鏈霉素、氯霉素、金霉素、土霉素、四环素、紅霉素等也有 12—20 年。临床使用寿命这样长的药物并不多。各种抗菌素不但在临床上长期使用, 继续保持卓越疗效, 不为其他药物所替换^[1], 而且很多抗菌素的使用范围还随抗菌素研究工作的深入而扩大。

近年来, 抗菌素研究和生产已取得了巨大的成就: 抗菌素新品种不断出现; 多种半合成新青霉素对耐药金黄色葡萄球菌感染的卓越疗效, 基本上解决了由于抗菌素应用而产生的金黄色葡萄球菌耐药问题^[2-4]; 有些抗菌素在临床上的用途扩展到化学治疗范围以外^[5-6]; 工业生产上劳动生产率进一步提高, 等等。

我国解放后不久, 从无到有地建立了抗菌素工业, 取得了辉煌的成就: 从事抗菌素研究与生产的队伍不断扩大; 能自己设计现代化的抗菌素工厂; 设计并制造生产设备; 抗菌素的产量与品种每年都有增加; 从国内土壤中找到了有治疗效果的抗菌素产生菌。国内由于细菌感染而致的疾病, 得到了基本的控制, 等等。都是令人兴奋的事实^[7]。

抗菌素研究与生产, 除了牵涉到有关微生物学、化学和化学工程学的很多学科外, 属于生物学和医学范畴的很多学科几乎都和它有关。抗菌素研究与生产的专著和专业期刊很少, 但文献资料却很多, 刊载这些文献资料的期刊, 估计有 60 种以上。抗菌素研究和生产的范围广泛而又复杂, 文献资料既多而且分散, 要全面探讨是比较困难的。现在从六十年代抗菌素的进展中, 仅就一般概况、抗菌素生产工艺、半合成与全合成抗菌素和今后发展趋向等四方面加以讨论。

一 般 概 况

近几年来增加的新品种主要有对耐药金黄色葡萄球菌有作用的梭酸 (fusidic acid), 抗结核菌的 rifamycin SV, 对尿道革兰氏阴性及綠膿杆菌感染有效、可用于治疗肾盂肾炎的广谱抗菌素 gentamicin, 抗革兰氏阳性菌的药效可达骨组织, 推荐用于治疗金黄色葡萄球菌感染的骨髓炎的 lincomycin, 对抗革兰氏阳性菌和结核菌特别是牛型结核菌均有有效的 capreomycin。此外, 还有很多种半合成新青霉素, 将在以后讨论。

新青霉素的出现解决了由于抗菌素应用而产生的金黄色葡萄球菌的耐药问题, 但是这些半合成新青霉素各国都没有普遍应用, 例如 1962 年美国肺炎患者的死亡率比前几年有所增加, 表明还没有足够数量的新青霉素控制耐药金黄色葡萄球菌。二甲氧基苯基青霉素、5-甲基-3-苯基-4-异噁唑青霉素、6-(α -乙氧基-1-萘酰基)青霉烷酸等半合成新青霉素在体外诱导葡萄球菌产生耐药性的试验结果表明, 以上几种半合成新青霉素与苄青霉素比较, 对葡萄球菌引起耐药性的速率非常缓慢, 特别是 6-(α -乙氧基-1-萘酰基)青霉

烷酸和 5-甲基-3-苯基-4-异噁唑青霉素^[2]。一年多来我们从上海市各医院收集了 1000 多株耐药金黄色葡萄球菌, 还未发现对二甲氧基苯基青霉素和 5-甲基-3-苯基-4-异噁唑青霉素不敏感的菌株。

抗菌素产量方面若以 1957—1959 年三年医用抗菌素产量总和为基准, 则 1960—1962 三年产量总和: 我国增长 2.78 倍, 美国增长 1.34 倍, 日本增长 1.3 倍。估计目前世界医用抗菌素总产量在 4000 吨以上。从表 1、2 美国和日本两个国家近十年来抗菌素产量增长情况, 可见近年抗菌素研究和生产进展一斑^[8-13]。六十年代产量增长远远超过过去任何时候。美国在 1959 年以前, 双氢链霉素与链霉素硫酸盐两者产量比为 3:2, 1960 年以后转为 2:3。这是因为临床报告证明双氢链霉素持久应用, 对内耳产生不可逆的毒性反应之故。这几年美国和日本的青霉素产量比以往任何时候均大, 1960 年以前, 美国青霉素保持在 300 吨左右, 1960 年以后, 逐年增加, 1962 年高达 558 吨。1960 年以前日本青霉素年产量为 18 吨左右, 1962 年达 32.8 吨。目前我们还未掌握足够资料分析其急剧增长的原因。

表 1 美国 1953—1962 的产量(吨)

品 种 \ 年 份	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962
青霉素	342	286	206	285	346	315	257	343	450	558
链霉素		64	70	59	90	78	129	274	305	366
双氢链霉素		202	167	223	264	254	213	178	176	256
四环素				100	184		139	130	179	195
医用抗菌素总产量	737	830	733	890	1106	1250	1036	1281	1502	1799
饲料及食物保藏用抗菌素	197	217	236	253	394		635	544	825	1069
抗菌素总产量	934	1047	969	1143	1500		1671	1825	2327	2868

注: 1963 年青霉素总产量为 570 吨。

表 2 日本 1953—1962 的产量(吨)

品 种 \ 年 份	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962
青霉素	24.2	34.4	26.4	18.8	15.3	16.7	18.1	24.5	28.2	32.8
链霉素	40	46	50	47	53	56	45	48	55	61
四环素		0.5	2	12	11	18	10	13	18	23
土霉素	1.8	1.1	1.2	2.2	2.4	1.3	0.6	0.7	0.7	0.7
金霉素	1.9	3.7	5.2	0.8	1.3	1.0	0.6	0.1	0.5	0.3
医用抗菌素总产量	78.3	94	104	93	99	118	91	109	137	160

非医用抗菌素和医用抗菌素增长的情况相仿, 1960 年以后美国非医用抗菌素的产量亦有较大增加, 1962 年达到 1000 多吨, 约为全部抗菌素总产量的 27%。

有的抗菌素除了作为化学治疗剂外, 在临床上还有其他用途。四环素可与肿瘤组织结合或沉积在骨骼生长部位 (osteogenetic region), 在紫外光下呈现黄色荧光反应。利用这个原理, 可以试用四环素作为胃癌、骨骼疾病的诊断剂。我国也曾以四环素作胃癌诊断研究^[5]。经其他方法确诊胃癌 52 例患者, 连续口服四环素 4—5 日后, 抽取洗胃液, 经处理后, 在紫外光下观察荧光反应, 试验结果, 确诊率达 96%。此法操作简单, 确诊率

高,对病人无大痛苦,若在应用过程注意避免对诊断有干扰的因素,提高确诊率,这将是值得推荐的一种胃癌辅助诊断法。此外,尚有灰黄霉素可治疗风湿病^[6]、心绞痛^[14]等病症的报道。青霉素的降解产物——青霉胺用于治疗胱氨酸尿,获得一定疗效^[15]等。这些例子说明有的抗菌素在医疗上的用途可扩展到化学治疗的范围以外。

抗菌素在农牧业上的应用,近年来进行了很多研究工作。杀稻瘟病素 S (blasticidin S) 对稻瘟病的卓越防治效果,是六十年代的新成就。据报道^[12],1963 年日本稻瘟病流行,不少地区估计颗粒无收,有机汞剂已不能挽救严重的灾情,应用杀稻瘟病素 S 后,收成没有减产。日本杀稻瘟病素 S 产量由 1961 年的 1 吨至 1963 年一跃而为 35 吨,现在还在扩建工厂,增加产量,估计将取代大部分有机汞剂。

应用抗菌素保藏食品是否会导致耐药菌加速产生,是多年来未能肯定的问题。据美国 1961 年报告,长期服用抗菌素导致大肠杆菌耐药并不严重^[16]。我国人民讲究烹调,鱼鲜、猪肉或其他食品大都经过蒸煮或油炸,即使食物中残存有微量抗菌素,可在烹调过程中破坏,可以认为不致存在加速产生耐药菌。

近年来找到的新抗菌素每年估计约有 100 多种,但是和过去一样,实际有效的只是少数,要得到有用的抗菌素显得愈来愈困难了。有些新抗菌素的化学结构确定后,发现是已知抗菌素。如粘菌素即多粘菌素 E, framycetin 即新霉素^[17], glebomycin 和 bluen-somycin 的化学结构完全一样,都是链霉素族抗菌素^[18-20]。Zygomycin A₁ 和 A₂ 的结构与 paromomycin 和 paromomycin II 相同^[21, 22]。

新抗菌素筛选除针对医疗外用,还注意到作为其他用途。前面谈到的杀稻瘟病素 S 就是一个例子。最近美国从燕麦根中分离得到的 avenacin, 毒性太大,估计不能作为医用,但可抑制十种植物和动物的病原菌,有可能用于防治植物病害^[23]。一些过去认为副作用较小的抗菌素,近年国外新发现了一些副作用^[24]。肿瘤、绿脓杆菌感染和某些病毒引起的疾病以及对现有各种抗菌素很容易引起耐药等问题,也和过去一样,还缺少有效的抗菌素。

抗菌素生产工艺

六十年代抗菌素生产工艺的进展,是与有关学科所取得的新成就密切相关的,现将各方面的新进展分述如下。

继五十年代以后,我国利用各种强烈因素处理与自然选育相结合的方法,继续选出青霉菌、链霉菌、金霉菌、土霉菌等优良菌种,应用于生产中取得了很大成绩。对诱变因素引起的形态突变、生理突变与产量突变的关系进行系统研究,认为除了诱变因素选择外,要兼顾突变完成的最适时间和其他条件。为使突变型稳定下来,又有赖于自然选育。用磷³² 内照射处理红霉菌,获得了红霉菌 P³²-102 菌株,产生红霉素的量比对照高 20% 左右。

国外用噬菌体作为生物诱变因素诱发营养缺陷型,获得较为满意的效果,借放线菌噬菌体的作用,将不产生链霉素的链霉菌变种,回复产生链霉素的能力^[25]。用噬菌体诱发红霉菌突变,获得 96% 形态突变型,98% 抗噬菌体突变型,而抗性变种产生红霉素的量不变^[26]。

菌种选育的任务,现在已经不仅是提高菌种产生抗菌素的量,同时还须要通过菌种的

基因突变和基因重组改变抗菌素的性质,分子生物学新学科的形成,对这方面的研究将起推动作用。

放线菌的种间基因重组,青霉菌与灰黄霉菌的种间基因重组得到的杂种,在形态特征方面不同于原种。以上这些工作还仅仅是一个开端,在抗菌素生产工艺上的应用还有一定距离。看来应用遗传学的方法进行菌种选育以改变抗菌素的某些特性是有可能的。

杂交育种,尤其是放线菌杂交育种,从发现到现在只不过十年历史,我国自1959年以来,开展了这方面的研究,先后对金霉菌、红霉菌和土霉菌等菌种进行种内和种间杂交试验,在实践上和理论上都取得了初步的成就^[27]。尤其重要的发现是杂种对诱变因素格外敏感,因而在菌种选育中采用杂交和诱发突变相结合的选育方法,更具有实践意义。

菌种选育应以诱发突变(基因突变)或诱发突变和杂交(基因重组)相结合,并以自然选育稳定突变型。

近年来,国外对抗菌素产生菌的生理代谢研究进行了不少工作,采用生化变种、标记同位素法、分离鉴定抗菌素产生菌代谢过程的中间体,获得具有指导实践意义的研究成果。例如应用放射性同位素 C^{14} , 研究生物合成红霉素机制,证明丙酸以完整的三碳单位进入红霉素内脂^[28],但是这方面的工作还有争论。生物合成灰黄霉素时,以 C^{14} 灰黄霉酮 C 及 Cl^{36} 灰黄霉酮 B 及 A 研究它们渗入灰黄霉素分子中的情况,发现灰黄霉酮 B 及 C 都可渗入灰黄霉素分子中,而灰黄霉酮 A 没有渗入灰黄霉素分子中^[29]。研究链霉素生物合成时,采用同位素稀释法,探讨肌醇对 C^{14} -葡萄糖放射活性参与链霉素分子中的影响,证明肌醇为链霉素分子中链霉胍部分的前体物质,它对链霉素生物合成有直接刺激作用^[30]。利用 $[C^{14}$ -胍基]-精氨酸作链霉素生物合成试验,结果表明在接种后 96 小时,加 $[C^{14}$ -胍基]-精氨酸于培养液内可较 72 小时加入的获得更多 C^{14} 标记链霉素,将标记链霉素降解,发现所有标记碳原子都集中在链霉胍部分的两个胍基上,因此认为链霉素的胍基是通过链霉菌转胍基酶的作用而由精氨酸提供的^[31]。加 C^{14} 标记化合物于灰色链丝菌培养基内进行链霉素生物合成,再降解所产生的链霉素,证明链霉素中 N-甲基-L-葡萄糖胺的甲基并非由甲酸盐而是由蛋氨酸上 S-甲基而来,链霉糖是从葡萄糖转化而来^[32]。

标记同位素和生化变种配合,探讨一些复杂的生物合成过程,亦已取得一些成果。如应用各种金霉菌与土霉菌变种和不同前体,阐明四环素生物合成途径,利用不同变种的特点和前体的化学结构相互配合,可以得到特定的四环族抗菌素。如以 1, 3, 10, 11, 12-五羟基-萘骈萘-2-甲酰胺作前体,用金霉菌变株可合成 6-去甲基金霉素^[33-35]。

使用抗代谢剂影响发酵过程方面,这几年也进行了一些研究工作。用乙硫丁氨酸或氨基嘌呤作为蛋氨酸的抗代谢剂可以使只能产生金霉素和四环素的菌种产生去甲基金霉素。因为甲基化反应是由对-氨基苯甲酸经一系列反应分别得到叶酸和 5-甲酰基-5, 6, 7, 8,-四氢叶酸,最后由具有活性的各种甲基传递辅酶来完成。磺胺类药物是一些对-氨基苯甲酸类抗代谢剂,在发酵培养基内加入某种磺胺药如磺胺嘧啶,可促使产生去甲基金霉素。通过应用抗代谢剂研究发酵过程,可以得到新产物,并说明生物合成途径^[36-38]。

将微生物的产物从生源观点分为菌体与代谢产物两大类。根据菌体生长,碳源利用与代谢产物形成速度的变化及其相互关系,将发酵过程分成三种类型^[39-40],即 1. 菌体生

长、碳源利用与产物形成相平行；2. 发酵第一时期菌体迅速增长，产物形成很少，在第二时期产物以高速度形成；3. 产物一般在菌体生长接近或达到最高时期形成。产物与碳源消耗无定量关系，产量远低于消耗碳源的量，其最高产量不超过碳源 10%，即所谓次生物质，大部分抗菌素如青霉素、链霉素、新生霉素等都属于此类型。根据菌体生长和产物形成的关系，对不同生理时期采取适宜措施，是提高产量的一个方向。

应用丰富培养基或在发酵过程中补充培养基的方法是近年来提高发酵单位的重要经验之一^[41-43]。适当掌握补料时间和补料液的配比是提高发酵单位的关键，例如以玉米浆、黄豆饼粉作为培养基，红霉素的形成是在菌体达到最高生长时开始的，若在培养基中蔗糖耗完毕时补加蔗糖，红霉菌即重新开始合成红霉素，但是当蔗糖与黄豆饼粉或其它氮源同时加入时对抗菌素合成则无促进作用。

我国在抗菌素产生菌的生理生化代谢方面，进行了不少研究工作，如本书收编的这方面论文，对抗菌素生产将起指导作用。

国外在深层发酵的通气-搅拌、发酵设备及其附件、灭菌技术等方面，继五十年代以后有了新的发展。以链霉素、卡那霉素等的发酵液为材料、研究非牛顿型流体流变学的结果^[44-47]，得到了搅拌动力放大的新关系^[48-52]，流动形态和混和时间的研究成果^[53]为连续发酵研究工作提供了条件。对于通气过程特别是非牛顿型流体单气泡行为、气泡群传质和氧传递的研究^[50, 51]，使对供氧、氧的利用等情况更为明确。较高的动力消耗是抗菌素生产的重要特点之一，按一般计算生产耗电总量的 3/4 以上是用于发酵工段，但认为加大发酵罐的搅拌强度以节约通气量是比较经济的途径^[54]。

提高发酵设备的装料系数是提高抗菌素工厂设备生产潜力的措施之一。对于发酵过程的泡沫问题，近年来致力于以机械方法和超声波法^[55]进行消沫的研究，并有了一定的进展^[56]。还有利用带有伞形扩大管的旋风分离器捕集罐内的泡沫，除去气体后的发酵液再回入罐内的方法是较好的经验^[57]。有效地将发酵过程生成的泡沫消除，非但可以增加装料量提高设备利用率，同时也由于代谢过程的废气及时排除，有利于生物合成。

用平板式热交换器进行培养基灭菌^[58-60]，这种设备的传热面大，使用效果良好。应用带标记同位素研究空气除菌的实验技术提高了实验的可靠性^[61]，使设计工作有所依据，乙烯醇树脂类合成纤维作为过滤介质，解决了纤维不能加热消毒的缺陷^[62]。

1963 年国内大规模生产的几种主要抗菌素，发酵单位有较大增长，与 1961 年比较，先进厂青霉素提高 20.8%，链霉素提高 20.0%，土霉素提高 35%，四环素提高 39.4%。1964 年上半年又有更大幅度提高。各种抗菌素发酵单位的提高除了反映菌种选育的成就外，在发酵方面，采用丰富培养基是其主要原因之一。丰富培养基有一次丰富和中间补料等方式。采用丰富培养基发酵必须与通气搅拌、消沫等措施相适应。例如四环素发酵，当通气搅拌不良时，易产生畸形菌丝，即使采用丰富培养基，也得不到高产量。银-银电极测定四环素发酵过程溶解氧的研究工作对阐明应用丰富培养基时，四环素发酵过程中供氧和氧的利用等情况有一定助益，还可提供发酵罐放大设计的参考依据。在四环素发酵中，提高前期单位，根据还原糖的变化，在过程中续加葡萄糖控制金霉素代谢，延长了四环素合成的旺盛阶段，使发酵单位提高 50—80%。研究磷对地霉菌代谢的影响，证实玉米浆中有利于生物合成土霉素的因子主要是六磷肌醇。

抗菌素发酵过程污染杂菌的防止问题,自从我国抗菌素工业建立开始即予以重视,曾经系统研究染菌原因,提出防止污染杂菌的措施^[63-64]。抗菌素发酵染菌,主要原因系设备渗漏,培养基灭菌不彻底,空气或种子带菌。培养基消毒时所产生的泡沫窝藏耐热的芽孢杆菌,未被泡沫外的 120°C 温度杀死是灭菌不彻底的主要原因。防止或消除泡沫,可以避免由此而引起的染菌。如何保证空气过滤设备的严密性,是减少染菌的另一措施。棉花或其他过滤介质在消毒时若被烤焦,造成漏隙,也会使杂菌随空气窜入发酵罐中。过滤介质若被油水所浸渍即失去过滤效能,在空气过滤系统中,采取冷却,加热保温以去除空气中的水和油并保持较低相对湿度的措施,保证了过滤介质的正常作用^[65]。接种室空气含菌量与种子带菌有关,消除霉菌孳生基地并喷射抑制霉菌与细菌的抗菌素,可以使接种室成为无菌室。在发酵过程中加强无菌观念,重视上述各种因素,深入分析产生染菌的原因,加强技术管理等,基本可以避免抗菌素发酵过程污染杂菌。

目前国内外生产中所取得的这些成就,在很大程度上还是经验式或半经验式的,如何将这些成就提高到理论,再指导生产实践,以期取得更大的成就,是愈来愈迫切的任务。

抗菌素分离提纯技术近年来也有所进展,特别是发展比较晚的用于分离提纯抗菌素的技术,如离子交换技术,1962 年有的学者认为有些离子交换树脂对有机大分子具有较好选择吸附性,是由于熵效应的结果^[66],这些离子交换树脂大多数具有较复杂的不规则的结构。

有人在研究两性离子交换树脂吸附电解质的基础上,提出了应用两性离子交换树脂分离提纯红霉素、青霉素和金霉素的报告,认为选择两性离子交换树脂中异电荷离子交换官能团的适当配合方法,可使离子交换树脂的选择吸附性有所提高。这种离子交换树脂的另一优点是在一定 pH 值时,树脂上的异电荷形成内盐键,有利于解吸附。

在成品的干燥技术方面,除喷雾干燥仍然应用外,较新型的干燥设备如气流干燥器在国外已应用于四环素成品干燥,大大加快干燥速率而不影响成品的化学效价和生物效价^[67]。

抗菌素分离提纯的收得率是有一定限度的,要提高不是容易的事。由于生产研究工作者的努力,抗菌素分离提纯技术不断改进,收得率继续提高。我国 1964 年上半年四环素和土霉素在大规模生产中的分离提纯收得率又比 1963 年提高 13.5% 和 17.4%。大规模生产的其他抗菌素,分离提纯的收得率也有不同程度提高。

我国废除菌丝过滤工序提取链霉素的生产工艺^[68],经过四年多时间的生产实践,在缩短工艺流程,减少劳动强度,提高收得率,减少操作费用等方面,都达到预期效果。最近 1—2 年来,在总结废除菌丝过滤工序提取链霉素工艺的同时,研究了流化床和脉动床离子交换的技术。为今后离子交换过程、设备设计和工艺改进提供了条件。国外在链霉素提取过程中,特别注意防止杂菌污染,这对提高产品质量有一定意义。

近年来国内为提高各种抗菌素的产品质量曾经从不同角度进行了研究改进,取得了良好效果。例如比较了喷雾干燥和冷冻干燥对链霉素质量的影响。在喷雾干燥中考查了热气流逸出干燥室途径,发现受粉器由于热气流的影响,温度升高,是使链霉素质量降低的原因。加长热气流通道后,产品质量显著提高。采用 tergitol-7、五氯酚和亚硫酸复盐中间纯化方法制备纯度很高的链霉素临床样品,现试验仍在进行中,可以预期在国家科委

领导下和全国有关部门协作下,链霉素在临床使用时的副反应,是能够找出原因的。应用黄血盐和硫酸锌作为纯化剂,可获得质量优良的土霉素制品。以沉淀法结合溶剂萃取法分离提纯的四环素经与意大利、英国的产品比较旋光、消光系数、纯度和效价等控制项目,其结果表明,国内产品的上列各控制项目达到或超过以上两国产品的水平。注射青霉素钾盐,注射部位有疼痛感,现已准备改制青霉素钠盐。经分别研究异辛酸钠和醋酸钠作为制备青霉素钠盐的成盐剂,证明都可达到预期的效果。

抗菌素生产工艺周期长,生产稳定性差,包括的学科和工种多,原料品种多而不一致,生产连续性,安全生产和劳动保护有特殊要求,因此在技术上和管理上都有较高要求。在党的正确领导下,通过抗菌素工作者的努力,六十年代伊始在抗菌素工业生产和研究上都已取得了不少新的成就。今后随着相关学科和工业部门的发展,还将在抗菌素工业生产中,出现更多的新品种、新设备、新工艺、新技术。

半合成与全合成抗菌素

1959年发现用发酵法或酶裂解法制得6-氨基青霉烷酸(6-APA),用化学方法接上侧链获得半合成新青霉素后,世界各国对半合成抗菌素引起了很大兴趣,近年来这方面的进展很快。

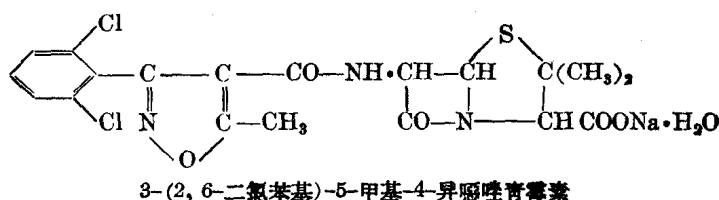
日本学者首先从青霉菌的发酵液中发现青霉素酰胺酶和青霉素的母核^[69],但当时未得到纯制品。Sheehan用化学合成方法获得了6-APA^[70-72]。这些工作为用酰氯酰化6-APA得到新青霉素准备了条件。但对6-APA和新青霉素研究工作的发展具有决定意义的是在无前体发酵的青霉菌发酵液中分离出6-APA和用酰胺酶裂解青霉素而获得6-APA。目前应用的生产方法主要为酶裂解法。1960年报道酶作用的基质浓度为3万单位/毫升,转化率为95%,随着工艺的改进,提高了青霉素酰胺酶的活力,基质浓度提高至10万单位/毫升,6-APA收率可达94%^[73],由于基质浓度的提高,可在裂解液中直接把6-APA结晶出来,也便于利用在水中较稳定的酰氯在裂解液中缩合成各种新青霉素。

国内6-APA的研究工作于1960年开始,当时既无菌种,文献报道也不多,完全以自力更生的精神展开了这方面的研究工作,获得了产生酰胺酶的大肠杆菌菌种。在培养基中加入苯乙酸或苯乙酰胺可提高酶活力几倍到10余倍,近来国外文献也强调苯乙酸的重要性并证明可作培养大肠杆菌的碳源。国外小量生产6-APA是用沙氏离心机收集大肠杆菌菌体。我们选得了一株大肠杆菌可用过滤法收集菌体,在生产6-APA过程中可以不用离心机,更适宜于大规模生产。应用味精母液作为培养基可提高酰胺酶活力。目前在40—80升规模,菌体用量为10%,基质浓度已达5万单位/毫升,裂解收率平均为88.3%。基质浓度和裂解收率还在继续提高。

国外在新型侧链的筛选方面,进行了大量研究工作,据统计已发表了40种以上的新类型,衍生了数以千计的新型青霉素。同时也研究了侧链和6-APA缩合的各种方法,按酰氯在水中的稳定性而决定在水中(或裂解液中)或有机溶剂中进行缩合。

合成的新青霉素数目虽然很多,但其中临床效果显著的只有少数。在青霉素V模型的基础上半合成了几种新青霉素如苯氧乙基和苯氧丙基青霉素。虽然解决了耐酸的问题,可供口服,但耐青霉素酶的问题并未解决。1960年找到了第一个对青霉素酶稳定的

半合成青霉素——2, 6-二甲氧苯基青霉素 (methicillin)。它的制菌谱和青霉素 G 或 V 差不多, 仍系窄谱抗菌素, 对敏感的或耐药的金黄色葡萄球菌其最小抑菌浓度都为 1.25—2.50 微克/毫升, 它和已知抗菌素无拮抗和协同作用, 但和梭酸 (fusidic acid) 合用, 治疗金黄色葡萄球菌感染引起的败血症, 具有协同作用。该抗菌素的出现还有效地控制了由耐药金黄色葡萄球菌引起的其他感染。在二甲氧苯基青霉素出现之前, 由于严重耐药金黄色葡萄球菌感染而致死的死亡率达 60—80%, 二甲氧苯基青霉素应用于临床后, 死亡率即降为 20%^[74]。二甲氧苯基青霉素自 1960 年开始应用至今极少发现有耐药菌, 不失为对耐药金黄色葡萄球菌有效的药物。其缺点为不耐酸, 因而不能口服, 排泄快, 用量大, 注射后局部疼痛。从二甲氧苯基青霉素的结构使人联想到可能是侧链的立体障碍而保护了青霉素分子中的 β 内酰胺环不被青霉素酶所破坏。在此基础上进行设计, 找到了 5-甲基-3-苯基-4-异噁唑青霉素 (oxacillin)、5-甲基-3-邻-氯-苯基-4-异噁唑青霉素 (cloxacillin) 和 6-(α -乙氧基-1-萘酰基) 青霉烷酸 (nafcillin), 这三个化合物都具有耐酸和耐青霉素酶, 可供口服, 剂量较小等优点。基本上克服了二甲氧苯基青霉素的缺点。1963 年报道的 3-羧基-2-喹噁啉基青霉素二钠盐^[75] (quinacillin), 是由喹噁啉二羧酸酐和 6-氨基青霉烷酸在二甲基甲酰胺和三乙胺中缩合而得。它对酸和青霉素酶皆稳定, 并具有耐热的特性。侧链为 3-(2, 6-二氯苯基)-5-甲基-4-异噁唑的青霉烷酸衍生物, 口服吸收更好, 血浓度比 5-甲基-3-邻氯苯基-4-异噁唑青霉素高 1 倍^[76]。 α -氨基苄基青霉素 (ampicillin) 是在青霉素 G 分子侧链的 α -碳原子上引入一个氨基, 在制菌谱上发生了显著的改变, 由窄谱变为广谱, 而且耐酸, 因对青霉素酶敏感所以对耐药葡萄球菌感染无效。这一化合物的研究成功使科学家们有信心将青霉素改造成用途更广的抗菌素, 使半合成青霉素的研究前途更广阔。



头孢子菌素是一族含有多种成份的抗菌素, 其中头孢子菌素 N 即为 6-APA 的衍生物, 而头孢子菌素 C 的主核是 7-氨基头孢霉烷酸 (7-ACA), 其结构与 6-APA 相似而不完全相同, 是一个六元二氢硫氮杂苯环 (dihydrothiazine) 而不同于 6-APA 的五元饱和噻唑环。青霉素的过敏是由于母核的噻唑环所引起, 因此试图以头孢子菌素 C 来克服青霉素的过敏, 但头孢子菌素 C 的抗菌作用仅为头孢子菌素 N 的 1/10, 为青霉素 G 的 1/1000。若将头孢子菌素 C 水解再接上不同侧链可获得不同抗菌活力的化合物, 大大增强其抗菌作用。其中 7-噻唑-2-乙酰胺-头孢霉烷酸 (cephalothin) 是这类衍生物中具有临床价值者。抗菌谱广, 对青霉素酶稳定, 与蛋白质结合小, 和其他抗菌素有协同作用。较新的衍生物还有 2, 6-二甲氧苯基头孢子菌素^[77]。最近报道的^[78, 79] cephaloridine (ceporin) 系以吡啶代替母核中的乙酰基, 可以减少注射时的疼痛感。这类化合物没有过敏性, 对青霉素酶稳定, 活力不受血清影响, 对革兰氏阴性细菌的作用强于 ampicillin、四