

青霉菌的生理和 青霉素的生物合成

周家惠著

科学出版社

1
.1
11

青霉菌的生理和青霉素的生物合成

周 家 惠 著

科学出版社

1959

內 容 簡 介

这本小册子是收集了 1943—1958 年的世界各国有关青霉素发酵方面的文献 250 篇加以归纳写出的综述。其内对青霉菌的菌种和选种,营养,发酵时的生化变化和各种因素对青霉素产量的影响,以及青霉素生物合成的机构作了深入的讨论。读者通过此册子,亦可明了其他抗生素发酵方面的知识。在书末附有记载详细的原始文献,在付印前又补充了一些较新的重要资料,文中又着重介绍对个别问题加以详细评述的综合性报导。可供从事抗生素、微生物学和其他发酵工作者作为参考用书。亦可供有关这方面的大学生作参考之用。

青霉菌的生理和青霉素的生物合成

周 家 惠 著

*

科学出版社出版 (北京朝陽門大街 117 号)

北京市書刊出版业營業許可證出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总經售

*

1959 年 3 月第 一 版

1959 年 3 月第一次印刷

(京) 0001—5,300

書号: 1661 字数: 55,000

开本: 850×1158 1/32

印张: 2 1/4

定价: (9) 0.34 元

前 言

抗生素除了治病外,在动物飼养上,植病防治和食品保存上皆有显著的成果。随着我国各项新的科学技术部門的建立,我国抗生素事业在飞速的发展着:在第二个五年計劃期間,全国各地将要建設二十多个抗生素厂;在各地的乡、社中已开始用土法生产抗生素刺激幼畜的生长;到明年我国将爭取大量生产有实际应用价值的抗生素二十余种。

由于抗生素在医学上的巨大价值,这門科学簡直是日新月异的发展着。因此評論这方面的材料有迫切的必要性。为此作者根据几年来的一些工作經驗和微小体会,搜罗了历年来各国有关青霉素发酵方面的主要文献加以綜合性的叙述,写成这一本小册子以供抗生素工作者們参考,借以發揮抛砖引玉的作用。讀者通过此册子举一反三亦可了解一些其他抗生素的有关发酵方面的知識。

著者限于能力和經驗,缺点和疏忽之处在所难免。希望讀者本着爱护和关怀的热忱,随时加以批評和指正。作者預致深切的謝意。

在写本书时,承曹国柔先生給予了很大的鼓励和支持,并提供許多宝贵的意見謹此致謝。

周 家 惠

1958年3月于石家庄华北药厂

目 录

第一章 引言	(1)
第二章 菌种和选种	(4)
(一) 能产生青霉素的真菌	(4)
(二) 选种的意义	(4)
(三) 选种方法	(6)
第三章 通气和搅拌	(18)
第四章 营养	(28)
(一) 碳源营养	(28)
(二) 氮源营养	(32)
(三) 矿质营养	(33)
第五章 发酵时的生化变化	(35)
第六章 影响青霉素产量的各种因素	(39)
(一) 接种菌丝	(39)
(二) 温度	(39)
(三) pH 值	(40)
第七章 前体	(41)
(一) 酰基侧链	(41)
(二) β -内酰胺-多四氢噻唑环	(47)
第八章 青霉素生物合成的机制	(49)
参考文献	(54)

第一章 引 言

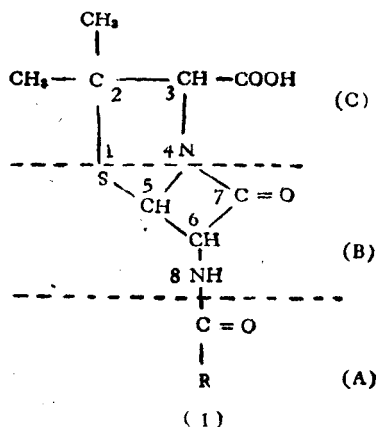
常常可以注意到,各种微生物混合培养时,一种微生物可以抑制他种微生物的生长。远在上世紀,微生物家 L. Pasteur 和 И. И. Мечникова 已經开始研究微生物之間的对抗問題,并利用此現象于治疗目的而获得了一些有价值的实验事实。在 1871 年 В. А. Манассеин 注意到接种某种青霉菌孢子于液体中,則不再生长細菌。1872 年 А. Г. Полотебнов 在自己的研究《霉菌的病理意义》中指出青霉菌在治疗长期不能痊愈的潰瘍和脓肿时具有利作用;将青霉菌貼附于去脓清洁的疮伤处,痊愈要比沒有青霉菌的快。1877 年 П. В. Лебсдинский 研究青霉菌的性质时发现,口服被青霉菌孢子污染过的食物后,病人的排泄物中細菌数量显著减少。以后 М. Г. Тартаковский (1904 年)观察到,青霉菌分泌的物质能杀死鸡瘟疫病菌。

在 1929 年 Alexander Fleming 报告,一种青霉菌(Penicillia)菌种的培养液具有抑制金黄色葡萄球菌及其他某些革兰氏阳性菌的生长能力。并将这种具有抗菌性质的活性物质命名为青霉素。該菌经过鑑别确定为音符型青霉菌(*Penicillium notatum*)。

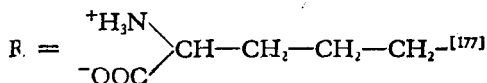
1940 年研究出从青霉菌培养液中提取青霉素的方法。所得粗制品具有高度抗菌活性,而对人体无毒。第一次治疗效果(1941)非常良好。在 1943—1944 年发展了一个新的工业部門——生物合成青霉素工业。起初用表面培养法,不久改用沉沒培养法大量生产青霉素。1945 年由人工合成法制取苯青霉素(青霉素 G)获得成功,但产量很少。以后虽然报导了一些新而独特的人工合成法,但直到现在还没有找到一个合理的方法。如 Sheehan 等^[1]在 1948 年开始研究青霉素的合成,經 9 年后在 1957 年刊载了合成青霉素 V (苯氧甲基青霉素)的报导。除青霉素 V 外,还得到为量 2—5 克

的 10 种合成青霉素。但这些方法皆不能用于工业生产上,至少在相当长的一段时间内尚不能代替生物合成的方法。

1943 年年中确定,青霉素不是一种纯一的化合物,而是许多含 β -内酰胺-多氢噻唑环 (β -lactam thiazolidine ring system) 而仅其酰基侧链 (Acyl side-chain) 的 R 基不同的一族化合物,它们共同的结构经证明如下。



许多年以前已经知道有许多有机酸能被青霉菌利用形成青霉素的侧链。因此把各种含 R 基的有机酸加到培养基中,获得了数十种青霉素。特别值得提出的是苯氧甲基青霉素 (青霉素 V) $R = C_6H_5OCH_2-$ 。它和其他青霉素不同点为耐酸,而可用于口服^[11, 226]。丙烯硫甲基青霉素 (青霉素 O 或 AT) $R = CH_2 = CH - CH_2 - S - CH_2 -$, 它的特点是不会引起过敏反应,适用于对青霉素 G 过敏的病人^[170]。某些 *Cephalosporium* 菌种产生的抗生素 Cephalosporin N (青霉素 N 或氨基羧基丁基青霉素)



亦是一种青霉素类型的化合物。美国研究者称此抗生素为 Synne-matin B。由于在青霉素分子中增加了一个正电荷 (氨基) 和一个

阴电荷(羧基),它的化学和生物性质和其他抗生素皆不同。能作用于某些革兰氏阴性菌,特别可用于伤寒沙門氏菌感染^[241]。由于这些R基性质不同而影响了青霉素的性质。因而开辟了研究生物合成新青霉素的广阔远景。

由于对青霉菌的生理进行了仔细的研究,使得在较短的十多年来青霉素的产量从每毫升数十单位增加到5000—6000单位。其决定性的步骤是(1)菌种 *Penicillium notatum* 改为橄榄型青霉菌 (*P. chrysogenum*)。(2)表面培养法改为沉没培养法。(3)利用强力作用因素及无性杂交挑选活性菌种。(4)利用青霉素G的前体。(5)由于培养基的改良,应用丰富培养基和良好的通气及搅拌。因此本文将环绕这些问题加以综述及讨论。

第二章 菌种和选种

(一) 能产生青霉素的真菌

以前认为只有 Fleming 氏菌种 *Penicillium notatum* Westling 能产生青霉素。这种观点是错误的。近 15 年来发现许多青霉菌属能产生青霉素或其类似物质。如 *P. chrysogenum* Thom^[242], *P. nigricans* Bain, *P. fluorescens*, *P. rubens* Biourge, *P. avellaneum* Thom, *P. baculatum* Westl., *P. turbatum* Westl.^[245], *P. meleagrinum* Biourge, *P. euglaucum*, *P. divaricatum*, *P. roseo-citreum*, *P. barnense* V. Beyna, *P. bialowiezense* Zal.^[246], *P. brunneo-rubrum* Dierckx, *P. cyaneo-fulvum* Biourge, *P. citreo-roseum* Dierckx, *P. griseo-roseum* Dierckx, *P. griseo-brunneum* Sopp., *P. godlewskii* Zal.^[34], *P. griseo-fulvum*, *P. steckii*, *P. chloroleucum*, *P. asperulum*, *P. crateriforme*^[242] 和 *P. crustosum*^[29] 等。许多第状菌亦能形成青霉素或其类似物。如 *Aspergillus giganteus* Wehm.^[35], *A. flavus*^[36], *A. nidulans* Wint^[37,42], *A. parasiticus*^[38,39], *A. nigers*^[40], *A. flavipes*, *A. oryzae*^[41], *A. caespitosus*^[42], *A. sydowi*, *A. quadrilineatus*^[43] 及同科他属 *Aspergillaceae*-*Paecilomyces varioti* Bainier 等。除上述二类真菌外,真菌 *Cephalosporium*^[44,157], 好热性真菌 *Malbranchea pulchella*^[232] 和病原性皮霉菌 *Trichophyton mentagrophytes*^[158] 亦能产生青霉素类似物。其中仅 *P. notatum* Westl. 和 *P. chrysogenum* Thom. 具有工业意义。

(二) 选种的意义

选种对提高抗生素工业生产率具有重大的意义。随着分离高活性变种的研究,已获得每毫升产青霉素 6000 单位的菌种(原始的 Fleming 菌种每毫升仅产数十单位)。选种的意义有二。

1. 巩固有益的性質：許多产抗生素的微生物常随着時間而发生变异。产生抗生素的能力減弱或消失。*P. notatum* 亦不例外，形成不具抗生活性的变种^[45,46]。*P. notatum* NRRL 1249 B21 經累代的移植培养，很快的产生自然变异。原来的类型被变种替代。其特点为产生孢子能力(sporulation)增加，青霉素产量降低。有的还增加形成色素能力。变异所得的低活性菌株比母种稳定，并不再回复为高活性菌株。但若培养該菌时，使其不形成孢子，則經 50 次連續移种后仍保持活性^[47]。*P. chrysogenum* Q-176 亦同样变异而降低活性^[48,49]，而且在琼脂斜面上累代的移植培养，菌株的退化变异率增加。許多事实証明，定时而連續的移种菌株于实验室培养基对菌种的发酵性質有毒性影响。虽然亦有移种报告 Backus, Stauffer 和 Johnson 的 *P. chrysogenum* Q-176 于琼脂培养基 403 次，仅得到二个变种，而且产抗生素能力亦不改变^[54]。但实际上則經常把菌种移种在不活化的培养基上，而保存在半休眠状态的条件下。保存菌种活性方法：把孢子接种于沙土，高分子物質，干麸皮或黍米上^[25]。并保存在真空密封的試管中，放在室温和冰箱中皆可以。或用无菌馬血清从黍米或琼脂斜面上洗下孢子制成浓悬浮液。用吸管移入安瓿中約一毫升，并放于冰冻干燥器的离心机中，由于离心运动，孢子悬流在安瓿中分散成一薄层，有利于很快冰冻，离心运动只須 3—5 分鐘，进一步干燥到湿度为 0.5—0.7% 即可。冰冻干燥法显著減低孢子的生活能力，但是其抗菌活性仍和黍米(作为对照)的相同(表 1)^[26,51]。亦可将孢子保存在上复以石蜡或其他矿物油的琼脂斜面上^[7]。在保存前必須进行单菌落分离。

表 1 冰冻干燥法对菌株「新雜种」孢子的生活能力和抗菌活性的影响^[26]

保存孢子方法	孢子发芽率%			效价(单位/毫升)		
	試驗一	試驗二	試驗三	試驗一	試驗二	試驗三
黍 米	45.0	49.3	45.2	1420	1460	1625
冰冻干燥法	20.5	38.3	24.8	1620	1873	1573

可見选种任务之一是分离和挑选那种能长期保持工业生产上有利性质的菌种。

2. 改良生产菌种：为了提高工业生产，不仅要保存有利的性质。而且要設法改善。为此利用自然变异或人工变异产生的新活性变种。后者效果特別显著。所得的新活性变种，不但青霉素产量高，而且比母种稳定^[50]。并且得到某些新的有利于工业生产的特征。例如能利用价格便宜的培养基，前体的利用率高^[8,55]。失去某些代謝物，特别是很难使青霉素純化和分离的一些色素^[31,56]并得到产生(或优先产生)某种类型的青霉素如青霉素G^[56]或青霉素X^[57,58]。有的变种可以使发酵時間縮短^[10]。

(三) 选种方法

形成变种的原因有三方面：(1)自发的，(2)外部作用或生长在某些培养基上，(3)由于异体胞核融合現象的結果。因此选种方法亦可从这三方面着眼。

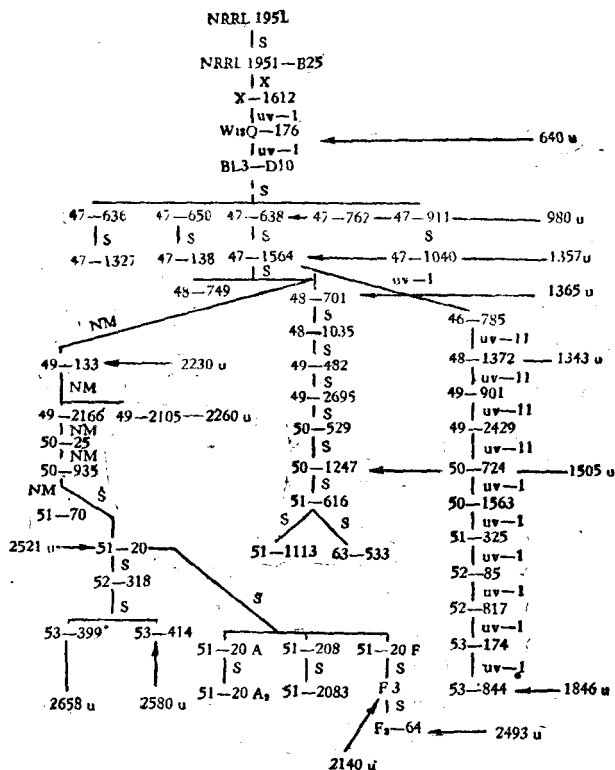
1. 分离自然变种：产抗生素菌种常倾向于产生自然变异(spontaneous mutation)。因此可借系統挑选自然变种而获得較高活性的变种。Raper^[59]从各种物质中檢驗了189个 *P. notatum-chrysogenum* 菌，株其中仅15个不具活性。最活性的有下列形态特征^[59,60]：
(1)菌落生长10—20天后柔滑疏松，表面平坦或多放射状皺紋，并帶各种深度的綠色。(2)菌落表面有很多淡黄色至深黄的小滴状渗出液。(3)随着菌落增长发黑而变成棕色。(4)孢子光滑呈球形或橢圓形，大小为2.5—4.0微米。Raper 和 Thom^[61]在分离新 *P. chrysogenum* 变种时得出下列結論：菌种活性常由下列形态特征的改变而提高。(1)菌落生长速度減小，(2)褶皺增加，(3)孢子产生能力降低，(4)形成強烈分枝，常帶有畸形的分生孢子柄。利用这些形态特征和生理活性的一定关系，分离出比較高活性的菌种 Wis Q-176^[62]。近年来，在比較高的活性菌株中，亦发现这些类似現象。Backus 和 Stauffer^[63]在研究 *P. chrysogenum* NRRL1951 到 Wis 51-20 的一系列世代时得出一些菌种特性和青霉素生产能力的启发性的規律：菌种生长力和生殖力的逐漸衰退常伴随着增加

青霉素的能力。Farrell^[58] 同样报告他的高活性菌株的一些类似的退化现象(degeneration)。但并不能根据这结论说任何退化的菌种将会是产生高单位的菌种。因为经变异处理后的存活孢子中亦可遇到一些生长速度缓慢,孢子生产力微弱而产抗生素能力低的变种。

Arima^[49] 指出若正常菌株中混有不活化的变种时,则产生效价降低。即使混合比例为10%,效价降低很多。因此他建议为了保持高活性菌株的生产能力,必须每月除去低效价的变种孢子。利用单孢子分离法能获得纯活性变种。此法为用显微操作器挑选单个孢子,或在试管内系统稀释孢子到每试管含1—2个孢子,接种于适当的培养基中,进行单孢子培养,测定活性,而在其中挑选产量最高的。亦可将孢子移种在半固体培养基上,并培养在恒温箱中,成熟后借形态特征挑选高活性菌落,重复这种挑选可得到同样性质的培养物。

连续挑择自然变种中的优良菌种,并不一定能得到良好的效果。而仅能略微提高菌种的活性。但此法在选种工作中,仍起着重要作用。如1943—1944年 Raper 和 Alexander^[64] 在美国土壤中挑选出 *P. chrysogenum* NRRL 1951 代替 *P. notatum* 使青霉素的工业产量大大的提高一步。此菌种的后代已成为世界上生产青霉素供应的主要来源。美国威斯康辛(Wisconsin)系无色菌种的第一次重要改进,以及有名的 Wis 51—20 菌种获得亦是应用自然选种法分离而得(图1)^[63]。

2. 人工变异(即诱导变异 induced mutation)获得活性变种:利用强力作用因素(X光,紫外光和各种化学物质)能显著的提高微生物的变异。所得的人工活性变种,大大的提高了产青霉素的能力。而且有的变种根本不可能在自然变异中产生(有关这方面的详细内容,读者可参考 Алиханян 的综合性报导^[1,32])。此法为将振荡的孢子悬浮液和一定浓度的化学物质混和,或被X光或紫外光照射,经一定时间后,绝大部分的孢子死亡,剩下极小部分的孢子发生变异。把存活孢子接种到琼脂平碟上,检验产抗生素的



S—表示自然选种法

X—用 X 光处理

μ—效率

uv-1—用波长 2750 Å 的紫外光处理

NM—用氮芥子气处理

uv-11—用波长 2534 Å 的紫外光处理

图 1 美国威斯康辛系菌种的改造经过 [68]

能力而挑选出高效价的菌落，再反复处理就能逐渐获得最活性的菌株。因此利用此法选种时必须先确定放射能和变异之间的关系。应用适宜的引起变异的照射剂量，才能使选种获得成功。而结合利用各种强烈作用因素是目前研究放射能选种时较有前途的一种方法。

Gattani^[65] 将菌种移种于含各种浓度的硝酸铀的马铃薯葡萄糖培养基上，则形态变异率增加，得到的变种 18G 和 X-1612C 的抑菌圈比母种大。许多学者亦应用过秋水仙碱^[66]，樟脑^[67,68]，水合氯醛^[69]，六氯己烷^[7]，镭^[70,71]，放射活性同位素 P^{32} ^[72]， I^{131} ^[72,73]，缓慢或快速的中子轰击干或湿的孢子^[74,75]。所得变种活性并不比母种高多少，但有的恰失去了一些不利的性质。例如 Otani^[71] 用镭照射 Q-176 得到的变种并不增加青霉素，但恰失去了产生色素的能力，而使青霉素易于纯化而制得白色产品。

用 X 光照射 *P. chrysogenum* 1951 B 25 得活性变种 X-1612^[76,77]，但培养于发酵缸内则渐渐降低活性^[77]。应用 X 光时变异率常随剂量的增加而提高^[4]。一般的作用剂量为 20 kr* 到 640 kr。

紫外光广泛用于人工变异。用紫外光 (2750Å) 照射 *P. chrysogenum* X-1612 得 Q-176^[62]。在提高青霉素产量上具有很大的意义，进一步照射 Q-176 获得的新变种比 Q-176 增加效价 50% 以上^[54]。Foster^[78] 用紫外光照射 Q-176 所得变种 *P. chrysogenum* var. *brevisterigmata* 产生青霉素超过 3000 单位。Farrell^[58] 借 6 次连续的照射和挑选变种发现，经每次照射后皆逐步增加效价，最后所得的无色变种的效价为 2575 而原来的仅产 1285 单位/毫升。Abe^[79] 和 Shiga^[80] 用紫外光照射 Q-176 亦获得不形成水溶性黄色色素的变种，在摇瓶中产量为 2630 单位/毫升。进一步研究指出用紫外光很难得到稳定性变种，其中很多变种在沉没生长时形成棕色色素^[81]。Raper^[57] 利用紫外光 (2537Å) 照射 NRRL

* r 即 röntgen-equivalent-physical 的简写，1 个 r 单位相当于 1 克(单位密度)的物质(例如水)接受 83 尔格的能量，亦即 $10^8 r \approx 2 \text{ 卡/克} = 3.76 \text{ 千瓦-秒/磅}$ ， $1 kr \approx 1000 r$ 。

1984A 获得变种 NRRL-1984 N 22 能产生青霉素 $\times 50\%$ 以上。紫外光作用时变异率常随作用时间而提高,但到一定限度后(15分钟),若再增加作用时间则变异率反下降^[4]。Arima^[52] 指出,发芽孢子比较容易被紫外光杀死,而溼孢子比干孢子对紫外光更敏感。

在这里还必须提到,菌株 Q-176 分泌金黄色色素于培养液中,使提纯青霉素带来了困难。经多次移种产色素菌株,没有一次能得到不产色素的菌落。在威斯康辛大学里用紫外光照射 Q-176 得到一些无色素菌株,其中最活性的是 BL3-D10。该菌株产量虽比 Q-176 低,但能把不形成色素的特性,长久保持在后代中(图 1)。

多次研究证明,紫外光波长在 2500—2700Å 时变异效果最好。此波段能被核酸(细胞核成份)强烈吸收。众所周知,紫外光除了引起变异外还能引起致死作用。各种菌株对紫外光的致死作用具有不同的敏感度,愈是活性的菌种对紫外光的致死作用愈敏感。因此在进行对某菌株选种时,首先要阐明应用什么样的剂量,以便达到最高的变异率。一般所用照射强度在 2000—4000 尔格/毫米²/秒范围之内。但利用光反应(photo reactivation)即经紫外光照射后,已被杀死的孢子用日光或灯光照射后复活。因此紫外光的照射强度可以提高到 10000—20000 尔格/毫米²/秒(所谓超高剂量),此时变异率可提高 20 倍,而主要是提高了形成抗生素的变异。紫外光照射强度和照射时间及照射距离有关,利用特殊的器械——紫外光测定仪 (ultravioletmeter) 测定光流,可得到正确的作用剂量。

次乙亚氨 (ethylen-imine) 是一个简单的含氮杂环化合物。其结构为 CH_2-CH_2 。因它能和氨基酸及硫醚化合物起反应,故具



有强烈的细胞毒作用。Алиханян 等^[13] 利用此物作用于 *P. chrysogenum* ВНИИП-А (即菌株 Д2/3),经四次阶梯式的作用和

挑选后,发现每次都能提高一些活性,并得到了新菌株《新品种 24》和 No.87。其效价皆比母种高(图 2)。

利用次乙亚氨获得的无色变种《K₂》在苏联青霉素选种工作中起着重要的作用。

操作方法为用 1:3000, 1:4000, 1:5000 和 1:6000 倍稀释的次乙亚氨处理孢子,在 4—6°C 的冰箱中延长作用时间 24 和 48 小时,之后将悬浮液移植到琼脂平碟上,并检验活性。

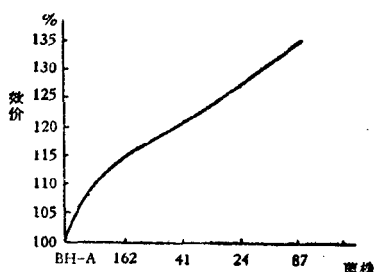
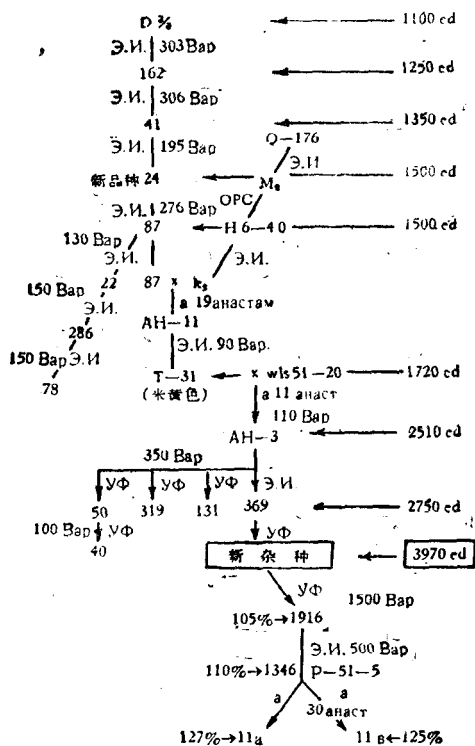


图 2 在次乙亚氨作用下,阶梯式挑选 *P. chrysogenum* 和提高效价之间的关系^[82]。

氮芥子气 [甲基-二-(β-氯乙基)-胺 methyl-bis-(β-chloro-ethyl)-amine] 及其同系类似含氮物质亦广泛的用于选种工作。Stahmann^[82] 利用氮芥子气作用 *P. notatum* 832 四分种,所得形态变种增加 30 倍,并指出增加致死量随着增加变种,并认为用氮芥子气获得的变种比紫外光多。Arima^[53] 同样指出,氮芥子气获得无色变种率比紫外光多。但相反的 Reese^[54] 认为紫外光得到的变种比氮芥子气多。在 Johnson^[55] 的评论中比较了这二种方法,认为当存活孢子为 3—30% 时紫外光比氮芥子气形成的活性变种百分率高;而存活孢子低时 (0.1—1%) 则相反,氮芥子气作用较强。Backus 和 Stauffer^[63] 在青霉菌的选种工作中获得很大的成就,利用紫外光和氮芥子气作用于孢子,并进行了 3 万个单孢子菌落的筛选,结果分离出 Wis 51—20 其活性超过原始菌种 Q-176 一倍。在 1953—1954 年工业生产上皆广泛的应用该菌种。Имшенецкий^[27] 应用强烈作用因素获得的高活性菌种的菌落直径比原始野生菌(菌落光滑,直径大)小,而皱纹增加。因此作者建议可利用形态特征除去不良菌株,使选种工作能较简易的进行。应当指出,分离人工变种后,首先要移种几次,挑选能保持活性且比较稳定的菌株^[83]。



Bar. 被检验的变种数 Э.И. 用次乙亚氮处理
a 吻合 УФ 用紫外光处理
анаст 被检验的吻合菌落数 cd 效价
OPC 挑选对抗葡萄球菌的

图 3 苏联产青霉素菌种选种的经过^[22]