

抗肿瘤抗生素 1588 的研究

I. 产生菌的生物学特征及抗生素 1588 的 发酵、分离及纯化*

孔秋桐 刘慈俊 王宗阳 王家驹 司穉东

(中国科学院上海植物生理研究所微生物室)

张建宇 朱宏娟 郑彩珍

(上海第三制药厂抗菌素研究所)

提要 我们用诱导前噬菌体的方法在上海的花园土壤中筛选到一株丁香轮丝链霉菌 1588。本文报道该菌的生物学特征及其产生的抗生素 1588 的发酵、分离及纯化的研究结果。文中还介绍了一种适于对酸碱不稳定的腐草霉素—博莱霉素类抗生素的提取流程,也介绍了用一株对同时存在于抗生素 1588 发酵液中的其它抗生素不敏感的枯草杆菌进行生物测定的方法。

Maeda 和 Umezawa 等人先后发现了腐草霉素⁽¹⁾和博莱霉素⁽²⁾。由于这类抗生素在临床上有一定疗效,且对骨髓和免疫机能不抑制,因而受到了重视。几年来,在这类抗生素中又发现了 zorbamycin⁽³⁾、YA-56⁽⁴⁾、victomycin⁽⁵⁾、platomycin⁽⁶⁾和 tallysomycin⁽⁷⁾。

我们在寻找抗肿瘤药物时,曾用诱导前噬菌体的方法^(8,9)筛选到一株腐草霉素—博莱霉素类抗生素的产生菌,编号 1588,并对该菌进行了鉴定,还进行了它所产生的抗生素 1588 的发酵及提取、理化性质⁽¹⁰⁾、抗肿瘤作用⁽¹¹⁾和临床前药理⁽¹²⁾等研究。最后,观察了抗生素 1588 对中晚期食管癌病人的治疗效果⁽¹³⁾。现将该菌的生物学特征及抗生素 1588 发酵及分离纯化的研究结果报告如下。

方法和材料

1. 菌种鉴定按常规方法进行⁽¹⁴⁾。
2. 发酵培养基试验按正交试验法⁽¹⁵⁾进行,常用的为 $L_9(3^4)$ 、 $L_{18}(3^7)$ 和 $L_{27}(3^{10})$ 正交表。
3. 培养条件 斜面、种子及发酵等培养温度均为 28°C; 摇瓶发酵试验在往复摇床上进行,振幅 6 cm, 频率 104 次/分。发酵培养基装量为每个 500 ml 三角烧瓶中装 50 ml。
4. 效价测定 以杯碟法测定。指示菌为 *Bacillus subtilis* A. S. 1.311-8, 它是对存在于 1588 菌株发酵液中另一个能抑制枯草杆菌生长而无诱导前噬菌体活力的成份有抗性的菌株。测定用培养基配方: 蛋白胨 0.5%, 牛肉膏 0.15%, Na_2HPO_4 0.15%, KH_2PO_4 0.05%, 琼脂 1.8%, pH 8.0。
5. 提取所用树脂为 734 阳离子交换树脂, 上海树脂厂出品。大孔树脂 GDX-104 系天津试剂一厂产品。中性氧化铝为上海五四农场化学试剂厂产品。

本文于 1980 年 7 月 14 日收到。

* 张娅珍参加主要技术工作。戈宝榛、白永延、徐美琳、张文玲、胡开先、吴梦淦、王丽雯、王玉琴、朱素娟、夏洁等同志曾参加部分工作。

结 果

(一) 产生菌的生物学特征

1588 号菌是 1970 年 5 月从上海岳阳路 320 号科学院草坪土壤中分离得到的, 其形态、培养特征及生理生化特征如下:

1. 形态及培养特征 孢子丝直而短, 二级轮生(图 1), 孢子呈短柱状(图 2)。高氏合成一号琼脂: 气丝绒毛状, 白至藕荷(«色谱», 科学出版社, 1957, 下同)。基丝炒米黄至暗虎皮黄, 无可溶色素。蔡氏蔗糖琼脂: 气丝绒状, 粉白至落英淡粉。基丝米色至淡肉色至浅驼色, 无可溶色素。克氏合成一号琼脂: 气丝绒絮状, 浅米色至落英淡粉至浅雨后桃红(III₂)。基丝篾黄, 炒米黄至初熟杏黄。可溶色素无, 日久轻微淡黄。葡萄糖天门冬素琼脂: 气丝绒状, 粉白至浅粉。基丝葵扇黄至淡蜜黄。可溶色素无至杏仁黄。葡萄糖酵母膏琼脂: 气丝绒絮状, 白至荷花白, 基丝黄色至暗黄(Id 57')。可溶色素黄至风帆黄。马铃薯块: 气丝绒絮状, 白至荷花白。基丝浅黄到淡咖啡, 薯块淡黄至淡咖啡。可溶色素甘草黄至软木黄。

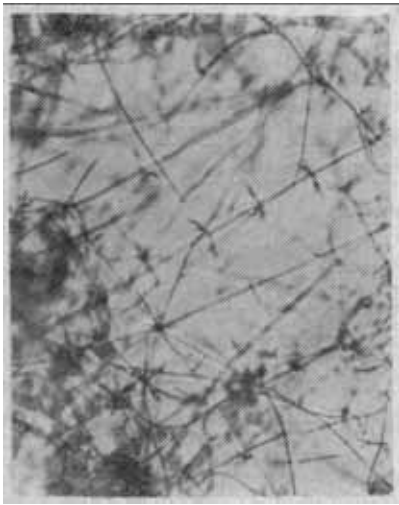


图 1 丁香轮丝链霉菌 1588 的孢子丝
(×150, 高氏培养基)



图 2 丁香轮丝链霉菌 1588 的孢子形态(×5500)

2. 生理生化特征 明胶液化强, 牛奶凝固并胨化强, 淀粉水解很弱, 纤维素上生长弱, 能还原硝酸盐。利用葡萄糖、果糖、鼠李糖、蔗糖、肌醇良好, 对木糖、阿拉伯糖、甘露醇利用较差; 在棉子糖上微有生长。

3. 抗菌谱的测定 以二倍稀释法在平皿上测定, 抗生素 1588 的抗菌谱见表 1。

根据 1588 号菌在高氏合成一号琼脂上气丝绒毛状, 淡紫粉, 基丝黄色, 无可溶色素, 在有机培养基上不产生类黑素, 蛋白酶作用强, 淀粉酶作用弱, 纤维素上生长很差等特征, 与阎逊初、张国伟⁽¹⁶⁾报道的丁香轮丝链霉菌的特征相符, 故定名为丁香轮丝链霉菌 1588 (*Streptomyces lilacinovercillatus* 1588 Yen et Zhang)。

(二) 抗生素 1588 的发酵

1. 种子培养基试验 比较了几种配方, 并观察了这几种配方中生长的种子对抗生素产量的影响, 确定较好的配方为淀粉 1.5%, 糊精 0.5%, 花生饼粉 1.5%, 酵母粉 0.5%, 自然 pH。

2. 发酵培养基试验 我们分别用 L₉(3⁴), L₁₈(3⁷)及 L₂₇(3¹³)正交表安排了实验, 将配

表 1 抗生素 1588 的抗菌谱*

菌 名	MIC $\mu\text{g/ml}$	菌 名	MIC $\mu\text{g/ml}$
<i>Bacillus subtilis</i> I	0.025	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	0.40
<i>Bacillus subtilis</i> II	0.08	<i>Shigella dysenteriae</i>	0.20
<i>Bacillus subtilis</i> IRC-6	0.05	<i>Salmonella gallinarum</i>	0.80
<i>Bacillus megatherium</i> 47	0.20	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.40
<i>Proteus</i> sp.	3.125	<i>Salmonella anatum</i>	0.80
<i>Escherichia coli</i> K ₁₂ S	0.40	<i>Salmonella newington</i>	0.20
<i>Escherichia coli</i> K ₁₂ (λ)	0.20	<i>Serratia lutea</i>	3.125
<i>Escherichia coli</i> B	0.40	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 11	25.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 46101(S.1)	12.5	<i>Mycobacterium</i> 607	0.20
<i>Micrococcus flavus</i>	3.125	<i>Mycobacterium phlei</i>	0.05
<i>Staphylococcus aureus</i> 2009	1.56	<i>Candida albicans</i>	1.56

* 本实验中, 抗生素 1588 含铜样品及脱铜样品的最低抑制浓度(MIC)相同。

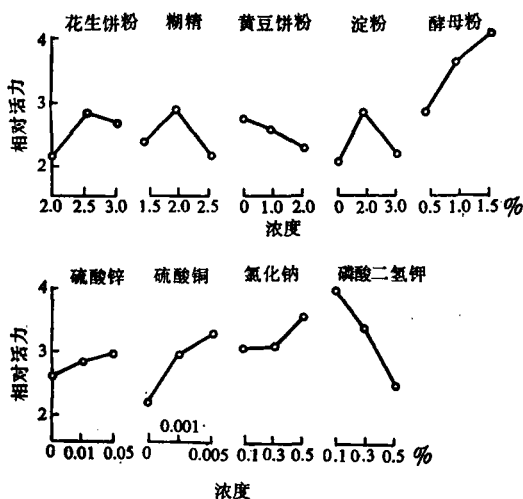


图 3 各培养基成份对抗生素 1588 产量的影响

方中各成份对抗生素产量的影响进行了多次对比试验, 并研究了某些成份之间的交互作用。结果表明, 对 1588 号菌株的抗生素产量来说, 其碳源的优劣顺序为: 糊精 > 淀粉 > 葡萄糖; 氮源的优劣顺序为: 花生饼粉 > 黄豆饼粉 > 硫酸铵 > 蛋白胨。培养基成份的含量对抗生素 1588 产量的影响见图 3, 从而确定在我们的实验条件下, 发酵的最佳配方为: 淀粉 2.0%, 糊精 2.0%, 花生饼粉 2.5%, 酵母粉 1.5%, 磷酸二氢钾 0.1%, 氯化钠 0.5%, 硫酸锌 0.05%, 硫酸铜 0.005%, 自然 pH。

(三) 抗生素 1588 的分离与纯化

抗生素 1588 在酸性条件下不稳定⁽¹⁰⁾, 我们采用了 734 阳离子交换树脂提取, 氯化钠-乙醇溶液洗脱的提取方法, 其流程见图 4。最后, 样品用硫化氢脱铜⁽³⁾浓干, 即得抗生素

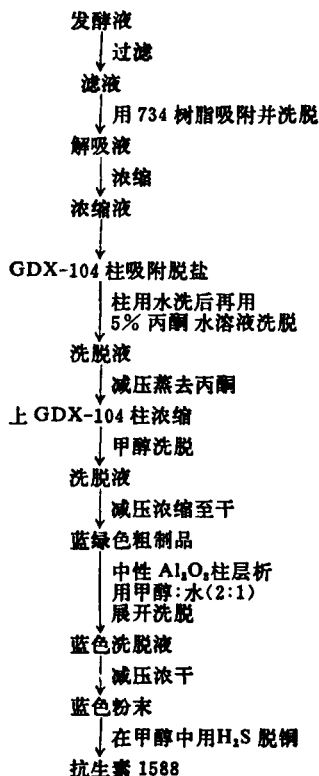


图 4 抗生素 1588 分离纯化流程图

1588 纯品。

讨 论

1. 抗生素 1588 的产生菌经鉴定为丁香轮丝链霉菌, 它有轮生的孢子丝, 这与 zorbamycin⁽³⁾、YA-56⁽⁴⁾、victomycin⁽⁵⁾、platomycin⁽⁶⁾及 tallysomycin⁽⁷⁾的产生菌显然不同。腐草霉素及博莱霉素的产生菌 *S. verticillus* 843-1 及 *S. verticillus* B 80-Z₂ 也为轮生链丝菌, 因此 1588 号菌株有很多性状与之相似, 如在合成培养基上气丝绒毛状、在有机培养基上不产类黑素、对淀粉水解弱等。但也有一些区别, 如 1588 号菌的气丝为白色, 而 843-1 及 B80-Z₂ 均为橄榄灰色; 1588 号菌蛋白水解及硝酸盐还原作用均强, 而 843-1 菌虽能水解蛋白但无还原硝酸盐能力, B 80-Z₂ 则能还原硝酸盐而蛋白水解力不定⁽²⁾。因此, 抗生素 1588 产生菌与腐草霉素及博莱霉素产生菌虽同为轮生链霉菌, 但从其培养特征及生理生化性状方面的差异来看, 应属不同的种。

2. 腐草霉素-博莱霉素类抗生素产生菌发酵过程中常伴产其它抗生素^(1,3,6,7), 这些抗生素往往只有抗细菌或抗真菌活力, 而没有诱导前噬菌体及抗肿瘤作用。丁香轮丝链霉菌的发酵液中也存在一个脂溶性抗生素, 它只有抗枯草杆菌活力, 而无诱导前噬菌体作用。因此, 在高产菌株选育、发酵产物提取纯化以及成品检验中, 仅用抑制细菌活力的大小来表示抗肿瘤成份的含量, 测得的数据往往偏高。最初, 我们曾用诱导前噬菌体的活力来作抗生素 1588 的效价测定, 不过平板诱导测定⁽⁸⁾不易准确定量, 液体诱导测定⁽⁹⁾虽可定量, 但操作步骤复杂。后来, 我们在对抗生素 1588 敏感的枯草杆菌 A.S.1.311 中选取了一株 A.S.1.311-8 菌株作指示菌, 能专一地指示抗生素 1588 的活力而不受发酵液中其它抗生素的干扰, 避免了出现“假单位”。

3. 抗生素 1588 在酸性条件下极不稳定, 我们不能采用文献中常用的提取分离方法。本文中介绍的提取方法的优点是: 树脂价廉易得; 上述存在于发酵液中的另一个抗生素在 734 树脂上几乎不吸附; 色素吸附少, 洗脱液呈黄绿色或蓝绿色, 纯度较高。

致谢 中国科学院微生物研究所阎述初先生曾指导菌种鉴定; 华东师范大学电镜室协助进行电镜观察, 谨此致谢。

参 考 文 献

1. Maeda K, et al: A new antibiotic, phleomycin. *J Antibiotics* A 9:82, 1956
2. Umezawa H, et al: New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiotics* A 19:200, 1966
3. Argoudelis AD, et al: Zorbamycin and related antibiotics I. production, isolation and characterization. *J Antibiotics* 24:543, 1971
4. Ito Y, et al: Antibiotic YA 56, a new family of phleomycinbleomycin group antibiotics. *J Antibiotics* 24:727, 1971
5. Kawamoto I, et al: A new antibiotic victomycin (XK-49-1-B-2) I. taxonomy and production of the producing organism. *J Antibiotics* 28:358, 1975
6. Takasawa S, et al: Platomycins A and B I. taxonomy of the producing strain and production, isolation and biological properties of platomycins. *J Antibiotics* 28:656, 1975
7. Kawaguchi H, et al: Tallysomycin, a new antitumor antibiotic complex related to bleomycin I. production, isolation and properties. *J Antibiotics* 30:779, 1977
8. 上海植物生理研究所微生物室噬菌体组: 应用噬菌体及其与细菌间的特性筛选抗肿瘤药物, 《科研成果汇编》(1966~1971), 157 页, 上海植物生理研究所编印, 1972
9. Lein J, et al: Induction of lysogenic bacteria as a method of detecting potential antitumor agents. *Nature* 196:783, 1962 -
10. 刘慈俊等: 抗肿瘤抗生素 1588 的研究 II. 物理化学性质及主要组份性质的研究. 待发表
11. 杨国桢等: 抗肿瘤抗生素 1588 的研究 III. 对动物肿瘤的实验治疗研究. 待发表
12. 杨国桢等: 抗肿瘤抗生素 1588 的研究 IV. 待发表
13. 祝浩强等: 抗肿瘤抗生素 1588 的研究 V. 治疗食管癌 50 例的临床疗效评价. 待发表
14. 中国科学院微生物研究所放线菌分类组编: 链霉菌鉴定手册, 科学出版社, 1975
15. 上海市科学技术交流站: 正交试验设计法——多因素的试验方法, 上海人民出版社, 1975
16. 阎述初等: 放线菌分类的研究 IV. 轮生放线菌类群的鉴定. *微生物学报* 9:394, 1963

**STUDIES ON ANTITUMOR ANTIBIOTIC
1588 I. BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
PRODUCING STRAIN AND
FERMENTATION ISOLATION AND
PURIFICATION OF ANTIBIOTIC 1588**

Kong Qiutong, Liu Cijun, Wang Zongyang,
Wang Jiaxun and Si Zhidong

(*Department of Microbiology, Shanghai Institute of Plant
Physiology, Academia Sinica*)

Zhang Jianyu, Zhu Hongjuan and Zheng Caizhen

(*Institute of Antibiotics, The Third Pharmaceutical Plant, Shanghai*)

ABSTRACT

In screening of antitumor antibiotics a strain of streptomycetes was isolated from garden soil in Shanghai, which produces an antibiotic belonging to the phleomycin-bleomycin family. This strain has been identified as *Streptomyces lilacinovercillatus* 1588 Yen et Zhang. The antibiotic produced by this strain was named Antibiotic 1588.

In this paper, the biological characteristics of this strain and the selection of the fermentation media by the method of multiple-factor orthogonal experimental design were reported.

An isolation-purification procedure for Antibiotic 1588 using strong acidic cation exchange resin, porous resin and active aluminum oxide chromatography was established.

In the bioassay, *Bacillus subtilis* A. S. 1.311-8 was used as the testing bacteria. This strain was insensitive to other antibiotics existing in the culture broth besides Antibiotic 1588.