

## 藤黄灰链霉菌-H103 发酵液中抗真菌活性成分的分离纯化\*

姬生宝 范晋勇 元英进\*\*

(天津大学化工学院 天津 300072)

**摘要:** 通过大孔树脂吸附等方法对藤黄灰链霉菌 H103 发酵液中的抗真菌活性成分进行了分离纯化, 得到了纯度较高的活性物质的结晶, 并且建立了通过大孔树脂吸附-结晶的分离纯化路线以及反相高压液相色谱-蒸发光散射 (HPLC-ELSD) 的检测方法, 为进一步的理化性状研究打下了一个良好的基础。实验表明, 最佳吸附树脂为 X-5 树脂, 洗脱剂为 50% 乙醇, HPLC 条件为: 反相色谱柱 Agilent 20RBA  $\times$  310SB- $C_{18}$  (150mm  $\times$  4.6mm i. d, 5 $\mu$ m), 以乙腈 (A)-水 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 0~4.0min, V (A): V (B) = 20: 80, 4.0~9.5min, V (A): V (B) = 45: 55, 此后 V (A): V (B) = 80: 20, 流动相流速: 0.8mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}$ C, ELSD 条件: 漂移管温度 115 $^{\circ}$ C, 载气流速 (空气) 2.3L/min。

**关键词:** 抗生素, 大孔树脂, 分离纯化

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0077-05

**Isolation and Purification of the Antifungal Antibiotic from the Fermentation  
Broth of *Streptomyces luteogriseus* H-103 \***

JI Sheng-Bao FAN Jin-Yong YUAN Ying-Jin\*\*

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering, Tianjin University,  
Tianjin 300072)

**Abstract:** The antifungal antibiotic produced by *Streptomyces luteogriseus* H-103 was purified by means of macroporous adsorbent resin, and the crystal of the antibiotic with high purity was got. In this paper, the methods of purification by adsorbing of microporous adsorbent resin and detection by reversed high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD) were established. The result appeared that resin X-5 is the best adsorbent, the eluant is 50% ethanol. The antibiotic was successfully separated on Agilent<sup>TM</sup> 20RBA  $\times$  310SB  $C_{18}$  column (150mm  $\times$  4.6mm i. d, 5 $\mu$ m), using a mixture of acetonitrile (A) -H<sub>2</sub>O (B) as a mobile phase under gradient elution at a flow of 0.8mL/min at 30 $^{\circ}$ C. 0~4.0 min, V (A): V (B) = 20: 80, 4.0~9.5min, V (A): V (B) = 45: 55, then V (A): V (B) = 80: 20. The drift tube temperature and the air carrier gas flow rate of the ELSD were set at 115 $^{\circ}$ C and 2.3L/min.

**Key words:** Antibiotic, Macroporous resin, Isolation and purification

目前, 化学农药在控制植物病虫害造成的巨大损失上, 仍然起着主要的作用。但是, 单一地使用化学农药, 已经给人类的生存环境造成了严重的污染, 引起了生态环境的严重破坏, 并且使病虫害的抗药性直线上升<sup>[1,2]</sup>。由于生物农药具有既能控制有害生物又具有无公害的优点, 因此, 各国政府和公司都对生物农药的研究开发给予高度重视<sup>[3]</sup>。微生物农药则是生物农药的重要组成部分, 被认为是害虫防治上最有希望的

\* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2002AA248041)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002AA248041)

\*\* 通讯作者 Tel: 022-27403888, E-mail: yiyuan@public.tpt.tj.cn

收稿日期: 2004-09-03, 修回日期: 2004-10-09

途径之一<sup>[4]</sup>。微生物农药是指利用微生物及其次生代谢产物,制备出防治植物病虫害的制剂的总称<sup>[3]</sup>。本实验室从土壤中分离筛选得到一株链霉菌,经鉴定为藤黄灰链霉菌 (*Streptomyces luteogriseus*),菌株编号 099,经过诱变筛选得到菌株 H103,从其发酵 96h 的发酵液中分离得到了一种具有良好抗肿瘤活性的抗生素-麦拓来霉素<sup>[5~7]</sup>。另外,实验发现其 72h 的发酵液具有良好的抗植物真菌病害活性,对棉花立枯,花生叶斑,黄瓜炭疽等多种经济作物真菌病虫害有着很好的抑制作用,具有很高的实用推广价值,故有必要对其产生的抗真菌活性物质进行分离纯化。由于该活性物质为水溶性抗生素,有机溶剂萃取法无法有效地对其进行浓缩,而大孔吸附树脂方法既可以对活性物质进行富集,又可以同时进行分离纯化,用少量树脂就可以处理大量发酵液,具有设备简单操作方便等特点<sup>[8]</sup>,故本文采用大孔吸附树脂方法对活性物质进行分离纯化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**藤黄灰链霉菌 H103 (*Streptomyces luteogriseus*),本实验室从土壤分离并经过诱变得到。立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*),购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

**1.1.2 培养基:**固体斜面培养基<sup>[6]</sup>;真菌培养基:PDA 培养基<sup>[9]</sup>;液体种子培养基:葡萄糖 5g,可溶性淀粉 30g,酵母膏 2g,蛋白胨 4g,  $K_2HPO_4$  1.5g, NaCl 0.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g,自来水配制定容至 1L,自然 pH 值,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min。发酵培养基:葡萄糖 5g,玉米淀粉 30g,酵母膏 4g,玉米浆 2g,  $K_2HPO_4$  0.5g, NaCl 0.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g,淀粉酶 0.05g,自来水配制定容至 1L,自然 pH 值,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min。

**1.1.3 大孔吸附树脂:**大孔吸附树脂 H103、X-5、NKA、AB-8、NKA-9、S-8 均购自南开大学化工厂。

**1.1.4 仪器及设备:**30L 全自动发酵罐(德国 B. Braun 公司);TU-1900 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器责任有限公司)。色谱工作站:Agilent 1100 色谱工作站。蒸发光散射检测器:Allteck ELSD2000。质谱工作站:FINNICAN LCQ Advantage MAX。

### 1.2 方法

**1.2.1 抑菌活性测定方法:**采用菌丝块法:用移液管吸取 15mL PDA 培养基注入  $\Phi 12$ cm 的培养皿中,与已放入其中的 1mL 待测样品混匀,放置冷却至凝固。用已灭菌、直径为 6mm 的打孔器将已在 PDA 培养基上已于 28℃ 下培养了 48h 的立枯丝核菌菌落沿边缘打成 6mm 的圆形菌块。将病原菌菌块放置于上述已凝固好的 PDA 培养基中,每皿放置 3 个病原菌菌块,28℃ 培养 24h,量取菌落直径,取平均值,用以下公式计算活性物质抑菌率<sup>[10]</sup>。空白对照以同样体积的无菌水代替样品。

抑菌率 (%) =  $[1 - (\text{样品组菌落平均直径} - 0.6) / (\text{对照组菌落平均直径} - 0.6)] \times 100\%$ ,菌落直径单位:厘米(cm)。

**1.2.2 发酵液和大孔吸附树脂的预处理:**发酵液 4,000r/min 离心除菌体,pH 调至 3 左右,5,000r/min 离心除去杂蛋白,再调节至 10 左右,同样条件下离心除去生成的杂

蛋白沉淀, 回调发酵液 pH 值至 7 待用。树脂的预处理参照厂家说明。

**1.2.3 树脂筛选实验:** 取经过预处理的各种树脂各 1mL, 放入三角瓶中, 加入 100mL 的发酵液, 室温下于 220r/min 的摇床上吸附 4h, 然后取吸附剩余液 1mL, 测其活性。

**1.2.4 洗脱剂的选择:** 在大孔吸附树脂实验中, 常用的洗脱剂是不同浓度的甲醇及乙醇溶液。取吸附饱和的 X-5 树脂 0.3g, 分别用不同浓度的甲醇及乙醇的水溶液作为洗脱剂, 用量为 20mL, 25℃ 下于 220r/min 的摇床上静态解吸 4h, 旋蒸至干, 加水 5mL 溶解后, 检测其活性。

**1.2.5 抗菌活性物质的动态吸附及结晶:** X-5 树脂经过预处理后装柱 (2.0cm × 30cm), 发酵液用量 1,800mL, 以流速 4mL/min 进行吸附。吸附完毕后, 先用去离子水 500mL 洗脱, 然后再用 50% 的甲醇 500mL 洗脱, 最后用 50% 乙醇 500mL 洗脱, 流速均为 4mL/min, 收集洗脱液, 每 50mL 为一瓶。分别测定每瓶洗脱液的抗菌活性, 合并活性高的洗脱液, 将合并液旋蒸浓缩后于 20℃ 下静置 48h, 得到粗结晶。

**1.2.6 粗结晶物质的抗菌活性测定:** 取少量粗结晶, 加入少量水, 调节 pH 至 8 使其溶解, 然后检测其生物活性。用 pH 为 8 的蒸馏水作对照。

**1.2.7 粗结晶水溶液的紫外光扫描:** 波长范围: 190 ~ 400nm;

**1.2.8 粗结晶水溶液的反相高效液相色谱-蒸发光散射 (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) 检测:** 取少量结晶, 溶解于水中, 自然 pH 值。

HPLC 条件: 色谱柱 Agilent 20RBA × 310SB-C<sub>18</sub> (150mm × 4.6mm i.d., 5μm), 流动相为乙腈-水, 线性梯度洗脱, 乙腈体积含量分别为: 0min ~ 4.0min 为 20%, 4.0min ~ 9.5min 为 45%, 此后为 80%。流动相流速: 0.8mL/min, 柱温: 30℃, 进样量 20μL。

ELSD 条件: 漂移管温度 115℃, 空气流速 2.3L/min。Impactor: off。

**1.2.9 粗结晶的质谱分析:** HPLC 条件同上, 用质谱仪对粗结晶的水溶液成分进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 树脂筛选结果

树脂制造结果如图 1 所示, 用 X-5 树脂处理后的发酵液的剩余活性最小, 而剩余活性最大的是用 H-103 处理过的发酵液, 这说明 X-5 树脂对该活性物质的吸附能力最强, 这可能与该树脂较大的比表面积 (约 500 ~ 600m<sup>2</sup>/g) 和较大的孔径 (约 290Å ~ 300Å) 有关。H-103 树脂虽然比表面积最大 (约 1,000 ~ 1,100 m<sup>2</sup>/g), 但是其过小的孔径 (约 80Å ~ 90Å) 限制了活性物质的扩散, 所以吸附效果不如比表面积比它小但是孔径它大的 X-5, 故选用 X-5 作为实验用的大孔吸附树脂。

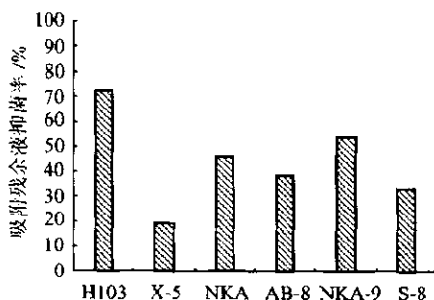


图 1 经不同树脂处理后的发酵液的剩余活性

## 2.2 洗脱剂的选择

洗脱剂的选择实验结果如图 2 所示, 50% 的乙醇水溶液具有较好的把活性物质从树脂上洗脱下来的能力。同时发现, 50% 的甲醇水溶液虽不能较好地洗脱活性物质, 但是却能较好的洗脱色素。所以采用 50% 的甲醇和 50% 乙醇联合洗脱的方法对活性物质进行洗脱。

## 2.3 粗结晶物质的抗菌活性检测

生物活性测定结果见表 1。可以看到, 在粗结晶用量很少的情况下, 其水溶液就能具有很高的抑菌活性, 说明此粗结晶就是我们所要分离得到的抗生素。

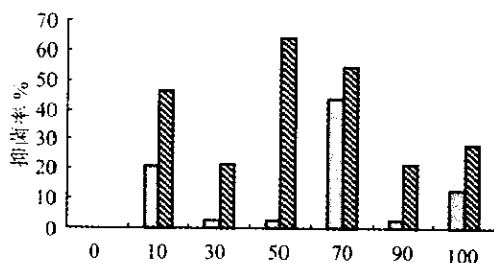


表 1 粗结晶物质的活性检测

样品	菌落直径/cm	抑菌率 (%)
粗结晶的水溶液	0.6 ± 0.0 *	100
对照	4.5 ± 0.1 *	

\* 期望值 ± 样本标准差

图 2 不同浓度的洗脱剂的洗脱能力对比

□ 甲醇溶液, ■ 乙醇溶液

## 2.4 粗结晶水溶液的紫外光扫描

紫外扫描结果如图 3 所示, 可以发现其只在 196nm 处有紫外吸收峰, 但是此波长已经处于紫外波长的末端, 吸收属于末端紫外吸收, 且所用溶剂水的最低波长极限是 210nm, 在 196nm 处会有较强吸收, 对被测物质产生干扰<sup>[11]</sup>。所以可以认为此抗生素没有紫外吸收, 紫外检测器对其无效, 故用蒸发光散射 (ELSD) 检测器对其进行下面的实验。

## 2.5 粗结晶水溶液反相 HPLC-ELSD 检测

由图 4 可知, 只有一个主要的峰出现, 杂质的峰很小, 所以可以认定此主峰就是由抗生素结晶所产生的峰。抗生素的保留时间是 3.747 分钟。由于蒸发光散射检测器为质量检测器, 其对所有组分的响应因子基本相同, 所以各组分的峰高就显示了其质量的多少<sup>[12,13]</sup>。由图可以看出, 得到的粗结晶较纯, 纯度可达 95% 以上。

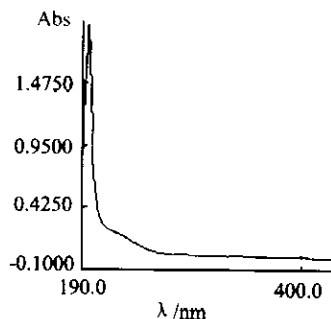


图 3 抗生素的紫外光扫描结果

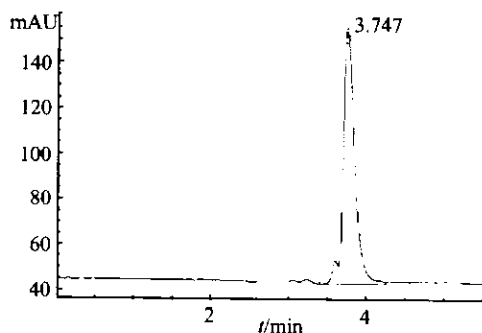


图 4 HPLC-ELSD 色谱图

## 2.6 质谱分析结果

质谱分析见图 5。

此图为正离子质谱图, 负离子质谱图则基本没有响应。从图中可以看出, 该抗生

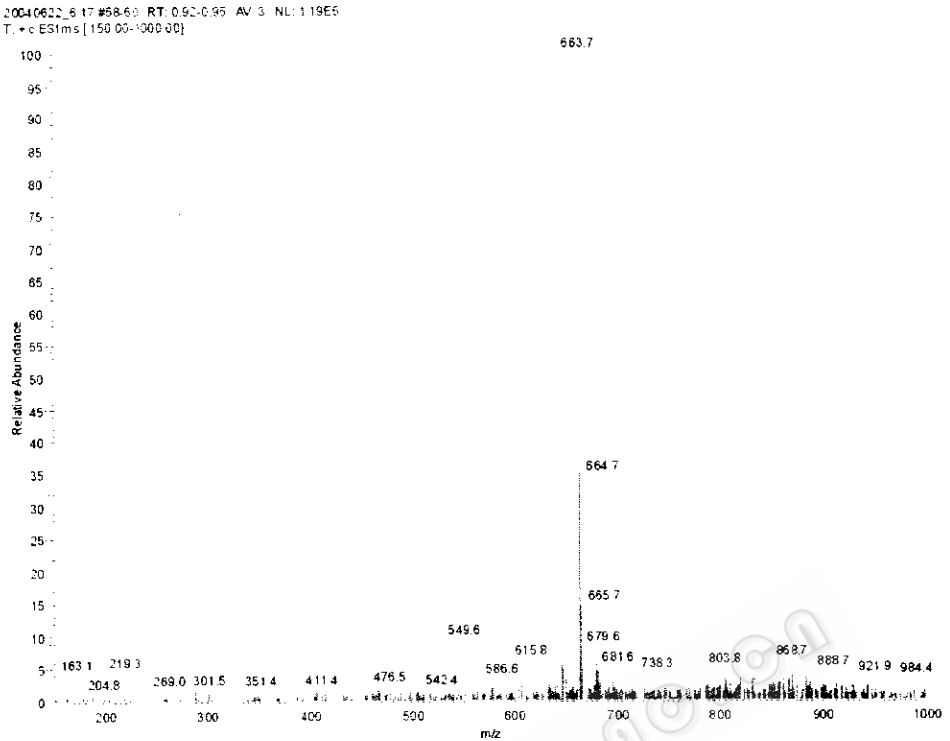


图5 质谱分析结果

素的分子量约为 662.7，为一种小分子物质。

### 3 结论与展望

藤黄灰链霉菌 H103 菌株产生的抗生素的抗菌谱较广，对多种经济植物的病虫害都有明显的抑制作用，具有较好的工业应用价值。研究表明，该抗生素分子量约为 662.7，为极性水溶性的抗生素，易溶于弱碱性水，不溶于一般非极性有机溶剂，且没有紫外吸收。初步推测此抗生素可能为一种新的抗生素，具有较好的研究及应用前景。对该抗生素的结构及性质的进一步研究正在实验中，相信研究结果一定会对我国农用抗生素的发展产生积极的推动作用。

### 参考文献

- [1] Joop C L. Crop Protection, 2000, 19: 375 ~ 384.
- [2] Rasmussen F B. The Science of the Total Environment, 1996, 188 suppl: (1): 45 ~ 60.
- [3] Samuel G M, Graham A M. Biosystems Engineering, 2003, 84 (2): 119 ~ 125.
- [4] 张超, 王玉霞. 西南园艺, 2003, 31 (4): 58 ~ 59.
- [5] 元英进, 石炳兴, 胡宗定, 等. 中国专利, 2001, 01141443. X.
- [6] 石炳兴, 赵红, 刘喜朋, 等. 过程工程学报, 2001, 4: 442 ~ 444.
- [7] 张建勇, 牛晋阳, 陈贵斌, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (2): 24 ~ 28.
- [8] 顾觉奋. 抗生素. 上海: 上海科学技术出版社, 2001.
- [9] 程光胜, 李玲阁. 微生物学实验法. 北京: 科学出版社, 1983. 324 ~ 342.
- [10] Wang S L, Yieh T C, Shih I L. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 33 (2): 142 ~ 148.
- [11] 高崑玉. 色谱法在精细化工中的应用. 北京: 中国石化出版社, 1997. 288 ~ 290.
- [12] 魏洪, 丁明玉. 色谱, 2000, 18 (5): 398 ~ 401.
- [13] 王明娟, 胡昌勤. 中国药事, 2000, 16 (7): 431 ~ 433.