



农用抗菌素 402 的研究

II. 分离、提纯和理化性质*

郑幼霞 王 浩 沈炳福

张益棠 张庭兰

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

直丝淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulorectus*) “402” 产生的农用抗菌素“402”(以下简称“402”), 不论在离体或整体条件下对麦类赤霉病都有抑制作用^[1]。本文报道“402”的分离、提纯和理化性质的研究结果。

一、发酵

用二只茄子瓶培养的“402”产生菌的孢子接入 50 升种子罐(装 30 升培养基), 28°C 下通气培养 30 小时, 然后接入 10,000 升罐中(装 6,000 升培养基), 28°C 下通气(通气量 1:0.5)发酵 70 小时, 效价可达 800—1,000 单位/毫升。种子罐和发酵罐培养基成分均为(%) : 葡萄糖 2, 淀粉 2, 黄豆饼粉 3, NaCl 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.025, K₂HPO₄ 0.02, (NH₄)₂SO₄ 0.2, CaCO₃ 0.2。pH 7.2—7.4。

二、分离和提纯

将发酵液用草酸调 pH 至 3—4, 滤去菌丝体。清液用氢氧化钠调 pH 至 6.0 并通过 724 羧酸型阳离子交换树脂柱。用蒸馏水冲洗柱后, 再以 2N 盐酸洗脱, 收集有活性的洗脱液部分, 用氢氧化钠调 pH 至 3—4, 50°C 水浴减压浓缩干燥, 以热甲醇溶解, 滤去不溶物, 滤液加入 6 倍体积的丙酮, 便有沉淀析出, 抽气过滤收集白色沉淀, 并用丙酮洗涤两次, 然后真空干燥即得“402”盐酸盐的粗制品。粗制品为灰白色的无定型粉末, 极易吸水潮解。

将粗制干粉再溶于甲醇中, 通过酸性氧化铝层析柱吸附, 用 pH 3—4 的甲醇洗脱, 分部收

集, 合并活性高的部分, 减压浓缩后加入丙酮即得白色沉淀。离心收集沉淀, 用丙酮洗涤两次, 经真空干燥所得白色无定形粉末, 按上法在酸性氧化铝柱上进行再纯化, 减压浓缩后于 4°C 放置数天, 有白色固体析出, 再用甲醇重结晶一次, 便得“402”精制品, 纯度为 720 单位/毫克。

三、理化性质

“402”的盐酸盐为白色无定形粉末, 熔点为 210—215°C (分解)。易溶于水及甲醇, 微溶于乙醇, 不溶于其他有机溶剂。比旋度为 $[\alpha]_D^{25} -23.5$ (Cl.0 H₂O)。

用 Доскоцилова^[2] 的八种溶剂系统进行纸层析表明“402”为碱性水溶性抗菌素(图 1)。

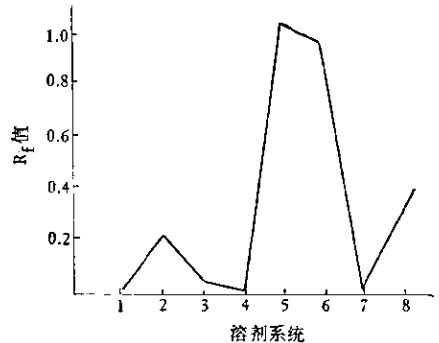


图 1 “402”的纸层析图谱

分别以 1N 的 NaOH 和 CH₃COOH-H₃PO₄-HBO₃ 配制成 pH 为 8.5 和 3.5 的缓冲液为介质, 在 1000 伏的电压下进行纸电泳, “402”都向阴

* 承江苏宜兴农药厂协助进行 10,000 升罐发酵试验; 中国科学院有机化学研究所协助进行元素分析; 本所技术室测定红外光谱。刘成沛同志参加部分技术工作。

极移动,在 pH3.5 介质中的比移值较大(图 2)。

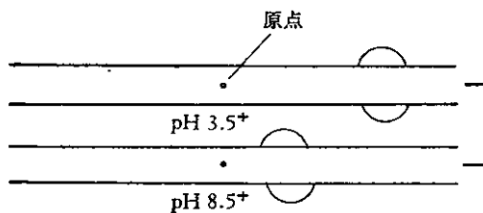


图 2 “402”的纸电泳图谱

“402”的紫外光谱为末端吸收;红外光谱如图 3 所示。

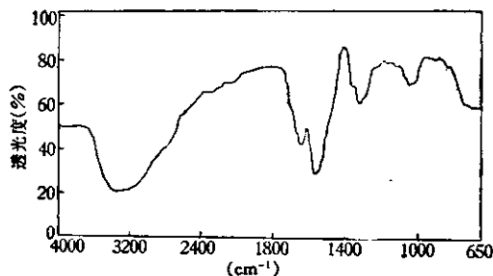


图 3 “402”的红外吸收光谱

“402”盐酸盐的元素分析实验值为: C35.37, H6.93, N16.13, Cl15.67。由此推知“402”分子的实验式可能为: $C_{20}H_{44}N_8O_{11} \cdot 3HCl$ 。按此式推算元素的理论比值为 C 35.21, H 6.89, N 16.43, O 25.82, Cl 15.62。

“402”对双缩脲、 α -萘酚、碱性酒石酸钠、碱性氢氧化银、茚三酮、Elson-Morgan 试剂等均为阳性反应;对坂口氏、三氯化铁试剂等则呈阴性反应。

“402”在 pH2—4 范围内较为稳定, 100℃

表 1 温度和 pH 对“402”效价的影响

效价	处理条件	处理时间					
		15分钟		30分钟		60分钟	
		100℃	60℃	100℃	60℃	100℃	
pH 2		3.1	4.2	3.1	3.5	2.1	
pH 4		3.4	3.5	4.1	4.05	2.2	
pH 7		0	1.07	0	1.05	0	
pH 8		0	1.04	0	0.85	0	
pH 9		0	0.75	0	0	0	
对照		3.45					

保温 1 小时,活力降低 30%; pH 在 7 以上则很不稳定, 100℃ 保持 15 分钟即全部失活(表 1)。

“402”是一个多组分抗菌素, 用纸层析分离, 可得到三个对茚三酮呈阳性反应的斑点, 对枯草杆菌 63501 都有抑菌活性(图 4), 所用溶剂系统为吡啶 10: 正丁醇 10: 醋酸 3: 水 12: 第三丁醇 4, R_f 值分别为 0.45, 0.40, 0.30。

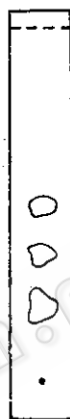


图 4 “402”组分的纸层析图谱

四、酸性水解物的分析

将“402”盐酸盐用 6N 盐酸溶解后, 封装入安瓿管, 于 100℃ 水浴水解 10 小时后, 将水解产物进行纸层析, 用茚三酮试剂显影, 见图 5。

上述结果可看出: “402”在 8 个溶剂系统中的纸层析图谱和不同介质中的高压电泳, 均向负极方向泳动, 说明它是一个强碱性水溶性抗菌素。它至少含有性质十分相似的三个组分。功能团的测定表明分子中有 α -氨基、肽键及

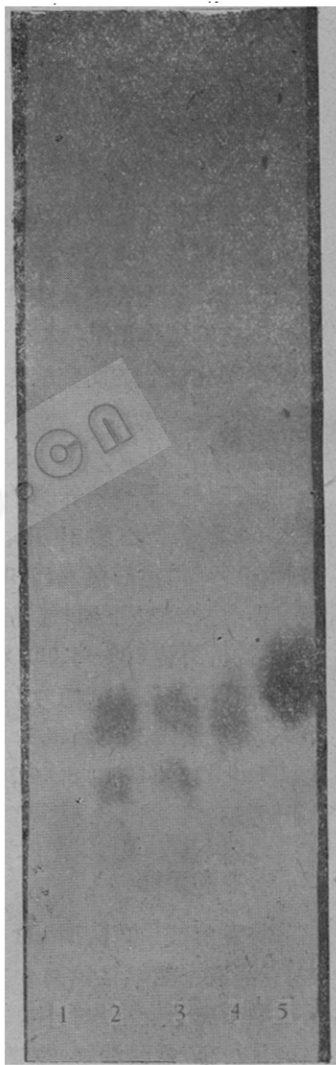


图 5 “402”酸性水解产物的纸层析*
* 溶剂系统: 第三丁醇: 乙酸: 水, 图中 1 为“402”盐酸盐, 2 为 100℃ 酸水解 10 小时, 3 为同温酸水解 20 小时, 4 为 β -赖氨酸, 5 为甘氨酸

氨基己糖等部分。对酸性水解产物的分析,证明 β -赖氨酸的存在。因之,推测“402”是属于链丝菌素类的抗菌素。至于它是否与报道过的含 β -赖氨酸的许多链丝菌素类抗菌素相同,尚未能做出肯定的结论。链丝菌素类抗菌素对作物病害有防治效果^[3,4],但由于毒性较大未见于生产应用。1974年,国外报道了一种没有延缓毒性的该类抗菌素RH4^[5]。从我们几年来的筛选经验表明,找到效果好、毒性低的链丝菌素类抗菌素仍然是有希望的。

参 考 文 献

- [1] 郑幼震等: 微生物学通报, 7(1): 1—5, 1980。
- [2] Доскоцилова, Д. и М. Вонбралек: *Антибиотики* 6: 694, 1961.
- [3] Macey, P. E.: *The Present status of Antibiotics, P., Antibiotics in Agriculture Proceedings of the University of Nottingham Ninth Easter School in Agriculture Science 1962.* Edited by Walcolm Woodbine, Butterworths Scientific Publications, London.
- [4] 张鸿龙等: 《全国第三次抗菌素学术会议论文集》, 第四册, 科学出版社, 北京, 1965年, 第20页。
- [5] Sawada, Y. et al.: *J. Antibiotics*, 27: 535, 1974.