

# 娄彻氏链霉菌 ATCC10739 产抗生素 Borrelidin 发酵条件优化及其分离纯化

李周 赵圣印\*

(东华大学 化学化工与生物工程学院 上海 201620)

**摘要:** 对娄彻氏链霉菌 ATCC10739 固体发酵产生十八元大环内酯抗生素 Borrelidin 进行了发酵条件的优化。首先筛选得到了理想的发酵培养基; 其次考察了发酵时间、起始 pH 值以及在 ISP-2 培养基中添加附加碳源、氮源对 Borrelidin 产量的影响。初步确定最适发酵条件为: ISP-2 培养基中添加 1% 甘油, 起始 pH 值为 6.0, 培养温度 30 °C, 发酵时间为 7 d, 产量可达 1.336 mg/L。采用有机溶剂萃取、硅胶层析和半制备型高效液相色谱(HPLC)等分离技术纯化得到 Borrelidin。

**关键词:** 娄彻氏链霉菌, Borrelidin, 固体发酵, 分离纯化

## Borrelidin production by *Streptomyces rochei* ATCC10739: optimization of fermentation, separation and purification conditions

LI Zhou ZHAO Sheng-Yin\*

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

**Abstract:** The solid fermentation conditions, including fermentation medium, fermentation time, initial pH, as well as additional carbon and nitrogen source for borrelidin produced by *Streptomyces rochei* ATCC10739 were investigated. Under the optimal fermentation conditions (ISP-2 medium supplemented with 1% glycerol; initial pH 6.0; culture temperature 30 °C; fermentation time, 7 days), the highest borrelidin production level was achieved as 1.336 mg/L media. Borrelidin was separated and purified by organic extraction, followed by silica gel chromatography and semipreparative high performance liquid chromatography (HPLC).

**Keywords:** *Streptomyces rochei*, Borrelidin, Solid fermentation, Separation and purification

1949 年, Berger 等人在娄彻氏链霉菌 (*Streptomyces rochei*) 代谢产物中分离得到一种具有

抗包柔氏螺旋体菌(Anti-Borrelia)活性的十八元大环内酯类抗生素 Borrelidin (图 1)<sup>[1]</sup>, 其结构于 1967

\* 通讯作者: Tel: 86-21-67792776; ✉: syzhao8@dhu.edu.cn  
收稿日期: 2010-11-17; 接受日期: 2011-02-23

年通过 NMR 和 X-ray 得到阐明<sup>[2-3]</sup>。Borrelidin 具有抗病毒活性和抗菌活性<sup>[4]</sup>, 研究表明该抗生素的活性可能来自于对 Threonyl-tRNA 合成酶的抑制作用<sup>[5]</sup>。最近 Borrelidin 被发现具有 CDK (依赖于细胞周期蛋白的激酶)抑制剂活性和抑制血管生成活性 (IC<sub>50</sub> 0.8 μmol/L)<sup>[6]</sup>, 其抑制血管生成活性对抗癌治疗可能有一定影响<sup>[7]</sup>, 具有研究价值。

Borrelidin 可以采用液体发酵和固体发酵来生产<sup>[8-9]</sup>, 也可通过全合成方法获得<sup>[10-13]</sup>, 但由于 Borrelidin 结构较为复杂, 使用全合成方法合成路线长、操作繁琐。而通过微生物发酵的方法进行制备具有耗时短、成本低、发酵重现性好的优势。但液体发酵 Borrelidin 化合物产量低, 且液体培养基处理时化合物不稳定。在固体发酵时, 培养基和培养条件对其产量影响很大, 条件不合适时产量甚微, 甚至不产生。因此, 本工作对娄氏链霉菌固体发酵法生产 Borrelidin 的条件进行优化, 以提高其产量, 并对菌株所产抗生素进行了分离纯化。

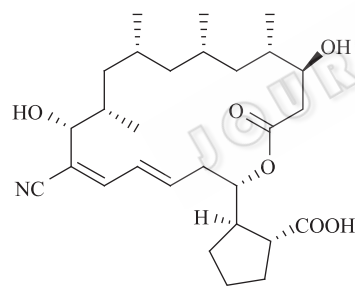


图 1 Borrelidin 的结构图  
Fig. 1 Structure of Borrelidin

1 材料与方法

1.1 菌种和仪器

娄氏链霉菌 ATCC10739: 购自美国标准菌种收藏所。

LC-MS 质谱仪: LCQ Fleet Ion Trap MSn Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific); 高效液相色谱仪: Agilent 1100 series 及 Agilent 1200 series (美国 Agilent 公司); 冷冻抽干机: ALPHA 1-2 LD, ALPHA

1-4 (德国 CHRIST 公司); 核磁共振谱仪: Bruker Ultrashield Plus 400M。

1.2 培养基<sup>[14]</sup>

1.2.1 生孢培养基: R2YE 培养基。

1.2.2 固体发酵培养基: 参照链霉菌手册, 选用常用链霉菌发酵培养基: R2YE 培养基, MS 培养基, Bn-2 培养基, ISP-2 培养基, ISP-4 培养基。所有培养基均 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

1.3 实验方法

1.3.1 发酵: (1) 孢子培养: 取活化后的孢子接种于 R2YE 培养基的玻璃培养皿中, 30 °C 培养 7 d 后, 用 20%甘油冲洗孢子, 玻璃珠打散, 孢子悬液于 -80 °C 保存。

(2) 固体发酵: 直径 150 mm 玻璃培养皿装 50 mL 固体培养基, 每块培养皿接种 120 μL 孢子悬液, 30 °C 培养。不同实验因素根据设计实施。

1.3.2 发酵产物中 Borrelidin 含量的测定方法: (1) 样品处理: 取固体发酵产品于 -80 °C 冰箱冷冻过夜后冷冻抽干, 培养基研磨后加 300 mL 甲醇萃取, 在冰水浴中超声破碎处理 30 min, 悬浮液搅拌 1 h, 抽滤后滤液浓缩至 400 μL, 转至 EP 管中, 保存于 -20 °C 冰箱, 即为待分析样品。

(2) Borrelidin 含量测定: 采用高效液相色谱法分析, 色谱柱为 Diamonsil 5 μm C18 柱, 流动相中 A 相为水, B 相为乙腈, 两相均添加 1‰ HCOOH, 紫外检测器的检测波长为 254 nm, 体积流量为 1 mL/min, 进样量 20 μL, 洗脱梯度见表 1。

表 1 HPLC 洗脱梯度 Table 1 Elution gradient of HPLC			
HPLC 分析 HPLC analysis		半制备 HPLC Semipreparative HPLC	
时间 Time (min)	B 相 B%	时间 Time (min)	B 相 B%
0	10	0	10
5	10	1	10
25	85	3	85
27	85	9	85
29	10	10	10
30	10	11	10

**1.3.3 发酵产物中 Borrelidin 的分离与纯化:** (1) Borrelidin 的粗提: 方法同样品处理, 甲醇萃取液即为粗提浸膏。

(2) 两次硅胶柱层析纯化: 硅胶采用湿法装柱, 粗提物拌样后干法上柱。第一次柱层析洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯=8:2、6:4、4:6、2:8、0:10 (V/V), 每个梯度洗 3 个柱体积, 分部收集并进行 HPLC 检测。将含有化合物的各部分合并旋干, 用少量甲醇溶解进行第 2 次柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯=7:3 (V/V), 含有化合物的部分旋干后用甲醇溶解, 准备半制备 HPLC 纯化。

(3) 半制备 HPLC 纯化: 将硅胶柱层析后收集到的样品用半制备 HPLC 纯化, 采用 Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 半制备柱, 流动相中 A 相为水, B 相为乙腈, 两相均添加 1% HCOOH, 流速为 3 mL/min, 紫外检测器的检测波长为 254 nm, 洗脱梯度见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵条件的优化

**2.1.1 不同培养基对 Borrelidin 产量的影响:** 150 mm 玻璃培养皿装 50 mL 固体培养基, 分别为 R2YE、MS、ISP-4、ISP-2、Bn-2 培养基, 进行 Borrelidin 固体发酵, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 9 d。Borrelidin 产量见图 2。

如图 2 所示, ISP-2 培养基固体发酵 Borrelidin 的产量最高。实验发现 ISP-2 培养基固体发酵生孢情况较差, 菌丝生长也较差, 平板上只有较薄的一

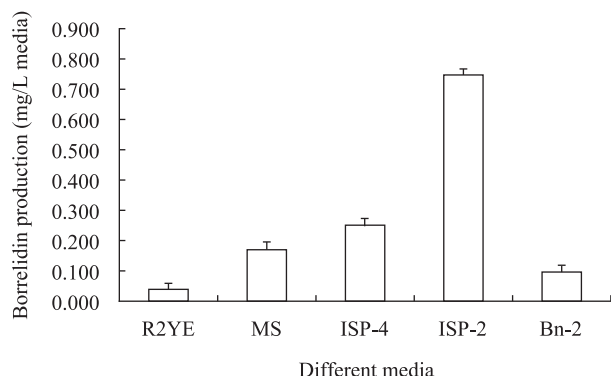


图 2 不同固体培养基对 Borrelidin 产量的影响  
Fig. 2 Effect of different media on the Borrelidin production

层菌丝体; ISP-4 培养基固体发酵情况与 ISP-2 培养基类似, 平板上只有较薄的一层菌丝体, 菌丝体密度略好于 ISP-2; MS 培养基生孢一般, 孢子化程度一般, 菌丝生长较好, 平板一般为灰白色; Bn-2 培养基生孢一般, 孢子化程度一般, 平板部分区域呈灰褐色; R2YE 培养基固体发酵生孢较好, 孢子化程度高, 发酵 9 d, 平板基本呈灰褐色。

**2.1.2 培养时间对 Borrelidin 产量的影响:** 150 mm 玻璃培养皿装 50 mL ISP-2 培养基, 进行 Borrelidin 固体发酵。因发酵时间太短 Borrelidin 产量低, 所以发酵时间定为 6–10 d。每天收取玻璃培养皿于  $-80^{\circ}\text{C}$  冷冻处理, 结果见图 3。

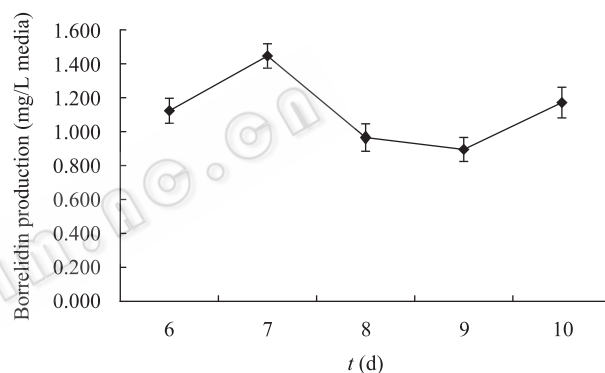


图 3 不同培养时间对 Borrelidin 产量的影响  
Fig. 3 Effect of different days on the Borrelidin production

如图 3 所示, 固体培养 6 d, Borrelidin 产量迅速增加, 8–9 d 出现负增长, 可能是菌体在生长过程中有所消耗, 第 10 天化合物产量有所回升。从 Borrelidin 的积累量来看, *S. rochei* ATCC10739 固体发酵的周期以 7 d 为宜。

**2.1.3 起始 pH 值对 Borrelidin 产量的影响:** 分别调整起始 pH 值至 3.0、4.5、6.0、7.5、9.0, 按上述条件进行固体发酵培养, 测定 Borrelidin 产量, 结果见图 4。起始 pH 值为 3.0 时, 固体培养基无法凝固。起始 pH 值不同对 Borrelidin 产量有一定影响, 由实验结果可知弱酸性 pH 较利于 Borrelidin 的产生。

**2.1.4 附加碳源对 Borrelidin 产量的影响:** 以 ISP-2 培养基为对照, 选择乳糖、糊精、淀粉、甘油及蔗糖作为附加碳源, 比较不同质量分数碳源对 Borrelidin 产量的影响, 结果见图 5。

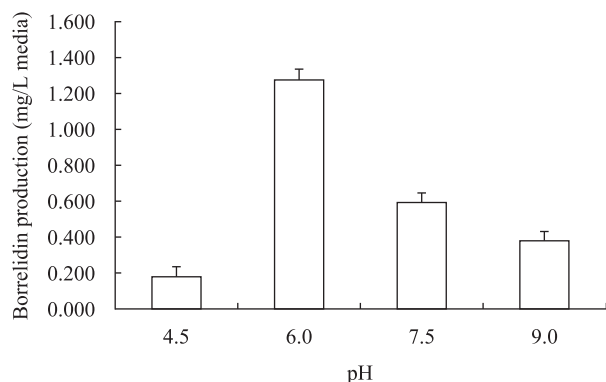


图4 起始 pH 对 Borrelidin 产量的影响

Fig. 4 Effect of initial pH on the Borrelidin production

图5表明,在所选择的5种附加碳源中,甘油、乳糖和淀粉最好。加入质量分数为1.0%的甘油, Borrelidin 产量可达1.336 mg/L 培养基;加入质量分数为1.0%的乳糖, Borrelidin 产量达1.110 mg/L 培养基;加入质量分数为1.5%的淀粉, Borrelidin 产量可达0.994 mg/L 培养基。显然,利用甘油作为附加碳源 Borrelidin 产量最高。

**2.1.5 附加氮源对 Borrelidin 产量的影响:** 选取黄豆饼粉、草酸铵、硝酸钠、胰蛋白胍和硫酸铵为附加氮源进行比较,培养条件同附加碳源和结果见图6。

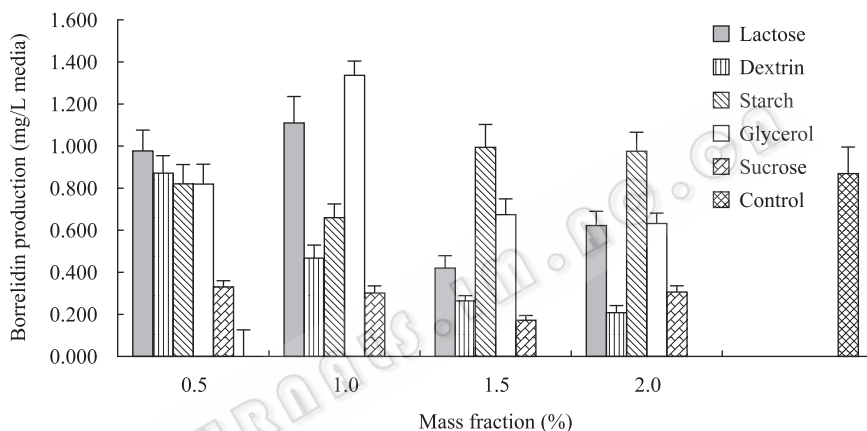


图5 不同附加碳源及其质量分数对 Borrelidin 产量的影响

Fig. 5 Effect of different additional carbon source and its concentration on the Borrelidin production

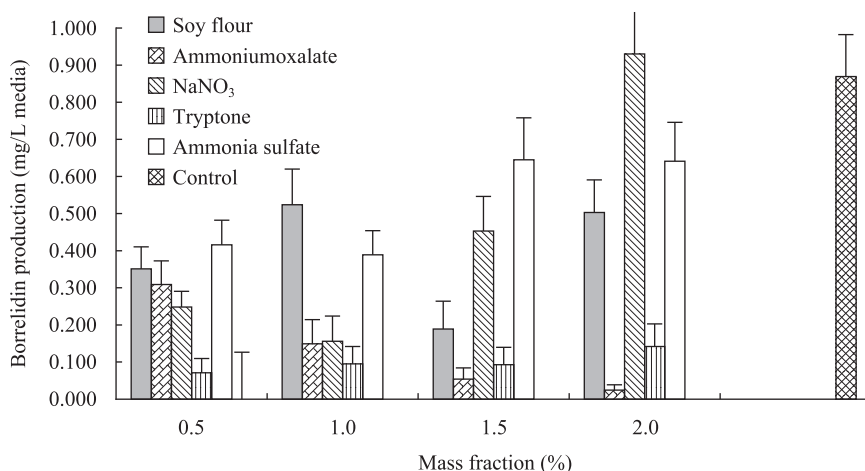


图6 不同附加氮源及其质量分数对 Borrelidin 产量的影响

Fig. 6 Effect of different additional nitrogen source and its concentration on the Borrelidin production

图6表明,在所选择的5种氮源中,加入质量分数为2.0%的 $\text{NaNO}_3$ , Borrelidin 产量达0.930 mg/L 培养基,加入胰蛋白胨 Borrelidin 产量下降,添加不同氮源化合物产量都没有明显增加反而降低,所以试验中不再选用附加氮源。

## 2.2 Borrelidin 的分离纯化

**2.2.1 硅胶柱层析纯化:** Borrelidin 粗提浸膏经2次硅胶柱分离后,由液质检测(ESI-MS  $m/z$  488.35  $[\text{M}-\text{H}]^-$ )确证化合物成功提取分离,化合物出峰时间为24.51 min。

**2.2.2 半制备 HPLC 纯化:** 经半制备 HPLC 纯化,得到较纯的 Borrelidin 样品, HPLC 出峰时间为24.244 min,经高分辨质谱检测和 $^1\text{H}$ NMR 确证化合物, HR-ESI-MS  $m/z$  488.3033  $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值 $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{NO}_6$ , 488.3090), Borrelidin 的 $^1\text{H}$ NMR 数据与文献[15]报道相符,确证纯化得到的化合物为目标产物。

## 3 结论

本文对娄彻氏链霉菌 ATCC10739 固体发酵产 Borrelidin 条件的研究表明,不同培养基对该菌产 Borrelidin 影响很大,ISP-2 培养基较最初的 R2YE 培养基 Borrelidin 产量提高近20倍;其次是附加碳源能显著提高 Borrelidin 产量,尤其是添加1%的甘油;培养基的起始 pH 值也是较重要的影响因素;附加氮源对产量提高作用不明显。通过发酵条件优化,化合物产量稳定在约1 mg/L 培养基,产量显著提高,国内对 Borrelidin 发酵的研究较少,若要进一步提高化合物产量,可尝试对化合物基因簇进行异源表达或尝试更多的发酵培养基及廉价的营养源。经硅胶柱层析、半制备高相液相色谱纯化得到 Borrelidin 抗生素,有关 Borrelidin 的生物活性研究正在进行之中。

## 参 考 文 献

[1] Berger J, Jampolsky LM, Goldberg MW. Borrelidin, a new antibiotic with antiborrelia activity and penicillin enhancement properties[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1949, 22(3): 476–478.  
[2] Keller-Scheirlein W. Composition of the antibiotic bor-

relidin[J]. Helvetica Chimica Acta, 1967, 50(3): 731–753.  
[3] Anderson BF, Herlt AJ, Richards RW, et al. Crystal and molecular structures of two isomorphous solvates of the macrolide antibiotic borrelidin: absolute configuration determination by incorporation of a chiral solvent in the crystal lattice[J]. Australian Journal of Chemistry, 1989, 42(5): 717–730.  
[4] Dickinson L, Griffiths AJ, Mason CG, et al. Anti-viral activity of two antibiotics isolated from a species of *Streptomyces*[J]. Nature, 1965, 206(981): 263–265.  
[5] Paetz W, Nass G. Biochemical and immunological characterization of threonyl-tRNA synthetase of two Borrelidin-resistant mutants of *Escherichia coli* K12[J]. European Journal of Biochemistry, 1973, 35(2): 331–337.  
[6] Wakabayashi T, Kageyama R, Naruse N, et al. Borrelidin is an angiogenesis inhibitor; disruption of angiogenic capillary vessels in a rat aorta matrix culture model[J]. The Journal of Antibiotics, 1997, 50(8): 671–676.  
[7] Tsuchiya E, Yukawa M, Miyakawa T, et al. Borrelidin inhibits a cyclin-dependent kinase (CDK), Cdc28/Cln2, of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The Journal of Antibiotics, 2001, 54(1): 84–90.  
[8] Saisivam S, Bhikshapathi DVRN, Krishnaveni J, et al. Isolation of borrelidin from *Streptomyces californicus*-an Indian soil isolate[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2008, 7(3): 349–355.  
[9] Lumb M, Macey PE, Spyvee J, et al. Isolation of vivomycin and borrelidin, two antibiotics with anti-viral activity, from a species of *Streptomyces*[J]. Nature, 1965, 206(4981): 263–265.  
[10] Duffey MO, LeTiran A, Morken JP. Enantioselective total synthesis of Borrelidin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(6): 1458–1459.  
[11] Nagamitsu T, Takano D, Marumoto K, et al. Total synthesis of borrelidin[J]. Journal of Organic Chemistry, 2007, 72(8): 2744–2756.  
[12] Vong BG, Kim SH, Abraham S, et al. Stereoselective total synthesis of (-)-borrelidin[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2004, 43(30): 3947–3951.  
[13] Nagamitsu T, Takano D, Fukuda T, et al. Total synthesis of (-)-borrelidin[J]. Organic Letters, 2004, 6(11): 1865–1867.  
[14] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Colney: John Innes Centre, Norwich Research Park, 2000: 405–420.  
[15] Hanessian S, Yang Y, Giroux S, et al. Application of conformation design in acyclic stereoselection: total synthesis of borrelidin as the crystalline benzene solvate[J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(45): 13784–13792.