

炭样小单孢菌 JXNU-1 广谱抗生素 产物的分离及其理化性质

龙中儿* 朱跃进 黄运红 付学琴

(江西师范大学生命科学学院 南昌 330022)

摘要: 基于实验室自行分离到的一株具有广谱抗菌活性的炭样小单孢菌 JXNU-1, 研究了该菌株广谱抗生素产物的分离纯化工艺及其部分理化性质。结果表明, 该菌产生的抗生素在中性和碱性条件下具有极高的热稳定性, 但在酸性条件下不稳定。发酵液通过离心、过滤的预处理过程后, 抗生素可吸附到 717 型阴离子交换树脂上, 经 2 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱除杂, 再用 20% 的乙醇洗脱, 可得抗生产品, 且在 20% 的乙醇溶液中加入 2 mol/L 的 NaCl, 可大大提高抗生素的洗脱效率。抗生素的酒精——盐洗脱液经减压浓缩去酒精、透析除盐后可得抗生素的水溶液。该抗生素水溶液经纸层析分析仅检测到单一活性斑点, HPLC 分析表明其纯度达到 99% 以上。所得抗生素在 Molish 反应, Benedict 反应和二苯胺反应中均呈现阳性, 紫外吸收具有典型的核苷类物质的光吸收特征, 推测该抗生素为一核苷类抗生素。

关键词: 炭样小单孢菌, 抗生素, 分离纯化

Isolation and Purification of Antibiotic from the Fermentation Broth of *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 and Its Physical-chemical Properties

LONG Zhong-Er* ZHU Yue-Jin HUANG Yun-Hong FU Xue-Qin

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022)

Abstract: Based on the strain of *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 with board-spectrum antimicrobial activity, the technology for the isolation and purification of antibiotic from the fermentation broth of the *Micromonospora carbonacea*, and its physical-chemical properties were studied. The results showed that, the antibiotic was stable under the condition of high temperature and alkali, but not in acid solution. After the pretreatment of centrifugation and filtration to remove the cells and lipids, the antibiotic was absorbed to negative exchange resin, and the impurity was excluded when 2 mol/L NaCl was used as primary eluent. The antibiotic could be eluted with 20% alcohol as eluent, and the eluting speed of the antibiotic was greatly accelerated as 2 mol/L NaCl was added into 20% alcohol as final eluent. Aqueous solution of the antibiotic was yielded from the alcohol-salt eluant by decompression concentration to wipe off alcohol and by dialysis to exclude salt. One active component was detected in antibiotic solution by paper chromatography, and the

HPLC purity was over 99%. As the antibiotic shows positive color-forming reaction to Molish reagents, Benedict's reagents and Dihydroxyamine reagents, combined with the characteristics of absorption spectra, it is deduced that the antibiotic belongs to nucleoside antibiotics.

Keywords: *Micromonospora carbonacea*, Antibiotics, Isolation and purification

炭样小单孢菌(*Micromonospora carbonacea*), 在分类学上属于放线杆菌纲, 放线菌目, 小单孢菌科, 小单孢菌属。炭样小单孢菌最初由Luedemann和 Brodsky于 1964 年分离得到^[1], 并发现该菌可以产生一多组分的糖类衍生物抗生素——扁枝衣霉素(Everninomicin)复合物^[2,3]。随后的研究表明扁枝衣霉素复合物是至少由A、B、C、D、E等组分组成的寡糖类复合物, 且各组分分子量均在 1600 左右, 抗革兰氏阳性细菌, 其中D的抗菌作用最强^[4,5]。我国有关炭样小单孢菌的研究, 目前只发现福建省微生物研究所的相关报道^[6-8], 表明除了产扁枝衣霉素^[8]以外, 一株海洋来源的炭样小单孢菌还可产生有免疫抑制和抗肿瘤活性、但没有抗菌活性的异黄酮类物质——大豆黄素和染料木素^[9]。从现有的文献来看, 暂未见有炭样小单孢菌发酵产其他活性产物的报道。

本实验室分离到一株具有广谱抗菌活性的炭样小单孢菌JXNU-1^[10], 本文报道了该菌株发酵所产生抗生素的分离纯化工艺及其理化特性的初步研究概况。

1 材料与方法

1.1 菌种

1.1.1 实验菌株: 炭样小单孢菌 JXNU-1(*Micromonospora carbonacea* JXNU-1), 自行从土壤中分离得到^[10]。

1.1.2 活性检测指示菌: 金黄色葡萄球菌 1.72 (*Staphylococcus aureus* 1.72), 购自中国普通微生物菌种保藏中心, 实验室自行保存于营养琼脂斜面。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 高氏 1 号培养基(实验过程中所用试剂均为生化试剂或分析纯化学试剂, 下同)。

1.2.2 种子培养基: 蔗糖 22.5 g, 黄豆粉 12.5 g, K_2HPO_4 0.2 g, NaCl 1 g, Na_2SO_4 0.1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $CaCO_3$ 2 g, 以蒸馏水定容至 1000 mL, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 备用。

1.2.3 发酵培养基: 淀粉 2.0%, 蔗糖 1.3%, 花生饼

粉 3.5%, NaCl 0.1%, K_2HPO_4 0.01%, Na_2SO_4 0.01%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, $CaCO_3$ 0.3%, 以蒸馏水定容至 1000 mL, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 备用。

1.3 实验方法

1.3.1 炭样小单孢菌的发酵培养: 斜面菌种经活化后, 以接种环取一环孢子接种于 50 mL/250 mL 种子培养基中, 200 r/min, 28 °C 培养 72 h。然后以 6% 的接种量移种于 20 mL/250 mL 发酵培养基中, 同样的条件下培养 108 h。

1.3.2 发酵液预处理: 发酵液 4000 r/min 离心 15 min, 去菌体得上清。上清以新华滤纸过滤除去上层漂浮油脂。

1.3.3 抗生素的活性稳定性: 将经预处理的发酵液分别调 pH 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0, 分别于 30、50、70、90、100 和 121 °C 的条件下静置处理 60 min 后, 立即调 pH 至发酵终了的 pH (pH 7.0 左右)后, 检测其抗菌活性。

1.3.4 抗生素的分离纯化: 采用离子交换法。取经常规方法预处理后的离子交换树脂适量, 与两倍体积预处理后的发酵液混合, 160 r/min, 18 °C 交换吸附 1 h, 上层析柱(内径 21.4 mm、高 22 cm, 其中树脂的填充高度为 20 cm)。然后依据介质的离子强度、pH 和介电常数对吸附离子和离子交换树脂之间静电作用力的影响规律, 选择适宜的洗脱剂进行选择洗脱, 以 10 mL/管收集, 分别检测其抗菌活性, 合并活性洗脱组分。

1.3.5 透析除盐: 收集洗脱液活性组分调 pH 7.0, 减压浓缩后, 置于截留分子量为 100 的透析袋(CE1021-24, 上海绿鸟科技有限公司)中, 蒸馏水透析除盐, 其间每 4 h 更换 1 次蒸馏水。

1.3.6 产物分析: 主要分析该炭样小单孢菌菌株产抗生素的组分、经离子交换分离后抗生素产品的纯度及其结构。其中组分分析采用纸层析法, 将新华滤纸剪成 5 cm×17 cm 大小的滤纸条, 在距边缘 2 cm 处点样, 分别以发酵原液和蒸馏水为对照, 乙醇:氯仿:蒸馏水=10:1:2(V/V/V)为展层剂(通过实验比较各种展层剂极性对层析结果的影响后确定), 室温

条件下上行法展层。展层后,悬挂于通风处干燥,生物显影法^[11]和紫外显影法^[12]显影。纯度分析采用高压液相色谱分析(HPLC-MS ZQ4000/2695, 美国 Waters 公司。色谱条件:色谱柱C18, 进样量 10 μ L, 流动相乙腈:水=5%:95%, 流速 0.9 mL/min, 检测波长 255 nm), 同时检测波长 200 nm~1000 nm 的吸收光谱(UV-VIS 2501 PC, 日本岛津公司)。结构的初步分析综合运用化学定性分析和光谱分析方法。

1.3.7 抗生素的抗菌活性测定:采用杯碟法^[13]测定抗生素的抗菌活性,以抑菌圈直径大小表示抗菌活性的强弱。

2 结果与讨论

2.1 抗生素的活性稳定性

抗生素的活性总是在一定 pH 和温度范围内稳定,超出该范围可能导致它的活性降低,甚至失活。实验首先研究了温度和 pH 值对该炭样小单孢菌菌株所产抗生素活性的影响,结果如图 1 所示:在 pH 7.0、9.0 和 11.0 条件下,抗生素活性随温度变化曲线近乎完全重合,既使在温度高达 121 的条件下,其活性都没有明显降低,表明在中性和碱性(达到 pH 11.0)条件下,炭样小单孢菌产生的抗生素有极强的热稳定性;但在酸性条件下(pH 3.0 和 5.0),随着温度的升高,抗生素的抗菌活性明显降低。

2.2 抗生素的离子交换法分离

选择适合炭样小单孢菌抗生素分离的离子交换剂是实现离子交换法分离的前提。实验分别取 10 mL 经预处理的 732 型(Na 型)和 717 型(Cl 型)树脂,加入适量经预处理后的发酵液中,室温下静态交换吸附 30 min 后,发现只有 717 型树脂交换吸附后的残液中未检测到抗生素活性,说明发酵液中的抗生素可交换吸附到 717 型离子交换树脂上。

随后通过实验对洗脱条件进行了优化。由于 NaCl 是常用的层析洗脱剂,实验选用 0.1 mol/L~4 mol/L NaCl pH 7.0 的磷酸缓冲液进行洗脱,对洗脱液分别进行活性检测,所有浓度的 NaCl 溶液均未能将活性产物洗脱下来,但紫外-可见分光光度分析可知,有许多杂质被洗脱下来。

考虑到低介电常数的介质条件下可以降低阴阳离子间的静电作用力,实验在证实浓度在 50% 及以下的乙醇不影响抗生素的活性之后,采用 20% 的乙醇作为洗脱剂,将活性物质洗脱下来。

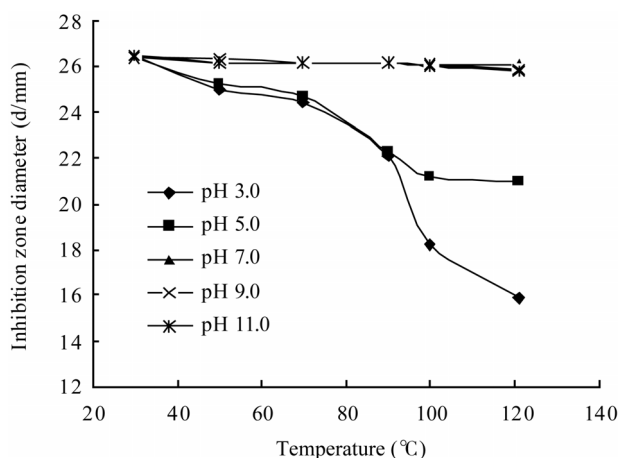


图 1 温度和 pH 对活性物质活性的影响

Fig. 1 Effects of temperature and pH on the activity of the antibiotic.

为提高活性产物的洗脱效率,实验在 20% 的乙醇溶液中加入适量的 NaCl(2 mol/L),活性洗脱峰集中,即抗菌活性物质的洗脱速度增加,最终确定抗菌活性物适宜的洗脱剂为含有 2 mol/L NaCl 的 20% 乙醇溶液。

由于 2 mol/L 的 NaCl 溶液可以除去发酵液中杂质,实验确定的抗生素洗脱方案为分段洗脱:先用 2 倍床体积的 pH 7.0、含 2 mol/L NaCl 的磷酸缓冲液在洗脱速度 120 mL/h 条件下洗脱除杂,再用含 2 mol/L NaCl 的 20%乙醇液以 60 mL/h 的速度洗脱,10 mL/管收集,分管检测活性,洗脱物仅在再次洗脱的最初两管和最后两管未检测到活性,中间表现出很强的抗菌活性。

2.3 透析除盐

由于放线菌来源的抗生素等活性物质的分子量一般在 150 D~2000 D 之间,可采用截留分子量为 100 D 的透析袋除去收集液中的盐离子。因本研究选用透析袋的透析效果受乙醇的影响,实验在透析前采用减压蒸馏的方式除乙醇,最后得到抗生素的水溶液。根据需要,该水溶液通过真空冷冻干燥得到白色、略黄的粉状产品。

2.4 抗生素的组分分析

发酵液(A)、离子交换层析洗脱液的活性峰(B)和生理盐水(C)在各种极性展层剂条件下层析展层后,生物显影的结果均表明离子交换后的洗脱液和发酵液中都仅有一个显影点(抑菌斑),且具有相同的迁移率。展层剂为乙醇:氯仿:蒸馏水=10:1:2(V/V/V)时的生物显影结果如图 2(箭头示

显影点)所示。

同时,透析后的抗生素溶液及发酵液在相同条件下层析展层后,紫外显影(显影波长为 300 nm)结果表明,发酵液(A)和透析后抗生素溶液(B)都只有 1 个显影斑点(如图 3 中箭头所示)。将斑点剪下,粘贴于活性检测平板,亦表现抑菌效果。由此表明分离纯化过程中没有抗生素组分的丢失。

2.5 抗生素的纯度分析

活性产物中的杂质组成及含量对产品的质量有重要影响。发酵液经上述产物分离程序后,所得产物中是否含有杂质及杂质含量有待进一步分析。

实验首先检测了透析除盐后的抗生素的光吸收特征,发现其水溶液仅在紫外区 215 nm 和 260 nm 处有吸收峰(图 4),表明样品中可能含有具有紫外吸

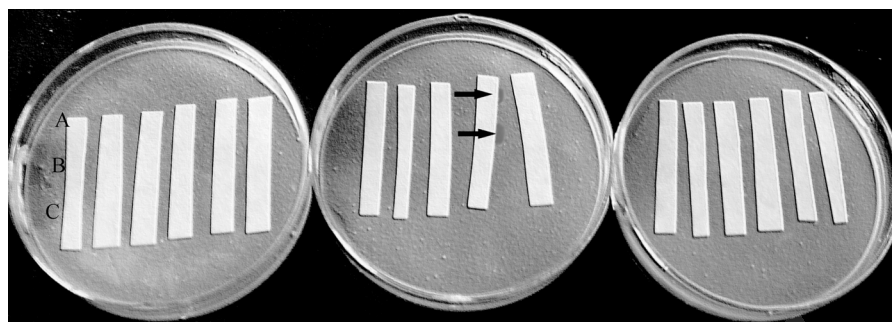


图 2 抗生素纸层析的生物显影图谱

Fig. 2 The biodevelopment map of paper chromatography for the antibiotic

A: 发酵液; B: 离子交换层析洗脱液的活性峰; C: 生理盐水

A: Fermentation broth; B: The eluant of ion exchange chromatography with the antibiotic activity; C: Physiological saline

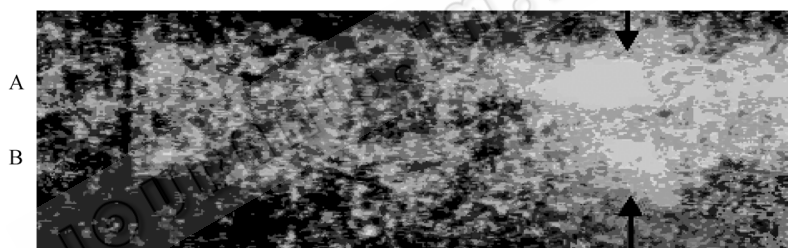


图 3 抗生素纸层析的紫外显影图谱

Fig. 3 The UV development map of paper chromatography for the antibiotic

A: 发酵液; B: 透析后的抗生素溶液

A: Fermentation broth; B: Solution of antibiotic after dialysis

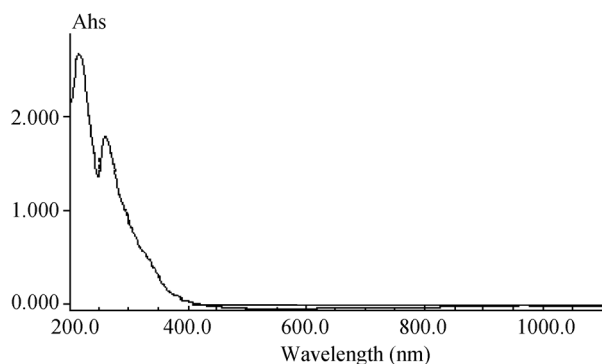


图 4 抗生素的吸收光谱

Fig. 4 The absorption spectra of the antibiotic

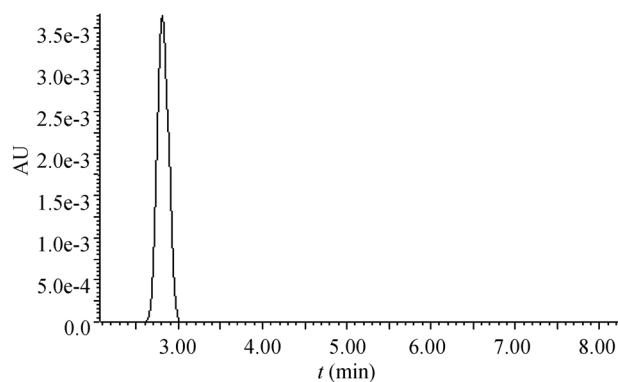


图 5 抗生素的 HPLC 分析图谱

Fig. 5 HPLC spectrum of the antibiotic

收特征的杂质组分;但 HPLC 分析结果仅显示单一而对称的峰(如图 5),表明样品的均一性好,其紫外吸收图谱中的 2 个吸收峰均为抗生素的吸收峰,HPLC 显示其纯度达到 99%以上。

由于抗生素水溶液经纸层析后,其生物显影(如图 2)和紫外显影(如图 3)均显示单一显影点,HPLC 分析又表明其主成分的纯度达到 99%以上,由此表明炭样小单孢菌发酵液中可能仅含有单一组分的抗生素。

2.6 抗生素结构的初步分析

初步的化学分析表明,实验用炭样小单孢菌所产抗生素在 Molish 反应, Benedict 反应和二苯胺反应中均呈现阳性反应,表明该抗生素的结构中含有糖基,结合其在 260 nm 处有吸收峰(核苷类物质的典型紫外吸收特征)的紫外吸收特征(图 4),推测该目标抗生素可能是一核苷类抗生素,其具体结构还有待进一步的研究。

3 结论

本文研究了炭样小单孢菌 JXNU-1 产广谱抗生素的分离纯化工艺及其部分化学性质,结果表明:

(1) 炭样小单孢菌产广谱抗生素在中性及碱性条件下具有极高的热稳定性,在酸性条件下不稳定。

(2) 炭样小单孢菌发酵液通过离心、过滤等发酵液预处理、阴离子交换树脂吸附、2 mol/L NaCl 洗脱除杂和含 2 mol/L NaCl 的 20%的乙醇洗脱、减压浓缩除酒精、透析除盐后可得抗生素水溶液。

(3) 离子交换法分离纯化得到的抗生素溶液,经纸层析分析,其紫外显影和生物显影均显示单一显影点,HPLC 分析表明其主成分的纯度达到 99%以上,表明炭样小单孢菌发酵液中可能仅含有单一组分的抗生素。

(4) 炭样小单孢菌产广谱抗生素在 Molish 反应, Benedict 反应和二苯胺反应中均呈现阳性反应,同时具有典型的核苷类物质吸收光谱特征,推测该抗生素为一核苷类抗生素。

参考文献

- [1] Luedemann GM, Brodsky BC. *Micromonospora carbonacea* sp. n., an everninomicin producing organism. In: Sylvester JC. Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1964. Ann Arbor, Michigan: American Society for Microbiology, 1965, pp.47-52.
- [2] Weinstein MJ, Luedemann GM, Oden EM, et al. Everninomicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora carbonacea*. In: Sylvester JC. Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1964. Ann Arbor, Michigan: American Society for Microbiology, 1965, pp.24-32.
- [3] Herzog HL, Meseck E, Delorenzo S, et al. Chemistry of antibiotics from *Micromonospora*: III. Isolation and characterization of everninomicin D and everninomicin B. *Applied Microbiology*, 1965, **13**(4): 515-520.
- [4] Chu M, Mierzwa R, Patel M, et al. A novel everninomicin antibiotic active against multidrug-resistant bacteria. *Tetrahedron Letters*, 2000, **41**(35): 6689-6693.
- [5] Mierzwa RA, Chu M, Jenkins JK, et al. Orthosomycins from *Micromonospora carbonacea*. United States Patent 5780442, 1998-7-14.
- [6] 程元荣, 黄 威. 小单孢菌产生的生物活性物质. 国外医药·抗生素分册, 1998, **19**(6): 407-418, 442.
- [7] 程元荣, 郑 卫. 小单孢菌及其产生的次级生物活性代谢产物. 中国抗生素杂志, 2006, **31**(6): 321-327.
- [8] 程振泰, 庄 鸿, 黄喜桂, 等. 小单孢菌产生的扁枝衣霉素 B 的研究. 海峡药学, 2006, **18**(5): 184-186.
- [9] 江红, 程元荣, 郑 卫. 海洋炭样小单孢菌产生的大豆黄素和染料木素. 中国海洋药物, 2007, **26**(1): 8-12.
- [10] 龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 一株具有广谱抗菌活性小单孢菌的分离和鉴定. 微生物学通报, 2008, **35**(3): 378-383.
- [11] Mullika TC, Suvimol S, Veena SN, et al. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, **101**(1-3): 330-333.
- [12] 王艳红, 吴元华, 朱春玉, 等. Diaion HP20 大孔吸附树脂与薄层层析法分离提取噬肽霉素. 黑龙江八一农垦大学学报, 2005, **17**(4): 22.
- [13] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2003, p.111.