

苍黄霉素的 研究

1. 苍黄霉素的分离和鉴定

王春平 叶绪慰 洪登璧 姜淑珍 刘肃

(中国科学院微生物研究所,北京)

苍黄霉素是苍黄诺卡氏菌苍黄霉素变种 (*Nocardia lurida* var. *Luridomycina*) 71-N40 产生的抗生素。它是两性(偏碱)水溶性物质,对革兰氏阳性细菌、分枝杆菌有抑制作用。本文报道苍黄霉素的发酵、产物的分离及其复合物的理化性质。

材 料 和 方 法

一、菌株

苍黄诺卡氏菌苍黄霉素变种 71-N40 经自然分离得到两个菌株,一株在斜面培养基上产

生黑褐色色素,菌落表面粗糙,有较茂盛的白色气生菌丝,编号为 71-N40B。另一株菌在斜面培养基上不产生色素,菌落表面致密,气生菌丝较少,编号为 71-N40W。通过摇瓶发酵试验,证明二株菌产生抗生素的效价相近,但 71-N40W 产生抗生素的时间较早。故选用 71-N40W 菌株做试验菌株。

二、培养基和培养条件

(一) 培养基

1. 斜面培养基组成(%): 黄豆饼粉 1(浸汁),葡萄糖 1,蛋白胨 0.3,NaCl 0.25,CaCO₃ 0.3,

琼脂2。pH 7.2—7.4, 120℃ 30 min 灭菌。

2. 摇瓶种子培养基组成(%)：黄豆饼粉2, 葡萄糖 2, 蛋白胨 0.5, CaCO₃ 0.2, pH 7.0, 120℃, 30 min 灭菌。

3. 发酵培养基组成(%)：黄豆饼粉 2, 淀粉 1, 豆油 1.5, NaNO₃ 0.3, NaCl 0.5, CaCO₃ 0.2, pH 7.0。

(二) 发酵条件

摇瓶发酵采用 500ml 三角瓶装 50ml 培养液, 摇瓶种子和发酵试验均在旋转式摇床上进行, 转速 220rpm, 偏心距 5cm, 培养温度 28℃, 种龄 24—30h, 接种量 5%。

发酵罐试验用二级种子, 第二级种子罐为 30 L 的不锈钢罐, 发酵罐为 240 L 不锈钢罐。通气量为 1:1.5(V/V/min), 搅拌速度为 260rpm, 接种量为 5—6%, 培养温度为 28℃, 培养时间 4 天。

三、生物效价测定

采用双层琼脂杯碟法, 测定菌为枯草杆菌 6633(As 1.339), 相对标准曲线范围在 10—250 μg/ml。

四、分离和纯化

发酵液加草酸调至 pH 4 过滤。滤液调至 pH 6, 通过强酸型阳离子交换树脂柱(1 × 1.1), 用 1N NH₄OH 洗脱, 部分收集器收集洗脱液, 将洗脱液调至 pH 5, 减压浓缩至 1/2 体积, 用硫酸调至 pH 3—4, 通过间苯二胺树脂(SO₃⁻型)脱色, 脱色液浓缩后, 滴到温乙醇中得絮状沉淀, 离心, 真空干燥后得棕色粉状粗制品, 纯度为 15—30%。

粗制品溶于水, 通过 CM-Sephadex C-25(钠型)柱, 用含 25% 甲醇的 pH 1 的硫酸水溶液和水组成梯度洗脱液处理, 洗脱液用 Ba(OH)₂ 调至 pH 6 后离心, 上清液浓缩, 浓缩液通过酸处理的氧化铝柱, 收集活性部分滴加到 95% 的温乙醇中, 得絮状沉淀, 离心、真空干燥, 得白色无定形粉末, 纯度为 95%。纯品在酸性乙醇中放置可得片状结晶。

五、抗菌谱的测定

采用杯碟法和纸片法。

测定培养基: 分枝杆菌培养基为 1000 ml 牛肉汁中加蛋白胨 10g, 甘油 10g, Tween 80 0.1 g, 琼脂 20g, 再加孔雀绿 0.01g, pH 7.2。其他菌用肉汁-蛋白胨培养基培养。

试验菌由中国科学院微生物研究所菌种保藏室和北京医学院附属第一医院抗菌素室提供。

六、样品水解和产物的分析

将抗生素复合物样品和 1N 硫酸封装入安瓿管内, 100℃ 水解 10 小时, 水解液用 Ba(OH)₂ 中和, 清液进行糖和氨基酸的纸色谱分析。糖的纸色谱显色剂为苯胺钛酸盐和苯胺二苯胺磷酸盐。氨基酸的纸色谱分析以茚三酮为显色剂。

结 果

一、发酵培养基的研究

菌株 71-N40 W 的原始效价很低, 只有 50 μg/ml。为了提高效价进行了发酵培养基试验。

(一) 不同碳源试验

碳源比较试验结果说明, 用葡萄糖和淀粉, 产量最高(60.9 μg/ml 和 58.1 μg/ml), 其次为甘油、豆油、纤维素、糠醛渣和糖蜜。而用乙酸钠则不产生抗生素。

(二) 不同氮源试验

结果表明, 以黄豆饼粉为最好(53.4 μg/ml), 其次是酵母粉、玉米浆和硝酸钠。用硫酸铵、硝酸铵和蛋白胨不产生抗生素。

根据上述结果, 并考虑到生产上的可能性, 我们选用黄豆饼粉 2%, 淀粉 1%, 豆油 1.5%, NaNO₃ 0.3%, NaCl 0.5%, CaCO₃ 0.2%, pH 7.0 作培养基供发酵用。在 30 L 罐中二级发酵, 接种量 5—6%, 28℃, 培养 4 天抗生素的效价可达 120 μg/ml。

(三) 生物活性:

该抗生素复合物只抑制革兰氏阳性细菌和分枝杆菌, 对革兰氏阴性细菌和其他细菌无活性。抗菌谱的测定结果见表 1。

(四) 71-N40 抗生素复合物的理化性质:

1. 溶解度、熔点和旋光度: 71-N40 菌所产生的抗生素复合物为白色片状结晶, 两性(偏

表1 71-N40 抗生素复合物的抗菌谱

试验菌名和菌号	最低抑菌浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
金黄色葡萄球菌 AS 1.801 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	6.25—12.5
同上 AS 1.879	12.5—25.0
同上 AS 1.363	50
同上 AS 1.879 (<i>Sarcina lutea</i>)	100
藤黄八叠球菌 AS 1.880 (<i>Bacillus subtilis</i>)	25—50
枯草杆菌 AS 1.339 (<i>Proteus sp.</i>)	6.25—12.5
变形杆菌 AS 1.491 (<i>Mycobacterium sp.</i>)	>1000
分枝杆菌 AS 1.562 (<i>Streptococcus faecalis</i>)	0.78—1.56
粪链球菌 AS 1.2 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	>1000
绿脓杆菌 AS 139-A	>1000
同上 北医一号	>1000

碱)物质。它易溶于水,微溶于甲醇、乙醇。见图1。其熔点为 180°C ;旋光 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 81.7^{\circ}$ (C1, 水)。

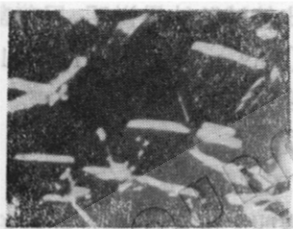


图1 71-N40 抗生素复合物硫酸盐结晶

2. 高压纸电泳: 新华1号滤纸,在柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中, pH 4, 4000 V, 30 mA, 1h, 向负极移动 2.3cm。pH 10, 3000V、80 mA, 1h 向正极移动 4.6cm。

3. 纸色谱: 新华1号滤纸,上行。2.5%氯化铵水溶液 Rf: 0.52, 0.72; 水 Rf: 0.23, 0.55; 甲醇: 3% 氯化铵 (7:3) Rf: 0.45; 甲醇: 2.5% 氯化铵 (1:1) Rf: 0.5, 0.8; 丁酮: 丁醇: 水 (30: 15:65) Rf: 0.14, 0.81; 甲醇: 水 (4:6) Rf: 0.64。

4. 纤维素薄层色谱: 71-N40 抗生素复合物在以 0.25% 氯化铵水溶液作为展层剂的纤维素薄层色谱上, 分离成四个组分, Rf 值为: A 0.81, B 0.62, C 0.142, D 0.13。其中 C、D 二组分含量较高。

5. 元素分析值: 71-N40 抗生素复合物硫酸盐元素分析的实验值为: C 49.89, 49.66; H 7.56, 7.53; N 11.35, 11.32; S 0.30, 0.28。

6. 紫外吸收光谱: 结果见图2。

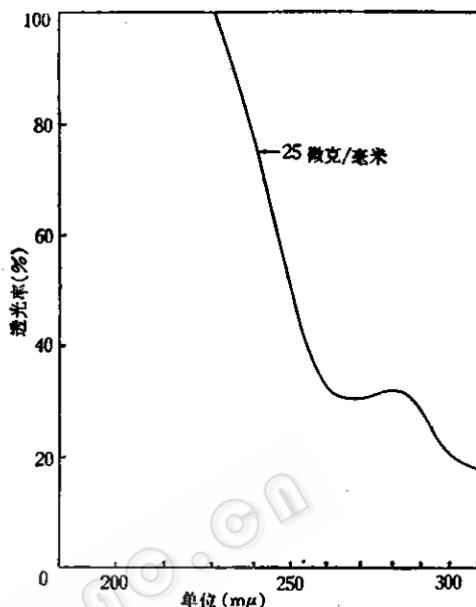


图2 抗生素复合物的紫外吸收光谱

7. 红外吸收光谱(溴化钾压片法): 71-N40 抗生素复合物硫酸盐在 3100cm^{-1} , 1382cm^{-1} 和 1110cm^{-1} 处有强吸收峰, 在 1620cm^{-1} , 1480cm^{-1} 和 1170cm^{-1} 处有较强吸收峰, 见图3。

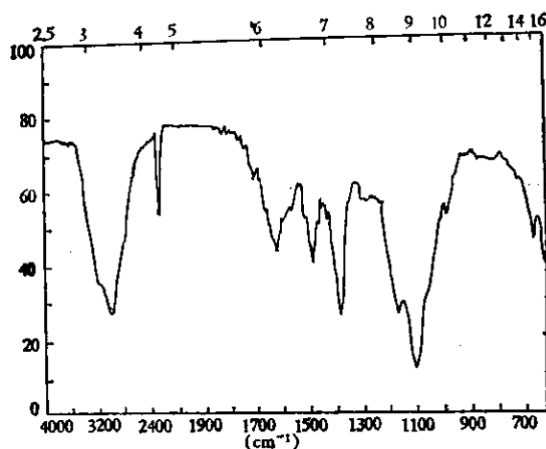


图3 71-N40 抗生素复合物硫酸盐的红外吸收光谱

(五) 水解产物的分析

71-N40 抗生素复合物水解产物的糖纸色

谱用 Schleicher & Schüll 2045 b 滤纸,上行,以苯酚:水:浓氨水 (160 g:40ml:1ml) 和正丁醇:醋酸:水 (8:3:1) 两种溶剂系统展层,结果除瑞斯托菌素所含的糖(葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖和鼠李糖)以外,还在 Rf 0.4 处有一个甾三酮

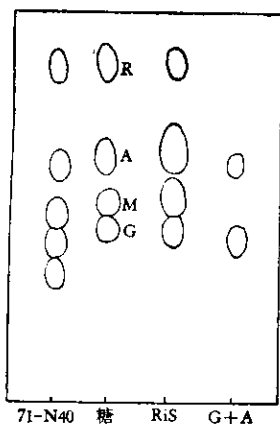


图 4 71-N40 抗生素复合物水解产物的纸色谱

A 为阿拉伯糖; R 为鼠李糖; G 为葡萄糖; M 为甘露糖; Ris 为 Ristocetin 的水解产物。

表 2 71-N40 抗生素复合物与瑞斯托菌素 A、B 复合物理化性质的差异

测定项目	样品	71-N40 抗生素复合物	瑞斯托菌素 A、B 复合物
熔点(°C)		180	250
旋光 [α] _D ²⁰ (C1, 水)		-81.7°	-112.2°
纸色谱 Rf (甲醇:3%氯化铵 =7:3)		0.45	0.77
纤维素薄层 Rf (0.25%氯化铵)		0.81, 0.62, 0.142, 0.127	分不开
高压电泳	pH4, 4000V	2.3	4.2
移距 (cm)	pH6, 3000V	4.6	5.8
元素分析 (%)	C	49.89, 49.16	52-53
	H	7.56, 7.53,	5.5-5.9
	N	11.35, 11.32	4.7-6.6
	S	0.30 0.28	0.8-1.5
红外吸收光谱 (cm ⁻¹)		3200(弱)	3200(强)
		3100(强)	1402(弱)
		1380(强)	1380(弱)
		1170(次强)	1200(次强)
		1110(强)	1110(次强)
		1060(次强)	
水解产物		除右列四种糖外, 还多一种未知糖	葡萄糖, 甘露糖, 阿拉伯糖, 鼠李糖

弱阳性反应, 苯胺肽酸盐弱反应的斑点。用苯甲酸:醋酸:水(8:3:1)为展层剂,下行24-26h, 除含四个已知糖以外还有一个未知糖与葡萄糖比移(R_g)为 0.81, 见图 4。

71-N40 抗生素复合物水解产物氨基酸的纸色谱结果表明, 在正丁醇:醋酸:水 (12:3:5) 的溶剂系统中, 在 Rf 0.08, 0.20, 0.34 和 0.47 有甾三酮弱反应斑点, 与瑞斯托菌素完全一致。

讨 论

从已发表的抗生素资料看^[1-3,6,10,11], 71-N40 抗生素复合物与抗生素 LL-AV-290、瑞斯托菌素、瑞斯托霉素和万古霉素相似, 它们都抑制革兰氏阳性细菌和分枝杆菌。其产物白色、水溶、两性偏碱, 不溶于有机溶剂。从产生菌和抗菌谱来看, 与瑞斯托菌素类似。但从理化性质上看, 二者差异较大^[4,5,7,8,9]。见表 2。

根据上述性质差异, 我们把 71-N40 抗生素复合物定名为苍黄霉素 (Luridomycin)。

参 考 文 献

- [1] Grundy, W. E. et al.: Ristocetin, Microbiologic Properties, *Antibiotics Ann.* 1956-1957, (ed. by Welch, H. and F. Marti-Ibanez), Medical Encyclopedia, Inc., N. Y. 1957, pp. 687-692.
- [2] Philip, J. B. et al.: Ristocetin A & B, Two New antibiotics, *Isolation, and Properties*, *ibid*, 1956-1957, pp. 699-705.
- [3] Romansky, M. J. et al.: Ristocetin. a New Antibiotic-Laboratory and Chemical Studies, Preliminary Report, *ibid*, 1956-1957, pp. 706-715.
- [4] Grundy, W. E. et al.: Ristocetin, A Microbiological Comparison of Ristocetin A and B, *ibid*, 1957-1958, pp. 158-162.
- [5] Holper, J. C. et al.: A Comparison of the in Vitro to in vivo Activity of Ristocetin, Penicillin and Erythromycin, *ibid*, 1958-1959, pp. 425-427.
- [6] Abbott Lab.: British patent, 765886 (1957), 850408 (1960), 833973 (1960), 843560 (1960).
- [7] Abbott Lab.: 特许公报, 昭 45-148 (1960).
- [8] Jodan, D. C.: Ristocetin, *Antibiotics I, Mechanism of Action* (ed. by Gottlieb, D. and P. D. Shaw), Springer-Verlag, Berlin, 1967, p. 84.
- [9] Fehlner, J. H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 1972, 69(9): 2420-2421
- [10] Horris, T. M. et al.: *Tetrahedron Lett.*, 1975 (31), 2655-2658.
- [11] Rehace, K. Z.: *Folia Microbiol.*, 6(1): 22, 1961.