

星海链霉菌抑菌活性物质的分离纯化

张姗姗¹ 赵心清^{1*} 陈亮宇¹ 杨天虹¹ 张凤华²

(1. 大连理工大学 生命科学与技术学院 辽宁 大连 116023)

(2. 大连医科大学 附属第一医院检验科 辽宁 大连 116011)

摘要: 星海链霉菌(*Streptomyces xinghaiensis*)是从大连星海湾海泥样品中分离的海洋链霉菌新种,其发酵液具有广谱抗菌活性。研究该菌株的发酵液对临床分离的耐药菌的抑制活性,发现星海链霉菌发酵液对鲍曼不动杆菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株具有抑制活性。采用 SPE、大孔吸附树脂 HP-20、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20、HPLC、TLC 等对抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的物质进行了活性追踪,发现活性物质为弱碱性水溶性成分,无特征紫外吸收,可被茚三酮显色,推断活性物质可能为氨基糖苷类化合物。对星海链霉菌基因组序列进行初步分析,发现一个与核糖霉素生物合成基因簇相似性较高的基因簇,但 TLC 分析结果表明,活性化合物与核糖霉素不同。

关键词: 星海链霉菌, 抑菌活性物质, 分离纯化, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA), 氨基糖苷类抗生素

Purification of the antimicrobial compounds from *Streptomyces xinghaiensis*

ZHANG Shan-Shan¹ ZHAO Xin-Qing^{1*} CHEN Liang-Yu¹ YANG Tian-Hong¹
ZHANG Feng-Hua²

(1. Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116023, China)

(2. The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116011, China)

Abstract: *Streptomyces xinghaiensis* is a novel *Streptomyces* species isolated from marine sediment sample collected in Xinghai Bay, Dalian, China, and wide spectrum of antimicrobial activities of its fermentation broth has been observed. In this study, the antibacterial activities of the fermentation broth of *S. xinghaiensis* against drug-resistant clinical isolates were investigated, and inhibitory activities against *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains were revealed. Purification of the active compound (s) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目; 生物反应器工程国家重点实验室开放课题资助项目

* 通讯作者: Tel: 86-411-84706308; Fax: 86-411-84706329; 邮箱: xqzhao@dlut.edu.cn

收稿日期: 2011-03-15; 接受日期: 2011-05-23

was performed and the properties of the active compounds were studied. Active fractions were obtained after treatments of the broth with macroporous adsorptive resin HP-20 and Sephadex LH-20. The active components were weak alkaloid compounds with no specific UV adsorption, and ninhydrin coloration further supported the hypothesis that the active compounds likely belong to aminoglycoside antibiotics. The draft genomic sequence of *S. xinghaiensis* was searched and a ribostamycin-related gene cluster was identified. However, Thin Layer Chromatography (TLC) analysis indicated that the major components of the active compounds are different from ribostamycin.

Keywords: *Streptomyces xinghaiensis*, Antimicrobial activity, Purification, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Aminoglycoside antibiotics

随着抗生素在临床上的普遍应用, 耐药性病原菌不断出现, 迫切需要开发新的抗生素类药物。近年来, 从海洋来源的微生物中寻找和筛选有抗菌活性的先导化合物成为抗感染创新药物研究的热点。海洋微生物生活在高压、高盐、寡营养等特殊环境中, 形成了独特的生长和代谢方式, 与陆地微生物相比更有可能产生结构新颖、功能独特的次级代谢物, 具有巨大的开发潜力^[1-4]。

本实验室自 2006 年起对大连地区的海洋放线菌菌种资源和重要次生代谢物合成基因进行了研究, 发现了一些独特的海洋放线菌菌种, 通过基因筛选证明了一些菌种生产 I 型聚酮类化合物的潜能^[5-6], 并鉴定了一株新的海洋放线菌, 命名为星海链霉菌^[7]。星海链霉菌分离自大连星海湾海底沉积物, 其发酵液对金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、白色假丝酵母等多种致病菌具有抑制活性, 但对临床分离病原菌的抑制活性研究还不够深入。本文考查了星海链霉菌对临床分离的耐药菌的抑制活性, 并对活性物质的性质进行了研究, 采用活性追踪的方法, 对抗临床分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的活性物质进行了初步分离纯化。

1 材料与方 法

1.1 菌种

星海链霉菌分离自大连星海湾海底沉积物, 菌种保存号 CCTCC AA 208049, 孢子悬液置于 20% 甘油中, 于 -70 °C 保存。

活性测试菌: 肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneu-*

moniae), 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*), 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 菌株 5301、5438、5885 为大连医科大学附属第一医院临床分离耐药菌。活性测试菌培养基参照文献[5]。

1.2 培养基

TSB 培养基购自美国 BD 公司。淀粉-黄豆培养基(W/V): 可溶性淀粉 0.2%, 黄豆粉 1.5%, 酵母粉 1.5%, 蛋白胨 0.2%, CaCO₃ 0.4%, NaCl 0.4%。所有培养基均 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.3 实验方法

1.3.1 发酵: 取 -70 °C 保存的星海链霉菌菌悬液 1 mL, 于 TSB 平板 30 °C 活化培养 7 d, 然后接种于 TSB 液体培养基中, 250 mL 摇瓶装 50 mL 培养基, 160 r/min、30 °C 培养 2 d 后, 按 2% 接种量, 将种子培养基接于 TSB 液体培养基或淀粉-黄豆培养基中, 250 mL 摇瓶装 50 mL 培养基, 160 r/min、30 °C 培养 7 d。

1.3.2 抑菌活性测试方法^[8]: 发酵液 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 将 100 μL 待测液体加入直径 6 mm 的抗生素测定纸片中, 放入铺有受试菌的平板上, 通过观察抑菌圈大小判断抑菌活性强弱。空培养基做相同实验作为空白对照。

1.3.3 发酵产物中活性物质的分离纯化: (1) 活性物质的稳定性及极性测试: 将离心处理后的发酵液分别置于 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、90 °C 和 100 °C 水浴 30 min, 检测抗菌活性, 确定热稳定性^[9]。将发酵液分别调至 pH 值为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 维持 60 min 后

调至 pH 为 7, 然后进行抑菌测试, 检测酸碱稳定性^[10]。将处理后的发酵液分别用正己烷、丙酮、乙酸乙酯等体积萃取 3 次, 萃取相浓缩 10 倍加入测试纸片, 吹干后做抑菌测试, 检测活性物质的极性^[11]。

(2) SPE 固相萃取实验: Waters Oasis MCX 6 mL SPE 小柱(美国 Waters 公司), 经 2 倍柱体积的去离子水活化后, 加样 1 mL 星海链霉菌发酵液, 用 3 倍柱体积的 2% 甲酸洗脱, 再以 3 倍柱体积的甲醇洗脱, 最后用 3 倍柱体积的含 5% 氨水的甲醇溶液洗脱。将氨化甲醇洗脱相旋蒸干, 沉积物用 1 mL 的去离子水溶解, 以金黄色葡萄球菌 5438 为受试菌做抑菌测试。

Waters Oasis HLB 6 mL SPE 小柱(美国 Waters 公司), 经 2 倍柱体积的去离子水活化后, 加样 1 mL 星海链霉菌发酵液, 用 3 倍柱体积的甲醇和水 5:95 (V/V) 的混合液洗脱, 然后用 3 倍柱体积的甲醇洗脱。将甲醇洗脱相旋蒸干, 沉积物用 1 mL 的去离子水溶解, 以金黄色葡萄球菌 5438 为受试菌做抑菌测试。

将上述 2 个样品做 HPLC 检测, 采用 C18 柱, 流动相为甲醇和水, 甲醇比例 20 min 内从 10% 升至 100% 并维持至 30 min。

(3) 大孔吸附树脂 HP-20 吸附^[12]: 将 30 mL 发酵液加入预处理后的 30 g 大孔吸附树脂 HP-20 中, 室温静态吸附 2 h, 将发酵液与树脂分离, 得到未吸附组分。分别用等倍体积 50% 乙醇和 100% 乙醇静态解析 1 h, 将得到的组分利用金黄色葡萄球菌 5438 进行抑菌活性测试, 并用 HPLC 分析化合物组成, HPLC 洗脱条件同上。

(4) 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 分离: 制成内径为 1 cm、高度为 17 cm 的葡聚糖凝胶柱。2 mL 未吸附组分(具有抗耐药金黄色葡萄球菌活性)用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 进行分离, 用 3 倍柱体积水缓慢洗脱, 每 10 mL 为 1 个组分, 共得到 15 个组分, 10 倍浓缩后, 做活性测试, 并用 HPLC 分析组成, HPLC 洗脱条件同上。

(5) 薄层层析检测及显色试验^[13-15]: 取 2.5 cm×7.5 cm 的硅胶薄层层析板, 取经葡聚糖凝胶

Sephadex LH-20 处理后的有活性样品上样 1 μL, 以不同比例的氯仿:甲醇:氨水为展层剂进行层析。茚三酮 0.2 g 溶于 100 mL 乙醇中作为显色剂, 喷于硅胶板表面进行显色。

将 1 mg/mL 浓度的硫酸核糖霉素(购自无锡福祈制药有限公司) 1 μL 与上述活性样品 1 μL 上样于同一硅胶板上, 以氯仿:甲醇:氨水=2:5:4 (V/V/V) 作为展层剂, 并用茚三酮显色剂显色^[14]。

2 结果与讨论

2.1 星海链霉菌发酵液对耐药性致病菌的抑菌活性

采用 TSB 培养基培养 7 d 获得的发酵液对 5 株临床分离的致病病原菌进行了活性测试, 结果表明, 星海链霉菌发酵产物对肺炎克雷伯氏菌无抑制活性, 对鲍曼不动杆菌有一定抑制活性, 对 3 株抗药性金黄色葡萄球菌中的 2 株有抑制活性, 对 5301 菌株没有活性(表 1)。淀粉-黄豆培养基对抗菌活性物质的产生效果与 TSB 相似(结果未显示)。

表 1 发酵液对致病菌的抑菌测试
Table 1 Antimicrobial activity test of the fermentation broth

致病菌测试菌株 Pathogenic test strains	抑菌圈直径 Diameter of the inhibition zone (mm)
肺炎克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.0
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	8.0
金黄色葡萄球菌 5301 <i>Staphylococcus aureus</i> 5301	6.0
金黄色葡萄球菌 5438 <i>Staphylococcus aureus</i> 5438	11.5
金黄色葡萄球菌 5885 <i>Staphylococcus aureus</i> 5885	9.8

2.2 抑菌活性物质的分离纯化

2.2.1 抑菌物质的稳定性与极性: 为了寻找合适的分离纯化方法, 需要研究活性物质的性质。对发酵液的活性物质进行了耐热和酸碱稳定性实验, 结果表明, 在 20 °C-100 °C 内和 pH 值 1-14 的酸碱范围内, 发酵液对多种测试菌的稳定性很好, 活性物质性质稳定。有机溶剂萃取实验表明, 活性物质主要

集中在水相, 不溶于有机溶剂, 为强极性物质。

2.2.2 抗菌活性物质的酸碱性质: Waters Oasis MCX SPE 小柱为强酸性离子交换树脂填料, Waters Oasis MCX 是混合阳离子萃取柱, 对碱性化合物具有较好的选择性。对金黄色葡萄球菌的抑菌测试结果表明, MCX 6 mL SPE 小柱得到的氯化甲醇洗脱相组分有抑菌活性, 原发酵液测试抑菌圈直径为 22 mm, 洗脱液抑菌圈直径为 18 mm, 说明发酵液中含有能抗金黄色葡萄球菌的碱性物质。星海链霉菌培养 7 d 后发酵液 pH 值在 8-9 之间, 显弱碱性, 与活性物质为弱碱性物质的推断吻合。

2.2.3 大孔吸附树脂 HP-20 吸附杂质: 考察了多种树脂对活性化合物分离纯化的效果, 发现大孔吸附

树脂 HP-20 的纯化效果最好。大孔吸附树脂 HP-20 处理空培养基的吸附相和未吸附相无抑菌活性, 发酵液未吸附相相比 50% 乙醇洗脱相有更好的活性 (表 2), 且 HPLC 峰较少, 而 100% 乙醇洗脱相无活性, 因此选择未吸附相做进一步分离。发酵液的大孔吸附树脂 HP-20 未吸附相与经过相同处理的空白培养基的未吸附相成分比较见图 1。

2.2.4 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 分离: 对葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 洗脱得到的 15 个组分分别进行耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 5438 的活性检测, 发现在分离得到的 15 个组分中, 第 2 个组分有抑制金黄色葡萄球菌的活性, 对该组分进行 HPLC 分析, 结果见图 2。

表 2 大孔吸附树脂 HP-20 分离组分抑菌测试结果 (抑菌圈直径, mm)

Table 2 Bacterium-inhibition test of Macroreticular resin HP-20 experiment (Diameter of the inhibition zone, mm)

	未吸附组分 A No absorption phase	50% 乙醇洗脱组分 10 倍浓缩 Ethanol eluent 10 times concentrated	50% 乙醇洗脱组分 2 倍浓缩 Ethanol eluent 2 times concentrated	100% 乙醇洗脱组分 10 倍浓缩 100% Ethanol eluent 10 times concentrated
金黄色葡萄球菌 5438 <i>Staphylococcus aureus</i> 5438	14	20	11	6

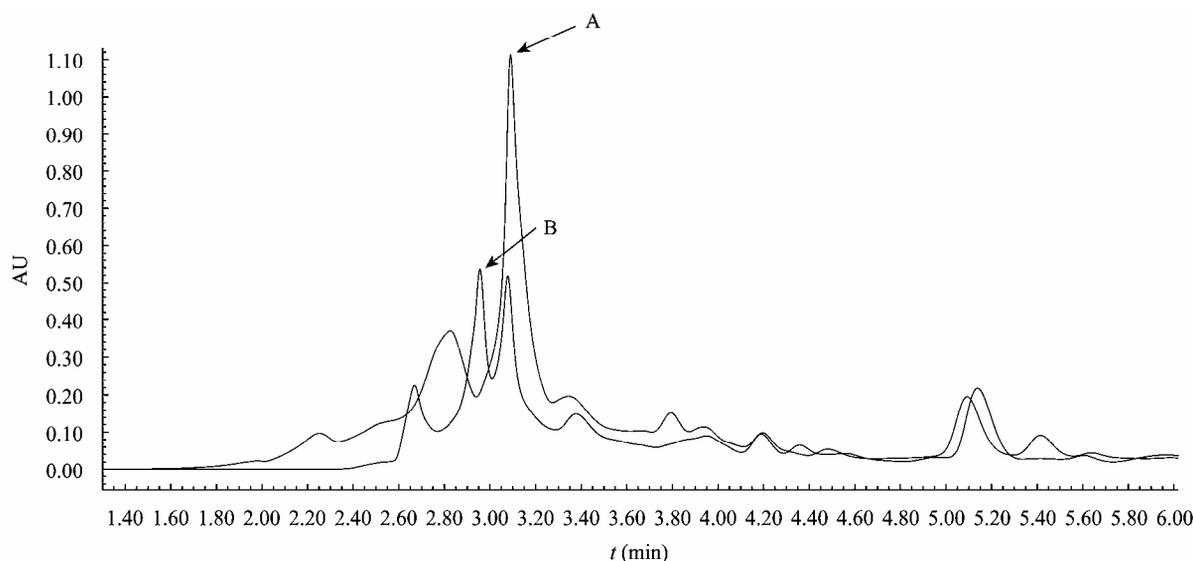


图 1 大孔吸附树脂 HP-20 发酵液未吸附相和空白培养基未吸附相在 210 nm 处 HPLC 分析

Fig. 1 HPLC under 210 nm of the fermentation eluents and the culture medium eluents in macroporous adsorptive resin HP-20 experiment

注: A: 发酵液未吸附组分; B: 空培养基未吸附组分。

Note: A: Non-absorption phase of the fermentation broth; B: Non-absorption phase of the culture medium.

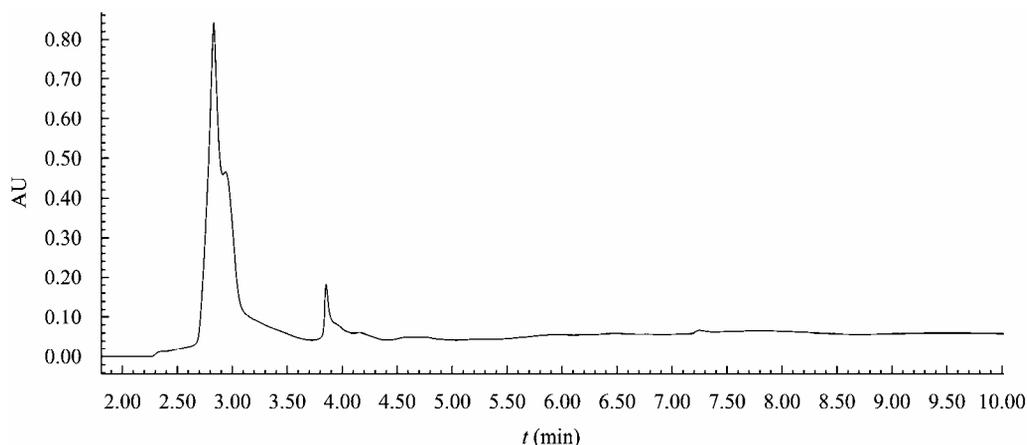


图2 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 第2组分在 210 nm 处 HPLC 分析结果
Fig. 2 HPLC analysis of the 2nd eluent of Sephadex LH-20 under 210 nm

由图2可以看出,葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 能有效分离活性物质,紫外全波长扫描表明可能的活性物质的最大吸收值在 196 nm 左右,在 200 nm 到 400 nm 波长范围内无特征紫外吸收。

2.2.5 薄层层析检测及显色实验:星海链霉菌抗菌活性物质是极性弱碱性物质,无特征紫外吸收,符合氨基糖苷类抗生素的特点。利用文献报道的检测氨基糖苷类化合物的方法对活性组分进行了TLC分析^[14],经茚三酮显色试验,发现平板上紫红色显色点(图3),推断活性样品中含有带伯胺基的物质,进一步支持了活性物质很可能是氨基糖苷类化合物的推测。多种不同比例的展层剂试验,茚三酮显色结果表明,可被显色的物质,在甲醇:氯仿:氨水的比例为3:1:2时,颜色最深的主成分的 R_f 值较大且各组分分离较好。

本课题组近期利用454和Solexa高通量测序对星海链霉菌进行了全基因组测序,由于本课题发现星海链霉菌可能产生氨基糖苷类抗生素,对星海链霉菌的基因组序列进行了分析,发现了一个与核糖霉素生物合成基因簇同源性很高的基因簇^[16],该基因簇序列已提交GenBank(GenBank登录号JF19543)。利用TLC分析了硫酸核糖霉素和纯化的样品,显色结果见图3,可以看出,活性物质除了一个主成分(R_f 值0.246)以外,还包括一些次要组分,而所有活性成分与核糖霉素的 R_f 值(0.087)不同,目前正在参照文献[17]的方法利用氯甲酸-9-苄基甲酯



图3 发酵液抗耐药金黄色葡萄球菌纯化组分与硫酸核糖霉素薄层层析对照试验

Fig. 3 TLC analysis results of the purified components with antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain comparing with ribostamycin sulfate standard

注: 1: 活性组分; 2: 核糖霉素标准品。

Note: 1: Active components; 2: Ribostamycin standard.

衍生化反应对活性物质的化学结构进行进一步深入研究。

3 讨论

星海链霉菌发酵液对临床分离病原菌的抗菌活性目前还未被深入研究。本文报道了星海链霉菌发

醇液对临床分离的耐药菌鲍曼不动杆菌以及 2 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑制作用, 证明活性物质具有很好的治疗临床病原菌感染的开发前景。

本研究发现大孔吸附树脂 HP-20 能有效吸附星海链霉菌发酵液中对金黄色葡萄球菌无活性的杂质, 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 能有效分离活性组分。活性物质在紫外波长范围内无明显吸收, 结合其碱性物质及可被茚三酮显色, 推测可能是氨基糖苷类物质。在星海链霉菌的基因组序列中, 发现了一个类似于核糖霉素的基因簇, 但是该基因簇与核糖霉素相比多了一个氧化还原酶基因, 可能造成合成的化合物结构出现差异。本课题确立了星海链霉菌抗耐药金黄色葡萄球菌活性物质的分离纯化路线, 目前正对活性物质进行进一步的分离纯化和结构鉴定。

参 考 文 献

- [1] Fenical W, Jensen PR. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria[J]. Nat Chem Biol, 2006, 2(12): 666-673.
- [2] Hong K, Gao AH, Xie QY, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China[J]. Marine Drugs, 2009, 7(1): 22-44.
- [3] Williams PG. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics[J]. Trends Biotechnol, 2008, 27(1): 45-52.
- [4] Gulder TA, Moore BS. Chasing the treasures of the sea - bacterial marine natural products[J]. Curr Opin Microbiol, 2009, 12(3): 252-260.
- [5] Zhao XQ, Jiao WC, Jiang B, et al. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25(5): 859-866.
- [6] 赵心清, 矫文策, 袁文杰, 等. 大连地区海泥样品中分离的五株海洋放线菌的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3): 1-4.
- [7] Zhao XQ, Li WJ, Jiao WC, et al. *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(11): 2870-2874.
- [8] 廖文彬, 鲍时翔. 红树林放线菌产抗菌活性物质的分离纯化研究[J]. 药物生物技术, 2004, 11(6): 376-380.
- [9] 龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 炭样小单胞菌 JXNU-1 广谱抗生素产物的分离及其理化性质[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1450-1454.
- [10] 谷俊, 林亲雄, 邢莹莹, 等. 海洋放线菌 M324 抗菌物质的发酵优化与性质的初步研究[J]. 药物生物技术, 2006, 13(5): 347-350.
- [11] 石磊, 史丽娟, 蒋沁, 等. 达托霉素发酵液大孔树脂吸附分离的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(2): 84-89.
- [12] 杨绪明, 张家骊, 李江华, 等. 庆大霉素发酵液薄层色谱(TLC)分析方法研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 128-133.
- [13] 李晓鑫, 姜红, 赵亚萍, 等. 注射用硫酸核糖霉素有关物质的检查[J]. 医药导报, 2008, 27(9): 1106-1108.
- [14] Hubicka U, Krzek J, Woltyńska H, et al. Simultaneous identification and quantitative determination of selected aminoglycoside antibiotics by thin-layer chromatography and densitometry[J]. J AOAC Int, 2009, 92(4): 1068-1075.
- [15] Subba B, Kharel MK, Lee HC, et al. The ribostamycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces ribosidificus*: comparison with butirosin biosynthesis[J]. Mol Cells, 2005, 20(1): 90-96.
- [16] Kurumbang NP, Liou K, Sohng JK. Biosynthesis of ribostamycin derivatives by reconstitution and heterologous expression of required gene sets[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 163(3): 373-382.
- [17] Kurumbang NP, Oh TJ, Liou KK, et al. Heterologous production and detection of recombinant directing 2-deoxystreptamine (DOS) in the non-aminoglycoside producing host *Streptomyces venezuelae* YJ003[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(5): 866-873.