

抗生素4-215的分离、提纯和鉴定

陈丽琼 郭永复 马国秋

(中国科学院微生物研究所, 北京)

抗生素4-215是由诺卡氏菌4-215产生的。它对水稻白叶枯有显著疗效。

抗生素4-215是两性的无色柱状结晶。易溶于酸和碱, 稍溶于甲醇和乙醇, 但不溶于丙酮和其他有机溶剂。茚三酮、三氯化铁、2,4-二硝基苯肼、蒽酮、Molisch 和坂口反应均为阴性。分子量是285, 实验式: $C_{10}H_{13}N_4O_4 \cdot H_2O$ 。比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = -35.5$ ($C = 1\%$, $0.1NHCl$); $[\alpha]_D^{25} = -72.11$ ($C = 1\%$, 甲醇)。熔点 $141-142^\circ C$ 。紫外吸收光谱: 234 毫微米 ($E_{1\%}^{1cm} = 280$) 和 295 毫微米 ($E_{1\%}^{1cm} = 340$) ($0.1NHCl$); 295 毫微米 ($E_{1\%}^{1cm} = 380$) (蒸馏水); 235 毫微米 ($E_{1\%}^{1cm} = 500$) 和 305 毫微米 ($E_{1\%}^{1cm} = 260$) ($0.1NNaOH$)。高效地抑制稻白叶枯病黄杆菌, 对稻瘟病菌和分枝杆菌 607, 也有较强的抑制作用。

抗生素4-215的理化性质和生物学特性与国外报道的间型霉素^[1-4] (Formycin) 几乎完全一致, 因此我们认为它们可能是同一抗生素。

抗生素4-215对水稻白叶枯病有显著疗效。本文着重报道抗生素4-215的分离、提纯, 理化性质和生物学特性, 并将它与国外报道的间型霉素 (Formycin) 进行比较。

材料与方 法

(一) 菌种: 诺卡氏菌4-215。

(二) 种子固体培养: 取小米加适量水泡涨, 15 磅灭菌 30 分钟, 接种, 在 $28^\circ C$ 培养 7 天后备用。

(三) 振荡培养: 培养基成份 (%): 葡萄糖 2.0; 玉米浆 1.0; $(NH_4)_2SO_4$ 0.25; KH_2PO_4 0.02; $NaCl$ 0.5; $CaCO_3$ 0.4, 自然 pH。15 磅灭菌 30 分钟后, 在 500 毫升三角瓶中加 100 毫升培养液, 接种后在 $28^\circ C$ 振荡培养 (旋转摇床 160 转/分) 72 小时。

(四) 抗生素效价测定: 用杯碟法。以稻白叶枯病黄杆菌为测定菌。上层培养基成份 (%): 蔗糖 2.0; 蛋白胨 0.5; 酵母膏 0.2; 谷氨酸钠 0.2; K_2HPO_4 0.2; $MgCl_2$ 0.1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01; 洋菜 2.0, pH6.0。底层培养基成份 (%): 蛋白胨 1.0; $NaCl$ 0.5; 洋菜 2.0, pH6.0, $30^\circ C$ 培养 18 小时后观察结果。

(五) 标准曲线的绘制: 将抗生素4-215纯结晶配成不同浓度的水溶液, 以稻白叶枯病黄杆菌为测定菌, 杯碟法测定, 以每毫升含有 15 和 5 微克抗生素的水溶液作对照, 每一浓度作 5 个培养皿。重复数据在 10 个以上, 求其平均值, 并以对照的结果为校正值, 用半对数纸作图, 绘制标准曲线, 见图 1。

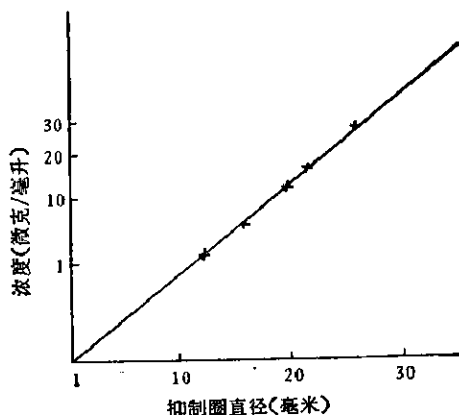


图1 抗生素4-215的标准曲线

(六) 纸电泳: 用新华1号滤纸, 在 pH2.2 和 11.0 的磷酸盐缓冲液中, 电压 250V 泳动 4

本文于1978年12月7日收到。

本工作得到北京医药工业研究院和我院实验中心大力协助, 一并致谢。

小时。

(七) 用分子筛精制抗生素: 把浓缩液通过分子筛 (Sephadex G25) 柱, 用蒸馏水展开, 分段收集。把有颜色的杂质部分去除, 集中无色的抗生素含量高的水溶液, 减压浓缩。浓缩液静置过夜后, 析出无色柱状的结晶。

(八) 分子量测定: 用瑞斯脱 (Rast) 法测定^[7]。

(九) 抗菌谱测定: 用抗生素 4-215 纯结晶 (游离型) 配成不同浓度的水溶液, 把测定菌分别选用其最适培养基作平皿, 每一浓度作 5 个培养皿, 用杯碟法测定, 分别采用其最适温度培养, 观察其最低抑菌浓度。

实验结果

(一) 抗生素 4-215 的发酵

对抗生素 4-215 产生菌进行碳、氮、无机盐的比较, 确定产抗生素较高的发酵培养基。摇瓶振荡培养, 抗生素产量最高达 224 微克/毫升。240 升发酵罐培养, 抗生素产量最高达 320 微克/毫升。

(二) 抗生素 4-215 的提取和精制

抗生素 4-215 是两性抗生素, 溶于水, 稍溶于乙醇和甲醇, 不溶于丙酮和其他有机溶剂。初步提取可用活性炭吸附法或离子交换法。后者比前者收率高。

1. 离子交换法

用不同型号树脂和不同交换基团进行比较, 结果见表 1。将发酵液调 pH3.0 通过离子交换柱, 用含 10% 甲醇的 1N 氨水溶液洗脱。以 Dowex 50H⁺ 树脂交换量最高, 每克树脂可交换 21.5 毫克的抗生素。但从洗脱效果来看, 磺酸 1 × 3 NH₄⁺ 洗脱较集中, 收率也最高, 达 90%。故选用磺酸 1 × 3 NH₄⁺ 树脂提取。120 升发酵滤液进行离子交换, 得到 3 升洗脱液。洗脱液在 55℃ 减压浓缩, 得抗生素粗制品。

2. 活性炭吸附法提取

发酵滤液在 pH3.0—7.0 用 1.5% 的活

性炭吸附, 均能吸附完全, 但洗脱效果以 pH3.0—4.0 较好。比较了四种洗脱剂, 结果见表 2。以 60% 甲醇-10% 氯仿-0.1 NHCl 水溶液洗脱效果最好。洗脱前将炭饼依次在少量氯仿、甲醇和丙酮中浸泡, 搅拌、滤干, 然后再进行抗生素提取。把吸附 120 升发酵液的炭饼用 60% 甲醇-10% 氯仿-

表 1 不同树脂提取结果的比较

离子交换树脂	交 换 量 (抗生素毫克/ 克树脂)	收 率 (%)
Dowex 50H ⁺ (200—400 目)	21.5	84
磺酸 1 × 3 H ⁺ (50—100 目)	2.88	75
磺酸 1 × 3 NH ₄ ⁺ (50—100 目)	1.70	90

表 2 不同洗脱剂的比较

洗 脱 剂	洗脱液含抗生素 (微克/毫升)
60% 甲醇-10% 氯仿-0.1 NHCl 水溶液	1024
80% 甲醇-0.1 NHCl 水溶液	128
50% 丙酮水溶液	64
80% 甲醇-NH ₄ OH 水溶液	32

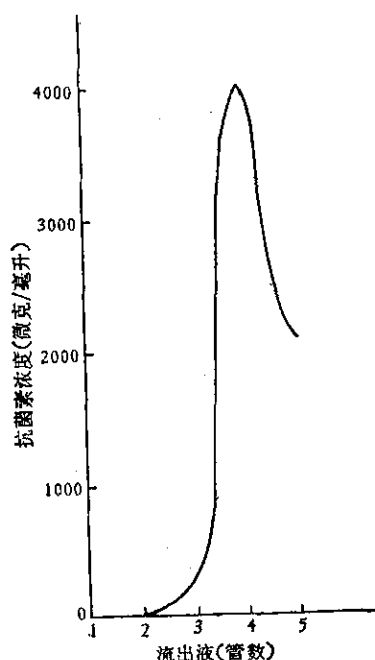


图 2 抗生素 4-215 洗脱曲线

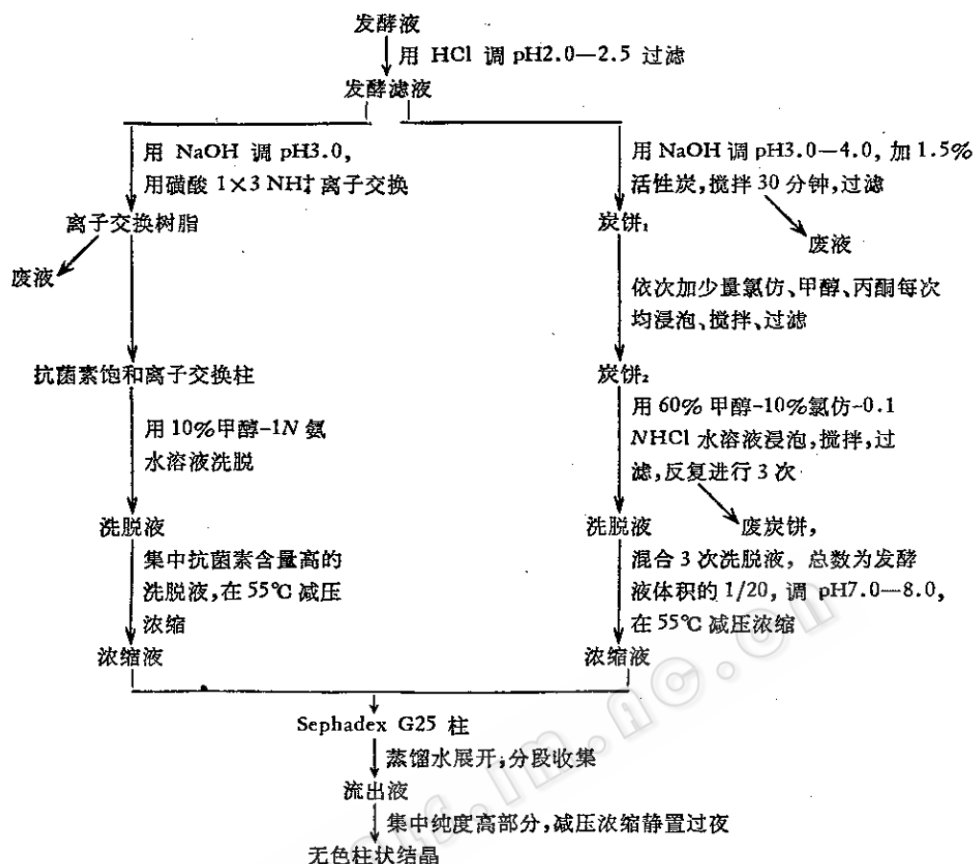


图 3 抗生素 4-215 精制流程图

0.1 NHCl 水溶液洗脱 3 次, 得到 6 升的洗脱液, 总收率达 70%。用氨水将洗脱液调 pH7.0, 在 55°C 减压浓缩, 得抗生素粗制品。

3. 抗生素 4-215 的精制

将上述方法提取的粗制品, 通过 Sephadex G25 柱(180 × 2.5 厘米)提纯, 得到 5 克抗生素纯结晶(见图 3)。

(三) 抗生素 4-215 的理化性质

抗生素 4-215 的游离型(两性物质)为无色柱状结晶(见图 4)。在紫外光照射下能发出紫色荧光。纸电泳呈两性(见图 5)。其盐酸盐为无色针状结晶, 其钠盐为无色柱状结晶(见图 6、7)。易溶于酸性和碱性水溶液, 在中性水中溶解度不大, 稍溶于甲醇、乙醇, 不溶于丙酮和其他有机溶剂。在

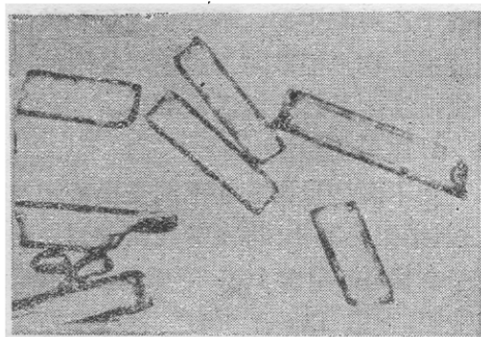


图 4 抗生素 4-215 (游离型)结晶

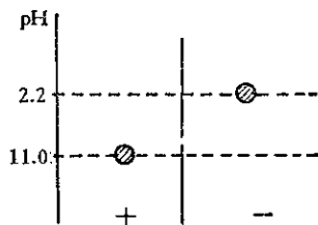


图 5 抗生素 4-215 的纸上电泳

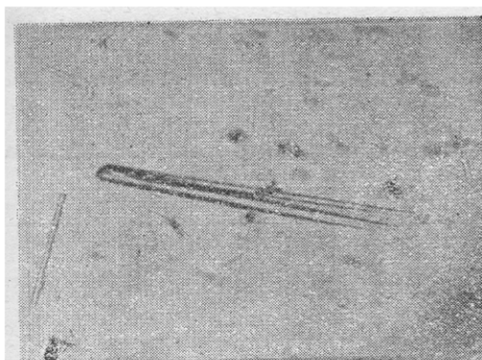


图 6 抗生素 4-215 的盐酸盐结晶

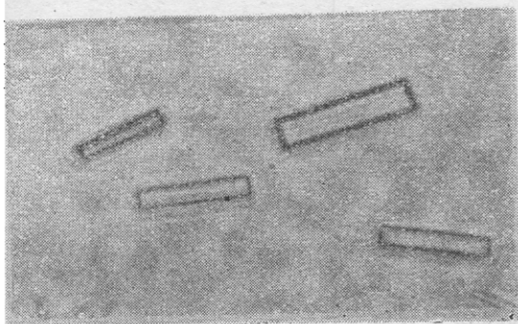


图 7 抗生素 4-215 的钠盐结晶

中性和碱性水溶液中对热稳定, 100℃ 加热 2 小时, 抗生素活性不被破坏。但在酸性水溶液中稳定性较差, 在 0.1N 盐酸溶液中 100℃ 加热 2 小时, 抗生素活性约被破坏 25%。对紫外光稳定, 在距紫外光源 40 厘米处, 照射 4 小时, 抗生素活性未见破坏。抗生素水溶液在 20℃ 左右存放 2 个月, 其抗生素活性未被破坏。分子量 285, 元素分析结果: C42.18%; N24.53%; H5.19%; O28.10%; 计算值: C42.10%; H5.30%; N24.55%; O28.05%, 实验式为: $C_{10}H_{13}N_5O_4 \cdot H_2O$ 。熔点 141—142℃。比旋光度: $[\alpha]_D^{20} = -35.5^\circ (C=1, 0.1N \text{ HCl})$; $[\alpha]_D^{25} = -72.11^\circ (C=1, \text{ 甲醇})$ 。紫外吸收光谱: 234 毫微米 ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 280$) 和 295 毫微米 ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 340$) (0.1N HCl); 295 毫微米 ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 380$) (蒸馏水); 235 毫微米 ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 500$) 和 305 毫微米 (0.1N NaOH) 见图 8。红外吸收光谱见图 9, 10。功能团

反应: 对 2, 4-二硝基苯肼, 蒽酮, Molisch, 茚三酮, 三氯化铁和坂口均为阴性反应。

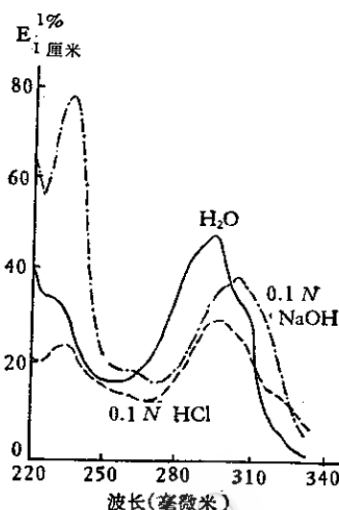


图 8 抗生素 4-215 的紫外吸收光谱

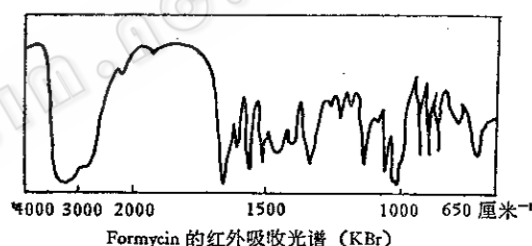


图 9 抗生素 Formycin 的红外吸收光谱

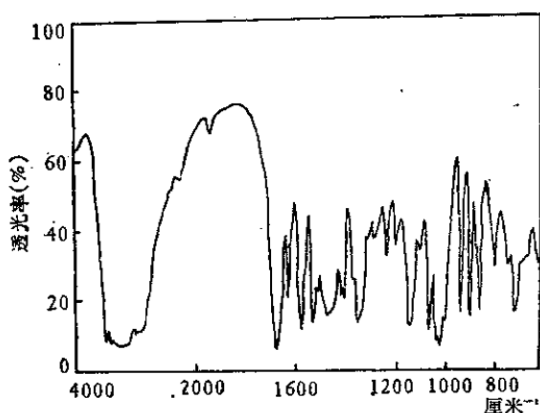


图 10 抗生素 4-215 (游离型) 的红外吸收光谱

(四) 抗生素 4-215 的生物学特性

抗生素 4-215 在植株上对水稻白叶枯病有显著疗效。用杯碟法测定, 抗生素浓度在 0.62 微克/毫升就能抑制稻白叶枯病

黄杆菌的生长。对稻瘟病菌和分枝杆菌 607 也有较强的抑制作用。抗生素浓度在

3.75 微克/毫升就能抑制其生长。但对其他测定的细菌和真菌均不抑制。结果见表 3。

表 3 抗生素 4-215 的抗菌谱

编 号	菌 名	最低抑菌浓度 (微克/毫升)
1	稻白叶枯病黄杆菌 (<i>Xanthomonas oryzae</i>)	0.62
2	稻瘟病菌 (<i>Piricularia oryzae</i>)	3.75
3	分枝杆菌 607 (<i>Mycobacterium</i> 607)	3.75
4	球孢枝孢 (<i>Cladosporium sphaerospermum</i>)	50.00
5	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	>100
6	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	>100
7	藤黄八叠球菌 (<i>Sarcina lutea</i>)	>100
8	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	>100
9	普通变形杆菌 (<i>Proteus vulgaris</i>)	>100
10	荧光极毛杆菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	>100
11	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	>100
12	亚麻茎萎病镰刀霉 (<i>Fusarium lini</i>)	>100
13	稻恶苗病菌 (<i>Gibberella fujikuroi</i>)	>100
14	热带假丝酵母 (<i>Candida tropicalis</i>)	>100
15	棉枯萎病菌 (<i>Fusarium vasinfectum</i>)	>100
16	稻恶苗病菌 1-124 (<i>Gibberella fujikuroi</i> 1-124)	>100

讨 论

抗生素 4-215 的理化性质和抗菌特性

与国外报道的间型霉素^[2-4] (Formycin) 几乎完全一致, 见表 4。因此我们认为抗生素 4-215 可能和间型霉素是同一抗生素。

表 4 抗生素 4-215 与间型霉素特性的比较

样 品	间型霉素 (Formycin) ^[2-4]	抗生素 4-215
项 目		
融点	141—142°C	140—142°C
性	两性化合物	两性化合物
比旋光度	$[\alpha]_D^{25} = -35.5^\circ (C=1, 0.1N HCl)$	$[\alpha]_D^{25} = -35.5^\circ (C=1, 0.1N HCl)$ $[\alpha]_D^{25} = -72.11^\circ (C=1, 甲醇)$
茚三酮反应	阴性	阴性
坂口反应	阴性	阴性
蒽酮反应	阴性	阴性
三氯化铁反应	阴性	阴性
2,4-二硝基苯肼反应	阴性	阴性
溶解度	溶于水和甲醇, 稍溶于乙醇不溶于丙酮和乙醚	易溶于酸性和碱性水, 稍溶于甲醇, 乙醇, 不溶于丙酮和其他有机溶剂。
分子量	285	285
紫外吸收光谱	234 毫微米和 295 毫微米 (0.1N HCl) 295 毫微米 (蒸馏水) 235 毫微米和 305 毫微米 (0.1N NaOH)	234 毫微米和 295 毫微米 (0.1N HCl) 295 毫微米 (蒸馏水) 235 毫微米和 305 毫微米 (0.1N NaOH)
抗菌特性		
黄杆菌	最低抑菌浓度: 0.78 微克/毫升	最低抑菌浓度 0.6 微克/毫升
分枝杆菌 607	较强抑制	最低抑菌浓度 3.75 微克/毫升

据报道,间型霉素是一种核苷类抗生素,它不仅是一种抗白叶枯病抗生素,而且也是一种抗癌、抗病毒抗生素^[5,6]。它能抑制小鼠艾氏癌,小鼠白血病 L-1210,吉田大鼠肉瘤细胞,HeLa 细胞和流感 A 病毒。在生物的代谢研究中,由于很多酶对于别位调节需要核苷酸,所以这种核苷类抗生素已经用来作为研究酶调节作用和酶的结构生化工具。

参 考 文 献

- [1] 复旦大学有机化学教研组编: 有机化学实验, 人民教育出版社出版, 1960 年, 第 35—38 页。
- [2] Hori, M. E. et al.: *J. Antibiotics* (Tokyo), 17A:96, 1964.
- [3] Koyama, G. et al.: *J. Antibiotics*, (Tokyo), 18A:175, 1965.
- [4] Ishizuka, M. et al.: *J. Antibiotics*, 17A: 124, 1964.
- [5] Umzawa, H. et al.: *J. Antibiotics*, 18A: 1965.
- [6] Ishizuka, M. et al.: *J. Antibiotics*, (Tokyo), 21A:5 (1968).

ISOLATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF THE ANTIBIOTIC 4-215

Chen Li-qiong Guo Yong-fu Ma Guo-qiu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Antibiotic 4-215 is produced by a strain of *Nocardia* sp. It shows a curative effect against bacterial blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae*.

Antibiotic 4-215 has been crystallized as colorless prism and it is an amphoteric compound, easily soluble in acid and alkaline water, moderately soluble in methanol and ethanol, but insoluble in acetone and other organic solvents. It gives negative reactions with ninhydrin, ferric chloride, 2,4-dinitrophenyl hydrazine, an throne Molisch's and Sakaguchi's reagents. Its molecular weight is 285 and the empirical formula is $C_{10}H_{13}N_5O_4 \cdot H_2O$, with a specific rotation of $[\alpha]_D^{20} = -35.5$

($C = 1\%$ in 0.1 N HCl), $[\alpha]_D^{25} = -72.11$ ($C = 1\%$ in MeOH), melting point 141—142°C. The ultraviolet absorption spectra are as follows: λ max 234 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 380$) and 295 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 340$) (in 0.1 N HCl solution); λ max 295 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 380$) in neutral aqueous solution); λ max 235 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 500$) and 305 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 260$) (in 0.1 N NaOH solution). It is highly inhibitory against pathogen *Xanthomonas oryzae* and moderately so against *piricularia oryzae* and *Mycobacterium* sp. 607.

According to its physical and chemical properties as well as the biological characteristic, antibiotic 4-215 is identical with Formycin.