

静丝霉素的分离与鉴定

卢惟钊 周梅娟

(上海市农药研究所, 上海)

余震 刘启鼎 严建孙 顾桂玉

(复旦大学生物系, 上海)

吸水链霉菌井冈变种与吸水链霉菌柠檬变种很相近。除产生井冈霉素外, 尚产生一种抗真菌抗菌素, 定名为静丝霉素, 其物理、化学及生物学特性与萨腊霉素很相似。其水解产物在纸层析上显出 8 个色点。其中 5 个分别为半胱氨酸, 天冬氨酸, 甘氨酸, 苏氨酸与脯氨酸。本文报道静丝霉素的分离、鉴定及测定方法。

井冈霉素的产生菌——吸水链霉菌井冈变种(*Streptomyces hygroscopicus* var. *jing-gangensis* Yen) 除产生井冈霉素外, 尚产生另一种抗真菌抗菌素静丝霉素(Jingsimycin), 其物理、化学及生物学特性与萨腊菌素(Saramycetin)相似。本文报道静丝霉素的分离、鉴定和测定方法。

材料与方法

(一) 菌种

吸水链霉菌井冈变种, 系由原始菌株经自然分离而得的 TH 82-5-40 号菌株, 其形态和生理生化特征与原始菌株相似^[1]。目前工业生产井冈霉素的高产菌株为 Co-20 号, 它除产生井冈霉素外^[2], 仍保持其原始菌株产生静丝霉素的特性, 但其产量较低。

(二) 发酵

发酵培养基的组份为(%)：玉米粉 3, 葡萄糖 2, 酵母粉 1, 蚕蛹粉 1, 鱼粉 1, NaCl 0.5, KH₂PO₄ 0.045 和 CaCO₃ 0.4。灭菌前调 pH 至 7.2, 接种后置 28℃, 用摇瓶培养(旋转式, 220 转/分)或用 500 升发酵罐培养 4 天。

(三) 分离与提纯

静丝霉素主要存在于菌丝体内。发酵后, 将发酵液过滤, 菌丝体用水洗多次, 再用 80% 乙醇(或丙酮)浸泡抽提多次, 抽提液合并后在 45℃ 减

压浓缩。浓缩液用正丁醇萃取数次, 合并萃取液, 在 45℃ 下减压浓缩, 在浓缩过程中有黄褐色沉淀出现, 此为活性成份, 浓缩液用纯丙酮析出沉淀, 沉淀物用丙酮洗涤并抽滤, 然后置棕色干燥器中干燥, 即得静丝霉素粗品。

静丝霉素粗品用氧化铝柱层析法进一步纯化。先称取一定量碱性氧化铝(层析用), 以 15% 量的蒸馏水使其部分失活(由于此物质对样品吸附力太强, 如不先加水使其部分失活降低吸附力, 则会影响洗脱), 再以甲醇湿法装柱, 柱长与直径之比以 2:1 为宜。将静丝霉素粗品溶于甲醇, 配成 4—5% 的甲醇溶液, 快速通过柱, 随即以纯甲醇快速洗脱, 收集并合并活性高峰部分, 在 45℃ 以下减压浓缩至小体积, 以纯丙酮析出沉淀, 离心, 沉淀物在棕色干燥器中干燥, 得白色无定形粉末, 此即静丝霉素钠盐的精制品。

结 果

(一) 物理与化学特性

静丝霉素钠盐的水溶液, 在 pH 6—8 范围内比较稳定, 45℃ 两小时活性基本不变, 75℃ 以上, 保温时间愈长失活愈多, 在日光或紫外光下, 极易失活。静丝霉素与

本文于 1978 年 7 月 18 日收到。

复旦大学生物系学生俞谷卫、陈龙琰、虞春年和陈志家参加部分工作。

表 1 静丝霉素与萨腊菌素的物理、化学特性的比较

项 目		静 丝 霉 素	萨 腊 菌 素 ^[3-4]
外 观		白色无定形粉末	白色无定形粉末
熔 点		254℃ 变褐, 266℃ 碳化	250℃ 变褐, 270—280℃ 碳化
旋 光 度		$[\alpha]_D^{25} + 42^{\circ}$ (C = 1, 水)	$[\alpha]_D^{25} + 40-42^{\circ}$ (C = 1, 水)
溶 解 度		溶于吡啶、DMF*、水(pH 7—9); 难溶于乙醇、正丁醇; 不溶于丙酮、乙醚、氯仿、乙酸乙酯、苯、己烷、石油醚和酸性水中。	溶于吡啶、水(pH 7—9)、甲醇; 难溶于酸性丙酮、正丁醇; 不溶于丙酮、乙醚、氯仿、乙酸乙酯、苯、己烷中。
功能团反应	茚三酮	阴 性	阴 性
	溴酚蓝	阴 性	阴 性
	硝普酸钠/氰化钾	阴 性	阴 性
	2,4-二硝基苯肼	阴 性	阴 性
	双缩脲	阳 性	阳 性
	氯化作用	阳 性	阳 性
	碘钼酸	阳 性	阳 性
	羧肟酸铁	阳 性	阳 性
元素分析(%)		C 41.15, H 4.97, N 14.18, S 12.56, Na 1.45	C 41.75, H 5.06, N 14.54, S 12.78, Na 1.58
分子量(中和当量法)		2100	2200
紫外吸收光谱峰(毫微米)		222, 270, 305	221.5, 270, 305
红外吸收光谱(KBr 压片)		3360, 2940, 1680, 1666, 1620, 1520, 1445, 1390, 1285, 1175, 1040	3320, 2980, 1689, 1668, 1610, 1506, 1437, 1379, 1280, 1168, 1034
水解产物		脯氨酸, 苏氨酸, 甘氨酸, 天冬氨酸和半胱氨酸, 以及 3 个未知的茚三酮色点。	脯氨酸, 苏氨酸, 甘氨酸, 天冬氨酸和半胱氨酸, 以及 3 个未知的茚三酮色点。

* 二甲基甲酰胺

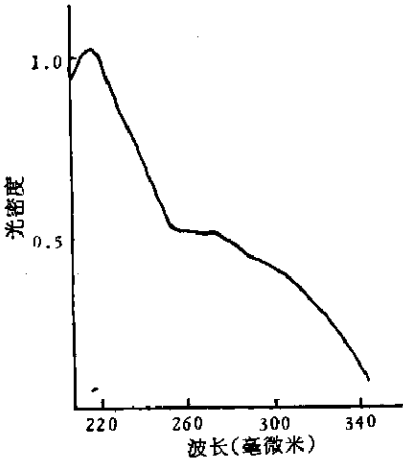


图 1 静丝霉素的紫外吸收光谱

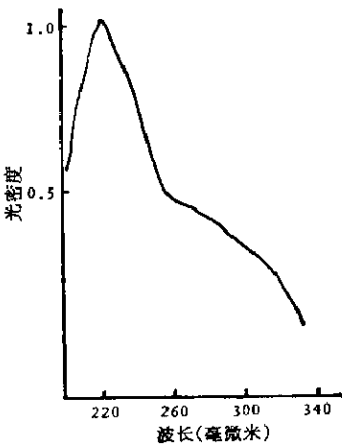


图 2 萨腊菌素的紫外吸收光谱

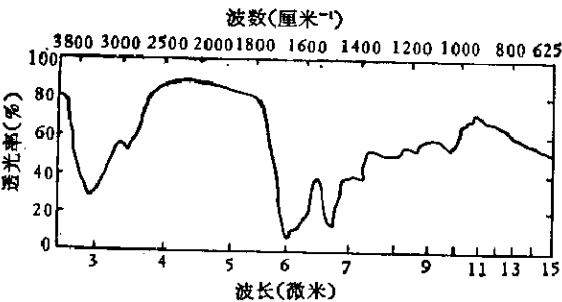


图 3 静丝霉素的红外吸收光谱 (KBr 压片)

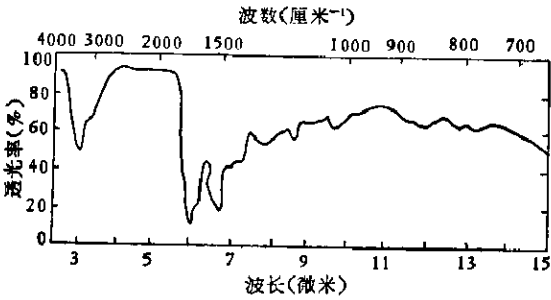


图 4 萨腊菌素的红外吸收光谱 (KBr 压片)

萨腊菌素的物理、化学特性比较见表 1。

静丝霉素和萨腊菌素的紫外吸收光谱

和红外吸收光谱见图 1—4。

静丝霉素属多肽类抗菌素，对其水解产物研究的结果表明^[9]，在双向纸层析下能显示出 8 个茚三酮色点，其中 5 个为脯氨酸、苏氨酸、甘氨酸、天冬氨酸和半胱氨酸，其结果与萨腊菌素的报道完全相同^[3]。

(二) 抗菌活性与生物效价的测定

静丝霉素抗菌谱极狭窄，用琼脂平板法测定，静丝霉素浓度在 1000 微克/毫升时，对革兰氏阳性和阴性细菌、酵母菌均无抑制作用。但在低浓度下，对某些真菌有明显的抑制作用。此情况与萨腊菌素相似^[3]，见表 2。

静丝霉素的效价采用管碟法（或纸片法）测定，双层培养基的底层为 2% 琼脂，上层为有检定菌的马铃薯汁蔗糖琼脂培养基。测定方法如下：

1. 检定菌的培养：将弯孢霉菌接种

表 2 静丝霉素与萨腊菌素^[3,10,11]的抗菌活性

菌 名	最低抑制浓度 (微克/毫升)	
	静丝霉素	萨腊菌素
枯草杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	>1000	>1000
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	>1000	>1000
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	>1000	>1000
稻白叶枯病黄杆菌 (<i>Xanthomonas oryzae</i>)	>1000	未做
啤酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	>1000	>1000
白假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)	>1000	>1000
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	125	±*
绿色木霉 (<i>Trichoderma viride</i>)	62.5	未做
产黄青霉 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	31.25	±*
拟青霉 (<i>Paecilomyces varioti</i>)	2.5	2.7
弯孢霉 (<i>Curvularia lunata</i>)	2.5	未做
小麦赤霉 (<i>Gibberella saubinetii</i>)	5.0	未做

* 有模糊圈。

除稻白叶枯病黄杆菌采用牛肉膏蔗糖琼脂培养基外，其他细菌均用营养肉汤琼脂培养基培养。霉菌、酵母菌采用马铃薯汁蔗糖琼脂培养基培养。

于马铃薯汁蔗糖琼脂斜面上,置 28℃ 培养 4—7 天,生成青灰色孢子堆,用生理盐水制成孢子悬液。此悬液可在 4℃ 冰箱中保存一个月。

2. 检定平板的制备: 将 10 毫升融化的底层培养基注入直径为 9 厘米的培养皿中,铺平冷却,再将 5 毫升融化的上层培养基(其菌悬液量为 2%)覆盖于上,冷却备用。此平板在 4℃ 冰箱内可保存两周。

3. 标准曲线绘制: 称取静丝霉素精品,用无菌蒸馏水配制成浓度为 3、6、9、12 和 15 微克/毫升的标准液。取检定平板 6 个,按常规操作,于 28℃ 培养 36 小时,测量抑菌圈直径,绘制标准曲线图(见图 5)。由

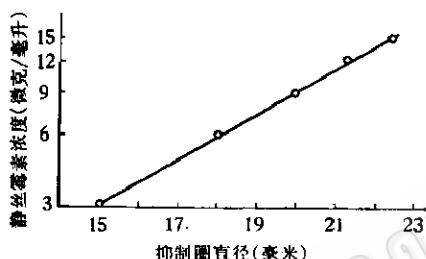


图 5 静丝霉素生物效价测定的标准曲线

图 5 可以看出,当静丝霉素浓度在 3—15 微克/毫升范围内,静丝霉素的浓度的对数值和抑菌圈直径呈线性关系,欲测样品可稀释到此浓度范围内,并在同一平皿中用标准液样品作对照。

文献报道^[10,11],测定萨腊菌素的效价是用拟青霉作为检定菌,用马肉汁培养基培养。因拟青霉为人体致病菌,而我们采用弯孢霉菌,取材方便且较安全,两者敏感度相近。

静丝霉素急性毒性试验是用小白鼠进行皮下或腹腔注射,其半致死剂量 (LD_{50}) 均大于 1000 毫克/公斤,亦与萨腊菌素类同^[10]。

讨 论

试验结果表明,静丝霉素的物理、化学

和生物学特性均与萨腊菌素相似,萨腊菌素是对人体深部真菌感染具有良好疗效的一种多肽类抗菌素^[12-16]。两者的产生菌不同,前者由吸水链霉菌井冈变种所产生,而后者是由萨腊赛链霉菌 (*Streptomyces saraceticus*) 所产生^[5]。吸水链霉菌井冈变种主要产物是农用抗菌素——井冈霉素,该变种的大部分特征与吸水链霉菌柠檬变种相似,但在培养特征方面尚有一些差别:井冈变种在蔗糖察氏琼脂上产生的可溶性色素为淡褐色,而柠檬变种为淡黄色;在葡萄糖天门冬素琼脂和淀粉琼脂上,前者为淡黄色,而后者为淡褐色。两者更重要的区别是,井冈变种能产生两种抗菌素——井冈霉素和静丝霉素,而柠檬变种除产生有效霉素外,尚未见有产生其他抗菌素的报道。这一点可作为“抗菌素是由某一特异的菌株所产生,它不是某一属性的属性”^[17]这一论点的一个例证。

参 考 文 献

- [1] 上海市农药研究所农用抗菌素组: 微生物学报, 15(2): 110—113, 1975。
- [2] 上海市农药研究所农用抗菌素组: 微生物学报, 15(3): 223—226, 1975。
- [3] Berger, J. et al.: Antimicrobial agents & Chemotherapy, 436—444, 1961.
- [4] Berger, J. et al.: Brit. Patent, 914, 683, 1961.
- [5] Berger, J. et al.: Ger. Patent, 1,122,670, 1962.
- [6] Berger, J. et al.: Japan Patent, 23,095, 1963.
- [7] Baudet, P. and E. Cherbuliez: *Helv. Chim. Acta*, 47(2): 661—683, 1964.
- [8] Kireschbaum, J. et al.: *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56: 410—411, 1967.
- [9] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 84—94, 科学出版社, 北京, 1973。
- [10] Grunberg, E. et al.: *Am. Rev. Res. Dis.*, 84: 504—506, 1961.
- [11] Emmons, C. W. and R. Piggott: *Am. Rev. Res. Dis.*, 84: 534—537, 1961.
- [12] Utz, J. P. et al.: *Am. Rev. Res. Dis.*, 84: 514—528, 1961.
- [13] Witorsch, P. et al.: *Am. Rev. Res. Dis.*,

- 93: 876—888, 1966.
- [14] Procknow, J.: *Am. Rev. Res. Dis.*, 94: 761—772, 1966.
- [15] Jrunberg, E. et al.: *Int. Congr. Chemother.*, *Proc.* 5th. 4: 69—76, 1967.
- [16] 综合药事研究所: *Japan drug index* p. 11245, 1974.
- [17] Waksman, S. A.: *Bacteriol. Rev.*, 21: 1—29, 1957.

PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF JINGSIMYCIN

Lu Wei-zhao Zhou Mei-juan

(*Shanghai Institute of Pesticides, Shanghai*)

Yu Zhen Liu Qi-ding Yan Jian-sun Gu Gui-yu

(*Department of Biology, Fudan University, Shanghai*)

Streptomyces hygroscopicus var. *jinggansis* Yan is closely related to *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*. Besides jinggangmycin, it produces an antifungal antibiotic Jingsimycin which was proved to be similar to Saramycetin

both in physicochemical and biological properties. The hydrolysate gave eight spots on paper chromatography. Five of them were identified as cysteine, aspartic acid, glycine, threonine and proline.