

农用抗生素 5102 的研究

II. 5102-2 号抗生素的分离和鉴别*

张声华 赵宏佐 刘锦林

(华中农学院 农用抗生素研究室, 武汉)
有机化学教研室

农用抗生素 5102 是吸水链霉菌应城变种 (*Streptomyces hygroscopicus* var. *yingchengensis* Yan et Ruan, n. var.) 的发酵产物, 已查明其中含有两种不同类型的抗真菌抗生素——5102-1 号和 5102-2 号抗生素。发酵液经酸化、浸提、萃取、纯化、洗脱等处理获得一种对玉米小斑病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 等有明显抑制作用的活性成分, 即 5102-2 号抗生素。它与抗生素静丝霉素, 萨腊菌素在水溶性、官能团显色、元素百分含量以及抗菌活性等方面均有差异, 因此, 5102-2 号抗生素可能是一种多肽类的新抗生素。

从吸水链霉菌应城变种^[1] 发酵液中分离得到两种抗真菌抗生素——5102-1 号抗生素和 5102-2 号抗生素。前者主要对水稻纹枯病等病原菌有强烈抑制作用, 后者则对玉米小斑病等病原菌有明显抑制效果。本文是关于 5102-2 号抗生素的分离、纯化、理化特性及抗菌活性的研究报告。

一、发酵条件

1. 菌种: 吸水链霉菌应城变种 (*Streptomyces hygroscopicus* var. *Yingchengensis*).

2. 培养基: 斜面培养基为高氏一号琼脂。摇瓶培养基 (%): 可溶性淀粉 5, 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.3, 黄豆饼粉 0.5, K_2HPO_4 0.1, $NaCl$ 0.2, $CaCO_3$ 0.5。

3. 发酵流程: 将在 28℃ 培养一周的斜面菌株, 用无菌水制成孢子悬液, 接入装有 120ml 培养基的摇瓶中, 在 28—30℃ 下摇瓶发酵 5 天, 摇床转速为 210rpm。

二、分离和提取

5102-2 号抗生素可以分别从菌丝体及发酵滤液中提取, 但以后者为主。发酵滤液用草酸酸化到 pH4.0, 离心, 去上清液,

沉淀, 加蒸馏水, 加碱调 pH 至 7.0—7.5, 不断搅拌, 浸提 1—2 小时后离心, 其沉淀再加水重复浸提, 离心, 弃去沉淀, 合并上清液, 令上清液快速通过 701 阴离子交换树脂, 将流出液调 pH3.5—4.0, 用正丁醇萃取, 离心, 正丁醇层用 Na_2CO_3 调 pH 到 6.0, 离心, 去水层, 然后在 50℃ 以下减压浓缩到原体积的 1/30 左右, 以 1:1 正己烷-丙酮析出沉淀, 离心, 沉淀以同一混合溶剂洗涤 1—2 次, 离心, 得灰棕色粗粉。

取碱性氧化铝 (层析用, 上海五三农场) 与水饱和和正丁醇混合装柱, 其上再用同法加适量活性炭 (层析用), 然后用水饱和和正丁醇洗涤至柱中流出液无紫外吸收物质时为止。将上述粗粉用水饱和和正丁醇溶解, 上柱, 用同一溶剂洗脱, 分部收集, 并用紫外分光光度计监测。分部浓缩收集液, 以正己烷-丙酮沉淀, 离心, 洗涤, 干燥后即得白色粉末状 5102-2 号抗生素。

本文于 1980 年 8 月 2 日收到。

* 华中农学院陈华癸教授, 周启副教授对本项工作进行指导并审阅本文; 武汉大学化学系、南开大学元素有机所协助进行红外光谱、元素分析工作。

三、理化性质

5102-2 号抗生素为白色粉末状物质，无明显熔点，在 266℃ 时即开始焦化。在酸性条件下难溶于水，溶于甲醇、水饱和正丁醇及吡啶中，微溶于异丙醇，不溶于乙醚、乙酸乙酯、丙酮、氯仿、己烷、石油醚等有机溶剂。当 10mg 5102-2 号抗生素分散于 10ml 水中时，水溶液呈浑浊状，pH 约为 7.0。该抗生素水溶液在低温时较稳定 (pH4.0—8.0 之间)，在过酸过碱条件下加热则很快失活。

本抗生素不易透过半透膜。在 pH 为 6.5 的吡啶:醋酸:水 (10:0.4:90) 缓冲液中电泳结果表明，它是一种酸性抗生素。以钠熔法分解抗生素，用亚硝基铁氰化钠试验，证明含有硫元素，以焰色试验则证明含有钠元素。

比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$: 本抗生素水溶性较小，故未做此项试验。

分子量(中和法)为 1,200。

元素分析 (%): C 43.98, H 5.52, N 10.70, S 7.92, Na 4.08。

官能团试验:

- 茚三酮 —
- 苯肼 —
- 硝普酸钠/氰化钾 —
- 溴酚蓝/氯化高汞 +
- 二缩脲 +
- 氯化作用 +

紫外吸收光谱: $E_{254}^{1\%} = 450$, $E_{216}^{1\%} = 216$ 。

红外吸收光谱: 3350, 2930, 1693, 1665, 1615, 1550, 1515, 1445, 1383, 1290, 1240, 1173, 1040。

水解产物的薄层层析: 5102-2 号抗生素用 6N HCl 水解 24 小时 (100—106℃)，将水解产物蒸发至干，加少量水再蒸发至干，以少量 10% 异丙醇溶解，供双向薄层

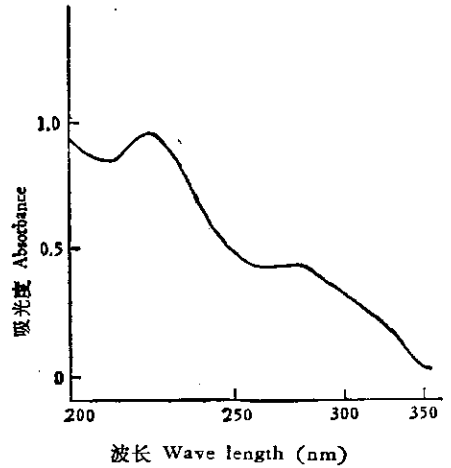


图 1 5102-2 号抗生素紫外吸收光谱(异丙醇中)

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of antibiotic 5102-2 in isopropanol

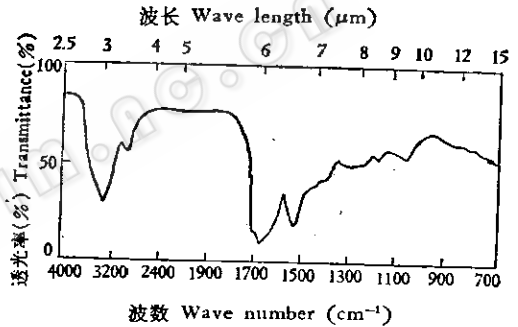


图 2 5102-2 号抗生素红外吸收光谱 (KBr 压片)

Fig. 2 Infrared absorption spectrum of antibiotic 5102-2 in KBr

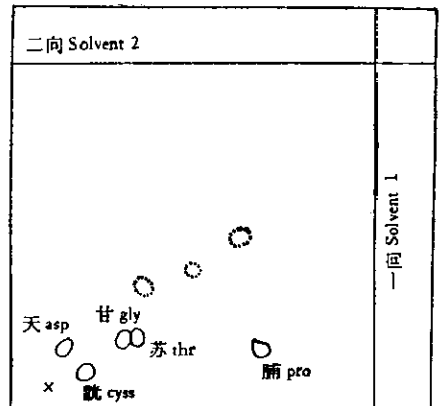


图 3 5102-2 号抗生素水解产物的双向薄层层析谱

Fig. 3 Two-dimensional separation of acid hydrolyzate of antibiotic 5102-2 by TLC on silica gel

表 1 5102-2 号抗生素同萨腊菌素、静丝霉素的特性比较

Table 1 Characteristic features: Comparison between Antibiotic 5102-2 and Saramycetin etc. Antibiotics

	5102-2 号抗生素 Antibiotic 5102-2	萨 腊 菌 素 Saramycetin	静丝霉素 Jingsimycin
化学分离 Chemical isolation	<p>主要从发酵液用正丁醇萃取, 在 pH6 时浓缩提取液, 以活性炭-碱性氧化铝柱层析, 洗脱剂为水饱和正丁醇。</p> <p>Mainly extd. from the filtered broth with <i>n</i>-butanol. The ext. was concd. at pH 6.0. Purified in water-saturated <i>n</i>-butanol on a chromatographic column of activated charcoal-Al_2O_3.</p>	<p>主要从菌丝体用正丁醇或甲醇萃取, 在 pH7 时浓缩提取液, 以碱性氧化铝柱层析, 洗脱剂为甲醇。</p> <p>Mainly extd. from mycelium with BuOH or MeOH. The ext. was concd. at pH 7.0. Purified in methanol on a chromatographic column of basic Al_2O_3.</p>	同左 See saramycetin
性 状 Nature	白色粉末, 分散于水中呈浑浊状。 Amorphous white powder. Usually give a turbid 0.1% solution in H_2O with a pH of 7.0	白色无定形粉末, 钠盐易溶于水。 Amorphous white powder, sol. in H_2O at pH 7-9	同左 See saramycetin
比旋光度 [α] _b in H_2O	水溶性差, 未予测定。 Not measurable due to low solubility	[α] _D ²⁰ -42° (C = 1.0, H_2O)	[α] _D ²⁰ 42° (C = 1, H_2O)
熔 点 M. P.	266°C 焦化 Char at 266°C	250°C 时呈棕色 270-280°C 时焦化 Char at 270-280°C	250°C 变褐, 266°C 碳化。 Char at 266°C
分子 量 Mol. wt.	1,200 (中和法 titration)	1,000-1,300 (中和法 titration) 2,100 (超离心法 ultracentrifugation) ^[43] ; 14,000 (超离心法 ultracentrifugation) ^[43] 。	2,100 (中和法 titration) ^[41]
元素分析 Analysis (%)	C 43.98 H 5.52 N 10.70 S 7.92 Na 4.08	C 41.75 H 5.06 N 14.54 S 12.78 Na 1.58	C 41.15 H 4.79 N 14.18 S 12.56 Na 1.45
紫外吸收光谱 UV	$E_{214}^{1\%} = 450$ $E_{216}^{1\%} = 216$ (异丙醇 in iso-PrOH)	$E_{217}^{1\%} = 510$. $E_{217}^{1\%} = 245$ (异丙醇 in iso-PrOH) $E_{217.5}^{1\%} = 440$, $E_{218}^{1\%} = 275$ $E_{305}^{1\%} = 205$ (水, H_2O)	max. $m\mu$ 222, 270, 305 (水, H_2O)
红外吸收光谱 IR(KBr) (cm^{-1})	3350, 2930, 1693, 1665, 1615, 1550, 1515, 1445, 1383, 1290, 1240, 1173, 1043	3320, 2980, 1689, 1668, 1610, 1506, 1437, 1379, 1280, 1168, 1034	3360, 2940, 1680 1666, 1620, 1520, 1445, 1390, 1285, 1175, 1040

续表

	5102-2 号抗生素 Antibiotic 5102-2	萨 腊 菌 素 Saramycetin	静丝霉素 Jingsimycin
官能团试验 Color test of functional groups with Standard reagents	茚三酮 - Ninhydrin 苯肼或 2, 4-二硝基苯肼 - Phenylhydrazine or 2, 4-Dinitro-phenylhydrazine 硝酸钠/氰化钾 - Nitroprusside/Potassium cyanide 溴酚蓝 + Bromophenol blue 二缩脲 + Biuret test 氯化作用 + Chlorination	- - - - - +	- - - - +
水解产物的薄层层析结果 Two-dimensional TLC analysis of acid hydrolyzate	得到 8 个茚三酮显色斑点, 其中 5 个被鉴定为胱氨酸, 天门冬氨酸, 甘氨酸, 苏氨酸, 脯氨酸。 Give eight ninhydrin-positive spots. Five of these were identified as aspartic acid, cystine, glycine, proline, threonine	同左 See antibiotic 5102-2	同左 See antibiotic 5102-2
抗菌活性 Antimicrobial spectra	对拟青霉、黄曲霉、黑曲霉、稻小球菌核病菌等无活性。对玉米小斑病菌、稻瘟病菌、玉米大斑病菌、油菜菌核病菌等显示活性。 Inactive against <i>Paecilomyces varioti</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Helminthosporium sigmaideum</i> . Active against <i>Cochliobolus heterostrophus</i> , <i>Piricularia oryzae</i> , <i>Helminthosporium turcicum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> etc.	对拟青霉显示活性。对黄曲霉、黑曲霉、链格孢、尖镰孢、黑根霉、长蠕孢菌。不如拟青霉那样敏感或出现清晰的抑制带。 Very narrow Active against <i>Paecilomyces varioti</i> , Less sensitive against <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Helminthosporium inequale</i> etc.	对拟青霉、弯孢霉、小麦赤霉菌、绿色木霉。产黄青霉、黑曲霉等显示活性。 Active against <i>Paecilomyces varioti</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Gibberella zeae</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>A. niger</i> etc.

层析点样之用。

吸附剂: 硅胶 G (E. Merck)

展开剂: 第一向: 正丁醇-醋酸-水 (4:1:1), 第二向: 苯酚-水 (3:1W/V)

层析后, 用茚三酮显色得到八个显色点, 其中五个经鉴定分别为胱氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸、苏氨酸和脯氨酸。

四、抗 菌 谱

用平皿二倍稀释法测定, 5102-2 号抗生素对参加试验的一些细菌及酵母菌均无抑制作用, 对一些丝状真菌如拟青霉 (*Paecilomyces varioti*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、水稻小球菌核病菌 (*Helminthosporium sigmaideum*)、水稻纹枯病菌 (*Piricularia sas-*

kii)、棉花立枯病菌 (*Pellicularia filamentosa*) 等也无抑制作用。但对玉米小斑病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*)、稻瘟病菌 (*Piricularia oryzae*)、稻恶苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*)、稻条斑病菌 (*Cercospora oryzae*)、稻胡麻斑病菌 (*Helminthosporium oryzae*)、玉米大斑病菌 (*Helminthosporium turcicum*)、甘薯黑疤病菌 (*Ophiostoma fimbriata*)、油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、棉黄萎病菌 (*Verticillium albo-atrum*)、柑桔青霉菌 (*Penicillium italicum*)、柑桔绿霉菌 (*Penicillium digitatum*) 等有明显抑制作用, 其最低抑制浓度都低于 $12\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

五、关于纯度问题的讨论

1. 溴酚蓝是蛋白质染色剂, 本实验中是阳性反应。如果这是由于蛋白质污染造成的, 那么茚三酮反应应为阳性, 但这里试验结果是阴性, 因此蛋白质污染可能性应是很小的。

2. 将样品水解后进行双向薄层层析, 发现未纯化前, 茚三酮显色点为 14 个, 纯化后为 8 个。

3. 在柱层析纯化过程中, 去掉可能引起污染的因素, 如橡皮、塑料管塞。全部用玻璃管接触有机洗脱溶剂, 并用紫外分光光度计监测洗脱过程, 有杂质存在时紫外吸收光谱即会表现异常。

4. 将抗生素粗品和纯化样品进行红外吸收光谱对照, 发现在粗品中的杂质吸收峰, 在纯化样品的吸收光谱中均已去掉, 且吸收峰位置正常, 无异常位移。

5. 对纯化过程中可能污染样品, 从而

造成 C、H、N、S、Na 百分含量不同于萨腊菌素的一些可能因素进行了理论计算。如二水合, 八水合草酸、草酸钠、碳酸钠污染可能造成 5102-2 号抗生素含硫量降到 8% 的情况, 以此数据为基础进行计算, 发现 C、H 百分含量均与测定结果不符。因此, 这些杂质的污染程度也不会造成 S、N 含量下降, 而 C、H 百分含量与萨腊菌素相近的情况。

从上述各项研究结果可知由吸水链霉菌应城变种发酵液中分离得到的 5102-2 号抗生素是一种酸性、含硫的多肽类物质。与文献报道的近似抗生素如萨腊菌素^[2]、静丝霉素^[3]相比较, 除一般理化特性有相似处外, 在水溶性、溴酚蓝显色、元素百分含量和抗菌活性等方面都有明显差异, 而且在分离纯化方法如浓缩时的 pH 控制、洗脱溶剂的选择等方面也不相同。综上所述, 我们认为 5102-2 号抗生素可能是属于多肽类抗生素中的新抗生素。

参 考 文 献

- [1] 华中农学院微生物教研组: 微生物学报, 18(1): 23—26, 1978.
- [2] Berger, J. et al.: X-5079C, A new polypeptide antifungal antibiotic active against systemic mycoses antimicrobial agents and chemotherapy (ed. by Finland M. and G. Savage), Braun-Brum field, Inc. USA, 1961, p. 436—446.
- [3] 卢惟钊等: 微生物学报, 20(2): 191—195, 1980.
- [4] Bandet, P. and E. Cherbuliez: *Helv. Chim. Acta*, 47: 661—683, 1964.
- [5] Bandet, B. and Cl. Otten: *Naturwiss.*, 55: 344, 1968.
- [6] Aszalos, A. et al.: *J. Antibiotics*, 22: 577—579, 1969.
- [7] *Chem. Abst.*, 78(13): 82940d, 1973.

STUDIES ON THE AGRICULTURAL ANTIBIOTICS 5102

II. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC 5102-2

Zhang Shenghua Zhao Hongzuo Liu Jinlin

(*Agricultural Antibiotic Laboratory, and Chemistry Teaching and Research Unit, Huazhong Agricultural College, Wuhan*)

Streptomyces 5102 produces two antifungal antibiotics, namely, antibiotics 5102-1 and 5102-2, different in their properties and structures. Antibiotic 5102-2, a polypeptide with antifungal activities, is present in both filtrate and mycelial mass of the fermentation product. Filtrate was used for the separation and purification of antibiotic 5102-2 reported in this article. The filtrate was adjusted to pH 4.0 with oxalic acid. After centrifugation the ppt. was successively extd. with aqueous alkali (pH 7.5) and butanol. The ext. was coned. to about one-thirtieth of its original vol. at pH 6.0 and then pptd. with hexane-ace-

tone. The antibiotic was purified in water-saturated butanol on a chromatographic column of activated charcoal basic Al_2O_3 . The purified antibiotic 5102-2 is an almost white powder, possessing in vitro activity against *Cochliobolus netterostrophus*. But it is inactive against *Paecilomyces varioti*. Most of the properties of antibiotic 5102-2 are similar to the known antibiotic saramycetin, but the two antibiotics are different from each other in water-solubility, color reaction with bromophenol blue, elementary analyses and antimicrobial spectrum. The differences suggest that the antibiotic 5102-2 is possibly a new antibiotic.