

新抗生素优乐霉素的发酵、分离和理化性质

叶绪慰 强亚静

(中国科学院微生物研究所, 北京)

优乐霉素是一个新氨基糖苷类抗生素,它强烈抑制革兰氏阳性和阴性细菌,尤其抑制卡那霉素等抗生素的耐药菌,对酵母、丝状真菌等无作用。通过 Amberlite IRC-50 铵型树脂柱从发酵液中分离出该抗生素的粗制品,再通过 D151 大孔树脂及 CM-Sephadex C 25 柱进行层析提纯。优乐霉素为白色粉末,碱性,与无机酸成盐,不溶于一般有机溶剂,用快原子轰击法质谱测得分子量为 583,实验式为 $C_{23}H_{44}N_4O_{13}$, 游离碱比旋度为 $[\alpha]_D^{25} + 137.8^\circ$, 熔点为 $162-165^\circ\text{C}$ (分解)。该抗生素无紫外吸收峰。根据 ^{13}C -核磁共振的化学位移数据,认为此抗生素结构属于阿泊拉霉素类抗生素。

关键词 优乐霉素;氨基糖苷类抗生素;链霉菌 C-19;阿泊拉霉素

新抗生素优乐霉素是 1979 年从云南西双版纳优乐山土壤中分离到的链霉菌 C-19 产生的氨基糖苷类抗生素。它强烈抑制革兰氏阳性和阴性细菌,尤其抑制耐卡那霉素的金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌,本文报道优乐霉素的发酵、分离、纯化和理化性质。

材料和方法

(一) 产生菌株

链霉菌 C-19 是 1979 年由本所张亚美从云南西双版纳优乐山土壤中分离的。在甘油天冬素琼脂斜面上 37°C 培养 7 天,表面气生菌丝呈灰白色,基丝为黄色,产生浅紫色色素。

(二) 培养基

(1) 摇瓶种子培养基(%) : 黄豆饼粉 1, 葡萄糖 0.3, 糊精 0.5, 硫酸镁 0.5, 蛋白胨 0.2, 氯化钾 0.1, 氯化钙 0.03, 磷酸二氢钾 0.05, 自然 pH。

(2) 发酵培养基(%) : 通过 $L_{16}(4^3)$ 正交试验选出;黄豆饼粉 5, 葡萄糖 3, 糊精 2, 蛋白胨 0.2, 氯化钠 0.5, 氯化镁 0.5, 磷酸钾 0.2, 酵母膏 0.1, 碳酸钙 0.3, pH7.2。

(三) 培养条件

摇瓶种子: 在 500ml 三角瓶中装 80ml 培养

基或 250ml 三角瓶装 30ml 培养基,在 37°C 培养,摇瓶机转速 220 转/分,偏心距 2.5cm,种子种龄 18—24 小时。

摇瓶发酵: 在 250ml 三角瓶中装 30ml 培养基, 28°C 培养,接种量为 2—4%。

罐发酵: 在 New Brunswick 公司生产的 28L 自控发酵罐中进行,发酵培养基 15L, 搅拌速度 250r/min, 通气量 10L/min, $28-30^\circ\text{C}$ 。一级种子接种量为 5%,发酵 96 小时。

(四) 生物效价测定

用双层琼脂杯碟法,测定菌为枯草杆菌 6633,相对标准曲线范围在 $5-30\mu\text{g/ml}$ 。耐药金黄色葡萄球菌 R-136 为参考测定菌(耐卡那霉素 $1000\mu\text{g/ml}$ 以上)。测定范围为 $60-50\mu\text{g/ml}$ 。测定培养基上层为(%) : 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.1, 琼脂 1.2, 牛肉浸汁全量(本所自制) pH7.5。下层为 1.2% 水琼脂。测定木盘面积 $9 \times 14\text{mm}$, 上层 60ml, 下层 150ml。

(五) 抗菌谱测定

用肉汁琼脂稀释法,肉汁琼脂培养基成分

本文于 1986 年 4 月 20 日收到。

北京医科大学临床药理研究所李家泰教授和上海医科大学抗生素研究所刘裕崑教授进行急性毒性试验;波兰科学院院士 W. Kurylowicz 教授惠赠 Lilly 公司阿泊拉霉素硫酸盐样品,在此一并致谢。

(%): 蛋白胨 1, 牛肉膏 1, 琼脂 1.2, pH7.2, 划线观察测定菌生长情况。托普霉素硫酸盐 (tobramycin sulfate) 样品为 Lilly 公司商品水针剂, 经五氯酚转盐纯化, 卡那霉素硫酸盐 (kanamycin sulfate) 为生物制品检定所标准品 774 单位, 阿泊拉霉素 (apramycin) 样品由 Lilly 公司实验室提供。为了计算方便均按重量计。

(六) 分析方法

用 3.5-二硝基水杨酸法^[7]测定还原糖。生长菌体经 3000r/min 15 分钟离心后测量固体体积和重量。用上海第二分析仪器厂 pH S-3 型酸度计测定 pH。

(七) 分离和纯化

发酵液中加入草酸调 pH 至 3, 离心, 用氢氧化钠调上清液至 pH7.2, 过滤, 上清液通过 Amberlite IRC-50 铵型树脂柱, 水洗净后用 0.7N 氢氧化铵洗脱, 活性部分减压浓缩, 用硫酸调浓缩液 pH2-3, 加活性炭脱色, 将无色液滴入无水乙醇中, 得白色絮状沉淀。经离心, 干燥, 得硫酸盐粗品。粗品溶于水, 通过 D151 大孔树脂 (南开大学化工厂) 铵型柱, 水洗净后用 0.1N 氢氧化铵洗出组分 I (优乐霉素), 浓缩后通过 CM-Sephadex C25 铵型柱, 用 0.05N 氢氧化铵洗脱, 浓缩, 滴入无水乙醇或冷冻干燥, 得白色纯品。

结 果

(一) 发酵温度

链霉菌 C-19 菌种斜面 and 种子摇瓶在 37℃ 培养比 28℃ 生长快。在 37℃ 24 小时生长菌液稠密, 菌丝粗壮, 而在 28℃ 需 48

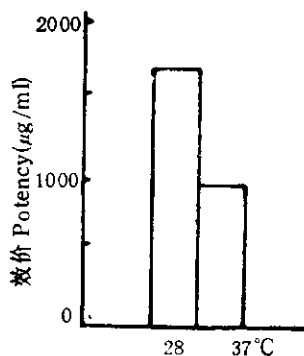


图 1 发酵温度的影响

Fig. 1 The effect of different temperature on the titer of youlemycin in fermentation

小时以上才能达到上述水平。但在发酵摇瓶培养时, 96 小时后测定, 28℃ 的摇瓶比 37℃ 所产生的效价高, 前者约 1560 μg/ml, 而后者只有 836 μg/ml (图 1)。

(二) 发酵培养基组分对抗生素产量和组分的影响

在发酵培养基中用氯化镁和磷酸钾分别代替硫酸镁和磷酸氢二钾, 抗生素产量增加 15% 左右 (图 2)。

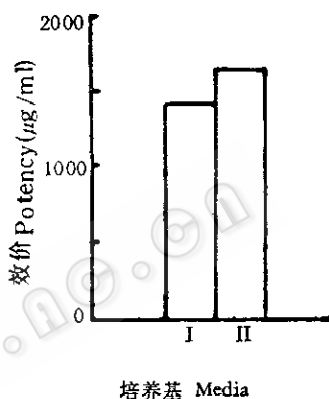


图 2 $MgCl_2$ 和 K_3PO_4 对优乐霉素产生的影响
Fig. 2 The effect of $MgCl_2$ and K_3PO_4 upon the youlemycin production
I. $MgSO_4 + K_2HPO_4$; II. $MgCl_2 + K_3PO_4$
 Mg^{2+} 0.5%; K^+ 0.2%

将发酵培养液 I 和 II 直接点样在烧结硅胶玻璃层析板上 (上海玻璃二厂), 用正丙醇: 甲醇: 氨水 (2.5: 2.0: 20) 展层, 枯草杆菌 6633 显迹, 从图 3 的结果可见, 培养基 I 中除主要组分优乐霉素外, 还有另外二个小组分, 而培养基 II 中主要是优乐霉素和另一个小组分。

(三) 接种量的影响

在装有 30ml 培养基的 250ml 三角瓶中进行试验 (图 4)。随着接种量的增加, 相对效价逐渐降低。2—6% 的接种量效价相差不大, 超过 6% 对效价影响明显。

(四) 摇瓶装量对优乐霉素产生的影响

在 500ml 三角瓶中分别装培养液 40,

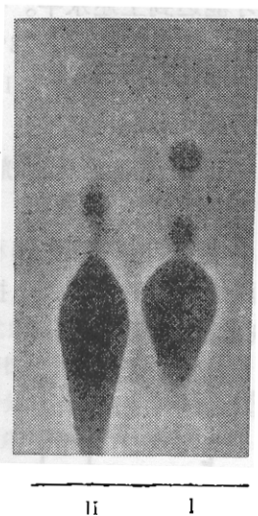


图3 发酵培养基组分对优乐霉素组分的影响
Fig. 3 The effect of fermentation medium on the production of youlemycin components (Characteristic bioautograph of the youlemycin complex) The solvent system was consisted of n-propanol: methanol: ammonia solution (2.5: 2.0:2.0)

60, 80, 100 和 120ml, 其结果见图5。装量在 40—80ml 时, 效价相差不大, 超过 80ml, 效价明显下降。

(五) 发酵代谢变化

在 28L 不锈钢发酵罐中进行链霉菌 C-19 发酵代谢变化试验(图6)。

链霉菌 C-19 在发酵罐中培养 24—84

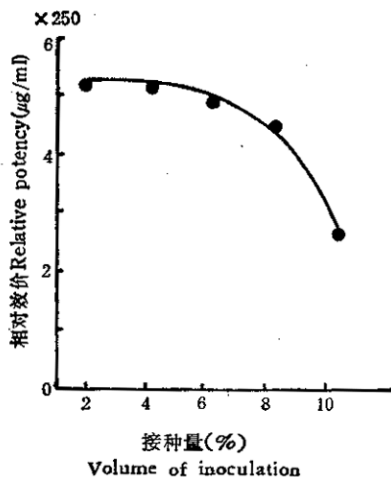


图4 接种量对优乐霉素产生的影响
Fig. 4 The effect of inoculation volume on the production of youlemycin

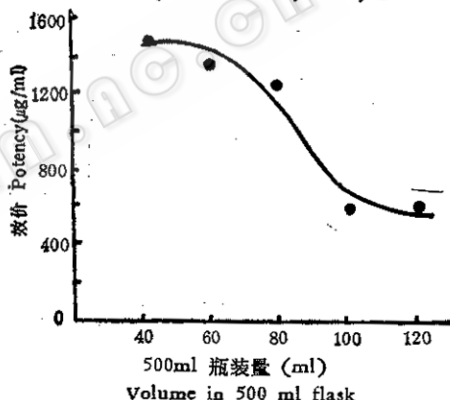


图5 摇瓶装量对优乐霉素产生的影响
Fig. 5 The effect of medium volume on the production of youlemycin in shake culture

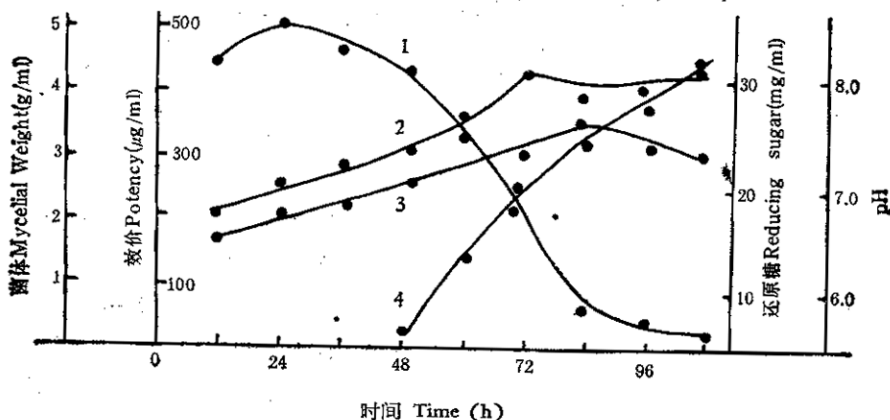


图6 优乐霉素产生菌发酵代谢的变化
Fig. 6 Metabolic change in tank fermentation with youlemycin producer *Streptomyces* sp. C-19
1. 还原糖 Reducing sugar; 2. pH; 3. 菌体 Mycelial weight; 4. 效价 Potency

小时,糖量迅速消耗,同时菌体逐渐增加,84小时后,菌体量稍降低,在72小时后pH下降,84小时后又开始上升,这与糖量的迅速消耗和菌体量降低有密切关系。抗生素在48小时已开始产生,随着菌体增殖而增加,在pH第二次上升后,抗生素产量达到最高。

(六) 离子交换树脂的性能

用羧酸型阳离子交换树脂 Amberlite IRC-50 (铵型) 分离优乐霉素效果较理想。每毫升树脂体积吸附约1mg左右抗生素。用0.5N氢氧化铵水溶液解吸,洗脱率约为95% (图7)。

(七) 理化性质

优乐霉素呈白色,无定形粉,碱性,易溶于水,微溶或难溶于甲醇、乙醇和冰醋酸,不溶于其他一般有机溶剂。无明确熔点,在162℃以上变褐色,比旋度 $[\alpha]_D^{25}$ 游离碱+137°(C 1, 水),硫酸盐+100.6°(C 1, 水)。功能团反应: Fehling's 和 Elson-Mor-

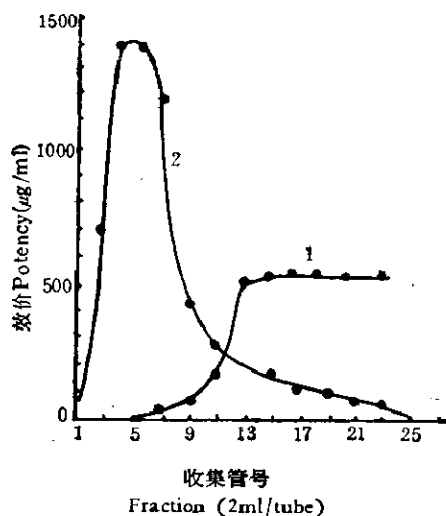


图7 离子交换树脂分离优乐霉素的性能
Fig. 7 Characterization of ion exchange resin on isolation of youlemycin
1. 吸附 Absorption 2. 解吸 Desorption

gan 反应为阳性,茚三酮反应弱阳性或可疑,坂口反应为阴性。

纸电泳用新华1号层析滤纸,在pH 4.0和8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中

表1 优乐霉素与其它氨基糖苷类抗生素的纸层析比较

Table 1 Comparison of the youlemycin with other aminoglycoside antibiotics on paper chromatography

溶剂系统 Solvent system	R _f 值*				
	优乐霉素 Youlemycin	卡那霉素 Kanamycin A	卡那霉素 Kanamycin B	托普霉素 Tobramycin	阿泊拉霉素 Apramycin
10%醋酸铵:甲醇 (1:1) Ammonium acetate: Methanol	0.75	0.76	0.78		
甲醇:水:醋酸 (80:15:5) Methanol: Water: Acetic acid	0.33	0.43	0.50		
丁醇:醋酸:水 (2:1:1) Butanol: Acetic acid: Water	0.81	0.84	0.83		
甲醇:10% 氯化铵 (1:1) Methanol: Ammonium chloride	0.45	0.48	0.41	0.41	
R _f 值**					
水饱和正丁醇+2%对甲苯磺酸(下行) n-butanol (water)+ P-toluene sulfonic acid	1.00	1.09	2.29	3.14	
Ibid	1.00	1.13	2.25	4.19	1.75

* 新华一号滤纸 Xin-hua No. 1 paper

** 德国 2045b 滤纸 Schleicher and Schüll 2045b paper, youlemycin = 1

进行, 3000V, 25mA 和 55mA, 30 分钟均向负极移动。(枯草杆菌显迹)。

纸层析用新华一号和德国 2045b 定向层析滤纸进行(表 1)。

从表 1 中看出优乐霉素与阿泊拉霉

素、卡那霉素 A 和 B、托普霉素在不同溶剂系统中的 R_f 值不同。

薄层层析在硅胶烧结玻璃板上(上海玻璃二厂产品)进行, 用枯草杆菌显迹(表 2)。

表 2 优乐霉素与其它氨基糖苷类抗生素的薄层层析比较

Table 2 A comparison of the youlemycin with other aminoglycoside antibiotics on thin-layer chromatography (silica gel)

溶 剂 系 Solvent system	R_f 值			
	优乐霉素 Youlemycin	卡那霉素 Kanamycin A	卡那霉素 Kanamycin B	托普霉素 Tobramycin
正丙醇:甲醇:浓氨水(2.5:2.0:2.0) n-propyl alcohol: Methanol: Ammonium hydroxide	0.13	0.15	0.16	0.26
10%醋酸铵:甲醇(1:1) Ammonium acetate: Methanol	0.23	0.32		0.24

元素分析 (%): C 33.63, 33.61; H 6.53, 6.79; N 8.72, 8.52。

分子量 (m/e) 583 [快原子轰击法 (FAB)]如图 8 所示。按¹³C 核磁共振图谱(图 9)计算实验式为 C₂₁H₄₅N₅O₁₂。

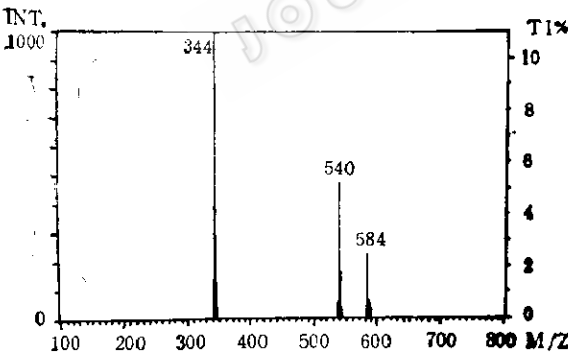


图 8 优乐霉素的质谱
Fig. 8 Mass spectrum of youlemycin in FAB

核磁共振氢谱见图 10。
紫外光谱为末端吸收。
红外光谱(溴化钾法)见图 11。

优乐霉素, 糖菌素与阿泊拉霉素的¹³C 核磁共振的化学位移 δ (ppm) 数据见表 3。

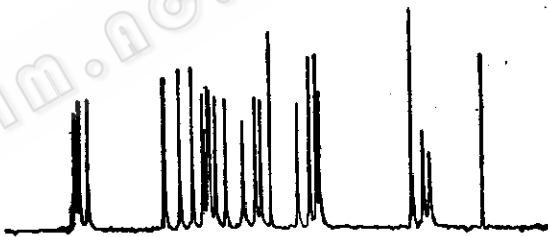


图 9 优乐霉素的核磁共振碳谱
Fig. 9 ¹³C NMR spectrum of youlemycin in D₂O, 100 MHz

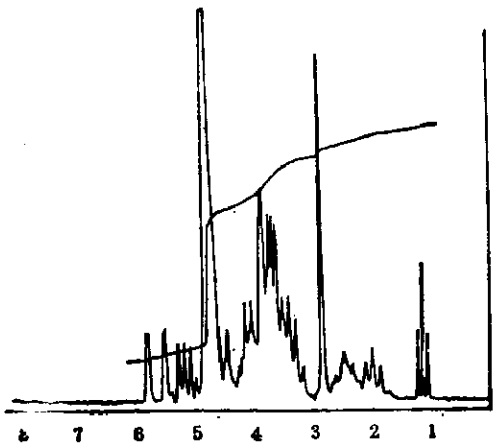


图 10 优乐霉素的核磁共振氢谱
Fig. 10 ¹H NMR spectrum of youlemycin in D₂O, 100 MHz

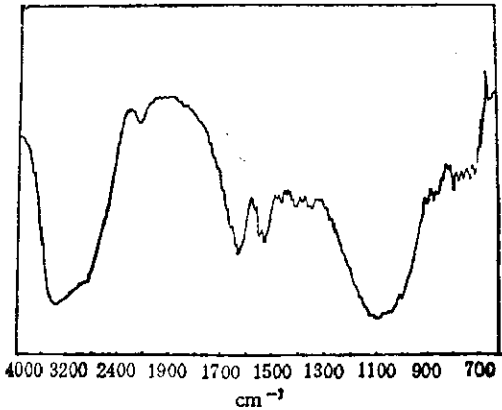


图 11 优乐霉素的红外光谱
Fig. 11 Infrared spectrum of youlemycin in KBr

表 3 优乐霉素、糖菌素与阿泊拉霉素 ¹³C 核磁共振的化学位移 δ (ppm)
Table 3 A comparison of youlemycin with saccharocin & apramycin in ¹³C-NMR chemical shifts

碳位 Carbon	糖菌素 ^[8] Saccharocin	阿泊拉霉素 ^[8] Apramycin	优乐霉素 硫酸盐 Youlemycin sulfate
1	50.7	50.7	50.7
2	29.1	29.1	29.1
3	49.5	49.5	50.3
4	78.9	78.6	78.8
5	75.9	75.9	75.8
6	73.2	73.2	73.2
1'	96.0	96.0	95.9
2'	48.7	48.9	48.9
3'	27.8	27.8	27.8
4'	66.8	66.8	66.9
5'	70.5	70.4	70.4
6'	63.7	63.5	63.5
7'	60.3	60.3	60.1
8'	93.6	93.6	93.5
1''	95.5	95.3	95.2
2''	71.2	71.2	71.2
3''	73.8	70.0	70.0
4''	70.2	53.2	53.0
5''	73.2	68.9	68.9
6''	61.4	61.3	61.2

续表 3

碳位 Carbon	糖菌素 ^[8] Saccharocin	阿泊拉霉素 ^[8] Apramycin	优乐霉素 硫酸盐 Youlemycin sulfate
N-CH ₃	31.4	31.3	31.1 54.8 14.4

(八) 抗菌活性

用琼脂稀释法测得优乐霉素硫酸盐的抗菌谱, 并与卡那霉素 A 硫酸盐和托普霉素硫酸盐进行比较(表 4)。

表 4 优乐霉素与卡那霉素、托普霉素的抗菌谱比较
Table 4 A comparison of youlemycin with kanamycin A, tobramycin in antimicrobial spectra

测 试 菌 Test organisms	最低抑制浓度 ($\mu\text{g/ml}$) Minimal inhibitory concentration		
	优乐 霉素 (Yl.)	卡那 霉素 (Km.)	托普 霉素 (Tob.)
金黄色葡萄球菌 R-136 <i>Staphylococcus aureus</i>	1.56	>100	1.56
金黄色葡萄球菌 FDA-209P <i>Staphylococcus aureus</i>	0.78	6.25	1.56
肺炎克氏杆菌 PCI-602 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.78	3.125	1.56
枯草杆菌 PIC-219 <i>Bacillus subtilis</i>	0.78	0.78	0.78
普通变形杆菌 OX-19 <i>Proteus vulgaris</i>	0.78	6.25	6.25
赛氏杆菌 755 <i>Serratia</i> sp.	1.56	12.5	12.5
溶壁微球菌 IFO-3333 <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	12.5	12.5	12.5
土生丛毛单胞菌 IFO-12685 <i>Comomonas terrigena</i>	1.56	3.125	1.56
绿脓杆菌 GN-315 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.5	>100	12.5
大肠杆菌 K-12 <i>Escherichia coli</i>	1.56	6.25	1.56

优乐霉素与其它氨基糖苷类抗生素对 19 株绿脓杆菌的体外抗菌性能比较见表 5。

表5 优乐霉素与其它氨基糖苷类抗生素对19株绿脓杆菌的体外抗菌性能比较*

Table 5 A comparison of youlemycin with other aminoglycoside antibiotics in antibacterial activity of nineteen strain *Pseudomonas aeruginosa*

	优乐霉素 Youlemycin	庆大霉素 Gentamicin	托普霉素 Tobramycin	卡那霉素 Kanamycin	丁胺卡那霉素 Amikacin
MIC ₉₀ mcg/ml	16	16	8	>128	4
MIC ₉₉ mcg/ml	约 16	>128	64	>128	8

* 该项实验数据由上海医科大学抗生素研究所刘裕崑教授提供。

The data were supplied by prof. Liu Yukun in Antibiotic Research Institute, Shanghai medical University.

(九) 急性毒性

LD₅₀: 小白鼠静脉注射游离碱为 160 mg/kg, 硫酸盐 204.17mg/kg, 10 只小白鼠死 1 只。

讨 论

自 1944 年发现链霉素至今已报道百种氨基糖苷类抗生素^[1], 经化学修饰的也不少。在临床应用的抗生素中除 β -内酰胺类外, 氨基糖苷类抗生素是应用品种最多的一类。从产生菌和抗菌活性看, 优乐霉素与暗霉素 (Nebramycin) 比较接近。暗霉素产生菌至少产生 13 个组分^[2-5]。除 1 和 3 组分未详细报道外, 其它组分均有理化数据。从理化性质和层析移距看优乐霉素与暗霉素 II (即阿泊拉霉素) 较接近^[4,6,8,9]。为此我们同 Lilly 公司实验室阿泊拉霉素硫酸盐样品直接进行比较, 发现纸层析和薄板层析的比移值、红外光谱和

核磁共振谱均与优乐霉素有差异。从 FAB 质谱和 ¹³C 核磁共振图谱以及元素分析推算其分子式为 C₂₈H₄₅N₅O₁₂, 在氨基糖苷类-抗生素中无与其相同的。从优乐霉素的 ¹³C 核磁共振化学位移 (ppm 值) 与糖菌素和阿泊拉霉素比较, 优乐霉素的基本结构与阿泊拉霉素很相似 (见图 12, 表 6), 只是在 3 位碳原子上差 0.8ppm, 在 14.4 和 54.8ppm 处有二个峰, 如果优乐霉素的结构是 3-乙醇胺阿泊拉霉素, 在 3 位碳原子上的化学位移应有 5—10ppm 低场位移, 在 2 和 4 碳原子上应有 2ppm 的高场位移, 而实际测试看不到这些, 因此优乐霉素的 -NH-CH₂-CH₂OH 在结构上的确切位置有待进一步肯定。

优乐霉素对庆大霉素、托普霉素等氨基糖苷类抗生素的耐药菌株敏感, 这是该抗生素在抗菌性能上的特点。该抗生素的产生菌 C-19 链霉菌是从我国云南西双版纳优乐山土壤中分离的, 由此把该菌产生

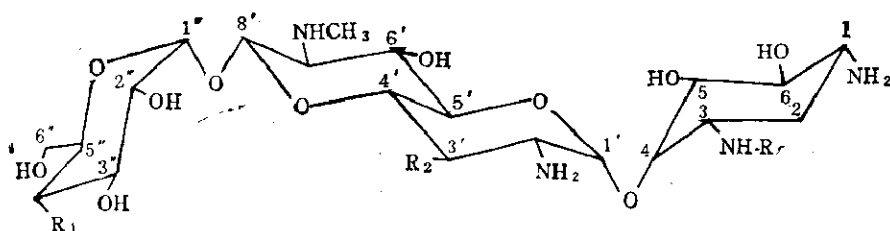


图 12 优乐霉素的基本结构

Fig. 12 The basic structure of youlemycin

表 6 几种抗生素基本结构比较

Table 6 A Comparison of the basic structure of some antibiotics

抗生素 Antibiotics	R ₁	R ₂	R ₃	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight
糖菌素 ^[8,9] Saccharocin	-OH	-H	-NH ₂	C ₂₁ H ₄₀ N ₄ O ₁₂	540
阿泊拉霉素 Apramycin	-NH ₂	-H	-NH ₂	C ₂₁ H ₄₁ N ₃ O ₁₁	539
氧阿泊拉霉素 Oxyapramycin	-NH ₂	-OH	-NH ₂	C ₂₁ H ₄₁ N ₃ O ₁₁	555
优乐霉素 Youlemycin	-NH ₂	-H		C ₂₃ H ₄₅ N ₃ O ₁₂	583

的抗生素主要组分定名为优乐霉素(Youlemycin)。发酵液中的另一小组分,因含量很低,没有作进一步检定。

参 考 文 献

- [1] 方 纲: 抗菌素生物理化特性, 第三册, 人民卫生出版社, 第 215 页, 1985 年。
 [2] Koch, K. F. et al.: 英国专利, 1,178,489, 1970。
 [3] William, M. S. et al.: 美国专利, 3,962,427,

1976。

- [4] Connor, S. O. et al.: *J. Org. Chem.*, 41: 2087, 1976。
 [5] Koch, K. F. et al.: *J. Org. Chem.*, 43: 1430, 1978。
 [6] Koji, T. et al.: 美国专利, 4,032,404, 1977。
 [7] Summer, J. B.: *J. Biochem.*, 61: 343, 1952。
 [8] Masashi, A. et al.: *J. Antibiotics*, 36: 651, 1983。
 [9] Kazuhiro, K. et al.: *J. Antibiotics*, 36: 738, 1983。

THE FERMENTATION, ISOLATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF YOULEMYCIN

Ye Xuwei Qiang Yajing

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Streptomyces sp. No. C-19 was isolated from soil sample collected at Youle mountain of Xishuangbanna in Yunnan. The strain was found to produce a new antibiotic—Youlemycin and a minor component.

Youlemycin was obtained with a high yield in soymealglucose medium and isolated by Amberlite IRC-50 resin column from culture broth. The substance was purified by chromatography on a Nankai D 151 macroreticular resin column and CM-Sephadex C25.

Youlemycin exhibits a broad antibacterial spectra, especially against most of the aminoglycoside-resistant organisms (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* etc.). It is a novel aminocyclitol antibiotic, which is related to apramycin and saccharocin (antibio-

tic KA-5685). Youlemycin is a colorless powder having the empirical formula $C_{23}H_{45}N_5O_{12}$ (MW. 583 by FAB mass spectra), m.p. 162—165°C (dec.) and $[\alpha]_D^{25} + 137.8^\circ$ in water. It has no characteristic absorption maxima in ultraviolet spectrum. It can form salts with inorganic acids. Based on its unique ultraviolet spectrum, infrared spectrum, nuclear magnetic resonance spectra, FAB mass spectra, and compared with kanamycin A or B, apramycin, tobramycin, it is judged to be a novel aminoglycoside type of compound.

Key words

Youlemycin; Aminoglycoside antibiotic; *Streptomyces* sp. C-19; Apramycin