

抗小麦赤霉病抗生素861-A 的提取、纯化及理化性质

金同铭 宋家祥 李香玲

(中国农业科学院原子能研究所, 北京)

卞则樑* 柴文刚 贺玉珍 张文信 方一苇 王光辉 谢光华 郑 平

(中国科学院化学研究所, 北京)

小麦赤霉病是小麦的主要病害之一。在筛选防治小麦赤霉病的农用抗生素过程中, 分离到链霉菌 861 菌株, 定名为玫瑰皮黄链霉菌淡色变种 (*Sireptomycetes roseopalutaceus* var. *pallidus*)^[1]。它的发酵液具有广谱的抗菌活性, 经提取分离得到三个组份, 其主要活性组分为抗生素 861-A。经大面积作物防病药剂试验表明, 对小麦赤霉病的防效达 80—97%^[2]。本文报道其提取、分离及理化性质。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和抗生素样品

抗生素 861-A 是玫瑰皮黄链霉菌淡色变种^[1]产生并经过分离纯化的代谢产物。

链丝菌素 F 为日本大坂大学 Kusumoto 教授所赠。

(二) 抗生素发酵条件

1. 孢子斜面培养: 28—32℃ 培养箱中培养 5—7 天备用。

2. 摇瓶种子: 用挖块法将斜面孢子接入装有种子培养基的摇瓶中。于旋转式摇床 (180—200 r/min) 28℃ 下振荡培养三天。

3. 摇瓶发酵: 按 5% 的接种量将摇瓶种子接入发酵摇瓶中 (500 ml 三角瓶中装 100 ml 发酵培养基), 置旋转式摇床 (180—200 r/min) 上于 28—30℃ 振荡培养 70—72h, 发酵结束。

(三) 分离、分析方法

1. 纸层析: 新华滤纸 No. 1 (0.5 × 30 cm), 点样后上行扩展, 用小麦赤霉菌作试验菌进行生物显影。

2. 薄层层析: 硅胶薄板, 溶剂体系为水: 甲醇: 正丁醇: 50% 氢氧化铵 (8:5:2:0.5), 0.5% 茚三酮乙醇溶液喷雾显迹。

3. 纸电泳: DY-WII 型电泳仪, 新华滤纸

No. 1 (0.5 × 27 cm), 电压 300 V, 电流 4 mA, 点样量 3 μl, 泳动 2h。

4. 柱层析: 将活化处理后的 CM-Sephadex G-25 装 120 × 2cm 玻璃柱, 床体积 200 ml。用 0.1 mol/L 的 NH₄Cl 平衡 12h 以上。复合物样品溶于少量水中, 缓缓加样, 用 0.1—1.0 mol/L 的 NH₄Cl 梯度洗脱, 每 5 ml 收集一次, 经赤霉菌作活性监测, 得 861-A、B、C 三个组份。

5. 高压液相色谱: Hitachi E635 高压液相色谱仪, 阴离子交换柱 (YSG-R₄N⁺Cl⁻) φ 9 × 100 mm。以 0.05 mol/L HAc + 0.05 mol/L NH₄Ac 为淋洗液。流速 1 ml/min, 示差折光检测。

结 果 和 讨 论

(一) 抗生素的提取和纯化

抗生素 861-A、B、C 的提取和纯化过程见图 1。发酵液经离子交换树脂提取后, 采用 CM-Sephadex G-25 及 HPLC 两种方法进行分离精制, 结果均获得三个有效组份 (图 2)。其中 A 的含量约占 80%, 活性最强; B 占 18—19%; C 占 1—2%。A 为抗生素的主要活性组份^[2]。这三个组份的性质十分相似。快原子轰击质谱表明, 它们不同于前人提出的链丝菌素类化合物^[3-5]。核磁和质谱数据表明, 861-A、B、C 分子骨架结构相同, 分子量之间彼此相差 18 个质量单位。

(二) 抗生素 861-A 的理化性质

1. 抗生素 861-A 为碱性的 N-糖甙类抗生素, 呈无定形粉末, 吸湿性强, 极易溶于水, 不溶于一般有机溶剂。

2. 861-A 对 Molish 反应、Tollen 试剂试

本文于 1987 年 11 月 4 日收到。

* 通讯联系人。

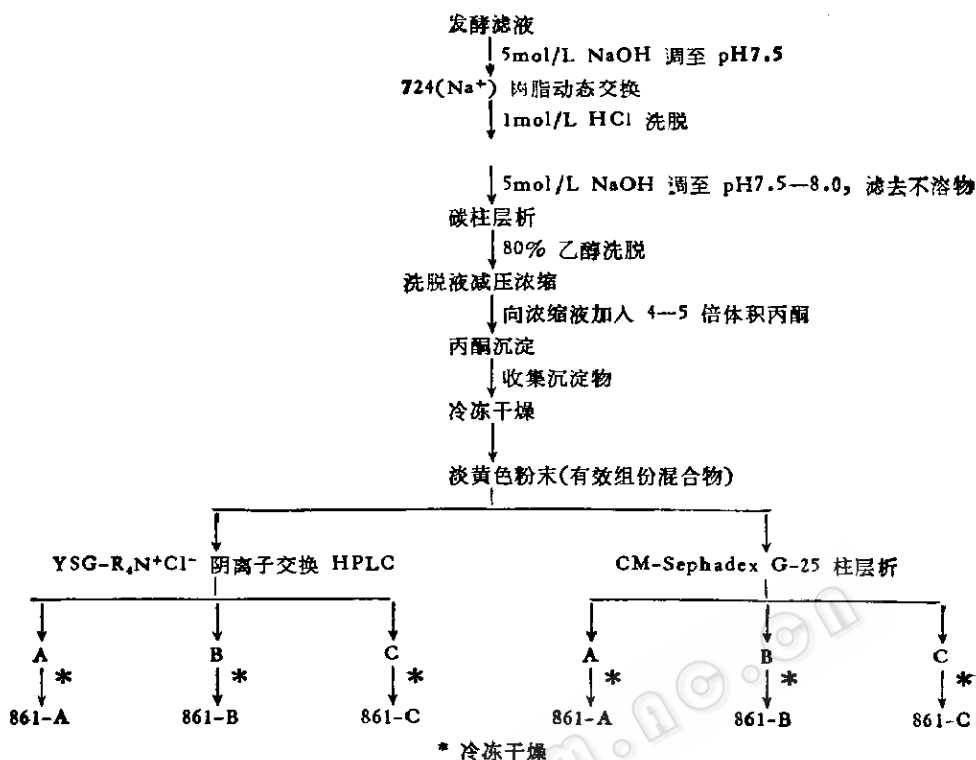


图1 抗生素 861-A、B、C 的分离纯化过程

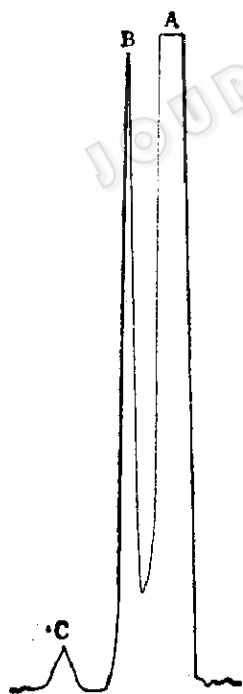


图2 抗生素 861 的 HPLC 图

试验、Fehling 试验、双缩脲试验为阳性。这些性质与链丝菌素 F 相同。

3. 稳定性试验: 用不同 pH 的缓冲溶液配成同一浓度的 861-A 溶液, 分别置于 100℃ 加热 15、30、60、120、180 min 后, 测定生物效价, 发现 15 min 内活性不变; 从 30 min 开始, pH2—7 者仍不失活, pH8—10 者, 活性损失近 20%; 60 min 时 pH2—6 者活性不变, pH7—8 者活性分别损失 30% 和 40%, pH9—10 者, 完全失活; 120—180 min, pH2—6 者活性损失 20—25%, pH7 者, 活性损失 50% 以上, pH8—10 者, 完全失活。

4. 纸层析、电泳及薄层层析: 纸层析: 861-A 在四种溶剂系统的 R_f 值见表 1; 电泳: 861-A

表1 861-A 的纸层析行为

溶 剂 系 统	R _f 值
正丁醇:乙酸:水 (2:1:1)	0.13
水饱和正丁醇(含 2% 六氢吡啶)	0.12
正丁醇饱和水(含 2% PTSA)	0.94
75% 甲醇+25% 水(含 3% NaCl)	0.40

验、Biuret 反应、三氯化铁试验均为阴性; 茚三酮

的纸电泳用 pH4.0 (柠檬酸-磷酸盐缓冲液) 和 pH8.0 (磷酸缓冲液) 的缓冲液生物显影, 结果均向负极移动, 其位移分别为 -16.9 mm (pH4.0)、 -7.0 mm (pH8.0)。861-A 与链丝菌素 F 具有相同的 R_f 值 (0.26)。

5. 861-A 的熔点(盐酸盐): $212-214^\circ\text{C}$ (分解); 比旋度(盐酸盐): $[\alpha]_D^{25} -4.4^\circ -5^\circ$ (H_2O , $L = 0.1 \text{ dm}$, $C = 10\%$); 元素分析的实验数据同理数值偏差较大, 其原因来源于称样过程中的吸湿所致。由于难以获得准确的元素分析数据, 故用快原子轰击质谱测定其分子量为 502, 用高分辨率快原子轰击质谱进一步测出其分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_2$, 这与链丝菌素 F 的分子式完全一致。

参 考 文 献

- [1] 林永年等: 微生物学报, 24 (4): 399—400, 1984。
- [2] 金同铭等: 全国第五届抗生素学术会议论文集(下册), p. 464—468, 1985。
- [3] 抗菌素生物理化特性编写组: 抗菌素生物理化特性, 第二分册, p496—498, 1981。
- [4] ————ibid., p632—635, 1981。
- [5] ————ibid., p807—808, 1981。
- [6] 中国科学院微生物研究所, 放线菌分类组: 链霉菌鉴定手册, p. 100, 1975。
- [7] Van Tamelen, E. E. et al.: J. Am. Chem. Soc., 83: 4295—4296, 1961。
- [8] Johnson, A. W. et al.: J. Chem. Soc., 1642—1655, 1962。
- [9] Khokhlov, A.S. et al.: J. Antibiotics, 25(9): 501—508, 1972。

ISOLATION, PURIFICATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ANTIBIOTIC 861-A USED FOR WHEAT SCAB CONTROL

Jin Tongming Song Jiexiang Li Xiangling

(Institute of Atomic Energy, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Bian Zeliang* Chai Wengang He Yuzhen Zhang Wenxin

Fang Yiwei Wang Guanghui Xie Guanghua Zheng Ping

(Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing)

Antibiotic 861 complex, isolated from *Streptomyces roseosclerotaceus* var. *pallidus* by ion exchange chromatography, exhibits a broad antibacterial spectrum and a unique controlling efficiency to wheat scab, which is the major wheat disease in China. The complex was further purified by carbon column, acetone precipitation and CM-Sephadex G-25 ion exchange chromatography or high-performance liquid chromatography, and 861-A, the major effective component, was then obtained.

Antibiotic 861-A is basic, hygroscopic white powder. It is very soluble in water and not soluble in normal organic solvents. A series of physico-chemical properties indicated that 861-A is a N-glycoside compound and identical with streptothricin F.

Key words

Antibiotic 861-A; N-glucoside; Streptothricin F; *Streptomyces roseosclerotaceus* var. *pallidus*