

农抗5102产生菌原生质体融合育种的研究

Ⅳ. 融合子 FR-008 的验证及其产生新活性物质的分离和鉴别

袁德军* 周 启

(华中农业大学农抗研究室, 武汉)

本文在探索5102-1号抗生素液相色谱(HPLC)分析法的基础上,从出发菌株10-22和融合子FR-008的发酵物中均分离出5102-1号抗生素的主要组分,进一步证实融合子FR-008为吸水链霉菌应城变种种内融合的重组子。实验还从融合子FR-008的发酵物中分离和纯化了出发菌株不能产生的活性物质,通过与浓硫酸和浓盐酸反应呈深兰色,紫外可见光谱在403, 380, 360, 340nm处有吸收峰等特征,表明它是一种七烯大环内酯类抗生素。在建立该抗生素中芳香残基的液相色谱分析法时,证明其中含有对氨基苯乙酰残基。用氨基酸分析仪测定经硫酸甲醇醇解和醇解产物再水解后的抗生素样品,表明它含有与已知七烯大环内酯类抗生素不同的氨基糖残基,其详细结构有待进一步研究确定。

关键词 融合子FR-008; 抗生素FR-008; 七烯大环内酯类抗生素

我们曾经报道了农抗5102产生菌吸水链霉菌应城变种通过种内原生质体融合获得的三株融合子,除了能产生亲本所能产生的全部或部分抗生素外,尚能产生亲本不能产生的对酿酒酵母有抑制作用的活性物质^[1]。

迄今尚未见到关于种内融合子产生新活性物质方面的报道。为此,我们对其中的一个融合子FR-008进行了研究。在进一步证实该菌株确系种内融合的重组子之后,提取和鉴别了它所产生的对酿酒酵母有抑制作用的活性物质,证明它是一种七烯大环内酯类抗生素,该抗生素结构中除了含有对氨基苯乙酰侧链外,它的氨基糖残基与已知七烯大环内酯类抗生素不同,其结构尚待进一步研究确定。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌株及指示菌: 菌株10-22、

WNF-2-1-135、WNF-2-1-90、融合子FR-008及水稻纹枯病菌参照文献[1]。

2. 培养基: (1)5102-1号抗生素半固体发酵培养基(%): 碎米 70; 玉米粉 20; 谷壳 10。配料: 水 = 1:1.2。(2)融合子FR-008培养基(%): 黄豆饼粉 5.0; 淀粉 4.0; NaCl 0.3。pH 7.0(灭菌前)。

3. 试剂: (1)抗生素类: 抗生素FR-008: 由融合子FR-008产生的新活性物质, 本文提取分离。克念菌素: 上海医药工业研究院提供。分子结构中含有对氨基苯乙酰和N-甲基对氨基苯乙酰^[2]。制霉菌素: 市出售片剂, 研细后用2%CaCl₂甲醇溶液溶解, 离心去沉淀, 上清液加水, 收集沉淀, 用丙酮、乙醚洗后, 干燥备用。(2)色谱分析用试剂: 硅胶GF₂₅₄

本文于1990年4月16日收到。

本研究接受联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带疾病研究和训练特别计划资助。

* 现在本校中心实验室工作。

(青岛海洋化工厂); YWG-C₁₈H₃₇ (天津试剂二厂); 重氮化—偶联反应显色剂见文献〔2〕。甲醇水溶液: 甲醇与蒸馏水等体积混合, 用前抽真空 4min 脱气。0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.3)。

(二) 发酵与分析方法

1. 5102-1号抗生素的半固体发酵、提取纯化和活性测定: 参照文献〔3、4〕。

2. 5102-1号抗生素的高效液相色谱 (HPLC) 检测法: 经纯化的5102-1号抗生素样品可直接在液相色谱仪上测定。测定色谱条件为: 日立 635A 型液相色谱仪; 色谱柱为 YWG-C₁₈H₃₇, 4.0×250mm; 流动相为 0.02mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.3); 流速为 1.0ml/min; 检测条件为 UV210nm, 0.16AUFS。

3. 抗生素 FR-008 的液体发酵: 将 FR-008 菌株的孢子接种在 FR-008 培养基中, 28℃ 摇床培养 5—6 天, 过滤或离心得发酵液及菌丝体。

4. 抗生素 FR-008 的紫外可见光谱和红外光谱: 紫外分光光度计扫描条件: 日立 200-10 型紫外可见光光度计, 扫描范围 190-500nm, 狭缝宽度 1.0nm; 扫描速度 120nm/min。抗生素 FR-008 样品用溴化钾压片后, 在贝克曼 FT-1300 型红外光谱仪上测定。

5. 抗生素 FR-008 结构中芳香残基的分析: 样品处理方法及测定条件见文献〔7〕。

6. 抗生素 FR-008 结构中氨基糖的分析: 样品处理参照文献〔9、10〕。氨基糖分析采用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪分析, 分析条件参照标准水解氨基酸分析〔8〕。

结果与讨论

(一) 融合子 FR-008 的验证

1. 出发菌株 10-22 代谢产物中 5102-1 号抗生素的 HPLC: 从出发菌株 10-22 的发酵物中提取和纯化了 5102-1 号抗生素。并以此为材料, 探索该抗生素的 HPLC 方法。在现有条件下, 拟出了能够分离 5102-1 号抗生素主要组分的 HPLC 检测方法 (图 1)。通过分部收集, 测定生物活性, 确定了保留时间为 16.10±0.2 min 的色谱峰是 5102-1 号抗生素的主要组分, 它在倒转法测定时, 能抑制水稻纹枯病菌并在其菌丝顶部产生典型的异常分枝 (图 2)。

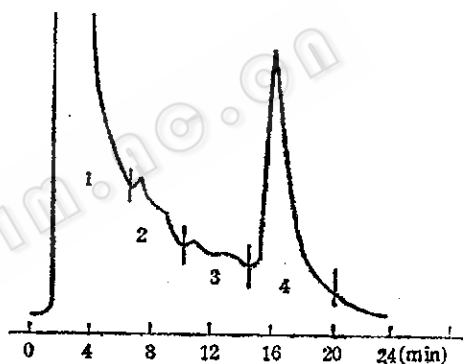


图 1 5102-1号抗生素的高效液相色谱图
Fig.1 The HPLC profile of Antibiotic 5102-1

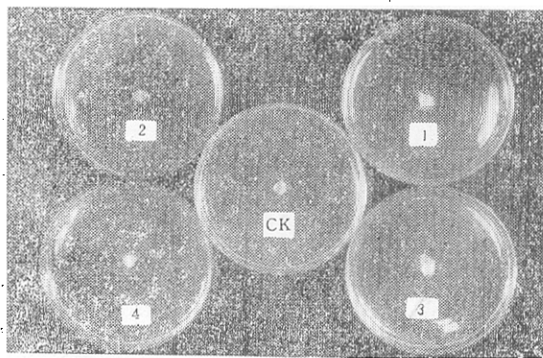


图 2 5102-1号抗生素HPLC分离分部收集生物活性
Fig.2 The antimicrobial activity of Antibiotic 5102-1 from different fractions of HPLC

1, 2, 3, 4 分别为图 1 所示的各部分
1,2,3,4 are different sections of active compound in Fig .1, respectively,

将融合子 FR-008 的发酵产物同上法处理后, 进行 HPLC 检测, 获得的结果与出发菌株 10-22 一样都存在有保留时间为 $16.10 \pm 0.2 \text{ min}$ 的色谱峰(图 3)。即在融合子 FR-008 的代谢产物中和 10-22 菌株一样存在 5102-1 号抗生素, 这与生物测定证实融合子 FR-008 能产生 5102-1 号抗生素的结果是一致的^[1]。从而进一步表明融合子是农抗 5102 产生菌——吸水链霉菌应城变种经种内融合所得到的重组子。

(二) 融合亲本及出发菌株不产生抗生素 FR-008 的证实

融合子 FR-008 及其亲本和出发菌株 WNF-2-1-90、WNF-2-1-135 和 10-22 分别在融合子 FR-008 培养基中培养后, 将其发酵产物的正丁醇提取液在紫外分光光度计上扫描, 其光谱图(图 4)表明, 融合子 FR-008 在 403、380、360 nm 处有强的吸收峰, 而亲本及出发菌株则在上述波段无特征吸收。这说明亲本和出发菌株不产生融合子所能产生的抗生素 FR-008。这与生物测定融合子 FR-008 对酿酒酵母有强的抑制活性而其亲本及出发菌株则没有的结果是一致的^[1]。

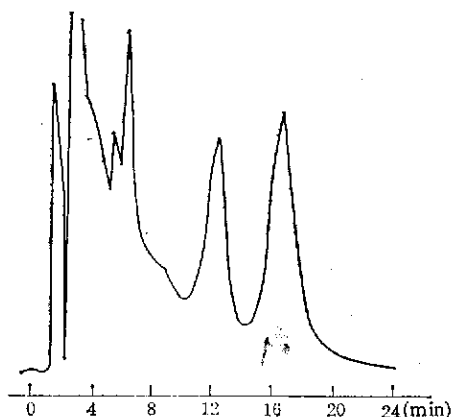


图 3 融合子 FR-008 代谢产物中 5102-1 号抗生素的 HPLC 图

Fig.3 The HPLC profile of Antibiotic 5102-1 from the metabolite of fusant FR-008

(三) 抗生素 FR-008 的分离和提纯

1. 抗生素 FR-008 的分离: 前文报道^[1], 融合子 FR-008 产生亲本所不能产生的抗生素为非水溶性物质, 因此, 我们选用溶剂萃取法来提取该抗生素, 过程如下: 融合子 FR-008 的发酵液过滤或离心。菌丝体用 80% 甲醇抽提, 离心去沉淀, 提取液浓缩至水相, 发酵滤液也浓缩 5—10 倍。合并两者浓缩液, 调 pH 7.0—7.5, 用水饱和正丁醇提取二次, 正丁醇

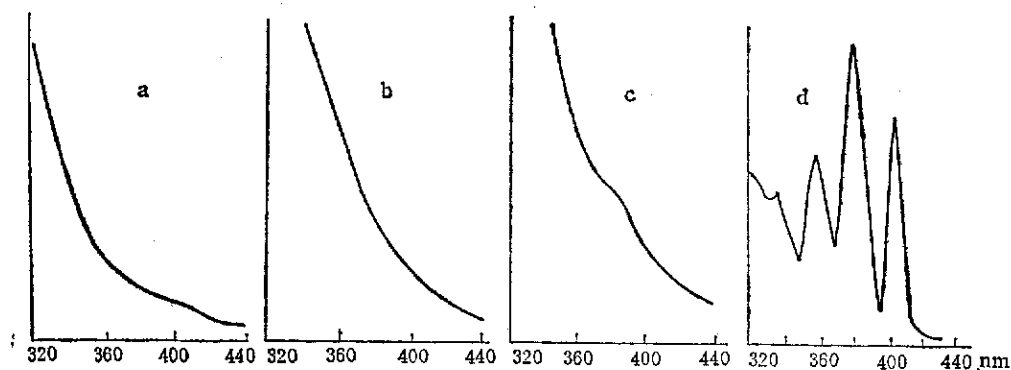


图 4 出发菌株、亲本及融合子发酵物的紫外光谱

Fig.4 UV absorption spectrum from the cultures of starting strain 10-22, parents and fusant FR-008

a. 10-22 菌株 strain 10-22; b. WNF-2-1-135 菌株 strain WNF-2-1-135; c. WNF-2-1-90 菌株 strain WNF-2-1-90; d. 融合子 FR-008 fusant FR-008

相浓缩至小体积, 浓缩物加乙醚沉淀, 沉淀干燥得粗品。

2. 抗生素 FR-008 的纯化: 粗品溶于 4% CaCl_2 甲醇溶液, 去不溶物, 上清液加 4—5 倍体积的水, 离心、收集沉淀, 沉淀用水洗后, 依次用丙酮、乙醚洗涤, 干燥得黄褐色抗生素 FR-008 精制品。或者将粗品溶于二甲亚砜, 离心去不溶物, 二甲亚砜溶液加 10 倍体积水, 去沉淀后, 上清液用水饱和正丁醇提取二次, 提取液减压浓缩至小体积, 加乙醚沉淀, 沉淀物用乙醚洗后得黄褐色抗生素精制品。

(四) 抗生素 FR-008 的鉴别

1. 抗生素 FR-008 的理化性质:

(1) 溶解性: 抗生素 FR-008 易溶于二甲亚砜、吡啶、醋酸、氯化钙甲醇溶液, 可溶于含水甲醇、乙醇等有机溶剂, 不溶于水、乙醚、乙酸乙酯、石油醚等有机溶剂。(2) 稳定性: 抗生素 FR-008 对热、紫外光不稳定, 在中性或弱碱性介质中较稳定。(3) 显色反应: 抗生素 FR-008 与浓硫酸、浓盐酸反应呈深兰色; 能使高锰酸钾很快褪色, 茚三酮反应阳性。

2. 抗生素 FR-008 的紫外可见吸收光谱和红外光谱: 抗生素 FR-008 甲醇溶液在紫外可见分光光度计上进行波长扫描, 其紫外可见吸收光谱在 403、380、360、340nm 处有较强的吸收峰 (图 5)。表明该抗生素具有典型的七烯大环内酯类抗生素的紫外可见吸收光谱特征。

抗生素 FR-008 的红外光谱图见图 6。

3. 抗生素 FR-008 结构中芳香残基的分析: 抗生素 FR-008 样品经碱水解用薄层层析及 HPLC 分析表明, 该抗生素结构中含有对氨基苯乙酮侧链^[7]。

4. 抗生素 FR-008 结构中氨基糖的分析: 在已知七烯大环内酯类抗生素结构中都含氨基糖残基, 已知的氨基糖有氨基

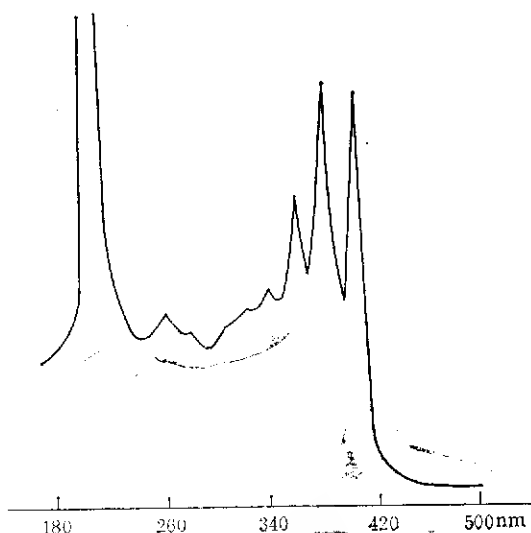


图 5 抗生素 FR-008 的紫外光谱 (甲醇溶液)
Fig. 5 UV absorption spectrum of Antibiotic FR-008 in methanol

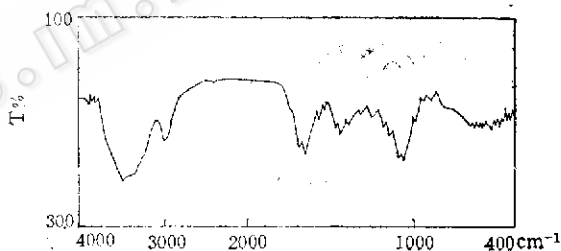


图 6 抗生素 FR-008 的红外光谱 (KBr, 压片)
Fig. 6 Infrared absorption spectrum of Antibiotic FR-008 in KBr

海藻糖和氨基表霉糖^[6]。

抗生素 FR-008 样品经硫酸甲醇溶液醇解后在氨基酸分析仪上分析结果表明, 该抗生素结构中所含氨基糖保留时间为 28.17min, 而克念菌素和制霉菌素样品的保留时间均为 8.8min (图 7)。醇解产物再水解, 抗生素 FR-008 样品出现有两个色谱峰, 其保留时间分别为 9.00min 和 42.37min, 同时, 保留时间 28.17min 的峰消失, 而制霉菌素样品水解后的保留时间则为 28.21min, 酸水解前保留时间为 8.8min 的峰也同时消失 (图 8)。

由此可见, 抗生素 FR-008 醇解产物

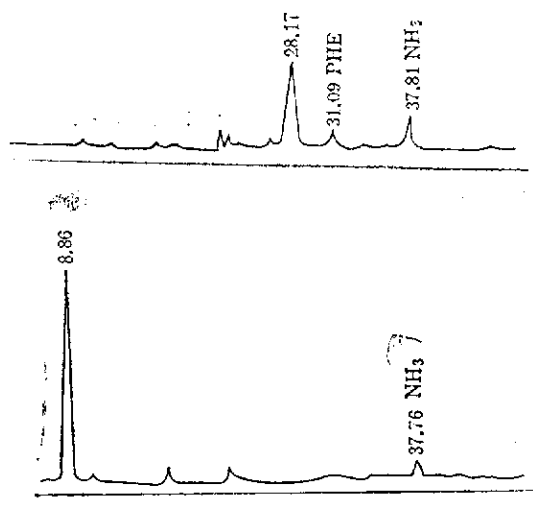


图 7 抗生素FR-008结构中
氨基糖的分析(样品甲醇解)

Fig.7 Analysis of aminosugar of Antibiotic FR-008 by amino acid analyzer(sample hydrolyzed by methanol)

- a. 抗生素 FR-008 Antibiotic FR-008
b. 制霉菌素 Nystatin

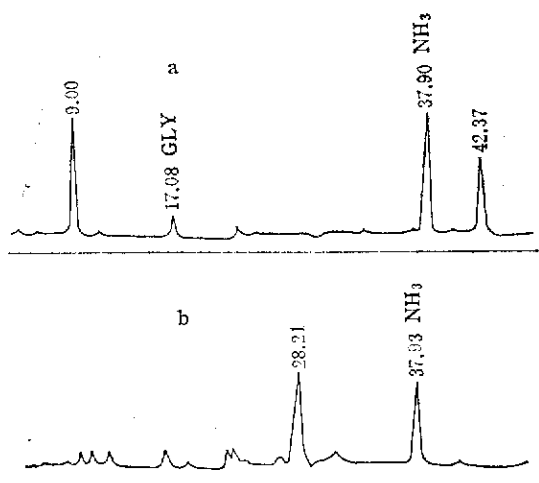


图 8 抗生素FR-008结构中氨基糖的分析
(甲醇解样本水解)

Fig.8 Analysis of aminosugar of Antibiotic FR-008 by amino acid analyzer(hydrolysis of methanol-hydrolyzed sample)

- a. 抗生素 FR-008 Antibiotic FR-008
b. 制霉菌素 Nystatin

在氨基酸分析仪上的保留时间为28.17 min,而氨基海藻糖甲苷则为8.8min,故该抗生素结构中的氨基糖可能不是氨基海藻糖;抗生素FR-008醇解产物水解后的色谱峰保留时间分别为9.00和42.37min,而氨基海藻糖和氨基表霉糖都不可能出现两个峰,所以其结构中的氨基糖也不可能是氨基表霉糖。同时,标准氨基酸分析表明,在保留时间为9.00和42.37min两处均无色谱峰,故样品污染的可能性较小。从而表明抗生素FR-008与已知七烯大环内酯类抗生素的氨基糖是不一样的,至于

该抗生素结构中所含的究竟是什么氨基糖,尚有待进一步研究确定。

吸水链霉菌应城变种通过种内原生质体融合得到的融合子FR-008,既可产生亲本所能产生的两种抗生素——5102-1号和5102-2号,又能产生亲本不能产生的与原来产生的抗生素完全不同的七烯大环内酯类抗生素。对其遗传机制还不了解,可能是由于融合后,基因发生大片段交换而形成的,也可能是启动某些“沉默基因”的结果,这有待今后通过遗传分析和代谢过程的生化分析给予解释。

参 考 文 献

- [1] 梁蓉芳,周 启:生物工程学报,3(2):130—136,1987。
- [2] 邹郁华:抗生素,8(4):259,1983。
- [3] 张声华等:华中农学院学报,1(3):39—43,1981。
- [4] 周 启等:抗生素,6(1):1—8,1981。
- [5] 马剑文等:抗生素,12(2):83—90,1987。
- [6] 王 敏、方金瑞:抗生素,科学出版社,pp.405—408,1988。
- [7] 袁德军等:高等农业院校中心实验室管理及学术交流研讨会学术论文集,p.11,1989。
- [8] HITACHI, Ltd., Instruction Manual for Model 835 High Speed Amino Acid Analyzer, 1984。
- [9] Dutcher, T. E. et al.: J. Org. Chem., 28:995—1004, 1963。

[10] Lee, C. H. et al.: *Tetrahedron Lett.*, 47:5837—5840, 1966.

[11] Hamiton-Miller, J. M. T.: *Bacteriol. Rev.*, 37(20):166—196, 1973.

[12] Berdy, J. et al.: *Advances in Appl. Microbiol.*, 18:319, 1974.

Studies on Fusion Breeding of Protoplasts from Antibiotic-producing Strain 5102

Ⅳ. Verification of Fusant FR-008, Isolation and Characterization of Its New Antimicrobial Substance*

Yuan Dejung Zhou Qi

(Agricultural Antibiotic Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan)

On the basis of the scrutiny of the high performance liquid chromatography of Antibiotic 5102-1, the principal components of Antibiotic 5102-1, which are active in the inhibition of *Pellicularia sasakii* and able to produce typical abnormal branches, have been isolated from the starting strain 10-22 and the fermented product of fusant FR-008. The result further verifies that FR-008, of which the aerial hyphae and cultural characteristics are not exactly the same as those of the starting strain, is a recombinant of intraspecific fusion of *Streptomyces hygroscopicus* var. *yingchengensis*. In the experiment, a new antimicrobial substance had been isolated and purified from the fermented product of fusant FR-008. The substance show a color of dark blue when reacted with concentrated sulphuric acid and concentrated hydrochloric acid and display an absorption peak at 403, 380, 360, 340nm respectively in the UV-VIS absorptions. These characteristics indicate that it is a kind of heptaene macrolide antibiotic. In the process of liquid chromatography for aromatic moiety, this antibiotic is found to contain *p*-amino-acetophenone moiety. Sample of methanol hydrolysis and hydrolysis of methanol-hydrolysed sample of the antibiotic have been determined by means of amino acid analyser, and are found to contain aminosugar moiety different from that in all the other heptaene macrolide antibiotics. The detailed structure of the aminosugar moiety has yet to be identified in further studies.

Key words

Fusant FR-008; Antibiotic FR-008; heptaene macrolide antibiotic

* This investigation received financial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases(TDR),