

发酵液中金褐霉素提取工艺的优化及鉴定

魏杰¹, 金爽¹, 孟宪军², 王秋雨¹

(1. 辽宁大学 生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 选择 8 种大孔吸附树脂, 根据它们对金褐霉素的吸附率和解吸率, 筛选较优的金褐霉素吸附剂; 并且对金褐霉素提取纯化的样品进行红外光谱、核磁共振检测分析, 鉴定分析提取工艺的效果。结果表明: X-5 大孔树脂具有较好的吸附性能和解吸效果, 优化了金褐霉素提取纯化的工艺条件; 红外光谱、核磁共振检测结果鉴定了金褐霉素的结构及其理化性质, 进一步证明该提取工艺达到较为理想的效果。

关键词: 金褐霉素; 大孔吸附树脂; 红外光谱; 核磁共振

中图分类号: TQ 920.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)02—0202—05

Purification and Identification of Aureofuscin from Fermented Broth

WEI Jie¹, JIN Shuang¹, MENG Xian-jun², WANG Qiu-yu¹

(1. Life and Sciences Academy, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. Food Sciences Academy, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract: In this article, the optimal parameters for extracting Aureofuscin were investigated by studying the adsorption and desorption rate of Aureofuscin among eight macroporous resins. The determination of the physical and chemical properties of Aureofuscin was carried by IR, NMR spectrum method. The results showed that X-5 resin possessed higher absorption and desorption rate, the finished Aureofuscin product was detected by IR and NMR spectrum, proved that the isolation and purification technology achieved general ideal effect.

Keywords: aureofuscin, macroporous resin, IR spectrum, NMR spectrum

金褐霉素(Aureofuscin)是链霉菌新种—金褐链霉菌(*Streptomyces aureofuscus.n.sp*)产生的一种四烯大环内酯类抗真菌抗生素,其化学结构与国外文献报道的纳他霉素(Natamycin)结构相似。早期研究表明,金褐霉素对霉菌、多种酵母菌及丝状真菌有

很强的抗菌作用,但不抗细菌,临床上用于治疗真菌性角膜炎,其疗效优于两性霉素 B,同时对一些真菌引起的皮肤病及霉菌性阴道炎等也有很好疗效。金褐霉素早在 1975 年发现时只做了早期化学结构和初步药效试验后,一直未作深入研究和进行产业

收稿日期: 2012-05-02

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究基金项目(L2011008)。

作者简介: 魏杰(1977—),女,辽宁抚顺人,工学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品科学与微生物工程方面的研究。

E-mail: weij41177@yahoo.com.cn

化开发^[1-3]。在 1997 年我国正式批准使用纳他霉素作为安全食品防腐剂后,金褐霉素才被重新重视起来。由于未作高产菌种选育和分离提取工艺的深入研究,发酵单位和提取收率都不高,难以达到产业化开发要求^[4-6]。鉴于金褐霉素与纳他霉素有着相似的化学结构和生物活性,而纳他霉素现在主要依赖进口,因此金褐霉素的研究开发在真菌疾病的防治和食品防腐上显示出了极好的应用前景和市场潜力,这对促进新药研制、食品防腐和发酵工业的发展都具有积极意义。

目前关于金褐霉素提取和检测方面的研究报道很少。本研究是在项目组前期研究工作基础上,采用大孔吸附树脂从发酵液中分离提取金褐霉素,筛选出较优的金褐霉素吸附剂,然后确定金褐霉素提取纯化的最适工艺条件;并对所得提取物样品采用红外光谱、核磁共振进行检测分析,鉴定金褐霉素的结构及其理化性质,同时进一步验证提取工艺的效果。

1 材料与方法

1.1 菌种

金褐链霉菌 (*Streptomyces aureofuscus.n.sp*)由沈阳农业大学食品学院实验室保存菌种。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基(组分 g/dL) 葡萄糖 2,玉米淀粉 1.5,黄豆粉 1,蛋白胨 0.3,玉米浆 1,酵母粉 1, MgSO₄·7H₂O 0.05,NaCl 0.4,CaCO₃ 0.6;pH 自然^[7]。

1.2.2 发酵培养基(组分 g/dL) 葡萄糖 4,玉米淀粉 2,蛋白胨 0.3,黄豆粉 1,MgSO₄·7H₂O 0.05,CaCO₃ 0.6^[8]。

1.3 摇瓶发酵实验

将斜面活化好的菌种用挖块法接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,220 r/min 摇床培养,29 °C 培养 40 h,使菌体处于迅速生长期。然后以体积分数 10% 接种种子液到装液量为 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,29 °C、220 r/min 摇床发酵 72 h。

1.4 金褐霉素提取工艺优化

1.4.1 金褐霉素提取工艺路线

取发酵液→离心(3 000 r/min,20 min)→保留上清液
不溶物用 95% 的乙醇浸提 2 次→合并浸提液→减压浓缩
→充分混合→调 pH 值 8.0→混合液过大孔吸附树脂柱→

80%乙醇洗脱减压浓缩→抽滤→黄色粉末

1.4.2 树脂的筛选 树脂的吸附率和解吸率是衡量树脂的重要指标,不仅吸附量大,还要求解吸率高,以保证成分最大限度地回收。作者选用 8 种大孔吸附树脂(X-5 大孔吸附树脂;HPD100、HPD400、HPD600、HPD200A、AB-8 大孔吸附树脂;D101 大孔吸附树脂、WD-6 大孔阴树脂)进行静态吸附试验和甲醇解吸试验,比较它们的吸附率和解吸率,从中选择出最适合的树脂作为试验采用的处理树脂。

1.4.3 树脂的吸附和解吸 准确称取 1 g 湿树脂于锥形瓶中,加 20 mL 金褐霉素发酵粗提液,封口,避光置于摇床中,在 18 °C、100 r/min 的条件下振荡吸附一段时间,将上述吸附饱和的大孔树脂用水洗至流出液无色,滤纸吸干树脂表面残留的溶液,加入一定量甲醇,在相同的条件下振荡解吸一段时间,收集解吸液,蒸发到体积为 20 mL^[9-11]。分别测吸附前、后溶液中金褐霉素浓度按下列方程计算:

$$Q(\%)=(c_0-c_1)/c_0$$

$$D(\%)=c_2 \times 100\% / (c_0 - c_1)$$

式中, Q 为吸附率(%); c_0 为吸附前质量浓度(mg/mL); c_1 为吸附后质量浓度(mg/mL); c_2 为解吸后质量浓度(mg/mL); D 为解吸率(%)。

1.5 金褐霉素含量的测定

取发酵液(总体积 6.0 L)1 mL,加入 9 mL 甲醇,充分振荡后离心(3 000 r/min,20 min)除去菌丝体的不溶物,取 1 mL 上清液用甲醇进行 10 倍数的稀释后,高速离心(10 000 r/min,10 min),所得上清液即为 HPLC 待测液。

1.5.1 高效液相色谱法(HPLC) 流动相为甲醇:水:冰醋酸(体积比 60:40:1),流速 1.0 mL/min,进行 HPLC 等度洗脱,对金褐霉素进行定性定量检测。

1.5.2 紫外光谱法 通过紫外分光光度计在波长 200~400 nm 内扫描,获得金褐霉素最大吸收波长为 302.5 nm,作为金褐霉素的检测波长。

1.6 金褐霉素提取样品的鉴定

1.6.1 红外光谱分析法 将待测样加入 100 mg 干燥的 KBr,在 4 000~400 cm⁻¹ 范围红外扫描。本实验提取样品由沈阳农业大学生物中心检测。

1.6.2 核磁共振分析法 将 SCP-BI5 mg 分别溶于 0.5 mL D₂O 中,在 600 M 超导核磁共振仪上分别测其 ¹H-NMR、¹³C-NMR 谱及二维谱。本实验提取样品由北华大学生物测试中心检测。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂的筛选

大孔树脂的吸附性能主要取决于吸附剂的表面性质,即树脂的极性和空间结构。作者将金褐霉素提取液进行减压浓缩,在温度 25 °C、转速 100 r/min 的条件下进行吸附和解吸,用 100% 甲醇进行洗脱,吸附和解吸时间均为 24 h,实验选取 8 种大孔吸附树脂进行筛选,结果见表 1。

表 1 不同大孔树脂对金褐霉素的吸附与解吸

Table 1 Adsorptive and desorption rate of different macroporous adsorption resin for Aureofuscin

树脂类型	吸附率/%	解吸率/%
HPD100	68.1	93.5
HPD200	72.5	87.7
HPD400	74.2	82.2
HPD600	74.1	82.4
WD-6	74.2	85.4
D101	70.4	79.5
X-5	78.7	93.7
AB-8	75.1	79.3

从表 1 可以看出,HPD400、X-5、WD-6、AB-8 四种树脂的吸附率较高,均可达到 50% 以上,X-5 达 78.7%;HPD100 树脂和 X-5 树脂的解吸率较好,HPD100 解吸率达 93.5%,X-5 达 93.7%。吸附率和解吸率都是树脂实验考察的重要指标,在生产上不仅要求树脂的吸附率大,还要求解吸率高,以保证有效成分最大限度回收。因此,综合吸附率和解吸率两个指标,选择 X-5 型树脂作为金褐霉素纯化树脂并进行后续实验。

综合本课题组前期实验结果,金褐霉素提取工艺路线优化为:取金褐链霉菌发酵液 3 000 r/min 离心 20 min,保留上清液。将含有菌丝体的不溶物用 95% 的乙醇浸提 2 次,合并浸提液,减压浓缩至原发酵液体积的 1/4,将浓缩液和保留的上清液充分混合,并调 pH 值至 8.0。将混合液过 X-5 大孔吸附树脂柱,80% 乙醇洗脱,将洗脱液减压浓缩、抽滤得到黄色粉末,在甲醇中重结晶得到金褐霉素结晶物。

2.2 金褐霉素的红外光谱分析鉴定

有机化合物的化学键或官能团都有各自的特征振动频率,通过测定化合物的红外吸收光谱,根据吸收带的位置,推断出分子中可能存在的化学键或官能团,再结合其它信息便可确定化合物的结构^[12]。

图 1 为提取样品金褐霉素的红外吸收光谱(KBr),结果显示其在 3 372.77、1 743.65、1 654.55、2 927.33 cm^{-1} 等处均有典型吸收峰。3 500~3 300 cm^{-1} 区域内 3 372.77 cm^{-1} 处的吸收峰是 O—H, NH_2 的伸缩振动,表明存在分子间和分子内氢键;3 100~2 800 cm^{-1} 区域内 2 927.33 cm^{-1} 处的吸收峰是 C—C 的伸缩振动;1 800~1 500 cm^{-1} 区域内 1 743.65 cm^{-1} 处的吸收峰是 C=O 的非对称伸缩振动;1 654.55 cm^{-1} 处的吸收峰是 C=O 对称伸缩振动。综上所述,所得到的目的产物是金褐霉素,它是大环内酯类的,同时也进一步证明本实验提取样品的工艺效果较好。

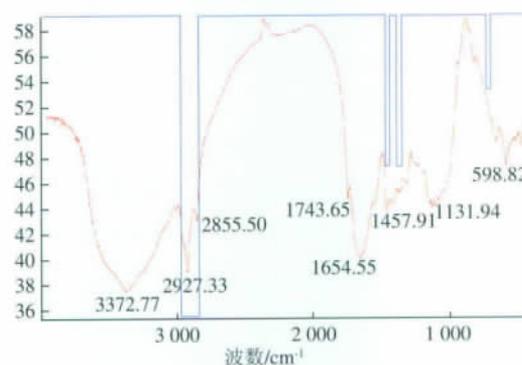


图 1 金褐霉素的红外吸收光谱图

Fig. 1 IR spectrum of Aureofuscin product

2.3 金褐霉素的核磁共振分析鉴定

天然化合物的结构鉴定是一项繁杂的工作,通常需要多种光谱学方法与化学方法相结合,才能确定物质的分子结构。X-衍射测定化合物的晶体结构是解析天然化合物结构最有效而且准确可靠的手段,但并非所有化合物都能够得到完美的单晶样品。因此,核磁共振技术仍然是确定天然化合物结构的最主要手段,体现了独特的优势。近 20 年来核磁共振技术的发展十分迅速,二维核磁共振可用于分析原子之间的相关性,傅立叶变换技术提高了核磁共振的灵敏度、高频超导核磁则提高了分辨率。核磁共振技术的发展对天然化合物的结构鉴定起到了极大的推动作用^[13-15]。

作者采用核磁共振技术手段进一步确定其化学结构。金褐霉素产品的核磁共振碳谱和氢谱分别见图 2~3。谱图中的化学位移与各碳原子、氢原子相对应。 ^{13}C -NMR 图谱解析如下:图中共有 25 个峰,对应于金褐霉素分子结构中的 25 个碳原子。由于相临的两个核之间的自旋偶合或自旋干扰,吸收峰发生裂分现象。因此,谱图中不仅有单峰,还有二重峰、三重峰和四重峰。在 $\delta 48.450$ 附近有一强吸收峰,对应于 C^*-NH_2 ,而氢谱中 $\delta 4.906$ 处出现的强吸收则对应 $\text{N}-\text{H}$ 。通过金褐霉素和纳他霉素的核磁共振谱和氢谱图的对比,可以看出金褐霉素与纳他霉素具有相似的化学结构,进一步证明我们得到的产物是金褐霉素。

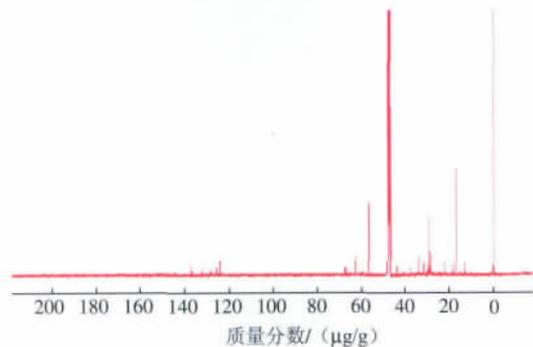


图 2 金褐霉素产品的核磁共振碳谱图(^{13}C -NMR)
Fig. 2 ^{13}C -NMR spectrum of aureofuscin product

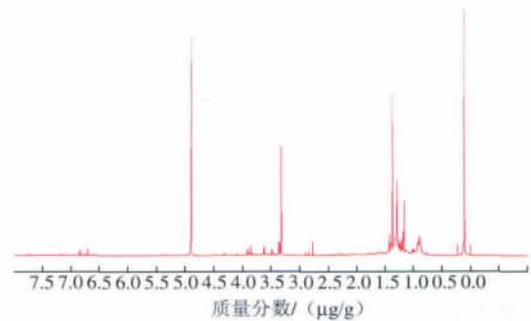


图 3 金褐霉素产品的核磁共振氢谱图(^1H -NMR)
Fig. 3 ^1H -NMR spectrum of aureofuscin product

3 结语

X-5 大孔吸附树脂金褐霉素吸附率和解吸率高,可以作为纯化金褐霉素的树脂。此方法建立了大孔吸附树脂纯化金褐霉素的方法,所得金褐霉素纯度较高,是一种简单实用的金褐霉素纯化方法。采用大孔树脂吸附分离方法制得的金褐霉素成品经高效液相分析含量和纯度较高,比溶剂萃取法制得的含量提高很多,说明大孔吸附树脂对金褐霉素的提取纯化有一定的应用价值。经过分离提取工艺的深入研究,可以解决提取收率不高,难以达到产业化开发的问题。

通过红外光谱、核磁共振碳谱和氢谱图的分析,进一步鉴定我们得到的目的产物是金褐霉素,同时也更深入地了解金褐霉素的结构及其理化性质。

参考文献:

- [1] 上海药物研究所金褐霉素研究小组. 一种新的抗真菌的抗生素——金褐霉素[J]. 微生物学报,1975,15(3):180-187.
Institute of Pharmaceutical Research in Shanghai (IPRS) in China. A original antimycotic antibiotic-aureofuscin [J]. **Chin J Microbiol**, 1975, 15(3):180-187. (in Chinese)
- [2] Basilio J C, Debasilio M Z, Chlericatti, et al. Characterization and contron of thread mould in cheese[J]. **Lett Appl Microbiol**, 2001, 32(6):419-423.
- [3] 王富金, 武济民. 金褐霉素微生物检定法[J]. 抗生素, 1980, 5(5):25-26.
WANG Fu-jin, WU Ji-min. Aure ofuscin biological standardization[J]. **Antibiotic**, 1980, 5(5):25-26. (in Chinese)
- [4] 范德彰, 蔡松年. 金褐霉素治疗真菌性角膜溃疡——实验研究及 248 例临床疗效观察[J]. 中华眼科杂志, 1985, 21(5):257-259.
FAN De-zhang, CAI Song-nian. Aureofuscin cure mycotic corneal ulcer——empirical study and 248 clinical curative effect view [J]. **China Ophthalmology Journal**, 1985, 21(5):257-259. (in Chinese)
- [5] Basilio J C, Debasilio M Z, Chlericatti C, et al. Characterization and contron of thread mould in cheese [J]. **Lett Appl Microbiol**, 2001, 32(6):419-423.
- [6] 魏杰, 孟宪军. 金褐霉素高产菌株的选育及其发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2):240-242.
WEI Jie, MENG Xian-jun, JIANG Qiu-shi. Study on the breeding of high aureofuscin producing strains and their fermentation conditions[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(2):240-242. (in Chinese)
- [7] 魏杰, 孟宪军. 前体对金褐霉素生物合成的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3):429-432.

- WEI Jie, MENG Xian-jun. Effect of precursor on aureofuscin biosynthesis [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3):429-432. (in Chinese)
- [8] 高萍. 大孔树脂在天然药物分离纯化中的应用[J]. **天津药学**, 2006, 18(2):63-66
GAO Ping. Application of macroporous adsorbing resins in the separation and purification of natural medicines [J]. **Tianjin Pharmacy**, 2006, 18(2):63-66. (in Chinese)
- [9] 黎海彬, 李小梅. 大孔吸附树脂及其在天然产物研究中的应用[J]. **广东化工**, 2005(3):22-52.
LI Hai-bin, LI Xiao-mei. Application of macroporous adsorbing resins in natural products research [J]. **Guangdong Chemical Industry**, 2005(3):22-52. (in Chinese)
- [10] 黄少伟, 池汝安, 张越非, 等. 大孔吸附树脂分离纯化土茯苓总黄酮[J]. **中国中医药杂志**, 2008, 33(10):1133-1137.
HUANG Shao-wei, CHI Ruan, ZHANG Yue-fei, et al. Separation and purification of flavonoids from *Smilax glabra* by macroporous adsorption resin[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2008, 33(10):1133-1137. (in Chinese)
- [11] 李晋, 徐怀德, 米林峰. 洋葱多糖的分离纯化及单糖组成研究[J]. **中国食品学报**, 2012, 12(2):202-206
LI Jin, XU Huai-de, MI Lin-feng. Isolation, purification and monosaccharide analysis of polysaccharide from onion [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2012, 12(2):202-206. (in Chinese)
- [12] Partanen R, Marie V, Macnaughtanw, et al. ¹H-NMR study of amylose films plasticised by glycerol and water [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2004, 56: 147-155.
- [13] Ruan R, Zou C, Wadhawan C, et al. Studies of water mobility and shelf life quality of precooked wild rice using pulsed NMR[J]. **Journal of Food Processing and Preservation**, 1996, 21(2):91-104.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第三届海峡两岸植物生理与分子生物学研究与教学研讨会

所属学科: 动植物微生物学, 生物物理学、生物化学及分子生物学, 细胞生物学

开始日期: 2013-04-10

结束日期: 2013-04-14

具体地点: 华南师范大学粤海酒店

主办单位: 中国植物生理与植物分子生物学学会 协办单位: 广东省植物生理学会

承办单位: 中国植物生理与植物分子生物学学会教育科普工作委员会、华南师范大学生命科学学院

联系人: 李娘辉

联系电话: 02085212078; 手机: 13022018767

传真: 02085211372

E-MAIL: linh@scnu.edu.cn;

会议网站: <http://www.cspp.cn/news.asp?id=1228>

会议名称(中文): 2013年生物医学与制药国际会议

会议名称(英文): 2013 International Conference on Biomedicine and Pharmacology

所属学科: 生物技术与生物工程, 医学免疫学, 生物医学工程学, 药学

开始日期: 2013-04-19

结束日期: 2013-04-21

主办单位: 国际管理科学与工程协会, 美国 Academic Journals 出版集团

会议主席: Prof. Roger W. Chan, University of Texas, Southwestern Medical Center, USA

联系人: ICBP 2013

联系电话: 86-371-5668 5669 +86 13623827670

E-MAIL: icbpconf@163.com

会议网站: http://www.easyeditor.org/icbp/?page_id=67