

密级: _____



中国科学院大学
University of Chinese Academy of Sciences

硕士学位论文

链霉菌 XBP-03 次级活性代谢产物的提取工艺研究

作者姓名: _____ 宋玉龙 _____

指导教师: _____ 周金燕 研究员 _____

_____ 谭 红 研究员 _____

_____ 中国科学院成都生物研究所 _____

学位类别: _____ 工程硕士 _____

学科专业: _____ 生物工程 _____

培养单位: _____ 中国科学院成都生物研究所 _____

二〇一四年五月

**Study on extraction process of bioactive secondary
metabolites produced by Streptomyces XBP-03**

By

Song Yu Long

A Dissertation

Submitted to

Graduate University of Chinese Academy of Sciences

In partial fulfillment of the requirement

For the master's degree of bioengineering

**Chengdu Institute of Biology, University of Chinese academy
of sciences**

May, 2014

声 明

本人声明，所呈交的论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。文中除引用与特别标注的部分外，本论文不包含他人已经发表、撰写或公布过的研究成果，也不包含为获得中国科学院成都生物研究所或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本研究做出贡献的个人或集体均已在本论文中做出了明确的说明并表示了谢意。

本学位论文成果是本人在中国科学院成都生物研究所学习期间在导师周金燕和谭红研究员指导下取得，论文成果归中国科学院成都生物研究所所有，本人完全了解中国科学院成都生物研究所关于保留、使用学位论文的规定，特此声明。

作者签名：

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
前 言.....	1
第一章 硅胶层析提取发酵液中活性成分的方法研究.....	5
1 实验材料.....	5
1.1 实验菌种.....	5
1.1.1 生产菌.....	5
1.1.2 供试菌.....	5
1.2 培养基(g/L).....	5
1.2.1 斜面培养基.....	5
1.2.2 平板生测培养基.....	5
1.3 主要试剂和仪器.....	5
1.3.1 主要试剂和材料.....	5
1.3.2 主要仪器和设备.....	6
2 实验方法.....	6
2.1 样品的生物活性测定.....	6
2.1.1 检测原理:.....	6
2.1.2 春雷霉素为标准的一剂量法.....	6
2.2 活性物质的分离分析和检测方法.....	7
2.2.1 发酵液中活性物质的薄层色谱体系的建立.....	7
2.2.2 高效液相色谱分离分析方法.....	7
2.3 发酵液的制备.....	8
2.4 活性物质的分离提取.....	8
2.4.1 粗品的制备.....	8
2.4.2 正相硅胶层析.....	8
2.4.3 二次正相硅胶层析.....	8
2.4.4 TLC 制备.....	9
2.4.5 二次 TLC 制备.....	9

2.4.6 高效液相色谱制备.....	9
3 实验结果.....	11
3.1 样品的生物活性测定.....	11
3.1.1 一剂量法春雷霉素标准曲线.....	11
3.1.2 样品生物活性测定.....	12
3.2 粗品的 TLC 检测.....	12
3.3 活性物质的分离提取结果.....	13
3.3.1 粗品的制备.....	13
3.3.2 正相硅胶柱层析.....	13
3.3.3 二次正相硅胶柱层析.....	13
3.3.4 TLC 制备.....	16
3.3.5 二次 TLC 制备.....	17
3.4 产品的质量检验.....	18
3.4.1 高效液相色谱制备和检验.....	18
3.4.2 高分辨质谱检验.....	20
4 讨论.....	21
4.1 发酵液中活性物质的生物活性测定.....	21
4.2 发酵液中活性化合物的分离提取.....	22
4.2.1 发酵液中活性物质粗品的制备.....	22
4.2.2 活性组分的分离纯化.....	22
4.3 存在的不足.....	23
小结.....	23
第二章 阳离子交换树脂对活性成分的提取工艺研究.....	25
1. 实验材料.....	25
1.1 实验菌种和培养基.....	25
1.2 实验试剂.....	25
1.3 实验仪器.....	25
2. 实验方法.....	25
2.1 发酵液中活性成分含量的测定.....	25
2.2 树脂的静态实验.....	25

2.2.1 树脂的预处理.....	25
2.2.2 树脂种类的筛选.....	26
2.2.3 发酵液 pH 值对树脂吸附效果的影响.....	27
2.2.4 解吸液的筛选.....	27
2.2.5 静态吸附动力学研究.....	27
2.2.6 吸附等温线的测定 ^[7]	27
2.3 动态实验.....	27
3 实验结果.....	28
3.1 静态实验结果.....	28
3.1.1 离子交换树脂的筛选.....	28
3.1.2 发酵液 pH 值对吸附效果的影响.....	28
3.1.3 解吸液的选择.....	29
3.1.4 静态吸附动力学研究.....	30
3.2 动态实验.....	35
3.2.1 动态吸附实验.....	35
3.2.2 动态解吸实验.....	35
3.2.3 重复验证实验.....	36
4 讨论.....	37
5 小结.....	37
第三章 膜对发酵液中活性成分的提取工艺研究.....	39
1 实验材料.....	39
1.1 实验菌种和材料.....	39
1.2 主要试剂和仪器.....	39
1.2.1 主要试剂.....	39
1.2.2 主要仪器和设备.....	39
2 实验方法.....	39
2.1 膜渗透通量的计算.....	39
2.2 料液固形物含量和澄清度的测定.....	40
2.3 微滤过程研究.....	40
2.3.1 微滤操作压力对渗透通量的影响.....	40

2.3.2 微滤操作温度对渗透通量的影响.....	40
2.4 超滤过程研究.....	40
2.4.1 超滤操作压力对渗透通量的影响.....	40
2.4.2 超滤操作温度对渗透通量的影响.....	40
2.5 纳滤操作过程.....	41
2.5.1 纳滤操作压力对渗透通量的影响.....	41
2.5.2 纳滤操作温度对渗透通量的影响.....	41
2.5.3 pH 对纳滤膜分离性能的影响.....	41
2.5.4 浓缩倍数对纳滤膜分离性能的影响.....	41
2.6 微滤-超滤-纳滤全通实验.....	41
3 实验结果.....	42
3.1 微滤实验.....	42
3.1.1 不同操作压力下的微滤渗透通量.....	42
3.1.2 不同操作温度下的微滤渗透通量.....	43
3.1.3 微滤后透过液中固形物含量和澄清度的测定.....	43
3.2 超滤实验.....	43
3.2.1 不同操作压力下的超滤渗透通量.....	43
3.2.2 不同操作温度下的超滤渗透通量.....	44
3.3 纳滤实验.....	45
3.3.1 不同操作压力下的纳滤渗透通量.....	45
3.3.2 不同操作温度下的纳滤渗透通量.....	46
3.3.3 pH 对纳滤膜分离性能的影响.....	46
3.3.4 浓缩倍数对纳滤膜分离性能的影响.....	47
3.4 微滤-超滤-纳滤贯通实验.....	47
4 讨论.....	48
5 小结.....	48
参考文献.....	49
核苷类抗生素有效成分的研究进展.....	51
引言.....	51
1 研究抗生素有效成分的必要性以及表示方法.....	52

1.1 研究抗生素有效成分的必要性.....	52
1.2 有效成分表示方法.....	52
1.2.1 重量单位.....	52
1.2.2 类似重量单位.....	52
1.2.3 重量折算单位.....	53
1.2.4 特定单位.....	53
2 核苷类农用抗生素有效成分的分离和鉴定方法.....	53
2.1 核苷类农用抗生素有效成分的分离技术.....	53
2.1.1 薄层层析法.....	53
2.1.2 柱色谱法.....	54
2.2 核苷类农用抗生素有效成分的分离流程.....	58
2.2.1 云南霉素.....	58
2.2.2 嘧肽霉素.....	59
2.2.3 抑霉菌素.....	60
2.2.4 谷氏菌素.....	62
2.2.5 米多霉素.....	63
2.3 核苷类农用抗生素有效成分的分析鉴定方法.....	65
2.3.1 紫外光谱在波谱综合解析中的作用.....	65
2.3.2 红外光谱在波谱综合解析中的作用.....	66
2.3.3 质谱在波谱综合解析中的作用.....	66
2.3.4 核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)	69
3 筛选新型核苷类抗生素有效成分的方法.....	69
3.1 从天然产物中开发新型核苷类抗生素.....	70
3.1.1 扩大微生物的来源.....	70
3.1.2 微生物基因组学的方法寻找新抗生素.....	71
3.1.3 定向发酵.....	75
3.2 核苷类抗生素的结构改造.....	75
3.2.1 糖基改造.....	76
3.2.2 碱基改造.....	77
3.2.3 糖基和碱基同时改造的核苷类.....	77

4. 核苷类抗生素的应用.....	77
4.1 作为农用抗生素在农业中的应用	77
4.2 作为抗病毒药物在医学上的应用	78
5. 展望	78
参考文献.....	81
发表论文情况.....	85
致 谢.....	86

图表目录

第一章

图 1-1 活性成分的分离流程.....	10
图 1-2 春雷霉素浓度对数的标准曲线.....	12
图 1-3 二次正相柱层析的 HPLC 分析.....	14
图 1-4 二次正相柱层析的 TLC 分析.....	15
图 1-5 a 和 b 样品中的氨基酸和还原糖分析.....	16
图 1-6 TLC 制备样的 HPLC 图谱.....	17
图 1-7 样品 d 的 HPLC 和 TLC 图谱.....	18
图 1-8 样品 c 和 e 的 HPLC 图谱.....	19
图 1-9 液相制备样的抑菌结果.....	19
图 1-10 活性成分的 ESI-MS.....	21
表 1-1 春雷霉素的抑菌结果.....	11
表 1-2 展层剂的筛选结果.....	13
表 1-3 二次正相柱层析的生物活性测定结果.....	15
表 1-4 化合物的高分辨率质谱分析.....	20
表 1-5 化合物的分子式和分子量.....	20

第二章

图 2-1 阳离子交换树脂的静态吸附率.....	28
图 2-2 pH 对树脂吸附率的影响.....	29
图 2-3 不同解吸剂解吸能力的比较.....	30
图 2-4 树脂的静态吸附动力学曲线.....	30
图 2-5 树脂吸附活性成分的准二级速率方程.....	31
图 2-6 树脂吸附活性成分的 Kannan 方程.....	32
图 2-7 7320 树脂对活性成分的吸附等温线.....	33

图 2-8 不同温度下的 Langmuir 方程.....	33
图 2-9 不同上样流速下的吸附穿透曲线.....	35
图 2-10 不同解吸流速下的动态解吸曲线.....	36
图 2-11 活性样品的 HPLC 检测图谱.....	37
表 2-1 阳离子交换树脂的性能参数.....	27
表 2-2 不同温度下的 Langmuir 方程参数.....	34
表 2-3 不同温度下的热力学参数.....	34
表 2-4 重复验证实验.....	36

第三章

图 3-1 不同操作压力下的渗透通量.....	42
图 3-2 不同温度下的膜渗透通量.....	43
图 3-3 不同操作压力下的超滤膜渗透通量.....	44
图 3-4 不同温度下的超滤膜渗透通量.....	44
图 3-5 不同操作压力下的纳滤膜渗透通量.....	45
图 3-6 不同温度下的纳滤膜渗透通量.....	46
图 3-7 料液 pH 对膜分离性能的影响.....	46
图 3-8 浓缩倍数对膜分离性能的影响.....	47

综述

图 4-1 云南霉素结构式.....	58
图 4-2 云南霉素分离纯化流程图.....	59
图 4-3 嘧肽霉素有效成分分离纯化流程图.....	60
图 4-4 抑霉菌素分子结构式.....	61
图 4-5 抑霉菌素分离纯化流程图.....	61

图 4-6 谷氏菌素分子结构式.....	62
图 4-7 谷氏菌素分离纯化流程图.....	63
图 4-8 米多霉素分子结构式.....	64
图 4-9 米多霉素分离纯化流程图.....	64
图 4-10 FAB 离子源原理示意图.....	67
图 4-11 电喷雾离子源原理示意图.....	68
图 4-12 APCI 工作原理示意图.....	68
图 4-13 青霉素作用原理示意图.....	73
图 4-14 基于竞争的抗生素筛选方法.....	75
表 4-1 按抗病毒药物的结构分类.....	76

链霉菌 XBP-03 次级活性代谢产物的提取工艺研究

宋玉龙（生物工程）

指导教师：周金燕 研究员

谭 红 研究员

（中科院成都生物研究所 成都 610041）

摘要

实验室前期从我国西部地区分离得到一株链霉菌，代号 XBP-03，其发酵产生的次级代谢产物对多种病原菌具有抗菌活性。本论文进行了链霉菌 XBP-03 的次级代谢产物中活性成分的提取工艺研究，主要研究了采用阳离子交换树脂和微滤膜-超滤膜-纳滤膜两种工艺技术提取发酵液中的活性成分。论文由三部分组成：

第一部分：硅胶层析提取发酵液中活性成分的方法研究。在提取过程中，以蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* Ym1004)为生物活性检测供试菌株进行生物活性跟踪，全程跟踪指导活性化合物的分离提取。从发酵液出发，经过 D101 树脂脱色、有机溶剂沉淀、正相硅胶层析、TLC 制备等步骤，建立了高纯度产品的制备工艺，纯度为 90%。并对得到的产品进行了质量检验，证实是我们需要的目标物。

第二部分：阳离子交换树脂对活性成分的提取工艺研究。本研究采用阳离子交换树脂提取发酵液中的活性成分。实验结果表明，在选取的 8 种市售阳离子交换树脂中，7320 树脂吸附效果最好，在 pH=7 时，树脂的交换容量最大；3%氨水可高效地将活性成分从 7320 树脂上解吸下来，解吸率为 95.00%。静态吸附动力学符合 Lagergren 准二级速率方程，颗粒内扩散为影响吸附速率的主要限速步骤，吸附速率常数为 $k=0.00738 \text{ g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。吸附等温线符合 Langmuir 方程，由热力学平衡方程计算得： $\Delta H=60.93 \text{ kJ/mol}$ ； $\Delta S > 0$ ； $\Delta G < 0$ ，表明该交换过程是自发的、吸热、熵增加的过程。在动态实验中，发酵液以 1BV/h 上样、3%氨水以 2BV/h 进行解吸，解吸液经减压浓缩得到褐色膏状物质，产物活性成分收率为 79.96%、纯度为 63%。

第三部分：膜对发酵液中活性成分的提取工艺研究。本研究采用微滤膜、超滤膜、纳滤膜提取活性成分。实验结果表明：操作压力和温度对微滤、超滤和纳滤过程有较大影响。实验所选微滤膜有较好的除杂和除浊效果；超滤膜较好的除去了蛋白质等大分子杂质，并且起到了纳滤预处理的作用；纳滤膜起到了很好的浓缩作用。从设备安全、能耗和效率的角度出发，确定了微滤操作压力为 0.2Mpa，温度：30℃；超滤操作压力和温度分别为 0.15Mpa、30℃；纳滤操作压力和温度分别为 0.15Mpa、30℃，料液 pH 在中性条件时，浓缩效果最好。最后，按照上述操作条件，将 2L 发酵液进行微滤-超滤-纳滤全通实验，得到浓缩液 343mL，活性成分收率为 83.12%。

关键词：链霉菌，抗菌活性，分离提取，阳离子交换树脂，膜

Study on extraction process of bioactive secondary metabolites produced by *Streptomyces* XBP-03

Song Yu Long (Bioengineering)

Directed by Prof. Zhou Jin Yan

Prof. Tan Hong

(Chengdu Institute of Biology, University of Chinese Academy of sciences, Chengdu 610041)

Abstract

Streptomyces XBP-03, whose secondary metabolites inhibit a variety of pathogens, was isolated from the soil samples in the Western China. This paper focused on the extraction process of bioactive secondary metabolites produced by *Streptomyces* XBP-03. What's more, the study on extraction of bioactive components from the fermentation broth with ion exchange resins and membrane were also carried out. This dissertation is made up of three chapters:

Chapter one is about the study to extract the bioactive components from the fermentation broth by Silica gel chromatography. Bioassays, taking *Bacillus cereus* Ym1004 as the tested strain, was used to identify the bioactive compounds. A pure compound was obtained through the steps of resin decolorization, organic solvent precipitation, silica gel chromatography and TLC preparation. The content of bioactive component was 90%, and the component was identified by HPLC, bioactivity and HR-ESI-MS analysis.

Chapter two is about the study to extract bioactive compounds from fermentation broth with ion exchange resins. The adsorption properties of resins for bioactive compounds were investigated. The 7320 resin has the highest adsorption efficiency

among eight kinds of ion exchange resins. The adsorption efficiency of 7320 resin for bioactive compounds was 93.60% under pH 7.0 and the desorption efficiency eluted by 3% ammonia could reach 95.00%. Kinetic analysis showed that the pseudo second order model describes the experimental data satisfactorily with the adsorption rate constant of $0.00738 \text{ g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$. The adsorption of bioactive compounds on the resin obeyed Langmuir isotherm, the thermodynamic equilibrium functions $\Delta G < 0$, $\Delta H = 60.93 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S > 0$ were obtained, so the adsorption was a spontaneous, endothermic and entropy increasing process. The dynamic experimental results indicated that the optimum uploading and desorbing speed were 1BV/h and 2BV/h, respectively. The elution was concentrated to obtain the brown paste. Through this process, the recovery rate of bioactive compounds was 79.96%, and the content of the component was 63%.

Chapter three is about the study to extract the bioactive compounds from fermentation broth with membranes. Microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration membrane were used to extract bioactive compounds. Results indicated that microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration processes were affected by the relative operation pressure and temperature greatly. The microfiltration had outstanding purification and clarification effects for the fermentation broth. Consequently, the ultrafiltration had a significant effect to wipe off some impurities such as proteins. And then the nanofiltration was performed to concentrate the permeabilizing solution as well as the further purification. Considering the equipment safety, energy consumption and efficiency, the microfiltration pressure and temperature were 0.2Mpa and 30°C respectively; the ultrafiltration pressure and temperature were 0.15Mpa and 30°C respectively; nanofiltration pressure and temperature were 0.15Mpa and 30°C respectively, and the concentration effect is best when the pH value was neutral. During the combination membrane separation process of MF-UF-NF, 2L fermentation broth were concentrated to 343mL, the recovery rate of bioactive compounds were 83.12%.

Keywords: *Streptomyces*, antimicrobial activity, extraction, ion exchange resin, membrane

前 言

农药的诞生与发展一直与人类的生存活动息息相关,并且随着人类的进步和社会的发展、人们的生活水平在不断提高的同时,人类对赖以生存的环境质量的要求越来越高,对农药本身的毒性和对环境的影响日益关注,对农药的安全性要求不断提高,对农药登记注册的标准也越来越严格。所以,在这些条件下,高效、低毒、低残留的生物农药应运而生并得到大力研究和发^[1]展。

农药是专门针对农业病原微生物和耐药菌研制的,农药课题是当今社会与环境和人类健康密切相关的重要课题。农药具体包括化学农药和生物农药。

化学农药是指传统意义上的农药,其分为两类:一类是无机农药,其快速发展始于上个世纪初,是当时防治病虫害农药的主力军;第二类是有机农药,上个世纪四十年代开始,有机农药开始广泛的用到控制病虫害方面上来,大大增强了同病害斗争的能力,挽回了大量的损失,是近代农业得到快速发展的动力之一。

生物农药是指利用生物活体或其代谢产物针对农业有害生物进行杀灭或抑制的生物制剂,根据其来源又可划分为微生物源农药、植物源农药和动物源农药,微生物源农药是生物农药中最重要的组成部分,包括活体微生物农药(如真菌、细菌、昆虫病毒、转基因生物、天敌等)和农用抗生素^[2]。其中,农用抗生素是生物农药中最主要的一类。

与化学农药相比,生物农药有效成分的来源以及生产方法与化学农药大不相同,其活性成分的作用机理和作用方式也有本质的区别,而且具有化学农药所不具备的环境友好以及可持续发展的特点。生物农药防治的主要方式是利用本身或其次级代谢产物所具有的特殊功能来相应的对抗害虫、病菌、杂草等。其有效成分的来源决定了其在生态系统中存在的形式,来源于自然系统所以不会与环境相背离,并且容易被植物、微生物、甚至是光照分解。所以对环境污染小或无污染,符合可持续农业发展的时代潮流。另外,生物农药的原材料也比较容易获取,一

般多为农副产品下脚料，如农产品秸秆、谷糠、树叶等。这些原材料价格都比较低廉。

目前，在农用抗生素领域里，日本的发展最快，居于世界领先地位，先后开发出了春日霉素、灭瘟素、多氧霉素、有效霉素等^[3]。另外，日本还筛选出杀虫素和除草素。世界上许多国家如美、日、意、俄、丹麦、印度等已把农用抗生素的研究列入国家发展的重点规划中。

近年来，我国也把农用抗生素列入国家重点发展计划中，且取得了很大的成绩，原药生产和复配生产的企业也达到一定的规模^[4]。在我国，经过半个多世纪的发展，农用抗生素的种类不断扩增，主要有 60 年代的灭瘟素和放线菌酮，70 年代的井冈霉素、庆大霉素、多抗霉素和杀蚜霉素，80 年代的公主岭霉素、农抗 120、浏阳霉素和韶关霉素，以及 90 年代的中生菌素、武夷霉素、宁南霉素等^[5]。

农用抗生素作为一类具有良好发展前景的生物农药，从国家“七五”计划以来一直作为植病生防和微生物农药的内容被列入攻关项目，特别是“九五”和“十五”期间更加受到重视。“九五”期间，在“农业生物技术”攻关项目中，植用抗生素和畜用抗生素 2 个专题被列入了微生物农药课题；在 863 高新技术产业化专项中，专列了赤霉素生产菌种改良和产业化的课题。“十五”期间，在“发酵工程关键技术研究攻关项目”中专列了以农用抗生素发酵为主的“微生物发酵新技术新工艺课题”；在 863 “农业生物药物”专题下专列了“新型多功能生物农药创制关键技术研究产品开发”课题；在“农产品安全生产与检测技术”专题下专列了“新型生物农药研制与产业化”课题。在这些课题中农用抗生素的研究内容占到了 1/4~1/3 的比例。在 973 “生防微生物基因挖掘项目”中也专列了井冈霉素、阿维菌素和多氧霉素等农用抗生素研究课题，与苏云金杆菌、病毒和激活蛋白等微生物农药课题并列^[4]。最近开发的申嗪霉素对蔓枯病、枯萎病和根腐病等平均防治效果达 80%。目前申嗪霉素已经获得农业部的正式登记，农业部全国农技推广中心已将申嗪霉素列入“十二五”期间的推广产品。由此可见，我国对农用抗生素的研究方兴未艾。

在筛选具有生物活性的微生物源次生代谢产物作为抗生素的过程中，在其理化性质已知并且结构已被鉴定的情况下，其活性成分有效、廉价的提取工艺在产

业化过程中具有非常重要的意义。首先，只有有效地提取方法才能避免在提取过程中活性成分的损失；其次，廉价的提取工艺减少了提取成本，更适合规模化生产。

本实验室从我国西部分离得到一株链霉菌 (*Streptomyces*)，前期研究表明，其发酵产生的活性次级代谢产物对多种病原菌具有抗菌活性。通过对原始菌株进行多轮诱变选育，最终获得了其高产突变株，并进行了高产菌株的发酵生产工艺研究，使其活性次级代谢产物的生产水平大幅提高，已具备了工业开发价值。本文主要针对发酵液中活性成分的工业化转化，结合其理化性质的特点，有针对性的探索了适合抗菌活性成分的分离提取工艺路线。

论文针对发酵液中活性成分的提取进行了 3 个方面的研究：首先，研究用硅胶层析法提取发酵液中活性成分，可以得到纯度比较高的产品，用于抗植物病原菌的研究，以及作为分析检测的对照样品等；第二，研究用阳离子交换树脂提取发酵液中活性成分，可以得到纯度比较好的产品，用于制备原药；第三，研究用膜技术提取发酵液中活性成分，可以得到浓度较高的产品，用于制备农药母药或制剂。

第一章 硅胶层析提取发酵液中活性成分的方法研究

1 实验材料

1.1 实验菌种

1.1.1 生产菌

链霉菌 (*Streptomyces*) XBP-03

1.1.2 供试菌

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* Ym1004), 为本实验室保藏菌种。

1.2 培养基(g/L)

1.2.1 斜面培养基

蛋白胨	5.0	氯化钠	5.0
牛肉膏	3.0	琼脂	15.0
蒸馏水定容至 1000mL		pH	7.0

1.2.2 平板生测培养基

蛋白胨	1.5	磷酸氢二钠	0.05
牛肉膏	1.5	琼脂	18.0
蒸馏水定容至 1000mL		pH	7.8-8.0

以上培养基需经 0.1MPa , 121℃ 灭菌 30min。

1.3 主要试剂和仪器

1.3.1 主要试剂和材料

超纯水 (18.2 兆欧)

甲醇、氯仿、冰乙酸、正丁醇、乙醇、氨水 (均为国产分析纯)、进口色谱纯甲醇、进口色谱纯乙腈、春雷霉素、GF254 正相硅胶载体 (青岛海洋化工)、

1mm 和 0.5mm 厚 GF254 制备型正相硅胶载体（安徽良臣硅胶化工厂）

1.3.2 主要仪器和设备

876-2 型真空干燥箱

玻璃色谱柱

YJ-875 型 医用净化工作台

GL-20G- II 型 高速冷冻离心机

YXQ.G01.280 型手提式高压蒸汽消毒器

HC-C18 色谱柱(4.6mm×250mm, 安捷伦公司)

Bons-RP 色谱柱(4.6mm×250mm, 安捷伦公司)

BÜCHI R-114 型旋转蒸发仪, B-480 型水浴锅

MILLI-Q Labo 超纯水制备器(MILLI PORE 公司)

高压液相色谱系统: SHIMADZU(岛津)液相色谱仪系统; LC-10AT 型输液泵, SPD-10A 紫外检测器, 7725i 进样阀; N3000 色谱工作站(浙江大学智能信息研究所)

Bruker Daltonics 公司的 BioTOF Q 型质谱仪

Finnigan LCQ Deca 液相色谱-电喷雾质谱联用系统

2 实验方法

2.1 样品的生物活性测定

选用同样具有抗蜡样芽孢杆菌活性的春雷霉素作为参照物, 得到样品生物活性的效价单位为春雷霉素当量单位, 以重量单位 μg 计。

2.1.1 检测原理:

用管碟法^[6]测定样品对蜡样芽孢杆菌的抗菌作用。

通过建立抑菌圈直径 (D) 与样品浓度 (C) 之间的关联, 达到对样品活性的定量。利用样品在培养基中的扩散, 使指示菌形成抑菌圈。在一定浓度范围内, 样品浓度 (C) 的对数与抑菌圈直径 (D) 呈线性关系, 即 $D=\alpha\text{Log}C+\beta$ 。

2.1.2 春雷霉素为标准的一剂量法

(1) 配制 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、670 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、

2250 $\mu\text{g/mL}$ 、3375 $\mu\text{g/mL}$ 等 7 个浓度的春雷霉素溶液系列。

(2) 取接种有蜡样芽孢杆菌的测定平板 18 套，每 3 套分成一组，共分 6 组。每个测定平板中均匀放置 4 个牛津杯，每间隔 2 个牛津杯内加入 200 μL 1000 $\mu\text{g/mL}$ 中间浓度的春雷霉素溶液 (C_0)，其余 2 个牛津杯内加入 200 μL 同一浓度的春雷霉素溶液，每一浓度作三个重复。置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中，培养 17 小时后测定抑菌圈直径。

(3) 将上述 18 个平板中 36 个 1000 $\mu\text{g/mL}$ 中间浓度春雷霉素溶液的抑菌圈直径的总平均值来校正各组中 1000 $\mu\text{g/mL}$ 中间浓度春雷霉素溶液的抑菌圈直径的平均值，求得各组的校正数。

(4) 以校正数校正其它各浓度春雷霉素溶液的抑菌圈直径，获得校正值。

(5) 绘制标准曲线：将上述校正后的抑菌圈直径 (mm) 为纵坐标，相应的浓度为横坐标，将上述数据以 $D=\alpha\text{Log}C+\beta$ 进行回归，其中： D 为校正后的抑菌圈直径 (mm)， C 为春雷霉素溶液浓度 ($\mu\text{g/mL}$)， α 、 β 为常数。

2.2 活性物质的分离分析和检测方法

2.2.1 发酵液中活性物质的薄层色谱体系的建立

为进一步确定、分析发酵液中的抗菌活性成分，选用薄层层析 (TLC) 进行实验。TLC 是生物分离纯化工程中常用的技术，在实验中需要根据化合物的极性大小来选择吸附性能合适的吸附剂和极性合适的展开剂。本实验中选取的展开剂为适合展开核苷类物质的混合试剂，薄层板为高效 GF254，上行展开。

2.2.2 高效液相色谱分离分析方法

高效液相色谱法具有以下特点：(1) 分离效能高 (理论塔板数： $2\times 10^3\sim 5\times 10^4$ 块/m)；(2) 选择性高；(3) 检测灵敏度高 (最小检出量可达 10^{-9}g)；(4) 分析速度快。

在高效液相色谱分析中，样品中各组分是借助于它们在流动相和固体相间的分配系数的差异而获得分离的。不同的物质在不同的条件下，在柱体中的保留时间也不同，利用这个特点就可以把样品中的各个物质分离开来。

实验选用 HC-C18 柱用于样品的检测，检测条件为流动相：甲醇：水=5：95

(0.05%冰乙酸), 流速 0.5mL/min, 检测波长 265nm, 柱温 40℃。

2.3 发酵液的制备

链霉菌 XBP-03 通过深层发酵培养 50 小时后, 发酵培养液以 6000 r/min 的条件离心 15min, 取上清液, 共制备 9L, 备用, 记为发酵液。

2.4 活性物质的分离提取

2.4.1 粗品的制备

发酵液用 D101 树脂脱色, 采用 3 倍无水乙醇沉淀, 将上清液浓缩。具体方法如下:

- (1) 取发酵液, 加样到装有 D101 树脂的层析柱, 收集流出液;
- (2) 添加 3 倍体积的无水乙醇到流出液内, 搅拌均匀后, 静置 4 小时;
- (3) 过滤分离上清液和沉淀;
- (4) 利用适量 75%乙醇对沉淀进行洗涤, 离心收集上清液;
- (5) 将所得上清液合并, 55℃减压浓缩。

2.4.2 正相硅胶层析

- (1) 上面的褐色膏状物与硅胶按 1:1 的比例拌料, 风干。
- (2) 取 200-300 目硅胶, 用氯仿: 甲醇: 水=6.5:3.5:0.7 混合液装柱。
- (3) 将硅胶拌料样品加到硅胶柱中, 在上层再次添加一层硅胶, 防止在添加流动相时将样品冲起。
- (4) 利用梯度洗脱的方法, 即氯仿: 甲醇: 水=6.5:3.5:0.7; 4.5:5.5:1.2 以及甲醇: 水=7:3 进行洗脱。洗脱液分瓶装, 每 500mL 一瓶, 洗脱液用 TLC 进行检测, 待某一梯度洗脱液洗脱完全时, 再换下一个梯度洗脱液进行洗脱。
- (5) 柱层析结果利用 TLC 检测分析, 展层效果相近的洗脱液合并蒸干。

2.4.3 二次正相硅胶层析

- (1) 取 200-300 目硅胶, 用氯仿: 甲醇: 水=6.5:3.5:0.7 体系装柱。
- (2) 将一次正相硅胶层析第二梯度洗脱液所得样品, 按照与拌料硅胶质量比为 1:1 进行拌料, 将样品加到硅胶柱中, 在上层再添加一层硅胶, 防止在添加流动相时将样品冲起。
- (3) 利用氯仿: 甲醇: 水=4.5:5.5:1.2 进行洗脱。分瓶收集, 每 250mL 一瓶,

洗脱液用 TLC 进行检测，展层效果相近的洗脱液合并蒸干。

(4) 柱层析结果利用 TLC、HPLC 和生物活性检测等方法进行分析，将含有抗菌活性物质的样品，进行下一步分离提取。

2.4.4 TLC 制备

通过对二次正相硅胶层析后得到的样品进行 TLC 和 HPLC 分析检测，得到了一个含有抗菌活性物质的样品，取一部分样品用 TLC 进行制备。

(1) 取 1mm 厚的制备型硅胶板，在其距离边缘 1cm 处用铅笔轻轻画一条直线，将样品用 50%乙醇溶解后沿着铅笔线痕迹进行上样。

(2) 用展层剂：乙醇：氨水：水=4:1:1 进行展层，展层高度为 7cm。

(3) 待展层结束后，将硅胶板取出，放在通风厨里自然晾干。

(4) 在 254nm 荧光下进行观察，用铅笔轻轻的在薄层板上勾勒出荧光带边缘。

(5) 用刮刀将铅笔画出区域的硅胶刮下，之后用 50%乙醇浸提，将浸提液冷冻干燥。

2.4.5 二次 TLC 制备

将上面 TLC 制备得到的样品再次进行二次 TLC 制备，方法如下：

(1) 取 0.5mm 厚的制备型硅胶板，在其距离边缘 1cm 处用铅笔轻轻画一条直线，将样品用 50%乙醇溶解后沿着铅笔线痕迹进行上样。

(2) 用展层剂：乙醇：冰乙酸：水=4:1:1 进行展层，展层高度为 7cm。

(3) 接下来按照 2.4.4 的方法进行处理，冻干得样品。

2.4.6 高效液相色谱制备

经过上述步骤分离提取后，能够得到高纯度的产品。为了验证获得的产品是否是目标物。进一步使用 HPLC 法进行制备后，用质谱进行检测。本实验采用反相高压色谱柱进行检测和制备，该色谱柱通常使用的流动相是水-甲醇或水-乙腈，通过加入甲醇或乙腈含量的不同来调节分离不同物质，但如果化合物带有离子型基团，则需要在流动相中加入盐或调节流动相的 pH 值，例如可以加入少量的甲酸、乙酸、三氟乙酸等来提高分析分离效果。

实验选用反相色谱柱进行制备。收集目标峰，利用 HPLC 进行分析后，冷冻

干燥得样品，并对样品进行活性和分子量等检测。

液相制备条件为：Bouns-RP 柱，流动相乙腈：水=5:95，流速：0.5mL/min，检测波长：265nm，柱温：40℃。

经过以上一系列步骤之后，即可确定用硅胶层析法提取发酵液中活性成分的流程，如下所示：

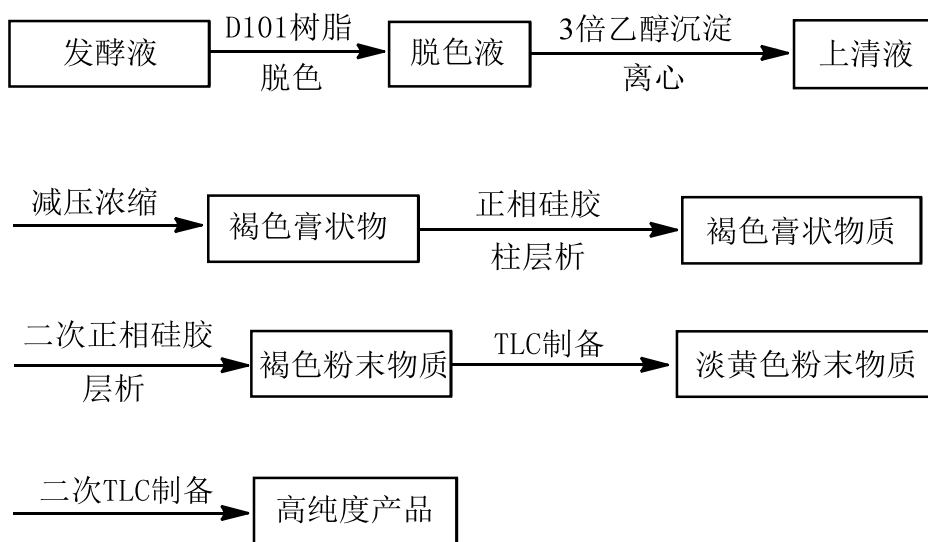


图 1-1 活性成分的分离流程

Fig.1-1 The separation progress of bioactive component

3 实验结果

3.1 样品的生物活性测定

3.1.1 一剂量法春雷霉素标准曲线

定量检测发酵液中的抗菌活性物质,可实现用效价当量衡量发酵液的抗菌活性大小,指导发酵液预处理过程中活性物质的损失率以及在分离过程中对活性物质进行跟踪。为定量检测 XBP-03 菌株发酵液中的抗菌活性物质,本实验选用同样具有抗蜡样芽孢杆菌活性的春雷霉素作为参照物,一剂量法测得春雷霉素标准曲线,并用来计算 XBP-03 发酵液中的抗菌活性物质的效价,效价单位为春雷霉素当量单位,以重量单位 μg 计。

生测平板在 30°C 培养 17 小时后,测量各浓度春雷霉素产生的抑菌圈直径,将校正后的抑菌圈直径 (mm) 为纵坐标,相应的浓度为横坐标,以 $D=\alpha\text{Log}C+\beta$ (D: 抑菌圈直径,单位: mm; C: 春雷霉素的浓度,单位: $\mu\text{g}/\text{mL}$; α 、 β 为常数) 方式进行回归分析见图 1-1。抑菌结果测定及校正如表 1-1:

表 1-1 春雷霉素的抑菌结果
Table1-1 The inhibition results of kasugamycin

春雷霉素浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	浓度对数 $\text{log}C$	抑菌圈平均直径 (mm)	中心浓度平均直径 (mm)	校正值 (mm)	校正后直径 (mm)
3375	3.528	25.67	26.65	-0.17	26.48
2250	3.352	23.45	25.01	-0.03	24.98
1500	3.176	21.93	23.38	-0.21	22.17
1000	3.000	20.10	21.00	0.00	21.00
670	2.826	17.88	19.25	0.10	19.35
450	2.653	16.71	17.65	-0.24	17.41
300	2.477	14.88	15.64	-0.08	15.56

数据回归处理结果显示: 在 $300\sim 3375\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内, 春雷霉素浓度的对数与抑菌圈直径呈良好的线性关系: 回归方程为 $y = 10.349x - 10.073$, 相关系数 $R^2 = 0.9928$ 。其中中心浓度的抑菌圈直径 $D = 21.00\text{mm}$, 回归曲线见图 1-3。

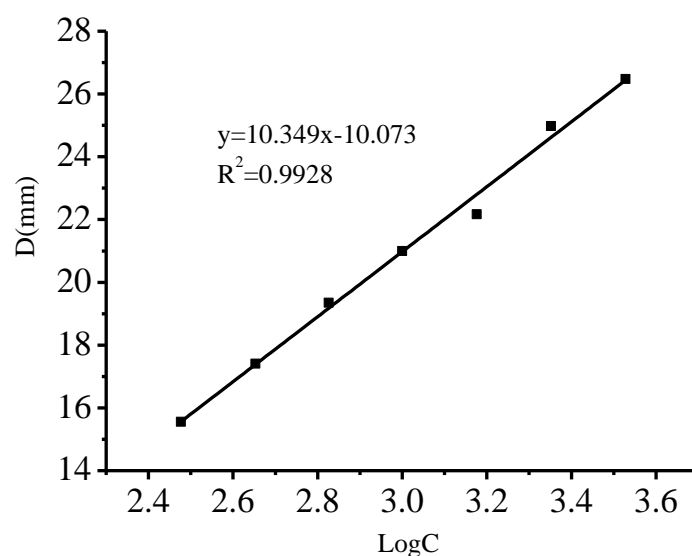


图 1-2 春雷霉素浓度对数的标准曲线

Fig.1-2 The standard curve of logarithm of terramycin's concentration

3.1.2 发酵液的生物活性测定

样品生物活性效价的定量测定：参照一剂量法测定要求，对待测定样品进行系列稀释，测定时使其中间浓度的抑菌圈直径落在所作标准曲线范围的中心浓度附近，方可利用标准曲线对其进行数据处理，求出其效价单位（春雷霉素当量，以 μg 计）。

发酵液稀释 20 倍后， $200\mu\text{L}$ 加样量的抑菌圈直径为 20.60mm ，对应春雷霉素浓度的对数是 2.96，相当于春雷霉素浓度是 912.01，因春雷霉素加样量也是 $200\mu\text{L}$ ，所以，发酵原液的效价是 $18240.2\mu\text{g}$ （春雷霉素当量）。

3.2 粗品的 TLC 检测

根据活性物质的性质和相关类似物质的文献报道，实验采用乙醇-冰乙酸-水、正丁醇-冰乙酸-水、乙醇-氨水-水展层，用 5% 茚三酮丙酮溶液做显色剂，以显色点个数（包括紫外 254nm 照射下的荧光点）和 R_f 值判断展层效果，结果见表 1-2。

表 1-2 展层剂的筛选结果

Table 1-2 TLC agent screening results

展开剂	乙醇：冰乙酸：水	正丁醇：冰乙酸：水	乙醇：氨水：水
	4:1:1	4:1:1	4:1:1
显色点个数	4	3	9

活性物质粗品在乙醇-氨水-水体系内展层后，显色点个数多达 9 个；并且在活性物质标样所在的 Rf 值附近，显色点之间分得比较开。因此，乙醇-氨水-水体系可用于下面实验中活性物质的 TLC 检测。

3.3 活性物质的分离提取结果

3.3.1 粗品的制备

将 9L 发酵液用 D101 树脂脱色，脱色液加入 3 倍体积的无水乙醇放置 4h，过滤得滤液，将滤液 55℃ 减压浓缩，获得褐色膏状物，共计 240g。

3.3.2 正相硅胶柱层析

将得到的粗品（240g）进行正相硅胶层析，实验设置了 3 个洗脱梯度，很好的达到了分离提取的目的。3 个洗脱梯度相应的将活性粗提物分成了 3 大部分，将三部分样品进行活性跟踪实验，结果如下：

第一部分对应 1 梯度洗脱液部分，其呈黄色，没有活性，主要含有色素；

第二部分对应 2 梯度洗脱液样品，其是主要的活性成分所在部分；

第三部分对应 3 梯度洗脱液样品，有微弱活性，但是含有大量色素。

根据抗菌活性检测结果，活性物质主要在二梯度洗脱液中，故将二梯度洗脱液样品留作下一步分离提取。

3.3.3 二次正相硅胶柱层析

将上一步得到的样品（109g）在等度洗脱的条件下进行二次正相硅胶柱层析，每 250mL 收集一瓶，经薄层层析检测，将展层效果相近的洗脱液合并，相应的将得到的样品分为 1[#]-6[#]组分（按样品薄层层析划分），并对以上 6 个组分进行 HPLC 检验。

检测结果如下所示：

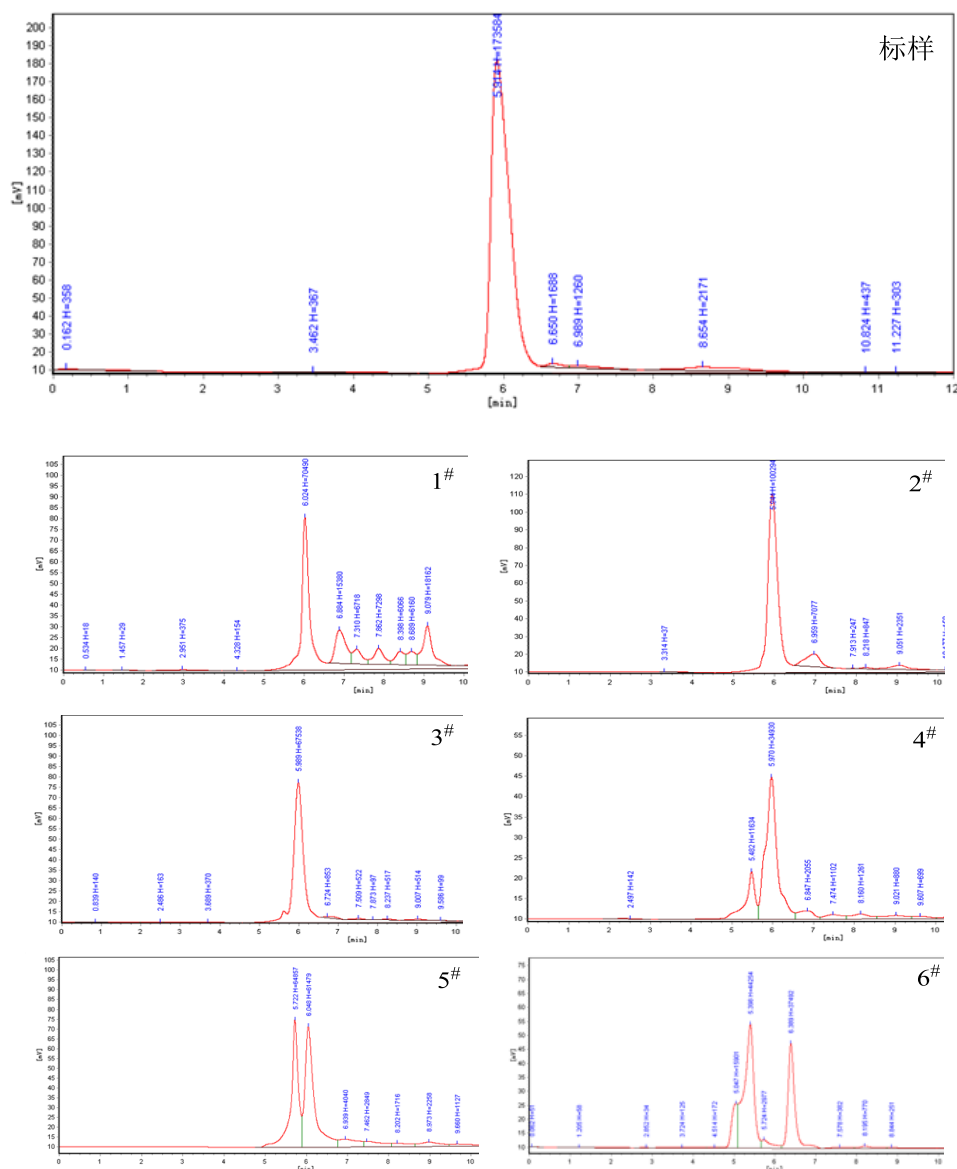


图 1-3 二次正相柱层析的 HPLC 分析

Fig.1-3 HPLC analysis of second reversed phase chromatography

由图 1-3 可得，标样的峰保留时间为 6min。二次正相硅胶柱层析后的 1[#]-5[#] 样品都在 6min 处有峰出现。所以，单从 HPLC 结果来看，1[#]-5[#] 样品中都可能含有活性物质。

将 1[#]-6[#] 进行 TLC 检测，展层后在 254nm 紫外下观察荧光点，荧光点用铅笔标记好后，进行茚三酮显色，显色后的效果图如图 1-4 所示。单从 TLC 效果图可以看出，活性物质主要在 5[#] 中，3[#]、4[#] 和 6[#] 样中含有少量的活性物质；1[#] 和 2[#] 不含有活性物质。

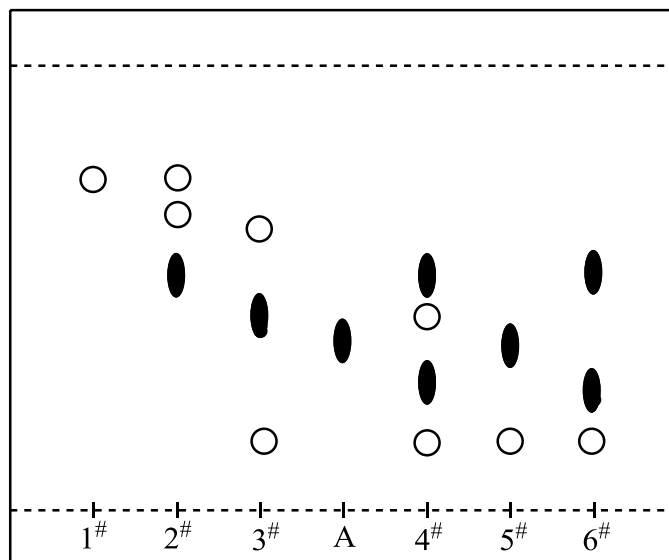


图 1-4 二次正相柱层析的 TLC 分析

Fig.1-4 TLC analysis of second reversed phase chromatography

注：A：活性物质标样，1[#]-6[#]代表二次硅胶层析后得到的 6 个组分；●代表荧光点；○代表茚三酮显色点。

从 1[#]-6[#]样品中分别取出少量配成 2mg/mL 溶液，进行生物活性的测定，测定结果如表 1-3 所示。可以看出，5[#]样品活性最高，说明活性成分主要在 5[#]样品中；3[#]、4[#]和 6[#]样品有微弱活性，说明其中含有少量的活性成分；1[#]和 2[#]无活性，说明其不含有活性成分。

表 1-3 二次正相柱层析的生物活性测定结果

Table1-3 The biological activities of second reversed phase chromatography

样品	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]
质量 (g)	40	34	8	2	6	1.8
抑菌圈直径 (mm)	0	0	20.12	21.08	30.56	21.54
含量 (%)	0	0	9.06	2.50	86.65	1.80

综合 HPLC、TLC 和生物活性的检测结果，可以确定，活性物质主要在 5[#]，其质量为 6g，颜色呈深褐色，可见其还含有色素等杂质

进一步将 5[#]样品展层后进行还原糖和茚三酮显色，结果显示样品中还有还原糖和氨基酸或多肽存在。

3.3.4 TLC 制备

为了除去 5[#]样品中的还原糖和氨基酸或多肽，提高样品纯度，实验按照 2.4.4 的实验方法对 5[#]样品进行 TLC 制备。取 20mg 样品进行制备，分离得到含有活性成分的条带，冻干得到 TLC 制备样 4mg。将该制备样在 TLC 分析板上进行还原糖和茚三酮显色，其检测结果如图 1-5 所示，可以看到 5[#]样经过 TLC 制备后除掉了氨基酸-赖氨酸（赖氨酸由 HPLC 鉴定）和还原性糖。

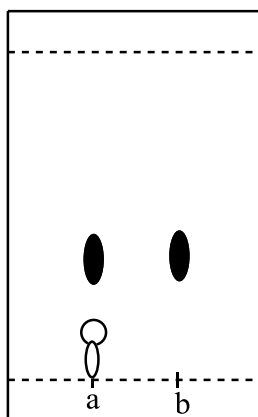


图 1-5 a 和 b 样品中的氨基酸和还原糖分析

Fig.1-5 The analysis of amino acid and reducing sugar of a and b

注：a 代表 5[#]样；b 代表 TLC 制备样；● 代表荧光点；○ 代表氨基酸显色点
○ 代表还原糖显色点

将 TLC 制备样用 HPLC 进行检测，结果如图 1-6 所示，从液相图可以看出，经过 TLC 制备后，活性物质峰的含量由原来的 40%增加到 73%，但仍有部分的杂峰。

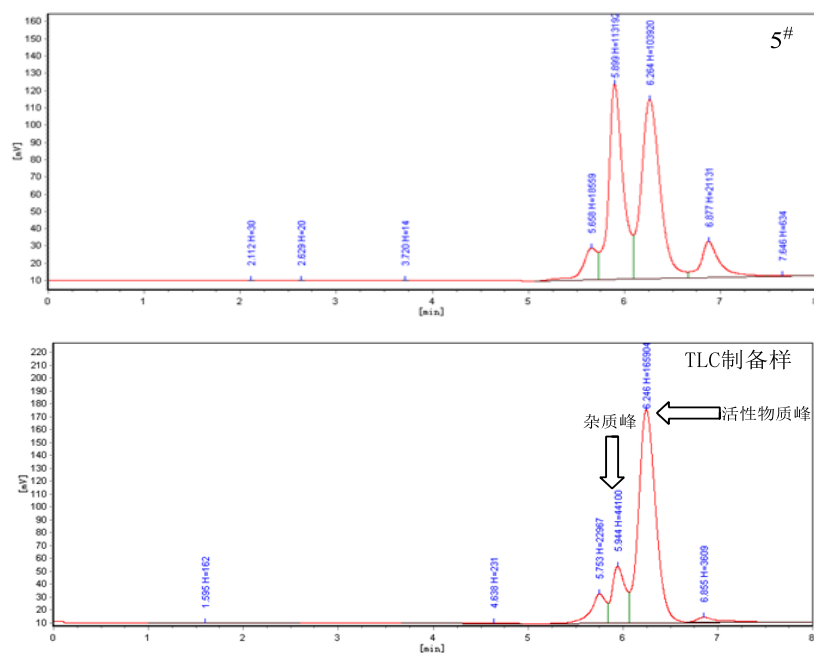


图 1-6 TLC 制备样的 HPLC 图谱

Fig.1-6 HPLC spectrum of the sample after preparative TLC

综合 TLC 和 HPLC 检测结果可知, 经过 TLC 制备后, 可以除去 5# 中氨基酸和还原性糖; 也除去一些紫外吸收物质 (由 HPLC 图谱可知), 提高了活性物质在样品中的含量。

但是, 由图 1-6 中的 HPLC 图谱可以看出, TLC 制备样中还含有一部分杂质, 因此, 为了进一步提高纯度, 进行了二次 TLC 制备以除去 HPLC 图谱中的杂质峰。

3.3.5 二次 TLC 制备

将 3.3.4 中得到的 4mg TLC 制备样按照 2.4.5 的方法进行二次 TLC 制备, 得到了 1mg 二次 TLC 制备样, 用 TLC 和 HPLC 进行检测。

二次 TLC 制备样的 TLC 和 HPLC 检测结果如下所示:

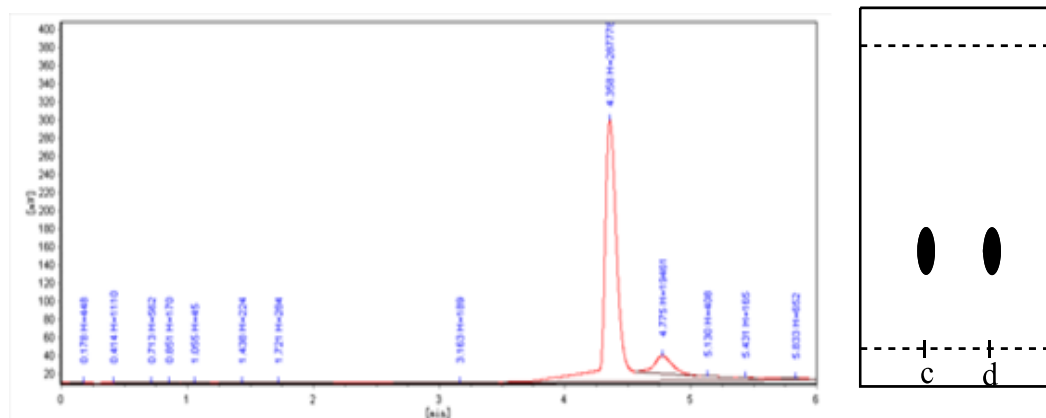


图 1-7 样品 d 的 HPLC 和 TLC 图谱

Fig.1-7 HPLC and TLC spectrum of d
注：c 代表标样；d 代表二次 TLC 制备样

由图 1-7 可以看出,经过二次 TLC 制备后,得到了单一的荧光点;通过 HPLC 检测,发现二次 TLC 制备样的纯度很高,活性物质峰面积比例达到了 90%,说明经过二次 TLC 制备,得到了高纯度的产品。

3.4 产品的质量检验

通过以上实验,建立了高纯度产品的提取工艺,产品的纯度为 90% (HPLC 检测)。这种方法与通过 HPLC 制备来得到高纯度产品的方法相比,具有上样量大和操作简单等特点。接下来,从纯度、活性和分子量方面对样品进行了质量检测。

3.4.1 高效液相色谱制备和检验

将二次 TLC 制备样品进行液相制备,液相制备条件同 3.3.5。制备得到的样品进行 HPLC 检测和生物活性实验,结果如图 1-8 和图 1-9。

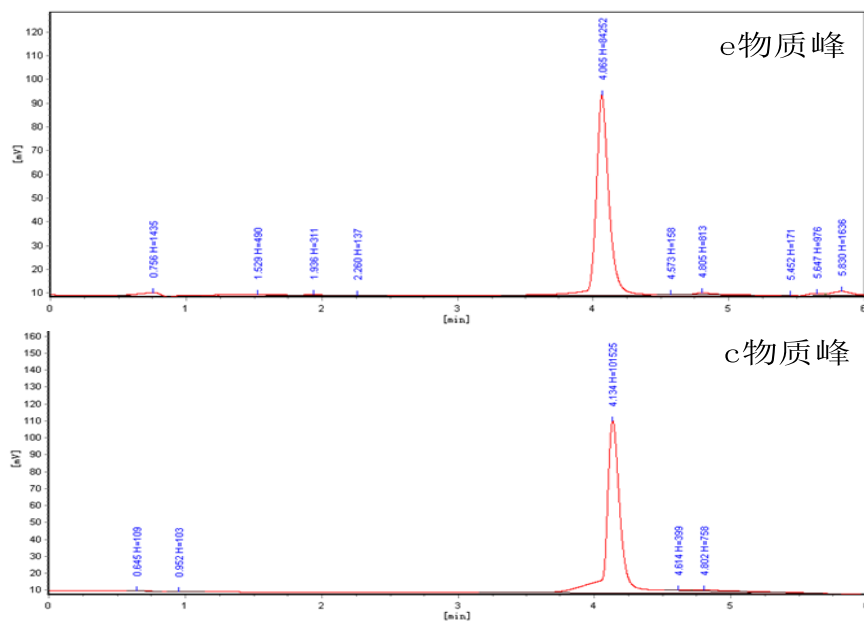


图 1-8 样品 c 和 e 的 HPLC 图谱
Fig.1-8 HPLC spectrums of c and e
注：c 代表标样； e 代表液相制备样

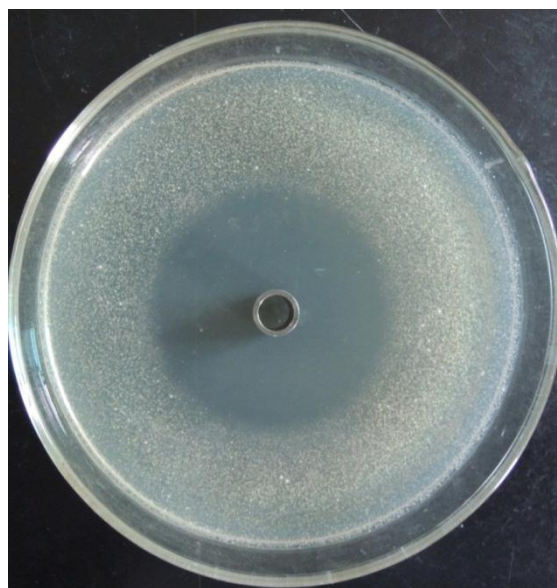


图 1-9 液相制备样的抑菌结果
Fig.1-9 Bactericidal tests of sample after preparative HPLC

由以上实验结果可以看出：二次 TLC 制备样经 HPLC 制备后，样品和标样在液相图谱上的峰保留时间一致，其在 HPLC 上的含量达到了 95%以上，可以达到质谱分析的要求。并且样品具有很好的抗菌活性。

3.4.2 高分辨质谱检验

将 HPLC 制备样品进行高分辨率质谱分析，其 HR-ESI-MS 分析结果如下：

表 1-4 化合物的高分辨率质谱分析
Table 1-4 HR-ESI-MS analysis of compound

Compound	m/z	m/z
	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
活性成分	445.1678	467.1510

表 1-5 化合物的分子式和分子量
Table 1-5 Molecular Weights and formulas of compounds

Compound	Molecular Weight	Formula	Molecular Weight
	Tested		Calculated
活性成分	444.1599	C ₁₆ H ₂₄ N ₆ O ₉	444.3986

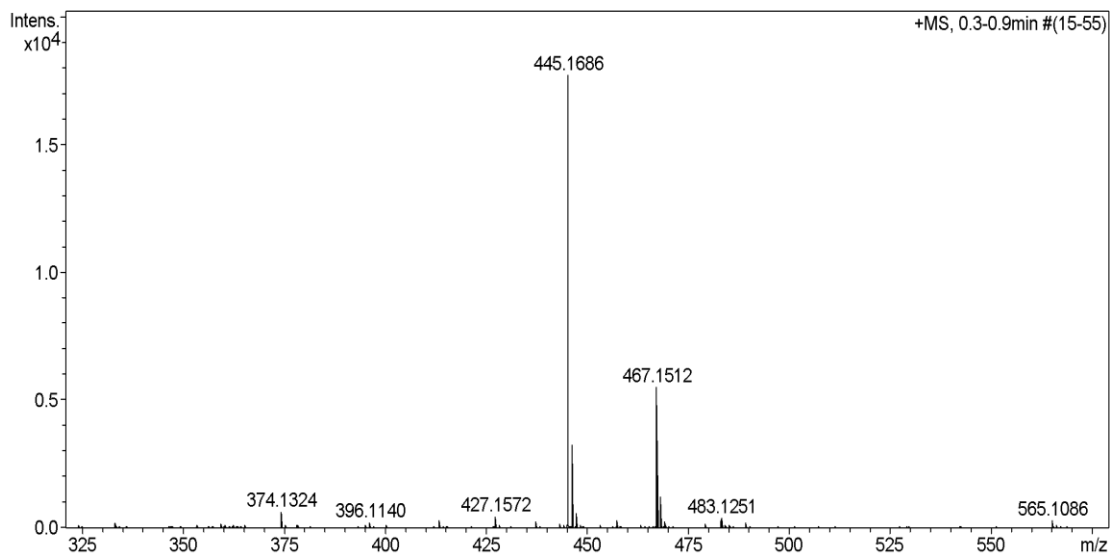


图 1-10 活性成分的 ESI-MS

Fig.1-10 ESI-MS of bioactive component

通过 HR-ESI-MS 检验结果可知，液相制备样的分子量为 444.3986，和标样的分子量一致。

综合 HPLC 和 HR-ESI-MS 检验结果可知，从发酵液出发，经过实验设计的分离提取方法，可以得到高纯度的活性物质样品。

4 讨论

4.1 发酵液中活性物质的生物活性测定

在分离过程中，指示菌是关系到分离成败的重要因素。在未知物质的分离提取过程中，生物活性检测-即测定组分对指示菌的拮抗作用或使用其它筛选模型是跟踪活性物质的唯一方法。目前，对于核苷类农用抗生素，比较常用的指示菌有金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、藤黄八叠球菌、白色假丝酵母和炭疽病毒等；常用到的活性测定方法包括平板划线法、琼脂块法、管碟法、纸片法和生物自显影等。

通过将发酵液对以上多种指示菌进行抑菌活性实验后发现，其对蜡样芽孢杆菌的抑菌效果最显著，故实验选用蜡样芽孢杆菌作为分离提取过程中的指示菌；在活性测定方法中，由于管碟法具有定量、重复性好、操作简单等特点，故采用此方法进行活性测定。论文以春雷霉素作为参照，实现了活性化合物的活性检测。

4.2 发酵液中活性化合物的分离提取

活性物质的分离提取是生物工程下游技术中最重要的组成部分，也是测定物质结构，明确其特性的关键步骤。由于发酵液中含有大量的糖、氨基酸、蛋白和色素等杂质，因此，针对这些不同的杂质，实验设计了相应的处理方法。

通过离心，除去发酵液中的菌体和固形物；树脂脱色除去了大部分的色素；加入无水乙醇使大部分的蛋白变性沉降。同时，由于发酵液中活性物质的含量比较低，通过将发酵液制成粗品，使活性成分的浓度大大的提高，为后续的分离提取和检测做了准备。最后，针对活性物质的理化性质和相关的实验探索，设计相应的分离提取手段，如硅胶柱层析、TLC 制备等。

4.2.1 发酵液中活性物质粗品的制备

将发酵液通过离心、大孔吸附树脂脱色、3 倍无水乙醇沉淀和减压浓缩后，得到了粗品。通过以上处理，除去了大量的蛋白、色素等杂质，为后面的分离提取工作提供了样品。

4.2.2 活性组分的分离纯化

4.2.2.1 正相硅胶柱层析

正相硅胶柱层析是以固体吸附剂为固定相，以有机溶剂或缓冲液为流动相构成柱状的一种色谱方法。这种方法适用范围较广，进样量大，可用于样品的大量制备，特别是对一些不能在溶液中形成离子的抗生素类，无疑是很好的选择。

实验采用了氯仿-甲醇-水洗脱体系，通过设置洗脱条件，经过两次正相硅胶柱层析，得到了 6 个组分。通过将得到的 6 个组分进行 TLC 和 HPLC 检测，确定了活性物质的位置。

4.2.2.2 薄层色谱法

薄层色谱法是现代实验室最重要的精确分离、分析手段之一，是进行柱色谱层析的预试验。生物自显影技术将薄层层析的分离功能和生物活性检测有机结合，在进行 TLC 的同时，结合抗菌活性检验，快速准确的找到活性物质在薄层层析板上的位置，极大的提高了寻找目的产物的效率。

通过筛选，实验采用乙醇-氨水-水做展层剂，实现了活性化合物的快速分析检测。在活性物质分离提取的最后阶段，在酸性展层体系下，用 TLC 对性质比较接近的样品进行高效的分离和制备，也起到了很好的效果。

4.2.2.3 高效液相色谱法 (HPLC)

高效液相色谱 (HPLC) 是在原有的液相柱层析基础上引入气相色谱的理论并加以改进和发展起来的, 兼具分离效能高、选择性高、检测灵敏度高和分析速度快的特点, 因此应用范围也日益扩展。

其中, 反相高效液相色谱是基于溶质、极性流动相和非极性固定相表面间的疏水效应建立的一种色谱模式。很多有机分子的结构中都有非极性的疏水部分, 这部分越大, 一般保留值就越高。在 HPLC 中这是应用最广泛的一种分离模式。由于使用了非破坏性检测器, 在大多数情况下, 可除去流动相, 实现对少量珍贵样品的回收, 亦可用于样品的纯化制备。

本章从链霉菌 XBP-03 的发酵液出发, 采用正相硅胶层析和 TLC 两种分离提取手段, 可以得到高纯度的活性成分产品。为了对得到最终样品进行验证, 将二次 TLC 制备样进行 HPLC 制备, 得到了活性物质纯品, 并通过对纯品进行 HPLC 和 HR-ESI-MS 检测, 证明其就是活性物质标样。

4.3 存在的不足

论文第一章进行了硅胶层析提取发酵液中活性成分的方法研究, 但是还存在以下几点不足:

1. 在活性成分的分离提取过程中, 用到了氯仿等有毒试剂。从安全和环境友好的角度出发, 在以后的分离提取中, 可以使用类似性质的但毒性较小的试剂来替代。

2. 在样品的 TLC 制备过程中, 由于薄层板较薄使得载样量过小, 这增加了工作量并且降低了效率。为了克服这些缺点, 可以通过增加薄层板的厚度和筛选其他柱层析的方法来克服这项缺点。

小结

通过第一章的研究, 可以得到以下结论:

1. 实验从链霉菌 XBP-03 发酵液 (9L) 出发, 经过离心、D101 树脂脱色、三倍无水乙醇沉淀等步骤后得到了 240g 粗品。

2. 粗品通过硅胶柱层析和二次硅胶柱层析后得到了一个含有活性物质的样品, 其质量为 6g。

3.含有活性成分的样品经过 TLC 制备和二次 TLC 制备后，可以得到高纯度的产品，其在 HPLC 上的含量为 90%。

4.将得到的产品经过 HPLC 制备后，进行 HPLC、活性和质谱检测，证明了该样品是我们的目的物。

第二章 阳离子交换树脂对活性成分的提取工艺研究

1. 实验材料

1.1 实验菌种和培养基

本实验所用生产菌、生物活性测定指示菌、培养基同第一章 1.1 和 1.2。

1.2 实验试剂

纯水；NKC-9、D072、002×7、D151 型号树脂由南开大学化工厂生产；001×7、D001、7320、D113 型号树脂由上海开平树脂厂生产；其他化学试剂均为分析纯。

1.3 实验仪器

YJ-875 型医用净化工作台

GL-20G- II 型高速冷冻离心机

BÜCHIR-114 型旋转蒸发仪；B-480 型水浴锅等

2. 实验方法

2.1 发酵液中活性成分含量的测定

实验采用微生物效价检定法测定活性成分的含量，以春雷霉素作为标准，建立抑菌圈直径（D）与春雷霉素浓度（C）之间的关联，按照第一章 3.1.1 建立的春雷霉素浓度对数的标准方程算出春雷霉素与发酵液中活性成分的等反应剂量。

2.2 树脂的静态实验

2.2.1 树脂的预处理

新树脂使用前必须进行预处理，以去除树脂中所含低聚物、有机物及有害离子。

首先,将树脂以水浸泡一昼夜,而后进行反洗和正洗,洗至出水清亮。再以树脂体积 2-3 倍的 4-5% 的 HCl 和 NaOH 交替处理,在酸碱处理之间应以水淋洗;交替处理以“酸-水-碱-水”为一个循环,处理一到三个循环。预处理后经再生处理即可投入使用。

2.2.2 树脂种类的筛选

选取 8 种不同极性、不同型号的阳离子交换树脂,树脂的相关参数如表 2-1 所示。取预处理好的树脂 2.5g (湿重),放入 50mL 三角烧瓶中,加入 5mL pH=7 的发酵液,置于 30℃, 150r/min 的恒温摇床上振荡 24h。取吸附剩余液,测定活性成分浓度并计算吸附率。

相关计算公式如下:

$$\text{吸附量 (mg/g)} = (C_o - C_e)V / m$$

$$\text{吸附率 (\%)} = (C_o - C_e) \times 100 / C_o$$

$$\text{解析率 (\%)} = C_d \times V_d \times 100 / [(C_o - C_e) \times V_o]$$

$$\text{回收率 (\%)} = C_d \times V_d \times 100 / (C_o \times V_o)$$

式中 C_o 为发酵液中活性成分的初始浓度 (mg/mL); C_e 为吸附平衡后剩余液中的浓度(mg/mL); C_d 为解析液中活性成分的浓度 (mg/mL); V_d 解析液体积 (mL); V_o 为原液体积 (mL); m 树脂重量 (湿重 g)。

表 2-1 阳离子交换树脂的性能参数
Table 2-1 Performance Parameters of Ion Exchange Resins

树脂	极性	质量交换容量 (mmol/g)	含水量 (%)	湿密度
001×7	强酸性	≥4.6	46~52	1.25~1.29
002×7	强酸性	≥4.4	46~52	1.24~1.28
7320	强酸性	≥4.5	46~52	1.25~1.29
NKC-9	强酸性	≥4.7	≤10	1.20~1.30
D72	强酸性	≥4.2	50~55	1.20~1.30
D001	强酸性	≥4.35	45~55	1.18~1.28
D151	弱酸性	≥9.5	60~70	1.05~1.15
D113	弱酸性	≥11	45~52	1.15~1.20

2.2.3 发酵液 pH 值对树脂吸附效果的影响

发酵液 pH 值分别调为 3、4、5、6、7、8、9、10，按照 2.2.1 的方法进行静态吸附，计算在不同料液 pH 条件下，树脂的吸附效果。

2.2.4 解吸液的筛选

将吸附饱和的树脂用 30mL 不同种类和浓度的解吸液进行解吸，计算解吸率。

2.2.5 静态吸附动力学研究

取预处理好的树脂 2.5g (湿重)，放入 50mL 三角烧瓶中，加入 5mL pH=7 的发酵液，置于 30℃，150r/min 的恒温摇床上振荡；在不同的时间点取样，测定发酵液中活性成分含量并计算树脂吸附率。

2.2.6 吸附等温线的测定^[7]

分别称取 0.5g、1g、1.5g、2g、2.5g 树脂 (湿重) 置于 50mL 三角烧瓶中，加入 5mL pH=7 的发酵液，分别置于 25℃、30℃ 和 35℃ 恒温摇床上、150r/min 振荡 24h，测吸附剩余液浓度 C_e ，计算吸附量 Q_e ，作 $C_e - Q_e$ 图，得吸附等温线。

2.3 动态实验

取离子交换柱 (内径 1cm 高 40cm)，装入 15.5g 树脂 (湿重)，将发酵液以不

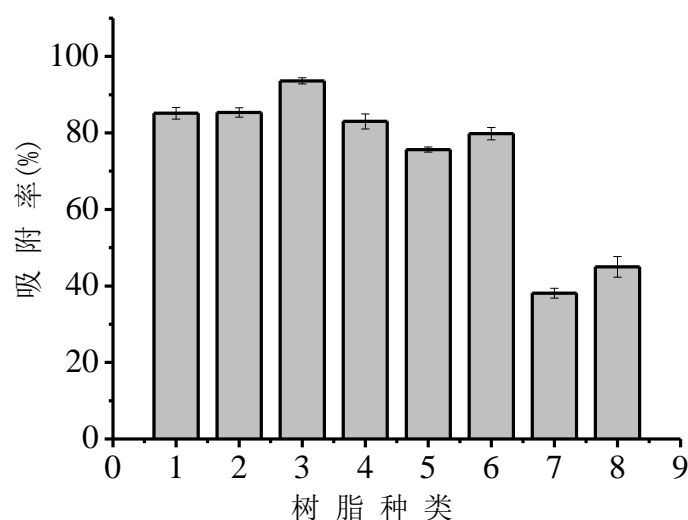
同的上样流速通过交换柱，分管接收流出液，分析流出液中活性成分浓度变化，绘制泄漏曲线；用碱性解吸液 3% 氨水以不同解吸流速对动态吸附后的树脂进行解吸，测定解吸液中活性成分浓度，绘制解吸曲线。

3 实验结果

3.1 静态实验结果

3.1.1 离子交换树脂的筛选

不同极性、不同型号的阳离子交换树脂对活性成分的吸附效果如图 2-1 所示，可知强酸性阳离子交换树脂的吸附效果要好于弱酸性树脂；其中强酸性阳离子交换树脂 7320 吸附效果最好，吸附率可达 93.60%。



1: 001×7; 2: 002×7; 3: 7320; 4: NKC-9; 5: D72; 6: D001; 7: D151; 8: D113

图 2-1 阳离子交换树脂的静态吸附率

Fig. 2-1 Static Adsorption Efficiency of Different Ion Exchange Resins

3.1.2 发酵液 pH 值对吸附效果的影响

离子交换树脂的吸附本质为离子间的交换，因此样品的 pH 值对吸附效果有很大的影响。结果如图 2-2 所示。

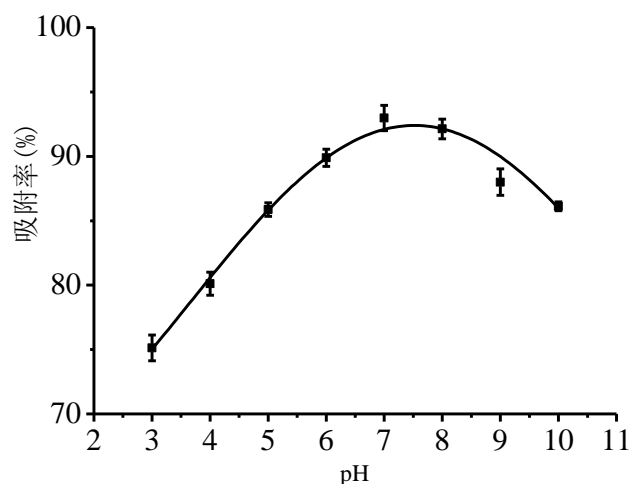


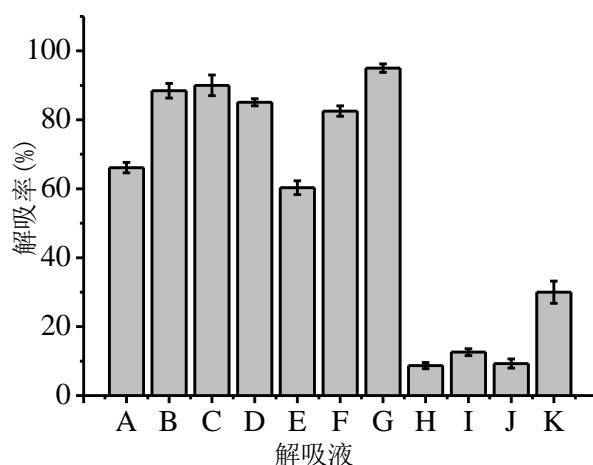
图 2-2 pH 对树脂吸附率的影响

Fig. 2-2 Effect of pH on 7320 Resin Adsorption

在 $\text{pH} < 7$ 时, 吸附率随 pH 值的增大而增大; $\text{pH} = 7$ 左右时的吸附率最大; 随着 pH 值的继续增大, 吸附率变小。可能的原因是: 7320 树脂是阳离子交换树脂, 其对有机物的主要吸附机制之一是离子交换和静电作用, 因而 pH 值对吸附率的影响与目的物在水溶液中的存在形态密切相关。 pH 值较小时, 溶液中 H^+ 浓度比较大, 活性成分对树脂的亲合力会受到 H^+ 浓度的影响, 导致吸附率下降; pH 值较大时, 活性成分分子态增多而离子态减少, 也导致其与树脂的吸附力降低^[8]。

3.1.3 解吸液的选择

采用了含无机盐的解吸液, 以及酸性和碱性解吸液进行解吸, 结果如图 2-3 所示。酸和碱的解吸效果要比盐的解吸效果好, 其中 3% 氨水的解吸率最高, 达到 95.00%。



A: 1% HCl; B: 2% HCl; C: 2.5% HCl; D: 3% HCl; E: 1% NH₄OH; F: 2% NH₄OH; G: 3% NH₄OH; H: 1% NaCl; I: 1% MgSO₄; J: 1% NH₄Cl; K: 1% CaCl₂

图 2-3 不同解吸剂解吸能力的比较

Fig. 2-3 Comparison of Desorption Efficiency within the Analytical Solutions

3.1.4 静态吸附动力学研究

3.1.4.1 静态吸附动力学曲线

树脂的吸附过程不仅要考虑吸附量的大小，还要考虑吸附速度的快慢。由图 2-4 可知，吸附 2h 后，活性成分的吸附量随着时间的延长变化很缓慢，即已基本达到吸附平衡，说明 7320 树脂对活性成分的吸附是一个快速吸附平衡过程，而快速吸附可以缩短生产周期，这在工业上是非常有利的。

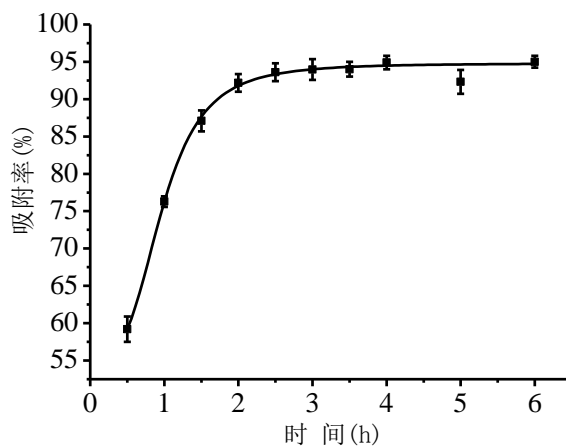


图 2-4 树脂的静态吸附动力学曲线

Fig 2-4 Kinetic curve of static adsorption by 7320 resin

3.1.4.2 静态吸附动力学

通常情况下，吸附动力学可用准一级速率方程或者准二级速率方程来描述^[9-10]，从而对吸附行为进行预测，以便通过控制吸附条件来达到对目的物更好吸附的目的。

对图 2-4 数据采用准一级和准二级速率方程进行拟合，结果如图 2-5 所示，表明：活性成分在树脂上的吸附动力学特性更加符合准二级速率方程：

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{kQ_e^2} + \frac{t}{Q_e} \quad (1)$$

式中： k 为表观吸附速率常数 ($\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$)； Q_e 和 Q_t 分别为平衡时和 t 时刻的吸附量 (mg/g)。

方程为 $t/Q_t = 0.1697t + 3.904$ ，相关系数 $R^2 = 0.9978$ 。由准二级速率方程斜率可得平衡吸附量： $Q_e = 5.89$ (mg/g)，接近实验得到的平衡吸附量；速率常数 $k = 0.00738$ $\text{g}/\text{mg} \cdot \text{min}$ 。

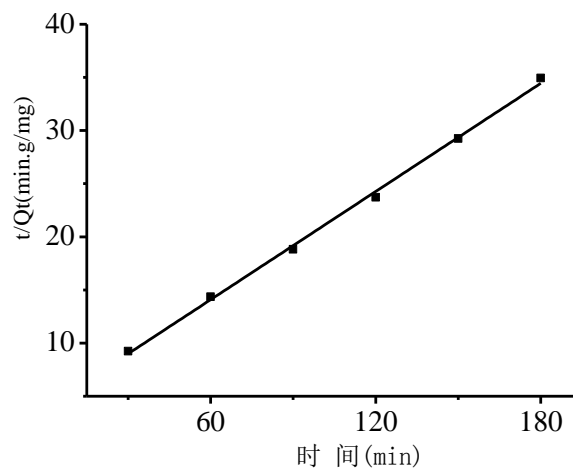


图 2-5 树脂吸附活性成分的准二级速率方程

Fig. 2-5 The Second-order Kinetics Curve of Bioactive Components Adsorbed on 7320 Resin

3.1.4.3 速度控制步骤的确定

树脂对目的物的离子吸附过程主要通过膜扩散 (外部扩散) 和粒扩散控制 (内部扩散)来完成^[11-12]。扩散过程可用 Kanna 方程式^[13]表达：

$$q_t = K_p \times t^{1/2} + C \quad (2)$$

式中： K_p 为粒扩散速率常数 [$\text{mg}/(\text{min}^{1/2} \cdot \text{mL})$]， q_t 为树脂在 t 时刻的吸附量 (mg/g)， C 为常数。

图 2-6 为 7320 树脂吸附活性成分的 Kannan 曲线，在吸附过程的前 90min 内， q_t 对 $t^{1/2}$ 的拟合公式为 $y = 0.38005x + 1.19553 (R^2 = 0.99613)$ ，呈现很好的线性关系，说明这段时间颗粒内扩散是主要限速步骤；90min 以后，线性关系发生改变，说明 90min 以后膜扩散控制对吸附速率的影响变大^[14]。因此，在 90min 以后，为了提高吸附量和工作效率，可以通过提高发酵液中活性成分浓度、进行搅拌或添加电场等措施来提高吸附速度。

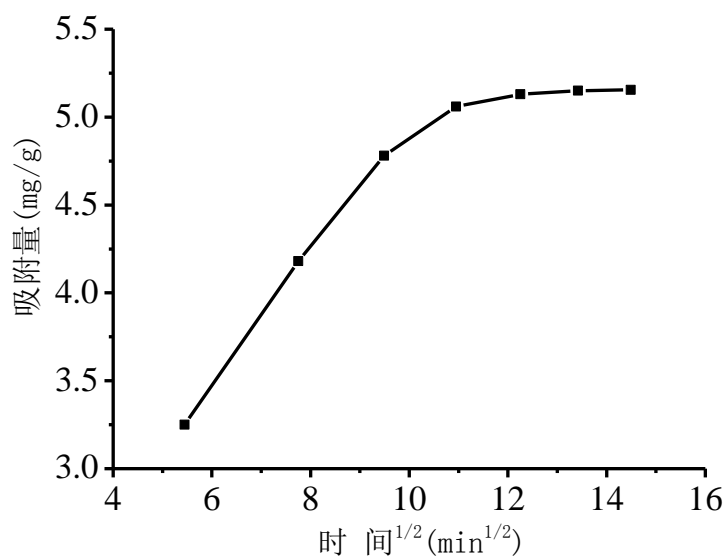


图 2-6 树脂吸附活性成分的 Kannan 方程

Fig. 2-6 Kannan Curve of Bioactive Components Adsorbed on 7320 Resin

3.1.4.4 吸附等温线测定

不同温度下 7320 树脂对活性成分的吸附等温线如图 2-7 所示，说明温度对平衡吸附量有着较大的影响，在本实验研究体系内，随着温度的升高，平衡吸附量逐渐增大，体现了吸附吸热特征，升温对吸附有利。

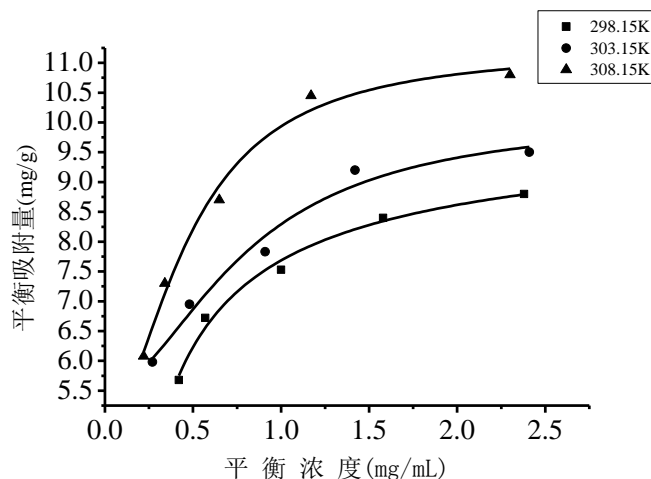


图 2-7 7320 树脂对活性成分的吸附等温线

Fig. 2-7 Adsorption Isotherms of 7320 Resin for Bioactive Components

采用 Langmuir 模型和 Freundlich 模型对图 2-7 数据进行拟合。结果显示，Langmuir 模型更适合描述 7320 树脂对活性成分的吸附行为：

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_{\max} b} + \frac{C_e}{Q_{\max}} \quad (3)$$

式中： Q_{\max} 为单分子层饱和吸附量 (mg/g)； b 为 Langmuir 常数 (1/mg)。

其拟合曲线、方程参数见图 2-8 和表 2-2。Langmuir 常数 b 随温度的升高而增大，这说明温度升高，树脂对活性成分的吸附能力增强。

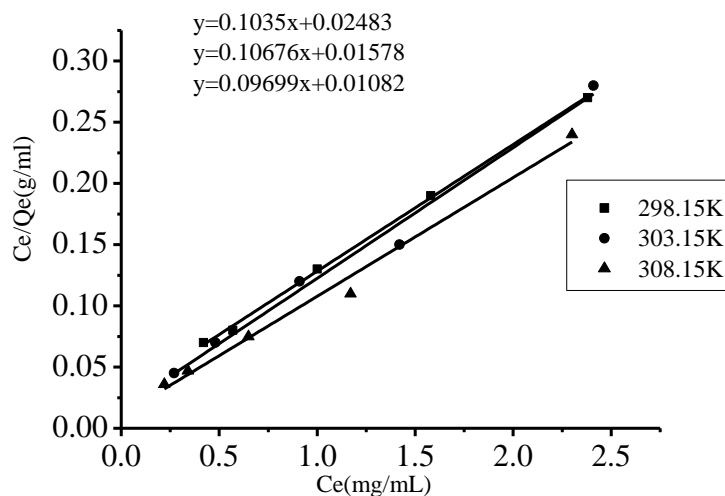


图 2-8 不同温度下的 Langmuir 方程

Fig.2-8 Langmuir Isotherms under Different Temperatures

表 2-2 不同温度下的 Langmuir 方程参数

Table 2-2 The Fitting Result of Langmuir Equation under Different Temperatures

T (K)	Regression equation	Q_{\max} (mg/g)	b (mL mg)	R^2
298.15	$y=0.1035x+0.02483$	9.66	4.17	0.99883
303.15	$y=0.10676x+0.01578$	9.37	6.77	0.98386
308.15	$y=0.09699x+0.01082$	10.31	8.96	0.98687

针对不同温度的吸附平衡，利用 Van't Hoff 方程和相应热力学关系式，分析吸附过程中的热力学行为^[15]。吸附焓变 ΔH 、吉布斯函数 ΔG 和熵变 ΔS 分别应用下列方程计算：

$$d \ln K_L = -\frac{\Delta H}{R} d\left(\frac{1}{T}\right) \quad (4)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_L \quad (5)$$

$$\ln K_L = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (6)$$

式中： K_L 为常数； R 为气体常数，8.314J/(K·mol)； T 为绝对温度 (K)

ΔH 、 ΔG 和 ΔS 的计算结果如表 3。

表 2-3 不同温度下的热力学参数

Table 2-3 Thermodynamic Parameters under Different Temperatures

T (K)	K_L	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS [J/(mol · k)]
298.15	4.17		-3.54	12.08
303.15	6.77	60.93	-4.82	16.10
308.15	8.96		-5.62	18.43

由表 2-3 知，活性成分在 7320 树脂上的吸附过程中： $\Delta G < 0$ ，说明吸附反应比较容易进行；且 ΔG 随温度的升高而减小，表明吸附反应自发进行的程度变高。交换反应焓变 ΔH 为正值，表明该吸附反应为吸热过程，温度的升高有利于吸附的进行。吸附过程中 ΔH 为 2.1~20.9kJ/mol 时，对应为物理吸附； ΔH 为

20.9~418.4kJ/mol时, 对应为化学吸附^[16], 说明该吸附过程为化学反应过程。 $\Delta S > 0$, 说明吸附反应是熵增的过程, 可能原因是当活性物质分子交换到树脂上时, 由于其分子的体积远大于水分子体积, 因而活性物质的吸附引起更多水分子的脱附, 而水分子的脱附进入液相是熵增加的过程^[8]。

3.2 动态实验

3.2.1 动态吸附实验

发酵液按 0.5BV/h、1BV/h、2BV/h、4BV/h 4 个流速进行上样, 以流出液浓度达到上样液浓度的 10% 为泄露点。图 2-9 为 4 个流速条件下, 流出液中活性成分浓度的变化情况。上样流速越大, 泄露点出现的越早; 上样流速越低, 泄露点出现的越迟, 说明树脂交换柱内离子交换越充分, 越有利于提高树脂交换柱的利用率。但是流速过低, 降低了效率, 因此, 以 1BV/h 流速进行动态吸附为佳。

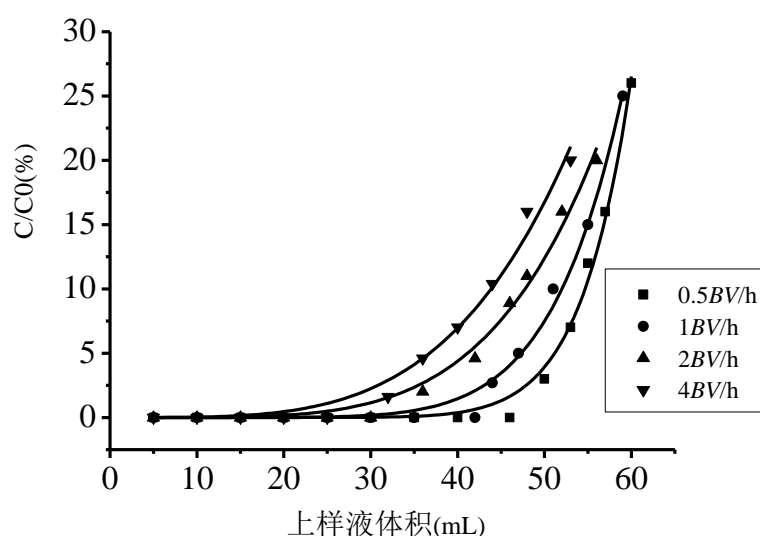


图 2-9 不同上样流速下的吸附穿透曲线

Fig. 2-9 Breakthrough Curves under Different Uploading Speeds

3.2.2 动态解吸实验

用 3% 氨水分别以 1BV/h、2BV/h、3BV/h、4BV/h 4 个解吸流速对吸附饱和后的树脂进行解吸, 解吸曲线如图 2-10 所示。从图中可以看出, 解吸流速越低, 解吸峰越集中, 同时所用解吸液的体积越小; 解吸流速过快, 造成解吸峰不集中

同时解吸液体积过大。综合考虑, 采用 2BV/h 的解吸流速进行解吸。

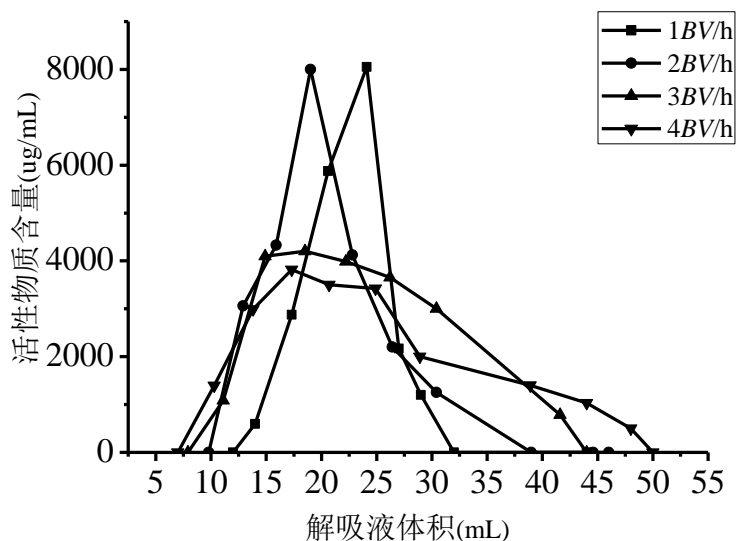


图 2-10 不同解吸流速下的动态解吸曲线

Fig. 2-10 Dynamic Desorption Curves under Different Desorbing Speeds

3.2.3 重复验证实验

取 51mL 预处理好的发酵液, 树脂用量为 15.5g (湿重), 体积为 19mL, 平行 3 次, 以 1BV/h 的流速进行上样, 之后用 2BV/h 的纯水冲洗, 最后用 3% 的氨水以 2BV/h 的流速解吸, 收集解吸液, 蒸干得到褐色膏状物质, 活性成分得率为 79.96%, HPLC 图谱上峰面积为 63%。具体结果见表 2-4 和图 2-11。

表 2-4 重复验证实验

Table 2-4 Repeated Verification Test

	Absorption efficiency (%)	Desorption efficiency (%)	Recovery efficiency (%)
1	94.89	92.65	79.60
2	93.89	95.34	79.03
3	96.01	93.13	81.25
Average	94.93	93.71	79.96
RSD (%)	1.12	1.53	1.44

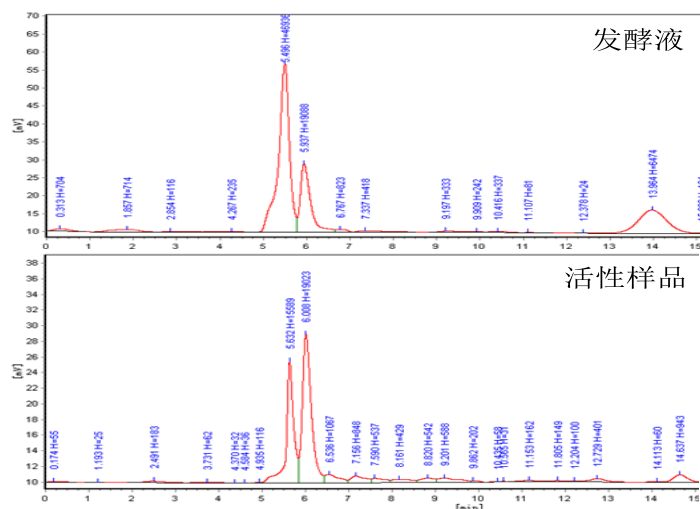


图 2-11 活性样品的 HPLC 检测图谱

Fig.2-11 HPLC spectrum of the bioactive sample

4 讨论

论文第一章中研究了硅胶柱层析提取发酵液中的活性成分，通过此方法得到了纯度约为 90% 的产品，可用于分析测试和抗菌机理的研究，但不适合于工业化生产。

为了克服硅胶柱层析方法的不足并得到得到纯度比较好的，可以用作生物原药的产品，本章采用阳离子交换树脂提取发酵液中的活性成分，其优越性在于工艺简单、操作简单、保持生物活性、提取率高，适合于工业化生产。

但是本章还存在一些不足：1. 筛选得到的解吸剂-3% 氨水，虽然可以高效的将活性成分从树脂上解吸下来，但是需要的解吸液的量较大，可以通过筛选新型解吸剂来解决此问题；2. 本章初步探讨了活性成分在阳离子交换树脂上的一些吸附特性，但研究的还不是很彻底，有条件的话，还可以再深入的研究。

5 小结

本章针对阳离子交换树脂种类、解析剂、pH 值等影响发酵液中活性成分吸附效果的因素进行了研究和综合比较。结果表明：在实验条件下，相对于其它树

脂, 7320 强酸性阳离子交换树脂对活性成分的吸附效果最好, 在 $\text{pH}=7$ 时, 吸附率达到 93.60%; 3% 氨水可有效地将活性成分从 7320 树脂上解吸下来, 解吸率为 95.00%。吸附动力学可用准二级速率方程进行拟合, 并且颗粒内扩散是主要的限速步骤。在实验研究范围内, 吸附等温线符合 Langmuir 方程; 由相关热力学公式计算得: $\Delta H > 0$; $\Delta S > 0$; $\Delta G < 0$, 表明树脂对活性成分的吸附是吸热、熵增的自发过程, 吸附过程中存在不可逆的化学变化。动态吸附和解吸实验表明: 上样流速越低, 泄露点出现的越迟; 解吸流速越低, 解吸效果越好。综合考虑, 确定发酵液以 1BV/h 进行上样、用 3% 氨水以 2BV/h 进行解吸, 最后将解吸液减压浓缩至褐色膏状, 活性成分得率为 79.96%, 纯度为 63%。

第三章 膜对发酵液中活性成分的提取工艺研究

1 实验材料

1.1 实验菌种和材料

本实验所用的发酵液产生菌、生物活性测定指示菌、培养基同第一章 1.1 和 1.2。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂

纯水、氢氧化钠、柠檬酸（均为国产分析纯）

1.2.2 主要仪器和设备

876-2 型真空干燥箱

YJ-875 型 医用净化工作台

GL-20G- II 型 高速冷冻离心机

YXQ.G01.280 型手提式高压蒸汽消毒器

MILLI-Q Labo 超纯水制备器(MILLI PORE 公司)

美国 Perkin Elmer Lambda 35 型紫外可见分光光度计

LJ6T-MF02-PV200 管式微滤设备

LJ6T-NF02-PV300 管式纳滤设备

超滤膜：PS10-1812C

纳滤膜：NF150-1812C

2 实验方法

2.1 膜渗透通量的计算

通常用单位时间内通过单位膜面积的溶剂透过量来表示渗透通量。公式如

下:

$$J_w = \frac{V}{S \cdot t}$$

其中, J_w 为渗透通量 $L/m^2 \cdot h$; S 为膜的有效面积 m^2 , t 为操作时间 h 。

2.2 料液固形物含量和澄清度的测定

固形物含量的测定: 取 1mL 的料液于 1.5mL 的离心管中, 于 12000rpm 下离心 10min, 得到固体沉淀物, 烘干后, 称其质量。

澄清度的测定: 取 1mL 的发酵液, 稀释 5 倍, 用蒸馏水做空白对照, 在 544nm 的波长下测定其透光度。

2.3 微滤过程研究

2.3.1 微滤操作压力对渗透通量的影响

往微滤设备内加入 600mL 料液, 分别在压力为 0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25; 0.3Mpa 的情况下进行微滤, 当微滤透过液达到 320mL 时, 停止操作, 记录操作时间以及透过液和残液的体积, 并计算出在不同压力条件下膜的渗透通量。

2.3.2 微滤操作温度对渗透通量的影响

在操作压力为 0.2Mpa 的条件下, 加入 600mL 料液, 料液温度设置为 20、25、30℃.按照 2.3.1 的实验方法进行操作。

2.4 超滤过程研究

2.4.1 超滤操作压力对渗透通量的影响

往超滤设备内加入 600mL 料液, 分别在压力为 0.1; 0.15; 0.2Mpa 的情况下进行超滤, 当透过液达到 400mL 时, 停止操作, 记录操作时间以及透过液和残液的体积并计算出在不同压力条件下膜的渗透通量。

2.4.2 超滤操作温度对渗透通量的影响

在操作压力为 0.15Mpa 的条件下, 加入 600mL 料液, 料液温度设置为 20、25、30℃.按照 2.4.1 的实验方法进行操作。

2.5 纳滤操作过程

2.5.1 纳滤操作压力对渗透通量的影响

往纳滤设备内加入 600mL 料液，分别在压力为 0.1；0.15；0.2Mpa 的情况下进行纳滤，当透过液达到 400mL 时，停止操作，记录操作时间以及透过液和残液的体积并计算出在不同压力条件下膜的渗透通量。

2.5.2 纳滤操作温度对渗透通量的影响

在操作压力为 0.15Mpa 的条件下，加入 600mL 料液，料液温度设置为 20、25、30℃。按照 2.5.1 的实验方法进行操作。

2.5.3 pH 对纳滤膜分离性能的影响

在操作压力为 0.15Mpa、料液温度为 30℃的情况下。将料液 pH 分别调节为 3、4、5、6、7、8，按照 2.5.1 的方法进行操作，测定浓缩液和透过液中活性成分含量，计算活性成分收率。

2.5.4 浓缩倍数对纳滤膜分离性能的影响

在操作压力为 0.15Mpa、料液温度为 30℃、pH 为 7 的情况下，向纳滤设备内不间断加入 1.2L 料液，测定在浓缩 2、3、4、5、6 倍的情况下，浓缩液中活性成分的含量并计算收率。

2.6 微滤-超滤-纳滤全通实验

取料液 2L，进行微滤（压力：0.2 Mpa、温度：30℃）-超滤（压力：0.15 Mpa、温度：30℃）-纳滤（压力：0.15 Mpa、温度：30℃、料液 pH 7）全通实验，计算最后产品的浓缩比（ R_1 ）和收率（ R_2 ）

其中： $R_1=V_1/V_2$ ； $R_2=(C_2V_2/C_1V_1) \cdot 100\%$

式中： V_1 和 V_2 分别为原液与浓缩液的体积； C_2 为浓缩液浓度， C_1 为原料液浓度。

3 实验结果

3.1 微滤实验

3.1.1 不同操作压力下的微滤渗透通量

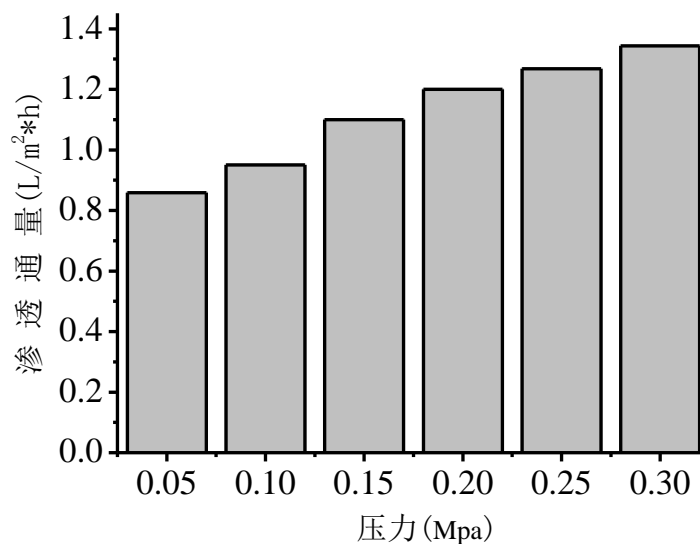


图 3-1 不同操作压力下的渗透通量

Fig.3-1 Effect of pressure on membrane flux

由实验结果可知，随着实验操作压力的提高，膜渗透通量在逐渐提高，但是从减少能耗和兼顾设备生产能力的角度综合考虑，操作压力维持在 0.2MPa

3.1.2 不同操作温度下的微滤渗透通量

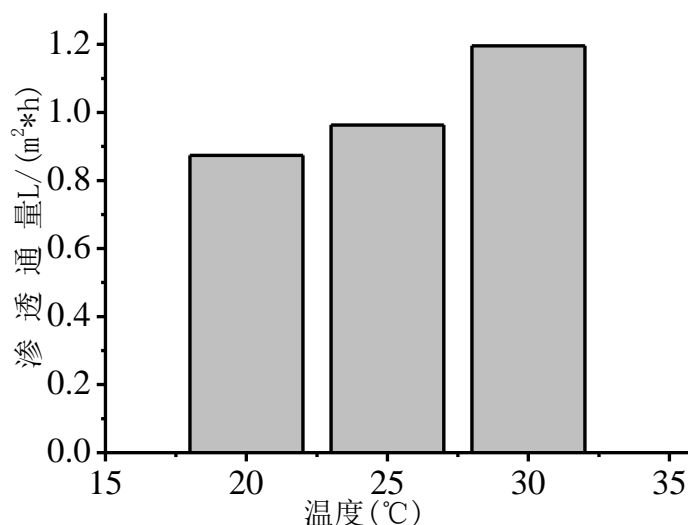


图 3-2 不同温度下的膜渗透通量

Fig.3-2 Effect of temperature on membrane flux

从实验结果中看出随着温度的提高，渗透通量逐渐提高，可能的原因是随着温度的升高，发酵液的黏度减小，通量增加。将 30°C 作为微滤操作温度。

3.1.3 微滤后透过液中固形物含量和澄清度的测定

通过测定，微滤后透过液相对于原发酵液，固形物除去率为 78.23%、色素除去率为 66.82%。

3.2 超滤实验

3.2.1 不同操作压力下的超滤渗透通量

由于超滤过程近似于一定操作条件下的机械筛分过程，膜两侧的操作压力作为过程推动力，对超滤膜分离特性具有较大影响。本实验利用 MWCO 为 10000 的聚砜超滤膜对微滤透过液进行超滤实验，对不同操作压力下的膜通量进行测定，结果见图。

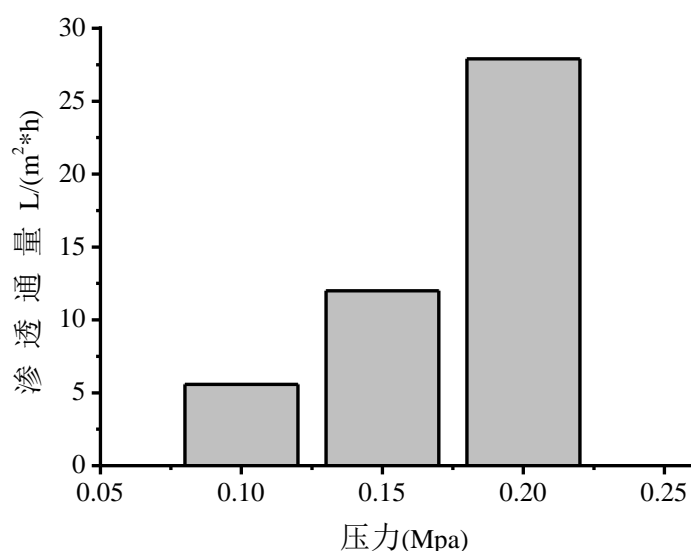


图 3-3 不同操作压力下的超滤膜渗透通量

Fig.3-3 Effect of pressure on membrane flux

由图可以看出,随着操作压力的增大,料液透过通量增加效果明显。但是在实际的超滤实验中,压力太低,膜的渗透通量会很小,运行时间就会延长,生产周期的延长是导致杂质产生的原因之一;压力太高,动力消耗就增大,成本就会增加。所以选择一个最佳压力是不可缺少的超滤实验步骤。本实验将 0.15Mpa 作为超滤操作压力。

3.2.2 不同操作温度下的超滤渗透通量

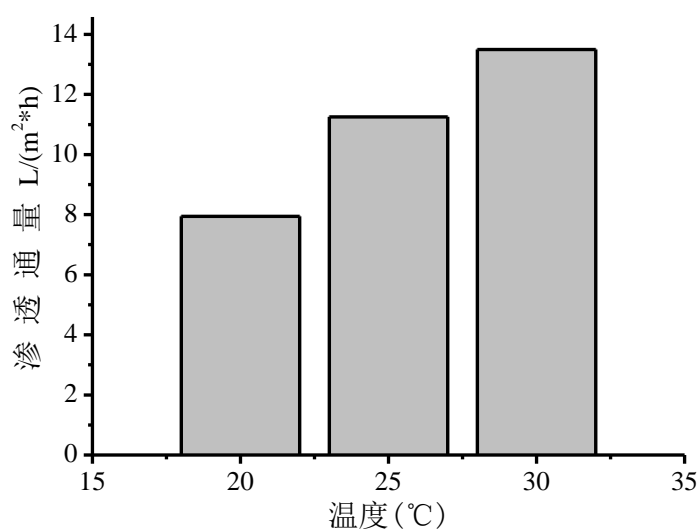


图 3-4 不同温度下的超滤膜渗透通量

Fig.3-4 Effect of temperature on membrane flux

料液温度主要影响有机膜的孔径、膜阻力和料液的粘度,从而使膜通量发生变化。有研究表明:在一定的温度范围与压力条件下,温度每升高 1°C ,膜通量增加 $1\% \sim 2\%$ ^[17]。在本实验中,随着温度的升高膜渗透通量也随之增加,将 30°C 作为超滤操作温度。

3.3 纳滤实验

3.3.1 不同操作压力下的纳滤渗透通量

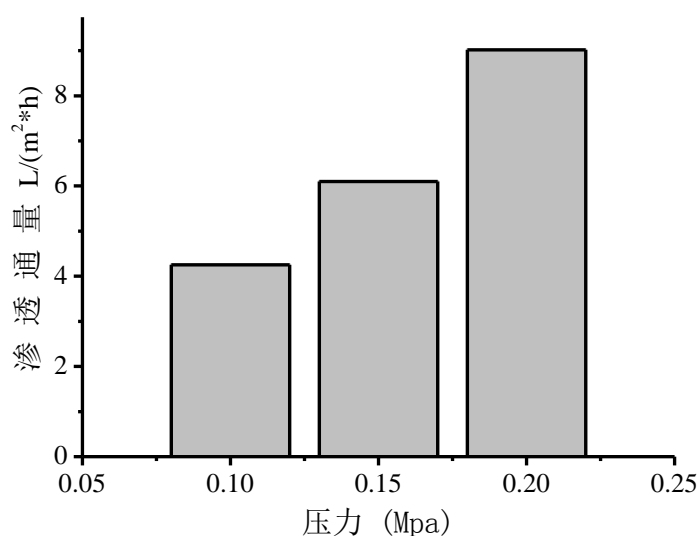


图 3-5 不同操作压力下的纳滤膜渗透通量

Fig.3-5 Effect of pressure on membrane flux

在实验操作范围内,随着压力的提高,膜渗透通量增大,从实际考虑,确定 0.15Mpa 作为纳滤操作压力。

3.3.2 不同操作温度下的纳滤渗透通量

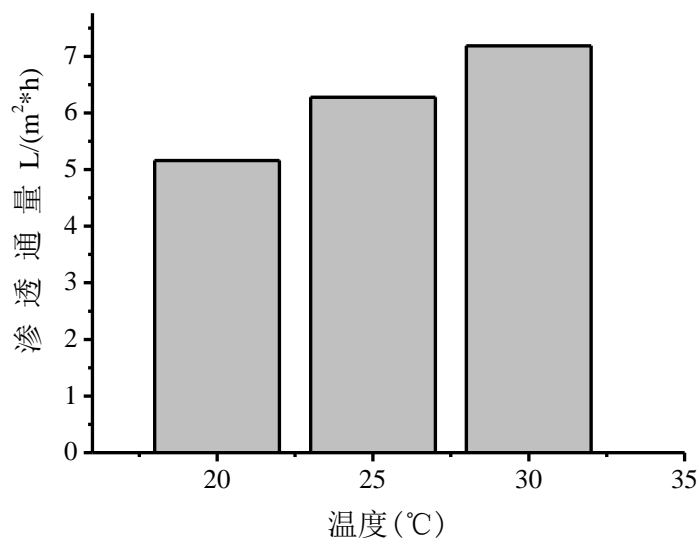


图 3-6 不同温度下的纳滤膜渗透通量

Fig.3-6 Effect of temperature on membrane flux

纳滤膜渗透通量随着操作温度的提高，渗透通量提高，将 30℃作为纳滤操作温度。

3.3.3 pH 对纳滤膜分离性能的影响

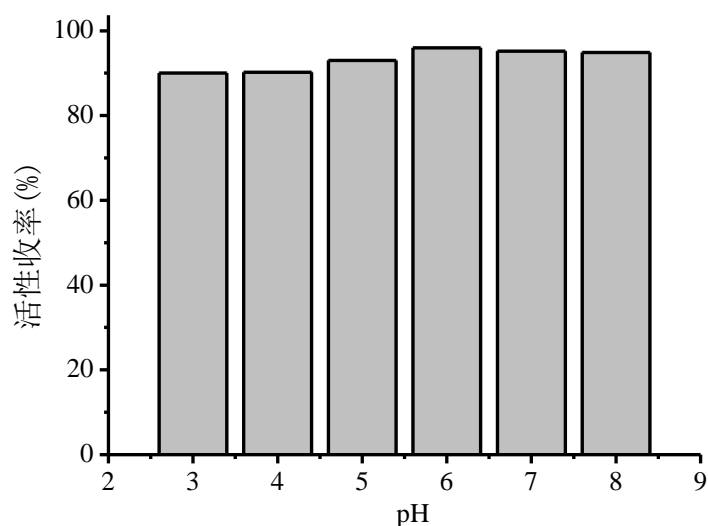


图 3-7 料液 pH 对膜分离性能的影响

Fig.3-7 Effect of the pH on separation performance of nanofiltration

根据实验室前期的研究，发酵液中活性成分在碱性条件下不稳定，故在纳滤

实验中，主要考察了酸性和中性条件下料液 pH 对纳滤膜分离性能的影响。由实验结果可以看出，在料液 pH 为中性条件时，纳滤膜对活性成分的截留率要好于偏酸性条件，产生此现象的原因可能是在酸性条件下，活性成分带正电荷，而纳滤膜（复合膜）上有负的带电基团，异性相吸，使活性成分在膜面处吸附层加厚，膜面处浓度大于主体浓度和膜相浓度，浓差极化现象增强，浓差梯度使得扩散作用加强，静电作用和浓差极化双重作用使得截留率较低。为此，将纳滤料液 pH 设为 7。

3.3.4 浓缩倍数对纳滤膜分离性能的影响

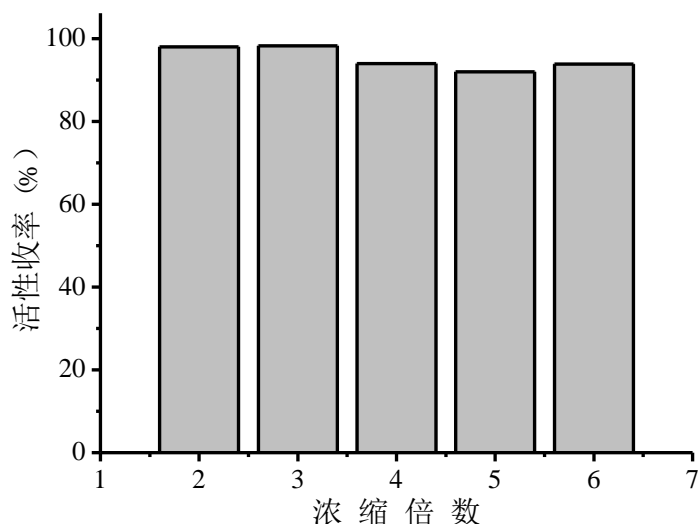


图 3-8 浓缩倍数对膜分离性能的影响

Fig.3-8 Effect of the concentration time on separation performance of nanofiltration

由实验结果可以看出，随着浓缩倍数的增加，截留率变化不大，这对料液的高倍数浓缩来说是一个好的实验结果。

3.4 微滤-超滤-纳滤贯通实验

将 2L 发酵液进行微滤实验，得透过液 1.6L，在剩余残液中加入 150mL 纯水进行洗膜，洗 3 次，最后得到水洗液 452mL；将微滤透过液和水洗液共 2052mL 进行超滤实验，得超滤透过液 1.7L，在残液里加入 100mL 纯水洗膜，洗 3 次，最后得到水洗液 295 mL；将超滤透过液和水洗液共 1995mL 进行纳滤浓缩，最后得到 343mL 浓缩液，相当于将发酵液浓缩了 5.8 倍，发酵液中活性成分收率为 83%

4 讨论

本章采用微滤膜-超滤膜-纳滤膜提取发酵液中活性成分，相对于第二章得到的农药原药，膜提取工艺可以得到浓度较高的液体产品，可用于制备农药母药或制剂。同时膜工艺也具有操作简单、提取率高和保持生物活性等特点，且对原料液起到了很好的脱色和除浊的效果。

通过本章的研究，完善了链霉菌 XBP-03 次级活性代谢产物相关的提取工艺，使我们得到所需的产品的方式和用途更加多样化，可以针对不同的需要选用不同的提取工艺。

但是，本章也存在一些不足：首先，由于实验室设备的限制，只研究了低压力和低温度下的过滤效果，以后如果有条件，可以适当的把实验做的更完善一些。再者，由于时间有限，只对单一膜材料进行了研究，希望以后对多种膜材料进行研究。

5 小结

1. 在微滤实验中，确定了操作压力为 0.2Mpa、操作温度为 25℃，在此条件下，微滤透过液中固形物除去率为 78.23%、色素除去率为 66.82%。
2. 在超滤实验中，确定了操作压力为 0.15Mpa、操作温度为 30℃。
3. 在纳滤实验中，确定了操作压力为 0.15Mpa、操作温度为 30℃、料液 pH 为 7；在浓缩 6 倍时，活性成分还是有一个比较高的收率。
4. 在微滤-超滤-纳滤贯通实验时，将 2L 发酵液浓缩 5.8 倍后，得到 343mL 浓缩液，其中活性成分收率约为 83%。

参考文献

- [1] 沈寅初, 张一宾编. 生物农药[M]. 北京: 化学工业出版社. 2000.
- [2] 范玲. 微生物农药研究进展及产业发展对策. 中国生物工程杂志[J]. 2002, 22(5):83-86.
- [3] 李勇, 杨慧敏. 微生物农药的研究和应用进展[J]. 贵州农药科学, 2003,31(2):62-63.
- [4] 朱昌雄, 宋渊. 我国农用抗生素的现状与发展趋势探讨[J]. 中国农业科技导报, 2006, 8(6):17-19.
- [5] 高菊芳编译, 亦冰校. 生物农药的作用、应用与功效(一)-微生物产物农药[J]. 世界农药, 2001,23(1):1-11.
- [6] Lin Birun(林璧润), Yang Limei(杨丽梅), Jiang Xuebin(江学斌)等. 管蝶法测定抗生素 2507 的技术条件探讨[J]. 广东农业科学, 1998(2):38-41
- [7] 陈刚, 邱家山, 赵红卫等. 新型离子交换树脂 CG-6 对人凝血酶原复合物的吸附行为分析及研究. 离子交换与吸附[J]. 2007, 23(2):166-174.
- [8] 谢祖芳, 童张法, 陈渊等. 弱碱性树脂吸附-解吸苦味酸. 环境工程学报[J]. 2012, 6(9): 3131-3136.
- [9] 张青梅, 郑寿荣, 王家宏等. 胺基树脂的合成及对水中重金属离子的吸附特征. 环境工程学报[J]. 2010, 4(12):2657-2661.
- [10] Wei R X, Chen J L, Chen L L, et al. Study of absorption of lipoic acid on three types of resin. Reactive & Functional Polymers [J]. 2004, 59(3):243-252.
- [11] 郑建仙主编. 食品分离重组工程技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998.
- [12] 杨莉丽, 康海彦, 李娜等. 离子交换树脂吸附镉的动力学研究. 离子交换与吸附[J].2004, 20(2):138-143.
- [13] 张利, 冯喜文, 刘春新等. 大孔树脂吸附金丝桃素的动力学和热力学研究. 安徽农业科学[J]. 2010, 38(28):15612-15615.
- [14] 孙蕾蕾, 马丽娜, 渠飞翔等. 山楂汁中总酸和黄酮在 D941 树脂上的吸附动力学和热力学. 离子交换与吸附[J]. 2013, 29(3): 228-235.
- [15] Bautista L F, Martinez M, Aracil J. AIChE Journal [J]. 1999, 45(2): 761-768.
- [16] Kilic M, Yazici H, Solak M Bioresour. Technol [J]. 2009, 100(7): 2130.
- [17] Magara Y. The effect of operational factors on solid/liquid separation by ultra-membrane filtration in a biological denitrification systems for collected human excreta treatment plant[J]. Wat Sci Tech, 1991,23(12):1583-1590.

核苷类抗生素有效成分的研究进展

引言

核苷类抗生素是一类主要由微生物产生的, 具有生物活性的次级代谢产物, 此类化合物通常是由核苷或核苷酸经过一系列后修饰所形成的结构比较精细复杂的分子, 因此具有广谱生物活性(如抗真菌、抗细菌、杀虫、除草、抗肿瘤、抗病毒以及免疫抑制和激活作用等)^[1]。近年来, 随着生物技术的进步, 核苷系列产品包括核苷酸、核苷及其衍生物得到广泛使用。其中核苷类化合物在抗病毒、抗肿瘤方面, 展示了不可取代的独特作用。美国 FDA 批准的抗艾滋病药物中大部分都是核苷类衍生物。核苷类药物有望成为继磺胺药和抗生素之后的新一代具有重要作用的药物^[2]。

抗生素的生物活性与其结构密切相关, 在核苷类抗生素中结构简单的核苷类似物通常抑制核酸的生物合成, 结构复杂的核苷类似物则对蛋白或多糖的生物合成起到抑制作用。核苷类抗生素自发现以来就得到了广泛应用。例如, 嘌呤霉素(puromycin)被广泛用于研究蛋白质的合成机制;多氧霉素(polyoxin)^[1]、杀稻瘟菌素 S (blasticidin S)^[1]、米多霉素(mildiomyacin)^[2]、及中生菌素(zhongshengmycin)^[3]在农业上被广泛用于植物病害防治。

基于核苷类化合物的结构多样性和特殊性、复杂广泛的生理生化活性和较好的理化性质稳定性, 对其的关注和重视程度也越来越高。

本文概括了研究抗生素有效成分的必要性以及其表示方法、对核苷类农用抗生素有效成分的分离纯化方法做了总结、对筛选新型核苷类抗生素有效成分、核苷类抗生素的应用情况做了研究。

1 研究抗生素有效成分的必要性以及表示方法

1.1 研究抗生素有效成分的必要性

在一种发酵液中，可能包含有很多种组分，除了一种或几种有较强活性外，其他组分活性很小或者没有活性。有的产品（如发酵液浓缩液）存在着效价低，药效不稳定的缺点，其原因之一就是对该抗生素的有效组分缺乏研究。

同时，人们逐渐认识到农用抗生素作为生物产生的活性化学物质，本质上和化学农药一样，是具有一定分子量的化学物质。因此，研究开发新农用抗生素也应该和化学农药一样在阐明其化学结构的基础上对它的安全性及对环境的影响进行详尽的研究，从而为研究农用抗生素的构效关系、作用机理以及应用化学修饰技术，对一些天然农用抗生素有效成分的结构进行改造提供了物质基础，进一步发挥农用抗生素的优越性，使其更好的服务于农业^[4]。

1.2 有效成分表示方法

抗生素类药物为生理活性物质，其大多为微生物发酵后经化学精制或化学半合成而制得。抗生素效价的标示量，原则上应按所含特定的抗菌活性部分的重量来计算。但是，在工业生产及临床使用的抗生素中，并非都是达到百分之百的纯品，有的已习惯上使用一种效价单位。因此，在实际应用上，抗生素类有效成分的表示方法，是按照各种抗生素的特点及使用经验，采用符合客观实际的效价单位表示。常用的抗生素效价单位有重量单位、类似重量单位、重量折算单位、特定单位。

1.2.1 重量单位

以抗生素中所含特定的抗菌活性部分（纯游离碱或游离酸）的重量 1 微克作为 1 单位，即 1 毫克=1000 单位。如链霉素硫酸盐、土霉素盐酸盐等均以重量单位表示。用这种方法表示，对不同有机酸根的同一种抗生素，只要单位一样或有效部分重量一样，则这一抗生素的各种盐类虽然称重不同，但实际有效含量是相同的。

1.2.2 类似重量单位

以特定的纯抗生素制品盐的重量 1 微克作为亚单位，即 1 毫克=1000 单位，

其中包括了无抗菌活性的酸根在内,如四环素盐酸盐(包括无生物活性的盐酸根在内)。这种类似重量单位,虽然并不合理,但在国际上已经习惯沿用。

1.2.3 重量折算单位

以特定的纯抗生素制品的某一重量为二单位而加以折算。如第2次青霉素国际标准品(1952年)青霉素G钠称重0.5998微克为1单位,即1毫克=1670单位,那么80万单位的青霉素G钠称重应为0.48克。虽然青霉素G制品现已完全可用化学或物理方法检验其含量,但仍广泛使用效价单位的表示方法。

1.2.4 特定单位

以一特定量的抗生素标准品(或对照品)作为1单位。如第1批杆菌肽国际标准品(1953年)杆菌肽A为1毫克=55单位。制霉菌素(1963年)为1毫克=3000单位等。由于这类抗生素的效价单位或者折算效价很难确定或难以计算,因此只能以国际标准品的效价单位,作为比较的基准。目前,抗生素的剂量原则上以纯品的重量表示,并加注单位。如土霉素0.25克(250000单位);个别品种仍以习惯沿用,如青霉素仍用单位表示剂量。

2 核苷类农用抗生素有效成分的分离和鉴定方法

2.1 核苷类农用抗生素有效成分的分离技术

不同的核苷化合物结构各有特点,来源和分离目标产物的目的也不尽相同,所以在分离提取中用到的技术也难以统一。目前,国内相关单位对提高发酵产量的研究较多,但对提取工艺的研究却相对较少。本文对目前国内外在核苷分析检测及分离中常用的薄层色谱和柱色谱法进行介绍,以期从事本项研究工作的人士提供参考。

2.1.1 薄层层析法

薄层层析是一种简便、快速、微量的层析方法,是以撒布到平面(如玻璃片)上、形成薄层的吸附剂做为固定相(分离介质),再选用适当的溶剂做为流动相进行层析,通过被分离物质在固定相和流动相中的分配系数不同而实现分离。

目前已有多种分离介质用于薄层层析:如黄红兵等^[5]用0.13% CMC(含4%磷酸氢二钠)调制的硅胶GF254为固定相,以氯仿:醋酸乙酯:异丙醇:水:

浓氨水(8: 2: 6: 0.3: 0.2) 为流动相, 分离了得到了赤芝子实体中的核苷。此法具有简单易行、结果可靠、专属性强等优点。徐文豪等^[6]用薄层层析(硅胶 GF 板) 结合柱色谱, 从西藏产冬虫夏草的子座中分离得到次黄嘌呤核苷、腺苷、胸腺嘧啶等物质。邱蔚然^[7]用凝胶薄层层析分离并测定肌苷。

在薄层色谱中, 当展开剂(流动相) 向一个方向运动时称为一维展开。而当被分离物质成分复杂时可采用二维展开, 即一维层析展开后再在垂直方向上进行第二次展开, 2 次展开可采用不同极性的展开剂系统。吴有光等^[8]为筛查代谢异常病, 采用在同一块薄层板上进行多相二维分离的方法, 对临床采集的血样和尿样进行检测, 分离出了 20 余种核苷类化合物。

2.1.2 柱色谱法

柱色谱法是将固定相均匀地填充于柱管内构成色谱柱, 利用被分离物质在固定相和流动相之间的分配系数差异而实现分离。由于被分离物质分子在柱内与固定相和流动相相互接触的路径长, 因此分离效果好、分辨率高, 一次性可处理较大体积的样品, 当样品液体积较大而其中的待测物浓度较低时, 仍可有效分离。若采用高压输送流动相、高效固定相并且联接上在线检测器等, 则分离效能更高, 应用范围更广。较之薄层色谱, 柱色谱具有灵敏、快速以及上样量大等优点。目前, 用于核苷类化合物分离的分离介质主要有硅胶、离子交换树脂、大孔树脂、活性炭、氧化铝、凝胶和十八烷基硅胶等。

2.1.2.1 硅胶柱层析

硅胶是一种酸性吸附剂, 适用于酸性或中性物质的分离。因其具有硅氧交联结构且表面有许多作为活性基团的硅醇基, 故能与极性化合物或不饱和化合物形成氢键而具有吸附性。硅胶柱层析属于吸附层析, 分离的效果取决于固定相、流动相和被分离化合物的性质三个因素。核苷类化合物杂环中的氮以及各种取代基具有结合和释放质子的能力, 故具有酸性和碱性解离的性质, 控制溶液的 pH 值可改变该类化合物的解离状态, 达到与其他化学成分分离的目的, 再通过硅胶柱使不同极性的核苷类化合物分离。汪宇等^[9]将人工培养蛹虫草子座的干品经过浸提、过滤、浓缩、萃取等一系列步骤后制成浸膏, 与少量硅胶拌样后晾干, 在硅胶柱上以氯仿-甲醇洗脱, 得到了腺苷和虫草素。

十八烷基(octadecylsilyl, ODS 或 C18) 硅胶是常用的非极性键合相, 是将十

八烷基氯硅烷试剂与硅胶表面的硅醇基经多步反应生成 ODS 键合相, 用于高效液相分析检测或分离制备。王忠华等^[10]研制了一种新型含极性基团的芳烃键合固定相: 苯胺甲基键合硅胶(PAMS) 固定相, 它对被分离物质的主要保留机制为疏水作用和 π - π 作用, 同时亚氨基的存在使该固定相还具有氢键和离子交换作用。作者以 0.02 mol/L 的 K_2PO_4 溶液(pH 4.0) 为流动相, 在 PAMS 固定相上快速分离了核苷和碱基。与 ODS 柱相比, PAMS 固定相与溶质间的疏水作用远小于 ODS 柱。此外, 部分核苷和碱基在 PAMS 固定相上的流出顺序与 ODS 上的不同, 说明除了疏水作用外, 该固定相还有离子交换、静电作用等保留机制存在。1986 年, Long 曾用十八烷基反相 高效液相色谱联用阴离子交换高效液相色谱法, 使嘌呤和核苷在十八烷基硅胶柱上得到分离, 核苷酸则在阴离子交换柱上得到分离。

2.1.2.2 离子交换树脂层析

离子交换层析(ion exchange chromatography, IEC)是以离子交换剂为固定相, 利用流动相中的组分离子与交换剂上的平衡离子进行可逆交换时的结合力的大小进行分离的一种层析方法。用阴/阳离子交换树脂进行核苷分离时, 可通过调节样品 pH 值或其他方法, 使待分离物质带有易吸附在阳离子或阴离子交换树脂上的负电荷或正电荷, 然后选择合适的溶剂(流动相) 进行洗脱。Li^[11]用阴离子交换固定相 SAX-SPE 分离 2'-脱氧尿苷, 然后再用 HPLC 和常压化学电离质谱法(APCI-MS) 进一步检测。在此法中, 2'-脱氧尿苷和 5'-碘-2'-脱氧尿苷的平均回收率分别达到 81.5% 和 78.6%。由于该方法具有处理能力大、去除盐等杂质、可反复使用、操作简单、成本低等特点, 是抗生素分离领域的重要方法之一。

2.1.2.3 大孔吸附树脂层析

大孔树脂的孔径和比表面积大, 具有物理化学稳定性高、吸附容量大、选择性好、吸附速度快、解吸条件温和等优点。而且, 大孔吸附树脂还有非极性、中等极性、极性和强极性之分, 随着有机材料的不断发展, 不同性质大孔吸附树脂填料相继出现, 也使得大孔吸附色谱在抗生素分离领域的使用范围越来越广, 可以用于分离非极性、中等极性、强极性等抗生素。凡属于弱电解质或非离子型的核苷类化合物均可用大孔吸附树脂进行分离纯化。余竞光等^[12]采用 GDX-105 大孔吸附树脂, 以水为流动相, 分离得到了尿嘧啶和尿苷。廖文彬等^[13]在对红树林放线菌产生的抑菌活性物质进行提取分离时, 以大孔吸附树脂 AB-8 作为柱层析

固定相, 结合 732 型阳离子交换柱层析及其他方法, 获得了 2 个核苷类抗生素。其中, 经阳离子交换后的回收率为 77.15%, 经过 AB-8 后回收率为 55.45%。徐文豪等^[14]采用离子交换树脂、大孔吸附树脂、多次硅胶柱层析及薄层层析, 从藏产冬虫夏草的子座中分离得到了次黄嘌呤核苷、胸腺嘧啶、尿嘧啶等物质。李锋等^[15]用大孔树脂、硅胶、聚酰胺和 Sephadex LH-20 反复柱层析得到了核黄素、核苷等物质。田宝泉等用聚酰胺、大孔树脂、硅胶、RP-18、SephadexLH-20 反复柱层析分离了腺苷等物质。

2.1.2.4 活性炭吸附层析

以活性炭作为固定相的柱技术, 利用其强大的吸附力将溶液中的核苷类物质富集于活性炭上, 再以合适的方法将目标物解吸下来, 最后使用结晶等技术获得纯品。如在 1984 年, 日本 Takeda 化工股份有限公司的工作人员将经树脂处理过的含有核苷酸、核苷、嘌呤的溶液的酸碱度调至 pH 9, 再将其加入活性炭柱中, 对吸附剩余液进行分析表明, 活性炭柱对核苷和嘌呤的吸附率达 100%。该公司的研究人员还用活性炭柱对核苷、核苷酸进行了分离: 将含有核苷、核苷酸、嘌呤的溶液调至酸性, 经过活性炭柱, 用水冲洗炭柱后通入 NaOH 溶液, 将吸附于柱上的核苷酸洗脱下来; 再用醇及 NaOH 溶液可将核苷解吸下来, 回收率可达 90%以上。我国也有使用活性炭柱分离提取肌苷的报道^[16,17]。

2.1.2.5 毛细管电色谱法

毛细管电色谱(capillary electrochromatography,CEC) 是以电渗流(或电渗流结合高压输液泵) 为流动相的驱动力, 利用电泳迁移和色谱固定相的保留机制达到物质分离的目的。一般而言, 溶质与固定相间的相互作用对分离起主导作用。该法有很大的选择性, 可以根据不同核苷类物质的分子性质(如分子大小、电荷数、疏水性等) 进行有效的分离。Weiss 等^[18]用毛细管电泳-安培检测法测定可作为癌变及与氧自由基相关疾病判断指标的 8-羟基脱氧鸟苷(8-Hydroxydeoxyguanosine,8-OHdG) 的含量。Ohyama^[19]将 3-(4-磺基-1, 8-萘二甲酰氨基) 甲硅烷基硅胶(SNAIP) 作为毛细管电色谱中的固定相, 利用被分离物质与固定相的静电作用和疏水作用不同, 以甲醇-水的磷酸缓冲溶液作为流动相成功分离了核苷和核苷酸的碱基。梅素容等^[20]建立了毛细管电泳-柱末安培检测法测定尿中的 8-OHdG, 采用一步固相萃取法预处理及动态 pH 调节进样, 在长度为 75 cm、内径为 25 μm 的毛细管柱上, 以 30 mmol/L 的硼砂溶液(pH 9.12)

为流动相, 在分离电压为 20 kV, 进样时间为 10 s 的条件下, 对被测定物的检测限达到了 20 nmol/L, 该方法操作简单、灵敏、高效, 十分适合临床诊断检查。明永飞等^[21]研究了毛细管胶束电动色谱分离几种核苷所需的分离条件, 以含 30 mmol/L 十二烷基硫酸钠(SDS) 和 3% 乙腈的 36 mmol/L 硼酸缓冲液(pH 9.0) 为流动相, 在分离电压为 25 kV、分离温度为 25℃时, 在 6min 内即可成功分离 5 种核苷(胞苷、尿苷、鸟苷、肌苷、胸苷), 迁移时间的重现性误差小于 1%; 面积的重现性误差小于 3%。凌建亚等^[22]用超声波从虫草属真菌中提取虫草素, 并以高效毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE) 分离测定。在分离电压为 20 kV、检测波长为 258 nm、进样时间为 5 s、柱温为 20℃的条件下, 以 0.025 mol/L 硼砂溶液(pH9.4) 为流动相, 运行时间 5 min, 最终, 虫草素的加样回收率为 97.2%, RSD 为 1.38% (n= 6)。CZE 法用于少量生物样品中核苷和脱氧核苷类物质的检测, 操作简便, 在一定程度上弥补了 HPLC 法的不足。

2.1.2.6 凝胶层析法

凝胶层析是利用孔结构的不同大小来分离不同大小的物质, 所用的基质材料凝胶是一种球形颗粒状高分子材料, 不溶于水, 具有一定的孔径分布, 在水中可膨胀, 大分子由于无法进入微孔, 因此在柱中所走的路径短, 被洗脱出层析柱, 而小分子由于经过的路径较长、阻力较大而后被洗脱流出, 因此可按照分子大小的顺序实现各组分之间的分离。Pelegrini 等^[23]利用凝胶 S-200 柱层析配合反相层析技术从植物种子中分离得到一种新型抗菌肽。

2.1.2.7 其他分离方法

Jokela^[24]将一种交联了木糖异构酶的晶体(CLXIC)作为固定相进行柱层析, 发现可以很好的分离尿苷、胞苷、腺苷、鸟苷、胸苷。加入流动相后的各个样品的洗脱顺序与样品分子中各碱基组分的含量百分比有关。研究发现核苷分子与 CLXIC 固定相之间的作用不仅是离子交换或疏水作用, 还存在碱基分子与 CLXIC 特殊的交换作用。

Goosens^[25]采用正相、反相硅基纤维素和直链淀粉手性作为固定相成功分离了单核苷酸前药 3'-叠氮脱氧胸苷(AZT) 的非对映异构体。陈顺志^[26]采用超临界 CO₂ 萃取技术从虫草中提取得到了虫草素。有报道称, 在实际生产中该技术具有所需溶剂少并且产品纯度好、得率高等优点。在中试研究中已达到每次投料量 4 kg 的规模, 预计此法适用于高纯度虫草素的大规模生产。

2.2 核苷类农用抗生素有效成分的分离流程

随着微生物源农用抗生素研究的深入,核苷类和核苷肽类农用抗生素被开发出来,有些已经在农业生产中发挥着重要作用。基于核苷类抗生素复杂广泛的生理生化活性和较好的理化性质稳定性,对其的关注和重视程度也越来越高。因此,分离纯化核苷类抗生素有效成分成为近年来的研究热点。

在现阶段,关于抗生素多组分的研究很多,有着重要的意义。有的新组分是合成某些抗生素药物的中间体,价格也较昂贵,如果将其提取纯化,可望产生显著的经济效益和社会效益。此外,由于在菌种发酵过程中会产生各种相关的类似物,可能是抗菌作用更好而毒副作用更小的抗生素,也可能是成为新的潜在药物品种。由此可见,明确一种抗生素中各组分的功能,对于其高效的利用具有重要作用。

2.2.1 云南霉素

云南霉素是一个对肿瘤细胞有抑制作用的物质,其是云谷霉素(谷氏菌素)的水解产物。它具有很强的抗肿瘤活性及很弱的抗微生物活性。结构如下:

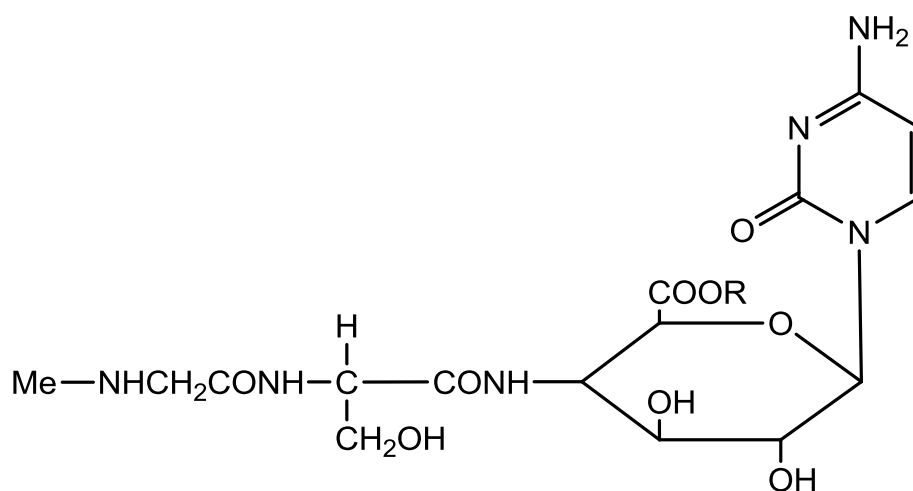


图 4-1 云南霉素结构式

分离流程如下所示：

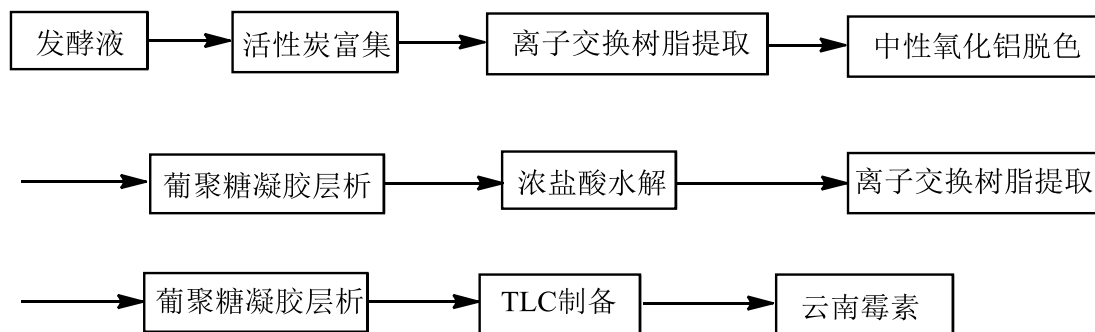


图 4-2 云南霉素分离纯化流程图

具体的步骤为：

- 1.发酵液经过活性炭富集、阳离子交换树脂提取后得到活性部分。
- 2.活性部分经过中性氧化铝脱色、葡聚糖凝胶层析后得到进一步纯化。
- 3.纯化后的活性部分再经过浓盐酸水解、阳离子交换树脂提取、葡聚糖凝胶层析和 TLC 制备后，样品经冷冻干燥即可得到云南霉素。

可以看到，在云南霉素的分离纯化过程中，主要用到了各种柱层析的方法，同时，要将每一步的结果进行活性跟踪，并将活性部分进行下一步的分离提取。由于柱层析具有高通量、简便快捷等特点，大大的提高了效率。但是由于以上分离过程比较复杂，增加了成本，降低了效率。因此，可以考虑筛选其他的分离介质来高效的分离云南霉素以减少工作量。

2.2.2 嘧肽霉素

嘧肽霉素是新型的抗病毒农用抗生素，由不吸水链霉菌(*Streptomyces achyrosopicus*) 产生。其对烟草花叶病毒病、番茄病毒病、辣椒病毒病、瓜类病毒病以及玉米矮花叶病毒病等均有明显的防治效果^[27-28]。目前，已经报道了 3 种从嘧肽霉素产生菌发酵液中分离出的生物活性物质，将三种组分分别命名为 A,B,C；其分子量分别为 417,1008 和 244。

下面介绍一下组分 B, C 的分离流程

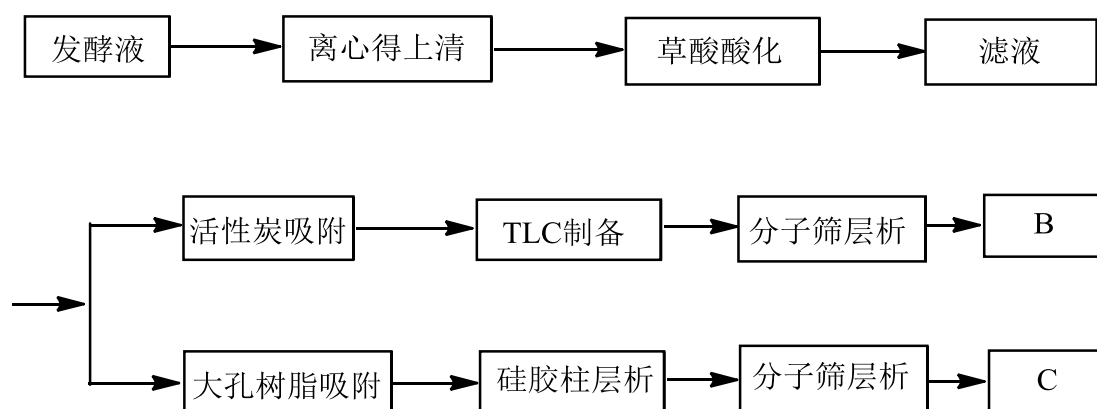


图 4-3 嘧肽霉素有效成分分离纯化流程图

具体的步骤为:

1. 发酵液 4000r/min, 离心 10-15min; 将上清液用草酸酸化, 50-60 度水浴, 过滤得滤液。

2. 将滤液用活性炭进行吸附 (50% 丙酮洗脱); 活性炭吸附物用 TLC 进行制备 (展层体系为正丁醇: 无水乙醇: 冰醋酸: 水(V/V)=30:10:3:7); 最后将活性成分进行 Sephadex LH-20 分子筛层析 (60% 甲醇洗脱), 即可得到 B 组分。

3. 将滤液用 SP825L 吸附 (50% 甲醇洗脱); 吸附物进行正相硅胶柱层析 (流动相为氯仿: 正丁醇: 甲醇: 乙酸=42:2:4:2); 最后将活性成分进行 Sephadex LH-20 分子筛层析 (60% 甲醇洗脱), 即可得到 C 组分。

从流程图可以看出, 在组分 B 和 C 的分离过程中整合了活性炭和大孔吸附树脂高通量、TLC 和硅胶柱层析操作简便以及 Sephadex LH20 分离度高的特点, 兼顾了成本和效率问题, 形成了基本的分离路线。但是仍然有多处可以进行改进。如在大孔吸附树脂和活性炭分离过程中, 可以考虑采用梯度洗脱代替等度洗脱, 以成分发挥其分离优势; 硅胶柱层析时寻找可以替代氯仿的洗脱剂, 这样可以减少有毒物质的用量; Sephadex LH-20 分离中可以考虑过载上样来提高效率。

2.2.3 抑霉菌素

抑霉菌素是由浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所筛选的一种核苷

类抗生素，产生菌为刺孢吸水链霉菌天目山亚种（*S.hygrospinosus vartianmushanensis n.var.Sang et al*），其对白色假丝酵母、炭疽病菌、纹枯病菌等真菌的生长有强抑制活性，对灰霉病菌、枯萎菌、稻瘟病菌的生长有较强抑制活性。结构图如下所示：

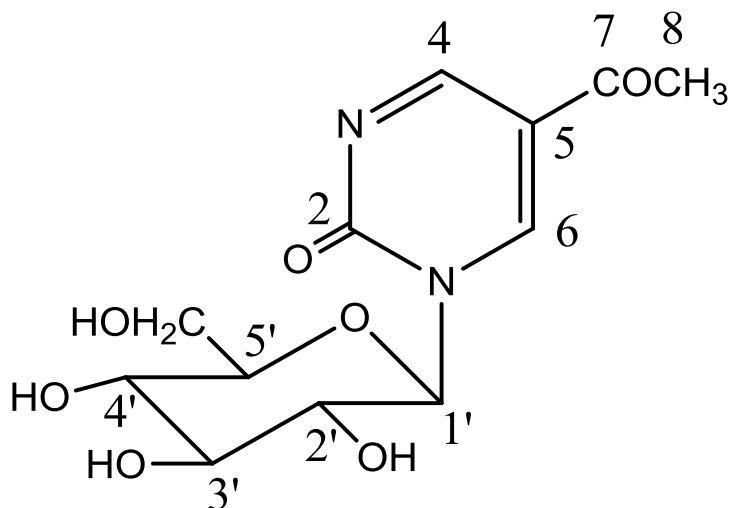


图 4-4 抑霉菌素分子结构式

其分离流程如下：

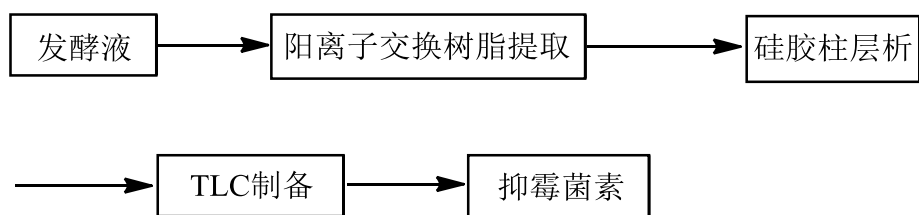


图 4-5 抑霉菌素分离纯化流程图

具体步骤为：

- 1.发酵液经离子交换树脂吸附后（2N 氨水洗脱），将解吸液浓缩即得到粗提物。
- 2.将粗提物进行正相硅胶柱层析（流动相为丙醇：水=9:1），得到抑霉菌素粗

品。

3.将得到粗品进行 TLC 制备（展层剂丙醇：水=8:2），将 $R_f \approx 0.35$ 处的含有荧光带的硅胶刮下。

4.将得到的含有样品的硅胶刮下，用甲醇浸提即可得到抑霉菌素纯品。

可以看出，在抑霉菌素的分离过程中，采用了上样量大、高效的柱层析方法而且分离步骤比较少，这就减少了分离过程中样品的损失，提高了工作效率。

2.2.4 谷氏菌素

谷氏菌素是禾粟链霉菌(*Streptomyces gramineus*)产生的核苷肽类抗生素,具有抗细菌、支原体及抗病毒和肿瘤等活性。结构图如下所示：

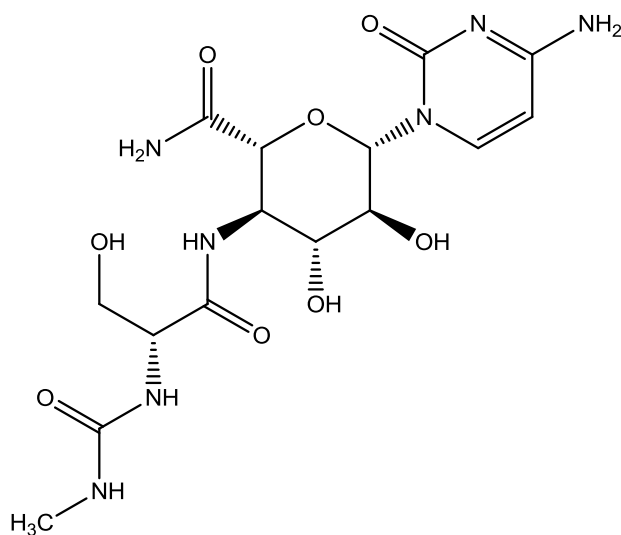


图 4-6 谷氏菌素分子结构式

其分离流程如下：

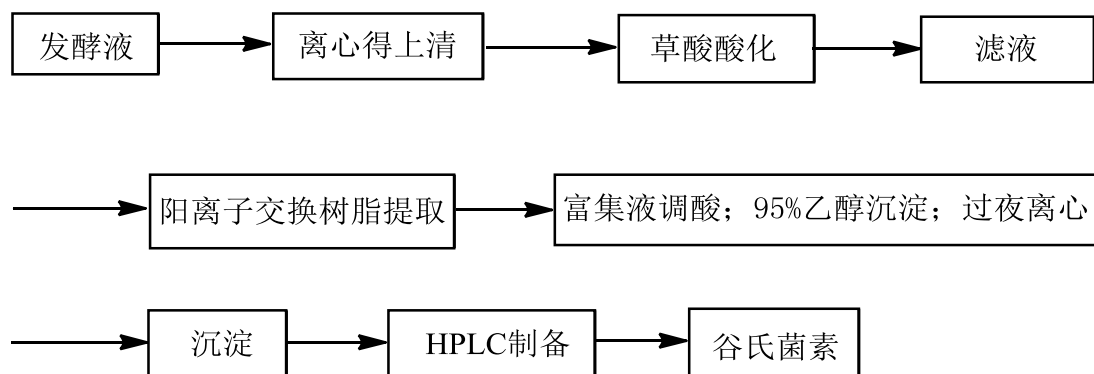


图 4-7 谷氏菌素分离纯化流程图

其分离步骤为：

1. 发酵液 6000rpm 离心 5min 得上清液，将上清液用草酸调 pH 为 3；煮沸 10min；6000rpm 离心 5min 得上清液。

2. 将上清液用 Dowexs 50WX2 (H^+ , 100-200mesh, Sigma) 树脂进行吸附，吸附饱和后用 0.3M 氨水解吸；将解吸液用磷钨酸进行检测，阳性反应馏分旋转蒸发浓缩 ($\leq 40^\circ C$)。

3. 将浓缩液用乙酸调 pH 为 4.5，再用八倍体积的 95% 乙醇沉淀，4℃ 过夜；13000rpm 离心，收集沉淀。

4. 将沉淀晾干，乙醇洗涤；水溶，进行 HPLC 检测

5. 将检测后的样品进行 HPLC 制备，制备后即可获得谷氏菌素

可以看到在谷氏菌素的前期分离过程中，采用了高通量的离子交换树脂和沉淀法，这为后期的进一步分离积攒了样品并且节省了时间；而且整个提取过程也比较简单，值得为分离类似抗生素作参考。

2.2.5 米多霉素

米多霉素(mildiomycin, MIL)是 1978 年日本的 TakashiIwasa 等从一株龟裂链轮丝菌(*Streptoverticillium rimofaciens*B-98891)的次级代谢产物中分离得到的一种新型核苷类抗生素，属于抗真菌类抗生素，对各类白粉菌均有强烈的抑制或杀灭作用，且对人类及鱼类的毒性很小^[29]。是一种吸湿性的碱性抗生素，无挥发

性，熔点 $>300^{\circ}\text{C}$ ，比旋光值 $=+100^{\circ}(c\ 0.5, \text{H}_2\text{O})$ ， $=+78.5^{\circ}(c\ 0.5, 0.1\text{N HCl})$ 。易溶于水，微溶于吡啶、二甲基亚砷、二甲基乙酰胺、二烷和四氢呋喃等。在中性水溶液中稳定，在 pH 9.0 或 pH 2.0 条件下稳定性降低。其结构图如下所示：

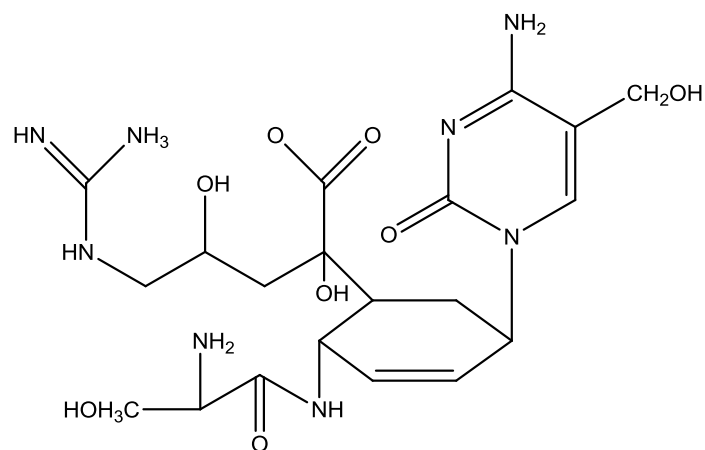


图 4-8 米多霉素分子结构式

日本学者 Suita 等^[30]在发现 MIL 时，探索性的摸索了一条提取方法，但是该流程繁琐且成本较高。陈勇等人^[31-32]研究了米多霉素在 HZ011 弱酸性阳离子交换树脂上的离子交换特性，通过发酵液预处理、HZ011 树脂吸附、D296 大孔强碱树脂脱色以及精制等过程，实现了米多霉素的高收率、高纯度的分离纯化。其流程见下图。

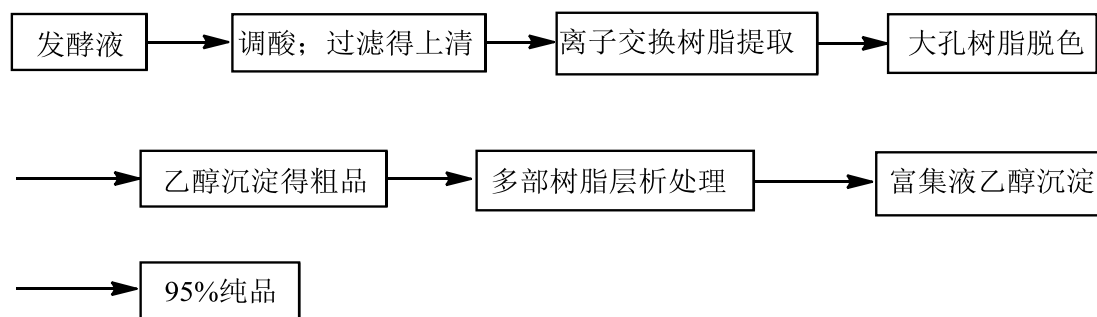


图 4-9 米多霉素分离纯化流程图

其分离纯化步骤为:

1. 发酵液用草酸调 pH 为 7 后过滤得上清。
2. 上清液经过 JK110 树脂吸附、D296 树脂脱色和乙醇沉淀后得到含有 80% MIL 的粗品。

3. 粗品进行 HD-2 树脂层析、HZ011 树脂吸附、D296 树脂脱色、001*16 树脂脱盐、乙醇沉淀和水溶后即可得到 95% 的米多霉素纯品。

可以看出,米多霉素的分离纯化主要借用柱层析和有机溶剂沉淀的交互运用,优点是上样量大、效率高;但是以上分离纯化过程比较繁琐,涉及各种不同树脂的多次运用,可能会造成最终的样品回收率较低等问题。

2.3 核苷类农用抗生素有效成分的分析鉴定方法

一般来说分离纯化出的核苷类化合物的样品量都比较少,所以在分析鉴定此类物质的时候就应该采用有效的方法和步骤。核苷类化合物已经作为构象研究、质谱、核磁共振和旋光光谱测定的重要模式化合物。核苷类抗生素研究的普遍性为新核苷类抗生素的研究提供了丰富有效的数据。

近些年来发展起来的波谱分析方法已成为核苷类抗生素分析鉴定的重要手段,其以光学理论为基础,以物质与光相互作用为条件,建立物质分子结构与电磁辐射之间的相互关系,从而进行物质分子几何异构、立体异构、构象异构和分子结构的分析和鉴定。该方法具有快速、灵敏、准确、重现等特点,使之成为有机物结构分析和鉴定的常用分析工具和重要分析方法^[33]。但在实际的实验操作中,单用一种方法往往难以得出明确的结论,需要综合利用多种波谱方法联合解析^[34]。

2.3.1 紫外光谱在波谱综合解析中的作用

紫外吸收光谱主要用于确定化合物的类型及共轭情况。如是否是不饱和化合物?是否具有芳香环结构?是否具有共轭体系等化合物的骨架信息。这里要注意的是紫外吸收光谱虽然可以反映分子结构中发色团和助色团的特性信息,但特征性差,且不能完全反映整个分子的特性。只能作为结构鉴定的一种辅助工具,用于定量分析。樊连梅等^[35]通过对宁南霉素溶液在紫外光区进行扫描,并与灭瘟素的紫外吸收光谱进行对比,证明宁南霉素的分子结构中也有胞嘧啶核苷的结构。王艳红等^[36]通过紫外分光光度仪在 200-400nm 光区对噻肽霉素水溶液进行

扫描并与灭瘟素的紫外吸收光谱进行对比, 也同样证明其结构中有胞嘧啶核苷。

2.3.2 红外光谱在波谱综合解析中的作用

红外吸收光谱主要是通过测定分子中化学键的振动频率来确定官能团, 提供未知物具有哪些官能团、化合物的类别(芳香族、脂肪族、饱和、不饱和)等。红外光谱有时也可提供未知物的细微结构。如直链、支链、链长、结构异构及官能团间的关系等信息, 但它在综合光谱解析中居次要地位。

2.3.3 质谱在波谱综合解析中的作用

质谱主要提供有关分子的分子量、元素组成、由裂解碎片推导结构单元等结构信息。质谱图上的碎片峰可以提供一级结构信息。质谱的另一个主要功能是在综合光谱解析后, 验证所推测的未知物结构的正确性。

电子轰击电离(electron impact ionization, EI)是质谱中用途最广泛的离子产生法, 一般为 70eV 的电子束, 远大于大多数有机化合物的电离电位(7~15eV), 会使相当多的分子离子进一步裂解, 产生广义的碎片离子。其具有以下优缺点:

(1) 稳定, 质谱图再现性好, 便于计算机检索及比较; (2) 离子碎片多, 可提供较多的分子结构信息; (3) 样品必须易于气化; (4) 当样品分子稳定性不高时, 分子离子峰的强度低, 甚至不存在分子离子峰。

化学电离(chemical ionization, CI), 化学电离是通过离子-分子反应来完成的。反应气体一般是甲烷、异丁烷、氨等, 生成 $(M+H)^+$, $(M-H)^+$, $(M+NH_4)^+$ 的准分子离子。化学电离质谱不能作峰的匹配性比较(无论用计算机还是用人工), 也不适应于结构测定, 它的主要用途是检测分子离子从而确定分子量。

场电离(field ionization, FI)和场解吸(field desorption, FD)。场电离是一种软电离技术。当样品蒸汽邻近或接触到带高正电位的金属针时, 由于高曲率的针端产生很强的电位梯度, 样品分子可被电离。其优点是电离快速, 适合于和气相色谱联机; 缺点是要求样品汽化, 灵敏度低。场解吸: 原理与 FI 相同, 但样品是被沉积在电极上。FD 适用于难汽化的、热不稳定样品。FD 的分子离子峰比 FI 的强, 质谱图比 FI 的还要简单。

快原子轰击(fast atom bombardment, FAB)。是一种广泛应用的软电离技术。快原子轰击利用的重原子一般为 He 或 Ar。

其原理为: Ar^+ (高动能的) + Ar(热运动的) \rightarrow Ar(高动能的) + Ar^+ (热运动的)

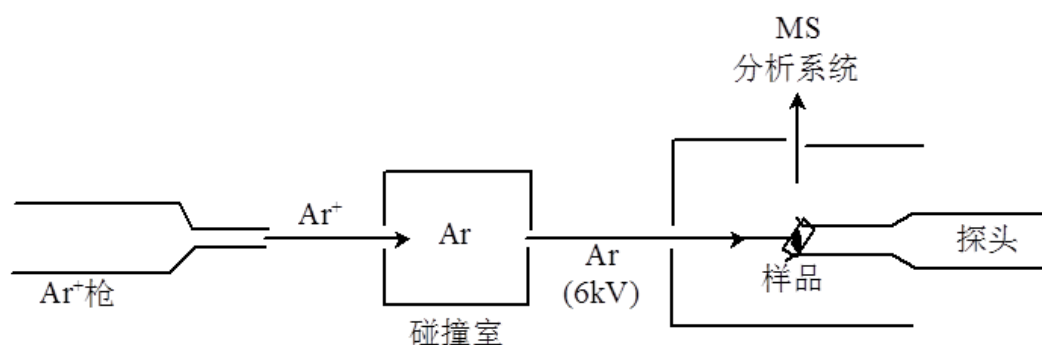


图 4-10 FAB 离子源原理示意图

FAB 可完成连 FD 都有困难的、高极性、难汽化的化合物的电离。样品多调匀于基质（一般为甘油等）中。基质应具有流动性、低蒸气压、化学惰性、电解质性和好的溶解性。FAB 得到的是准分子离子峰 $(M+H)^+$ ；当分析极性样品（糖类），常加入 NaCl 水溶液，得到 $(M+Na)^+$ 离子峰。

基质辅助激光解吸电离（matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI）。其原理是在一个微小的区域内，在极短的时间间隔，激光可对靶物提供高的能量，对它们进行极快的加热，可以避免热敏感的化合物加热分解。其具有如下优点：（1）使一些难于电离的样品电离，且无明显的碎裂，从而得到完整的被分析化合物分子的电离产物；（2）特别适用于与飞行时间质谱相配（MALDI-TOFMS）。

电喷雾电离（electrospray ionization, ESI）。主要应用于高效液相色谱 HPLC 与质谱仪的联用。其原理主要是：从雾化器套管的毛细管端喷出的带电液滴，随着溶剂的不断快速蒸发，液滴迅速变小，表面电荷密度不断增大。由于电荷间的排斥作用，就会排出溶剂分子，得到样品的准分子离子。示意图如下：

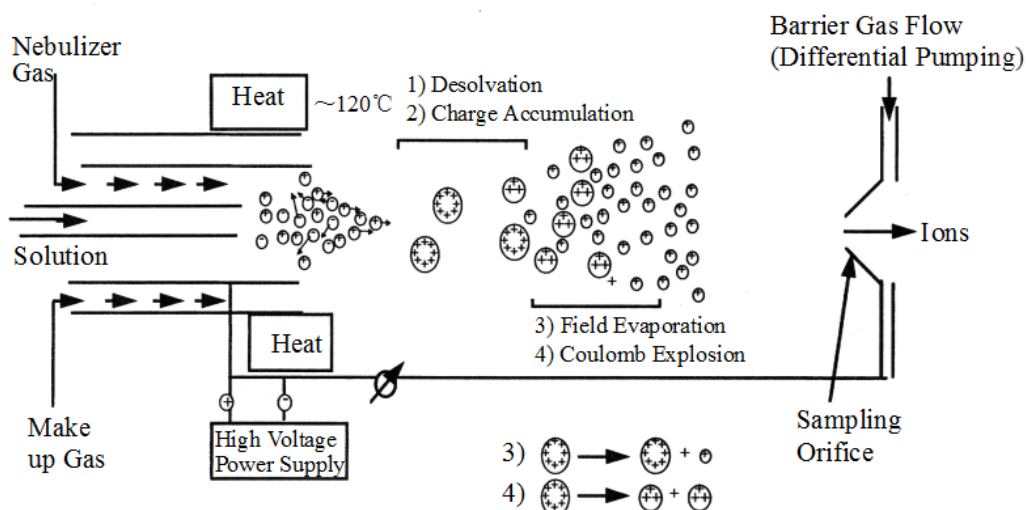


图 4-11 电喷雾离子源原理示意图

在 ESI 中，通常小分子得到带单电荷的准分子离子，而大分子则得到多种多电荷离子。检测质量可提高几十倍。ESI 是很软的电离方法，通常无碎片离子峰，只有整体分子的峰，十分有利于生物大分子的质谱测定。

大气压化学电离 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)。是由 ESI 源派生出来的，常压下电晕放电。其原理是喷出的液滴先汽化，随后溶剂分子被电离，发生化学电离的过程。其前提是样品必要要可以气化，适用于弱极性的小分子化合物($M < 1000$)。其示意图如下所示：

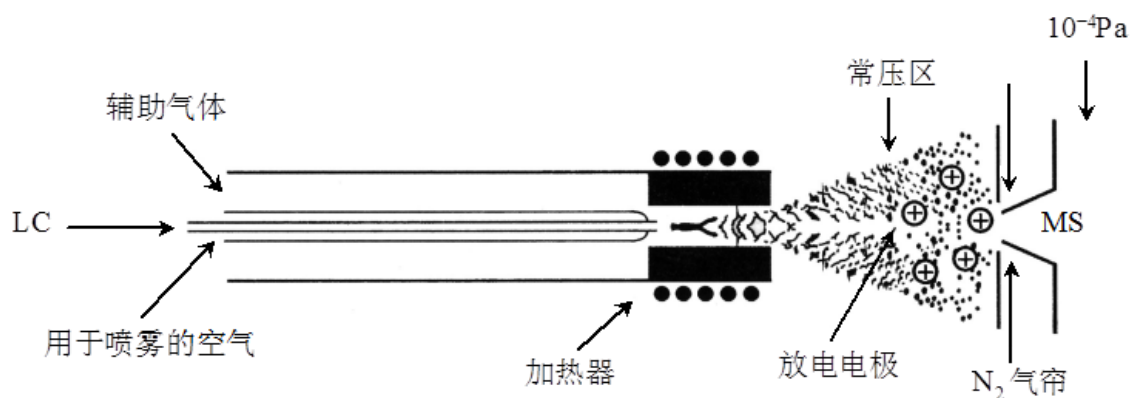


图 4-12 APCI 工作原理示意图

2.3.4 核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

核磁共振为结构鉴定提供了丰富、重要、可信的信息,尤其是随着二维、三维、以及多维 NMR 的应用,使它逐渐成为分析各类物质的主要方法,

2.3.4.1 核磁共振氢谱在波谱综合解析中的作用

核磁共振氢谱主要提供提供化合物中有关质子的信息。(1) 质子的类型: 质子所处的化学环境说明化合物具有哪些种类的含氢官能团。(2) 氢分布: 由峰的强度(面积) 可说明各种类型氢的相对数目。(3) 核间关系: 峰的数目标志分子中磁不等性质子的种类, 共振信号的数目表明分子中不同类型质子的数量, 这里应注意是否存在信号的重叠;峰的裂分数可说明相邻碳原子上质子数; 偶合常数可确定化合物构型。氢核间的偶合关系与氢核所处的化学环境可提供化合物的二级结构信息, 如连结方式、位置、距离; 结构异构与立体异构(几何异构、光学异构、构象) 等。

2.3.4.2 核磁共振碳谱在波谱综合解析中的作用

核磁共振碳谱(^{13}C NMR)与氢谱类似, 也可提供化合物中碳核的类型、碳的分布、碳核间的关系三方面结构信息, 主要提供化合物的碳“骨架”信息。碳谱的各条谱线一般都有它的惟一性, 能够迅速、正确地否定所拟定的错误结构式。碳谱对立体异构体比较灵敏, 能给出细微结构信息。

一般情况, 由 IR、 ^1H NMR 及 MS 三种光谱提供的数据, 即可确定未知物的化学结构, 若不足, 再增加 ^{13}C -NMR 等。特殊情况, 还可以辅助以其它光谱, 如荧光谱、旋光谱、拉曼光谱等提供的结构信息。

3 筛选新型核苷类抗生素有效成分的方法

新型抗生素的筛选流程通常包括以下三个步骤:(1) 微生物体的分离和培养;(2) 抗生素的检测;(3) 抗生素物质的化学描述及结构鉴定。由于能够产生新型抗生素的放线菌的生活范围相当广泛, 直到 20 世纪 60 年代中期, 不需要复杂的方法便能分离到这些菌株。当时的筛选流程通常是依赖有效的工厂式的操作, 微生物学家在筛选过程中根据生产菌株的形态学和它们的抗菌谱挑选分离出许多链霉菌用来生产抗生素和作为可能产生新的抗生素的候选者, 然后抗生素物质被提纯、描述和鉴定。然而, 随着天然产生的抗生素的数量不断增加, 发现新的抗生素已变得越来越困难。因此, 创新筛选新抗生素的方法势在必行^[36]。

核苷类化合物由于具有广泛多样的生物活性,在医疗、农药方面都有重要应用;并且由于核苷类抗生素普遍在抗菌、除草、杀虫和抗肿瘤等方面具有高效、低毒和无污染性,因此,对其的关注程度也越来越高。新型核苷类抗生素的筛选即可通过天然产物获得,也可以通过化学合成获得。

3.1 从天然产物中开发新型核苷类抗生素

天然产物在医学史上对药物的贡献最大,1983~1994年间就有520种新的药物被批准通过,其中39%是天然产物或来自于天然产物,而60%~80%的抗菌和抗癌药物也是来自于天然产物^[37]。但是,近些年来天然产物特别是微生物产物的筛选日渐衰落,现代技术包括硅胶板筛选技术,组合生物合成技术^[38,39],组合生物催化技术^[40]在药物发现中逐渐占据主导地位。然而,99%的微生物并没有被开发出来^[41]。如果用当前分子技术独立培养方法来培养以前认为不可培养或所谓培养不了的微生物时,越来越多的结果表明这些微生物实际上可以被培养出来^[42],同时也可用传统的筛选方法培养出来。而这些新的微生物很可能是大量生物活性物质的来源。目前,从自然环境的天然产物中发现新核苷类抗生素基本有三条途径:1.直接从土壤、海洋等自然资源中分离提取;2.利用微生物基因组学的方法寻找新抗生素;3.采用定向发酵的方法使已知抗生素产生菌产生新抗生素。

3.1.1 扩大微生物的来源

3.1.1.1 稀有放线菌作为筛选资源

在1974年以前,放线菌来源的抗生素几乎都是由链霉菌产生的(在大约2000种抗生素中,约95%的抗生素是由链霉菌产生的)。在以后的6年中,由稀有放线菌产生的抗生素约占放线菌来源的1100种抗生素的25%^[43],因此,作为抗生素来源的稀有放线菌的作用变得越来越重要。

稀有放线菌通常被认为是使用常规的分​​离方法较链霉菌的分​​离频率低很多的放线菌属。它们产生抗生素的能力可与链霉菌相媲美。可以推断,分离和筛选稀有放线菌是发现新抗生素的希望所在。然而,链霉菌产生的新型抗生素无论在数量上还是在种类上都要比其它的放线菌属多得多,这意味着具有产生新抗生素能力的未被发现的链霉菌属或链霉菌种在自然界中还大量存在。既然使用传统方法不能将它们分离出来,这样的链霉菌也就应该被看作是稀有菌种^[36]。稀有放

线菌中指孢囊放线菌属和游动放线菌属都可以产核苷类抗生素^[44]，对稀有放线菌的研究会为新型核苷类抗生素提供重要的来源。

3.1.1.2 从极端环境微生物中筛选新抗生素

近年来，极端环境微生物已成为发现新抗生素的宝贵来源之一，尽管它们产生的抗生素还不多。极端环境微生物能够产生很多的化学物质，它们大部分没有什么明显作用，但在偶然情况下从中可以发现具有很高生物活性的物质。实际上，这种产生多样化学物质的能力肯定能够提高微生物体产生稀有化合物的新抗生素的几率。例如，一些研究人员就认为嗜盐微生物产生抗生素的能力要高于其它的极端环境微生物。

3.1.1.3 海洋微生物是新型生物活性物质和新抗生素先导化合物的来源

开发治疗严重疾病的抗生素，关键在于发现具有一定生物活性的新型化合物或先导化合物，然后进行生产优化或进行结构改造加以优化，才有可能开发出有临床应用价值的新药物。所以，新型生物活性物质或先导化合物的发现是新抗生素研究的起点。将 1980~1984 年 5 年间全世界所报道的由微生物产生的新化合物与 1988~1992 年 5 年间的报道相比较，可以发现，来源于陆栖链霉菌产生的新化合物已由 74.17% 下降到 50.15%，相反，来源于海洋微生物的新化合物在前 5 年间报道极少，到 1988~1992 年这 5 年间上升到 12.17% (有近 400 个)。这不仅反映了海洋微生物开始受到重视，而且表明了从海洋微生物中开发新药物有着巨大的潜力和诱人的前景(以上统计数据来自中国医学科学院医药生物技术研究所微生物产物数据库的统计资料。海洋微生物不仅能产生新型的生物活性化合物，而且还能产生一些由陆栖微生物所产生的有应用价值的抗生素。例如从海洋链霉菌-鲁特格斯链霉菌鼓浪屿亚种的代谢产物中，不仅发现了新抗生素 8510，而且也发现了肌醇胺霉素和春日霉素^[45]。上述霉素过去都是由陆栖微生物产生的。其中春日霉素是一种重要的农用抗生素，杀菌谱广，毒性低，对稻瘟病等有极好的防治效果，是一种无公害农药。

近年来，已经开始在海洋生物中寻找核苷类抗生素。从海绵动物们中得到了多种新颖的抗微生物、抗肿瘤和抗病毒的化合物，如具有抗病毒作用的核苷类化合物等。

3.1.2 微生物基因组学的方法寻找新抗生素

经典的抗生素筛选，被称为是抗生素产生菌与活性物质的双重筛选，其初筛

样品为发酵液或粗提品,成分复杂,活性组分少,筛选过程耗时长,且效率较低。因此,急需建立一些抗生素筛选的新方法来更有效地筛选新抗生素。近年来已经出现了一些抗生素筛选新方法,如以细菌细胞分裂为靶标,得到了很多非常有潜力的新活性物质。这些新的方法,随着微生物基因组信息的日渐丰富而变得明确可行。大量微生物全基因组 DNA 序列公布,产生了大量的基因组信息,对微生物的研究起了重大的影响^[46]。

3.1.2.1 以细菌细胞壁为靶标的抗生素筛选方法^[47]

青霉素作用机制的研究,也使得细菌细胞壁肽聚糖的合成过程变得明确。细菌细胞壁的合成,作为较早途径的抗生素筛选靶标,已经从全细胞筛选到破细胞筛选、特异酶的体外筛选,发展到重组细胞壁合成途径基因的生化筛选。

20 世纪 60~90 年代, Merck 公司应用 Lederberg 等发现的原理:青霉素可以诱导细菌细胞原生质体在等渗溶液中的形成,发明了原生质球筛选,并用此方法得到了一系列细胞壁合成抑制剂,如 MurA 抑制剂磷霉素, Alr/Ddl 抑制剂环丝氨酸, MraY 抑制剂衣霉素(tunicamycin), 肽基转移酶抑制剂, 头霉素 C, 硫霉素(thienamycin), 青霉素类, 头孢菌素类和糖基转移酶默诺霉(moenomycin)等。多氧霉素、Nikkomycin 是作用于病原真菌的抗生素。Endo 等(1970), Bartnick (1972), Bowers (1974), Ishizaki(1974) 等报道多氧霉素对真菌的呼吸作用、DNA、RNA、蛋白质和磷脂的合成影响很小,但引起敏感菌生长菌丝的尖端形成膨胀泡而破裂。Ohta 等(1969)报道多氧霉素 D 抑制 ¹⁴C-葡萄糖胺掺入植物病原菌的细胞壁几丁质中。Endo 和 Misato (1969) 报道多氧霉素 D 抑制由几丁质合成酶催化的,由尿二磷-N-乙酰葡萄糖胺到几丁质这一步反应,并通过酶的动力学研究,说明多氧霉素 D 是几丁质合成酶的竞争性抑制剂。Hori 等(1974)报道多氧霉素 D 与几丁质合成酶的底物尿二磷-N-乙酰葡萄糖胺结构类似,从而竞争性地抑制该酶活性,导致敏感细胞几丁质不能合成而起到杀菌作用。

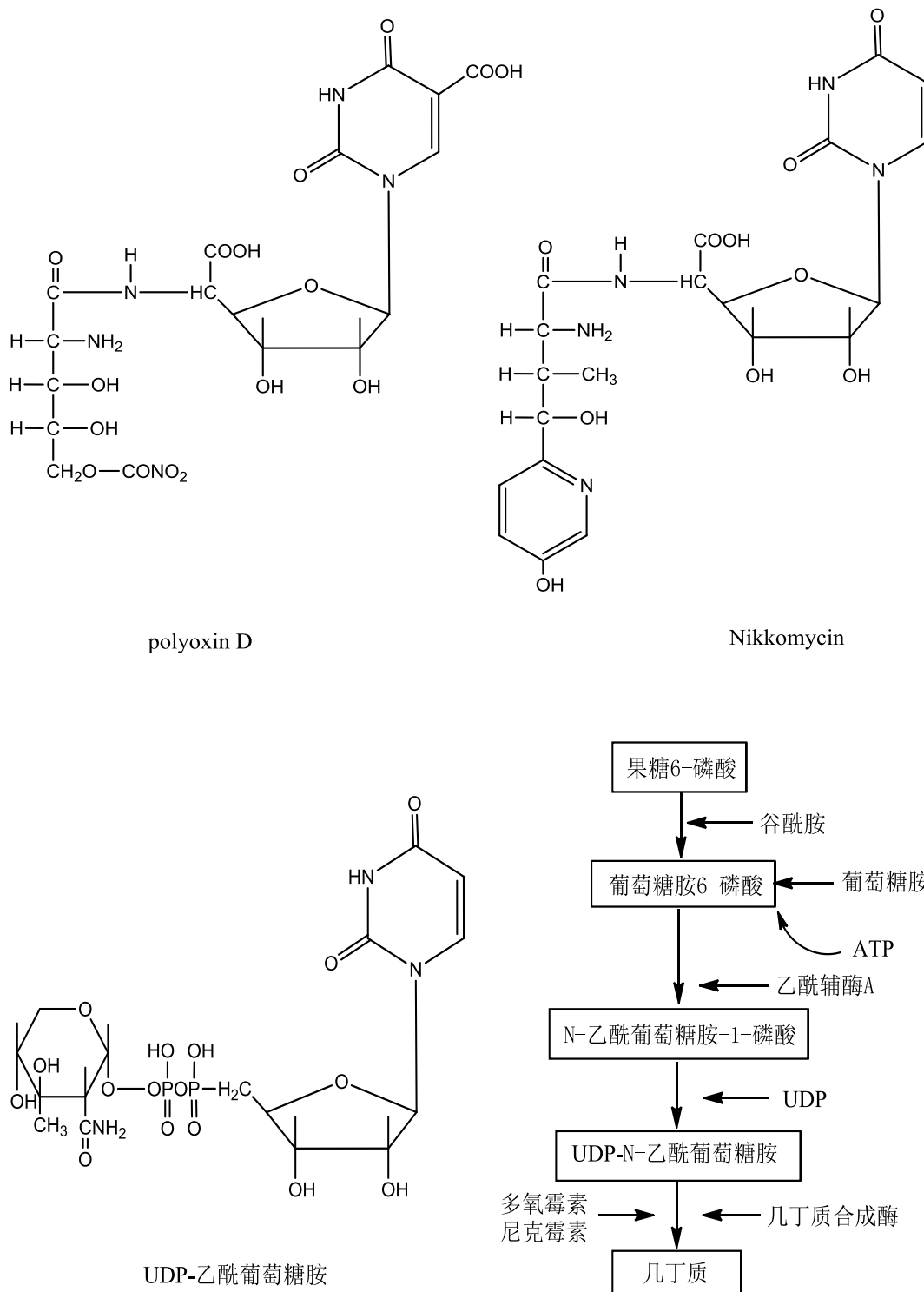


图 4-13 青霉素作用原理示意图

3.1.2.2 以微生物细胞分裂为靶标的抗生素筛选方法

抑制细菌细胞增殖即抑制细菌的细胞分裂，这一过程有一系列蛋白和细胞因子调节和协调，包括一种 Fts 蛋白家族，FtsZ 蛋白，参与细胞分裂的早期过程，

并且可以被其他蛋白(SulA, MinD, MinC, MinE 和 DicB)抑制。FtsZ 蛋白的浓度可以调节细胞分隔的频率,小幅度的浓度升高可以使得细胞结构发生微小变化,大幅度的浓度升高可以导致细胞丝化甚至菌体死亡。影响 FtsZ 蛋白作用机理或生成的化合物,将是很好的候选药物。

Haydon 等^[48]已经合成了一系列的 FtsZ 抑制剂,简称为 PC190723。这些抑制剂可以通过抑制 FtsZ 来抑制细菌细胞分裂。PC190723 不仅在体外对葡萄球菌的杀菌力有效且有选择性,包括耐甲氧西林和多药耐药的金葡菌,而且对体内感染的模型也很有效,可以治疗感染了致死剂量金葡菌的小鼠,这使得 FtsZ 成为一个抗生素筛选的有效靶点。

3.1.2.3 利用基因组寻找抗生素作用靶点^[49]

微生物基因组的发展给新抗生素的发现带来了希望,人们已经发现了几百个重要的微生物基因和其他一些致病基因,这些基因都是很有潜力的药物作用靶点。但是直到现在,在微生物基因组的帮助下只发现了很少成功的候选药物^[50]。微生物基因组的揭示,为基于靶标的、有显著作用的抑制剂筛选提供了大量的、不同的并十分有效的作用靶标。在这个过程中,人们发现了一些新的靶标如双组分信号传导系统、辅酶代谢、细胞分裂、蛋白质分泌和新发现的 DNA 复制相关蛋白。但是迄今只有多肽去甲酰酶(polypeptide deformylase, PDF)的抑制剂,进入了临床 I 期实验^[51]。

3.1.2.4 基于竞争的抗生素筛选方法^[52]

在这种方法中,病原体的表型改变(如生长抑制)可被监测,并可用来筛选候选药物。

Lucia 等建立了一种基于竞争的抗生素筛选方法,通过将病原微生物与人源细胞共同培养,用以筛选高效低毒的化合物。该方法的优点是筛选仅需一轮,并通过检测由人源细胞发出的信号(非微生物发出的信号),以监测化合物的作用效果,这意味着可以不需要对病原微生物进行基因修饰,简化繁琐的筛选步骤。理论上讲,这种方法可以不需要彻底了解检测的病原微生物,甚至不需要知道药物的作用靶点,即可筛选出需要的化合物。图 4-14 为这一筛选方法的简图。

图 4-14 中,左图为可在细胞表面展示 HA 标签及膜结合组织纤溶酶原活化因子(HA-tPA)的人源细胞,这种酶可将纤溶酶原(PG)转化为纤溶酶(PL),纤溶酶可将其底物(S)转化为一种荧光产物(P)。右图为人源细胞与细菌共同培养体系,

在无有效抗生素存在下，细菌的生长抑制了人源细胞生长，则无荧光产生。若加入抗生素，则病原微生物数量减少人源细胞不断生长，产生较强的荧光信号。

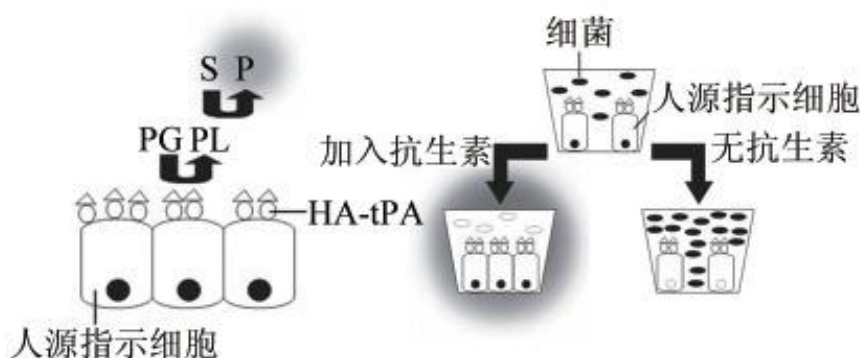


图 4-14 基于竞争的抗生素筛选方法

3.1.3 定向发酵

定向发酵是通过改变发酵培养基组成及发酵条件，影响发酵产物的量和质，使原为微量抗生素的量大为增加，即可获得一种新抗生素。

3.1.3.1 发酵培养基中加入酶抑制剂

添加 L-甲硫氨酸于丁头孢霉发酵液中定向产生头孢美素 C，而抑制其他组分生长。加入磺胺、乙硫氨酸等抑制生物甲基化的抗代谢物于金色链霉菌发酵液中抑制金霉素产生，定向产生 6-脱甲基金霉素。

3.1.3.2 发酵培养基中加入前体物质

如果在发酵培养基中加入某些前体物质，可未经显著地改变，直接组成抗生素分子的一部分，能增加某些组分产量或直接产生新的物质。众所周知，加苯乙酸于产黄青霉的发酵液中产生青霉素 G，加苯氧乙酸则产生可供口服的青霉素 V。

3.1.3.3 控制培养基的营养，定向获得抗生素的某一组分

如在庆大霉素发酵液中不加钴离子，主要产生脂溶性的庆大霉素 A，加入钴离子后，主要产生水溶性的庆大霉素 C 组分。

3.1.3.4 控制发酵时间

有些抗生素在发酵时随着发酵时间的延长而改变抗生素的组分。如放线菌素发酵时，开始形成放线菌素 B，最后转变为 D 类。

3.2 核苷类抗生素的结构改造

近年来，核苷类抗病毒药物的研究相当活跃，根据目前抗病毒药物抗病毒结构的不同，可将它们分为如表所示的几种类型。从表中可以看出，核苷类药物占了一半以上^[53]。

表 4-1 按抗病毒药物的结构分类

药物作用	例子
抗逆转录酶病毒药物	地丹诺辛, 扎西他宾, 司他夫定, 齐多夫定, 拉米夫定, 地拉韦定, 奈非拉平, 吡啶那韦, 沙奎那韦, 利托那韦, 安普纳韦
抗巨细胞病毒药物	更昔洛韦, 膦甲酸钠
抗肝炎病毒药物	单磷酸阿糖腺苷, 拉米夫定, 干扰素, 甘草甜素
抗 HPV 药物	米喹莫特, 西多福韦
抗疱疹类药物	阿昔洛韦, 泛昔洛韦, 伐昔洛韦, 阿糖腺苷, 喷昔洛韦, 膦甲酸钠
抗流感 A 及呼吸道病毒药物	反义寡核苷酸类, 利巴韦林, 金刚烷胺, 金刚乙胺, GS4701, GS4104, zanamivir

所以, 就目前而言, 对核苷类化合物进行结构修饰以寻找高效、低毒、选择性高且价格便宜的药物是目前广大药物工作者研究的热点^[54]。

核苷是由碱基和糖基两部分构成的, 下面根据糖基改造、碱基改造以及糖基碱基同时改造三大类进行讨论。

3.2.1 糖基改造

糖基改造对抗病毒活性有很大的影响, 通过改造糖基有时可以使药物的抗病毒活性有很大的提高, 同时还可以降低药物的毒副作用, 而且改造后的糖基与天然核糖相差越大, 则核苷的毒副作用越低, 可以说糖基改造是研究和筛选药物的一条很好途径。糖基改造不仅可以在 D-或 L-型呋喃糖基上进行, 而且还可以将呋喃糖基变成吡喃糖、四元氧杂糖、碳环型以及无环型^[55]。

呋喃糖型的改造, 其占了整个核苷化合物相当大的一部分, 因此很有必要对这一部分作较详细的总结。这一类改造可以在 2'、3'、4'、5' 几个位置单独或同时进行。

二杂 D-或 L-型核糖核苷类, 这类化合物中糖基是由含两个杂原子的五元环构成的, 例如临床应用于治疗 AIDs 的拉米夫定。

杂环核苷类似物,以核苷为基本构架,通过戊糖环中的氧原子和其他碳原子以及环的大小的改变而产生一系列核苷类似物,具有明显的抗 HBV 活性。

碳环核苷,核苷中亚甲基代替戊糖环中氧原子的化合物称为碳环核苷。碳环可以是六元环,五元环,四元环和三元环。可以是饱和的也可以是非饱和的。碳环核苷的化学性质可看成嘌呤的 N₉ 烷基取代物,而多羟基环戊烷在构象上与呋喃糖核苷极相似,更引起研究者的兴趣。碳环核苷具有对体内各种水解酶较稳定,可避免被过早降解失活等优点。

3.2.2 碱基改造

碱基对核苷及其衍生物的抗病毒活性起着决定性作用。对碱基的改造主要是针对 5-位碳,取代的基团有卤素、乙炔基、乙烯基等一些较小的基团。5-位代尿嘧啶由于氟原子半径与氢原子接近,可作为尿嘧啶替代物,氯和溴原子半径与甲基相近,可作为胸腺嘧啶替代物,当它们 DNA 或 RNA 链时,可干扰病毒的合成。

3.2.3 糖基和碱基同时改造的核苷类

糖基和碱基同时改造是核苷抗病毒药物发展的一个重要方面(不包括碱基改造的无环核苷)。虽然仅对碱基进行改造得到了一些具有活性的核苷,但真正应用于临床的却不多。通过对糖基和碱基的同时改造,可以使合成的核苷与天然核苷的差别加大,往往能够增加药物的抗病毒谱,相应在降低了其毒性。但是进行这种双改造时,碱基和糖基上引入的取代基都不能太大,否则活性较低或无活性。这类化合物的研究也进行得相当多,所得到的应用于临床上的药物也较多^[56,57],其结构可以是以上所有改造糖基和改造碱基的任意组合。

4. 核苷类抗生素的应用

核苷类抗生素以其广谱的生物活性(如抗真菌、抗细菌、杀虫、除草、抗肿瘤、抗病毒以及免疫抑制和激活作用等)和高效、无污染(或污染小)等特点,在现代农业和医药行业等方面得到了广泛应用。

4.1 作为农用抗生素在农业中的应用

我国是一个农业病虫害发生严重的国家,每年因为病虫害而导致农作物减

产甚至绝收的损失高达几百亿元。为了防治农作物病虫害, 农民大量使用化学农药, 而传统化学农药的长期使用不仅严重污染了环境, 降低了农产品的品质(农药残留问题), 给人们的身体健康带来严重的威胁, 而且害虫抗药性问题也越来越严重, 农药的安全性和有效性已经成为制约我国农业发展的严重障碍。生物农药的出现给这一问题的解决带来了曙光, 生物农药产业在近 20 年里, 得到迅速发展, 已经成为农药行业的一颗新星。

如多效霉素作为一种能够抑制真菌细胞壁几丁质生物合成的抗生素, 具有活性高、对人畜安全、环境相容性好的特点。近年来通过对多效霉素生物合成基因簇的研究, 人们已经在发酵液中分离出了新型多效霉素 P、O, 并且随着多效霉素生物合成基因簇的进一步研究, 人们有望合成出新型、高效的多效霉素; 另外通过结构—活性关系、多效霉素作用机理研究, 科学家们通过化学合成法合成出具有抗真菌活性的多效霉素衍生物, 此类药物活性高、安全性好、对人畜低毒, 将逐渐取代化学农药。

核苷类抗生素自发现以便得到广泛应用, 例如: 嘌呤霉素被广泛用于研究蛋白质的生物合成机制; 多氧霉素、杀稻瘟菌素、米多霉素及中生菌素在农业上被广泛用于植物病害防治。

4.2 作为抗病毒药物在医学上的应用

近年来, 核苷类抗病毒药物的研究相当活跃, 特别是阿昔洛韦的研制成功引起了人们的广泛关注, 核苷类抗病毒药物的研究报道大量涌现, 相继推出了一系列高效低毒的药物。目前的核苷类抗病毒药物的作用机制主要从两方面出发: 1. 酶抑制剂; 2. DNA 链终止剂。

但核苷类化合物存在着两大缺陷: 毒副作用及耐药性。因此, 对核苷类抗病毒药物的结构改造是目前的研究热点。

天然产物型的核苷类抗生素也广泛具有抗肿瘤、抗病毒活性, 例如前文提到的多种核苷类抗生素, 但临床应用的报道少见。

5. 展望

核苷类抗生素作为农用抗生素的一个重要组成部分, 是一种具有良好的发展前景的生物农药, 根据我国现有生物农药和农用抗生素发展的现状, 可以说明农

用抗生素的良好发展将是我国生物农药产业发展壮大的关键。

核苷类抗生素的生物活性主要是由于其在最基本的细胞代谢途径中能发挥多项作用。随着病原菌抗阳性的出现,耐药性的增强,新抗生素的研究和开发变得迫在眉睫。虽然蛋白质组学和微生物基因组学等生物技术的发展给抗微生物药的发展注入了活力,但是要从根本解决新抗微生物抗生素的研发还是需要从药物化学方面找出路。由于核苷类抗生素存在潜在的新颖的抗菌靶点,所以其必将会对新抗生素的研发提供有力支持。

现今,核苷类抗生素在农用和医学上都得到了广泛的应用,核苷类抗生素的合成(生物合成和化学合成)、结构改造、合成机理以及作用机理都成为了国内外各个科研院所的研究热点。同时随着生物技术、药物化学、合成化学等技术的飞速发展,以及对其研究领域的拓展和不断深入,我们有理由相信核苷类抗生素必将会对社会发展做出更大的贡献。

参考文献

- [1] Isono K. Nucleotide antibiotics: structure, biological activity and biosynthesis [J]. J antibiot (Tokyo),1988,41(12):1711-1739.
- [2] Jia L, Tanka N, Terabe S. Two-dimensional separation system of coupling capillary liquid chromatography to capillary electrophoresis for analysis of *Escherichia coli* metabolites[J]. Electrophoresis,2005,26(18):3468- 3478.
- [3] Isono K. Current progress on nucleotide antibiotics [J].Pharmacol Ther,1991,52(3):269-286.
- [4] 沈寅初.农用抗生素研究开发新进展[J].植保技术与推广,1997,17(6):35-37.
- [5] 黄红兵, 江英桥. 赤芝子实体总核苷的含量测定及薄层色谱鉴别[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(3):61-62.
- [6] 徐文豪, 薛智, 马健民. 冬虫夏草的水溶性成份--核苷类物质的研究[J].中药通报,1988, 13(4):226-228.
- [7] 邱蔚然. 肌苷的快速简易微量测定[J].医药工业杂志,1985,16(2):23-25.
- [8] 吴有光,匡渤海,龙飞.临床化学上氨基酸、有机酸及核苷类的二维薄层色谱多项分离[J].色谱,1996,14(4):259-263.
- [9] 汪宇, 于荣敏, 杨光照等. 人工培养蛹虫草子座中核苷类化合物的提取工艺研究[J]. 中国药师, 2004, 7(12):929- 931.
- [10] 王忠华, 周蓉, 达世禄. 核苷与碱基的苯胺甲基键合硅胶固定相高效液相色谱分离[J]. 分析测试学报, 2003, 22(3):28- 31.
- [11] Li K M, Rivory L P, Clarke S J. Rapid quantitation of plasma 2'-deoxyuridine by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and its application to pharmacodynamic studies in cancer patients [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 820(1):121- 130.
- [12] 余竞光, 翟云凤. 薄盖灵芝化学成分的研究(第 I 报)[J]. 药学学报,1979, 14(6):374- 377.
- [13] 廖文彬, 鲍时翔. 红树林放线菌产抗菌活性物质的分离纯化研究[J]. 药物生物技术, 2004,11(6): 376-380.
- [14] 李锋, 何直升, 叶阳. 红花中核黄素及其降解产物[J].中草药, 2004, 35(3):247-249.
- [15] 田宝泉, 杨益平, 何直升,等. 苦瓜水溶性部位化学成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(5):657-658.

- [16] 董明, 姚恕, 林容轩等. 活性炭分离肌昔和次黄嘌呤的研究[J]. 浙江大学学报(自然科学版), 1990, 24(2):323-324.
- [17] 李永泉, 张进, 姚恕等. 活性炭单柱提取肌昔新技术的研究[J]. 化学反应工程与工艺, 1994, 10(4): 408-412.
- [18] Weiss D J, Lunte C E. Detection of a urinary biomarker for oxidative DNA damage 8-hydro-xydeoxyguanosine by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. Electrophoresis, 2000, 21(9):2080-2085.
- [19] Ohyama K, Fujimoto E, Wada M, et al. Investigation of a novel mixed-mode stationary phase for capillary electro-chromatography. Part III: Separation of nucleosides and nucleic acid bases on sulfonated naphthalimido-modified silyl silica gel [J]. J Sep Sci, 2005, 28(8):767-737.
- [20] 梅素容, 蔡凌霜, 姚庆红等. 毛细管电泳柱末安培检测癌症病人尿中 8-羟基脱氧鸟昔[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(11):1987-1989.
- [21] 明永飞, 赵艳芳, 李秀娟等. 几种核苷的毛细管胶束电动色谱分离[J]. 分析化学研究简报, 2006, 34(2):227-230.
- [22] 凌建亚, 孙迎节, 吕鹏等. 虫草素真菌中虫草素的超声波提取及毛细管电泳测定[J]. 菌物系统, 2002, 21(3):394- 399.
- [23] Pelegrini P B, Farias L R, Saude A C M, et al. A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens. Curr Microbiol, 2009,59(4): 400-404.
- [24] Jokela J, Leisola M. Chromatographic separation of nucleosides using a cross-linked xylose isomerase crystal stationary phase [J]. J Sep Sci, 2004, 27(17-18):1491-1497.
- [25] Gossans J F, Foulon C, Villard A L, et al. Column selection and method development for the separation of nucleoside phosphotriester diastereoisomers, new potential anti-viral drugs: Application to cellular extract analysis [J]. Biomed Chromatogr, 2005, 19(6):415-25.
- [26] 陈顺志. 一种超临界萃取虫草脱氧核苷的生产方法: 中国, 1339440[P]. 2002-03-13.
- [27] 吴元华, 杜春梅, 朱春玉等. 新型农抗嘧肽霉素研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(4):135-136.
- [28] 赵秀香, 吴元华, 杜春梅等. 新型农药嘧肽霉素防治番茄病毒病药效[J]. 农药, 2004, 43(12):534-536.
- [29] Harada S, Kishi T. Isolation and characterization of mildiomycin, a new nucleoside antibiotic [J]. J Antibiotics, 1978, 31:519-524.
- [30] Suita T S, Neyagawa H S, Kawanishi T A, et al. Method for producing mildiomycin: US, 4334022[P]. 1982-06-08.
- [31] 徐志南, 陈勇, 沈文和等. 氨基霉素分离纯化的方: CN, 200510050432.4[P]. 2005-10-05.

- [32] Xu Zhinan, Chen Yong, Shen Wenhe, et al. Absorption and desorption behaviors of S-adenosyl-L-methionine in a fixed bed ion-exchange column [J]. The Korean Journal of Chemical Engineering, 2006, 23(1):108-112.
- [33] Douglas A Skoog, Donald M West. Principles of instrumental analysis (second edition)[M], America : Saunders Colleg,1980.
- [34] D. H. Williams, I. Fleming, Spectroscopic methods in organic chemistry[M]. Mc Graw Hill Book Co. Singapore, Fifth Ed,1995.
- [35] 樊连梅, 陈洁敏, 刘更森. 宁南霉素(16A-6)性质的初步鉴定[J]. 莱阳农学院学报,2002,19(4):279-281.
- [36] 孙秋, 杨慧敏, 褚红标等. 筛选新抗生素的方法[J]. 云南农业科技, 2003,4:43-45.
- [37] Harvey A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products [J]. Drug Discovery Today, 2000, 5: 294-300.
- [38] Cane D E, Walsh C T, Khosla C. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations and mutations [J]. Science, 1998, 282:63-68.
- [39] Hutchinson C R. Combinational biosynthesis for new drug discovery [J].Curr Opin Microbiol, 1998,1:319-329.
- [40] Michels P C, Khmelnitsky Y L, Dordick J S, et al. Combinationl biocatalysis: a natural approach to drug discovery [J]. Trends Biotechnol, 1998, 16:210-215.
- [41] Davies J. Millennium bug [J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24:M2- M5.
- [42] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. Chem Biol, 1998, 5: R245-R249.
- [43] Cramer R, Davies J E. Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes [J]. Journal of Antibiotics, 1986(39):128-135.
- [44] 李文均, 张忠泽, 姜成林. 几种主要稀有放线菌的选择性分离[J]. 国外医药.抗生素手册,2002,23(1):18-22.
- [45] 方金瑞, 黄维真. 深海微生物的研究进展[J]. 海洋通报, 1995, 14(2):66-69.
- [46] Pucci M J. Use of genomics to select antibacterial targets [J].Biochem Pharmacol, 2006, 7(1): 1066-1072.
- [47] Silver L L. Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 7(1):996-1005.
- [48] Haydon D J, Stokes N R, Ure R. An inhibitor of FtsZ with potential and selective anti-staphylococcal activity [J]. Science, 2008, 321(5896):1673-1675.
- [49] Chan P F, Holmes D J, Payne D J. Finding the gems using genomic discovery: antibacterial drug discovery strategies-the successs and the challenges[J]. Drug Discover Today Ther, 2004,

1(4):519-527.

[50] Yassin A, Mankin A A. Potential new antibiotic sites in the ribosome revealed by deleterious mutations in RNA of the large ribosomal subunit [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(33):24329-24342.

[51] 马寅姣, 宋沁馨. 顾觉奋. 抗生素筛选方法[J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 35(9):654-658.

[52] Lucia G, Oliver J M, Andrew D G, et al. A competition based assay for the screening of species-specific antibiotics [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64:62-68.

[53] 衣淑珍. *药学进展*[J], 1999, 23(1):5-9.

[54] 景慧萍, 王冬梅. 核苷类抗病毒药物研究进展[J]. *中国药事*, 2005, 19(12):762-765.

[55] 李子成, 陈淑华, 蒋宁等. 核苷类抗病毒药物的研究进展[J]. *化学研究与应用*, 2002, 14(1):15-20.

[56] AIDU. *Drugs of the Future* [J], 1982, 7(6):375- 377.

[57] Dideoxyinosine. *Drugs of the Future* [J], 1990, 15(6):569- 577.

发表论文情况

1. 宋玉龙, 周金燕, 杨 杰, 谭 红. 阳离子交换树脂对新奥霉素的吸附性能分析与研究. 离子交换与吸附 (已接受)

致 谢

时光如梭,三年的硕士研究生学习生活即将结束,在临近毕业论文完成之际,我要向所有关爱、帮助、支持过我的老师、朋友、亲人们献上我至诚的谢意。

首先我要衷心的感谢我的导师周金燕研究员,在三年的研究生生活里,周老师在我论文的选题、实验方案设计和实施、论文写作和修改各个环节都给与我悉心的指导。周老师严谨的治学态度、开阔敏锐的思维和敬业精神,都深深的感染了我,并激励我不断前行。我由衷的感谢周老师在我整个研究生阶段给我创造的许多锻炼机会,使我在各个方面都去的了很大的进步。

在这里还要感谢本课题组的谭红、杨杰、钟娟、肖亮、罗迪、舒丹等各位老师,在实验过程中给予的精心指导和无私帮助,使我掌握了诸多实验技能和实验技巧。谭红老师对我的实验提出了非常多的宝贵意见和建议,在此对她表示深深的谢意,感谢谭老师给我的诸多指导与帮助。

感谢彭文璟、丁忠涛、张智师兄及孙丰慧、陈冠霞师姐在学术上、研究工作和生活中给予的关心和鼓励。衷心地感谢邓洪渊、巩涛、肖松、杨晗、何海波、何海清、付茂红、谭中元等在平时学习、工作与生活中给予的支持和关心。在此表示衷心的感谢。

最后,感谢我的家人在生活和工作上对我的鼓励和指导,他们是我求学道路上最有力的支持者,感谢他们在我生活和精神上给予我的理解、鼓励和帮助。

我将以努力的工作来回馈各位老师的教导、各位朋友的帮助及家人的支持!
祝大家身体健康、万事如意!

宋玉龙

2014 年 4 月 10 日