

发酵液中多拉菌素的提取和萃取条件研究

邹泽先^{1,2}, 陈 新¹, 张晓琳^{2*}

¹武汉工业学院, 武汉 430023; ²国家粮食局科学研究院, 北京 100037

摘要:采用单因素实验, 分别研究提取试剂、发酵液放置时间、pH 值和温度对发酵液中多拉菌素提取效果的影响; 然后以乙酸乙酯为萃取试剂, 研究萃取次数及萃取体积对多拉菌素萃取效果的影响。结果显示, 甲醇为最佳提取试剂; 发酵液在 pH 为 3~11、温度为 20~80 °C 的条件下放置 144 h, 多拉菌素均能稳定存在, 提取得到的多拉菌素的质量浓度没有显著变化; 浓缩提取液液经 2 倍体积乙酸乙酯萃取 2 次即可。该条件下多拉菌素的质量浓度和萃取率分别为 151.78 μg/mL 和 98.00%。

关键词:多拉菌素; 发酵液; 萃取条件

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Extraction Conditions of Doramectin in Fermentation Broth of *Streptomyces avermitilis*

ZOU Ze-xian^{1,2}, CHEN Xin¹, ZHANG Xiao-lin^{2*}

¹Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; ²Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China

Abstract: The optimal extraction conditions of doramectin in fermentation broth of *Streptomyces avermitilis* were investigated by parallel experiments. Factors including distribution ratio of doramectin in fermentation broth (hyphae or supernatant), extractants, extraction times, storage time, pH and temperature on extraction results were investigated with one-factor experiments. Meanwhile, the optimal extraction times and extracting volume were optimized based on using ethyl acetate. The optimal extraction conditions of doramectin in fermentation broth of *Streptomyces avermitilis* were obtained as follows: the optimal extraction solvent was methanol, and doramectin in fermentation broth could be stored for at least 144 h within the conditions of pH from 3 to 11 and temperature from 20 to 80 °C. Using ethyl acetate to extract doramectin, twice was the optimal extracting time, and the twice volume of ethyl acetate and concentrated extract was the best extraction proportion. Under the optimal extraction conditions, the concentration of doramectin and its extraction rate were 151.78 μg/mL and 98.00%, respectively.

Key words: doramectin; fermentation broth; extraction condition

多拉菌素(doramectin)为20世纪90年代研制开发的新一代大环内酯类抗寄生虫药,是以环己烷羧酸(cyclohexanecarboxylic acid)为前体,通过基因重组的阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)新菌株发酵而成的一种阿维菌素类抗生素^[1,2]。经近20年的研究,它被认为是目前阿维菌素族中最优秀的抗寄生虫药物之一,为内外兼杀剂,对线虫、节肢动物均有良好的驱杀效果^[3],其在动物体内的代谢具有血药浓度高、半衰期长、消除缓慢的特点^[2],是目前具有开发潜力的兽用抗寄生虫药物之一^[4]。

多拉菌素的优良性能使得其在养殖业及宠物业上应用较为广泛,但我国国内对于多拉菌素的研发则还只是处于初级阶段^[5],目前多拉菌素的国内外文献报道多集中在其药代动力学研究和残留检测等方面^[6],包括以SPE固相萃取柱建立高通量的检测方法^[7],以及以LC-MS快速分离并定量检测微量残留药物的方法^[8],但有关多拉菌素提取及分离、纯化方面则未见系统研究报道。本文旨在对多拉菌素发酵液的分离纯化方面进行探索研究,为后续研究提供理论依据。

1 材料、仪器与方法

1.1 材料与常用仪器

1.1.1 菌种

菌种 *Streptomyces avermitilis* XJ-8-115, 由国家粮

收稿日期: 2011-02-17 接受日期: 2011-08-31

基金项目: 国家“863”计划高技术研究发展计划资助项目“生物兽药新产品研究和创制”(2006AA10A208-1)

* 通讯作者 Tel: 86-10-81763841; E-mail: zxl@chinagrain.org

食局科学研究院筛选保藏。

1.1.2 材料

多拉菌素发酵液(国家粮食局科学研究院提供);多拉菌素标准品购自 Sigma,纯度 97.8%;甲醇、乙醇、丙酮、乙腈、异丙醇盐酸及氢氧化钠均为分析纯,由北京化工厂生产;甲醇、乙腈为色谱纯,Merck 公司生产。

1.1.3 培养基

种子培养基:可溶性淀粉 30 g/L,酵母提取物 2 g/L,大豆蛋白 2 g/L,CoCl₂·6H₂O 5 mg/L,pH 7.0~7.2,250 mL 三角瓶装样量为 50 mL。

发酵培养基:可溶性淀粉 70 g/L,酵母膏 16 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L,K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g/L,KCl₄ g/L,CoCl₂·6H₂O 5 mg/L,pH 7.0~7.2,250 mL 三角瓶装样量为 50 mL。

培养基的灭菌条件是 121 °C 灭菌 30 min。

1.1.4 仪器

高效液相色谱仪(2487 检测器,515 泵,717 进样器,美国 waters 公司);UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计(美国 Unico 公司);Eppendorf 5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);Delta 型 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司);SPY50 双层培养摇床(上海市离心机械研究所);SHB-III 型水循环多用真空泵。

1.2 多拉菌素发酵提取液的浓缩提取液的制备

取 1L 多拉菌素发酵液,加入 3 倍的甲醇(V/V),震荡摇匀,室温下提取 12 h,减压抽滤得到上清液,减压浓缩至原体积的 1/3~1/4,即得到多拉菌素发酵液的浓缩提取液。

1.3 多拉菌素的标准曲线的绘制

准确称取多拉菌素标准品 0.0250 g,置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度线,配制成质量浓度为 500 μg/mL 的多拉菌素标准母液,然后再依次稀释成质量浓度分别为 300、200、100、50、20、10、5 μg/mL 的多拉菌素标准溶液,将多拉菌素标准溶液在以下色谱条件下进样检测。色谱柱:Agilent Nucleosil 100—5 C₁₈,3.5 μm,250 mm×4.0 mm;流动相:甲醇—乙腈水溶液(V_{甲醇}:V_{乙腈}:V_水)=45:45:10;流速:1.0 mL/min;进样量 10 μL;检测波长:245 nm;柱温:25 °C。以多拉菌素标准溶液的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.4 不同因素对多拉菌素发酵液提取效果的影响

1.4.1 不同的提取试剂

取 5 组 50 mL 的多拉菌素发酵液,加入 3 倍体

积的不同有机溶剂:甲醇、乙醇、乙腈、丙酮及异丙醇,震荡摇匀并于室温提取 12 h 后,减压抽滤得到上清液,再取上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定各组溶液中多拉菌素的质量浓度,考察不同的提取试剂对多拉菌素提取效果的影响。各组设置 3 个重复。

1.4.2 发酵液 pH

取 7 份 50 mL 的多拉菌素发酵液,分别用 6 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 3、5、原始对照(pH 为 6.36)、7、9、11、13,避光 4 °C 放置 8 h,再调各组溶液的 pH 至中性,加入 3 倍体积的甲醇,震荡摇匀并于室温提取 12 h 后,减压抽滤得到上清液,再取上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定各组溶液中多拉菌素的质量浓度。各组均设 3 个重复,考察 pH 对多拉菌素发酵液提取效果的影响。

1.4.3 发酵液的放置时间

取 15 组 50 mL 的多拉菌素发酵液,分别避光 4 °C 放置 2、4、8、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144 h,加入 3 倍体积的甲醇,震荡摇匀并于室温提取 12 h 后,减压抽滤得到上清液,再取上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定各组溶液中多拉菌素的质量浓度。各组均设 3 个重复,考察不同放置时间对多拉菌素发酵液提取效果的影响。

1.4.4 不同温度

以具塞三角瓶分别取 7 组 50 mL 多拉菌素发酵液,分别置于不同温度的水浴锅:20、30、40、50、60、70、80 °C,放置水浴锅中 8 h 后,加入 3 倍体积的甲醇,震荡摇匀并于室温提取 12 h 后,减压抽滤得到上清液,再取上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定各组溶液中多拉菌素的质量浓度。各组设定 3 个重复,考察温度对多拉菌素发酵液提取效果的影响。

1.5 不同因素对多拉菌素浓缩提取液的萃取效果的影响

1.5.1 萃取次数

取 50 mL 的多拉菌素发酵液的浓缩提取液,加入等体积的乙酸乙酯,分别萃取 1、2、3 次,合并每次的有机相,有机相经减压浓缩干燥后加入 50 mL 的甲醇至完全溶解,取样经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定其中多拉菌素的质量浓度,每组重复 3 次。考察不同萃取次数对多拉菌素的萃取效

果的影响。

1.5.2 萃取试剂的体积

取 6 组 50 mL 的多拉菌素发酵液的浓缩提取液,加入不同体积的乙酸乙酯萃取,使 $V_{\text{浓缩提取液}}$:

$V_{\text{乙酸乙酯}}$ 分别为 1:0.5、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,取有机相减压浓缩干燥后加入 50 mL 的甲醇至完全溶解,取样经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定其中多拉菌素的质量浓度。每组设定 3 个重复,考察不同萃取体积对多拉菌素的萃取效果的影响。

1.6 发酵液中多拉菌素质量浓度的测定

“1.4”及“1.5”项下各实验中多拉菌素的质量浓度的测定,均以“1.3”中多拉菌素的标准曲线求得,即以 HPLC 测定得到多拉菌素的峰面积,再由标准曲线得出其质量浓度。

1.7 多拉菌素的萃取率的计算

萃取率 = (萃取溶剂中多拉菌素的总量/提取液中多拉菌素的总量) $\times 100\%$

1.8 数据处理

数据均采用 Originlab 8.0 软件进行分析和统计,每一个系数的显著性通过 Student t 检验和 P 值来衡量。

2 结果与分析

2.1 多拉菌素标准曲线的绘制

以多拉菌素标准液的质量浓度与峰面积为横纵坐标绘制标准曲线,得到其回归方程: $Y \times 10^{-4} = 1.7623X - 0.4938$,线性相关系数为 0.9998。该标准曲线显示多拉菌素在线性范围 5 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内具有良好的线性关系。根据此标准曲线能准确地得到多拉菌素的实际质量浓度。

2.2 不同因素对发酵液中多拉菌素提取效果的影响

2.2.1 不同的提取试剂

实验表明不同的提取试剂效果差异显著,以乙腈及甲醇的提取效果较好,它们提取得到多拉菌素的质量浓度分别为 147.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 142.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但两者差异不显著 ($P > 0.05$);同时,甲醇的成本及毒性均较乙腈低。故提取试剂选择甲醇。

2.2.2 发酵液 pH

图 1 所示即为发酵液 pH 对多拉菌素提取效果的影响。由图可以看出,在 pH 为 3 ~ 11 范围内,多拉菌素比较稳定;但当发酵液 pH 为 13 时,多拉菌素已经无法被检测出。这可能是由于在强碱性条件下,多拉菌素的结构发生改变,使得多拉菌素发生降

解或变为其它未知物质,而不能被检测出。多拉菌素在 pH 为 3 ~ 11 范围内均较稳定,提取效果良好,故提取发酵液时不需要调节 pH 值。

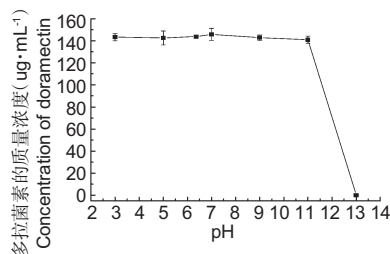


图 1 发酵液 pH 对多拉菌素提取效果的影响

Fig. 1 Effects of pH on the extraction results of doramectin

2.2.3 发酵液的放置时间

发酵液放置时间对多拉菌素提取效果的影响见图 2。从图 2 可以看出,在 2 ~ 144 h 内,发酵提取液中测得的多拉菌素的含量是趋于稳定的。所以,多拉菌素发酵液在避光条件下,放置一周是可行的。

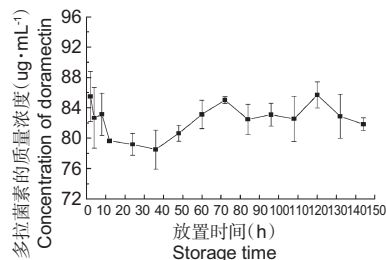


图 2 发酵液放置时间对多拉菌素提取效果的影响

Fig. 2 Effects of storage time on the extraction results of doramectin

2.2.4 不同温度

图 3 所示即为温度对多拉菌素提取效果的影响。如图所示,在 20 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,均能提取得到多拉菌素,且提取液中多拉菌素的质量无显著性差异 ($P > 0.05$);且温度的升高,有利于蛋白等杂质沉淀。故在 20 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$ 均能提取出多拉菌素,其在 20 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下稳定,选定多拉菌素的提取温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

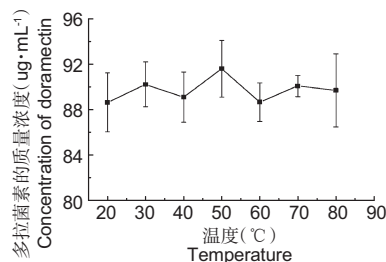


图 3 温度对多拉菌素提取效果的影响

Fig. 3 Effects of temperature on ttraction results of doramectin

2.3 不同因素对多拉菌素萃取效果的影响

2.3.1 萃取次数

随着萃取次数的增加,萃取率也增大。萃取1次仅能达到89.41%,萃取2次可达98%,萃取2次和萃取3次的效果则没有明显的差异($P > 0.05$)。故从成本及试剂回收的角度,选择乙酸乙酯对多拉菌素的浓缩提取液萃取2次即可。

2.3.2 萃取试剂的体积

随着设定比例中乙酸乙酯与浓缩提取液体积比的增大,萃取率也随之增大。在实验过程中,当萃取剂体积小于发酵液体积时,有明显的乳化现象,待静置较长时间分层后,测得萃取率为65.57%;当比例增大至2:1时,萃取率增大至96.71%,与更大萃取体积得到的萃取率差异不显著($P > 0.05$),所以综合考虑选择 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{多拉菌素浓缩提取液}}$ 为2:1。

3 讨论

本实验考察了多因素对多拉菌素提取及萃取效果的影响。结果显示,在对提取试剂优化实验中,得到更为廉价和低毒的甲醇作为提取试剂。多拉菌素在设定的温度、放置时间及pH为3~11的范围内均较稳定。萃取实验中以乙酸乙酯为萃取剂,优化得出其与多拉菌素浓缩提取液的体积比例为2:1,萃取2次即可。

本实验中发现,发酵液中多拉菌素在pH为3~11时稳定存在。在pH值为13时,检测不到多拉菌素,故推测多拉菌素发生变化,降解至其它物质而不能被检测到。提取试剂实验中,乙腈极性较甲醇大,提取效果优于甲醇;但是乙腈成本及毒性也都较甲

醇高,且两者提取所得多拉菌素的质量浓度差异不显著($P > 0.05$);故选择甲醇做完提取试剂。本文选择3倍浸提试剂提取菌体,是由预实验完成并在本文验证,菌丝体经3倍甲醇浸提2次即可浸提完全。

参考文献

- Mckellar QA, Benchaoui HA. Avermectins and milbermycins. *J Vet Pharmacol Ther*, 1996, 19:331-351.
 - Mckellar QA. Developments in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anthelmintic drugs. *J Vet Pharmacol Ther*, 1997, 20(suppl. 1):10-19.
 - Hu HB(扈洪波), Zhu BL(朱蓓蕾), Li JS(李俊锁). Progress in research of avermectins. *Chin J Anim Vet Sci*(畜牧兽医学报), 1999, (6):520-529.
 - Fang CL(房春林), Yang GY(杨光友), Gu XB(古小彬). Progress in research of doramectin. *China Anim Husb Vet Med*(中国畜牧兽医), 2006, 33:55-57.
 - Zhou XZ(周绪正), Zhang JY(张继瑜), Li JS(李金善), et al. Effects and application methods of doramectin. *China Rural Sci Technol*(中国农村科技), 2005, 11:37-38.
 - Gao YH(高玉红), Gu ZC(郭照成), Liu FY(刘方悦), et al. Research advancement and application of doramectin. *J Northeast Agric Univ*(东北农业大学学报), 2009, 40:141-144.
 - Harrison AC, Walker DK. Automated 96-well solid phase extraction for the determination of doramectin in cattle plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, (16):777-783.
 - Hernando MD, Su'arez-Barcena JM, Bueno MJM, et al. Fast separation liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food. *J Chromatogr A*, 2007, (1155):62-73.
- (上接第104页)
- He XY(何晓燕), Zhang LY(张利英), Bai XF(白雪芳), et al. Bioactivity of oligosaccharide produced by depolymerisation of xanthan with xanthan-degrading enzyme. *Microbiol*(微生物学通报), 2005, 32(3):87-90.
 - Yao Q(姚倩), Sun T(孙涛), Xu YX(徐轶霞). Preparation of chitosan oligosaccharide derivatives and their antioxidant activity. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008, 20:530-533.
 - Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem*, 1995, 43:27-32.
 - Su L, Ji WK, Lan WZ, et al. Chemical modification of xanthan gum to increase dissolution rate. *Carbohydr Polym*, 2003, 53:497-499.
 - Zhu HW(朱淮武). Spectral Analysis for the Structure of Organic Compounds(有机分子结构波谱解析). Beijing: Chemical Industry Press, 2008. 50-51.
 - Tian YL(田益玲), Chen GH(陈冠华), Wei XY(魏显有). Determination of eliminating ration of Chinese traditional medicines for hydrogen peroxide by fluorescence spectrophotometry. *J Anal Chem*, 2002, 30:183-185.
 - Duh PD, Du PC, Yen GC. Action of methanolic extract of mung bean bulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37:1055-1059.
 - XQ Zha, JH Wang, XF Yang, et al. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran. *Carbohydr Polym*, 2009, 78:570-575.
 - Christensen BE, Myhr MH, Smidsrød O. Degradation of double-stranded xanthan by hydrogen peroxide in the presence of ferrous ions. *Carbohydr Polym*, 1995, 280:85-99.