

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2022.02.06

恩拉霉素提取工艺研究

闵江¹, 娄燕¹, 刘正光¹, 赵才兵¹, 张翠芬¹, 高鹏¹, 王丹丹¹, 陈森¹, 梁景乐^{2*}

(1. 山东胜利生物工程有限公司 山东济宁 272000; 2. 中牧实业股份有限公司 北京 100095)

[收稿日期] 2021-02-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 02-0042-04 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为优化恩拉霉素提取工艺,以 70% 甲醇溶液为提取剂,提取恩拉霉素,经过浓缩、脱色、结晶、重结晶,制备高含量恩拉霉素产品。得到最佳提取工艺条件是:浸提 pH3.5~4.0,浸提温度 30℃,三次浸提时间 1 h,一次浸提料液比 1:7,二次浸提料液比 1:3,三次浸提料液比 1:3,活性炭用量是浓缩液体积的 1.0%~1.5%,粗精粉重结晶得到纯品,含量 97%。

[关键词] 恩拉霉素;提取工艺;甲醇

Extraction Technology of Enramycin

MIN Jiang¹, LOU Yan¹, LIU Zheng-guang¹, ZHAO Cai-bing¹, ZHANG Cui-fen¹, GAO Peng¹,
WANG Dan-dan¹, CHEN Sen¹, LIANG Jing-le^{2*}

(1. Shandong Shengli Bioengineering Co., LTD, Jining, Shandong, 272000, China; 2. China Animal Husbandry Industry Co., Ltd, Beijing 100095, China)

Corresponding author: LIANG Jing-le, E-mail: liangjingle@163.com

Abstract: To optimize extraction technology of Enramycin, 70% methanol solution was used to extract Enramycin, and then was concentrated, decolorized, crystallized, recrystallized. The active pharmaceutical ingredient (API) was produced. The optimized extraction technological conditions were pH 3.5~4.0, temperature 30℃, extraction time 1h, three extraction process ed with material-liquid ratios 1:7, 1:3, 1:3, 1.0%~1.5% ratio of activated carbon / concentrated solution, recrystallized once. The product of Enramycin was 97%.

Key words: Enramycin; extraction; methanol solution

恩拉霉素 (Enramycin), 又名恩来霉素、恩霉素、安来霉素、持久霉素,是由土壤中分离出来的放线菌 (*Streptomyces fungicidius* NO. B5477) 发酵产生的一种多肽类抗生素^[1-2]。恩拉霉素具有促生长^[3]和改善饲料利用率的作用,并且对革兰阳性菌

有很强的抑制作用,特别对肠道中有害的梭菌抑制作用较强,长期使用后不易产生耐药性等特点,因此被世界上很多国家推荐作为动物促生长剂,是一种较好的饲料添加剂^[4]。

现有的恩拉霉素分离纯化方法主要有 Amber-

作者简介: 闵江, 硕士, 工程师, 从事抗生素研发工作。E-mail: minjiangzwj@163.com

通讯作者: 梁景乐。E-mail: liangjingle@163.com

lite XAD-2 大孔树脂^[5]、高速逆流色谱^[6]、AB-8 大孔树脂吸附和分子筛相结合的方法^[7]、大孔树脂和反相色谱结合分离恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 的方法^[8]，提取恩拉霉素方法过于繁琐，不利于工业化生产。鉴于此，对恩拉霉素提取工艺进行了研究，可为工业化生产恩拉霉素提供实验数据，以此填补国内空白。

1 材料与方法

1.1 原料 EN2017184 批恩拉霉素发酵液与恩拉霉素标准品由山东胜利生物工程有限公司提供。

1.2 主要试剂 甲醇（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；丙酮（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；乙腈（HPLC，J. T. Baker）；盐酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；氢氧化钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；活性炭粉（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；磷酸二氢钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。

1.3 主要仪器 液相色谱仪 Agilent1200（Agilent

公司，美国）；FW-100 型万能粉碎机（上海楚定分析仪器有限公司）；JA31002 型电子天平（上海越平科学仪器有限公司）；KDM 型调热电热套（山东鄄城光明仪器有限公司）；Heidolph 4000 旋转蒸发仪（海道夫，德国）；DZF-6050 型真空干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；SHB-Ⅲ型循环水真空泵（郑州长盛实验仪器有限公司）；xutemp 型低温恒温液浴循环两用槽（杭州雪中炭恒温技术有限公司）；ALPHA1-2 型冷干机（CHRIST）。

1.4 实验方法

1.4.1 恩拉霉素干菌丝体制备 发酵结束后，取适量发酵液，加入 2~3%（w/v）硅藻土助滤剂，搅拌均匀，然后用布什漏斗真空抽滤，待发酵液完全过滤后，滤饼用 3 倍发酵液体积的去离子水洗涤两次，减压抽至无水滴流出，得到的恩拉霉素湿菌丝体，放在真空干燥箱中烘干，粉碎，备用。

1.4.2 恩拉霉素提取工艺 工艺流程图见图 1。

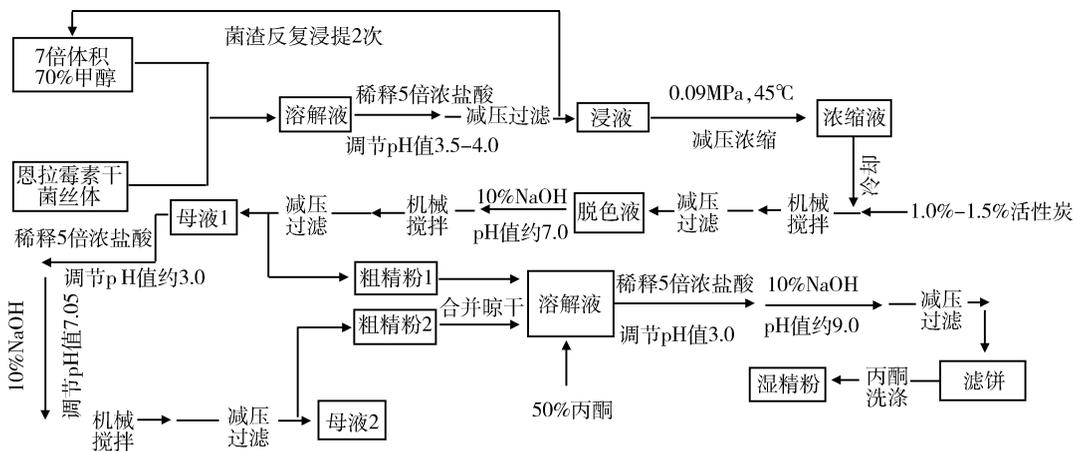


图 1 恩拉霉素提取工艺流程图

Fig 1 Flow chart of extraction process of enramycin

1.4.3 恩拉霉素效价的检测

1.4.3.1 对照品溶液的制备 取恩拉霉素对照品适量（约相当于恩拉霉素 20 mg），置 100 mL 容量瓶中，加稀释液（2 L 丙酮、2.1 L 去离子水与 18 mL 盐酸混合均匀）适量使溶解，稀释液稀释至刻度，制成约含 0.2 mg/mL 的溶液。

1.4.3.2 供试品溶液的制备 精确称量恩拉霉素 0.02 g，放入 100 mL 容量瓶中加入适量稀释液，溶解后用稀释液定容，摇匀、过滤、备用。

1.4.3.3 色谱条件^[9] 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以乙腈-0.6% 磷酸二氢钠溶液（30:70）为流动相；检测波长为 267 nm，进样量 20 μL。

2 结果与分析

2.1 恩拉霉素在不同浓度甲醇溶液中溶解能力

取适量恩拉霉素菌丝体,在 30 ℃ 条件下分别用无水甲醇、90% 甲醇溶液、70% 甲醇溶液一次浸提;利用液相色谱检测浸提液效价,结果见表 1。可以看出,无水甲醇浸提恩拉霉素的效果不佳,考虑 70% 甲醇溶液浸提恩拉霉素菌丝体。

表 1 不同浓度甲醇溶液中恩拉霉素溶解度

Tab 1 Solubility of Enramycin in methanol solutions with different concentrations

甲醇浓度 (%)	效价 (μg/mL)
100	10978
90	11581
70	20453

2.2 浸提 pH 的选择 取适量恩拉霉素菌丝体,在 30 ℃ 条件下分别用 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的 70% 甲醇溶液一次浸提;检测浸提液效价,结果见表 2。可以看出,酸性条件下 70% 甲醇溶液浸提恩拉霉素的效果较好,综合设备承受能力与安全因素,确定 70% 甲醇溶液用稀释盐酸至 pH 为 3.5~4.0 浸提恩拉霉素菌丝体。

表 2 不同 pH 下 70% 甲醇溶液中恩拉霉素溶解度

Tab 2 Solubility of Enramycin in 70% methanol solution at different pH

pH	效价 (μg/mL)
6.0	4 435
5.5	5823
5.0	6910
4.5	11183
4.0	16504
3.5	17804
3.0	16885
2.5	17050

2.3 浸提温度的选择 取适量恩拉霉素菌丝体,分别在 30 ℃、40 ℃、50 ℃ 条件下用 pH 为 3.5~4.0 的 70% 甲醇溶液一次浸提;检测浸提液效价,结果见表 3。可以看出,温度越高,甲醇溶液浸提恩拉霉素的效果较好。鉴于恩拉霉素稳定性较差,综合动力成本与安全因素,确定 30 ℃ 为浸提温度。

表 3 不同温度下甲醇溶液中恩拉霉素溶解度

Tab 3 Solubility of Enramycin in methanol solution at different temperatures

温度 (℃)	效价 (μg/mL)
30	19625
40	22037
50	22763

2.4 浸提时间的选择 取适量恩拉霉素菌丝体,在 30 ℃ 条件下用 pH 为 3.5~4.0 的 70% 甲醇溶液一次浸提;分别在 0.5、1、2 h 取样检测浸提液效价,结果见表 4。考虑到时间成本与浸提率,浸提时间可以选用 1 h。

表 4 不同时间下甲醇溶液中恩拉霉素溶解度

Tab 4 Solubility of enramycin in methanol solution at different time

浸提时间 (h)	效价 (μg/mL)
0.5	12546.16
1	15929.47
2	13838.56

2.5 浸提料液比选择 在 30 ℃ 条件下,比较不同料液比 (m/v) 对浸提率的影响,实验结果见表 5。可以看出,恩拉霉素菌丝体浸提次数越多,甲醇溶液的使用量越多,浸提率越高,菌渣中残留的恩拉霉素越少。考虑到溶剂套用情况、菌渣残留、生产设备承受能力等情况,确定一次浸提料液比为 1:7,二次浸提料液比为 1:3,三次浸提料液比为 1:3。

表 5 不同料液比对浸提率的影响

Tab 5 The influence of different material-liquid ratios on the extraction rate

一次浸提料液比	二次浸提料液比	三次浸提料液比	浸提率 (%)	菌渣效价 (%)
1:4	1:2	\	85.21	1.23
1:5	1:3	\	91.23	0.94
1:7	1:3	1:3	96.28	0.36

2.6 活性炭用量选择 浓缩液使用不同活性炭用量 (m_{活性炭}/v_{浓缩液}) 进行脱色,考察脱色损失及粗精粉质量的影响,实验结果见表 6。可以看出,活性炭的使用量越多,粗精粉质量越好,但恩拉霉素损失越多。考虑到粗精粉需进行重结晶及产品收率问题,

活性炭用量($m_{\text{活性炭}} \setminus v_{\text{浓缩液}}$)可控制在 1.0% - 1.5% 之间。

表 6 不同用量活性炭对恩拉霉素粗精粉质量影响

Tab 6 The effect of different amounts of activated carbon on the quality of Enramycin coarse powder

$m_{\text{活性炭}} \setminus v_{\text{浓缩液}}$ (%)	恩拉霉素粗精粉产品性状	脱色损失 (%)
1.0	较黄,不松散	-4.69
1.5	微黄	-6.34
2.0	黄白相间	-8.57
3.0	微白	-12.91

2.7 结晶次数的选择 脱色液加碱结晶,比较结晶次数对母液中恩拉霉素残留率的影响,实验结果见表 7。可以看出,两次结晶后可较大程度减少母液中残留的恩拉霉素,提高产品收率。

表 7 结晶次数对产品收率的影响

Tab 7 The influence of crystallization times on product yield

结晶次数	母液中残留恩拉霉素效价($\mu\text{g}/\text{mL}$)	损失率 (%)
1	4458.18	-21.77
2	483.29	-2.32

2.8 重结晶工艺选择 恩拉霉素粗精粉含量在 85% 左右,尝试使用 70% 甲醇溶液、乙酸乙酯、丙酮溶液等对粗精粉进行重结晶纯化,50% 丙酮溶液重结晶效果较好,获得恩拉霉素纯品颜色较白,含量 97% 以上,丙酮溶液中残留较多恩拉霉素,收率偏低,下一步实验拟提高此工艺过程的收率。

3 结论

通过对浸提溶剂、浸提 pH、浸提温度、浸提时间、料液比、活性炭用量等单因素研究,确定了恩拉霉素提取的最佳工艺:浸提溶剂为 70% 甲醇溶液,浸提 pH 为 3.5 ~ 4.0,浸提温度为 30 °C;三次浸提时间都为 1 h;一次浸提料液比为 1:7,二次浸提料液比为 1:3,三次浸提料液比为 1:3;活性炭用量($m_{\text{活性炭}} \setminus v_{\text{浓缩液}}$)为 1.0% ~ 1.5%;两次结晶获得粗精粉,并对粗精粉进行重结晶,可获得含量高达 97% 的恩拉霉素纯品。相比较现有的大孔树脂吸附及色谱等恩拉霉素的分离纯化方法,此工艺的操作简单易行,对设备要求较低,另外此工艺稳定可

行,所用的溶剂均可回收利用,对环境污染较小,为工业化生产恩拉霉素纯品奠定基础。

参考文献:

- [1] Higashide E, Hatano K, Shibata M. Enduracidin, a new antibiotic I, Streptomyces fungicidicus No. B5477, an enduracidin producing organism [J]. Antibiotics, 1968, (21): 126 - 137.
- [2] Asai M, Muroi N, Sugita H, et al. Enduracidin, a new antibiotic II. isolation and characterization [J]. Antibiotics, 1968, (21): 138 - 146.
- [3] Pedrosa A A, Menten J F, Lambais M R, et al. JO: Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics [J]. Poultry Sci, 2006, 85: 747 - 752.
- [4] 叶婷婷, 陈方龙, 曹丹, 等. 饲料添加剂恩拉霉素的研究进展 [J]. 饲料添加, 2011, (6): 25 - 26.
Ye T T, Chen F L, Cao D, et al. Research progress of feed additive enramycin [J]. Feed Additives, 2011, (6): 25 - 26.
- [5] Hori M. Enduracidin, a new antibiotic VI. Separation and determination of enduracidins A and B by column chromatography [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1973, 21(6): 1171 - 1174.
- [6] Inoue K, Hattori Y, Hino T, et al. An approach to on-line electrospray mass spectrometric detection of polypeptide antibiotics of enramycin for high-speed counter-current chromatographic separation [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51(5): 1154 - 1160.
- [7] 王丹丹, 杨文革, 胡永红, 等. 大孔树脂分离纯化持久霉素 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(4): 194 - 196.
Wang D D, Yang W G, Hu Y H, et al. Separation and Purification of Duromycin by Macroporous Resin [J]. Food and Fermentation Industry, 2010, 36(4): 194 - 196.
- [8] 吴家鑫, 黄永东, 齐鹏, 等. 大孔树脂吸附与反相色谱纯化恩拉霉素 [J]. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1701 - 1708.
Wu J X, Huang Y D, Qi P, et al. Purification of enramycin by macroporous resin adsorption and reversed phase chromatography [J]. Journal of Bioengineering, 2014, 30(11): 1701 - 1708.
- [9] 刘雅晶. 恩拉霉素高效液相色谱 (HPLC) 检测方法的建立 [D]. 江西: 江西农业大学动物科学技术学院, 2016: 1 - 38.
Liu Y J. Determination of Enramycin by the method of HPLC [D]. Jiang Xi: College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, 2016: 1 - 38.