

The Study on the Preparation and Purification of Prodigiosin

Jinxiang Ge*, Shiqing Sun#, Deming Feng, Dezhen Lin, Yi Wu

Nanhu College, Jiaying University, Jiaying Zhejiang
Email: #30548471@qq.com

Received: May 9th, 2019; accepted: May 24th, 2019; published: May 31st, 2019

Abstract

In this work, prodigiosin from microbial was purified by silica gel column chromatography, and suitable eluents for prodigiosin were screened by TLC. The content of prodigiosin in different purified steps was determined by high performance liquid chromatography. The results showed that the crude product of prodigiosin produced by microbial fermentation reached 6.23 ± 1.56 g/L with the content of $0.29\% \pm 0.14\%$; the acetone extract reached 52.3 ± 4.5 mg/L with the content of $29.6\% \pm 4.8\%$; the ratio of suitable eluent was 9:1 (chloroform and ethyl acetate). The final content of prodigiosin could reach $96.2\% \pm 1.3\%$ and its yield was 3.3 ± 0.4 mg/L.

Keywords

Prodigiosin, Separation and Purification, HPLC

灵菌红素的纯化制备工艺研究

葛金祥*, 孙诗清#, 冯德明, 林德镇, 吴轶

嘉兴学院南湖学院, 浙江 嘉兴
Email: #30548471@qq.com

收稿日期: 2019年5月9日; 录用日期: 2019年5月24日; 发布日期: 2019年5月31日

摘要

通过微生物发酵法生产灵菌红素, 薄层层析法筛选合适的灵菌红素展开剂, 然后利用硅胶柱层析高效纯化制备灵菌红素纯品, 高效液相色谱法检测各纯化组分中灵菌红素的含量。结果发现, 微生物发酵法生产灵菌红素粗产品达到 6.23 ± 1.56 g/L, 其含量为 $0.29\% \pm 0.14\%$; 丙酮提取物达到 52.3 ± 4.5 mg/L, 其含量为 $29.6\% \pm 4.8\%$; 以氯仿与乙酸乙酯为基础筛选出9:1比例的灵菌红素与杂质的分离效果较好,

*第一作者。

#通讯作者。

适合作为硅胶柱层析的洗脱剂进行灵菌红素的纯化, 纯化后的产品经过乙醚洗涤结晶后, 产量达到 3.3 ± 0.4 mg/L, 其含量为 $96.2 \pm 1.3\%$ 。

关键词

灵菌红素, 分离纯化, 高效液相

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

灵菌红素是一种主要由微生物产的天然红色素, 1929年 Amako 等在研究沙雷氏菌 (*Serratia*) 生长时发现, 而首先分离得到灵菌红素的是 Harashima 等在 1960 年完成的[1] [2], 其化学结构式如图 1 所示。

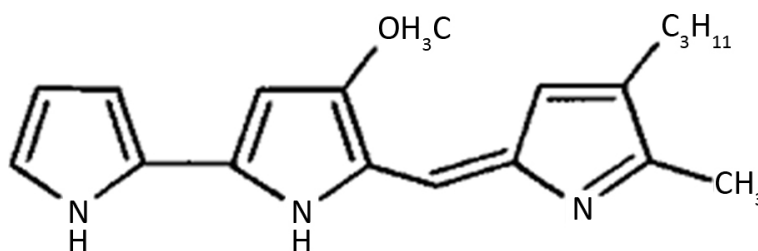


Figure 1. Chemical structure of prodigiosin

图 1. 灵菌红素的化学结构式

随着研究人员对灵菌红素的性质及生物活性的深入研究, 发现它具有抗细菌、抗疟疾、抗真菌、抗原生动物[3] [4] [5], 以及人们最关注的免疫抑制活性和引起肿瘤细胞凋亡的作用[6] [7] [8], 因此作为一种天然色素, 灵菌红素在医学、食品、印染、纺织、饲料添加剂、环境治理等领域, 均有巨大的应用潜力和广阔的市场前景。且灵菌红素作为一种微生物所产的色素, 克服了植物色素提取的诸多弊端, 如生产周期短, 同时不受资源、时间和空间等因素的限制, 并且易于工业化生产[9] [10] [11]。为此, 本文利用实验室筛选的一株高产菌株进行发酵生产灵菌红素, 研究其纯化制备方法为灵菌红素的进一步开发利用提供大量的物质基础。

2. 材料与方法

2.1. 灵菌红素的发酵

利用本实验室分离鉴定的粘质沙雷氏菌(CGMCC:4074)按照文献[12]所述条件进行种子培养与发酵培养, 培养 48 h 后, 5000 rpm 离心收集菌体, 60℃真空干燥, 称重, 得灵菌红素粗产品。

2.2. 灵菌红素的提取

称取适量灵菌红素粗产品加入按照 1:27 (W:V) pH = 3.0 的酸性丙酮, 25℃下, 超声提取 20 min, 提取 3 次。合并提取液于 60℃旋转蒸干得到丙酮提取物, 称重。

2.3. 灵菌红素的薄层层析

以自制的硅胶 G60 薄层层析板为层析介质, 使用氯仿:乙酸乙酯的双溶剂系统, 分别筛选 1:9, 3:7, 5:5, 7:3, 9:1 五种展开剂, 分析杂质与灵菌红素的分离度与 R_f 值变化, 确定最优展开剂。

2.4. 灵菌红素的硅胶柱层析

采用湿法柱层析的方法进行灵菌红素的硅胶柱层析。使用普通玻璃层析柱(10 mm × 20 cm), 按照样品与柱层析硅胶(200~300 目) 1:10 的质量比进行加样, 按照 2.3 优化的展开剂进行等度洗脱, 根据颜色变化, 收集灵菌红素部分, 于 60℃ 旋转蒸干, 乙醚洗涤后得到柱层析纯化物, 称重。

2.5. 灵菌红素的含量检测

通过高效液相色谱外标法测定各组分离菌红素的含量。供试品溶液的制备: 精密灵菌红素粗产品、丙酮提取物和柱层析纯化物 10 mg 使用色谱甲醇超声波提取, 离心并定容至 25 mL 备用。对照品溶液的制备: 精密称取灵菌红素对照品 1.0 mg 使用色谱甲醇超声波溶解并定容至 25 mL 容量瓶中, 制成 40 mg/L 的灵菌红素对照品溶液, 备用。色谱条件为: 使用 Agilent Technologies 1200 液相色谱仪, Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 在甲醇: 5% 乙酸铵 = 85:15 的流动相系统, 535 nm 检测波长下, 以 1.0 mL/min 流速, 测定灵菌红素含量。

3. 结果与分析

3.1. 灵菌红素的发酵与提取实验结果

通过上述的发酵过程, 结果获得了 6.23 ± 1.56 g/L 的灵菌红素粗产品。对粗产物进行丙酮超声波提取后获得 52.3 ± 4.5 mg/L 丙酮提取物。经过硅胶柱层析后获得 3.3 ± 0.4 mg/L。

3.2. 灵菌红素的薄层层析条件筛选结果

在溶剂比例条件下, 灵菌红素与杂质的分离效果差异明显。其中, 根据经验得知, 当展开剂使目标产物与杂质的 R_f 值差异在 0.5 以上, 其作为柱色谱的洗脱剂, 对其分离效果较好(如图 2 与表 1 所示)。因此, 溶剂系统选择氯仿:乙酸乙酯 = 9:1 为最优洗脱剂。

Table 1. R_f changes of prodigiosin and impurities in different solvent ratios
表 1. 不同溶剂比例条件下灵菌红素与杂质的 R_f 变化

溶剂	样品	
	灵菌红素 R_f	杂质 R_f
1:9	接近 1.0	接近 1.0
3:7	0.95	0.83
5:5	0.85	0.62
7:3	0.80	0.55
9:1	0.70	小于 0.3

3.3. 灵菌红素的含量检测结果

在不同处理条件下所获得的灵菌红素产品, 通过高效液相色谱外标法测定了灵菌红素含量, 结果见表 2 与图 3。从表 2 可以看出, 灵菌红素粗产品中灵菌红素含量较低, 大多数是菌体的重量, 丙酮提取

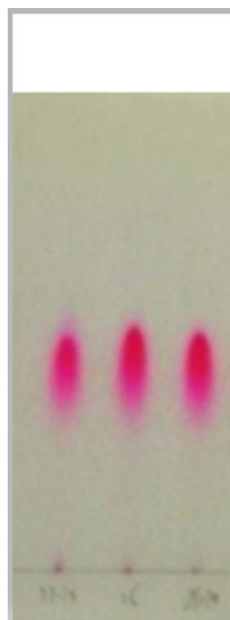
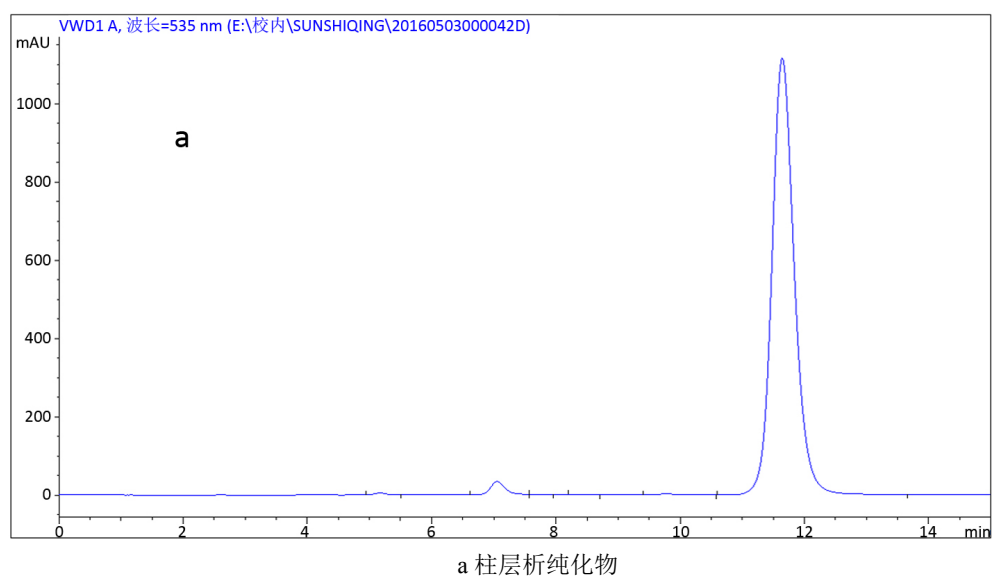


Figure 2. Thin layer chromatography of prodigiosin
图 2. 灵菌红素 TLC 图

以后灵菌红素的含量提高 100 倍左右，而硅胶柱层析又将灵菌红素含量提高了 3 倍左右，达到了 96% 以上。但在灵菌红素的回收率上，丙酮一步提取后，其回收率在 86% 以上，而经过柱层析后其回收率下降到 20% 以下。这些可能大大增加了灵菌红素的分离纯化成本。

Table 2. Contents of different prodigiosin samples
表 2. 不同灵菌红素样品的含量

样品名称		
灵菌红素粗产品/%	丙酮提取物/%	柱层析纯化物/%
0.29 ± 0.14	29.6 ± 4.8	96.2 ± 1.3



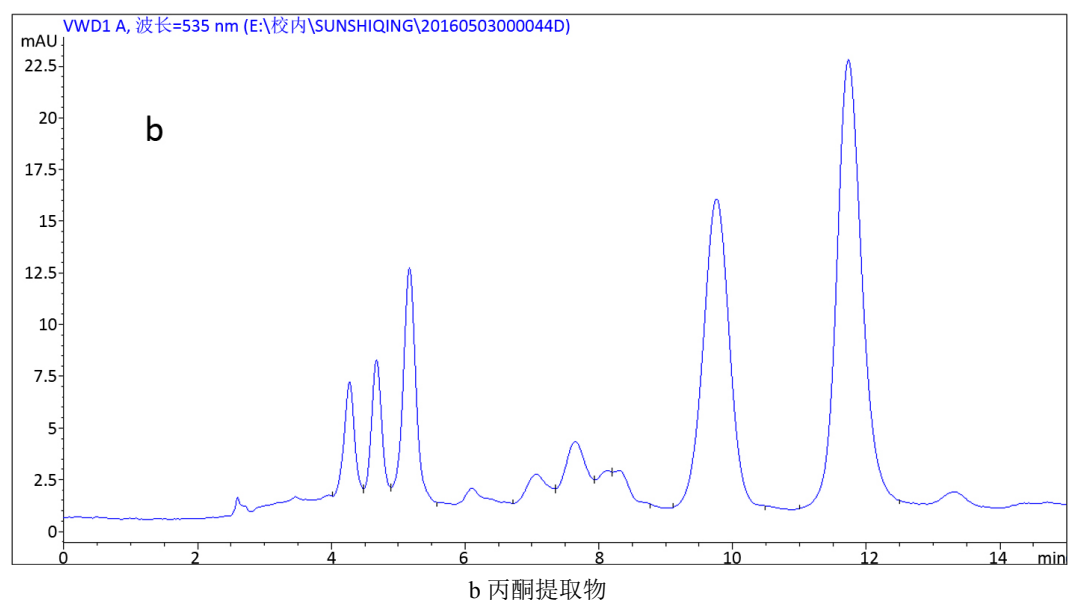


Figure 3. High performance liquid chromatography of prodigiosin
图 3. 灵菌红素的高效液相色谱图

4. 结论

以粘质沙雷氏菌发酵法生产灵菌红素产品是绿色可行的，其粗产品的产量可以达到 6.23 ± 1.56 g/L。配以超声波辅助提取技术可以大大提高灵菌红素的含量，达到 $29.6\% \pm 4.8\%$ 。再经过硅胶柱层析可以高效纯化制备高纯度的灵菌红素纯品，其含量可达到 $96.2\% \pm 1.3\%$ 。该工艺操作简单、灵活，可根据实际需要进行删减。比如灵菌红素用于水体治理和染色方面，可以直接使用丙酮提取物。对于开发药品或扩展其生物活性，可以使用柱层析纯化产品。因此该纯化制备工艺为进一步开发灵菌红素应用提供一定的参考数据。

基金项目

嘉兴市科技局项目(2016AY13005)资助，2018 年嘉兴学院重点 SRT 项目(85178404)资助。

参考文献

- [1] Shieh, W.Y., Chen, Y.W., Chaw, S.M. and Chiu, H.-H. (2003) A Red, Facultatively Anaerobic, Marine Bacterium Isolated from Sea Water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 479-484. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02307-0>
- [2] Pandey, R., Chander, R. and Sainis, K.B. (2003) A Novel Prodigiosin-Like Immunosuppressant from an Alkalophilic *Micrococcus* sp. *International Immunopharmacology*, **3**, 159-167. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(02\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(02)00114-5)
- [3] Giri, A.V., Anandkumar, N., Muthukumar, G. and Pennathur, G. (2004) A Novel Medium for the Enhanced Cell Growth and Production of Prodigiosin from *Serratia marcescens* Isolated from Soil. *BMC Microbiology*, **4**, 11-21. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-11>
- [4] Nakashima, T., Kato, Y., Yamaguchi, K., Nakashima, T. and Kato, Y. (2005) Evaluation of the Anti-*Trichophyton* Activity of a Prodigiosin Analogue Produced by γ -*Proteobacterium*, Using Stratum Corneum Epidermis of the *Yucatan micropig*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **11**, 123-128. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0376-0>
- [5] Song, C., Sanada, M., Johdo, O., Ohta, S., Nagamatsu, Y. and Yoshimoto, A. (2000) High Production of Prodigiosin by *Serratia marcescens* Grown on Ethanol. *Biotechnology Letters*, **22**, 1761-1765. <https://doi.org/10.1023/A:1005646102723>
- [6] Montaner, B. and Perez, T.R. (2002) The Cytotoxic Prodigiosin Induces Phosphorylation of p38-MAPK But Not of

SAPK/JNK. *Toxicology Letters*, **129**, 93-98. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00477-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00477-5)

- [7] Songia, S., Mortellaro, A., Taverna, S., *et al.* (1997) Characterization of the New Immunosuppressive Drug Undecylprodigiosin in Human Lymphocytes. *Immunology*, **158**, 3987-3995.
- [8] Yamamoto, D., Uemura, Y., Tanaka, K., *et al.* (2000) Cycloprodigiosin Hydrochloride H^+/Cl^- Symporter Induces Apoptosis and Differentiation in HL-60 Cells. *International Journal of Cancer*, **88**, 121-128. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20001001\)88:1<121::AID-IJC19>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20001001)88:1<121::AID-IJC19>3.0.CO;2-C)
- [9] 苏龙, 詹萍, 陈旭健, 等. 微生物产天然红色素提取技术研究进展[J]. 玉林师范学院学报: 自然科学版, 2008, 29(3): 84-86.
- [10] 王君, 张宝善. 微生物生产天然红色素的研究进展[J]. 微生物学报, 2007, 34(3): 580-583.
- [11] 苏龙, 刘洪海, 吴弦华, 等. 一株高产红色素菌的筛选及其色素的提取和理化性质研究[J]. 食品科技, 2007(12): 43-45.
- [12] 孙诗清, 冯德明, 刘晓侠, 等. X-5 型大孔吸附树脂发酵分离灵菌红素的工艺优化[J]. 嘉兴学院学报, 2018, 30(6): 83-88.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8844, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hicet@hanspub.org