

链霉菌 702 抗尖孢镰刀菌次级代谢产物的 分离鉴定及活性研究

魏赛金, 张智平, 涂晓嵘, 何健, 涂国全*

(江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 从链霉菌 702 代谢产物中分离纯化抗尖孢镰刀菌的活性成分。以抗尖孢镰刀菌活性为导向, 采用多种色谱分离技术对活性成分进行分离纯化, 并对其理化性质和波谱学数据进行测定和综合解析, 鉴定其化学结构。结果从链霉菌 702 代谢产物中分离得到 1 个多烯大环内酯化合物, 经鉴定为制霉菌素 (Fungichromin), 该化合物具有显著的抗尖孢镰刀菌作用, 其尖孢镰刀菌古巴“专化型”FOC1、FOC4 的 EC_{50} 和 EC_{90} 分别为 4.7、3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 21.5、53.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词: 链霉菌 702; 抗尖孢镰刀菌古巴“专化型”活性; 次生代谢产物; 制霉菌素

中图分类号: TQ920.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)05-0982-05

Studies on the Isolation, Identification and Activity of Anti-*Fusarium oxysporum* Secondary Metabolites Produced by *Streptomyces* sp. 702

WEI Sai-jin, ZHANG Zhi-ping, TU Xiao-rong, HE Jian, TU Guo-quan*

(Biological Science and Engineering College of Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Objective To investigate anti-*Fusarium oxysporum* secondary metabolites from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. 702. Method Under the direction of anti-*Fusarium oxysporum* activity, active compounds were isolated and purified with a variety of chromatographic separation techniques, and identified base on their physical-chemical properties and spectral data. Results and Conclusion A polyene macrolide compound, identified as fungichromin, was isolated from the fermentation broth produced by *Streptomyces* sp. 702, and showed remarkable anti-*Fusarium oxysporum* activity with the EC_{50} and EC_{90} against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* FOC1, FOC4 of 4.7, 3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 21.5, 53.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Key words: *Streptomyces* sp. 702; anti-*fusarium oxysporu* f. sp. *cubense* activity; secondary metabolites; fungichromin

在进行以棉花枯萎病为靶目标的农用抗生素产生菌的分离筛选研究中, 江西省南昌市发酵应用重点实验室从江西农业大学的棉花土壤中分离筛选到一株链霉菌, 编号为 702 号。该菌所产抗菌活性物质在微量浓度下分别对细菌、霉菌和酵母菌均有极强的抗菌作用^[1]。从链霉菌 702 的发酵液中提取抗菌单体活性组分 S2 和进行化学结构鉴定, 抗菌单体活性组分 S2 为 9 种氨基酸组成的环肽, 分子量 1 269.65 和分子式 $\text{C}_{62}\text{H}_{84}\text{N}_{12}\text{O}_{17}$, 为国内首次发现和鉴定, 命名红谷霉素^[2]。前期研究发现其发酵产物

收稿日期: 2011-06-05 修回日期: 2011-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960011、31071724)和江西省自然科学基金项目(32009GZN0030、2010GZN0037)

作者简介: 魏赛金(1969—), 女, 博士生, 主要从事微生物所产活性物质的研究; * 通讯作者: 涂国全, 教授, 硕士生导师, E-mail: tuguquan@263.net。

具有很强的抗尖孢镰刀菌作用^[3],对其抗菌活性成分进行研究的过程中,分离到1个具有显著抗尖孢镰刀菌活性的单体组分DZP-9,经鉴定为制霉菌素(fungichromin)。以尖孢镰刀菌古巴“专化型”FOC1,FOC4为靶标菌,对其抗菌活性进行研究,表明其 EC_{50} 和 EC_{90} 分别为4.7、3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和21.5、53.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与阳性对照药纳他霉素活性相当,显示出良好的应用开发前景,现将试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备 50 L全自动发酵罐;GZX-9140MBE 恒温电热鼓风干燥箱;立式灭菌锅(LDZX-40B1型50 L);电子天平;分析天平;恒温振荡摇床;YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂);SPX-70 恒温培养箱(上海森信仪器厂);X-5 显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司),温度未经校正;Bruker AV 400 型核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克 Bruker 公司),TMS 内标,溶剂为 $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-d_5$;HPLC-ESI-MS 用 LCMS-2010A 型质谱仪(日本岛津)测定;IR 用 Tensor 27 FT-IR 分光光度仪测定(KBr 压片);Shimadzu UV-2401PC 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);AKTA Explorer 100 制备型高效液相色谱仪(美国安玛西亚 AKTA explorer 100 air 快速纯化工艺开拓系统);分析型 Beckman System Gold 高效液相色谱仪;色谱制备柱:MuMing Packing Material(25×300 mm) 柱色谱和薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂);原料:玉米淀粉、玉米粉、黄豆饼粉、葡萄糖、蔗糖、大豆油等。

1.1.2 菌种 链霉菌702(*Streptomyces* 702):江西农业大学应用微生物研究室甘油管冷冻保藏。

指示菌:尖孢镰刀菌古巴“专化型”(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC) FOC1、FOC4 由中国热带农业科学院热环境与植物保护研究所提供^[4];黑曲霉(*Aspergillus niger*) 由江西农业大学应用微生物实验室提供。

1.1.3 培养基 链霉菌702 斜面培养基,指示菌斜面、平板培养基:马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

种子培养基:蔗糖 20 g,玉米粉 30 g,黄豆粉 10 g,酵母膏 4 g,碳酸钙 6 g,豆油 4 mL,定容至 1 000 mL,起始 pH 7.0。

发酵培养基:玉米淀粉 16.83 g,玉米粉 30 g,葡萄糖 20 g,磷酸二氢钾 0.3 g,蛋白胨 8.64 g,黄豆饼粉 15 g,硝酸钾 5 g,氯化钙 5 g,豆油 10 mL,定容至 1 000 mL,起始(消前) pH 8.0。

1.1.4 阳性对照药 纳他霉素,购自北京东方瑞德生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 链霉菌702 种子培养 将链霉菌702 斜面菌种制成孢子悬液($T_{660\text{nm}}=80\%$) 按2.5%体积比接种链霉菌702 孢子悬液于装有400 mL 种子培养基的2 000 mL 三角瓶中,30℃,200 r/min 回转式摇床旋转培养48 h。

1.2.2 链霉菌702 的50 L 罐一级发酵 接种1.5 L 培养48 h 的链霉菌702 种子液于装有30 L 发酵培养基的50 L 发酵罐中,以转速200 r/min,通气量30 L/min,30℃下培养。

1.2.3 链霉菌702 的500 L 罐二级发酵 接种培养48 h 的链霉菌702 一级发酵液30 L 于装有200 L 的发酵培养基的500 L 发酵罐中以转速200 r/min,通气量200 L/min,30℃下培养。

1.2.4 化合物的分离纯化 200 L 链霉菌702 发酵液,加2倍体积90%的工业酒精室温浸提2次,每次24 h,真空抽滤,合并滤液,减压浓缩,得油状物80 L,然后用乙酸乙酯萃取3次,每次120 L,萃取液减压浓缩,得抗尖孢镰刀菌活性物质浸膏。取浸膏500 g,上硅胶柱色谱,用氯仿:甲醇(100:0,90:10,95:5,85:15,80:20,75:25,0:100) 溶剂系统洗脱,得26个馏分,合并得抗黑曲霉组分48.08 g。

取抗真菌组分5 g,加400 mL 无水甲醇溶解后,用超纯水定容成2 L,低温离心后,得样品溶液,上样制备型 HPLC,每次400 mL 进样,制备条件为:制备柱 Rp-C₁₈ MuMing Packing Material (25×300 mm,10 μm);梯度洗脱,流动相 A 为乙腈:0.05% 三氟乙酸(1:99),流动相 B 为乙腈:0.05% 三氟乙酸(80:20);流速:20 mL/min;柱温:室温 检测波长:340 nm、254 nm、280 nm。按单组分保留时间收集洗脱液,将洗脱液浓缩、冻干,得17个化合物,其中分离量最大的化合物为 DZP-9(500 mg),测定其抗菌活性,表明具有显著的抗黑霉菌活性。

1.2.5 HPLC 分析条件 色谱柱:Beckman HPLC Columns C₁₈ ODS (4.6×250 mm,5 μm);梯度洗脱:

流动相 A(乙腈:0.05% TFA 1:99) 流动相 B(乙腈:0.05% TFA 80:20) 流速:1 mL/min;柱温:室温;检测波长:340 nm;进样量:20 uL。

1.2.6 抗尖孢镰刀菌活性测定 将尖孢镰刀菌古巴“专化型”的两生理小种 FOC1 ,FOC4 分别接种于 PDA 平板上 ,于 28 ℃ 恒温培养 5 d 后 ,用直径 10 mm 的打孔器取菌落边缘菌块 ,制备 FOC1 ,FOC4 菌块作为接种物。然后将化合物按比例配制系列浓度 ,吸取 2 mL 与 18 mL 的 PDA 培养基混匀配制含不同浓度的含药平板 ,以添加相应浓度的纳他霉素和无菌水的平板作为阳性和阴性对照 ,将制备好的菌块移至平板中央 ,28 ℃ 恒温培养 ,待到空白对照菌落约布满培养皿的 2/3 时 ,采用十字交叉法测量和记录菌落直径 ,并计算化合物对 FOC1 ,FOC4 的抑制率 ,同一处理 3 个重复。

测定并计算:(1) 菌丝净增长量为菌落直径与菌块直径之差;(2) 菌丝生长抑制率(%) = [1 - (药剂处理的菌落直径 - 菌块直径) / (空白对照菌落直径 - 菌块直径)] × 100%;(3) 毒力回归方程:根据生物统计几率值换算表 ,将抑菌率换算为几率值 ,以几率值作为因变量 ,浓度的对数作为自变量建立毒力回归方程;(4) 通过毒力方程求得几率值为 5 时的浓度即为 EC₅₀ ,几率值为 6.281 6 时的浓度为 EC₉₀。

2 结 果

2.1 化合物的结构鉴定

化合物 DZP-9 黄色无定形粉末 ,熔点 195 - 196 ℃ ,溶于丙酮、氯仿、DMSO、甲醇、乙醇 ,不溶于水和石油醚 ,TLC 上改良碘化铋钾试剂显阴性。紫外光谱显示化合物 DZP-9 在 337、340 和 320 nm 处有最大吸收 ,表明其结构中存在较大共轭体系。红外光谱显示化合物 DZP-9 分子中可能含有羟基(3 417、1 066、1 006 cm⁻¹) ,酯键(1 723、1 172、1 137 cm⁻¹) ,共轭双键(3 023、1 639、849 cm⁻¹)。¹³C NMR 和 DEPT 谱(表 1) 共显示 35 个碳信号 ,其中 3 个甲基碳、9 个亚甲基碳、21 个次甲基碳(包括 10 个烯碳) 、2 个季碳(包括 1 个酯基碳和 1 个烯碳) 。FAB-MS 图谱显示 m/z 693(M + Na) ,表明化合物 DZP-9 的分子量为 670。经 Scifinder scholar 联机检索分子量为 684 的化合物 ,并与上述 UV、IR 和 NMR 谱的特征比较 ,表明化合物 DZP-9 可能为制霉色基素。将化合物 DZP-9 的¹³C NMR 数据和制霉色基素的¹³C NMR^[2-3]比较(表 1) ,并经化合物 DZP-9 的 HSQC、¹H - ¹H COSY、HMBC 和 ROSEY 谱的确证 ,鉴定化合物 DZP-9 为制霉色基素 ,其分子式为 C₃₅H₅₈O₁₂ ,结构式见图 1。

表 1 化合物 DZP-9 和制霉色基素的¹³C NMR 数据

Tab.1 ¹³C NMR data of DZP-9 and Fungichromin

δ in ppm

位置 Position	δC			位置 Position	δC		
	DZP-9 ^a	制霉色基素 Fungichromin ^b	制霉色基素 Fungichromin ^c		DZP-9 ^a	制霉色基素 Fungichromin ^b	制霉色基素 Fungichromin ^c
1	172.3(s)	172.2(s)	173.0(s)	19	136.3(d)	-	135.4(d)
2	60.1(d)	59.9(d)	60.3(d)	20	133.5(d)	-	134.1(d)
3	73.7(d)	-	73.7(d)	21	133.8(d)	-	134.8(d)
4	41.3(t)	-	41.4(t)	22	132.7(d)	132.8(d)	133.7(d)
5	74.0(d)	74.0(d)	74.1(d)	23	133.7(d)	134.2(d)	
6	44.5(t)	44.4(t)	45.2(t)	24	130.3(d)	130.3(d)	132.0(d)
7	73.9(d)	-	73.9(d)	25	133.8(d)	-	134.3(d)
8	44.8(t)	-	45.3(t)	26	72.5(s)	72.5(s)	73.2(s)
9	74.1(d)	-	74.2(d)	27	74.9(d)	74.9(d)	75.2(d)
10	44.2(t)	-	44.3(t)	28	18.5(q)	18.6(q)	18.0(q)
11	71.1(d)	71.0(d)	71.5(d)	29	12.2(q)	12.2(q)	11.7(q)
12	40.9(t)	40.9(t)	39.6(t)	1'	72.1(d)	-	72.6(d)
13	69.9(d)	69.9(d)	70.3(d)	2'	36.2(t)	35.8(t)	36.2(t)
14	78.4(d)	78.4(d)	78.3(d)	3'	25.7(t)	25.7(t)	26.0(t)
15	79.8(d)	79.7(d)	80.4(d)	4'	32.2(t)	32.2(t)	32.9(t)
16	140.2(s)	140.1(s)	138.6(s)	5'	23.0(t)	23.0(t)	23.7(t)
17	128.9(d)	128.9(d)	129.9(d)	6'	14.3(q)	14.3(q)	14.4(q)
18	128.1(d)	128.0(d)	129.1(d)				

^a Recorded at 100MHz in C5D5N; ^b Recorded at 15 MHz in C5D5N , and the data were obtained from reference^[5]; ^c Recorded at 100MHz in MeOH - d4 , and the data were obtained from reference^[6].

2.2 抗尖孢镰刀菌活性

以纳他霉素为阳性对照, 测定 DZP-9 对靶标菌 FOC1、FOC4 的抗菌活性和毒力方程, 其结果分别见表 2 和表 3。从表中可见表明 DZP-9 对靶标菌 FOC1、FOC4 的 EC₅₀ 和 EC₉₀ 分别为 4.7、3.4 μg/mL 和 21.5、53.1 μg/mL, 与阳性对照药那他霉素活性相当。

3 讨论

制霉菌素 (Fungichromin) 最早由 Cope 等^[7-8] 于 1958 年从 *Streptomyces cellulosa* 的发酵液中分离得到, 其后在

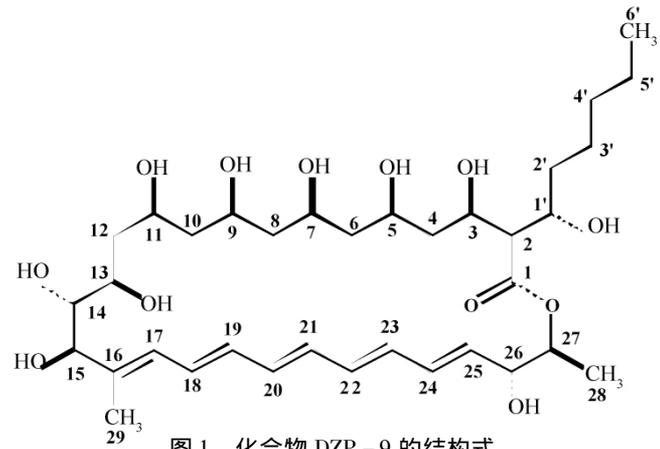


图 1 化合物 DZP-9 的结构式

Fig. 1 The structure of compound DZP-9

表 2 DZP-9 对 FOC1 的抗菌活性和毒力方程

Tab.2 Antibacterial activity against FOC1 and toxicity equation of DZP-9

抗生素 Antibiotics		菌落直径/mm Colonies diameter				抑制率/% Inhibition ratio	毒力回归方程及 r 值 Toxic regression equation and r value	EC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)	EC ₉₀ / (μg · mL ⁻¹)
名称 Name	浓度 Concentration /(μg · mL ⁻¹)	1	2	3	均值 Average				
DZP-9	32.2	10.5	11.0	11.6	11.0	96.6	Y = 1.885 8X + 3.802 5 r = 0.968 5	4.7	21.5
	25.8	13.4	13.0	13.2	13.2	91.6			
	19.3	14.1	15.0	15.8	15.0	87.5			
	12.9	19.5	19.0	18.7	19.1	78.0			
	6.4	24.7	25.0	22.1	23.9	66.8			
纳他霉素 Nata mycin	8.0	10	11.4	12.3	11.2	96.1	Y = 2.520 3X + 4.223 9 r = 0.965 1	2.1	6.6
	6.0	15.5	16.1	16.2	15.9	85.3			
	4.0	21.4	20.0	19.5	20.3	75.2			
	2.0	36.2	36.2	38.1	36.8	37.0			
	1.0	39.2	39.5	41.0	39.9	29.9			
阴性对照 Negative control	54.4	51.7	52.5	52.8	0				
FOC1 菌块 FOC1 piece	9.6	9.6	9.6	9.6					

表 3 DZP-9 对 FOC4 的抗菌活性和毒力方程

Tab.3 Antibacterial activity against FOC4 and toxicity equation of DZP-9

抗生素 Antibiotics		菌落直径/mm Colonies diameter				抑制率/% Inhibition ratio	毒力回归方程及 r 值 Toxic regression equation and r value	EC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)	EC ₉₀ / (μg · mL ⁻¹)
名称 Name	浓度 Concentration /(μg · mL ⁻¹)	1	2	3	均值 Average				
DZP-9	32.2	15.3	15	15.9	15.4	85.8	Y = 0.081 8X + 4.801 9 r = 0.961 9	3.4	53.1
	25.8	17.5	16.4	16.8	16.9	82.6			
	19.3	19.6	18.2	18.7	18.8	78.5			
	12.9	21.1	20.8	21.0	21.0	73.9			
	6.4	22.6	21.6	23.0	23.0	69.5			
纳他霉素 Natamycin	8.0	14.7	13.1	13.9	13.9	89.1	Y = 1.589 8X + 4.628 6 r = 0.979 5	1.7	12.0
	6.0	19.5	20.0	20.3	19.9	76.1			
	4.0	21.9	22.4	24.1	22.8	70.0			
	2.0	29.1	31.9	28.1	29.7	55.2			
	1.0	37.2	38.7	39.4	38.4	36.4			
阴性对照 Negative control	56.7	54.4	55.2	55.4	0				
FOC4 菌块 FOC4 piece	8.8	8.8	8.8	8.8					

S. cellulose, *S. fradiae*, *S. griseus*, *S. roseoluteus*, *Streptoverticillium cinnamomeum* subsp. *cinnamomeum* 和 *Streptomyces padanus* 等菌中也分离获得^[9-11]。本文以抗尖孢镰刀菌活性为导向,首次从链霉菌 702 中分离得到制霉菌素,经活性测试表明其具有显著的抗尖孢镰刀菌作用,为链霉菌 702 抗尖孢镰刀菌的主要活性物质,有望通过进一步研究开发成微生物源的生物农药。

参考文献:

- [1]黎循航,刘妹,涂国全.链霉菌 702 所产生物活性物质抑菌活性的初步研究[J].江西农业大学学报:自然科学版,2002,24(6):829-832.
- [2]钟敏,童孝田,孙宇辉,等.链霉菌 702 所产抗细菌组分 S₂ 的化学结构鉴定[J].福建农林大学学报:自然科学版,2007,36(3):307-311.
- [3]何建,阮彩彪,涂晓嵘,等.农抗 702 及其单体组分对尖孢镰刀菌的抗菌毒力测定[J].江西农业大学学报:自然科学版,2011,33(3):0493-0497.
- [4]王国芬,彭军,代鹏,等.香蕉枯萎病镰刀菌 ITS 序列的 PCR 扩增及其分子检测[J].华南热带农业大学学报,2007,13(3):1-4.
- [5]Noguchi H, Harrison P H, Arai K, et al. Biosynthesis and full NMR assignment of fungichromin, a polyene antibiotic from *Streptomyces cellulosa* [J]. *J Am Chem Soc*, 1988, 110(9):2938-2945.
- [6]Pandey R C, Guenther E C, Aszalos A A. Physicochemical and biological and comparison of polyene macrolide antibiotics fungichromin, lagosin and cogomycin [J]. *J Antibiotics*, 1982, 35(8):988-996.
- [7]Cope A C, Johnson H E. Fungichromin: Determination of the structure of the pentaene chromophore [J]. *J Am Chem Soc*, 1958, 80(6):1504-1506.
- [8]Cope A C, Bly R K, Burrows O J, et al. Fungichromin: Complete structure and absolute configuration at C₂₆ and C₂₇ [J]. *J Am Chem Soc*, 1962, 84(11):2170-2178.
- [9]Robison R S, Aszalos A, Kraemer N, et al. Production of fungichromin by *Streptoverticillium cinnamomeum* subsp. *cinnamomeum* NRRL B-1285 [J]. *J Antibiotics*, 1971, 24(4):273.
- [10]Harrison P H, Noguchi H, Vederas J C. Biosynthesis of polyene antibiotics: intact incorporation of ¹³C-labeled octanoate into fungichromin by *Streptomyces cellulosa* [J]. *J Am Chem Soc*, 1986, 108(13):3833-3834.
- [11]Shih H D, Liu Y C, Hsu F L, et al. Fungichromin: A substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani* [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(1):95-99.