

·研究简报·

SPRI-231菌株活性组分分离纯化及抑菌作用简报

李庆华¹, 张李桃¹, 陶黎明^{2*}, 顾学斌²

(1. 华东理工大学 药学院, 上海 200237; 2. 上海农药研究所, 国家南方农药创制中心 上海基地, 上海 200032)

摘要:从广西南宁地区采集的土壤里筛选出一株能够产生抗菌活性物质的链霉菌株 (streptomyces), 菌号为 SPRI-231。通过溶剂浸提、大孔树脂吸附、柱层析、薄层层析、高效液相色谱等方法分离得到两个具有抑菌活性的化合物, 分别命名为 SPRI-231 () 和 SPRI-231 (), 经过 UV、IR、ESI-MS、ESI-HRMS、元素分析等鉴定方法, 判定其分子式分别为 $C_{51}H_{91}N_3O_{21}$ 和 $C_{52}H_{93}N_3O_{21}$ 。活体和离体生物活性测定发现其具有较好的抗菌效果, 500 mg/L SPRI-231 () 精提物对黄瓜灰霉病菌和黄瓜炭疽病菌的抑制率分别为 83.02% 和 90.40%。

关键词:农用抗生素; 分离鉴定; SPRI-231 菌株; 生物活性

中图分类号: O658; S482.2

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2005)04-0379-04

The Separation, Purification and Bioassay of the Effective Metabolites of SPRI-231

LI Qing-hua¹, ZHANG Li-tao¹, TAO Li-ming^{2*}, GU Xue-bin²

(1. College of Pharmacy of East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. Shanghai Pesticide Research Institute, Shanghai 200032, China)

Abstract: For the screening of new agro-antibiotics, a strain of streptomycetes was isolated from the soil sample collected in Guangxi Province and named SPRI-231. The strain's active metabolites of the strain were isolated and purified with solvent extraction, silica gel chromatography, TLC, HPLC etc. The pure components of compound SPRI-231 () and SPRI-231 () were obtained. Based on physico-chemical properties, as well as UV, IR, ESI-MS, ESI-HRMS and elemental analysis, their molecular formulae were confirmed as $C_{51}H_{91}N_3O_{21}$ and $C_{52}H_{93}N_3O_{21}$, respectively. These two compounds have good effect in protecting plant fungi diseases, the inhibition rate of refined extracts of SPRI-231 () at 500 mg/L against cucumber *Botrytis cinerea* and cucumber *Colletotrichum lagenarium* were 83.02% and 90.40%, respectively.

Key words: agro-antibiotics; separation; SPRI-231; bio-active

农用抗生素是微生物的次级代谢产物,能以较低的浓度杀死或抑制其他微生物生长、发育、代谢等^[1],是生物农药发展的一个重要方向。

在筛选新的农用抗生素的过程中,上海农药研究所、国家南方农药创制中心上海基地工作人员从广西南宁采集的土壤中分离出一株具有抗菌

收稿日期: 2005-05-16; 修回日期: 2005-06-24.

作者简介: 李庆华 (1978-), 男, 湖北人, 华东理工大学硕士研究生, 主要从事农用抗生素研究; *通讯作者: 陶黎明 (1958-), 男, 上海人, 博士, 教授级高级工程师, 主要从事农用抗生素研究. 联系电话: 021-59883850; E-mail: liming833@hotmail.com

活性的链霉菌属菌株 SPR I-231,在其发酵产物中发现的抗生物质对黄瓜灰霉病菌和黄瓜炭疽病菌具有较好的活体防治效果,对多种植物病原真菌如小麦赤霉病菌、黄瓜灰霉病菌、水稻纹枯病菌等具有很好的离体抑制效果。笔者对其发酵液中活性组分的分离纯化及抑菌活性进行了研究,并对纯化后的活性组分进行了初步的结构分析与鉴定。目前尚未见到相关的文献报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及作物 SPR I-231 菌株: 采自广西南宁地区的土样中,用高氏培养基在 28℃ 恒温分离培养 6~8 d 所得。

供试病原菌: 灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、炭疽病菌 *Colletotrichum lagenarium*、玉米小斑病菌 *Helmintosporium maydis*、白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea* (仅作盆栽用)、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*、稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae*。

盆栽试验供试作物: 黄瓜、水稻、玉米等盆栽小苗。

1.1.2 培养基 抑菌活性测定采用 PDA 培养基; 斜面用培养基配制: 每 1 000 mL 摇瓶培养基中含淀粉 20.0 g、 K_2HPO_4 0.5 g、NaCl 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、 KNO_3 1.0 g、 $FeSO_4$ 0.01 g、琼脂 20.0 g, pH 7.2; 发酵用培养基: 每 100 mL 摇瓶培养基中含葡萄糖 2.0 g、黄豆粉 2.5 g、淀粉 1 g、酵母粉 0.4 g、NaCl 0.2 g、牛肉膏 0.1 g、 K_2HPO_4 0.5 mg, pH 7.2。

1.1.3 分离指示菌 在初步分离 SPR I-231 活性组分粗品的过程中,为了确定活性组分在分离相中的分布位置,使用稻瘟病菌作为活性组分的指示菌。生测方法为通用的纸碟法 (抑菌圈法)。

1.1.4 供试药剂 经过有机溶剂浸提、大孔树脂吸附解析、柱层析、薄层层析及高效液相色谱等方法从 SPR I-231 菌株发酵代谢产物中分离纯化得到了两个具有抑菌活性的化合物 SPR I-231 () 和 SPR I-231 (), 经 HPLC 分析其纯度均在 97% 以上。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株发酵及发酵液预处理 将放线菌菌株 SPR I-231 接入发酵培养基中, 28℃ 恒温摇床培

养 96 h。摇瓶发酵液经 5 000 r/min 离心 15 min 后,得上清液和菌丝体,菌丝体用体积分数为 80% 的丙酮浸泡,得浸泡液,待用。

1.2.2 抑菌活性物质粗提及其活性测定 将菌丝体的丙酮浸泡液旋转蒸发除去丙酮得水溶液,取一定量发酵上清液和浸泡液分别用酸碱溶液调节至 pH 值为 2、7、10,各分成两份,一份在 100℃ 水浴中加热 10 min,然后利用指示菌检测其热稳定性,另一份检测其酸碱稳定性。

1.2.3 粗提物提取纯化 滤液经旋转蒸发除去丙酮后,用稀盐酸调节溶液 pH 值约为 5~6,静置过夜,有沉淀析出,滤去上清液。所得沉淀依次用乙醚、丙酮溶解,洗涤,过滤,除去强脂溶性的杂质^[2]。滤饼用少量甲醇溶解,进行硅胶柱层析,淋洗剂为氯仿-甲醇-水 = 12:5:0.3 (体积比,下同)。合并含有活性组分的收集液,浓缩,经制备硅胶薄层色谱进一步纯化 (展开剂为氯仿-甲醇-水 = 12:6:0.3),得 R_f 值为 0.3 的色带,刮下色带,用甲醇浸泡,抽滤浓缩,供下步纯化^[3]。

将经过薄层层析得到的样品进行高效液相色谱制备。所用流动相为甲醇-乙腈-水 (74:10:16, 5 mmol/L 乙酸铵缓冲液), UV-Vis 检测器波长为 210 nm^[4]。

1.2.4 生物活性测定 将经由高效液相色谱制备所得的两个化合物分别进行活体和离体生物活性测定。活体生物活性测定按国家南方农药创制中心 SOP (标准操作程序) 进行。

喷药: 将各待测定用盆栽小苗 (黄瓜 1 叶真叶期, 玉米、小麦 2 叶期, 水稻 3~4 叶期) 置喷药塔中均匀喷雾已配制好的药液,喷湿即可,不使叶片流淌药液。每处理 3 次重复,并设喷水作空白对照。

接种诱发: 黄瓜白粉病在喷药前一天先喷雾接种白粉病菌孢子悬浮液,置 28~26℃ 有光照的恒温室中, 24 h 后再喷药; 其他各病都于喷药当天药液干后接种,其中炭疽病、稻瘟病、玉米小斑病用一定浓度分生孢子悬浮液,赤霉病用菌丝体悬浮液均匀喷雾接种。接种后,分别设置各自适宜发病的温湿度条件,置恒温温室保温柜中保温诱发。

调查: 接种诱发 7 d 后,待空白对照病症稳定后调查。其中稻瘟病、纹枯病、玉米小斑病、小麦赤霉病、灰霉病按病情分级调查,按病情指数计算防治效果; 白粉病、炭疽病调查病斑个数,按病斑个数计算防治效果。

盆栽试验设置 3 个浓度: 500、250、125 mg/L,

以清水作对照,分别对灰霉病菌等 7 种病原菌进行试验。每个浓度重复 3 次,试验重复 2 次。

离体生物测定均采用稀释法(含毒介质法)。将待测药物配制成一定浓度药液,吸取 1 mL 加入到 9 mL 培养基中充分混匀后制成平板。用微量加样器吸取 5 μ L 菌液或孢子悬浮液滴加在含药平板中,或者用镊子将用打孔器切取的 5 mm 菌块放到含药平板上。设不含药空白对照。2~3 d 后量取菌落生长直径,计算抑制率。

1.2.5 纯组分初步鉴定 制备所得活性组分纯品经过 UV、IR、ESI-MS、ESI-HRMS、NMR、元素分析等鉴定方法进行初步结构解析^[5]。

2 结果与分析

2.1 活性组分的提取纯化

生物测定跟踪结果显示,上清液无抑菌活性。菌丝体经 80%丙酮浸泡后离心所得的浸泡液具有抑菌活性,可知 SPR I-231 活性组分主要存在于菌

丝体中。活性组分在 pH 7 时热稳定性较好,同样 SPR I-231 发酵产物在 pH 7 时生测效果亦最好,在 pH 2 和 pH 10 时次之。

薄层层析分析显示 R_f 值为 0.3 左右有一个斑点,而高效液相色谱分析结果显示, R_f 值为 0.3 左右的样品中含有两个具有抑菌活性的化合物,其保留时间分别为 30.84 和 34.70 min,分别命名为 SPR I-231()和 SPR I-231()。

2.2 SPR I-231活体及离体生物活性

活体抗菌活性测试结果(见表 1)表明,SPR I-231()和 SPR I-231()都对黄瓜灰霉病菌(Bc)和黄瓜炭疽病菌(Cl)有一定的抑制作用,其中的药效比 好,500 mg/L 处理时 SPR I-231()对两种病菌的抑制率分别达 83.02%和 90.40%。两化合物对其他的植物病害无抑制作用。

离体的抗菌活性测试结果(表 2)表明,SPR I-231()和 SPR I-231()对多种植物病害都具有较强的离体抑菌作用。

Table 1 Inhibition rate of SPR I-231 in vivo (%)

Cont /mg · L ⁻¹	SPR I-231()				Cont /mg · L ⁻¹	SPR I-231()			
	Bc	SD	Cl	SD		Bc	SD	Cl	SD
500	16.80	0.29	62.13	0.45	500	83.02	0.16	90.40	0.53
250	10.41	0.34	50.42	0.65	250	32.16	0.21	85.57	0.21
125	7.52	0.28	39.34	0.57	125	13.31	0.28	71.73	0.21

Note: Bc—Botrytis cinerea, Cl—Colletotrichum lagenarium; SD—standand deviation. The same as in table 2.

Table 2 Inhibition rate of SPR I-231 in vitro (%)

Pathogens	Cont of SPR I-231 () /mg · L ⁻¹						Pathogens	Cont of SPR I-231 () /mg · L ⁻¹					
	100		10		1			100		10		1	
	IR	SD	IR	SD	IR	SD		IR	SD	IR	SD	IR	SD
Fg	100.0	0.00	77.2	0.57	51.4	1.00	Fg	100.0	0.00	82.9	0.11	54.3	0.54
Bc	100.0	0.00	81.3	0.12	0.0	1.15	Bc	100.0	0.00	78.1	0.23	43.8	0.64
Rs	100.0	0.00	96.7	0.10	77.5	1.09	Rs	96.7	0.22	96.7	0.31	82.5	0.54
Hm	100.0	0.00	55.6	0.11	33.0	0.43	Hm	100.0	0.00	33.3	0.25	2.22	0.24
Cl	100.0	0.00	70.0	0.24	40.0	0.36	Cl	100.0	0.00	100.0	0.00	50.0	0.36
Po	77.3	0.06	72.7	0.20	63.6	0.11	Po	81.8	0.32	72.7	0.43	63.6	0.12

Note: Fg—Fusarium graminearu, Rs—Rhizoctonia solani, Hm—Helmintosporium maydis, Po—Pyricoraria orizae; IR—Inhibition rate(%).

2.3 SPR I-231()和 SPR I-231()的图谱解析及初步鉴定

SPR I-231()紫外光谱显示,其在 233、240、269 nm 有 3 个较为明显的吸收峰,最大吸收波长为 240 nm。红外光谱显示在约 3 350 cm^{-1} 左右有宽而强的吸收峰,可以推断其为 -OH 或者 -NH₂,

1 650 cm^{-1} 左右有吸收峰,推断其为酰胺的 -C=O 或者 -C=C 特征峰,根据 1 700 cm^{-1} 左右的吸收峰推断其可能为 α 、 β 不饱和酮羰基特征峰。元素分析中 C: 56.42%, H: 8.62%, N: 3.51%, 其他 31.45%。根据质谱(见图 1A)测试结果可知,其中 1 082.624 3 为 $[M + H^+]$ 峰,1 104.603 9 为

$[M + Na]^+$ 峰,可以推断其含有 C、H、N、O 4种元素,且分子式为 $C_{51}H_{91}N_3O_{21}$ 。

同样,SPRI-231 () 的紫外光谱显示其在 233、240、270 nm 有 3个较为明显的吸收峰,最大吸收波长为 233 nm。红外光谱分析情况同 SPRI-

231 ()。元素分析中 C: 56.56%, H: 8.86%, N: 3.30%, 其他 31.28%。根据质谱测试结果,其中 1096.6411 为 $[M + H]^+$ 峰,可以推断其含有 C、H、N、O 4种元素,且分子式为 $C_{52}H_{93}N_3O_{21}$ (图 1B)。其余图谱略。

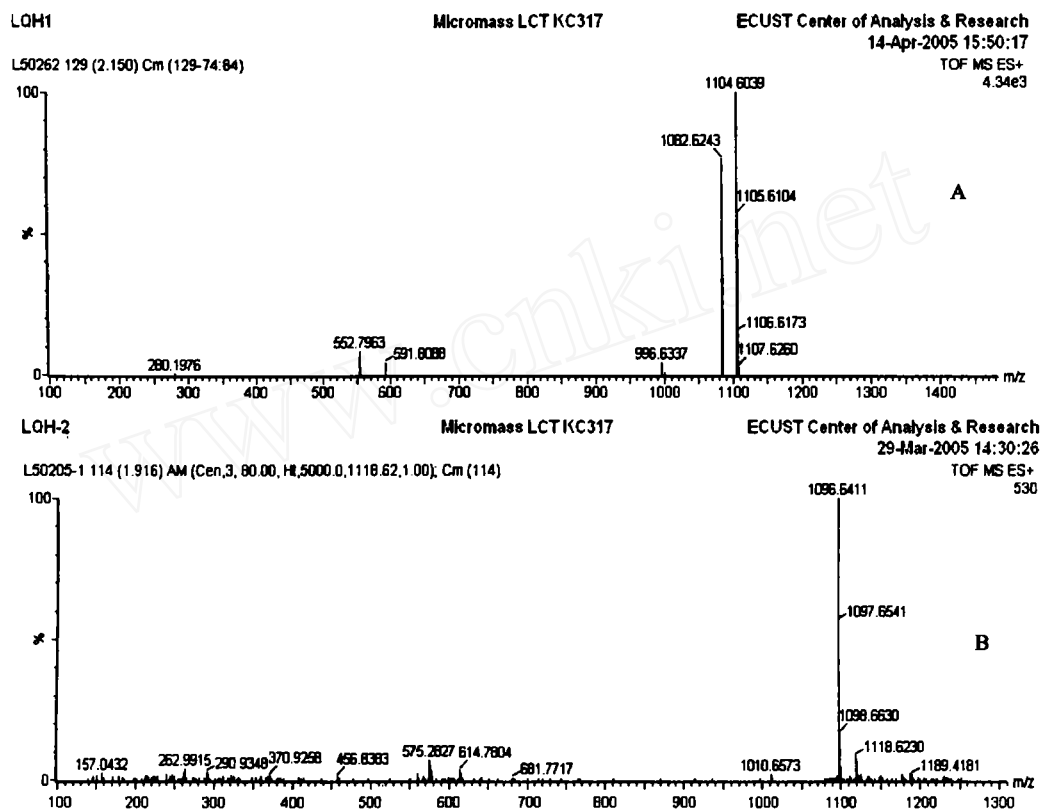


Fig 1 ESI-HRMS of SPRI-231 () (A) and SPRI-231 () (B)

3 讨论

随着人们生活质量的提高,对农药使用的要求也在逐步严格,急需一批高效、安全、对环境友好、能够在环境中很快降解的新型农用杀菌剂产品来替代现有的一些污染严重的老品种。本研究中的 SPRI-231 抗生素经微生物发酵而来,其两个活性组分对黄瓜灰霉病和黄瓜炭疽病有一定的防效,由其分子式分析可能是新化合物,有待于进一步确证其结构,以便深入研究其化合物结构与活性的关系。

致谢:上海农药研究所教授级高级工程师倪长春对本文初稿提出修改意见,特此谢忱!

参考文献:

- [1] CHENG Wan-yi (陈万义), XUE Zhen-xiang (薛振祥). New Pesticide Research and Development (新农药研究与开发) [M]. Beijing (北京): Chemical Industry Publisher (化学工业出版社), 1995. 508-509.
- [2] TAO Liming (陶黎明), GU Xue-bin (顾学斌), XU Wenping (徐文平), et al 长川霉素的研究 [J]. Pesticides (农药), 2002, 42 (12): 11-13.
- [3] GU Xue-bin (顾学斌), TAO Liming (陶黎明), XU Wenping (徐文平), et al 磷氮霉素 PN-2 的分离鉴定及活性研究初报 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2002, 4 (1): 75-79.
- [4] Fushimi S, Nishikawa S, Seto H, et al Studies on new phosphate ester antifungal antibiotics: phoslactamycins [J]. J Antibiotics, 1989, 42 (7): 1019-1025.
- [5] Fushimi S, Nishikawa S, Seto H, et al Studies on new phosphate ester antifungal antibiotics: phoslactamycins [J]. J Antibiotics, 1989, 42 (7): 1026-1037.

(Ed. TANG J)