

内生真菌 ZJUF0986 代谢的抗菌活性物质特性

王国平^{1,2} 郑必强^{1,2} 章初龙^{1*} 林福呈¹

(1. 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029; 2. 建德市大洋化工有限公司, 杭州 311616)

摘要: 内生真菌紫杉木霉 ZJUF0986 菌株产生的活性代谢产物 I 对植物病原真菌具有广谱抑菌活性。通过紫外吸收、薄层色谱、捷克八溶剂系统纸色谱、pH 纸色谱及不同 pH 和温度处理手段, 研究了该活性代谢产物 I 的部分理化性质。结果表明, 活性代谢产物 I 的最大紫外吸收峰为 199 nm; 以石油醚: 乙酸乙酯 = 95: 5 为展开剂薄层层析时, 样品斑点的 R_f 值为 0.58; 捷克八溶剂系统纸色谱和 pH 纸色谱图谱与已知各类抗生素纸图谱相比较, 活性代谢产物 I 是一类低极性、弱酸性、非水溶性的抗生素; 活性代谢产物 I 在酸性至弱碱性和低于 100 °C 的条件下相当稳定, 在 pH > 10 和 121 °C 下活性物质不稳定。

关键词: 内生真菌; 紫杉木霉; 代谢产物; 理化性质

The antifungal activity of the bioactive compound produced by endophytic fungus ZJUF0986

Wang Guoping^{1,2} Zheng Biqiang^{1,2} Zhang Chulong^{1*} Lin Fucheng¹

(1. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China;

2. Jiande Dayang Chemical CO., LTD, Hangzhou 311616, Zhejiang Province, China)

Abstract: Bioactive metabolite I produced by endophytic fungus *Trichoderma taxi* ZJUF0986 displays broad antifungal activity to many phytopathogenic fungi. The partial physical and chemical properties of the bioactive metabolite I was analyzed by ultraviolet absorbability, thin-layer chromatography, paper chromatography pH and Daskochilova system, and treatment with different pH and temperature levels. Results showed that the maximum UV absorb wavelength was 199 nm. The R_f value of the metabolite I was 0.58 when thin-layer chromatography in petroleum ether: ethyl acetate (95:5) as mobile phase. The comparison of paper chromatography pH and Daskochilova system between the metabolite I and various known antibiotics indicated that the metabolite I was a low polar, weakly acerbic and hydrophobic antibiotic. And the metabolite I maintained stability at acidic to alkalescent and low than 100 °C conditions, it becomes unstable at pH > 10 or 121 °C.

Key words: endophytic fungi; *Trichoderma taxi*; metabolite; physical and chemical property

青霉素、链霉素、四环素、氨基糖类、大环内脂类等抗生素的发现, 推动了全世界抗生素研究热潮。极端环境、海洋和植物内生菌等具有特殊的生理性状和遗传背景, 因而必定存在大量未知的、具有不同代谢系统的新物种。千百万年进化造就的生物多样

性必定伴随着复杂的化学多样性, 因此极有可能从中发现新的生物活性物质^[1-3]。

Strobel 等^[4] 在短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 枝条中分离得到一种产生紫杉醇 paclitaxel 的内生真菌安德鲁紫杉菌 *Taxomyces andreanae*, 这一发现为开

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2006C12008)

作者简介: 王国平, 男, 1974 年生, 助理工程师, 研究方向为应用微生物, email: fungi@zju.edu.cn, Tel: 0571-86971185

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: clzhang@zju.edu.cn, Tel: 0571-86971185

收稿日期: 2008-01-22

辟紫杉醇药源提供了一条新的途径,也促使各国纷纷开展内生真菌研究。微生物资源研究开发与动植物资源利用相比,不会导致生物资源与环境的失衡,更具有自然资源的可持续利用。作者等^[5]对南方红豆杉 *T. chinensis* var. *mairei* 内生真菌抗真菌活性筛选发现几株木霉菌株具有抗真菌活性,其中 ZJUF0869、ZJUF0870 和 ZJUF0986 属于同一种木霉菌属新种紫杉木霉 *Trichoderma taxi*^[6],并分离提取了 ZJUF0986 菌株发酵液中的主要活性物质及其抗菌活性谱,研究表明,这种具有广谱抗真菌活性的活性代谢产物 I 具有潜在的应用推广价值。本研究对活性代谢产物 I 的部分理化性质,包括极性、稳定性和酸碱性等进行了研究,为该活性物质的进一步研究和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、培养基、试剂及仪器

供试菌株:紫杉木霉菌株 ZJUF0986 及靶标菌株灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、终极腐霉 *Pythium ultimum* 均由浙江大学生物技术研究所在真菌实验室分离并保存。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA)。

试剂:色谱纯乙腈, Honeywell Burdick & Jackson, USA 产品;其它试剂均为国产分析纯。

仪器:Waters 液相色谱仪,旋转蒸发器 RE-52AA,三用紫外分析仪 ZF-7,紫外分光光度计 Analytikjena SPECORD 200。

1.2 活性代谢产物 I 的制备、纯度检测及紫外吸收测定

活性代谢产物 I 的制备:ZJUF0986 菌株发酵液的石油醚粗提物用石油醚溶解,去离子水反萃取,有机相中加入无水硫酸钠干燥,过滤后 50℃ 减压浓缩,得无色粘稠物备用。无色粘稠物用氯仿溶解拌入 H60 型薄层层析硅胶,挥干溶剂后装柱,以不同梯度的氯仿/甲醇流动相进行洗脱。采用高效薄层层析色谱 (thin-layer chromatography, TLC) 追踪斑点,展开剂为石油醚:乙酸乙酯 = 95:5,紫外光 (254 nm) 照射或碘蒸汽显迹,配合滤纸片扩散法进行抑菌活性追踪测定,将斑点位置相同并有抑菌活性的样品进行合并,分离纯化得到活性代谢产物 I。

用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测活性代谢产物 I 样品的纯

度, HPLC 检测条件为: Waters C18 分析柱 (sunfire C18 5 μ m 4.6 $\times$ 250 mm)、Waters 二元高压梯度泵 (1525 binary HPLC pump)、流动相乙腈:水为 3:2、流速 1.0 mL/min、进样量 20 μ L、Waters 紫外可见光检测器 (2487 2-channel uv/vis detector)、检测波长 193 nm、室温。

用紫外分光光度计对活性代谢产物 I 的紫外吸收特征进行测定,检测波长范围为 190 ~ 400 nm。

1.3 活性代谢产物 I 的薄层层析

纯化后的活性代谢产物 I 用乙腈溶解后进行 TLC 分析,用微量移液器点样,点样量为 5 μ L,点样时少量多次,并用电吹风吹干,将点样点的直径控制在约 5 mm,展开剂为石油醚:乙酸乙酯 = 95:5,层析后在紫外分析仪紫外光下观察。

1.4 捷克八溶剂系统纸色谱层析及 pH 纸色谱层析

按文献^[7]配制的捷克八溶剂系统:(1)水饱和正丁醇;(2)水饱和正丁醇内含 2% 对甲苯磺酸;(3)正丁醇:乙酸:水 = 2:1:1;(4)水饱和正丁醇内含 2% 六氢吡啶;(5)以正丁醇饱和的 0.5 mol/L、pH 7 的磷酸缓冲液;(6)正丁醇饱和的水,内含 2% 对甲苯磺酸;(7)苯:甲醇 = 4:1,滤纸先用 0.5 mol/L、pH 7 的磷酸缓冲液处理后晾干;(8)甲醇:水 = 3:1,水内含 3% 氯化钠,滤纸先用 5% 硫酸钠处理晾干后使用。

pH 纸色谱:分别用 pH 2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 的缓冲溶液处理滤纸条,干燥后点样,在石油醚:乙酸乙酯 = 95:5 展开剂中进行展层。

1.5 活性代谢产物 I 对 pH 及温度的稳定性

将活性代谢产物 I 的水溶液 pH 分别调到 3、4、5、7、8、9、10、11,作用 24 h 后回调至原 pH 值 (约 6),将未处理样品的抑菌活性定为 100%,以灰葡萄孢为指示菌,采用菌丝生长速率法进行抑菌活性测定,同时用 HPLC 测定试验样品中活性代谢产物 I 浓度变化情况。

将活性代谢产物 I 水溶液分别在 40、50、60、70、80、90、100、121 $^{\circ}$ C 处理 30 min,以未处理的样品抑菌活性定为 100%,以灰葡萄孢为指示菌,采用菌丝生长速率法进行抑菌活性测定,同时用 HPLC 测定试验样品中活性代谢产物 I 浓度变化情况。

相对抑制率 (%) = (试验样品 ID_{50} /原始样品 ID_{50}) $\times$ 100

1.6 抑菌活性测定

菌丝生长速率法:用无菌水将供试样品稀释成

5 个梯度后加入到 PDA 中,混匀后倒入直径 60 mm 的培养皿中制成有毒平板。每梯度 3 次重复,以无菌水为对照。将活化的供试病原菌菌饼(直径 5 mm)接种至有毒平板中央,25 ℃ 培养至对照皿即将长满平皿时,用十字交叉法测量各处理皿的菌落直径。

抑制率(%) = $[1 - (\text{处理菌落直径} - \text{菌饼直径}) / (\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径})] \times 100$

利用 DPS 统计软件,采用剂量对数 - 抑菌率概率值法求得半抑制稀释倍数(ID_{50})或半抑制浓度(IC_{50})及毒力回归方程。

滤纸片扩散法:以终极腐霉、立枯丝核菌和灰葡萄孢 3 种病原菌作为指示菌,将活化的指示菌菌饼(直径 5 mm)接种至 PDA 平板上进行初步培养,待菌落生长至直径 20 mm 时备用。取 5 μL 各组样品的乙腈溶液置于滤纸圆片(直径 5 mm)上,略微风干后,置于上述供试 PDA 平板菌落边缘。以乙腈溶

液为对照,各处理 3 次重复,25 ℃ 培养 2 ~ 3 天测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 活性代谢产物 I 高效液相色谱 - 紫外(UV)检测结果

柱层析洗脱液分段收集,并采用 TLC 追踪斑点,配合滤纸片扩散法抑菌活性追踪,洗脱液 11 ~ 15 号组分,对终极腐霉、立枯丝核菌和灰葡萄孢 3 种指示菌都具有很强的抑菌活性,通过反相 HPLC - 紫外(UV)检测,图谱中只出现一个主要峰,分离度好且峰形对称,杂质峰极小(图 1)。收集主峰进行活性跟踪,确认主峰为活性代谢产物 I 所产生的,该活性代谢产物 I 对终极腐霉、立枯丝核菌和灰葡萄孢 3 种指示菌的 IC_{50} 分别为 1.06、1.08 和 9.30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

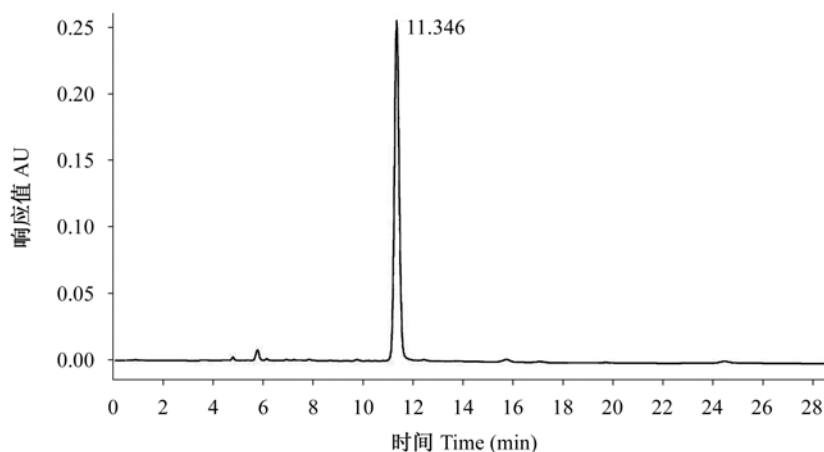


图 1 活性代谢产物 I HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatography of the bioactive metabolite I

2.2 活性代谢产物 I 紫外吸收特征图谱

纯化后的 ZJUF0986 活性代谢产物 I 样品用色谱纯乙腈溶解,测定其在 190 ~ 400 nm 处的紫外吸收值,以色谱纯乙腈为对照。结果表明,活性代谢产物 I 紫外吸收为单峰,且在 199 nm 处吸收值最大,并随波长增加而降低(图 2)。

2.3 活性代谢产物 I 薄层色谱鉴定

纯化后的 ZJUF0986 活性代谢产物 I 进行 TLC 层析,样品经展开剂展开后,在凝胶成像系统的紫外光下能看到紫红色斑点(图 3),其 R_f 值为 0.58。

2.4 捷克八溶剂系统纸色谱层析及 pH 纸色谱层析

捷克八溶剂系统纸色谱层析时,活性代谢产物 I 在 4 号溶剂(水饱和正丁醇内含 2% 六氢吡啶)中

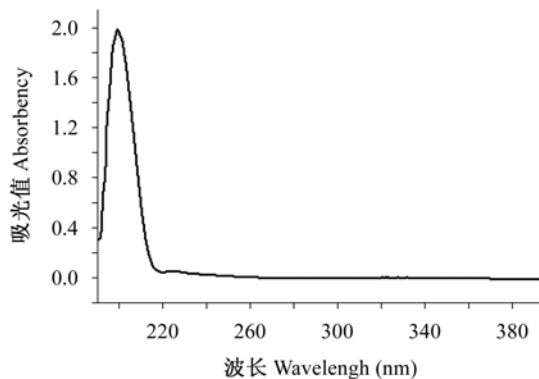


图 2 活性代谢产物 I 的紫外吸收谱

Fig. 2 Ultraviolet absorption curve of the bioactive metabolite I
不移动,5 号溶剂(正丁醇饱和的 0.5 mol/L、pH 7 的

磷酸缓冲液)和6号溶剂(正丁醇饱和的水,内含2%对甲苯磺酸)中移动较小,在其它几种溶剂中移动均很大,几乎接近溶剂线。

活性代谢产物 I 无论滤纸片的 pH 如何变化,其在流动相中层开的 Rf 值基本上是一条与原点平行的直线。

2.5 活性代谢产物 I 对 pH 的稳定性

活性代谢产物 I 水溶液在 pH 3~9 的范围内处理 24 h 后,对指示菌的抗菌活性及其活性代谢产物 I 浓度基本没有变化,pH 大于 9 时抑菌活性及活性代谢产物 I 会有部分损失,当在 pH 为 11 的强碱性环境中,抑菌活性及其活性代谢产物 I 浓度急剧下降,样品损失率达 70.71% (表 1)。

2.6 活性代谢产物 I 对温度的稳定性

活性代谢产物 I 在 40~80 ℃ 处理后,抑菌活性及活性代谢产物 I 浓度基本没有变化,90 ℃ 以上处理后抑菌活性及样品浓度稍有损失,但 121 ℃ 处理 30 min 后活性损失较大,损失率为 17.95% (表 2)。

表 1 活性代谢产物 I 在不同 pH 条件下的稳定性

Table 1 Stability of the bioactive metabolite I at different pH

处理 Treatment	吸收峰面积 HPLC peak area			平均吸收峰面积 Average HPLC peak area	损失率 (%) Loss rate	相对抑制率 (%) Relative inhibition rate
	1	2	3			
对照 Control	5.45E+06	5.50E+06	5.43E+06	5.46E+06		100.0
pH 3	5.43E+06	5.41E+06	5.38E+06	5.41E+06	0.92 cC	100.0
pH 4	5.37E+06	5.44E+06	5.45E+06	5.42E+06	0.73 cC	100.0
pH 5	5.41E+06	5.43E+06	5.47E+06	5.43E+06	0.55 cC	100.0
pH 6	5.47E+06	5.46E+06	5.50E+06	5.48E+06	-0.37 cC	100.0
pH 7	5.51E+06	5.49E+06	5.42E+06	5.47E+06	-0.18 cC	100.0
pH 8	5.54E+06	5.44E+06	5.45E+06	5.48E+06	-0.37 cC	100.0
pH 9	5.46E+06	5.49E+06	5.44E+06	5.47E+06	-0.09 cC	100.0
pH 10	4.87E+06	4.92E+06	4.86E+06	4.88E+06	10.62 bB	92.3
pH 11	1.59E+06	1.61E+06	1.60E+06	1.60E+06	70.71 aA	34.6

注:英文小写字母 a、b、c 和大写字母 A、B、C 分别代表 5%、1% 水平上差异显著性。下同。Note: The capitalization and the small letter stand for the 1% and 5% significant level respectively. The same as below.

3 讨论

通过 TLC、捷克八溶剂系统及 pH 纸色谱等分析手段,参照已知各类抗生素纸图谱,初步推断 ZJUF0986 活性代谢产物 I 是一类低极性、弱酸性、非水溶性的抗生素。据文献[8]报道,木霉菌产生的抗生素大多不稳定,很容易转化为不具抗菌活性的化合物。而 ZJUF0986 产生的活性代谢产物除了

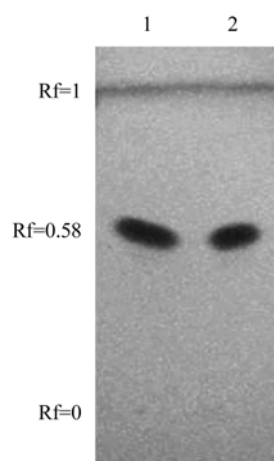


图 3 活性代谢产物 I TLC 层析图谱

Fig. 3 TLC chromatography of the bioactive metabolite I

注:1:对照品;2:样品。Note: 1: Control; 2: the bioactive metabolite I.

活性代谢产物 I 在一定的温度范围内具有较强的耐受性,但高温高压环境下也不稳定。

在强碱性环境下不稳定外,在强酸、弱碱性及一定温度范围内均比较稳定,在生产、储藏和应用上具有优势。此外,本研究明确了其最大紫外吸收峰及 TLC 的 Rf 值,为鉴定跟踪这种活性物质提供了技术基础。

由于内生真菌长期生活在植物体内的特殊生境中,与宿主协同进化,并形成互惠共生关系^[9]。红豆杉是第四世纪冰川后遗留下来的世界珍稀濒危植

表 2 活性代谢产物 I 在不同温度条件下的稳定性
Table 2 Stability of the bioactive metabolite I at different temperatures

处理(℃) Treatment	吸收峰面积 HPLC peak area			平均吸收峰面积 Average HPLC peak area	损失率(%) Loss rate	相对抑制率(%) Relative inhibition rate
	1	2	3			
对照 Control	5.45E+06	5.50E+06	5.43E+06	5.46E+06		100.0
50	5.42E+06	5.49E+06	5.50E+06	5.47E+06	-0.09 cC	100.0
60	5.47E+06	5.43E+06	5.49E+06	5.47E+06	-0.09 cC	100.0
70	5.43E+06	5.40E+06	5.44E+06	5.42E+06	0.73 cC	100.0
80	5.50E+06	5.42E+06	5.45E+06	5.46E+06	0.09 cC	100.0
90	5.32E+06	5.37E+06	5.32E+06	5.34E+06	2.20 bB	96.5
100	5.33E+06	5.32E+06	5.34E+06	5.33E+06	2.38 bB	96.5
121	4.54E+06	4.42E+06	4.49E+06	4.48E+06	17.95 aA	85.3

物,其内生真菌与宿主特殊的关系以及所处的微生态环境,可能会使其产生独特的代谢系统和防御体系,也可能会产生具有新颖结构和特异功能的活性物质。Wang 等^[10]从短叶红豆杉、南方红豆杉等分离筛选到产生紫杉醇的内生真菌安德鲁紫杉菌、瘤座孢菌 *Tubercularia* sp. 等,Strobel 等^[11]从红豆杉分离筛选了产生其它生物活性物质的内生真菌,如从欧洲红杉 *T. baccata* 分离的内生真菌枝顶孢菌 *Acremonium* sp. 产生抗真菌活性物质白灰制菌素 A (leucinostatin A) 等。紫杉醇和白灰制菌素对终极腐霉具有强烈的抑制作用,可能对宿主植物抵抗病原菌,特别是卵菌的侵染具有重要作用^[12]。从紫杉木霉 ZJUF0986 分离的活性代谢产物 I 对包括终极腐霉在内的多种植物病原真菌具有抑制作用,可促进宿主红豆杉植株的抗逆性。因此,该活性代谢产物 I 具有潜在的应用推广价值。

参 考 文 献(References)

[1] Proksch P, Edrada R A, Ebel R. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(2/3): 125-134
[2] Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1992, 11(4): 287-291

[3] Schulz B, Boyle C, Draeger S, et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 2002, 106(9): 996-1004
[4] Strobel G, Stierle A, Stierle D, et al. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiliferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon*, 1993, 47: 71-80
[5] 傅科鹤,章初龙,刘树蓬,等. 南方红豆杉内生真菌的抗菌活性. *植物保护学报*, 2006, 33(3): 268-272
[6] Zhang C, Liu S, Lin F, et al. *Trichoderma taxi* sp. nov., an endophytic fungus from Chinese yew *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 270(1): 90-96
[7] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986:339-345
[8] 陈凯,杨合同,李纪顺,等. 绿色木霉菌抗生物质的初步分离及其对植物病原真菌的抑制作用. *山东农业科学*, 2006, 4: 52-54
[9] 郭良栋. 内生真菌研究进展. *菌物系统*, 2001, 20(1):148-152
[10] Wang J, Li G, Lu H, et al. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 193(2): 249-253
[11] Strobel G A, Torczynski R, Bollon A. *Acremonium* sp. - a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science*, 1997, 128(1): 97-108
[12] Strobel G A. Microbial gifts from rain forests. *Canada Journal Plant Pathology*, 2002, 24(1): 14-20