

1 个广谱抗真菌天然产物的快速鉴定及活性评价

万中义, 张亚妮, 张志刚, 黄大野, 王开梅*, 杨自文

(湖北省生物农药工程研究中心/湖北农业科技创新中心生物农药分中心, 湖北武汉 430064)

摘要 [目的]对湖北咸宁地区山坡土样中分离得到的1株放线菌 HBERC-31270 的发酵提取物进行快速鉴定及活性评价。[方法]对 HBERC-31270 进行发酵与提取,并对发酵提取物进行生物活性测定、高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)、紫外吸收光谱(UV)分析及活性评价。[结果]提取物高效液相色谱(HPLC)制备组分活性测定结果表明,其活性部位在14~21 min。根据 HPLC-MS 及 UV 确定其主要成分为一个分子量小分子化合物。通过对其质谱数据进行分析确定了分子离子峰,经天然产物数据库比对及文献调研,确定其主要活性成分为9-甲基链米酮。盆栽试验结果表明,该菌对多种作物真菌性病害具有较好的防治效果。[结论]试验结果为放线菌 HBERC-31270 的进一步研究提供了理论依据。

关键词 天然产物;农药活性;放线菌;9-甲基链米酮

中图分类号 S482.2*92 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)33-0009-03

Rapid Identification and Activity Evaluation of a Broad Spectrum Antifungal Natural Products

WAN Zhong-yi, ZHANG Ya-ni, ZHANG Zhi-gang, WANG Kai-mei* et al (Hubei Biopesticide Engineering Research Center/The Branch Center of Biopesticide, Hubei Agricultural Sciences and Technology Innovation Center, Wuhan, Hubei 430064)

Abstract [Objective] Rapid identification and activity evaluation were carried out for the fermentation extracts of a strain HBERC-31270 which was isolated from a soil sample collected in Xianning, Hubei province. [Method] The strain HBERC-31270 was fermented and extracted, and bioactivity determination, HPLC-MS, UV spectrum analysis and activity evaluation were carried out for the fermentation extracts. [Result] It was determined by components bioassay that the active compounds were in between 14-21 min in HPLC profile, and the compounds were identified as 9-methylstreptimidone on the basis of MS, UV absorption spectrum and natural product dictionary. It was found by pot test that the fermentation broth was very effective against a variety of fungal diseases. [Conclusion] The results provide theoretical basis for the further study of actinomycetes HBERC-31270.

Key words Natural products; Pesticide activity; Actinomycetes; 9-methylstreptimidone

在生物农药的研究开发工作中,放线菌产生的天然产物是其重要的来源^[1-2]。一方面,放线菌可直接通过发酵及后处理制成生物农药,如阿维菌素^[3-5]、多杀菌素^[6]、井冈霉素^[7-8]等;另一方面,以天然产物为模板,对其结构进行优化改造,是研发高效低毒绿色农药的另一途径,如甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂^[9]就是以担子菌产生的 strobilurin^[10]为先导化合物经人工改造而获得。随着人们对环境中微生物资源的不断挖掘,重复发现已知化合物的概率越来越高,获得新活性化合物的难度越来越大。因此,从大量样品中对活性化合物进行快速鉴定成为发现新化合物的关键。

HBERC-31270 是湖北省生物农药工程研究中心在天然产物筛选过程中,从湖北咸宁地区采集的土样中分离出的1株放线菌,经生物活性测定,其发酵提取物对多种农业真菌病原具有强烈的抑制活性。笔者对其发酵提取物进行制备及收集,获得了不同时间流出的样品共36份,通过生物测定确定其活性成分部位,通过高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)分析、天然产物数据库比对及文献调研对活性产物的化学结构进行了快速鉴定,并通过盆栽试验对其进行了生物活性评价,以期为该菌的进一步研究与应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种。放线菌 HBERC-31270 分离自湖北咸宁采集

的山坡树林根际土,土样编号为 S-1699,由湖北省生物农药工程研究中心分离保藏。农药活性测定用指示真菌包括番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*, BOTCIN)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*, RHISOL)、黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*, FUSCUL)、小麦颖枯病菌(*Septoria nodorum*, SEPNOD)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*, ALTSOL)、蚕豆锈病菌(*Uromyces fabae*, UROFAB)。

1.1.2 培养基。斜面培养基:ISP-2 培养基。采用 18 mm × 180 mm 玻璃试管,每管装琼脂培养基 8~10 mL。种子培养基:同 ISP-2,不加琼脂。采用 500 mL 带挡板三角瓶,每瓶装培养基 100 mL,121 °C 灭菌 30 min。发酵培养基:主要成分为葡萄糖、棉籽蛋白、酵母浸粉等。采用 500 mL 带挡板三角瓶,每瓶装培养基 100 mL,121 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 主要仪器与数据库。Ly-0.8 型冰冻干燥机,上海东富龙科技有限公司生产;Waters 高效制备液相色谱仪(Waters 2525 泵,带 2767 自动收集系统,2996 二极管阵列式检测器);液相色谱-质谱联用仪,采用 Waters 2695 高效液相色谱仪(Waters 2996 二极管阵列式检测器)、Micromass Quattro micro 质谱仪(电喷雾离子源 ESI)以及 Masslynx V4.1 液质联用分析软件;查普曼天然产物数据库 2003 版。

1.2 方法

1.2.1 菌株摇瓶发酵。从斜面取 8~10 mm 的 1 块菌苔转移至种子摇瓶中,置于 28 °C、150 r/min 旋转式摇床上振荡培养 72~96 h,按 10% (V/V) 的接种量转接至发酵培养基中,置于 28 °C、150 r/min 旋转式摇床上振荡培养 100~120 h,即完成发酵。

基金项目 湖北省农业科技创新中心项目(2016-620-000-001-039)。
作者简介 万中义(1964-),男,湖北天门人,研究员,博士,从事微生物天然产物研究与开发。*通讯作者,研究员,硕士,从事天然产物研究。

收稿日期 2016-09-21

1.2.2 发酵液冻干与提取。将发酵液转移至不锈钢冻干盒中,置于冻干机中冰冻干燥,冻干条件为: -40℃预冻2 h,将冷阱预冷至 -45℃以下,然后开启真空泵升华。真空度为50~90 Pa,升温速率为2~3℃/h,极限温升为37℃。冻干完成后,转移至三角瓶中,先用少量50%甲醇-水湿润,再加入100 mL乙酸乙酯,于摇床上180 r/min振荡萃取1 h,分离出乙酸乙酯相,旋转蒸发,除去溶剂,以少量甲醇溶解,12 000 r/min离心3 min,取上清液送HPLC-MS分析。

1.2.3 提取物生物活性测定。取一定量发酵提取物,加入乙醇溶解,以纯水稀释至一定浓度后,用96孔板进行生物活性测试。组分活性测试采用相同的靶标及方法。

1.2.4 提取物液质联用分析。色谱柱为美国Sunfire C₁₈柱,150.0 mm×2.1 mm(i.d.),粒径为3.5 μm,柱温为40℃,进样量为2 μL,流动相为超纯水和色谱纯乙腈,梯度洗脱。质谱检测条件:电喷雾电离(ESI),毛细管电压为3.5 kV,锥孔电压为70 V,离子源温度为100℃,干燥气温度为300℃,脱溶剂气体流速为500 L/h,锥孔气体流速为50 L/h。

1.2.5 提取物鉴定。根据组分活性测定结果,确定活性成分的保留时间,从高效液相色谱(HPLC)中精确提取活性物质的紫外吸收光谱,确定吸收峰的波长。从正、负离子流图谱中可判定目标产物的分子离子峰。将吸收峰波长及分子量输入Chapman天然产物数据库,查询同该物质性质相同或

相近的化合物名称及其结构式,通过理化及生物学性质,确定活性化合物的种类及结构式。

1.2.6 发酵液室内活性评价。采用对峙法。

$$\text{抑菌率} = (\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}) / (\text{对照组菌落直径} - \text{菌饼直径}) \times 100\%$$

1.2.7 发酵液盆栽活性评价。采用小麦、蚕豆、番茄幼苗,进行HBERC-31270发酵液的盆栽活性评价。供试幼苗均在室内培养14 d左右。将发酵液加入0.1%吐温-80后喷于幼苗叶面,24 h后接入病原菌孢子。以清水加0.1%吐温-80为空白对照,7 d后进行调查。

分级方法:0级,叶片无病斑;1级,病斑面积占叶片面积的5%以下;3级,病斑面积占叶片面积的6%~10%;5级,病斑面积占叶片面积的11%~20%;7级,病斑面积占叶片面积的21%~50%;9级,病斑面积占叶片面积的50%以上。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})}{(\text{调查总叶数} \times 9)} \times 100$$

$$\text{防效} = \frac{(\text{空白病情指数} - \text{处理病情指数})}{\text{空白病情指数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 HBERC-31270 发酵提取物的农药活性 从表1、2可知,具有抗真菌活性的组分出现在14~21 min,其余组分无活性。

表1 HBERC-31270 粗提物农药活性
Table 1 Bio-activity of HBERC-31270 extract

提取物 Extract	BOTCIN	SEPNOD	ALTSOL	FUSCUL	RHISOL	UROFAB
发酵 A Fermentation A	9	9	9	9	9	7
发酵 B Fermentation B	9	9	9	9	9	7

注:9表示完全抑制;7表示大部分抑制。

Note:9. Complete inhibition; 7. Most inhibition.

表2 HBERC-31270 制备组分活性
Table 2 The activity of prepared components of HBERC-31270

时间 Time//min	BOTCIN	SEPNOD	ALTSOL	FUSCUL	RHISOL	UROFAB
1~13	0	0	0	0	0	0
14	0	7	0	7	7	0
15	0	9	7	7	9	0
16	0	7	7	9	9	3
17	0	7	7	7	0	3
18	7	7	9	7	0	3
19	7	9	0	7	0	7
20	9	3	9	7	7	9
21	0	0	7	7	0	7
22~36	0	0	0	0	0	0

注:9表示完全抑制;7表示大部分抑制;3表示部分抑制;0表示无活性。

Note:9. Complete inhibition; 7. Most inhibition; 3. Part inhibition; 0. No inhibition.

2.2 HBERC-31270 提取物的 HPLC 及紫外吸收光谱 (UV) 由图1、2可知,保留时间为16.60 min的化合物紫外吸收峰为237、292 nm,该吸收光谱特征明显,最强吸收峰(237 nm)的吸光强度为1.0,比弱峰(292 nm,吸光强度为0.1)高出约10倍,该特征为紫外吸收光谱的重要特征(相当于摩尔吸光系数ε)。

2.3 HBERC-31270 活性产物的质谱 (MS) 由图3可知,在正离子流中m/z 616.4处有1个强峰,m/z 633.2处有1个次强峰,一般情况下,可能会将这2个峰之一作为分子离子

峰。不过,由于MS的特征,常会出现2个分子结合在一起形成质谱峰,即产物的分子量约为该值的50%。在负离子流中,最高丰度为m/z 307.1,正离子流中对应峰为m/z 308.9。根据MS特征,判定该峰为产物分子离子峰,即该产物的分子量为308.00 Da。

2.4 活性化合物的快速鉴定 将化合物分子量及紫外吸收峰波长输入Chapman化合物数据库查询,条件为分子量在307~309,紫外吸收峰值波长23*和29*(*号代表任意值,考虑到不同仪器间的误差)。查询得到3个化合物,1个来自放

线菌,另外 2 个来自其他植物,据此初步判断活性产物为源于放线菌的 9-甲基链米酮,其分子量为 307.38 Da。

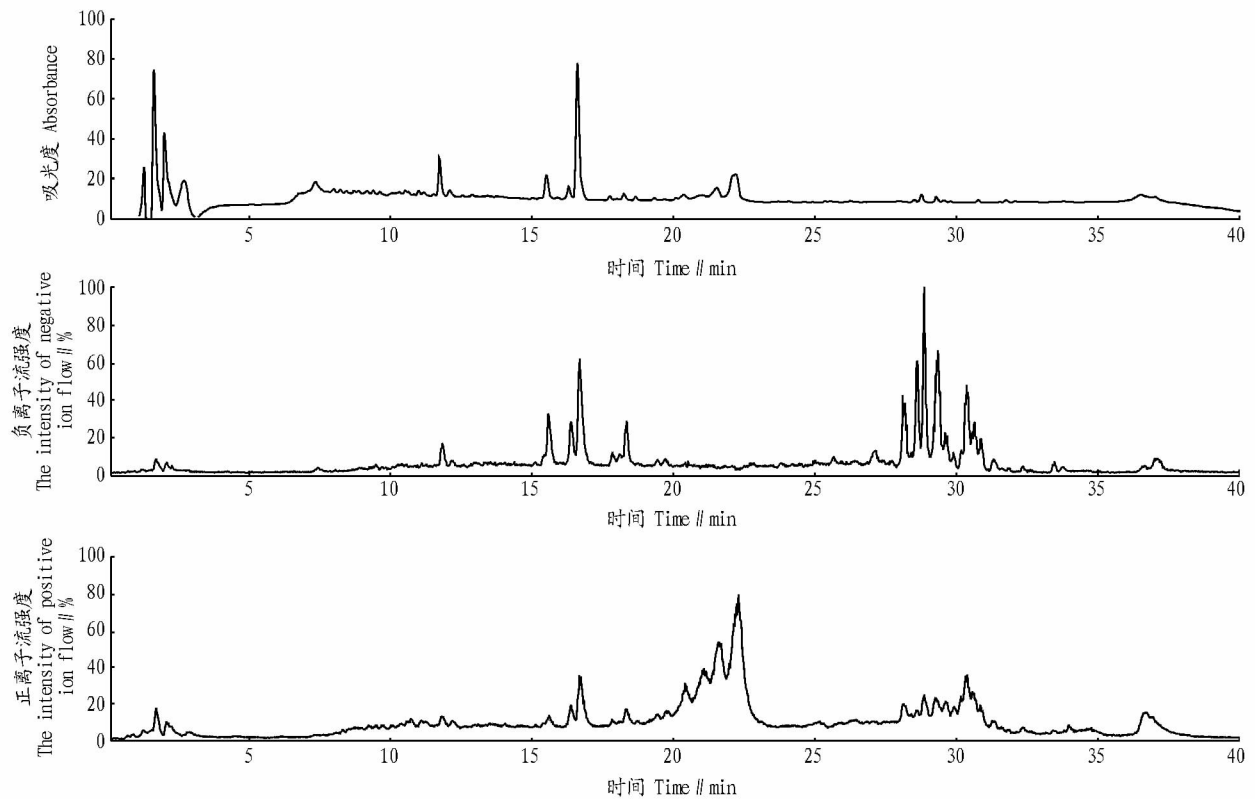


图 1 HBERC-31270 提取物 HPLC-MS 图谱

Fig. 1 HPLC-MS spectrum analysis of HBERC-31270 extract

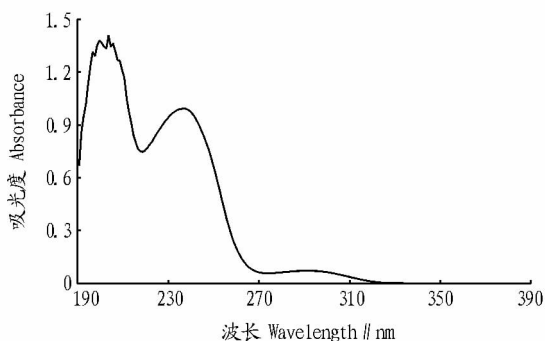


图 2 活性化合物的 UV 图谱

Fig. 2 The ultraviolet absorption spectrum of active compounds

查询文献[11-12]可知,9-甲基链米酮的摩尔吸光系数 $\varepsilon(\lambda_{230\text{ nm}})$ 为 23 100, $\varepsilon(\lambda_{291\text{ nm}})$ 为 790, 与该菌株活性产物紫外光谱相似。

确定该化合物分子式为 $C_{17}H_{25}NO_4$, 其结构式如图 4 所示。

2.5 HBERC-31270 室内及田间活性评价 由图 5、6 可知, HBERC-31270 不仅对常见农作物真菌病害如番茄灰霉病、水稻纹枯病等具有较好的抑制效果, 对小麦白粉病、蚕豆锈病等也具有较好的防治效果。

3 讨论

进行天然产物结构的鉴定通常需要四大光谱, 即红外光谱、紫外光谱、质谱和核磁共振谱。红外光谱提供了化合物分子振动的信息, 紫外光谱则是分子内部电子能级跃迁的

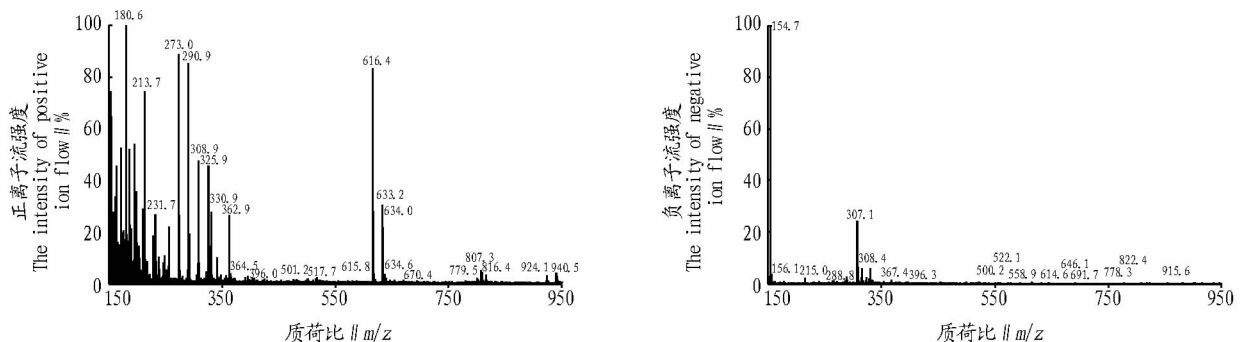


图 3 活性产物的 MS 图谱(保留时间=16.60 min)

Fig. 3 MS of active compounds (16.60 min)

植株所能承受的极限时,植物就不能对这种胁迫做出有效的保护。

该研究只是探讨了在渗透胁迫下芹菜植株体内一些生理生化指标的变化,其具体的变化机理有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 李锦树,王洪春,王文英,等. 干旱对玉米叶片细胞透性及膜脂的影响[J]. 植物生理学报,1983,9(3):223-228.
- [2] 张智,夏宜平,徐伟伟. 两种观赏草的自然失水胁迫初步研究[J]. 园艺学报,2007,34(4):1029-1032.
- [3] 王海珍,梁宗锁,韩蕊莲,等. 土壤干旱对黄土高原乡土树种水分代谢与渗透调节物质的影响[J]. 西北植物学报,2004,24(10):1822-1827.
- [4] BEWLEY J D. Physiological aspects of desiccation tolerance[J]. Ann Rev Plant Physiol,1979,39(30):195-238.

- [5] 张美云,钱吉,郑师章. 渗透胁迫下野生大豆游离脯氨酸和可溶性糖的变化[J]. 复旦学报(自然科学版),2001,40(5):558-561.
- [6] 王霞,侯平,伊林克. 水分胁迫对柽柳植物可溶性物质的影响[J]. 干旱区研究,1999,16(2):6-11.
- [7] 蔡海霞,吴福忠,杨万勤. 干旱胁迫对高山柳和沙棘幼苗光合生理特征的影响[J]. 生态学报,2011,31(9):2430-2436.
- [8] 王红梅,包维楷,李芳兰. 不同干旱胁迫强度下白刺花幼苗叶片的生理生化反应[J]. 应用与环境生物学报,2008,14(6):757-762.
- [9] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2版. 北京:科学出版社,2006:167-173.
- [10] 韩瑞宏,田华,高桂娟,等. 干旱胁迫下紫花苜蓿叶片水分代谢与两种渗透调节物质的变化[J]. 华北农学报,2008,23(4):140-144.
- [11] 赵黎芳,张金政,张启翔,等. 水分胁迫下扶芳藤幼苗保护酶活性和渗透调节物质的变化[J]. 植物研究,2003,23(4):437-442.

(上接第11页)

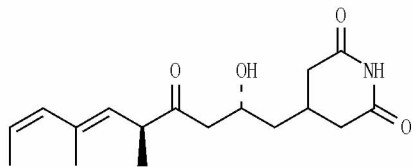


图4 9-甲基链米酮的结构式

Fig. 4 The chemical formula of 9-methylstreptimidone

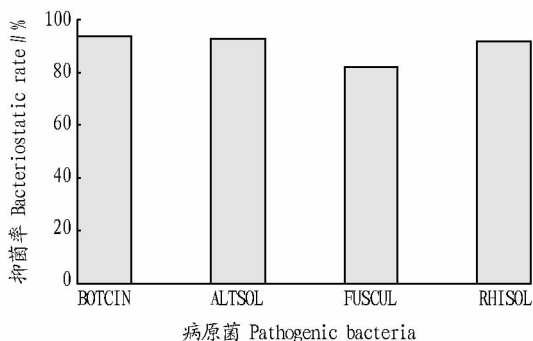


图5 HBERC-31270 室内活性评价结果

Fig. 5 Evaluation results of indoor activity of HBERC-31270

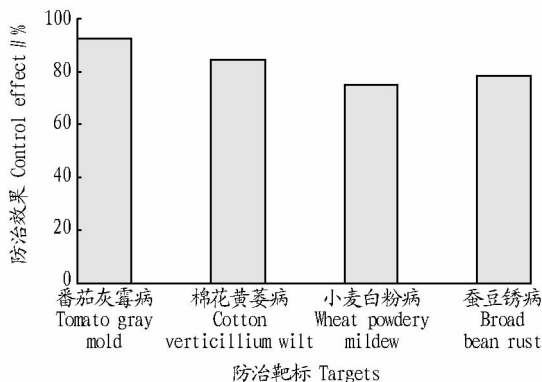


图6 HBERC-31270 盆栽活性评价结果

Fig. 6 Evaluation results of pot test of HBERC-31270

结果,质谱提供了分子离子及其碎片的信息,核磁共振谱则体现了化合物中化学键的关系。红外及核磁共振谱的获得

需要有一定量的纯化合物(纯度95%以上,质量2mg以上),并进行高分辨质谱、氢谱、碳谱分析及结构解析,这些化合物的获得需要进行发酵、提取、精制等程序,费时费力,所以采用四大光谱进行化合物的鉴定非常耗时。一般鉴定1个未知化合物需要1至数月甚至更长时间。

在微生物源天然产物的筛选过程中,由于筛选到的绝大多数活性化合物均已知,如对每一活性化合物进行四大光谱分析,则费时费力。因此,在筛选过程中,进行化合物的快速早期鉴别,对天然产物的研究开发具有重要意义。

据文献报道,9-甲基链米酮属亚胺类天然产物,具有广谱抗真菌活性,并有抗病毒活性,且毒性明显低于同类天然产物放线菌酮(环己酰亚胺)。同后者相比,国内极少见相关文献报道。由于其良好的抗真菌活性和较低的毒副作用,推测该产物具有良好的应用开发前景。

参考文献

- [1] 叶胜蓝,汪江峰,黄剑. 土壤放线菌 P3-2 的分类鉴定及抗菌活性研究[J]. 生物技术通报,2012(1):156-161.
- [2] 唐依莉,王蓉,洪葵. 不同红树林地区老鼠簕内生放线菌的分离及其环境适应性[J]. 微生物学通报,2012,39(1):25-32.
- [3] 沈寅初,杨慧心. 杀虫抗生素 Avermectin 的开发及特性[J]. 农药译丛,1994(3):1-13.
- [4] 殷向东. 生物源杀虫剂研究应用进展及其在我国的发展思路[J]. 农药,1999(11):45-46.
- [5] ÖMURA S. Microbial metabolites:45 years of wandering, wondering and discovering[J]. Tetrahedron,2011,67(35):6420-6459.
- [6] 陈小龙,郑裕国,沈寅初. 农用抗生素刺糖菌素(Spinosads)的研究进展[J]. 农药,2002,41(1):4-7.
- [7] 沈寅初. 井冈霉素研究开发25年[J]. 植物保护,1996(4):44-45.
- [8] 沈寅初. 我国微生物源杀菌抗生素的研究开发[J]. 世界农药,2011,33(4):1-3.
- [9] 袁武栋. 阿米西达——一种独特的生物杀菌剂[J]. 四川农业科技,2003(5):34.
- [10] ANKE T, OBERWINKLER F, STEGLICH W, et al. The strobilurins—new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* [J]. The journal of antibiotics,1977,30(10):806-810.
- [11] OTANI T, SASAKI T, MINAMI Y, et al. New glutarimide antibiotics, S-632-B₁ and B₂. I. Taxonomy of producing strain, fermentation and biological properties[J]. Journal of antibiotics,1989,42(5):642-653.
- [12] SAITO N, KITAME F, KIKUCHI M, et al. Studies on a new antiviral antibiotic, 9-methylstreptimidone. I. Physicochemical and biological properties [J]. J Antibiotics,1974,27(3):206-214.