

链霉菌 4301 菌株抑菌活性物质的分离与结构鉴定

陈敏^{1,2}, 蓝锦福³, 冯敏妍³, 谢丽君², 宋圆圆², 曾任森²

(1 华南农业大学公共基础课实验教学中心, 广东 广州 510642; 2 农业部生态农业重点开放实验室, 广东省高等学校农业生态与农村环境重点实验室, 华南农业大学农学院, 广东 广州 510642; 3 华南农业大学理学院, 广东 广州 510642)

摘要:从土样中分离筛选的链霉菌 4301 菌株的代谢产物具有抑菌活性, 通过溶媒萃取并利用各种柱层析手段从该菌株发酵液中分离得到 5 个化合物, 利用波谱技术确定其结构分别为槲皮素、芹菜素、阿魏酸、香草酸和没食子酸, 并初步评价了化合物 I ~ V 的抑菌活性. 生测结果表明: 浓度为 10 mmol/L 槲皮素对香蕉炭疽病菌 *Colletotrichum musae*、荔枝炭疽病菌 *Glomerella cingulata*、荔枝霜疫霉菌 *Peronophythora litchii* 和小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum* 均有抑菌作用. 浓度为 10 mmol/L 的香草酸对荔枝霜疫霉菌的抑菌圈直径达到了 28 mm.

关键词:链霉菌; 结构鉴定; 代谢产物; 抑菌活性

中图分类号: S476.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)03-0032-04

Isolation and Identification of Antifungal Metabolites of Streptomyces Strain 4301

CHEN Min^{1,2}, LAN Jin-fu³, FENG Min-yan³, XIE Li-jun², SONG Yuan-yuan², ZENG Ren-sen²

(1 Center of Experimental Teaching for Common Basic Courses, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Key Laboratory of Ecological Agriculture, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Agroecology and

Rural Environment of Guangdong Regular Higher Education Institutions, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3 College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Streptomyces* sp. strain 4301 isolated from the soil displayed fungicidal activity. Five compounds were isolated and purified from fermented broth of the strain through silica gel column chromatography. Their structures were identified on the basis on their IR, MS, ¹H and ¹³C NMR. The five compounds were quercetin, apigenin, ferulic acid and vanillic acid, gallic acid. The fungicidal activity of these compounds were assayed. Quercetin inhibited mycelial growth of four test plant pathogens including *Colletotrichum musae*, *Glomerella cingulata*, *Peronophythora litchii* and *Fusarium graminearum*. The diameter of inhibitory cycles of *P. litchii* affected by vanillic acid at a concentration of 10 mmol/L was 28 mm.

Key words: *Streptomyces* sp.; structure identification; metabolites; fungicidal activity

全球农业病虫害的防治仍以化学农药为主. 大量化学农药的施用, 严重污染了环境, 危及人类健康及生命. 据联合国环境规划署调查, 全世界每年大约有 100 万人农药中毒, 其中 20 万人死亡^[1]. 而我国农药污染是世界上最严重的国家之一, 食品中农药检出率高达 90% 以上. 生物源农药通常具有安全、无毒副作用、不污染环境等优点, 发展生物源农药已

成为一种趋势. 华南农业大学农业部生态农业重点开放实验室在新农药的筛选过程中, 从土壤中分离到 1 株放线菌, 经鉴定为链霉菌 *Streptomyces* 4301 菌株. 该菌株的代谢产物具有强烈的抑菌活性, 在固体培养条件下 4301 菌株对荔枝霜疫霉菌 *Peronophythora litchii* 和荔枝炭疽病菌 *Glomerella cingulata* 的抑菌圈透明, 对荔枝霜疫霉菌的抑菌圈直径达到 25.5

收稿日期: 2009-01-08

作者简介: 陈敏 (1967—), 女, 实验师, 硕士; 通讯作者: 曾任森 (1965—), 男, 教授, 博士, E-mail: rszeng@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30670331, 30671381); 广东省自然科学基金 (8451064201001012); 广东省科技计划项目 (2008A030101008, 2008B021500001).

mm^[2]. 本研究分离与鉴定了该菌株产生的抗菌活性物质,为研制毒性低、适合于水果生产上使用的新型杀菌活性物质奠定基础,为人工化学合成杀菌活性物质提供先导化合物模型.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 从湖南省安乡县安丰乡稻田土样中分离出的1株放线菌,经鉴定该菌株为链霉菌 *Streptomyces* 4301 菌株.

1.1.2 供试植物病原菌 香蕉炭疽病菌 *Colletotrichum musae*、荔枝炭疽病菌 *Glomerella cingulata*、荔枝霜疫霉菌 *Peronophythora litchii* 和小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*,均由华南农业大学植物病理研究室周而勋教授提供.

1.1.3 培养基 保藏培养基:链霉菌用高氏一号培养基,病原菌用 PDA 培养基.

液体种子培养基:每1 000 mL 水含黄豆饼粉 60 g(煮后过滤),葡萄糖 10 g,氯化钠 2.5 g,蛋白胨 3 g,碳酸钙 2 g,用 NaOH 调节 pH 至 7.2~7.4.

液体发酵培养基:1 000 mL 水含黄豆饼粉 40 g(煮后过滤),葡萄糖 10 g,氯化钠 2.5 g,蛋白胨 3 g,碳酸钙 2 g,FeSO₄·7H₂O 0.01 g,MgSO₄·7H₂O 0.3 g,磷酸氢二钾 0.5 g,用 NaOH 调节 pH 至 7.2~7.4.

1.1.4 仪器与试剂 Bruker AV-600 型核磁共振仪,以 TMS 为内标;Agilent1100MSD Trap 质谱仪;北京 X4 型显微熔点仪(温度计未校正);上海博讯 DZF6050MBE 真空干燥箱;上海嘉鹏 RE52-3 旋转蒸发器;上海安亭 ZF-2 型三用紫外分析仪;巩义市予华 SHZ-D(Ⅲ)真空泵.薄层硅胶板 GF254 和柱层析硅胶 G(200~300 目),均为青岛海洋化工厂生产;Sephadex LH-20 和 C₁₈ 均为 Pharmacia 公司生产.其他试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 菌株的发酵培养 菌种在高氏1号培养基上 28℃ 培养 7 d 后,取适量菌体接种于种子培养基,于 28℃、120 r/min 的条件下摇床培养 2 d 得到种子培养液.将该种子培养液按 10% 的接种量,接种于 500 mL 三角瓶,每瓶含 100 mL 液体发酵培养基,28℃、120 r/min 摇床培养 5 d,共计发酵 60 L.

1.2.2 提取分离 菌株发酵培养后用布氏漏斗抽滤,分为上清液和菌丝体两部分.上清液 60 L 浓缩至约 5 L,用等体积乙酸乙酯萃取 3 次得浸膏 10 g.浸膏拌硅胶过柱,依次用石油醚、乙酸乙酯、甲醇梯度洗脱,收集各馏分,减压浓缩、合并,得到 5 个色谱组分 Fr.1~Fr.5.

1.2.3 纯样品添加液及对照液的配制 将需要测试的样品分别溶于丙酮(分析纯)中,然后用水配制为含 $\varphi = 1\%$ 丙酮的 0.3 和 10 mmol/L 的样品溶液,定容至所需要体积,置于冰箱中保存待用.吸取 1 mL 丙酮倒入 100 mL 的容量瓶中用蒸馏水定容得到 $\varphi = 1\%$ 的丙酮溶液,以此溶液为对照.

1.2.4 抑菌活性的测定 将培养好的供试菌与适量培养基充分混匀,倒入 9 cm 培养皿中制成带菌平板,每个平板上放 3 个牛津杯(内径 0.6 cm、外径 0.8 cm、高 1.0 cm 的不锈钢杯),每杯加入纯样品液 0.2 mL,以 $\varphi = 1\%$ 丙酮为对照,置 28℃ 恒温箱中培养 2~4 d 后,用十字交叉法测量抑菌圈直径^[3],3 次重复.

2 结果与分析

链霉菌 4301 菌株发酵液(60 L)经过乙酸乙酯萃取液浓缩获得浸膏 10 g,经过硅胶柱层析获得 Fr.1~Fr.5 共 5 个组分.经反复的正反相硅胶、Sephadex LH-20 和 C₁₈ 柱色谱等分离,从 Fr.2 得到化合物 I(80 mg)、化合物 II(10 mg),从 Fr.3 得化合物 III(50 mg)、化合物 IV(59 mg),从 Fr.4 得化合物 V(40 mg).

2.1 结构鉴定

已经分离获得的 5 个化合物经过薄层色谱和熔点测定,证明是纯化合物.利用波谱技术对其结构进行解析.这些化合物的结构如图 1 所示.

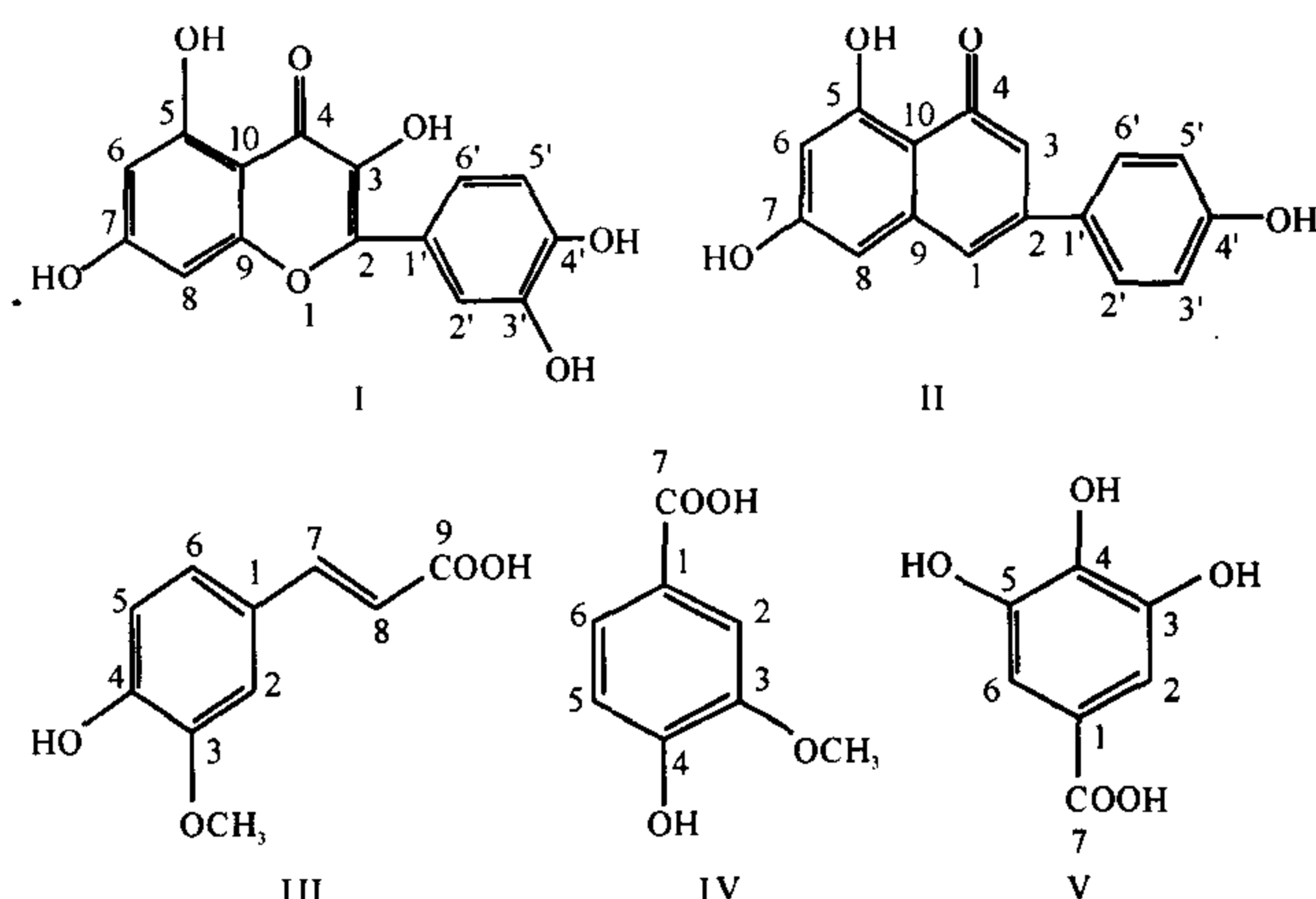


图 1 5 种化合物的结构图

Fig. 1 Structures of five compounds

化合物 I(甲醇):黄色粉末,m. p. 310~312℃, E I-MS m/z : 303 $[M + H]^+$, C₁₅H₁₀O₇. ¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 175.9 (C-4), 163.9 (C-7), 160.7 (C-5), 156.2 (C-9), 147.7 (C-4'), 146.8 (C-2), 145.1 (C-3'), 135.8 (C-3), 122.0 (C-1'), 120.0 (C-6'), 115.6 (C-2'), 115.1 (C-5'), 103.0 (C-10), 98.2 (C-6), 93.4 (C-8). ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.18 (1H, d, $J = 210$ Hz, H-6), 6.40 (1H, d, $J = 210$ Hz, H-8), 6.88 (1H, d, $J = 815$ Hz, H-5'), 7.53

(1H,dd, $J = 815, 210\text{Hz}$, H-6'), 7.68 (1H, d, $J = 210\text{Hz}$, H-2'), 9.30 (1H, br, 3'-OH), 9.58 (1H, br, 4'-OH), 10.77 (1H, br, 7-OH), 12.48 (1H, br, 5-OH). 与文献[4-5]波谱数据对照, 鉴定化合物 I 为 3,5,7,3',4'-五羟基黄酮, 即槲皮素 (Quercetin).

化合物 II (丙酮): 黄色粉末, mp 340 ~ 342 °C, ESI-MS 显示准分子离子峰为 $m/z: 269.64 [M-1]^-$, 结合¹H-NMR 和¹³C-NMR, 推定分子式为 C₁₅H₁₀O₅. 从¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 可以看出, 该化合物为黄酮类化合物, 并且有 3 个羟基; ¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 指出 C-4 在低场 (δ 181.72, s), 为 4 位的羰基碳信号, 说明有 5 位羟基, δ 98.81 (C-6) 和 93.94 (C-8) 分别为 8 位和 6 位的碳信号. ¹H-NMR 中, δ 6.76 (1H, s, 3-H) 为 3 位的质子信号, δ 6.18 (1H, d, $J = 1.8\text{Hz}$, H-6), 6.46 (1H, d, $J = 1.8\text{Hz}$, H-8) 分别为 6 位和 8 位的 2 个间位氢质子, δ 7.90 (2H, d, $J = 9.0\text{Hz}$, H-2'6'), 6.91 (2H, d, $J = 9.0\text{Hz}$, H-3', 5') 构成 AA'BB' 偶合系统, 为黄酮 B 环上 2', 6' 和 3', 5' 位质子特征信号, 提示 B 环为 4' 位取代模式, 12.95 (1H, s, 5-OH), 10.80 (1H, s, 7-OH), 10.35 (1H, s, 4'-OH). ¹³C-NMR δ : 181.72 (C-4), 164.10 (C-2), 163.71 (C-7), 161.44 (C-9), 161.14 (C-4'), 157.29 (C-5), 128.44 (2C, C-2', 6'), 121.16 (C-1'), 115.93 (2C, C-3', 5'), 103.68 (C-10), 102.82 (C-3), 98.81 (C-6), 93.94 (C-8). 以上数据与文献[6-8]对照, 鉴定该化合物 II 为 5,7,4'-三羟基黄酮, 即芹菜素 (Apigenin).

化合物 III (甲醇): 白色结晶, mp 170 ~ 171 °C, ESI-MS m/z 195.0 $[M+H]^+$, C₁₀H₁₀O₄, ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.11 (1H, d, $J = 1.6\text{Hz}$, H-2), 6.93 (1H, d, $J = 8.0\text{Hz}$, H-5), 7.09 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0\text{Hz}$, H-6), 7.26 (1H, d, $J = 16\text{Hz}$, H-7), 6.31 (1H, d, $J = 16\text{Hz}$, H-8), 3.94 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 126.7 (C-1), 109.5 (C-2), 147.0 (C-3), 148.4 (C-4), 114.7 (C-5), 123.6 (C-

6), 146.8 (C-7), 114.2 (C-8), 170.6 (C-9), 56.0 (-OCH₃). 其光谱数据与文献[9]对照, 其各种数据与阿魏酸一致, 故确定为 3-甲氧基-4-羟基-桂皮酸, 即阿魏酸 (Ferulic acid).

化合物 IV (丙酮): 浅黄色针状结晶, mp 209 ~ 212 °C, ESI-MS 显示准分子离子峰 $m/z: 169 [M+H]^+$, ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) 显示该化合物有 1 个呈 ABX 系统的 3 个烯烃信号, ¹H-NMR δ : 3.91 (3H, s, Ar-OCH₃), 6.91 (1H, d, $J = 8.2\text{Hz}$, H-5), 7.60 (1H, d, $J = 2.0\text{Hz}$, H-2), 7.57 (1H, d, d, $J = 2.0, 8.2\text{Hz}$, H-6); ¹³C-MNR (600 MHz, CD₃OD) δ : 56.3 (Ar-OCH₃), 113.4 (C-5), 115.5 (C-2), 122.8 (C-6), 124.8 (C-1), 148.0 (C-4), 152.0 (C-3), 167.6 (C-7). 综合以上分析, 化合物 IV 为邻二取代苯甲酸衍生物, 分子式为 C₈H₈O₄. 以上数据显示与文献报道的 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸, 即香草酸 (Vanillic acid) 一致^[10,11].

化合物 V (丙酮): 无色针状结晶, mp 248 ~ 252 °C, 紫外灯 365 nm 下显蓝色荧光. ESI-MS $m/z: 171 [M+H]^+$. 分子式 C₇H₆O₅, ¹³C-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 168.0 (C-7), 145.9 (C-3, 5), 138.7 (C-4), 121.9 (C-1), 110.1 (C-2, 6). ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.18 (2H, s, H-2, 5). 与文献[5]波谱数据对照, 鉴定化合物 V 为 3,4,5-三羟基苯甲酸, 即没食子酸 (Gallic acid).

2.2 纯样品的抑菌活性

5 个化合物对香蕉炭疽病菌、荔枝炭疽病菌、荔枝霜疫霉菌和小麦赤霉病菌的抗菌活性结果见表 1. 从表 1 可以看出, 在浓度为 0.3 mmol/L 时, 化合物 II (芹菜素) 对小麦赤霉病菌抑菌效果很好, 其抑菌圈直径达到了 26.5 mm; 在浓度为 10 mmol/L 时, 化合物 IV (香草酸) 对荔枝霜疫霉菌抑制效果非常好, 其抑菌圈直径达到 28 mm. 化合物 I (槲皮素) 对荔枝炭疽病菌的抑菌圈直径也达到 18 mm. 化合物 I 对所有 4 种作物病原菌均有抑制作用.

表 1 链霉菌 4301 菌株所产生的 5 种化合物的抑菌活性¹⁾
Tab.1 Antimicrobial activity of five pure compounds isolated from *Streptomyces* sp. strain 4301

化合物	$c/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	抑菌圈直径/mm			
		荔枝炭疽病菌	小麦赤霉病菌	荔枝霜疫霉菌	香蕉炭疽病菌
对照	0	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
槲皮素	10.0	18.00 ± 0.41c	6.00 ± 0.39b	16.53 ± 0.54c	18.15 ± 0.43b
芹菜素	0.3	16.50 ± 0.64b	26.50 ± 0.64d	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
阿魏酸	10.0	0.00 ± 0.00a	12.12 ± 0.43c	5.93 ± 0.35b	0.00 ± 0.00a
香草酸	10.0	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	28.00 ± 0.91d	0.00 ± 0.00a
没食子酸	10.0	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	16.63 ± 0.75c	0.00 ± 0.00a

1) 表中数据为平均值 ± 标准误, 同列数字后小写字母不同者表示 0.05 水平差异显著 (Duncan's 法)

3 讨论

本文从链霉菌菌株4301发酵液中分离得到的5个化合物中,3个属于酚酸类,2个为黄酮类化合物。黄酮类化合物具有多种生物活性,芹菜素具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等多种生物学作用^[12],2005年Kristan等^[13]研究证明5,7,4'-三羟基黄酮为17-羟甾脱氢酶的抗氧化剂($IC_{50} = 2.9 \mu\text{mol/L}$)和抑制剂($IC_{50} = 54 \mu\text{mol/L}$)。而槲皮素也具有广泛的药理作用和生物活性,如抗氧化和清除氧自由基、降低血压、保护心肌缺血、避免缺血再灌注损伤、增强免疫功能及抗癌、抗菌、抗病毒及镇痛作用等^[14-16]。而在农业上的应用比较少,本研究证明槲皮素和芹菜素对农作物病原菌有较强烈的抑制作用,可为黄酮类化合物的应用开拓新的领域。

酚酸类物质具有化感作用已被广泛报道^[17-23]。Chen等^[24]从链霉菌中分离得到对羟基苯甲酸,并证明其对油菜和稗草有化感作用,Kim等^[25]从番茄植株水提液中分离得到水杨酸,证明其对茄子有化感作用。本研究证明香草酸和没食子酸对荔枝霜疫霉病菌有强烈的抑制作用。这些酚酸类化感物质结构虽然简单,但可以为研制开发新型农药提供模型。

参考文献:

- [1] 张锡贞,张红雨. 生物农药的应用与研发现状[J]. 山东理工大学学报:自然科学版,2004,18(1):96-100.
- [2] 陈敏,谢丽君,李春远,等. 链霉菌4301菌株的抑菌活性与液体发酵的优化[J]. 华南农业大学学报,2009,30(2):15-19.
- [3] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 2版. 北京:中国农业出版社,1997:47-51.
- [4] 高晓慧,谢宁,冯锋. 五层龙的化学成分研究[J]. 中药材,2008,31(9):1348-1351.
- [5] 卢文杰,牙启康,陈家源,等. 岗松中的一个新黄酮醇苷类化合物[J]. 药学学报,2008,43(10):1032-1035.
- [6] 梁龙,刘昌瑜,李光玉,等. 丝瓜叶化学成分的研究[J]. 药学学报,1996,31(2):122-125.
- [7] 陈丽霞,曲戈霞,邱峰,等. 穿心莲黄酮类化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(5):391-395.
- [8] 邓玉林,徐志慧,杨宾,等. 山楂根的化学成分分离和结构鉴定[J]. 北京理工大学学报,2006,26(5):464-467.
- [9] 毕跃峰,郑晓珂,冯卫生. 卷柏中化学成分的分离与结构鉴定[J]. 药学学报,2004,39(1):41-45.
- [10] 秦小萍,林壁润,王振中. 灰色变异链霉菌2507抑菌活性成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,2007,19:998-1000.
- [11] 王丽莉,孔维雪,原忠. 北沙参中的新8-O-4'型异木脂素[J]. 药学学报,2008,43(10):1036-1039.
- [12] 隋海霞. 芹菜素的生物学作用[J]. 国外医学:卫生学分册,2008,35(2):301-701.
- [13] KRISTAN K, KRAJNC K, KONC J, et al. Phytoestrogens as inhibitors of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase[J]. Steroids, 2005, 70:626-635.
- [14] LARocca L M, MAGGIANO N. Differential sensitivity of leukemic and normal hematopoietic progenitors to the killing effect of hyperthermia and quercetin used in combination, role of heat-shock protein-70[J]. International Journal of Cancer, 1997, 73(1):75-83.
- [15] NIJVELDT R J, VAN NOOD E, VAN HOORN D E C, et al. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 74(4):418-425.
- [16] OKAMOTO T. Safety of quercetin for clinical application[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2005, 16(2):275-278.
- [17] RICE E L. Allelopathy[M]. 2ed. New York: Academic Press, 1984:424.
- [18] DAO T H. Sorption and mineralization of plant phenolic acids in soil[M]. Washington D C: American Chemical Society, 1987:359-370.
- [19] ELLIOTT L F, CHENG H H. Assessment of allelopathy among microbes and plants[M]. Washington D C: American Chemical Society, 1987:504-515.
- [20] SIQUEIRA J O, NAIR M G, HAMMERSCHMIDT R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems[J]. Critical Review Plant Science, 1991, 10:63-121.
- [21] CHENG H H. Characterization of mechanisms of allelopathy[M]. Washington D C: American Chemical Society, 1995:132-141.
- [22] BLUM U. The value of model plant-microbe-soil systems for understanding processes associated with allelopathic interactions[M]. Washington D C: American Chemical Society, 1995:127-131.
- [23] BLUM U. Allelopathic interactions involving phenolic acids[J]. Journal of Nematology, 1996, 28:259-267.
- [24] CHEN M, ZHOU J R, LI C Y, et al. Isolation, identification and bioactivity of allelochemicals of *Streptomyces* sp. strain 6803[J]. Allelopathy Journal, 2009, 23(2):411-424.
- [25] KIM Y S, KIL B S. Identification and growth inhibition of phytotoxic substance from tomato plant[J]. The Korean Journal of Botany, 1989, 32(1):41-49.

【责任编辑 周志红】