

海绵共附生放线菌 *Streptomyces* sp. A01059 抗稻瘟病活性物质的分离研究

彭杰^{1,2}, 吴晓鹏¹, 张开山¹, 黄惠琴¹, 孙前光¹, 鲍时翔¹

(¹中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101; ²海南大学, 海口 571158)

摘要: 对海绵共附生放线菌 *Streptomyces* sp. A01059 的发酵液进行研究, 以获得有抗稻瘟病活性的化合物; 用乙酸乙酯对发酵液进行萃取, 然后用活性追踪的方法对乙酸乙酯萃取物进行分析, 最后使用制备液相获得相应的活性部位; 结果获得分子量为 508 和 522 的两个活性化合物; 实验首次对放线菌 *Streptomyces* sp. A01059 的代谢产物进行分离研究, 为稻瘟病的防治提供了新的途径。

关键词: 海绵共附生放线菌; 活性物质; 稻瘟病

中图分类号: Q939.13, R965 **文献标识码:** A

Separation of Active Compounds Against *Pyricularia oryzae* from Sponge-Associated Actinobacteria *Streptomyces* sp. A01059

Peng Jie^{1,2}, Wu Xiaopeng¹, Zhang Kaishan¹, Huang Huiqin¹, Sun Qianguang¹, Bao Shixiang¹

(¹Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou 571101; ²Hainan University, Haikou 571158)

Abstract: The fermentation broth of marine sponge-associated actinobacteria *Streptomyces* sp. A01059 was studied for the valuable active compounds which against rice blast; The fermentation broth was extracted with ethyl acetate, then activity-guided method was used to analysis the extraction and the active compounds were obtained by preparative liquid chromatography; Two active compounds were obtained and the molecular weight were 508 and 522, respectively; The metabolites of *Streptomyces* sp. A01059 were studied in this paper for the first time systematically, and a new method was provided to control rice blast.

Key words: sponge-associated actinobacteria, active compound, rice blast

0 引言

与陆地微生物相比, 海洋微生物能够耐受海洋特有的高盐、高压、低氧、低光照等多种极端条件, 因此形成了独特的代谢和生理特性, 产生了化学结构独特的次级代谢产物, 为人类提供了陆地微生物所不能提供的活性代谢产物^[1]。海洋放线菌作为海洋微生物的一个重要组成部分, 其代谢产物的多样性正日益受到重视, 特别是结构新颖的天然产物^[2]。近年来, 越来越多的研究表明许多具有开发前景的海洋生物活性物质并

不是由海绵、海藻等动植物自身产生的, 而是由与其共生或者腐生的微生物产生的^[3-4]。笔者对稻瘟病有防治效果的海绵共附生放线菌 *Streptomyces* sp. A01059 的发酵液进行了分离研究, 并从中发现了两个生物活性物质。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Waters Alliance 2695 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司); 996 光电二极管阵列检测器(美国 Waters

基金项目: 国家 863 计划 863 重点课题“特殊环境微生物资源的开发利用技术”子课题“生物质转化微生物资源的开发利用”(2007AA09Z447)、中央级公益性科研院所基金(ITBBZD2007-5-1)。

第一作者简介: 彭杰, 男, 1980 年出生, 山东聊城, 硕士, 农业生物技术, 主要从事微生物次生代谢产物分离、鉴定研究。通信地址: 571101 海南省海口市城西路 4 号热带生物所 1503, Tel: 0898-66890695, E-mail: jackp_sdau@163.com。

通讯作者: 鲍时翔, 男, 1966 年出生, 博导, 教授, 主要研究领域: 应用微生物。通信地址: 571101 海南省海口市城西路 4 号生物所 1503, Tel: 0898-66890695, E-mail: bsxhhq@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2009-03-04, **修回日期:** 2009-03-12。

公司); Waters DeltaPrep 4000 半制备液相色谱仪(美国 Waters 公司); Finnigan TSQ 三级四级杆质谱仪(美国 Finnigan 公司)带有 ESI 源和 Xcalibur1.0 工作站; 超纯水(Millipore 公司); 甲醇(色谱纯, 山东禹王实业); HYPERSIL C18 色谱柱(4.6mm×250mm, 5μm), Waters Nova-Pak C18 柱(25 mm×200 mm, 6 μm)。

稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)购自中国工业微生物保藏中心。菌株 A01059 由笔者实验室分离获得。

1.2 菌株发酵

取海洋放线菌 A01059 接种于装有 100 ml 种子培养基(葡萄糖 10 g, 大豆粉 10 g, 酵母膏 10 g, 可溶性淀粉 5 g, KH_2PO_4 0.5 g, 天然陈海水 1000 ml, pH 7.2)的 250 ml 三角瓶中, 28 °C、150 r/min 震荡培养 48 h 作为种子液。将种子液接种于发酵培养基(大豆粉 1%, 玉米粉 1%, 可溶性淀粉 0.5%, KH_2PO_4 0.05%, 天然陈海水, pH 7.2), 接种量为 6%, 28 °C 震荡培养 6 天。

1.3 提取分离

海洋放线菌 A01059 发酵液经 8000r/min 离心 10 min, 共得到 30 L 上清液。取上清液用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩回收乙酸乙酯得到萃取物, 萃取物用甲醇溶解后使用液相色谱仪(HPLC)进行分析, 根据分析结果对活性部位使用制备型 HPLC 制备。

1.4 乙酸乙酯萃取物的分析与制备

取乙酸乙酯萃取物用 50% 甲醇(V/V)溶解, 并进行 HPLC 色谱分析, 分析条件为: 流动相为甲醇(B)-水(C), B 相由 30% (V/V) 20 min 内线性升到 60%(V/V), 然后再 20 min 线性升到 100%(V/V), 流速 1 ml/min, 检测波长 220 nm。根据分析条件确定 Waters Delta Prep 4000 半制备液相色谱仪对各组分进行制备的流动相条件为: Waters Nova-Pak C18 柱(25 mm×200 mm, 6 μm); 流动相为甲醇-水, 甲醇由 35%(V/V) 保持 15 min 后, 15 min 内线性升到 90%(V/V), 然后再保持 10 min, 流速 15 ml/min, 检测波长 220 nm, 室温。

1.5 活性检测

采用纸片扩散法^[9], 将稻瘟病菌的孢子悬液均匀涂布于土豆汁固体培养基上, 取直径为 6 mm 无菌滤纸片轻贴于检测平板上, 滴加 10 μl 待测样品/纸片, 28 °C 下培养 24 h 后, 测量抑菌圈直径。每个样重复 3 次取平均值。

2 结果

2.1 乙酸乙酯萃取物 HPLC 色谱分析

在 1.4 的分析条件下, 乙酸乙酯萃取物中的各组分均得到了很好的分离效果, 各峰均达到了基线分离。色谱分析图如图 1。

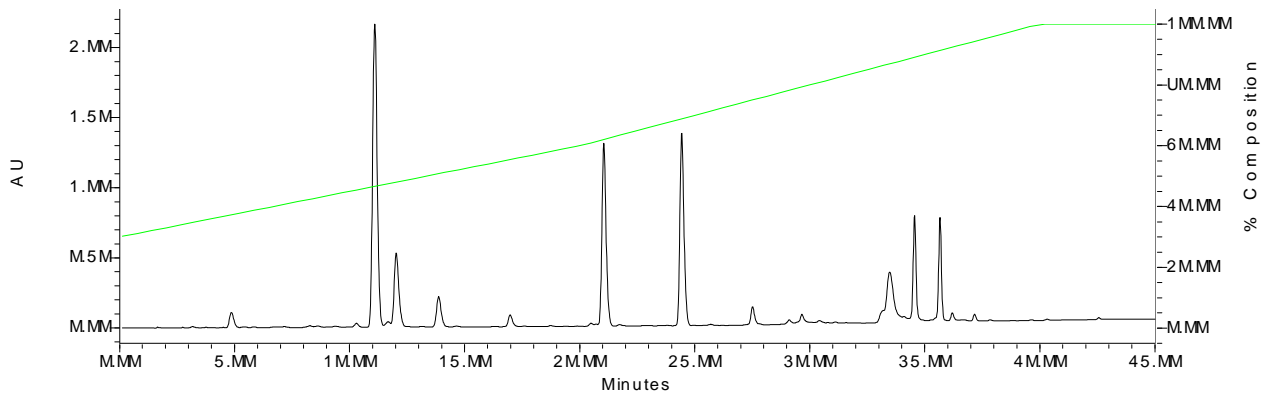


图 1 乙酸乙酯提取物 HPLC 分析图谱

2.2 乙酸乙酯萃取物中各化合物的制备

使用 1.4 的半制备液相流动相条件对乙酸乙酯萃取物中的各组分进行分离制备, 各组分均得到很好的分离效果(图 2), 并分别得到 123.1 mg、64.8 mg、24.6 mg、46.5 mg、110.3 mg、99.7 mg、32.3 mg、103.3 mg、97.0 mg 棕黄色膏状样品, 备用。

2.3 乙酸乙酯萃取物中各成分的活性测定

采用纸片扩散法, 测定乙酸乙酯提取物中 9 个组分的甲醇溶解物对稻瘟病菌的抑制情况, 以甲醇作对照。发现 1~7 号物质均无活性, 8、9 号物质对稻瘟病菌表现出较强的抑制活性, 纯甲醇对稻瘟霉孢子的萌发

无影响(表 1)。因此, 确定 8、9 号物质是抑制稻瘟病菌的活性物质。

2.4 活性物质的 HPLC/ESI-MS-MS 分析

HPLC 条件同 1.4 分析条件, 质谱条件: 喷雾电压 4.0 kv; 加热毛细管温度 325 °C; 氮气作为夹套气和辅助气, 夹套气 40 psi; 辅助气为 20 个单位; 一级质谱扫描范围 M/Z 100-1000(图 3)。得出活性峰 8、9 的分子量分别为 508 和 522, UV 吸收扫描图谱显示两个化合物具有相同的紫外吸收, 笔者初步推断这 2 种物质是相差 1 个 $-\text{CH}_2$ 的类似化合物。化合物结构正在解析, 论文待发表。

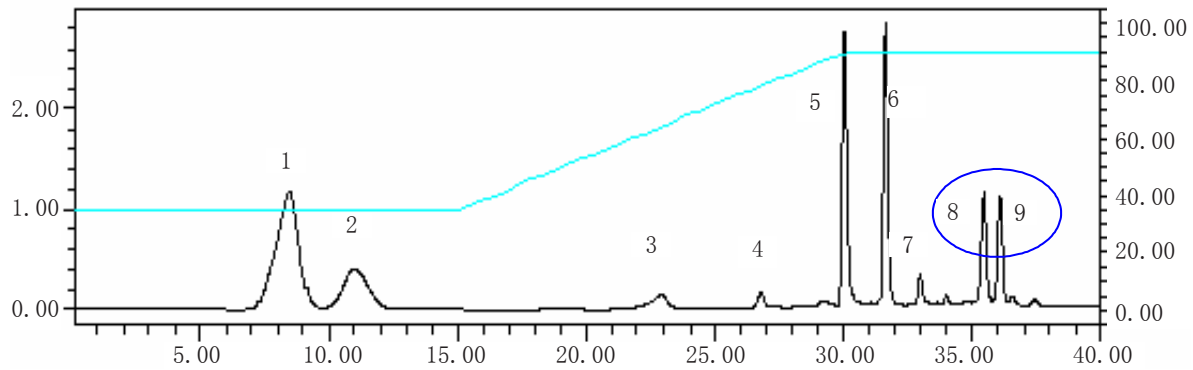


图2 乙酸乙酯提取物中各成份制备 HPLC 图谱

表1 各组分对稻瘟病菌的抑制情况

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	甲醇
抑菌圈直径/mm	0	0	0	0	0	0	0	34	32	0

RT: MM-QNQ

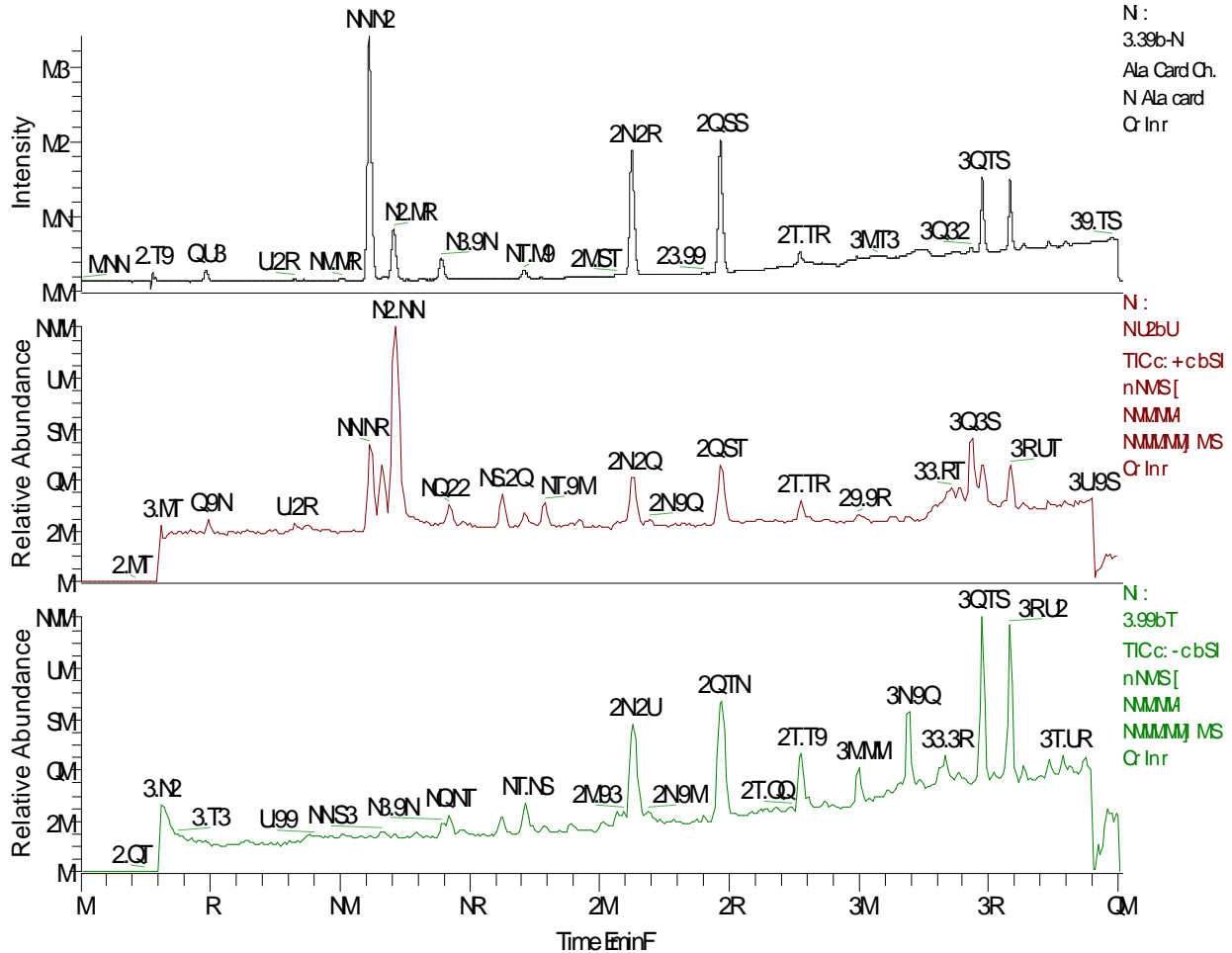


图3 乙酸乙酯提取物 HPLC/ESI-MS 分析图谱

3 讨论

使用多种有机溶剂对海洋放线菌 *Streptomyces* sp. A01059 的发酵液进行萃取, 发现大部分溶剂均能有效萃取活性物质。但由于乙酸乙酯毒性低, 最终选择使

用乙酸乙酯作为萃取溶剂。在采用半制备液相色谱制备活性物质时, 为确保样品的分离效果, 用于进样的样品溶剂应与洗脱液的起始浓度保持一致。因此, 用于溶解样品的溶剂不采用纯甲醇, 而改用 50% 甲醇/水

(V/V)溶解。此时,各峰值紫外吸收显著增强,峰宽减小、峰高增加,进样量显著加大。

试验应用稻瘟霉活性追踪分离方法,对产于中国南海的放线菌 *Streptomyces* sp. A01059 的代谢产物进行了分离研究,为海洋天然产物的研究积累了新的研究资料。

参考文献

- [1] 李越中,陈琦.海洋微生物资源及其产生生物活性代谢产物的研究.生物工程进展.2000.5:28-31.
- [2] Bugni TS, Ireland CM. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms [J]. *Nat Prod Rep*, 2004, 21:143-163.
- [3] 林白雪,黄志强,谢联辉.海洋细菌活性物质的研究进展.微生物学报.2005.4:657-660.
- [4] 刘全永,胡江春,薛德林,等.海洋微生物生物活性物质研究.应用生态学报.2002.7:901-905.
- [5] Hunfeld K P, Weigand J, Wichelhaus T A. In vitro activity of mezlocillin meropenem aztreonam, vancomycin, teicoplanin, ribostamycin and fusidic acid against *Borrelia burgdorferi*[J]. *Antimicrobial Agents*, 2001, 17:203-208.