

## 吸水链霉菌 BS-112 产生的抗真菌活性物质的分离纯化与结构鉴别

张楠<sup>1</sup>, 孙长坡<sup>2</sup>, 宋振<sup>1</sup>, 国辉<sup>1</sup>, 张本峰<sup>3</sup>, 仇念全<sup>3</sup>, 刘训理<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018

<sup>2</sup> 国家粮食局科学研究院, 北京 100037

<sup>3</sup> 山东农业大学林学院, 泰安 271018

**摘要:**【目的】分离纯化吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) BS-112 产生的抗真菌活性物质, 究明各活性组分的结构, 测定其对黄曲霉的抑制作用, 为该菌株及其产生的抗真菌活性物质的应用提供依据。【方法】通过大孔吸附树脂柱层析、硅胶柱层析及制备 HPLC 等方法, 对该菌株产生的抗真菌活性物质进行分离纯化; 利用质谱 (MS) 和核磁共振谱 (NMR) 解析各活性组分的结构; 采用微量液体稀释法测定各活性组分对黄曲霉的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MFC)。【结果】从 BS-112 菌株发酵液中分离获得 4 个抗真菌活性组分, 利用波谱技术确定其结构分别为 Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B。96 孔板法测得这 4 个化合物对黄曲霉的 MIC 分别为 3.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MFC 分别为 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。【结论】BS-112 菌株产生的抗真菌活性物质由 Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 4 个化合物组成, 它们对黄曲霉均具有良好的抑制作用。

**关键词:** 吸水链霉菌, 抗真菌活性物质, 分离纯化, 结构鉴别

**中图分类号:** Q939.9      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0224-09

多烯大环内酯抗生素是抗生素中的一个化学类群, 其结构由 25-37 个碳原子组成大内酯环, 在环的一部分有共轭多烯结构, 对应部位有羟基, 并由糖苷键连接一个或多个氨基糖。由于结构中共轭双键数目不同而被分为三、四、五、六、七烯, 每类都有特异紫外吸收峰值<sup>[1]</sup>。共轭四烯的大环内酯的紫外吸收光谱在 291  $\pm$  2 nm、302  $\pm$  2 nm、320  $\pm$  3 nm 有特征吸收峰, 都具有抗真菌作用, 约 50 余种。四烯大环内酯抗生素在医疗、食品和农业生产中已被广泛

应用, 如纳他霉素能够专性地抑制酵母菌和霉菌, 并具有良好的理化稳定性, 已成为 30 多个国家广泛使用的一种天然生物食品防腐剂和抗菌添加剂<sup>[2]</sup>; 梧宁霉素对林木腐烂病、溃疡病、黑斑病等有较好的防治效果, 并有明显促进伤组织愈合、弱苗根系发达、老化根系再生、提高作物抗病能力等特点, 且毒性低, 对人畜安全, 无公害, 不污染环境, 是一种新型的农用抗生素。在已报道的具有抗真菌活性的抗生素中, 大多数具有多烯大环内酯的结构, 而且多烯生

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划重点项目 (2009BADA0B50)

\* 通信作者。Tel: +86-538-8249131; E-mail: xlliu@sdau.edu.cn

作者简介: 张楠 (1980-), 男, 山东青岛人, 博士研究生, 研究方向为应用微生物。E-mail: nan25000@163.com

收稿日期: 2010-06-26; 修稿日期: 2010-12-02

素是一类目前临床常用药中最不容易产生抗药性的抗真菌抗生素,也是研发医用抗真菌药物的重要来源<sup>[3]</sup>。

本研究室从泰山林地土壤中分离获得一株高效拮抗菌 BS-112,经形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞壁组分及 16S rDNA 序列分析鉴定为吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) (其 16S rDNA 序列 GenBank 登录号:EU529841)<sup>[4]</sup>。该菌株能够产生两类抗菌物质,其中,抗细菌活性物质是一种小分子量的中性胞外多糖(分子量约为 2200 Da),对大肠杆菌、金黄葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌等病原细菌具有较广谱的抗性,尤其对家蚕黑胸败血病菌的抑制作用强,且具有抗氧化活性;而抗真菌活性物质为多烯大环内酯抗生素,对黄曲霉、赭曲霉、黑曲霉等粮食和饲料中常见的霉菌具有较强的抑制作用,且理化性质稳定,毒性低,具有作为粮食和饲料防霉剂的潜力。本试验对 BS-112 菌株产生的抗真菌活性物质进行了分离纯化,对其化学结构进行了鉴别,并测定了各活性组分对黄曲霉的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MFC)。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株:**吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)BS-112 由本实验室从泰山林地土壤中分离获得,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC No. 3504。指示菌:黄曲霉(*Aspergillus flavus*)CGMCC 3.2890 由国家粮食局科学研究院提供。

**1.1.2 培养基:**菌株活化培养基为土豆 200 g,葡萄糖 20.0 g,硫酸铵 1.0 g,硫酸镁 1.0 g,磷酸二氢钾 0.6 g,琼脂 16.0 g,水 1 L。菌株发酵培养基:玉米粉 5.0 g,葡萄糖 15.0 g,蛋白胨 25.0 g,硫酸镁 1.0 g,磷酸二氢钾 0.5 g,水 1 L。抗真菌活性物质效价生物测定培养基:同菌株活化培养基。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**大孔吸附树脂 X-5(天津南开和成科技有限公司),硅胶柱层析硅胶(200 - 300 目)(青岛基亿达硅胶试剂厂),其他常规试剂均为国产的色谱纯。Lab Tech LC600 高效液相色谱仪(北京莱伯泰科仪器有限公司),超高效液相色谱仪 UPLC[沃特世科技(上海)有限公司(Waters)],HP1100LC-MSD 质谱仪(安捷伦科技有限公司),

Varian INOVA 600 超导高分辨核磁共振谱仪(美国 Varian 公司),Heraeus 台式高速冷冻离心机(德国贺力氏公司)。

### 1.2 BS-112 菌株发酵液的制备

发酵培养基经 121℃ 湿热灭菌 20 min,将 BS-112 菌株种子液以 1% 的接种量接种到 50 mL/250 mL 三角瓶中,200 r/min,29℃ 振荡培养 84 h。发酵液 100℃ 灭菌 10 min,低速大容量多管离心机 3945 × g 离心 30 min,取上清液用于抗真菌活性物质的提取及纯化。

### 1.3 抗真菌活性物质效价的测定

抗真菌活性物质效价生物测定平板的制备。将生物测定培养基融化后,温度降至 50℃ - 55℃ 时,加入黄曲霉孢子悬液,使孢子的浓度为  $2 \times 10^4 - 4 \times 10^4$  CFU/mL,将培养基孢子悬液倒入培养皿,20 mL/培养皿,制备混菌平板。抗真菌活性物质效价的测定:采用牛津杯法<sup>[5]</sup>。将抗真菌活性物质溶液加入牛津杯中(250 (L/孔)),28℃ 培养 18 h,交叉法测量抑菌圈直径,根据抑菌圈的直径大小计算其效价。抗真菌活性物质效价计算公式: $y = 10^{(x+21.153)/15.577} \times n$  [y: 抗真菌活性物质效价(μg/mL);x: 抑菌圈直径(9.3 mm < x < 19.2 mm);n: 稀释倍数]。

### 1.4 抗真菌活性物质的提取

选用的大孔吸附树脂为 X-5 树脂,40 cm × 2.6 cm 玻璃层析柱。树脂:发酵液(m:V) = 1:20,120 r/min 振荡吸附 2.5 h 后,将树脂装柱,去离子水洗脱 3 BV 后,用 75% 乙醇水溶液对抗真菌活性物质进行解吸,流速为 0.5 mL/min,每 20 min 收集一管,每管 10.0 mL。每管取 1.0 mL 的解吸液经真空旋转蒸发(40℃)除去乙醇,蒸馏水定容至原体积,以黄曲霉为指示菌进行活性测定并计算效价,合并有活性的解吸液,减压浓缩,冷冻干燥得到活性物质粗提物。

### 1.5 抗真菌活性物质的硅胶柱层析

选用 60 cm × 2.6 cm 玻璃层析柱,200 - 300 目硅胶。用 5 mL 甲醇溶解抗真菌活性物质粗提物 2 g,过滤除去少量的不溶物,将滤液上硅胶柱进行动态吸附,用甲醇:氯仿 = 3:2(V:V)作为洗脱剂进行洗脱,流速为 1.0 mL/min,每 15 min 收集一管,每管 15.0 mL。每管取 1.0 mL 的洗脱液经真空旋转蒸发(40℃)除去有机溶剂,蒸馏水定容至原体积,

以黄曲霉为指示菌进行活性测定并计算效价,合并有活性的洗脱液,减压浓缩,冷冻干燥。

### 1.6 抗真菌活性物质的 HPLC

将硅胶柱层析后的冷冻干燥物用甲醇溶解,用制备型 HPLC 进一步分离、制备。高效液相色谱的制备条件为:色谱柱为 Venusil XBP C18 (20 mm × 250 mm, 10 μm); 流动相为甲醇:水 = 61:39 (V:V); 流速 5 mL/min; 柱温为 30℃; 检测波长为 305 nm; 手动进样,每次进样量为 6 mL (含抗真菌活性物质冷冻干燥物 30 mg)。分别收集图谱中各吸收峰所对应的洗脱液并进行活性检测,活性洗脱液经减压旋转蒸发(40℃)去除甲醇,冷冻干燥。取少量冷冻干燥物溶于 61% 甲醇水溶液,利用超高效液相色谱(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC),以甲醇和水为流动相进行梯度洗脱,检测各活性组分的纯度。色谱条件为:色谱柱为 BEH C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 柱温为 30℃; 检测波长为 305 nm; 自动进样,每次进样量为 0.2 μL (含各活性组分冷冻干燥物 0.05 μg); 以 0.2 mL/min 的流速洗脱 15 min。

### 1.7 抗真菌活性物质的结构鉴别

质谱分析采用 HP1100LC-MSD 质谱仪,以电喷雾法(Electrospray Ionization, ESI)测定。检出模式:正、负离子检测;质谱条件:雾化压力 30 psi, 碎裂电压 150 V, 干燥器温度 350℃, 干燥气流量 10 L/min, 扫描范围( $m/z$ ) 100 - 1000。核磁共振分析:抗真菌活性物质用氘代二甲基亚砜(DMSO)溶解,四甲基硅烷(TMS)为内标,在 Varian INOVA 600 超导高分辨核磁共振谱仪上做氢谱( $^1\text{H-NMR}$ )、碳谱( $^{13}\text{C-NMR}$ )、梯度场同核位移相关谱(gCOSY)、梯度场异核多量子相关谱(gHMBC)、梯度场异核多键相关谱(gHMBC)等的测定,结合谱图分析推测结构。

### 1.8 抗真菌活性物质对黄曲霉的最小抑/杀菌浓度的测定

取无菌 96 微孔板,第 1 孔加入 150 μL 的 RPMI-1640 培养液(不含抗真菌活性物质)作为阴性对照,第 2 - 11 孔分别加入 75 μL RPMI-1640 培养液 2 倍稀释的抗真菌活性物质溶液,使各孔的最终药物质量浓度为 50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20、0.10 μg/mL。第 2 - 12 孔分别加

入  $1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$  CFU/mL 黄曲霉孢子悬液 75 μL,第 12 孔再加入 75 μL RPMI-1640 培养液作为阳性对照。最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MFC)的测定参照美国临床标准委员会(NCCLS)的《产孢丝状真菌的液基稀释抗真菌药敏试验参考方案》进行。

## 2 结果

### 2.1 X-5 树脂对抗真菌活性物质的提取结果

BS-112 菌株的发酵液经大孔吸附树脂 X-5 吸附层析后,测定解吸液的效价,绘出解吸曲线见图 1。含有抗真菌活性物质的解吸液集中在第 2 - 12 管(100 mL,约 3 BV),经计算回收率为 85.27%,合并活性部分,浓缩后冷冻干燥得到活性物质的粗提物。X-5 大孔吸附树脂可以有选择性的吸附 BS-112 菌株产生的抗真菌活性物质,而该菌株产生的抗细菌活性物质不被吸附,但解吸液中仍含有较多的杂质。

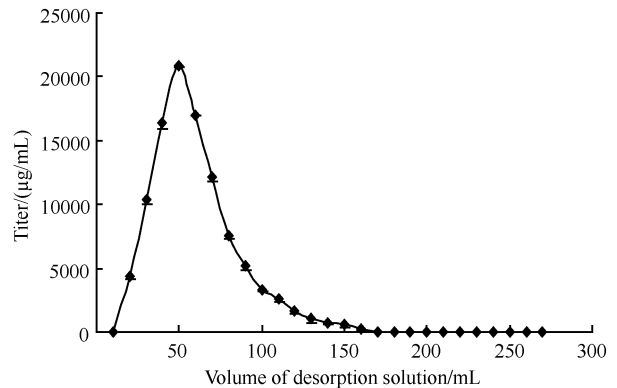


图 1 X-5 树脂的动态解吸曲线

Fig. 1 Dynamic desorption curve of antifungal active substances on X-5 resin.

### 2.2 抗真菌活性物质的硅胶柱层析结果

将抗真菌活性物质的粗提物经硅胶柱层析后,测定洗脱液的效价,绘出洗脱曲线见图 2。洗脱液中的活性组分集中在第 25 - 35 管(从 1.4 BV 至 2.1 BV 之间的洗脱液),经计算回收率为 83.62%,合并活性洗脱液,浓缩后冷冻干燥得到淡褐色粉末状固体。

### 2.3 抗真菌活性物质的 HPLC 结果

将硅胶柱层析后的样品用甲醇溶解,经制备型 HPLC 分离纯化,各组分的 HPLC 图谱如图 3 所示。

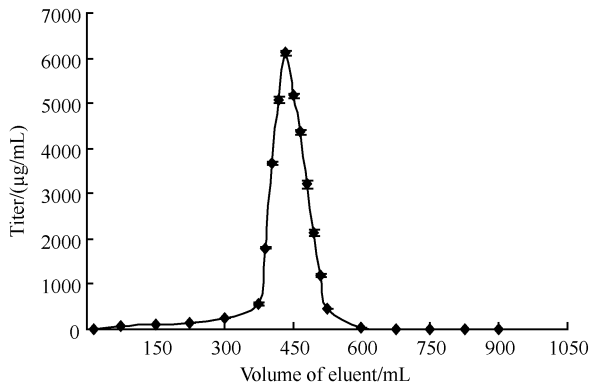


图2 硅胶柱层析的动态洗脱曲线

Fig.2 Dynamic elution curve of antifungal active substances on silica gel.

抗真菌活性物质各组分分离情况比较理想,在保留时间 9.61 min、17.41 min、21.40 min 和 34.88 min 处出现 4 个显著吸收峰(分别记为 A、B、C、D),而在 11.23 min、12.19 min 和 25.39 min 处还存在 3 个微弱吸收峰。分别将各个吸收峰收集并检测其对黄曲霉的抑菌活性,结果发现 A、B、C、D 4 个显著吸收峰均具有明显的抑菌活性,其相对峰面积分别为 5.54%、11.39%、37.78% 和 41.69%,收集 4 个活性峰的洗脱液,真空浓缩干燥后得到粉末状纯化样品。4 个活性组分经分析型 UPLC 纯度验证,结果 4 个活性组分的洗脱曲线均为单一峰,表明其纯度已达到化学结构测定的要求。

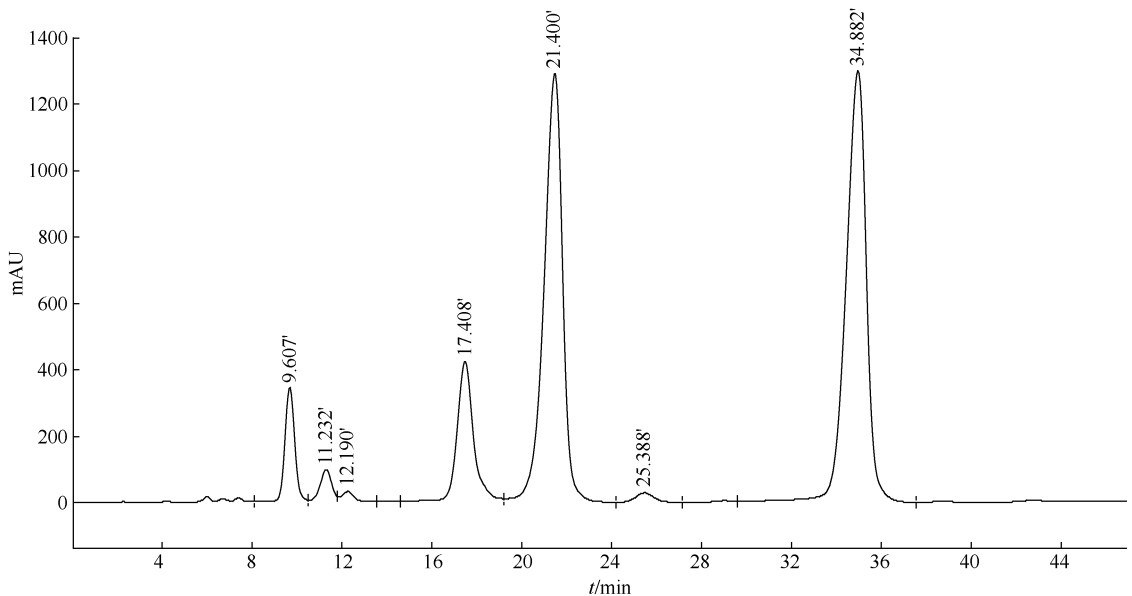


图3 吸水链霉菌 BS-112 产生的抗真菌活性物质的 HPLC 分离图谱

Fig.3 HPLC spectrum of antifungal active substances produced by *Streptomyces hygroscopicus* BS-112.

## 2.4 抗真菌活性组分的结构鉴别

BS-112 菌株产生的 4 个抗真菌活性组分的部分物理性状和结构分析如下。

**2.4.1 活性组分 A:** 淡褐色无定形粉末(甲醇),易溶于甲醇、二甲基亚砜、吡啶和乙醇水溶液,微溶于丙酮、乙醚等有机溶剂。ESI-MS 在  $m/z$ : 696.78、720.78 处显示准分子离子峰  $[M - H]^-$ 、 $[M + Na]^+$ ,由此得出活性组分 A 的分子量为 697.78,结合  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$  数据,确定分子式为  $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{NO}_{14}$ 。对其  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$  谱中各相关信息进行分析归属,结果列于表 1。根据上述分析和与文献报道数据对比<sup>[6]</sup>,推断活性组分 A 为 Tetrin B,其

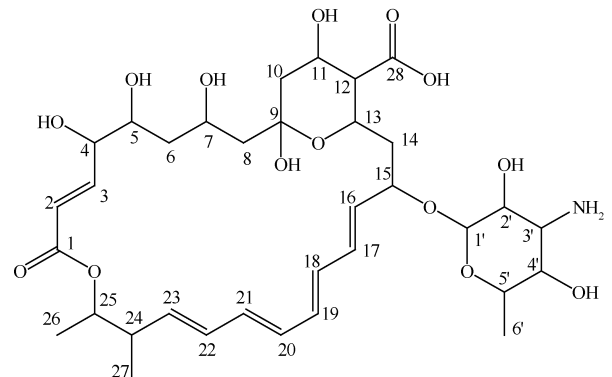


图4 活性组分 A 的化学结构式

Fig.4 Chemical structure of active component A.

表 1 活性组分 A 和 B 的<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 谱数据Table 1 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR spectra data of active components A and B (in DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz)

Position	A		B	
	$\delta_{\text{H}}$ (J/in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , mult	$\delta_{\text{H}}$ (J/in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , mult
1		165.5, qC		165.4, qC
2	5.92, s	121.8, CH	5.95, s	121.8, CH
3	6.70, d (6.5)	149.9, CH	6.70, d (6.6)	149.8, CH
4	4.01, s	73.6, CH	4.00, s	73.6, CH
5	3.66, m	73.2, CH	3.67, br	73.6, CH
6a			1.40, m	
6b	1.39, br	40.6, CH <sub>2</sub>	1.59, br	40.6, CH <sub>2</sub>
7	3.85, s	68.2, CH	3.85, s	68.2, CH
8a	1.04, m	45.1, CH <sub>2</sub>	1.13, m	45.2, CH <sub>2</sub>
8b	1.85, br		1.85, br	
9		97.7, qC		97.8, qC
10a	1.38, m	37.0, CH <sub>2</sub>	1.38, m	36.8, CH <sub>2</sub>
10b	2.24, br		2.24, br	
11	4.09, m	66.3, CH	4.05, m	66.3, CH
12	1.78, br	59.9, CH	1.80, m	60.0, CH
13	4.26, br	68.6, CH	4.27, br	68.6, CH
14a	1.50, br		1.50, br	
14b	1.59, br	47.2, CH <sub>2</sub>	1.71, br	47.3, CH <sub>2</sub>
15	4.36, br	75.2, CH	4.37, br	75.2, CH
16	6.09, m	128.9, CH	6.91, m	128.9, CH
17	6.01, m	137.0, CH	5.97, m	136.9, CH
18	6.33, br	134.2, CH	6.32, br	134.2, CH
19	6.29, br	133.8, CH	6.28, br	133.6, CH
20	6.24, br	131.8, CH	6.33, br	131.7, CH
21	6.31, br	131.6, CH	6.27, br	131.9, CH
22	5.95, s	134.9, CH	5.94, s	136.4, CH
23	5.53, br	132.8, CH	5.50, br	131.7, CH
24	2.52, m	39.9, CH	2.30, br	48.2, CH
25	4.86, m	73.1, CH	4.91, br	72.3, CH
26	1.10, d (5.6)	14.3, CH <sub>3</sub>	1.08, d (5.6)	14.5, CH <sub>3</sub>
27a			1.31, br	
27b	1.00, s	16.4, CH <sub>3</sub>	1.39, m	24.1, CH <sub>2</sub>
28		178.4, qC	0.85, s	13.0, CH <sub>3</sub>
29				178.2, qC
1'	4.53, s	96.2, CH	4.52, s	96.1, CH
2'	4.20, br	66.0, CH	4.20, br	65.9, CH
3'	2.97, br	56.6, CH	3.00, br	56.6, CH
4'	3.24, m	70.1, CH	3.26, m	68.9, CH
5'	3.40, m	73.1, CH	3.30, m	73.2, CH
6'	1.18, d (12.1)	18.6, CH <sub>3</sub>	1.18, d (12.0)	18.6, CH <sub>3</sub>

结构如图 4 所示。

**2.4.2 活性组分 B:** 淡黄色微晶粉末(甲醇), 易溶于甲醇、二甲基亚砜和吡啶, 微溶于丙酮、氯仿和乙醚等有机溶剂。ESI-MS 在  $m/z$ : 710.81、734.81 处显示准分子离子峰  $[M - H]^-$ 、 $[M + Na]^+$ , 由此得

出活性组分 B 的分子量为 711.81, 结合<sup>1</sup>H-NMR 和<sup>13</sup>C-NMR 数据, 确定分子式为 C<sub>35</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>14</sub>。对其<sup>1</sup>H-NMR 和<sup>13</sup>C-NMR 谱中各相关信息进行分析归属, 结果列于表 1。根据上述分析和与文献报道数据对比<sup>[7]</sup>, 推断活性组分 B 为 Tetramycin B, 其结构如图 5 所示。

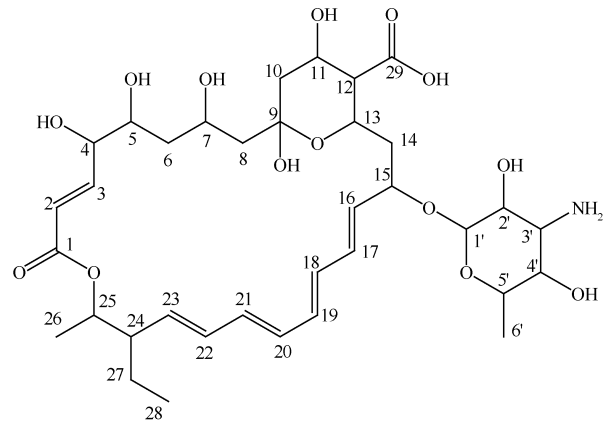


图 5 活性组分 B 的化学结构式

Fig. 5 Chemical structure of active component B.

**2.4.3 活性组分 C:** 无色针状粉末(甲醇), 易溶于甲醇、甘油、二甲基亚砜和冰乙酸, 微溶于丙酮、乙醚和水。ESI-MS 在  $m/z$ : 680.78、704.78 处显示准分子离子峰  $[M - H]^-$ 、 $[M + Na]^+$ , 由此得出活性组分 C 的分子量为 681.78, 结合<sup>1</sup>H-NMR 和<sup>13</sup>C-NMR 数据, 确定分子式为 C<sub>34</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>13</sub>。对其<sup>1</sup>H-NMR 和<sup>13</sup>C-NMR 谱中各相关信息进行分析归属, 结果列于表 2。根据上述分析和与文献报道数据对比<sup>[8]</sup>, 推断活性组分 C 为 Tetrin A, 其结构如图 6 所示。

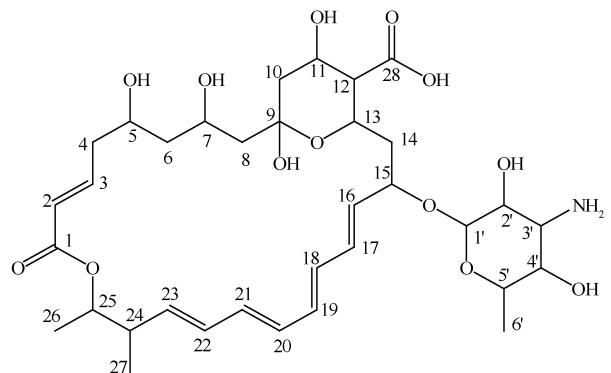


图 6 活性组分 C 的化学结构式

Fig. 6 Chemical structure of active component C.

**2.4.4 活性组分 D:**淡黄色粉末(甲醇),易溶于甲醇、吡啶、二甲基亚砷和甘油,微溶于氯仿、乙醚和水。ESI-MS 在  $m/z$ : 694. 81、718. 81 处显示准分子离子峰  $[M - H]^-$ 、 $[M + Na]^+$ , 由此得出活性组分 D 的分子量为 695. 81, 结合  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$  数据, 确定分子式为  $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{NO}_{13}$ 。对其  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$  谱中各相关信息进行分析归属, 结果列于表 2。根据上述分析和与文献报道数据对比<sup>[7]</sup>, 推断活性组分 D 为 Tetramycin A, 其结构如图 7 所示。

表 2 活性组分 C 和 D 的  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  谱数据

Table 2  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra data of active components C and D (in  $\text{DMSO-}d_6$ , 600 MHz)

Position	C		D	
	$\delta_{\text{H}}$ (Jin Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , mult	$\delta_{\text{H}}$ (Jin Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , mult
1		165. 2, qC		165. 1, qC
2	5. 77, d (7. 6)	124. 4, CH	5. 76, d (7. 5)	124. 4, CH
3	6. 65, m	146. 9, CH	6. 64, m	146. 8, CH
4a	2. 21, m		2. 21, br	
4b	2. 26, br	41. 9 CH <sub>2</sub>	2. 28, br	41. 9, CH <sub>2</sub>
5	3. 71, m	71. 1, CH	3. 71, m	71. 3, CH
6a			1. 31, br	
6b	1. 46, br	44. 4, CH <sub>2</sub>	1. 43, br	44. 4, CH <sub>2</sub>
7	3. 83, m	68. 2, CH	3. 85, m	68. 1, CH
8a	1. 05, m		1. 13, br	
8b	1. 85, br	45. 1, CH <sub>2</sub>	1. 85, br	45. 2, CH <sub>2</sub>
9				97. 8, qC
10a	1. 46, m		1. 38, br	
10b	2. 23, m	36. 6, CH <sub>2</sub>	2. 31, br	36. 7, CH <sub>2</sub>
11	4. 02, br	66. 3, CH	4. 03, br	66. 3, CH
12	1. 79, m	60. 3, CH	1. 80, m	60. 1, CH
13	4. 28, br	69. 2, CH	4. 29, br	69. 3, CH
14a	1. 48, m		1. 84, m	
14b	1. 61, br	47. 3, CH <sub>2</sub>	1. 71, br	47. 3, CH <sub>2</sub>
15	4. 37, br	75. 0, CH	4. 37, br	75. 2, CH
16	6. 09, br	129. 0, CH	6. 11, m	129. 1, CH
17	6. 03, m	136. 9, CH	6. 09, m	136. 8, CH
18	6. 27, s	134. 0, CH	6. 28, s	134. 0, CH
19	6. 34, br	133. 8, CH	6. 36, m	133. 6, CH
20	6. 33, s	132. 1, CH	6. 28, s	131. 8, CH
21	6. 25, br	131. 8, CH	6. 34, br	132. 1, CH
22	5. 96, s	135. 1, CH	6. 00, s	136. 6, CH
23	5. 53, br	132. 9, CH	5. 50, br	131. 8, CH
24	2. 55, s	40. 3, CH	2. 28, br	48. 3, CH
25	4. 84, br	73. 0, CH	4. 90, br	72. 2, CH
26	1. 09, d (5. 5)	14. 3, CH <sub>3</sub>	1. 07, d (5. 6)	14. 4, CH <sub>3</sub>
27a			1. 31, br	
27b	0. 99, s	16. 4, CH <sub>3</sub>	1. 39, br	24. 1, CH <sub>2</sub>
28		178. 6, qC	0. 85, s	13. 0, CH <sub>3</sub>
29				178. 4, qC
1'	4. 54, s	96. 0, CH	4. 53, s	96. 1, CH
2'	4. 19, br	66. 0, CH	4. 21, br	66. 0, CH
3'	2. 96, br	56. 8, CH	3. 00, br	56. 7, CH
4'	3. 24, m	70. 1, CH	3. 26, m	69. 9, CH
5'	3. 31, m	73. 1, CH	3. 29, m	73. 2, CH
6'	1. 18, d (12. 0)	18. 6, CH <sub>3</sub>	1. 18, d (12. 0)	18. 6, CH <sub>3</sub>

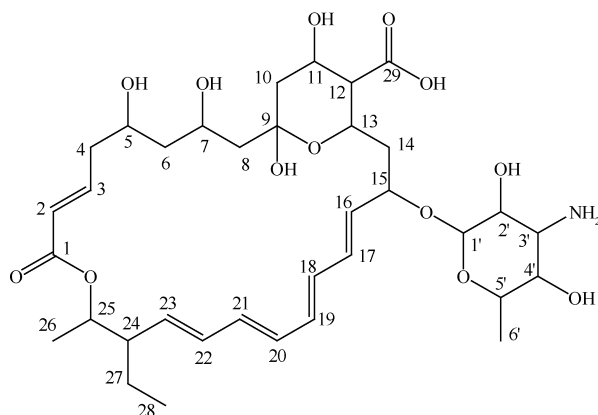


图 7 活性组分 D 的化学结构式

Fig. 7 Chemical structure of active component D.

## 2.5 各活性组分对黄曲霉的 MIC 与 MFC

测定结果显示, 4 个活性组分在较低的浓度下就能够抑制和杀死黄曲霉。Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 对黄曲霉的 MIC 分别为 3. 13  $\mu\text{g/mL}$ 、12. 56  $\mu\text{g/mL}$ 、1. 56  $\mu\text{g/mL}$  和 6. 25  $\mu\text{g/mL}$ 。取肉眼清晰的培养基液体, 即抑/杀菌级别为 0 - 1 的微孔培养基, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 平板涂布 PDA 培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后, 未发现黄曲霉菌落的生长, 因此确定 Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 对黄曲霉的 MFC 分别为 6. 25  $\mu\text{g/mL}$ 、25. 0  $\mu\text{g/mL}$ 、3. 13  $\mu\text{g/mL}$  和 12. 56  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 3 讨论

吸水链霉菌 BS-112 发酵液经大孔吸附树脂 X-5 吸附层析、硅胶柱层析和 HPLC 分离获得 4 个抗真菌活性组分。它们的化学结构与 Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 相同。96 孔板法测得 Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 对黄曲霉的 MIC 分别为 3. 13  $\mu\text{g/mL}$ 、12. 56  $\mu\text{g/mL}$ 、1. 56  $\mu\text{g/mL}$  和 6. 25  $\mu\text{g/mL}$ , MFC 分别为 6. 25  $\mu\text{g/mL}$ 、25. 0  $\mu\text{g/mL}$ 、3. 13  $\mu\text{g/mL}$  和 12. 56  $\mu\text{g/mL}$ 。

X-5 大孔吸附树脂是从多种树脂中筛选出来的对 BS-112 菌株产生的抗真菌活性物质具有良好提取效果的树脂, 其吸附与解吸性能良好, 利于该菌株产生的抗真菌活性物质的工业化提取。硅胶柱层析能够除去抗真菌活性物质中大量的杂质和色素, 但由于 BS-112 菌株产生的 4 个抗真菌活性组分的结构类似, 所以硅胶柱层析不能将 4 个活性组分分离。而通过 HPLC 由于选择了合适的色谱柱和筛选

了最佳的流动相,因此可以将4个活性组分很好的分离。

由于BS-112菌株产生的抗真菌活性物质在甲醇、乙醇中的溶解性较好,这也是大多数大环内酯类抗生素的共性,因此,在整个分离纯化过程中使用的溶剂体系基本是以甲醇、乙醇为主,采用的分离条件也是经过多次试验筛选的最佳条件,从试验结果看,分离效果比较理想。

Tetrin 是 Gottlieb 和 Pote<sup>[9]</sup> 从链霉菌 (*Streptomyces* sp.) 代谢产物中发现的四烯大环内酯抗生素,经 Rinehart 等<sup>[10]</sup> 分离纯化得到 Tetrins A 和 B。Van Etten 和 Gottlieb<sup>[11]</sup> 对 Tetrins A 和 B 的抗真菌活性进行了测定,发现它们对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solan*)、番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*)、油茶炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*)、苜蓿黄萎病 (*Verticillium albo-atrum*) 等植物病原真菌具有较强的抑制作用。Tetramycin 由 Dornberger 等<sup>[12]</sup> 最先报道,是由诺尔斯链霉菌 (*Streptomyces noursei*) 产生的四烯大环内酯抗生素。Radics 等<sup>[13]</sup> 通过高场核磁共振光谱对 Tetramycins A 和 B 的结构进行了解析。Tetramycins A 和 B 对酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae* JH)、苜蓿根腐病菌 (*Fusarium solani* JP)、点青霉 (*Penicillium notatum* JP) 等具有较强的抑制作用,最小抑菌浓度均小于 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,是一种广谱的、高效的抗真菌剂<sup>[13]</sup>。Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 对哺乳动物毒性低,无副作用<sup>[14-15]</sup>。即使高浓度的 Tetrins A 和 B 对哺乳动物的毒性也比大多数多烯抗生素(如制霉菌素、纳他霉素等)低浓度时的毒性低<sup>[11]</sup>。

前人对 Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 的抗真菌活性研究主要集中在植物病原真菌上,但 Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 由于化学结构的原因,它们对紫外线较为敏感,不宜与阳光接触,因此,限制了它们在大田中的应用。本研究发现 Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 对粮食和饲料中常见的霉菌尤其对黄曲霉具有较好的抑制作用,在较低的浓度下即可达到杀菌效果,它们对黄曲霉的

MIC 与纳他霉素的基本相同<sup>[16]</sup>,比 Zhang 等<sup>[17]</sup> 从枯草芽胞杆菌中提取的 Bacillomycin D 及 Eduardo 等<sup>[18]</sup> 报道的龙舌兰提取物对黄曲霉的 MIC 要低。Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 是一类高效、安全的抗真菌剂,且具有低剂量、高效率、抗菌作用时间长等特点。虽然 Tetrins A 和 B、Tetramycins A 和 B 不能在农业生产中推广使用,但具有作为粮食和饲料防霉剂的潜力。

由于黄曲霉毒素污染所带来的巨大经济损失和健康危害,人们一直在寻求对其进行有效防治的策略和技术,并提出了一些初步措施,包括良好的田间管理、虫害控制及物理化学去毒方法等<sup>[19-20]</sup>,其中生物防治是行之有效的方法之一。生物防治黄曲霉毒素污染是一种环保型的方法,具有较广泛的应用前景。采用生物化学的方法,提取分离出抑制黄曲霉生长的有效成分,是提高目前生防效率的手段之一<sup>[21]</sup>。

吸水链霉菌 BS-112 是一株抗菌谱广、发酵性状优异、遗传稳定的拮抗菌,产生的抗真菌活性物质对多种粮食和饲料中常见的霉菌具有强烈的拮抗作用且毒性低。对该菌株进行进一步的菌种选育、发酵及制剂加工工艺优化,有望开发出高效、低毒、不污染环境的粮食和饲料防霉剂。

**致谢** 感谢山东省分析测试中心林云良高级实验师、王晓研究员为化合物的化学结构解析所做的工作。

## 参考文献

- [1] 李宁,李文,沙沂,何建勇,姜其华,李铤. 多烯大环内酯抗生素——鲁丝霉素的结构解析. 波谱学杂志 (*Chinese Journal of Magnetic Resonance*), 2008, 25(4): 514-521.
- [2] Liang JL, Lin JP, Xu ZN, Su W, Chen PL. Space-flight mutation of *Streptomyces gilvosporeus* for enhancing natamycin production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2007, 15(5): 720-724.

- [ 3 ] Vilar V, Botelho C, Boaventura R. Equilibrium and kinetic modeling of Cd biosorption by algae *Gelidium* and agar extraction algal waste. *Water Research*, 2006, 40(2): 291-302.
- [ 4 ] 张楠, 刘训理, 周启升, 曹宁宁, 张莎莎, 国辉. 拮抗放线菌 BS-112 的鉴定及抗菌物质粗提物对家蚕主要病原菌的抑制作用. *蚕业科学 (Science of Sericulture)*, 2009, 35(4): 796-802.
- [ 5 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 84.
- [ 6 ] Rinehart KJ, Tucker WP, Pandey RC. Polyene antibiotics. III. The structure of tetrin B. *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 3747-3751.
- [ 7 ] Geonseek R, Choi WC, Hwang SJ, Yeo WH, Lee CS, Kim SK. Tetrin C, a new glycosylated polyene macrolide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. GK9244. *Journal of Natural Products*, 1999, 62: 917-919.
- [ 8 ] Pandey RC, German VF, Nishikawa Y, Rinehart KL. Polyene antibiotics. II. The structure of Tetrin A, *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93(15): 3738-3747.
- [ 9 ] Gottlieb D, Pote HL. Tetrin, an antifungal antibiotic. *Phytopathology*, 1960, 50: 817.
- [ 10 ] Rinehart KL, German VF, Tucker WP, Gottlieb D. Isolierung und eigenschaften der Tetrine A und B. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1963, 688(1): 77-86.
- [ 11 ] Van Etten JL, Gottlieb D. Studies on the mode of action of Tetrin A, *Journal of General Microbiology*, 1967, 46: 377-387.
- [ 12 ] Dornberger K, Thruma H, Radics L. The structure of tetramycin, a new polyene macrolide antibiotic, *Tetrahedron*, 1979, 35(15): 1852-1856.
- [ 13 ] Radics L, Incze M, Dornberger K, Thruma H. Tetramycin B, a new polyene macrolide antibiotic; The structure of tetramycins A and B as studied by high-field NMR spectroscopy, *Tetrahedron*, 1982, 38(1): 183-189.
- [ 14 ] Hamilton-Miller JM. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *American Society for Microbiology*, 1973, 37(2): 166-196.
- [ 15 ] Dornberger K, Fügner R, Bradler G, Thrum H. Tetramycin, a new polyene antibiotic. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1971, 24(3): 172-127.
- [ 16 ] 孙启华, 崔树玉, 李爱萍, 董非, 陈璐. 纳他霉素防腐抑菌效果的研究. *中国消毒学杂志 (Chinese Journal of Disinfection)*, 2005, 22(4): 435-436.
- [ 17 ] Zhang T, Shi ZQ, Hu LB, Cheng LG, Wang F. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24: 783-788.
- [ 18 ] Eduardo S, Norma H, Santos G. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 98: 271-279.
- [ 19 ] Hassan Y, Tayyeb M, Giti A, Chergahali AM. Effect of roasting on degradation of Aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43: 1135-1139.
- [ 20 ] Fanelli C, Taddei F, Trionfetti NP, Jestoi M, Ricelli A, Visconti A, Fabbri, AA. Use of resveratrol and BHA to control growth and mycotoxin production in wheat and maize seeds. *Aspects of Applied Biology*, 2003, 68: 63-71.
- [ 21 ] 刘付香, 李玲, 梁炫强. 生物防治黄曲霉毒素污染研究进展. *中国生物防治 (Chinese Journal of Biological Control)*, 2010, 26(1): 96-101.



# Isolation, purification and characterization of antifungal substances from *Streptomyces hygrosopicus* BS-112

Nan Zhang<sup>1</sup>, Changpo Sun<sup>2</sup>, Zhen Song<sup>1</sup>, Hui Guo<sup>1</sup>, Benfeng Zhang<sup>3</sup>, Nianquan Qiu<sup>3</sup>, Xunli Liu<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

<sup>2</sup> Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China

<sup>3</sup> College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

**Abstract:** [ **Objective** ] In order to provide the basis for application of *Streptomyces hygrosopicus* BS-112 and its antifungal active substances, we isolated and purified the active substances produced by strain BS-112, and then we examined their chemical structures and determined their inhibitory effects on *Aspergillus flavus*. [ **Methods** ] We extracted and purified the antifungal active substances from strain BS-112 using column chromatography with X-5 macroporous resin and 200 - 300 mesh silica gel respectively, and then purified them by preparative HPLC with Venusil XBP C18 column. The chemical structures of active components were identified by means of spectroscopic analysis, including mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Their minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration against *Aspergillus flavus* were determined by the standard broth microdilution method. [ **Results** ] We obtained four active components from the fermentation broth of strain BS-112 and their chemical structures were the same as Tetrins A and B, Tetramycins A and B. Assay using 96-well plate illustrated that the MIC of Tetrin A, Tetrin B, Tetramycin A and Tetramycin B against *Aspergillus flavus* were 3.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively, and their MFC were 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 12.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. [ **Conclusion** ] The antifungal active substances of strain BS-112 were composed of four compounds, Tetrins A and B, Tetramycins A and B. The four active compounds showed strong inhibitory against *Aspergillus flavus*.

**Keywords:** *Streptomyces hygrosopicus*, antifungal active substances, isolation and purification, structure identification

(本文责编:王晋芳)

Supported by the 10<sup>th</sup> Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2009BADA0B50)

\* Corresponding author. Tel: +86-538-8249131; E-mail: xliu@sdau.edu.cn

Received: 26 June 2010/ Revised: 2 December 2010