

胡永红,曹 峥,杨文革,等.多效霉素研究进展[J].江苏农业科学,2013,41(12):1-4.

多效霉素研究进展

胡永红,曹 峥,杨文革,李佼佼,开玉美,梁萌萌

(南京工业大学,江苏南京 211816)

摘要:多效霉素是一种抗真菌核苷类抗生素,能够抑制真菌细胞壁几丁质的合成,并且对农作物、鱼和哺乳动物安全。目前生产的多效霉素大部分都是可可链霉菌阿苏变种发酵产生的。就多效霉素的作用机理、生物合成、化学合成和应用及市场等方面进行了研究,并对其发展进行了展望。

关键词:多效霉素;生物农药;作用机理;生物合成

中图分类号: S482.2⁺8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0001-04

多效霉素(Polyoxins)也被称为多抗菌素、多抗霉素、多氧霉素,是一种肽嘧啶核苷酸类抗生素,它是由可可链霉菌阿苏变种所产生的次级代谢产物^[1-2]。Isono 等发现多效霉素共有 A 至 N 这 14 种成分组成,自从 1967 年以来,多效霉素作为农用杀菌剂,广泛被用于治疗水稻纹枯病、番茄灰霉病和梨黑斑病等植物真菌病害。经过研究发现,多效霉素对于真菌和昆虫细胞壁几丁质的合成有很好的抑制作用^[3],鉴于农作物和哺乳动物等体内不存在几丁质,所以多效霉素对脊椎动物和哺乳动物具有非靶标生物安全性,同时还对引起黏膜和全身性感染的病原细胞白色念珠菌有很好的抑制作用^[4]。我国农药市场中多效霉素制剂剂型多种多样,其中应用最广泛的有 1.5%、2%、3%、10% 的可湿性粉剂,1%、3% 的水剂及 32% 的原药等^[5]。

1 多效霉素

1.1 多效霉素 A 和 B 的理化性质

在由可可链霉菌阿苏变种发酵所产生的产物中,多效霉素 A 和 B 作为混合物中 2 种主要成分,它们易溶于水,而不溶于甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂,其分子式分别为 $C_{23}H_{32}N_6O_{14}$ 、 $C_{17}H_{25}N_5O_{13}$,其在 pH 值为 1~8 的范围内稳定;它们是两性化合物,多效霉素 A 的 pK_a 值为 3.0、7.3、9.6,多效霉素 B 的 pK_a 值为 3.0、6.9、9.4;多效霉素 A 的比旋度为 $[\alpha]_D^{32^\circ} = -32^\circ (c=1, \text{水})$,多效霉素 B 的比旋度为 $[\alpha]_D^{32^\circ} = 34^\circ (c=1, \text{水})$ ^[1]。Isono 等利用活性炭、Dowex 50W 阳离子交换柱、纤维素色谱法、区带电泳技术分离纯化得到 A、B 组分^[6]。

1.2 多效霉素 A 简介

多效霉素 A 以无色针状从乙醇的水溶液中析出,它没有固定的熔点,但在超过 180℃ 的条件下逐渐分解。将多效霉素 A 加入氢氧化钠水溶液中,能够水解得到 4 个组分,通过

紫外、红外光谱分析,发现它们分别为:5'-羟甲基尿嘧啶($C_5H_6N_2O_3$),作为多效霉素 A 的发色基团;多效霉素 C($C_{11}H_{15}N_3O_8$),是从多效霉素混合物中的另一种多效霉素;另外 2 种多羟基氨基酸 polyoximic acid 和 polyoxamic acid,化学家们常把它们用作有机生物碱氮杂糖合成的前体^[7]。

1.3 多效霉素 B 简介

Muller 等通过多效霉素 A 对几丁质合成酶抑制作用的探索研究,发现多效霉素 A 对真菌细胞壁不具有抑制作用^[8]。但经研究发现,多效霉素 B 能够有效抑制几丁质的合成。经分离纯化得到的多效霉素 B 为无色无定形粉末,它也没有固定的熔点,会在温度 160℃ 以上逐渐分解。科学家们在之后的研究工作中,分别建立了高效液相法和生物效价测定法。于福利等采用 C_{18} 反相色谱柱和二极管阵列检测器,以甲醇-水(10:90)为流动相,柱温 30℃,流速 0.6 mL/min,检测波长 262 nm,以外标法检测多效霉素 B^[9]。鉴于高效液相检测法操作繁琐、费用较贵等缺点,钟建江等采用牛津杯抑菌法,测定可可链霉菌发酵液中多效霉素 B 的生物效价,通过与 HPLC 结果相比较,证明了该方法的可行性,建立了一套快速、简单、费用低廉的多效霉素 B 生物检测方法^[10-11]。

2 多效霉素作用机理

尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc,图 1)是合成几丁质的重要底物,在几丁质合成酶(chitin synthase, CS)的作用下生物合成几丁质^[12],几丁质作为丝状真菌细胞壁的必要组成部分,并且在昆虫体内作为一种重要的高聚物,是外骨骼和肠围食膜的重要组成成分^[13-14]。多效霉素作用于病原真菌细胞壁骨架成分——几丁质,有着“抗真菌中的青霉素”的美称。于 1969 年 Endo 等报道了多效霉素混合物中的多效霉素 D,可以削弱由 UDP-GlcNAc 到几丁质这步反应,通过酶的动力学研究,证明了多效霉素 D 是几丁质合成酶的竞争性抑制剂^[15]。经研究发现,多效霉素 A 至 N(图 2)这 14 种混合物中,除了多效霉素 C、I,其他多效霉素对敏感细胞几丁质的合成都有一定的抑制作用^[16-19]。Ohta 等经研究发现多效霉素能够引起 UDP-N-乙酰葡萄糖胺的过量积累,然后抑制几丁质在植物病原真菌 *Cochliobolus miyabeanus* 中的合成,达到干扰其细胞壁形成的作用^[20]。Misato 等研究了将 ^{14}C -GlcNH₂ 掺入 UDP-GlcNAc 和几丁质中,结果显

收稿日期:2013-04-21

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)3060];2011 年江苏省创新资金(编号:CXLX12_0452)。

作者简介:胡永红(1968—),女,江苏南通人,博士,教授,主要研究方向为生物农药、生物发酵。Tel:(025)58139928;E-mail:yonghong-hu11@126.com。

示:在对多效霉素敏感性较低的菌株中,其几丁质的合成也受到抑制,但 $\text{UDP} - ^{14}\text{C} - \text{GlcNAc}$ 的积累量比多效霉素敏感的菌株的量小^[21]。尼克霉素(nikkomycins,图 3)是一种吡啶核苷类抗生素,于 20 世纪 70 年代由联邦德国的 Dahn 等发现,其作用机理与多效霉素类似,并且对哺乳动物无毒或毒性低^[22]。多效霉素和尼克霉素是 2 种具有发展潜力的杀菌剂^[23]。另外随着新抗真菌药物的发展,科学家们通过建立结构-活性关系(structure-activity relationship, SAR),合成出具有高活性的多效霉素^[24-27]、尼克霉素^[28]系列化合物。

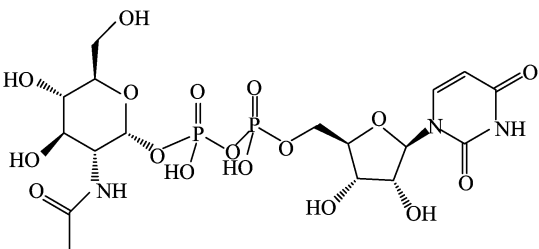
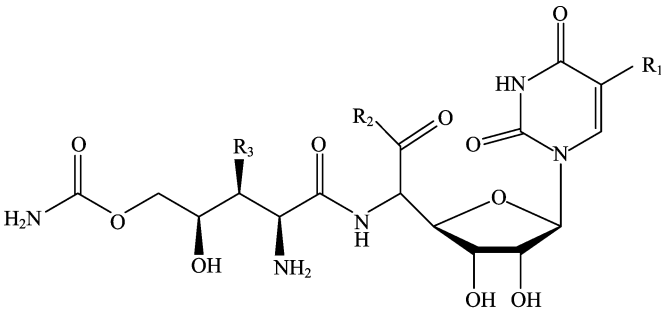


图1 尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺的化学结构



多效霉素	A	B	C	D	E	F	G
R ₁	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	COOH	COOH	COOH	CH ₂ OH
R ₂		OH	OH	OH	OH		OH
R ₃	OH	OH	×	OH	H	OH	H
多效霉素	H	I	J	K	L	M	N
R ₁	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	H	H	H	×
R ₂			OH		OH	OH	OH
R ₃	OH	×	OH	OH	OH	H	OH

图2 多效霉素混合物的化学结构

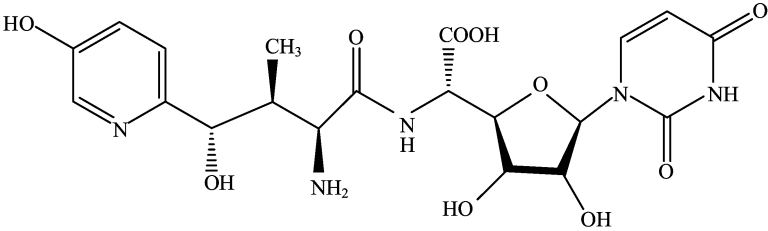


图3 尼克霉素的化学结构

3 多效霉素合成方法

3.1 生物合成法

日本科研制药株式会社最早从可可链霉菌阿苏变种(*Streptomyces cacaoi* var. *asoensis*)发酵液中提取得到多效霉素,1967 年,Isono 等利用可可链霉菌阿苏变种进行发酵,生产多效霉素,最终通过阳离子交换柱 Dowxe 50W 分离得到粗产物,并且使用纤维柱分离得到多效霉素 A、B、C、D、E、F、G、

H、I^[29]。我国多效霉素是金色产色链霉菌(*Streptomyces aureochromogenes*)所产生的代谢产物,李忠福等利用金色产色链霉菌 3297 为研究对象,对多效霉素发酵过程中的温度、pH 值、转速等因素进行 7 因素 3 水平的正交试验,进行摇瓶发酵试验,确定最佳配比,以提高多效霉素的生物效价^[30]。近年来随着基因工程的飞速发展,新的技术被引进多效霉素领域,Li 等利用多效霉素生物合成基因簇在重组菌株中异源表达,经分离鉴定发现除了多效霉素 A 至 N 以外,发酵液中还有另

外 2 种新型的多效霉素 P、O^[18] (图 4)。通过多效霉素 P、O 对梨黑斑病菌、水稻纹枯病菌和灰霉病等真菌病害抑制作用

的研究,结果显示多效霉素 P 拥有比多效霉素 O 更强的抗真菌活性。

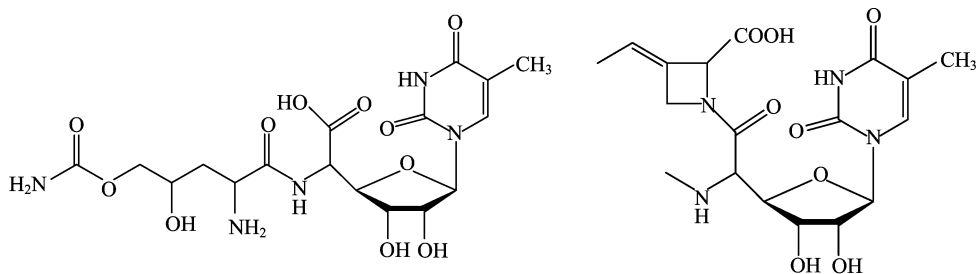


图4 多效霉素P(左)和O(右)

3.2 化学合成法

由于通过发酵法生产多效霉素中除了多效霉素 A 和 B 以外,其余多效霉素产量均比较低,而且分离效率低,得到的量非常少,但是多效霉素的生物活性较强,因此合成化学家们通过化学合成法合成各种多效霉素。Barrett 等报道了一种通过硝基烯酸来合成多效霉素 C 的方法^[31],随着研究的深入,多效霉素 C 与其嘧啶类似物收到合成化学家们的广泛关注^[32],Kenn 等利用 D-甘油醛缩丙酮和 2-三甲基甲硅烷氧基咪唑在以 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 为催化剂的作用下合成胸腺嘧啶多效霉素 C^[33]。1973 年,Kuzuhara 等首次合成多效霉素 J^[34],随后合成学家们对多效霉素 J 的合成方法进行了进一步的研究,Arun 等利用胸腺嘧啶多效霉素 C 和 5-O-氨基甲酰-聚草氨酸合成多效霉素 J^[35]。Uchida 等报导了一种合成了 N-保护 L-氨基甲酰-聚草氨酸的简便方法,并将该方法应用于多效霉素 J 和 L 的全合成过程,用于简化多效霉素 J、L 的合成^[36]。作为在多效霉素混合物中研究得最多的 2 种多效霉素——多效霉素 B 和 D,Uchida 等在之后的研究中,将该简便方法用于多效霉素 B 和 D 的合成,在 N 保护 L-氨基甲酰-聚草氨酸衍生物、多效霉素 C、多效霉素 C 酸耦合反应的基础上首次合成多效霉素 B 和多效霉素 D^[37]。2006 年,Shiro 等应用尿嘧啶多效霉素 C 和 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ 首次合成了多效霉素 M,其总体收率达到 3.2%^[4]。通过结构活性关系(SAR)研究,科学家发现以胸腺嘧啶为组成单元的多效霉素 H 和 J,比多效霉素 A、B、D、F、L 对几丁质具有更强的抑制作用^[38],但是由于生物合成条件的限制,使用化学合成多效霉素及其相关衍生物的合成越来越普遍。

4 多效霉素的应用及市场

多效霉素主要用于防治水稻纹枯病、苹果斑点落叶病、烟草赤星病、梨黑斑病等病害^[39-40]。崔琳霞等以 3% 多效霉素水剂为试药,对苹果斑点落叶病进行田间防效试验,防治效果良好,不产生药害,证明多效霉素是防治苹果斑点落叶病的理想药剂^[41]。徐秋菊等在广西岑溪市稻瘟病常发区进行了小区药效试验,结果显示 0.3% 多抗霉素水剂安全性好、防效高,适于推广示范^[42]。杨继芝等筛选多菌灵和多效霉素进行复配,计算小麦赤霉病菌菌丝生长的抑制率、毒力曲线以及 EC_{50} 值^[43]。张海宽等在日光温室栽培基地进行试验,结果表明春雷霉素、多效霉素对番茄灰霉病具有良好的防治效果^[44]。陶宁等采用高效液相色谱法建立了稻田土壤及水中多抗霉素残留量的分析方法,该方法操作简便,分离效果好,

准确度和精密度良好,符合农药残留的检测要求^[45]。目前多效霉素只有中国和日本能够生产,但是由于我国生产得到的多效霉素无论在质量还是在效价上都无法与日本产品相抗衡,以致在多效霉素行业中日本形成垄断,并且销售价格昂贵,使得多效霉素成为一种高端杀菌剂,从而阻碍了多效霉素的大规模使用。

5 展望

多效霉素作为一种能够抑制真菌细胞壁几丁质生物合成的抗生素,具有活性高、对人畜安全、环境相容性好的特点。近年来通过对多效霉素生物合成基因簇的研究,人们已经在发酵液中分离出了新型多效霉素 P、O,并且随着多效霉素生物合成基因簇的进一步研究,人们有望合成出新型、高效的多效霉素;另外通过结构-活性关系、多效霉素作用机理研究,科学家们通过化学合成法合成出具有抗真菌活性的多效霉素衍生物,此类药物活性高、安全性好、对人畜低毒,将逐渐取代化学农药。笔者所在课题组正在进行相关研究,利用实验室自主筛选获得的多效霉素产生菌株,对其发酵条件进行优化,以提高多效霉素效价,在此基础上,课题组将通过提取多效霉素生物合成基因簇,并对其进行克隆、转导和表达,合成出新型、高效多效霉素,最终进行大田试验。

参考文献:

- [1] Isono K, Asahi K, polyoxins S O, et al. 13. The structure of polyoxins[J]. Journal of the American Chemical Society, 1969, 91(26): 7490-7505.
- [2] Isono K, Nagatsu J, Kawashima Y, et al. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. I. Isolation and characterization of polyoxins A and B[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1965, 29: 848-854.
- [3] Merzendorfer H, Zimoch L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases[J]. Journal of Experimental Biology, 2003, 206(24): 4393-4412.
- [4] Shiro Y, Kato K, Fujii M, et al. First synthesis of polyoxin M[J]. Tetrahedron, 2006, 62(37): 8687-8695.
- [5] 吴家全, 李军民. 多抗霉素研究现状与市场前景[J]. 农药科学与管理, 2010, 31(11): 21-23.
- [6] Isono K, Nagatsu J, Kawashima Y, et al. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics[J]. Arg Biol Chem, 1965, 29(9): 848-854.
- [7] Casiraghi G, Zanardi F, Rassu G, et al. Stereoselective approaches to bioactive carbohydrates and alkaloids - with a focus on recent syntheses drawing from the chiral pool[J]. Chemical Reviews, 1995, 95(6): 1677-1716.

- [8] Mueller H, Furter R, Zaehner H, et al. Metabolic products[yeasts] of microorganisms, 203; Inhibition of chitosomal chitin synthetase and growth of *Mucor rouxii* by nikkomycin Z, nikkomycin X, and polyoxin A: A comparison [J]. Archives of Microbiology, 1981, 130 (3) : 195 - 197.
- [9] 于福利, 宋喜峰, 姜军侠, 等. 多效霉素 B 的高效液相色谱分析方法[J]. 农药, 2008 (47) : 188 - 189.
- [10] 钟建江, 孙 力. 多氧霉素 B 的定量分析检测方法: 中国, 101302558 [P]. 2008 - 6 - 26.
- [11] Sun L, Chen W Q, Deng Z X, et al. Microbiological assay for quantitative determination of polyoxin B [J]. Process Biochemistry, 2009 (44) : 361 - 364.
- [12] 陈西广, 刘万顺, 刘晨光. 几丁质的研究与进展[J]. 生物工程进展, 1997, 17 (3) : 4 - 8.
- [13] Gooday G W. The action of polyoxin on fungi [M]. Berlin: Akademie - Verlag, 1979: 159 - 168.
- [14] Cablb E. Molecular aspects of yeast morphogenesis [J]. Annual Review of Microbiology, 1975, 29: 191 - 214.
- [15] Endo A, Misato T. Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP - *N* - acetylglucosamine; chitin *N* - acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1969, 37 (4) : 718 - 722.
- [16] Kunitoyo S, Michio T, Takeo N, et al. Transformation of polyoxins D, E and F with Sodium bisulfite [J]. Biological Chemistry, 1972, 36 (7) : 1229 - 1236.
- [17] Isono K, Asahi K, Suzuki S. Polyoxins, antifungal antibiotics. XIII. Structure of polyoxins [J]. Journal of the American Chemical Society, 1969, 91 (26) : 7490 - 7505.
- [18] Li J, Li L, Feng C, et al. Novel polyoxins generated by heterologously expressing polyoxin biosynthetic gene cluster in the sanN inactivated mutant of *Streptomyces ansochromogenes* [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11 : 135.
- [19] Zhao C, Huang T, Chen W, et al. Enhancement of the diversity of polyoxins by a thymine - 7 - hydroxylase homolog outside the polyoxin biosynthesis gene cluster [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76 (21) : 7343 - 7347.
- [20] Ohta, N, Kakiki, et al. Studies on the mode of action of polyoxin D. II. Effect of polyoxin D on the synthesis of fungal cell wall chitin [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1970 (34) : 1224 - 1234.
- [21] Misato T, Kakiki K, Hori M. Mechanism of polyoxin resistance [J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1977 (83) : 253 - 260.
- [22] 叶丽娟, 朱 辉, 田 敏. 微生物来源的真菌细胞壁抑制剂的研究进展 [J]. 国外医药抗生素分册, 2005, 26 (1) : 34 - 41.
- [23] Zhang D, Miller M J. Polyoxins and nikkomycins: progress in synthetic and biological studies [J]. Current Pharmaceutical Design, 1999, 5 (2) : 73 - 99.
- [24] Naider F, Shenbagamurthi P, Steinfeld A S, et al. Synthesis and biological activity of tripeptidyl polyoxins as antifungal agents [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1983, 24 (5) : 787 - 796.
- [25] Shenbagamurthi P, Smith H A, Becker J M, et al. Design of anticandidal agents: synthesis and biological properties of analogues of polyoxin L [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 1983, 26 (10) : 1518 - 1522.
- [26] Khare R K, Becker J M, Naider F R. Synthesis and anticandidal properties of polyoxin L analogues containing alpha - amino fatty acids [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 1988, 31 (3) : 650 - 656.
- [27] Emmer G, Ryder N S, Grassberger M A. Synthesis of new polyoxin derivatives and their activity against chitin synthase from *Candida albicans* [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 1985, 28 (3) : 278 - 281.
- [28] Delzer J, Fiedler H P, Müller H, et al. New nikkomycins by mutasynthesis and directed fermentation [J]. Journal of Antibiotics, 1984, 37 (1) : 80 - 82.
- [29] Isono K, Nagatsu J, Kawashima Y, et al. V. Isolation and characterization of polyoxins C, D, E, F, G, H and I [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1967, 31 : 190 - 199.
- [30] 李忠福, 陈亚敏. 多氧霉素发酵条件的研究 [J]. 中小企业管理与科技, 2009 (10) : 223.
- [31] Barrett A, Lebold S A. (Phenylthio) nitromethane in the total synthesis of polyoxin C [J]. Journal of Organic Chemistry, 1990 (55) : 3853 - 3857.
- [32] Mita N, Tamura O, Ishibashi H, et al. Nucleophilic addition reaction of 2 - trimethylsilyloxyfuran to *N* - gulosyl - *C* - alkoxymethylnitrones: synthetic approach to polyoxin C [J]. Organic Letters, 2002, 4 (7) : 1111 - 1114.
- [33] Harding E K, Southard J M. A formal synthesis of thymine polyoxin C [J]. Tetrahedron, Asymmetry, 2005 (16) : 1845 - 1854.
- [34] Kuzuhara H, Ohru H, Emoto S. Total synthesis of polyoxin J [J]. Tetrahedron Letters, 1973, 14 (50) : 5055 - 5058.
- [35] Ghosh A K, Wang Y O. Total synthesis of (+) - polyoxin J [J]. Journal of Organic Chemistry, 1999, 64 (8) : 2789 - 2795.
- [36] Uchida K, Kato K, Akita H. A convenient synthesis of a *N* - protected *l* - carbamoyl - polyoxamic acid derivative; total synthesis of (+) - polyoxin J and (+) - polyoxin L [J]. Synthesis, 1999, 9 : 1678 - 1686.
- [37] Uchida K, Kato K, Yamaguchi K, et al. First total syntheses of (+) - polyoxin B and (+) - polyoxin D [J]. Heterocycles, 2000, 53 : 2253 - 2259.
- [38] Hori M, Kakiki K, Suzuki S, et al. Studies on the mode of action of polyoxins. Part III. Relation of polyoxin structure to chitin synthetase inhibition [J]. Agr Biol Chem, 1971, 35 (8) : 1280 - 1291.
- [39] Li R, Liu G, Xie Z, et al. PolY, a transcriptional regulator with ATPase activity, directly activates transcription of polR in polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi* [J]. Molecular Microbiology, 2010, 75 (2) : 349 - 364.
- [40] Luo Y C, Zhang H H, Liu Y Z, et al. An asymmetric approach to 5 - *O* - carbamoyl - 2 - epi - polyoxamic acid and the total synthesis of 2'' - epi - polyoxin J [J]. Tetrahedron, Asymmetry, 2009, 20 (10) : 1174 - 1180.
- [41] 崔琳霞, 武艳苒. 3% 多抗霉素水剂防治苹果落叶斑点病田间药效试验 [J]. 中国农学通报, 2008, 24 (12) : 394 - 395.
- [42] 徐秋菊, 韦 彦, 颜 群, 等. 0.3% 多抗霉素水剂防治水稻稻瘟病田间药效试验研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (33) : 14635, 14664.
- [43] 杨继芝, 王继师, 龚国淑, 等. 多菌灵、多抗霉素及其复配对小麦赤霉病菌的生物活性研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (9) : 4627 - 4628, 4630.
- [44] 张海宽, 周 斌. 春雷霉素、多抗霉素防治番茄灰霉病田间药效试验 [J]. 农药科学与管理, 2010, 31 (5) : 48 - 49.
- [45] 陶 宁, 龚道新, 杨友才, 等. 稻田土壤及水中多抗霉素残留量的分析与检测方法研究 [J]. 分析测试学报, 2012, 31 (6) : 715 - 719.