

程 亮. 出芽短梗霉 PA-2 产除草活性物质的初步分离[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 199-202.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.054

出芽短梗霉 PA-2 产除草活性物质的初步分离

程 亮

(青海省农林科学院植物保护研究所/青海省农业有害生物综合治理重点实验室, 青海西宁 810016)

摘要: 将出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) PA-2 进行液体发酵, 发酵液用等体积正丁醇萃取 3 次, 正丁醇萃取液旋转蒸发去溶剂后进行硅胶柱层析, 以二氯甲烷和甲醇的混合液进行梯度洗脱, 每 50 mL 收集为 1 个馏分, 共收集到 50 个馏分。生物测定结果表明, 以二氯甲烷和甲醇 (体积比 20:1) 洗脱得到的馏分 15~23 对供试杂草野燕麦表现出了较强的活性, 对野燕麦的除草抑制作用均为 4 级。合并馏分 15~23, 以二氯甲烷和甲醇 (体积比 15:1) 的混合液为展开剂进行薄层层析, 生物测定结果表明, R_f 值范围在 0.19~0.83 的活性条带对野燕麦有不同程度的抑制活性。HPLC 分析 PA1 条带发现, 该活性条带主要含有 2 个组分, 最大吸收峰在 220 nm, 其保留时间分别为 59.015、65.948 min。

关键词: 出芽短梗霉; 代谢产物; 除草活性; 分离纯化; 柱层析; 薄层层析

中图分类号: S482.4⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0199-03

化学除草剂从应用至今已有 70 多年的历史, 在提高农作物产量方面起到不可低估的作用。但从 20 世纪 70 年代中期以来, 抗药性杂草种类一直呈上升趋势^[1-2]。同时, 随着环境保护呼声的日益提高, 高毒性农药的大量使用对农业生产及生态环境造成的负面影响已引起世界范围的广泛关注。为了保护人类生存的环境和农业的可持续发展, 除草剂的研制与使用将严格受到环境和生态的制约^[3]。微生物除草剂因其对目标杂草选择性强、环境负荷小和安全性高等优势而成为近年来杂草生物防治研究中一个较活跃的领域。

近年来, 以微生物天然产物开发生物源除草剂或新颖除草剂的先导化合物引起了杂草科学家和农药化学家的极大兴趣。利用微生物天然产物开发除草剂, 即将细菌、真菌和放线菌等微生物在发酵过程中所产生的、具有抑制某些杂草生物活性的次级代谢产物, 加工成可以直接使用的形态。

农药工业发掘具有除草活性微生物产生的毒素的努力主要集中在非病原土壤微生物和腐生微生物上, 而不是植物病原菌。从微生物天然产物分离得到的植物毒素在贮藏、应用、制剂的相容性和半衰期方面都比活体微生物具有优越性, 施用分离出来的毒素不会使非靶标植物染病, 其药效通常不依赖环境因素, 便于预测。毒素在分子大小、化学种类 (肽类、萜类、二酮吡嗪、大环内酯、酚类) 和寄主专一性 (病原菌从完全专一寄生到非专一寄生) 上差别很大^[4]。

出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 别称出芽茵酶、芽生侧茵酶、黑酵母及短梗霉等, 是一类类酵母真菌, 具有酵母样和真菌菌丝体 2 种形态, 据其生理特征和孢子产生的特征等将之归属于半知菌门 (Deuteromycophyta) 丛梗孢目 (Moniliales) 短梗霉菌属 (*Aureodacidium*)。出芽短梗霉可产生多种

代谢产物, 如胞外多糖、酶、抗菌素、黑色素及单细胞蛋白等, 是一种很有开发价值和前景的多功能新型生物制品^[5-13]。Prashanthi 等从香泽兰花序上分离到出芽短梗霉, 该菌株代谢产物能引起香泽兰花序乌霉症状、花蕾早凋谢和抑制种子萌发^[14]。李永龙等从杨树叶片上分离纯化的出芽短梗霉 PA-2 菌株代谢物对一些杂草具有除草活性^[15]。

本试验以 PA-2 菌株为研究对象, 利用树脂柱层析、薄层层析及液相色谱等方法对该菌株除草活性组分进行初步分离和纯化, 为深入研究除草活性物质的化学结构奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

出芽短梗霉 PA-2 菌株。

1.2 杂草

野燕麦 (*Avena fatua* L.)。

1.3 培养基

YPD 培养基 (10 g 酵母提取物、20 g 蛋白胨、20 g 葡萄糖和 1 000 mL 水) 用于 PA-2 菌株的液体发酵培养。

1.4 试剂

正丁醇 (分析纯), 天津市百世化工有限公司生产; 甲醇 (分析纯), 天津市北辰方正试剂厂生产; 二氯甲烷 (分析纯), 上海广诺化学科技有限公司生产; 柱层析硅胶 (300~400 目), 山东烟台江友硅胶开发有限公司生产; 硅胶制备板 (20 mm×20 mm), 山东烟台江友硅胶开发有限公司生产; 甲醇 (色谱纯), 德国默克公司生产。

1.5 仪器设备

旋转蒸发仪 N-1100, 埃朗科技国际贸易 (上海) 有限公司生产; 真空泵 SHZ-D III, 郑州长城科工贸有限公司生产; 高效液相色谱仪, 天津博纳艾杰尔科技有限公司生产。

1.6 除草活性物质的分离纯化

将培养好的斜面种子接种于已消毒的发酵培养基中, 在 28℃ 下振荡培养 144 h, 得到发酵液 30 L。将发酵液于 5 000 r/min 离心 20 min, 将沉淀部分用 10 L 80% 丙酮浸泡过

收稿日期: 2015-04-27

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31160371、30860165); 国家科技支撑计划 (编号: 2012BAD19B02)。

作者简介: 程 亮 (1978—), 男, 河南林州人, 硕士, 副研究员, 主要从事杂草生物防治方面的研究。Tel: (0971) 5313283; E-mail: liangcheng1979@163.com。

夜。冷冻离心去除沉淀,将上清液减压旋转浓缩去除丙酮,然后与发酵液合并。用等体积正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇相浓缩至干,再用甲醇浸取 2 遍,过滤除去甲醇不溶物,真空浓缩除去甲醇,获得粗品。

粗品经硅胶柱层析分离,以二氯甲烷/甲醇不同的比例作洗脱液,分别为 25 : 1 (1 500 mL)、15 : 1 (800 mL)、3 : 1 (500 mL) 的流动相进行洗脱,分部收集,根据生物活性跟踪结果,将活性部分浓缩,得到淡黄色固体。用少量甲醇溶解,进行 TLC 分离制备,展开液配比为二氯甲烷 : 甲醇 = 15 : 1,记录除草活性物质条带 R_f 值,将具有除草活性最高的条带刮下,用无水甲醇浸泡过夜,过滤,滤液减压浓缩至 10 mL 左右,再用制备型 HPLC 进一步分离纯化(制备柱型号: COSMOSIL 5C18 - MS - II, 20 mm I. D. \times 250 mm,日本半井公司,流动相为甲醇 : 水 = 5 : 95,流速 16 mL/min,检测波长 220 nm)。整个分离纯化过程以除草活性为生物活性跟踪。

1.7 生物活性测定

硅胶柱层析分离所得馏分生物活性测定采用种子萌发抑制法:首先,1% 次氯酸钠对野燕麦种子消毒 3 min,然后用无菌水冲洗 3 次,室内晾干备用。在直径 6 cm 的培养皿中放入同皿底大小的双层滤纸,灭菌后备用。在每皿中加入 1 mL 毒素稀释液(为减少溶剂对种子萌发的影响,取粗毒素处理液 0.5 mL 均匀滴加到滤纸上,待滤纸完全干后再均匀滴加 0.5 mL 灭菌水),在上述处理的培养皿中均匀摆放 20 粒杂草种子,置于 12 h 光照/12 h 黑暗、25 $^{\circ}$ C 条件下培养,并以灭菌水作对照,每个处理重复 4 次,3 d 后检测种子萌发情况。

种子萌发标准以种子发芽长度超过种子长度计,按下列公式计算种子萌发抑制率。

种子萌发抑制率 = (对照组种子萌发率 - 处理组种子萌发率) / 对照组种子萌发率 \times 100%。

除草抑制作用分级标准如表 1 所示。

表 1 除草抑制作用分级标准		
等级	种子萌发抑制率 (%)	记号
0	同对照	-
1	<25	+
2	25 ~ <50	++
3	50 ~ <75	+++
4	75 ~ 95	++++
5	>95	+++++

2 结果与分析

2.1 粗毒素的柱层析和薄层层析

将除草活性物质粗提物进行硅胶柱层析,以二氯甲烷和甲醇(体积比 25 : 1、15 : 1、3 : 1) 的混合液对其进行梯度洗脱,每 50 mL 收集为 1 个馏分,共收集到了 104 个馏分。将所收集到的馏分分别用甲醇稀释,利用种子萌发抑制法对野燕麦进行除草活性测定,结果表明柱层析后所得到的馏分都对野燕麦表现出不同程度的活性,其中馏分 15 ~ 23 对野燕麦的抑制作用达到了 4 级,其余馏分活性较弱,如馏分 31、馏分 32 对野燕麦的抑制作用为 3 级,馏分 4、馏分 5 等对野燕麦的抑制作用为 2 级,馏分 1、馏分 2 等对野燕麦的抑制作用为 1 级。

15 ~ 23 馏分合并浓缩,进行薄板层析(图 1),在展开剂二氯甲烷 : 甲醇为 20 : 1 时,可以分离出大致 5 个条带,其 R_f

分别为 0.83、0.50、0.40、0.29、0.19,依次标记为 PA1、PA2、PA3、PA4、PA5,分别将其刮下回收,用甲醇溶解,除去硅胶粉,旋转蒸发至干,甲醇定容后,分别取等量的各回收样品对野燕麦进行生物活性测定。

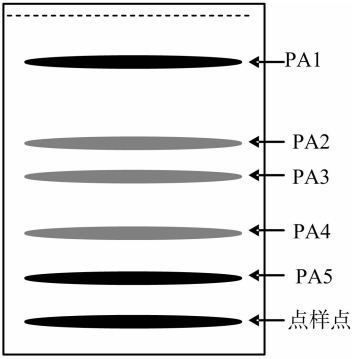


图1 出芽短梗霉粗毒素薄层层析模式

生物测定结果表明,PA - 2 所分离出的 5 个条带对野燕麦都具有不同程度的除草活性,PA1 条带芽长抑制率为 83.73%,根长抑制率为 93.37%;PA2 条带对野燕麦种子芽长抑制率为 51.53%,根长抑制率为 74.35%;PA3 条带对野燕麦种子芽长抑制率为 63.74%,根长抑制率为 63.60%;PA4 条带对野燕麦种子芽长抑制率为 73.39%,根长抑制率为 74.34%;PA5 条带对野燕麦种子的芽长抑制率为 64.12%,根长抑制率为 75.69%。PA1 和 PA5 在波长为 365 nm 下吸收,显示紫色色带,PA2、PA3 和 PA4 在波长为 254 nm 先吸收,显示荧光色带。

2.2 HPLC 分析

2.2.1 检测波长的选择 用紫外分光光度计对除草活性强的 PA1 条带进行紫外波谱区 200 ~ 900 nm 全波长扫描,以确定样品的最大吸收波长,由图 2 可见,在波长为 220 nm 处有较大的吸收峰,且无次级吸收,故在以下的 HPLC 分析时选用 220 nm 为分析波长。

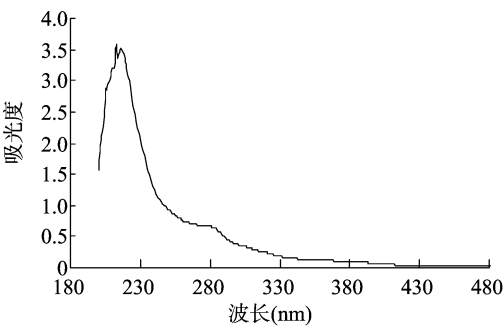


图2 粗毒素的波长扫描

2.2.2 活性组分的 HPLC 分析 色谱分析条件: COSMOSIL 5C18 - MS - II (20 mm I. D. \times 250 mm),流动相为甲醇 : 水为 5 : 95,流速 16 mL/min,检测波长 220 nm,每次进样量 15 μ L。将 PA - 2 的 PA1 条带回收样品通过有机滤膜,取样 15 μ L 进行 HPLC 分析,由图 3 可见,通过对图谱的分析,可以看出在上述分析条件下该样品可分离出 2 个较大的峰,其保留时间分别为 59.015 min 和 65.948 min,可以看出保留时间是 59.015 min 的组分(标记为 A 峰)峰形较好,有点拖尾,后面

有个保留时间为 65.948 min 的小峰(标记为 B 峰)。分别将 2 个组分进行收集制备,利用种子萌发抑制法测定其对野燕麦的活性(图 4 为 2 个组分处理 3 d 的症状),可见 2 个组分

峰都表现出了不同程度的除草活性,A 峰对野燕麦种子的芽长抑制率为 64.81%,根长抑制率为 75.00%;B 峰对野燕麦种子的芽长抑制率为 62.96%,根长抑制率为 52.34%。

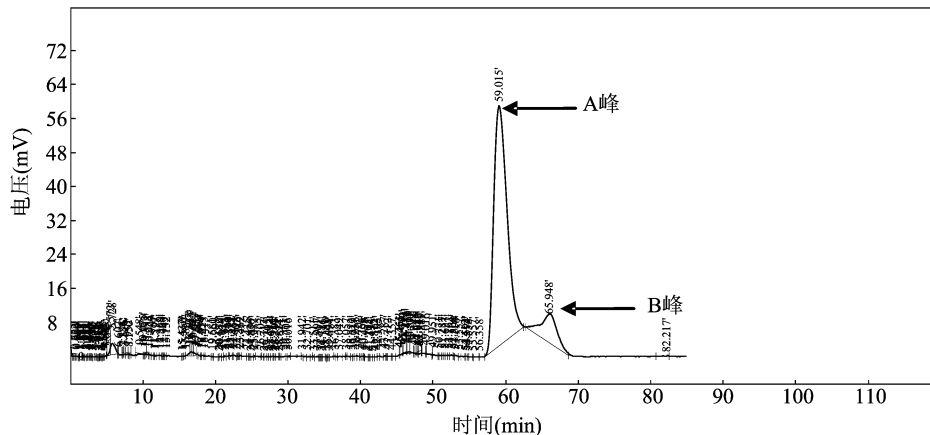


图3 PA1条带回收样品的HPLC分析



图4 活性条带各组分对野燕麦的活性

3 讨论与结论

由于利用微生物代谢产物进行除草剂开发的研究从本质上是利用化合物的生物活性,类同于化学合成除草剂,所以更受到化学家们的重视。而深入研究微生物代谢产物,以期从中找到天然源的环保型化学除草剂之先导化合物,是天然产物利用研究的一个热门领域。

已往研究曾采用薄层层析分离天然除草活性物质^[16]。但该法上样量小,分离组分用于生测后难以有足够的量进行第 2 次分离。选用硅胶作固定相,二氯甲烷和甲醇混合溶剂作洗脱剂,对除草活性物质进行柱层析,取得了较好的分离效果。显然本试验采用柱层析方法对出芽短梗霉除草活性物质进行粗分是可行的。使用柱层析分离,上样量大,能保证获得足够多的除草活性物质进行再分离纯化以及生测和结构鉴定。

生物活性跟踪贯穿于整个提取过程中是必须的。根据除草活性物质分离流程的不同与要求,采用的生测方法也多种多样。本研究通过摸索,过柱子后获得的馏分确定了用培养皿滤纸法来进行活性跟踪。随后进行薄层层析板生物活性测定,确定薄层板上的除草活性条带区域,达到进一步去除杂质的目的。同时研究还发现,有些除草活性组分中的物质在 254、365 nm 紫外光下几乎无吸收或者吸收很弱,但在别的波长下却有最大吸收。因此,用薄层层析分离除草活性物质时不应只刮取在 254、365 nm 下有荧光带的部分生测,还应刮取荧光带之间无荧光的部分进行生测,以防某些无荧光的活性物质在分离过程中损失。采用柱层析分离,因为收集洗脱液

是连续的,有助于发现一些在紫外光下无吸收的次生代谢产物。但柱层析缺点是不直观,将薄层层析和柱层析相结合有助于解决这一问题。最后 HPLC 分析制备获得的除草活性组分的量较少,故采用容器直径较小的瓶盖进行生物活性测定。

本试验利用薄层层析的方法,得到了 5 个条带,并分别测定了其野燕麦的除草活性,对 5 条带回收样品都进行了 HPLC 分析,但除 PA1 条带外,其他样品的色谱图分离效果不太理想,文中未列出。笔者认为 5 个条带的组分差别较大,其物化性质也必存在诸多差异,故在同一条件下进行 HPLC 分析时,其分离度难免会受到影响,同时,PA1 的 HPLC 结果显示,A 峰和 B 峰 2 个保留时间分别为 59.015 min 和 65.948 min,这 2 个峰还是没有完全分开,可能是难分离物质,要求在今后分离工作中不断选择和试验分离效果较好的洗脱剂或展开剂,选择适宜的洗脱方法对除草活性物质进行分离。为了达到较好的分离目的,特别到了分离后期,不仅可以改变流动相,也可以改变固定相。所以对其分离条件的进一步探索仍需进行,此部分试验也正在进行中。

参考文献:

- [1] 邱芳心,杜桂萍,刘开林,等. 杂草抗药性及其治理策略研究进展[J]. 杂草科学,2015,33(2):1-6.
- [2] 杨浩娜,柏连阳. 抗草甘膦杂草检测方法的研究进展[J]. 杂草科学,2014,32(3):30-33.
- [3] 姚克兵,王飞兵,庄义庆,等. 植物源除草剂 Pure 对非耕地杂草的防除效果[J]. 杂草科学,2015,33(3):49-51.
- [4] 王晓艳. 生防菌株 SF-193 对空心莲子草的防除作用及应用潜力研究[D]. 扬州:扬州大学,2007.
- [5] 卢辉官. 出芽短梗霉的胞外多糖在氮源作用下的积累及其应用[D]. 扬州:扬州大学,2010.
- [6] 崔玉海. 出芽短梗霉 G-58 的发酵条件及动力学研究[D]. 无锡:江南大学,2008.
- [7] Ma C, Ni X, Chi Z, et al. Purification and characterization of an alkaline protease from the Marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(3):343-351.

许同桃,金义翠,朱文静,等.微囊化缓释复合农药海藻酸钠-苯磺隆的制备与表征[J].江苏农业科学,2016,44(6):202-204.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.055

微囊化缓释复合农药海藻酸钠-苯磺隆的制备与表征

许同桃,金义翠,朱文静,丁希,孔南,张磊

(连云港职业技术学院医学院,江苏连云港 222006)

摘要:以海藻酸钠-苯磺隆为主要原料,采用高压静电法技术制备缓释复合农药海藻酸钠-苯磺隆凝胶微球,并对目标产物进行表征;通过色谱法考察释放性能,缓释复合农药海藻酸钠-苯磺隆凝胶微球,包封率达到 90%,具有优良的缓释性能。

关键词:缓释农药;苯磺隆;海藻酸钠;微球;制备;表征

中图分类号:S482.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)06-0202-03

农业生产中,传统施药方法因风吹、日晒、雨淋而造成的农药流失和分解通常达 70%~80%,因此反复喷施,成倍用药,造成巨大浪费和环境污染。与传统剂型农药相比,缓释农药可延长农药活性,减少淋溶、蒸发、降解以及降低经皮中毒的危险性,是解决农药低使用率和环境污染矛盾的一种有效方法^[1]。苯磺隆为选择内吸传导型麦类作物高效磺酰脲类除草剂^[2],主要用于防除各种一年生阔叶杂草^[3],苯磺隆结构中有多个活性基团羰基以及多个活性 N 原子,容易与载体海藻酸钠通过化学或物理作用相连,得到缓释海藻酸钠复合苯磺隆农药。缓释农药的缓释能力由药物在载体中扩散速率控制。从结构上来看,缓释农药是原药夹杂在载体高分子材料网络中而形成的复合结构^[4],天然高分子材料海藻酸钠等具有无毒、成本低、来源广泛、可生物降解等优点,作为具有优良生理相容性的药用缓控释制剂辅料,越来越受到人们的关注^[5-7],但在农药领域,海藻酸钠为载体制备缓控农药的研究很少。笔者所在课题组长期从事医用辅料的制备与应用研

究,合成多种缓控释医用辅料。本研究选择海藻酸钠作为制备缓控苯磺隆药物的载体,即通过高分子骨架的设计和在海藻酸钠骨架上连接不同结构单元以得到所需要的性能,医药缓释高分子的设计模型,同样可以进行高分子化农药的设计。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

UV-18000 型紫外/可见分光光度计;多功能反应器;Spectrum One B 型傅里叶红外光谱仪测定;BS323S 电子天平。

甲醇、乙腈,色谱级;新蒸二次蒸馏水;氨水(浓度):26%~30%(氨水:水=1:500);苯磺隆、海藻酸钠,化学纯,药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验原理

用注射器抽取适量所要包裹的芯材与海藻酸钠的混合乳状液,在注射泵作用下,以一定速度向下推压乳状溶液,与此同时在电场力的作用下,乳状溶液通过平针头克服黏滞力和表面张力,呈一定粒径的液滴落入盛有 CaCl₂ 溶液的量杯中,固化成不溶于水的海藻酸钠-氯化钙微胶囊。海藻酸钠、苯磺隆本身的活性基团通过分子间作用力或者氢键直接结合,过程如下:

收稿日期:2015-05-15

基金项目:江苏省大学生实践创新项目(编号:201411050002Y)。

作者简介:许同桃(1968—),女,江苏连云港人,博士,教授,主要从事药用新材的研究。Tel:(0518)85690835;E-mail:13775592234@163.com。

[8] Mari M, Martini C, Spadoni A, et al. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2012, 73: 56-62.

[9] Choudhury A R, Bhattacharyya M S, Prasad G S. Application of response surface methodology to understand the interaction of media components during pullulan production by *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2012, 1(3): 232-237.

[10] Zou X, Zhou Y, Yang S T. Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(8): 2105-2113.

[11] Botić T, Kralj - Kunčić M, Sepčić K, et al. Biological activities of organic extracts of four *Aureobasidium pullulans* varieties isolated from extreme marine and terrestrial habitats [J]. Natural Product

Research, 2014, 28(12): 874-882.

[12] Janisiewicz W J, Jurick W M, Peter K A, et al. Yeasts associated with plums and their potential for controlling brown rot after harvest [J]. Yeast, 2014, 31(6): 207-218.

[13] 徐磊. 短梗霉黑色素的分离提取及其结构分析[D]. 大连:大连理工大学, 2006.

[14] Prashanthi S K, Kulkarni S. *Aureobasidium pullulans*, a potential mycoherbicide for biocontrol of eupatorium [*Chromolaena odorata* (L.) King and Robinson] weed [J]. Current science, 2005, 88(1): 18-21.

[15] 李永龙,程亮,朱海霞,等. 出芽短梗霉菌菌株 PA-2 的除草活性及对作物的安全性[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(2): 232-238.

[16] 李铭刚, Groth I, 李一青, 等. 薄层层析指导下的嗜碱放线菌菌株 YIMQ-14 次生代谢产物研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 481-486.