

高速逆流色谱法分离玉米内生菌 YY1 菌株脂肽类抗菌物质

The separation of lipopeptides from endophytic strain YY1 in maize using high-speed counter-current chromatography

赵莹^{1,2} 徐雅迪¹ 侯美玲¹ 申 珅¹ 郝志敏^{1*} 董金皋^{1*}

(1. 河北农业大学, 河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 保定 071000; 2. 渤海理工职业学院, 黄骅 061100)

Zhao Ying^{1,2} Xu Yadi¹ Hou Meiling¹ Shen Shen¹ Hao Zhimin^{1*} Dong Jingao^{1*}

(1. Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China; 2. Bohai Polytechnic Vocational College, Huanghua 061100, Hebei Province, China)

植物内生菌作为植物微生态系统的重要组成部分,在宿主应对外界环境的应激耐受性、宿主的生长及有效活性成分产生等方面均具有重要影响。枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 作为代表物种,可产生一系列抗菌活性物质,对多种植物病原菌均有良好的拮抗活性(周金伟等,2016)。本课题组从玉米健康植株中分离到1株具有广谱抗菌活性的枯草芽胞杆菌 YY1(侯美玲,2012),该菌株可通过产生脂肽类物质从而抑制病菌菌丝及分生孢子发育。本研究利用高速逆流色谱系统对其脂肽类物质进行分离,并结合生物学活性评价,建立基于高速逆流色谱系统的芽胞杆菌脂肽类物质分离方法,以期对细菌活性物质的分离纯化提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica* 01~23 菌株、枯草芽胞杆菌 YY1 菌株,均由本实验室保存。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:葡萄糖 20 g、马铃薯 200 g、琼脂粉 13 g、蒸馏水 1 000 mL; LB (Luria-Bertani) 培养基:酵母提取物 5 g、胰蛋白胨 10 g、NaCl 10 g、ddH₂O 1 000 mL, pH 7.0; 发酵培养基:可溶性淀粉 3.0%、蛋白胨 2.0%、KH₂PO₄ 0.02%、MnCl₂ 0.01%。

试剂及仪器:甲醇为色谱纯,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。Agilent 1200 高效液相色谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司; HSCCC-TBE300A 高速逆流色谱仪,上海同田生物技术股份有限公司。

1.2 方法

最适检测波长的确定:按照侯美玲(2012)方法提取枯草芽胞杆菌 YY1 菌株的脂肽类物质。利用高效液相色谱对脂肽类提取物进行初步分析。以 80% 甲醇为溶剂,流速 1 mL/min,进样量 20 μ L,柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长分别设置为 214、246、280、313 nm,检测样品不同波长下的出峰情况。

溶剂体系的确定:配制 16 个不同的溶剂体系(丁琼,2014),脂肽类提取物分别溶解于各溶剂体系,静置过夜。分别收集各溶剂体系的上相和下相,溶解于 1 mL 甲醇。在含有浓度为 1.0×10^4 个/mL 玉米大斑病菌分生孢子的 PDA 平板上打 4 个直径为 6 mm 的孔,孔中注入待测溶液,50 μ L/孔,25 $^{\circ}$ C 恒温培养 3 d,测定抑菌圈面积以确定分配系数 K , $K = \text{上相抑菌圈面积} / \text{下相抑菌圈面积}$ 。当 $0.5 < K < 2$ 则符合要求。每个处理重复 3 次。

脂肽类物质分离及活性检测:配制最佳溶剂体系 2 L,静置将上下相分开,超声脱气 20 min。高速逆流色谱 25 $^{\circ}$ C 水浴,泵上相至其从检测器流出为止,流速 50 mL/min。高速逆流色谱正转 900 r/min,泵下相,流速为 2 mL/min,收集检测器处流出上相,量取体积,计算保留率 $R = (320 - V_{\text{上}}) / 300 \times 100\%$, $R > 40\%$ 可使用。等体积上相下相样品进样。当出现吸收峰时,分段收集分离物并标明序号及出峰时间,分离物风干后溶解于 1 mL 色谱甲醇中。按照上述溶剂体系的确定方法测定分离物的抗菌活性。每个处理重复 3 次。

活性组分的高效液相色谱分析:对抗菌活性最

高的分离物进行高效液相色谱分析。以80%甲醇为溶剂,流速1 mL/min,进样量20 μ L,柱温25 $^{\circ}$ C,检测波长为214 nm。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS17.0软件进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱条件的确定

当检测波长为214 nm时吸收峰最大,峰值达2 500 mAU,而其它检测波长的吸收峰峰值均在800 mAU以下,故将214 nm作为最佳检测波长。

在16个溶剂体系中上相的抑菌活性逐渐增加,

下相的抑菌活性逐渐减小,分配系数 K 依次增大。其中,1~11号体系 K 值均小于0.5,13~16号体系的 K 值在2.0~2.5之间,12号体系的分配系数 K 为1.6,分配系数 $0.5 < K < 2$ 即为符合要求,即乙酸乙酯:正丁醇:水体积比为4:1:5。

2.2 脂肽类物质分离及活性检测

枯草芽胞杆菌YY1菌株的脂肽类提取物经高速逆流色谱分离,共获得14个分离物,按出峰顺序分别标记为1~14号,其中4个分离物具有抑菌活性,9号分离物的抑菌圈最大,平均面积为520.24 mm²,显著大于其它分离物的抑菌圈,其出峰时间为114.41 min(图1)。

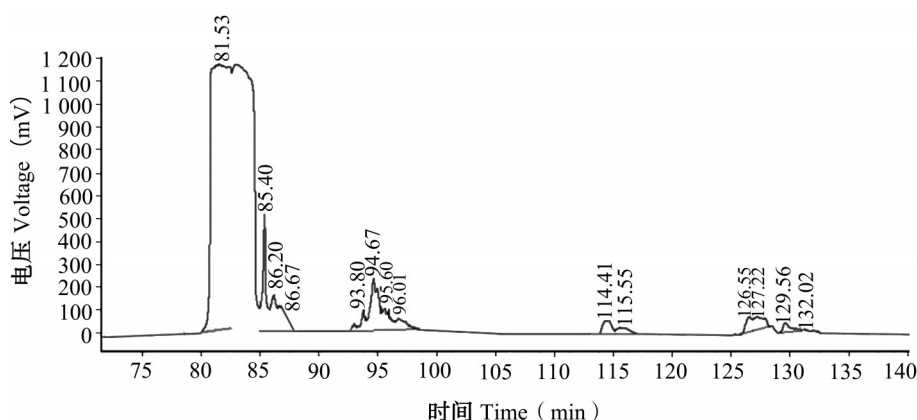


图1 枯草芽胞杆菌YY1菌株的脂肽类提取物高速逆流色谱谱图

Fig. 1 The spectrogram of high-speed counter-current chromatography of lipopeptides from YY1 strain

2.3 9号分离物的高效液相色谱分析

9号分离物高效液相色谱分析结果显示,在保留时间5.27 min处出现一峰形较为对称的吸收峰,推测其为单一物质,为分离物9的主要组分。

3 讨论

本研究初步确定了利用高速逆流色谱分离枯草芽胞杆菌YY1菌株脂肽类物质的最佳溶剂体系为乙酸乙酯:正丁醇:水=4:1:5。进一步对其中抑菌活性最强的分离物进行高效液相色谱检测,发现该分离物的主要组分出峰时间为5.27 min,其保留时间与叶云峰等(2011)在相同检测条件下伊枯草菌素A保留时间5.39 min的结论极为相近,推测其可能为伊枯草菌素A的结构类似物,在后续的研究中应对主要活性物质做进一步纯化和结构鉴定。

参考文献 (References)

Ding Q. 2014. Study on separation of natural products and solvent system selection in high-speed counter current chromatography. Mas-

ter Thesis. Changsha: Central South University (in Chinese) [丁琼. 2014. 高速逆流色谱中天然产物分离及溶剂体系选择方法的研究. 硕士学位论文. 长沙: 中南大学]

Hou ML. 2012. Identification and antifungal activity substances of endophytic bacteria from maize. Master Thesis. Baoding: Agricultural University of Hebei (in Chinese) [候美玲. 2012. 玉米内生细菌的分离鉴定及抗真菌活性物质的研究. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学]

Ye YF, Li QQ, Yuan GQ, Fu G, Miao JH, Lin W. 2011. Purification of antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight. Chinese Journal of Biological Control, 27(3): 357–361 (in Chinese) [叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 付岗, 缪剑华, 林伟. 2011. 枯草芽胞杆菌B47菌株抗菌物质的分离纯化及其对玉米小斑病的防治作用. 中国生物防治学报, 27(3): 357–361]

Zhou JW, Zhou HL, Yi YJ, Bo LY, Li GY. 2016. The antifungal activity and mechanism of *Brevibacillus brevis* on plant pathogenic fungus. Journal of Plant Protection, 43(4): 600–607 (in Chinese) [周金伟, 周红丽, 易有金, 柏连阳, 李高阳. 2016. 短链芽胞杆菌对植物病原真菌的抑菌活性和抑菌机理. 植物保护学报, 43(4): 600–607]

(责任编辑:王璇)