

文章编号:1001-6880(2014)3-0370-04

黄麻链霉菌 NF0919 菌株发酵液有效成分薄层色谱分离的展开剂优化

张文文, 杨敬辉, 陈 露, 陈宏州, 庄义庆 *

江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 句容 212400

摘要:根据单因素试验法确定了黄麻链霉菌(*Streptomyces corchorusii*)NF0919 菌株发酵产物的薄层色谱展开剂组分, 利用均匀设计法和逐步回归法建立回归模型优化展开剂的配比, 最终得出最优化的展开剂系统为氯仿—甲醇—水—冰醋酸 = 10: 2. 75: 0. 5: 0. 2, 分离效果较理想。

关键词:展开剂系统优化; 黄麻链霉菌; 薄层色谱

中图分类号:R284. 1

文献标识码:A

Optimization of TLC Solvent System for the Separation of Chemical Components of *Streptomyces corchorusii* Strain NF0919 Fermentation Broth

ZHANG Wen-wen, YANG Jing-hui, CHEN Lu, CHEN Hong-zhou, ZHUANG Yi-qing *

Zhenjiang Institute of Agricultural Science, Jurong 212400, China

Abstract: A strain of *Streptomyces corchorusii* (coded as NF0919) was isolated in our laboratory. It was antagonistic to *Rhizoctonia solani* Kühn and produced alkyl glycoside which had antifungal activity. In this study, the TLC solvent system was developed to separate the chemical components of fermentation broth of *Streptomyces corchorusii* strain NF0919 based on single factor tests. The TLC solvent system was further optimized using the uniform design and quadratic polynomial stepwise regression. The optimal solvent system was determined to be: chloroform-methanol-water-glacial acetic acid = 10: 2. 75: 0. 5: 0. 2. Under the optimal solvent system, the fermentation broth separated clearly.

Key words: optimization of solvent system; *Streptomyces corchorusii*; TLC

植物病原真菌是危害农作物的主要病原微生物, 给农业生产造成了巨大的损失^[1,2]。目前化学农药在控制植物病原微生物造成的损失上仍起着重要作用, 但是化学农药的大量使用已经对人类环境造成了严重的危害并增加了病原微生物的抗药性^[3]。从天然资源中寻找活性物质代替化学农药和使用天然抗菌化合物保护作物已经成为当前研究的重点^[4]。

高芬^[5]等报道过链霉菌 182-2 能够产生抗真菌抗生素, 其发酵液具有广谱抗菌性, 水溶性好。Lee SY^[6]等报道链霉菌次生代谢产物对辣椒炭疽病菌有良好的防治效果。经田间连续多年的防治试验证明, 我室筛选的生防新菌种—黄麻链霉菌(*Streptomyces corchorusii*)NF0919 菌株(经中科院微生物所

鉴定)的发酵代谢产物对多种作物病原菌有很好防控效果。

本研究通过选择适当的薄层层析展开剂组分, 使用合理的层析展开目标参数, 根据均匀实验设计法建立薄层色谱展开效果的预测模型得出最优的展开剂体系配比, 使 NF0919 菌株发酵产物的各组分在薄层板上分离, 确定各个组分的大致极性和比移值, 为该菌株发酵产物的进一步纯化和鉴定提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

黄麻链霉菌(*Streptomyces corchorusii*)NF0919 菌株, 本室自备。种子培养基。

1.2 试剂和仪器

三氯甲烷(氯仿)、乙酸乙酯、甲醇、苯、丙酮、石油醚、正己烷、冰醋酸, 均为分析纯。硅胶板(上海灵一化工), 草酸。

FA2004A 电子天平(上海精天电子仪器有限公司);SHZ-III(D)循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂);RE-5203 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SW-CJ-1B(U)单人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);TCYQ 摆床(太仓市实验仪器设备厂);PHS-3D 冷藏柜(上海精科);HX6001T 电子天平(慈溪市天东衡器厂);PHS-2C 精密酸度计(上海雷磁仪器厂);ZDX-35BI 座式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);16K-R 台式高速冷冻离心机(长沙市鑫奥仪器仪表有限公司);双槽层析缸(上海信谊公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种的发酵

将冰箱里保存的 NF0919 斜面在高氏一号培养基上活化,30 °C 培养 10 d,挑取 1 cm² 大小的菌块接种于种子培养基中(250 mL 三角瓶装量 50 mL),置于摇床上 180 rpm,30 °C 培养 40 h,按 10% 的接种量接入发酵培养基中(250 mL 三角瓶装量 50 mL),置于摇床上 180 rpm,30 °C 培养 7 d。

1.3.2 有效成分的提取

发酵液离心后取滤液加草酸调 pH 至 3.5,静止 2 h 后离心,滤液浓缩成褐色糊状。浓缩液:乙酸乙酯 = 1:2 比例进行超声辅助浸提 0.5 h,反复浸提数次至萃取液无色透明,将乙酸乙酯萃取液真空浓缩成浸膏。

1.3.3 点样及展开

取少量浸膏用甲醇溶解,点样量 0.2~0.5 μL,点板前硅胶板烘箱内 105 °C 活化 0.5 h,展开前展开剂在层析缸内预饱和 10 min,展开方式为单向上行法,上行展开至少 80 mm,每种展开剂组分的展开时间相同,重复试验两次。待板自然阴干后置于碘蒸气饱和的密闭容器中显色,确定分离后各物质的 R_f 值。

值,根据 R_f 值确定分离目标函数 COF_{mod}^[7]。

1.3.4 展开剂组分单因素试验

分别选用不同极性强度的展开剂对提取液进行展开,展开方法同(3),展开后确定斑点数 N 并计算各组分的 R_f 值。

1.3.5 均匀设计法优化展开剂配比

在确定了样品展开剂基本组分后,根据组分数采用 DPS 软件建立均匀设计实验表 U₁₀(10⁴),实验方案见表 1。

表 1 均匀设计因素水平表

Table 1 Levels and Factors in uniform experimental design

因素 Factor	最低水平 Lowest level	最高水平 Highest level	分段值 Fragmentation threshold
氯仿 Chloroform	10	20	1
甲醇 Methyl alcohol	1	5.5	0.5
水 Water	0.2	2.0	0.2
冰醋酸 Glacial acetic acid	0.1	1.0	0.1

2 结果和分析

2.1 展开剂组分的确定

分别选用不同极性强度因子的展开剂对提取液样品进行展开的结果见表 2。由展开结果的斑点数和 R_f 值(一般在 0.2~0.8 之间较好)可见较为理想的展开剂系统为氯仿—甲醇及氯仿—甲醇—水。对这两种展开剂进行 3 次重复实验,氯仿—甲醇组分和氯仿—甲醇—水组分的斑点数和 R_f 值的结果见表 2,结果显示第一种展开剂的展开效果重现性差,另外,在试验中观察到展开的斑点有拖尾现象,考虑到提取样品液为酸性,因此在展开剂组分中加入少量冰醋酸以使斑点集中^[8]。

表 2 展开剂组分选择结果

Table 2 Sample elution result with different developing solvent

展开剂 Developing solvent	配比 Matching(v/v)	展开结果 Expanding results	斑点数 Spots	R_f 值 R_f value
氯仿:甲醇 Chloroform: Methyl alcohol	10:3	展开	4	0.90,0.76,0.53,0.47
氯仿:甲醇:水 Chloroform: Methyl alcohol: Water	10:3:1	展开	5	0.90,0.76,0.53,0.37,0.27
石油醚:丙酮 Petroleum ether: Acetone	7:3	展开	3	0.40,0.22,0.10
石油醚:乙酸乙酯:丙酮 Petroleum ether: Ethyl acetate: Acetone	3:1:1	展开	3	0.46,0.28,0.20
石油醚:乙酸乙酯 Petroleum ether: Ethyl acetate	3:1	展开	3	0.41,0.23,0.15
正己烷:乙酸乙酯:丙酮 Normal hexane: Ethyl acetate: Acetone	3:1:1	展开	1	0.22

正己烷:丙酮 Normal hexane: Acetone	3: 1	展开	1	0.22
氯仿:甲醇 Chloroform: Methyl alcohol	30: 3	展开	4	0.80, 0.66, 0.47, 0.33
氯仿:甲醇:水 Chloroform: Methyl alcohol: Water	30: 3: 1	展开	4	0.78, 0.64, 0.43, 0.34
氯仿:甲醇 Chloroform: Methyl alcohol	10: 3	展开	4	0.90, 0.76, 0.53, 0.47
		展开	4	0.80, 0.68, 0.49, 0.32
		展开	3	0.82, 0.68, 0.47
氯仿:甲醇:水 Chloroform: Methyl alcohol: Water	10: 3: 1	展开	5	0.90, 0.76, 0.53, 0.37, 0.27
		展开	5	0.90, 0.75, 0.53, 0.37, 0.27
		展开	4	0.78, 0.54, 0.38, 0.27

2.2 均匀设计实验结果

将氯仿—甲醇—水—冰醋酸所组成的四元溶剂系统按不同配比建立均匀设计实验方案，并将各个

因素依次设为 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 ，根据软件所建立的随机均匀设计实验方案进行试验，展开结果见表 3。

表 3 均匀设计法实验方案及结果

Table 3 Results of uniform experimental design

试验号 Test number	X_1	X_2	X_3	X_4	斑点数 N Spots N	COF_{mod}
1	15	5	0.8	1.0	4	33.20
2	13	3	0.2	0.8	5	35.19
3	20	2	0.6	0.5	4	15.06
4	19	3.5	2.0	0.7	4	45.13
5	16	4	0.4	0.1	1	33.78
6	18	5.5	1.2	0.3	4	36.28
7	10	4.5	1.6	0.6	1	12.67
8	17	1.5	1.4	0.9	1	13.27
9	14	2.5	1.8	0.2	5	43.01
10	12	1	1.0	0.4	3	13.07

应用 DPS 软件对以上数据进行二次多项式逐步回归，根据自变量对试验指标 COF_{mod} 用的显著程度由大到小依次引入，剔除作用较小的自变量，最终得到二次多项式回归方程：

$$\text{回归方程 } Y = 4.512 + 9.184X_2 + 2.862X_3 - 0.312X_1 * X_1 - 1.243X_2 + 0.107X_4 * X_4 + 0.989X_1 * X_2 + 0.148X_2 * X_4 - 0.380X_3 * X_4$$

对此回归方程做显著性检验，得到回归模型与实验数据间的相关系数 $R = 0.9997$, $P = 0.023 < 0.05$ ，回归方程在 $a = 0.05$ 水平上相关系数显著，可以用来拟合实验数据，预测最优指标。

2.3 实验优化结果及验证

根据所建立的回归方程，使用 DPS 软件求出实验范围内因素最优水平为氯仿—甲醇—水—冰醋酸 = 10:2.75:0.5:0.2，在该水平下实验最优指标的预

测值为 60.53，将此展开剂按上述方法点样后重复展开三次，得到斑点数 N 和 R_f 值见表 4。

表 4 最优指标各因素水平

Table 4 Optimal Levels of Every Factor in the TLC Solvent System

因素 Factor	斑点数 N Spots N	R_f 值 R_f value
$X_1 : X_2 : X_3 : X_4 =$ 10:2.75:0.5:0.2	4	0.80, 0.64, 0.43, 0.33
	4	0.80, 0.65, 0.42, 0.25
	4	0.80, 0.64, 0.43, 0.33

3 结论

本研究利用均匀设计法优化发酵提取液薄层色谱展开剂体系，通过二次多项式逐步回归法得出回归方程，得到试验范围内最优的展开剂体系为氯仿

—甲醇—水—冰醋酸 = 10:2.75:0.5:0.2, 发酵提取液展开的四个斑点 R_f 值依次为 0.80、0.64、0.43、0.33, 在薄层板上依次为四个黄色斑点。根据薄层色谱展开图初步确定了发酵提取液的极性为强极性, 为该菌株发酵产物的进一步纯化和鉴定提供依据。

参考文献

- 1 Sun Q(孙强), Yan JF(闫建芳), Liu Q(刘秋), et al. Identification of antifungal strain MY02 and preliminary separation of its bioactive substances. *Plant Protection* (植物保护), 2007, 5(33):71-74.
- 2 Song GT(宋光桃), Zhou GY(周国英). Selection of antagonistic actinomycetes to *Colletotrichum gloeosporioides* and study of its antibacterial spectrum. *J Central South Univ Forest Tech* (中南林业科技大学学报), 2012, 2(30):75-78.
- 3 Van Lenter JC. A greenhouse without pesticides: Fact or fantasy. *Crop Protection*, 2000, 19:375-384.
- 4 Hollway PJ, Wong WC, Partridge HJ. Effects of some nonionic

polyoxyethylene surfactants on uptake of ethirimol and diclofutrazol from suspension formulations applied to wheat leaves. *Pesticide Sci*, 1992, 34:109-118.

- 5 Gao F(高芬), Lu SF(卢赛飞), Wang ML(王梦亮). Preliminary purification and characterization of antifungal substance produced by *Streptomyces* sp. 182-2. *Plant Protection* (植物保护), 2012, 38:71-75.
- 6 Lee SY, Hamisi T, Yong SL. Biocontrol of anthracnose in pepper using chitinase, β -1,3 glucanase and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22:1359-1366.
- 7 Ban YD(班允东), Wu W(吴文), Yang L(杨丽), et al. Optimization of the solvent systems for thin-layer chromatography VIII. external punishment function method. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1995, 13:379-382.
- 8 Zhang XY(张晓毅), Zhao MM(赵美美), Yu X(于新). Optimization of the TLC solvent system for Trichoderma Viride yellow pigment by the uniform experimental design. *J Biomath* (生物数学学报), 2011, 26:371-376.

(上接第 426 页)

- 8 Peng FL(彭峰林), Xie XL(谢小龙), Deng SX(邓树勋). Effect and mechanism of exercise preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Chin Sport Sci* (体育科学), 2006, 26(5):64-68.
- 9 Liu JX, Li XZ, Ma XB, et al. Cardio-protective effects of co-rocalm on acute myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Chin J Integr Med*, 2006, 12:199-202.
- 10 Kou YY(寇毅英), Zha XDJ(扎西多杰), Li YF(李永芳), et al. The antioxidative effect of san wei tan xiang powder on rats hearts against myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Chin Med Mater* (中药材), 2008, 31:1013-1015.
- 11 Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, et al. Cardiacoxidative-

- tressin acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res*, 2005, 65:230-238.
- 12 Manoj M. Lalu, Wenjie Wang, Richard Schulz. Peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Heart Failure Reviews*, 2002, 7:359-369.
- 13 Qin J(秦剑), Li HL(李惠兰), Zhang RP(张荣平), et al. Cardio-protection of SPM (*Salvia przewalskii* Maxim var *mandarinorum* stib.) during acute myocardial ischemia/reperfusion injury in rats *in vivo*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18:92-94.
- 14 Yoshiki N. The role of nitric oxide in cardiol-reperfusion injury. *J Pn Cire*, 1997, 61.