

拟康氏木霉菌 YIM PH30002 铁载体活性化学成分

陈金莲^{1,2}, 刘 凯², 苗翠萍², 官会林¹, 赵立兴^{2*}, 孙世中^{1*}¹云南师范大学能源与环境科学学院, 昆明 650092;²云南大学省微生物研究所 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室, 昆明 650091

摘要:通过双层琼脂平板法对拟康氏木霉菌 YIM PH30002 在三种培养基条件下产铁载体能进行了半定量分析检测, 该菌株在 PDB 培养基中, 产铁载体成分的量最多。利用多种色谱技术从菌株 YIM PH30002 的 PDB 发酵液的乙酸乙酯提取物中共获得了 5 个聚酮类代谢产物, 经波谱数据分析与文献比对, 化合物分别鉴定为: kongingin A (**1**)、kongingin B (**2**)、kongingin D (**3**)、kongingin F (**4**)、kongingin M (**5**)。化合物 **1~4** 表现有铁载体活性, 其中化合物 **2** 的铁载体活性相对较强, MTC 值约为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。但化合物均无显著抗菌生物活性。

关键词:拟康氏木霉; 铁载体活性; 聚酮化合物

中图分类号: R284.2; O629.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.11.008

Chemical Constituents with Siderophores Activities from *Trichoderma koningiopsis* YIM PH30002

CHEN Jin-lian^{1,2}, LIU Kai², MIAO Cui-ping², GUAN Hui-lin¹, ZHAO Li-xing^{2*}, SUN Shi-zhong^{1*}¹College of Energy and Environmental Science, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China;²Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China of Ministry of Education and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: The semiquantitative analysis of siderophore produced by *Trichoderma koningiopsis* YIM PH30002 were detected by double-layer agar plate method. The results indicated the PDB medium was suitable for the strain YIM PH30002 to produce siderophore with maximum production. With further investigation, five polyketides were isolated from the ethyl acetate extract of the PDB fermentation broth of strain YIM PH30002 by various column chromatographical techniques. Their structures were elucidated as kongingin A (**1**), kongingin B (**2**), kongingin D (**3**), kongingin F (**4**), kongingin M (**5**) on the basis of spectroscopic analysis and literature data. Compounds **1-4** showed siderophore activities, among them compound **2** presented higher activity with MTC of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the iron (Fe III) acquisition tests. However, compounds **1-5** exhibited weak antimicrobial activities.

Key words: *Trichoderma koningiopsis*; siderophores; polyketides

木霉菌属丝孢目 (*Moniliales*) 丛梗孢科 (*Moniliaceae*) 木霉属 (*Trichoderma*) 真菌, 是典型的丝状真菌, 具有较强环境适应能力, 易于生长繁殖, 在各种环境中有着广泛的分布与种群有优势, 尤其在森林与农业土壤环境中极易分离得到^[1]。木霉菌具有重寄生、分泌胞外酶降解病原真菌细胞壁、产生抑菌活性次生代谢产物等生物学特性, 木霉菌作为生物防治菌剂在全球农业领域应用已取得瞩目的成

效^[2]。

微生物产生的具有铁离子螯合活性的次生代谢产物即铁载体 (siderophores) 对依赖铁离子的病原菌有显著抑制作用^[3], 铁载体通路已成为抑制病原菌的潜在新靶标。Vinale 等^[4]人从哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 代谢产物中还发现了一个对马铃薯具有促生作用的新型铁载体化合物 harzianic acid。自然环境中许多微生物具有产生铁载体成分的能力, 其具体功能与作用已获得了阶段性的阐释^[5], 微生物铁载体活性成分的研究对药物研发与农业种植有着重要意义。

拟康氏木霉 *Trichoderma koningiopsis* YIMPH

收稿日期: 2015-06-22 接受日期: 2015-09-09

基金项目: 国家自然科学基金 (41361075); 云南省应用基础研究重点项目 (2013FA015); 云南省教育厅科学研究基金重大专项 (ZD2013008)

* 通讯作者 E-mail: toshizhong_sun@hotmail.com; zlx70@163.com

30002 分离自健康三七 (*Panax notoginseng*) 植物,通过双层琼脂平板法与发酵粗提物的铁载体活性检测,发现其在 PDB 培养基中的代谢产物表现出对铁离子较强的螯合活性。从其发酵液的乙酸乙酯粗提物中分离得到 5 个聚酮类化合物,经波谱解析分别鉴定为:kongingin A (1)、kongingin B (2)、kongingin D (3)、kongingin F (4)、kongingin M (5)。对单体化合物进行了抑菌与铁载体活性分析,化合物均无明显抑菌活性,但化合物 2 的铁离子螯合活性相对较强。

1 仪器与材料

1.1 菌株来源

菌株 YIM PH30002 分离于三七植物的茎部,综合其 ITS 基因序列 (GenBank 登录号: KM 190127) 系统发育分析与形态学特征观察结果,确定为拟康氏木霉菌 (*Trichoderma koningiopsis* YIM PH30002)。标本菌株保存于云南大学省微生物研究所菌种保藏库。

1.2 培养基

PDA 培养基 (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 15.0, 琼脂 12.0, 蒸馏水, 液体培养基 (PDB) 不加琼脂。改良马丁培养基 (g/L): K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, 蔗糖 10.0, 蛋白胨 5.0, 酵母浸膏 2.0, 琼脂 12.0, 蒸馏水, 液体培养基不加琼脂。察氏培养基 (g/L): 蔗糖 30.0, $NaNO_3$ 2.0, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KCl 0.5, 琼脂 12.0, 蒸馏水, 液体培养基不加琼脂。LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, $NaCl$ 10.0, 蒸馏水, pH 7.2-7.4。

1.3 主要仪器与试剂

柱色谱硅胶 (200~300 目) 和 GF₂₅₄ 薄层色谱硅胶板均由青岛海洋化工有限责任公司生产; Sephadex LH-20 为瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司生产; MCI gel (75~150 μm) 为英国 Hichrom 公司生产; 分析型与半制备型 HPLC 为安捷伦 1200 Series, 色谱柱为 Phenomenex C₁₈ (250 mm \times 4.60 mm, 5 μm) 与 YMC C₁₈ (250 mm \times 10 mm, 5 μm) 柱; 核磁共振波谱由 Bruker AV-400 和 DRX-500 测定, TMS (四甲基硅烷) 为内标; 质谱分析由 Agilent G3250AA spectrometer 质谱仪测定; 显色方法为荧光灯下波长 254 nm 和 365 nm 处观察荧光, 碘蒸气显色与硫酸茴香醛处理后加热显色; 分析纯试剂石油醚, 乙酸乙酯, 丙酮, 氯仿, 甲醇由天津化学试剂有限

公司生产; 色谱纯甲醇由德国 Merck 公司生产; 铁载体活性检测试剂 CAS 溶液: 首先将 60.5 mg 铬天青 S (Chrome azurol S, CAS), 溶解于 50 mL 去离子水中, 加入 10 mL Fe^{3+} 溶液 (1 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mM HCl) 混匀后, 记为“ A 液”; 其次称取 72.9 mg 十六烷基基溴化铵 (HTDMA) 溶解于 40 mL 去离子水中, 加热充分溶解后, 记为“ B 液”; 最后将 A 液与 B 液缓慢混合摇匀后得到 CAS 检测溶液。

1.4 铁载体活性检测

菌株 YIM PH30002 产铁载体固体平板检测参照文献^[6,7], 采用双层琼脂法, 上层为培养基 (分别为 PDA、改良马丁、察氏 3 种), 下层为添加有 4% 的 CAS 溶液的水琼脂, 用直径为 5 mm 的打孔器从 YIM PH30002 菌株平板内移取菌块接入双层平板中央, 接种后放置 28 $^{\circ}C$ 培养箱培养 3 d, 观察菌落周围特征晕圈颜色变化。菌株 YIM PH30002 在以上 3 种液体培养基的发酵液乙酸乙酯粗提物铁载体活性成分检测参照文献^[8], 将粗提物用甲醇溶解, 粗提物的浓度检测范围设置为 10~1000 $\mu g/mL$, 按等体积比与 CAS 溶液加入 96 孔板内, 反应总体积 80 μL , 以溴化十六烷基三甲铵 (CTAB) 作为阳性对照, 甲醇作为阴性对照, 每个处理设三个重复, 并同时观察特征颜色变化, 将能引起 CAS 检测液出现特征颜色变化时的粗提物浓度记为最小检测浓度 (Minimum test concentration, MTC) 值。单体化合物铁载体活性的 MTC 值测定同粗提物的检测方法与步骤一致。

1.5 发酵与提取分离

将菌株接种斜面活化培养 5 d, 接种于 500 mL 锥形瓶中 (含有 150 mL PDB 培养基) 置摇床上 130 rpm, 28 $^{\circ}C$ 培养 3 d; 将种子培养液按 8%~10% (v/v) 接种量接入发酵培养基 (PDB) 中, 置摇床上 130 rpm, 28 $^{\circ}C$ 培养 10 d, 共发酵 50 L。发酵后用纱布过滤分离发酵液与菌丝体。用等体积的乙酸乙酯萃取发酵液三次, 合并提取液, 并真空浓缩蒸干, 菌丝体使用过量丙酮浸泡并超声破壁 15 min, 用等体积的乙酸乙酯萃取丙酮提取物三次并浓缩蒸干。两部分萃取物经 TLC 和 HPLC 检测分析后合并得到总浸膏 43.6 g。粗提物用等体积比的石油醚相与甲醇/水相 (9:1, v/v) 溶解分离萃取 3 次, 甲醇/水相经真空浓缩蒸干后, 经正向硅胶色谱, 以氯仿/甲醇 (1:0、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1, v/v) 梯度洗脱得到六个组分 (Fr. 1~6)。其中组分 Fr. 1 经 Sephadex LH-

20 柱色谱以甲醇洗脱,得到四个组分(Fr. 1. 1 ~ 1. 4),其中 Fr. 1. 2 进一步经 Sephadex LH-20 柱色谱以甲醇洗脱得到化合物 **2**,kongingin B(20. 1 mg), Fr. 1. 2 剩余组分经硅胶柱色谱以石油醚/丙酮(10 : 1-5: 1)梯度洗脱得到化合物 **1**,kongingin A(18. 1 mg),Fr. 1. 1 组分经 Sephadex LH-20 柱色谱以甲醇洗脱后经硅胶柱色谱以石油醚/丙酮(10: 1 ~ 1: 1)梯度洗脱得到化合物 **5**,kongingin M(14. 3 mg)。组分 Fr. 2 经 MCI 柱色谱以甲醇/水(10% ~ 100%)梯度洗脱得到三个组分 Fr. 2. 1 ~ Fr. 2. 3,其中组分 Fr. 2. 1 经半制备 HPLC 以甲醇/水(10% ~ 100%)作为流动相梯度洗脱,流速为 3. 0 mL/min,分别得到化合物 **3**,kongingin D(7. 5 mg)和 **4**,kongingin F(8. 6 mg)。

1. 6 抑菌活性分析

单体化合物抗菌活性分析参照文献^[9],采用微量稀释法于 96 孔板分析单体化合物的最小抑菌浓度(MIC)值。化合物以二甲基亚砜(DMSO)溶解,采用二倍连续稀释法将化合物检测浓度范围设置为 1 ~ 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$,DMSO 在每个孔中的终浓度小于 5%;以鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为病原指示细菌,用 LB 培养基将细菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 后使菌落数为 1×10^5 units/mL;以尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、人参链格孢(*Alternaria panax*)、腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)为病原指示真菌,用 PDB 培养基将真菌在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后使菌落数为 1×10^3 units/mL;卡那霉素与制霉菌素分别作为抗细菌与真菌的阳性对照,DMSO 作为阴性对照;每个处理设三个重复,最后将接有细菌的板放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,接有真菌的 96 孔板置 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36 h 后,置显微镜下观察记录,最终将观察到孔中无菌体生长时所在化合物浓度定为该化合物的最小抑制浓度。

表 1 YIM PH30002 在 3 种培养基产铁载体比较

Table 1 Comparison of siderophores produced by strain YIM PH30002 in three medium

编号 No.	培养基 Medium	D (mm)	d(mm)	D/d
1	PDAPDA medium	56 \pm 0. 151	39 \pm 0. 148	1. 44
2	察氏 Czapek-Dox medium	27 \pm 0. 178	21 \pm 0. 157	1. 29
3	改良马丁 Modified Martin medium	42 \pm 0. 186	31 \pm 0. 210	1. 35

注:D:晕圈直径;d:菌落直径。

Note:D;diameter of halo;d;diameter of colony.

2 结果与讨论

2. 1 铁载体活性

采用由真菌常用的培养基与通用 CAS 检测平板构成的双层平板,拟康氏木霉菌 YIM PH30002 能在上层的 3 种不同培养基上生长良好,且在下层的 CAS 检测平板上能够形成典型的铁载体整合晕圈。从表 1 结果可看出菌株 YIM PH30002 在上层为 PDA 培养基时所产生的铁载体特征晕圈大于在察氏与改良马丁培养基所形成的晕圈,且菌株在察氏培养基中产铁载体能力相对最弱;对菌株 YIM PH30002 产铁载体形成的特征型整合晕圈进行半定量分析,结果见表 1,由于菌株在 PDA 培养基生长速度最快,相应的铁载体整合晕圈较大,因此,在铁载体整合晕圈与菌落的直径比值上最大,由此可知,菌株 YIM PH30002 在 PDA 培养基上生长时,产铁载体能力最强。菌株 YIM PH30002 在 3 种不同培养基液体发酵的萃取粗提物铁载体检测分析结果见表 2,由于 CTAB 是最常用的金属离子螯合剂,所以将其作为阳性对照,CTAB 引起 CAS 检测液出现特征颜色变化的 MTC 值为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;菌株 YIM PH30002 在察氏与改良马丁培养基发酵液中萃取的粗提物引起 CAS 检测液出现特征颜色变化的 MTC 值分别为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而 PDB 培养基发酵液萃取粗提物的 MTC 值为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与平板法检测结果一致,因此 MTC 值可以作为微生物产铁载体能力的定量分析。化合物 **1** ~ **5** 对铁离子螯合活性的 MTC 值分析结果见表 2,结果表明,化合物 **5** 在浓度即使大于 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时也未引起 CAS 检测液出现特征颜色变化,即无铁载体活性,化合物 **2** 的铁载体活性相对化合物 **1**、**3** 和 **4** 较强,其 MTC 值为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 2 YIM PH30002 不同发酵液的粗提物与化合物 1~5 的铁载体活性

Table 2 The siderophores activities of the crude extracts and compounds 1-5

	粗提物与单体化合物 Extract and compounds ($\mu\text{g/mL}$) ^a									
	E ₁	E ₂	E ₃	1	2	3	4	5	CTAB ^b	甲醇 ^c
MTC	50	150	100	400	300	500	500	N	10	N
特征颜色	橙色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	-	橙色	-
Typical color	Orange	Purple	Purple	Purple	Purple	Purple	Purple	-	Orange	-

注: E₁、E₂、E₃ 分别表示 PDB、察氏、改良马丁三种不同培养基发酵液粗提物;^aMTC 值单位;^b阳性对照;“阴性对照”;“N”无铁载体活性, MTCs > 1000 $\mu\text{g/mL}$;“-”无特征颜色变化。

Note: E₁, E₂, E₃ represented three different fermentation extract from PDB, modified Martín and Czapek dox medium, respectively; ^aData^c expressed in MTC ($\mu\text{g/mL}$); ^b Positive control; ^c Negative control; “N” No siderophore activity; “-” No typical color change.

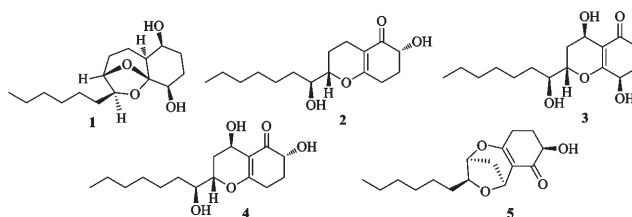


图 1 化合物 1~5 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-5

2.2 结构鉴定

化合物 (1) Koninginin A, 无色油状, C₁₆H₂₈

O₄; HR-ESI-MS m/z : 307. 1913 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4. 32 (1H, s, H-9), 4. 03 (1H, m, H-10), 3. 89 (1H, dd, $J = 11. 2, 2. 4$ Hz, H-1), 3. 62 (1H, m, H-4), 2. 25 (1H, m, H-8a), 1. 58 (1H, m, H-8b), 1. 97 (1H, m, H-3a), 1. 82 (1H, m, H-3b), 1. 88 (1H, m, H-2a), 1. 52 (1H, m, H-2b), 1. 72 (1H, m, H-7a), 1. 61 (1H, m, H-7b), 1. 60 (1H, m, H-6), 1. 57 (2H, m, H-11), 1. 30 (2H, m, H-14), 1. 28 (2H, m, H-13), 1. 28 (2H, m, H-15), 1. 27 (2H, m, H-12), 0. 88 (3H, t, $J = 6. 0$ Hz, H-16); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 109. 2 (C-5), 79. 4 (C-10), 79. 1 (C-9), 72. 7 (C-4), 69. 9 (C-1), 41. 4 (C-6), 35. 2 (C-11), 31. 7 (C-14), 30. 8 (C-2), 29. 1 (C-13), 27. 3 (C-8), 25. 6 (C-3), 25. 2 (C-12), 22. 5 (C-15), 20. 6 (C-7), 14. 0 (C-16)。以上波谱数据与文献^[10]报道一致。确定该化合物为 koningin A。

化合物 (2) Koninginin B, 无色油状, C₁₆H₂₆O₄; HR-ESI-MS m/z : 305. 1773 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4. 04 (1H, dd, $J = 13. 2, 5. 2$ Hz, H-2), 3. 87 (1H, s, 2-OH), 3. 78 (1H, m, H-9), 3. 64 (1H, br s, 10-OH), 3. 77 (1H, m, H-10), 2. 56 (1H, m, H-4a), 2. 08 (1H, m, H-4b), 2. 35 (1H, m,

H-3a), 1. 80 (1H, m, H-3b), 1. 95 (1H, m, H-7a), 1. 66 (1H, m, H-7b), 1. 65 (1H, m, H-8a), 1. 55 (1H, m, H-8b), 1. 35 (2H, m, H-12), 1. 33 (2H, m, H-11), 1. 30 (1H, m, H-13), 1. 31 (2H, m, H-14), 1. 29 (2H, m, H-15), 0. 87 (3H, t, $J = 7. 2$ Hz, H-16); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 198. 5 (C-1), 171. 8 (C-5), 109. 5 (C-6), 81. 2 (C-9), 73. 5 (C-10), 71. 4 (C-2), 33. 2 (C-4), 32. 2 (C-11), 29. 7 (C-14), 29. 4 (C-13), 27. 6 (C-3), 25. 8 (C-8), 23. 1 (C-12), 23. 0 (C-15), 18. 1 (C-7), 14. 5 (C-16)。以上波谱数据与文献^[11]报道一致。确定该化合物为 koningin B。

化合物 (3) Koninginin D, 无色油状, C₁₆H₂₆O₅; HR-ESI-MS m/z : 321. 1792 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4. 66 (1H, br s, H-7), 4. 45 (1H, m, H-4), 4. 10 (1H, m, H-9), 3. 72 (1H, m, H-10), 2. 64 (1H, m, H-2a), 2. 37 (1H, m, H-2b), 2. 23 (1H, m, H-3a), 2. 01 (1H, m, H-3b), 1. 97 (1H, m, H-8a), 1. 77 (1H, m, H-8b), 1. 60 (2H, m, H-12), 1. 58 (1H, m, H-11a), 1. 48 (1H, m, H-11b), 1. 31 (2H, m, H-13), 1. 30 (2H, m, H-14), 1. 30 (2H, m, H-15), 0. 89 (3H, t, $J = 7. 2$ Hz, H-16); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 198. 5 (C-1), 171. 1 (C-5), 114. 2 (C-6), 77. 4 (C-9), 73. 1 (C-10), 65. 7 (C-4), 57. 3 (C-7), 33. 1 (C-2), 32. 8 (C-11), 31. 7 (C-14), 30. 9 (C-13),

29.2 (C-8), 28.8 (C-3), 25.2 (C-12), 22.6 (C-15), 14.0 (C-16)。以上波谱数据与文献^[11]报道一致。确定该化合物为 koninginin D。

化合物 (4) Koninginin F, 无色油状, C₁₆H₂₆O₃; HR-ESI-MS m/z : 321. 1797 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.80 (1H, br s, H-7), 4.08 (1H, m, H-9), 4.06 (1H, m, H-2), 3.69 (1H, s, H-10), 2.62 (1H, m, H-4a), 2.37 (1H, m, H-4b), 2.35 (1H, m, H-3a), 1.98 (1H, m, H-3b), 1.97 (1H, m, H-8a), 1.80 (1H, m, H-8b), 1.62 (2H, m, H-11), 1.51 (2H, m, H-12), 1.31 (2H, m, H-13), 1.30 (2H, m, H-14), 1.29 (2H, m, H-15), 0.88 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-16); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 198.3 (C-1), 173.5 (C-5), 112.6 (C-6), 77.3 (C-9), 72.8 (C-10), 71.0 (C-2), 57.2 (C-7), 33.1 (C-4), 31.7 (C-11), 31.4 (C-14), 29.2 (C-13), 28.6 (C-8), 27.1 (C-3), 25.4 (C-12), 22.6 (C-15), 14.0 (C-16)。以上波谱数据与文献^[12]报道一致。确定该化合物为 koninginin F。

化合物 (5) Koninginin M, 无色油状, C₁₆H₂₄

O₄; HR-ESI-MS m/z : 303. 1620 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.99 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-7), 4.83 (1H, br s, H-9), 4.05 (1H, m, H-10), 3.94 (1H, dd, J = 7.9, 5.2 Hz, H-2), 3.81 (1H, br s, 2-OH), 2.53 (2H, m, H-4), 2.35 (1H, m, H-3a), 1.83 (1H, m, H-3b), 1.64 (1H, m, H-11a), 1.48 (1H, m, H-11b), 1.30 (2H, m, H-12), 1.30 (2H, m, H-13), 1.28 (2H, m, H-14), 1.28 (2H, m, H-15), 0.88 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-16); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 194.8 (C-1), 173.8 (C-5), 116.1 (C-6), 85.9 (C-10), 79.5 (C-9), 70.9 (C-2), 66.2 (C-7), 32.5 (C-8), 31.7 (C-11), 31.6 (C-14), 29.2 (C-13), 29.0 (C-3), 26.4 (C-4), 26.3 (C-12), 22.5 (C-15), 14.1 (C-16)。以上波谱数据与文献^[13]报道一致, 确定该化合物为 koninginin M。

2.3 抑菌活性

抑菌活性分析结果(表3)表明, 化合物 1~5 对检测的病原指示真菌无显著的抑菌活性, MIC 值范围为 128~256 μg/mL, 而对病原指示细菌无抑菌活性, 其 MIC 值均大于 256 μg/mL。

表3 化合物(1~5)对微生物的最小抑制浓度(MICs)

Table 3 Minimal inhibitory concentration of compounds (1-5) against tested microorganisms

指示菌株 Strains	MICs (μg/mL) ^a					卡那霉素 ^b Kanamycin	制霉菌素 ^c Nystatin
	1	2	3	4	5		
<i>A. baumannii</i>	N	N	N	N	N	16	-
<i>S. aureus</i>	N	N	N	N	N	8	-
<i>F. oxysporum</i>	256	256	128	N	128	-	8
<i>A. panax</i>	128	256	256	N	N	-	8
<i>F. solani</i>	N	256	N	N	256	-	16

注:^aMIC 值单位;^b抑制细菌对照;^c抑制真菌对照;“N”(MICs > 256 μg/mL)。

Note:^aData^cxpressed in MIC (μg/mL);^bAntibacterial control;^cAntifungal control.

2.4 讨论

铁元素是大部分微生物生长的必须元素, 真菌、细菌能通过自身代谢产生对环境中铁离子具有螯合活性的化合物^[5], CAS 平板法已被广泛用于微生物产铁载体潜能检测^[14]。铁离子、CAS 和 HTDMA 会络合形成蓝色复合物(FeDye3-x)其具体显色原理可用化学式: FeDye3-x + Ly → FeL3-y + Dyex-表示, 当对 Fe³⁺ + 具有更高亲和力的配体(L)出现, 如将铁载体加入 FeDye3-x 蓝色复合物中, 复合物中的铁离子便会转移到配体上, 而释放出染料, 此时溶液的颜色由蓝色变为黄色、紫色或橙色。因此用双层琼脂平

板法可在平板上观察到典型铁载体颜色晕圈, 微生物代谢提取物与 CAS 溶液的理化反应同样可通过特征颜色变化来判断化合物铁离子螯合强度。本文研究发现菌株 YIM PH30002 在三种不同培养基中产铁载体能力存在差异, 其在 PDA 培养基上特征颜色晕圈最大。铁载体特征螯合晕圈与菌落直径比值作为产铁载体能力的一种半定量分析方法^[15], 与菌株 YIM PH30002 在三种不同液体培养基发酵液的提取物与 CAS 检测液的理化反应的定量分析方法结果一致。微生物所产铁载体是一类较特殊的天然产物, 近年来围绕微生物所产铁载体的功能与机制

等方面引发了广泛讨论:研究发现阻断结核杆菌铁载体循环通路可诱发自毒效应,即内源铁载体物质积累导致结合杆菌死亡,这为结核病药物的研发提供了新的靶标^[16];研究还表明微生物产生铁载体可促进植物生长^[17],抑制病原菌等作用^[18]。本文首次报道三七内生真菌拟康氏木霉菌 YIM PH30002 具有产铁载体的能力,并发现了部分化合物具有一定的铁载体活性,但未能发现具有极强铁离子螯合活性的单体,这与粗提物显示的螯合活性存在差异,可能与化合物间的协同作用有一定关联,有关菌株 YIM PH30002 分泌的铁载体代谢产物对铁离子的协同螯合作用机制值得进一步深入研究。

参考文献

- Samuels GJ. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res*, 1996, 8: 923-935.
- Keswani C, Mishra S, Sarma BK, et al. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl Microbiol Biot*, 2014, 98: 533-544.
- Haas H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake; the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biot*, 2003, 62: 316-330.
- Vinale F, Nigro M, Sivasithamparam K, et al. Harzianic acid; a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 347: 123-129.
- Hider RC, Kong XL. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep*, 2010, 27: 637-657.
- Miranda SP, Cabirol N, Téllez RG, et al. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Meth*, 2007, 70: 127-131.
- Milagres AM, Machuca A, Napoleao D. Detection of siderophores production from several fungi and bacteria by a modification of chromeazurol S (CAS) agar plate assay. *J Microbiol Meth*, 1999, 37: 1-6.
- Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*, 1987, 160: 46-56.
- Tian SZ, Pu X, Luo GY, et al. Isolation and characterization of new p-terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardopsis gilva* YIM 90087. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 3006-3012.
- Xu XX, Zhu YH. Total synthesis of koniginin A and its diastereoisomer. *Tetrahedron Lett*, 1995, 36: 9173-9176.
- Liu G, Wang Z. Total synthesis of koniginin D, B and E. *Synthesis*, 2001, 1: 119-127.
- Ghisalberti EL, Rowland CY. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod*, 1993, 56: 1799-1804.
- Lang BY, Li J, Zhou XX, et al. Koniginins L and M, two polyketides from *Trichoderma koningii* 8662. *Phytochem Lett*, 2015, 11: 1-4.
- Shin SH, Lim Y, Lee SE, et al. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J Microbiol Meth*, 2001, 44: 89-95.
- Chen SX (陈绍兴), Zhao X (赵翔), Xie ZX (谢志雄). Detection of siderophore from *Halophilic archaea* with two-layer plate. *Microbiol China* (微生物学通报), 2008, 35: 142-144.
- Jones CM, Wells RM, Madduri AVR, et al. Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by interrupting siderophore recycling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 1945-1950.
- Sadeghi A, Karimi E, Dahaji PA, et al. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World J Microb Biot*, 2012, 28: 1503-1509.
- Miethka M, Marahel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Res*, 2007, 71: 413-451.
- Wang H, Qi M, Cutler AJ. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 4153-4154.
- Jasalavich CA, Ostrofsky A, Jellison J. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 4725-4734.
- Zhao J, Xu L, Huang Y, et al. Detection of antimicrobial compounds from extracts of the endophytic fungi associated with *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* using TLC-bioautography-MTT assay. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 28-32.
- Bernas T, Dobrucki JW. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 380: 108-116.
- Rodriguez RJ, White Jr. JF, Arnold AE, et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol*, 2009, 182: 314-330.
- Nisa H, Kamili AN, Nauchoo IA, et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. *Microb Pathogenesis*, 2015, 82: 50-59.

(上接第 1852 页)