

## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101940211 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 12

(21) 申请号 201010127349. 3

(22) 申请日 2010. 03. 19

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 2060 2007. 05. 25

(71) 申请人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区学  
源街

(72) 发明人 俞晓平 申屠旭萍 董胜张

郝培应 边亚琳 陈春

(51) Int. Cl.

A01N 43/90 (2006. 01)

A01P 3/00 (2006. 01)

C12P 19/40 (2006. 01)

C12N 1/20 (2006. 01)

C12R 1/525 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

丰加霉素在防治黄瓜枯萎病中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种防治蔬菜真菌病害微生物农药的制备方法,属于微生物技术领域。该方法利用一种从浙江杭州临安天目山采集的土样中分离筛选出的淀粉酶产色链霉菌 D,经过菌种的活化培养;发酵培养;发酵物提取;将所提纯的活性化合物配以农用药物辅料等步骤,制备成多种剂型的农用药物。该微生物农药可用于防治黄瓜枯萎病、番茄灰霉病或番茄早疫病等蔬菜真菌病害,其防治效果较常规化学药剂相当或略优,且安全。

1. 丰加霉素在防治黄瓜枯萎病中的应用。

2. 权利要求 1 所述的应用,其中丰加霉素由以下方法获得:淀粉酶产色链霉菌 (*Streptomyces diastatochromogenes*)D 经斜面活化培养和发酵培养获得含有丰加霉素的发酵液,向发酵液中加入等体积的正丁醇进行萃取,取上层,并在真空条件下浓缩至浸膏,再以蒸馏水溶解,离心取上清液,而后上 Sephadex LH20 柱层析,以体积比 10%~90%的乙醇和蒸馏水梯度洗脱,分离纯化得活性化合物丰加霉素,所述的淀粉酶产色链霉菌 D 已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏登记号为 CGMCC No. 2060。

## 丰加霉素在防治黄瓜枯萎病中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,特别是涉及生防放线菌——淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes*)D 的培养及其代谢产物的分离与应用。

### 背景技术

[0002] 放线菌(*Actinomycetes*)与人类的关系极为密切。据统计,在已发现的抗生素中,有70%约为放线菌所产生。土壤是放线菌栖居的重要场所,从土壤中获得具有高效抗菌活性的放线菌产生抗生素是目前世界范围内研制开发新医药和新农药必不可少的基础工作。

[0003] 目前对植物病害的防治,主要采用化学农药防治的方法。化学农药虽然对多种病害有较理想的防治效果,但长期使用会诱发病菌的抗药性。另外,农药的频繁使用不仅增加了农产品的生产成本,农药残留问题也十分严重。利用放线菌产生的抗病原真菌的活性物质进行植物真菌病害的生物防治,则具有周期短、易于研究、便于生产、无毒无害等优点。

[0004] 本发明从杭州的土壤中分离到一株生防放线菌,经微生物分类学鉴定为淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes*),并对此生防放线菌发酵代谢产物中的抗菌成分进行分离,得到了活性成分,经四大光谱分析,证明为已知核苷类抗生素,丰加霉素(*Toyocamycin*)。该发明为微生物源农药的进一步研制和开发提供优良的出发菌株和生物活性化合物。

[0005] 以往对丰加霉素活性的报道主要集中在抗肿瘤方面,但由于其对人正常细胞的毒性太大,无法应用于临床。在抗菌活性的报道方面,丰加霉素主要抑制白假丝酵母,新隐球酵母,草分支杆菌和金黄色葡萄球菌等,几乎没有对植物病原菌(稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)除外)抑制作用的相关报道(陈伊,李舟,魏玉珍,等.根际放线菌 I06-03431 产生的核苷类抗生素 3431 的研究.生物学杂志,2009,26(4):17-20)。本研究通过对淀粉酶产色链霉菌抗菌活性成分丰加霉素的研究发现,丰加霉素在低浓度就能强烈抑制黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)孢子萌发和菌丝生长。本发明正是填补了这项空白,拓宽了丰加霉素的应用。同时本发明中淀粉酶产色链霉菌产丰加霉素的发酵水平在 105.6mg/L,相比文献(M. C. Flickinger, M. Greenstein, C. Bremmon, et al. Strain selection, medium development and scale-up of toyocamycin production by *Streptomyces chrestomyceticus*. *Bioprocess Engineering*, 5(1990):143-153)报道的产素水平约 12mg/L 要高出 7.8 倍。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是针对化学农药不安全与微生物源农药种类较少的不足,提供一种从杭州土壤中分离筛选出的放线菌-淀粉酶产色链霉菌 D;本发明的另一目的是提供利用该菌株通过发酵提取其代谢产物制备成防治部分植物真菌病害的微生物农药及其制备方法。

[0007] 本发明淀粉酶产色链霉菌的分离、筛选与鉴定：

[0008] 是于 2006 年 8 月在浙江杭州临安天目山采集的土样中，经分离、培养、发酵、活性测定以及对抑制植物真菌病害病原菌有效菌株的筛选等步骤获得并保存；经微生物分类学鉴定为淀粉酶产色链霉菌 (*Streptomyces diastatochromogenes*)，定名为淀粉酶产色链霉菌 (*Streptomyces diastatochromogenes*)D。该菌株已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏日期 2007 年 5 月 25 日，保藏登记号 CGMCC No. 2060。保藏文件参见专利 ZL200710156833.7 的公开文本，公开号为 CN101225368A。

[0009] 淀粉酶产色链霉菌 D 显微形态特征：孢子丝直、钩状、松散螺旋形，孢子长圆、椭圆或卵圆形。

[0010] 本发明所述的淀粉酶产色链霉菌 D，经发酵提取可获得对部分植物真菌病害病原菌具有抑制作用的活性化合物丰加霉素 (Toyocamycin)。

[0011] 本发明目的通过以下技术方案来实现：

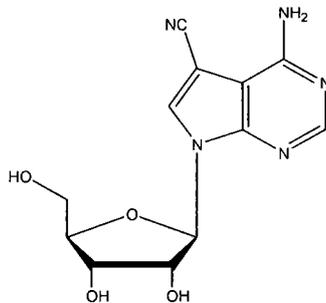
[0012] 一种防治番茄灰霉病、黄瓜枯萎病或番茄早疫病等植物真菌病害微生物农药的制备方法，按以下步骤进行：

[0013] (1) 菌种的活化培养：将分离保存的淀粉酶产色链霉菌 D 菌种移至试管内高氏一号斜面上，在  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  条件下，培养至试管斜面长满孢子；

[0014] (2) 发酵培养：发酵培养液为每 1000mL 中含有玉米粉 21.5g，可溶性淀粉 10g，麸皮 5g， $\text{CaCO}_3$  2.5g， $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.5g， $\text{FeSO}_4$  0.5g， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5g，灭菌；待冷却至  $40^{\circ}\text{C}$ ，在无菌条件下接种淀粉酶产色链霉菌 D 至发酵培养液中，在  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  条件下，培养 5 天；

[0015] (3) 发酵物提取：发酵完毕，收集发酵液，按常规化学方法提取、层析，分离纯化获得活性化合物 Toyocamycin，该化合物分子式为  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ ，结构式见下式；

[0016]



[0017] (4) 将此活性化合物配以农用药物辅料，制备成多种剂型的农用药物。

[0018] 本发明的有益效果：

[0019] 一是本发明从杭州土壤分离筛选出代谢物产量高、并对部分植物真菌病害病原菌具有较强抑制作用的淀粉酶产色链霉菌 D，这为农业上防治植物真菌病害病原菌提供了一种微生物菌株；

[0020] 二是本发明提供了从淀粉酶产色链霉菌 D 的发酵物中提取其活性代谢产物丰加霉素 Toyocamycin，并进而制备成可防治植物真菌病害的微生物源农药的制备方法；该农药应用于植物真菌病害的防治，其效果较常规化学药剂相仿或略优（见试验列表 1-3），为农用杀菌剂的开发增添了新的途径。

## 具体实施方式

[0021] 实施例 1:(淀粉酶产色链霉菌 D 的分离与筛选)

[0022] 本发明于 2006 年 8 月在浙江临安天目山采集的土样中,经分离、培养、发酵、活性测定以及对抑制植物真菌病害病原菌有效菌株的筛选等步骤,从中获得淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes*)D,保存。

[0023] 淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes*)D 抑菌活性测定:取其发酵上清液 1mL 于无菌培养皿内,与 9mL 冷却至 50℃ 的 PDA 培养基迅速混匀,冷却后在每个培养基平面分别放 1 个直径为 4mm 的黄瓜枯萎病菌或番茄灰霉病菌或番茄早疫病菌等供试菌菌饼,菌饼接于培养皿中央(培养皿直径为 9cm),置培养箱中 28℃ 培养 36h,以无菌水处理作为对照,重复 3 次;采用十字交叉法测定菌落直径,以下列公式计算抑制率:

[0024]

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - 4} \times 100\%$$

[0025] 测定结果表明:淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes*)D 代谢产物对黄瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌的抑制率分别为 86.9%、83% 和 85.2%。

[0026] 实施例 2:(淀粉酶产色链霉菌 D 发酵代谢产物的制备方法)

[0027] 按以下步骤进行:

[0028] (1) 菌种试管斜面活化培养:斜面培养基为高氏一号培养基,其组分与含量为:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KNO}_3$  1g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、可溶性淀粉 20g、NaCl 0.5g、 $\text{FeSO}_4$  0.01g、琼脂 20g,溶化后补足水至 1L;在无菌条件下用接种环挑取少许淀粉酶产色链霉菌 D 的孢子,至已灭菌的高氏一号培养基试管(15×150mm)中,置培养箱内 28℃ ± 1℃,活化培养 96h,至试管斜面长满孢子;

[0029] (2) 发酵培养:发酵培养液为每 1000mL 中含有黄玉米粉 21.5g,可溶性淀粉 10g,麸皮 5g,  $\text{CaCO}_3$  2.5g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.5g,  $\text{FeSO}_4$  0.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5g,余量为水;每 300mL 三角瓶装 40mL 发酵培养液,配制后 121℃ 灭菌 20min,待冷却至 40℃ 在无菌条件下,挑取一铂金环淀粉酶产色链霉菌 D 孢子接种,28℃ ± 1℃,发酵培养 5 天;

[0030] (3) 发酵物提取:发酵完毕后收集发酵液,向发酵液中加入等体积的正丁醇进行萃取,取上层,并在真空条件下浓缩至浸膏,再以蒸馏水溶解,离心取上清液,而后上 Sephadex LH20 柱层析,以体积比 10%~90% 的乙醇和蒸馏水梯度洗脱,分离纯化得活性化合物 Toyocamycin。

[0031] 本发明中淀粉酶产色链霉菌产丰加霉素的发酵水平在 105.6mg/L,相比文献(M. C. Flickinger, M. Greenstein, C. Bremmon, et al. Strain selection, medium development and scale-up of toyocamycin production by *Streptomyces chrestomyceticus*. *Bioprocess Engineering*, 5(1990):143-153)报道的产素水平约 12mg/L 要高出 7.8 倍。

[0032] 以下实施例 3、4 中所述的淀粉酶产色链霉菌 D 代谢产物均为实施例 2 所制产品;所述产品的百分含量均为质量百分比。

[0033] 实施例 3:(利用淀粉酶产色链霉菌 D 发酵代谢产物制备成可湿性粉剂)

[0034] 其中:

- [0035] 白炭黑:(上海富奇化工有限公司生产)
- [0036] 农乳 0203-B:(邢台蓝星助剂厂生产)
- [0037] 木质素磺酸钠:(上海威呈化工有限公司生产)
- [0038] 轻质碳酸钙:(上海大宇生化有限公司生产)
- [0039] 产品含 1.5% 活性化合物 Toyocamycin, 加入 2% 的白炭黑作为吸附剂, 并加入 1% 的农乳 0203-B 和 3% 的木质素磺酸钠辅料, 最后用轻质碳酸钙补足到 100%, 混匀后, 经气流粉碎制成可湿性粉剂(以下内容中称“产品 A”)。
- [0040] 实施例 4:(利用淀粉酶产色链霉菌 D 发酵代谢产物制备成乳油)
- [0041] 其中:
- [0042] 乙醇(上海申兴制药厂生产)
- [0043] 农乳 0204(邢台蓝星助剂厂生产)
- [0044] 二甲苯(上海申兴制药厂生产)
- [0045] 产品 2% 的活性化合物 Toyocamycin, 用 4% 的乙醇溶解, 加入质量 5% 农乳 0204-C 作为乳化剂, 最后用二甲苯补足到 100%, 搅拌混匀制成乳油(以下内容中称“产品 B”)。
- [0046] 试验例:(本发明产品与常规农药防治效果对比试验)
- [0047] 将“产品 A、B”对黄瓜枯萎病或番茄灰霉病或番茄早疫病等植物病害进行防治试验, 以常规化学农药、清水为对照, 如表 1、表 2 和表 3 所示, 试制的农用杀菌剂“产品 A、B”比常规化学农药防治效果相仿或略优。
- [0048] 表 1 产品 A 对番茄灰霉病防效统计表
- [0049] (药效试验均于 2009 年 7 月 -9 月在杭州市郊试验农田进行)
- [0050]

| 产品与对照药      | 稀释倍数 | 使用方法 | 校正防效 (%) |
|-------------|------|------|----------|
|             |      |      | 番茄灰霉病    |
| 产品 A        | 1000 | 喷雾   | 88.9     |
|             | 1500 | 喷雾   | 86.3     |
|             | 2000 | 喷雾   | 81.5     |
| 70%甲基托布津可湿粉 | 1000 | 喷雾   | 87.2     |
| 清水          | -    | 喷雾   | 4.1      |

- [0051] 表 2 产品 B 对黄瓜枯萎病防效统计表
- [0052] (药效试验均于 2009 年 7 月 -9 月在杭州市郊试验农田进行)

| 产品与对照药      | 稀释倍数 | 使用方法 | 校正防效 (%) |
|-------------|------|------|----------|
|             |      |      | 黄瓜枯萎病    |
| [0053] 产品 B | 800  | 喷雾   | 90.6     |
|             | 1200 | 喷雾   | 82.4     |
|             | 1600 | 喷雾   | 76.1     |
| 50%多菌灵可湿粉   | 500  | 喷雾   | 85.7     |
| 清水          | -    | 喷雾   | -9.3     |

[0054] 表 3 产品 B 对番茄早疫病防效统计表

[0055] (药效试验均于 2009 年 7 月 -9 月在杭州市郊试验农田进行)

| 产品与对照药      | 稀释倍数 | 使用方法 | 校正防效 (%) |
|-------------|------|------|----------|
|             |      |      | 番茄早疫病    |
| [0056] 产品 B | 800  | 喷雾   | 89.1     |
|             | 1200 | 喷雾   | 80.4     |
|             | 1600 | 喷雾   | 73.6     |
| 70%代森锰锌     | 500  | 喷雾   | 81.3     |
| 清水          | -    | 喷雾   | 3.9      |