



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108794502 B

(45) 授权公告日 2021.02.05

(21) 申请号 201810597998.6

(22) 申请日 2018.06.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108794502 A

(43) 申请公布日 2018.11.13

(83) 生物保藏信息
CGMCC No.14121 2017.05.08

(73) 专利权人 宁波大学
地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818号

(72) 发明人 丁立建 何山 刘勇 贺小平
金海晓 斯拉瓦·爱泼斯坦

(74) 专利代理机构 宁波奥圣专利代理有限公司
33226

代理人 何仲

(51) Int.Cl.

C07D 493/22 (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12R 1/77 (2006.01)

审查员 杨森

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种单端孢霉烯类化合物及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种单端孢霉烯类化合物及其制备方法和用途,特点是该单端孢霉烯类化合物的结构式如I所示,其制备方法步骤包括将保藏号为CGMCC No.14121的镰刀菌通过微生物发酵培养来获取单端孢霉烯类化合物的发酵物,通过纱布过滤使菌丝体与发酵液分离;然后将菌丝体加入到甲醇中超声破碎,再用乙酸乙酯等体积萃取3次,将萃取物用旋转蒸发器蒸干得到菌体浸膏;将发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取3次,合并收集乙酸乙酯相,将乙酸乙酯相用旋转蒸发器蒸干得到菌液浸膏,合并菌体浸膏和菌液浸膏得到总粗浸膏;最后将总粗浸膏用乙腈溶解后,用半制备反相高效液相色谱进行分离纯化得到,优点是对水产致病菌哈维弧菌具有抑制作用。

1. 一种单端孢霉烯类化合物的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 发酵生产

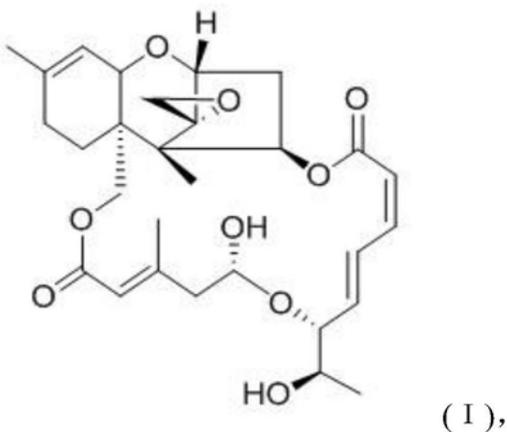
将保藏编号为CGMCC No.14121的镰刀菌 (*Fusarium* sp.) 菌种划线复活,接种到PDB固体培养基,28℃培养箱中活化3天,用接种针从斜面中挑取一个菌落接种到PDB液体培养基中,于28℃,在转速为180rpm的摇床上震荡培养3天得到种子液,然后将种子液以体积比10%的接种量接到PDB液体培养基中,于28℃,在转速为180rpm的摇床上震荡培养12天,获得菌株发酵物,将菌株发酵物通过纱布过滤分离获得菌丝体与发酵液;

(2) 浸膏获取

将步骤(1)得到的菌丝体加入到甲醇中超声破碎,再用乙酸乙酯等体积萃取3次,将萃取物用旋转蒸发器蒸干得到菌体浸膏;将步骤(1)得到的发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取3次,合并收集乙酸乙酯相,将乙酸乙酯相用旋转蒸发器蒸干得到菌液浸膏;将菌体浸膏和菌液浸膏合并得到总粗浸膏;

(3) 化合物I的分离精制

将步骤(2)得到的总粗浸膏用乙腈溶解后,用半制备反相高效液相色谱进行分离纯化得到单端孢霉烯类化合物,其结构如下所示:



其中所述的半制备反相高效液相色谱的洗脱液为乙腈与水按体积65:35的比例混合而成。

2. 根据权利要求1所述的一种单端孢霉烯类化合物的制备方法,其特征在于步骤(1)所述的PDB固体培养基的配制方法如下:将26g马铃薯、35g海盐和20g琼脂溶于1L蒸馏水中;所述的PDB液体培养基的配制方法如下:将26g马铃薯和35g海盐溶于1L蒸馏水中,调pH至7.6-7.8。

3. 一种权利要求1-2中任一项所述的单端孢霉烯类化合物的用途,其特征在于:所述的单端孢霉烯类化合物在用于制备水产致病菌哈维弧菌抑制剂方面的用途。

一种单端孢霉烯类化合物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种单端孢霉烯类化合物,尤其是涉及一种单端孢霉烯类化合物及其制备方法和用途。

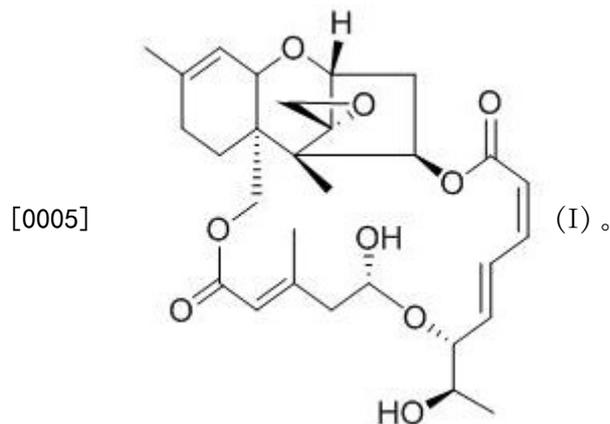
背景技术

[0002] 已报道的单端孢霉烯类化合物具有多方面的生物活性,包括抗肿瘤、抗HIV、抗菌、抗疟、抗白血病、抑制蛋白质的合成、抑制DNA和RNA的合成、免疫抑制、以及用做生物除草剂和杀虫剂等生物活性。本发明人研究得知,海洋真菌液体发酵产物经乙酸乙酯提取,提取物有较好的抗菌活性,于是对其活性成分进行了研究。目前尚未见该化合物结构及抗哈维弧菌活性的报道,因此市场上也尚未见有与此相关的药物。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是提供一种对水产致病菌哈维弧菌具有一定的抑制作用的单端孢霉烯类化合物及其制备方法和用途。

[0004] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种单端孢霉烯类化合物,该化合物的结构式如下I所示:



[0006] 上述单端孢霉烯类化合物的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 发酵生产

[0008] 将保藏编号为CGMCC No. 14121的镰刀菌(*Fusarium* sp.)菌种划线复活,接种到PDB固体培养基,28℃培养箱中活化3天,用接种针从斜面中挑取一个菌落接种到PDB液体培养基中,于28℃,在转速为180rpm的摇床上震荡培养3天得到种子液,然后将种子液以体积比10%的接种量接到PDB液体培养基中,于28℃,在转速为180rpm的摇床上震荡培养12天,获得菌株发酵物,将菌株发酵物通过纱布过滤分离获得菌丝体与发酵液;

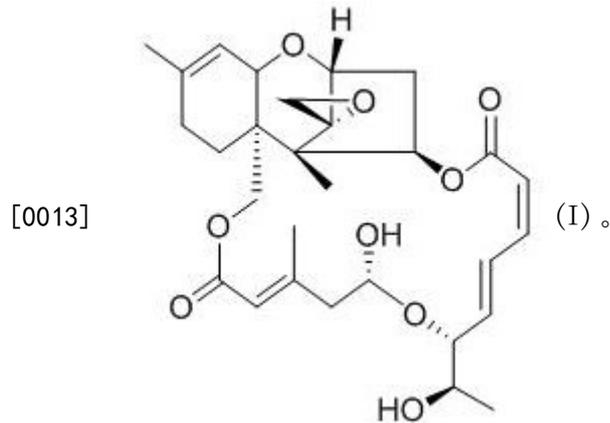
[0009] (2) 浸膏获取

[0010] 将步骤(1)得到的菌丝体加入到甲醇中超声破碎,再用乙酸乙酯等体积萃取3次,将萃取物用旋转蒸发器蒸干得到菌体浸膏;将步骤(1)得到的发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取3次,合并收集乙酸乙酯相,将乙酸乙酯相用旋转蒸发器蒸干得到菌液浸膏;将菌体浸

膏和菌液浸膏合并得到总粗浸膏；

[0011] (3) 化合物I的分离精制

[0012] 将步骤(2)得到的总粗浸膏用乙腈溶解后,用半制备反相高效液相色谱进行分离纯化得到单端孢霉烯类化合物,其结构如下所示:



[0014] 所述的PDB固体培养基的配制方法如下:将26g马铃薯、35g海盐和20g琼脂溶于1L蒸馏水中;所述的PDB液体培养基的配制方法如下:将26g马铃薯和35g海盐溶于1L蒸馏水中,调pH至7.6-7.8。

[0015] 所述的半制备反相高效液相色谱的洗脱液为乙腈与水按体积65:35的比例混合而成。

[0016] 上述单端孢霉烯类化合物的用途,所述的单端孢霉烯类化合物在用于制备水产致病菌哈维弧菌抑制剂方面的用途。

[0017] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明一种单端孢霉烯类化合物及其制备方法和用途,通过海洋真菌发酵培养来获取单端孢霉烯类化合物的发酵物,然后将发酵产物用乙酸乙酯提取,得粗浸膏,将该提取物经反相半制备高效液相色谱分离纯化得到,该单端孢霉烯类化合物具有抗水产致病菌哈维弧菌的作用。

[0018] 上述镰刀菌(*Fusarium* sp.),该菌为Ls-68菌株,保藏编号为CGMCC No.14121,于2017年05月08日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

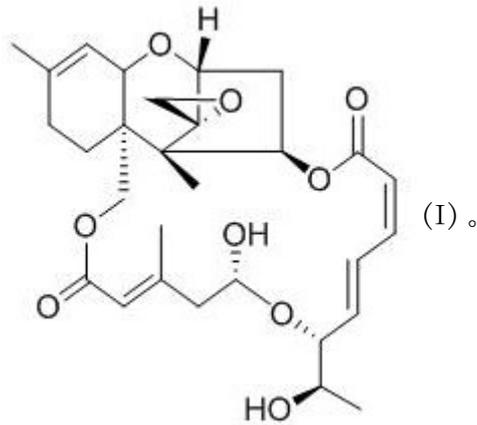
具体实施方式

[0019] 以下结合实施例对本发明作进一步详细描述。

[0020] 实施例一

[0021] 一种单端孢霉烯类化合物,结构式如I所示:

[0022]



[0023] 实施例二

[0024] 如实施例一I式所示的单端孢霉烯类化合物的制备方法,具体包括如下步骤:

[0025] (1) 发酵生产

[0026] 将保藏编号为CGMCC No. 14121的镰刀菌(*Fusarium sp.*)菌种划线复活,接种到PDB固体培养基,28℃培养箱中活化3天,用接种针从斜面中挑取一个菌落接种到PDB液体培养基中,于28℃,在转速为180rpm的摇床上震荡培养3天得到种子液,然后将种子液以体积比10%的接种量接到PDB液体培养基中,于28℃,在转速为180rpm的摇床上震荡培养12天,获得菌株发酵物,将菌株发酵物通过纱布过滤分离获得菌丝体与发酵液;

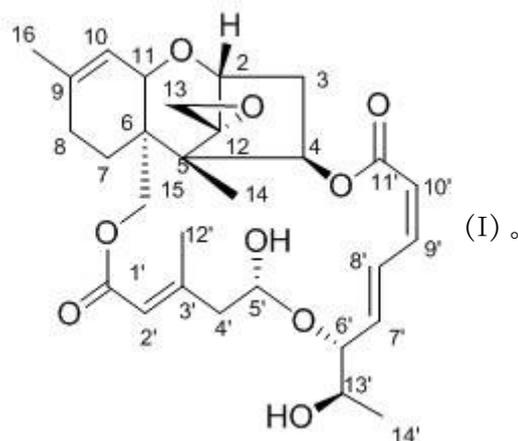
[0027] (2) 浸膏获取

[0028] 将步骤(1)得到的菌丝体加入到甲醇中超声破碎,再用乙酸乙酯等体积萃取3次,将萃取物用旋转蒸发器蒸干得到菌体浸膏;将步骤(1)得到的发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取3次,合并收集乙酸乙酯相,将乙酸乙酯相用旋转蒸发器蒸干得到菌液浸膏;将菌体浸膏和菌液浸膏合并得到总粗浸膏;

[0029] (3) 化合物I的分离精制

[0030] 将步骤(2)得到的总粗浸膏用乙腈溶解后,用半制备反相高效液相色谱进行分离纯化得到单端孢霉烯类化合物,其结构如下所示:

[0031]



[0032] 上述的PDB固体培养基的配制方法如下:将26g马铃薯、35g海盐和20g琼脂溶于1L蒸馏水中;PDB液体培养基的配制方法如下:将26g马铃薯和35g海盐溶于1L蒸馏水中,调pH至7.6-7.8。上述半制备反相高效液相色谱的洗脱液为乙腈与水按体积65:35的比例混合而成。

[0033] 该化合物呈白色固体粉末,分子式为 $C_{29}H_{38}O_9$,HRESIMS m/z 552.9237 $[M+Na]^+$, 1H 和 ^{13}C -NMR数据见表1。

[0034] 表1化合物的 1H 和 ^{13}C NMR数据在 (600MHz和150MHz, in CD_3OD)

[0035]

No.	1H chemical shifts (ppm)	^{13}C chemical shifts (ppm)
2	3.75 (1H, d, 5.1 Hz)	80.5
3	2.51 (1H, dd, 15.3, 8.3 Hz); 2.11 (1H, m)	35.6
4	5.95 (1H, dd, 8.4, 4.3 Hz)	75.5
5		49.6
6		44.4
7	1.90 (2H, m)	21.4
8	2.04 (2H, m)	28.6
9		141.2
10	5.45 (1H, d, 5.3 Hz)	119.8
11	3.90 (1H, d, 5.7 Hz)	68.9
12		66.6
13	3.08 (1H, d, 4.0); 2.87 (1H, d, 4.0 Hz)	64.4
14	0.86 (3H, s)	7.9
15	4.38 (1H, d, 12.4 Hz); 3.98 (1H, d, 12.4 Hz)	64.4
16	1.74 (3H, s)	23.3
1'		167.9
2'	5.79 (1H, d, 11.1 Hz)	118.9
3'		156.9
4'	2.68 (1H, m), 2.28 (1H, d, 3.9 Hz)	48.6
5'	5.57 (1H, dd, 8.6, 3.5 Hz)	102.1
6'	4.08 (1H, m)	83.4
7'	6.14 (1H, dd, 15.2, 2.6 Hz)	137.3
8'	7.67 (1H, dd, 15.1, 11.6 Hz)	126.9
9'	6.70 (1H, t, 11.4 Hz)	144.8
10'	5.79 (1H, d, 11.1 Hz)	120.1
11'		167.9
12'	2.27 (3H, d, 1.2 Hz)	18.3
13'	3.65 (1H, ddd, 8.5, 5.7, 2.6 Hz)	78.2
14'	1.34 (3H, d, 6.0 Hz)	16.6

[0036] 实施例3

[0037] 体外抗菌活性测试 (96孔板抑菌测试)

[0038] (1) 实验样品

[0039] 被测样品溶液的配制:测试样品为上述实施例一中分离纯化的化合物纯品,精密称取适量样品,用甲醇配制成所需浓度的溶液,供测活性。该实验使用的指示菌为常见水产致病菌哈维弧菌。

[0040] (2) 实验方法

[0041] 96 孔板抑菌测试方法:配制培养基后,灭菌两个小时左右,烘干冷却后用于活化菌种。将哈维弧菌接种在LB固体培养基中,37℃下培养 24 小时。将LB固体培养基中菌种接种到LB液体培养基中,于37℃下培养12小时。菌体悬浮液加入96孔板,加入各梯度待检测化合物,待测化合物所用溶剂作为对照组,10.0 μ g/ml苯甲酰磺胺作阳性对照,甲醇溶液为阴

性对照,其中甲醇溶液浓度与被测样品溶液中甲醇浓度相同。37℃培养24小时。待测化合物的浓度分别为2.0μg/ml、4.0μg/ml、6.0μg/ml、8.0μg/ml、10.0μg/ml。24小时之后,测定600nm下吸光值。根据如下公式计算抑制率:抑制率(%)=(OD_R-OD)/(OD_R-OD_B),其中OD_R:菌液对照孔吸光值;OD_B:空白吸光值;OD:样品测定孔吸光值

[0042] (3) 实验结果

[0043] 在96孔板抑菌测试中,不同浓度的化合物I对哈维弧菌的抑制结果见表2:

[0044] 表2不同浓度的化合物对指示菌的抑制率

指示菌	化合物 I				
	2μg/ml	4μg/ml	6μg/ml	8μg/ml	10μg/ml
哈维弧菌抑制率 (%)	2.85	5.84	13.69	22.38	36.26

[0046] 由上表可知化合物I具有显著的抗水产致病菌哈维弧菌的作用,可用于细菌抑制剂方面的研究。

[0047] 上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。