

新型生物杀虫剂——刺糖菌素*

李荣贵 王 普** 梅建凤 沈寅初

(浙江工业大学制药工程研究所 杭州 310032)

摘要: 刺糖菌素是由土壤放线菌多刺糖多孢菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 产生的次级代谢产物, 是一种具有触杀及摄食毒性的广谱杀虫剂。对鳞翅目害虫而言, 刺糖菌素是目前已发现的杀虫剂中选择性最高的化合物之一。文中就刺糖菌素的结构、生物合成、性质以及生产方法进行了综述。

关键词: 刺糖菌素, 多刺糖多孢菌, 生物杀虫剂

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0077-05

A NEW TYPE OF BIOPESTICIDE——SPINOSYN

LI Rong-Gui WANG Pu MEI Jian-Feng SHEN Yin-Chu

(Institute of pharmaceutical engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)

Abstract: Spinosyns are secondary metabolites from the aerobic fermentation of *saccharopolyspora spinosa*. Spinosyn is a kind of broad-spectrum insecticide, which has contact and ingestion toxicity on insects. On lepidopteran insects, spinosad (a mixture of spinosyn A and spinosyn D) is one of the most selective compounds ever discovered. In this paper, the structure, biosynthesis, property and process of spinosyns are reviewed.

Key words: Spinosyn, *Saccharopolyspora spinosa*, Biopesticide

刺糖菌素是由多刺糖多孢菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 产生的次级代谢产物, 其主要活性成份为刺糖菌素 A 组份 (Spinosyn A) 和刺糖菌素 D 组份 (Spinosyn D)。多刺糖多孢菌是一种新型的放线菌^[1], 它是由一位化学家在加勒比海度假时从一个废弃的甘蔗制甜酒厂附近土壤中分离得到的, 通过对其发酵液的抗蚊虫幼虫活性测定发现了刺糖菌素。由美国陶氏益农公司 (Dow Agrosciences Company) 生产的 2.5% 悬浮剂 (商品名: 莱喜) 和 48% 悬浮剂 (商品名: 催杀) 已获得我国农药的临时登记, 分别用于防治甘蓝的小菜蛾和棉花的棉铃虫。

刺糖菌素是一种具有触杀及摄食毒性的广谱杀虫剂, 对鳞翅目害虫的防治效果最好。与一般的杀虫剂相比, 刺糖菌素兼具生物农药的安全性和化学合成农药的快速效

* 浙江省科技厅资助项目 (No. 020121)

** 联系人

收稿日期: 2001-12-19, 修回日期: 2002-04-10

果, 并因其低毒、低残留、对天敌安全、分解快而获得美国“总统绿色化学品挑战奖”。有关刺糖菌素的研究国内尚属空白。

1 刺糖菌素的结构

1990 年, Boeck 等人^[2]首次从多刺糖多孢菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) NRRL-18395 培养液中分离出了刺糖菌素组份 A、B、C、D、E、F、H、J 和刺糖菌素 A 假糖苷配基,

表 1 刺糖菌素各组份结构对照表

组份	R ₁ *	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
刺糖菌素 A	Me	Me	Et	Me	H	Me	Me	Me
刺糖菌素 B	H	Me	Et	Me	H	Me	Me	Me
刺糖菌素 C	H	H	Et	Me	H	Me	Me	Me
刺糖菌素 D	Me	Me	Et	Me	Me	Me	Me	Me
刺糖菌素 E	Me	Me	Me	Me	H	Me	Me	Me
刺糖菌素 F	Me	Me	Et	H	H	Me	Me	Me
刺糖菌素 H	Me	Me	Et	Me	H	H	Me	Me
刺糖菌素 J	Me	Me	Et	Me	H	Me	H	Me
刺糖菌素 K	Me	Me	Et	Me	H	Me	Me	H
刺糖菌素 L	Me	Me	Et	Me	Me	Me	H	Me
刺糖菌素 M	H	Me	Et	Me	H	Me	H	Me
刺糖菌素 N	H	Me	Et	Me	Me	Me	H	Me
刺糖菌素 O	Me	Me	Et	Me	Me	Me	Me	H
刺糖菌素 P	Me	Me	Et	Me	H	Me	H	H
刺糖菌素 Q	Me	Me	Et	Me	Me	H	Me	Me
刺糖菌素 R	H	Me	Et	Me	H	H	Me	Me
刺糖菌素 S	Me	Me	Me	Me	H	H	Me	Me
刺糖菌素 T	Me	Me	Et	Me	H	H	H	Me
刺糖菌素 U	Me	Me	Et	Me	H	H	Me	H
刺糖菌素 V	Me	Me	Et	Me	Me	H	H	Me
刺糖菌素 W	Me	Me	Et	Me	Me	Me	H	H
刺糖菌素 Y	Me	Me	Me	Me	H	Me	Me	H

* R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈ 各基团的位置见图 1。

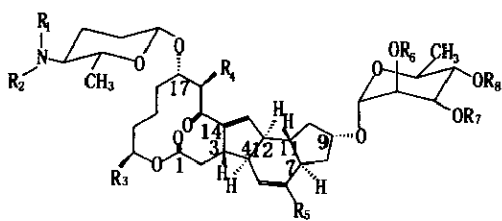


图 1 刺糖菌素的结构通式

面证实了刺糖菌素的结构。从结构上讲, 刺糖菌素属大环内酯类化合物, 但和一般的大环内酯类化合物相反, 刺糖菌素没有抑菌活性, 却有杀虫活性^[9]。刺糖菌素各组份的结构见图 1 和表 1。

2 刺糖菌素的生物合成

与一般的大环内酯类化合物相似, 刺糖菌素也是由乙酸和丙酸单位通过多烯合成

其中刺糖菌素 A 组份约占 85% ~ 90%, D 组份约占 10% ~ 15%, 刺糖菌素 B、C、E、F、H、J 组份和刺糖菌素 A 假糖苷配基均为次要组分。到目前为止, 另外还发现了 15 种刺糖菌素类化合物^[3-5], 包括刺糖菌素组份 K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、Y。

Kirst 等人^[6]通过光谱学 (NMR, MS, UV, IR) 和 X-衍射晶体学方法确定了刺糖菌素 A 的结构, 其母核是由一个 5, 6, 5-顺-反-顺三环和一个十二元的内酯环粘合而成。另外, 一个氨基糖 (β -D-福罗糖胺) 和一个中性糖 (α -L-2, 3,

4-三氧甲基鼠李糖) 分别通过糖苷键连到刺糖菌素 A 的母核上。刺糖菌素其它组分的结构则可通过光谱学方法 (NMR, MS, UV, IR) 以及通过与刺糖菌素 A 的结构加以比较后确定。1998 年, Paquette 等人^[7,8]采用化学方法对刺糖菌素 A 进行了全合成, 虽然这种方法目前尚没有实际应用价值, 但它却从一个侧面

途径进行合成的^[10]，但其合成过程也有独特之处：(1) 3个分子内 C-C 键 (C₃-C₁₄, C₄-C₁₂ 和 C₇-C₁₁) 的形成和环的闭合明显是通过 4 + 2 成环加成反应和羟醛缩合反应或米歇尔缩合反应进行的。(2) L-鼠李糖和 D-福罗糖胺是在内酯化形成糖苷配基后分别连到 9 位和 17 位 (见图 1) 羟基上的，然后，再对鼠李糖的 2, 3, 4-羟基进行甲基化。从刺糖菌素的合成途径来看，其大部分次要组份的形成，可以认为是鼠李糖的氧甲基化程度不同、福罗糖胺的氮甲基化程度不同以及长链脂肪酸中间体在组装过程中乙酸和丙酸单位相互交换的结果。

3 刺糖菌素的物理、化学及生物学性质

3.1 刺糖菌素的物理性质 刺糖菌素的实用性产品为白色或浅灰白色固体，带有一种类似于轻微陈腐泥土的气味，是 85% ~ 88% 的刺糖菌素 A 组份和 12% ~ 15% 的刺糖菌素 D 组份的混合物。熔点：A 组份为 118℃，D 组份为 169℃；蒸气压：A 组份为 3.2×10^{-10} Pa，D 组份为 2.1×10^{-10} Pa；水中溶解度 (mg/L)：A 组份在 pH5、7、9 时分别为 290、235、16，D 组份在 pH5、7、9 时分别为 29、0.332、0.053。

3.2 刺糖菌素的化学性质 酸碱稳定性：在 pH5 ~ 9 范围内，刺糖菌素 A 组份和 D 组份都比较稳定。在温和酸性条件下 (浓盐酸，甲醇，回流 2h)，刺糖菌素 A 和 D 容易分解生成各自的 17 位脱糖基假糖苷配基，在更为剧烈的条件下 (7.2mol/L 硫酸，甲醇，回流 3h)，刺糖菌素 A 会继续脱去 9 位的鼠李糖生成刺糖菌素 A 假糖苷配基，而刺糖菌素 D 则因为分子内重排未能得到刺糖菌素 D 假糖苷配基。环境稳定性^[11]：刺糖菌素在环境中通过多种途径组合的方式进行降解，主要为光降解和微生物降解，最终降解成 C、H、O、N 等自然组分。刺糖菌素由土壤光解作用降解的半衰期为 9 ~ 10d，而水光解作用的半衰期则小于 1d，叶面光降解的半衰期是 1.6 ~ 16d。在无光照条件下，刺糖菌素经有氧土壤代谢的半衰期为 9 ~ 17d。

3.3 刺糖菌素的生物学性质 作用方式：现已知道各类杀虫剂有多种不同的作用方式，包括有机磷和氨基甲酸酯是乙酰胆碱酯酶的抑制剂，滴滴涕和拟除虫菊酯是 Na⁺ 通道的阻断剂，阿维菌素是 γ -氨基丁酸受体 Cl⁻ 通道的激活剂，吡虫啉和烟碱是烟碱型乙酰胆碱受体的拮抗剂，溴虫腈和鱼藤酮是线粒体呼吸作用的抑制剂，而苏云金芽孢杆菌是通过形成内毒素，并结合到昆虫肠细胞膜的高亲和性和特异性受体上，从而干扰 K⁺ 离子依赖性活性氨基酸运输而起作用。电生理实验证明，刺糖菌素作用于昆虫的神经系统^[12,13]，导致非功能性的肌收缩，衰竭，并伴随颤抖和麻痹。刺糖菌素具有影响乙酰胆碱受体的功能，但其作用位点不同于吡虫啉和烟碱。此外，刺糖菌素还可影响 γ -氨基丁酸受体^[9]，但其作用位点与阿维菌素不同。迄今为止，尚未发现某类产品能以相同的方式影响昆虫的神经系统，而且尚无有关刺糖菌素交叉抗性的报道。毒性：根据中国农药毒性分级标准，刺糖菌素属低毒杀虫剂。对哺乳动物低毒：大鼠急性经口 LD₅₀ > 5,000 mg/kg (雌)，3783mg/kg (雄)，小鼠急性经口 LD₅₀ > 5,000mg/kg，兔急性经皮 LD₅₀ > 5,000mg/kg，大鼠急性吸入 LC₅₀ > 5mg/kg；对鸟类低毒：野鸭急性经口 LD₅₀ > 2,000mg/kg，鹌鹑急性经口 LD₅₀ > 2,000mg/kg；对鱼类毒性较低：96h 急性 LC₅₀ 鲟鱼为 30mg/L，蓝鳃鱼为 5.9mg/L，鲤鱼为 5mg/L。另外，对哺乳动物的慢性毒理试验表明刺糖菌素无致畸、致突变、致癌作用。杀虫谱：刺糖菌素属广谱杀虫剂^[12]，它对

鞘翅目、双翅目、同翅目、膜翅目、等翅目、鳞翅目、缨翅目以及螨虫等昆虫都有杀虫活性。对鳞翅目昆虫而言,刺糖菌素是目前已发现的杀虫剂中选择性最高的化合物之一^[11]。此外,它对蓟马、虱、白蚁以及许多双翅目和膜翅目害虫也有较好的效果。

4 刺糖菌素的发酵生产

4.1 菌种特性^[1] 多刺糖多孢菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 属糖多孢菌属,是一种好氧型革兰氏阳性的非抗酸性放线菌。它在大多数培养基(如 ISP2、ATCC172、苹果酸钙等)上都能生长良好,形成气生菌丝体。气生菌丝为粉黄色,营养菌丝为黄色到黄褐色,产浅粉黄色孢子,在某些培养基上则产生白色孢子。孢子链外观为珠状,有孢子壳,孢子壳表面为针状。菌体生长温度为 15℃ ~ 37℃,对溶菌酶敏感,在高渗条件下(11% NaCl)可以生长。

4.2 摇瓶发酵^[2] 将保藏于冷冻干燥管或液氮安瓿瓶中的菌种转接斜面,其成份为酶解酪蛋白、酵母膏、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、葡萄糖和琼脂,接种后的斜面 30℃ 培养 10 ~ 14d。成熟后的斜面孢子用于接种一级营养培养基,成份为酶解酪蛋白、酵母膏、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、葡萄糖和甘油,在 30℃, 250 r/min 振荡培养 48h。然后以 5% 的接种量接种生产培养基,其成份为葡萄糖、胨化牛奶、棉子饼粉、 CaCO_3 和油酸甲酯, 28℃ ~ 30℃, 250r/min 振荡培养 6 ~ 8d 后,用于产物的测定或分离纯化。

4.3 搅拌式生物反应器发酵^[2] 将培养成熟的一级种子培养液以 2.5% 的接种量接种二级种子培养液, 30℃, 250r/min 培养 48h 后,以 5% 的接种量接种装有 115L 生产培养基的 165L 搅拌式生物反应器, 30℃ 发酵 8 ~ 10d。发酵过程中维持溶氧水平 $\geq$ 饱和度浓度的 50%。

4.4 刺糖菌素的分离^[14] 在发酵液中加入等体积的丙酮萃取,过滤,滤液用 NaOH 调 pH 至 10,加入 1/2 发酵液体积的乙酸乙酯,分层后弃去水相,有机相减压浓缩到 1/2 发酵液体积,用 1/2 发酵液体积的酒石酸 (0.1mol/L) 萃取,分层,减压蒸发除去水溶液中可溶性的乙酸乙酯,利用反渗透操作浓缩水溶液,用 NaOH 调节浓缩后水溶液的 pH 值至 10 ~ 11,过滤,分出沉淀物,水洗,真空干燥,得到刺糖菌素成品。

4.5 刺糖菌素的测定 HPLC 是刺糖菌素测定的常用方法,其各个组份都可用 HPLC 进行定性或定量分析。对刺糖菌素 A 组份和 D 组份测定^[15] 时可采用如下 HPLC 系统:色谱柱为 C_{18} 柱;流动相为乙腈、甲醇及水的混合物,其中含少量乙酸铵;检测波长为 250nm。另外, Lee 等人^[16] 还报道了采用荧光免疫测定方法检测刺糖菌素 A 组份。

5 结论与展望

以低毒的新型生物源农药取代目前大量使用的毒性较高的化学农药,已越来越受到重视,并成为研究开发的热点。刺糖菌素是一种新型的微生物源杀虫剂,它的优越性能包括:独特的化学结构和作用方式,对影响经济的重要害虫具有极高的活性,半衰期短,易降解,对哺乳动物、鱼类、鸟类及大多数益虫具有极高的安全界限。由于刺糖菌素的优越性能,使其有望成为新一代杀虫剂的主要品种。该产品的开发具有很好的经济效益和社会效益。

今后的研究方向:(1) 对刺糖菌素进行化学修饰,并对刺糖菌素的构效关系作深

入研究, 以开发出效价更高、杀虫谱更广的刺糖菌素类似物。(2) 利用基因工程手段对多刺糖多孢菌进行转基因研究, 提高刺糖菌素的发酵水平。(3) 利用基因工程手段改变刺糖菌素的代谢途径, 为进一步的结构修饰提供先导化合物。

参 考 文 献

- [1] Mertz F P, Yao R C. *Intl J Syst Bacteriol*, 1990, **44**: 34 ~ 39.
- [2] Boeck L D, Chio H, Eaton T E, *et al.* *Eur Pat Appl*, EP 375 316, 1990.
- [3] Baker P J. U. S. US 5 227 295, 1997.
- [4] Turner J R, Huber Mary L B, Broughton M C, *et al.* U. S. US 5 591 606, 1997.
- [5] Mynderse J R, Baker P J, Mabe J A, *et al.* *PCT Int Appl*, WO 94 20 518, 1994.
- [6] Kirst H A, Michel K H, Martin J, *et al.* *Tetrahedron Lett*, 1991, **32** (37): 4839 ~ 4842.
- [7] Paquette L A, Gao Z, Ni Z, *et al.* *J Am Chem Soc*, 1998, **120**: 2543 ~ 2552.
- [8] Paquette L A, Gao Z, Ni Z, *et al.* *J Am Chem Soc*, 1998, **120**: 2553 ~ 2562.
- [9] Kirst H A, Michel K H, Mynderase J, *et al.* *ACS symp ser*, 1992, **504**: 214 ~ 225.
- [10] Kirst H A. *Pur Appl Chem*, 1998, **70** (2): 335 ~ 338.
- [11] Thompson G D, Dutton R, Sparks T C. *Pest Manage sci*, 2000, **56** (8): 696 ~ 702.
- [12] Salgado V L. *Pestic Biochem Physiol*, 1998, **60** (2): 91 ~ 102.
- [13] Salgado V L, Sheets J J, Watson G B, *et al.* *Pestic Biochem Physiol*, 1998, **60** (2): 103 ~ 110.
- [14] Baker P J. *PCT Int Appl*, WO 91 06 552, 1991.
- [15] West S D, Turner L G. *J Agric Food Chem*, 2000, **48**: 366 ~ 372.
- [16] Lee M, Walt D R, Nugent P. *J Agric Food Chem*, 1999, **47**: 2766 ~ 2770.