

文章编号:1001-6880(2014)7-0990-05

滑桃树种子内生菌 *Streptomyces* sp. WXC 抗菌化合物的分离和结构鉴定

吴 欣*, 魏 博

国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005

摘要:本文对分离自滑桃树种仁的内生菌 WXC 进行初步的分类研究, 其形态特征和系统发育分析表明该菌属于链霉菌属 (*Streptomyces* sp.)。其发酵产物具有抗菌活性, 以抗菌活性为指导, 采用硅胶层析、凝胶层析和反相中压柱层析对 *Streptomyces* sp. WXC 发酵代谢产物进行分离纯化, 得到 2 个吡喃萘醌类化合物, 通过核磁共振、质谱等波谱技术确定它们分别为 frenolicin B(1) 和 deoxyfrenolicin(2)。

关键词:内生菌; *Streptomyces* sp. WXC; 分离纯化; 结构

中图分类号:Q939.13; R931.17

文献标识码:A

Antifungal Compounds from *Trewia nudiflora* Seed Endophytic *Streptomyces* sp. WXC

WU Xin*, WEI Bo

The Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

Abstract: Based on the morphological characteristics and phylogenetic analysis, endophytic strain WXC isolated from the seed of *Trewia nudiflora* was classified as *Streptomyces* sp. The fermentation products of strain WXC showed antifungal activity. Bioactivity-guided fractionations resulted in the isolation of two pyran naphthoquinone compounds, using column chromatography. The structures of compounds 1 and 2 were elucidated respectively as frenolicin B and deoxyfrenolicin according to spectroscopic analyses including NMR and MS.

Key words: endophytic; *Streptomyces* sp. WXC; isolation and purification; structure

滑桃树 (*Trewia nudiflora* L.) 为大戟科滑桃树属植物, 热带大乔木。从该植物中分离到的美登木素类化合物在体外有抗人鼻咽癌的活性, 体内有抗 P338 淋巴白细胞活性, 此外对多种害虫有细胞毒性或昆虫拒食作用^[1-3]。初步研究结果表明其种子、茎皮、果皮的乙醇提取物对一些真菌如橙色青霉 UC-4376 具有明显的抑制作用。我们通过分离滑桃树的内生菌并进行初步的抑菌活性筛选, 挑出具有活性的菌株并对其次生代谢产物进行研究, 期望获得具有抗菌活性的化合物。

在滑桃树内生菌中, 我们筛选到 WXC 菌株, 经形态特征和系统发育分析鉴定为链霉菌 *Streptomyces* sp., 其发酵提取物显示出良好的抗真菌和抗细菌活性, 能抑制橙色青霉、黑曲霉、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌等的生长。采用硅胶层析、凝胶层析和反相中压柱层析, 以滤纸片法抗菌活性检测对

该菌株的次级代谢产物进行活性跟踪分离, 获得 2 个吡喃萘醌类化合物, 通过核磁共振、质谱等波谱技术确定它们分别为 frenolicin B (1) 和 deoxyfrenolicin (2)。本文报道该链霉菌的系统发育分析以及抗菌化合物的分离和结构鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

质谱用 BioESI-Q-TOF (Bruker) 测定; NMR 谱用 Bruker DRX 500 MHz 或者 Bruker DRX 600 MHz 核磁共振仪测定, 四甲基硅烷 (TMS) 为内标。硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析板及柱层析硅胶 (200~300 目), 均为青岛海洋化工厂生产; 反相柱层析填料 RP-18 为 Merck 公司生产; Sephadex LH-20 为 Amersham Pharmacia 公司产品。

滑桃树 (*Trewia nudiflora* L.) 种子采自中国科学院西双版纳热带植物园。菌株 WXC 是由滑桃树无菌苗^[4]中分离到的一株内生菌。用含有赤霉素 (1

mg/mL) 的琼脂培养基诱导滑桃树无菌苗, 当其长到 5~6 cm 时, 将其切成 5 mm 的片段, 置于高氏一号培养基上, 28 °C 培养分离得到 WXC 菌株。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株 WXC 分类学研究

1.2.1.1 形态观察

菌株 WXC 的孢子悬液在高氏 - 天冬素琼脂平板上划线, 斜插无菌盖玻片, 28 °C 培养, 分别于 5、10、20 d 取出盖玻片用光学显微镜及电镜观察菌丝及孢子的表面特征。培养特征采用国际链霉菌规划 (ISP) 推荐的培养基 28 °C 培养, 不同时间观察并记录结果。

1.2.1.2 系统发育分析

菌株总 DNA 提取采用参考文献中推荐的方法^[5]。以总 DNA 为模板, 引物序列如下: 27f(5'-GAGATTGATCCTGGCTCAG-3'); 1495r(5'-CTACG-GCTACCTTGTACGA-3'), Tag 酶进行 PCR 扩增。扩增程序采用: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min; 52 °C 退火 1 min; 72 °C 延伸 3 min; 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物的测序由深圳华大生物科技有限公司完成。测序结果在 NCBI 进行 BLAST 比对, 获得近缘典型菌种序列, 采用国际上通用的邻接法 (NJ)、最大简约法 (MP)、最大似然法 (ML) 和贝叶斯法 (MB) 构建菌株系统发育树。贝叶斯法 (MB) 的分析采用程序 MrBayes version 3.12^[6]; 最大似然法 (ML) 的分析采用程序 PHYML (<http://www.lirmm.fr/guindon/phymml.html>)^[7]; 邻接法 (NJ) 和最大简约法 (MP) 的分析采用程序 PHYLIP package version 3.4 (distributed by Felsenstein, J., Univ. of Washington)。

1.2.2 菌株的发酵培养

从 YMG 培养基斜面上挑取 *Streptomyces* sp. WXC 菌株接种至 YMG 平板, 28 °C 培养 3~4 d 后, 挑取菌体接种至 5 L YMG 培养基平板中, 于 28 °C 培养 8 d。

1.2.3 抗菌活性检测

取 1 mg/mL 的 DMSO 发酵提取物溶液 10 μL, 加到滤纸片上, 置于含橙色青霉 (*Penicillium avellaneum* UC-4376) 的检测平板, 42 °C 培养 42 h, 测量抑菌圈大小, 判断抑菌活性。

1.2.4 发酵产物的提取与分离

将培养物切割成小块状后用乙酸乙酯: 甲醇: 冰乙酸 (80: 15: 5) 的混合溶液提取, 共 3 次, 合并提取

液减压浓缩除去有机溶剂得总提物, 用等体积乙酸乙酯和水充分萃取总提物, 得乙酸乙酯相 1.7 g。

1.7 g 乙酸乙酯相, 甲醇溶解后, 经凝胶柱 (120 g Sephadex LH-20) 层析, 甲醇洗脱, 经 TLC 检测及抑菌活性测试后, 合并得到活性组分 Fr. 1 (311 mg)。活性组分 Fr. 1 经反相中压柱 (80 g RP-18) 层析, 甲醇-水/丙酮-水洗脱 (水; 50% 甲醇, 300 mL; 70% 甲醇, 500 mL; 80% 丙酮, 600 mL; 丙酮), 经 TLC 检测及抑菌活性测试, 合并得到活性组分 Fr. 1-1 (111.2 mg)。Fr. 1-1 再经反相中压柱 (80 g RP-18) 层析, 甲醇-水洗脱 (水; 30%; 70%; 100% 甲醇), 经 TLC 检测及抑菌活性测试, 合并得到活性组分 Fr. 1-1-1 (27 mg) 和 Fr. 1-1-2 (45.6 mg)。Fr. 1-1-1 经正相硅胶柱层析, 石油醚饱和 3 g 硅胶装柱, 石油醚-丙酮 (10: 1) 洗脱, 经 TLC 检测合并得到化合物 1 (5.0 mg) (图 1)。Fr. 1-1-2 经正相硅胶柱层析, 石油醚饱和 3 g 硅胶装柱, 石油醚-丙酮 (10: 1; 5: 1) 洗脱, 经 TLC 检测合并得到化合物 1 (10.2 mg), 化合物 2 (32.0 mg) (图 1)。

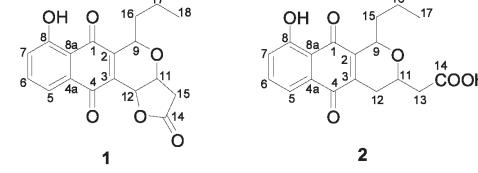


图 1 化合物 1 和 2 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1 and 2

2 结果与讨论

2.1 菌株 WXC 分类学研究

2.2.1 形态及培养特征

菌株 WXC 在高氏-天冬素琼脂上菌落圆形, 直径 1~3 mm, 边缘整齐, 菌落隆起, 表面平坦, 基内菌丝生长丰富, 黄色, 气生菌丝淡黄色, 孢子呈圆柱形, 表面较光滑。培养特征见表 1。

2.2.2 系统发育分析

菌株 WXC 菌株与 NCBI 上的近源典型菌株 (*Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces marokkonensis*, *Streptomyces glaucescens*, *Streptomyces albaduncus* strain JCM 4715, *Streptomyces griseoflavus* subsp. *Pyrinidicus*, *Streptomyces griseoloalbus*, *Streptomyces paradoxus*, *Streptomyces* sp. NRRL 5799, *Streptomyces cinnabarinus* strain NRRL B-12382, *Streptomyces canus*) 的匹配度只有 98%。采用邻接法 (NJ), 最大简约法

表 1 菌株 WXC 的培养特征

Table 1 The cultural characteristics of strain WXC

培养基 Media	生长 (Dia)	气生菌丝 Aerial mycelium	基生菌丝 Substrate mycelium	扩散的色素 Diffusible pigment	
胰蛋白胨酵母提取物琼脂 Tryptone-yeast extract agar (ISP 1)	中等 Moderate	1~3 mm	淡黄 Pale yellow	浅黄 Light yellow	没有 No
酵母麦芽提取物琼脂 Yeast-extract-malt extract agar (ISP 2)	良好 Good	2~4 mm	浅黄 Light yellow	黄色 Yellow	黄色 Yellow
燕麦琼脂 Oatmeal agar (ISP 3)	中等 Moderate	1~3 mm	白色 White	黄色 Yellow	浅黄 Light yellow
无机盐淀粉琼脂 Inorganic salts-starch agar (ISP 4)	弱 Poor	1~2 mm	浅白 Light white	浅白 Light white	没有 No
甘油天门冬素琼脂 Glycerol-asparagine agar (ISP 5)	中等 Moderate	1~3 mm	淡黄 Pale yellow	浅黄 Light yellow	没有 No
蛋白胨酵母提取物琼脂 Peptone-yeast extract-iron agar (ISP 6)	中等 Moderate	2~4 mm	白色 white	黄色 Yellow	没有 No

(MP), 最大似然法(ML)和贝叶斯法(MB)构建菌株 WXC 与其近源典型菌株的系统发育树(图 2)。菌株 WXC 系统发育树节点处的数值是 Bootstrap (1000 次)和马尔可夫链循环次数(10^6 次)(图 2)。该树的外类群是选择了与菌株 WXC 及其它参比菌种关系较远的链霉菌属成员 *Streptomyces canus* 和 *Streptomyces albosporous subsp. Labilomyceticus*; 邻接

法(NJ)构建的系统发育树是以 Jukes-Cantor 模型为基础的,而最大似然法和贝叶斯法均以时间可逆(GTR)模型为基础。根据四种方法获得的系统发育树有着较为一致的拓扑结构,可以确定各种分析手段均支持菌株 WXC 在树中的分枝位置。因此,菌株 WXC 属于链霉菌属,暂定名为 *Streptomyces* sp. WXC。

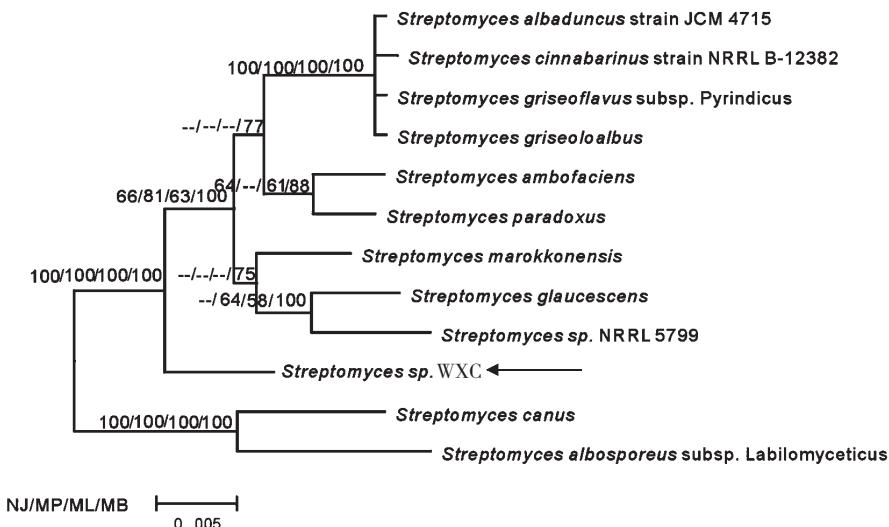


图 2 菌株 WXC 与相关典型菌株的 16S rDNA 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain WXC and representative species of genus *Streptomyces*

2.2 化合物结构鉴定

化合物 1, 黄色粉末。ESI-Q-TOF 测得该化合物的准分子离子峰为 m/z 327, 2034 [M-H]⁻ 和 679, 2021 [2M + Na]⁺, 结合 NMR 的 DEPT 谱得出化合物 1 的分子式为 $C_{18}H_{16}O_6$ 。化合物 1 的¹³C NMR 谱显示有 18 个碳信号,由 DEPT 谱可知分别为 8 个季碳、6 个次甲基、3 个亚甲基和 1 个甲基。根据 HMBC 中甲基质子 δ_H 7.71 与碳 δ_C 124.8d, 161.9s, 181.5s 和 131.5s 的¹H-¹³C 远程相关, δ_H 7.31 与碳

δ_C 119.7d, 161.9s 和 114.9s 的¹H-¹³C 远程相关,以及 δ_H 7.71 与 δ_H 7.69 的¹H-¹H COSY 相关,推断出片段 a(图 3)。根据 HMBC 中甲基质子 δ_H 0.71 与碳 δ_C 33.8t 和 19.5t 的¹H-¹³C 远程相关, δ_H 4.93 与碳 δ_C 66.3d, 135.2s, 149.3s 和 33.8t 的¹H-¹³C 远程相关, δ_H 5.26 与碳 δ_C 66.3d, 135.2s, 188.1s 和 181.5s 的¹H-¹³C 远程相关, δ_H 2.73 与碳 δ_C 66.3d, 68.7d 和 173.8s 的¹H-¹³C 远程相关,推断出片段 b

(图 3)。根据 δ_c 188.1s 和 181.5s 化学位移值推测两个碳上为羰基, HMBC 相关表明片断 a 和 b 通过

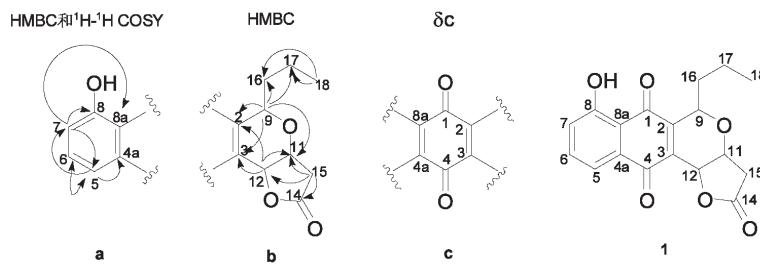


图 3 化合物 1 的结构推导

Fig. 3 Structural elucidation of compound 1

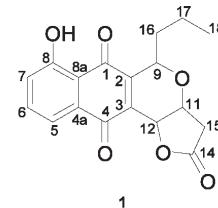
^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 7.71 (1H, m, H-5), 7.69 (1H, m, H-6), 7.31 (1H, dd, J = 1.4, 8.1 Hz, H-7), 4.93 (1H, dd, J = 2.8, 10.5 Hz, H-9), 4.62 (1H, m, H-11), 5.26 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-12), 2.73 (1H, d, J = 17.8 Hz, H-15), 2.99 (1H, dd, J = 5.2, 17.8 Hz, H-15), 1.78 (2H, m, H-16), 1.69 (2H, m, H-17), 1.05 (3H, m, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 188.1 (C-1), 149.3 (C-2), 135.2 (C-3), 181.5 (C-4), 131.5 (C-4a), 119.7 (C-5), 137.1 (C-6), 124.8 (C-7), 161.9 (C-8), 114.9 (C-8a), 69.7 (C-9), 66.3 (C-11), 68.7 (C-12), 173.8 (C-14), 36.8 (C-15), 33.8 (C-16), 19.5 (C-17), 13.5 (C-18)。

化合物 2, 黄色粉末。ESI-Q-TOF 测得该化合物的准分子离子峰为 m/z 329.1015 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, 结合 NMR 的 DEPT 谱得出化合物 2 的分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 。化合物 2 的 ^{13}C -NMR 谱显示, 比化合物 1 少了一个氧化的次甲基和酮基, 但多了一个亚甲基和羧基。因此根据 HMQC 及化合物 1 的核磁数据, 并结合文献数据^[8], 鉴定该化合物为化合物 1 的衍生物, deoxyfrenolicin。

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 7.70 (1H, m, H-5), 7.64 (1H, m, H-6), 7.31 (1H, dd, J = 1.4, 8.1 Hz, H-7), 4.87 (1H, m, H-9), 4.32 (1H, m, H-11), 1.81 (1H, m, H-12), 2.88 (1H, dd, J = 2.1, 16.9 Hz, H-12), 2.73 (2H, m, H-13), 1.82 (2H, m, H-15), 1.69 (1H, m, H-16), 1.58 (1H, m, H-16), 1.03 (3H, t, H-17); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 188.4 (C-1), 145.8 (C-2), 137.1 (C-3), 182.9 (C-4), 131.8 (C-4a), 119.2 (C-5), 136.3 (C-6), 124.5 (C-7), 161.6 (C-8), 114.8 (C-8a), 70.9 (C-9), 63.1 (C-

这两个羰基联接起来形成完整的化合物 1 结构, 与文献数据比较^[8], 表明该化合物为 frenolicin B。

8c



11), 27.8 (C-12), 40.3 (C-13), 174.8 (C-14), 34.6 (C-15), 19.3 (C-16), 13.6 (C-17)。

2.3 讨论

本研究以药用植物内生菌 WXC 为研究对象, 通过对菌株 WXC 形态特征和培养特征的观察以及 16S rDNA 序列分析表明 WXC 为链霉菌属。链霉菌 WXC 与其近源典型菌株的匹配度只有 98%。根据四种方法获得的系统发育树有着较为一致的拓扑结构, 在菌株 WXC 的分枝节点都是 100% 的一致重复结果。

frenolicin B 和 deoxyfrenolicin 为该菌种主要的抑菌活性成分, 都属于吡喃萘醌类化合物。有研究表明, deoxyfrenolicin 是产生 frenolicin B 过程中的副产物, 在空气中氧化可生成 frenolicin B^[9]。二者对支原体和真菌都有较好的生物活性, 高浓度时, deoxyfrenolicin 较 frenolicin B 抗真菌活性高; 低浓度时, frenolicin B 较 deoxyfrenolicin 抗真菌活性高; 而 frenolicin B 的抗支原体活性不如 deoxyfrenolicin^[10]。frenolicin B 对动物的球虫病有很好的疗效, 主要作为饲料添加剂来预防鸡和猪的球虫病^[9,11]。通过以上研究发现药物植物内生菌活性成分的结构类型, 为进一步从植物中寻找具有广泛生物、生理活性的药物先导化合物打下了基础。

参考文献

- Powell RG, Smith CR, Plattner RD, et al. Additional new maytansinoids from *Trewia nudiflora*: 10-epiterwiasine and norterwiasine. *J Nat Prod*, 1983, 46: 660-666.
- Powell RG, Weisleder D, Smith CR. Novel maytansinoid tumor inhibitors from *Trewia nudiflora*: trewiasine, dehydro-trewiasine, and demethyltrewiasine. *J Org Chem*, 1981, 46: 4398-4403.