

植物内生链霉菌 KIB-271 抗植物病原真菌活性成分研究

董 淼^{1,2}, 杨凤仙², 罗剑英², 黄胜雄², 马亚团^{2,3*}, 李蓉涛^{1*}¹昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500; ²中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201; ³西北农林科技大学理学院, 杨凌 712100

摘要: 利用硅胶柱层析和制备型高效液相色谱等方法从来自杜鹃花科植物的一株内生链霉菌 *Streptomyces* sp. KIB-271 的发酵液中分离得到 4 种戊二酰亚胺类化合物, 通过分析其理化性质和波谱数据, 分别鉴定为 cycloheximide (**1**)、iso-cycloheximide (**2**)、2,6-二酮-4-[(*E*)-2'-((3''*S*, 5''*S*)-3'', 5''-二甲基-2''-酮-环亚己基)]-乙基-哌啶 (**3**) 和 2,6-二酮-4-[(*E*)-2'-((3''*R*, 5''*S*)-3'', 5''-二甲基-2''-酮-环亚己基)]-乙基-哌啶 (**4**), 其中, **4** 为首次从天然产物中分离得到。抗菌试验研究表明化合物 **1** 对多株植物病原真菌具有明显的抗菌活性, 可能是 *Streptomyces* sp. KIB-271 代谢产物的主要活性物质之一。

关键词: 植物内生菌; 次级代谢产物; 波谱数据; 抗菌活性

中图分类号: R914.4, R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.002

Secondary Metabolites from an Endophytic *Streptomyces* sp. KIB-271 and Their Anti-fungus Activity

DONG Miao^{1,2}, YANG Feng-xian², LUO Jian-ying², HUANG Sheng-xiong², MA Ya-tuan^{2,3*}, LI Rong-tao^{1*}¹ *Kunming University of Science and Technology, The Faculty of Life Science and Technology, Kunming 650500, China;*² *State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;* ³ *College of Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China*

Abstract: Four heterocyclic glutarimide antibiotics, namely cycloheximide (**1**), iso-cycloheximide (**2**), 4-[2'-((3''(*S*), 5''(*S*)-3'', 5''-dimethyl-2''-oxocyclohexylidene) ethyl] piperidine-2,6-dione (**3**), and 4-[2'-((3''(*R*), 5''(*S*)-3'', 5''-dimethyl-2''-oxocyclohexylidene) ethyl] piperidine-2,6-dione (**4**), were isolated from the endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. KIB-271. Their structures were identified through mass spectrometry and NMR experiments. Among them, compound **4** was reported for the first time as a natural product. In the antimicrobial experiments, **1** exhibited obvious antifungal activity *in vitro* against most of the tested fungus, and was considered as one of the main antimicrobial constituent from *Streptomyces* sp. KIB-271.

Key words: endophyte; secondary metabolites; spectrometry; antimicrobial

在天然产物的来源中, 微生物是除植物外一类具有丰富次级代谢产物的主要来源。据统计, 从微生物中获得的 34000 种天然活性物质中, 35% 以上来源于放线菌, 其中链霉菌属 (*Streptomyces*) 为主要贡献者^[1]。目前从微生物中分离得到的结构新颖或具有生物活性的化合物中, 植物内生菌来源的占 51%, 而从土壤微生物中分离的仅占 38%^[2]。因此, 人们逐渐把目光投向以前研究较少的植物内生菌, 以期寻找结构新颖的活性物质。

本研究从云南昆明植物园采集的大白花杜鹃 (*Rhododendron decorum* Franch.) 植株中分离得到一株链霉菌, 命名为 *Streptomyces* sp. KIB-271。在前期的发酵液活性筛选实验中, 我们发现其发酵液提取物有明显的抑菌活性。因此, 我们选取该菌株进行大量发酵并对发酵液中的次级代谢产物进行提取分离, 得到了 4 个主要化合物。通过分析其理化性质和波谱数据, 分别将其鉴定为 cycloheximide (**1**)、iso-cycloheximide (**2**)、2,6-二酮-4-[(*E*)-2'-((3''*S*, 5''*S*)-3'', 5''-二甲基-2''-酮-环亚己基)]-乙基-哌啶 (**3**) 和 2,6-二酮-4-[(*E*)-2'-((3''*R*, 5''*S*)-3'', 5''-二甲基-2''-酮-环亚己基)]-乙基-哌啶 (**4**) (见图 1), 其中化合物 **1** 显示明显的抗真菌活性, **4** 为首次从天然产物中分离得到。

收稿日期: 2015-09-09 接收日期: 2015-12-23

基金项目: 国家自然科学基金 (21262021); 中央高校基本科研业务费专项资金 (QN2013039)

* 通讯作者 Tel: 86-871-65920569; E-mail: rongtaolkm@163.com

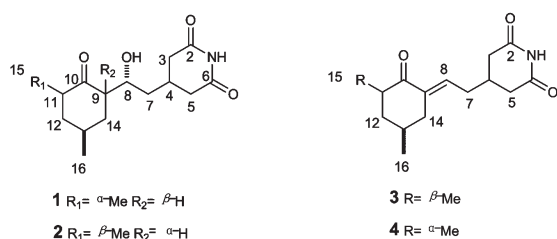


图1 化合物1~4的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-4

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Bruker Avance III-600 型核磁共振仪; Bruker AV-400 型核磁共振仪; Waters Xevo TQ-S 型超高压液相三重四极杆联用质谱仪; LC 3000 型高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司生产); Hitachi Chromaster 5430 型高效液相色谱仪; YMC-Triat C_{18} 型液相色谱柱(250 × 10 mm I. D.); 柱层析硅胶 G, 200~300 目(青岛海洋化工厂生产); 柱层析硅胶 RP18, 230~400 目(德国 EMD 化学试剂公司生产); 其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 菌株

发酵菌株 *Streptomyces* sp. KIB-271 是从采自昆明植物园(东经 102°45', 北纬 25°9') 的大白花杜鹃植株中分离得到的菌株, 通过 16S RNA 测序分析, 确定其为链霉菌属。现保存于昆明植物研究所植物化学与西部植物资源可持续利用国家重点实验室。病原菌株由西北农林科技大学鉴定并提供, 菌株保存在昆明植物研究所植物化学与西部植物资源可持续利用国家重点实验室。

1.3 培养基及培养条件

固体培养基: 为 MS 培养基, 配方为大豆粉 20 g/L(煮沸过滤取滤液), 甘露醇 20 g/L, 技术琼脂粉 20 g/L, pH = 7.0。

种子培养基: 为 TSB 培养基, 配方为胰蛋白胨 17 g/L, 大豆蛋白胨 3 g/L, 氯化钠 5 g/L, 磷酸氢二钾 2.5 g/L, 右旋葡萄糖 2.5 g/L, pH = 7.3 ± 0.2。

发酵培养基: 蔗糖 50 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 酪蛋白氨基酸 0.1 g/L, 酵母提取物 5 g/L, Mops 21 g/L, Trace elements 1 mL/L, K_2SO_4 0.25 g/L, $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 10 g/L, pH = 7.2。

将在 MS 平板上活化好的菌株接种到 10 只装有 50 mL 种子液的 250 mL 三角摇瓶中, 置于 28 °C, 250 rpm 摇床上培养 2 d。

将种子液按 4% 接种量转接到 50 只盛有 250 mL 发酵培养基的 1 L 三角瓶中, 置于 28 °C, 250 rpm 摇床上培养 5 d。

1.4 提取与分离

收集发酵液, 于 6000 rpm 转速下离心 20 min。上清液用等体积的乙酸乙酯萃取三次, 菌丝体用 500 mL 丙酮浸泡过夜后过滤, 有机相减压浓缩。经 HPLC 分析, 合并乙酸乙酯与丙酮相, 用无水硫酸钠干燥, 有机相减压浓缩, 得到 2 g 粗提物。粗提物经硅胶柱层析, 用石油醚-乙酸乙酯(100:0, 50:50, 0:100), 氯仿-甲醇(50:50) 及甲醇(100:0) 梯度洗脱, 共得到 5 个组分(Fr. A ~ Fr. E)。用 RP-18 分离极性段 Fr. B 的成分, 分离方法为: 25% ~ 50% ~ 75% ~ 100% 甲醇-水梯度洗脱, 得到五个极性段(FB-1 ~ FB-5)。其中 FB-1 经高效液相色谱制备, 用 55% 甲醇-水等度洗脱, 得到两个化合物, 分别是 1(4.1 mg) 和 2(2.0 mg)。FB-2 经高效液相色谱制备, 以 55% 甲醇-水等度洗脱, 得到化合物 3(2.7 mg) 和 4(2.3 mg)。

1.5 抗菌敏感性试验

按照文献中的有关规程操作^[3], 采用滤纸片法测定化合物 1~4 对大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 8099)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)、酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、斜卧青霉(*Penicillium decumbens* ATCC 10436)、小麦赤霉病菌(*Gibberella saubinetti*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium coeruleum*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、苹果腐烂病(*Valsa mali Miyabe*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌 1(*Fusarium oxysporum* Schl.)、尖孢镰刀菌 2(*Fusarium oxysporum*) 和大丽轮枝菌(*Verticillium dahlia*) 十五种病原菌的抑菌圈。试验中, 每个化合物浓度配制为 5 μg/mL, 并以制霉菌素为阳性对照, 加入等体积 50% DMSO-无菌水的滤纸片为阴性对照, 不接菌悬液的固体平板为空白对照。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1 无色粘稠固体; 分子式为 $C_{15}H_{23}NO_4$; ESI-MS m/z : 282 $[M+H]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 8.49 (1H, s, 1-NH), 4.19 (1H, dd, $J =$

12.8, 3.2 Hz, H-8), 2.78 (1H, dd, $J = 16.8, 3.9$ Hz, H-5a), 2.76 (1H, dd, $J = 12.5, 2.8$ Hz, H-3a), 2.65 (1H, m, H-11), 2.51 (1H, m, H-9), 2.46 (1H, m, H-4), 2.34 (1H, dd, $J = 12.2, 3.3$ Hz, H-3b), 2.33 (1H, m, H-5b), 2.18 (1H, m, H-13), 1.93 (1H, m, H-12b), 1.90 (1H, m, H-14a), 1.81 (1H, m, H-14b), 1.63 (1H, dd, $J = 10.3, 7.0$ Hz, H-7a), 1.61 (1H, m, H-12a), 1.22 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-16), 1.21 (1H, dd, $J = 10.7, 3.7$ Hz, H-7b), 0.97 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 216.7 (C-10), 172.8 (C-6), 172.6 (C-2), 66.6 (C-8), 50.2 (C-9), 42.7 (C-12), 40.6 (C-11), 38.5 (C-3), 38.0 (C-7), 37.3 (C-5), 33.1 (C-14), 27.6 (C-4), 26.8 (C-13), 18.4 (C-16), 14.3 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 确定化合物 **1** 为 cycloheximide。

化合物 2 白色固体; 分子式为 C₁₅H₂₃NO₄; ESI-MS m/z : 282 [M + H]⁺; ^1H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 8.32 (1H, s, 1-NH), 3.78 (1H, m, H-8), 2.79 (1H, dd, $J = 17.2, 4.2$ Hz, H-5a), 2.74 (1H, dd, $J = 13.7, 7.8$ Hz, H-3a), 2.53 (1H, m, H-4), 2.46 (1H, m, H-11), 2.38 (1H, dd, $J = 13.5, 6.9$ Hz, H-3b), 2.32 (1H, dd, $J = 17.4, 4.3$ Hz, H-5b), 2.28 (1H, m, H-9), 2.05 (1H, dd, $J = 9.5, 4.5$ Hz, H-12a), 2.03 (1H, m, H-13), 1.97 (1H, m, H-14a), 1.56 (1H, dd, $J = 10.5, 2.5$ Hz, H-7a), 1.42 (1H, dd, $J = 10.0, 2.2$ Hz, H-7b), 1.21 (1H, m, H-14b), 1.11 (1H, m, H-12b), 0.99 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-16), 0.97 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 217.1 (C-10), 172.6 (C-6), 172.4 (C-2), 68.9 (C-8), 55.4 (C-9), 45.2 (C-11), 44.9 (C-12), 39.5 (C-14), 38.8 (C-3), 38.5 (C-7), 37.0 (C-5), 27.0 (C-4), 31.6 (C-13), 21.2 (C-16), 14.2 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 确定化合物 **2** 为 *iso*-cycloheximide。

化合物 3 淡黄色粘稠固体; 分子式为 C₁₅H₂₁NO₃; ESI-MS m/z : 264 [M + H]⁺; ^1H NMR CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.80 (1H, s, 1-NH), 6.42 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-8), 2.73 (1H, brd. t, $J = 7.6$ Hz, H-5a), 2.70 (1H, brd. t, $J = 7.4$ Hz, H-3a), 2.59 (1H, dd, $J = 13.2, 6.3$ Hz, H-14a), 2.56 (1H, m, H-11), 2.34 (1H, m, H-5b), 2.31 (1H, m, H-3b), 2.23 (1H, m, H-13), 2.21-2.11 (2H, m, H-7), 2.06 (1H, m, H-14b), 2.02 (1H, m, H-4), 1.75-1.66 (2H, m,

H-12), 1.14 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-15), 1.06 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16); ^{13}C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 203.7 (C-10), 171.5 (C-2 and C-6), 138.5 (C-9), 132.7 (C-8), 40.6 (C-11), 38.3 (C-12), 37.6 (C-3 and C-5), 34.9 (C-14), 32.6 (C-7), 30.3 (C-13), 26.0 (C-4), 21.2 (C-16), 17.3 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[6,7], 确定化合物 **3** 为 2,6-二酮-4-[(*E*)-2'-((3''*S*,5''*S*)-3'',5''-二甲基-2''-酮-环亚己基)]-乙基-哌啶。

化合物 4 淡黄色粘稠固体; 分子式为 C₁₅H₂₁NO₃; HR-ESI-MS m/z 286.1418 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₅H₂₁NO₃, 263.1521); ^1H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.81 (1H, br s, 1-NH), 6.35 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 2.73 (1H, m, H-5b), 2.71 (1H, dd, $J = 12.2, 6.0$ Hz, H-3a), 2.70 (1H, m, H-14a), 2.39 (1H, m, H-11), 2.34 (1H, brd. t, $J = 6.1$ Hz, H-5a), 2.33 (1H, dd, $J = 11.7, 6.0$ Hz, H-3b), 2.23 (1H, m, H-4), 2.20-2.16 (2H, m, H-7), 1.97 (1H, m, H-12a), 1.91 (1H, m, H-14b), 1.87 (1H, m, H-13), 1.27 (1H, m, H-12b), 1.13 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-15), 1.05 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-16); ^{13}C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 203.2 (C-10), 171.2 (C-2 and C-6), 139.2 (C-9), 131.8 (C-8), 44.2 (C-11), 40.9 (C-12), 37.6 (C-5), 37.5 (C-3), 36.4 (C-14), 32.6 (C-7), 30.5 (C-13), 30.3 (C-4), 22.2 (C-16), 15.9 (C-15)。其核磁数据与文献报道基本一致^[6], 确定化合物 **4** 的结构为 2,6-二酮-4-[(*E*)-2'-((3''*R*,5''*S*)-3'',5''-二甲基-2''-酮-环亚己基)]-乙基-哌啶。

化合物 **3** 和 **4** 的绝对构型的鉴定是根据文献^[6]中相应化合物的数据, 在化合物 **3** 和 **4** 的碳谱中, C-11 的化学位移区别比较明显, 化合物 **3**: δ : 40.6 (C-11), 而化合物 **4**: δ : 44.2 (C-11), 这是因为 11 位 C 上的甲基的不同构型导致的。在氢谱中, H-12 的化学位移比较明显, 化合物 **3**: δ : 1.75-1.66 (2H, m, H-12), 而化合物 **4** 中 12 位的 H 裂分为两组信号: δ : 1.97 (1H, m, H-12a) 和 1.27 (1H, m, H-12b)。因为 11 位为 β -Me 时, 其与 16 位的 α -Me 对 12 位的不同方向的两个 H 产生不同方向的耦合, 所以最终 H-12 的两个 H 化学位移差别不大。而当 11 位为 α -Me 时, 其与 16 位的 α -Me 对 12 位的两个不同方向的 H 产生同方向耦合, 所以产生了两组不同的化学位移。以上区别与文献^[6]报道的完全一致, 所以在全部数据基本相同的基础上, 化合物 **3** 和 **4** 的绝对

构型得以确立。

2.2 化合物抗菌活性

抗菌敏感性试验结果显示,化合物 **1** 对九个植物病原真菌表现出明显的抑菌效果,四个化合物对

金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均没有表现出抑制作用;化合物 **2**、**3** 和 **4** 对所选测试真菌均没有表现出明显的抑制活性(见表 1)。

表 1 化合物 **1** 的抗菌活性
Table 1 Antifungal activities of compound **1**

化合物 Compound	抑菌圈直径(对照:制霉菌素) diameter of inhibition zones (nystafungin, mm)								
	酵母菌 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	斜卧青霉 <i>Penicillium decumbens</i> ATCC 10436	马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium coeruleum</i>	尖孢镰刀菌 1 <i>F. oxysporum</i> Schl	尖孢镰刀菌 2 <i>F. oxysporum</i>	腐皮镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i> (Hebert) Barr	小麦赤霉病菌 <i>Gibberella saubineti</i>	棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Vasinfectum</i> .
1	22(15)	9(18)	16(10)	26(20)	10(17)	25(22)	10(25)	17(22)	12(11)

3 讨论

本文分离得到的 4 个代谢产物中,化合物 **1**、**2** 和 **3** 最初是从放线菌中分离得到的抗生素^[5-7],随后的活性研究中发现化合物 **1** 能抑制大多数真核细胞的蛋白合成^[8],故其全合成、生物合成及衍生物的发现与合成都成为了热点^[9]。化合物 **4** 于 2009 年首次通过衍生化得到^[6],而本实验是首次从天然产物中分离得到。通过初步的抗菌敏感性试验,化合物 **1** 对九株测试真菌表现出很好的抑制活性,而且其表现出对真菌的专一抗性,我们推测化合物 **1** 可能是链霉菌 *Streptomyces* sp. KIB-271 次级代谢产物中的主要活性物质之一,其广谱的抗植物病原真菌的活性,可为后期寻找生物农药前体提供一定依据。推测其生源途径,可认为化合物 **3** 和 **4** 是由 **2** 和 **1** 分别脱去一分子水得到,但是只有化合物 **1** 表现出抗真菌活性,说明抗菌活性可能与其 8-OH 和 9-H 的存在和及构型有关,有待进一步研究。

参考文献

- Bérdy J. Thoughts and facts antibiotics; Where we are now and where we are heading. *J Antibiot*, 2012, 65:385-395.
- Schutz B, Boyle C, Draeger S, et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabo-

lites. *Mycol Res*, 2002, 106:996-1004.

- Fang ZD (方中达). Methodology for Plant Pathology(植病研究方法). Beijing:China Agricultural Press, 1998.
- Shi NN, Lu CH, Coy Choke Ho, et al. Kitasatodine and kitasatopenoid from *Kitasatospora* sp. H6549, a new strain from Malaysia. *Rec Nat Prod*, 2013, 7 (1):1-5
- Jeffs PW, McWilliams D. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of the biosynthesis of cycloheximide. stereospecific incorporation of malonate into the glutarimide ring. *J Am Chem Soc*, 1981, 103:6185-6192.
- Guo HF, Li YH, Yi H, et al. Synthesis, structures and anti-HBV activities of derivatives of the glutarimide antibiotic cycloheximide. *J Antibiot*, 2009, 62:639-642.
- Han B, Cui CB, Cai B, et al. (-)-Anhydrocycloheximide, a new cell cycle inhibitor, and cycloheximide produced by *Streptomyces flavoretus*. *Chin J Med Chem*, 2004, 14: 370-372.
- Guo HF (郭会芳), Li YH (李玉环), Tao PZ (陶佩珍), et al. Antiviral activities of cycloheximide and its derivatives. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45:268-273.
- Yin M, Yan YJ, Lohman JR, et al. Cycloheximide and actiphenol production in *Streptomyces* sp. YIM56141 governed by single biosynthetic machinery featuring an acyltransferase-less type I polyketide synthase. *Org Lett*, 2014, 16: 3072-3075.