

伯氏致病杆菌 SN52 次生代谢产物的分离纯化及结构鉴定

田晓美¹, 卢星忠¹, 王 宁¹, 席雪冬¹, 于志国^{1,2*}¹沈阳农业大学植物保护学院; ²辽宁省生物农药工程技术研究中心, 沈阳 110866

摘要: 采用硅胶柱层析、凝胶 LH-20 柱层析和半制备高效液相色谱技术对伯氏致病杆菌 SN52 的次生代谢产物进行分离纯化, 得到 6 个单体化合物。通过波谱综合解析和文献数据对照方法对所分离到的化合物进行结构鉴定。结果显示, 均为吲哚类化合物, 其中 5 个为已知化合物, 鉴定为: xenocylins A(1)、xenocylins B(2)、xenocylins C(3)、xenocylins D(4)、xenocylins E(5); 1 个为新化合物, 命名为 xenocylins F(6)。

关键词: 致病杆菌; 次生代谢产物; 吲哚; 化合物

中图分类号: S482.7

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.004

Isolation and Identification of Secondary Metabolites from *Xenorhabdus bovienii* SN52

TIAN Xiao-mei¹, LU Xing-zhong¹, WANG Ning¹, XI Xue-dong¹, YU Zhi-guo^{1,2*}¹College of plant protection, Shenyang Agricultural University;²Engineering & technological research center of biopesticide, Shenyang 110866C, China

Abstract: Six indole derivatives were isolated and purified from secondary metabolites of *Xenorhabdus bovienii* SN52 by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography and semi-preparative high-performance liquid chromatography. Their chemical structures were elucidated by spectroscopic technologies including nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectroscopy (MS), and were identified as xenocylins A (1), xenocylins B (2), xenocylins C (3), xenocylins D (4), xenocylins E (5) and xenocylins F (6), in which 6 was a new compound.

Key words: *Xenorhabdus*; secondary metabolites; indole; compound

昆虫病原线虫共生菌属于肠杆菌科^[1] (*Enterobacteriaceae*), 包括发光杆菌和致病杆菌两个属。其中发光杆菌与异小杆线虫共生, 致病杆菌与斯氏线虫共生。由于昆虫病原线虫共生菌能够产生丰富的次级代谢产物^[2], 使其作为新型抗生素来源而受到越来越多的关注。致病杆菌由斯氏线虫携带进入被寄生昆虫体内^[3], 导致患败血症并在 48 h 内死亡。在昆虫寄主体内, 细菌大量的繁殖, 分解昆虫有机体, 一方面为线虫提供营养, 使线虫大量繁殖, 另一方面, 细菌分泌多种代谢产物, 来保护虫体免受其它竞争者的侵染^[4]。目前为止, 在致病杆菌中分离的化合物主要分为两类, 一类是非蛋白质类小分子化合物, 如 indoles^[5-7], nematophin^[8], benzylideneacetone^[9], xenofuranones^[10], xenocoumacin^[11] 和 xenorhabdins^[12], 这些化合物对革兰氏阳性菌具有很

强的抑菌活性, 对马铃薯晚疫病菌、灰霉病菌也具有很强的抑制作用^[5]。另一类是蛋白类大分子化合物, 如: PAX 3^[13], xentrivalpeptides^[14], szentiamide^[15], cabanillasin^[16], chaiyafumines^[17] 和 taxllalids^[18], 这类物质具有明显的杀虫作用。目前致病杆菌已经成为新型抗生素的重要来源之一^[19,20]。

本文利用现代色谱技术对 *Xenorhabdus bovienii* SN52 发酵液的固相提取物进行了分离纯化, 得到 6 个单体化合物。通过波谱综合解析和文献数据对照方法对所分离到的化合物进行结构鉴定。发现有 5 个化合物为已知化合物, 1 个为新化合物, 这为开发新型抗生素提供了理论依据。

1 仪器与材料

1.1 菌株和培养基

伯氏致病杆菌 SN52 是沈阳农业大学植物保护学院微生物次生代谢产物研究室保存的已鉴定菌株。NBTA 培养基: 牛肉膏 3.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L

L, 氯化钠 5.0 g/L, 琼脂粉 15 g/L, 氯化三苯基四氮唑 0.040 g/L, 溴百里酚蓝 0.025 g/L, 蒸馏水 1 L; LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L 蒸馏水 1 L; M 培养基: 葡萄糖 6.13 g/L, 蛋白胨 21.29 g/L, MgSO₄ 1.50 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.46 g/L, KH₂PO₄ 0.86 g/L, K₂HPO₄ 1.11 g/L, NaSO₄ 1.72 g/L, 蒸馏水 1 L。pH 均为 7.0~7.2。

1.2 主要试剂和仪器

甲醇、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、氯仿、甲酸(国药集团化学试剂有限公司), 色谱甲醇(美国 Sigma-Aldrich 公司), 柱层析硅胶(青岛海洋化工厂), Sephadex LH-20 柱层析凝胶(瑞典 Pharmacia 公司), XAD-16 大孔树脂(罗门哈斯国际贸易有限公司), 暗箱四用紫外线分析仪(上海嘉鹏科技有限公司), 旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司), Agilent 1260 型液相色谱仪(美国 Agilent 公司), AP-300 型自动旋光仪(日本 Atago 公司), Agilent 6540 飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司), AV-600 Hz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司)。

2 提取与分离

2.1 菌株的培养及发酵

将保存在 -80 °C 超低温冰箱中的 SN52 菌株接种在 NBTA 固体鉴别培养基上, 28 °C, 培养 48 h, 挑取初生型蓝色单菌落, 转接到装有 20 mL LB 培养基的 100 mL 三角瓶中, 28 °C、180 rpm 振荡培养 24 h, 将其作为下一步发酵的种子培养液; 事先将 20 g 树脂分装到装有 400 mL M 培养基的 2 L 三角瓶中, 进行灭菌。以 8% 的接种量, 将种子液接种于此三角瓶中, 相同条件下发酵 5 d。

2.2 次生代谢产物的提取、分离和纯化

45 L 伯氏致病杆菌 SN52 发酵液, 采用蒸馏水洗涤的方法, 收集树脂并在 28 °C 条件下烘干。烘干后的树脂装入 2 L 的分液漏斗中, 用甲醇提取 4 次, 合并提取液。减压浓缩得到发酵粗提物。将发酵粗提物用 0.5 L 50% 甲醇水溶液进行分散, 而后用 2 倍体积二氯甲烷萃取 4 次, 合并二氯甲烷萃取液, 减压浓缩得到粗提物浸膏 20 g。为下一步分离纯化备用。

利用薄层层析法(TLC)来筛选柱层析的洗脱条件, 根据粗提物的极性, 选用几种极性差别较大的溶剂按照不同体积比配置混合液作为展开剂。二氯甲烷: 甲醇(=8:2, 95:5), 石油醚: 乙酸乙酯(=7:3, 9

:1) 四种比例混合剂进行薄层层析检测, 以筛选最合适的展开剂。最终确定正相硅胶柱梯度洗脱条件为石油醚、石油醚: 乙酸乙酯(=100:4, 100:8, 100:16, 1:1)、乙酸乙酯、甲醇。收集正相硅胶柱分离得到的样品, 进行 254 nm 紫外吸收检测以及 TLC 检测, 经 15% 浓硫酸染色后, 将目标组分合并后再分离。目标组分经过硅胶柱层析、凝胶柱层析进行分离纯化, 最后利用 HPLC 仪器, 使用分析柱(4.6 × 250 mm)分析。HPLC 分离条件为 0~30 min, 甲醇浓度从 20% 梯度洗脱到 100%。根据 HPLC 分析结果, 采用 HPLC 半制备色谱柱(9.4 × 250 mm)制备目标化合物。分析和制备柱均为: 流动相 A: 色谱甲醇, B: 超纯水。为了防止拖尾现象, 向其中分别加入 0.1% 甲酸。

化合物 1 和 2 是先后经过一次凝胶柱层析两次硅胶柱层析以及 HPLC 分析制备得到。其中凝胶柱层析洗脱液配比为: 石油醚: 甲醇: 二氯甲烷 = 2:1:1, 硅胶柱层析为: 石油醚: 乙酸乙酯 = 100:8 和 10, 0:10。经过 HPLC 分析, 确定其制备条件为: 56% 甲醇等梯度洗脱, 得到化合物 1(43 mg) 和 2(24 mg)。

化合物 3 和 4 是先后经过一次凝胶柱层析两次硅胶柱层析以及 HPLC 分析制备得到。其中凝胶柱层析洗脱液配比为: 石油醚: 甲醇: 二氯甲烷 = 2:1:1, 硅胶柱层析为: 石油醚: 乙酸乙酯 = 100:6 和 100:9。经过 HPLC 分析, 确定其制备条件为: 60% 甲醇等梯度洗脱, 得到化合物 3(22.3 mg) 和 4(35.9 mg)。

化合物 5 和 6 是经过两次硅胶柱层析以及 HPLC 分析制备得到。其中硅胶柱层析洗脱液配比为石油醚: 乙酸乙酯 = 100:4, 100:6。经过 HPLC 分析, 确定其制备条件为: 65% 甲醇等梯度洗脱, 得到化合物 5(10.2 mg) 和 6(53.2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 无色油状物。¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 8.28 (1H, s, NH), 7.65 (1H, d, *J* = 7.86 Hz, H-4), 7.32 (1H, d, *J* = 8.05 Hz, H-7), 7.21 (1H, d, *J* = 7.46 Hz, H-5), 7.16 (1H, d, *J* = 7.43 Hz, H-6), 7.01 (1H, d, *J* = 1.87 Hz, H-2), 4.70 (1H, dd, *J* = 7.09, 4.49 Hz, H-2'), 3.67 (1H, s, OH), 3.33 (1H, dd, *J* = 15.03, 4.44 Hz, H-1'), 3.07 (1H, dd, *J* = 15.03, 7.15 Hz, H-1'), 2.91 (1H, hept, *J* = 6.82 Hz, H-4'), 1.16 (3H, d, *J* = 7.07 Hz, *R*² = CH₃), 1.06 (3H, d, *J* = 6.65 Hz, H-

1'')。以上数据与文献^[5]一致,故将化合物鉴定为 xenocyloins A。分子式为 $C_{14}H_{17}NO_2$, 结构式如图 1 所示。

化合物 2 无色油状物。¹H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 8.17 (1H, s, NH), 7.64 (1H, d, $J = 7.86$ Hz, H-4), 7.34 (1H, d, $J = 8.09$ Hz, H-7), 7.20 (1H, m, H-5), 7.14 (1H, m, H-6), 7.06 (1H, d, $J = 2.23$ Hz, H-2), 4.62 (1H, dd, $J = 7.25, 4.42$ Hz, H-2'), 3.61 (1H, m, OH), 3.32 (1H, H-1'), 3.04 (1H, m, H-1'), 2.78 (1H, m, H-4'), 1.68 (1H, m, $R^2 = CH_2CH_3$), 1.45 (1H, m, $R^2 = CH_2CH_3$), 0.89 (3H, t, $J = 7.46$ Hz, $R^2 = CH_2CH_3$), 1.01 (3H, d, $J = 6.70$ Hz, H-1'')。以上数据与文献^[5]一致,故将化合物鉴定为 xenocyloins B。分子式为 $C_{15}H_{19}NO_2$, 结构式如图 1 所示。

化合物 3 无色油状物。¹H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 8.25 (1H, s, NH), 7.66 (1H, d, $J = 7.86$

Hz, H-4), 7.36 (1H, d, $J = 8.08$ Hz, H-7), 7.21 (1H, t, $J = 7.51$, H-5), 7.15 (1H, t, $J = 7.45$, H-6), 7.03 (1H, d, $J = 1.90$ Hz, H-2), 5.48 (1H, dd, $J = 7.87, 4.97$ Hz, H-2'), 3.28 (1H, dd, $J = 15.07, 4.94$ Hz, H-1'), 3.21 (1H, dd, $J = 15.07, 7.91$ Hz, H-1'), 2.74 (1H, m, H-4'), 2.07 (3H, s, $COCH_3$), 1.11 (3H, d, $J = 6.97$ Hz, H-1''), 1.00 (3H, d, $J = 6.75$ Hz, $R^2 = CH_3$)。以上数据与文献^[5]一致,故将化合物鉴定为 xenocyloins C。分子式为 $C_{16}H_{19}NO_3$, 结构式如图 1 所示。

化合物 4 无色油状物。 $[\alpha]_D^{25} + 42.67^\circ$ (c 1.0, $CHCl_3$); ¹H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 8.25 (1H, s, NH), 7.66 (1H, d, $J = 7.86$ Hz, H-4), 7.35 (1H, d, $J = 8.05$ Hz, H-7), 7.21 (1H, t, $J = 7.50$ Hz, H-5), 7.16 (1H, t, $J = 7.44$ Hz, H-6), 7.04 (1H, d, $J = 1.69$ Hz, H-2), 5.49 (1H, dd, $J = 8.16, 4.61$ Hz, H-2'), 3.31 (1H, dd, $J = 15.15,$

表 1 化合物 5 和 6 的核磁数据 ($CDCl_3$)

Table 1 NMR data of compounds 5 and 6 ($CDCl_3$)

No.	5		6	
	δ_H (multi, Hz)	δ_C	δ_H (multi, Hz)	δ_C
2	7.05 (d, 2.29)	122.7	7.02 (s)	122.9
3		110.6		110.6
4	7.64 (d, 7.87)	118.7	7.63 (d, 7.67)	118.6
4a		127.3		127.3
5	7.20 (m)	122.1	7.21 (t, 7.29)	122.0
6	7.15 (m)	119.5	7.16 (t, 7.22)	119.5
7	7.35 (d, 8.08)	111.1	7.35 (d, 7.92)	111.2
7a		136.0		136.0
1'	3.19 (dd, 15.14, 8.21) 3.30 (dd, 15.15, 4.61)	26.4	3.30 (dd, 14.97, 4.44) 3.23 (dd, 14.92, 7.86)	26.7
2'	5.48 (dd, 8.21, 4.60)	76.6	5.50 (m)	77.2
3'		210.7		211.5
4'	2.63 (m)	44.1	2.75 (m)	37.6
1''	0.98 (d, 6.67)	15	0.98 (d, 6.71)	18.7
$COCH_2CH_3$		173.7		173.8
$COCH_2CH_3$	2.37 (m)	27.3	2.38 (m)	27.3
$COCH_2CH_3$	1.09 (t, 7.75)	8.8	1.11 (t, 7.44)	8.8
$R^2 = CH_2CH_3$	1.75 (m) 1.39 (m)	26.1		
$R^2 = CH_2CH_3$	0.88 (t, 7.48)	11.4		
$R^2 = CH_3$			1.15 (d, 7.20)	17.5

4.58 Hz, H-1'), 3.20 (1H, dd, $J = 15.14, 8.20$ Hz, H-1'), 2.65 (1H, m, H-4'), 2.07 (3H, s, COCH₃), 1.76 (1H, m, $R^2 = CH_2CH_3$), 1.40 (1H, m, $R^2 = CH_2CH_3$), 0.99 (3H, d, $J = 6.78$ Hz, H-1''), 0.89 (3H, t, $J = 6.75$ Hz, $R^2 = CH_2CH_3$)。以上数据与文献^[5]一致,故将化合物鉴定为 xenocylins D。分子式为 C₁₇H₂₁NO₃, 结构式如图 1 所示。

化合物 5 无色油状物。[α]_D²⁵ + 49.00° (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) 数据(见表 1)与文献^[7]一致,故将化合物鉴定为 xenocylins E。分子式为 C₁₈H₂₃NO₃, 结构式如图 1 所示。

化合物 6 无色油状物。[α]_D²⁵ + 59.67° (c 1.0, CHCl₃); HR-ESI-MS [$M + Na$]⁺ m/z 310.1417 (calcd for C₁₇H₂₁NO₃Na, 310.1419), 确定其相对分子质量为 287, 分子式为 C₁₇H₂₁NO₃。在 ¹³C NMR 中显示了 17 个信号,这与根据质谱确定的分子式相吻合,进一步分析 DEPT 和 HSQC 图谱,可推断化合物 **6** 含有 5 个季碳($\delta_C = 211.5, 173.8, 136.0, 127.3, 110.6$), 7 个叔碳($\delta_C = 122.9, 122.0, 119.5, 118.6, 111.2, 77.2, 37.6$), 2 个仲碳($\delta_C = 27.3, 26.7$)和 3 个伯碳($\delta_C = 18.7, 17.5, 8.8$)。仔细分析化合物 **6** 和 **5** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据,发现二者非常相似(表 1),不同的是化合物 **6** 比化合物 **5** 缺少一个乙基信号($\delta_H = 1.39, 1.75, \delta_C = 26.1; \delta_H = 0.88, \delta_C = 11.4$),而增加了甲基信号($\delta_H = 1.15, \delta_C = 17.5$),综合分析 HMBC 和 COSY 图谱(图 2),最终鉴定化合物 **6** 的结构如图 1 所示。由于化合物 **5** 和 **6** 的旋光均为右旋,推测化合物 **2'** 位置处的立体构

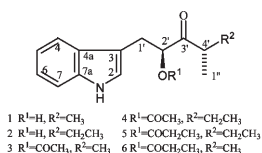


图 1 化合物 1~6 的结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-6

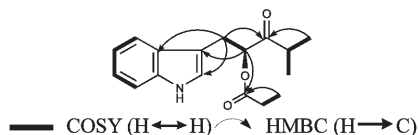


图 2 化合物 6 的主要 COSY 和 HMBC 相关信号

Fig. 2 Key COSY and HMBC correlations of compound 6

型与化合物 **5** 相同。此结构经 SCI Finder 检索,未发现相关报道,为新化合物,将其命名为 xenocylins F,其相关详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载(www.trew.ac.cn)。

致谢:感谢沈阳农业大学引进人才启动基金资助,大连化物所分析测试中心进行质谱测试,辽宁夸克侠产品检测有限公司进行核磁共振测试。

参考文献

- Forst S, Dowds B, Boemare N, et al. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Ann Rev Microbiol*, 1997, 47:72.
- Laura VF, Biedermann HW, Tobias E, Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat Prod Rep*, 2015, 32:904-936.
- Rasmann S, Köllner TG, Degenhardt J, et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 2005, 434:732-737.
- Brachmann AO. Isolation and identification of natural products and biosynthetic pathways from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Bio-und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes, PhD. 2009.
- Li JX, Chen GH, Webster JM. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J Nat Prod*, 1995, 58:1081-1086.
- Li JX, Chen GH, Webster JM. N-(Indol-3-ylethyl)-2'-hydroxy-3'-methylpentanamide, a novel indole derivative from *Xenorhabdus nematophilus*. *J Nat Prod*, 1996, 59: 1157-1158.
- Proschak A, Zhou Q, Schöner T, et al. Biosynthesis of the insecticidal xenocylins in *Xenorhabdus bovienii* E.; Bode, H. B. *ChemBiochem*, 2014, 15:369-372.
- Li JX, Chen GH, Webster JM. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Can J Microbiol*, 1997, 43: 770-773.
- Ji DJ, Yi YK, Kang GH, et al. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 239:241-248.
- Brachmann AO, Forst S, Furgani GM, et al. Xenofuranones A and B: phenylpyruvate dimers from *Xenorhabdus szentirmaii*. *J Nat Prod*, 2006, 69:1830-1832.
- Taylor WC, Lacey MJ, Akhurst RJ, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J Nat Prod*, 1991, 53:785-795.