

文章编号:1001-6880(2016)6-0828-05

线虫共生菌 *Xenorhabdus budapestensis* SN19 次生代谢产物的分离纯化与结构鉴定

卢星忠¹,石丹姝¹,高淳之¹,田晓美¹,毕于慧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、凝胶柱层析和半制备高效液相色谱技术对线虫共生菌 *Xenorhabdus budapestensis* SN19 的次生代谢产物进行分离纯化,得到 2 个单体化合物。通过波谱综合解析和文献数据对照分别鉴定为 xenematisides C(1) 和 xenematisides E(2),其中化合物 2 为新化合物,化合物 1 对番茄灰霉病菌具有较强的抑制作用($EC_{50} = 22.71 \mu\text{g/mL}$)。

关键词:线虫共生菌;次生代谢产物;酯肽;抗真菌活性

中图分类号:S482.7

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.6.003

Isolation and Identification of Secondary Metabolites from *Xenorhabdus budapestensis* SN19

LU Xing-zhong¹, SHI Dan-shu¹, GAO Chun-zhi¹, TIAN Xiao-mei¹, BI Yu-hui¹, YU Zhi-guo^{1,2*}

¹Collegiate of plant protection, Shenyang Agricultural University; ²Engineering & technological research center of biopesticide, Shenyang 110866, China

Abstract: Two depsipeptides were isolated and purified from secondary metabolites of *Xenorhabdus budapestensis* SN19 by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography and semi-preparative high-performance liquid chromatography. Their structures were identified as xenematisides C (1) and xenematisides E (2) using nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectroscopy (MS). Xenematisides E (2) was a new compound. Xenematisides C (1) showed a strong inhibition activity against *Botrytis cinerea* ($EC_{50} = 22.71 \mu\text{g/mL}$).

Key words:nematode symbiotic bacteria;secondary metabolitesdepsipeptide;antifungal

致病杆菌是斯氏线虫(*Steinernema*)的肠道共生菌,属于革兰氏阴性细菌^[1-3]。线虫通过自然开口进入寄主昆虫体内,将致病杆菌释放到寄主的血淋巴中,细菌在寄主昆虫体内大量繁殖导致寄主的死亡^[4],一方面致病杆菌降解昆虫尸体,为线虫的繁殖提供营养,另一方面产生多种次生代谢产物抑制其它环境微生物的繁殖^[5,6]。致病杆菌能够产生多种次生代谢产物^[7,8],如:xenocoumacins^[9]、xenorhabdins^[10]、xenofuranones^[11]、indole derivatives^[12]、anthraquinones^[13],其中一些代谢产物具有较强的生物活性。近年来一些多肽类的化合物被分离和鉴定出来,如: GameXPeptides^[14]、sentiamide^[15] 和 PAX peptides^[16],这类物质具有抗细菌、真菌和细胞毒性的生物活性^[17]。

本实验通过对 *Xenorhabdus budapestensis* SN19 发酵液的固相提取物进行了分离纯化,得到 2 个脂肽类化合物。通过波谱综合解析及文献数据对照分别鉴定为 xenematisides C(1) 和 xenematisides E(2),其中化合物 2 为新化合物,化合物 1 对番茄灰霉病菌具有较强的抑制作用,这为开发新型生物农药提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基

线虫共生菌 *Xenorhabdus budapestensis* SN19 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的菌株。LB 培养基:胰蛋白胨 10.0 g/L,酵母提取物 5.0 g/L,NaCl 10.0 g/L,蒸馏水 1.0 L; NBTA 培养基:牛肉膏 3.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,氯化钠 5.0 g/L,琼脂粉 15.0 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 1.0 L; M 培养基: 葡萄糖 6.13 g/L, 蛋白胨 21.29 g/L, $MgSO_4$ 1.50 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2.46 g/L, KH_2PO_4 0.86 g/L, K_2HPO_4 1.11 g/L, Na_2SO_4 1.72 g/L, 蒸馏水 1.0 L。pH 均为 7.0~7.2。

1.1.2 主要试剂和仪器

甲醇、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、氯仿、甲酸、丙酮(国药集团化学试剂有限公司), 色谱甲醇(美国 Sigma-Aldrich 公司),(1-氟-2,4-二硝基苯基-5)-L-丙氨酸(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(GE Healthcare), XAD-16 大孔树脂(罗门哈斯国际贸易有限公司), C_{18} 柱(250×9.40 mm, 5 μm , Agilent), Agilent C_{18} 色谱柱(150×4.60 mm, 5 μm), 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 型液相分析色谱仪(美国 Agilent 公司), LC-2010A HT(日本岛津公司), 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)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的培养和发酵

将保存于-80 °C 超低温冰箱的 SN19 菌株接种于 LB 液体培养基中, 28 °C 培养 12 h, 涂布于 NBTA 固体鉴别培养基, 28 °C 培养 48 h, 挑取蓝色单菌落, 转接于 3 个装有 20 mL LB 培养基的 100 mL 三角瓶, 28 °C、180 rpm 振荡培养 24 h, 作为一级种子, 将一级种子按 8% 的接种量接种于 20 个含有 20 mL LB 培养基的 100 mL 三角瓶, 相同条件下振荡培养 24 h 作为二级种子。将二级种子按 8% 的接种量接种于 60 个含有 400 mL M 培养基及 20 g XAD-16 大孔树脂的 2 L 三角瓶在 28 °C、180 rpm 条件下振荡培养 96 h。

1.2.2 次生代谢产物的提取、分离和纯化

24 L SN19 发酵液, 用蒸馏水洗涤 2 次, 除去菌体, 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, 用甲醇浸泡提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩得到发酵粗提物。将发酵粗提物用 600 mL 50% 甲醇水溶液进行分散, 然后用等体积二氯甲烷萃取 4 次, 收集合并二氯甲烷相, 35 °C 条件下减压浓缩得到粗提物浸膏 16.83 g, 进一步分离纯化。

将粗提物进行硅胶柱层析, 洗脱液为二氯甲烷: 甲醇(=100:0, 50:1, 20:1, 10:1, 0:100), 每个梯度洗脱液体积为 3 L, 根据 TLC 结果合并为 5 个部分, F1 到 F5, F2(1.35 g)部分进行 LH-20 凝胶柱层析, 二氯甲烷: 甲醇(=1:1)作为洗脱液得到纯化合物 1(426.5 mg), F3(53.21 mg)部分进行 LH-20 凝胶柱层析, 二氯甲烷: 甲醇(=1:1)作为洗脱液, 根据 TLC 结果合并后再通过半制备 HPLC 分离纯化, 流动相分别为: A(水含 0.1% 甲酸) 和 B(甲醇含 0.1% 甲酸); 洗脱程序为: 0~35.0 min, 20%~80% B 流速为 3.6 mL/min, 检测波长为 210, 254 nm。在保留时间 30.6 min 收集峰, 减压浓缩得到纯化合物 2(14.5 mg)。

1.2.3 化合物生物活性测定

用丙酮和吐温 80(1:1)溶解化合物, 加入到 PDA 培养基中, 使培养基含药浓度分别为 3.125、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将含有化合物的 PDA 培养基倒入 90 mm 培养皿中, 分别接入靶标菌株(番茄灰霉病菌、稻瘟病菌、辣椒疫霉菌)菌饼(直径 0.6 cm), 每株菌 3 个重复并设置对照, 26 °C 条件下培养, 待对照组菌饼长至培养皿的 2/3 时测量菌落直径并计算生长抑制率。生长抑制率(%) = [(对照菌落平均直径-菌饼直径)-(处理菌落平均直径-菌饼直径)]/(对照菌落平均直径-菌饼直径)。

2 结果与讨论

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色粉末, $[\alpha]_D^{20} +48.00$ ($c 1.00$ MeOH), HR-ESI-MS [$M + H$]⁺ m/z 624.2824 (calcd for $C_{35}H_{38}N_5O_6$, 624.2822) 确定其相对分子质量为 623, 结合¹H NMR 和¹³C NMR 确定其分子式为 $C_{35}H_{37}N_5O_6$ 。¹H NMR (DMSO, 600 MHz) 和¹³C NMR (DMSO, 150 MHz) 数据(见表 1)与文献^[18]一致, 故将化合物 1 鉴定为 xenematinides C。结构式如图 1 所示。

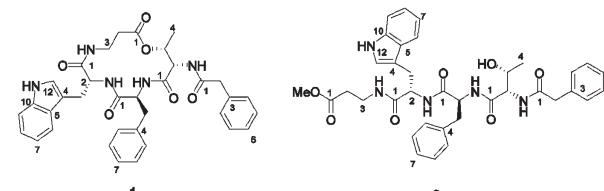


图 1 化合物 1 和 2 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1 and 2

表 1 化合物 1 和 2 的¹H NMR, ¹³C NMR 数据Table 1 ¹H NMR and ¹³C NMR Spectroscopic Data of Compounds 1 and 2

Position	1		2	
	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)
β -Ala	1	169.3. qC		171.7. qC
	2	34.0. CH ₂	2.42. dt (16.8.3.6)	33.4. CH ₂
		2.53. m		2.43. t (7.2)
	3	34.7. CH ₂	3.32 m	34.8. CH ₂
		3.38. dd (15.6.4.2)		3.30. m
	NH		7.39. t (6.0)	
	OCH ₃			51.4. OCH ₃
				3.59. s
	1	171.1. qC		171.0. qC
	2	54.1. CH	4.17. m	53.6. CH
Trp	3	25.8. CH ₂	2.80. m	27.9. CH ₂
		3.17. dd (15.6.4.2)		3.06. dd (14.6.4.8)
	4	110.5. qC		110.0. qC
	5	128.2. qC		127.1. qC
	6	117.9. CH	7.47. d (7.8)	118.5. CH
	7	118.2. CH	6.97. t (7.2)	118.1. CH
	8	120.9. CH	7.06. t (7.8)	120.8. CH
	9	111.3. CH	7.34. d (8.4)	111.3. CH
	10	136.0. qC		136.1. qC
	11/NH		10.68. brs	
Phe	12	123.8. CH	6.83. brs	123.8. CH
	NH		8.88. d (7.8)	
	1	170.4. qC		170.2. qC
	2	54.8. CH	4.46. m	53.6. CH
	3	34.7. CH ₂	2.80. m	37.2. CH ₂
		2.80. m		2.85. m
	4	137.0. qC		137.2. qC
	5/9	129.1. CH	7.22. m	129.2. CH
	6/8	128.2. CH	7.24. m	127.8. CH
	7	126.3. CH	7.06. t (7.2)	126.0. CH
Thr	NH		8.68. d (7.8)	
	1	170.8. qC		169.8. qC
	2	54.1. CH	4.64. d (9.0)	58.2. CH
	3	72.0. CH	5.11. m	66.5. CH
	4	16.9. CH ₃	1.06. d (6.0)	19.4. CH ₃
PAA	NH		8.22. d (9.6)	
	OH			4.93. d (4.2)
	1	171.6. qC		170.4. qC
4/8	2	41.7. CH ₂	3.59. (13.8)	41.9. CH ₂
		3.66. (14.4)		3.56. d (14.2)
	3	136.4. qC		136.4. qC
	5/7	128.9. CH	7.28. m	129.1. CH
	6	128.2. CH	7.26. m	128.1. CH
		126.6. CH	7.16 m	126.2. CH
				7.20. m

表 2 化合物 1、2 对植物病原真菌的抑制中浓度

Table 2 Inhibitory concentration of compound 1 and 2 to plant pathogenic fungi

植物病原真菌 Plant pathogenic fungi	化合物 Compound	EC ₅₀ (μg/mL)	毒力回归方程 Regression equation	95% 置信限 95% confidence interval	r
<i>Botrytis cinerea</i>	1	22.71	$y = 3.0349 + 1.4489x$	17.43 ~ 29.59	0.9756
	2	85.31	$y = 1.9943 + 1.5566x$	51.48 ~ 141.36	0.9792
<i>Phytophthora capsici</i>	1	68.13	$y = 3.0995 + 1.0366x$	32.02 ~ 144.96	0.9953
	2	87.60	$y = 2.4966 + 1.2887x$	50.29 ~ 152.58	0.9817
<i>Pyricularia oryzae</i>	1	58.02	$y = 3.7359 + 0.7168x$	25.29 ~ 133.11	0.9778
	2	95.66	$y = 2.9038 + 1.0583x$	48.66 ~ 188.04	0.9915

化合物 2 白色粉末, $[\alpha]^{20}D +13.33$ (*c* 1.00 DMSO), HR-ESI-MS [$M + H$]⁺ *m/z* 656.3067 (calc for $C_{36}H_{42}N_5O_7$, 656.3084) 确定其相对分子质量为 655, 分子式为 $C_{36}H_{41}N_5O_7$ 。在化合物 2 的¹³C NMR 谱图, 显示了 36 个信号, 这与根据质谱确定的分子式相吻合, 进一步结合¹H NMR、¹³C NMR 与 HSQC 谱图可推断化合物 2 中有 5 个羰基, 2 个甲基, 5 个亚甲基, 1 个吲哚环, 2 个苯环, 6 个活泼氢, 其中 $\delta_H = 10.81$ (brs) 为吲哚环上连接在氮原子上的活泼氢, $\delta_H = 4.93$ (1H, d, *J* = 4.2 Hz) 为羟基上的活泼氢。比较化合物 1 的谱图, 结合 HMBC、COSY 分析, HMBC 谱图中, $\delta_H = 2.85$ 、 $\delta_H = 3.06$ 与 $\delta_C = 127.1$ 及 $\delta_C = 171.0$ 相关; COSY 谱图中 $\delta_H = 4.42$ 与 $\delta_H = 2.85$ 、 $\delta_H = 3.06$ 及 $\delta_H = 8.30$ 相关, 证明了色氨酸 (Trp) 残基的存在。HMBC 谱图中, $\delta_H = 2.43$ 、 $\delta_H = 2.43$ 与 $\delta_C = 171.7$ 相关, $\delta_H = 3.26$ 、 $\delta_H = 3.30$ 与 $\delta_C = 171.7$ 相关; COSY 谱图中 $\delta_H = 3.26$ 、 $\delta_H = 3.30$ 与 $\delta_H = 2.43$ 、 $\delta_H = 2.43$ 及 $\delta_H = 8.12$ 相关证明了 β -丙氨酸 (β -Ala) 残基的存在。HMBC 谱图中 $\delta_H = 2.61$ 、 $\delta_H = 2.85$ 与 $\delta_C = 70.2$ 及 $\delta_C = 129.2$ 相关; COSY 谱图中 $\delta_H = 4.51$ 与 $\delta_H = 2.61$ 、 $\delta_H = 2.85$ 及 $\delta_H = 7.82$ 相关证明了苯丙氨酸 (Phe) 残基的存在。HMBC 谱图中 $\delta_C = 19.4$ 与 $\delta_H = 4.15$ 相关; COSY 谱图中 $\delta_H = 3.88$ 与 $\delta_H = 0.92$ 、 $\delta_H = 4.93$ 、 $\delta_H = 4.15$ 相关, $\delta_H = 4.15$ 与 $\delta_H = 7.97$ 相关, 证明了苏氨酸 (Thr) 残基的存在。HMBC 谱图中 $\delta_H = 3.48$ 、 $\delta_H = 3.56$ 与 $\delta_C = 170.4$ 及 $\delta_C = 129.1$ 证明了苯乙酸 (PAA) 片段的存在。进一步比较化合物 1 与 2 的¹H NMR、¹³C NMR 谱图, 发现化合物 2 中增加了一组氧甲基信号 ($\delta_H = 3.59$, $\delta_C = 51.4$) 和一个羟基信号 ($\delta_H = 4.93$), 结合 HSQC 及 COSY、HMBC 图谱 (图 2) 推断化合物 2 的

结构式如图 1 所示。由于化合物 1 和 2 的旋光均为右旋, 且其生源合成途径相同, 推测化合物 1 和 2 中氨基酸构型完全相同, 即化合物 2 中也含有 D-Trp、L-Phe、L-Trp。综合以上数据表明化合物 2 是化合物 1 的开环甲酯化结构, 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 xenematinides E。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) 及¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) 数据见表 1。化合物 2 的核磁及其它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.trcw.ac.cn)。

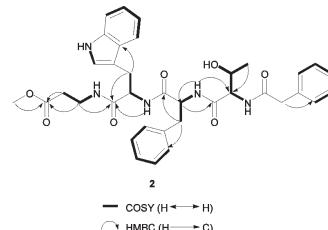


图 2 化合物 2 的主要 COSY 和 HMBC 相关信号

Fig. 2 Key COSY and HMBC correlations of compound 2

2.2 化合物生物活性结果

化合物 1 对灰霉病菌具有较强的抑制作用 ($EC_{50} = 22.71 \mu\text{g/mL}$), 对稻瘟病菌和辣椒疫霉病菌抑制作用较弱。化合物 2 对番茄灰霉病菌、稻瘟病菌和辣椒疫霉病菌的抑制作用均不明显。如表 2 所示。

2.3 讨论

本试验从 *Xenorhabdus budapestensis* SN19 中分离出 2 个酯肽类化合物, 其中 xenematinides C (1) 是一个环肽类化合物, 最早于 2011 由 Crawford 等^[18] 从 *Xenorhabdus Nematopila* 中分离得到。xenematinides E (2) 是化合物 xenematinides C (1) 的开环结构, 这是首次发现该化合物, 对化合物的生物活性测定结果

显示 xenematinides C(1) 对番茄灰霉病菌具有一定的抑制作用, 能为开发新型抗番茄灰霉病菌生物农药提供理论基础。多肽类化合物是由氨基酸组成, 在自然环境中易被降解, 它们有望规避化学合成农药的耐药性及环境污染。成为新型农药的先导化合物, 为现代农业有害生物的防治提供新思路。

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, 辽宁夸克侠检测有限公司进行核磁共振测试。

参考文献

- Park JM, Kim M, Min J, et al. Proteomic identification of a novel toxin protein (Txp40) from *Xenorhabdus nematophila* and its insecticidal activity against larvae of *Plutella xylostella*. *J Agric Food Chem*, 2012, 60:4053-4059.
- Brown SE, Cao AT, Hines ER, et al. A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *J Biol Chem*, 2004, 279:14595-14601.
- Richardson GR, Herbert EE, Park Y, et al. *Xenorhabdus nematophila* lrhA is necessary for motility, lipase activity, toxin expression, and virulence in *Manduca sexta* insects. *J Bacteriol*, 2008, 190:4870-4879.
- Lang G, Kalvelage T, Peters A, et al. Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *J Nat Prod*, 2008, 71:1074-1077.
- Sergeant M, Baxter L, Jarrett P, et al. Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. *J Appl Environ Microbiol*, 2006, 72:5895-5905.
- Houard J, Aumelas A, Noel T, et al. Cabanillasin, a new anti-fungal metabolite, produced by entomopathogenic *Xenorhabdus cabanillasii* JM26. *J Antibiot*, 2013, 66:617-620.
- Reimer D, Nollmann FI, Schultz K, et al. Xenotide biosynthesis by entomopathogenic *Xenorhabdus nematophila*. *J Nat Prod*, 2014, 77:1976-1980.
- Zhou QQ, Dowling A, Heide H, et al. Xentrivalpeptides A-Q: depsipeptide diversification in *Xenorhabdus*. *J Nat Prod*, 2012, 75:1717-1722.
- McInerney BV, Gregson RP, Lacey MJ, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus spp.*, Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J Nat Prod*, 1991, 54:774-784.
- McInerney BV, Taylor WC, Lacey MJ, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus spp.*, Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J Nat Prod*, 1991, 54:785-795.
- Brachmann AO, Forst S, Furgani GM, et al. Xenofuranones A and B: phenylpyruvate dimers from *Xenorhabdus szentirmaii*. *J Nat Prod*, 2006, 69:1803-1832.
- Li J, Chen G, Webster J, et al. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J Nat Prod*, 1995, 58:1081-1086.
- Richardson WH, Schmidt TM, Nealson KH. Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54:1602-1605.
- Bode HB, Reimer D, Fuchs SW, et al. Determination of the absolute configuration of peptide natural products by using stable isotope labeling and mass spectrometry. *Chem Eur J*, 2012, 18:2342-2348.
- Ohlendorf B, Simon S, Wiese J, et al. Szentiamide, an N-formylated cyclic depsipeptide from *Xenorhabdus szentirmaii* DSM 16338T. *Nat Prod Commun*, 2011, 6:1247-1250.
- Fuchs SW, Proschak A, Jaskolla TW, et al. Structure elucidation and biosynthesis of lysine-rich cyclic peptides in *Xenorhabdus nematophila*. *Org Biomol Chem*, 2011, 9: 3130-3132.
- Zhou QQ, Grundmann F, Kaiser M, et al. Structure and biosynthesis of xenoamicins from entomopathogenic *Xenorhabdus*. *Chem Eur J*, 2013, 9:16772-16799.
- Crawford JM, Portmann C, Kontnik R, et al. NRPS substrate promiscuity diversifies the xenematinides. *J Org Lett*, 2011, 13: 5144-5147.