

# *Streptomyces* sp. KC17012 次生代谢产物及抗菌活性研究

何江波<sup>1</sup>, 康大伟<sup>1</sup>, 陈秀<sup>1</sup>, 王纪爱<sup>1</sup>, 王涛<sup>1</sup>, 毕晓旭<sup>1</sup>, 栾杰<sup>2\*</sup>, 曹艳茹<sup>1\*</sup><sup>1</sup>昆明学院医学院, 昆明 650214; <sup>2</sup>云南省疾病预防控制中心理化检测中心, 昆明 650022

**摘要:** 研究 *Streptomyces* sp. KC17012 的次生代谢产物。采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、反相 RP-18 柱色谱等方法, 对 *Streptomyces* sp. KC17012 的发酵产物乙酸乙酯萃取部分进行分离纯化, 然后采用核磁共振波谱 (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) 与质谱方法 (MS), 结合与文献数据对比, 共鉴定 18 个化合物, 分别为 seco-((S)-Pro-(R)-Val) (1)、环-(L-脯-L-酪) 二肽 (2)、环-(D-脯-L-酪) 二肽 (3)、环-(L-脯-L-苯丙) 二肽 (4)、色氨酸 (5)、amethyldioxindole-3-acetate (6)、3-羧基吲哚 (7)、邻氨基苯甲酸 (8)、胸腺嘧啶核苷 (9)、macrolactin A (10)、红花脂 A (11)、(-)-methyl dihydrophaseate (12)、菜豆酸 (13)、(-)-ethyl dihydrophaseate (14)、布卢门醇 A (15)、3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxy-7-megastigmen-9-one (16)、trogopterin A (17) 和  $\beta$ -谷甾醇 (18), 其中化合物 1~4 属于二肽类, 11~14 为倍半萜类脱落酸类似物。采用微量稀释法检测以上单体化合物的体外抗菌活性, 结果表明化合物 1 和 10 分别在 11 和 33  $\mu$ mol/L 浓度下对枯草杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌具有较好的抑制作用。本研究为进一步挖掘链霉菌 KC17012 的代谢产物奠定了基础。

**关键词:** 链霉菌; 抑菌活性; 二肽; 脱落酸类似物; 结构鉴定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)9-1523-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.9.009

## Secondary metabolites of *Streptomyces* sp. KC17012 and their antibacterial activity

HE Jiang-bo<sup>1</sup>, KANG Da-wei<sup>1</sup>, CHEN Xiu<sup>1</sup>,  
WANG Ji-ai<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, BI Xiao-xu<sup>1</sup>, LUAN Jie<sup>2\*</sup>, CAO Yan-ru<sup>1\*</sup><sup>1</sup>School of Medicine, Kunming University, Kunming 650214, China;<sup>2</sup>Center for Physical and Chemical Testing, Kunming Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China

**Abstract:** To study the secondary metabolites of *Streptomyces* sp. KC17012. The compounds were isolated by silica column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and RP-18 reverse-phase column chromatography from the EtOAc extract of the culture of *Streptomyces* sp. KC17012. The structures were characterized by various spectroscopic method (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and MS) and comparison with the data of literatures. Eighteen compounds were isolated from the EtOAc extract, and identified as seco-((S)-Pro-(R)-Val) (1), cyclo(L-Pro-L-Tyr) (2), cyclo(D-Pro-L-Tyr) (3), cyclo(L-Pro-L-Phe) (4), tryptophan (5), methyldioxindole 3-acetate (6), 1H-indole-3-carboxylic (7), anthranilic acid (8), thymidine (9), macrolactin A (10), carthamate A (11), (-)-methyl dihydrophaseate (12), phaseic acid (13), (-)-ethyl dihydrophaseate (14), blumenol A (15), 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxy-7-megastigmen-9-one (16), trogopterin A (17), and  $\beta$ -sitosterol (18). All compounds were isolated from *Streptomyces* sp. KC17012 for the first time, compounds 1-4 were dipeptide type compound, and abscisic derivatives (11-14) belong to sesquiterpenes. Microdilution method was used to test the antibacterial activity of the above compounds. Compounds 1 and 10 were effective against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* at the concentrations of 11 and 33  $\mu$ mol/L respectively. This study lay a foundation for the further exploitation of the metabolites of *Streptomyces* sp. KC17012.

**Key words:** *Streptomyces* sp.; antibacterial activity; dipeptide; abscisic derivatives; structural identification

收稿日期: 2022-02-14 接收日期: 2022-05-18

基金项目: 云南省应用基础研究计划高校联合面上基金 (2018FH001-052, 202001BA070001-043); 昆明市春城计划青年拔尖人才项目 (C201914001); 国家自然科学基金 (31660002)

\* 通信作者 E-mail: yanrucao3@aliyun.com, luanjie0510@163.com

链霉菌属于革兰氏阳性菌,原核生物界、放线菌目(Actinobacterales)、链霉菌科(Streptomycetaceae)、链霉菌属(*Streptomyces*)。链霉菌是一类重要的微生物资源,主要存在于土壤、海洋、淡水等生态系统中,被广泛应用于药物研究,农业杀虫剂、除草剂等方面<sup>[1]</sup>。链霉菌具有神奇的创造功能,可以产生大量结构新颖且具有较好生物活性的次生代谢产物,且多数代谢产物为含氮类型的化合物。据统计,在目前发现的微生物活性产物中,由链霉菌产生的次生代谢产物约占总数的2/3<sup>[2]</sup>。医学应用的抗生素多为链霉菌代谢产物,如氨基糖苷类抗生素等,这些抗生素在医学及农业生产中发挥着举足轻重的作用<sup>[3]</sup>。近年来,随着普通环境微生物的研究日渐成熟,特殊环境微生物,例如海洋、火山口、极地等极端环境成为研究的热点。Li等<sup>[4]</sup>从海洋链霉菌HS-34中分离得到具有抗副溶血性弧菌的化合物。Ye等<sup>[5]</sup>从广西红树林土壤中分离得到两株链霉菌,并发现两株菌的次生代谢产物均对金黄色葡萄球菌具有较好的抑制作用;Zhou等<sup>[6]</sup>从极地真菌*Geomyces pannorum* SA3-2-YM的次级代谢产物中发现具有肿瘤细胞毒活性的环二肽化合物。链霉菌KC17012是我们课题组从东川铜矿土中分离得到,通过菌株形态与特征,结合16S rRNA基因的系统进化分析,确定该菌株为一株新菌株(GenBank number: MW526995)。因此,我们课题组继续对*Streptomyces* sp. KC17012进行深入研究,旨在阐明其次生代谢产物,为该菌的深入开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

质谱仪(美国Agilent 6500系列Q-TOF LC/MS);核磁共振仪(Avance 600 MHz, TMS作为内标,  $\delta$ 为ppm,  $J$ 为Hz);制备液相(江苏汉邦, Hanbon-NP 7000C);制备柱(安捷伦 Zorbax, XDB-C<sub>18</sub>, 21.2 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m);万分之一电子天平(上海越平科学仪器有限公司);摇床(上海智城分析仪器制造有限公司, ZWY-2102);柱层析用硅胶、薄层层析用硅胶 GF254(青岛海洋化工厂有限公司);Sephadex LH-20(美国GE公司);RP-18(日本YMC产品, 40~60  $\mu$ m);D101大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司);色谱试剂(上海星可高纯度试剂公司);石油醚、二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯、甲醇等有机溶剂均为工业纯度经重蒸后使用。显色剂为H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(10%)的乙醇液。

### 1.2 菌种与材料

菌株鉴定:自云南昆明东川铜矿中分离,16S rRNA基因序列分析结果表明KC17012为链霉菌属(*Streptomyces*)菌株。大肠杆菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)以及枯草芽孢杆菌(ATCC6051),以上病原菌均购于上海药物研究所。菌种目前保存于昆明学院农学与生命科学学院菌种库(编号为KC17012)。

菌株KC17012活性培养基:PDA培养基(g/L),土豆200g,葡萄糖20g,琼脂20g,自来水1000mL,微量盐1mL,121 $^{\circ}$ C,灭菌30min。

菌株KC17012发酵培养基:PDB培养基(g/L),土豆200g,葡萄糖20g,自来水1000mL,微量盐1mL,121 $^{\circ}$ C,灭菌30min。

指示菌培养基:LB固体培养基(g/L),胰蛋白胨10g,酵母提取物5g,氯化钠10g,琼脂20g,自来水1000mL。

### 1.3 菌株活化与种子液的培养

将保存于4 $^{\circ}$ C的菌株KC17012 *Streptomyces* sp.接种于PDA平板,28 $^{\circ}$ C培养7天以进行活化。然后将单菌落接种至改良ISP2培养基(1L):酵母膏4g,酵母浸粉5g,葡萄糖4g,动物蛋白胨2g,植物蛋白胨1g,微量盐1mL,复合维生素少许,自来水1000mL, pH 7.2,恒温摇床28 $^{\circ}$ C,180 r/min,发酵3天,作为种子液。

### 1.4 菌株发酵

将种子液接种至PDB培养基25L(土豆200g,葡萄糖20g,自来水1000mL,微量盐1mL,121 $^{\circ}$ C,灭菌30min),200mL/瓶,培养8天,28 $^{\circ}$ C,180 r/min,发酵液采用纱布过滤,收集滤液,得发酵液25L,然后将发酵液浓缩至2L。

### 1.5 提取与分离

采用等体积的乙酸乙酯对发酵液进行萃取,共3次,浓缩萃取液,得乙酸乙酯浸膏43g。将乙酸乙酯浸膏用甲醇溶解,过滤,除去不溶物,然后采用D101大孔树脂柱(直径80mm $\times$ 长度500mm)初步分离,洗脱剂为10% $\rightarrow$ 100%乙醇水梯度洗脱;根据薄层色谱(TLC),10%硫酸乙醇溶液显色合并相似成分,得6个组分Fr A~F。Fr A组分(1.3g),经Sephadex LH-20柱(MeOH)纯化,得到Fr A1~3, Fr A-1组分(230mg)经过多次硅胶柱层析除去杂质,然后结晶得到化合物2(120mg),再次从母液中分离得到化合物3(72mg)。Fr A-2部分(137mg),采用多次硅胶柱色谱分离后得到化合物1(16mg)。

FrA-3 部分(70 mg)经过反复结晶得到纯品化合物 **4** (55 mg)。Fr B 组分(2.1 g),采用 Sephadex LH-20 柱(MeOH)纯化,得 Fr B1~4。组分 Fr B1 经 RP-18 反相柱色谱分离得 Fr B1-1(80 mg),采用制备液相分离纯化,以 10%-100% 色谱甲醇梯度洗脱(流速 10 mL/min)得化合物 **5**(19 mg,  $t_{R}=11.43$  min)和化合物 **6**(21 mg,  $t_{R}=13.23$  min)。组分 Fr B2(248 mg)采用硅胶柱(二氯甲烷:甲醇 10:1→5:1, V/V)梯度洗脱,得到化合物 **7**(18 mg)。Fr B3(120 mg),采用硅胶柱(二氯甲烷:甲醇 10:1→5:1, V/V)梯度洗脱,得到化合物 **8**(22 mg)。组分 Fr B4(330 mg)通过多次结晶,得到纯度较高的化合物 **9**(12 mg)。Fr C 组分(3.1 g),经 Sephadex LH-20 柱(MeOH)分离得到 Fr C 1~3, Fr C-1 组分(90 mg)采用硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇 20:1→5:1, V/V)梯度洗脱,得到化合物 **10**(11 mg)。Fr C-2 部分(430 mg),采用硅胶柱色谱分离后得到组分 Fr C-2-1(107 mg),然后采用制备液相,以 40%-80% 色谱甲醇梯度洗脱(流速 10 mL/min)得化合物 **11**(3 mg)和化合物 **12**(43 mg)。Fr C-3 部分(200 mg)采用硅胶柱色谱分离到纯品化合物 **13**(57 mg)。Fr D 组分(1.1 g),采用 Sephadex LH-20 柱(MeOH)分离得 Fr D1~3。组分 Fr D1(100 mg)经 RP-18 反相柱色谱分离,得到样品 Fr D1-1(37 mg),采用硅胶柱色谱(二氯甲烷:

甲醇 10:1→5:1, V/V) 梯度洗脱得化合物 **14**(1.8 mg)和化合物 **15**(27 mg)。Fr D2(35 mg)采用硅胶柱(二氯甲烷:甲醇 10:1→5:1, V/V)梯度洗脱,得到化合物 **16**(3.8 mg)。组分 Fr D3(49 mg)采用制备液相,得化合物 **17**(7 mg)。组分 Fr F(1.01 g)通过多次结晶,得到纯度较高的化合物 **18**(200 mg)。

### 1.6 体外抗菌活性检测

本研究采用微量稀释法检测化合物的体外抑菌活性。分别将大肠杆菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)以及枯草芽孢杆菌(ATCC6051)接种于 LB 固体培养基,37 °C 培养 24 h 后,挑取单菌落 2~3 个于 20 mL LB 液体培养基中,37 °C,180 r/min,摇床培养 6 h,用 LB 液体培养基稀释成  $1 \times 10^5$  CFU/mL 菌悬液。称取适量的化合物 **1~18**,用 DMSO 配制成 100  $\mu$ mol/L 的储存液,并用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。取无菌的 96 孔板,外周 36 孔分别加入 100  $\mu$ L 无菌水,其余每孔加入 100  $\mu$ L  $1 \times 10^5$  CFU/mL 菌悬液。同时,选取环丙沙星作为阳性对照,DMSO 作空白对照,且每个梯度设 3 个复孔,微板观察法检测其最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值。

### 2 实验结果

本文对 *Streptomyces* sp. KC 17012 的次生代谢产物进行研究,分离鉴定了 18 个化合物(见图 1),其中

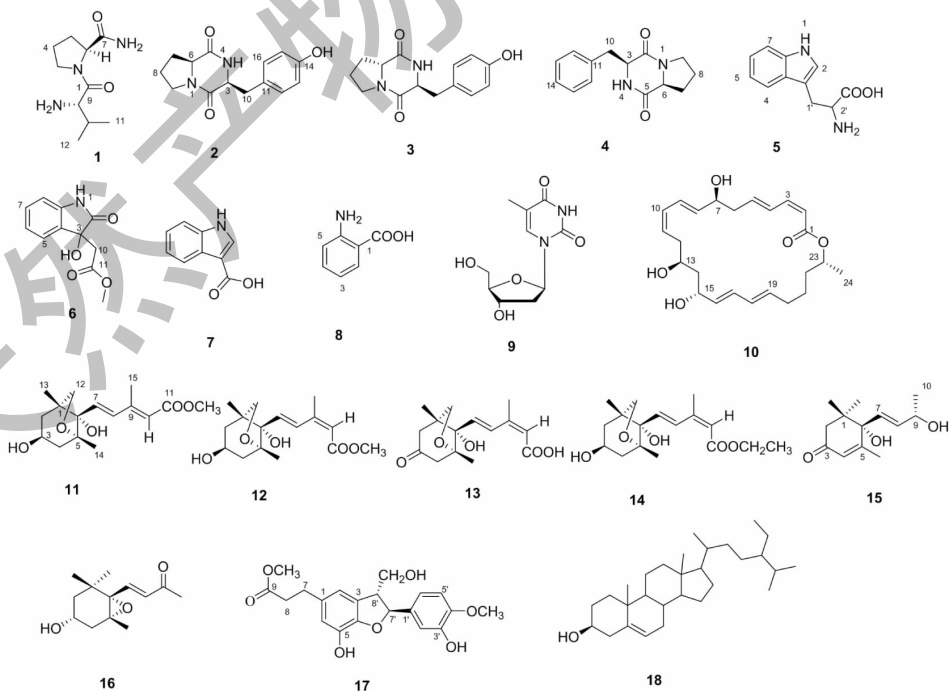


图 1 化合物 **1~18** 的结构式

Fig. 1 The chemical structures of compounds **1-18**

包括二肽类, 吡啶衍生物类, 脱落酸类似物等, 我们对分离得到的化合物进行体外抑菌活性测试, 结果表明化合物 **1** 和 **10** 具有较好地抑制枯草杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的活性。

## 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 白色粉末; 分子式  $C_{10}H_{19}N_3O_2$ , ESI-MS:  $m/z$  212  $[M-H]^-$ ;  $[\alpha]_D^{25}$ -112.15 ( $c$  0.53,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 4.23 (1H, td,  $J = 6.6, 1.8$  Hz, H-9), 4.07 (1H, s, H-6), 3.51 ~ 3.61 (2H, m, H-3), 2.51 (1H, m, H-10), 2.35 (1H, m, H-5a), 2.05 (1H, m, H-4a), 1.94 ~ 1.99 (2H, m, H-4b, 5b), 1.11 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-11), 0.95 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-12);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 172.8 (C-1), 46.3 (C-3), 23.4 (C-4), 29.7 (C-5), 61.7 (C-6), 167.7 (C-7), 60.2 (C-9), 30.0 (C-10), 19.0 (C-11), 16.8 (C-12)。以上数据与文献<sup>[7]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 **1** 为 *seco*-((*S*)-*Pro*-(*R*)-*Val*)。

**化合物 2** 白色粉末; 分子式  $C_{14}H_{16}N_2O_3$ , ESI-MS:  $m/z$  261  $[M+H]^+$ ;  $[\alpha]_D^{25}$ -53.1 ( $c$  0.15,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.03 (2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-12, 16), 6.70 (2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-13, 15), 4.37 (1H, t,  $J = 4.8$  Hz, H-3), 4.05 (1H, ddd,  $J = 10.8, 6.0, 1.8$  Hz, H-6), 3.56 (1H, dt,  $J = 16.8, 6.0$  Hz, H-9a), 3.35 (1H, m, H-9b), 3.09 (1H, dd,  $J = 13.8, 4.8$  Hz, H-10a), 3.03 (1H, dd,  $J = 14.4, 4.8$  Hz, H-10b), 2.10 (1H, m, H-7a), 1.21 (1H, m, H-7b), 1.84 (2H, m, H-8);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 167.1 (C-2), 58.1 (C-3), 170.9 (C-5), 60.2 (C-6), 29.6 (C-7), 22.9 (C-8), 46.1 (C-9), 37.8 (C-10), 127.6 (C-11), 132.3 (C-12, 16), 116.3 (C-13, 15), 157.9 (C-14)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 **2** 为环-(*L*-脯-*L*-酪)。

**化合物 3** 白色粉末; 分子式  $C_{14}H_{16}N_2O_3$ , ESI-MS:  $m/z$  261  $[M+H]^+$ ;  $[\alpha]_D^{25}$ +35.0 ( $c$  1.31,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.99 (2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-12, 16), 6.75 (2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-13, 15), 4.18 (1H, t,  $J = 4.8$  Hz, H-3), 3.55 (1H, m, H-9a), 3.33 (1H, m, H-9b), 3.12 (1H, dd,  $J = 13.8, 4.2$  Hz, H-10a), 2.90 (1H, dd,  $J = 14.4, 4.8$  Hz, H-10b), 2.64 (1H, dd,  $J = 10.2, 6.0$  Hz, H-6), 2.07 (1H, m, H-7a), 1.92 (1H, m, H-8a), 1.66 (1H, m, H-7b), 1.63 (1H, m, H-8b);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,

$CD_3OD$ )  $\delta$ : 167.6 (C-2), 60.0 (C-3), 171.5 (C-5), 59.2 (C-6), 29.9 (C-7), 22.5 (C-8), 46.2 (C-9), 40.3 (C-10), 127.1 (C-11), 132.4 (C-12, 16), 116.5 (C-13, 15), 158.3 (C-14)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 **3** 为环-(*D*-脯-*L*-酪)。

**化合物 4** 白色粉末; 分子式  $C_{14}H_{16}N_2O_2$ , ESI-MS:  $m/z$  245  $[M+H]^+$ ;  $[\alpha]_D^{25}$ +40.0 ( $c$  2.14,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.32 ~ 7.33 (3H, m, H-12, 14, 16), 7.21 (1H, m, H-13, 15), 4.23 (1H, t,  $J = 4.8$  Hz, H-3), 3.55 (1H, dt,  $J = 16.8, 6.0$  Hz, H-9a), 3.34 (1H, dd,  $J = 9.0, 3.0$  Hz, H-9b), 3.21 (1H, dd,  $J = 13.8, 4.8$  Hz, H-10a), 3.01 (1H, dd,  $J = 13.8, 4.2$  Hz, H-10b), 2.63 (1H, dd,  $J = 10.8, 6.6$  Hz, H-6), 2.06 (1H, m, H-7a), 1.94 (1H, m, H-8a), 1.66 (2H, m, H-7b);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 167.6 (C-2), 59.9 (C-3), 171.5 (C-5), 159.3 (C-6), 30.0 (C-7), 22.6 (C-8), 46.3 (C-9), 41.1 (C-10), 136.8 (C-11), 129.8 (C-12, 16), 131.4 (C-13, 15), 128.7 (C-14)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 **4** 为环-(*L*-脯-*L*-苯丙)二肽。

**化合物 5** 无色油状物; 分子式  $C_{11}H_{12}N_2O_2$ , ESI-MS:  $m/z$  205  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 10.87 (1H, br s, COOH), 7.55 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-4), 7.33 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-7), 7.18 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 7.05 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-6), 6.97 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-5), 3.41 (1H, dd,  $J = 9.0, 4.2$  Hz, H-2'), 3.30 (1H, dd,  $J = 15.0, 4.2$  Hz, H-1a'), 2.94 (1H, dd,  $J = 15.0, 9.0$  Hz, H-1b');  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 123.9 (C-2), 109.8 (C-3), 118.4 (C-4), 120.9 (C-6), 111.3 (C-7), 136.3 (C-8), 127.3 (C-9), 27.3 (C-1'), 54.8 (C-2'), 170.3 (C-3')。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道一致, 故鉴定化合物 **5** 为色氨酸。

**化合物 6** 白色粉末; 分子式  $C_{11}H_{11}NO_4$ , ESI-MS:  $m/z$  244  $[M+Na]^+$ ;  $[\alpha]_D^{25}$ -22.0 ( $c$  0.16,  $CH_3OH$ );  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.37 (1H, br d,  $J = 7.2$  Hz, H-6), 7.27 (1H, td,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, H-5), 7.04 (1H, td,  $J = 7.8, 0.6$  Hz, H-7), 6.90 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-8), 3.49 (3H, s), 3.10 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-10a), 3.07 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-10b);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 181.0 (C-2), 74.9 (C-3), 131.9 (C-4), 131.1 (C-5), 125.3 (C-

6), 123.7 (C-7), 111.4 (C-8), 143.7 (C-9), 42.7 (C-10), 171.1 (C-11), 52.2 (OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道一致,故确定化合物**6**为 methylendioindole-3-acetate。

**化合物 7** 无色油状物,易溶于甲醇;分子式 C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, ESI-MS:  $m/z$  162 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.96 (1H, dd,  $J$  = 7.2, 1.2 Hz, H-5), 7.85 (1H, s, H-2), 7.33 (1H, dd,  $J$  = 7.2, 1.2 Hz, H-8), 7.08 (2H, m, H-67); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 133.5 (C-2), 127.7 (C-3), 108.9 (C-4), 123.7 (C-5), 122.2 (C-6), 122.5 (C-7), 113.0 (C-8), 138.4 (C-9), 169.4 (C-10)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道一致,故鉴定化合物**7**为 3-羧基吗啉。

**化合物 8** 无色油状物;分子式 C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, ESI-MS:  $m/z$  138 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.83 (1H, dd,  $J$  = 7.8, 1.8 Hz, H-5), 7.25 (1H, td,  $J$  = 7.2, 1.8 Hz, H-3), 6.72 (1H, dd,  $J$  = 7.8, 0.6 Hz, H-2), 6.58 (1H, t,  $J$  = 7.2, 1.2 Hz, H-4)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道一致,故鉴定化合物**8**为邻氨基苯甲酸。

**化合物 9** 白色粉末;分子式 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS:  $m/z$  265 [M + Na]<sup>+</sup>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -22.0 (c 0.16, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.82 (1H, s, H-6), 6.28 (1H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-1'), 4.40 (1H, td,  $J$  = 6.6, 3.6 Hz, H-4'), 3.90 (1H, dd,  $J$  = 6.6, 3.6 Hz, H-3'), 3.78 (1H, dd,  $J$  = 12.0, 3.0 Hz, H-5'), 3.73 (1H, dd,  $J$  = 12.0, 3.6 Hz, H-5'), 2.22 (2H, m, H-2'), 1.88 (3H, s, -CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 152.6 (C-2), 166.6 (C-4), 111.7 (C-5), 138.3 (C-6), 12.6 (C-7), 89.0 (C-1'), 41.3 (C-2'), 72.4 (C-3'), 86.4 (C-4'), 63.0 (C-5')。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道一致,故鉴定化合物**9**为胸腺嘧啶核苷。

**化合物 10** 无色油状物,易溶于甲醇,氯仿;分子式 C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS:  $m/z$  425 [M + Na]<sup>+</sup>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -10.3 (c 0.08, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.22 (1H, dd,  $J$  = 13.8, 11.5 Hz, H-4), 6.64 (1H, t,  $J$  = 11.5 Hz, H-9), 6.56 (1H, dd,  $J$  = 15.6, 11.4 Hz, H-17), 6.17 (2H, m, H-3, 5), 6.12 (1H, t,  $J$  = 10.8 Hz, H-10), 6.05 (1H, dd,  $J$  = 15.0, 10.2 Hz, H-18), 5.75 (1H, dd,  $J$  = 15.0, 5.4 Hz, H-8), 5.65 (1H, m, H-19), 5.56 (3H, m, H-2, 11, 16), 5.01 (1H, m, H-23), 4.30 (2H, m, H-7, 15), 3.85 (1H, m,

H-13), 2.49 (1H, m, H-12a), 2.41 (3H, m, H-12b), 2.16 (2H, m, H-6), 1.45 ~ 1.65 (4H, m, H-14, 20), 1.29 ~ 1.33 (4H, m, H-21, 22), 1.26 (1H, d,  $J$  = 6.0 Hz, H-24); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 168.2 (C-1), 118.1 (C-2), 145.2 (C-3), 130.4 (C-4), 142.4 (C-5), 43.0 (C-6), 72.5 (C-7), 137.7 (C-8), 126.1 (C-9), 131.6 (C-10), 128.5 (C-11), 36.7 (C-12), 69.4 (C-13), 44.1 (C-14), 69.9 (C-15), 135.4 (C-16), 131.9 (C-17), 131.4 (C-18), 135.3 (C-19), 33.2 (C-20), 25.8 (C-21), 36.2 (C-22), 72.4 (C-23), 20.3 (C-24)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道一致,故鉴定化合物**10**为 macrolactin A。

**化合物 11** 白色粉末,易溶于甲醇;分子式 C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS:  $m/z$  319 [M + Na]<sup>+</sup>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -7.85 (c 0.26, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.65 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-8), 6.57 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-7), 5.89 (1H, s, H-10), 4.11 (1H, m, H-3), 3.80 (1H, dd,  $J$  = 7.2, 2.4 Hz, H-12a), 3.73 (1H, d,  $J$  = 7.2 Hz, H-12b), 3.70 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 2.34 (3H, d,  $J$  = 0.6 Hz, H-15), 2.05 (1H, ddd,  $J$  = 13.8, 7.2, 1.8 Hz, H-4a), 1.86 (1H, ddd,  $J$  = 13.8, 7.2, 1.2 Hz, H-2a), 1.74 (1H, dd,  $J$  = 13.8, 10.2 Hz, H-4b), 1.67 (1H, ddd,  $J$  = 13.2, 11.4, 2.4 Hz, H-2b), 1.11 (3H, s, H-14), 0.90 (3H, s, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 49.8 (C-1), 44.6 (C-2), 66.1 (C-3), 46.1 (C-4), 87.9 (C-5), 83.5 (C-6), 134.6 (C-7), 137.6 (C-8), 153.5 (C-9), 120.4 (C-10), 169.1 (C-11), 77.4 (C-12), 16.5 (C-13), 19.7 (C-14), 14.2 (C-15), 51.7 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道一致,故鉴定化合物**11**为红花香脂 A。

**化合物 12** 白色粉末;分子式 C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS:  $m/z$  319 [M + Na]<sup>+</sup>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -11.29 (c 1.33, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.01 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-8), 6.55 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-7), 5.78 (1H, s, H-10), 4.11 (1H, m, H-3), 3.81 (1H, dd,  $J$  = 7.2, 2.4 Hz, H-12a), 3.71 (1H, d,  $J$  = 7.2 Hz, H-12b), 3.70 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 2.09 (3H, d,  $J$  = 0.6 Hz, H-15), 2.03 (1H, ddd,  $J$  = 13.8, 7.2, 1.8 Hz, H-4a), 1.86 (1H, ddd,  $J$  = 13.8, 7.2, 1.2 Hz, H-2a), 1.74 (1H, dd,  $J$  = 13.8, 10.2 Hz, H-4b), 1.66 (1H, ddd,  $J$  = 13.2, 11.4, 2.4 Hz, H-2b), 1.15 (3H, s, H-14), 0.94 (3H, s, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 49.6 (C-1), 44.7 (C-2), 66.1 (C-

3), 46.1 (C-4), 87.9 (C-5), 83.4 (C-6), 135.9 (C-7), 131.8 (C-8), 152.1 (C-9), 118.4 (C-10), 168.3 (C-11), 77.4 (C-12), 16.1 (C-13), 19.8 (C-14), 21.4 (C-15), 51.7 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **12** 为(-)-methyl dihydrophaseate。

**化合物 13** 白色粉末;分子式 C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS:  $m/z$  303 [M + Na]<sup>+</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-13.99 (*c* 1.68, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.10 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-8), 6.47 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-7), 5.79 (1H, s, H-10), 3.95 (1H, dd, *J* = 7.8, 2.4 Hz, H-12a), 3.66 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-12b), 2.81 (1H, d, *J* = 18.0 Hz, H-4a), 2.71 (1H, dd, *J* = 18.0, 2.4 Hz, H-2a), 2.47 (1H, dd, *J* = 18.0, 2.4 Hz, H-4b), 2.38 (1H, dd, *J* = 18.0, 2.4 Hz, H-2b), 2.07 (3H, d, *J* = 0.6 Hz, H-15), 1.21 (3H, s, H-13), 1.01 (3H, s, H-14); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 49.6 (C-1), 53.3 (C-2), 211.1 (C-3), 54.1 (C-4), 87.9 (C-5), 83.1 (C-6), 133.8 (C-7), 133.0 (C-8), 151.4 (C-9), 119.9 (C-10), 169.6 (C-11), 78.7 (C-12), 19.6 (C-13), 21.4 (C-14), 19.8 (C-15)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **13** 为菜豆酸。

**化合物 14** 白色粉末;分子式 C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>, ESI-MS:  $m/z$  333 [M + Na]<sup>+</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-17.2 (*c* 0.05, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.01 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-8), 6.54 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-7), 5.77 (1H, s, H-10), 4.16 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.11 (1H, m, H-3), 3.81 (1H, dd, *J* = 7.2, 2.4 Hz, H-12a), 3.71 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-12b), 2.09 (3H, d, *J* = 0.6 Hz, H-15), 2.03 (1H, ddd, *J* = 13.8, 7.2, 1.8 Hz, H-4a), 1.86 (1H, ddd, *J* = 13.8, 7.2, 1.2 Hz, H-2a), 1.74 (1H, dd, *J* = 13.8, 10.2 Hz, H-4b), 1.66 (1H, ddd, *J* = 13.2, 11.4, 2.4 Hz, H-2b), 1.28 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.15 (3H, s, H-14), 0.94 (3H, s, H-13); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 49.2 (C-1), 44.7 (C-2), 66.2 (C-3), 46.2 (C-4), 88.0 (C-5), 83.4 (C-6), 135.7 (C-7), 131.9 (C-8), 151.9 (C-9), 118.9 (C-10), 167.9 (C-11), 77.4 (C-12), 16.1 (C-13), 19.8 (C-14), 21.4 (C-15), 61.2 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.8 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **14** 为(-)-ethyl dihydrophaseate。

**化合物 15** 无色油状物;分子式 C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>, ESI-MS:  $m/z$  247 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 5.78 (1H, br s, H-4), 5.70 (1H, dd, *J* = 16.4, 4.8 Hz, H-8), 5.67 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-7), 4.22 (1H, m, H-9), 2.38 (1H, d, *J* = 16.8 Hz, H-2a), 2.06 (1H, d, *J* = 16.8 Hz, H-2b), 1.81 (3H, d, *J* = 4.8, 1.2 Hz, H-13), 1.14 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-10), 0.94 (3H, s, H-12), 0.92 (3H, s, H-11); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 42.6 (C-1), 50.8 (C-2), 201.4 (C-3), 127.3 (C-4), 167.6 (C-5), 80.0 (C-6), 137.1 (C-7), 130.1 (C-8), 68.8 (C-9), 24.6 (C-10), 23.5 (C-11), 24.0 (C-12), 19.7 (C-13)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **15** 为布卢门醇 A。

**化合物 16** 无色油状物,易溶于甲醇;分子式 C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>, ESI-MS:  $m/z$  225 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.02 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-7), 6.29 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-8), 3.91 (1H, m, H-3), 2.39 (1H, dd, *J* = 14.5, 5.0 Hz, H-4β), 2.28 (3H, s, H-10), 1.67 (1H, m, H-4α), 1.64 (1H, m, H-2α), 1.26 (1H, m, H-2β), 1.20 (6H, s, H-12, 13), 0.98 (3H, s, H-11); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 35.1 (C-1), 46.7 (C-2), 64.3 (C-3), 40.5 (C-4), 67.2 (C-5), 69.8 (C-6), 142.4 (C-7), 132.8 (C-8), 197.3 (C-9), 28.2 (C-10), 25.5 (C-11), 29.1 (C-12), 19.7 (C-13)。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道一致,故鉴定化合物 **16** 为 3α-hydroxy-5α,6α-epoxy-7-megastigmen-9-one。

**化合物 17** 白色粉末;分子式 C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>, ESI-MS:  $m/z$  377 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.99 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-2'), 6.86 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, H-6'), 6.78 (1H, dd, *J* = 7.8 Hz, H-5'), 6.62 (1H, s, H-2), 6.59 (1H, s, H-6), 5.51 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-7'), 3.84 (1H, m, H-9a'), 3.84 (4'-OCH<sub>3</sub>), 3.77 (1H, dd, *J* = 11.4, 7.8 Hz, H-9b'), 3.67 (9-OCH<sub>3</sub>), 3.47 (1H, m, H-8'), 2.82 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-7), 2.61 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-8); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 135.4 (C-1), 116.6 (C-2), 130.1 (C-3), 147.1 (C-4), 142.3 (C-5), 117.1 (C-6), 31.8 (C-7), 37.3 (C-8), 175.5 (C-9), 135.1 (C-1'), 110.6 (C-2'), 147.6 (C-3'), 149.2 (C-4'), 116.2 (C-5'), 119.8 (C-6'), 88.9 (C-7'), 55.9 (C-8'), 65.2 (C-9'), 56.5 (4'-OCH<sub>3</sub>), 52.2 (9-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[21]</sup>报道一致,故鉴定

化合物 **17** 为 trogopterin A。

化合物 **18** 白色粉末;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.28 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-6), 3.45 (1H, m, H-3), 1.18 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.76 (6H, overlap, H-26, 27), 0.61 (3H, s, H-18)。采用 TLC 展开, 10% 硫酸乙醇显色为紫色化合物, 并与标准品对照, 确定该化合物 **18** 为  $\beta$ -谷甾醇;

## 2.2 体外抗菌活性检测结果

本实验采用的受试菌株为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)。采用微板观察法检测其 MIC 值, 其中用环丙沙星作为阳性对照, 化合物 **1** 和 **10** 有较好的抑菌活性, 其 MIC 值分别为 11 和 33  $\mu\text{mol/L}$  (阳性对照环丙沙星 MIC 为 2  $\mu\text{mol/L}$ )。

## 3 讨论与结论

链霉菌具有神奇的创造功能, 其次生代谢产物多具有显著的生理活性<sup>[3]</sup>。本文对东川铜矿来源链霉菌 KC17012 发酵液进行分离, 得到 18 个成分, 主要为二肽类、吡啶生物碱衍生物、脱落酸类似物等。其中化合物 **1** 和 **10** 通过体外抗菌活性检测, 其体外抑菌活性 MIC 为 11 和 33  $\mu\text{mol/L}$ , 其余化合物均没有活性。化合物 **1** ~ **4** 为二肽类成分, 含量较大, 而化合物 **3** 是由 *D*-型脯氨酸和 *L*-型酪氨酸构成, 这种由 *D*-型氨基酸参与的肽类物质的构成形式在自然界中存在较少。化合物 **11** ~ **14** 为脱落酸 (ABA) 类似物成分。ABA 是一种重要的植物激素, 在调节植物生长, 抵抗极端外环境等方面具有重要作用。但是 ABA 生产成本较高, 难以大规模工业化生产, 因此利用微生物代谢产生 ABA 具有广阔的应用空间。本文研究链霉菌 KC17012 发酵液的次级代谢产物及单体成分的抗菌活性, 为后期深入挖掘该化合物的其他抗菌活性及抗菌机制提供了科学参考。

## 参考文献

- Actinomycete Classification Group, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. *Streptomyces* Identification Manual (链霉菌鉴定手册) [M]. Beijing: Science Press, 1975: 6-12.
- Zhang L, Chang KL, Yao G, et al. Research progress on secondary metabolites of *Streptomyces albireticuli* and *Streptomyces albofauvus* [J]. Chin Antibiotics J (中国抗生素杂志), 2021, 46(2): 89-96.

- Zhu ZY, Tian ZH, Li JX. Functions of *Streptomyces* and its application in agriculture [J]. Acta Trop Subt Plant (热带亚热带植物学报), 2019, 27: 580-590.
- Li RF, Cong LN, Xie DG, et al. Isolation, purification and structural identification of antibacterial active substances from marine *Streptomyces* HS-B34 [J]. Ind Microbiol, 2020, 5(5): 9-14.
- Ye JJ, Lu QP, Jia SH, et al. Identification and antibacterial activity of two strains of mangrove-derived *Streptomyces* [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2020, 36: 1134-1139.
- Zhou XY, Ma GH, Chen JY, et al. Study on the secondary metabolites of the polar fungus *Geomyces pannorum* SA3-2-YM [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 48-56.
- Bin Y, Jun DD, Xue FZ, et al. Proline-containing dipeptides from a marine sponge of a *Callyspongia* Species [J]. Helv Chim Acta, 2009, 92: 1112-1117.
- Pakorn, WA, Waranya, et al. Antibacterial activity of cyclo (*L*-Pro-*L*-Tyr) and cyclo (*D*-Pro-*L*-Tyr) from *Streptomyces* sp. strain 22-4 against phytopathogenic bacteria [J]. Nat Prod Res, 2016, 30: 1980-1983.
- Yue HC, Tang H, Liu BS, et al. Cyclodipeptides from the actinomycete *Kytococcus* sp. associated with the sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物), 2013, 32(2): 31-36.
- Chen MH, Wu HX, Dong B, et al. Chemical constituents from culture of *Streptomyces* sp. CICC 202950 [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 1320-1324.
- Feng WS, Zhang ZG, Li M, et al. Chemical constituents from the seeds of *Lepidium apetalum* Willd [J]. Chin Pharmacol J (中国药理学杂志), 2018, 53(1): 16-19.
- Guo WJ, Gu SX. Study on the chemical constituents of *Epulo-rhiza* sp. an endophytic fungus with potential anti-HIV activity [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2010, 41: 1773-1775.
- Ji RX, Cao YR, Miao CP, et al. Studies on secondary metabolites of *Streptomyces* sp. YIM 245 [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1-4.
- Sang SM, Xia ZH, Mao SL. Studies on chemical constituents in seeds of *Allium tuberosum* Rotl [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2000, 25: 286-287.
- He S, Wang HQ, Yan XJ, et al. Preparative isolation and purification of macrolactin antibiotics from marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* using high-speed counter-current chromatography in stepwise elution mode [J]. J Chromatogr A, 2013, 1272: 15-19.