

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20051403132

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

三株特异生境放线菌次级代谢产物的研究

The Study on the Secondary Metabolites from Three Strains of
Specific Habitats Actinomycetes

李 健

指导教师姓名: 沈月毛 教授

郑忠辉 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2008年6月30日

论文答辩时间: 2008年7月30日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 黄培强

评 阅 人: _____

2008年7月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要	I
英文摘要	III
本论文分离鉴定结构的化合物.....	VI
常用英文缩写词	XII
主要仪器及使用方法	XIV
主要试剂及耗材	XVI
第一篇 前 言	1
1. 天然产物是创新药物的重要源泉	1
2. 微生物天然产物的研究现状及发展趋势.....	2
2.1. 研究现状	2
2.2. 发展趋势	3
2.2.1. 组合生物合成	3
2.2.2. 基因组导向的天然产物研发.....	4
2.2.3. 拓展微生物的来源	6
3. 海洋放线菌及其活性天然产物	6
3.1. 海洋放线菌	6
3.1.1. 海洋放线菌分类概况	7
3.1.2. 海洋放线菌的分布	8
3.1.2.1. 海底沉积物中的放线菌.....	8
3.1.2.2. 海洋共附生放线菌	8
3.1.2.3. 其他海洋环境中的海洋放线菌	10
3.1.3. 海洋放线菌来源的活性物质.....	11
3.1.3.1. <i>Salinispora</i> 属产生的新化合物	11
3.1.3.2. <i>Marinispora</i> 属产生的新化合物	13
3.1.3.3. <i>Verrucosispora</i> 属产生的新化合物	15

3.1.3.4. <i>Micromonosproa</i> 属产生的新化合物	16
3.1.3.5. <i>Streptomyces</i> 属产生的新化合物	17
3.2. 植物内生菌及其活性天然产物	18
3.2.1. 植物内菌的分布及多样性研究	18
3.2.2. 植物内放线菌产生的活性物质	19
4. 本课题的研究目的、内容和意义	20
第二篇 第一章 海洋沉积物中放线菌的分离和活性筛选	22
1.1. 实验部分	23
1.1.1. 材料和方法	23
1.1.1.1. 材料	23
1.1.1.2. 方法	25
1.2. 结果与分析	26
1.2.1. 海洋放线菌的分离及其抗菌活性的筛选	26
1.2.2. 抗细菌青枯病原菌的实验	27
1.2.3. 抗肿瘤活性菌株的筛选	31
1.3. 讨论	33
第二篇 第二章 海洋放线菌DSS-18 化学成分研究	34
2.1. 实验部分	35
2.1.1. DSS-18 菌株鉴定的及其生物活性测定	35
2.1.1.1. DSS-18 菌株鉴定	35
2.1.1.1.1. 培养特征分析	35
2.1.1.1.2. DSS-18 菌株的 16S rDNA 鉴定	35
2.1.1.2. DSS-18 发酵培养基筛选及提取物生物活性测定	37
2.1.2. DSS-18 菌株的发酵	38
2.1.3. DSS-18 下游处理及化学成分分离	38
2.1.4. 化合物DS-11 和DS-16 抗肿瘤活性测定	41
2.2. 实验结果	41

2.2.1. 放线菌的鉴定	41
2.2.1. <i>Streptomyces</i> sp. DSS-18 菌株的生物活性测定结果	43
2.2.2. 化合物的结构解析	44
2.2.3. 化合物DS-11 和DS-16 抗肿瘤活性测定结果.....	59
2.3. 讨论	60
2.3.1. 海洋放线菌化学成分	61
2.3.2. Type II聚酮类化合物生物合成的调控	61
第三篇 第三章 云南美登木内生放线菌CS化学成分研究.....	64
3.1. 植物内共生放线菌研究简介	64
3.1.1. 美登木内共生放线菌CS的研究背景	64
3.1.2. 继续研究的意义及目的	64
3.2. 实验部分	66
3.2.1. 发酵培养基的筛选	66
3.2.1.1. 材料和方法.....	66
3.2.2. 120L液体发酵及下游处理	67
3.2.2.1. 120L液体发酵	67
3.2.2.2. 下游处理过程	68
3.2.3. 化学成分的分离及结构测定	68
3.2.3.1. 化学成分的分离.....	68
3.2.3.2. 化合物的结构测定	72
3.2.4. Mosher法测定化合物CS1-4-1 的绝对构型	72
3.2.4.1. 实验部分	72
3.2.4.1.1. 仪器与试剂.....	72
3.2.4.1.2. MTPA酯制备	72
3.2.5. 化合物CS1-3, CSM1-3 和CSM2-3 重结晶及X-Ray衍射实验	73
3.2.5.2.1. CS1-3 重结晶及晶体衍射实验.....	73
3.2.5.2.2. 化合物CSM1-3 和CSM2-3 重结晶及晶体衍射实验.....	73
3.2.5.3. 晶体的数据分析.....	73

3.2.6. 化合物CS1-3 生物合成的初步研究.....	74
3.3. 结果与分析.....	74
3.3.1. 化合物结构解析.....	74
3.3.2. 化合物CS1-3 的 ¹³ C-NMR谱的分析.....	116
3.3.3. 部分化合物抗肿瘤活性研究.....	117
3.4. 讨论	117
第三篇 第四章 滑桃树内生放线菌W6F2B化学成分的研究.....	119
4.1. 实验部分	119
4.1.1. 菌株发酵	119
4.1.1.1. 材料和方法.....	119
4.1.1.2. 发酵过程及下游处理	119
4.1.1.3. 化学成分分离及重结晶.....	120
4.2. 结果与分析.....	120
4.2.1 结构解析	120
4.3. 小结	125
第三篇 第五章 Naphthomycin L的抗肿瘤作用机制的研究	126
5.1. 安莎类抗生素研究简介.....	126
5.2. 实验部分	127
5.2.1. 细胞培养	127
5.2.1.1. 细胞培养液的配制.....	127
5.2.1.2. 细胞的培养和传代.....	127
5.2.2. MTT法测定Naphthomycin L的抗肿瘤活性	127
5.2.3. 细胞形态观察	128
5.2.4. 流式细胞仪检测 Naphthomycin L 对人乳腺管癌细胞的作用	128
5.2.4.1. 流式细胞仪分析 Naphthomycin L 对人乳腺癌细胞存活的影响	128

5.2.4.2. 流式细胞仪分析 Naphthomycin L 对人乳腺癌细胞周期的影响.....	128
5.3. 结果与分析.....	128
5.3.1. Naphthomycin L 的细胞毒作用	128
5.3.2. Naphthomycin L 诱导肿瘤细胞死亡	129
5.3.3. Naphthomycin L 对肿瘤细胞形态影响.....	129
5.3.4. Naphthomycin L 对肿瘤细胞周期的影响	130
5.4. 讨论	132
结 语.....	133
参考文献.....	135

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Content

Abstract	I
Abstract in English	III
The identified structures in the study	VI
Abbreviations of English	XII
Main instruments	XIV
Main reagents and disposable materials	XVI
Part one Introduction	1
1. Natural products – major resources for novel drugs	1
2. Advance trends on natural products	2
2.1. Advance.....	2
2.2. Trends.....	3
2.2.1. Combinational biosynthesis.....	3
2.2.2. Genomics-Guided Natural-Product Discovery.....	4
2.2.3. Microbiology resources extension	6
3. Marine actinomycetes and natural products with bioactivities	6
3.1. Marine actinomycetes.....	6
3.1.1. Classification of marine actinomycetes.....	7
3.1.2. Distribution of marine actinomycetes.....	8
3.1.2.1. Actinomycetes from marine sediments	8
3.1.2.2. Symbiotic marine actinomycetes	8
3.1.2.3. Actinomycetes on other marine environment.....	10
3.1.3. Bioactive natural products from marine actinomycetes	11

3.1.3.1. New compounds from <i>Salinispora</i> sp.	11
3.1.3.2. New compounds from <i>Marinispora</i> sp.	13
3.1.3.3. New compounds from <i>Verrucosispora</i> sp.	15
3.1.3.4. New compounds from <i>Micromonosproa</i> sp.	16
3.1.3.5. New compounds from <i>Streptomyces</i> sp.	17
3.2. Plant endophyte and natural products with bioactivities	18
3.2.1. Distribution Diversity of plant endophytes.....	18
3.2.2. Bioactive natural products from plant endophytes.....	19
4. Purpose, contents and significance of this subject	20
Part two. Chapter one. Isolation and bioactivities screening of	
actinomycetes from marine sediments	22
1.1. Experiment part	23
1.1.1. Materials and methods	23
1.1.1.1. Materials	23
1.1.1.2. Methods	25
1.2. Results and Analysis	26
1.2.1. Isolation and antimicrobial activities screening	26
1.2.2. Screening of anti <i>Ralstonia solanacearum</i> strains	27
1.2.3. Screening of antitumor strains	31
1.3. Discussion	33
Part two. Chapter two. The study on Chemical Components of	
marine actinomycete DSS-18	34
2.1. Experiment part	35
2.1.1. The identification of strain DSS-18	35
2.1.1.1. The identification of strain DSS-18	35
2.1.1.1.1. The culture characters	35
2.1.1.1.2. The analysis of 16S rDNA sequence	35

2.1.1.2. Media screening for DSS-18 fermentation and it's bioactivities screen.....	37
2.1.2. Fermentation of strain DSS-18	38
2.1.3. The downstream processing of DSS-18 fermentation broth and Chemical Components isolation.....	38
2.1.4. Antitumour activity screening of DS-11 and DS-16	41
2.2. Results and Analysis.....	41
2.2.1. The identification of DSS-18	41
2.2.1. The bioactive results of DSS-18	43
2.2.2. Structure elucidation	44
2.2.3. The antitumour activity of DS-11 and DS-16	59
2.3. Discussion	60
2.3.1. Chemical Components of marine actinomycete DSS-18	61
2.3.2. Regulation of Type II Polyketide biosynthesis	61
Part three. Chapter Three. Chemical Components study from <i>Maytenus hookeri</i> endophyte CS	64
3.1. Introduction on plant endophyt studies	64
3.1.1. The research background on <i>Maytenus hookeri</i> endophyte CS	64
3.1.2. Purpose and significance of further research	64
3.2. Experiment part	66
3.2.1. Media screening for CS fermentation	66
3.2.1.1. Materials and methods	66
3.2.2. The downstream processing of CS fermentation broth	67
3.2.2.1. 120 L Liquid Fermentation.	67
3.2.2.2. The downstream processing of CS broth	68
3.2.3. The isolation of Chemical Components and structure elucidation ..	68
3.2.3.1. The isolation of Chemical Components	68
3.2.3.2. Structure elucidation	72

3.2.4. Absolute Configuration determination of CS1-4-1 by Mosher's method.....	72
3.2.4.1. Experiment part	72
3.2.4.1.1. Instruments and reagents	72
3.2.4.1.2. Preparation of MTPA ester.....	72
3.2.5. Recrystallization and X-Ray diffraction of CS1-3, CSM1-3 and CSM2-3	73
3.2.5.2.1. Recrystallization and X-Ray diffraction of CS1-3	73
3.2.5.2.2. Recrystallization and X-Ray diffraction CSM1-3 和 CSM2-373	
3.2.5.3. Data analysis	73
3.2.6. The biosynthesis pathway study of CS1-3.....	74
3.3. Results and Analysis.....	74
3.3.1. Structure elucidation	74
3.3.2. The ¹³ C-NMR analysis of CS1-3.....	116
3.3.3. The antitumour activity of several compounds.....	117
3.4. Discussion	117
Part four. Chapter Four. Chemical Components study from <i>Trewia nudiflora</i> endophyte W6F2B	119
4.1. Experiment part	119
4.1.1. Fermentation of strain W6F2B.....	119
4.1.1.1. Materials and methods	119
4.1.1.2. The downstream processing.....	119
4.1.1.3. The isolation of Chemical Components and Recrystallization ...	
.....	120
4.2. Results and Analysis.....	120
4.2.1 Structure elucidation	120
4.3. Brief summary	125

Part Three. Chapter Five. The antitumor mechanism of Naphthomycin L	126
5.1. Introduction on ansamycin.....	126
5.2. Experiment part	127
5.2.1. Cell Culture	127
5.2.1.1. cell culture medium Preparation	127
5.2.1.2. Cultivation and passage of tumor cells	127
5.2.2. Antitumor activity of Naphthomycin L by MTT method	127
5.2.3. Morphological Observation	128
5.2.4. Effects of naphthomycin L on MDA-MB-435 cells detected by flow cytometry	128
5.2.4.1. Apoptosis of naphthomycin L on MDA-MB-435 detected by flow cytometry	128
5.2.4.2. Cell cycle of naphthomycin L on MDA-MB-435 detected by flow cytometry	128
5.3. Results and Analysis	128
5.3.1. Cytotoxicity of Naphthomycin L.....	128
5.3.2. Cell apoptosis induced by Naphthomycin L.....	129
5.3.3. Effects of Naphthomycin L on the morphology of MDA-MB-435 cells.	129
5.3.4. Effects of Naphthomycin L on the cell cycle of MDA-MB-435 cells	130
5.4. Discussion	132
Conclusion.....	133
Reference	135

摘要

随着陆生的微生物资源尤其是放线菌资源被深入研究和开发，资源几近枯竭，已经无法为制药业提供足够的药物先导化合物。目前很多学者将目光着眼于新资源中放线菌的研究，这些新资源包括海洋和植物内共生等。已有的研究表明这些放线菌具有相对特殊的代谢途径，能够产生结构新颖、活性突出及作用机制独特的次级代谢产物，这些新资源成为天然产物研发的新热点。

本研究采用选择性分离方法对采自西太平洋近赤道区的 19 个深海沉积物样品中的放线菌进行了较为系统的分离，从中分离到 90 株放线菌，对其发酵液乙酸乙酯抽提物的生物活性进行筛选。对 3 株放线菌 (1 株海洋放线菌和 2 株云南美登木内生放线菌)进行了次级代谢产物研究，从其发酵产物中分离鉴定 42 个化合物 (包括 1 个乙酰化产物，2 个 Mosher 酯化和 1 个对溴苯甲酰化产物)，其中 25 个是新化合物。对部分化合物进行了生物活性研究。并对具有较强细胞毒活性的新化合物 **Naphthomycin L** 进行了初步的作用机制研究。

对从 19 个海洋沉积物样品中分离的 90 株放线菌，采用滤纸片琼脂扩散法和 MTT 法，对其发酵液乙酸乙酯抽提物的抗菌活性和体外细胞毒性进行筛选。结果显示，有 35 株菌对至少一种细菌或者真菌有抑制作用，有 29 株菌对青枯雷尔氏菌有抑制作用，分别占总供测菌株的 38.8%和 32.2%。有 32 株放线菌具有体外细胞毒性占供测菌株的 35.6%，其中只对 KB 细胞有抑制作用的菌株有 16 株，只对 Raji 细胞有抑制作用的菌株有 9 株，对两种肿瘤细胞都有抑制作用的菌株有 7 株分别占供测菌株的 17.8%、10.0%和 7.8%。海洋沉积物来源的放线菌种蕴藏着丰富的产生生物活性物质的菌株，具有潜在的应用前景。

对海洋放线菌 **DSS-18** 进行了高氏培养基的 150 L 发酵罐发酵，并对其次生代谢产物进行了分离纯化，通过波谱学方法对化合物结构进行了测定，经过结构解析测定了 16 个结构，化合物类型涉及聚酮类、大环内酯和环肽。其中化合物 **DS-20**、**DS-25**、**DS-26**、**DS-27**、**DS-28** 和 **DS-31** 为新 II 型聚酮类化合物，**DS-9** 和 **DS-16** 为已知聚酮类化合物；化合物 **DS-3**、**DS-5**、**DS-6**、**DS-8** 和 **DS-10** 为已知的四重内酯 (**Nonactin**) 类化合物 **DS-1** 和 **DS-2** 为其单体酸；化合物 **DS-11** 为环肽类化合物与 **Valinomycin** 结构相同，四重内酯类化合物和环肽类化合物均

属于离子载体类抗生素。四重内酯类化合物具有较强的抗细菌和细胞毒活性；**DS-11** 具有极强的细胞毒活性，对Raji细胞 IC_{50} 为 0.8 ng/mL，而且具有一定的抗真菌活性。根据化合物和粗提物活性实验结果我们可以初步推测构成**DSS-18** 菌株发酵液粗提物抗菌、抗肿瘤活性的成分主要为这些四重内酯以及环肽。

对云南美登木内共生放线菌 **CS** 进行了 Waksman 培养基的 150 L 发酵罐发酵，从其发酵提取物中分离鉴定了 26 个结构 (包括 1 个乙酰化产物, 2 个 Mosher 酯化产物和 1 个对溴苯甲酰化产物), 其中 19 个新化合物, 化合物类型包括大环内酯类、大环内酰胺类、聚酮类和萜类。化合物 **CS1-2-1**、**CS1-2-2**、**CS1-4-1**、**CS1-4-2**、**CS4-3**、**CS4-8**、**CS1-3**、**CS3-4-1** 和 **CS3-4-3** 为新型聚酮类化合物；**CSM1-1**、**CSM1-3**、**CSM2-1**、**CSM2-2**、**CSM2-3** 为新型大环内酯类化合物；**CS4-2** 为新型大环内酰胺类化合物。通过 Mosher 酯化反应确定了化合物 **CS1-4-1** 的绝对构型。将化合物 **CS1-3** 乙酰化后的产物进行 X-ray 衍射实验确定了化合物 **CS1-3** 的相对立体构型。对化合物 **CSM1-3** 及 **CSM2-3** 进行 X-ray 衍射实验确定了这类化合物的相对立体构型。初步的活性测试表明化合物 **CSM1-1**、**CSM1-3**、**CSM2-1**、**CSM2-2**、**CSM2-3** 和 **CS4-2** 具有较强的细胞毒活性。

经过生物活性测试表明化合物 **CS4-2** (**Naphthomycin L**) 具有很强的细胞毒性，对其进行了细胞毒性作用机制的初步研究。

对滑桃树内共生放线菌 **W6F2B** 进行了 YMG 培养基的 50 L 发酵罐发酵。并从发酵产物中分离鉴定了 2 个化合物，**W1-2** 和 **W1-3** 均为已知化合物，本文首次应用晶体衍射实验确定化合物 **W1-2** 的相对立体构型。

本研究的结果表明，无论是海洋放线菌，还是植物内生放线菌都蕴藏着丰富的次生代谢产物资源，这些结构新颖、活性突出的次生代谢产物将是药物或先导化合物的重要来源。

关键词：放线菌；次生代谢

Abstract

As the terrestrial sources, especially actinomycetes, have been fully researched, they can't provide enough new leading-compounds for pharmacy. Thus, it is crucial that new groups of actinomycetes from unexplored or underexploited habitats such as marine and plant endophytes be pursued as sources of novel bioactive secondary metabolites. Relative studies have proved that marine and endophytes actinomycetes can produce numerous metabolites with novel structures, powerful activity and unique mechanism. All these new sources have become new focus for natural product research.

In this study, we isolated 90 strains from 19 deep sea sediments samples, and examined the bioactivity of the ethyl acetate extract of these strains. We focused on and studied the secondary metabolites of 3 actinomycetes (**DSS-18**, **CS**, **W6F2B**). Totally, 42 compounds, including 25 new compounds, were isolated and identified from the three strains,. The bioactivities of some compounds were studied. The primary mechanism of the new compound **Naphthomycin L** which showed activity was studied as well.

The cytotoxin and anti-microbial activities of 90 strains from 19 marine sediments samples were studied by MTT and disc-agar diffusion methods. The result indicated, 35 strain showed inhibitory activities against at least one bacterial or fungal, 29 strain showed inhibitory activities against *Ralstonia solanacearum*, which accounted for 38.8% and 32.2% respectively of all strains. 32 strains showed cytotoxin, accounting for 35.6% of all strains, Among them, 16 strains were against KB cell lines, 9 strains against Raji cell lines and 7 strains against both cell, lines which accounted for 17.8%, 10.0% and 7.8% respectively. Actinomycetes from marine sediments produce abundant secondary metabolites with potent bioactivities, indicating potential values in applications.

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库