

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 21720081152534

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

两株特殊生境放线菌的次级代谢产物的研究

Studies on the Secondary Metabolites Produced by Two
Actinomycetes from Specific Habitats

何海钢

指导教师姓名: 宋思扬教授
沈月毛教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2011年 月 日

论文答辩时间: 2011年 月 日

学位授予日期: 2011年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011年5月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

摘 要	I
Abstract	IV
常用英文缩略语	VIII
第一章 前 言	1
1.1 放线菌与天然产物	1
1.2 海洋放线菌及其活性次级代谢产物研究概况	2
1.2.1 海洋放线菌	2
1.2.1.1 海洋放线菌的分布.....	2
1.2.1.2 海洋放线菌物种资源及生物多样性.....	4
1.2.2 海洋放线菌活性次级代谢产物研究概况	5
1.2.2.1 抗菌活性化合物.....	5
1.2.2.2 抗肿瘤活性化合物.....	7
1.2.2.3 其它生物活性的化合物.....	9
1.3 植物内生放线菌及其活性次级代谢产物研究概况	11
1.3.1 植物内生放线菌	11
1.3.1.1 植物内生放线菌的生物多样性.....	12
1.3.1.2 植物内生放线菌与宿主的关系.....	13
1.3.2 植物内生放线菌活性次级代谢产物研究概况	14
1.3.2.1 抗菌活性化合物.....	14
1.3.2.2 抗肿瘤活性化合物.....	15
1.3.2.3 其它生物活性的化合物.....	17
1.4. 本学位论文研究的目的、意义和内容	18
第二章 材料与方 法	20
2.1 材 料	20
2.1.1 菌株来源	20
2.1.2 常用培养基	20

2.1.3 拮抗测定指示菌	21
2.1.4 肿瘤细胞株	21
2.1.5 抗肿瘤活性测试常用试剂	21
2.1.6 主要试剂及耗材	22
2.1.7 TLC 显色剂	23
2.1.8 主要仪器	23
2.2 方法	24
2.2.1 技术路线	24
2.2.2 培养基的筛选	24
2.2.3 菌株的发酵	25
2.2.4 抗菌活性测定	26
2.2.5 抗肿瘤活性测定	26
2.2.6 发酵产物的分离纯化	27
2.2.6.1 薄层层析 (TLC)	27
2.2.6.2 反相硅胶柱 (RP-18) 层析	27
2.2.6.3 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析	28
2.2.6.4 正相硅胶柱层析	28
2.2.6.5 制备性薄层层析 (PTLC)	29
2.2.6.6 重结晶	29
2.2.7 化合物的结构测定	29
2.2.7.1 质谱 (MS) 分析	29
2.2.7.2 核磁共振 (NMR) 分析	29
第三章 结果与分析	31
3.1 海洋小单孢菌 <i>Micromonospora</i> sp.Fxy120 菌株次级代谢产物研究	31
3.1.1 菌株的固体发酵及发酵产物的提取	31
3.1.1.1 发酵培养基筛选	31
3.1.1.2 15L 固体发酵及发酵产物的提取	31
3.1.2 发酵产物的分离纯化	32
3.1.2.1 组分 F1 的分离纯化	32

3.1.2.2 组分 F2 的分离纯化	34
3.1.2.3 组分 F3 的分离纯化	36
3.1.3 化合物的结构解析	36
3.1.3.1 化合物 HF-1	36
3.1.3.2 化合物 HF-2	37
3.1.3.3 化合物 HF-3	39
3.1.3.4 化合物 HF-4	40
3.1.3.5 化合物 HF-5	42
3.1.3.6 化合物 HF-12	43
3.1.3.7 化合物 HF-14	44
3.1.3.8 化合物 HF-15	45
3.1.3.9 化合物 HF-16	46
3.2 喜树内生链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.W112 菌株次级代谢产物的研究	48
3.2.1 菌株的固体发酵及发酵产物的提取	48
3.2.1.1 发酵培养基筛选	48
3.2.1.2 17 L 固体发酵及发酵产物的提取	49
3.2.2 发酵产物的分离纯化	49
3.2.2.1 组分 W1 的分离纯化	49
3.2.2.2 组分 W2 的分离纯化	52
3.2.2.3 组分 W3 的分离纯化	54
3.2.2.3 组分 W5 的分离纯化	54
3.2.3 化合物的结构解析	55
3.2.3.1 化合物 HW-1	55
3.2.3.2 化合物 HW-2	57
3.2.3.3 化合物 HW-4	60
3.2.3.4 化合物 HW-7	61
3.2.3.5 化合物 HW-8	62
3.2.3.6 化合物 HW-12	63
3.2.3.7 化合物 HW-14	64

3.2.3.8 化合物 HW-15	65
3.2.3.9 化合物 HW-16	67
3.2.3.10 化合物 HW-22	68
3.2.3.11 化合物 HW-23	70
3.2.3.12 化合物 HW-25	74
3.2.3.13 化合物 HW-30	75
3.3 化合物的抗菌和抗肿瘤活性测试	77
3.3.1 抗菌活性测试	77
3.3.2 抗肿瘤活性测试	77
第四章 讨论与展望	78
4.1 菌株中分离到的化学成分分析	78
4.1.1 海洋小单孢菌 <i>Micromonospora</i> sp.Fxy120 菌株次级代谢产物分析...	78
4.1.2 喜树内生链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.W112 菌株次级代谢产物分析	79
4.2 AHBA 合酶基因阳性菌株与安莎类抗生素筛选	80
4.3 展望	81
参考文献	83
致 谢	90

Content

Abstract.....	I
Abstract in English	IV
Abbreviations	VIII
Chapter one Introduction	1
1.1 Actinomycetes and Natural products.....	1
1.2 Marine actinomycetes and bioactive natural products	2
1.2.1 Marine actinomycetes.....	2
1.2.1.1 Distribution of marine actinomycetes.....	2
1.2.1.2 Resources and biodiversity of marine actinomycetes.....	4
1.2.2 Bioactive metabolites from marine actinomycetes.....	5
1.2.2.1 Antimicrobial compounds.....	5
1.2.2.2 Antitumor compounds.....	7
1.2.2.3 Compounds with miscellaneous bioactivities.....	9
1.3 Plant endophytic actinomycetes and bioactive natural products	11
1.3.1 Plant endophytic actinomycetes.....	11
1.3.1.1 Biodiversity of plant endophytic actinomycetes.....	12
1.3.1.2 Relationship between endophytic actinomycetes and host plants ...	13
1.3.2 Bioactive metabolites study from plant endophytic actinomycetes.....	14
1.3.2.1 Antimicrobial compounds.....	14
1.3.2.2 Antitumor compounds.....	15
1.3.2.3 Compounds with miscellaneous bioactivities.....	17
1.4. Purpose, significance and contents of this thesis.....	18
Chapter two Materials and Methods	20
2.1 Materials	20
2.1.1 Sources of the strains used in this dissertation.....	20

2.1.2	Fermentation media.....	20
2.1.3	The indicator organisms.....	21
2.1.4	The tumor cell lines.....	21
2.1.5	Reagents.....	21
2.1.6	TLC chromogenic reagents.....	23
2.1.7	Main reagents and disposable materials.....	22
2.1.8	Main instruments.....	23
2.2	Methods.....	24
2.2.1	Experimental procedure.....	24
2.2.2	Screening of the fermentation media.....	24
2.2.3	Fermentation.....	25
2.2.4	Antimicrobial bioassays.....	26
2.2.5	Antitumor bioassays.....	26
2.2.6	Isolation and purification of natural products.....	27
2.2.6.1	Thin layer chromatography (TLC).....	27
2.2.6.2	Reversed-phase silica gel (RP-18) column chromatography.....	27
2.2.6.3	Sephadex LH-20 column chromatography.....	28
2.2.6.4	Silica gel column chromatography.....	28
2.2.6.5	Preparative thin layer chromatography (PTLC).....	29
2.2.6.6	Recrystallization.....	29
2.2.7	Structure elucidation.....	29
2.2.7.1	Mass spectrometry (MS) analysis.....	29
2.2.7.2	Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis.....	29
Chapter three Results and Analysis.....		31
3.1	Study on the secondary metabolites of marine <i>Micromonospora</i> sp. Fxy120.....	31
3.1.1	The solid state fermentation and extraction.....	31
3.1.1.1	Fermentation media.....	31
3.1.1.2	The 15L solid fermentation and extraction.....	31

3.1.2 Isolation of fermentation products	32
3.1.2.1 Isolation of fraction F1	32
3.1.2.2 Isolation of fraction F2	34
3.1.2.3 Isolation of fraction F3	36
3.1.3 Structure elucidation of compounds.....	36
3.1.3.1 Compound HF-1	36
3.1.3.2 Compound HF-2	37
3.1.3.3 Compound HF-3	39
3.1.3.4 Compound HF-4	30
3.1.3.5 Compound HF-5	42
3.1.3.6 Compound HF-12	43
3.1.3.7 Compound HF-14	44
3.1.3.8 Compound HF-15	45
3.1.3.9 Compound HF-16	46
3.2 Study on the secondary metabolites of the endophytic <i>Streptomyces</i> sp. W112 of <i>Camptotheca acuminata</i>	48
3.2.1 Solid state fermentation and extraction.....	48
3.2.1.1 Fermentation media screening	48
3.2.1.2 The 17 L solid fermentation and extraction.....	49
3.2.2 Isolation of fermentation products	49
3.2.2.1 Isolation of fraction W1	49
3.2.2.2 Isolation of fraction W2	52
3.2.2.3 Isolation of fraction W3	54
3.2.2.3 Isolation of fraction W5	54
3.2.3 Structure elucidation of compounds.....	55
3.2.3.1 Compound HW-1	55
3.2.3.2 Compound HW-2	57
3.2.3.3 Compound HW-4	60
3.2.3.4 Compound HW-7	61
3.2.3.5 Compound HW-8	62

3.2.3.6 Compound HW-12	63
3.2.3.7 Compound HW-14	64
3.2.3.8 Compound HW-15	65
3.2.3.9 Compound HW-16	67
3.2.3.10 Compound HW-22	68
3.2.3.11 Compound HW-23	70
3.2.3.12 Compound HW-25	74
3.2.3.13 Compound HW-30	75
3.3 Antimicrobial and antitumor activities of compounds	77
3.3.1 Antimicrobial activities	77
3.3.2 Antitumor activities	77
Chapter four Discussion and Perspectives	78
4.1 Discussion of the compounds from the strains	78
4.1.1 Compounds from <i>Micromonospora</i> sp.Fxy120	78
4.1.2 Compounds from <i>Streptomyces</i> sp.W112	79
4.2 AHBA synthetase gene positive strains and screening for the production of ansamycin antibiotics	80
4.3 Perspectives	81
References	83
Acknowledgements	90

摘要

天然产物是药物的重要来源。放线菌在产生抗生素方面有独特的优势，目前发现的2万多种微生物来源的生物活性物质中，约有45%是由放线菌所产生的。然而，随着陆地可培养微生物资源的大量开发和研究，从中发现新菌种、新代谢产物的可能性日趋减小。于是研究者们将目光投向了海洋和植物内生放线菌等特殊生境的新资源。独特的生存环境意味着独特的进化过程，意味着独特的代谢途径和防御机制。从特殊生境放线菌中，可以分离到许多结构新颖、生物活性多样而独特的次级代谢产物，因此特殊生境已成为发现新菌种和新活性物质的重要源头。

本论文对分离自海洋和药用植物的2株放线菌（PCR扩增AHBA合酶基因均呈阳性）的次级代谢产物进行了研究，旨在发掘具有较高生物活性的新天然产物，为开发新药奠定基础。

对海洋小单孢菌 *Micromonospora* sp. Fxy120 菌株进行15 L的YMG固体培养基发酵，采用中压反相硅胶柱层析、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析和正相硅胶柱层析等方法对其发酵产物进行了分离纯化，通过波谱学方法对化合物的结构进行了测定，共鉴定了9个化合物，包括1个新的聚酮类化合物 Phaeochromycin 的衍生物（HF-2）、1个壬二酸（HF-1）、1个二苯氨基甲酸酯类化合物（HF-3）、1个大环内酯类化合物(S)-Curvularin（HF-4）、1个十八碳烯酸单甘油酯（HF-5）、1个新的苯甲酸类化合物（HF-12）、2个苯乙酸类化合物（HF-14、HF-15）和1个新的吡啶衍生物（HF-16）（见下附表）。

对喜树内生链霉菌 *Streptomyces* sp. W112 菌株进行17 L的Waksman固体培养基发酵，从其发酵提取物中分离并鉴定13个化合物，包括1个靛红酸酐衍生物（HW-1）、2个新的大环内酯类化合物（HW-2和HW-23）、3个苯甲酸类化合物（HW-4、HW-6和HW-7）、1个吲哚乙酸（HW-30）及其3个衍生物（HW-8、HW-12和HW-25）、2个吡喃酮类化合物 Germicidins A和C（HW-14和HW-15）、1个吡喃衍生物（HW-16）和1个萘醌型大环内酰胺类化合物（HW-22）。其中HW-2和HW-23为新化合物，HW-22属于安莎类化合物 Hygrocin 的衍生物。

分别采用滤纸片扩散法和MTT法对部分化合物的抗菌和抗肿瘤活性进行了






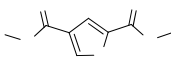
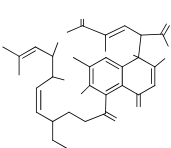
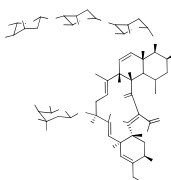

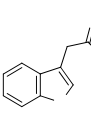
初步测定。抗菌活性测定结果显示, 在终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{片}$ 时, 化合物 **HF-16**、**HW-2**、**HW-22** 和 **HW-23** 均对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* CMCC26003 具有较强的抑制活性, 抑菌圈直径 (mm) 分别为: 8、23、8 和 16; 抗肿瘤活性测定结果显示, 在浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, **HW-2** 和 **HW-22** 对人宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制率分别为 47.5% 和 57.4%, **HW-22** 对人肝癌 HepG2 细胞生长的抑制率为 77.3%。

本论文研究结果表明, 海洋放线菌和植物内生放线菌蕴藏着丰富的次级代谢产物, 是开发抗菌抗肿瘤等多种药物的潜在资源。

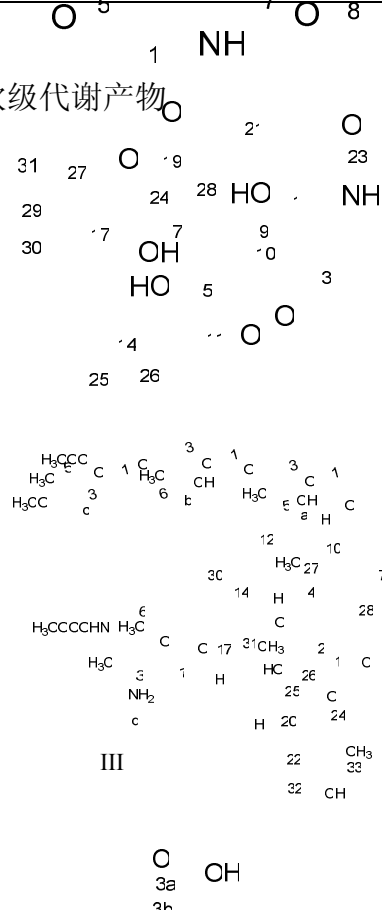
附表 两实验菌株中纯化的化合物数据表

名称	结构	分子式	分子量(Da)	类型	生物活性	新的/已知
HF-1		$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$	188.0	壬二酸	\	已知
HF-2		$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$	304.0	聚酮类	无	新化合物
HF-3		$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$	314	二苯氨基甲酸酯类	\	已知
HF-4		$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5$	292	大环内酯类	\	已知
HF-5		$\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4$	356.7	十八碳烯酸单甘油酯类	\	已知
HF-12		$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_5$	208	苯甲酸类	无	新化合物
HF-14		$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	152.0	苯甲酸类	\	已知
HF-15		$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	152	苯甲酸类	\	已知
HF-16		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$	179	吡啶衍生物	抗菌	新化合物
HW-1		$\text{C}_8\text{H}_5\text{NO}_4$	179	靛红酸酐衍生物	\	已知
HW-2		$\text{C}_{63}\text{H}_{92}\text{N}_2\text{O}_{21}$	1213.5	大环内酯类	抗菌、抗肿瘤	新化合物
HW-4		$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	154	苯甲酸类	\	已知

摘要

HW-7		C ₇ H ₆ O ₃	138	苯甲酸类	\	已知
HW-8		C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	246	吲哚乙酸类	\	已知
HW-12		C ₉ H ₇ NO ₂	161	吲哚乙酸类	\	已知
HW-14		C ₁₁ H ₁₆ O ₃	196.2	吡喃酮类	\	已知
HW-15		C ₁₀ H ₁₂ O ₃	182.2	吡喃酮类	\	已知
HW-16		C ₈ H ₉ NO ₄	183	吡喃衍生物	\	已知
HW-22		C ₃₁ H ₃₅ NO ₈	549.2	大环内酯类 (安莎类)	抗菌、 抗肿瘤	已知
HW-23		C ₆₃ H ₉₄ N ₂ O ₁₉	1183	大环内酯类	抗菌	新化合物
HW-25		C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	205	吲哚乙酸类	\	已知
HW-30		C ₁₀ H ₉ NO ₂	175	吲哚乙酸	\	已知

关键词：药用植物；放线菌；次级代谢产物



Abstract

Natural products, or derivatives there-of, are the most important source of new medicines. The role of actinomycetes as a distinguished source of useful pharmaceuticals is highlighted by the remarkable fact that, for all of the 20 000 more antibiotics isolated from microorganisms so far, about 45% of them are produced by actinomycetes. However, with the terrestrial actinomycetes having been thoroughly explored and researched, the possibilities of discovering new species and new secondary metabolites from this source has been declined gradually. Thus, researchers turned their attention to the actinomycetes from marine and medicinal plant endophytes. Special ecological environment means distinct evolutionary processes, which implies unique metabolic pathways and defense mechanisms, resulting in high diversity of secondary metabolites in chemical structures and biological activities. Among those metabolites, many valuable lead compounds were obtained for discovery of new antibiotics. Therefore, marine and medicinal plant endophytic actinomycetes have become the sources with great importance for new microbial species and novel bioactive compounds.

In this thesis, secondary metabolites from one marine actinomycete and one plant endophytic actinomycete, both possessing a gene for AHBA synthase, were isolated for the discovery of new bioactive compounds.

The marine actinomycete *Micromonospora* sp. Fxy120 was cultured in a 15 L YMG agar medium. Nine compounds were purified from the fermentation product. Their structures were elucidated by extensive analyses of spectroscopic data to be a new polyketide Phaeochromycin derivative (**HF-2**), heptanedioic acid (**HF-1**), diethylenebenzene carbamate (**HF-3**), a macrocyclic lactone (*S*)-Curvularin (**HF-4**), octadecenoic acid glyceride (**HF-5**), three benzoic acids (**HF-12**, **HF-14** and **HF-15**) and a new pyridine derivative (**HF-16**) (Shown in the table followed).

The endophytic *Streptomyces* sp. W112 of medicinal plant *Camptotheca acuminata* was cultured in 17 L Waksman agar medium. Thirteen compounds were

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