

深海芽孢杆菌 E401B03 次生代谢产物分离和结构鉴定

郭书举¹, 史大永¹, 李富超¹, 朱校斌¹, 缪宇平²

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国水产科学院 东海水产研究所, 上海 200090)

摘要: 利用硅胶柱、凝胶柱及高效液相(HPLC)等色谱方法, 对采自中国南海的深海芽孢杆菌 E401B03 发酵液的乙酸乙酯相浸膏进行了分离, 通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR、EIMS 等方法鉴定了 7 个化合物: N-苯乙基乙酰胺、3-(羟基乙酰基)-吡啶、3-(2-羟基乙基)-吡啶、环(缬-缬)二肽、尿嘧啶、胸腺嘧啶、对羟基苯甲醛。

关键词: 深海; 芽孢杆菌; 次生代谢产物

中图分类号: R931.77

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)06-0028-03

芽孢杆菌是一类重要的微生物, 广泛存在于土壤、水、空气中, 可以产生多种多样的代谢物质, 如环肽、多肽、香豆素及大环内酯类化合物^[1-3]。深海芽孢杆菌因其独特的生存环境, 可能产生一些结构新颖、活性独特的化合物。本研究以采自中国南海的芽孢杆菌 E401B03 为研究对象, 对其发酵液的乙酸乙酯相提取物进行了分离, 先期分离了 7 个化合物, 并通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR 等方法鉴定了其结构分别为: N-苯乙基乙酰胺、3-(羟基乙酰基)-吡啶、3-(2-羟基乙基)-吡啶、环(缬-缬)二肽、尿嘧啶、胸腺嘧啶、对羟基苯甲醛。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

BRUKER AVANCE-500 型核磁共振仪; 三氯甲烷、二氯甲烷、四氯化碳、石油醚、乙酸乙酯、冰乙酸、三氟乙酸酐、溴素、香草醛、N-溴代丁二酰亚胺、乙醇钠、乙醇均为分析纯; 柱色谱硅胶(160~200 目)和薄层色谱硅胶 GF254(60 型)为青岛海洋化工厂产品。

芽孢杆菌 E401B03 从中国南海北部 1400 m 深海沉积物中分离。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养

将菌种从固体斜面培养基取适量接种到固体培养基(蛋白胨 5 g/L, 酵母粉 1 g/L, 柠檬酸铁 0.01 g/L, 琼脂粉 15 g/L, pH 7.6)的平板上, 28 °C 培养 48 h 后,

作为种子接种到液体培养基(蛋白胨 5 g/L, 酵母粉 1 g/L, 柠檬酸铁 0.01 g/L, pH 7.6)中, 共接种 25 L, 28 °C, 130 r/min 于摇床培养 7 d。

1.2.2 提取分离

25 L 发酵液用同体积的乙酸乙酯萃取 3 次后, 减压蒸干得到 1.50 g 浸膏。浸膏经硅胶柱色谱分离(石油醚: 乙酸乙酯, 氯仿: 甲醇梯度洗脱), 得到 13 个组分, 组分 J2 经过凝胶柱和硅胶柱分离, 得到化合物 6。组分 J1 经过凝胶柱氯仿: 甲醇 1:1 洗脱, 得化合物 7。组分 E 经过凝胶柱分离, 得到化合物 4。组分 F 经过凝胶柱、HPLC 分离, 得到化合物 2 和 3。组分 K 经凝胶柱、HPLC 分离得到化合物 5。组分 G 经过凝胶柱、HPLC 分离的化合物 1。

2 波谱数据与结果鉴定

化合物 1, 白色粉末, 易溶于甲醇。EI-MS: m/z [M]⁺ 163(22), 104(100), 91(20), 72(18); ¹H-NMR (CD₃OD): 7.24(m, 2H), 7.16(m, 3H), 3.37(m, 2H), 2.77(m, 2H), 1.89(s, 3H); ¹³C-NMR(CD₃OD): 172.9, 140.1, 129.5, 129.2, 127.1, 41.8, 36.3, 22.6。以上数据与 N-苯乙基乙酰胺的相关数据一致^[4]。

化合物 2, 淡黄色晶体, 易溶于甲醇。EI-MS: m/z [M]⁺ 175(20), 144(100), 116(21), 89(13); ¹H-NMR (CD₃OD): 8.22(m, 1H), 8.19(s, 1H), 7.45(m, 1H), 7.22(m,

收稿日期: 2011-11-20; 修回日期: 2011-12-26

基金项目: 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室开放课题(开-09-03); 江苏省自然科学基金项目(BK2011395)

作者简介: 郭书举(1981-), 男, 山东聊城人, 助理研究员, 研究方向为海洋天然产物, E-mail: guoshuju@qdio.ac.cn; 史大永, 通信作者, 电话: 0532-82898719, E-mail: shidayong@qdio.ac.cn

2H), 4.73(s, 2H); $^{13}\text{C-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: 196.0, 138.2, 134.0, 126.9, 124.3, 123.2, 122.6, 114.9, 112.8, 66.2。以上数据与 3-(羟基乙酰基)-吲哚的相关数据一致^[5]。

化合物 3, 淡黄色晶体, 易溶于甲醇。EI-MS: m/z $[\text{M}]^+$ 161(25), 130(100), 103(8), 77(8); $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: 7.52(d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 7.31(d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 7.06(m, 2H), 6.98(m, 1H), 3.80(t, $J=7.15\text{Hz}$, 2H), 2.96(t, $J=7.15$, 2H); $^{13}\text{C-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: 136.3, 128.0, 123.3, 122.3, 119.4, 119.1, 112.2, 110.0, 63.6, 29.7。以上数据与 3-(2-羟基乙基)-吲哚的相关数据一致^[6]。

化合物 4, 白色粉末, 易溶于氯仿。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 9.87(bs, 1H), 7.80(dd, $J=9.2$, 4.4Hz, 2H), 6.96(dd, $J=9.2$, 4.4Hz, 2H); $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 190.8, 161.4, 132.2, 132.2, 130.0, 115.8, 115.8。EI-MS: m/z $[\text{M}]^+$ 122(91), 121(100), 93(41), 65(42), 39(30)。以上数据对羟基苯甲醛的相关数据一致, 确定该化合物为对羟基苯甲醛。

化合物 5, 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 3.86(m, 2H), 2.25(m, 2H), 0.84(d, $J=7.2$, 6H), 0.72(d, $J=7.2$, 6H); $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 168.0, 168.0, 59.5, 59.5, 31.1, 31.1, 18.1, 18.1, 16.2, 16.2。以上数据与化合物环(缬-缬)二肽的相关谱图数据一致^[7]。

化合物 6, 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO})$: 7.38(1H, d, $J=7.5\text{Hz}$), 5.45(1H, d, $J=7.5\text{Hz}$); $^{13}\text{C-NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO})$: 164.4, 151.5, 142.3, 100.3。EI-MS: m/z $[\text{M}]^+$ 112(100), 69(65), 42(47), 28(34)。以上数据与尿嘧啶的相关数据一致, 确定该化合物为尿嘧啶。

化合物 7, 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO})$: 7.23(1H, s), 1.72(3H, s)。 $^{13}\text{C-NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO})$: 164.9, 151.5, 137.7, 107.7, 11.7。EI-MS: m/z $[\text{M}]^+$ 126(100), 55(82), 28(34)。以上数据与胸腺嘧啶的相关数据一致, 确定该化合物为胸腺嘧啶。

化合物 1-7 的化学结构见图 1。

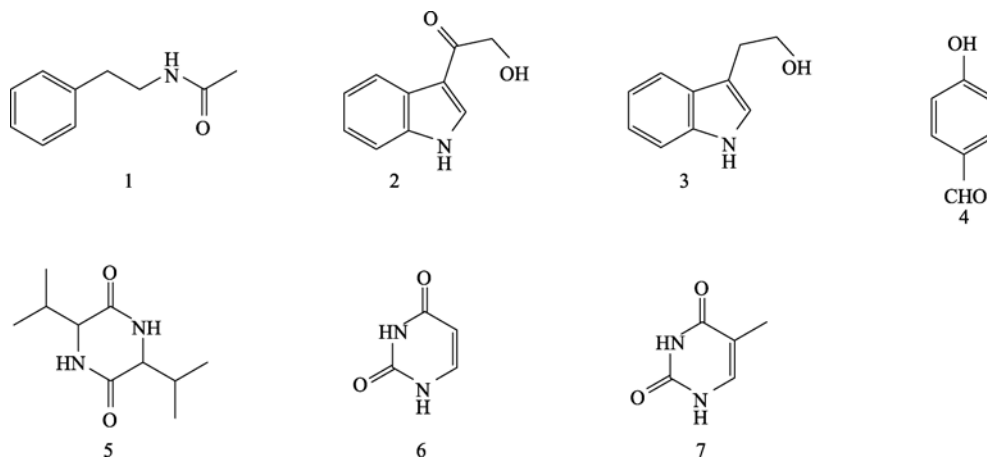


图 1 化合物 1-7 的结构

3 结论

目前, 针对海洋微生物的研究, 还主要集中在近海, 但是在黑暗寡营养的深海, 同样存在着大量的深海微生物。本研究以采自中国南海的深海细菌为研究对象, 先期从深海芽孢杆菌 E401B03 的次生代谢产物中分离并鉴定了 7 个化合物, 为深海微生物次生代谢产物的研究带来了新的契机。目前, 本课题组正在对深海细菌次生代谢产物进行深入研究。随着人们对深海微生物资源的重视及研究的深入, 相信会有越来越多的深海微生物活性物质被发现。

参考文献:

[1] Yoo J S, Zheng C J, Lee S, et al. Macrolactin N, a new

peptide deformylase inhibitor produced by *Bacillus subtilis*[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16: 4889-4892.

[2] Pinchuk I V, Bressollier P, Sorokulova I B, et al. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats[J]. Res Microbiol, 2002, 153:269-276.

[3] He H, Shen B, Korshalla J, et al. Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus circulans*, J2154[J]. Tetrahedron, 2001, 57: 1189-1195.

[4] Zhao P J, Wang H X, Li G H, et al. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces* sp. Lz531[J]. Chem Biod, 2007, 4: 899-904.

[5] Dillman R, Cardellina J H. Aromatic secondary metabolites from the sponge *Tedania ignis*[J]. J Nat Prod,

- 1991, 54: 1056-1061.
- [6] Ameer R M, Mellouli L, Chabchoub F, et al. Purification and structure elucidation of two biologically active molecules from a new isolated *Streptomyces* sp. US 24 strain[J]. Chem Nat Com, 2004, 40: 510-513.
- [7] Suzuki K, Sasaki Y, Endo N, et al. Acetic acid-catalyzed diketopiperazine synthesis[J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29: 233-237.

Isolation and identification of secondary metabolites produced by a deep-sea *Bacillus* sp. E401B03

GUO Shu-ju¹, SHI Da-yong¹, LI Fu-chao¹, ZHU Xiao-bin¹, MIAO Yu-ping²

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071, China; 2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai, 200090, China)

Received: Nov.,20,2011

Key words: deep-sea; *Bacillus* sp.; secondary metabolites

Abstract: Seven compounds, were isolated from the ethyl acetate extract of *Bacillus* sp. E401B03. Compounds 1-7 were obtained by normal phase silica gel, Sephadex LH-20 chromatography and reverse phase HPLC techniques. Their structures were identified by spectroscopic methods including ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and EIMS.

(本文编辑: 康亦兼)