

柳珊瑚共生细菌 *Bacillus subtilis* 发酵液化学成分研究^{*} Study on Chemical Constituents from Marine Gorgonian -associated Bacterium *Bacillus subtilis*

高程海¹, 易湘茜², 方燕¹, 王一兵¹, 何碧娟¹, 陈波^{1**}

GAO Cheng-hai¹, YI Xiang-xi², FANG Yan¹, WANG Yi-bing¹, HE Bi-juan¹,
CHEN Bo¹

(1. 广西科学院广西-东盟海洋研究中心, 广西南宁 530007; 2. 广西中医学院药学院, 广西南宁 530001)

(1. GX-ASEAN Marine Research Central, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Department of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要: 采用多种常规柱色谱和高效液相色谱分离技术, 运用理化和波谱分析方法, 对柳珊瑚共生细菌 *Bacillus subtilis* 的化学成分进行分离鉴定, 并对分离得到的化合物进行抑菌活性测试和抗污损生物幼虫附着活性测试。结果分离得到 7 个环二肽类化合物, 依次为环(S-脯氨酸-甘氨酸), 环(S-脯氨酸-R-亮氨酸), 环(4-羟基-脯氨酸-亮氨酸), 环(苯丙氨酸-甘氨酸), 环(丙氨酸-苯丙氨酸), 环(苯丙氨酸-缬氨酸), 环(S-脯氨酸-R-苯丙氨酸)。化合物 1 和化合物 2 有抑制罗非鱼病原菌生长活性, 化合物 1~3 有抗藤壶幼虫附着活性, 化合物 1 有抗华美盘管幼虫附着活性。7 个化合物均首次从柳珊瑚共生菌 *Bacillus subtilis* 发酵液中分离得到, 其抑制罗非鱼致病菌活性和抗污损生物附着活性也是首次报道。

关键词: 海洋细菌 柳珊瑚共生菌 环二肽 结构鉴定

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)03-0222-04

Abstract: Studies on the chemical constituents of the culture broth from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus subtilis* were carried out. Seven pure substances were first isolated from the culture broth by CC and HPLC, and their structures were determined on the basis of physico-chemical properties and spectroscopic methods such as ¹H NMR and ¹³C NMR. These compounds were obtained and characterized by comparison of their physical and spectral data (¹H NMR, ¹³C NMR and MS) with values obtained in the literature. Antimicrobial activity bioassay indicated that compounds 1 and 2 had significant activity against pathogenic bacteria from *tilapia*. Compounds 1~3 showed potent antilarval activity towards *Balanus amphitrite* larvae. Compound 1 exhibited antilarval activity against *Hydroides elegans* at the concentration of 50 μg/ml.

Key words: marine bacillus, *Bacillus subtilis*, cyclic dipeptide, chemical identification

柳珊瑚俗称海柳, 广泛分布于热带和亚热带海域。柳珊瑚属于腔肠动物, 能够在错综复杂的海洋环境中免受外来生物如致病菌和海洋污损生物侵害而

顺利生长。柳珊瑚共生海洋细菌能够产生活性独特的化学成分帮助柳珊瑚防御外来生物侵害^[1~3]。另外, 在海洋独特的低温、高压、高盐、寡营养环境中, 海洋细菌以其特有的代谢方式, 产生出众多结构新颖特殊代谢产物^[4,5]。因此, 从柳珊瑚共生细菌寻找生物独特、结构新颖的活性先导化合物是目前国内外海洋微生物研究的热点之一。

本研究对柳珊瑚共生细菌 *Bacillus subtilis* 发酵液的乙酸乙酯萃取部分进行化学成分分析, 从中分离得到 7 个化合物。运用理化方法、¹H NMR、¹³C

收稿日期: 2011-01-07

作者简介: 高程海(1979-), 男, 助理研究员, 主要从事海洋来源的动植物和微生物次生代谢产物及生物活性研究。

* 广西科学院基本业务经费项目(10YJ25HY02), 广西青年基金项目(2011GXNSFB018035), 广西科技攻关项目(桂科攻 1114011-7)资助。

** 通讯作者。

NMR和文献对照等方法,7个化合物依次分别被鉴定为环(S-脯氨酸-甘氨酸),环(S-脯氨酸-R-亮氨酸),环(4-羟基-脯氨酸-亮氨酸),环(苯丙氨酸-甘氨酸),环(丙氨酸-苯丙氨酸),环(苯丙氨酸-缬氨酸),环(S-脯氨酸-R-苯丙氨酸)。

1 材料与方 法

1.1 仪器与材料

Brucker Avance 500 型核磁共振波谱仪, TMS 为内标; Waters 600 半制备型高效液相色谱仪 (PDA 检测器; 色谱柱参数: 10mm × 250mm, 5 μ m, Phenomenex)。Agilent 1200 LC-MS 液相质谱连用仪, XT5 显微熔点测定仪, TQHZ-2002A 型摇床, 薄层色谱硅胶板, 柱层析硅胶, Sephadex LH-20 凝胶; 高效液相色谱用试剂为色谱纯, 所用其他试剂均为分析纯。

共生细菌从 2010 年 8 月在广西涠洲岛海域采集的柳珊瑚 (*Anthogorgia caerulea*) 中分离, 通过形态比对和 16S rRNA 鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

1.2 提取与分离

共生细菌 *Bacillus subtilis* 用摇床培养(培养基: 牛肉膏 3g/L, 蛋白胨 10g/L, 氯化钠 5g/L; 培养条件: 30 $^{\circ}$ C, 150r/min), 获得 60 L 发酵液。发酵液用乙酸乙酯萃取, 萃取液真空浓缩后得到乙酸乙酯萃取部分 4.6g。对乙酸乙酯萃取部分采用硅胶柱、凝胶柱 (Sephadex LH-20) 和半制备高效液相色谱等方法进行分离纯化。

1.3 结构鉴定

运用¹H NMR、¹³C NMR、MS 和样品熔点测定分析方法及与文献对比方法, 对获得的单体化合物 1~7 进行结构鉴定。

1.4 抑菌活性测试

化合物 1~7 采用标准的纸片扩散法^[9] 测试对罗非鱼病原菌(无乳链球菌、嗜水气单胞菌病、爱德华氏菌病、荧光假单胞菌)的抑制活性。

将 28 $^{\circ}$ C 下培养 24 h 的 4 种病原菌菌株悬浮液加入到已经灭菌处理的 LB 培养基中, 然后倒平板静置。化合物 1~7 用 DMSO 溶解, 然后配制成 10 mg/ml 浓度的溶液。将 5 μ l 溶液加入到灭菌滤纸片上($\varnothing = 6$ mm), 以 DMSO 为空白对照, 以利福平 (Rifampicin, 0.2 mg/ml) 和氨苄青霉素 (Ampicillin, 10 mg/ml) 为阳性对照。将纸片置于已倒好的 LB 培养基上, 紧贴培养基。每个菌种做 2 个平行。30 $^{\circ}$ C 下培养 24 h 后观察抑菌斑的大小。

1.5 抗污损生物幼虫附着活性筛选

1.5.1 幼虫的培养

华美盘管虫幼虫的培养按照 Qian & Pechenik 方法^[7], 幼虫需要培养 5 d 左右达到附着前的状态。藤壶幼虫的培养根据 Thiagarajan 等^[8] 方法, 在附着测试之前, 处于介虫状态的藤壶幼虫在 8 $^{\circ}$ C 黑暗环境中放置 4 d。

1.5.2 抗幼虫附着活性筛选

化合物 1~7 分别溶解于 DMSO 溶液中, 用无菌海水配制成 100 μ g/ml、50 μ g/ml、25 μ g/ml、12.5 μ g/ml、6.25 μ g/ml 共 5 个浓度梯度。在聚苯乙烯 24 孔径板的每个孔中加入 1 ml 配制好的测试样品和 20 个游动的华美盘管虫幼虫或藤壶幼虫, 每个样品做 4 个平行, 加有 DMSO 的无菌海水作为阴性对照。将配有测试样品的 24 孔径板放于 28 $^{\circ}$ C 的培养箱中放置 24 h 后, 观察实验结果。通过显微镜观察逐个记录已附着在板壁上的幼虫个数和没有附着在板壁上的幼虫个数以及已死亡的幼虫个数。计算已附着在板壁上的幼虫个数占实验用的总幼虫个数的百分比, 通过 EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM Version 1.5 软件计算抑制幼虫附着 EC₅₀。

2 结果与分析

2.1 分离纯化结果

将乙酸乙酯萃取部位经硅胶柱层析, 以石油醚-丙酮系统(100:0~0:100)梯度洗脱, 得到 E1~E35 共 35 个流份。E13~E15 流份经硅胶柱层析, 以石油醚-乙酸乙酯系统(30:70)等梯度梯度洗脱得到化合物 1 (7.3 mg)。E16 流份经过重结晶得化合物 2 (10.8 mg)。E19~E21 流份经硅胶柱层析, 以石油醚-丙酮梯度洗脱(100:10~0:100)并重结晶得化合物 3 (4.8 mg) 和化合物 4 (5.7 mg)。E25~258 流份经反复硅胶柱层析, 以石油醚-丙酮梯度洗脱以及半制备高效液相色谱得到化合物 5 (6.7 mg)、化合物 6 (14.2 mg)、化合物 7 (13.5 mg)。

2.2 结构鉴定结果

化合物 1: C₇H₁₀N₂O₂, 淡黄色固体; mp. 158~160 $^{\circ}$ C; ESI-MS m/z 155 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 4.26 (1H, t, $J = 6.9$ Hz, H-6), 4.13 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-9a), 3.77 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-9b), 3.53 (2H, m, H-3), 2.32 (1H, m, H-5a), 2.12 (1H, m, H-5b), 2.03 (1H, m, H-4a), 1.98 (1H, m, H-4b)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 172.0 (C-7), 166.5 (C-1), 59.9 (C-6), 47.0 (C-9), 46.4 (C-3), 29.4 (C-

5), 23.3 (C-4)。以上波谱数据与文献[9]对照一致, 故鉴定化合物1为环(S-脯氨酸-甘氨酸)。

化合物2: $C_{11}H_{18}N_2O_2$, 白色固体; mp 162 ~ 164 °C; ESI-MS m/z 211 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.23 (1H, brs, N-H), 4.10 (1H, t, $J = 8.2$ Hz, H-6), 4.00 (1H, dd, $J = 9.4, 3.5$ Hz, H-9), 3.59 (1H, m, H-3a), 3.51 (1H, m, H-3b), 2.33 (1H, m, H-5a), 2.05 (1H, m, H-5b), 2.03 (1H, m, H-4a), 1.88 (1H, m, H-4b), 2.01 (1H, m, H-10a), 1.52 (1H, m, H-10b), 1.78 (1H, m, H-11), 0.99 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, Me-12), 0.94 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, Me-13)。¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 170.3 (C-7), 166.2 (C-1), 59.0 (C-6), 53.4 (C-9), 45.5 (C-3), 28.1 (C-5), 22.7 (C-4), 38.6 (C-10), 24.6 (C-11), 23.3 (C-12), 21.3 (C-13)。以上波谱数据与文献[10]对照一致, 故鉴定化合物2为环(S-脯氨酸-R-亮氨酸)。

化合物3: $C_{11}H_{18}N_2O_3$, 黄色针晶; ESI-MS m/z 227 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 4.49 (1H, t, $J = 4.0$ Hz, H-6), 4.18 (1H, m, H-9), 3.65 (1H, dd, $J = 13.0, 4.5$ Hz, H-3a), 3.48 (1H, dd, $J = 13.0, 4.5$ Hz, H-3b), 3.70 (1H, m, H-4), 2.30 (1H, m, H-5a), 2.10 (1H, m, H-5b), 1.93 (2H, m, H-10), 1.52 (1H, m, H-11), 0.97 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-12), 0.96 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.3 (C-1), 167.8 (C-7), 68.2 (C-4), 61.6 (C-6), 54.5 (C-3), 53.6 (C-9), 41.2 (C-10), 36.4 (C-5), 26.4 (C-11), 23.1 (C-12), 22.5 (C-13)。以上波谱数据与文献[11]对照基本一致, 故鉴定化合物3为环(4-羟基-脯氨酸-亮氨酸)。

化合物4: $C_{11}H_{18}N_2O_2$, 白色粉末; mp 162 ~ 164 °C; ESI-MS m/z 205 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.30 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 4.24 (1H, t, $J = 4.5$ Hz, H-6), 3.44 (1H, dd, $J = 12.0, 4.5$ Hz, H-3a), 3.25 (1H, dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, H-3b), 3.02 (1H, dd, $J = 14.0, 4.5$ Hz, H-7a), 2.64 (1H, dd, $J = 18.0, 1.33$ Hz, H-7b)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 170.0 (C-1), 168.6 (C-4), 136.4 (C-1'), 131.4 (C-2', 5'), 129.6 (C-3', 5'), 128.4 (C-4'), 57.5 (C-6), 44.7 (C-3), 40.87 (C-7)。以上波谱数据与文献[12, 13]对照基本一致, 故鉴定化合物4为环(苯丙氨酸-甘氨酸)。

化合物5: $C_{12}H_{14}N_2O_2$, 无色针晶; ESI-MS m/z 218.24 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.27 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 4.35 (1H, td, $J = 4.56, 0.90$ Hz, H-2), 3.74 (1H, qd, $J = 6.90, 1.38$ Hz, H-6), 3.27 (1H, dd, $J = 13.74, 4.56$ Hz, H-7a), 3.03 (1H, dd, $J = 13.74, 4.56$ Hz, H-7b), 0.60 (3H, d, $J = 6.90$ Hz, H-8)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.9 (C-1), 50.9 (C-3), 170.1 (C-4), 54.8 (C-6), 37.1 (C-7), 19.6 (C-8), 136.6 (C-1'), 128.6 (C-3', 5'), 127.7 (C-2', 6'), 125.9 (C-4')。以上波谱数据与文献[14]对照基本一致, 故鉴定化合物5为环(丙氨酸-苯丙氨酸)。

化合物6: $C_{14}H_{18}N_2O_2$, 白色粉末; mp 280 ~ 282 °C; ESI-MS m/z 269 [M + Na]⁺; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.26 (1H, s, H-Phe), 7.88 (1H, s, H-Va1), 7.22 (5H, m, H-(5'-9')), 4.15 (1H, m, H-2), 3.62 (1H, m, H-2), 3.14 (1H, dd, $J = 5.0, 13.5$ Hz, H-3a), 2.88 (1H, dd, $J = 5.0, 13.5$ Hz, H-3b), 1.76 (1H, m, H-3), 0.89 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-4), 0.86 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-5)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 166.4 (C-1), 58.7 (C-2), 37.7 (C-3), 23.1 (C-4), 11.7 (C-5), 166.3 (C-1'), 55.0 (C-2'), 37.6 (C-3'), 136.3 (C-4'), 130.4 (C-5'), 127.9 (C-6'), 126.4 (C-7'), 127.9 (C-8'), 130.4 (C-9')。以上波谱数据与文献[15, 16]对照基本一致, 故鉴定化合物6为环(苯丙氨酸-缬氨酸)。

化合物7: $C_{14}H_{16}N_2O_2$, 黄色油状; mp 137 ~ 139 °C; ESI-MS m/z 245 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.34 (2H, dd, $J = 7.8, 7.2$ Hz, H-3', 5'), 7.29 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-4'), 7.23 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2', 6'), 4.13 (1H, t, $J = 3.0$ Hz, H-9), 4.07 (1H, br s, H-6), 3.60 (1H, m, H-3a), 3.40 (1H, m, H-3b), 3.10 (2H, m, H-10), 1.95 (1H, m, H-5a), 1.83 (1H, m, H-5b), 1.72 (2H, m, H-4)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 169.18 (C-7), 164.8 (C-1), 135.3 (C-1'), 132.3 (C-2', 6'), 129.1 (C-3', 5'), 127.7 (C-4'), 60.1 (C-6), 57.8 (C-9), 45.2 (C-3), 40.5 (C-10), 28.9 (C-5), 21.7 (C-4)。以上波谱数据与文献[12, 17]对照基本一致, 故鉴定化合物7为环(S-脯氨酸-R-苯丙氨酸)。

2.3 抑菌活性

化合物1对无乳链球菌、嗜水气单胞菌病、爱德

华氏菌病、荧光假单胞菌病 4 种罗非鱼病原菌均显示出较强抑菌活性, 最小抑制浓度皆为 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 。化合物 2 对无乳链球菌、爱德华氏菌也显示出较强抑菌活性, 最小抑制浓度分别为 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 和 $1.4 \mu\text{g/ml}$ 。化合物 3~7 对 4 种罗非鱼病原菌基本无抑菌活性。

2.4 抗幼虫附着活性

化合物 1 在浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$ 时, 具有抗华美盘管虫幼虫附着的活性, 但是在浓度为 $25 \mu\text{g/ml}$ 时, 没有显示出活性。化合物 2~7 在实验浓度范围内, 没有显示出抗华美盘管虫幼虫附着活性。

在抗藤壶幼虫附着实验中, 化合物 1~3 均显示出潜在的抗藤壶幼虫附着活性, EC_{50} 分别为 $40.27 \mu\text{g/ml}$, $36.14 \mu\text{g/ml}$, $44.88 \mu\text{g/ml}$ 。化合物 4~7 在实验浓度范围内, 没有显示出抗藤壶幼虫附着。

3 结论

通过各种分离技术和结构鉴定方法, 从柳珊瑚共生菌 *Bacillus subtilis* 的发酵液共分离鉴定了 7 个环二肽类化合物。化合物 1~2 显示出较强抑制罗非鱼病原菌的活性。化合物 1~3 显示出较强的抗藤壶幼虫附着活性。化合物 1 显示出较强的抗华美盘管虫幼虫附着活性。从化学生态学角度解释了柳珊瑚不被污损生物覆盖的原因。化合物 1~7 均首次从柳珊瑚共生菌 *Bacillus subtilis* 发酵液中分离得到, 其抑制罗非鱼致病菌活性和抗污损生物附着活性也是首次报道, 该研究为深入了解北部湾海域的柳珊瑚共生菌特性提供了科学依据。

参考文献:

[1] Tapiolas D M, Roman M, Fenical W. Octalactins A and B: cytotoxic eight-membered-ring lactones from a marine bacterium *Streptomyces* [J]. *J Am Chem Soc*, 1991, 113: 4682-4683.

[2] Romero F, Espliego F, Pérez Baz J, et al. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora* I: Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities [J]. *J Antibiot*, 1997, 50 (9): 734-737.

[3] Gao C H, Tian X P, Qi S H, et al. Antibacterial and anti-larval compounds from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus amylolique faciens* ATCC 23350T [J]. *J Antibiot*, 2010, 63(4): 191-193.

[4] John W B, Brent R C, Murray H G, et al. Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28: 196-268.

[5] Zhang L, An R, Wang J, et al. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(3): 276-281.

[6] Acar J F. The disc susceptibility test [M] // Lorian V (ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980: 24-54.

[7] Miao L, Qian P Y. Antagonistic antimicrobial activity of marine fungi and bacteria isolated from marine biofilm and seawaters of Hong Kong [J]. *Aquat Microb Ecol*, 2005, 38: 231-238.

[8] Thiyagarajan V, Harder T, Qian P Y. Relationship between the energy reserve of cyprids and metamorphosis in the barnacle *Balanus amphitrites* Darwin (Cirripedia: Thoracica) [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2002, 280: 79-93.

[9] 秦文娟, 孔庆芬, 范志同, 等. 掌叶半夏化学成分的研究 III [J]. *中草药*, 1984, 15(11): 10-12.

[10] Adamczeski M, Reed A R, Crews P. New and known diketopiperazines from the caribbean sponge *Calyx cf. podatypa* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58 (2): 201-208.

[11] Salbatore D R, Maya M, Giuseppina T. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides [J]. *Biomol Eng*, 2003, 20(4-6): 311-316.

[12] 尹文清, 林永成, 周世宁. 南海海洋真菌 2516 号中的环肽成分 [J]. *中山大学学报*, 2002, 41(4): 56-59.

[13] 陈光英, 刘晓红, 温露. 南海红树林内生真菌 1893 代谢产物研究 [J]. *中山大学学报*, 2003, 42(1): 49-52.

[14] 李厚金, 林永成, 刘晓红, 等. 红树林内生真菌 2524 号的肽类成分 I [J]. *中山大学学报*, 2002, 41(4): 110-112.

[15] 刘海滨, 高昊, 王乃利, 等. 红树林真菌草酸青霉 (092007) 的环二肽类成分 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24(8): 474-478.

[16] Stark T, Hofmann T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazine in roasted cocoa Nibs [J]. *Agric Food Chem*, 2005, 25 (18): 7225-7226.

[17] 李德海, 顾谦群, 朱伟明, 等. 海洋放线菌 11014 中抗肿瘤活性成分的研究 I: 环二肽 [J]. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(8): 449-453.

(责任编辑: 邓大玉)