文章编号:1001-6880(2014)4-0509-04

一株大象粪便链霉菌的次生代谢产物研究

王　唐,姜　怡,靳荣线,玄其存,吴少华*

云南大学云南省微生物研究所 西南微生物多样性教育部重点实验室,昆明 650091

摘　要:采用正相硅胶柱色谱、反相硅胶柱色谱、凝胶柱色谱等方法对来自大象粪便的链霉菌 YIM801 的发酵产物进行分离,共获得 11 个化合物,依据理化性质及波谱数据分析,分别鉴定为环(苯丙氨酸-缬氨酸)(**1**)、环(亮氨酸-缬氨酸)(**2**)、N-乙酰色胺(**3**)、N-乙酰酪胺(**4**)、5′-O-乙酰胸苷(**5**)、2′-脱氧尿苷(**6**)、2-吡咯甲酸(**7**)、2,5-二羟基苯甲醇(**8**)、2,5-二羟基苯甲醇甲醚(**9**)、2-甲氧基对苯二酚(**10**)和间羟基苯甲醇(**11**)。所有化合物均为首次从大象粪便来源的链霉菌中分离得到。

关键词:链霉菌;大象;动物粪便;次生代谢产物

中图分类号:O629　　**文献标识码**:A

Studies on Secondary Metabolites of *Streptomyces* sp. Isolated from *Elephas maximus* Feces

WANG Tang, JIANG Yi, JIN Rong-xian, XUAN Qi-cun, WU Shao-hua*

Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Ministry of Education, Kunming 650091, China

Abstract: Eleven compounds were obtained from the fermentation broth of the strain *Streptomyces* sp. YIM801, which was isolated from *Elephas maximus* feces, by using silica gel, RP-18, and Sephadex LH-20 column chromatography. On the basis of spectral data and physicochemical properties, their structures were identified as cyclo-(Phe-Val) (**1**), cyclo-(Leu-Val) (**2**), N-acetyltryptamine (**3**), N-acetyltyramine (**4**), 5′-O-acetylthymidine (**5**), 2′-deoxyuridine (**6**), 2-minaline (**7**), 2,5-dihydroxybenzyl alcohol (**8**), 2,5-dihydroxy benzene methanol methyl ether (**9**), 2-methoxyhydroqunone (**10**), hydroxybenzyl alcohol (**11**). All of the compounds were isolated from *Streptomyces* sp. from *Elephas maximus* feces for the first time.

Key words: *Streptomyces* sp.; *Elephas maximus*; animal feces; secondary metabolites

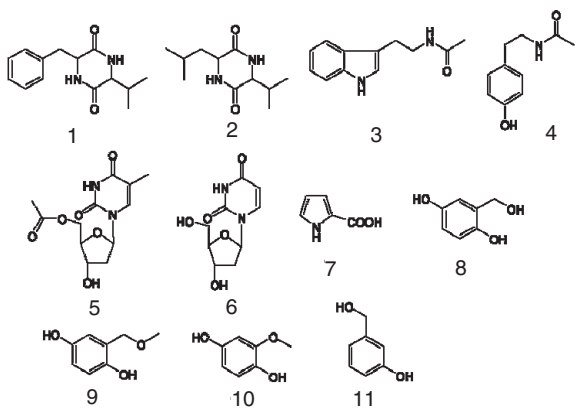

图 1　化合物 1~11 的化学结构

Fig. 1　The chemical structures of compounds **1~11**

在原核生物中,丝状放线细菌,特别是举足轻重的链霉菌,是主要的生物活性物质产生者。链霉菌目及所包含的链霉菌属产生了 80% 的代谢产物。从上世纪 50~70 年代,在放线细菌所产生的 60% 新抗生素中几乎都是链霉菌所产生[1]。国内外对土壤、极端环境、海洋和植物体等各种生境的放线菌研究较多,并从中获得了多种具有独特化学结构和生物活性的次生代谢产物[2],而目前关于动物粪便放线菌代谢产物的研究报道相对较少。

菌株 YIM801 从大象粪便中分离得到,通过对其培养特征和 16S rRNA 基因序列分析,鉴定为链霉菌属(*Streptomyces* sp.)。抗菌活性检测显示该菌株的发酵产物具有较强的抗菌活性。因此,我们进一步对其发酵产物的化学成分进行了研究,从发酵提取物中分离得到 11 个化合物。依据理化性质及

收稿日期:2013-03-22　　接受日期:2013-06-13

基金项目:国家自然科学基金项目(30900002);云南省应用基础研究基金项目(2010CD009);云南省教育厅科学研究基金项目(2010Z054)

* 通讯作者 Tel:86-871-65032423;E-mail:shwu123@126.com

波谱数据分析,分别鉴定为环(苯丙氨酸-缬氨酸)(**1**)、环(亮氨酸-缬氨酸)(**2**)、N-乙酰色胺(**3**)、N-乙酰酪胺(**4**)、5′-*O*-乙酰胸苷(**5**)、2′-脱氧尿苷(**6**)、2-吡咯甲酸(**7**)、2,5-二羟基苯甲醇(**8**)、2,5-二羟基苯甲醇甲醚(**9**)、2-甲氧基对苯二酚(**10**)和间羟基苯甲醇(**11**)。所有化合物均为首次从大象粪便来源的链霉菌中分离得到。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

Bruker DRX-500 型超导核磁共振仪;Agilent G3250AA LC / MSD TOF 型质谱仪;EYELA 旋转蒸发仪。反相硅胶 RP-18(Merck),Sephadex LH-20(Pharmacia),薄层层析用硅胶 G 板和柱层析硅胶 200~300 目(青岛海洋化工厂);其他试剂均为分析纯。

1.2 菌株来源

实验菌株于 2011 年 4 月从饲养在昆明野生动物园的大象粪便中分离得到,由云南大学云南省微生物研究所姜怡副研究员鉴定为链霉菌属(*Streptomyces* sp.),微生物样品保存于云南大学云南省微生物研究所,菌株号为 YIM 801。

1.3 发酵培养

从新鲜斜面培养基中将菌株转接到装有 100 mL 38#培养基(葡萄糖 4 g,酵母膏 4 g,麦芽膏 5 g,复合维生素微量 3.7 mg,微量盐 1 mL,琼脂 13 g,蒸馏水 1000 mL,pH7.2)的 500 mL 锥形瓶中,于 28 ℃、200 rpm 摇床培养 4 d,得到种子液。再将种子液转接到装有 100 mL SGG 培养基(葡萄糖 10 g,甘油 10 g,玉米粉 2.5 g,蛋白胨 5 g,可溶性淀粉 10 g,酵母膏 2 g,$CaCO_3$ 3 g,NaCl 1 g,蒸馏水 1000 mL,pH7.3)的 500 mL 锥形瓶中,于 28 ℃、200 rpm 摇床培养 7 d,共发酵培养 80 L。

1.4 提取分离

发酵产物经 4500 rpm 离心 10 min 得到发酵液和菌丝体,发酵液经乙酸乙酯萃取 3 次后减压浓缩,菌丝体经 95 % 乙醇浸泡 3 次后减压浓缩,根据 TLC 检测,合并发酵液和菌丝体粗体物共 47 g。发酵粗提物经硅胶柱层析,用氯仿-甲醇梯度洗脱,得到 7 个组分。组分 2 依次经 RP-18 反相柱层析甲醇-水(1∶5)、硅胶柱层析石油醚-乙酸乙酯(4∶1)洗脱得化合物 **1**(3 mg)、化合物 **2**(8 mg)、化合物 **3**(6 mg)。组分 3 依次经反相 RP-18 柱层析甲醇-水(1∶4)、硅胶柱层析氯仿-甲醇(20∶1)洗脱得化合物 **7**(6 mg)。组分 4 依次经硅胶柱层析石油醚-乙酸乙酯(75∶25)、硅胶柱层析石油醚-丙酮(65∶35)洗脱,依次得到化合物 **9**(4 mg)、化合物 **10**(2 mg)。组分 5 依次硅胶柱层析石油醚-乙酸乙酯(4∶1)、硅胶柱层析石油醚-丙酮(7∶3)洗脱,再经重结晶得到化合物 **8**(9 mg)、化合物 **11**(7 mg)。组分 6 经硅胶柱层析石油醚-乙酸乙酯(6∶4)得到三个组分(Fr 6-1 ~ Fr 6-3),其中组分 Fr 6-1 经硅胶柱层析氯仿-甲醇(97∶3),再经重结晶得化合物 **4**(9 mg),组分 Fr 6-2 经 RP-18 反相柱层析甲醇-水(5∶95)洗脱得化合物 **5**(4 mg),Fr6-3 经凝胶 Sephadex LH-20 柱层析,用甲醇洗脱得化合物 **6**(4 mg)。

2 结构鉴定

化合物 1 白色粉末,根据 ESI-MS *m/z*:247 [M + H]$^+$、269 [M + Na]$^+$,确定其相对分子质量为 246,再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_{14}H_{18}N_2O_2$。^{1}H NMR ($CDCl_3$,500 MHz) δ: 7.27 (5H,m,H-5′-9′),4.16 (1H,dd,J = 8.3,3.3 Hz,H-2′),3.73 (1H,d,J = 2.8 Hz,H-2),3.25 (1H,dd,J = 13.8,3.6 Hz,H-3′a),2.94 (1H,dd,J = 13.8,8.6 Hz,H-3′b),2.07 (1H,m,H-3),0.89 (3H,d,J = 7.1 Hz,H-4),0.62 (3H,d,J = 6.8 Hz,H-5);^{13}C NMR ($CDCl_3$,125 MHz) δ:167.5 (C-1),167.1 (C-1′),135.3 (C-4′),129.6 (C-5′,9′),128.8 (C-6′,8′),127.3 (C-7′),60.0 (C-2),55.9 (C-2′),40.2 (C-3′),31.5 (C-3),18.4 (C-4),16.0 (C-5)。以上数据与文献对照一致[3],故鉴定为环(苯丙氨酸-缬氨酸)。

化合物 2 白色粉末,根据 ESI-MS *m/z*:213 [M + H]$^+$、447 [2M + Na]$^+$,确定其相对分子质量为 212,再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_{11}H_{20}N_2O_2$。^{1}H NMR ($CDCl_3$,500 MHz) δ: 8.23 (1H,s,NH-Leu),8.10 (1H,s,NH-Val),4.01 (1H,d,J = 9.8 Hz,H-2),3.88 (1H,m,H-2′),2.44 (1H,m,H-3),1.98 (1H,m,H-4′),1.74 (1H,m,H-3′a),1.61 (1H,m,H-3′b),1.04 (3H,d,J = 7.0 Hz,H-4),0.99 (3H,d,J = 6.5 Hz,H-5),0.95 (3H,d,J = 6.5 Hz,H-5′),0.88 (3H,d,J = 6.7 Hz,H-6′);^{13}C NMR ($CDCl_3$,125 MHz) δ:169.2 (C-1′),168.4 (C-1),60.2 (C-2),53.1 (C-2′),43.6 (C-3′),31.4 (C-3),24.3 (C-4′),23.2 (C-6′),

21.0 (C-5′),18.7 (C-4),16.4 (C-5)。以上数据与文献对照一致[4],故鉴定为环(亮氨酸-缬氨酸)。

化合物 3　淡黄色固体,根据 ESI-MS *m/z*: 203 [M + H]$^+$、201 [M-H]$^-$,确定其相对分子质量为 202,再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_{12}H_{14}N_2O$。^{1}H NMR ($CDCl_3$,500 MHz) δ: 7.60 (1H,d,J = 7.8 Hz,H-4),7.39 (1H,d,J = 8.0 Hz,H-7),7.22 (1H,t, J = 7.8 Hz,H-6),7.14 (1H,t, J = 8.0 Hz,H-5),7.03 (1H,s,H-2),3.61 (2H,t, J = 6.6 Hz,H-11),2.98 (2H,t,J = 6.6 Hz, H-10), 1.97 (3H, s, H-2′);^{13}C NMR ($CDCl_3$,125 MHz) δ:170.0 (C-1′),136.4 (C-8),127.4 (C-9),122.2 (C-6),121.9 (C-2),119.5 (C-5),118.6 (C-4),113.0 (C-3),111.2 (C-7),39.8 (C-11),25.2 (C-10),23.3 (C-2′)。以上数据与文献对照一致[5],故鉴定为 N-乙酰色胺。

化合物 4　白色晶体,根据 ESI-MS *m/z*:180 [M + H]$^+$、178 [M-H]$^-$,确定其相对分子质量为 179,再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_{10}H_{13}NO_2$。^{1}H NMR (CD_3OD,500 MHz) δ: 7.05 (2H,d,J = 8.2 Hz,H-2,6),6.74 (2H,d,J = 8.3 Hz,H-3,5),3.36 (1H,t,J = 7.4 Hz,H-8),2.71 (1H,t, J = 7.5 Hz,H-7),1.92 (3H,s,H_3-10);^{13}C NMR (CD_3OD,125 MHz) δ:173.2 (C-9),156.8 (C-1),131.2 (C-4),130.6 (C-2,6),116.2 (C-3,5),42.3 (C-8),35.5 (C-7),22.4 (C-10)。以上数据与文献对照一致[6],故鉴定为 N-乙酰酪胺。

化合物 5　白色固体,根据 ESI-MS *m/z*:285 [M + H]$^+$、283 [M-H]$^-$,确定其相对分子质量为 284,再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_{12}H_{16}N_2O_6$。^{1}H NMR (CD_3OD,500 MHz) δ:7.52 (1H,s,H-6),6.30 (1H,t,J = 6.8 Hz,H-1′),4.37 (1H,m,H-4′),4.35 (1H,dd,J = 12.1,5.3 Hz,H-5′a),4.29 (1H,dd,J = 12.1,3.6 Hz,H-5′b),4.08 (1H,dd,J = 7.3,3.6 Hz,H-3′),2.30 (2H,m,H-2′),2.12 (3H,s,C-7′),1.92 (3H,s,5-CH_3);^{13}C NMR (CD_3OD,125 MHz) δ:172.2 (C-6′),166.2 (C-4),152.3 (C-2),137.4 (C-6),111.6 (C-5),86.5 (C-1′),85.7 (C-4′),72.2 (C-3′),65.0 (C-5′),40.5 (C-2′),20.6 (C-7′),12.4 (5-CH_3)。以上数据与文献对照一致[7],故鉴定为 5′-*O*-乙酰胸苷。

化合物 6　白色固体,根据 ESI-MS *m/z*:229 [M + H]$^+$、479 [2M + Na]$^+$,确定其相对分子质量为 228,再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_9H_{12}N_2O_5$。^{1}H NMR (CD_3OD,500 MHz) δ: 8.01 (1H,d,J = 8.0 Hz,H-6),6.30 (1H,t,J = 6.7 Hz,H-1′),5.72 (1H,d,J = 8.1 Hz,H-5),4.40 (1H,m,H-4′),3.96 (1H,dd, J = 6.3,3.3 Hz,H-3′),3.81 (1H,dd,J = 12.1,3.3 Hz,H-5′a),3.75 (1H,dd,J = 12.1,3.7 Hz,H-5′b),2.30 (1H,m,H-2′a),2.29 (1H,m,H-2′b);^{13}C NMR (CD_3OD,125 MHz) δ:166.6 (C-4),152.6 (C-2),142.9 (C-6),103.1 (C-5),89.4 (C-1′),87.1 (C-4′),72.7 (C-3′),63.3 (C-5′),41.8 (C-2′)。以上数据与文献对照一致[8],故鉴定为 2′-脱氧尿苷。

化合物 7　淡黄色粉末,根据 ESI-MS *m/z*:112 [M + H]$^+$、110 [M-H]$^-$,确定其相对分子质量为 111,再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_5H_5NO_2$。^{1}H NMR (CD_3OD,500 MHz) δ: 6.94 (1H,dd,J = 2.7,1.7 Hz,H-3),6.85 (1H,dd,J = 4.6,1.4 Hz,H-5),6.18 (1H,dd,J = 4.5,3.2 Hz,H-4);^{13}C NMR (CD_3OD,125 MHz) δ:164.5 (C-6),124.4 (C-5),123.8 (C-2),116.6 (C-3),110.6 (C-4)。以上数据与文献对照一致[9],故鉴定为 2-吡咯甲酸。

化合物 8　白色粉末,根据 ESI-MS *m/z*:141 [M + H]$^+$、139 [M-H]$^-$,确定其相对分子质量为 140,再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_7H_8O_3$。^{1}H NMR (CD_3OD, 500 MHz) δ: 6.77 (1H,d,J = 2.7 Hz,H-6),6.65 (1H,d,J = 8.6 Hz,H-3),6.49 (1H,dd,J = 8.5,2.9 Hz,H-4),4.56 (2H,s,H-7);^{13}C NMR (CD_3OD,125 MHz) δ: 151.8 (C-5),150.0 (C-2),126.28 (C-1),118.5 (C-3),117.5 (C-6),115.0 (C-4),69.8 (C-7)。以上数据与文献对照一致[10],故鉴定为 2,5 二羟基苯甲醇。

化合物 9　白色粉末,根据 ESI-MS *m/z*:155 [M + H]$^+$、177 [M + Na]$^+$,确定其相对分子质量为 154,再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_8H_{10}O_3$。^{1}H NMR ($CDCl_3$,500 MHz) δ:6.77 (1H,d,J = 8.7 Hz,H-3),6.70 (1H,dd,J = 8.7,2.9 Hz,H-4),6.55 (1H,d,J = 2.7 Hz,H-6),4.59 (2H, s, H-7), 3.44 (3H, s, OCH_3);^{13}C NMR ($CDCl_3$,125 MHz) δ:151.7 (C-2),150.5 (C-5),

124.8（C-1），119.1（C-3），117.9（C-4），116.8（C-6），75.6（C-7），60.1（OCH_3）。以上数据与文献对照一致[10]，故鉴定为2,5-二羟基苯甲醇甲醚。

化合物 10 白色粉末，根据 ESI-MS *m/z*：141 $[M+H]^+$、305 $[2M+Na]^+$，确定其相对分子质量为140，再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_7H_8O_3$。^{1}H NMR（CD_3OD，500 MHz）δ：6.76（1H，d，J = 2.9 Hz，H-3），6.61（1H，d，J = 8.6 Hz，H-6），6.54（1H，dd，J = 8.5，2.9 Hz，H-5），4.58（3H，s，OCH_3）；^{13}C NMR（CD_3OD，125 MHz）δ：150.1（C-4），147.9（C-2），128.5（C-1），115.6（C-6），114.8（C-5），114.4（C-3），60.1（OCH_3）。以上数据与文献对照一致[11]，故鉴定为2-甲氧基对苯二酚。

化合物 11 白色晶体，根据 ESI-MS *m/z*：125 $[M+H]^+$、147 $[M+Na]^+$，确定其相对分子质量为124，再结合^{1}H NMR 和^{13}C NMR 波谱数据确定其分子式为 $C_7H_8O_2$。^{1}H NMR（CD_3COCD_3，500 MHz）δ：7.16（1H，t，J = 7.8 Hz，H-5），6.89（1H，s，H-2），6.83（1H，d，J = 7.5 Hz，H-6），6.72（1H，t，J = 5.8 Hz，H-4），4.58（2H，d，J = 5.9 Hz，H_2-7），4.18（1H，t，J = 5.9 Hz，7-OH）；^{13}C NMR（CD_3COCD_3，125 MHz）δ：158.7（C-3），145.5（C-1），130.3（C-5），118.8（C-6），114.9（C-4），114.7（C-2），65.0（C-1）。以上数据与文献对照一致[12]，故鉴定为间羟基苯甲醇。

参考文献

1 Berdy J. Thoughts and facts about antibiotics：Where we are now and where we are heading. *J Antibiot*，2012，65：385-395.

2 Takahashi Y，Omura S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol*，2003，49：141-154.

3 Liu HB（刘海滨），Gao H（高昊），Wang NL（王乃利），*et al*. Cyclic dipeptide constituents from the mangrove fungus *Penicillium oxalicum*（No. 092007）. *J Shenyang Pharm Univ*（沈阳药科大学学报），2007，24：474-478.

4 Wang SM（王双明），Tan NH（谭宁华），Yang YB（杨亚滨），*et al*. Cyclodipeptides from the roots of *Panax notoginseng*. *Nat Prod Res Dev*（天然产物研究与开发），2004，16：383-386.

5 Li DL（李冬利），Li XM（李晓明），Cui CM（崔传明），*et al*. Chemical constituents of *Hypocreales* sp.，an endophytic fungus derived from the red alga *Symphyocladia latiuscula*. *Marine Sci*（海洋科学），2008，32：51-55.

6 Shen MX（沈明曦），Chen G（陈刚），Li W（李文），*et al*. Isolation and structure identification of chemical constituents from marine bacterium *Pantoea agglomerans*. *Chin J Med Chem*（中国药物化学杂志），2012，22：127-130.

7 Ahmed AF，Wu MH，Wu YC，*et al*. Metabolites with cytotoxic activity from the formosan soft coral *Cladiella australis*. *J Chin Chem Soc*，2006，53：489-494.

8 Zheng D（郑丹），Jiang Y（姜怡），Han L（韩力），*et al*. Chemical constituents from the mycelium of a new *streptomycete*. *Chin J Med Chem*（中国药物化学杂志），2010，20：201-205.

9 Cheng YX（程永现），Zhou J（周俊），Teng RW（腾荣伟），*et al*. Nitrogen-containing compounds from *Brachystemma calycinum*. *Acta Bot Yunnanica*（云南植物研究），2001，23：527-530.

10 Zhang HY（张慧晔），Xie HH（谢海辉），Lin LD（林立东），*et al*. Phenolic metabolites of an *Ampelomyces* fungus. *J Trop Subtrop Bot*（热带亚热带植物学报），2009，17：77-79.

11 Chatterjee A，Ganguly D，Sen R. New synthesis of 4-phenyl coumarins：dalbergin and nordalbergin. *Tetrahedron*，1976，32：2407-2408.

12 Geng JL（耿家玲），Geng CA（耿长安），Chen JJ（陈纪军）. Chemical constituents of *Swertia cincta*. *Nat Prod Res Dev*（天然产物研究与开发），2012，24：42-46.