

# 南海深海细菌 *Bacillus amyloliquefaciens* GAS 00152 抗菌代谢产物研究

龙彬<sup>1,2</sup>, 高程海<sup>2\*</sup>, 潘丽霞<sup>2</sup>, 李菲<sup>1,2</sup>, 胡丽琴<sup>1,2</sup>, 文良娟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>广西大学轻工与食品工程学院, 南宁 530001; <sup>2</sup>广西科学院广西近海海洋环境科学重点实验室, 南宁 530007

**摘要:** 采用多种色谱分离技术, 从南海深海细菌 *Bacillus amyloliquefaciens* GAS 00152 发酵液中分离得到 12 个化合物, 经波谱数据分析分别鉴定为 4-苯基-3-丁烯酰胺(1)、苯乙酰胺(2)、苯乙酸-2-(4-羟苯基)乙酯(3)、对羟基苯乙醇(4)、环(甘氨酸-2-氨基丁酸)(5)、环(甘氨酸-亮氨酸)(6)、环(甘氨酸-L-脯氨酸)(7)、环(D-脯氨酸-L-缬氨酸)(8)、环(4-羟基脯氨酸-亮氨酸)(9)、环(N-甲基甘氨酸-苯丙氨酸)(10)、环(L-2-羟基脯氨酸-苯丙氨酸)(11)、环(2-哌啶酸-苯丙氨酸)(12)。其中, 化合物 1 为新天然产物。测试化合物 1~12 对番木瓜炭疽菌和香蕉黑星菌的抑制活性, 发现化合物 9 对两种热带水果致病菌显示出中等抗菌活性。

**关键词:** 海洋细菌; *Bacillus amyloliquefaciens*; 次生代谢产物; 抗菌活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Antibacterial Metabolites from Deep South China Sea-Derived Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* GAS 00152

LONG Bin<sup>1,2</sup>, GAO Cheng-hai<sup>2\*</sup>, PAN Li-xia<sup>2</sup>, LI Fei<sup>1,2</sup>, HU Li-qin<sup>1,2</sup>, WEN Liang-juan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

<sup>2</sup>Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China

**Abstract:** A bacterium strain, GAS 00152, was isolated from marine sediment collected at a depth of 2476 m in the South China Sea. This bacterium was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by analysis of its 16S rRNA gene sequence. Chemical investigation of the fermentation broth of GAS 00152 was carried out using silica gel column chromatography, PTLC and semi-preparative HPLC. Twelve compounds were isolated and identified as 4-phenyl-3-butenamide (1), 2-phenylacetamide (2), phenylacetic acid-2-(4-hydroxyl phenyl) ethyl ester (3), 4-hydroxyphenylethanol (4), cyclo-(Gly-Leu) (5), cyclo-(Gly-Leu) (6), cyclo-(Gly-L-Pro) (7), cycl-(D-Pro-L-Val) (8), cyclo-(4-hydroxy-Pro-Leu) (9), cyclo-(N-methyl-Gly-Phe) (10), cyclo-(L-2-hydroxy-Pro-Phe) (11) and cyclo-(pipercolinyl-phenylalanine) (12) on the basis of spectroscopic data and comparison with literatures. Among them, Compound 1 was a new natural product. Compounds 1-12 were evaluated for their antibacterial activity. Compound 9 showed moderate activities against *C. papayae* and *P. musarum*.

**Key words:** marine bacterium; *Bacillus amyloliquefaciens*; secondary metabolite; antibacterial activity

海洋是生命的起源地, 占地球表面积的 70%。位于海洋 1000 m 以下的深度区域称为深海, 占地球表面积的一半。随着深海勘探和海底作业技术的提高, 目前人类对海洋的研究已经从浅海逐渐走向深海。深海环境一般为高压 (≥100 atm)、低温 (≤4 °C)、黑暗 (完全无光)、高盐 (35‰)、寡营养 (营养

程度为表层海水 1%), 属于生命极限环境。生活在这种特殊环境下的海洋微生物在物种、基因组成和生态功能方面有着特异性和多样性<sup>[1,2]</sup>。深海细菌作为深海微生物的重要组成部分, 目前已经发现了许多不同于陆地或浅海的新的海洋细菌类型<sup>[3,4]</sup>。然而, 深海细菌次生代谢产物研究却相对较少。

番木瓜和香蕉都属于喜被人们食用的热带水果。番木瓜炭疽病是番木瓜最主要的田间采后病害之一, 严重时可造成其年产量下降 30%<sup>[5]</sup>。香蕉黑星病是危害香蕉叶片和果实的重要病害, 严重影响香蕉的外观和耐贮性<sup>[6]</sup>。目前对番木瓜炭疽病和

收稿日期: 2013-11-24 接受日期: 2014-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81260480); 广西自然科学基金项目 (2011GXNSFB018035, 2011GXNSFE018002, 2012GXNSFAA053160, 2012GXNSFEA053001)

\* 通讯作者 Tel: 86-771-2503975; E-mail: wenjuan@gxu.edu.cn

香蕉黑星病多采用苯并咪唑类药物如多菌灵等进行防治。研究表明,两种病原菌株对苯并咪唑类药物的抗性由单基因控制,一旦单基因发生突变,就会表现出强抗药性,长期使用多菌灵引起的抗药性风险很大,因此寻找新型杀菌剂变的日趋急切<sup>[7]</sup>。本文通过抗菌活性初步筛选,获得了一株发酵产物具有较强抗菌活性的深海细菌 GAS 00152,经 16S rRNA 分子生物学鉴定为 *Bacillus amyloliquefaciens*。本文报道了该深海细菌的分子生物学鉴定、次生代谢产物分离和鉴定以及抗菌活性测试结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

Brucker Avance DRX 600 核磁共振波谱仪(TMS 为内标);Waters 2695 分析半制备型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,配 PDA 检测器);YMC-Park ODS-A 半制备色谱柱(10 mm × 150 mm, 5 μm);LRH-250A 生化培养箱(广东省医疗器械厂);SYD001 无菌操作台(苏州亿达净化设备有限公司);HVE-50 高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司);ZHWHY-2112C 双层恒温培养震荡器(上海智城分析仪器有限公司);VCX-500 超声波细胞破碎仪(美国 Sonics 公司);MaXis Q-TOF 超高分辨飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公司);API2000 LC/MS/MS 液质连用色谱仪(美国应用生物系统公司);Agilent 6410 串联质谱仪(美国安捷伦公司);制备薄层层析硅胶板(10 cm × 20 cm, 青岛海洋化工厂);200 ~ 300 目柱层析硅胶(青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20 凝胶(瑞典 Pharmacia Biotech 公司);色谱纯甲醇(美国 Fisher 公司),其他所用试剂均为分析纯。

细菌 *Bacillus amyloliquefaciens* GAS 00152 分离自中国南海北部(E 112°21', N 18°24')水深 2476m 的海底沉积物样品,菌种保存于广西北部湾海洋研究中心。

改良 MA 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 5 g/L,陈海水,pH 7.2 ~ 7.4,121 °C 灭菌 30 min 备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 海洋细菌 GAS00152 的分子生物学鉴定

##### 1.2.1.1 PCR 扩增 16S rRNA 基因序列

取少量菌体于无菌 Eppendorf 管中,加入 50 μL 10% 的 Chelex 溶液,沸水浴加热 5 ~ 10 min,冷却后,10000 rpm 低温离心 15 min,取上清液做 PCR 扩

增模板。根据细菌 16S rRNA 基因的保守序列,设计一对通用引物(正向引物 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3';反向引物:5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'),以待测菌株总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL):5 μL 10 × buffer, 5 μL MgCl<sub>2</sub>, 2 μL dNTP (5mM), 1 μL 正向引物(10 μM), 1 μL 反向引物(10 μM), 0.25 μL TaqDNA Polymerase (2U/μL), 1 μL DNA 模板, 34.75 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s; 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延长 1.5 min; 30 个循环; 72 °C 下延伸 10 min。扩增产物置于 4 °C 下保存待测序。

##### 1.2.1.2 扩增产物的序列测定

扩增产物经纯化后,委托北京六合华大基因科技股份有限公司测序。将所测得的 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud 核酸序列数据库中进行在线同源序列搜索(Nucleotide-Nucleotide Blast),进行相似性比对,确定菌株的系统发育地位,鉴定抑菌活性菌株的种属。

##### 1.2.1.3 系统发育树的构建

通过 Clustalx 软件进行海洋细菌菌株 GAS00152 及其最相似菌株的 16S rRNA 基因序列的对比,使用软件 Mega5 构建系统进化树。

##### 1.2.2 菌株的发酵培养

种子培养基和发酵培养基均采用改良 MA 培养基。种子液装入 250 mL 的三角瓶,每瓶加入 120 mL 培养基,121 °C 灭菌 15 min,冷却至室温,从平板上接入适量菌种,菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* 接入其中,每三角瓶接一环。在恒温震荡器中,在 150 rpm, 28 °C 的摇床上培养 72 h 后分别转接到 500 个 500 mL 三角瓶中,每瓶 200 mL 培养基,于 150 rpm, 28 °C 的摇床上培养 144 h,得 100 L 发酵液。

##### 1.2.3 发酵产物的提取与分离

取深海细菌 *Bacillus amyloliquefaciens* GAS 00152 发酵液共 100 L,经超声破碎后再用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,萃取液合并后经真空低温浓缩,干燥后得到固体 15.37 g。将萃取样品装入正相硅胶(200 ~ 300 目),经 CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO 和 CHCl<sub>3</sub>-MeOH 溶剂系统梯度洗脱,薄层色谱点板后合并相似流份,最终得到 7 个分离部位(E1 ~ E7)。E3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱(CHCl<sub>3</sub>: MeOH = 1:1, V:V)纯化后,经过薄层色谱检测后合并为 7 个流份。流份 E3-4 经薄层层析板制备(展开剂 Pet.: EtOAc = 1:2, V:V)

后,得化合物 **1** (3.2 mg) 和 **2** (9.2 mg)。E4 经硅胶柱层析,以  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 系统 (V:V = 10:0 ~ 3:10) 进行梯度洗脱后,经过薄层色谱检测后合并为 5 个流份。流份 E4-1 经过半制备 HPLC 进行分离 (流动相 MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$  = 15: 85, V: V) 后,得到化合物 **6** (29.6 mg)、**7** (3.0 mg)、**8** (6.2 mg)。流份 30 ~ 42 经薄层层析板制备 (展开剂  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{Me}_2\text{CO}$  = 10: 1) 得化合物 **9** (3.2 mg) 和 **10** (9.6 mg)。E5 经硅胶柱层析,用  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 系统 (V:V = 1:0.05 ~ 1:0.3) 洗脱后,经薄层色谱检测合并为 6 个流份。流份 E5-3 经过半制备 HPLC 进行分离 (流动相 MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$  = 25: 75, V: V) 后,得化合物 **5** (51.4 mg)。组分 E6 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH = 1: 1, V: V) 纯化后,经薄层色谱检测合并为 5 个流份。流份 E6-2 经薄层层析板制备 (展开剂  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{Me}_2\text{CO}$  = 2: 1, V: V) 得化合物 **4** (5.2 mg) 和 **12** (3.3 mg)。流份 E6-3 经过半制备 HPLC 分离 (MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$  = 25: 75, V: V) 后得化合物 **3** (2.5 mg)。

#### 1.2.4 抗菌活性测试

化合物 **1** ~ **12** 分别用 DMSO 溶液配置成浓度为 5 mg/mL,再各取 5  $\mu\text{L}$  溶液添加到滤纸片 (直径 6 mm) 上,然后置于含番木瓜炭疽菌 (*C. papayae*) 和香蕉黑星菌 (*P. musarum*) 的 LB 培养基检测平板。空白对照为 DMSO 溶液,阳性对照为多菌灵 (浓度为 5 mg/mL)。37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h,测量抑菌圈大小,判断抗菌活性。每个样品做 2 个平行。抑菌圈直径  $\geq 20$  mm 表示具有强抗菌活性;20 mm > 抑菌圈直径  $\geq 10$  mm 表示具有中等抗菌活性;直径 10 mm > 抑菌圈直径 > 6 mm 表示具有弱抗菌活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株鉴定

16S rRNA 基因序列分析表明 GAS00152 与 *Bacillus amyloliquefaciens* CA812 的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%, 故该菌株为 *Bacillus amyloliquefaciens*, 其系统发育树见图 1。

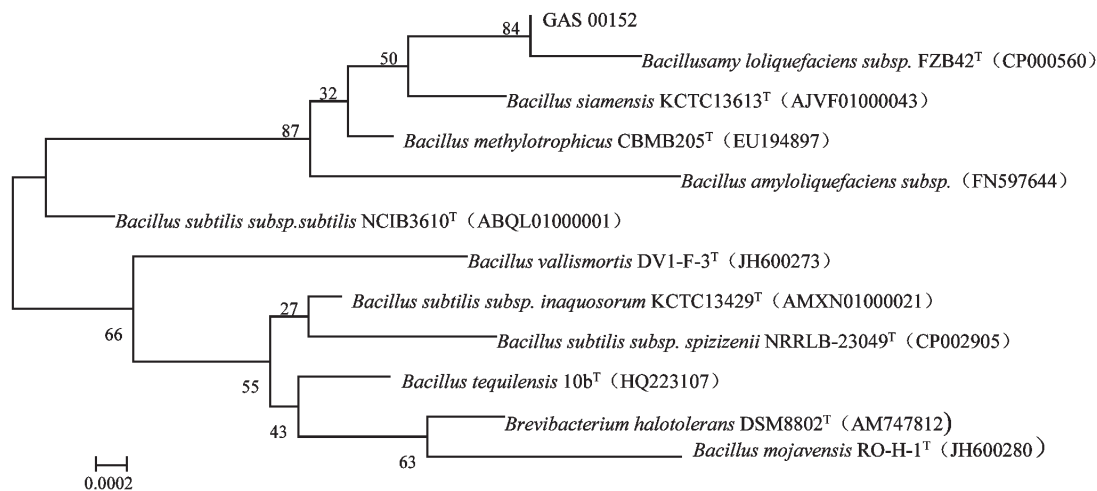


图 1 菌株 GAS00152 的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the strain GAS00152 based on 16S rRNA gene sequences

### 2.2 结构鉴定

化合物 **1** 淡黄色粉末 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ); UV (MeOH)

在 248 nm 处有最大吸收;HR-ESI-MS:  $m/z$  162. 0846  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$ ); EI-MS 给出分子离子峰  $m/z$  161  $[\text{M}]^+$ , 一个失去酰胺基的离子碎片  $m/z$  117  $[\text{M}-\text{CONH}_2]^+$ , 结合  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 谱确定其分子式为  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$ , 计算不饱和度为 6。IR 谱显示有酰胺基 (3356, 1637  $\text{cm}^{-1}$ ) 和苯环 (1495  $\text{cm}^{-1}$ ) 等官能团。 $^1\text{H}$  NMR 谱给出一个单取代苯环的 5 个质子信号:  $\delta_{\text{H}}$  7. 19 (2H, t,  $J = 7. 8$  Hz, H-2, 6)、7. 28

(2H, m, H-3, 5)、7. 24 (1H, d,  $J = 7. 8$  Hz, H-4), 2 个烯烃质子信号:  $\delta_{\text{H}}$  6. 99 (1H, t,  $J = 6. 6$  Hz, H-8)、6. 88 (1H, d,  $J = 6. 6$  Hz, H-7) 和 1 个亚甲基信号:  $\delta_{\text{H}}$  3. 51 (2H, s, H-9)。 $^{13}\text{C}$  NMR 谱显示该化合物有 10 个碳原子, 包括 1 个酰胺碳:  $\delta_{\text{C}}$  180. 1 (C-10), 6 个苯环碳:  $\delta_{\text{C}}$  144. 5 (C-1)、127. 4 (C-2)、128. 0 (C-3)、123. 3 (C-4)、129. 0 (C-5)、127. 0 (C-6), 2 个双键碳:  $\delta_{\text{C}}$  110. 8 (C-8) 和 130. 3 (C-7), 1 个亚甲基碳:  $\delta_{\text{C}}$  37. 1 (C-10)。HMBC 谱中, 亚甲基质子与 C-10、C-7、C-8 相关, 与 C-1、C-2、C-3 不相关, 证明双键

在 C-7,8 位上。综合以上信息,将化合物 **1** 鉴定为 4-苯基-3-丁烯酰胺。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.28 (2H, m, H-3,5), 7.24 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-4), 7.19 (2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-2,6), 6.88 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-7), 6.99 (1H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-8), 3.51 (2H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-9);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 144.5 (C, C-1), 127.4 (CH, C-2), 128.0 (CH, C-3), 123.3 (CH, C-4), 129.0 (CH, C-5), 127.0 (CH, C-6), 130.3 (CH, C-7), 110.8 (CH, C-8), 37.1 ( $\text{CH}_2$ , C-9), 180.1 (C, C-10)。该化合物之前作为合成产物或合成中间体进行报道<sup>[8,9]</sup>,作为天然产物首次被分离,并报道了其 $^1\text{H NMR}$ 和 $^{13}\text{C NMR}$ 谱数据。

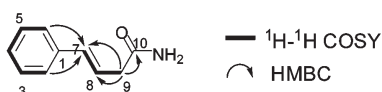


图2 化合物 **1** 关键的 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 与 HMBC 相关

Fig.2 Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of compound **1**

**化合物 2** 白色片状结晶( $\text{CDCl}_3$ ); EI-MS  $m/z$  135  $[\text{M}]^+$ , 91  $[\text{M}-\text{CONH}_2]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.29 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz, H-2,6), 7.37 (2H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-3,5), 7.26 (1H, t,  $J = 6.0$  Hz, H-4), 3.58 (2H, s, H-7);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 135.0 (C, C-1), 129.2 (CH, C-2,6), 129.5 (CH, C-3,5), 127.5 (CH, C-4), 43.5 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 173.7 (C, C-8)。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[10]</sup>一致,故鉴定化合物 **2** 为苯乙酰胺。

**化合物 3** 无色油状( $\text{CDCl}_3$ ); ESI-MS  $m/z$  279.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.24 (2H, dd,  $J = 12.1, 5.4$  Hz, H-2,6), 7.29 ~ 7.34 (2H, m, H-3,5), 7.27 ~ 7.29 (1H, m, H-4), 3.60 (2H, s, H-7), 4.26 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-10), 2.84 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-11), 7.00 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-13,17), 6.73 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-14,16), 4.87 (1H, brs, 15-OH);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 134.2 (C, C-1), 129.4 (CH, C-2,6), 127.2 (CH, C-3,5), 128.7 (CH, C-4), 41.6 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 171.7 (C, C-8), 65.7 ( $\text{CH}_2$ , C-10), 34.3 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 130.2 (CH, C-12), 130.0 (CH, C-13,17), 115.5 (CH, C-14,16), 154.4 (C, C-15)。上述氢谱和碳谱

数据与文献<sup>[11]</sup>一致,故鉴定化合物 **3** 为苯乙酸-2-(4-羟苯基)乙酯。

**化合物 4** 淡黄色针状晶体( $\text{CD}_3\text{OD}$ ); ESI-MS  $m/z$ : 137.1  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.03 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2,6), 6.70 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3,5), 3.68 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-8), 2.72 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-7);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 132.1 (C, C-1), 130.8 (CH, C-2,6), 116.1 (CH, C-3,5), 156.7 (C, C-4), 39.4 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 64.6 ( $\text{CH}_2$ , C-8)。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[12]</sup>一致,故鉴定化合物 **4** 为对羟基苯乙醇。

**化合物 5** 白色粉末( $\text{CD}_3\text{OD}$ ); ESI-MS  $m/z$ : 143.2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 3.90 (1H, dd,  $J = 8.1, 5.5$  Hz, H-3), 4.01 (1H, d,  $J = 18.5$  Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.83 (1H, d,  $J = 17.9$  Hz, H-6 $\beta$ ), 1.45 (2H, d,  $J = 7.1$  Hz, H-7), 0.92 ~ 1.00 (3H, m, H-8);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 171.6 (C, C-2), 61.4 (CH, C-3), 168.9 (C, C-5), 43.8 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 25.3 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 21.1 ( $\text{CH}_3$ , C-8)。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[13]</sup>一致,故鉴定化合物 **5** 为环(甘氨酸-2-氨基丁酸)。

**化合物 6** 白色粉末( $\text{CD}_3\text{OD}$ ); ESI-MS  $m/z$ : 171.2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 3.90 (1H, dd,  $J = 8.1, 5.5$  Hz, H-3), 4.01 (1H, d,  $J = 18.5$  Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.83 (1H, d,  $J = 17.9$  Hz, H-6 $\beta$ ), 1.66 ~ 1.71 (2H, m, H-7), 1.78 ~ 1.86 (1H, m, H-8), 0.97 (6H, m, H-9,10);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 171.6 (C, C-2), 54.8 (CH, C-3), 168.9 (C, C-5), 45.3 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 43.8 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 25.3 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 23.4 ( $\text{CH}_3$ , C-9), 22.1 ( $\text{CH}_3$ , C-10)。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[14]</sup>一致,故鉴定化合物 **6** 为环(甘氨酸-亮氨酸)。

**化合物 7** 白色固体( $\text{DMSO}-d_6$ ); ESI-MS  $m/z$ : 155.3  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 3.84 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 3.50 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-3 $\beta$ ), 8.06 (1H, s, 4-NH), 4.12 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-6), 3.48 ~ 3.57 (2H, m, H-9), 2.11 ~ 2.14 (1H, m, H-7 $\alpha$ ), 1.84 ~ 1.85 (3H, m, H-8, 7 $\beta$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 163.9 (C, C-2), 44.6 (C-3), 169.3 (C, C-5), 58.0 (CH, C-6), 27.9 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 22.1 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 45.9 ( $\text{CH}_2$ , C-9)。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[15]</sup>一致,故鉴定

化合物 **7** 为环(甘氨酸-L-脯氨酸)。

**化合物 8** 白色针状晶体( $\text{CDCl}_3$ );ESI-MS  $m/z$ :197.2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 219.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 3.90 (1H, s, H-3), 6.72 (1H, s, 4-NH), 4.04 (1H, m, H-6), 2.24 ~ 2.42 (1H, m, H-7 $\alpha$ ), 2.58 ~ 2.60 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 1.93 ~ 2.09 (2H, m, H-8), 3.49 (1H, ddd,  $J = 11.8, 9.1, 3.0$  Hz, H-9 $\alpha$ ), 3.60 (1H, dt,  $J = 12.4, 8.2$  Hz, H-9 $\beta$ ), 1.76-1.91 (1H, m, H-10), 1.05 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-11), 0.88 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 170.4 (C, C-2), 58.9 (CH, C-3), 165.1 (C, C-5), 60.5 (CH, C-6), 28.6 (CH<sub>2</sub>, C-7), 22.4 (CH<sub>2</sub>, C-8), 45.2 (CH<sub>2</sub>, C-9), 28.5 (CH, C-10), 19.1 (CH<sub>3</sub>, C-11), 16.1 (CH<sub>3</sub>, C-12)。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[16]</sup>一致,故鉴定化合物 **8** 为环(D-脯氨酸-L-缬氨酸)。

**化合物 9** 白色片状晶体( $\text{CD}_3\text{OD}$ );EI-MS  $m/z$ :227.1  $[\text{M}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 4.47 (1H, t,  $J = 4.2$  Hz, H-3), 3.45 (1H, s, H-4), 4.18 (1H, m, H-6), 2.05 ~ 2.13 (2H, ddd,  $J = 13.3, 11.2, 4.3$  Hz, H-7), 4.59 (1H, s, 8-OH), 4.52 (1H, ddd,  $J = 11.1, 6.4, 1.4$  Hz, H-8), 2.25 ~ 2.32 (2H, m, H-9), 1.84 ~ 1.96 (2H, m, H-10), 1.51 (1H, m, H-11), 0.96 (6H, dd,  $J = 6.4, 3.2$  Hz, H-12, 13);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 169.0 (C, C-2), 54.6 (CH, C-3), 173.1 (C, C-5), 58.7 (CH, C-6), 38.1 (CH<sub>2</sub>, C-7), 69.1 (CH, C-8), 55.2 (CH<sub>2</sub>, C-9), 39.4 (CH<sub>2</sub>, C-10), 24.8 (CH, C-11), 22.3 (CH<sub>3</sub>, C-12), 22.2 (CH<sub>3</sub>, C-13)。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[17]</sup>一致,故鉴定化合物 **9** 为环(4-羟基脯氨酸-亮氨酸)。

**化合物 10** 无色油状( $\text{CDCl}_3$ );EI-MS  $m/z$ : 219.1  $[\text{M}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 4.26 (1H, dd,  $J = 10.4, 6.8$  Hz, H-3), 4.08 (2H, s, H-6), 3.80 (1H, m, H-7 $\alpha$ ), 3.66 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 3.48 (3H, m, 1-CH<sub>3</sub>), 7.28 ~ 7.52 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6');  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 170.3 (C, C-2), 59.1 (CH, C-3), 164.7 (C, C-5), 56.3 (CH<sub>2</sub>, C-6), 37.4 (CH<sub>2</sub>, C-7), 35.5 (1-CH<sub>3</sub>), 133.3 (C, C-1'), 130.7 (CH, C-2'), 128.2 (CH, C-3'), 129.4 (CH, C-4'), 128.3 (CH, C-5'), 129.5 (CH, C-6')。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[18]</sup>一致,故鉴定化合物

**10** 为环(N-甲基甘氨酸-苯丙氨酸)。

**化合物 11** 无色油状( $\text{CDCl}_3$ );ESI-MS  $m/z$  261.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.78 (1H, s, N-H), 4.25 (1H, dd,  $J = 12.0, 4.3$  Hz, H-3), 7.35 (2H, t,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'), 7.29 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz, H-4'), 7.23 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2', 6'), 2.25 ~ 2.31 (1H, m, H-7 $\alpha$ ), 1.93 ~ 1.96 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 1.86 ~ 1.91 (2H, m, H-8), 3.64 ~ 3.68 (2H, m, H-9), 3.62 (1H, dd,  $J = 17.2, 4.3$  Hz, H-10 $\alpha$ ), 2.73 (1H, dd,  $J = 17.2, 12.0$  Hz, H-10 $\beta$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 168.1 (C, C-2), 55.8 (CH, C-3), 166.1 (C, C-5), 87.6 (C, C-6), 36.8 (CH<sub>2</sub>, C-7), 19.9 (CH<sub>2</sub>, C-8), 45.4 (CH<sub>2</sub>, C-9), 41.0 (CH<sub>2</sub>, C-10), 135.7 (C, C-1'), 129.3 (CH, C-2', 6'), 129.2 (CH, C-3', 5'), 127.6 (CH, C-4')。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[19]</sup>一致,故鉴定化合物 **11** 为环(L-2-羟基脯氨酸-苯丙氨酸)。

**化合物 12** 无色油状( $\text{CDCl}_3$ );EI-MS  $m/z$  258.3  $[\text{M}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 4.54 (1H, ddd,  $J = 6.0, 4.1, 1.7$  Hz, H-3), 4.36 ~ 4.43 (1H, m, H-6), 1.87 (1H, m, H-7 $\alpha$ ), 1.63 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 1.55 (1H, m, H-8 $\alpha$ ), 1.45 (1H, m, H-8 $\beta$ ), 1.47 (2H, m, H-9), 2.82 (2H, m, H-10), 3.44 (1H, dd,  $J = 16.8, 4.4$  Hz, H-11 $\alpha$ ), 3.15 (1H, dd,  $J = 16.8, 6.0$  Hz, H-11 $\beta$ ), 7.21 ~ 7.33 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6');  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 168.8 (C, C-2), 56.4 (CH, C-3), 169.7 (C, C-5), 54.9 (CH, C-6), 28.4 (CH<sub>2</sub>, C-7), 20.0 (CH<sub>2</sub>, C-8), 22.6 (CH<sub>2</sub>, C-9), 40.1 (CH<sub>2</sub>, C-10), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C-11), 136.0 (C, C-1'), 131.6 (CH, C-2', 6'), 129.7 (CH, C-3', 5'), 127.7 (CH, C-4')。上述氢谱和碳谱数据与文献<sup>[20]</sup>一致,故鉴定化合物 **12** 为环(2-哌啶酸-苯丙氨酸)。

### 2.3 抗菌活性

化合物 **2** ~ **7**、**10** 对 2 株供试细菌未表现出任何抗菌活性。化合物 **1**、**8** 和 **11** 对番木瓜炭疽菌表现出显抗活性(抑菌圈直径分别为 9 mm 和 7 mm 及 8 mm)。化合物 **9** 对番木瓜炭疽菌和香蕉黑星菌表现出中等抗菌活性(抑菌圈直径分别为 18 mm 和 20 mm)。化合物 **12** 对番木瓜炭疽菌和香蕉黑星菌表现出弱抗菌活性(抑菌圈直径分别为 7 mm 和 9 mm)。

### 3 结论

从深海细菌 *Bacillus amyloliquefaciens* GAS 00152 发酵液中分离鉴定了 12 个化合物。化合物 1 ~ 12 均为首次从深海细菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 中分离得到,其中化合物 1 为新天然产物。初步评价 12 个化合物的抗菌活性,发现化合物 9 对两种热带水果致病菌有中等抑制活性,有成为生物农药的潜力。

#### 参考文献

- Zhao CH(赵昌会), Ye DZ(叶德赞), Wen WL(魏文玲). Research on deep-sea microbiology. *Microbiology*(微生物通报), 2006, 33: 142-146.
- Wackett LP. Deep sea and land microbiology. *Envi microb*, 2013, 15: 2629-2630.
- Romanenko LA, Tanaka N, Kalinovskaya NI, et al. Antimicrobial potential of deep surface sediment associated bacteria from the Sea of Japan. *World J Microb Biot*, 2013, 29: 1169-1177.
- Zhang XY, Zhang Y, Xu XY, et al. Diverse deep-sea fungi from the south china sea and their antimicrobial activity. *Curr Microbiol*, 2013, 67: 525-530.
- Li M(李敏), Hu MJ(胡美娇), Gao ZY(高兆银), et al. Toxicity test of fungicides for *Collectotrichum gloeosporioides* penz on papaya in Laboratory. *Agrochemicals*(农药), 2009, 48: 767-768.
- Hong SH(洪胜福). Law and preventive skill of *Marcophoma musae* in Banana. *Fujian Sci Tech Trop Crops*(福建热作科技), 2013, 35: 14-15.
- Gao CZ(高成庄), Li J(李健). Progress in the application of benzimidazoles and their derivatives. *J Zhengzhou Univ Light Ind*(郑州轻工业学院学报), 2007, 22(2/3): 35-36, 57.
- Ekkati AR, Bates DK. A convenient synthesis of n-acylpyrroles from primary aromatic amides. *Synthesis*, 2003, 13: 1959-1961.
- Kitamura M, Murakami K, Shiratake Y, et al. Synthesis of  $\alpha$ -arylcarboxylic acid amides from silyl enol ether via migratory amidation with 2-azido-1, 3-dimethylimidazolium hexafluorophosphate. *Chem Lett*, 2013, 42: 691-693.
- Peng XD, Xiao DJ, Deng SZ, et al. Studies on the chemical constituents of the marine sponge *Cinachyrella australiansis* from the South China Sea( II ). *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物杂志), 2004, 23(6): 5-7.
- Cheng MJ, Wu MD, Chen IS, et al. Secondary metabolites from the mycelia of the fungus *Monascus pilosus* BCRC 38072. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56: 394-397.
- Kodaira H, Ishikawa M, Komoda Y. Isolation and identification of anti-platelet aggregation principle from the bark of *Fraxinus japonica* blume. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31: 2262-2268.
- Davies DB, Khaled MA. Conformations of peptides in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Part III. Cyclic dipeptide ring conformations. *J Chem Soc, Perkin Trans*, 1976, 10: 1238-1244.
- Li DH, Gu QQ, Zhu WM, et al. Antitumor components from marine actinomycete 11014 I. Cyclic dipeptides. *Chin J Anti*(中国抗生素杂志), 2005, 30: 449-452.
- Liu R, Zhu TJ, Zhu WM, et al. The antitumor active component from marine derived actinomycete S1001. *Chin J Anti*(中国抗生素杂志), 2006, 31: 36-38.
- Jayatilake GS, Thornton MP, Leonard AC, et al. Metabolites from an Antarctic sponge associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nat Prod*, 1996, 59: 293-296.
- Rosa SD, Mitova M, Tommonaro G. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. *Bio Eng*, 2003, 20: 311-316.
- Davies DB, Khaled MA. Conformations of peptides in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Part II. Homoallylic coupling in cyclic dipeptides. *J Chem Soc, Perkin Trans*, 1976, 10: 187-196.
- Park YC, Gunasekera SP, Lopez JV, et al. Metabolites from the marine-derived fungus *Chromocleista* sp. isolated from a deep-water sediment sample collected in the gulf of Mexico. *J Nat Prod*, 2006, 69: 580-584.
- Mitova M, Tutino ML, Infusini G, et al. Exocellular peptides from antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Mar Biotechnol*, 2005, 7: 523-531.