

文章编号:1001-6880(2014)7-1026-04

深海放线菌 *Actinomadura* sp. 01119 的代谢产物研究

林 已^{1,2},林秀萍¹,艾 文¹,田新朋¹,周雪峰¹,徐石海^{2*},刘永宏^{1*}¹中国科学院南海海洋研究所 广东省海洋药物重点实验室,广州 510301;²暨南大学 生命与科学技术学院,广州 510632

摘要:采用硅胶柱色谱、制备薄层色谱和凝胶色谱等分离方法,对分离自深海沉积物中的海洋放线菌 *Actinomadura* sp. 01119 的代谢产物进行研究,从中分离得到 9 个化合物,经¹H NMR、¹³C NMR 和 MS 等波谱分析并结合相关文献鉴定为环(*L*-苯丙-*L*-脯)二肽(1),环(*L*-脯-*L*-脯)二肽(2),环(*L*-酪-*L*-脯)二肽(3),环(*D*-酪-*L*-脯)二肽(4),环(*L*-异亮-*L*-脯)二肽(5),环(*L*-缬-*L*-脯)二肽(6),棕榈酸(7),对羟基苯甲酸(8),尿嘧啶(9)。其中化合物 1~6 为环二肽类化合物。

关键词:深海放线菌; *Actinomadura* sp. 01119; 代谢产物; 环二肽

中图分类号:R931.77

文献标识码:A

Study of Metabolites from A Deepsea Actinomycete Strain *Actinomadura* sp. 01119

LIN Ji^{1,2}, LIN Xiu-ping¹, AI Wen¹, TIAN Xin-peng¹, ZHOU Xue-feng¹, XU Shi-hai^{2*}, LIU Yong-hong^{1*}¹Guangdong Key Laboratory Of Marine Materia Medica, South China Sea Institute Of Oceanology, Guangzhou 510301, China;²Life Science College Of Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Nine compounds were isolated and purified from a deepsea actinomycete *Actinomadura* sp. 01119 by silica gel column, Sephadex LH-20 chromatography and PTLC. Their structures were identified as cyclo-(*L*-Phe-*L*-Pro) (1), cyclo-(*L*-Pro-*L*-Pro) (2), cyclo-(*L*-Tyr-*L*-Pro) (3), cyclo-(*D*-Tyr-*L*-Pro) (4), cyclo-(*L*-Ile-*L*-Pro) (5), cyclo-(*L*-Val-*L*-Pro) (6), hexadecanoic acid (7), *p*-hydroxybenzoic acid (8), uracil (9) by ¹H NMR, ¹³C NMR and MS. Compounds 1~6 are cyclic dipeptides.

Key words: deepsea actinomycete; *Actinomadura* sp. 01119; metabolites; cyclic dipeptide

放线菌是一类能产生丰富活性物质的生物资源,历史上为抗生素工业的建立和发展发挥过巨大的作用^[1]。如今,随着放线菌生物多样性研究的进一步深入,从放线菌中寻找新的具有生物活性的物质仍然显示出巨大的发展前景。但是,由于受到生长环境等因素的限制,目前从陆地放线菌发现新代谢产物的速度正在不断下降,所以人们把目光投向另一个极具发展潜力的药物新来源——海洋放线菌^[2]。海洋放线菌由于生长在深海高盐高压等极端环境中,相对于陆地放线菌能够产生更多结构新颖的次级代谢产物,所以近年来倍受关注。*Actinomadura* 属的放线菌为稀有放线菌,对其研究具有一定历史。从早期的报道中获悉,该属菌株能够产生具有抗癌、抗炎、抗菌等活性的次级代谢产物以及结构复杂的抗生素类化合物,为药物的开发提供了

先导性作用^[3]。最近几年的研究中,发现该属菌株所产生的次级代谢产物在其他方面也有应用,如:产生具有高耐热性的木聚糖酶^[4]及能降解聚乙交酯的酶^[5]等。环二肽类化合物是放线菌产生的主要类型化合物之一,近年来从海洋微生物中发现了一系列的环二肽类化合物,经研究表明了环二肽具有多方面的活性,不仅具有较强的抗菌、抗病毒、抗氧化、抗污和抗肿瘤活性,还可以作为植物生长调节剂、免疫增强剂等^[6]。在近期的报道中,环二肽在群体感应调控机制中也充当着信号分子的重要角色,如:环(*L*-酪-*L*-脯)二肽^[7],现已成为化学生态学的研究热点。

本文对分离自深海沉积物中的海洋放线菌 *Actinomadura* sp. 01119 进行固体发酵,从发酵培养物中共分离得到 9 个化合物,通过波谱数据并结合文献对照,对其结构进行了解析,分别鉴定为环(*L*-苯丙-*L*-脯)二肽(1),环(*L*-脯-*L*-脯)二肽(2),环(*L*-酪-*L*-脯)二肽(3),环(*D*-酪-*L*-脯)二肽(4),环(*L*-异亮-*L*-脯)二肽(5),环(*L*-缬-*L*-脯)二肽(6),棕榈酸

收稿日期:2013-06-28 接受日期:2013-10-21

基金项目:国家自然科学基金项目(31270402;21172094);国家863 计划项目(2013AA092902)

*通讯作者 Tel:86-20-89023244; E-mail: yonghongliu@scsio.ac.cn; txush@jnu.edu.cn

(7), 对羟基苯甲酸(8), 尿嘧啶(9)。其中化合物 1 ~ 6 为环二肽类化合物。本文重点报道了该菌株的发酵培养及其发酵培养物中 9 个化合物的分离纯化和结构鉴定过程。

1 材料与方法

1.1 仪器与器材

Avance 500 核磁共振仪(美国 Bruker 公司); ESI-MS 质谱仪(美国 Agilent 公司); MPC 500 旋光仪(法国 Anton Paar 公司); Sephadex LH-20 柱色谱凝胶(Pharmacia 公司); 检测用薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 和分离用柱色谱硅胶(100~200 目、200~300 目、300~400 目)均为青岛海洋化工厂产品, 制备薄层板(20×20×0.05 cm)为烟台江友硅胶开发有限公司产品; 实验所用试剂购自天津富宇精细化工有限公司。

海洋放线菌 *Actinomadura* sp. 01119 由中国科学院南海海洋研究所田新朋博士分离和鉴定。菌种现保存于中国科学院海洋微生物研究中心。

种子培养基 YMS: 酵母膏 0.4%, 可溶性淀粉 0.4%, 麦芽浸膏 1%, 海盐 0.25%, 琼脂 1.5%, 水, pH 7.2~7.4。

发酵培养基 M7: 酵母膏 0.75%, 大豆蛋白胨 0.75%, 甘油 1.5%, 氯化钠 0.25%, 海盐 0.25%, 琼脂 2%, 水, pH 7.2~7.4。

1.2 方法

1.2.1 菌株的发酵培养

配制培养基 YMS 和 M7 于 121 °C 灭菌 30 min, 并在培养基冷却前震荡摇匀, 待其冷却后倒入平板中备用。

将菌株用划线接种法接种到 YMS 平板上, 于 28 °C 培养箱中倒置培养 3 d, 作为发酵种子。将 YMS 培养平板上的菌种, 用划线接种法接种到 M7 平板上, 于 28 °C 培养箱中倒置培养两周。

1.2.2 提取与分离

将固体发酵培养物切块并浸泡于无水乙醇中, 超声 6 min, 静止浸泡 2 d, 过滤, 分别回收滤液和滤渣, 滤液经减压浓缩除去水和乙醇。滤渣用乙酸乙酯浸泡两遍, 过滤除去滤渣, 减压浓缩滤液, 除去乙酸乙酯。合并三次初提取物, 用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩萃取液得到粗浸膏 40 g。粗浸膏用少量的乙酸乙酯和甲醇溶解, 再用 200~300 目的硅胶拌样, 干燥后干法上硅胶柱, 用丙酮:石油醚(0:1→2:100→

10:100→20:100→30:100→50:100), 丙酮:氯仿(50:100→70:100→1:0) 的梯度洗脱, 经 TLC 检测, 合并相同馏分, 得到 Fr. 1~Fr. 11 共 11 个馏分。Fr. 3 经硅胶柱层析, 石油醚-氯仿梯度洗脱得到化合物 7(14 mg)。Fr. 6 经硅胶柱层析, 石油醚-丙酮梯度洗脱得到化合物 1(10 mg) 和化合物 8(5 mg)。Fr. 7 经硅胶柱层析, 氯仿-丙酮梯度洗脱得到馏分 Fr. 7-1~Fr. 7-3, Fr. 7-1 经薄层制备(氯仿:甲醇 9:1) 得到化合物 2(8 mg), Fr. 7-2 经薄层制备(氯仿:甲醇 8:1) 得到化合物 3(21 mg), Fr. 7-3 经氯仿-丙酮梯度洗脱得到化合物 4(24 mg)、化合物 5(5 mg)、化合物 6(3 mg)。Fr. 8 经甲醇-氯仿梯度洗脱, 得到化合物 9(30 mg)。

2 结构鉴定

化合物 1 白色片状晶体(甲醇); 苛三酮显色阴性, 薄层原位水解后苛三酮显色阳性, 提示为环肽类化合物。 $[\alpha]_D^{28} = -24.3^\circ$ (*c* 0.5, MeOH), ESI-MS *m/z* 244, 结合¹H NMR、¹³C NMR、DEPT-135 谱确定了化合物的分子式为 C₁₄H₂₆N₂O₂。¹H NMR 谱中 δ: 7.29 (5H, m) 提示结构中含有一个单取代的苯环, 结合¹³C NMR、DEPT 谱 δ: 137.4 (s), 131.0 (d), 129.5 (d), 128.1 (d) 推测出结构含有苯丙氨酸片段; δ: 60.1 (d), 46.0 (t), 29.4 (t), 22.8 (t) 碳信号说明结构中有脯氨酸片段。根据¹H NMR、¹³C NMR、DEPT-135 数据结合理化性质确定该化合物结构是环(苯丙-脯)二肽。根据 Adamczeski 等人总结的经验规则^[8], 同时氢谱、碳谱及旋光数据与文献^[9]报道的化合物环(*L*-苯丙-*L*-脯)二肽(cyclo-(*L*-Tyr-*L*-Pro))基本一致, 因此进一步确定化合物 1 的结构为环(*L*-苯丙-*L*-脯)二肽(cyclo-(*L*-Tyr-*L*-Pro))。该化合物的部分波谱数据为¹H NMR (MeOD, 500 MHz) δ: 7.29 (5H, m), 4.45 (1H, t, *J* = 4.5 Hz, H-2'), 4.07 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2), 3.54 (3H, m, H-3a', H-5), 3.38 (1H, m, H-3b'), 2.10 (1H, m, H-3a), 1.91 (2H, m, H-4), 1.28 (1H, m, H-3b); ¹³C NMR&DEPT (MeOD, 125 MHz) δ: 171.0 (s, C-1), 169.9 (s, C-1'), 137.4 (s, C-4'), 131.0 (d, C-5', C-9'), 129.5 (d, C-6', C-8'), 60.1 (d, C-2), 57.7 (d, C-2'), 46.0 (t, C-5), 38.1 (t, C-3'), 29.3 (t, C-3), 22.8 (t, C-4)。

化合物 2 白色片状固体(甲醇); $[\alpha]_D^{28} = -31.2^\circ$ (*c* 0.5, MeOH), EI-MS *m/z* 217 [*M* +

Na^+ 。 ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) δ : 4.31 (2H, t, J = 8.0 Hz, H-2, H-2'), 3.49 (4H, m, H-5, H-5'), 2.31 (2H, m, H-3a, H-3a'), 1.90 ~ 2.10 (6H, m, H-3b, H-3b', H-4, H-4')； ^{13}C NMR&DEPT (MeOD, 125 MHz) δ : 168.7 (s, C-1, C-1'), 61.8 (d, C-2, C-2'), 46.2 (t, C-5, C-5'), 28.7 (t, C-3, C-3'), 24.2 (t, C-4, C-4')。参照文献^[8,10], 确定化合物2为环(L-脯-L-脯)二肽。

化合物3 白色片状晶体(甲醇); $[\alpha]_D^{28}$ -57.5° (c 0.5, MeOH), EI-MS m/z 283 [M + Na]⁺。 ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) δ : 7.06 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-5', H-9'), 6.73 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-6', H-8'), 4.37 (1H, m, H-2'), 4.05 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-2), 3.35 (2H, m, H-5), 3.08 (2H, m, H-3'), 2.12 (1H, m, H-3a), 1.26 (1H, m, H-3b), 1.82 (2H, m, H-4)； ^{13}C NMR&DEPT (MeOD, 125 MHz) δ : 170.9 (s, C-1), 167.0 (s, C-1'), 157.7 (s, C-7'), 132.1 (d, C-5', C-9'), 127.8 (s, C-4'), 116.3 (d, C-6', C-8'), 60.1 (d, C-2), 57.9 (d, C-2'), 46.0 (t, C-5), 37.6 (t, C-3'), 29.4 (t, C-3), 22.8 (t, C-4)。参照文献^[8,9], 确定化合物3为环(L-酪-L-脯)二肽。

化合物4 白色无定形粉末(甲醇); $[\alpha]_D^{28}$ -28.5° (c 0.5, MeOH), EI-MS m/z 283 [M + Na]⁺。 ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) δ : 7.00 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-5', H-9'), 6.93 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-6', H-8'), 4.16 (1H, t, J = 4.5 Hz, H-2), 3.78 (1H, m, H-2'), 3.35, 2.64 (2H, m, H-5), 3.14 (1H, dd, J = 4.5 Hz, H-3b'), 2.88 (1H, dd, J = 4.5 Hz, H-3a'), 1.67 (2H, m, H-3a, H-3b), 1.92, 2.09 (2H, m, H-4)； ^{13}C NMR&DEPT (MeOD, 125 MHz) δ : 171.5 (s, C-1), 167.6 (s, C-1'), 158.3 (s, C-7'), 132.3 (d, C-5', C-9'), 126.2 (s, C-4'), 116.4 (d, C-6', C-8'), 60.0 (d, C-2), 59.2 (d, C-2'), 46.1 (t, C-5), 40.3 (t, C-3'), 29.9 (t, C-3), 22.5 (t, C-4)。参照文献^[8,11], 确定化合物4为环(D-酪-L-脯)二肽。

化合物5 白色无定形粉末(氯仿); $[\alpha]_D^{28}$ -5.8° (c 0.5, MeOH), EI-MS m/z 233 [M + Na]⁺。 ^1H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 6.29 (1H, br. s), 4.07 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-2), 3.95 (1H, s, H-2'), 3.62, 3.52 (2H, m, H-5), 2.31 (2H, m, H-3), 2.03 (2H, m, H-4), 1.92 (1H, m, H-3'), 1.42, 1.19 (2H, m, H-4'), 1.04 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-6'), 0.91 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-5')； ^{13}C NMR&DEPT (c DCl₃,

125 MHz) δ : 170.1 (s, C-1), 165.1 (s, C-1'), 60.5 (d, C-2), 58.8 (d, C-2'), 45.1 (t, C-5), 35.3 (d, C-3'), 28.1 (t, C-3), 24.0 (s, C-4'), 22.3 (t, C-4), 15.8 (d, C-6'), 12.1 (q, C-5')。参照文献^[8,10], 确定化合物5为环(L-异亮-L-脯)二肽。

化合物6 白色不定型粉末(甲醇); $[\alpha]_D^{28}$ -105.6° (c 0.5, MeOH), ESI-MS m/z 219 [M + Na]⁺。 ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) δ : 4.21 (1H, m, H-2), 3.31 (2H, m, H-3), 2.03 (2H, m, H-4), 3.52 (2H, m, H-5), 4.06 (1H, t, J = 4.0 Hz, H-2'), 2.03 (1H, m, H-3'), 1.12 (3H, d, J = 8.0 Hz, H-4'), 0.94 (3H, m, J = 8.0 Hz, H-5')； ^{13}C NMR&DEPT (MeOD, 125 MHz) δ : 171.1 (s, C-1), 166.4 (s, C-1'), 60.2 (d, C-2), 58.4 (d, C-2'), 44.9 (t, C-5), 28.4 (t, C-3), 28.2 (d, C-3'), 21.7 (t, C-4), 17.5 (q, C-4'), 15.3 (q, C-5')。参照文献^[8,9], 确定化合物6为环(L-缬-L-脯)二肽。

化合物7 ^1H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 0.86 (3H, m), 2.34 (2H, t, J = 7.5 Hz), 1.63 (2H, m), 1.2 ~ 1.4 (22H, m)。在TLC薄层板上与棕榈酸的标准品对照, 其R_f值与显色行为相同。参考文献^[12], 确定化合物7为棕榈酸。

化合物8 ESI-MS m/z 137 [M-H]⁻, 139 [M + H]⁺, ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) δ : 7.89 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.83 (2H, d, J = 8.5 Hz)。在TLC薄层板上与对羟基苯甲酸的标准品对照, 对应的R_f值和显色行为相同, 参照文献^[13], 确定化合物8为对羟基苯甲酸。

化合物9 白色无定形粉末(DMSO);微溶于甲醇, 在TLC薄层板上与尿嘧啶的标准品对照, 其R_f值和显色行为相同。 ^1H NMR (DMSO, 500 MHz) δ : 11.0 (1H, br. s, H-2), 10.80 (1H, br. s, H-4), 7.38 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-5), 5.47 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6)。参照文献^[14], 确定化合物9为尿嘧啶。

3 讨论

从深海放线菌 *Actinomadura* sp. 01119 分离得到的化合物以环二肽类化合物为主。环二肽类化合物具有多种生物学活性, 如植物生长调节剂、抗菌和抗肿瘤活性等^[6]。本文采用了滤纸片扩散法测定化合物1~6对大肠杆菌、金色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、*Micrococcus lutes* 006 (UST950701-006) 的抑菌活性, 结果显示, 在每片滤纸片含有 50 μg 样品时, 均

没有表现出对指示菌株具有抑菌活性。对于这些化合物其他方面的活性有待进一步研究。

参考文献

- 1 Liu Y(刘妍), Li ZY(李志勇). New research progress of marine actinomycetes. *Biotechnology Bulletin*(生物技术通报), 2005, 6:34-39.
- 2 Ren XM(任香梅), Huang HB(黄洪波), Liu J(刘静), et al. Aromatic amide metabolites from the marine-derived *Streptomyces lusitanus* SCSIO LR32. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23:591-595.
- 3 Leyre M, Francisco R, Fernando E, et al. IB-00208, a new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura* I. Isolation of the strain, taxonomy and biological activities. *J Antibiot*, 2002, 56:219-225.
- 4 Zina T, Boudjemaa S, Mokhtar B, et al. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. Strain Cpt20 Isolation from Poultry Compost. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166:663-679.
- 5 Sukhumaporn S, Shinji T, Vichien K, et al. Development of fermentation process for PLA-degrading enzyme production by a new thermophilic *Actinomadura* sp. T16-1. *Biotechnol Bioproc E*, 2009, 14:302-306.
- 6 Guo XC(郭秀春), Zheng L(郑立), Zhou WH(周文辉), et al. Recent advance on diketopiperazines produced by marine microorganism. *Microbiology*(微生物学通报), 2009, 36: 1596-1603.
- 7 Degraffi G, Aguilar C, Bosco M, et al. Plant growth-promoting
- Pseudomonas putida WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Current Microbiology*, 2002, 45:50-54.
- 8 Madeline A, Andrea R. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, *calyx* of *podatypa*. *J Nat Prod*, 1995, 58:201-208.
- 9 Li Y(李益), Tang JS(唐金山), Gao H(高昊), et al. Study of anti-MRSA bioactive constituents from a marine actinomycetes *Micromonospora* sp. (NO. 69). *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物), 2010, 29:21-27.
- 10 Starkt, Hofmann. Structures, sensory activity, and dose/response function of 2, 5-diketopiperazines in roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*). *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 7222-7231.
- 11 Campbell J, Lin Q, Grand D, et al. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by cyclic dipptides. *Chem Biol*, 2009, 4:1051-1059.
- 12 Song FX(宋福行), Fang X(范晓), Xu XL(徐秀丽), et al. Study on the chemical constituents of the marine Sponge *Tedania* sp. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物), 2004, (3): 11-14.
- 13 Zhang LX(张立新), Xue F(薛峰), Tang MJ(唐美君) . Isolation and identification of several chemical constituents in sponge *Tedania* sp. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物), 2008, 27:15-17.
- 14 Huang RM(黄日明), Peng Y(彭燕), Zhou XF(周雪峰), et al. Chemical constituent of *Callyspongia* sp. from South China. *Chin Pham J*(中国药学杂志), 2010, 45:338-340.

(上接第 993 页)

- 3 Powell RG, Weisleder D, Smith CR, et al. Treflorine, trenudine, and N-methyltrenudone: novel maytansinoid tumor inhibitors containing two fused macrocyclic rings. *J Am Chem Soc*, 1982, 104:4929-4934.
- 4 Wu X(吴欣), Lu CH(鲁春华). Studies on the secondary metabolites of co-culture of the calli of *Trewia nudiflora* and its endophytic strain *Fusarium* sp. WXE. *J Xiamen Univ Nat Sci*(厦门大学学报, 自科版), 2010, 49:406-409.
- 5 Liu ZH(刘志恒), Jiang CL(姜成林). Modern biology and biotechnology of actinomycete (放线菌现代生物学与生物技术). Beijing: Science Press, 2004. 293-295.
- 6 Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, 19:1572-1574.
- 7 Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*, 2003, 52:696-704.
- 8 Ellestad GA, Kunstmann MP, Whaley HA, et al. The structure of frenolicin. *J Am Chem Soc*, 1968, 90:1325-1332.
- 9 Ellestad GA, Whaley HA, Patterson EL. Structure of frenolicin. *J Am Chem Soc*. 1966, 88:4109-4110.
- 10 Iwai Y, Kora A, Takahashi Y, et al. Production of deoxyfrenolicin and a new antibiotic, frenolicin B by *Streptomyces roseofulvus* strain AM-3867. *J Antibiotics*, 1978, 31:959-965.
- 11 Masanori K, Shiro W, Hideki S. Anticoccidal activity of frenolicin B and its derivatives, *J Antibiotics*, 1985, 38:1447-1448.