

拟诺卡氏放线菌 YIM 90087 的发酵液化学成分研究

张孝龙¹, 潘芸¹, 李铭刚¹, 林婷婷¹, 丁章贵¹, 文孟良¹, 赵江源^{1,2*}¹云南大学云南省微生物研究所; ²自然资源药物化学教育部重点实验室(云南大学), 昆明 650091

摘要:对拟诺卡氏菌 YIM90087 的液体发酵提取物进行了化学成分研究, 从中分离得到 10 个化合物。通过波谱数据分析, 鉴定其结构分别为: 4-羟基苯甲醛(**1**)、2-羟基-1-(1H-吡啶-3-基)乙酮(**2**)、4-羟基苯甲酸(**3**)、2-氨基-3-甲氧基-4-甲基吡啶(**4**)、4,7-双(4-甲氧基苯基)-6-羟基-5-甲氧基苯并噻唑(**5**)、1-(4-甲基哌嗪-1-基)乙酮(**6**)、(3R,8aS)-3-异丙基-六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮(**7**)、2-(2-氨基乙基)乙酸苯酯(**8**)、N-乙酰基酪胺(**9**)和 6'-羟基-4,2',3',4''-四甲氧基-对三联苯(**10**)。化合物**4**目前只见化学合成报道, 为新天然产物。

关键词:拟诺卡氏菌; 液体发酵; 分离纯化; 结构鉴定

中图分类号: R379.1; 58

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.002

Secondary Metabolites from Cultures of *Nocardioopsis* sp. YIM 90087ZHANG Xiao-long¹, PAN Yun¹, LI Ming-gang¹, LIN Ting-ting¹,DING Zhang-gui¹, WEN Meng-liang¹, ZHAO Jiang-yuan^{1,2*}¹Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University; ²Key Laboratory of Medicinal

Chemistry for Natural Resource (Yunnan University), Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: The chemical constituents from the liquid fermentation of *Nocardioopsis* sp. YIM90087 were studied. ten compounds were isolated, and their structures were determined by spectral analysis as 4-hydroxybenzaldehyde(**1**), 2-hydroxy-1-(1H-indol-3-yl) ethanone(**2**), 4-hydroxybenzoic acid(**3**), 3-methoxy-4-methylpyridin-2-amin(**4**), 4,7-Bis(4-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzo[d]thiazole(**5**), 1-(4-methylpiperazin-1-yl) ethanone(**6**), cyclo(-L-pro-L-val-)(**7**), 2-(2-aminoethyl) phenyl acetate(**8**), N-acetyltyramine(**9**) and 6'-Hydroxy-4,2',3',4''-tetramethoxy-p-terphenyl(**10**). Compound**4** was previously reported in chemical synthesis, and was a new natural product.

Key words: *Nocardioopsis* sp.; liquid fermentation; isolation; structural elucidation

拟诺卡氏菌属(*Nocardioopsis*, Meyer 1976 年提出^[1])微生物是一类高 G + C 含量革兰氏阳性好氧菌, 广泛分布于各种环境中, 尤其在中度和高度盐环境中呈优势微生物群落。菌株 YIM 90087 是 2004 年由李文均等人从中国新疆高盐土壤中分离出来的一株拟诺卡放线菌, 并鉴定为拟诺卡氏菌属(*Nocardioopsis gilva* sp. Nov.)^[2]。本研究组已经开展了对该菌株的固体发酵代谢产物的研究^[3], 分离得到 10 个化合物, 这些化合物的结构类型主要为环肽类化合物, 其中 6'-羟基-4,2',3',4''-四甲氧基-对三联苯为 2013 年发表的一个新的三联苯类化合物^[4], 化合物(4S)-4-苄基-1,3-恶唑-2,5-二酮以前只见化学合成报道, 为新天然产物。

为继续寻找该 YIM90087 菌株中结构新颖的活性化合物, 并比较不同发酵方式下该菌株代谢产物的差异, 本文对该菌株的液体发酵培养条件进行优化(包括培养基、培养基盐浓度、氯化物、pH 值、发酵时间等), 最后选定培养基为 PDB 改良培养基, 发酵盐浓度为 5% NaCl, pH = 10, 发酵时间为 12 d, 采用液体发酵的方式; 通过对其液体发酵提取物进行化学成分研究, 从中共分离得到 10 个化合物, 其中化合物**7**和**10**在该菌株固体发酵代谢产物中也分离得到, 化合物**4**以前只见化学合成报道, 为新天然产物。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Bruker AM-400 型核磁共振仪; Bruker DRX-500 型核磁共振仪; Agilent G3250AA LC/MSD TOF 型质谱仪; 薄层层析硅胶板和柱层析硅胶 G, 200 ~ 300

收稿日期: 2016-04-22 接受日期: 2016-05-31

基金项目: 国家自然科学基金(81203001; 31260012; 21402169); 云南省人才项目(2011CI001)

* 通讯作者 Tel: 86-871-65032170; E-mail: jyzhao@ynu.edu.cn

目(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(Amersham Pharmacia); 反相材料 RP-C18, Merck; Waters 高效液相色谱仪(515-2996); 岛津制备型高效液相色谱仪(LC-8A); 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 发酵菌株

菌株 YIM90087 是拟诺卡氏菌属的一个新种(*Nocardiopsis gilva* sp. nov.), 菌株保存于云南省微生物研究所。

1.3 培养基及培养条件

斜面培养基: 淀粉 20 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 酵母膏 2 g/L, KNO_3 2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, 1% NaCl。

种子培养基: 淀粉 20 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, 蛋白胨 2 g/L, KNO_3 2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, NaCl 50 g/L, 酵母膏 2 g/L, pH = 7.4 ~ 7.6。

发酵培养基(PDB 改良培养基): 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 酵母膏 2 g/L, NaCl 50 g/L, pH = 10。

种子液制备: 从新鲜斜面培养中将菌株转接到装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 37 °C、180 rpm 摇床培养 5 d。

将种子液按 10% 接种量转接到装有 250 mL 种子培养基的 500 mL 锥形瓶中, 共发酵 560 瓶, 37 °C、180 rpm 摇床培养 12 d。

1.4 提取与分离

将发酵液过滤, 分别处理上清液和菌丝体部分。上清液用乙酸乙酯萃取 3 次; 菌丝体用丙酮浸泡超声提取(3 次, 30 min/次), 过滤, 上清液合并, 蒸去丙酮后, 用乙酸乙酯萃取 3 次; 合并上清液和菌丝体的乙酸乙酯萃取部分, 减压浓缩后得到 101.1 g 发酵液提取物。

发酵液提取物经硅胶柱层析, 用石油醚、石油醚-EtOAc (10:1)、EtOAc、MeOH 流动相顺序洗脱, 得到 4 个组分(S1-S4), S2 经反相中压液相色谱, 用 10%、20%、30%、50%、60%、70% 甲醇梯度洗脱, 得到 6 个馏分(Fr. 1-Fr. 6)。Fr. 2 经过凝胶 Sephadex LH-20 柱层析, 用甲醇洗脱得化合物 5(15 mg) 和 10(11 mg)。Fr. 3 经硅胶柱层析, 用石油醚-丙酮(8:1)洗脱得化合物 6(13 mg) 和 7(9 mg)。Fr. 4 经 Sephadex LH-20 柱层析, 用甲醇洗脱得化合物 2(17 mg) 和 8(19 mg)。S3 经反相中压液相色

谱, 用 20%、50%、70% 甲醇梯度洗脱, 得到 3 个馏分(S3.1-S3.3)。S3.1 经过凝胶 Sephadex LH-20 柱层析, 甲醇洗脱, 再经 HPLC 制备, 用甲醇-水(30:70)洗脱得化合物 1(8 mg)、3(7 mg)、4(10 mg) 和 9(12 mg)。

2 结构鉴定

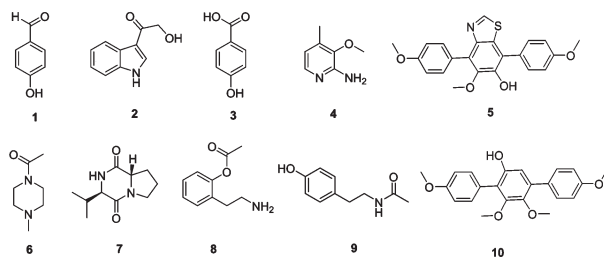


图 1 化合物 1~10 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-10

化合物 1 淡黄色粉末(甲醇), 分子式为 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$; ESI-MS m/z : 145 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.97 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-2, 6), 7.82 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-3, 5), 9.87 (1H, s, H-7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 132.5 (C-1), 116.0 (C-2, 6), 130.0 (C-3, 5), 191.1 (C-7)。以上数据与文献报道^[5]一致, 确定化合物 1 为 4-羟基苯甲醛。

化合物 2 白色固体(甲醇); 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$; ESI-MS m/z : 198 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ^1H NMR (DMSO , 400 MHz) δ : 4.57 (2H, d, $J = 5.6$ Hz, H-2), 8.33 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-4), 8.16 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6), 7.21 (1H, m, H-7), 7.17 (1H, m, H-8), 7.47 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 4.92 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, H-2); ^{13}C NMR (DMSO , 100 MHz) δ : 194.5 (C-1), 65.3 (C-2), 133.4 (C-4), 113.2 (C-5), 125.4 (C-5a), 121.8 (C-6), 121.2 (C-7), 122.8 (C-8), 112.2 (C-9), 136.3 (C-9a)。以上数据与文献报道^[6]基本一致, 确定化合物 2 为 2-羟基-1-(1H-吡啶-3-基)乙酮。

化合物 3 白色固体(甲醇); 分子式为 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$; ESI-MS m/z : 161 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; ^1H NMR (DMSO , 400 MHz) δ : 7.77 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.70 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5); ^{13}C NMR (DMSO , 100 MHz) δ : 122.3 (C-1), 132.5 (C-2, 6), 115.6 (C-3, 5), 151.9 (C-4), 169.0 (C-7)。以上

数据与文献报道^[7]基本一致,确定化合物**3**为4-羟基苯甲酸。

化合物4 棕色油状(甲醇);分子式为 $C_7H_{10}N_2O$;ESI-MS m/z : 161 $[M + Na]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 2.33 (3H, s, H-8), 3.86 (3H, s, H-7), 6.37 (1H, d, $J = 5.7$ Hz, H-5), 7.63 (1H, d, $J = 5.7$ Hz, H-6); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 153.3 (C-2), 141.5 (C-3), 137.6 (C-4), 120.1 (C-5), 137.9 (C-6), 60.0 (C-7), 14.6 (C-8)。以上数据与文献报道^[8]基本一致,确定化合物**4**为2-氨基-3-甲氧基-4-甲基吡啶。

化合物5 黄色固体(氯仿);分子式为 $C_{22}H_{19}NO_4S$;ESI-MS m/z : 416 $[M + Na]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7.66 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2,6), 7.06 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3,5), 3.85 (3H, s, H-7), 3.83 (3H, s, H-7'), 3.87 (3H, s, H-7'') 7.63 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'',6''), 7.09 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'',5''), 8.76 (1H, s, H-1'''); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 126.2 (C-1), 131.8 (C-2,6), 113.5 (C-3,5), 159.1 (C-4), 55.3 (C-7), 126.7 (C-1'), 144.4 (C-2'), 144.8 (C-3'), 119.3 (C-4'), 132.0 (C-5'), 145.3 (C-6'), 60.4 (C-7'), 129.0 (C-1''), 130.2 (C-2'',6''), 113.9 (C-3'',5''), 159.6 (C-4''), 55.2 (C-7''), 131.6 (C-1''')。以上波谱数据与文献报道^[4]一致,确定化合物**5**为4,7-双(4-甲氧基苯基)-6-羟基-5-甲氧基苯并噻唑。

化合物6 白色固体(甲醇);分子式为 $C_7H_{14}N_2O$;ESI-MS m/z : 165 $[M + Na]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 2.61 (3H, s, H-2), 3.07-2.91 (2H, m, H-2',6'), 2.85 (2H, m, H-3',5'), 3.73 (3H, s, H-7'); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 171.7 (C-1), 26.7 (C-2), 38.7 (C-2',6'), 52.2 (C-3',5'), 48.8 (C-7')。以上数据与文献报道^[9]基本一致,确定化合物**6**为1-(4-甲基哌嗪-1-基)乙酮。

化合物7 白色针晶(甲醇);分子式为 $C_{10}H_{16}N_2O_2$;ESI-MS m/z : 219 $[M + Na]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 3.57 (2H, m, H-3), 2.36 (2H, m, H-4), 2.53 (1H, m, H-5), 4.08 (1H, brs, H-6), 4.25 (1H, dd, $J = 6.9, 8.3$ Hz, H-9), 2.36 (2H, m, H-10), 1.14 (3H, d, $J = 7.3$ Hz, H-11), 0.97 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-12); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 165.3 (C-1), 45.6 (C-3), 21.9 (C-4), 33.1 (C-5), 58.3 (C-6), 169.5 (C-7), 63.5

(C-9), 29.4 (C-10), 19.0 (C-11), 17.5 (C-12)。以上数据与文献报道^[10]基本一致,确定化合物**7**为(3*R*,8*aS*)-3-异丙基-六氢吡咯并[1,2-*a*]吡嗪-1,4-二酮。

化合物8 白色固体(甲醇);分子式为 $C_{10}H_{13}NO_2$;ESI-MS m/z : 202 $[M + Na]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 2.25 (3H, s, H-1), 7.20 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-3'), 7.13 (1H, m, H-4'), 7.19 (1H, m, H-5'), 7.00 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 2.74 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-7'), 2.78 (2H, m, H-8'); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 23.3 (C-1), 170.5 (C-2), 148.8 (C-1'), 130.2 (C-2'), 129.7 (C-3'), 122.2 (C-4'), 128.3 (C-5'), 122.0 (C-6'), 34.6 (C-7'), 40.9 (C-8')。以上数据与文献报道^[11]一致,确定化合物**8**为2-(2-氨基乙基)乙酸苯酯。

化合物9 白色固体(甲醇);分子式为 $C_{10}H_{13}NO_2$;ESI-MS m/z : 202 $[M + Na]^+$; 1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 1.77 (3H, s, H-1), 3.16 (2H, m, H-1'), 2.55 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 6.97 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-2'',6''), 6.66 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-3'',5''); ^{13}C NMR (DMSO, 100 MHz) δ : 22.6 (C-1), 169.1 (C-2), 40.6 (C-1'), 34.4 (C-2'), 129.5 (C-1''), 129.5 (C-2'',6''), 115.1 (C-3'',5''), 155.6 (C-4'')。以上数据与文献报道^[12]基本一致,确定化合物**9**为N-乙酰基酪胺。

化合物10 白色针晶(甲醇);分子式为 $C_{22}H_{22}O_5$;ESI-MS m/z : 389 $[M + Na]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 4.87 (1H, br s, 6'-OH), 7.36 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2,6), 7.06 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3,5), 3.88 (3H, s, H-7), 6.75 (1H, s, H-5'), 3.67 (3H, s, H-7'), 3.59 (3H, s, H-8'), 7.53 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'',6''), 6.97 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'',5''), 3.87 (3H, s, H-7''); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 124.2 (C-1), 131.5 (C-2,6), 114.7 (C-3,5), 159.4 (C-4), 55.3 (C-7), 121.4 (C-1'), 151.4 (C-2'), 144.2 (C-3'), 135.4 (C-4'), 111.4 (C-5'), 149.1 (C-6'), 60.9 (C-7'), 60.8 (C-8'), 130.2 (C-1''), 130.2 (C-2'',6''), 113.6 (C-3'',5''), 158.9 (C-4''), 55.2 (C-7'')。以上数据与文献报道^[4]基本一致,从而确定化合物**10**为6'-羟基-4,2',3',4''-四甲氧基-对三联苯。

3 讨论

本文对菌株 YIM90087 采用液体发酵方式培养

得到的发酵液化学成分进行了研究,从中分离鉴定了 10 个化合物,与本研究组前期采用固体发酵形式对菌株 YIM90087 次级代谢产物的研究结果进行比较分析,发现固体发酵的代谢产物结构类型主要为环肽类化合物,而液体发酵的代谢产物结构类型多样,化学多样性更加丰富,表明对同一菌株采用不同的发酵方式会引发不同的代谢途径,因此不同发酵方式下菌株的代谢产物结构类型差异较大,但同时也分离得到了 2 个相同的化合物(化合物 7 和 10),表明这些化合物可作为该菌株的化学分类的特征化合物。

参考文献

- 1 Meyer J. *Nocardiopsis*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int JSystBacteriol*, 1976, 26:487-493.
- 2 Li WJ (李文均), Kroppenstedt RM, Wang D (王栋), et al. Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *Int J Sys Evol Microbiol*, 2006, 56: 1089-1096.
- 3 Pan Y (潘芸). Studies on secondary metabolites of one *Nocardiopsis actinomycete*. Kunming: Yunnan University, MSc. 2015.
- 4 Tian SZ, Pu X, Luo G, et al. Isolation and characterization of new *p*-Terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087. *J Agric Food Chem*, 2013, 61:3006-3012.
- 5 Wang YS, Huang R, Yang JH. Chemical constituents of *Litsea szemaiois*. *Chem Nat Compd*, 2011, 47:122-123.
- 6 Irlinger B, Bartsch A, Kraemer HJ, et al. New tryptophan metabolites from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. *Helv Chim Acta*, 2005, 88:1472-1485.
- 7 Matsui T, Kudo A, Tokuda S, et al. Identification of a new natural vasorelaxant compound, (+)-osbeckic acid, from rutin-free tartary buckwheat extract. *J Agric Food Chem*, 2010, 58:10876-10879.
- 8 Nakayama K, Ohtsuka M, Kawato H, et al. Preparation of pyridopyrimidine derivatives as inhibitors of drug efflux pump of microorganisms. *PCTInt Appl* (2002), WO 2002087589 A1 Nov 07, 2002.
- 9 Rozengart EV, Basova NE. Ammonium compounds with localized and delocalized charge as reversible inhibitors of cholinesterases of different origin. *Evol Biochem Physiol*, 2001, 37: 604-610.
- 10 Tang LD (唐丽丹), Liang YW (梁远维), Liao XJ (廖小建), et al. Study on the secondary metabolites from the marine sponge *Phakellia fusca* Fungi PF18. *J Chin Med Mater* (中药材), 2011, 34:1877-1879.
- 11 Il'yuchenok IY, Stolyarchuk AA, Shadurskii KS, et al. Radioprotective and pharmacological properties of some phenylethylamine derivatives. *Farmakologiya i Toksikologiya* (Moscow), 1976, 39:600-607.
- 12 Garcez WS, Martins D, Garcez FR, et al. Effect of spores of saprophytic fungi on phytoalexin accumulation in seeds of frog-eye leaf spot and stem canker-resistant and susceptible soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *J Agric Food Chem*, 2000, 48:3662-3665.