

芽孢杆菌 HZ16 发酵产物中的环二肽类化学成分

王宏鹏*, 楼 坚, 陈丽春, 李 音, 班兆军, 黄 俊

浙江科技学院生物与化学工程学院; 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室; 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 杭州 310023

摘要: 利用多种色谱分离技术手段对采自空气的芽孢杆菌 HZ16 的发酵液成分进行研究, 从中分离得到 8 个环肽类化合物, 经波谱分别鉴定为 Cordycydeptide A (**1**)、(2E/Z, 5Z)-2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-5-(2-methylpropylidene)-3,6-piperazinedione (**2**)、Cyclo(Tyr-Pro) (**3**)、Cyclo(Pro-Val) (**4**)、Cyclo(Thr-Leu) (**5**)、Cyclo(Pro-Thr) (**6**)、Cyclo(Dehydroala-Leu) (**7**) 和 Cyclo(4-OH-Pro-Leu) (**8**)。这 8 个化合物均为首次报道由芽孢杆菌中获得, 同时发现其中的化合物 **1**、**2**、**3** 和 **8** 具有显著的杀死卤虫幼虫的细胞毒活性, 它们的 4 h 卤虫致死率分别为 96.3%、89.2%、96.8% 和 99.5%。

关键词: 芽孢杆菌; 环二肽; 细胞毒活性

中图分类号: Q501; Q503

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.010

Cyclodipeptides from *Bacillus* sp. HZ16

WANG Hong-peng*, LOU Jian, CHEN Li-chun, LI Yin, BAN Zhao-jun, HUANG Jun

Zhejiang University of Science and Technology; Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemistry and

Biology Processing Technology of Farm Products; Zhejiang Province Collaborative Innovation Center of Agricultural

Biological Resources Biochemical Manufacturing, Hangzhou 310023, China

Abstract: To study the chemical constituents from *Bacillus* HZ16. The compounds were isolated and purified by means of chromatographic techniques and their structures were identified on the basis of spectral features. 8 cyclic dipeptides, named Cordycydeptide A (**1**), (2E/Z, 5Z)-2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-5-(2-methylpropylidene)-3,6-piperazinedione (**2**), Cyclo(Tyr-Pro) (**3**), Cyclo(Pro-Val) (**4**), Cyclo(Thr-Leu) (**5**), Cyclo(Pro-Thr) (**6**), Cyclo(Dehydroala-Leu) (**7**) and Cyclo(4-OH-Pro-Leu) (**8**), were isolated from the organic extract of fermentation broths of *Bacillus* HZ16. These 8 compounds were isolated from *Bacillus* sp. for the first time and compounds **1**, **2**, **3** and **8** showed significant cytotoxic activity against the brine shrimp larvae, the mortality rate in 4 h were 96.3%, 89.2%, 96.8% and 99.5%, respectively.

Key words: *Bacillus*; cyclodipeptide; cytotoxicity

环二肽类化合物在自然界广泛存在, 又称为 2, 5-二酮哌嗪 (2, 5-diketopiperazines), 2, 5-二氧哌嗪 (2, 5-dioxopiperazines), 由两个氨基酸通过肽键相互连接形成相对稳定的六元环结构, 由于氨基酸构型以及形成六元环的构象不同, 导致环二肽的结构的多样性^[1]。环二肽普遍存在于蛋白及多肽水解物以及动植物、酵母、原生生物、真菌、海洋生物中^[2], 是天然产物化学中经常被分离得到的物质之一, 其具有胞间信息传递、抑制毒素、促癌细胞凋亡和镇痛

等多种生物活性^[3]。本文报道由芽孢杆菌 HZ16 中分离纯化获得的环二肽类物质。芽孢杆菌是自然界中普遍存在的革兰氏阳性菌, 在工业、畜牧业和环境治理等领域均有广阔的应用前景, 是重要的兼性营养菌^[4]。该属菌株通常会产针对革兰氏阳性以及阴性菌的广谱抗生素^[5]。

前期从空气样本采集并分离纯化获得一株单一菌落, 通过对菌株进行 16S rDNA 扩增并进行测定, 将得到的序列在 RDP11 数据库中用 SeqMatch 程序进行同源性检索, 所得到的 1374bp 序列与 *Bacillus aerophilus*、*Bacillus stratosphericus* 和 *Bacillus altitudinis* 匹配度达到 100%, *Bacillus pumilus* 和 *Bacillus safensis* 达 97%, 确定其为芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属, 命

收稿日期: 2016-12-12 接受日期: 2017-03-02

基金项目: 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心开放基金项目 (2016KF0025, 2016KF0003, 2016KF0007); 浙江省科技计划项目 (2016C37078)

* 通信作者 Tel: 86-571-85070380; E-mail: wanghongpeng@hotmail.com

名为 HZ16。本文对该芽孢杆菌的发酵产物的化学成分进行了研究,从该菌的发酵产物中分离得到 8 个环二肽化合物,分别鉴定为 Cordyceptide A (**1**)、(2E/Z,5Z)-2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-5-(2-methylpropylidene)-3,6-piperazinedione (**2**)、Cyclo(Tyr-Pro) (**3**)、Cyclo(Pro-Val) (**4**)、Cyclo(Thr-Leu) (**5**)、Cyclo(Pro-Thr) (**6**)、Cyclo(Dehydroala-Leu) (**7**) 和 Cyclo(4-OH-Pro-Leu) (**8**)。快速高效的卤虫致死实验^[6]表明,化合物 **1**、**2**、**3** 和 **8** 具有显著的杀死卤虫幼虫的细胞毒活性,其 4 h 致死率分别为 96.3%、89.2%、96.8% 和 99.5%。

1 仪器与材料

核磁用 Bruker AMX 300(300.135 MHz)、Varian Inova 500(499.8 MHz) 型核磁共振仪测定;质谱用 EI-MS(70 eV)用 Finnigan MAT 95;ESI-MS 用 Finnigan LCQ 检测器质谱仪测定;高分辨质谱(HR-ESI-MS)用 Apex IV 7 Tesla 傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)。制备 HPLC 用岛津 LC-20 液相 ODS-2 MAG 柱。柱色谱用硅胶(300~400 目)和薄层色谱用硅胶 G 均由青岛海洋化工厂生产。反相用材料 RP-18 为 Merck 公司产品。大孔吸附树脂为罗门哈斯 XAD-16 大孔吸附树脂。显色为 254 nm、365 nm 荧光,浸泡大茴香醛显色剂(85:14:1:1, 甲醇:醋酸:硫酸:大茴香醛)后加热显色。旋转蒸发器:EYELA N-1100;上海亚荣 RE5220。薄层色谱板:浙江台州路桥四甲生化塑料厂 GF254 层析硅胶铝基薄板;烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂 20×20 cm 薄成制备板。试剂均为分析纯。

2 液体发酵

发酵使用 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 1000 mL 水, pH6.0)。在 1 L 的三角瓶中加入 200 mL 液体培养基,灭菌。无菌条件下取 8~10 mm² 大小的菌苔 2~3 块接入液体培养基中,先在 28℃ 的摇床上静置培养 1 d, 然后 120 rpm 旋转震荡培养 1 d, 共发酵 50 L, 经过过滤后分别获得菌丝体和发酵液。

3 提取分离

将发酵产物过滤后分别得到发酵液和菌丝体,滤液用大孔吸附树脂吸附后洗脱富集得到粗提物,

滤饼用乙酸乙酯超声萃取获得粗提物,经过 TLC 对照,二者成分基本相同,故将它们合并起来加工。将合并后的 8.8 g 浸膏用等质量硅胶拌样后进行柱层析分离,用二氯甲烷:甲醇(10:0→0:10)梯度洗脱,通过薄层层析检测合并相同的部分,获得四个组分(Fr. 1-Fr. 4)。所得组分经过反复的硅胶柱层析、RP-18、制备薄层、Sephadex LH-20 进行分离纯化。其中化合物 **3**、**4** 从 Fr. 1 的组分中经正相硅胶柱层析分离得到,化合物 **1**、**2**、**5** 从 Fr. 2 的组分中经凝胶色谱和反相色谱分离得到,化合物 **8** 从 Fr. 3 的组分中利用制备薄层色谱分离得到,化合物 **6**、**7** 从 Fr. 4 的组分中通过凝胶色谱和结晶分离得到。

4 结构鉴定

化合物 **1** 白色固体;¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ: 7.98 (s, 1H, NH-4), 7.68 (s, 1H, NH-1), 7.40 (br s, 1H, NHa-13), 6.91 (br s, 1H, NHb-13), 4.20 (m, 1H, CH-3), 3.77 (m, 1H, CH-6), 2.69 (dd, *J* = 15.58 Hz, 4.58 Hz, 1H, CHb-11), 2.31 (dd, *J* = 15.73 Hz, 8.09 Hz, 1H, CHa-11), 1.86 (m, 1H, H-7), 1.42 (m, 1H, Hb-8), 1.20 (m, 1H, Ha-8), 0.92 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃-10), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃-9);¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ: 171.3 (C-12), 167.6 (C-2), 166.8 (C-5), 58.6 (C-6), 51.0 (C-3), 38.6 (C-11), 37.7 (C-7), 24.2 (C-8), 14.9 (C-10), 11.8 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为 Cordyceptide A。

化合物 **2** 白色固体;¹H NMR (Pyridine-*d*₅, 600 MHz) δ: 11.07 (br s, 1H, NH-1), 10.83 (br s, 1H, NH-4), 7.62 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH-13, 17), 7.32 (s, 1H, CH-11), 6.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH-14, 16), 6.30 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, CH-7), 3.66 (s, 3H, OCH₃-18), 3.20 (m, 1H, CH-8), 1.08 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, CH₃-9, 10);¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 159.9 (C-15), 159.7 (C-3, 6), 132.9 (C-2), 131.1 (C-13, 17), 126.9 (C-5), 126.8 (C-12), 125.2 (C-7), 115.1 (C-11), 114.9 (C-14, 16), 55.3 (C-18), 25.6 (C-8), 22.4 (C-9, 10); HR-ESI-MS: *m/z* 287.1393 [M + H]⁺ (calcd. 287.1390 for C₁₆H₁₉N₂O₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为 (2E/Z,5Z)-2-[(4-Methoxyphenyl)methylene]-5-(2-methylpropylidene)-3,6-piperazinedione。

化合物 3 白色固体; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 9.12 (s, 1H, 4'-OH), 7.77 (s, 1H, 4-NH), 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, CH-2', 6'), 6.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, CH-3', 5'), 4.24 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, CH-6), 4.04 (m, 1H, CH-3), 3.40 (m, 1H, CH₂-9a), 3.20 (m, 1H, CH₂-9b), 2.91 (2H, CH₂-10), 2.00 (m, 1H, CH₂-7a), 1.72 (m, 2H, CH₂-8), 1.42 (m, 1H, CH₂-7b); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 168.8 (C-5), 165.0 (C-2), 155.8 (C-4'), 130.7 (C-2', 6'), 127.0 (C-1'), 114.7 (C-3', 5'), 58.35 (C-6), 55.9 (C-3), 44.5 (C-9), 34.7 (C-10), 27.7 (C-7), 21.8 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为 Cyclo(Tyr-Pro)。

化合物 4 白色固体; ^1H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 6.30 (brs, 1H, NH-4), 4.04 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H, CH-6), 3.90 (brs, 1H, CH-3), 3.58 (m, 2H, CH₂-9), 2.60 (m, 1H, H-10), 2.30-1.80 (m, 4H, H-7, 8), 1.04 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃-11), 0.88 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃-12); ^{13}C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 170.2 (C-5), 164.9 (C-2), 60.3 (C-3), 58.7 (C-6), 45.0 (C-9), 28.4 (C-7), 28.3 (C-10), 22.2 (C-8), 18.9 (C-11), 13.9 (C-12)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为 Cyclo(Pro-Val)。

化合物 5 白色固体; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 8.11 (s, 1H, NH-1), 7.91 (s, 1H, NH-4), 4.93 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, OH-7a), 3.97 (m, 1H, CH-6), 3.63 (m, 1H, CH-3), 3.49 (m, 1H, CH-7), 1.81 (m, 1H, CH-10), 1.68-1.60 (m, 2H, CH₂-9), 1.08 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃-8), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃-11), 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃-12); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 168.5 (C-2), 166.6 (C-5), 66.6 (C-6), 60.4 (C-7), 52.6 (C-3), 44.9 (C-9), 23.2 (C-10), 23.0 (C-11), 21.4 (C-12), 20.0 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为 Cyclo(Thr-Leu)。

化合物 6 白色固体; ^1H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 7.33 (br s, 1H, NH-4), 4.25 (m, 1H, CH-6), 4.00 (m, 1H, CH-3), 3.65 (br s, 1H, OH-10), 3.46 (m, 3H, CH₂-9, CH-10), 2.40-1.60 (m, 4H, CH₂-7, CH₂-8), 1.25 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH₃-11); ^{13}C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 170.1 (C-5), 165.2 (C-2), 65.3 (C-10), 59.3 (C-3), 58.7 (C-6), 45.0 (C-9), 27.8 (C-7), 22.3 (C-8), 19.0 (C-

11)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **6** 为 Cyclo(Pro-Thr)。

化合物 7 白色固体; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.44 (br s, 1H, NH-1), 8.39 (brs, 1H, NH-4), 5.17 (s, 1H, CH₂-11a), 4.77 (s, 1H, CH₂-11b), 3.96 (m, 1H, CH-6), 1.80 (m, 1H, CH-8), 1.57 (m, 2H, CH₂-7), 0.86 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, CH₃-9, 10); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 166.4 (C-5), 158.2 (C-2), 134.6 (C-3), 98.8 (C-11), 53.7 (C-6), 43.5 (C-7), 23.3 (C-8), 22.6 (C-9), 22.1 (C-10)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **7** 为 Cyclo(Dehydroala-Leu)。

化合物 8 白色固体; ^1H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ : 4.20 (m, 1H, CH-8), 4.03 (m, 1H, CH-6), 3.51 (m, 3H, CH-3, CH₂-9), 2.49-2.15 (m, 2H, CH₂-7), 1.94 (m, 3H, CH-11, CH₂-10), 0.92 (m, 6H, CH₃-12, 13); HR-ESI-MS: m/z 249.12096 [M + Na]⁺ (calcd. 249.12111 for C₁₁H₁₈N₂O₃Na)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **8** 为 Cyclo(4-OH-Pro-Leu)。

5 卤虫致死活性筛选

卤虫致死活性是目前科学家们最为信赖的细胞毒活性测试方法之一^[14]。配制质量百分比为 2% 的 NaCl 溶液, 用 1% 的 NaHCO₃ 溶液调节 pH 值 7.8, 获得培养液。在培养液中加入 1 g 丰年虾休眠卵, 通入空气并光照, 24 h 后得到孵化的丰年虾幼体。将 200 μL 的培养液加入到 24 孔板的孔中, 每个孔中放入人工孵化的游动的丰年虾 (*Artemia salina*) 幼体 25 ~ 30 个。将化合物 **1** ~ **8** 分别用 DMSO 溶解, 稀释到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加入到每个培养孔中, 对照只加 DMSO, 此外, 以化合物放线菌素 D (Actinomycin D) 作为阳性对照, 每一处理重复三次。在室温下培养 4 h 后, 在显微镜下计算每个槽中死亡的海虾个数, 最后用计算致死率, 详细实验步骤参见文献^[6]。由卤虫致死实验得知, 化合物 **1**、**2**、**3** 和 **8** 具有显著的杀死卤虫幼虫的细胞毒活性, 其 4 h 致死率分别为 96.3%、89.2%、96.8% 和 99.5%。

表 1 化合物 **1** ~ **8** 的细胞毒活性

Table 1 Toxicity of compounds **1-8** with mortality rates (%)

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	Actinomycin D
Mortality	96.3	89.2	96.8	24.6	63.6	51.3	41.5	99.5	100

参考文献

- Campbell J, Lin Q, Geske GD, *et al.* New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type *Quorum Sensing* by Cyclic Dipeptides. *ACS Chem Biol*, 2011, 4:1051-1059.
- Brauns SC, Milne P, Naudé R, *et al.* Selected cyclic dipeptides inhibit cancer cell growth and induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Anticancer Res*, 2004, 24:1713-1719.
- Lu X (卢曦元), Xu DC (徐德昌). Review on researching development of cyclic dipeptid bioactivity. *China J Bioinform (生物信息学)*, 2011, 9:289-291.
- Li XF (李雪峰), Wang L (王利). Sequence analysis of 16S rDNA gene of *Bacillus pumilus*. *J Southwest Univ Nat, Nat Sci (西南民族大学学报: 自科版)*, 2015, 41:291-294.
- Starostin KV, Demidov EA, Bryanskaya AV, *et al.* Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Scientific Reports*, 2015, 5:1-9.
- Wang HP (王宏鹏), Xie ZP (谢泽平), Kuang Y (况焱), *et al.* Nitrogen containing chemical constituents from the marine *Streptomyces* sp. B170167 and their cytotoxic activity. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2016, 28:1557-1561.
- Jia JM, Ma XC, Wu CF, *et al.* Cordycedipeptide A, a new cyclodipeptide from the culture liquid of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. *ChemInform*, 2005, 53:582-583.
- Schneemann I, Ohlendorf B, Zinecker H, *et al.* Nocapyrones A-D, γ -Pyrone from a *Nocardiopsis* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. *J Nat Prod*, 2010, 73:1444-1447.
- Jayatilake GS, Thornton MP, Leonard AC, *et al.* Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nat Prod*, 1996, 59:293-296.
- Furtado NAJC, Pupo MT, Carvalho I, *et al.* Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain. *J Brazil Chem Soc*, 2005, 16:1448-1453.
- Tan N, Wang S, Yang Y, *et al.* Cyclodipeptides of *Panax notoginseng* and Lactams of *Panas ginseng*. *Acta Botan Yunnan*, 2003, 25:366-368.
- Liu C, Yang XQ, Ding ZT, *et al.* Cyclodipeptides from the secondary metabolites of two novel *Actinomycetes*. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(1):78-80.
- Maskey RP, Asolkar RN, Kapaun E, *et al.* Phytotoxic arylethylamides from limnic bacteria using a screening with microalgae. *J Antibiotics*, 2002, 55:643-649.
- Huang XJ (黄筱娟), Chen WH (陈文豪), Ji MH (纪明慧), *et al.* Chemical constituents from leaves of *Ananas comosus* and their biological activities. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2015, 46:949-954.
- Sundaresan NR, Pillai VB, Gupta MP. Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51:614-618.
- Kim DH, Jung YJ, Lee JE, *et al.* SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301:F427-F435.
- Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787:414-420.
- Marchenko ND, Wolff S, Erster S, *et al.* Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J*, 2007, 26:923-934.
- Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, *et al.* p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 2012, 149:1536-1548.

(上接第 835 页)