

柳珊瑚共生菌 *Bacillus methylotrophicus* 发酵液化学成分研究*

Study on Chemical Constituents from Marine Gorgonian-associated Bacterium *Bacillus methylotrophicus*

龙彬^{1,2}, 高程海^{1**}, 胡丽琴^{1,2}, 潘丽霞¹, 林琳^{1,2}, 余炼^{1,2}, 文良娟²

LONG Bin^{1,2}, GAO Cheng-hai¹, HU Li-qin^{1,2}, PAN Li-xia¹, LIN Lin^{1,2}, YU Lian^{1,2}, WEN Liang-juan²

(1. 广西科学院 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】研究柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 共生细菌 *Bacillus methylotrophicus* 发酵液中的化学成分。【方法】采用多种柱色谱和高效液相色谱分离技术, 对柳珊瑚 *A. caerulea* 共生菌 *B. methylotrophicus* 发酵液中化学成分进行研究, 运用理化和波谱分析方法鉴定其化学结构。【结果】从共生细菌 *B. Methylotrophicus* 发酵液中分离了6个化合物, 分别鉴定为环(脯-甘)二肽(1)、环(S-脯-R-亮)二肽(2)、胸苷(3)、尿苷(4)、原儿茶酸(5)、3-Furancarboxylic acid-5-(hydroxmenthy)-Furan (6)。【结论】化合物1~6均是首次从该种细菌中分离得到, 丰富了柳珊瑚共生菌 *B. methylotrophicus* 的化学多样性。

关键词: 柳珊瑚 海洋细菌 化合物 结构鉴定

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2014)01-0089-04

Abstract:【Objective】To investigate the chemical constituents of the fermentation liquid from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus methylotrophicus*. 【Method】The compounds were isolated and purified by column chromatography on silica gel and their structures were identified by spectral analyses and comparison with literatures. 【Result】Six compounds were obtained from the fermentation liquid of *B. methylotrophicus* and characterized as Cyolo-(Pro-Gly) (1), Cyolo-(S-pro-R-leu) (2), Thymidine (3), Uridine (4), Protocatechuic acid (5), 3-Furancarboxylic acid-5-(hydroxmenthy)-Furan (6). 【Conclusion】Compounds 1~6 were isolated from *B. methylotrophicus* for the first time, which enriches the chemical diversity of marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus methylotrophicus*.

Key words: gorgonian, marine bacteria, compounds, chemical identification

收稿日期: 2013-11-01

修回日期: 2013-12-09

作者简介: 龙彬(1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋生物资源与开发研究。

* 国家自然科学基金项目(81260480), 广西自然科学基金项目(2011GXNSFB018035, 2011GXNSFE018002, 2012GXNSFAA-053160, 2012GXNSFEA053001)资助。

** 通信作者: 高程海(1979-), 男, 副研究员, 主要从事海洋天然产物研究。

【研究意义】海洋微生物主要是指生活在海水、海泥及与海洋动植物共附生的微生物总称^[1]。近年来, 以海洋腔肠动物、海洋鱼类和海洋软体动物为宿主的共生微生物受到了一定程度的关注。海洋共生微生物可以提高宿主在海洋中的环境适应性和生存能力,

产生抑制宿主竞争对手或捕食者的次生物质,故它们产生生物活性物质的几率一般要高于非共生海洋微生物和陆地微生物^[2~5]。【前人研究进展】柳珊瑚属于腔肠动物,其共生微生物多为真菌、细菌以及放线菌。方燕等报道了从广西柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 分离获得 6 株活性菌株^[6]。高程海等从其中一株活性共生菌 *Bacillus subtilis* 中分离获得了 7 个环二肽类化合物,部分化合物具有抑菌和抗污损活性^[7]。【本研究切入点】选择柳珊瑚 *A. caerulea* 另外一株活性共生菌 *B. methylotrophicus* 为研究对象,进行系统的化学调查。【拟解决的关键问题】采用色谱分离技术和波谱分析方法,对共生菌 *B. methylotrophicus* 发酵液中化学成分进行分离鉴定,加快北部湾海洋微生物次生代谢产物研究进展。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

XT5 显微熔点测定仪(上海光学仪器厂), Brucker Avance 600 型核磁共振波谱仪(德国 BRUKER 公司), Waters 1296 半制备型高效液相色谱仪(二极管阵列检测器, 10mm × 250mm, 5μm, Phenomenex)(美国 WATERS 公司), N-1100V-W 旋转蒸发仪(日本东京理化株式会社), QP5050A EI 质谱仪(日本 SHIMADZU 公司), LCQDECAXP ESI 质谱仪(美国 FINNIGAN 公司), 柱层析硅胶(青岛海洋化工有限公司生产), Sephadex LH-20(美国 GE Healthcare 公司)。高效液相色谱用试剂为色谱纯,其他所用试剂均为分析纯。

1.2 生物材料

菌株 *B. methylotrophicus* 从广西北海市斜阳岛海域采集的花刺柳珊瑚 *A. caerulea* 中分离得到。现保存于广西科学院广西北部湾海洋研究中心(菌株编号: 2011-GAS-00079)。

发酵培养基: 玉米粉 20g/L, 蛋白胨 2g/L, 葡萄糖 20g/L, 可溶性淀粉 5g/L, 酵母膏 2g/L, 氯化钠 4g/L, 磷酸氢钾 0.5g/L, 七水合硫酸镁 0.5g/L, 碳酸钙 2g/L。

1.3 共生菌株发酵培养

共生菌 *B. methylotrophicus* 采用摇床培养, 在 28℃、140r/min 条件下培养 7d。共获得约 90L 发酵液。

1.4 化合物 1~6 的分离和纯化

发酵液用等体积乙酸乙酯萃取, 萃取液经真空减压浓缩、通风干燥, 得到萃取物 70.17g。

对乙酸乙酯萃取物经硅胶柱色谱纯化, 依次采用

氯仿-丙酮系统(10:0, 10:2, 10:4, 10:8, V:V) 和氯仿-甲醇系统(10:1, 10:2, 10:3, V:V) 梯度洗脱后, 再进一步结合 Sephadex LH-20 凝胶色谱和反相半制备高效液相色谱等方法进行进一步分离纯化。

1.5 化合物 1~6 的结构鉴定

运用 ¹H NMR、¹³C NMR 与文献报道对比方法, 对获得的单体化合物 1~6 进行结构鉴定。

2 结果

2.1 化合物的分离纯化

乙酸乙酯萃取物采用硅胶柱层析, 得到 7 个部位(A-G)。部位 C 经过半制备高效液相色谱(甲醇:水=25:75)分离得到化合物 4(13.2 mg); 部位 F 经过半制备高效液相色谱(甲醇:水=10:90)分离得到化合物 3(1.4 mg), 经过半制备高效液相色谱(甲醇:水=30:70)分离得到化合物 1(1.4 mg) 和 2(2.5 mg); 部位 G 经过半制备高效液相色谱(甲醇:水=5:95), 分离得到化合物 5(4.0 mg) 和 6(12.7 mg), 各化合物的结构如图 1 所示。

2.2 化合物结构鉴定

化合物 1: 白色粉末; EI-MS m/z 155 [M]⁺; ¹H NMR(600 MHz, MeOH) δ_H : 4.23(H, s, H-2), 4.11(H, d, $J=1.2$ Hz, H-2'), 3.53(2H, dd, $J=2.4, 5.4$ Hz, H-5), 2.32(H, d, $J=5.4$ Hz, H-3), 2.01(3H, m, $J=1.8$ Hz, H-4); ¹³C NMR(150 MHz, MeOH) δ_C : 171.0(C-1), 166.4(C-1'), 59.8(C-2), 46.9(C-5), 46.3(C-2'), 29.3(C-3), 23.2(C-4)。以上数据与文献[8]报道的数值基本一致, 故鉴定化合物 1 为环(脯-甘)二肽。

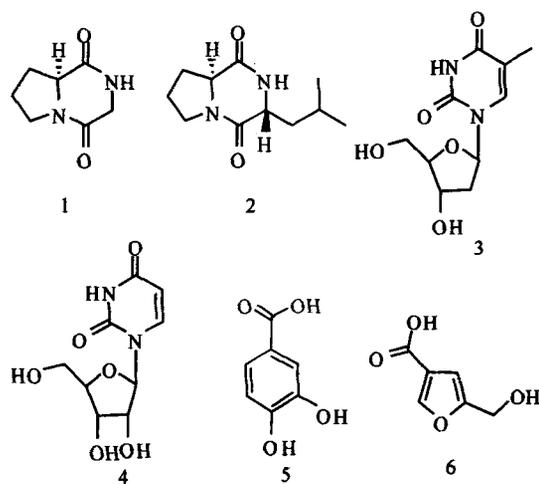


图 1 化合物 1~6 的结构

Fig. 1 Structures of Compounds 1~6

化合物 2: 淡黄色粉末; ESI-MS m/z 211.7 [M+]

Guangxi Sciences, Vol. 21 No. 1, February 2014

H]⁺; ¹H NMR (600MHz, MeOH) δ_H : 4.26(H, d, $J=7.2$ Hz, H-2), 4.13(H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 3.51(2H, m, H-5), 2.30(H, m, H-3), 2.01(2H, m, H-4), 1.89(H, m, H-7), 1.52(H, m, H-8), 0.96(6H, m, 9-CH₃), 0.96(6H, m, 10-CH₃); ¹³C NMR(150MHz, MeOH) δ_C : 172.8(C-1'), 168.9(C-1), 60.2(C-2), 54.6(C-2'), 46.4(C-5), 39.3(C-7), 29.0(C-3), 25.7(C-4), 23.6(C-8), 23.3(9-CH₃), 22.2(10-CH₃)。以上数据与文献[9]报道的数值基本一致,故鉴定化合物2为环(S-脯-R-亮)二肽。

化合物3:黄绿色粉末;EI-MS m/z 242 [M]⁺; mp:130~131℃; ¹H NMR (600MHz, MeOH) δ_H : 11.27(1H, s, NH), 7.82(H, d, $J=1.2$ Hz, H-1), 6.28(H, d, $J=6.6$ Hz, H-2), 1.88(3H, d, $J=1.2$ Hz, 13-CH₃), 4.60(1H, s, H-1'), 2.50(2H, s, H-2'), 3.73(H, m, H-3'), 4.39(H, d, $J=3.0$ Hz, H-4'), 3.78(H, d, $J=3.6$ Hz, H-5'); ¹³C NMR(150MHz, MeOH) δ_C : 138.1(C-1), 111.5(C-2), 166.4(C-3), 152.3(C-4), 12.4(13-CH₃), 86.2(C-1'), 41.1(C-2'), 72.2(C-3'), 88.8(C-4'), 62.8(C-5')。以上数据与文献[10]报道的数值基本一致,故鉴定化合物3为胸苷。

化合物4:桔红色粉末;EI-MS m/z 244 [M]⁺; ¹H NMR (600 MHz, MeOH) δ_H : 8.00(H, d, $J=7.8$ Hz, H-3), 5.90(H, d, $J=4.2$ Hz, H-5), 5.70(H, s, H-4), 4.17(2H, d, $J=4.2$ Hz, H-8), 4.15(2H, d, $J=3.6$ Hz, H-7), 4.00(2H, s, H-6), 3.79(2H, m, H-9); ¹³C NMR (150MHz, MeOH) δ_C : 166.1(C-1), 152.4(C-2), 142.7(C-4), 102.6(C-3), 90.6(C-5), 86.3(C-8), 75.7(C-6), 73.6(C-7), 62.2(C-9)。以上数据与文献[11]报道的数值基本一致,故鉴定化合物4为尿苷。

化合物5:棕黑色粉末;mp 198~200℃;EI-MS m/z 154 [M]⁺; ¹H NMR (600 MHz, MeOH) δ_H : 7.42(H, d, $J=5.4$ Hz, H-3), 6.78(H, d, $J=7.8$ Hz, H-6), 7.40(H, s, H-7); ¹³C NMR (150 MHz, MeOH) δ_C : 170.8(C-1), 123.7(C-2), 117.7(C-3), 145.9(C-4), 151.2(C-5), 115.6(C-6), 123.7(C-7)。以上数据与文献[12]报道的数值基本一致,故鉴定化合物5为原儿茶酸(Protocatechuic acid)。

化合物6:桔红色晶体;EI-MS m/z 143[M]⁺; ¹H NMR (600 MHz, MeOH) δ_H : 8.81(H, s, H-3), 7.12(H, s, H-5), 5.08(2H, s, H-6); ¹³C NMR

(150 MHz, MeOH) δ_C : 175.8(C-1), 169.9(C-4), 147.5(C-3), 141.1(C-2), 111.6(C-5), 61.3(C-6)。以上数据与文献[13]报道的数值基本一致,故鉴定化合物6为3-Furancarboxylic acid-5-(hydroxymethyl)-Furan。

3 结论

运用柱色谱、制备薄层层析和半制备型高效液相色谱等多种现代分离方法,对广西柳珊瑚共生菌化合物进行化学调查,获得6个单体化合物,丰富了柳珊瑚共生菌 *B. methylotrophicus* 的化学多样性。化合物2据文献报道对鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 有很强的抗菌活性^[14],因此,下一步可对其抑菌广谱性、剂效关系和作用原理进行深入研究。

参考文献:

- [1] 薛超波,王国良,金珊.海洋微生物多样性研究进展[J].海洋科学进展,2011,17(2):287-294.
Xue C B, Wang G L, Jin S. Advances in marine microbial diversity research [J]. Advances In Marine Science, 2011,17(2):287-294.
- [2] 戈惠名,谭仁祥.共生菌——新活性天然产物的重要来源[J].化学进展,2009,21(1):30-45.
Ge H M, Tan R X. Symbionts, an important source of new bioactive natural products progress in chemistry[J]. Progressing Chemistry, 2009,21(1):30-45.
- [3] Debbab A, Aly A H, Lin W H, et al. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi[J]. Microbial Biotechnology, 2010,3(5):544-563.
- [4] Rahman H, Austin B, Mitchell W J, et al. Novel anti-infective compounds from marine bacteria [J]. Marine Drugs, 2010,8:498-518.
- [5] Rate M E, Ebel R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats[J]. Natural Product Report, 2011,28:290-344.
- [6] 方燕,潘丽霞,易湘茜,等.柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 相关可培养细菌多样性及抗污活性研究[J].广西科学,2012,19(3):253-256.
Fang Y, Pan L X, Yi X Q, et al. Diversity and antifouling activity of culturable bacteria associated with the Beibu gulf gorgonian *Anthogorgia caerulea* [J]. Guangxi Sciences, 2012,19(3):253-256.
- [7] 高程海,易湘茜,方燕,等.柳珊瑚共生细菌 *Bacillus subtilis* 发酵液化学成分研究[J].广西科学,2011,18(3):222-225.
Gao C H, Yi X Q, Fang Y, et al. Study on chemical constituents from marine gorgonian associated bacterium *Bacillus subtilis* [J]. Guangxi Sciences, 2011,18(3):222-225.
- [8] 李厚金,林永成,刘晓红,等.红树林内源真菌 2524 号的肽类成分(D)[J].中山大学学报,2002,41(1):110-112.
Li H J, Lin Y C, Liu X H, et al. The Peptides from Man-

- grove Endophytic Fungus NO. 2524(D)[J]. Aata Scientiarum University Sunatseny, 2002, 41(1): 110-112.
- [9] 马菁菁. 两株海洋放线菌发酵液活性成分研究[D]. 广州: 暨南大学, 2010.
Ma J J. Study on the active constituents in fermentation broth of two strains of *marine actinomycetes* [D]. Guangzhou: Jinan University, 2010.
- [10] 曹新伟. 川贝母的化学成分研究与贝母属药用植物质量评[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.
Cao X W. Studies on the chemical constituents from the bulb *fritillariae cirrhosae* and quality assessment of *fritillaria* species [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 2008.
- [11] 刘雅静, 袁延强, 刘秀河, 等. 黑木耳化学成分的研究[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(4): 69-71.
Liu Y J, Yuan Y Q, Liu X H, et al. Study on chemical composition of *auricularia auricular* [J]. Food and Nutrition in China, 2011, 17(4): 69-71.
- [12] 高晓忠, 周长新, 张水利, 等. 毛茛科植物石龙芮的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 124-125.
Gao X Z, Zhou C X, Zhang S L, et al. Studies on the chemical constituents in herb of *Ranunculus sceleratus* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(2): 124-125.
- [13] Evidente A, Cristinzio G, Punzo B, et al. Flufuran, an antifungal 3,5-disubstituted furan produced by *Aspergillus flavus* link[J]. Chmistry & Biodiversity, 2009, 6: 328-334.
- [14] Fdhila F, Vázquez V, Sánchez J L, et al. Dd-dike-topiperazines; antibiotics active Against vibrio a nguillarum isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus* [J]. Journal of natural products, 2003, 66(10): 1299-1301.

(责任编辑: 陆雁)

广西 2014 年将着力推进八个领域重大科技项目

新闻时间: 2014-1-14

2014 年是进一步加快实施“十二五”规划、全面深化科技体制改革、加快创新型广西建设的重要一年。自治区科技厅将继续围绕自治区党委、政府的中心工作, 在 2013 年的基础上加快整合优化资源, 积极构造和实施一批重大科技项目, 推动广西科技发展实现新的跃升。

一、“十二五”科技发展规划重大专项。继续支持“十二五”科技发展规划所确定的新能源汽车关键技术研究、非粮生物质能源产业关键技术攻关与产业化示范等 11 个重大科技专项, 集中力量突破一批关键共性技术, 研发一批具有自主知识产权和市场竞争力的重大战略产品, 建设一批技术水平高、带动性强的技术创新平台和产业化示范基地, 全面提高科技对经济社会发展的支撑作用。

二、千亿元产业重大科技攻关工程。继续实施千亿元产业“350 工程”和“2423”工程, 组织实施千亿元产业重点创新产品研发、千亿元产业关键共性技术攻关等项目, 加快 23 个千亿元产业研发中心建设, 对 24 个重点产业发展中急需解决的重大科技问题组织攻关, 开发一批具有自主知识产权的重大成果, 攻克一批产业共性关键技术, 全面提升产业技术水平和竞争力, 推动广西产业做大做强做优。

三、科技惠民示范工程。围绕全民健康、公共安全、生态环境保护和社会综合管理等领域, 组织一批关键技术攻关, 集成一批先进适用技术进行区域性应用示范, 开展科技惠民工程试点示范。

四、科技成果转化与推广。针对广西科技成果转化率和产业化率不高的问题, 组织实施传统产业改造升级重大共性技术集成转化应用示范、科技型中小企业技术创新资金项目、科技特派员创新创业示范等项目。

五、现代农业产业科技示范。通过组织实施特色种业及海洋产业关键技术研究示范、科技特派员创新创业示范和现代农业产业科技示范县建设及技术集成应用等项目, 加快推进农业科技创新, 支撑和引领高产、优质、高效、生态、安全的现代农业发展。

六、科技创新平台与基地建设。通过组织实施高新技术产业创新公共服务平台建设、农业科技创新平台建设与服务示范和基层科技能力建设示范等项目, 进一步提高广西高新区、农业科技园区、工程院、工程技术研究中心、重点实验室等各类创新平台和基地建设。

七、中国-东盟科技合作与技术转移服务能力建设与示范。围绕中国-东盟技术转移中心建设, 进一步升级优化中国-东盟科技合作与技术转移信息服务平台功能, 建成覆盖中国及东盟国家的技术转移协作网络, 培育建设广西面向东盟的技术转移示范机构, 提升技术转移服务能力, 开展技术对接示范活动和技术培训, 有效推动中国及东盟国家先进适用技术的双向转移。

八、发明专利倍增计划。通过继续组织实施科技项目发明专利倍增工程、创新平台发明专利倍增工程、知识产权优势企业发明专利倍增工程等, 进一步推动全民发明创造活动, 增强广西发明创造能力, 大幅度提高广西万人发明专利拥有量。

(摘自广西壮族自治区科技厅)