

## 海绵内/共生稀有放线菌 *Dermacoccus* sp. X4 次级代谢产物分离纯化及结构解析

张艳凤<sup>1,2</sup>, 许勇<sup>1,2</sup>, 陈雷<sup>1,2</sup>, 胡俊<sup>1,2</sup>, 张学成<sup>1,2</sup>, 房伟<sup>1,2</sup>, 方泽民<sup>1,2</sup>, 肖亚中<sup>1,2</sup>

1 安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230601

2 安徽省微生物与生物催化工程技术研究中心, 安徽 合肥 230039

张艳凤, 许勇, 陈雷, 等. 海绵内/共生稀有放线菌 *Dermacoccus* sp. X4 次级代谢产物分离纯化及结构解析. 生物工程学报, 2016, 32(5): 599–609.

Zhang YF, Xu Y, Chen L, et al. Isolation, identification and structural characterization of secondary metabolites from amarine sponge-derived rare actinobacterium *Dermacoccus* sp. X4. Chin J Biotech, 2016, 32(5): 599–609.

**摘要:** 从中国南海西沙群岛 10 m 深海水中采集得到一株未鉴定海绵样品, 对其进行共附生微生物的分离, 得到真菌及细菌共 16 株。通过分子生物学鉴定及菌株发酵液抑菌活性测定, 发现其中一株稀有放线菌皮生球属菌株 *Dermacoccus* sp. X4 对金黄色葡萄球菌具有较好抑菌活性。大量发酵制备该菌株发酵液, 通过硅胶分配层析、ODS 反相层析、Sephadex<sup>TM</sup>LH-20 凝胶过滤层析及 C<sub>18</sub> 反相层析等分离方法对发酵液成分进行分离, 并使用液相质谱连用、一维核磁及二维核磁分析对分离得到的单一化合物进行鉴定, 确定二酮哌嗪类化合物 1 个, 吡啶酸酯类化合物 2 个。本研究中吡啶酸酯类化合物为首次从微生物次级代谢产物中得到, 为丰富海洋微生物药用资源作出贡献。

**关键词:** 海绵共附生微生物, 次级代谢产物, 抑菌活性, 分离纯化, 结构解析

**Received:** September 10, 2015; **Accepted:** December 21, 2015

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2013AA092901), Scientific Research Foundation for Returned Scholars, Ministry of Education of China, the Introduction Project of Academic and Technology Leaders in Anhui University (No. 32030066), Innovative Research Team Program of 211 Project in Anhui University.

**Corresponding author:** Yazhong Xiao. Tel: +86-551-63861861; E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2013AA092901), 教育部留学回国人员科研项目, 安徽大学人才引进计划 (No. 32030066), 安徽大学 211 工程创新团队计划项目经费资助。

# Isolation, identification and structural characterization of secondary metabolites from amarine sponge-derived rare actinobacterium *Dermacoccus* sp. X4

Yanfeng Zhang<sup>1,2</sup>, Yong Xu<sup>1,2</sup>, Lei Chen<sup>1,2</sup>, Jun Hu<sup>1,2</sup>, Xuecheng Zhang<sup>1,2</sup>, Wei Fang<sup>1,2</sup>, Zemin Fang<sup>1,2</sup>, and Yazhong Xiao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

<sup>2</sup> Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, Hefei 230039, Anhui, China

**Abstract:** We isolated and identified the symbiotic and adnascent microorganisms from an unidentified sponge collected from 10-meter-deep seawater of the Paracel Islands in China. A total of 16 strains were obtained and identified. Through bacteriostatic activity assay, one of the strains, *Dermacoccus* sp. X4, was found to effectively inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*. Subsequently, its secondary metabolites were purified by silica gel partition, octadecylsilane (ODS) reverse phase, Sephadex<sup>TM</sup>LH-20 size exclusion, and C18 reverse phase chromatography. Using liquid chromatography, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance, three of the purified compounds were structurally characterized to be one 3-(4-hydroxybenzyl) hexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione and two indole acid glycerides. This is the first report about indole acid glyceride isolated from microbial secondary metabolites, enriching marine drug candidate resources.

**Keywords:** sponge associated microorganism, secondary metabolite, bacteriostatic activity, isolation and purification, structural characterization

海洋占据地球 70%以上的面积，是新型海洋天然产物来源的巨大宝库。自 20 世纪 50 年代 Bergmann 和 Feeney 首次从海绵 *Tethya crypta* 中获得新颖的核酸衍生物以来<sup>[1-2]</sup>，此后每年都有上百种结构新颖且具有良好活性的新化合物被报道<sup>[3]</sup>。

软体动物是海洋生物的重要成员，在海洋生态平衡中发挥功能。其中，海绵由于其固着生活方式，缺乏有效的物理性防御，在激烈的生存竞争中，主要通过积聚或分泌多种具有攻击性、甚至毒害性的次级代谢产物来维护种群的生存，是新型活性化合物的重要来源。目前，已经从各类海绵中分离获得多个具有显著生物活性（包括抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗炎等）的化合物<sup>[4-19]</sup>。然而，海绵资源有限，对海绵资源

的过量捕捞会破坏海洋的生态平衡。因此，来源于海洋软体生物如海绵的药源材料短缺已经成为限制海洋药物开发的瓶颈。

近年来，随着对微生物及其宿主关系研究的不断深入，人们发现，来源于海绵的某些活性物质实际上是由与其共附生的微生物产生的<sup>[5]</sup>，无疑为海洋药物药源问题的解决提供了思路，即可以通过对共附生微生物的发酵制备来解决海洋药物的药源问题。

海绵共附生微生物物种多样，具有广泛的代谢产物多样性<sup>[14-15]</sup>，是新型生物活性物质的重要源泉<sup>[16-20]</sup>。目前，已从其共附生微生物中发现了若干结构新颖、活性独特的次级代谢产物，如从海绵 *Ircinia* sp. 中分离得到一个二倍半萜硫酸胍盐 sulfircin，它具有抗真菌病原体活性

(MIC 为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 它还能促进神经肌肉传导, 也是乙酰胆碱酯酶的抑制剂<sup>[21]</sup>, 来自海绵 *Xestospongia testudinaria* 共附生真菌 *Aspergillus* sp. 的 2 个新的倍半萜二聚体类化合物 disydonols A 和 C 对 HepG-2 和 Caski 癌细胞有细胞毒性<sup>[22]</sup>。

为了更多了解海绵共附生微生物及其代谢产物, 前期我们从南海海域 10 m 深处采集若干海绵样品。本研究中, 我们对 1 株未鉴定海绵进行了共附生微生物的分离鉴定, 获得 16 株微生物菌株, 并对得到 1 株具有抑菌活性的稀有放线菌——皮生球菌属菌株 *Dermaococcus* sp. X4 合成的活性化合物进行初步分离纯化及结构解析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Sephadex<sup>TM</sup>LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences); YMC·GEL ODS-A-HG 12 nm S-50  $\mu\text{m}$  (YMC Co.Ltd); 色谱纯甲醇及乙腈 (Merck KGaA); 硅胶 200–300 目及硅胶 H 板 (青岛海洋化工有限公司)。其他试剂均为进口或国产分析纯级。

### 1.2 仪器

旋转蒸发器 (EYELAN-1100, Tokyo Rikakikai Co.LTD); 高效液相色谱仪 (AGILENT 1260); 液质联用质谱仪 (SATUKN2200); 核磁共振波谱仪 (DMX500, Bruker)。

### 1.3 分离培养基

细菌使用伊莫逊氏培养基进行分离; 放线菌分别使用高氏培养基、琼脂培养基、淀粉干酪素琼脂以及葡萄糖硝酸盐琼脂进行分离; 真菌使用马丁培养基和察贝克氏琼脂进行分离<sup>[23]</sup>。

### 1.4 海绵共附生微生物的分离

海绵样品处理: 取 20 g 海绵样品, 无菌海

水冲洗表面后, 用 75% 酒精漂洗 4 min, 然后再用无菌海水冲洗 4 次 (最后一次清洗用的水涂布于相应培养基上检查表面消毒效果), 表面消毒的样品在无菌条件下剪碎, 加入 50 mL 无菌海水, 经漩涡振荡器振荡 1 min 后, 静置至澄清, 取上清液备用。

吸取 0.5 mL 经预处理的样液于装有 4.5 mL 无菌海水的试管中, 充分混匀, 按照  $10^{-1}$ – $10^{-5}$  的比例稀释, 用微量移液器吸取 100  $\mu\text{L}$  经稀释后的样品溶液至装有各相应分离培养基的培养皿中, 用涂棒均匀涂布, 涂好的平板置于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱进行培养。生长的菌落挑出后进一步分离纯化, 并记录菌落培养特征与个体形态。

### 1.5 海绵共附生微生物的初步鉴定

细菌和真菌基因组 DNA 分别使用细菌和真菌基因组提取试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司) 提取。使用引物 27F 及 1492R (表 1) 扩增各细菌菌株的 16S rRNA 基因序列<sup>[24]</sup>; 使用引物 P1 及 P2 (表 1) 扩增各真菌菌株的 ITS 序列<sup>[25]</sup>。获得的 DNA 序列使用 NCBI 中的 Blast 程序进行相似性比对, 确定各菌株的种属归类。

### 1.6 海绵共附生微生物的抑菌活性测定

收集各菌株培养至稳定期的发酵液备用。将活化好的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* subsp., ATCC25923<sup>T</sup>)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, ATCC25922<sup>T</sup>)、新型隐球菌

表 1 扩增菌株 16S rRNA 基因和 ITS 序列引物  
Table 1 The primers used to clone the 16S rRNA genes and ITS sequence of the strains

Primers	Primer sequence (5'–3')
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT
P1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
P2	TCCTCCGCTTATTGATATGC

(*Cryptococcus neoformans*, ATCC14116<sup>T</sup>) 及白假丝酵母菌 (*Candida albicans*, ATCC10231<sup>T</sup>) 等 4 株待测菌的 1 mL 菌液 ( $OD_{600}=1$ ) 与 100 mL 伊莫逊氏培养基或沙氏琼脂培养基 (麦芽糖 40 g, 蛋白胨 10 g, 琼脂 20 g, 补充蒸馏水至 1 L) 混合均匀后制备待测琼脂平板, 将牛津杯置于琼脂平板上, 每板放置 4 个, 分别加入 100  $\mu$ L 无菌水 (阴性对照)、发酵上清原液、1/2 浓度发酵原液、1/4 浓度发酵原液, 每种菌设置 3 个平行。细菌置于 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 真菌置于 28  $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 观察是否有抑菌圈出现并测量抑菌圈直径大小。

### 1.7 *Dermaococcus* sp. X4 的分子生物学及形态学鉴定

将菌株 *Dermaococcus* sp. X4 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 及模式菌比对软件 EzTaxon-e (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) 进行比对后, 在 GenBank 上获取相关的 16S rRNA 基因序列, 使用 MEGA 5.0 进行比对分析后, 采用 Kimura 2-parameter 模型和邻接法 (Neighbor-Joining) 构建菌株 *Dermaococcus* sp. X4 的系统发育聚类图, 进一步确定该菌株的分类地位。

挑取菌株 *Dermaococcus* sp. X4 的单菌落在 MT 固体培养基平板上划线, 置于 28  $^{\circ}$ C 条件下培养生长 72 h 后观察其菌落大小及形态。取对数期的菌体用磷钨酸染色后采用透射电镜 (FEI Tecnai G2 F20, FEI) 观察菌体大小及形状。

### 1.8 *Dermaococcus* sp. X4 次级代谢产物提取

菌株发酵上清制备: 对 *Dermaococcus* sp. X4 的发酵培养基进行优化后, 选用生长对数期菌

液作为种子液 ( $OD_{600}=2.1$ ), 按照 1% 接种量接种至马丁培养基中 (400 mL 培养基/1 L 三角瓶), 28  $^{\circ}$ C、120 r/min 条件下培养至 90 h, 收集发酵液, 8 000 $\times$ g 离心去除菌体, 得到澄清发酵液。

次级代谢产物的提取: 采用等体积乙酸乙酯对发酵液进行萃取, 分离小分子脂溶性物质, 等体积萃取 3 次, 收集乙酸乙酯组分, 将乙酸乙酯相蒸发浓缩去除有机溶剂, 得到菌株发酵液粗浸膏。

### 1.9 次级代谢产物的分离纯化

发酵液浸膏 570 mg 溶于适当溶剂中, 与 5 g 干硅胶拌样, 干法上样后, 采用硅胶 200-300 目层析柱 (内径 40 mm, 长度 400 mm) 进行分离。用石油醚溶剂进行装柱后, 采用梯度洗脱, 洗脱体系分别为: 石油醚 丙酮=10 0; 9 1; 8 2; 7 3; 6 4; 5 5; 二氯甲烷 甲醇=9 1; 7 3; 5 5; 0 10, 每个梯度洗脱 400 mL, 收集各洗脱馏分, 每管收集 10 mL, 并进行薄层层析分析, 根据层析情况合并相同组分, 共得到 17 个组分。将质量较大的组分 15、16 及 17 进一步进行凝胶色谱分离 (内径 22 mm, 长度 1 200 mm), 柱材料为 Sephadex<sup>TM</sup> LH-20, 采用甲醇作洗脱液, 洗脱 3 个柱体积 (400 mL), 收集各洗脱馏分, 并进行薄层层析分析, 根据层析情况合并相同组分, 将质量较大的组分 15-1、16-2 及 17-1 过 ODS 离子交换色谱柱 (内径 22 mm, 长度 400 mm), 采用甲醇 水=3 7; 4 6; 1 1; 7 3 及 10 0 作洗脱剂, 收集各洗脱馏分, 并进行薄层层析分析, 根据层析情况合并相同组分, 将质量较大的组分 15-1-B、16-2-A 及 17-1-4 利用高效液相色谱进行分离, 采用 C<sub>18</sub> 半制备柱 (Pheno-menex Gemini 5 $\mu$ C<sub>18</sub>

110A, 250 mm×10.00 mm 5 micron), 210 nm 波长下进行检测, 分离得到化合物单体。

### 1.10 化合物的结构解析

取 0.5 mg 样品溶于 0.5 mL 色谱级甲醇中进行质谱分析; 将各样品分别以 0.5 mL CH<sub>3</sub>DO 溶解, 反复交换 2 次。最后以 0.7 mL CH<sub>3</sub>DO 将样品溶于核磁管, 加入一滴氘代丙酮作为内标, 在 23 °C 下, 利用 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 等核磁技术对各样品进行结构分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 海绵共附生微生物的分离

基于 16S rRNA 及 ITS 编码基因的序列聚类分析表明 (表 2), 共得到 16 个不同种微生物菌

株, 分布于枝孢属 (*Cladosporium* sp.)、丛赤壳属 (*Nectria* sp.)、踝节菌属 (*Talaromyces* sp.)、青霉菌属 (*Penicillium* sp.)、锁掷酵母属 (*Sporidiobolus* sp.) 等真菌, 考克氏菌属 (*Kocuria* sp.)、皮生球菌属 (*Dermacoccus* sp.) 等放线菌及类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.) 等细菌。

### 2.2 分离菌株的抑菌活性

经过培养观察, 分离菌株 *Dermacoccus* sp.X4 (16S rRNA gene GenBank ID: KT944034) 对金黄色葡萄球菌显示出抑菌活性, 且抑菌活性随发酵液的浓度的增加而增强, 菌株发酵液原液、倍比稀释至 1/2 及 1/4 的发酵液的抑菌圈直径分别为: 25 mm、23 mm 及 19 mm (图 1)。

表 2 海绵分离菌株的 16S rRNA 基因和 ITS 序列鉴定

Table 2 The identification of strains isolated from sponge based on 16S rRNA gene and ITS sequence

Ttaxonomy position/genera	Strain number	The similar strain (Accession No.)	Similarity (%)
<i>Alternaria</i>	13XS-f1	<i>Alternaria alternata</i> strain NFML_CH44_376	100.00
<i>Alternaria</i>	13XS-f2	<i>Alternaria tenuissima</i> strain CHR-1	99.00
<i>Penicillium</i>	13XS-f3	<i>Penicillium oxalicum</i>	99.00
<i>Cladosporium</i>	13XS-f4	<i>Cladosporium perangustum</i>	98.00
<i>Talaromyces</i>	13XS-f5	<i>Talaromyces</i> sp. NRRL 62223	99.00
<i>Aspergillus</i>	13XS-f6	<i>Aspergillus awamori</i> strain SRRC 332	99.00
<i>Eutypella</i>	13XS-f7	<i>Eutypella</i> sp. W57-7 (AB693818)	99.00
<i>Bacillus</i>	13XS-f8	<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205 <sup>T</sup>	99.38
<i>Kocuria</i>	13XS-f9	<i>Kocuria palustris</i> strain JPR-01	99.00
<i>Nectria</i>	13XS-f11	<i>Nectria cinnabarina</i> strain 5175 (HM054135)	99.00
<i>Dermacoccus</i>	13XS-X4	<i>Dermacoccus nishinomyaensis</i> DSM20448 <sup>T</sup>	99.16
<i>Penicillium</i>	13XS-X8	<i>Penicillium chrysogenum</i> strain FRR 807	99.00
<i>Penicillium</i>	13XS-X9	<i>Talaromyces purpurogenus</i> (AB872825)	100.00
<i>Kocuria</i>	13XS-Z6	<i>Kocuria palustris</i> DSM11925 <sup>T</sup>	99.93
<i>Sporidiobolus</i>	13XS-fr	<i>Sporidiobolus pararoseus</i> (HQ670681)	98.00
<i>Penicilliumchrysogenum</i>	13XS-f12	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY373902)	100.00

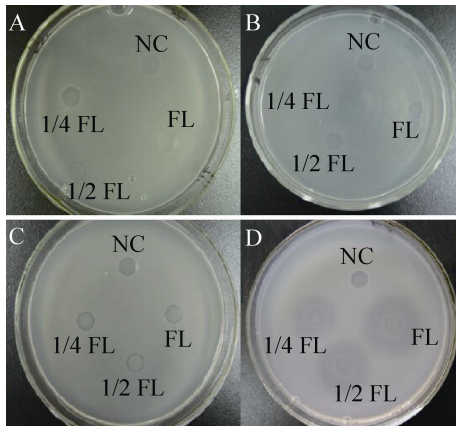


图 1 *Dermacoccus* sp. X4 对新型隐球菌 (A)、白假丝酵母菌 (B)、大肠杆菌 (C) 及金黄色葡萄球菌 (D) 的抑制作用

Fig. 1 The inhibitory effects of *Dermacoccus* sp. X4 fermentation broth on *C. neoformans* (A), *C. albicans* (B), *E. coli* (C), and *S. aureus* subsp. (D). NC: negative control; FL: fermentation liquor.

### 2.3 *Dermacoccus* sp. X4 的分子生物学及形态学鉴定

基于菌株 *Dermacoccus* sp. X4 的 16S rRNA 基因序列构建 Neighbor-Joining 系统发育聚类图 (图 2), 系统发育聚类图显示, 该菌株与已经报道的模式菌株 *Dermacoccus nishinomyaensis* DSM20448<sup>T</sup> 亲缘关系最近, 且与 *Dermacoccus* 属的其他几个种也具有很近的亲缘关系, 因此确定该菌株归属于 *Dermacoccus* sp.。

*Dermacoccus* sp. X4 为不运动的放线菌, 在 28 °C 条件下, 在马丁培养基上生长 72 h 后, 菌落呈规则圆形, 直径约为 1 mm, 淡黄色, 表面光滑湿润, 中部隆起, 为表面有光泽的克隆。电镜观察菌体为椭圆形, 直径约为 0.5–1.5 μm (图 3)。

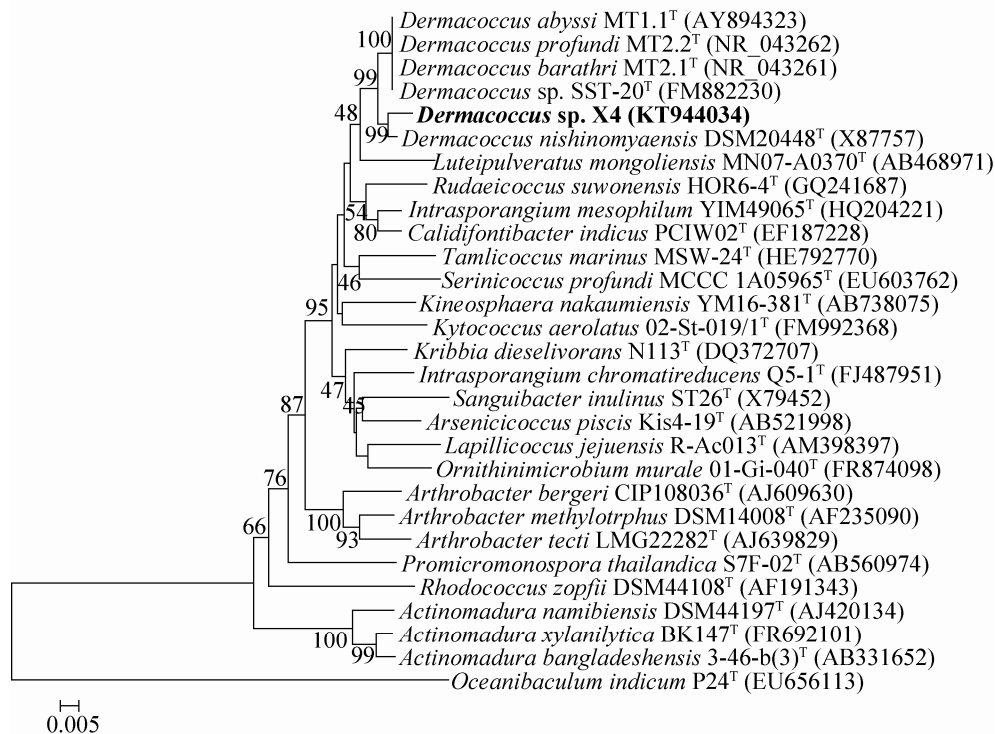


图 2 菌株 *Dermacoccus* sp. X4 的系统发育聚类图 (邻接法)

Fig. 2 The Neighbor-Joining tree of strain *Dermacoccus* sp. X4.

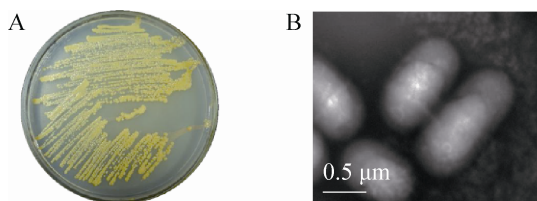


图3 菌株 *Dermacoccus* sp. X4 的菌落 (A) 和菌体 (B) 形态

Fig. 3 The morphology of the clony (A) and the cell (B) of *Dermacoccus* sp. X4.

#### 2.4 *Dermacoccus* sp. X4 次级代谢产物分离

通过大量摇瓶发酵, 获得 *Dermacoccus* sp.

X4 发酵液 10 L, 得到乙酸乙酯萃取浸膏 570 mg.

经过各分离技术的综合运用, 最终获得 6 个单一化合物 (表 3 和图 4)。

#### 2.5 *Dermacoccus* sp. X4 次级代谢产物结构解析

化合物 X4-15 :

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, MeOD)  $\delta$ : 8.10 (1H, d,  $J=7.44$  Hz, 4-H), 7.86 (1H, s, 2-H), 7.38 (1H, d,  $J=7.80$  Hz, 7-H), 7.13 (2H, m, 5-H, 6-H);

表 3 单一化合物质量

Table 3 The quantities of the purified compounds

Fraction No.	Quantities (mg)	Fraction No.	Quantities (mg)
x4-16A1	1.1	X4-17-4	14.6
x4-15B	2.0	X4-17-6	3.0
x4-16A4	1.0	X4-17-5	4

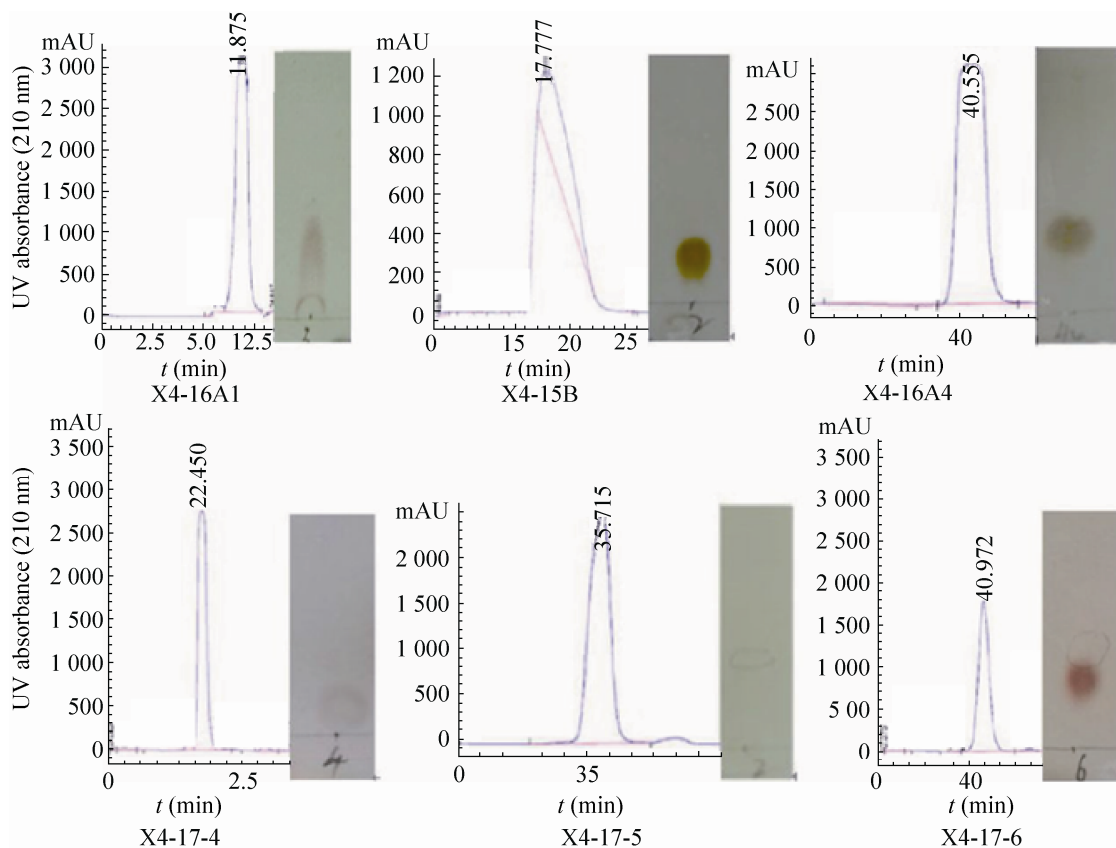
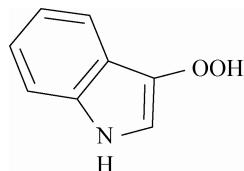


图 4 单一化合物 HPLC 及 TLC 分析图谱

Fig. 4 The high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC) spectra of the purified compounds.

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, MeOD)  $\delta$ :138.17 (C-8), 132.53 (C-2), 127.88 (C-9), 123.19 (C-6), 122.26 (C-4), 121.91 (C-5), 112.63 (C-7)。该化合物为白色粉末, 质谱显示该化合物的相对分子质量为 149, 表明其含有 N 元素, 推测其分子式为  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_2$ 。

结合  $^1\text{H-NMR}$  谱图, 发现氢的出峰位置均在  $\delta 6.0\text{--}8.5$  (一般苯环上的氢出峰位置) 左右, 另外  $\delta 7.86$  处为一单峰, 故判断该化合物的骨架为吲哚结构。由  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$  图谱可知, H-4 和 H-5 相关, H-5 和 H-6 相关, H-6 和 H-7 相关, 再由 HMBC 谱图和 HMQC 谱图可知, H-4/C-4, H-4/C-6, H-4/C-8, H-2/C-2, H-2/C-8, H-2/C-9, H-7/C-7, H-7/C-9, H-7/C-5, H-5/C-5, H-5/C-7, H-5/C-9, H-6/C-6, H-6/C-8, H-6/C-4, 可判断该化合物为吲哚结构。质谱信息表明该化合物的相对分子质量为 149, 故确定该化合物为 3-hydroperoxy-1H-indole, 将该化合物的核磁数据与文献[26]比较, 确定该化合物结构如下:



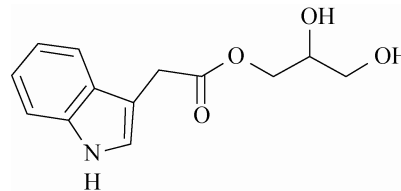
化合物 X4-16A:

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, MeOD)  $\delta$ :7.52 (1H, d,  $J=8.34$  Hz, 4-H), 7.31 (1H, d,  $J=7.74$  Hz, 7-H), 7.14 (1H, s, 2-H), 7.06 (1H, m, 6-H), 6.98 (1H, m, 5-H), 3.69 (2H, s, 10-H), 3.63 (1H, m, 2'-H), 3.56 (2H, m, 1'-H), 3.50 (2H, m, 3'-H);

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, MeOD)  $\delta$ :179.38 (C-11), 138.15 (C-8), 128.76 (C-9), 124.53 (C-2), 122.35 (C-6), 119.72 (C-5), 119.48 (C-4), 112.16

(C-7), 109.62 (C-3), 73.86 (C-2'), 64.40 (C-1', 3'), 32.45 (C-10)。

化合物为白色粉末, 分子量 256, 推测其分子式为  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_4$ 。将该化合物的核磁数据与 X-4-2-15B 比较, 发现低场信号基本一样, 而是在高场位置增加了几组峰, 故初步判断该化合物的骨架为一个吲哚结构。由  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$  图谱可知, H-4 和 H-5 相关, H-5 和 H-6 相关, H-6 和 H-7 相关, 再由 HMBC 谱图和 HMQC 谱图可知, H-4/C-4, H-4/C-3, H-4/C-6, H-4/C-8, H-4/C-9, H-4/C-5, H-4/C-7, H-7/C-7, H-7/C-9, H-7/C-5, H-2/C-2, H-2/C-10, H-2/C-3, H-2/C-8, H-2/C-9, H-6/C-6, H-6/C-4, H-6/C-7, H-5/C-5, H-5/C-7, H-5/C-9, 判断该化合物为一个在 3 号位被取代的吲哚结构。进一步分析  $\delta$ : 3.0–4.0 的高场区域, 结合氢谱、碳谱以及 DEPT135 谱图可发现, 该区域为 1 个叔碳, 3 个仲碳。由 HMBC 谱图和 HMQC 谱图可知, H-10/C-10, H-10/C-11, H-10/C-3, H-10/C-4, H-10/C-9, H-2'/C-2', H-2'/C-1', H-2'/C-3', H-1'/C-1', H-1'/C-2', H-1'/C-10, H-3'/C-3', H-3'/C-2', 从而判断被取代部分为一个甘油酯片段, 将以上两个片段结构按 HMBC 给出相关性, 结合 HMQC、 $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$  图谱数据, 确定该化合物为 3-吲哚乙酸甘油酯, 将该化合物的核磁数据与文献[27]比较, 确定该化合物结构如下:



化合物 X4-17-4:

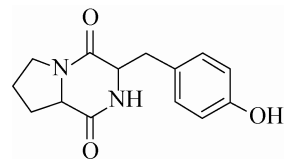
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, MeOD)  $\delta$ :7.02 (2H, d,  $J=8.10$  Hz, 2',6'-H), 7.02 (2H, d,  $J=8.16$  Hz,



3', 5'-H), 4.35 (1H, s, 3-H), 4.03 (1H, m, 8-H), 3.53 (1H, m, 5-H), 3.31 (1H, m, 5-H), 3.03 (2H, m, 10-H), 2.07 (1H, m, 7-H), 1.78 (2H, m, 6-H), 1.20 (1H, m, 7-H);

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, MeOD)  $\delta$ :170.77 (C-1), 166.94 (C-4), 157.67 (C-4'), 132.12 (C-2', 6'), 127.61 (C-1'), 116.17 (C-3', 5'), 60.04 (C-8), 57.89 (C-3), 45.91 (C-5), 37.65 (C-10), 29.39 (C-7), 22.71 (C-6)。化合物为白色粉末,从质谱图上可以看出该化合物的相对分子质量为 260;从碳谱上看,该化合物有 14 个碳原子,推测其分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ 。

由  $^1\text{H-NMR}$  谱图中的  $\delta$ :7.02 (2H, d,  $J=8.10$  Hz), 7.02 (2H, d,  $J=8.16$  Hz), 并通过  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$  谱图知其相互耦合,判断该化合物存在一个 1,4 取代的苯环结构。另外,由  $^{13}\text{C-NMR}$  谱图中的  $\delta$ :170.77 和  $\delta$ :166.94 可判断该化合物还存在 2 个羰基。由  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$  图谱可知 H-3 和 H-10 相关, H-8 和 H-7 相关, H-5 和 H-6 相关, H-6 和 H-7 相关,再由 HMBC 谱图和 HMQC 谱图可知, H-2', 6'/C-2', 6', H-2', 6'/C-10, H-2', 6'/C-3', 5', H-2', 6'/C-4', H-3', 5'/C-3', 5', H-3', 5'/C-1', H-3', 5'/C-4', H-3/C-3, H-3/C-10, H-3/C-1', H-3/C-4, H-8/C-8, H-8/C-7, H-8/C-1, H-5/C-5, H-5/C-6, H-5/C-7, H-10/C-10, H-10/C-1', H-10/C-3, H-10/C-4, H-7/C-7, H-7/C-6, H-7/C-5, H-7/C-8, H-7/C-1, H-6/C-6, H-6/C-7, H-6/C-5, H-6/C-8, 综上,判断该化合物为 3-(4-hydroxybenzyl) hexahydropyrrolo-[1,2-a]pyrazine-1,4-dione。将该化合物的核磁数据与文献[28]比较,确定该化合物结构如下:



### 3 讨论

对从中国南海西沙群岛 10 m 深海水中采集得到 1 株未鉴定海绵样品进行共附生微生物分离,得到 1 株对金黄色葡萄球菌等具有抑菌活性的菌株 *Dermaococcus* sp. X4,对该菌株的次级代谢产物进行初步分离,得到了 6 个单一化合物,对其中 3 个化合物的结构进行了解析。结果表明,这 3 个化合物分别为: 1) 3-hydroperoxy-1H-indole; 2) 3-吡啶乙酸甘油酯; 3) 3-(4-hydroxybenzyl) hexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione。其中化合物 1) 和 2) 为首次从微生物代谢产物中分离鉴定。由于本次研究中获得的这 3 个化合物的纯品质量分别为 2.0 mg、1.1 mg 及 14.6 mg,质量较小,所以未对纯品化合物的抗菌活性进行测定。但根据文献调研的结果, Golubev 和 Suvorov 对化合物 1) 及 2) 进行了合成,发现其具有抗结核分支杆菌活性和促进植物生长活性,并且作用于中枢神经系统<sup>[26-27]</sup>,但是由于化学合成成本高且步骤繁琐,限制了其应用开发。对化合物 3) 的研究,有诸多抗菌、抗肿瘤及免疫活性的报道<sup>[28-30]</sup>。该研究为这 3 种活性化合物的制备提供了新的技术途径,也进一步表明海洋微生物是获取活性化合物的重要资源。

### REFERENCES

- [1] Bergmann W, Feeney RJ. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *J Org Chem*, 1951, 16(6): 981-987.

- [2] Bergmann W, Feeney RJ. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *J Am Chem Soc*, 1950, 72(6): 2809–2810.
- [3] Hu YW, Chen JH, Hu GP, et al. Statistical research on the natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *J Nat Prod*, 2012, 75(3): 311–335.
- [4] Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(2): 160–258.
- [5] Wang GY. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33(7): 545–551.
- [6] Ahn YB, Rhee SK, Fennell DE, et al. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(7): 4159–4166.
- [7] Sun JZ. Studies on five south China sea sponges: chemistry and bioactivities[D]. Ji'nan: Shandong University, 2010(in Chinese).  
孙继政. 五种中国南海海绵的化学成分及生物活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [8] Zhu H. Studies on the metabolites of the fungi associated with the marine sponge *Gelliodes carnosa*[D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College Hospital, 2013(in Chinese).  
朱虹. 丰肉结海绵相关真菌次级代谢产物研究[D]. 北京: 中国医学科学院&北京协和医院, 2013.
- [9] De Rosa S, Mitova M, Tommonaro G. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. *Biomol Eng*, 2003, 20(4/6): 311–316.
- [10] He HY, Ding WD, Bernan VS, et al. Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomaivitiensis*. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(22): 5362–5363.
- [11] Bugni TS, Janso JE, Williamson RT, et al. Dictyosphaeric acids A and B: new decalactones from an undescribed *Penicillium* sp. obtained from the alga *Dictyosphaeria versluyii*. *J Nat Prod*, 2004, 67(8): 1396–1399.
- [12] Li DL, Li XM, Wang BG. Natural anthraquinone derivatives from a marine mangrove plant-derived endophytic fungus *Eurotium rubrum*: structural elucidation and DPPH radical scavenging activity. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(7): 675–680.
- [13] Zheng CJ, Shao CL, Guo ZY, et al. Bioactive hydroanthraquinones and anthraquinone dimers from a soft coral-derived *Alternaria* sp. fungus. *J Nat Prod*, 2012, 75(2): 189–197.
- [14] Mehbub MF, Lei J, Franco C, et al. Marinesponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar Drugs*, 2014, 12(8): 4539–4577.
- [15] Blunt JW, Copp BR, Hu WP, et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(2): 170–244.
- [16] Zhang W, Guo YW, Gu YC. Secondary metabolites from the South China Sea invertebrates: chemistry and biological activity. *Curr Med Chem*, 2006, 13(17): 2041–2090.
- [17] Jadulco R, Brauers G, Edrada RA, et al. New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. *J Nat Prod*, 2002, 65(5): 730–733.
- [18] Wang CY, Wang BG, Brauers G, et al. Microsphaerones A and B, two novel  $\gamma$ -pyrone derivatives from the sponge-derived fungus *Microsphaeropsis* sp.. *J Nat Prod*, 2002, 65(5): 772–775.
- [19] Edrada RA, Heubes M, Brauers G, et al. Online analysis of xestodecalactones A-C, novel bioactive metabolites from the fungus *Penicillium* cf. *montanense* and their subsequent isolation from the sponge *Xestospongia exigua*. *J Nat Prod*, 2002, 65(11): 1598–1604.
- [20] Mapperson RR, Kotiw M, Davis RA, et al. The diversity and antimicrobial activity of *Preussia* sp. endophytes isolated from Australian dry rainforests. *Curr Microbiol*, 2014, 68(1): 30–37.
- [21] Wright AE, McCarthy PJ, Schulte GK. Sulfircin: a new sesterterpene sulfate from a deep-water sponge of the genus *Ircinia*. *J Org Chem*, 1989, 54(14):

- 3472–3474.
- [22] Sun LL, Shao CL, Chen JF, et al. New bisabolane sesquiterpenoids from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. isolated from the sponge *Xestospongia testudinaria*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(3): 1326–1329.
- [23] Hu SC. Isolation and screening of marine microorganisms with cytotoxicity and studies on the secondary metabolites[D]. Nanjing: Huazhong Agricultural University, 2005(in Chinese).  
胡申才. 具细胞毒活性海洋微生物的分离筛选及次级代谢物研究[D]. 南京: 华中农业大学, 2005.
- [24] Shahina M, Hameed A, Lin SY, et al. *Sphingomicrobium astaxanthinifaciens* sp. nov., an astaxanthin-producing glycolipid-rich bacterium isolated from surface seawater and emended description of the genus *Sphingomicrobium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2013, 63(Pt9): 3415–3422.
- [25] Sui X, Feng FJ, Lou X, et al. Total DNA extraction from soil microorganisms and construction of ITS-PCR system for soil fungi. *China Brewing*, 2011, (9): 166–168(in Chinese).  
隋心, 冯富娟, 娄鑫, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取以及土壤真菌 ITS-PCR 体系的建立. *中国酿造*, 2011, (9): 166–168.
- [26] Suvorov NN, Golubev VE. Indole derivatives. XXXVII. Synthesis of glycerides of indole-3-alkanoic acids and O-(indol-3-ylalkyl) glycerols. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 1967, 1(8): 13–18.
- [27] Golubev VE, Suvorov NN. Indole derivatives. XXVI. Synthesis of monoglycerides of indole-3-carboxylic acids. *Khim Geterotsikl Soedin, Sb. 1: Azotsoderzhashchie Geterotsikly*, 1967: 21–24.
- [28] Li CS, An CY, Li XM, et al. Triazole and dihydroimidazole alkaloids from the marine sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44. *J Nat Prod*, 2011, 74(5): 1331–1334.
- [29] Kilian G, Jamie H, Brauns SC, et al. Biological activity of selected Tyrosine-containing 2,5-diketopiperazines. *Pharmazie*, 2005, 60(4): 305–309.
- [30] Kimura Y, Sawada A, Kuramata M, et al. Brevicompanine C, Cyclo-(D-Ile-L-Trp), and cyclo-(D-Leu-L-Trp), plant growth regulators from *Penicillium brevi-compactum*. *J Nat Prod*, 2005, 68(2): 237–239.

(本文责编 陈宏宇)