

海洋真菌与细菌发酵物中的环二肽*

周世宁¹ 林永成² 吴雄宇² 姜广策² 关利平³

(中山大学生命科学学院生物化学系 广州 510275)¹

(中山大学化学化工学院应用化学系 广州 510275)²

(香港城市大学生物与化学系 香港九龙)³

摘要: 从红树林真菌 1356 菌株发酵液中分离到 4 个环二肽, 它们是环 Pro-Tyr, 环 Pro-Ile, 环 Gly-Phe 和环 Ala-Phe。另从海洋细菌 110 菌株发酵液中分离到 5 个环二肽, 它们是环 Leu-Ile, 环 Val-Leu, 环 Ala-Val, 环 Ala-Ile 和环 Ala-Leu。这些环二肽多数是新发现的微生物产物。本文比较了新分离的环二肽与已经报道的环二肽在来源、结构、功能等方面的区别。

关键词: 海洋真菌, 海洋细菌, 环二肽

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0059-04

CYCLIC DIPEPTIDES FROM MARINE FUNGI AND BACTERIA CULTURES

ZHOU Shi-Ning¹ LIN Yong-Cheng² WU Xiong-Yu² JIANG Guang-Ce² VRUJMOED L. L. P³

(Department of Biochemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275)¹

(Department of Applied Chemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275)²

(Department of Biology and Chemistry, City university of Hong kong, HK)³

Abstract: Four and Five cyclic dipeptides were isolated respectively from a marine fungus and a bacteria strain. The cyclic dipeptides from fungus 1356 were cyclo (Pro-Tyr), cyclo (Pro-Ile), cyclo (Gly-Phe) and cyclo (Ala-Phe). The cyclic dipeptides from bacterium 110 were cyclo (Leu-Ile), cyclo (Val-Leu), cyclo (Ala-Val), cyclo (Ala-Ile) and cyclo (Ala-Leu). These cyclic dipeptides were compared with some cyclic dipeptides isolated from other organisms.

Keywords: Marine fungi, Marine bacteria, Cyclic dipeptides

迄今, 环二肽类化合物在人、脊椎动物、无脊椎动物、真菌和细菌中均有发现。结构不同的环二肽, 其生物功能显著不同, 具有包括从激素调节到细菌生理调控广泛范围的生物活性。有的环二肽具有立体构型专一的催化作用, 例如环 His-Phe 能催化 R-型氰醇合成, 而环 His-Leu 却催化 S-型氰醇合成。在氨基酸合成中发现环二肽具有对映体选择活性^[1]。最近 Holden 等^[2]发现, 环二肽在细菌生理调控系统中能作为信号分子。在过去的 10 多年里, Stierle 等^[3]和 Bell 等^[4]分别报道过海洋细菌的环二肽。也有作者报道过海洋真菌的环二肽或其衍生物^[5,6]。最近我们在海洋环境分离的内生真菌及细菌中, 分别获得了多个环二肽, 其中包括一些新的环二肽结构。由于微生物环二肽的生理功能开始被发现, 对它们的研究更有意义。本文小结近年的有关发现。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39870023)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39870023)

广东自然科学基金资助项目 (No. 980306)

收稿日期: 2001-03-14, 修回日期: 2001-06-25

1 材料与方法

1.1 菌种

真菌菌株 1356 (未鉴定), 从香港海岸红树林分离的内生菌株。

细菌 110, 分子鉴定为 *Bacillus subtilis*, 从中国南海大亚湾海底沉积物分离。

1.2 培养基

真菌培养基 (CYT): 葡萄糖 10 g, 酵母膏 1g, 蛋白胨 (浙江带鱼粉) 2 g, 25% 人工海水定容至 1 L。

细菌培养基: Zobell 2216E 海水培养基。

1.3 发酵

真菌培养: 500mL 三角瓶装 GYT100mL, 接入斜面种子, 28℃, 振荡 (160r/min) 培养约 5d, 所得菌丝以 5% 比例接入新的相同培养基中 (500mL 瓶装 200mL), 28℃ ± 静置培养约 1 个月。

细菌培养: 500mL 三角瓶装 2216E 100mL 斜面接种, 于 45℃ 振荡培养至对数期作种子。接 2mL 到 100mL 新 2216E 中 (500mL 三角瓶), 45℃, 振荡培养 48h。

1.4 提取分离

合并发酵液, 浓缩, 乙酸乙酯抽提, 蒸发溶剂, 硅胶柱分离, 乙酸乙酯-石油醚和甲醇-乙酸乙酯梯度洗脱; 各组份洗脱液浓缩得粗品, 用乙酸乙酯-甲醇, 乙酸乙酯-石油醚重结晶得精品。

1.5 结构分析

质谱分析应用 VGZAB-HS; 核磁共振分析用 INOVA-500, 元素分析用 Perkin-Elmer240C, 另外还有 NICOLER5DX-RTIR 红外光谱仪、Perkin210 分光光度计, HORIBA SEPA-300 旋光仪及显微熔点仪等。

2 结果与讨论

2.1 真菌 1356 与细菌 110 的环二肽

菌株 1356 发酵液, 经提取分离获得多个组份, 其中包括 4 个环二肽。通过仪器测定数据的综合分析, 他们的结构被确定。

组份 A, 白色结晶, 据 FABMS 离子峰 (261) 及其他数据, 结合 NMR 数据可知其分子式为 $C_{14}H_{16}N_2O_3$ 分子量为 260, 1H NMR 和 ^{13}C NMR 分别显示有对位二取代苯和二酰胺羰基。又据 1H - 1H COSEY, HMBC 分析, 此物被定为环 Pro-Tyr 结构。

组份 B, 针状结晶, 熔点 140-141.5℃, 据 FABMS 分析其分子量为 210, 含偶数氮; 从 NMR 数据可知含有 11 个碳 18 个氢以及存在酰胺。参考标准品数据, 综合分析, 该组份为环 Pro-Ile。

组份 C, 白色针状物, 于 166℃ 升华, FABMS 显示此物分子量为 204, 含偶数氮, 结合 NMR 数据推得其分子式为 $C_{11}H_{12}O_2N_2$, 有活泼 H, 可能有 2 个酰胺; 不饱和度为 7, 含一取代苯环, 综合分析, C 组份为环 Gly-Phe。

组份 D, 分析数据与组份 C 相似, 只显示多一个甲基, 因而推断为环 Ala-Phe。

同样, 根据 NMR、FABMS 等分析, 对海洋细菌 110 发酵物的分离物进行了测定, 发现了 5 种环二肽, 他们是: 环 Leu-Ile, 环 Val-Leu, 环 Ala-Val, 环 Ala-Ile 和环 Ala-Leu。经氨基酸分析, 这些结构进一步获得确定。

2.2 不同来源环二肽比较

天然的环二肽来源广泛,已从人、脊椎动物、无脊椎动物、真菌及细菌分离到环二肽(表1)。从不同生物分离到的环二肽谱一般是不同的。种类数量的差异较大,但某些环二肽同时可从不同生物中得到。

海洋内生真菌 1356 得到的环二肽 Cyclo (Pro-Ile) 和 Cyclo (Pro-Tyr) 已在海洋弧菌中发过,海洋细菌 110 的 5 个环二肽,尚未在其他生物产物中发现。这 5 个环二肽均不含 Pro 残基。环二肽谱及数量的差异暗示其生物学功能及生物合成途径的多样性。

海绵中的环二肽含量丰富,然而这些环二肽不一定全由海绵本身合成,因为多种海洋细菌,甚至从海绵分离的细菌都被证实能产生环二肽,而海绵中含有占其干重约 40% 的微生物菌体,因而有理由怀疑其环二肽是否真正来源于海绵本身。事实上从海绵得到的环二肽与从海洋细菌所获得的环二肽不少是相同的。

在已发现的天然环二肽中,只有约 10 种的氨基酸或其衍生物。按出现频率高低,他们依次是 Pro, Leu, Val, Ala, Ile, Tyr, Phe, Gly, Gln, Met, His 等,其中 Pro 的出现率达 70% 以上。还不清楚为什么某些氨基酸或环肽出现率特别高。

2.3 天然环二肽的生物活性

从人和高等动物得到的环二肽几乎都有很强的生物活性。例如环 His-Pro 具有调节

表 1 天然环二肽的来源与功能

来源	环二肽	功能	参考文献
人, 脊椎动物	Cyclo (His-Pro)	抑制胰岛素、垂体催乳素, 调控食欲能量代谢	7
	Cyclo (Gly-Gln)	抑制吗啡引起的心博呼吸压抑	8
无脊椎动物 蚂蚁 海绵	Cyclo (Pro-Gly)	促进记忆	
	Cyclo (Leu-Phe)	(苦味) 自卫/进攻	9
	Cyclo (Pro-Leu)		10
	Cyclo (Pro-Val)		
	Cyclo (Pro-Ile)		
Cylo (Pro-Phe)			
海星 真菌	Cyclo (Methyl-Bo-Nva)		
	Cyclo (Gly-Pro)		
海洋 1356	Cyclo (Pro-Ile)		
	Cyclo (Ala-Phe)		
	Cyclo (Pro-Tyr)		
	Cyclo (Gly-Phe)		
海洋曲霉 <i>Corollaspora</i>	Cyclo (Ala-Tyr 衍生物)	抗 G ⁺ 细菌	
	Cyclo (Pro-Leu)		
	Gliovictin	抗肿瘤	5, 6
细菌 海洋弧菌	Cyclo (Pro-Leu)		
	Cyclo (Pro-Val)		4
	Cyclo (Pro-Ile)		
	Cyclo (Pro-Tyr),		
	Cyclo (Dhap-Ile)		
	Cyclo (Dhap-Leu)		
	Cyclo (Dhap-Val)		
	Cyclo (Ala-Pro)		
	Cyclo (Leu-Pro)		
	Cyclo (Pro-Val)		
110 ^a	Cyclo (Met-Pro)	诱导生物发光	2
	Cyclo (Leu-Ile)		
	Cyclo (Val-Leu)		
	Cyclo (Ala-Val)		
	Cyclo (Ala-Ile)		
	Cyclo (Ala-Leu)		
<i>Ps. aeruginosa</i>	Cyclo (Ala-Val)	激活 AHL 感应器 诱导生物发光	2
<i>C. ferundii</i>	Cyclo (Ala-Val)		
<i>Pr. mirabilis</i>	Cyclo (Ala-Val)	激活 AHL 感应器	2
<i>E. agglomerans</i>	Cyclo (Ala-Val)	诱导生物发光	2
<i>Ps. fluorescens</i>	Cyclo (Phe + Pro)	激活 AHL 感应器	2
<i>Ps. alcaligenes</i>	Cyclo (Phe-Pro)	诱导生物发光	2
<i>Agrobacterium</i>	Cyclo (Pro-Tyr)	诱导生物发光 色素产生	2

激素及调控能量代谢的作用, 环 Pro-Gly 具有抗健忘促进记忆功能。从蚂蚁得到的环 Leu-Phe 能用作自卫或进攻的武器。但从海绵和海星分离到的环二肽生物活性未明。

从真菌曾获得过有抗菌活性的环二肽, 一些真菌来源的含氨基酸衍生物的环二肽显示了抑制肿瘤细胞活性。海岸红树林内生真菌 1356 的环二肽 Pro-Tyr 在假单胞菌和土壤杆菌中都发现过, 并具有诱导生物发光和色素产生的活性。1356 菌的其他环二肽生物活性尚未清楚。

迄今, 关于细菌环二肽生物学功能的报道极少, 直到最近一些细菌环二肽被发现具有细胞间进行通讯的介导作用, 也就是作为信号分子。这无疑是一个引人注目的发现。环 Pro-Tyr, 环 Phe-Pro, 环 Ala-Val 等几个来自细菌的环二肽能够激活酰化高丝氨酸内酯 AHL 的感应系统, 而 AHL 是一种细菌数量感应系统的信号分子。这暗示环二肽分子可作为 AHL 的拮抗分子。

真菌 1356 以及海洋弧菌均产生环 Pro-Tyr, 而在海洋细菌 110 则发现有环 Ala-Val, 这些分子是否也发挥着生态或生理上调控活性, 尚需进一步的查证。另外, 微生物中获得的环二肽是否在高等生物中表现活性, 是一个有趣的研究方向。

参考文献

- [1] Iyer M S, Gigstad K M, Namdev N D, *et al.* *Amino Acids*, 1996, **11** (3~4): 259~268.
- [2] Holden M T G, Chhabra S R, Nys R de, *et al.* *Mol Microbiol.* 1999, **33** (6): 1254~1266.
- [3] Stierle A C, Gardellina J H, Singleton F L. *Experientia* 1988, **44**: 1020~1030.
- [4] Bell R, Carmeli S. *J Nat Prod*, 1994, **57**: 1587~1590.
- [5] Okutani K. *Bull Jap Soc Fish*, 1997 **43**: 995~999.
- [6] Furuya K, Okudaira M, Shindo T, *et al.* *Sankyo kenkyusho Nempo* 1985, **37**: 140~145.
- [7] Jara L J, Prasad C, Espinoza L R. *Lupus* 1997, **6** (3): 258~260.
- [8] Unal C B, Owen M D, Millington W R. *Brain research*, 1997, **747** (1): 52~59.
- [9] Cruz L L, Morgan E D J. *Chemical Ecology* 1997, **23** (3): 705~712.
- [10] Adamczeski M, Reed A R, Crews P. *J Nat Prod*, 1995, **58** (2): 201~208.