

一株南海木榄内生真菌 (*Gloesporium* sp.) 代谢产物的研究

李春远¹, 陈敏¹, 丁唯嘉¹, 林永成², 周世宁³

(1 华南农业大学理学院, 广东广州 510642; 2 中山大学化学与化学工程学院,
广东广州 510275; 3 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275)

摘要:从1株木榄内生真菌(*Gloesporium* sp.)中分离得到4个化合物,利用波谱技术确定其结构分别为环(甘-苯丙)二肽(1)、环(苯丙-酪)二肽(2)、3-(2-甲基丙基)-2,5-哌嗪二酮(3)、苯丙酸(4),其中化合物3、4为首次从海洋真菌中分离得到。

关键词:海洋真菌; 内生真菌; 代谢产物

中图分类号: O629

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)01-0122-03

Study on the Metabolites of Endophytic Fungus (*Gloesporium* sp.) Isolated from *Bruguiera gymnoihiza* Grown in the South China Sea

LI Chun-yuan¹, CHEN Min¹, DING Wei-jia¹, LIN Yong-cheng², ZHOU Shi-ning³

(1 College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3 School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The metabolites of endophytic fungus (*Gloesporium* sp.) isolated from *Bruguiera gymnoihiza* grown in the South China Sea was studied. Four compounds were isolated from the metabolites. Their structures were elucidated by comprehensive spectrometric methods as 3-benzylpiperazine-2, 5-dione (1), 3-benzyl-6-(4-hydroxybenzyl) piperazine-2, 5-dione (2), 3-(2-methylpropyl)-2, 5-piperazinedione (3), 3-phenylpropanoic acid(4). Among of them, compounds 3, 4 were first found from marine fungus.

Key words: marine fungus; endophytic fungus; metabolites

由于海洋环境的特殊性和微生物在生态系统的功能,海洋微生物已经发展出独特的代谢方式,提供了在陆地微生物中未遇到过的代谢产物,使得海洋微生物成为又一个天然活性物质资源的巨大宝库^[1]. 为从海洋微生物中寻找在农业上有应用价值的活性物质,对多株海洋红树林真菌进行了相关性筛选,发现来自南海红树木榄的一株内生真菌(*Gloesporium* sp.)具有较好的促进水稻生长的活性,

因此对其代谢产物做了分离.

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Varian Mercury2Plus 300 (TMS 内标)核磁共振波谱仪为美国瓦里安公司生产, Thermo DSQ 质谱仪为 Thermo Finnigan 公司生产, X4 型显微熔点仪为上海济成分析仪器有限公司生产. 薄层层析和柱层析

收稿日期: 2007-05-09

作者简介: 李春远(1978—),男,讲师,博士, E-mail: chunyuanyuanli@scau.edu.cn

基金项目: 国家“863”科技攻关计划项目(2003AA624010, 2006AA09Z422); 广东省科技计划项目(2003A3040501); 广东省自然科学基金重点基金(021732); 华南农业大学新学科扶持基金(2006X013)

硅胶为青岛海洋化工厂生产。所用溶剂为分析纯。菌株采自中国湛江海域木榄内生真菌(*Gloesporium* sp.),由中山大学周世宁教授提供,菌种保存在中山大学生命科学学院内。发酵培养基为葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 2 g/L,酵母膏 1 g/L,粗海盐 2 g/L,pH 7。

1.2 菌种培养

500 mL 三角瓶,内装培养液 300 mL,经 121 °C 高温灭菌 15 min 后,接种,共培养 150 L,25 °C 静置培养 30 d,过滤,收集发酵液和菌体。

1.3 提取与分离

培养液在 60 °C 下浓缩至 2 L,用 2 L 乙酸乙酯萃取,重复 6 次。提取液浓缩后,经硅胶柱层析,用石油醚-乙酸乙酯、乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱,分别得到化合物 1 (10 mg)、2 (20 mg)、3 (10 mg)、4 (20 mg)。

1.4 结构鉴定

通过分析化合物的氢谱($^1\text{H NMR}$)、碳谱($^{13}\text{C NMR}$)、红外光谱(IR)、快原子轰击质谱(FABMS)等实验数据,并与文献对照,鉴定化合物 1~4 的结构。

2 结果与分析

2.1 实验数据

化合物 1: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2$,170 °C 左右升华。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 ,300 MHz): δ 7.82 (1 H, brs),7.62 (1 H, brs),7.26 (5 H, m),4.15 (1 H, m),3.43 (1 H, dd, $J=17.5,2.5$ Hz),3.17 (1 H, dd, $J=13.0,5.5$ Hz),3.03 (1 H, dd, $J=13.0,5.0$ Hz),2.85 (1 H, d, $J=17.5$ Hz)。 $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , TMS, 75 MHz): δ 166.9 (C),165.4 (C),135.0 (C),129.5 (CH),127.7 (CH),126.3 (CH),55.5 (CH),43.5 (CH_2),39.1 (CH_2)。FABMS (m/z):205。

化合物 2:熔点(m. p.) > 280 °C。IR (KBr) ν_{max} : 3 414,3 205,1 676,1 516,1 458,1 241 cm^{-1} 。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 ,300 MHz): δ 9.22 (s, 1 H),7.99 (brs, 1 H),7.95 (brs, 1 H),7.09~7.22 (m, 5 H),6.86~6.89 (d, $J=8.4$ Hz, 2 H),6.59~6.61 (d, $J=8.4$ Hz, 2 H),3.02 (m, 1 H),2.90 (m, 1 H),2.67 (dd, $J=14.0,4.8$ Hz, 1 H),2.57 (dd, $J=14.0,4.8$ Hz, 1 H)。 $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 167.6 (C),167.4 (C),156.7 (C),136.7 (C),131.7 (CH),130.7 (CH),128.6 (CH),127.2 (CH),126.4 (CH),115.5 (CH),55.8 (CH),55.3 (CH),38.2 (CH_2),38.0 (CH_2)。

化合物 3: m. p. 254 ~ 255 °C。FABMS m/z

171, $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 ,300 MHz): δ 8.19 (1 H, s),7.93 (1 H, s),0.86 (3 H, d, 6.7 Hz),0.88 (3 H, d, 6.7 Hz),1.52 (dd, 2 H, 6.7 Hz),1.76 (m, 6.7 Hz),3.61 (overlap, 2 H),3.79 (overlap, 1 H)。 $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 166.9,166.2,53.7,45.0,43.0,24.4,23.7,22.6。

化合物 4: m. p. 48.5 °C, $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6 ,75 MHz) δ 179.3,30.6,35.7,128.4,128.1,128.4,126.2,140.0。 $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6 ,300 MHz) δ 2.73 (t,7.5 Hz, 2 H),3.01 (t,7.5 Hz, 2 H),7.34 (overlap, 5 H)。

2.2 结构鉴定

化合物 1:白色颗粒晶体。FABMS 显示分子离子峰 205 $[\text{M} + \text{H}]^+$,结合 $^{13}\text{C NMR}$ 和 $^1\text{H NMR}$ 推断化合物分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 $^1\text{H NMR}$ 在 δ 7.21~7.30 有 5 个烯氢,结合 $^{13}\text{C NMR}$ 说明分子中有一单取代苯环。 $^{13}\text{C NMR}$ 中 δ 167.7 和 166.2 是 2 个羰基,结合 $^1\text{H NMR}$ 在 δ 8.14 和 7.88 的活泼氢,及 IR (KBr) ν_{max} 1 678 cm^{-1} 可知含有 2 个酰胺键。化合物的不饱和度为 7,去掉苯环的 4 个不饱和度和 2 个酰胺的不饱和度,还应有 1 个环, $^1\text{H NMR}$ δ 3.07 (dd, $J=4.5,13.0$ Hz, 1 H),2.88 (dd, $J=4.5,13.0$ Hz, 1 H) 是 1 个 CH_2 上的 2 个氢位移。另外,分子还有 1 个 CH 和 1 个 CH_2 。由此推出化合物 1 是甘氨酸和苯丙氨酸组成的环二肽。其理化数据与文献[2]对照基本一致,鉴定为环(甘-苯丙)二肽,其分子结构见图 1。

化合物 2:白色固体, m. p > 280 °C。 $^1\text{H NMR}$ δ 6.86~6.89 (d, $J=8.4$ Hz, 2 H) 和 δ 6.59~6.61 (d, $J=8.4$ Hz, 2 H) 表明存在一对对二取代苯环, δ 7.09~7.22 (m, 5 H) 表明分子中有 1 个单取代苯环。 δ 7.99 (brs, 1 H),7.95 (brs, 1 H) 处是 NH 信号,结合碳谱中 δ 167.6、167.4 处羰基及 IR (KBr) ν_{max} 1 676 cm^{-1} 的酰基峰,推测化合物 2 为环肽化合物。从 IR (KBr) ν_{max} 3 414 cm^{-1} 的吸收峰可知,氢谱中的 δ 9.04 (s, 1 H) 是酚羟基。与文献[3] $^1\text{H NMR}$ (未给出 $^{13}\text{C NMR}$ 数据)对照一致,鉴定为环(苯丙-酪)二肽,其分子结构见图 1。

化合物 3:白色针状晶体。 $^{13}\text{C NMR}$ 结合 DEPT 表明分子中有 2 个甲基、2 个次甲基、2 个亚甲基和 2 个羰基碳, $^1\text{H NMR}$ 在 δ 8.19 (1 H, s),7.93 (1 H, s) 有 2 个活泼 H,判断是酰胺的 H,结合 FABMS 提供的分子离子峰 171 $[\text{M} + \text{H}]^+$,推出分子式为 $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ 。除掉 2 个羰基的不饱和度,分子还有 1 个环,因此化合物 3 是环二肽。对照文献[4]的标准数据,基本一致,表明化合物 3 是 3-(2-甲基丙基)-2,

5-哌嗪二酮,其分子结构见图1。

化合物4:无色针状晶体,熔点 48.5 °C,薄层检视在 254 nm 有紫外,展开有彗星状拖尾,结合碳谱 δ 179.3 的羰基以及氢谱 δ 10.74 (brs, 1 H) 的活泼 H, 判断是有机酸。碳谱 δ 30.6、35.7 是 2 个 CH_2 , 根据

氢谱 δ 2.73 (t, 7.5 Hz, 2 H), 3.01 (t, 7.5 Hz, 2 H) 的偶合情况表明二者相互连接。结合碳谱 δ 128.4 (高), 128.1, 128.4 (高), 126.2 (低) 3 个 CH 信号及 H 谱积分情况表明分子有一苯环, 就此确定化合物 4 为苯丙酸, 其分子结构见图 1。

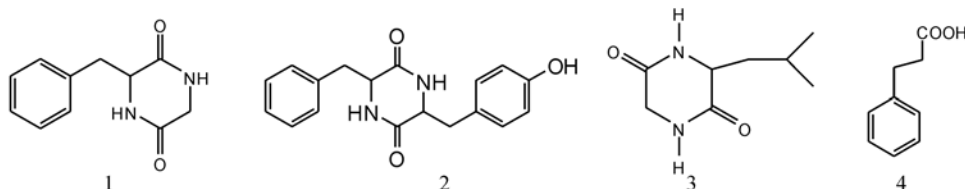


图1 化合物1~4的分子结构

Fig. 1 The structures of compound 1-4

3 结论

从该菌培养液的乙酸乙酯萃取部分得到 4 个化合物, 分别鉴定为环(甘-苯丙)二肽(1)、环(苯丙-酪)二肽(2)、3-(2-甲基丙基)-2,5-哌嗪二酮(3)、苯丙酸(4), 化合物 3、4 为首次从海洋真菌中分离得到。

有关单体化合物的活性正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 林永成. 海洋微生物及其代谢产物 [M]. 北京: 化学

工业出版社, 2003: 11.

- [2] 尹文清, 林永成, 周世宁. 南海海洋真菌 2516 号中的环肽成分 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2002, 41 (4): 56-58.
[3] 李厚金, 林永成, 周世宁, 等. 红树林内源真菌 2524 号的肽类成分 (I) [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2002, 41 (1): 110-112.
[4] KOPPLE K D, OHNISHI M. Conformations of cyclic peptides; II. Side-chain conformation and ring shape in cyclic dipeptides [J]. J Am Chem Soc, 1969, 91 (4): 962-970.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 121 页)

木材阻燃效果越好。SBB 阻燃效果略逊于 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 。 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和 SBB 两药剂的同时作用形成具协同效应的阻燃体系, 提高阻燃效果。 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 与 SBB 质量比 1:3 且 $w = 10\%$ 处理的试材阻燃性能最佳, 燃烧质量损失率为 5.19%, 平均有焰燃烧时间为 0。

参考文献:

- [1] 李志娟, 李青山, 杨德治. 走向 21 世纪的新型阻燃剂 [J]. 化学工程师, 2001 (4): 36.
[2] 杨文斌, 吴纯初, 顾练百. 木材阻燃的回顾与展望 [J]. 林业机械与木工设备, 2000 (4): 4-6.
[3] 刘其梅, 彭万喜, 张明龙, 等. 木质材料阻燃技术研究现状与趋势 [J]. 世界林业研究, 2006, 19 (1): 42-46.
[4] OLOYEDE A, GROOMBRIDGE P. The influence of microwave heating on the mechanical properties of wood [J]. Materials Processing Technology, 2002 (100): 67-73.
[5] GARABA B. Effect of zinc borate as flame retardant for-

mulation on some tropical woods [J]. Polymer Degradation and Stability, 1999 (64): 517-522.

- [6] 骆介禹, 苗国平. 硼酸锌的合成及对木材阻燃性的研究 [J]. 阻燃材料与技术, 1992 (1): 5-9.
[7] 骆介禹. 木材阻燃的概况 [J]. 林产工业, 2000, 27 (2): 7-9.
[8] 中国标准出版社. 中国林业标准汇编: 木材与木制品卷 [G]. 北京: 中国标准出版社, 1998: 84-148.
[9] 刘燕吉. 木质材料燃烧性能检测方法及有关法规 [J]. 木材工业, 1997, 11 (3): 33-36.
[10] 李淑君, 王清文, 侯建敏. 三种木材阻燃剂对木材吸湿性及尺寸稳定性影响的比较研究 [J]. 东北林业大学学报, 1999, 27 (6): 34-37.
[11] 吴玉章, 原田寿郎. 磷酸铵盐处理人工林木木材的燃烧性能 [J]. 林业科学, 2005, 41 (2): 112-116.
[12] 殷宁. 水溶性复方处理剂提高木材阻燃性的研究 [J]. 北京林业大学学报, 1998, 20 (5): 28-32.

【责任编辑 李晓卉】