

2 株红树内生真菌混合发酵培养液中 代谢产物的分离鉴定

李春远¹, 张杰¹, 钟嘉升¹, 何炳坚¹, 黎荣棠¹, 梁煜潮¹, 林永成², 周世宁³

(1 华南农业大学理学院, 生物材料研究所, 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:将混合发酵技术应用于南海红树林内生真菌 E33 和 K38 代谢产物的培养, 从该提取物中分离到 5 个化合物, 利用波谱技术确定其结构分别为 2-甲酰基-3,5-二羟基-4-甲基苯甲酸(化合物 1)、6,8-二羟基-4-乙酰基异香豆素(化合物 2)、5-羟基-6,8-二甲氧基-2,3-二甲苯-4H-萘-[2,3-b]-吡喃-4-酮(化合物 3)、7,22-(E)-二烯-3,5,6-三羟基麦角甾醇(化合物 4)、甘露醇(化合物 5)。其中, 化合物 1、2 和 3 以往鲜见从海洋真菌中分离到的报道。

关键词:海洋真菌; 内生真菌; 混合发酵; 代谢产物

中图分类号: O629

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)01-0117-03

Isolation and Identification of the Metabolites from the Mixed Fermentation Broth of Two Mangrove Endophytic Fungi

LI Chun-yuan¹, ZHANG Jie¹, ZHONG Jia-sheng¹, He Bing-jian¹,

LI Rong-tang¹, LIANG Yu-chao¹, LIN Yong-cheng², ZHOU Shi-ning³

(1 Institute of Biomaterial, College of Science, 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: Mixed fermentation technique was applied to culture two marine derived mangrove endophytic fungi K38 and E33 from the South China Sea coast. Five secondary metabolites were isolated from the crude extracts. Their structures were elucidated by spectral methods as 2-formyl-3,5-dihydroxy-4-methylbenzoic acid (compound 1), 6,8-dihydroxy-4-acetylisocoumarin (compound 2), 5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-4H-naphtho-[2,3-b]-pyran-4-one (compound 3), 7,22-(E)-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol-ergosta (compound 4) and mannitol (compound 5). Among them, there were no previous report about compounds 1,2 and 3 isolated from marine fungi.

Key words: marine fungus, entophytic fungus; mixed fermentation; metabolites

海洋微生物已成为寻找新药先导化合物的新源泉^[1]。红树林内生真菌兼具海洋真菌和植物内生菌的特点, 与其他微生物一样, 很多红树林内生真菌只是在特定条件下才会发展出独特的代谢方式并产生特

殊的化学成分, 因此仍需发展新技术和手段以寻找更多的新颖活性代谢产物。混合发酵技术被应用在食品 and 酶工业上以提高产量, 但极少应用在微生物代谢产物的发现上, 为寻找新的有活性天然产物, 本

收稿日期: 2010-05-29

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

基金项目: 863 计划项目(2006AA09Z422, 2006AA09Z419); 广东省自然科学基金(9451064201003751, 9151027501000055); 华南农业大学“211 工程”三期重点建设项目(2009B010100001); 华南农业大学 2010 年度大学生创新实验计划(L10039)

研究将该方法用在被系统研究证明有较强代谢能力的部分红树内生真菌上. 内生真菌 K38 和 E33 分别采集自我国湛江红树植物秋茄 *Kandelia candel* 叶片及麒麟菜 *Eucheuma muricatum* 枝干. 我们在对 2 株菌代谢产物的系统研究中, 得到十多种化合物^[2-6]. 本课题组在进一步开展 2 株菌混合发酵产物的研究中, 分离鉴定了 5 种化合物, 其中 2-甲酰基-3,5-二羟基-4-甲基苯甲酸(化合物 1)、6,8-二羟基-4-乙酰基异香豆素(化合物 2)、5-羟基-6,8-二甲氧基-2,3-二甲基-4H-萘-[2,3-*b*]-吡喃-4-酮(化合物 3) 以往鲜见从海洋真菌分离到的报道, 且未从单独发酵的 K38 和 E33 菌中获得过, 7,22-(*E*)-二烯-3,5,6-三羟基麦角甾醇(化合物 4)、甘露醇(化合物 5) 曾在 K38 的菌丝体中分离到.

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. HREIMS 测试用 VG Autospec-500 质谱仪由美国 Beckman 公司生产; Bruker VECTOR22 红外波谱仪由德国布鲁克公司生产; 薄层层析和柱层析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, 由中山大学周世宁教授提供, 保存在中山大学化学与化学工程学院内. 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, 25 °C 静置培养 30 d, 过滤, 收集发酵液和菌体, 共培养 60 L.

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 (20 mg)、化合物 2 (20 mg)、化合物 3 (10 mg)、化合物 4 (20 mg) 和化合物 5 (150 mg).

1.4 结构鉴定

通过分析化合物的氢谱 (¹H NMR), 碳谱 (¹³C NMR), 红外光谱 (IR), 质谱 (EIMS, HREIMS) 等试验数据, 鉴定了化合物 1~5 的结构.

2 结果与分析

2.1 试验数据

化合物 1: C₉H₈O₅, 无色针状晶体. 熔点 (mp)

264 °C, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.80 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 11.46 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 2.01 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 195.7, 167.1, 162.9, 134.0, 113.9, 111.2, 110.4, 7.6. ES-IMS (*m/z*): 195, 151.

化合物 2: C₁₁H₈O₅, 无色针状晶体. mp 240~241 °C, HREIMS [M]⁺ 220.0372. ¹H NMR (acetone-*d*₆, 300 MHz) δ 2.53 (s, 3H), 6.47 (d, 2.4 Hz, 1H), 7.73 (d, 2.4 Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 9.81 (br s, 1H), 11.1 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 196.4, 166.4, 163.7, 163.3, 155.1, 135.1, 116.9, 104.1, 102.6, 98.5, 28.5. IR (KBr) ν_{max}: 3 422, 3 188, 1 685, 1 651, 1 165 cm⁻¹.

化合物 3: 黄色针状晶体, mp 195~197 °C, ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 15.22 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.57 (d, 2.4 Hz, 1H), 6.37 (d, 2.4 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.03 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 184.13, 167.40, 162.61, 161.50, 160.62, 153.30, 141.09, 119.22, 108.40, 104.21, 101.04, 97.80, 97.23, 56.08, 55.40, 23.12, 20.68. EIMS (*m/z*): 300 [M]⁺, 282, 271, 254, 229.

化合物 4: 白色固体, mp 242~244 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 5.35 (1H, m), 5.20 (2H), 4.07 (m, 1H), 3.62 (brs, 1H), 2.14 (dd, 8.0, 6.5 Hz, 1H), 2.10~2.00, (m, 2H), 2.01~1.80 (m, 4H), 1.80~1.70 (m, 2H), 1.70~1.20 (m, 1H), 1.09 (s, 3H), 1.03 (d, 6.0 Hz, 3H), 0.92 (d, 6.5 Hz, 3H), 0.84 (d, 7.5 Hz, 3H), 0.83 (d, 6.5 Hz, 3H), 0.60 (s, 3H).

化合物 5: 无色针状结晶, mp 164-165 °C. IR ν_{max} (KBr): 3 432, 1 615, 1 454, 1 401, 1 078, 885, 589 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, TMS): 3.37 (ddd, 11, 5.5 Hz, 1H), 3.45 (ddd, 8.5, 5.5 Hz, 1H), 3.54 (t, 7.5 Hz, 1H), 3.60 (ddd, 11.0, 8.5, 3.5 Hz, 1H), 4.08 (d, 7.0 Hz, 1H), 4.26 (t, 5.5 Hz, 1H), 4.34 (d, 5.5 Hz, 1H).

2.2 结构鉴定

化合物 1, 无色针状结晶 (丙酮), mp 264 °C, 用硅胶柱 [V(石油醚): V(乙酸乙酯) = 3:1] 洗脱获得, TLC [V(石油醚): V(乙酸乙酯) = 2:1] 展开, 紫外灯下显彗星状斑点, 碘缸里斑点变白色, 表明该化合物为有机酸或碱, 测其 pH 呈酸性, 表明该化合物含有羧基. 对化合物溶液滴加三氯化铁-铁氰化钾显蓝色, 与 2,4-二硝基苯肼反应, 溶液中出现砖红色絮状沉淀, 提示分子中含有酚羟基和醛基. 根据 ¹H NMR 的积分, 排除干扰峰, 可以明显地识别出 δ

12.80(s,1H)和10.35(s,1H)是活泼H信号, δ 7.02(s,1H)初步判断是芳香H信号, δ 2.01(s,3H)是与芳香环相连的甲基信号。 ^{13}C NMR(150 MHz, DMSO- d_6)在低场区 δ 195.7是醛基信号, δ 167.1初步判断是羧基的信号, δ 7.6对应芳香环上甲基信号,剩余6个C推测为1个苯环,由于分子中苯环上只有1个H未被取代,根据ESIMS给出的分子离子峰195[M-H] $^+$,结合碳谱、氢谱及上述分析,表明化合物1分子式为 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_5$,因此结构式中还有1个羟基,即推测化合物1苯环上5个H分别被1个羧基、2个羟基、1个醛基、1个甲基取代。进一步与文献[7]数据对照基本一致,确定化合物1为2-乙酰基-3,5-二羟基-4-甲基苯甲酸。其分子结构见图1。

化合物2,无色针状结晶(丙酮),mp 240~241 $^\circ\text{C}$ 。HREIMS给出相对分子质量220.0372,分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$ 。 ^{13}C NMR结合DEPT可以看出分子中包括3个芳香CH,以及1个 CH_3 和7个季C, δ 196.4是羰基C,和双键发生共轭。 ^1H NMR显示 δ 6.47(d,2.4 Hz,1H)和7.73(d,2.4 Hz,1H)是苯上2个间位的H, δ 8.49(s,1H)的H从化学位移值判断参与了共轭。 δ 9.81(brs,1H)和11.1(s,1H)结合IR 3422 cm^{-1} 吸收判断是2个羟基,其中 δ 11.1(s,1H)高尖峰是和羰基形成氢键的—OH, ^{13}C NMR中 δ 166.4的C初步判断是酯羰基。因此化合物2可能是异香豆素类。 ^1H NMR δ 2.53(s,3H)表明分子的一 CH_3 与双键或羰基连接。由此查阅文献[8],对照有关物理常数和波谱数据,基本一致,确定化合物2为6,8-二羟基-4-乙酰基异香豆素。其分子结构见图1。

化合物3,黄色针状晶体。EIMS谱给出分子离子峰 m/z 282[M] $^+$,结合氢谱和碳谱,推出分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$,不饱和度为10。碳谱存在10个季C(其中 δ 184.13的羰基C与双键共轭),3个CH,4个 CH_3 。除去双键和羰基所占的7个不饱和度,分子应具有三环结构。 ^1H NMR δ 6.57(1H,d,2.4 Hz)和6.37(1H,d,2.4 Hz)是苯环上互为间位的H,分子中4个 CH_3 从位移上看 δ 56.08(OCH_3 -6)和55.40为 OCH_3 , δ 23.12和20.68为与双键相连的 CH_3 , ^1H NMR δ 15.22(1H,s)高尖峰是和羰基形成氢键的—OH,分子式中剩余的1个O表明分子中存在1个吡喃环,由此写出可能的结构式,查阅文献[9],对照波谱数据,基本一致,确定化合物3为5-羟基-6,8-二甲氧基-2,3-二甲基-4H-萘-[2,3-*b*]-吡喃-4-酮。其分子结构见图1。

化合物4,无色针状晶体,硅胶柱分离用V(乙酸乙酯):V(石油醚)=3:1洗脱得到。其 ^1H NMR与微生物代谢产物中广泛存在的麦角甾醇的氢谱类似,与麦角甾醇的氢谱不同的是在低场出现了3个活泼H,推测可能是三羟基麦角甾醇。查阅文献[10],对照波谱数据,基本一致。化合物4确定为7,22-(*E*)-二烯-3,5,6-三羟基麦角甾醇。其分子结构见图1。

化合物5极易溶于水和DMSO,mp164~165 $^\circ\text{C}$,在紫外灯下和碘中均不显色。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , TMS)谱只在 δ 3.36~4.34之间有吸收峰。分析可能为甘露醇,查阅文献[11],对照波谱数据,基本一致。确定为甘露醇。其分子结构见图1。

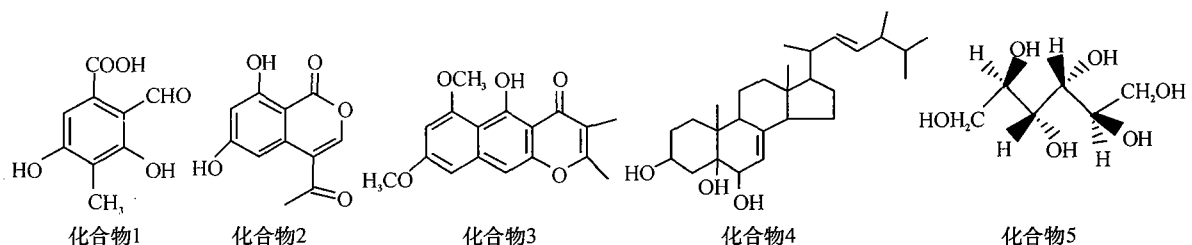


图1 化合物1~5的分子结构

Fig. 1 The structures of compound 1-5

3 结论

从该菌培养液的乙酸乙酯萃取部分得到5个化合物,分别鉴定为2-乙酰基-3,5-二羟基-4-甲基苯甲酸(化合物1)、6,8-二羟基-4-乙酰基异香豆素(化合物2)、5-羟基-6,8-二甲氧基-2,3-二甲基-4H-萘-[2,3-*b*]-吡喃-4-酮(化合物3)、7,22-(*E*)-二烯-3,5,6-三羟基麦角甾醇(化合物4)和甘露醇(化合物5)。化合物1、2、3以往

鲜见从海洋真菌中分离到的报道。化合物4、5曾从单独发酵的K38菌株中分离得到。根据文献报道,化合物1能抑制稻瘟霉分生孢子生长,最低抑菌浓度为 $3.06\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,同时还能使稻瘟霉菌丝体变形,出现多分枝现象,最低变形浓度为 $1.53\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [12],因此判断该化合物可能是混合发酵液乙酸乙酯提取物表现出抑制稻瘟霉活性的原因之一。化合物1~5的相关生物活性尚在继续研究中。

(下转第123页)

林分凋落物显著增加了土壤有机质和氮,促进了微生物的活动,增强了酶的活性,对土壤肥力改善具有积极的作用,有利于林木的健康生长。

参考文献:

- [1] DICK R P. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health [M] // PANKHURST C E, DOUBE B M, GUPTA V V S R. Biological Indicators of Soil Health. Wallingford: CAB International, 1997: 21-156.
- [2] DENG Shi-ping, TABATAI M A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. III. Phosphatases and arylsulphatases [J]. Biol Fertil Soils, 1997, 24: 141-146.
- [3] BANDICK A K, DICK R P. Field management effects on soil enzyme activities [J]. Soil Biol Biochem, 1999, 31: 1471-1479.
- [4] CHAPMAN S J, CAMPBELL C D, PURI G. Native woodland expansion; Soil chemical and microbiological indicators of change [J]. Soil Biol Biochem, 2003, 35: 753-764.
- [5] 陈金林, 罗汝英, 俞元春. 杉木、马尾松、甜槠等林分下土壤养分状况研究 [J]. 林业科学研究, 1998, 11(6): 586-591.
- [6] 刘春华, 吴奇镇. 马尾松木荷混交林林分结构和土壤肥力研究 [J]. 防护林科技, 2002(4): 19-21.
- [7] 薛立, 陈红跃, 徐英宝, 等. 混交林地土壤物理性质与微生物数量及酶活性的研究 [J]. 土壤通报, 2004, 35(2): 154-158.
- [8] 薛立, 赖日石, 陈红跃, 等. 深圳宝安区生态风景林典型造林地土壤养分、微生物和酶活性的研究 [J]. 林业科学研究, 2002, 15(2): 242-246.
- [9] 郑诗樟, 肖青亮, 吴蔚东, 等. 丘陵红壤不同人工林型土壤微生物类群、酶活性与土壤理化性状关系的研究 [J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(1): 57-61.
- [10] NIKES D G. Genetic improvement of low land tropical conifers [M]. Rome: FAO, 1979.
- [11] ZHENG Yong-qi, WANG Huo-ran. Genetic resources and breeding of *Pinus caribaea* in China [C] // International Union of Forest Research Organizations. Forests and Society: the Role of Research, Abstracts of group discussions vol. 2, XXI IUFRO World Congress 2000. Kuala Lumpur, Malaysia: IUFRO, 2000: 46.
- [12] 朱志淞, 丁衍畴, 王观南, 等. 加勒比松 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1986: 122-158.
- [13] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析 [J]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978.
- [14] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2000.
- [15] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [16] 关松荫. 土壤酶及其研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [17] 郑郁善, 黄宝龙. 福建含笑杉木混交林生物量和土壤肥力的研究 [J]. 南京林业大学学报, 1998, 22(2): 49-52.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 119)

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.
- [2] 李春远, 杨瑞云, 林永成, 等. 海洋真菌 K38 号代谢产物的研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(1): 67-70.
- [3] LI Chun-yuan, YANG Rui-yun, LIN Yong-cheng, et al. A new nonadride derivative from mangrove fungus (strain No. K38) [J]. J Asian Nat Prod Res, 2007, 9(3): 285-291.
- [4] 李春远, 余志刚, 林永成, 等. 红树林真菌 E33 代谢产物的分离及衍生物的制备 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(6): 52-54.
- [5] LI Chun-yuan, DING Wei-jia, SHE Zhi-gang, et al. A new biphenyl derivative from an unidentified marine fungus E33 [J]. Chem Nat Compd, 2008, 44(2): 163-165.
- [6] 李春远, 丁唯嘉, 陈敏, 等. 来自红树林内生真菌 #E33 中的一个新的水杨酸衍生物 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2008, 47(1): 121-122.
- [7] KIMURA Y, YOSHINARI T, KOSHINO H, et al. Rubralactone, rubralides A, B and C, and rubramin produced by *Penicillium rubrum* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(8): 1896-1901.
- [8] KIM S, FAN G, LEE J, et al. Synthesis of 4-acetyliscoumarin: First total syntheses of AGI-7 and sescandelin [J]. J Org Chem, 2002, 67: 3127-3130.
- [9] MACIAS M, ULLOA M, GAMBOA A, et al. Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *Guanomyces polythrix* [J]. J Nat Prod, 2000, 63(6): 757-761.
- [10] 杨瑞云, 李春远, 林永成, 等. 南海马尾藻 (*Sargassum* sp.) 内生真菌 No. ZZF36 中甾醇化合物的研究 [J]. 中药材, 2006, 29(9): 908-909.
- [11] KAWAGISHI H, KATSUMI R, SAZAWA T, et al. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei* [J]. Phytochemistry, 1988, 27(9): 2777-2779.
- [12] 张祎, 王涛, 裴月湖, 等. 土壤真菌 07-11 号菌株中的酚酸性成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(5): 353-355.

【责任编辑 李晓卉】