

红树林内生真菌 K38 和 E33 混合发酵代谢产物研究*

李春远¹, 佘志刚², 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来自南海红树林内生真菌 E33 和 K38 的培养, 其发酵液乙酸乙酯萃取物对多种植物病原菌有较强抑制活性, 从该提取物中分离到 deoxyscytalidin (1), 1-甲氧基-2-羟基-3-甲基蒽醌(2), 5-丁基-2-吡啶甲酸甲酯(3), 5-(3-丁烯基)-2-吡啶甲酸甲酯(4), sescandelin (5) 五个单独培养未能得到的代谢产物, 其中化合物 1, 2, 3, 4 为首次从海洋真菌里得到。

关键词: 红树林内生真菌; 混合发酵; 抗真菌活性

中图分类号: O629 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2010) 06-0136-04

Studies on Metabolites from the Mixed Fermentation Products of Two Mangrove Endophytic Fungi K38 and E33

LI Chunyuan¹, SHE Zhigang², LIN Yongcheng², ZHOU Shining³
(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. College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The technique of mixed fermentation was applied to culture two mangrove endophytic fungi K38 and E33 from the South China Sea Coast. The crude extracts from the fermentation liquids extracted by ethyl acetate showed significant inhibitory activities to several plant pathogens. Five secondary metabolites were isolated from this crude extracts, which did not obtained from these two strains by pure fermentation before. Their structures were elucidated by spectral methods to be deoxyscytalidin (1), 2-hydroxy-1-methoxy-3-methylanthracene-9, 10-dione (2), methyl 5-butylpicolinate (3), methyl 5-(but-3-enyl) picolinate (4), sescandelin (5). Compound 1, 2, 3, 4 were found in marine fungi for the first time.

Key words: mangrove endophytic fungi; mixed fermentation; antifungal activity

由于海洋环境的特殊性和微生物在生态系统的功能, 海洋微生物已发展出独特的代谢方式, 并提供了陆生微生物未遇到过的代谢产物。海洋微生物已成为寻找新药先导化合物的新源泉^[1]。红树林独特的生理和生态使其成为海洋微生物(特别是

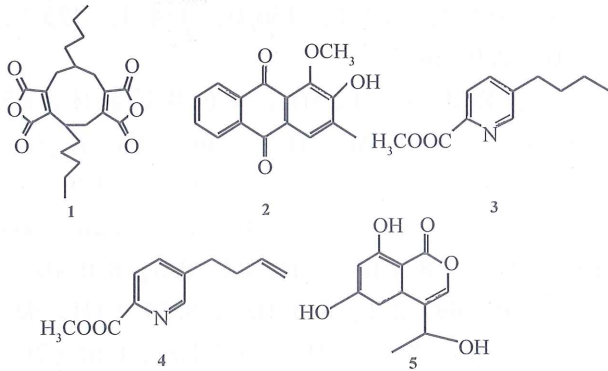
海洋真菌)丰富的聚集地, 对红树林内生真菌的研究表明, 从中有可能找到新的生物控制剂和药物。内生真菌 K38 和 E33 分别采集自我国湛江湿地红树植物秋茄叶片及麒麟菜枝干, 二者单独发酵的粗提物基本不显示抗菌活性, 由于它们在相同培

* 收稿日期: 2010-04-19

基金项目: 国家“863”科技攻关计划资助项目(2006AA09Z422, 2006AA09Z419); 广东省自然科学基金资助项目(9451064201003751, 9151027501000055); 华南农业大学“211工程”三期重点建设项目(2009B010100001)

作者简介: 李春远(1978年生), 男, 博士, 副教授; 通讯作者: 佘志刚, 林永成; E-mail: ceshzhzg@mail.sysu.edu.cn

养条件 (GYT 培养基, 室温) 下均生长良好, 因此对其进行了混合发酵, 生测结果表明发酵液乙酸乙酯萃取物对小麦赤霉、香蕉炭疽、荔枝霜疫霉等多种危害农业和水果的病菌显示出较强的抗菌作用。为解释上述现象产生的机制, 前期分别系统研究了两株菌的代谢产物, 分离得到十多种化合物^[2-6]。本研究在上述基础上进一步开展了两株菌混合发酵产物的研究, 共分离鉴定了 8 种化合物, 其中 deoxyscytalidin (1), 1-甲氧基-2-羟基-3-甲基蒽醌 (2), 5-丁基-2-吡啶甲酸甲酯 (3), 5-(3-丁烯基)-2-吡啶甲酸甲酯 (4), sescandelin (5) 以往未从单独发酵的两株菌中分离到, 化合物 1, 2, 3, 4 为首次从海洋真菌里获得。麦角甾醇、过氧化麦角甾醇及尿嘧啶以往曾在 E33 菌中分离得到。



1 结果与讨论

化合物 1 的快原子轰击质谱给出准分子离子峰 389 $[M+H]^+$, 元素分析 ($w/\%$) C 67.31%, H 8.20%, N 0, 与理论值 C 67.32%, H 8.22%, N 0 对比并结合碳谱, 推出分子式 $C_{22}H_{28}O_6$, 计算不饱和度为 9。碳谱结合 DEPT 谱可以看出 22 个碳中有 2 个季碳, 2 个次甲基碳, 10 个亚甲基碳和 2 个甲基碳, δ 165.54, 165.34, 165.30, 164.91 的季碳提示分子中有 4 个酯羰基存在, 由于分子没有这么多 O, 推测分子中可能存在 2 个酸酐。 δ 144.24, 143.47, 143.27, 143.25 的季碳提示分子中有 2 个双键存在, 剩余的不饱和度表明分子中还有 3 个环存在, 很容易联想到可能有五元的酸酐环存在。 1H NMR 中 δ 0.86 和 0.80 的 2 个三重峰以及 ^{13}C NMR 中 2 个 CH_3 和众多 CH_2 的存在, 提示分子中可能存在 2 条烷基链。由此判断出该化合物的结构与以往分离到 (-)-byssochlamic acid 非常相似^[2], 只是 2 条烷基链的长度不同, 对照文献

[7] 数据基本一致, 确定化合物 1 为 deoxyscytalidin。

化合物 2 为黄色针状晶体, EI-MS 谱给出分子离子峰 m/z 268 $[M]^+$, 结合氢谱和碳谱, 推出其分子式为 $C_{16}H_{12}O_4$, 计算不饱和度为 11。碳谱提示存在 9 个季碳 (其中 2 个羰基碳), 5 个 CH , 2 个 CH_3 。具有典型的蒽醌骨架特征, 并解释了所有不饱和度。氢谱中 2 个甲基均为单峰, 从位移值判断 δ 3.94 (s, 3H) 为甲氧基, 2.45 (s, 3H) 为甲基, 在 δ 8.20 (1H, m), 8.16 (1H, m), 7.79 (2H, m) 出现的 4 个芳香质子之间的多重峰及偶合常数, 表明它们之间是同一苯环上四个互相处于邻位 H。另外在 δ 7.89 (1H, s) 是另一个苯环上的 H。进一步与文献 [8] 对照, 确证其结构为 1-甲氧基-2-羟基-3-甲基蒽醌。

化合物 3 的快原子轰击质谱给出其准分子离子峰 194 $[M+H]^+$, 结合元素分析推出分子式 $C_{11}H_{15}NO_2$ 。 1H NMR 中 2.69 (2H, t, 7.3 Hz), 1.61 (2H, tt, 7.3 Hz), 1.38 (2H, qt, 7.3 Hz), 0.94 (3H, t, 7.3 Hz) 几组 H 之间的偶和关系, 表明分子中的 CH_3 与 3 个 CH_2 互相连接成一个丁基链。薄层层析展开没有拖尾现象, 结合 1H NMR δ 4.00 (3H, s) 的活泼 H, 推测分子中可能有一个甲氧基, 剩余的不饱和度提示分子中可能存在一个芳香环, 1H NMR 中 δ 8.05 (1H, dd, 0.5, 8.0 Hz), 7.62 (1H, dd, 2.1, 8.0 Hz), 8.55 (1H, dd, 2.1, 0.5 Hz) 证明了这一推论。该化合物 1H NMR 数据与我们以往在 K38 中发现的 5-丁基-2-吡啶甲酸十分相似, 由此推测该化合物为 5-丁基-2-吡啶甲酸的甲酯化产物。据此查阅文献 [9], 对照相关数据基本一致, 确定化合物 3 的结构为 5-丁基-2-吡啶甲酸甲酯。

化合物 4 薄层层析斑点与 3 类似, 1H NMR 在低场部分也十分类似, 推测可能为类似物。 1H NMR δ 5.80 (2H, ddt, 7.3, 16.8 Hz), 5.02 (1H, ddt, 1.4, 8.0, 16.8 Hz), 5.01 (1H, ddt, 1.4, 8.0, 10.6 Hz) 的偶和情况及化学位移表明与 3 不同的是有一个不参与共轭的末端双键。判断出分子中存在一个丁烯基。由此推测该化合物为 5-(3-丁烯基)-2-吡啶甲酸的甲酯化产物。进一步与文献 [9] 标准数据对照基本一致, 证明化合物 4 为 5-(3-丁烯基)-2-吡啶甲酸甲酯。

化合物 5 是白色粉末状固体, 溶解于丙酮中, 用硅胶薄层层析展开, 在 254 nm 紫外光下显示很强的荧光斑点。电喷雾质谱显示分子离子峰为 221 $[M-H]^+$, ^{13}C NMR 结合 DEPT 谱可以看出分子中

共有 11 个碳, 其中包括 3 个芳香 CH, 以及 1 个 CH₃ 和 6 个季碳, δ 65.7 是连 O 的 CH。¹H NMR 显示 δ 6.50 (d, 2.1 Hz, 1H) 和 δ 6.74 (d, 2.1 Hz, 1H) 是苯上两个间位的 H, δ 7.43 (s, 1H) 的 H 参与了共扼体系。 δ 11.91 高尖峰是和羰基形成氢键的 -OH, ¹³C NMR 中具有 δ 167.50 左右的碳初步判断是酯羰基。推测该化合物可能是异香豆素类化合物。¹H NMR δ 9.70 (s, 1H), δ 4.46 (s, 1H) 有可能是 -OH。 δ 1.52 (d, 7 Hz, 3H) 表明分子的 CH₃ 是和一个 CH 连接的, 分子中 CH 只有一个 δ 65.7, 对应¹H NMR δ 4.86 (overlap, 1H) 表明该 H 还连有 O, 断定该碳可能是和酯羰基 O 直接连, 也可能是连接了一个羟基。由此查阅文献 [10], 对照有关物理常数和波谱数据基本一致, 确定化合物 5 为 sescandelin。

麦角甾醇、过氧化麦角甾醇及尿嘧啶通过与标准品进行熔点及薄层对照得到确认。

2 实验部分

2.1 试剂与实验仪器

葡萄糖 (CP)、蛋白胨、酵母膏 (BR)、乙酸乙酯 (AR)、石油醚 (AR)、甲醇 (AR) 等为市售。结构测定仪器: Bruker 600NB 核磁共振仪, VG-2ABB-HS 质谱仪, 北京 X4 型显微熔点仪, Bruker EQUINOX55-A590P3E 红外光谱仪, 日本岛津公司 UV-2501PC 紫外-可见吸收光谱仪

2.2 菌种及细胞

真菌 E33 和 K38 分别为南海红树林麒麟菜和秋茄内分离出的真菌, 种属未定, 保藏在中山大学化学学院和生命科学学院。

2.3 菌种发酵培养

同时将两株菌等量接种在培养培养基中, 菌种发酵培养基的配比及发酵方法同文献 [2], 共培养 120 L。

2.4 分离

发酵液过滤, 滤液在 50 °C 下浓缩到 5 L, 乙酸乙酯提取多次, 合并浓缩乙酸乙酯提取液得提取物 50 g。提取物经硅胶柱层析, 石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱, 在 φ 为 8%~12% 的梯度下得化合物 1 (2 mg)、3 (5 mg)、4 (3 mg), φ 为 15%~20% 梯度下得化合物 2 (5 mg)。 φ 为 25%~30% 的梯度下得化合物 5 (5 mg)。麦角甾醇、过氧化麦角甾醇及尿嘧啶为从菌丝体的甲醇提取液中分离得到。

2.5 化合物的物理和波谱数据

化合物 1: C₂₂H₂₈O₆, 无色针状晶体 (2 mg),

θ_{mp} (CHCl₃) 为 88~90 °C; MS (FAB pos) (m/z) /%: 389, 342; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 3.30 (1H, m), 2.91~2.51 (4H, s), 2.25 (2H, m), 1.93 (1H, m), 1.63~1.18 (14H), 0.86 (3H, t, 7.2 Hz), 0.80 (3H, t, 7.0 Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.54, 165.34, 165.30, 164.91, 144.24, 143.47, 143.27, 143.25, 49.99, 34.98, 31.46, 29.11, 28.13, 28.08, 27.14, 27.08, 22.52, 22.41, 13.99, 13.97。

化合物 2: C₁₆H₁₂O₄, θ_{mp} (CH₃OH) 为 220~222 °C; EI-MS, (m/z) /%: 268 [M]⁺, 250, 222; ¹H NMR (600 MHz, CD₃COCD₃) δ 8.20 (1H, m), 8.16 (1H, m), 7.89 (1H, s), 7.79 (2H, m), 3.88 (3H, s), 6.44 (1H, 2.1 Hz), 2.34 (3H, s); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 148.3, 157.1, 133.6, 127.3, 127.4, 134.9, 134.8, 127.8, 184.0, 183.7, 136.0, 134.3, 125.5, 127.0, 62.0, 16.7。

化合物 3: C₁₁H₁₅NO₂, 无色片状晶体, MS (FAB pos): 194 [M+H]⁺, 163; UV λ_{max} /nm (log ϵ): 264 (3.39); 225 (3.77); IR (KBr) ν/cm^{-1} : 1724, 1592, 1572, 1313; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (1H, dd, 0.5, 8.0 Hz), 7.62 (1H, dd, 2.1, 8.0 Hz), 8.55 (1H, dd, 2.1, 0.5 Hz), 2.69 (2H, t, 7.3 Hz), 1.61 (2H, tt, 7.3 Hz), 1.38 (2H, qt, 7.3 Hz), 0.94 (3H, t, 7.3 Hz), 4.00 (3H, s)。

化合物 4: C₁₁H₁₃NO₂, 无色片状晶体, MS (FAB pos): 192 [M+H]⁺, 150; UV λ_{max} /nm (log ϵ): 264 (3.50); 225 (3.89); IR (KBr) ν/cm^{-1} : 1728, 1642, 1572, 1593, 1313; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (1H, d, 2.1, 8.0 Hz), 7.64 (1H, dd, 2.1, 8.0 Hz), 8.56 (1H, d, 2.1 Hz), 2.80 (2H, t, 7.3 Hz), 2.42 (2H, dtdd, 7.3, 8.0 Hz), 5.80 (2H, ddt, 7.3, 16.8 Hz), 5.02 (1H, ddt, 1.4, 8.0, 16.8 Hz), 5.01 (1H, ddt, 1.4, 8.0, 10.6 Hz), 4.00 (3H, s)。

化合物 5: C₁₁H₁₀O₅, 白色粉末。 θ_{mp} 189~190 °C; ¹H NMR (600 MHz, CD₃COCD₃) δ : 6.73 (d, 2.1 Hz, 1H), 6.45 (d, 2.1 Hz, 1H), 11.46 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 4.96 (m, 7 Hz, 1H), 4.45 (s, 1H), 1.52 (d, 7 Hz, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃COCD₃) δ : 24.6, 65.7, 101.3, 103.1, 103.6, 139.5, 143.2, 165.8, 166.9, 167.6。

(下转第 144 页)

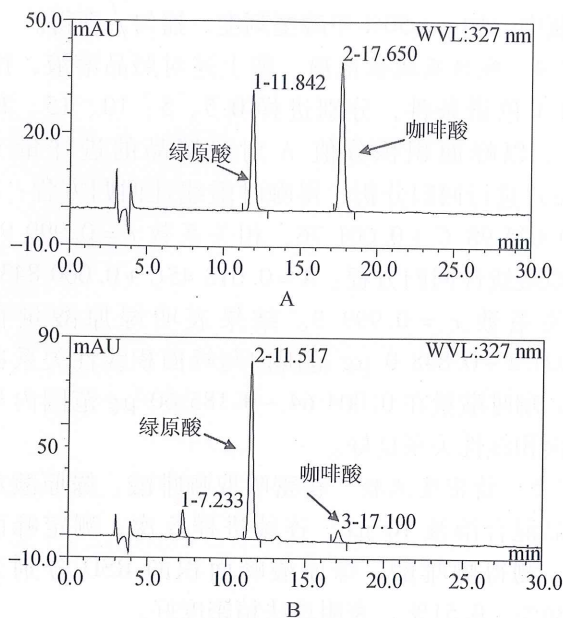


图2 混合对照品(A)及红腺忍冬(B)高效液相色谱
Fig. 2 HPLC of chlorogenic acid and caffeic acid (A);
Samples of *Lonicera hypoglauca* Miq. (B)

本研究采用薄层色谱法对红腺忍冬进行定性鉴别,采用高效液相色谱法同时测定10批红腺忍冬中绿原酸和咖啡酸的含量,能更加客观地评价红腺忍冬药材的质量。

表1 红腺忍冬中绿原酸及咖啡酸的含量

Table 1 Contents of chlorogenic acid and caffeic acid in
Lonicera hypoglauca Miq.

样品批号	w(绿原酸)/%	w(咖啡酸)/%
0706001	2.41	0.16
0707002	3.14	0.11
0707003	3.30	0.21
0707004	3.02	0.22
0707005	3.10	0.18
0707006	3.47	0.20
0707007	3.48	0.13
0707008	3.86	0.10
0707009	3.17	0.14
0707010	3.25	0.16

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会编. 中国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:21.
- [2] 邓玲姣,周晓舟,黄素梅,等. 忻城县金银花及其茎、叶中绿原酸含量测定[J]. 广西农学报,2007,22(5):34-36.
- [3] 辛宁,王柳萍,张守平,等. HPLC法测定广西红腺忍冬中绿原酸含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(5):849-851.

(上接第138页)

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 C Y, YANG R Y, LIN Y C, et al. A new nonadride derivative from mangrove fungus (strain No. k38) [J]. J Asian Natural Products Research, 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 C Y, DING W J, SHE Z G, et al. A new biphenyl derivative from an unidentified marine fungus E33 [J]. Chemistry of Natural Compounds, 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] AYER W A, LU P P, ORSZANSKA H, Deoxyscytalidin and lignicol: new metabolites from scytalidium species [J]. J Natural Products, 1993, 56(10):1835-1838.
- [8] 杨世林,杨学东,刘江云. 天然产物化学研究[M]. 北京:科学出版社,2009:670.
- [9] CAPASSO R, EVIDENTE A, CUTIGNANO A, et al. Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai* [J]. Photochemistry, 1996,41(4):1035-1039.
- [10] KIMURA Y, NAKAJIMA H, HAMASAKI T, et al. Sescandelin, a new root promoting substance produced by the fungus, *Sesquicillium candelabrum* [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(9): 2477-2479.