

## 榄钱两株附生真菌混合培养次级代谢产物研究\*

朱峰<sup>1</sup>, 胡谷平<sup>2</sup>, 陈忻<sup>1,3</sup>, 袁毅桦<sup>1</sup>, 黄美珍<sup>1</sup>, 孙恢礼<sup>3</sup>, 向文洲<sup>3</sup>, 林永成<sup>2</sup>

(1. 佛山科学技术学院化学与化工系, 广东 佛山 528000;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

3. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

**摘要:** 通过混合培养2株附生于南海榄钱的真菌产生了2个抗菌次级代谢产物(A和B), 其结构通过完整的波谱数据(主要是2D NMR数据)分别解析为新曲霉酸(A)和曲酸(B)。化合物B的结构进一步通过单晶X-射线衍射分析得到证实。当单独培养这2株真菌时未能得到化合物A。研究结果进一步表明, 混合培养技术有助于从海洋微生物中发现更多独特的天然产物。

**关键词:** 榄钱; 附生真菌; 混合培养; 代谢产物; 晶体结构

**中图分类号:** O629 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2009)06-0079-04

### Studies on the Secondary Metabolites Produced by Mixed Cultures of Two Epiphytic Fungi Isolated from a Fruit of Mangrove *Avicennia marina*

ZHU Feng<sup>1</sup>, HU Guping<sup>2</sup>, CHEN Xin<sup>1,3</sup>, YUAN Yihua<sup>1</sup>,  
HUANG Meizhen<sup>1</sup>, SUN Huili<sup>3</sup>, XIANG Wenzhou<sup>3</sup>, LIN Yongcheng<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry & Chemical Engineering, Foshan University, Foshan 528000, China;

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

3. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** A mixed culture of two epiphytic fungi from a rotten fruit of mangrove *Avicennia marina* produced two antibacterial secondary metabolites (A and B). Their structures were elucidated as neoaspergillilic acid (A) and kojic acid (B) by comprehensive spectral methods (mainly by 2D NMR spectral methods). The structure of compound B was further characterized by single crystal X-Ray diffraction analysis. The crystal of compound B belongs to monoclinic system, space group is  $P2_1/n$ . The unit cell parameters are:  $a = 0.37833(3)$  nm,  $b = 1.83758(14)$  nm,  $c = 0.84889(7)$  nm,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 96.7520(10)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,  $V = 0.58606(8)$  nm<sup>3</sup> and  $Z = 4$ . Compound A was not obtained when either strains was cultured individually. The results showed that the application of mixed culture technique would be contribute to discover more novel natural products from marine microorganisms.

**Key words:** *Avicennia marina*; epiphytic fungus; mixed culture; metabolite; crystal structure

海洋真菌, 特别是红树林真菌, 已被证明是新颖天然产物的丰富源泉<sup>[1-2]</sup>。近年来, 从海洋真菌中发现了许多新颖结构, 但仍然发现许多海洋真菌在正常生长环境下不能产生新颖结构或产率非常

低。因此, 有必要发展新的方法或技术用于发现更多新的结构和提高代谢物产量。由于很多重要的生化途径单株微生物不能或只能微弱地完成, 需要两种或多种微生物共同作用才能完成, 因此在相同培

\* 收稿日期: 2009-04-20

基金项目: 中国科学院 / 广东省海洋生物重点实验室(LMB, LAMB和LMM)联合开放基金资助项目(LMB071009); 广东省自然科学基金资助项目(04300674)

作者简介: 朱峰(1971年生), 男, 副教授, 博士; E-mail: zhufeng@fosu.edu.cn

养体系中混合培养 2 种不同的微生物菌株将有助于获得新的结构。据此假设, 通过混合培养海洋微生物已导致至少发现了 9 个新的结构<sup>[3-4]</sup>。

榄钱是红树白骨壤 *Avicennia marina* 果的俗称, 其味甘、微苦、性凉, 具有清热、利尿、凉血败火的功效, 是沿海一带食、药两用的佳果<sup>[5]</sup>。本文报道通过混合培养 2 株附生于南海腐烂榄钱的真菌菌株产生的 2 个抗菌次级代谢产物 (A 和 B) 的提取分离与结构鉴定。

## 1 结果与讨论

化合物 A 的 LREIMS 分析表明其相对分子质量为 224, 电子能谱元素分析表明含有 N 原子, 结合 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 分析, 推出其分子式为 C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。该化合物遇醋酸铜呈现草绿色沉淀, 遇三氯化铁呈现深红色。这是羟氨酸的典型特征, 提示存在官能团 -N(OH)C(=O)-, 并进一步由 NMR 信号 [ $\delta_{\text{H}}$  11.00 (br s, OH) 和  $\delta_{\text{C}}$  154.33 (s, 羰基)] 所证实。其 NMR 谱给出 2 套异丁基结构信号。综合解析化合物 A 完整的 NMR 谱推出其结构为 1-羟基-3, 6-二异丁基-2-吡嗪酮 (见图 1A), 即新曲霉酸。

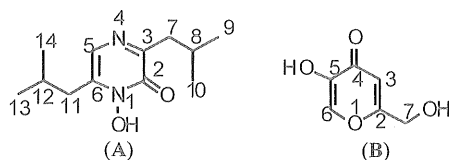


图 1 化合物 A 和 B 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds A and B

新曲霉酸首次分离自真菌 *Aspergillus sclerotiorum* 的培养滤液。MacDonald 等发现它有强的抗菌活性。Masaki 等<sup>[6]</sup>完成了其全合成。Micetich 等的生源合成研究表明, 它的生源合成前体是亮氨酸。在本研究中, 在相同条件下通过单独培养真菌菌株 FSY-01 和 FSW-02 未能获得化合物 A。提示化合物 A 可能是 2 株真菌共同作用产生的代谢物。

化合物 B 的 LREIMS 提示其相对分子质量为 142, 电子能谱元素分析表明含有 C 和 O 原子, 结合其 NMR 谱推出其分子式为 C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>。NMR 分析表明存在 2 个羟基 [ $\delta_{\text{H}}$  8.96 (br s) 和 5.62 (br s)]、1 个 CH<sub>2</sub> 基团 [ $\delta_{\text{H}}$  4.28 (s),  $\delta_{\text{C}}$  59.42 (t)] 和 1 个羰基 [ $\delta_{\text{C}}$  173.68 (s)]。其结构通过综合解析其完整的 NMR 谱推出为 5-羟基-2-羟甲基-4-吡喃酮 (见图 1B), 即曲酸, 并最终通过单晶

X-射线衍射分析得到证实。

化合物 B 的单晶 X-射线衍射分析表明其分子式为 C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, 相对分子质量为 142.11。晶体为单斜晶系, 空间群为 *P*2<sub>1</sub>/*n*。a = 0.378 33 (3) nm, b = 1.837 58 (14) nm, c = 0.848 89 (7) nm,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 96.752 0 (10)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ , V = 0.586 06 (8) nm<sup>3</sup>, Z = 4, D<sub>c</sub> = 1.611 mg / m<sup>3</sup>, F(000) = 296,  $\mu$  (Mo K $\alpha$ ) = 0.138 mm<sup>-1</sup>。化合物 B 的晶体结构见图 2。化合物 B 中存在分子间氢键, 其重要结构特征见分子晶胞填充图 (图 3 和图 4)。

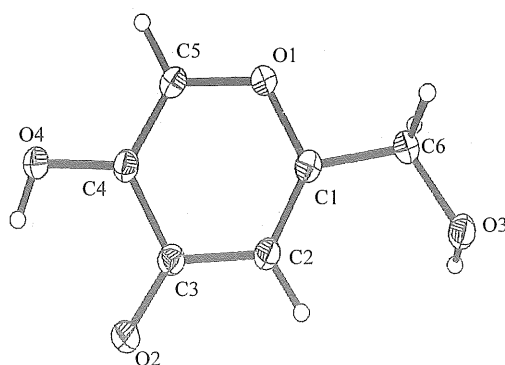


图 2 化合物 B 的 X-射线晶体结构

Fig. 2 X-Ray crystal structure of compound B

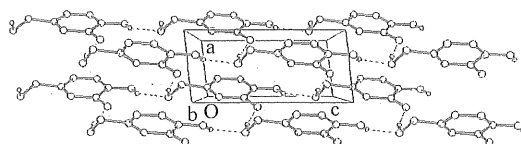


图 3 化合物 B 沿 b 轴晶胞填充图

Fig. 3 Packing diagram of compound B, showing the intermolecular hydrogen-bonding network along the b axis

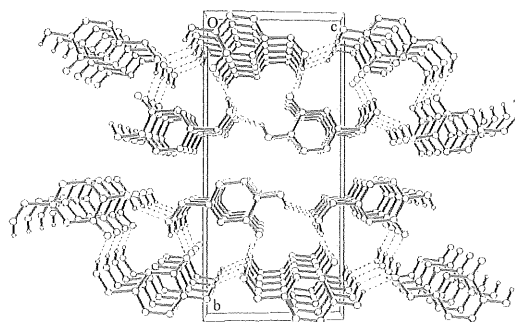


图 4 化合物 B 晶胞立体填充图

Fig. 4 Stereodrawing for the packing diagram in the crystal cell of compound B

曲酸本身具有抗菌活性, 特别是由于进入皮肤后能络合细胞中的铜离子, 使铜离子无法再与酪氨酸酶结合, 从而有效抑制酪氨酸酶的活性, 减少黑素的生成, 因此, 曲酸已被广泛地应用于美白护肤品<sup>[7]</sup>。

生长现象(见 2.3)提示代谢物合成机制有可能是一开始菌株 FSY-01 产生了抑菌活性物质曲酸抑制菌株 FSW-02 的生长, 但菌株 FSW-02 在被抑制的过程中改变自己的代谢途径, 产生了纯培养时没能产生的抗菌物质新曲霉酸, 从而反过来抑制了菌株 FSY-01 的生长。本实验结果进一步说明混合培养技术可以改变微生物的代谢途径, 从而导致产生独特的活性代谢物, 因而有助于从海洋微生物发现更多独特的结构。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

仪器: 美国 Varian Inova 500NB 超导核磁共振仪; Thermo DSQ 低分辨质谱仪; JXA-8800R 电子探针和 INCA 能谱仪; 德国 Bruker Smart 1 000 CCD X-射线单晶衍射仪; X4 显微镜熔点测定仪(温度计未校正)。

试剂: 葡萄糖 CP, 蛋白胨 BR, 酵母膏 BR, 粗海盐(食用), 其它均为市售 AR 试剂。

### 2.2 菌种

2 株真菌菌株(菌株编号 FSY-01 和 FSW-02)均分离自广东湛江遂溪潮间带泥地里一腐烂榄钱, 种属均为 *Aspergillus* sp.。菌种保存在佛山科学技术学院。

### 2.3 真菌混合发酵培养

培养基: 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 酵母膏 1 g/L, 粗海盐 3.5 g/L, 自然 pH 值。

60 L 培养基分装 1 L 三角瓶, 每瓶装 400 mL,  $1.25 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min, 冷却后于无菌条件下同时接入真菌菌株 FSY-01 和 FSW-02, 在室温下静置培养 30 d。开始时菌株 FSY-01 快速生长, 15 d 后, 菌株 FSW-02 反而比菌株 FSY-01 长的更快。

### 2.4 次级代谢物提取与分离

发酵总物纱布过滤, 滤液于 50 °C 下减压浓缩至约 3 L, 用等体积乙酸乙酯萃取 5 次, 萃取液合并减压浓缩得粗提物, 粗提物拌硅胶过柱, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 洗脱组分再反复硅胶柱层析, 重结晶纯化, 先后得到化合物 A (60 mg) 和 B (1.1 g)。

### 2.5 化合物实验数据

化合物 A: 黄色颗粒状固体,  $\theta_{mp}$  125 ~ 128 °C。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 11.00 (br s, OH), 7.27 (s, H-5), 2.57 (d, 7.5 Hz, H-7), 2.51 (dd, 4.0, 2.0 Hz, H-11), 2.14 (m, H-12), 2.04 (m, H-8), 0.90 (d, 6.5 Hz, H-9 和 H-10), 0.89 (d, 6.5 Hz, H-13 和 H-14)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 154.33 (s, C-2), 152.27 (s, C-3), 121.48 (d, C-5), 137.52 (s, C-6), 36.11 (t, C-7), 26.12 (d, C-8), 21.98 (q, C-9 和 C-10), 41.43 (t, C-11), 26.18 (d, C-12), 22.36 (q, C-13 和 C-14)。HMBC: C-2 与 H-7、OH; C-3 与 H-7、8; C-5 与 H-11; C-6 与 H-5、11 和 OH; C-7 与 H-8、9、10; C-8 与 H-7、9、10; C-9 / C-10 与 H-7、8; C-11 与 H-5、12; C-12 与 H-11、13、14; C-13 / C-14 与 H-11、12 相关。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY: H-7、H-8 和 H-9 / H-10 连续相关; H-11、H-12 和 H-13 / H-14 连续相关。电子能谱元素分析 (*w*/%): C 64.49, N 14.21 和 O 21.30。LREIMS (*m/z*): 224 (*M*<sup>+</sup>), 207, 193, 182 (基峰), 166, 153。

化合物 B: 无色棱柱状晶体,  $\theta_{mp}$  155 ~ 157 °C。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.96 (br s, 5-OH), 7.99 (s, H-6), 6.32 (s, H-3), 5.62 (br s, 7-OH), 4.28 (s, H-7)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 167.84 (s, C-2), 109.68 (d, C-3), 173.68 (s, C-4), 145.48 (s, C-5), 139.07 (d, C-6), 59.42 (t, C-7)。HMBC: C-2 与 H-3、6、7、7-OH, C-3 与 H-7, C-4 与 H-3、6, C-5 与 H-3、6、5-OH, C-6 与 H-3、5-OH, C-7 与 H-3、7-OH 相关。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY: H-7 与 7-OH 相关。电子能谱元素分析 (*w*/%): C 49.26 和 O 50.74。LREIMS (*m/z*): 142 (*M*<sup>+</sup>), 113, 96, 85, 69 (基峰), 57。

### 2.6 化合物 B 单晶 X-射线衍射分析

用于单晶 X-射线衍射分析用的晶体通过甲醇重结晶制备。取大小为 0.46 mm × 0.40 mm × 0.26 mm 的无色棱柱形晶体置于 Bruker Smart 1 000 CCD X-射线单晶衍射仪上, 用石墨单色化的 Mo-K $\alpha$  辐射为光源 ( $\lambda = 0.071\ 073$  nm), 173 (2) K 下, 以  $\omega/2\theta$  扫描方式在  $2.22^\circ \leq 2\theta \leq 27.01^\circ$  范围内收集 3 153 衍射数据, 其中 1 266 为独立衍射点 ( $R_{int} = 0.020\ 4$ )。使用  $I \geq 2\sigma(I)$  点, 用 SHELXL-97

程序直接法解出晶体结构, 数轮差值 Fourier 拟合确定非氢原子坐标, 对全部非氢原子坐标及各向异性参数进行全矩阵最小二乘法修正。氢原子位置按理论模型计算, 偏差因子为  $R_1 = 0.0355$ ,  $wR_2 = 0.0963$  [ $I > 2\theta(I)$ ] 和  $R_1 = 0.0405$ ,  $wR_2 = 0.1022$  (所有数据)。差值电子密度最高和最低峰分别为  $0.334 \times 10^{-3}$  和  $-0.222 \times 10^{-3} \text{ e/nm}^3$ 。

#### 参考文献:

- [1] ZHU F, CHEN X, YUAN Y H, et al. The chemical investigations of the mangrove plant *Avicennia marina* and its endophytes [J]. *The Open Nat Prod J*, 2009, 2: 24 - 32.
- [2] 夏雪奎, 李庆, 邵长伦, 等. 南海红树林内生真菌 ZZF13 次级代谢产物的研究[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2009, 48(4): 133 - 136.
- XIA X K, LI Q, SHAO C L, et al. The secondary metabolites of the mangrove endophytic fungus(ZZF13) from the South China Sea [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2009, 48(4): 133 - 136.
- [3] PETTIT R K. Mixed fermentation for natural product drug discovery [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83: 19 - 25.
- [4] ZHU F, LIN Y C. Marinamide, a novel alkaloid and its methyl ester produced by the application of mixed fermentation technique to two mangrove endophytic fungi from the South China Sea [J]. *Chin Sci Bull*, 2006, 51(12): 1426 - 1430.
- [5] 唐冰, 朱汝华. 榄钱的性状及显微鉴别 [J]. *时珍国医国药*, 2006, 4(9): 1739.
- TANG B, ZHU R H. Character and microscopic identification of the fruit of *Avicennia marina* [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2006, 4(9): 1739.
- [6] MASAKI M, CHIGIRA Y, OHTA M. Total synthesis of racemic aspergillilic acid and neoaspergillilic acid [J]. *J Org Chem*, 1966, 31(12): 4143 - 4146.
- [7] BENTLEY R. From *miso*, *saké* and *shoyu* to cosmetics: a century of science for kojic acid [J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23(6): 1046 - 1062.
- LI X Y. Interaction of metronidazole with bovine serum albumin by using fluorescence and resonance light scattering spectra [J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2007, 23(2): 262 - 267.
- [16] 李改仙, 李建晴, 魏玉霞, 等. 四碘荧光素与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(8): 1277 - 1280.
- LI G X, LI J Q, WEI Y X, et al. Study on the interaction of tetraiodofluorescein and bovine serum albumin by fluorimetry [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2005, 25(8): 1277 - 1280.
- [17] 颜承农, 上官云凤, 童金强, 等. 双嘧达莫与牛血清白蛋白结合热力学特征的荧光光谱法研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2003, 23(3): 543 - 546.
- YAN C N, SHANG G Y, TONG J Q, et al. Study on thermodynamics of binding reaction of dipyrindamole with bovine serum albumin [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2003, 23(3): 543 - 546.
- [18] SHAIKH S M T, SEETHARAMAPPA J, ASHOKA S, et al. A study of the interaction between bromopyrogallol red and bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2007, 73(2): 211 - 216.
- [19] HOU H N, QI Z D, OU YANG Y W, et al. Studies on interaction between vitamin B12 and human serum albumin [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 47(1): 134 - 139.
- [20] GHOSH S. Conformational study of papain in the presence of sodium dodecyl sulfate in aqueous medium *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 41(2): 209 - 216.

(上接第 78 页)