

中国南海红树内生真菌 No. 1403 次级代谢物的研究^{*}

姜广策¹, 林永成¹, 周世宁², L. L. P. VRIJMOED³, E. B. G. JONES³

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 3. 香港城市大学生物和化学系, 香港)

摘 要: 中国南海红树的内生真菌 No. 1403 是由香港城市大学 Vrijmoed 教授等分离出来的。其发酵液粗提物有明显的抗菌活性, 对酵母菌和霉菌均有抑制作用。采用硅胶柱层析、核磁共振、质谱、红外光谱和 X 光结晶衍射等方法对该菌静置培养的发酵液化学成分进行研究, 发现真菌 No. 1403 能产生灰黄霉素 A 和多种醌类抗生素 B、C、D 及其它化合物, 其中 C 未见文献报道。A 的产量很高, 约为 20 mg/L。本研究表明 No. 1403 是有应用价值的灰黄霉素新的产生菌。

关键词: 内生真菌; 次级代谢物; 抗生素

中图分类号: O624.99 **文献标识码:** A

植物内生真菌 (*Endophytic fungi*) 生活在高等植物的组织中, 对于内生真菌的次级代谢物的研究还较为缺乏, 据保守的估计内生真菌的种类繁多, 大约有 1.5×10^6 种^{1,2}, 由于数量庞大, 而且与其它生物之间紧密的生态关系, 使这类真菌成为潜在的具有产生丰富的次级代谢物的来源。

目前国内除了对内生真菌的形态特征和分布情况有过研究外, 对其化学成分, 尤其生长于海洋环境的内生真菌的次级代谢物的研究还未见报道, 国际上也才刚刚开始。作者等近年研究了几种南海红树林内生真菌, 发现了很多种有意义的化合物。本文报道其中一种内生真菌 No. 1403 代谢产物的分离和分子结构测定。

1 材料与方法

1.1 试剂与试验仪器

所用试剂均为市售 AR 试剂, 所用仪器为 VG ZAB-MS 质谱仪, INOVA-500 核磁共振仪, FT-5DX 红外光谱仪, ELEMETAR VARIO EL 元素分析仪。

1.2 菌种

内生真菌 No. 1403 由香港城市大学 L. L. P. Vrijmoed 和 E. B. G. Jones 教授提供。菌种分别保存在香港城市大学和中山大学内。

1.3 菌种培养

培养基: $w(\text{葡萄糖})$ 为 2%, $w(\text{蛋白胨})$ 为 0.2%, $w(\text{酵母膏})$ 为 0.1%, 海水 1 000 mL,

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29672053); 广东省自然科学基金资助项目 (950026 和 980371)

收稿日期: 2000-03-23; 作者简介: 姜广策 (1973~), 男, 博士生; 通讯联系人: 林永成。

分装入 500 mL 三角瓶, 每瓶 300 mL, 8 Pa 15 min 灭菌后接种 (接种量 10%). 25 °C 静置培养 30~40 d, 过滤, 收集发酵液.

1.4 提取物抗菌活性试验

内生真菌 No. 1403 发酵液浓缩后, 分别用石油醚乙酸乙酯和甲醇提取, 以啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 为受试菌, 于 25 °C, 在 PDA 固体培养基培养 24~48 h, 结果表明乙酸乙酯提取物对两种菌的生长抑制活性最强, 生长不明显, 甲醇提取物次之, 石油醚提取物基本没有活性.

1.5 次级代谢物提取

收集发酵液约 30 L, 浓缩至 5 L, 乙酸乙酯萃取, 萃取液浓缩, 过滤, 拌入 100 目硅胶并装柱, 以乙酸乙酯和石油醚混合溶液梯度洗脱, 其中 φ (乙酸乙酯) 为 10%~30% 时洗脱出 D, φ (乙酸乙酯) 为 50%~60% 先后洗脱出 B 和 A, φ (乙酸乙酯) 为 60%~80% 洗脱出 C. 各部分洗脱液再以聚酰胺或 200~300 目硅胶柱层析分离, 重结晶纯化, 得 2.1 g 白色块状晶体 A, 35 mg 红色针状晶体 B, 40 mg 红色颗粒状晶体 C, 20 mg 红色针状晶体 D.

1.6 化合物的物理和波谱数据

A FABMS: 353(100%)(M+1), 355(36%)(M+3), ^1H NMR(500 Mz, CDCl_3 , TMS): 6.14(s, H-3), 5.53(s, H-10), 4.02(s, CH_3 -14), 3.97(s, CH_3 -15), 3.62(s, CH_3 -16), 3.01(dd, 13.5, 16.5 Hz, H-12a), 2.83(ddq, 6.5, 4.5, 13.5 Hz, H-13), 2.42(dd, 4.5, 16.5 Hz, H-12b), 0.96(d, 6.5 Hz, CH_3 -17).

^{13}C NMR(CDCl_3): 197.1(C-11), 192.4(C-7), 170.7(C-9), 169.5(C-6), 164.6(C-2), 157.7(C-4), 105.5(C-10), 104.8(C-1), 97.2(C-5), 90.7(C-8), 89.4(C-3), 57.0(C-14), 56.6(C-15), 56.3(C-16), 40.0(C-12), 36.4(C-13), 14.2(C-17).

IR ν/cm^{-1} (KBr): 3022, 2973, 2945, 2846, 1707, 1665, 1648, 1616, 1588, 1356, 1222, 1138, 1110, 1053, 990, 962, 885, 821, 751, 688.

元素分析(w/%, 括号里为计算值, $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{Cl}$): C 57.61(57.87), H 4.69(4.83). θ_{mp} 224 °C.

B FABMS: 305(M+1). ^1H NMR(500 Mz, CDCl_3 , TMS): 12.60(s, OH), 7.62(2OH), 7.36(s, H-9), 6.11(s, H-1), 3.91(s, OCH_3 -16), 3.82(t, 5.5, 5.5 Hz, H-7), 3.08(d, 17 Hz, H-8a), 2.99(dd, 18.5, 5.5 Hz, H-5a), 2.92(dd, 18.5, 5.5 Hz, H-5b), 2.79(d, 17 Hz, H-8b), 1.26(s, CH_3 -15), ^{13}C NMR(CDCl_3): 189.8(C-4), 178.6(C-3), 160.2(C-2), 158.6(C-14), 142.9(C-10), 130.9(C-12), 127.4(C-11), 119.3(C-9), 110.3(C-13), 108.6(C-1), 70.7(C-7), 69.6(C-6), 55.8(C-16), 40.4(C-5), 29.1(C-8), 24.0(C-15).

IR ν/cm^{-1} (KBr): 3500.8, 3369.1, 3031.0, 2979.0, 2924.9, 2853.9, 1717.0, 1674.6, 1618.6, 1597.2, 1511.9, 1479.8, 1455.5, 1415.6, 1370.2, 1344.2, 1321.1, 1277, 1236.3, 1114.1, 1076.0, 1045.9, 985.1, 933.7, 856.7, 818.8, 795.2, 629.6, 456.7.

元素分析(w/%, 括号里为计算值, $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$): C 63.54(63.15), H 5.208(5.25). θ_{mp} 215~217 °C.

C FABMS: 337(M+1), m/z : 55, ^1H NMR(500 Mz, CDCl_3 , TMS): 13.35(s, OH-9),

12.62(s, OH-10), 6.46(s, H-3), 4.77(t, 4.5, 4.5 Hz, H-7, OH), 3.92(s, CH₃-16), 3.54(t, 4.5, 4.5 Hz, H-5), 2.74(d, 18 Hz, H-8a), 2.67(d, 18 Hz, H-8b), 1.24(s, CH₃-15). ¹³C NMR(CDCl₃): 183.3(C-4), 176.5(C-1), 160.9(C-10), 160.9(C-2), 160.2(C-9), 139.5(C-11), 136.8(C-12), 109.8(C-14), 109.6(C-3), 107.3(C-13), 76.3(C-7), 69.2(C-6), 68.2(C-5), 56.8(C-16), 34.8(C-8), 25.5(C-15).

IR ν/cm^{-1} (KBr): 3 514, 3 479, 3 374, 3 029, 2 987, 2 938, 2 896, 1 595, 1 475, 1 440, 1 398, 1 370, 1 300, 1 200, 1 208, 1 138, 1 082, 997, 948, 864, 821, 632, 554, 491.

元素分析(w/%, 括号里为计算值, C₁₆H₁₆O₈): C 56.56(57.14), H 4.617(4.76). θ_{mp} 232 °C.

D FABMS: 285(M+1), m/z : 105, ¹H NMR(500 MHz, CDCl₃, TMS): 13.587(s, OH-4), 13.469(s, OH-1), 8.233(d, 8 Hz, H-8), 8.145(s, H-5), 6.706(s, H-3), 4.011(s, CH₃-16), 2.554(s, CH₃-15). ¹³C NMR(CDCl₃): 187.656(C-10), 184.669(C-9), 160.638(C-4), 157.464(C-2), 150.168(C-4), 145.126(C-6), 135.509(C-7), 133.221(C-11), 131.802(C-12), 127.304(C-5), 127.055(C-8), 112.684(C-14), 106.890(C-3), 106.163(C-13), 56.637(C-16), 21.936(C-15).

IR ν/cm^{-1} (KBr): 2 921.3, 2 852.4, 2 666, 1 708, 1 593, 1 464.7, 1 421, 1 409, 1 371, 1 275.9, 1 206, 1 118, 959, 821, 723.8.

元素分析(w/%, 括号里为计算值, C₁₆H₁₂O₅): C 67.60(67.61), H 4.23(4.23). θ_{mp} 209 °C.

2 结果与分析

No. 1403 菌采自红树的树叶内部, 为典型的植物内源性真菌. 初步的菌种鉴定表明 No. 1403 菌不属于半知菌类的丛梗孢目, 与灰黄青霉菌没有亲缘关系, 该菌为灰黄霉素新的产生菌, 而且灰黄霉素的产量较高, 对采集该菌的红树林的微生物生态调查发现与 No. 1403 菌共生的红树没有烟草疫霉 (*Parasiticae tabacina* Adam) 的感染. 这是在红树中第一次发现的现象, 可能与该菌产生的灰黄霉素和另外 3 种抗生素有关. 这一推测还有待进一步研究. 初步抗菌试验表明, No. 1403 菌的乙酸乙酯提取物对啤酒酵母和黑曲霉 2 种菌的生长抑制活性最强. 化合物 A, B, C 和 D 的结构通过波谱技术推导出来, 其中 C 未见文献报道 (图 1).

A 的 FABMS 分子离子峰是 353 (M+1), 其同位素峰 (M+1) : (M+3) = 3:1, 表明含氯, 结合元素分析、核磁共振氢谱和碳谱, 推出分子式为 C₁₇H₁₇O₆Cl, 不饱和度为 9, 显示分子可能含有芳香环, 红外光谱证明分子中存在羰基, 碳谱中位于 196.9 和 192.4 低场的为羰基碳. 尚有 8 个不饱和碳, 其中位于 170.700, 157.699, 164.560 的可能为连 O 的烯碳. DEPT 谱表明分子中有 4 个甲基, 分别为 14.5, 57.0, 56.6, 56.3, 后 3 个甲基为连氧的甲基, 1 个亚甲基 40.0 和 2 个次甲基 36.4, 89.4. 除去羰基的 2 个不饱和度和烯碳的 4 个不饱和度后, 该分子可能为三环结构. H-H COSY 表明 H-3 与 CH₃-14、CH₃-15 相关, H-10 与 CH₃-16 相关, H-12a 与 H-13、H-12b 之间彼此相关, H-13 还与 CH₃-17 相关. ROSY 揭示了 H-3 与 H-10、CH₃-15、CH₃-14, H-10 与 CH₃-16、H-3 相关, H-12a 与 H-13、H-12b 之间彼此相关, H-13 还与 CH₃-17 相关, H-12b 与

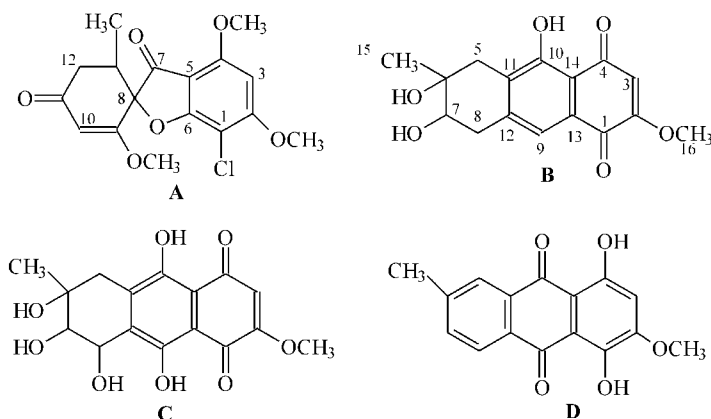


图 1 A B C 和 D 的结构图

Fig. 1 The structures of A, B, C, and D

CH₃-17 相关. HMQC 指定了分子中所有碳上质子的归属. HMBC 进一步确证了整个分子结构 (见图 2).

B 的极性比 **A** 小, 在硅胶柱层色中, 含 φ (乙酸乙酯) 为 50% ~ 60% 的乙酸乙酯-石油醚混合溶剂洗脱. **B** 为褐色结晶. 表明 **B** 分子中可能存在共轭体系. 根据 FABMS 分子离子峰是 305 ($M+1$), 以及元素分析、核磁共振氢谱、碳谱数据, 得出其分子式为 $C_{16}H_{16}O_6$, 不饱和度为 9. 红外光谱表明分子中存在羰基 $\nu_{C=O}$ 1 717 cm^{-1} , 碳谱中 189.8 和 178.6 的信号为羰基碳, 160.2 ~ 108.6 有 8 个烯碳, 其中位于 160.2 较低场的可能为连氧的烯碳, DEPT 谱表明分子中有 2 个亚甲基, 分别为 29.1 和 40.4, 2 个甲基 55.8 和 24.0, 2 个次甲基中有 2 个是烯碳 119.3 和 108.6. 1H NMR 谱也有酚羟基的吸收 (12.36), 这是典型的具有氢键的酚羟基的信号. 综合考虑分子中的 2 个羰基、8 个烯碳, 该分子可能为蒽醌类化合物. $H-H$ COSY 揭示了 $H-9$ 与 $H-8a$, $H-8b$ 相关, $H-7$ 与 $H-8a$, $H-8b$ 相关 $H-5$ 与 $H-15$ 相关. ROSY 中可看到 $H-7$ 与 $H-8a$ 相关, $H-5a$ 与 $H-8b$ 相关. HMBC 谱对于构成整个分子结构起重要作用 (见图 2), 因为 6.1 质子与 119 和 127 碳没有相关, 故此这个质子是在 3 位上.

C 为红色颗粒状结晶, 其波谱与 **B** 很接近. FABMS 分子离子峰是 337 ($M+1$), 结合元素分析数据, 可知分子式为 $C_{16}H_{16}O_8$, **C** 的分子式比 **B** 只多 2 个 O, 表明 **C** 可能也是一个蒽醌类化合物. **C** 的 1H NMR 谱多了 2 个羟基. 这 2 个羟基的位置较容易决定. 由于 1 个增加的羟基信号在 13.35, 存在强的氢键, 故应在 9 位上. 考虑在四氢化的环中, $H-H$ COSY 显示 2 个连氧的次甲基 ($CH-7$ 和 $CH-8$) 互相偶合, 偶合常数是 5 Hz, 而非连氧的亚甲基 (CH_2-5) 只有同碳偶合, 由此可推测另一个增加的羟基在 8 位上. 这一结构与其所有的波谱数据相符.

D 为红色针状结晶, 其 FABMS 分子离子峰是 285 ($M+1$), 分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$, 不饱和度为 11. 红外光谱显示分子中存在羰基 $\nu_{C=O}$ 1 708 cm^{-1} , 碳谱中这 2 个羰基碳吸收在 187.7 和 184.7, 1H NMR 谱有 2 个存在强氢键的羟基信号: 13.47 和 13.59, DEPT 谱指出分子中除了 2 个甲基碳 (21.92 和 56.64) 外, 其余 12 个都是烯碳. 因此 **D** 也是蒽醌类化合

物. 根据 **D** 的 HMBC 谱可确定整个分子结构 (见图 2).

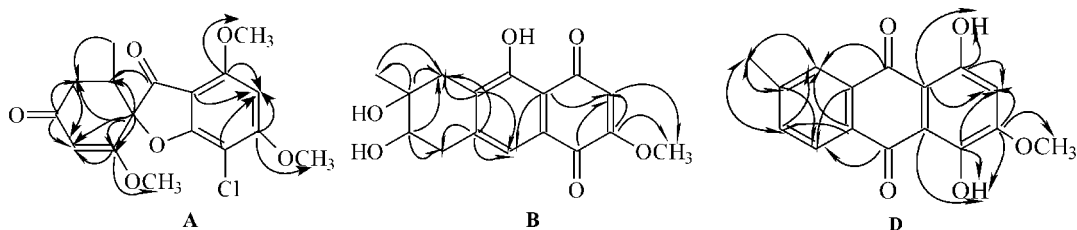


图 2 **A**、**B** 和 **D** 的 HMBC 相关图

Fig. 2 The HMBC correlations of **A**, **B**, and **D**

参考文献:

- [1] 王建锋, 吕华鹰, 苏文金. 植物内生真菌产紫杉醇的研究 [J]. 微生物学通报, 2000, 27 (1): 58.
- [2] DREYFUSS M M, CHAPELA I H. In the discovery of natural products with therapeutic potential [M]. Boston, 1994. 49 ~ 79.

Studies on the Secondary Metabolites of Mangrove Fungus No. 1403 from the South China Sea

JIANG Guang-ce, LIN Yong-cheng^{*}, ZHOU Shi-ning, L. L. P. VRIJMOED, E. B. G. JONES

Abstract: The ethyl acetate extract of the mangrove endophytic fungus No. 1403 from the South China Sea showed an obvious inhibition effect on yeast and mold. The studies on the secondary metabolites of the fungus revealed that No. 1403 can produce a series of antibiotics, including griseofulvin which was originally found in *Penicillium griseofulvum* and anthracenediones.

Keywords: mangrove endophytic fungus; secondary metabolites; antibiotics

^{*} School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China