

# 红树林内生真菌 K38 和 E33 共培养代谢产物研究\*

李春远<sup>1</sup>, 龚兵<sup>1</sup>, 黄素萍<sup>1</sup>, 佘志刚<sup>2</sup>, 林永成<sup>2</sup>, 周世宁<sup>3</sup>

(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:** 将来自南海红树林内生真菌 E33 和 K38 的共培养, 从该培养液提取物中分离到 Castaneiolide (**1**), 脑苷脂-1-O-吡喃葡萄糖基-(2S, 3R, 4E, 2'R)-2-N-(2'-羟基棕榈酰)-9-甲基-4, 8-sphingadienine (**2**), 3 $\beta$ , 7 $\beta$ , 19-三羟基-5-烯-胆甾烷 (**3**), 3-羟基-4-(3-甲基-2-丁烯氧)基-苯甲醛 (**4**), 对羟基苯甲醛 (**5**) 五个代谢产物, 其中化合物 **1**, **2**, **4** 为首次从海洋真菌里得到。化合物 **1**, **2**, **3**, **4** 以往未从单独发酵的两菌中分离得到。

**关键词:** 红树林内生真菌; 共培养; 代谢产物

中图分类号: O621.2 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2013)02-0066-04

## Studies on Metabolites from the Co-culture Broth of Mangrove Endophytic Fungi K38 and E33

LI Chunyuan<sup>1</sup>, GONG Bing<sup>1</sup>, HUANG Suping<sup>1</sup>, SHE Zhigang<sup>2</sup>, LIN Yongcheng<sup>2</sup>, ZHOU Shining<sup>3</sup>

(1. Institute of Biomaterial, College of Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. College 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:** Two mangrove endophytic fungi K38 and E33 from the South China Sea Coast were co-cultured. Five secondary metabolites, including Castaneiolide (**1**), (2S, 3R, 4E, 2'R)-2-N-(2'-hydroxy-palmitoyl)-1-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-9-methyl-4, 8-sphingadienine (**2**), cholesta-5-en-3 $\beta$ , 7 $\beta$ , 19 $\alpha$ -triol (**3**), 3-hydroxy-4-(3-methylbut-2-enyloxy) benzaldehyde (**4**), 4-hydroxybenzaldehyde (**5**), were isolated from this crude extracts. Among them, compounds **1**, **2**, **4** were found in marine fungi for the first time, and compounds **1**, **2**, **3**, **4** were not obtained from these two strains by pure fermentation.

**Key words:** mangrove endophytic fungi; co-culture; metabolites

海洋微生物已成为寻找新药先导化合物的新源泉<sup>[1]</sup>。红树林微生物是海洋微生物的重要组成部分。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, 生测结果表明

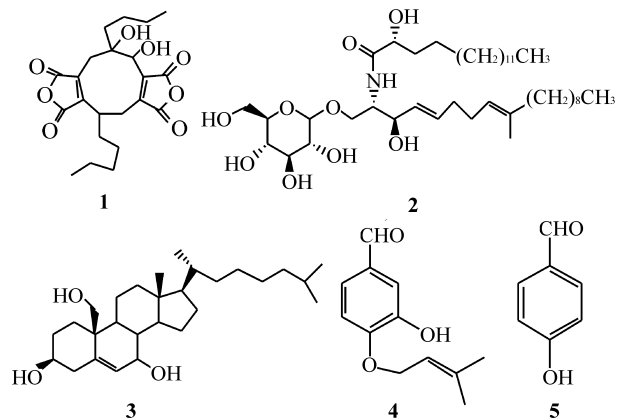
二者单独发酵的粗提物基本不显示抗菌活性, 但共培养液萃取物对小麦赤霉等多种危害农业和水果的病菌显示出较强抗菌作用<sup>[2]</sup>。前期我们分别系统研究了两株菌的代谢产物<sup>[3-7]</sup>, 并进一步对两菌共

\* 收稿日期: 2012-09-09

基金项目: 国家 863 科技攻关计划资助项目 (2006AA09Z422, 2006AA09Z419); 国家自然科学基金资助项目 (21102049); 广东省自然科学基金资助项目 (9451064201003751, 9151027501000055); 广州市科技计划资助项目 (11C12100771); 华南农业大学“211 工程”三期重点建设项目 (2009B010100001); “合生珠江”大学生科技创新实验资助项目 (H11005)

作者简介: 李春远 (1978 年生), 男, 博士, 副教授; 通讯作者: 佘志刚; E-mail: chunyuanyuan-li@163.com

培养产生的代谢产物进行了分离, 共分离到十八种单体化合物, 有两个是新化合物<sup>[8-12]</sup>。本文在上述基础上进一步开展了两株菌共培养代谢产物的研究, 又分离鉴定了另外 5 种化合物, 分别为 Castaneiolide (**1**), 脑苷脂-1-O-吡喃葡萄糖基-(2S, 3R, 4E, 2'R)-2-N-(2'-羟基棕榈酰)-9-甲基-4, 8-sphingadienine (**2**), 3 $\beta$ , 7 $\beta$ , 19-三羟基-5-烯-胆甾烷 (**3**), 3-羟基-4-(3-甲基-2-丁烯氧)基-苯甲醛 (**4**), 对羟基苯甲醛 (**5**), 其中化合物 **1**, **2**, **3**, **4** 以往未从单独发酵的两株菌中分离到, 化合物 **1**, **2**, **4** 为首次从海洋真菌里获得。



## 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  $421 [M + H]^+$ , 元素分析 ( $w$ ) C 62.84%, H 6.72%, N 0, 与理论值 C 62.85%, H 6.71%, N 0 对比并结合碳谱, 推出分子式  $C_{22}H_{28}O_8$ , 计算不饱和度为 9。碳谱结合 DEPT 谱可以看出 22 个碳中有 9 个季碳, 2 个次甲基碳, 9 个亚甲基碳和 2 个甲基碳,  $\delta$  167.8, 167.2, 166.2, 165.8, 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两个酸酐。 $\delta$  146.8, 145.3, 144.7, 142.6 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。 $\delta$  78.3, 69.9 根据化学位移和分子式判断是连氧的碳, 表明分子中有 2 个羟基。 $^1H$ NMR 中  $\delta$  0.89 和 0.97 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两条烷基链。由此判断出该化合物的结构与以往分离到 (-)-byssochlamic acid 非常相似<sup>[4]</sup>, 只是两条烷基链的长度和羟基数目不同, 对照文献<sup>[13]</sup>数据基本一致, 确定化合物 **1**

为 Castaneiolide。化合物 **1** 结构新颖, 属于 non-adrinide 类衍生物, 该类化合物目前在自然界发现的不超过 15 个。

化合物 **2** 的  $^1H$  NMR 谱中, 出现  $CH_2$  脂肪长链 ( $\delta$  1.26 附近) 和 2 个末端甲基信号 0.89 (6H, t, 6.7 Hz), 推测分子中有 2 个脂肪烷基链。 $\delta$  8.35 (1H, d, 8.4 Hz, NH) 和  $^{13}C$  NMR 谱 175.5 (CONH) 及众多连氧碳信号显示分子有酰胺键和多羟基存在, 表明该化合物为神经酰胺类化合物。 $^{13}C$  NMR  $\delta$  50 ~ 106 之间的碳共有 9 个连氧或连氮的信号, 推测分子中存在一个糖基, 其中  $\delta$  105.3 是糖基的异头碳信号,  $\delta$  105.3, 78.2, 78.2, 74.9, 71.5, 62.6 数据与  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基本一致, 此区间剩余的三个碳容易判断  $\delta$  54.5 的碳连接酰胺中的氮原子, 其他 2 个碳连 2 个羟基。 $\delta$  135.6, 132.2, 131.6, 124.0 表明分子中存在两个双键,  $^1H$  NMR 中  $\delta$  5.98 (2H, m), 5.25 (1H, m) 表明其中一个双键碳为季碳, 其他则为 CH,  $\delta$  1.62 (3H, s) 表明分子有一个  $CH_3$  连在双键上。根据快原子轰击质谱给出的分子离子峰  $726 [M - H]^+$ , 结合分子中存在 2 个羟基, 2 个双键, 1 个酰胺, 1 个  $CH_3$ , 可根据神经酰胺结构特点确定分子式为  $C_{41}H_{77}NO_9$ , 在此基础上查阅文献<sup>[14]</sup>, 对照相关数据基本一致, 确定其结构为脑苷脂-1-O-吡喃葡萄糖基-(2S, 3R, 4E, 2'R)-2-N-(2'-羟基棕榈酰)-9-甲基-4, 8-sphingadienine。

化合物 **3** 为白色针状结晶, EIMS 给出分子离子峰  $418 [M]^+$ , 结合  $^{13}C$  NMR 和 DEPT 推出分子式为  $C_{27}H_{46}O_3$ , 不饱和度为 5。 $^1H$  NMR 谱中有 4 个甲基  $\delta$  0.93 (3H, d, 6.8 Hz), 0.88 (6H, d, 7.2 Hz), 0.75 (3H, s),  $^{13}C$  NMR 结合 DEPT 表明分子中存在一个羟甲基  $\delta$  62.7, 两个仲羟基  $\delta$  72.5, 71.1 和一个三取代烯键  $\delta$  138.2, 130.0。根据以上数据, 结合不饱和度推测化合物为三羟基胆甾烷。进一步与文献<sup>[15]</sup>对照数据基本一致, 化合物 **3** 被确定为  $3\beta$ ,  $7\beta$ , 19-三羟基-5-烯-胆甾烷。

化合物 **4** 的分子离子峰为  $207 [M + H]^+$ , 结合  $^{13}C$  NMR 和 DEPT 推出分子式为  $C_{12}H_{14}O_3$ , 不饱和度为 5。 $^1H$  NMR  $\delta$  6.97 (1H, 8.4 Hz), 7.41 (1H, dd, 8.4, 2.4 Hz), 7.43 (1H, dd, 2.4 Hz) 表明化合物母体为偏三取代苯环,  $\delta$  1.73 (3H, s), 1.77 (3H, s), 4.68 (2H, d, 6.6 Hz), 5.49 (1H, m, 6.6, 1.3 Hz) 是典型的异戊烯氧基信号,  $\delta$  9.87 (1H, s) 结合  $^{13}C$  NMR  $\delta$  190.9, 表明分子中存在一个醛基, 根据剩余相对分子质量, 容易判

断<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  5.90 (1H, s) 为取代在苯上的羟基。在此基础上与文献 [16] 对照数据基本一致, 证明化合物 **4** 为 3-羟基-4-(3-甲基-2-丁烯氧) 基-苯甲醛。

化合物 **5** 是白色粉末状固体,<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.01 (2H, d, 8.4 Hz), 7.81 (2H, d, 8.4 Hz) 为对位被取代的苯,  $\delta$  9.86 (s, 1H) 与化合物 **4** 对比, 推测为醛基, 另一取代基为羟基未出信号, 进一步与标准品进行熔点及薄层对照得到确认化合物 **5** 为对羟基苯甲醛。

## 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 AVIII 600 MHz 核磁共振仪, VG-2ABB-HS 质谱仪。

### 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, 以石油醚-乙酸乙酯-甲醇梯度淋洗, 再经反复柱层析, 制备薄层层析和重结晶纯化后得到化合物 **1** (4 mg), **2** (15 mg), **3** (5 mg), **4** (2 mg), **5** (2 mg)。

### 2.5 化合物的物理和波谱数据

化合物 **1**: C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>, 无色针状晶体, MS (FAB pos)  $m/z$ : 421, 403, 385, <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.89 (3H, t, 7.2 Hz), 0.97 (3H, t, 7.8 Hz), 1.25 ~ 1.57 (8H, m), 1.64 (2H, m), 1.70 ~ 1.82 (2H, m), 1.89 (3H, t, 7.2 Hz), 2.61 (1H, d, 15.0 Hz), 2.92 (1H, s), 3.02 (1H, dd, 6.0, 13.2 Hz), 3.35 (1H, m), 3.49 (1H, d, 15.0 Hz), 3.71 (1H, t, 13.2 Hz), 4.72 (1H,

s), 5.42 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 167.8, 167.2, 166.2, 165.8, 146.8, 145.3, 144.7, 142.6, 78.3, 69.9, 43.3, 36.3, 35.5, 32.5, 28.8, 28.8, 25.5, 25.5, 23.9, 23.8, 14.4, 14.2。

化合物 **2**: C<sub>41</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>9</sub>, 白色粉末状固体, MS (FAB nega)  $m/z$ : 726 [M - H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ : 8.35 (1H, d, 8.4 Hz, NH), 5.98 (2H, m), 5.25 (1H, m), 4.92 (1H, d, 7.6 Hz), 4.77 (1H, m), 4.69 (1H, dd, 5.4, 10.7 Hz), 4.58 (1H, m), 4.46 (1H, brd, 11.5 Hz), 4.31 (1H, dd, 5.0, 11.8 Hz), 4.21 (1H, m), 4.02 (1H, m), 3.86 (1H, m), 2.12 (1H, m), 2.03 (1H, m), 1.74 (1H, brd), 1.62 (3H, s), 1.37 (1H, m), 1.26 (brd, Aliphatic - CH<sub>2</sub> -), 0.86 (1H, t, 6.9 Hz)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$ : 175.5, 135.6, 132.2, 131.6, 124.0, 105.3, 78.2, 78.2, 74.9, 72.4, 72.2, 71.5, 69.8, 62.6, 54.5, 39.8, 35.5, 32.9, 32.9, 31.9, 29.8 ~ 29.4, 28.2, 22.8, 22.7, 15.9, 14.2, 14.1。

化合物 **3**: C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, 无色针状晶体, MS (ESI pos)  $m/z$ : 418 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.67 (1H, s), 3.84 (2H, m), 3.65 (1H, d, 8.7 Hz), 3.61 (1H, m), 0.93 (3H, d, 6.8 Hz), 0.88 (6H, d, 7.2 Hz), 0.75 (3H, s)。<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 138.2, 130.0, 72.5, 71.1, 62.7, 56.9, 55.5, 48.7, 43.2, 42.9, 41.8, 41.5, 39.8, 39.5, 36.2, 35.7, 33.2, 31.3, 28.6, 28.1, 26.1, 23.8, 22.8, 22.5, 21.7, 18.8, 12.2。

化合物 **4**: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>, 黄色针状晶体, MS (FAB pos)  $m/z$ : 207 [M + H]<sup>+</sup>, 138。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.73 (3H, s), 1.77 (3H, s), 4.68 (2H, d, 6.6 Hz), 5.49 (1H, m, 6.6, 1.3 Hz), 5.90 (1H, s), 6.97 (1H, 8.4 Hz), 7.41 (1H, dd, 8.4, 2.4 Hz), 7.43 (1H, dd, 2.4 Hz), 9.87 (1H, s)。<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 190.9, 151.2, 146.4, 139.9, 130.6, 124.3, 118.4, 114.1, 111.3, 66.0。

化合物 **5**: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, 白色粉末。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.01 (2H, d, 8.4 Hz), 7.81 (2H, d, 8.4 Hz), 9.86 (s, 1H)。

## 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] 丁唯嘉,张杰,黎荣棠,等. 两株红树林内生真菌混合发酵液提取物抗植物病原菌活性及 LC-MS 研究[J]. 广东化工,2010,37(12): 7-9.
- [3] 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.
- [4] LI C Y, YANG R Y, LIN Y C, et al. A new nonadride derivative from mangrove fungus (strain No. k38) [J]. Journal of Asian Natural Products Research,2007, 9(3): 285-291.
- [5] 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.
- [6] 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):128-129.
- [7] 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. 中山大学学报:自然科学版[J]. 2008, 47(1):121-122.
- [8] LI C Y, DING W J, SHAO C L, et al. A new diimide derivative from the co-culture broth of two mangrove fungi (strain no. E33 and K38)[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2010,12(9): 809-813.
- [9] 李春远,余志刚,林永成,等. 红树林内生真菌 K38 和 E33 混合发酵代谢产物研究[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2010,49(6): 136-138,144.
- [10] LI C Y, ZHANG J, SHAO C L, et al. A new xanthone derivative from the co-culture broth of two marine fungi (Strain No. E33 and K38) [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2011, 47(3): 382-384.
- [11] 李春远,张杰,钟嘉升,等. 两株红树林内生真菌混合发酵培养液中代谢产物的分离鉴定[J]. 华南农业大学学报:自然科学版,2011,32(1): 117-119,123.
- [12] 丁唯嘉,黎荣棠,李春远,等. 两株红树林真菌共培养液抗植物病菌成分研究[J]. 广东农业科学, 2011, 38(9): 72-74,77.
- [13] ARAI R, SHIMIZU S, MIYAJIMA H, et al. Castaneolide, abscisic acid and monorden, phytotoxic compounds isolated from fungi (*Macrophoma castaneicola* and *Didymosporium radicolica*) cause "black root rot disease" in chestnut trees[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1989, 37(10): 2870-2872.
- [14] 胡琳,丁智慧,刘吉开. 灰黑拟牛肝菌的化学成分[J]. 云南植物研究, 2002,24(5): 667-670.
- [15] 徐圆缘,李玲,易杨华,等. 块花柳珊瑚化学成分的研究[J]. 第二军医大学学报,2010,31(4): 421-424.
- [16] AYER A W, TRIPONOV S L. Metabolites of peniophora polygonia part 2 some aromatic compounds[J]. Journal of natural products, 1993, 56(1): 85-89.