

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.05.010

铁皮石斛内生真菌 *Fusarium* sp. TP - G1 的次生代谢产物研究*

宋小仙¹, 徐进¹, 罗明和¹, 张应^{1,2,△}

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 重庆市疾病预防控制中心, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨铁皮石斛内生真菌 *Fusarium* sp. TP - G1 的次生代谢产物中结构新颖或生物活性独特的氨基醇类天然产物。方法 采用色谱层析技术对铁皮石斛内生真菌 *Fusarium* sp. TP - G1 的大米发酵液粗提物进行分离纯化;通过质谱(MS)及核磁共振(NMR)波谱数据分析,并结合文献数据,鉴定化合物,并确定所得化合物的结构。结果 分离获得6个化合物,分别为麦角甾醇(1), (22*E*, 24*R*) - ergosta - 6, 22 - dien - 3 β , 5 α , 8 α - triol (2), tert - butyl (1 - hydroxy - 3 - phenylpropan - 2 - yl) carbamate (3), (1 - hydroxy - 3 - phenylpropan - 2 - yl) carbamic acid (4), *N* - (1 - hydroxy - 3 - phenylpropan - 2 - yl) benzamide (5), *N* - (1 - hydroxy - 3 - phenylpropan - 2 - yl) - 2 - phenylacetamide (6)。结论 从铁皮石斛内生真菌 *Fusarium* sp. TP - G1 中分离获得6个次生代谢产物,其中化合物3至化合物6为新的氨基醇类天然产物。微生物是氨基醇类化合物的新供体,可通过微生物的基因工程改造来获得更多的氨基醇类化合物。

关键词: 内生真菌;次生代谢产物;铁皮石斛;氨基醇类;天然产物

中图分类号:R932;R284.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)05-0046-04

Secondary Metabolites of *Dendrobii Officinalis Caulis* Endophytic Fungus *Fusarium* sp. TP - G1

SONG Xiaoxian¹, XU Jin¹, LUO Minghe¹, ZHANG Ying^{1,2}

(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing, China 400065; 2. Chongqing Center for Disease Control and Prevention, Chongqing, China 400042)

Abstract: Objective To investigate the amino alcohols natural products with novel structure or unique biological activity in the secondary metabolites of *Dendrobii Officinalis Caulis* endophytic fungus *Fusarium* sp. TP - G1. **Methods** The compounds were isolated and purified from the crude extracts of rice fermentation broth of *Dendrobii Officinalis Caulis* endophytic Fungus *Fusarium* sp. TP - G1 by the chromatography method, and they were identified by mass spectrum (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) data analysis combined with literature data, and the structure of the compounds was determined. **Results** Six compounds were isolated and obtained, which were ergosterol (1), (22*E*, 24*R*) - ergosta - 6, 22 - dien - 3 β , 5 α , 8 α - triol (2), tert - butyl (1 - hydroxy - 3 - phenylpropan - 2 - yl) carbamate (3), (1 - hydroxy - 3 - phenylpropan - 2 - yl) carbamic acid (4), *N* - (1 - hydroxy - 3 - phenylpropan - 2 - yl) benzamide (5), *N* - (1 - hydroxy - 3 - phenylpropan - 2 - yl) - 2 - phenylacetamide (6). **Conclusion** Six secondary metabolites were isolated from the *Dendrobii Officinalis Caulis* endophytic fungus *Fusarium* sp. TP - G1, of which compounds 3 - 6 are new amino alcohols natural products. Microorganisms are new donors of amino alcohols, and more amino alcohols can be obtained through microbial genetic engineering.

Key words: plant endophytic fungus; secondary metabolites; *Dendrobii Officinalis Caulis*; amino alcohols; natural product

植物内生菌是与健康植物共生或仅一段时间寄生在植物体内的微生物,与植物共生或寄生,相互影响,与植物体一样能产生大量结构新颖的活性次生代谢产物。研究发现,植物含有或产生的活性产物极可能来自其内生菌。微生物资源可进行基因工程改造,并通过发酵工程等技术提高其产量,环境友好,可持续利用,是目前药用植物研究的重要方向。铁皮石斛味甘,性微寒,含有多种生物活性成分,其提取物具有抗肿瘤、抗凝血、调血脂、调血压、提高免疫力和抗衰老等药用价值和保健功效。前期研究发现,内生真菌 *Fusarium* sp. TP - G1 的次生代谢产物 trichosetin, beauvericins, enniatins, fusaric acid 具有抗菌、抗肿瘤、降血压等活性,提示植物

内生菌产生的次生代谢产物与药用植物的功效有一定关联性^[1-6]。本研究中以药用植物铁皮石斛内生真菌 *Fusarium* sp. TP - G1 为研究对象,并对其大米发酵产物的次生代谢物进行初步研究。本研究中对 *Fusarium* sp. TP - G1 的次生代谢产物进行分离纯化及结构鉴定,发现已知的6种化合物中化合物3至化合物6为新的氨基醇类天然产物。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器 Agilent 600 MHz DD2 型核磁共振仪(600/150 MHz, 四甲基硅烷为内标); Bruker amazon SL 型离子阱质谱仪; Agilent 1260 型高效液相色谱仪(配有 PDA

* 基金项目:重庆市技术创新与应用发展专项重点项目[cstc2019jscx - gksbX0145, cstc2020jscx - tpyzxX0021]; 重庆市技术创新与应用示范(社会民生类)一般项目[cstc2018jscx - msybX0257]。

第一作者:宋小仙,女,大学本科,主管药师,研究方向为药物分析,(电话)023-89029135(电子信箱)373731929@qq.com。

△通信作者:张应,女,硕士,副研究员,研究方向为植物保护,(电子信箱)610710159@qq.com。

检测器);YMC-pack ODS-A型色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm);HS-GF₂₅₄硅胶薄层板(烟台江友硅胶开发有限公司)。

试剂:乙腈(色谱纯,安徽时联特种溶剂有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 菌株来源

植物内生真菌 *Fusarium* sp. TP-G1 是从药用植物铁皮石斛中分离而来,并已鉴定^[1]。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:去皮马铃薯(200 g/L),切成小块,加水煮沸30 min,用纱布过滤,取滤液,加葡萄糖(20 g/L)、海盐(30 g/L)、2%琼脂粉,115℃灭菌30 min。

马铃薯葡萄糖水(PDB)培养基:PDA培养基配方中不加2%琼脂粉,115℃灭菌30 min。

大米培养基:大米100 g,酵母粉0.2%,NaH₂PO₄0.02%,KNO₃0.05%,NaCl 1%,121℃灭菌30 min。

1.4 菌株的发酵培养

吸取50 mL PDB培养基,置250 mL锥形瓶中,从PDA平板上接入真菌 *Fusarium* sp. TP-G1 的菌丝体,于28℃、200 r/min摇床上培养2 d,作为发酵种子液,分别转入含300 g大米培养基的2 L锥形瓶中,室温静置发酵30 d,共发酵2.5 kg。

1.5 发酵产物提取和分离

将静置发酵产物用甲醇浸提,甲醇经蒸馏浓缩后得到总浸膏,粗浸膏伴样,过一正相柱,用氯仿-甲醇体系(100:0,99:1,98:2,96:4,94:6,92:8,90:10,85:15,80:20,5:5,V/V)梯度洗脱,得Fr. A1~A10共10个馏分。Fr. A2采用正相硅胶氯仿-甲醇体系和乙酸乙酯-石油醚体系反复纯化,分离获得化合物1(50 mg)、化合物2(30 mg)。Fr. A(3-5)合并后,采用中压反相液相色谱(MPLC)法(条件为5%~60%乙腈50 min,60%~100%乙腈40 min),分别得到Fr. B1~B5。Fr. B1~B3合并后,采用相同条件MPLC法获得Fr. C1~C8。Fr. C2和Fr. C7分别采用高效液相色谱(HPLC)法制备获得化合物4(20 mg)、化合物3(18 mg)。Fr. C4~6合并后,采用HPLC法制备获得化合物5(15 mg)、化合物6(16 mg)。

2 结果与分析

各化合物的化学结构见图1。

化合物1:¹H NMR (CDCl₃ 600 MHz) δ_H: 5.54 (1H, dd, *J* = 5.4, 2.4 Hz), 5.36 (1H, m), 5.19 (1H, dd, *J* = 7.2, 15.0 Hz), 5.15 (1H, d, *J* = 7.8, 15.6 Hz), 3.61 (1H, m), 1.01 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CH₃-21), 0.92 (3H, s, CH₃-19), 0.89 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, CH₃-28), 0.82 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CH₃-26), 0.80 (3H, d, *J* = 6.6 Hz,

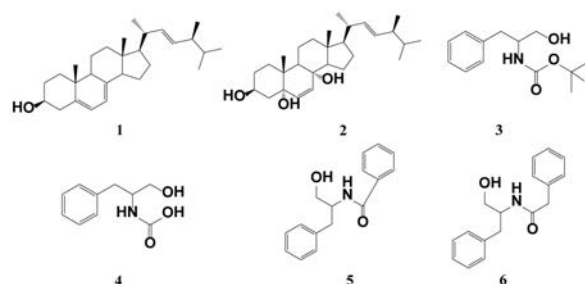


图1 化合物1至化合物6的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-6

CH₃-27), 0.61 (3H, s, CH₃-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ_C: 12.3 (C-18, CH₃), 16.5 (C-28, CH₃), 17.8 (C-19, CH₃), 19.9 (C-26, CH₃), 20.2 (C-27, CH₃), 21.3 (C-11, CH₂), 21.3 (C-21, CH₃), 23.2 (C-15, CH₂), 28.5 (C-16, CH₂), 32.2 (C-2, CH₂), 33.3 (C-25, CH), 37.3 (C-1, CH₂), 38.6 (C-10, C), 39.3 (C-12, CH₂), 40.6 (C-20, CH), 41.0 (C-4, CH₂), 43.0 (C-24, CH), 43.1 (C-13, C), 46.5 (C-9, CH), 54.8 (C-14, CH), 56.0 (C-17, CH), 70.7 (C-3, CH), 116.5 (C-7, CH), 119.8 (C-6, CH), 132.2 (C-23, CH), 135.8 (C-22, CH), 140.0 (C-5, C), 141.6 (C-8, C)。与文献[7]报道的麦角甾醇的核磁数据一致,故鉴定该化合物1为麦角甾醇。

化合物2:¹H NMR (CDCl₃ 600 MHz) δ_H: 6.21 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.47 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 5.19 (1H, d, *J* = 7.8, 15 Hz), 5.11 (1H, d, *J* = 7.8, 15 Hz), 3.93 (1H, m); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ_C: 12.9 (C-18, CH₃), 17.5 (C-28, CH₃), 18.1 (C-19, CH₃), 19.6 (C-21, CH₃), 20.0 (C-26, CH₃), 20.6 (C-11, CH₂), 20.9 (C-27, CH₃), 23.4 (C-16, CH₂), 28.6 (C-15, CH₂), 30.1 (C-2, CH₂), 33.1 (C-25, CH), 34.7 (C-4, CH₂), 37.0 (C-10, C), 37.1 (C-1, CH₂), 39.4 (C-12, CH₂), 39.7 (C-20, CH), 42.7 (C-24, CH), 44.6 (C-13, C), 51.1 (C-18, CH₃), 51.7 (C-14, CH), 56.2 (C-17, CH), 66.5 (C-3, CH), 79.4 (C-5, C), 82.1 (C-8, C), 130.7 (C-6, CH), 132.3 (C-22, CH), 135.2 (C-23, CH), 135.4 (C-7, CH)。与文献[8]报道的(22*E*, 24*R*)-ergosta-6, 22-dien-3β, 5α, 8α-triol的核磁数据一致,故确定该化合物2为(22*E*, 24*R*)-ergosta-6, 22-dien-3β, 5α, 8α-triol。

化合物3: H谱低场区的5个芳环H质子信号结合C谱低场区的C原子信号提示结构中可能含有1个单取代苯环,而二维多键碳氢关系(HMBC)谱中7.20/130.5; 7.25/127.3, 130.5; 7.29/129.4, 140.1的相关信号进一步验证单取代苯环片段。高场区通过异核单量子关系(HSQC), HMBC谱中的相关信号可推测2个脂肪链

片段。上述3个片段通过二维HMBC谱中2.71, 2.9/130.5, 140.1; 7.25/38.6; 3.80/140.1, 158.0连接成化合物3的结构。最后, 根据高分辨获得的分子式 $C_{14}H_{21}NNaO_3$, 鉴定化合物3为 tert-butyl (1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)carbamate。其核磁数据归属为, 1H NMR (CD_3OD 600 MHz) δ_H : 1.40 (9H, s), 2.71 (1H, dd, $J=8.4, 13.2$ Hz), 2.90 (1H, dd, $J=6.0, 13.8$ Hz), 3.52 (2H, d, $J=5.4$ Hz), 3.80 (1H, m), 7.20 (1H, t, $J=6.0$ Hz), 7.27 (4H, m); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 28.9, 38.6, 55.4, 64.6, 80.0, 127.3, 129.4, 130.5, 140.1, 158.0; (+) - HR - ESI - MS m/z 274.1417 ($[M+Na]^+$), 计算得到 $C_{14}H_{21}NNaO_3$, 274.1414。与文献[9]报道的 tert-butyl (1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)carbamate 的核磁数据基本一致, 故鉴定化合物3为 tert-butyl (1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)carbamate。

化合物4: 1H NMR (CD_3OD 600 MHz) δ_H : 2.79 (1H, dd, $J=6.0, 13.2$ Hz), 2.85 (1H, dd, $J=6.0, 13.8$ Hz), 4.09 (2H, m), 4.33 (1H, m), 7.21 (2H, d, $J=7.8$ Hz), 7.23 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 7.30 (2H, t, $J=7.8$ Hz); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 41.9, 54.9, 70.7, 128.0, 129.8, 130.5, 137.8, 162.1。与文献[10]报道的化合物(1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)carbamate 的核磁数据基本一致, 故鉴定化合物4为该化合物。

化合物5: 1H NMR ($DMSO-d_6$ 600 MHz) δ_H : 2.78 (1H, dd, $J=9.0, 13.8$ Hz), 2.94 (1H, dd, $J=4.8, 13.8$ Hz), 3.42 (1H, m), 3.49 (1H, m), 4.15 (1H, m), 4.84 (1H, t, $J=6.6$ Hz), 7.13 (1H, t, $J=6.6$ Hz), 7.24 (4H, m), 7.41 (2H, t, $J=7.8$ Hz), 7.47 (1H, t, $J=7.2$ Hz), 7.77 (2H, d, $J=7.8$ Hz), 8.15 (1H, d, $J=8.4$ Hz); ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 150 MHz) δ_C : 36.9, 53.7, 63.3, 126.3, 127.6, 128.5, 128.6, 129.5, 131.4, 135.2, 139.9, 166.4。与文献[11]报道的化合物 N -(1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)benzamide 的核磁数据一致, 故鉴定该化合物为化合物5。

化合物6: 1H 谱、 ^{13}C 谱的低场区信号, 结合二维HMBC谱可推测含有两个单取代苯环。而高场区的 1H 谱、 ^{13}C 谱信号及1个肽键C原子信号173.9, 结合二维HSQC, HMBC谱中4.14/139.8, 173.9, 38.0, 64.4; 3.45/130.2, 173.9, 137.0, 提示化合物6中含有1个连苯环并含有1个肽键的脂肪链片段。二维HMBC谱中信号2.70, 2.92/130.5, 139.8; 7.17/38.0; 3.45/130.2, 137.0; 7.14/44.1显示含有1个肽键的脂肪链片段通过2个 $-CH_2-$ 与两个单取代苯环分别连接成化合物6的结构。最后, 根据高分辨获得的分子式 $C_{17}H_{19}NNaO_2$ 进一步确认, 鉴定化合物6为 N -(1-hydroxy-3-phenylpropan-

2-yl)-2-phenylacetamide。其核磁数据归属为, 1H NMR (CD_3OD 600 MHz) δ_H : 2.70 (1H, dd, $J=9.0, 13.8$ Hz), 2.91 (1H, dd, $J=6.0, 13.8$ Hz), 3.42 (1H, d, $J=14.4$ Hz), 3.46 (1H, d, $J=14.4$ Hz), 3.53 (2H, d, $J=5.4$ Hz), 4.13 (1H, m), 7.13 (2H, d, $J=7.8$ Hz), 7.17 (3H, m), 7.22 (5H, m); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 38.0, 44.1, 54.3, 64.4, 127.4, 127.9, 129.5, 129.6, 130.2, 130.5, 137.0, 139.8, 173.9。 (+) - HR - ESI - MS m/z 292.1311 ($[M+Na]^+$), 计算得到 $C_{17}H_{19}NNaO_2$, 292.1308。与文献[12]报道的化合物 N -(1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)-2-phenylacetamide 的核磁数据一致, 故鉴定化合物6为该化合物。

3 讨论

本研究中铁皮石斛内生真菌 *Fusarium* sp. TP-G1 的大米发酵产物中分离获得化合物3至化合物6的氨基醇类天然产物, 并对上述化合物进行结构鉴定, 发现菌株的营养和生长条件对其次生代谢产物产生重大影响。氨基醇类化合物是一类用途广泛的有机化合物, 在化学合成和药物化学中都有重要应用^[11]。在化学合成中, 氨基醇类化合物可用作手性助剂拆分不对称合成中的外消旋混合物; 在药物化学中, 氨基醇是某些重要药物的药效基团, 如抗逆转录病毒蛋白酶抑制剂沙奎那韦、利托那韦、洛匹那韦、印地那韦、奈非那韦和安普列那韦, 可特异性地使蛋白酶失活, 阻止人类免疫缺陷病毒的复制。目前, 主要通过化学合成获得氨基醇类化合物, 但其化学反应条件剧烈, 产量低, 纯化困难^[11]。前期研究发现, 化合物3至化合物6仅可通过化学合成获得。本研究中从铁皮石斛内生真菌 *Fusarium* sp. TP-G1 的大米发酵产物中分离获得4个新的天然氨基醇类次生代谢产物, 表明微生物是氨基醇类化合物的新供体, 后期可通过微生物的基因工程改造来获得更多的氨基醇类化合物, 并对其生物合成机制进一步进行阐释。

参考文献

- [1] SHI SJ, LI YY, MING Y, et al. Biological activity and chemical composition of the endophytic fungus *Fusarium* sp. TP-G1 obtained from the root of *Dendrobium officinale* kimura et Migo[J]. Records of natural products, 2018, 12(6): 549-556.
- [2] TAN RX, ZOU WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites[J]. Nat Prod Rep, 2001, 18(4): 448-459.
- [3] ZHANG HW, SONG YC, TAN RX. Biology and chemistry of endophytes[J]. Nat Prod Rep, 2006, 23(5): 753-771.
- [4] 陈龙, 梁子宁, 朱华. 植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 30-34.
- [5] 陈道金, 刘慧敏, 杨静, 等. 植物内生菌活性成分研究进展[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1730-1732.
- [6] 范丽霞, 郑继平. 植物内生菌抗肿瘤活性产物研究进展[J].