

滇重楼内生真菌米曲霉中 1 个新的聚酮类化合物

侯雨婷, 于红梅, 陈彦君, 祝丽君, 陈毅坚, 郑朝胚, 周敏, 董淼*, 叶艳青*

云南民族大学化学与环境学院, 云南民族大学民族药资源化学国家民委教育部重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 研究滇重楼内生真菌米曲霉 *Aspergillus oryzae* 次生代谢产物的化学成分, 以期发现新的化合物。方法 采用液体发酵方式发酵, 萃取后运用硅胶及大孔吸附树脂等多种色谱技术进行分离纯化, 并根据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构。结果 从滇重楼内生真菌米曲霉发酵产物中分离鉴定了 3 个化合物, 分别鉴定为 3-氨基-4,5-二羟基-4,6-二甲基-2-(2-甲基丁酰)环己-2-烯酮 (1)、12-*N*-甲基-环-(*L*-色氨酸-*L*-苯丙氨酸) (2) 和二聚色氨酸素 (3)。结论 化合物 1 为新的聚酮类化合物, 命名为米曲霉聚酮 A。

关键词: 滇重楼; 内生真菌; 米曲霉; 次生代谢产物; 聚酮类; 米曲霉聚酮 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)17-4393-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.004

A new polyketide from endophytic fungus *Aspergillus oryzae* derived from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

HOU Yu-ting, YU Hong-mei, CHEN Yan-jun, ZHU Li-jun, CHEN Yi-jian, ZHENG Chao-pei, ZHOU Min, DONG Miao, YE Yan-qing

Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, School of Chemistry and Environment, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus oryzae* from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* in order to find new compounds. **Methods** The endophytic fungus *A. oryzae* was fermented by liquid fermentation. After extraction, silica gel and macroporous adsorption resin were used to separate and purify the extract. The structures of the compounds were identified according to their physical and chemical properties and spectroscopic data. **Results** Three compounds were isolated and their structures were identified as 3-amino-4,5-dihydroxy-4,6-dimethyl-2-(2-methylbutanoyl)cyclohex-2-enone (1), 12-*N*-methyl-cyclo-(*L*-tryptophyl-*L*-phenylalanyl) (2) and ditryptophenalanine (3). **Conclusion** Compound 1 is a new polyketide named asperpolyketide A.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.; endophytic fungi; *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn; secondary metabolites; polyketides; asperpolyketide A

植物内生菌 (endophyte) 是一种普遍存在于健康植物组织中的微生物资源, 这些特殊微生物与宿主植物形成了互利互惠且平衡对抗的复杂生态关系, 从而决定了其次生代谢产物具有化学结构和生物活性的多样性^[1]。微生物次生代谢产物结构多样, 种类繁多, 含有多种药理活性成分, 可作为重要的药物先导化合物^[2]。因此, 植物内生真菌次生代

产物已成为新化合物和新药不可或缺的来源^[3]。

滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 别名独角莲, 为百合科重楼属植物, 主要分布于贵州、云南和四川等地区, 是《中国药典》2015 年版收载的重楼药材的基原植物之一, 其干燥根茎入药, 具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效, 是“云南白药”“宫血宁胶囊”等

收稿日期: 2020-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31560099); 国家自然科学基金项目 (31860099); 云南省高校科技创新团队支持计划; 云南民族大学学学科博士点培育项目 (BSD-HX-2019-20)

作者简介: 侯雨婷 (1997—), 女, 硕士在读, 主要从事中药及天然药物活性成分研究。Tel: 18208841632 E-mail: 892135153@qq.com

*通信作者 叶艳青, 教授, 硕士生导师。Tel: 18087555237 E-mail: yey-qing@163.com

董淼, 博士。Tel: 18184837677 E-mail: dmmiao@foxmail.com

多种中成药的主要原料, 市场需求量较大^[4-5]。米曲霉属 *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn 半知菌亚门丝孢纲丝孢目从梗孢科, 是曲霉属真菌中的 1 个常见种, 一般在 30~37 °C 生长较为良好。其具有丰富的蛋白酶系, 能产生酸性、中性和碱性蛋白酶, 其稳定性高, 受热性好, 因此广泛地应用于食品、医药及饲料等工业中, 是我国传统酿造食品酱和酱油的生产菌种^[6]。

目前国内外学者对滇重楼内生真菌米曲霉次生代谢产物进行了一些研究, 主要报道的有生物碱、萜、黄酮、甾体、香豆素等类化学成分, 并且具有多种药理活性, 如抗肿瘤、抗菌、抗氧化、抗高血压、酶抑制活性等^[7-9]。本实验对来自云南大理的滇重楼进行内生真菌培养, 从培养得到的米曲霉次生代谢产物中分离得到 3 个化合物, 分别鉴定为 3-氨基-4,5-二羟基-4,6-二甲基-2-(2-甲基丁酰) 环己-2-烯酮 [3-amino-4,5-dihydroxy-4,6-dimethyl-2-(2-methylbutanoyl) cyclohex-2-enone, **1**]、12-*N*-甲基环-(*L*-色氨酸酰-*L*-苯丙氨酸酰) [12-*N*-methyl-cyclo-(*L*-tryptophyl-*L*-phenylalanyl), **2**] 和二聚色氨酸素 (ditryptophenaline, **3**)。其中化合物 **1** 为新的聚酮类化合物, 命名为米曲霉聚酮 A。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 半制备型 Venusil XBP C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 10 mm, 5 μm; 博纳艾杰尔科技有限公司); Bruker AV III-400 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Autospec-3000 型质谱仪 (英国 VG 公司); UV-2401A 型紫外分光光度计 (日本岛津股份有限公司); LDZX-40B1 型电热压力蒸汽灭菌锅 (上海申安器械厂); LRH-250-G 型光照培养箱 (广东省医疗器械厂); ZHWY-2120 型恒温振荡器 (上海智城公司); 50 L 型发酵罐 (镇江东方生物工程设备技术有限责任公司); DZFB-9D 型蒸汽发生器 (无锡市斯利斯达服装机械公司); ZLS05A/8 型螺杆空压机 (厦门东亚机械有限公司); 储气罐 (台州市富芳压缩机有限公司)。

1.2 试剂与材料

柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目) 和 GF₂₅₄ (100 mm × 100 mm) 硅胶板均为青岛海洋化工厂生产; D101 型大孔树脂 (天津普拉德生物科技有限公司); 工业用乙醇、醋酸乙酯、甲醇、二氯甲烷 (呈

贡祥化玻璃仪器厂); AR 级乙腈、丙酮、四氢呋喃 (天津天泰精细化学品有限公司); 显色剂为 10% H₂SO₄ 乙醇溶液; BR 级 *D*-色氨酸 (上海圻明生物科技有限公司); 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 发酵所用水为灭菌后的自来水。

本研究所用菌株是于 2012 年从产自云南大理的滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的根茎中分离所得, 由云南民族大学陈毅坚教授鉴定为滇重楼内生真菌米曲霉 *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn, GenBank 登录号: KM999948。

2 发酵、提取与分离

本实验通过前期多种少量样品发酵的结果对比分析, 选择采用液体发酵 (察式培养基 + *D*-色氨酸, *D*-色氨酸的量为 0.2 g/L) 方式进行米曲霉菌株的扩大发酵。发酵前, 在 250 mL 锥形瓶中配制察氏液体培养基来做母瓶发酵, 每瓶 100 mL。液体扩大发酵时将发酵所需的液体培养基扩大比例倒入发酵罐中, 1 次发酵 30 L, 然后将发酵罐高温灭菌, 冷却至室温后, 将母瓶倒入发酵罐中, 在 28 °C、121 r/min 条件下有氧发酵 5~7 d, 照此方法发酵 4 罐。

每罐发酵完成后, 发酵液装入 50 L 的塑料桶中, 滤过使菌液和菌丝体分开。菌液用 D101 型大孔树脂吸附, 再用 95% 工业乙醇洗脱, 浓缩得到菌液浸膏; 菌丝体用 95% 工业乙醇提取, 再用醋酸乙酯溶液萃取, 浓缩后得到菌丝体浸膏。4 罐菌液和菌丝体都用此方法, 最后将浸膏合并, 得到总浸膏 145 g。

对醋酸乙酯萃取部位 145 g 进行化学成分分离。首先用甲醇溶解, 用 100~200 目的硅胶进行硅胶柱色谱粗分, 以二氯甲烷-甲醇 (30:1、20:1、10:1、6:1、4:1、2:1、1:1、0:1) 梯度洗脱, 根据薄层色谱 (TLC) 检识结果, 合并相同组分, 得到 9 个流分 (Fr. A~I)。Fr. A (30:1 部分, 15.3 g) 用石油醚-丙酮 (20:1、10:1、7:1、4:1、2:1、1:1) 梯度洗脱, 得到 6 个组分 Fr. A₁~A₆。Fr. A₅ (2:1 部分) 经过半制备型 HPLC (XBP C₁₈ 柱, 38% 乙腈-水, 体积流量 3 mL/min) 分离纯化, 得到化合物 **1** (*t_R* = 5.2 min, 3.2 mg)、**2** (*t_R* = 8.6 min, 8.4 mg)、**3** (*t_R* = 12.4 min, 5.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, $[\alpha]_D^{25} -8.3^\circ$ (*c* 0.001, MeOH); UV (nm): 256 (2.59), 203 (2.78), 191 (3.33);

根据其质谱 ESI-MS m/z : 279 $[M+Na]^+$ 以及高分辨质谱 HR-ESI-MS m/z : 279.139 6 $[M+Na]^+$, 结合 1H -和 ^{13}C -NMR 谱确定分子式为 $C_{13}H_{21}NO_4$, 不饱和度为 4。化合物 **1** 的 1H -NMR 显示了 9 个氢信号, 包括 1 个连氧次甲基 δ_H 4.08 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 1 个环内次甲基 δ_H 2.71 (1H, dd, $J = 5.7, 9.0$ Hz) 和 1 个环外次甲基 δ_H 4.22 (1H, m), 1 个亚甲基 δ_H 1.51, 2.06 (2H, m) 和 4 个甲基 [1 个单峰 δ_H 1.73 (3H, s), 2 个双峰 δ_H 1.25 (3H, d, $J = 5.7$ Hz), δ_H 1.69 (3H, d, $J = 5.7$ Hz) 和 1 个三重峰 δ_H 1.01 (3H, t, $J = 6.2$ Hz)]。根据其 ^{13}C -NMR 和 DEPT 数据 (表 1) 观察到 13 个碳信号, 其中, 5 个季碳最为特征 (2 个羰基季碳、2 个 sp^2 杂化的季碳及 1 个 sp^3 杂化的季碳)。根据其不饱和度为 4, 排除 2 个羰基和 1 个双键, 化合物 **1** 应该含有 1 个环。根据 HMBC 中 H-10 与 C-9、C-8; H-11 与 C-7、C-8、C-9 的相关, 以及 1H - 1H COSY 中 H-11/H-8/H-9/H-10 的相关得到 1 个 2-甲基丁酮的侧链片段。剩余 8 个碳信号除去 2 个环上的甲基信号, 得到 1 个六元烯酮环。根据酮羰基 C-1 的化学位移向高场移动判断烯基必定与之相连; 同理, 根据侧链酮羰基 C-7 的化学位移向高场移动推测烯基与之相连。根据 H-13 与 C-6、C-5 和 C-1 的 HMBC 相关以及 H-13/H-6/H-5 的 1H - 1H COSY 相关可确认 C-5、C-6 和 C-13 的位置。根据 H-5 与 C-12、C-4 和 C-3 以及 H-12 与 C-4、C-5 和 C-3 的 HMBC 相

表 1 化合物 **1** 的核磁共振数据 (500/125 MHz, C_5D_5N)

Table 1 1H and ^{13}C -NMR data of compound **1** (500/125 MHz, C_5D_5N)

碳位	δ_C	δ_H
NH ₂		
1	195.5 (s)	
2	106.7 (s)	
3	178.9 (s)	
4	74.6 (s)	
5	76.6 (d)	4.08 (d, $J = 9.0$ Hz)
6	48.5 (d)	2.71 (dd, $J = 5.7, 9.0$ Hz)
7	207.9 (s)	
8	45.1 (d)	4.22 (m)
9	28.1 (t)	1.51 (m), 2.06 (m)
10	12.7 (q)	1.01 (t, $J = 6.2$ Hz)
11	17.8 (q)	1.25 (d, $J = 5.7$ Hz)
12	22.8 (q)	1.73 (s)
13	15.3 (q)	1.69 (d, $J = 5.7$ Hz)

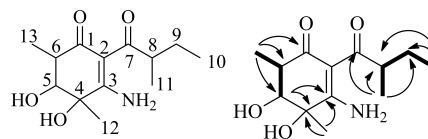


图 1 化合物 **1** 的结构及主要 HMBC (箭头) 和 1H - 1H COSY (实线) 相关

Fig. 1 Structure and key HMBC (solid arrows) and 1H - 1H COSY (bold lines) correlations of compound **1**

关可依次确认 C-4 和 C-3 的环上位置以及 12-CH₃ 与 C-4 相连。根据 C-3 的化学位移值向低场移动, 且为季碳, 那么剩余的氨基必然连于 C-3 上。至此, 化合物 **1** 的结构鉴定为 3-氨基-4,5-二羟基-4,6-二甲基-2-(2-甲基丁酰) 环己-2-烯酮, 命名为米曲霉聚酮 A。

化合物 **2**: 黄色粉末, 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.48 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-4), 7.41 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-6), 7.39 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7), 7.31 (2H, m, H-20, 22), 7.22 (1H, m, H-21), 7.16 (2H, m, H-19, 23), 7.10 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-5), 6.70 (1H, s, H-2), 4.20 (1H, t, $J = 4.0$ Hz, H-14), 4.00 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-11), 3.13 (2H, t, $J = 4.7$ Hz, H-17), 3.12 (3H, s, H-24), 3.07 (1H, m, H-10b), 1.05 (1H, dd, $J = 14.2, 11.2$ Hz, H-10a); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 123.5 (C-2), 110.1 (C-3), 118.9 (C-4), 120.1 (C-5), 129.1 (C-6), 111.5 (C-7), 126.7 (C-8), 136.6 (C-9), 31.0 (C-10), 55.5 (C-11), 165.9 (C-12), 63.3 (C-14), 166.0 (C-16), 36.9 (C-17), 135.2 (C-18), 130.5 (C-19, 23), 128.1 (C-20, 22), 122.6 (C-21), 33.4 (C-24); 以上波谱数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **2** 为 12-*N*-甲基-环-(*L*-色氨酰-*L*-苯丙氨酰)。

化合物 **3**: 白色粉末, 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.56 (4H, m, H-20, 22, 20', 22'), 7.49 (2H, m, H-21, 21'), 7.12 (4H, m, H-19, 23, 19', 23'), 7.05 (2H, m, H-7, 7'), 7.03 (2H, m, H-5, 5'), 6.95 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-6, 6'), 6.68 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8, 8'), 4.79 (2H, s, 1, 1'-NH), 4.70 (2H, s, H-2, 2'), 4.26 (2H, s, H-15, 15'), 3.65 (2H, dd, $J = 12.0, 3.8$ Hz, H-11, 11'), 3.50 (2H, dd, $J = 14.3, 3.0$ Hz, H-17b, 17b'), 3.25 (2H, dd, $J = 14.3, 4.4$ Hz, H-17a, 17a'), 3.02 (6H, s, H-24, 24'), 2.00 (2H, dd, $J = 12.3, 4.9$ Hz, H-12a, 12a'), 1.55 (2H, t, $J = 12.2$ Hz, H-12b, 12b'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 165.5 (C-13, 13'), 164.1 (C-16, 16'), 150.3 (C-9, 9'), 134.6 (C-18, 18'),

129.8 (C-7, 7'), 129.5 (C-19, 23, 19', 23'), 129.4 (C-20, 22, 20', 22'), 128.1 (C-21, 21'), 126.6 (C-5, 5'), 125.9 (C-5, 5'), 119.0 (C-6, 6'), 109.8 (C-8, 8'), 78.8 (C-2, 2'), 63.2 (C-15, 15'), 59.0 (C-11, 11'), 58.7 (C-11, 11'), 36.3 (C-17, 17'), 32.7 (C-24, 24'), 36.1 (C-17, 17')。以上波谱数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 3 为二聚色氨酸素。

4 讨论

本实验对重楼属植物滇重楼内生真菌米曲霉的次生代谢产物的化学成分进行研究, 运用多种分离纯化和鉴定技术, 从米曲霉的次生代谢产物的醋酸乙酯溶性部分中分离得到 3 个化合物, 其中 1 个是新的聚酮类化合物, 为深入了解重楼属植物内生真菌的次生代谢产物化学成分提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] 郭龙妹, 高林怡, 孙文静, 等. 药用植物内生真菌研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2019, 47(9): 11-13.
- [2] 贾力维, 王谦博, 张爽, 等. 药用植物内生真菌抗肿瘤代谢产物研究进展 [J]. 中医药信息, 2019, 36(2): 103-108.
- [3] 李馨蕊, 马川, 郭力, 等. 川穹内生真菌次级代谢产物中 1 个新的内酯化合物 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4859-4862.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 黄艳萍, 张杰, 杨敏, 等. 接种时期对丛枝菌根真菌侵染的滇重楼幼苗生长发育及甾体皂苷含量的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4438-4448.
- [6] 周玲. 植物内生真菌米曲霉的次生代谢产物研究 [D]. 昆明: 云南民族大学, 2018.
- [7] Sakata K, Kuwatsuka T, Sakurai A, et al. Isolation of aspirochlorine (=antibiotic A30641) as a true antimicrobial constituent of the antibiotic, oryzachlorin, from *Aspergillus oryzae* [J]. *J Agric Chem Soc Japan*, 1983, 47(11): 2673-2674.
- [8] 杨秀芳, 王鹏飞, 马养民, 等. 一株分离自黑果枸杞的内生真菌米曲霉代谢产物 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(9): 1554-1557.
- [9] Zhou M, Zhou K, He P, et al. Antiviral and cytotoxic isocoumarin derivatives from an endophytic fungus *Aspergillus oryzae* [J]. *Planta Med*, 2016, 82(5): 414-417.
- [10] Luo S L, Li G H, Liu F F, et al. A new sesquiterpene from endophytic fungus *Aspergillus* sp. [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(14): 1334-1338.
- [11] Lin A Q, Du L, Fang Y C, et al. Iso- α -cyclopiazonic acid, a new natural product isolated from the marine-derived fungus *Aspergillus flavus* C-F-3 [J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45(5): 677-680.