

栓菌 *Trametes* sp. G048 的化学成分研究

桑志高^{1,2}, 李冬利¹, 陶美华¹, 涂国全², 章卫民^{1*}

¹广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东省华南应用微生物重点实验室 省部共建国家重点实验室培育基地, 广州 510070; ²江西农业大学 生物科学与工程学院, 南昌 330045

摘要:从栓菌属真菌 *Trametes* sp. G048 的发酵液和菌丝体中分离并鉴定出 6 个化合物, 经波谱数据分析分别鉴定为 isodrimenediol diacetate(**1**)、isodrimenediol 2-acetate(**2**)、脑苷脂 D(**3**)、麦角甾醇(**4**)、过氧化麦角甾醇(**5**)和啤酒甾醇(**6**)。其中化合物 **1** 和 **2** 为新的天然产物。

关键词: 栓菌属; 倍半萜; drimane

中图分类号: R284.1; Q946.91; O629

文献标识码: A

Chemical Constituents of *Trametes* sp. G048

SANG Zhi-gao^{1,2}, LI Dong-li¹, TAO Mei-hua¹, TU Guo-quan², ZHANG Wei-min^{1*}

¹Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Collection and Application, Guangdong Provincial Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry--Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangzhou 510070, China;

²College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: Six compounds were isolated from the extract of *Trametes* sp. G048 and identified as isodrimenediol diacetate (**1**), isodrimenediol 2-acetate (**2**), cerebroside D (**3**), ergosterol (**4**), ergosterol peroxide (**5**) and cerevisterol (**6**). Compounds **1** and **2** are firstly reported as natural products.

Key words: *Trametes* sp.; sesquiterpene; drimane

栓菌属 (*Trametes*) 属于担子菌纲多孔菌目多孔菌科 (Polyporaceae), 是一类广泛分布的真菌, 主要寄生在活立木、立桩上, 有时也生长于腐木上^[1]。该属真菌在生物制药及食品工业等方面有较高的利用价值, 如云芝 (*Trametes versicolor*) 是著名的药用菌^[2]。迄今对栓菌属真菌的研究主要集中在菌种分类、漆酶相关研究等方面^[3-5], 对栓菌属真菌的代谢产物相关报道很少。为了发掘多孔菌科真菌的药用资源, 作者对采自广东大东山自然保护区的栓菌 *Trametes* sp. G048 的化学成分进行了研究。从其发酵液和菌丝体的乙酸乙酯提取物中分离出 6 个化合物: isodrimenediol diacetate(**1**)、isodrimenediol 2-acetate(**2**)、脑苷脂 D(**3**)、麦角甾醇(**4**)、过氧化麦角甾醇(**5**)和啤酒甾醇(**6**), 其中 **1** 和 **2** 为新的天然产物。

1 仪器与试剂

AVANCE III 型 500 MHz 核磁共振波谱仪 (Bruker 公司), Acquity UPLC-Q-ToF Micro 质谱仪 (Waters 公司), Trace DSQ 气相色谱-质谱联用仪 (Thermo Finnigan 公司), PZ1000B 旋转式大容量普通摇床 (武汉瑞华仪器设备有限公司), RE-2000 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂), 超净工作台 (上海恒益科技有限公司)。

柱层析硅胶 (100 ~ 200 目, 200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂), 高效薄层硅胶板 Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck 公司), C₁₈ 反相硅胶 (40 ~ 75 μm, Fuji Silysia Chemical Ltd.), 凝胶 Sephadex LH-20 (18 ~ 110 μm, Amersham Biosciences), 溶剂及试剂均为分析纯, 购自广州化学试剂厂。

2 菌种与培养条件

菌株 G048 从采自广东省大东山自然保护区的栓菌 (*Trametes* sp.) 子实体中分离获得, 菌种保存于广东省微生物研究所。发酵培养基为: 马铃薯 200

收稿日期: 2011-04-18 接受日期: 2011-07-21

基金项目: 广东省科技计划重点项目“食用菌产业推进关键技术研究与示范”(2009B020201012); 广东省科学院青年科学研究基金 (qnj201009); 广东省科学院优秀青年科技人才基金项目

* 通讯作者 Tel: 86-20-37656321; E-mail: wnzhang58@yahoo.com.cn

g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, 维生素 B_1 10 mg/L, pH 自然。用接种针挑取适量菌体, 接种到装有 100 mL 培养液的 250 mL 锥形瓶中, 在 28 °C、130 r/min 的条件下摇床培养 3 d, 获种子培养液。将该种子液按 5% 的接种量接种到装有 250 mL 培养液的 500 mL 锥形瓶中, 培养条件与种子液相同, 培养时间为 7 d, 共发酵 120 L。

3 提取与分离

120 L 发酵产物经过滤分离得发酵液和菌丝体, 发酵液用乙酸乙酯萃取 3 次, 40 °C 下减压浓缩得浸膏 5.9 g; 菌丝体置于 55 °C 烘箱烘干、粉碎, 以 98% 乙醇浸提多次, 浓缩至无醇味, 加适量水悬浮, 再用乙酸乙酯萃取 5 次, 40 °C 减压浓缩得浸膏 20.0 g。

浸膏分别用硅胶柱分离, 以石油醚/乙酸乙酯

(100:0 ~ 0:100) 梯度洗脱, 用薄层层析检测 (显色剂为茴香醛-浓硫酸试剂), 合并相似组分, 发酵液部分得到 7 个组分 (F1 ~ F7), 菌丝体部分得到 10 个组分 (M1 ~ M10)。F3 组分采用硅胶柱层析, 以石油醚/乙酸乙酯(4:1) 洗脱, 再经 Sephadex LH-20 以氯仿/甲醇(1:1) 洗脱得到化合物 **1** (5.3 mg)。F4 组分采用硅胶柱层析, 以石油醚/乙酸乙酯(2:1) 洗脱, 再经 Sephadex LH-20 以氯仿/甲醇(1:1) 洗脱得到化合物 **2** (17.7 mg)。M3 组分用 Sephadex LH-20 柱层析, 以氯仿/甲醇(1:1) 洗脱, 再经硅胶柱层析以石油醚/乙酸乙酯(3:1) 洗脱得到化合物 **4** (15.9 mg) 和化合物 **5** (9.4 mg)。M5 组分采用硅胶柱层析, 以氯仿/甲醇(5:1) 洗脱得到化合物 **6** (4.7 mg)。M9 组分采用 Sephadex LH-20 柱层析, 以氯仿/甲醇(1:1) 洗脱, 再经硅胶柱层析以氯仿/甲醇(4:1) 洗脱得到化合物 **3** (13.5 mg)。

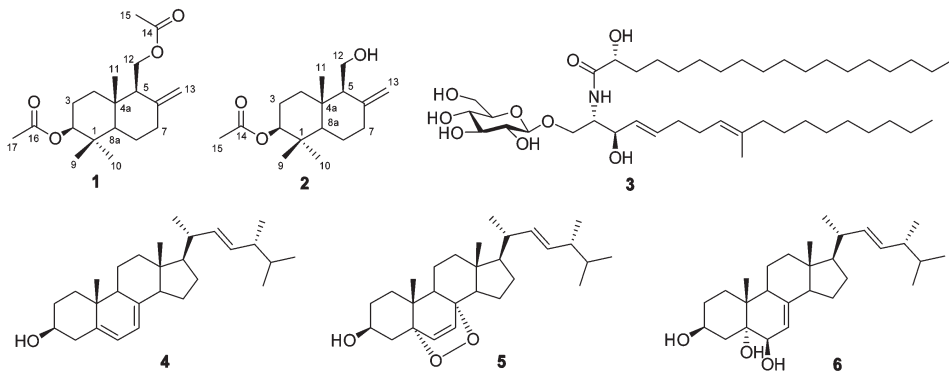


图 1 化合物 1~6 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1-6

4 结构鉴定

化合物 **1** 白色固体。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.88 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-13 β), 4.55 (1H, dd, $J = 11.8, 4.1$ Hz, H-2), 4.54 (1H, brs, H-13 α), 4.28 (1H, dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz, H-12 β), 4.23 (1H, dd, $J = 11.4, 8.4$ Hz, H-12 α), 2.43 (1H, ddd, $J = 13.3, 4.2, 2.4$ Hz, H-7 β), 2.06 (3H, s, H-17), 2.03 (3H, s, H-15), 2.09 ~ 2.03 (2H, m), 1.79 ~ 1.73 (2H, m), 1.68 ~ 1.59 (2H, m), 1.50 ~ 1.38 (2H, m), 1.23 (1H, dd, $J = 12.5, 2.7$ Hz, H-8a), 0.90 (3H, s, H-9), 0.87 (3H, s, H-10), 0.80 (3H, s, H-11); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 171.3 (s, C-14), 170.9 (s, C-16), 146.1 (s, C-6), 107.7 (t, C-13), 80.4 (d, C-2), 61.5 (t, C-12), 54.4 (d, C-8a), 54.3

(d, C-5), 38.5 (s, C-4a), 38.0 (s, C-1), 37.3 (t, C-7), 36.6 (t, C-4), 28.3 (q, C-9), 24.1 (t, C-3), 23.3 (t, C-8), 21.3 (q, C-17), 21.1 (q, C-15), 16.6 (q, C-10), 15.1 (q, C-11)。以上数据与文献一致^[6], 化合物 **1** 鉴定为 isodrimenediol diacetate, 该化合物只在化学合成 drimane 型倍半萜的过程中得到过, 为新的天然产物。它的前体物质 isodrimenediol 从多孔菌 *Polyporus arcularius* 中分离得到, 被认为是生物合成 drimane 型倍半萜的中间体, 具有一定的抗菌活性^[7]。

化合物 **2** 白色固体。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.97 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-13 β), 4.68 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-13 α), 4.54 (1H, dd, $J = 11.8, 4.3$ Hz, H-2), 3.82 (1H, dd, $J = 11.0, 3.9$ Hz, H-12 β), 3.78 (1H, dd, $J = 11.0, 10.9$ Hz, H-12 α), 2.44 (1H,

ddd, $J = 13.1, 4.3, 2.4$ Hz, H-7 β), 2.06 (3H, s, H-15), 2.02 ~ 1.20 (9H, m), 0.88 (3H, s, H-9), 0.85 (3H, s, H-10), 0.75 (3H, s, H-11); ^{13}C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 171.9 (s, C-14), 147.9 (s, C-6), 107.8 (t, C-13), 81.3 (d, C-2), 59.6 (d, C-5), 59.5 (t, C-12), 55.3 (d, C-8a), 39.4 (s, C-1), 38.9 (s, C-4a), 38.4 (t, C-7), 37.5 (t, C-4), 29.2 (q, C-9), 25.0 (t, C-3), 24.5 (t, C-8), 22.2 (q, C-15), 17.5 (q, C-10), 16.2 (q, C-11)。以上数据与文献一致^[6], 化合物 **2** 鉴定为 isodrimenediol 2-acetate, 该化合物也只在化学合成 drimane 型倍半萜的过程中得到过, 也是新的天然产物。

化合物 3 白色粉末。HR-ESI-MS 显示其分子式为 C₄₃H₈₁ON₉, 不饱和度为 4。其 ^{13}C NMR 谱显示酰胺羰基 δ_{C} 176.7, β -D-葡萄糖残基 δ_{C} 104.2, 77.5, 77.4, 74.5, 71.0, 62.2, 四个烯键碳 δ_{C} 136.3, 134.1, 130.6, 124.3, 两个末端甲基 δ_{C} 14.0 \times 2, 一个与氮相连的次甲基 δ_{C} 54.1, 一个连氧亚甲基 δ_{C} 69.2 和两个连氧次甲基 δ_{C} 72.6, 72.4。因此推测化合物可能为糖基化的鞘氨醇类化合物。为确定化合物中两个脂肪链的长度, 对其进行甲醇解, 生成的长链饱和脂肪酸酯通过 GC-MS 确定为 2-羟基十八酸甲酯, 其在 m/z 314 处出现碎片峰, 分子式为 C₁₉H₃₈O₃, 由此确定该化合物的含羰基饱和脂肪侧链碳个数为 18。 ^{13}C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ : 176.7 (s, C-1'), 136.3 (s, C-9), 134.1 (d, C-5), 130.6 (d, C-4), 124.3 (d, C-8), 104.2 (d, C-1''), 77.5 (d, C-3''), 77.4 (d, C-5''), 74.5 (d, C-2''), 72.6 (d, C-3), 72.4 (d, C-2'), 71.0 (d, C-4''), 69.2 (t, C-1), 62.2 (t, C-6''), 54.1 (d, C-2), 40.3 (t, C-10), 35.4 (t, C-3'), 33.3 (t, C-6), 32.6 (t, C-7, 16), 30.4 ~ 29.9 (t, C-12 ~ 15, 5' ~ 15'), 28.6 (t, C-11), 28.2 (t, C-16'), 25.7 (t, C-4'), 23.3 (t, C-17, 17'), 15.7 (q, C-19), 14.0 (q, C-18, 18')。因此化合物 **3** 鉴定为脑苷脂 D, 其核磁数据与文献^[8]报道从高等真菌黄鳞多孔菌 *Polyporus ellisii* 中得到的一致, 该化合物也从紫芝中得到过^[9]。脑苷脂类化合物是细胞膜的重要组成部分, 研究发现它们可以增强阿枯菌素 (aculeacin) 的

抗真菌活性^[10]。化合物 **4** ~ **6** 均为无色针晶, TLC 分析显示甾醇类化合物的特征斑点。将这 3 个化合物分别与麦角甾醇、过氧化麦角甾醇、啤酒甾醇标准样品进行 TLC 分析, 采用 3 种不同的展开体系, 其 R_f 值均一致, 混合点不分离, 故分别确定为麦角甾醇、过氧化麦角甾醇、啤酒甾醇。

参考文献

- 1 Zhao JD (赵继鼎). Flora Fungorum Sinicorum (中国真菌志)-Polyporaceae. Beijing: Science Press, 1998. 1-44.
- 2 Li JF (李俊峰). The biological characteristics, pharmacological effects and application prospect of *Coriolus versicolor*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2003, 31: 509-510.
- 3 Cui DZ (崔岱宗), Xiang BB (向冰冰). Progress on classification and identification of *Trametes* by molecular taxonomy. *Acad Period Farm Prod Proc* (农产品加工·学刊), 2009, 175: 29-33.
- 4 Zhou HM (周宏敏), Hong YZ (洪宇植), Xiao YZ (肖亚中), et al. High output of a *Trametes* laccase in *Pichia pastoris* and characterization of recombinant enzymes. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2007, 23: 1055-1059.
- 5 Fan FF, Zhuo R, Sun S, et al. Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. *Bioresource Technol*, 2011, 102: 3126-3137.
- 6 Justicia J, Oltra JE, Barrero AF, et al. Total synthesis of 3-hydroxydrimanes mediated by Titanocene (III) - evaluation of their antifeedant activity. *Eur J Org Chem*, 2005: 712-718.
- 7 Fleck WF, Schlegel B, Hoffmann P, et al. Isolation of isodrimenediol, a possible intermediate of drimane biosynthesis from *Polyporus arcularius*. *J Nat Prod*, 1996, 59: 780-781.
- 8 Gao JM, Hu L, Dong ZJ, et al. New glycosphingolipid containing an unusual sphingoid base from the basidiomycete. *Polyporus ellisii*. *Lipids*, 2001, 36: 521-527.
- 9 Liu C (刘超), Chen RY (陈若芸). A new triterpene from fungal fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2010, 41: 8-11.
- 10 Sitrin RD, Chan G, Dingerdissen J, et al. Isolation and structure determination of *Pachybasium* cerebrosides which potentiate the antifungal activity of aculeacin. *J Antibiot*, 1988, 41: 469-480.