

# 深海真菌 *Penicillium herquei* FS83 次生代谢产物研究

李浩华, 潘清灵, 陈玉婵, 李赛妮, 谭国慧, 叶伟, 刘洪新, 孙章华\*, 章卫民\*

广东省微生物研究所 省部共建华南应用微生物国家重点实验室

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, 广州 510070

**摘要:** 利用正相硅胶柱、反相硅胶柱、凝胶柱、薄层层析以及高效液相色谱法等色谱技术从深海真菌 *Penicillium herquei* FS83 的液体发酵产物中分离得到 5 个化合物, 通过波谱数据分析结合文献对照, 分别鉴定为 peniherin A (**1**)、sclerodin (**2**)、对羟基苯乙酸甲酯 (**3**)、对羟基苯乙酮 (**4**)、(*R*)-甲羟戊酸内酯 (**5**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2** 为首次从该属真菌中分离得到。生物活性实验显示, 化合物 **1** 无明显细胞毒活性及抑菌活性。

**关键词:** *Penicillium herquei*; 深海真菌; 次生代谢产物; 异香豆素

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.001

## Secondary Metabolites from Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium herquei* FS83

LI Hao-hua, PAN Qin-ling, CHEN Yu-chan, LI Sai-ni, TAN Guo-hui,

YE Wei, LIU Hong-xin, SUN Zhang-hua\*, ZHANG Wei-min\*

State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key

Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied

Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

**Abstract:** Five compounds were isolated from the extract of the deep-sea-derived fungus *Penicillium herquei* FS83 by utilizing various chromatographic methods such as silica gel, reverse silica gel, Sephadex LH-20, preparative TLC and HPLC. Their structures were identified as peniherin A (**1**), sclerodin (**2**), methyl (4-OH) phenylacetate (**3**), 4-hydroxyacetophenone (**4**), (*R*)-mevalonolactone (**5**), respectively, by spectroscopic data. Compound **1** was identified as a new compound, and compound **2** was isolated from *Penicillium* for the first time. No cytotoxic and antibacterial activities were detected for compound **1**.

**Key words:** *Penicillium herquei*; deep-sea-derived fungus; secondary metabolites; isocoumarin

海洋水域占地球表面积的 70% 以上, 海洋中蕴藏着丰富的生物资源, 其中微生物占海洋生物数量的 90%。海洋微生物由于其生存环境的特殊性(如高渗、高盐、低温、高压、低氧等), 使其具有独特的代谢方式, 从海洋微生物资源中发掘药物先导化合物已成为新药研发的一个重要发展趋势。海洋真菌是海洋微生物的重要组成部分, 其次级代谢产物大部分具有生物活性, 其主要的活性物质有杂多糖、倍半萜、脂肽类等化学物质<sup>[1]</sup>, 是海洋生物活性物质

的重要来源。

青霉属(*Penicillium* Link) 真菌中在自然界分布广泛, 种类繁多, 近百年来已从青霉中发现了很多活性代谢产物, 有的甚至已经是临床常用药物, 如从青霉菌中发现的青霉素目前仍然是临床上应用广泛的重要抗生素。因此, 青霉菌是一类重要的药源资源。为了发掘海洋青霉的活性代谢产物, 本课题组对南海沉积物来源的青霉属真菌进行了次级代谢产物研究<sup>[2-5]</sup>, 并发现菌株 *P. herquei* FS83 发酵提取物具有明显的抗菌和细胞毒活性<sup>[6]</sup>。因此, 作者对该菌株发酵产物进行分离纯化, 从中分离获得 5 个化合物, 分别鉴定为 peniherin A (**1**)、sclerodin (**2**)、对羟基苯乙酸甲酯 (**3**)、对羟基苯乙酮 (**4**)、(*R*)-甲羟戊酸内酯 (**5**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2** 为首次从该属真菌中分离得到。

收稿日期: 2015-11-27 接受日期: 2016-01-12

基金项目: 国家自然科学基金(31272087); 国家“863”计划(2012A A092104); 广东省科技计划(2014A020217012); 广州市科技计划(2013J4100067); 广东省海洋经济创新发展区域示范专项(GD2012-D01-002)

\* 通讯作者 Tel: 86-20-87688309; E-mail: wmzhang58@qq.com; sysuszh@126.com

## 1 仪器与试剂

AVANCE III 型 500 MHz 核磁共振波谱仪, Bruker 公司; X-4A 显微熔点仪, 上海精密科学仪器有限公司; EQUINOX 55 红外光谱仪, Bruker 公司; Ultrospec 6300pro UV/VIS 紫外分光光度计, Biochrom 公司; MAT95XP 高分辨质谱仪 (HR-ESI-MS), Thermo 公司; 超净工作台, 上海恒益科技有限公司; RE-2000 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; LC-20AT 高效液相色谱, 岛津公司。GF<sub>254</sub> 高效薄层硅胶板, Merck 公司; 凝胶柱 Sephadex LH-20, Amersham Biosciences Ltd; C<sub>18</sub> 反相柱, Fuji Fuji Silysia Chemical Ltd; 半制备柱, YMC-pack ODS-A column (250 × 10 mm, 5 μm, 12 nm), YMC 公司; 柱层板硅胶, 青岛海洋化工厂; 有机溶剂均为分析纯, 购自广州化学试剂厂。

## 2 菌种与发酵培养

菌株 FS83 从南海 (106°30.295'E, 10°0.941'N) 1675 m 深处的沉积物中分离得到。经鉴定为梅花状青霉 *Penicillium herquei*<sup>[6]</sup>, 菌株保存于广东省微生物研究所。发酵培养基为马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/L, 维生素 B<sub>1</sub> 10 mg/L, 海盐 15 g/L, pH 自然。将活化后的菌株 FS83 接种至含培养液的三角瓶中, 26 °C, 120 rpm 摇床培养 4 d, 获得种子液, 将种子液按 10% 接种量转接到装有培养液的锥形瓶中, 培养条件与种子液相同, 培养 7 d, 共发酵 100 L。

## 3 提取与分离

菌株 FS83 的发酵液经 8 层纱布过滤后用乙酸乙酯萃取 3 次, 减压浓缩得黑色浸膏 38.5 g。浸膏经过正相硅胶柱 (石油醚/乙酸乙酯, 1:0→0:1) 得到 6 个粗组份 (Fr. 1-Fr. 6)。Fr. 1 (5.6 g) 经凝胶柱 (二氯甲烷/甲醇, 1:1) 初步划段得到亚组分 Fr. 1a-Fr. 1f, Fr. 1c (0.9 g) 经过反相柱 (甲醇/水, 5:5) 进一步纯化得到 1 个主斑点 (120 mg), 再经正相柱 (石油醚/乙酸乙酯, 15:1) 纯化得到化合物 **1** (20.0 mg)。Fr. 2 (7.6 g) 经过凝胶柱 (二氯甲烷/甲醇, 1:1) 初步划段, 再过反相柱 (甲醇/水, 0:1→1:0) 进一步划段得到 17 个亚组分 (Fr. 2a-Fr. 2q), Fr. 2f (87 mg) 用 HPLC 半制备 (甲醇/水, 60:40, 3 mL/min) 分离得到化合物 **2** (6.5 mg)。Fr. 3 (5.1 g) 经过反相

柱 (甲醇/水, 2:8→1:0) 初步划段得到 26 个亚组分 (Fr. 3a-Fr. 3z), Fr. 3k (116 mg) 用 HPLC 半制备 (乙腈/水, 70:30, 3 mL/min) 分离纯化得到化合物 **3** (5.6 mg)。Fr. 4 (9.2 g) 经过凝胶柱 (二氯甲烷/甲醇, 1:1) 初步划段, 然后经过反相柱划段得到亚组分 Fr. 4a-Fr. 4n, Fr. 4g (350 mg) 再用硅胶柱 (石油醚/乙酸乙酯, 5:1) 分离划段成 9 个组分 (Fr. 4ga-Fr. 4gi), Fr. 4gc 通过 HPLC 半制备 (甲醇/水, 65:35, 3 mL/min) 分离得到化合物 **4** (5.7 mg)。Fr. 6 (3.1 g) 经凝胶、正相反复纯化后得到 7 个亚组分 Fr. 6a-Fr. 6g, Fr. 6d (415 mg) 用反相柱 (70% 甲醇/水) 纯化后, 用 HPLC 半制备 (乙腈/水, 60:40, 3 mL/min) 分离得到化合物 **5** (75.4 mg)。

## 4 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末, 易溶于甲醇, 254 nm 紫外光下显蓝红色荧光, 365 nm 紫外光下显黄色荧光, 碘染显色, 硫酸-茴香醛显色剂显红色。mp. 159 ~ 162 °C; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 254 (4.41) nm; IR (KBr) ν<sub>max</sub> 3374, 2925, 1712, 1663, 1453, 1294, 1192 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS *m/z* 327 [M + Na]<sup>+</sup>; HR-ESI-MS *m/z* 327.0857 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>Na, 327.0845), 显示该分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>, 不饱和度为 9。<sup>1</sup>H-NMR 数据显示低场区有 7 个氢 [δ<sub>H</sub> 7.44 (1H, s), 6.58 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.50 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 5.56 (1H, dt, *J* = 10.8, 7.4 Hz), 5.41 (1H, dt, *J* = 10.8, 7.4 Hz) 和 4.32 (2H, t, *J* = 6.8 Hz)], 在高场区有 1 个裂分为三重峰的甲基 [δ<sub>H</sub> 0.99 (3H, t, *J* = 7.5 Hz)] 和 4 个多重峰的氢 [δ<sub>H</sub> 2.53 (2H, m), 和 2.14 (2H, m)]; <sup>13</sup>C NMR 结合 HSQC 谱显示在低场区有 12 个碳: (δ<sub>C</sub> 167.6, 166.0, 165.1, 161.4, 144.0, 138.5, 135.9, 124.6, 114.5, 107.0, 105.4 和 101.3), 在高场区有 3 个亚甲基 [δ<sub>C</sub> 66.7 (连氧), 27.6 和 21.5] 和 1 个甲基 (δ<sub>C</sub> 14.6) (表 1)。上述信息显示化合物 **1** 可能有 1 个苯环、2 个双键和 2 个酯羰基片段, 除了 8 个不饱和度, 还有 1 个不饱和度无法归属, 说明化合物 **1** 还含有 1 个环。通过查阅文献发现化合物 **1** 的以上数据与已知化合物 penicilisorin 比较相似<sup>[7]</sup>, 不同之处是化合物 **1** 中没有 penicilisorin 上的 2 个甲氧基, 在含有 1 个双键的 C6 单位的直链部分取代了 penicilisorin 上的甲酯。HMBC 相关进一步确定了该双键位置 (图 1), 在 HMBC 谱上发现有从 H-1' [δ<sub>H</sub> 4.32

(2H,t,6.8)]分别到 C-9 ( $\delta_c$  161.4, C), C-2' ( $\delta_c$  27.6, CH<sub>2</sub>) 和 C-3' ( $\delta_c$  124.6, CH), 从 H-2' [ $\delta_H$  2.53 (2H,m,)]分别到 C-3'和 C-4' ( $\delta_c$  135.9, CH), 从支链甲基 H-6' [ $\delta_H$  0.99 (3H,t,7.5)]分别到 C-5' ( $\delta_c$  21.5, CH<sub>2</sub>) 和 C-4', 和从 H-5' 分别到 C-4' 和 C-3' 的相关, 因此支链部分的双键位置得以确定。同时根据顺反式双键二氢的耦合常数区间为 10 ~ 16 Hz 的规则, 从 <sup>1</sup>H NMR 数据中 H-3'/H-4' 的耦合常数 ( $J = 10.8$  Hz) 确定了  $\Delta 3'$  的构型为 *Z* 型, 因此该化合物的结构确定为 6,8-二羟基- $\Delta^{3'}$ -*Z*-己烯-9-异香

豆素酯, 命名为 peniherin A。化合物 **1** 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 ([www.trew.ac.cn](http://www.trew.ac.cn))。

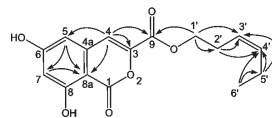


图 1 化合物 **1** 的化学结构及主要 HMBC (→) 相关  
Fig. 1 Chemical structure and key HMBC (→) correlations of **1**

表 1 化合物 **1** 的 <sup>1</sup>H (500 MHz) 和 <sup>13</sup>C (125 MHz) NMR 数据 (CD<sub>3</sub>OD)  
Table 1 <sup>1</sup>H (500 MHz) and <sup>13</sup>C (125 MHz) NMR data of compound **1** in CD<sub>3</sub>OD

No.	$\delta_H^*$	$\delta_c$	No.	$\delta_H$	$\delta_c$
<b>1</b>		166.0	9		161.4
<b>3</b>		144.0	1'	4.32 (2H,t,6.8)	66.7
<b>4</b>	7.44 (1H,s)	114.5	2'	2.53 (2H,m,)	27.6
<b>4a</b>		138.5	3'	5.41 (1H,dt,10.8,7.4)	124.6
<b>5</b>	6.58 (1H,d,2.1)	107.0	4'	5.56 (1H,dt,10.8,7.4),	135.9
<b>6</b>		167.6	5'	2.14 (2H,m,)	21.5
<b>7</b>	6.49 (1H,d,2.1,)	105.0	6'	0.99 (3H,t,7.5,)	14.6
<b>8</b>		165.1			
<b>8a</b>		101.3			

\*  $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz.

**化合物 2** 淡黄色针晶(氯仿), ESI-MS  $m/z$ : 351 [M + Na]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  6.95 (1H, s, H-8), 4.77 (1H, q,  $J = 6.6$ , H-2'), 2.75 (3H, s, 7-CH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, H-4', 5'), 1.45 (3H, d,  $J = 6.6$ , H-1'), 1.25 (3H, s, H-4', 5'); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  166.5 (C-6), 166.1 (C-9), 164.6 (C-1), 164.5 (C-3), 164.4 (C-4), 149.7 (C-7), 136.7 (C-3b), 119.9 (C-5), 118.8 (C-8), 109.1 (C-6a), 99.1 (C-9a), 94.9 (C-3a), 92.9 (C-2'), 44.3 (C-3'), 26.6 (C-4'), 24.3 (7-CH<sub>3</sub>), 21.8 (C-5'), 15.6 (C-1'). 以上数据与文献<sup>[8]</sup>中报道的数据一致, 故该化合物鉴定为 sclerodin。

**化合物 3** 无色油状物, ESI-MS  $m/z$ : 189 [M + Na]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.13 (2H, d,  $J = 8.4$ , H-2, 6), 6.76 (2H, d,  $J = 8.4$ , H-3, 5), 5.46 (1H, s, 4-OH), 3.71 (3H, s, H-9), 3.57 (2H, s, H-7); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.8 (C-8), 155.8 (C-4), 131.4 (C-2, 6), 126.8 (C-1), 116.4 (C-3, 5), 53.1 (C-9), 41.2 (C-7)。经查阅

相关文献, 该化合物的核磁数据与文献报道的数据基本一致<sup>[9]</sup>, 故确定为该化合物为对羟基苯乙酸甲酯。

**化合物 4** 白色晶体(甲醇), ESI-MS  $m/z$ : 135 [M-H]<sup>-</sup>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD)  $\delta$  7.85 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2, 6), 6.76 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3, 5), 2.51 (3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOD)  $\delta$  198.59 (C-7), 161.04 (C-4), 131.26 (C-2, C-6), 129.73 (C-1), 115.52 (C-3, C-5), 27.13 (C-8)。以上核磁数据与文献<sup>[10]</sup>中报道的化合物基本一致, 故该化合物鉴定为对羟基苯乙酮。

**化合物 5** 无色油状物, ESI-MS  $m/z$ : 153 [M + Na]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.50 (1H, m, Ha-6), 4.26 (1H, m, Hb-6), 2.56 (1H, d,  $J = 17.4$ , Ha-3), 2.39 (1H, d,  $J = 17.4$ , Hb-3), 1.81 (2H, dd,  $J = 6.8, 4.8$ , H-5), 1.27 (3H, s, H-7); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.6 (C-2), 68.6 (C-4), 67.3 (C-6), 45.3 (C-3), 36.4 (C-5), 30.2 (C-7)。经查阅文献, 发现该化合物与文献报道<sup>[11]</sup>的数

据基本一致,故该化合物鉴定为(*R*)-甲羟戊酸内酯。

## 5 细胞毒和抗菌活性测试

采用SRB法<sup>[12]</sup>测定化合物**1**、**3**、**5**对4种肿瘤细胞株SF-268、MCF-7、NCI-H460和HePG-2的细胞毒活性,但均无明显的细胞毒活性。采用生长对峙

表2 化合物**1**、**3**、**5**对植物病原真菌的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of **1**, **3** and **5** on plant pathogenic fungi

化合物 Compound	抑制率 Inhibition rate (%)		
	链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	荔枝霜疫霉 <i>Peronophthora lüchii</i>	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<b>1</b>	16.1	19.2	3.5
<b>3</b>	32.2	21.6	4.6
<b>5</b>	31.2	7.8	58.5

注:每片滤纸片中的化合物含量为10 μg。

Note: The content of sample in each filter paper was 10 μg.

## 6 讨论与结论

本研究从深海真菌 *Penicillium herquei* FS83 的发酵液中分离得到5个单体化合物,其中化合物**1**为新的异香豆素类化合物。研究表明,异香豆素类化合物具有抗癌、抗菌及消炎等生物活性<sup>[14,15]</sup>,虽然本研究通过活性测试发现化合物**1**没有细胞毒和抗菌活性,但今后可以对该化合物进行其他活性测试,以发掘该化合物的其他生物活性。化合物**2**为茛酮(phenalenone)类的化合物,据文献报道,从 *Penicillium herquei* 中发现的次生代谢产物多为该类成分<sup>[16,17]</sup>,因此茛酮类化合物可能是该真菌的特征性成分,在以茛酮类化合物为底物的化学合成设计上可以为工业化发酵奠定物质基础。

### 参考文献

- 1 She ZG (佘志刚), Hu GP (胡谷平), Wu YW (吴耀文), et al. Study on the methanolysis of the fungal polysaccharide from the marine mangrove fungus (Strain No. 1356) from the South China Sea. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报, 自科版), 2001, 40: 123-124.
- 2 Li LJ (李乐军), Tao MH (陶美华), Chen YC (陈玉婵), et al. Secondary metabolites from the solid culture of marine fungal strain *Penicillium sclerotiorum* FS50. *Mycosystema* (菌物学报), 2015, 34: 117-123.
- 3 Zhang L (张玲), Li DL (李冬利), Chen YC (陈玉婵), et al. Study on secondary metabolites of marine fungus *Penicilli-*

法<sup>[13]</sup>测定化合物**1**、**3**、**5**对链格孢(*Alternaria alternata*)、荔枝霜疫霉(*Peronophthora lüchii*)和胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)等3种植物病原真菌的抑制活性,结果显示每片滤纸片中的化合物含量为10 μg时,化合物**5**对胶孢炭疽菌具有一定的抑制作用,抑制率为58.5%,而其他化合物则无明显的抑制活性(表2)。

- um sp. FS60 from the South China Sea. *J Chin Med Mater* (中药材), 2012, 35: 1091-1094.
- 4 Li HH (李浩华), Wang L (王磊), Pan QL (潘清灵), et al. Study on the antifungal activity of marine fungus *Penicillium thomii* FS77. *J Chin Med Mater* (中药材), 2013, 36: 99-101.
- 5 Tao MH (陶美华), Li LJ (李乐军), Chen YC (陈玉婵), et al. Chemical constituents of marine fungus *Penicillium sclerotiorum* FS50. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1593-1596.
- 6 Li HH (李浩华), Chen YC (陈玉婵), Wang L (王磊), et al. Study on antimicrobial and antitumor activities of marine-derived fungus *Penicillium herquei* FS83. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2013, 1: 151-155.
- 7 Arunpanichlert J, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, et al. Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58: 1033-1036.
- 8 Ayer WA, Hoya Y, Pedra MS, et al. Metabolites produced by the Scleroderis canker fungus, *Gremmeniella abietina*. Part 1. *Can J Chem*, 1986, 64: 1585-1589.
- 9 Yuan QY (袁桥玉), Liu XQ (刘新桥). Chemical constituents from *Pleione bulbocodioides*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2012, 35: 1602-1604.
- 10 Ma HY (马宏宇), Sun Y (孙奕), Lv AL (吕阿丽), et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Artemisia capillaries* Thunb. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2010, 01: 61-63, 69.