

# 白腐真菌 *Hypocrea lixii* SCSIO 41520 次级代谢产物及抗菌活性研究

王雪花<sup>1</sup>, 徐新亚<sup>2</sup>, 李 易<sup>1</sup>, 姚飞华<sup>2</sup>, 程 霞<sup>2</sup>, 漆淑华<sup>2</sup>, 陶曙红<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>广东药科大学中药学院, 广州 510006; <sup>2</sup>中国科学院南海海洋研究所  
中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广州 510301

**摘要:**对来源于深圳大亚湾近海水域软珊瑚中分离得到的白腐真菌 *Hypocrea lixii* SCSIO 41520 的次级代谢产物及抗菌活性进行研究。采用硅胶柱层析、凝胶 Sephadex LH-20 柱层析、半制备 HPLC 等色谱技术对其进行分离纯化, 通过 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、MS 等波谱技术鉴定化合物结构。共分离鉴定了 8 个化合物, 分别为 4-(5,7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)heptanoic acid methyl ester(**1**)、5-methoxy eugenin(**2**)、rugulosin(**3**)、大黄素(**4**)、3-(5,7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl) propanoic acid(**5**)、comazaphilone C(**6**)、kasanosin C(**7**)、comazaphilone E(**8**), 其中化合物 **1** 是新化合物。纸片扩散法抗菌实验结果显示, 该真菌发酵产物的乙酸乙酯粗提物及各分离组分均有一定的抗菌活性, 单体化合物中, 化合物 **3** 在 25 μg/disc 的浓度下对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌有显著抑制作用, 抑菌圈直径分别为 16、15、9 mm。

**关键词:** *Hypocrea lixii* SCSIO 41520; 真菌; 代谢产物; 抗菌活性

中图分类号: R914.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)9-1522-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.9.010

## Secondary metabolites and antimicrobial activities of *Hypocrea lixii* SCSIO 41520

WANG Xue-hua<sup>1</sup>, XU Xin-ya<sup>2</sup>, LI Yi<sup>1</sup>, YAO Fei-hua<sup>2</sup>, CHEN Xia<sup>2</sup>, QI Shu-hua<sup>2</sup>, TAO Shu-hong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Sustainable Use of Marine Living Resources, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

**Abstract:** The secondary metabolites and antibacterial activities of *Hypocrea lixii* SCSIO 41520 were studied. Eight compounds were isolated by chromatography methods, such as silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel chromatography and pre-HPLC. The structures of these compounds were identified as 4-(5,7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl) heptanoic acid methyl ester (**1**), 5-methoxy eugenin (**2**), rugulosin (**3**), emodin (**4**), 3-(5,7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl) propanoic acid (**5**), comazaphilone C (**6**), kasanosin C (**7**), and comazaphilone E (**8**) on the basis of spectroscopic analysis. Compound **1** is a new chromone derivative. Antibacterial tests revealed that the ethyl acetate extract and its fractions of this fungal fermentation products had certain antibacterial activity. Compound **3** in the concent of 25 μg/disc had inhibitory effects against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. The diameter of bacteriostatic circles were 16, 15 and 9 mm, respectively.

**Key words:** *Hypocrea lixii* SCSIO 41520; fungi; metabolites; antimicrobial activity

海洋占地球表面积约 70%, 其中蕴藏着巨大而新颖的生物资源, 而海洋真菌无论从数量上或是多

样性方面都非常丰富, 其生长环境特殊, 多具有特异的遗传和代谢特性, 能够产生结构新颖、具有独特生理活性的次级代谢产物, 其代谢产物的相关研究已经成为海洋药物研发的重要方向之一。

白腐真菌 *Hypocrea lixii*, 广泛存在于自然界, 在

收稿日期: 2020-04-03

接受日期: 2020-06-17

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2017A030313235)

\* 通信作者 Tel: 86-20-39352240; E-mail: tsh7524098@126.com

植物、土壤、海洋中均有分布,是重要的具有生物防治用途的真菌<sup>[1,2]</sup>,在降解木质素、纤维素及有机污染物和农药等微生物降解领域也有广泛的应用<sup>[3-5]</sup>。但对该真菌次级代谢产物的研究寥寥无几, Yang 等<sup>[6]</sup>利用盐酸普鲁卡因诱导一株来源于海绵的菌株 *H. lixii* DLEN2008010,从其发酵产物中得到 4 个异黄酮类化合物(6'-*O*-crotonylgenistin、genistein、daidzei、genistin),以及对氨基苯甲酸甲酯、对羟基苯丙酸和胞嘧啶,并发现对氨基苯甲酸甲酯、对羟基苯丙酸具有较强的乙酰胆碱酯酶抑制活性。对 *Hypocrea* 属真菌代谢产物的研究也仅有少量文献报道,菌株来源包括红树植物<sup>[7-9]</sup>、海绵<sup>[10]</sup>及昆虫<sup>[11]</sup>的共附生真菌,其代谢产物的类型主要有甾醇,生物碱、色原酮、呋喃和环戊烯酮衍生物及醚类二聚体等。虽然同属和同种真菌的代谢产物有相似之处,而不同来源的菌株因其生长环境不同也常常会导致其次级代谢产物有明显差异,因此,本研究对从深圳大亚湾珊瑚中分离到的共附生真菌 *H. lixii* SCSIO 41520 的次级代谢产物进行了研究,以期发现结构新颖或者具有显著生物活性的化合物。

本课题组前期对该菌发酵产物的乙酸乙酯粗提物进行抗菌活性筛选,发现其对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、杂色曲霉及菠萝黑心病菌具有抗菌活性,最小抑制浓度(MIC)分别为 2.3、1.0、0.9、0.85  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,该结果显示 *H. lixii* SCSIO 41520 菌株的发酵产物对细菌和真菌都具有显著的抑制活性。为了明确发酵产物中发挥抑菌活性的有效成分,课题组对该发酵产物进行了化学成分研究,并测试其抗菌活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器及试剂

超导核磁共振仪:Bruker AVANCE 700 型,内标为 TMS;分析天平:SH 200E 型电子天平;中压制备液相色谱:CHEETAH MP200 system(Agela Technologies);高效液相色谱仪:Shimadzu LC-20AT pump with a Shimadzu SPD-M20A Photodiode Array Detector;高效液相色谱分析柱:YMC ODS-SP(150  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );高效液相色谱半制备柱:YMC-Pack ODS(250  $\times$  20 mm, S-5  $\mu\text{m}$ );超声波清洗器:KQ-5000D 型(昆山市超声仪器有限公司);旋转蒸发器:SB-2000(上海爱朗仪器有限公司);冷却水循环泵:CA-1116A(广州腾朗科技仪器有限公司)。

试剂:甲醇、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮、三氟乙酸、浓硫酸、二甲基亚砜(DMSO)等均为分析

纯,购买自广州试剂厂;色谱级甲醇、乙腈均购自默克公司;怡宝纯净水购自胜佳超市。

### 1.2 菌种的发酵

真菌(编号 SCSIO 41520)分离自深圳大亚湾近海水域采集的软珊瑚,并通过 DNA 提取、ITS 序列扩增以及序列比对鉴定为白腐真菌 *H. lixii*,与 GeneBank 中注册编号 JQ724452 的菌株相似度为 99%,菌种保存在中国科学院南海海洋研究所海洋微生物中心。

### 1.3 培养基及发酵条件

大米培养基:大米 10 kg;酵母浸膏 50 g;葡萄糖 50 g;海盐 450 g;水 1 500 mL。

取适量的真菌 *H. lixii* SCSIO 41520 菌丝体接种入装有 200 mL 大米培养基的 500 mL 锥形瓶中,在 28  $^{\circ}\text{C}$ ,转速为 180 rpm 的摇床中培养 2 天,得到的菌种液作为种子液。配制大米培养基 60 L,分装于 1 L 的锥形瓶中,以每 100 mL 培养基中加 1 mL 的种子液的比例接种,静置放置于 26  $^{\circ}\text{C}$  培养 35 天后收瓶。

### 1.4 提取与分离

于接种后的 35 天收瓶,将发酵产物用纱布过滤,分为菌液和菌丝两部分,菌液以乙酸乙酯进行 3 次萃取,浓缩得到浸膏,菌丝以丙酮浸泡约 30 min,再以细胞破碎机进行菌丝破碎,重复 3 次,合并提取液,减压浓缩,余下的水相以乙酸乙酯萃取,浓缩得到浸膏。经 HPLC 分析,菌液和菌丝两部分提取物成分组成基本一致,合并两部分的浸膏约为 175 g。

将所得到的粗提物经中压硅胶柱层析(H 硅胶装柱,100~200 目硅胶拌样,比例约为 1:1),以二氯甲烷:甲醇(100:0、95:5、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50)梯度洗脱,最后经 TLC、HPLC 合并得到 9 个组分(F1~9)。

F2(10 g)经常压正相硅胶柱层析,以石油醚/乙酸乙酯(40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、1:1)梯度洗脱,结合 TLC 和 HPLC 分析合并得到 8 个组分(F2.1~F2.8),其中 F2.6 经凝胶柱层析(二氯甲烷:甲醇=1:1)得到化合物 3(500 mg);F2.7 经凝胶柱层析(二氯甲烷:甲醇=1:1)除去色素,以 HPLC 半制备纯化(85% 甲醇,流速 5 mL/min)得到化合物 3( $t_{\text{R}}$ =37.2 min, 500 mg);F2.7 经凝胶柱层析(二氯甲烷:甲醇=1:1)除去色素,以 HPLC 半制备纯化(85% $\rightarrow$ 78% 甲醇,流速 5 mL/min),得到化合物 1( $t_{\text{R}}$ =36.5 min, 4 mg)、2( $t_{\text{R}}$ =38.6 min, 5 mg)、4( $t_{\text{R}}$

=28.7 min, 7 mg); F3 (10 g) 经反相中压硅胶柱层析, 以甲醇: 水 (5: 95 → 100: 0, 水中含有 0.03% TFA) 梯度洗脱, 经 TLC 和 HPLC 分析合并为 F3.1 ~ F3.8, 其中 F3.5 ~ 8 含有大量的化合物 **3**, F3.3 经凝胶柱层析 (甲醇) 除去色素, 经 TLC 和 HPLC 分析, 再以 HPLC 半制备纯化 (60%、70% 甲醇, 流速 5 mL/min), 得到化合物 **5** ( $t_R = 29.9$  min, 10 mg)、**8** ( $t_R = 28.6$  min, 5 mg); F3.4 经凝胶柱层析 (甲醇) 纯化, 再以 HPLC 半制备纯化 (78% 甲醇, 流速 5 mL/min), 得到化合物 **6** ( $t_R = 34.5$  min, 7 mg)、**7** ( $t_R = 37.8$  min, 4 mg)。

### 1.5 活性测试

被测试对象: 阳性对照药 (青霉素)、乙酸乙酯粗提取物、组分 (F1 ~ 9) 及单体化合物 **1** ~ **8**。以 DMSO 溶解配制成 5、20、20 和 10 mg/mL 的溶液。

(LBA 固体培养基: 细菌学蛋白胨 1%、酵母浸膏 0.5%、NaCl 1%、琼脂 2%; LB 液体培养基: 在固体培养基的基础上去掉 2% 的琼脂)。

被测试细菌、真菌菌株: 大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、白色念珠菌 *Candida albicans*。

实验方法: 采用纸片扩散法, 将灭菌的 LB 培养基倒入平板, 凝固后备用, 指示菌经活化后挑取单菌落于 LB 液体培养基中, 30 °C, 200 rpm 摇床中培养 12 h, 用 LB 培养基将菌液稀释至酶标仪 OD 值 0.1 ~ 0.5, 取稀释后的细菌 100  $\mu$ L, 涂布于细菌培养皿中。将配置好的青霉素、乙酸乙酯粗提取物、各组分及单体化合物溶液, 各取 2.5  $\mu$ L 加到直径为 5 mm 的无菌纸片上 (其终浓度分别为 12.5、50、50、25  $\mu$ g/disc), 将加有样品的纸片贴在培养基表面, 每个样品做两个平行, 30 °C 培养 12 h, 测量抑菌圈的直径。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物结构鉴定

**化合物 1** 淡黄色油状; 由 HR-ESI-MS 谱确定其分子式为  $C_{19}H_{24}O_6$  ( $m/z$  349.1650 [M + H]<sup>+</sup>, calcd for 349.1606), 不饱和度为 8。<sup>1</sup>H NMR 谱显示有两个苯环上间位耦合的质子 ( $\delta_H$  6.63 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz), 6.46 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz)), 一个烯烃质子 ( $\delta_H$  5.94 (1H, s)), 六个亚甲基 ( $\delta_H$  2.52 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz), 2.29 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz), 1.62 (2H, quint,  $J = 7.1$  Hz), 1.52 (2H, quint,  $J = 7.1$  Hz), 1.32 (4H, m)) 和三个甲氧基 ( $\delta_H$  3.57, 3.80, 3.86 (各 3H,

s)), 其中两个甲氧基与苯环相连, 以上信息提示该化合物具有苯环和一个短的脂肪链。<sup>13</sup>C NMR 谱显示有两个羰基 ( $\delta_C$  175.5, 173.4), 八个烯碳 ( $\delta_C$  166.1, 163.5, 160.3, 159.5, 110.6, 108.1, 96.1, 93.0) 和三个甲氧基 ( $\delta_C$  51.2, 55.9, 56.0), 在  $\delta_C$  20 ~ 40 之间有六个碳信号。<sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 谱数据与文献报道的 4-(5, 7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl) butanoic acid 相似<sup>[12]</sup>, 提示该化合物有相同的 2-苯基色原酮的母核, 不同的是 2 位上连接的脂肪链多了 3 个碳, 有 7 个碳 ( $\delta_C$  24.3, 25.9, 27.9, 28.0, 32.4, 33.2, 173.4), 并且末端的羧基变成了甲酯 ( $\delta_C$  173.4, 51.2)。HMBC 谱中, H-3 与 C-11、C-2 和 C-4 相关, H-16 与 C-17 和 C-14 相关, 17-OCH<sub>3</sub> 上的质子与 C-17 相关, 证实了脂肪链连接在 2 位, 且 17 位为甲酯。5-OCH<sub>3</sub> 上的质子与 C-5 相关, 7-OCH<sub>3</sub> 上的质子与 C-7 相关, HMBC 谱也证实了以上其他推测, 化合物结构和 HMBC 关键相关示意图见图 1 和图 2。综合以上信息, 将化合物鉴定为 4-(5, 7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl) heptanoic acid methyl ester, 该化合物未见文献报道, 为新化合物。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.trcw.ac.cn](http://www.trcw.ac.cn))。

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.63 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-8), 6.46 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-6), 5.94 (1H, s, H-3), 3.86 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.80 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.57 (3H, s, 17-OCH<sub>3</sub>), 2.52 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-11), 2.29 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-16), 1.62 (2H, quint,  $J = 7.1$  Hz, H-12), 1.52 (2H, quint,  $J = 7.1$  Hz, H-15), 1.32 (4H, m, H-13, 14); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 175.5 (C-4), 173.4 (C-17), 166.1 (C-2), 163.5 (C-7), 160.3 (C-5), 159.5 (C-9), 110.6 (C-3), 108.1 (C-10), 96.1 (C-6), 93.0 (C-8), 56.0 (7-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (5-OCH<sub>3</sub>), 51.2 (17-OCH<sub>3</sub>), 33.2 (C-16), 32.4 (C-11), 28.0 (C-12), 27.9 (C-15), 25.9 (C-13), 24.3 (C-14)。

**化合物 2** 淡黄色油状; <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.62 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-8), 6.47 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-6), 5.95 (1H, s, H-3), 3.86 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.80 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 2.26 (3H, s, 2-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 175.9 (C-4), 163.9 (C-2), 163.6 (C-7), 160.8 (C-5), 159.9 (C-9), 111.7 (C-3), 108.4 (C-10), 96.4 (C-6), 93.4 (C-8), 56.5 (5-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (7-OCH<sub>3</sub>),

19.6(2-CH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道<sup>[13]</sup>对比基本一致,故鉴定化合物**2**为5-methoxy eugenin。

**化合物3** 黄色粉末;<sup>1</sup>H NMR(700 MHz, DM-SO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ :14.72(2H, br s, 1, 1'-OH), 11.39(2H, s, 8, 8'-OH), 7.46(2H, s, H-5, 5'), 7.23(2H, s, H-7, 7'), 5.46(2H, s, 3, 3'-OH), 4.38(2H, d, *J* = 3.3 Hz, H-3, 3'), 3.36(2H, br s, H-4, 4'), 2.78(2H, d, *J* = 5.5 Hz, H-2, 2'), 2.43(6H, s, 6, 6'-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR(175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ : 194.0(C-9, 9'), 186.1(C-10, 10'), 180.6(C-1, 1'), 160.1(C-8, 8'), 147.6(C-6, 6'), 132.0(C-11, 11'), 124.5(C-7, 7'), 120.5(C-5, 5'), 114.1(C-12, 12'), 106.1(C-13, 13'), 68.5(C-3, 3'), 58.3(C-2, 2'), 55.6(C-14, 14'), 47.8(C-4, 4'), 21.5(6, 6'-CH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道<sup>[14]</sup>对比基本一致,故鉴定化合物**3**为rugulosin。

**化合物4** 黄色粉末;<sup>1</sup>H NMR(700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 7.54(1H, s, H-4), 7.16(1H, s, H-2), 7.08(1H, s, H-5), 6.55(1H, s, H-7), 2.43(3H, s, 3-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR(175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 189.7(C-9), 181.5(C-10), 165.7(C-6), 164.5(C-8), 161.4(C-1), 148.3(C-3), 135.1(C-4a), 132.9(C-10a), 124.1(C-2), 120.5(C-4), 113.4(C-9a), 109.0(C-8a), 108.9(C-5), 108.0(C-7), 21.5(6-CH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道<sup>[15]</sup>对比基本一致,故鉴定化合物**4**为大黄素(emodin)。

**化合物5** 白色结晶;<sup>1</sup>H NMR(700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 6.66(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.52(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 6.09(1H, s, H-3), 3.93(3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.91(3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 2.94(2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-11), 2.76(2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-12); <sup>13</sup>C NMR(175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 180.1(C-4), 175.5(C-13), 168.2(C-2), 166.6(C-7), 162.3(C-5), 161.9(C-9), 111.5(C-3), 109.3(C-10), 97.5(C-6), 94.2(C-8), 56.7(5-OCH<sub>3</sub>), 56.6(7-OCH<sub>3</sub>), 31.6(C-12), 29.9(C-11)。上述数据与文献报道<sup>[12]</sup>对比基本一致,故鉴定化合物**5**为3-(5,7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)propanoic acid。

**化合物6** 黄色粉末;<sup>1</sup>H NMR(700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 6.45(1H, m, H-11), 6.41(1H, s, H-5'), 6.02(2H, d, *J* = 15.4 Hz, H-10), 5.44(1H, s, H-4), 4.84(2H, d, *J* = 12.6 Hz, H-1), 4.09(1H, dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, H-6), 3.77(3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>), 2.82(1H, dd, *J* = 17.9, 8.0 Hz, H-5 $\alpha$ ), 2.65(1H, dd, *J* =

17.9, 4.8 Hz, H-5 $\beta$ ), 2.13(3H, s, H-7'), 1.87(3H, dd, *J* = 7.0, 1.5 Hz, H-12), 1.72(3H, s, H-9); <sup>13</sup>C NMR(175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 193.1(C-8), 169.3(C-8'), 161.4(C-3), 150.0(C-4a), 149.2(C-4'), 147.4(C-2'), 137.2(C-11), 135.0(C-3'), 127.8(C-6'), 126.1(C-10), 116.3(C-1'), 113.7(C-8a), 111.6(C-5'), 104.6(C-4), 86.4(C-7), 73.9(C-6), 65.3(C-1), 62.1(2'-OCH<sub>3</sub>), 34.9(C-5), 19.0(C-9), 18.6(C-7'), 17.2(C-12)。上述数据与文献报道<sup>[16]</sup>对比基本一致,故鉴定化合物**6**为comazaphilone C。

**化合物7** 黄色粉末;<sup>1</sup>H NMR(700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 6.34(1H, m, H-11), 6.15(1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-3'), 6.10(1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-5'), 5.91(1H, d, *J* = 14.7 Hz, H-10), 5.33(1H, s, H-4), 4.70(2H, d, *J* = 12.5 Hz, H-1), 3.89(1H, dd, *J* = 8.4, 4.8 Hz, H-6), 3.59(3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>), 2.70(1H, dd, *J* = 17.7, 8.4 Hz, H-5 $\alpha$ ), 2.50(1H, dd, *J* = 17.7, 4.8 Hz, H-5 $\beta$ ), 2.06(3H, s, H-7'), 1.75(3H, dd, *J* = 7.0, 1.5 Hz, H-12), 1.58(3H, s, H-9); <sup>13</sup>C NMR(175 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 193.2(C-8), 169.7(C-8'), 161.3(C-3), 161.1(C-4'), 159.9(C-2'), 149.9(C-4a), 139.2(C-6'), 134.9(C-11), 126.1(C-10), 116.5(C-8a), 116.4(C-1'), 110.0(C-5'), 104.5(C-4), 97.7(C-3'), 86.1(C-7), 74.1(C-6), 65.3(C-1), 56.3(2'-OCH<sub>3</sub>), 34.8(C-5), 19.6(C-9), 18.6(C-7'), 16.9(C-12)。上述数据与文献报道<sup>[17]</sup>对比基本一致,故鉴定化合物**7**为kasanosin C。

**化合物8** 黄色粉末;<sup>1</sup>H NMR(700 MHz, DM-SO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ : 9.49, 8.52(each 1H, s, 3', 4'-OH), 6.38(1H, s, H-5'), 6.34(1H, m, H-11), 6.05(1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-10), 5.57(1H, s, H-6), 5.30(1H, s, H-4), 4.81(1H, d, *J* = 12.7 Hz, H-1 $\alpha$ ), 4.73(1H, d, *J* = 12.7 Hz, H-1 $\beta$ ), 3.62(3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>), 2.93(1H, d, *J* = 17.4 Hz, H-5 $\alpha$ ), 2.69(1H, d, *J* = 17.4 Hz, H-5 $\beta$ ), 2.03(3H, s, H-7'), 1.82(3H, d, *J* = 8.3 Hz, H-12), 1.29(3H, s, H-9); <sup>13</sup>C NMR(175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ : 194.8(C-8), 167.3(C-8'), 159.2(C-3), 148.3(C-4a), 147.5(C-4'), 146.4(C-2'), 136.3(C-11), 133.9(C-3'), 125.9(C-6'), 125.2(C-10), 119.6(C-1'), 114.3(C-5'), 112.9(C-8a), 104.2(C-4), 77.1(C-6), 75.0(C-7), 63.7(C-1), 60.9(2'-OCH<sub>3</sub>), 31.1(C-5), 22.7(C-9), 19.1(C-7'), 18.6(C-12)。上述数据与文献报道<sup>[16]</sup>对比基本一致,故

鉴定化合物 **8** 为 comazaphilone E。

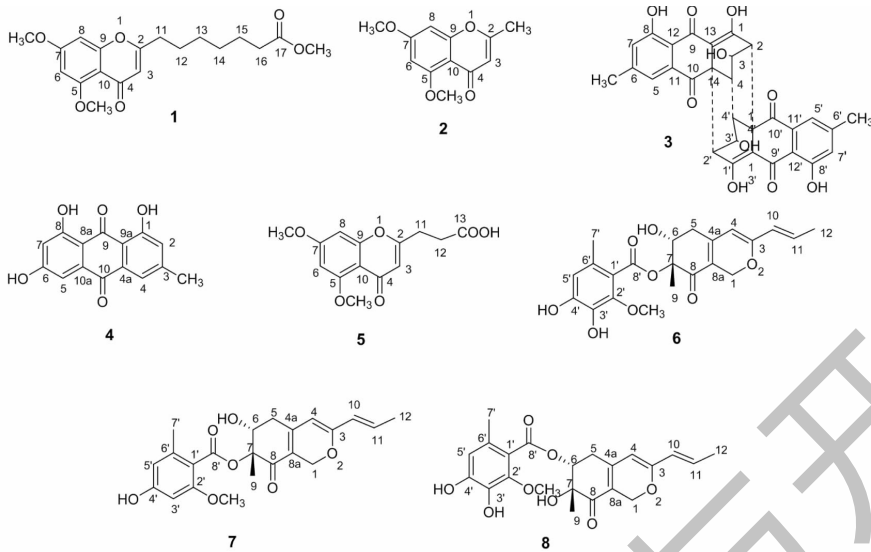


图 1 化合物 **1**~**8** 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds **1**-**8**

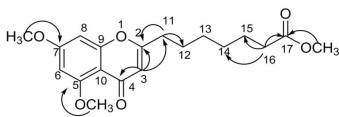


图 2 化合物 **1** 的关键 HMBC 相关(→)示意图

Fig. 2 Key HMBC correlations(→) of compound **1**

## 2.2 活性测试结果

纸片扩散法抗菌结果显示,与阳性药(青霉素)

对照,在 50  $\mu\text{g}/\text{disc}$  浓度下乙酸乙酯粗提物和组分 3、4 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌三种细菌均有一定的抑制作用,其他组分对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌有较弱的抑菌活性,所有测试样品对白色念珠菌没有显示出抑菌作用,结果见表 1。

从单体化合物 **1**~**8** 的抗菌实验结果中发现,化合物 **3** 在 25  $\mu\text{g}/\text{disc}$  浓度下对大肠杆菌、枯草芽孢

表 1 乙酸乙酯粗提物和各组分的抗菌活性结果

Table 1 Results of antibacterial activity of ethyl acetate extract and its fractions

样品 Sample	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>
青霉素 Penicillin	29	30	40	0
DMSO	0	0	0	0
乙酸乙酯粗提物 Ethyl acetate extract	7	14	15	0
F1	0	6	11	0
F2	0	10	12	0
F3	8	14	15	0
F4	9	7	8	0
F5	0	7	10	0
F6	0	7	8	0
F7	0	10	9	0
F8	0	6	8	0
F9	0	9	8	0

注:样品浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{disc}$ , 抑菌圈直径(d, mm)。

Note: The diameter of bacteriostatic circles (d, mm) in the content of 50  $\mu\text{g}/\text{disc}$ .

杆菌及金黄色葡萄球菌具有较强的抑菌效果,其抑菌圈直径分别为 9、15、16 mm,而其他化合物没有显示出抑菌作用。

### 3 讨论

本课题组对来源于大亚湾珊瑚的真菌 *H. lixii* SCSIO 41520 次级代谢产物及其抗菌活性进行研究。从中共分离鉴定 8 个化合物,其中化合物 **1** 为新化合物。抗菌活性研究发现化合物 **3** 在 25  $\mu\text{g}/\text{disc}$  浓度下对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌均具有较强的抗菌活性,抑菌圈直径分别为 16、15、9 mm。同时在分离过程中发现,组分 F2 和 F3 中有大量的化合物 **3** 析出,这与两组分的抗菌活性结果较强一致,推测化合物 **3** 为该真菌代谢产物的主要抗菌活性成分。

Gao 等<sup>[16]</sup>采用 96 孔板稀释法对嗜氮酮类化合物 **6** 和 **8** 的抗菌活性研究显示 **6** 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、荧光假单孢菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 值分别为 16、64 和 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; **8** 对荧光假单孢菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 值分别为 32 和 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。但本研究采用纸片扩散法,化合物 **6** 和 **8** 及同类型的化合物 **7** 均没有显示出明显的抗菌活性,可能是因为采用的实验方法不同,纸片扩散法操作简单、直观,用肉眼观察,可以发现抗菌效果明显的化合物,而 96 孔板稀释法是设置了连续梯度,用精密仪器测量,灵敏度会高一些。

本研究发现真菌 *H. lixii* SCSIO 41520 能代谢产生多种类型的化学成分,其中 rugulosin 为其含量较高的主要抗菌活性物质。rugulosin 是在 1970 年代从青霉菌中分离得到的真菌毒素,研究报道该化合物具有显著的抗菌活性,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA K-24 的 MIC 值为 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[18]</sup>,还具有抗病毒活性,对 HIV-1 整合酶有抑制作用,其  $\text{IC}_{50}$  值约为 20  $\mu\text{M}$ <sup>[19]</sup>,Snider 和 Nicolaou 还完成了 rugulosin 的全合成工作<sup>[20,21]</sup>。新化合物 **1**、化合物 **2** 和 **5** 属于色原酮类成分,该类成分在自然界广泛分布,色原酮及其衍生物也具有多种生物活性,可以为各种生物活性研究的先导化合物,包括抗菌<sup>[22]</sup>、抗肿瘤<sup>[23]</sup>、单胺氧化酶抑制活性<sup>[24]</sup>等。

因此,本研究发现了真菌 *H. lixii* SCSIO 41520 可以代谢产生高含量的 rugulosin 作为其主要抗菌成分,可为 rugulosin 的深入研究与开发提供充足的来源。基于色原酮的广泛活性,可对其进行不同的结构修饰和改造,系统研究其构效关系,开发具有特

定药理作用的活性分子。

### 参考文献

- 1 Yang HT. Classification and identification of *Trichoderma* (木霉分类与鉴定) [M]. Beijing: China Earth Press, 2009: 128-131.
- 2 Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, et al. Secondary metabolism in *Trichoderma*-chemistry meets genomics [J]. *Fungal Biol Rev*, 2016, 30: 74-90.
- 3 Zuo SS. Mechanism of corn stover degradation by white rot fungi treatment and application in production [D]. Beijing: China Agricultural University (中国农业大学), 2018.
- 4 Song YX, Song XL, Zhang XL, et al. Research progress of white rot fungi on refractory organic pollutants [J]. *Liaoning Agr Sci* (辽宁农业科学), 2019(5): 51-54.
- 5 Wang X, Li ZX, Ni ZJ, et al. Research progress on degradation of pesticides by white rot fungi [J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2020, 22(1): 1-10.
- 6 Yang WC, Liu YY, Yang JM, et al. Chemical constituents investigation of secondary metabolism of a marine fungus *Hypocrea lixii* induced by procaine hydrochloride [J]. *J Guangdong Ocean Univ* (广东海洋大学学报), 2020, 4(1): 55-63.
- 7 Liu T, Li ZL, Wang Y, et al. Study on the chemical constituents from the mycelium of marine-derived fungus *Hypocrea virens* [J]. *Chem Bioeng* (化学与生物工程), 2012, 29(2): 28-32.
- 8 Liu T, Li ZL, Wang Y, et al. Studies on the secondary metabolites from the marine-derived fungus *Hypocrea virens* [J]. *Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2012, 29(2): 93-97.
- 9 Liu T, Li ZL, Wang Y, et al. Studies on the secondary metabolites from the marine-derived fungus *Hypocrea virens* (II) [J]. *Chin J Med Chem*, 2012, 22(2): 124-126.
- 10 Ding LJ, Gu BB, Jiao WH, et al. New furan and cyclopentenone derivatives from the sponge-associated fungus *Hypocrea koningii* PF04 [J]. *Marine Drugs*, 2015, 13: 5579-5592.
- 11 Ren FX, Zhu SM, Wang B, et al. Hypocriols A-F, heterodimeric botryane ethers from *Hypocrea* sp., an insect-associated fungus [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79: 1848-1856.
- 12 Yuan WH, Wei ZW, Dai P, et al. Halogenated metabolites isolated from *Penicillium citreonigrum* [J]. *Chem Biodivers*, 2014, 11: 1078-1087.
- 13 Han AR, Paik YS. Antioxidant and proly endopeptidase inhibitory capacities of chromone C-glucosides from the clove buds (*Syzygium aromaticum*) [J]. *J Appl Biol Chem*, 2012, 55(3): 195-198.

- 14 He YQ. Screening, isolation and identification of anti-tumour compounds from mycelia of selected entomogenous fungi [D]. Hefei: Anhui Agricultural University (安徽农业大学), 2008.
- 15 Zhang X, Chou GX. Study on chemical constituents of *Patrinia scabiosaefolia* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 783-791.
- 16 Gao SS, Li XM, Zhang Yi, et al. Comazaphilones A-F, azaphilone derivatives from the marine sediment-derived fungus *Penicillium commune* QSD-17 [J]. J Nat Prod, 2011, 74: 256-261.
- 17 Li LQ, Yang YG, Zeng Y, et al. A new azaphilone, kasanosin C, from an endophytic *Talaromyces* sp. T1BF [J]. Molecules, 2010, 15: 3993-3997.
- 18 Yamazaki H, Koyama N, Omura S, et al. New rugulosins, anti-MRSA antibiotics, produced by *Penicillium radicum* FKI-3765-2 [J]. Org Lett, 2010, 12: 1572-1575.
- 19 Singh SB, Jayasuriya H, Dewey RJ, et al. Isolation, structure, and HIV-1-integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites [J]. J Ind Micro Biotech, 2003, 30: 721-731.
- 20 Snider BB, Gao XJ. Efficient syntheses of rugulosin analogues [J]. J Org Chem, 2005, 70: 6863-6869.
- 21 Nicolaou KC, Lim YH, Piper JL, et al. Total syntheses of 2, 2'-epi-cytoskyrin A, rugulosin, and the alleged structure of rugulin [J]. J Am Chem Soc, 2007, 129: 4001-4013.
- 22 Sharma VP, Kumar R. Synthesis, characterization and antimicrobial screening of some novel chromonyl chalcones [J]. Asian J Res Chem, 2014, 7: 649-652.
- 23 Duan YD, Jiang YY, Guo FX, et al. The antitumor activity of naturally occurring chromones: a review [J]. Fitoterapia, 2019, 135: 114-129.
- 24 Mpitimpiti AN, Petzer JP, Petzer A, et al. Synthesis and evaluation of chromone derivatives as inhibitors of monoamine oxidase [J]. Mol Divers, 2019, 23: 897-913.

(上接第 1490 页)

- 17 Dahech I, Hamden K, Zohra A, et al. Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 50: 1070-1074.
- 18 Olvera C, Centeno-leija S, Lopev-munguia A. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2007, 92: 11-20.
- 19 Djurić A, Gojgić-Cvijović G, Jakovljević D. *Brachy bacterium* sp. CH-KOV3 isolated from an oil-polluted environment—a new producer of levan [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 104: 311-321.
- 20 Zhu Y, Zhou H, Li XW, et al. Optimization of fermentation conditions for fructan production by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* LE-3 [J]. J Fuyang Norm Univ; Nat Sci (阜阳师范大学学报: 自科版), 2020, 37: 46-50.