

三株大兴安岭森林凋落物真菌中次生代谢产物及其抗菌活性研究

甄锦程¹, 司璐¹, 于洪佳¹,
都婷婷¹, 刘瑶¹, 单体江², 徐利剑^{1*}

¹黑龙江大学现代农业与生态环境学院, 哈尔滨 150080; ²华南农业大学林学与风景园林学院, 广州 510642

摘要:本研究采用天然产物分离技术从大兴安岭森林凋落物真菌 SGSF622 (*Berkleasium* sp.)、SGSF289 (*Oidiodendron* sp.) 和 SGSF062 (*Parapyrenochaeta* sp.) 的提取物中获得 8 个天然产物, 经核磁共振、质谱对这些化合物进行了结构鉴定, 分别为 1-甲氧基-Sch53825 (**1**)、3,4-二羟基-10-甲基-2-亚甲基十六碳-9-烯酸 (**2**)、3,3-二-(3-吲哚)丙烷-1,2-二醇 (**3**)、环(*D*-色-*L*-脯)二肽 (**4**)、6-demethylkigelin (**5**)、lignicol (**6**)、indole-3-carboxaldehyde (**7**) 和 *N*-(5-amino-2-hydroxy-1-oxopentyl)-tyrosine (**8**), 其中化合物 **1** 和化合物 **2** 为新化合物。抗菌活性结果显示, 化合物 **2** 和 **3** 具有明显的抗菌活性, 其中化合物 **2** 活性最强, 抗青枯劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) MIC 值为 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词:大兴安岭; 凋落物真菌; 次生代谢产物; 抗菌活性

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)9-1515-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.9.008

Study on secondary metabolites and antimicrobial activities of three fungi from forest litter in the Greater Hinggan Mountains

ZHEN Jin-cheng¹, SI Lu¹, YU Hong-jia¹, DU Ting-ting¹, LIU Yao¹, SHAN Ti-jiang², XU Li-jian^{1*}

¹College of Advanced Agriculture and Ecological Environment, Heilongjiang University, Harbin 150080, China;

²College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: In this study, eight natural compounds were obtained from the extracts of three fungal isolates *Berkleasium* sp. SGSF622, *Oidiodendron* sp. SGSF289 and *Parapyrenochaeta* sp. SGSF062 from the forest litter in the Greater Hinggan Mountains by the techniques of natural product separation. The structures of these compounds were elucidated by NMR and MS. They were 1-methoxy-Sch53825 (**1**), 3,4-dihydroxy-10-methyl-2-methylene hexadecano-9-enoic acid (**2**), 3,3-bis-(3-indole) propane-1,2-diol (**3**), cyclo-*D*-Trp-*L*-pro (**4**), 6-demethylkigelin (**5**), lignicol (**6**), indole-3-carboxaldehyde (**7**), and *N*-(5-amino-2-hydroxy-1-oxopentyl)-tyrosine (**8**), respectively. The compounds **1** and **2** were novel compounds. The results of antimicrobial activities showed that the compounds **2** and **3** had obviously antimicrobial activities, and the compound **2** had the strongest antimicrobial activity with MIC value of 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *Ralstonia solanacearum*.

Key words: Greater Hinggan Mountains; litter fungi; secondary metabolites; antimicrobial activities

真菌物种丰富且可以产生多样的次生代谢产物, 其中包括可以应用在医药与农药领域的抗菌化合物^[1]。森林凋落物的分解依赖于真菌的多样性, 森林凋落物也被认为是真菌的良好栖息地。大兴安岭森林凋落物中的真菌资源丰富, Zhang 等^[2]在大

兴安岭森林凋落物中, 发现 6 株真菌的提取物具有抗菌活性, 在 2 株真菌中得到 4 个单体化合物。Qiu^[3]在大兴安岭森林凋落物真菌中分离得到了 2 个具有抗细菌活性的单体化合物。本研究以三株具有抗菌活性的大兴安岭森林凋落物真菌为材料, 对其产生的主要抗菌化合物进行分离鉴定, 共得到 8 个化合物(见图1), 其中有 2 个化合物为新结构天然产物, 5 个化合物具有抗菌活性。本研究为进一步利用森林凋落物真菌产生的抗菌化合物奠定了基础。

收稿日期: 2022-03-28 接受日期: 2022-05-24

基金项目: 国家自然科学基金(31870528); 黑龙江大学研究生创新科研项目(YJSCX2021-217HLJU)

* 通信作者 Tel: 86-451-86609487; E-mail: xulijian@hlju.edu.cn

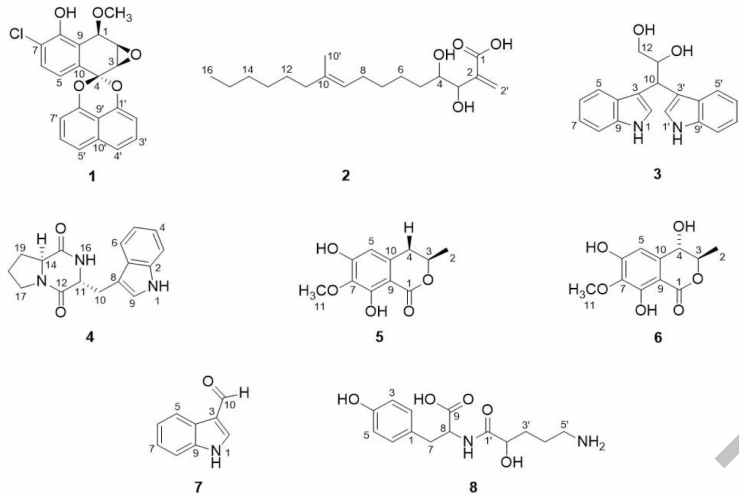


图 1 化合物 1~8 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-8

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

核磁共振仪 (Bruker Avance III 400, 德国); 高分辨质谱仪 (Bruker maXis, 美国); 柱层析用硅胶 (青岛海洋公司, 100 ~ 300 目); Sephadex LH-20 凝胶 (GE Healthcare, 美国); 旋转蒸发器 (上海亚荣仪器公司, RE-52AA); 卧式恒温培养摇床 (上海捷呈实验仪器有限公司, TS-211B); 恒温培养箱 (上海博讯有限公司, BIC-250); 分析型高效液相色谱 (岛津企业管理有限公司, LH-20A); 半制备型高效液相色谱 (北京慧德易科技有限公司, QuikSep LC-10); 甲醇等色谱纯试剂 (北京迈瑞达科技有限公司); 氘代试剂 (上海麦克林生化科技有限公司); 金霉素 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 真菌材料

三株真菌分离自大兴安岭森林凋落物样品, 分别为 *Berkleasmiium* sp. SGSF622 (GeneBank 登录号: MZ778149)、*Oidiiodendron* sp. SGSF289 (GeneBank 登录号: ON171371) 和 *Parapyrenochaeta* sp. SGSF062 (Genebank 登录号: MK192906), 菌株保藏在黑龙江大学植物病理学实验室。经活性筛选, 三株真菌乙酸乙酯提取物都表现出了抗菌活性。

1.3 真菌的发酵

马铃薯葡萄糖培养基 (PDA) 配方: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、1 000 mL 水, 灭菌后冷却备用。将真菌 SGSF622 接种至 90 mm 的 PDA 平板, 共接种 200 个, 在 25 °C 条件下静置培养 14 d。酵母提取物蔗糖培养基 (YES) 配方: 1 000 mL 蓝盖

瓶中蔗糖 10 g、酵母浸粉 2 g、硫酸镁 0.1 g、100 mL 水, 根据溶液体积加入适量蛭石, 灭菌后冷却备用。将真菌 SGSF289 和 SGSF062 接种至 YES 培养基, 每种真菌接种 20 瓶, 在 25 °C 条件下静置培养 14 d。

1.4 提取与分离

真菌培养发酵结束后, 利用等体积乙酸乙酯提取 24 h, 重复 3 次, 减压浓缩获得 SGSF622 提取物 3.0 g、SGSF289 提取物 5.3 g 和 SGSF062 提取物 4.8 g。提取物进行正相硅胶柱层析, 流动相采用二氯甲烷-甲醇 (100:0、100:0.5、100:1、100:2、100:3、100:5、100:10、100:20、100:50、100:100) 进行洗脱获得 10 个组分, 记为 Fr. 1 ~ Fr. 10。SGSF622 的 Fr. 2 与 Fr. 3 ~ Fr. 4 通过 Sephadex LH-20 柱层析, 二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱。进一步通过半制备液相, 甲醇-水洗脱 (0 ~ 4 min, 10% 甲醇; 4 ~ 55 min, 10% → 90% 甲醇; 55 ~ 70 min, 90% → 100% 甲醇; 70 ~ 90 min, 100% 甲醇)。SGSF622 得到两个化合物: 化合物 1 (2 mg, t_R = 55 min)、2 (2 mg, t_R = 61 min)。同 SGSF622 分离过程相同, SGSF289 的 Fr. 3 ~ Fr. 4 中分离了 2 个化合物: 化合物 3 (4 mg, t_R = 26 min) 和 4 (2 mg, t_R = 22 mg), SGSF062 的 Fr. 2、Fr. 4、Fr. 6 ~ Fr. 7 中分离得到 4 个化合物: 化合物 5 (4 mg, t_R = 24 min)、6 (2 mg, t_R = 20 min)、7 (3 mg, t_R = 22 min) 和 8 (2 mg, t_R = 16 min)。

1.5 抑菌活性测定

利用 96 孔板测定化合物最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。测试菌株包括青枯劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) BXL015、

丁香假单胞杆菌 (*Pseudomonas syringae*) BLY016、甘蓝黑腐黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) BLY013、水稻黄单胞菌 (*X. oryzae*) CCTCC AB 91123。其中水稻黄单胞菌来自中国典型培养物中心,其他菌株来自于黑龙江大学植物病理学实验室。采用 96 孔板微量稀释法^[4],对化合物 **1** ~ **8** 进行抗菌实验。在 96 孔板上,第 1 孔加入 100 μL 的 LB 液体培养基和 2 mg/mL 的待测化合物溶液母液 100 μL ,混合均匀后,在 96 孔板中进行倍半稀释,使每孔待测化合物终浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 0.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每个浓度 3 次重复,28 $^{\circ}\text{C}$ 细菌培养箱培养 1 天后,对细菌培养液浑浊度进行观察,培养液最澄清的最低化合物浓度为该待测化合物的最低抑菌浓度 (MIC),金霉素作阳性对照,DMSO 作阴性对照,空培养基作空白对照。

2 结果与分析

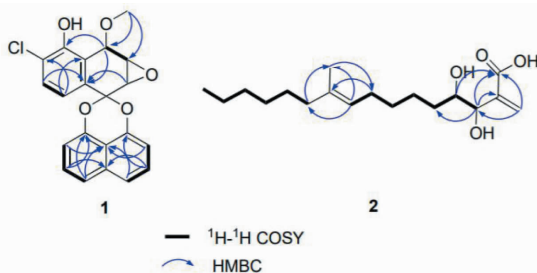
2.1 化合物结构的鉴定

化合物 1 白色粉末状固体,易溶于甲醇、二氯甲烷和氯仿等有机溶剂;HR-ESI-MS: m/z 381.054 2 [M-H]⁻ (calcd for C₂₁H₁₄ClO₅, 381.053 5),推测分子式为 C₂₁H₁₅ClO₅,其 NMR 数据见表 1。经文献查阅,发现化合物 **1** 结构与已知化合物 Sch53825 的结构最为相近^[5],差异在于化合物 **1** 比 Sch53825 多一个甲氧基信号 (-OCH₃) δ_{C} : 57.0, δ_{H} : 3.57 (s, 3H); 化合物 **1** 的 C-1 (δ 69.3) 化学位移值低场区移动了 7.8 ppm 和 C-2 (δ 51.8) 化学位移值高场区移动了 1.1 ppm。在 HSQC 谱中, H-11 与 C-11 相关; HMBC 谱中, H-11 与 C-1 相关 (见图 2), 确定了甲氧基的位置。综合上述信息, 鉴定该化合物为 1-甲氧基-Sch53825。

表 1 化合物 **1** 的 ¹H NMR (400MHz) 和 ¹³C NMR (100MHz) 数据 (CDCl₃)

Table 1 ¹H NMR (400 MHz) and ¹³C NMR (100 MHz) data of compound **1** (CDCl₃)

No.	1		Sch53825
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	5.32 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	69.3 (d)	61.5 (d)
2	3.63 (1H, dd, $J = 3.6, 2.4$ Hz)	51.8 (d)	52.9 (d)
3	3.73 (1H, d, $J = 3.6$ Hz)	50.5 (d)	50.5 (d)
4	-	97.0 (s)	97.5 (s)
5	7.45 ~ 7.41 (1H, m)	120.3 (d)	120.1 (d)
6	7.45 ~ 7.41 (1H, m)	130.0 (d)	130.0 (d)
7	-	122.0 (s)	123.4 (s)
8	-	150.3 (s)	150.2 (s)
9	-	121.2 (s)	122.3 (s)
10	-	132.2 (s)	131.3 (s)
11	3.57 (3H, s)	57.0 (q)	
1'	-	147.3 (s)	147.3 (s)
2'	7.60 ~ 7.48 (1H, m)	120.9 (d)	121.2 (d)
3'	7.60 ~ 7.48 (1H, m)	127.5 (d)	127.6 (d)
4'	6.93 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	109.2 (d)	109.2 (d)
5'	7.11 (1H, d, $J = 7.4$ Hz)	109.9 (d)	110.0 (d)
6'	7.60 ~ 7.48 (1H, m)	127.7 (d)	127.9 (d)
7'	7.60 ~ 7.48 (1H, m)	121.0 (d)	121.2 (d)
8'	-	147.4 (s)	147.4 (s)
9'	-	113.0 (s)	112.9 (s)
10'	-	134.1 (s)	134.3 (s)

图2 化合物1和2的 ^1H - ^1H COSY和HMBC相关Fig. 2 The ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations for compounds **1** and **2**

1996年,Chu等^[5]分离得到两个新化合物Sch53823与Sch53825,化合物Sch53825的结构主要通过与化合物Sch53823的波谱数据比对及采用化学衍生化的方式得到判断。实验成功将化合物Sch53825衍生化为乙酰化产物Sch53829,并对化合物Sch53829通过二维核磁共振数据(包括NOESY谱图)分析的方式确定出化合物的平面结构及相对构型。因此,化合物Sch53825的构型同样得到确定。2000年,Bode等^[6,7]采用 ^{13}C 、 ^{18}O 同位素标记实验对化合物cladospirone bisepoxide生物合成途径中的关键中间体与终产物实现分离及结构鉴定,阐明了化合物完整的生物合成途径。根据该类化合物的生物合成途径,可见化合物结构中C-2、C-3位双键氧化为三元氧环基团后,化合物H-2与H-3的空间朝向均为 α ^[8]。因此,根据与类似物一致的生物合成途径,化合物**1**结构中H-2与H-3的空间朝向保持一致。通过分析H-1与H-2间的耦合常数($J = 2.4\text{ Hz}$),暗示H-1与H-2间为顺式构型,通过比对化合物**1**与确定构型的类似物之间的波谱数据,该数据与文献中顺式构型的耦合常数相符^[5,9-13]。根据以上数据推断化合物**1**的构型与化合物

Sch53825一致。化合物**1**和**2**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)。

化合物**2** 淡黄油状,易溶于甲醇、二氯甲烷和氯仿等有机溶剂;HR-ESI-MS: m/z 357.228 8 [$\text{M} + \text{COOH}$] $^-$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{O}_6$, 357.227 3),推测分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_4$ 。化合物**2**的 ^1H NMR中显示,2个烯烃质子信号 δ_{H} : 6.43(s, 1H)和5.96(s, 1H); 3个次甲基信号 δ_{H} : 5.09(m, 1H)、4.51(d, 1H)、4.24(m, 1H); 9个亚甲基信号 δ_{H} : 1.99(m, 2H)、1.95(m, 2H)、1.71(m, 2H)、1.44~1.32(m, 6H)、1.32~1.19(m, 6H); 2个甲基信号 δ_{H} : 1.57(br s, 3H)、0.88(t, 3H)。化合物**2**的 ^{13}C NMR中,显示18个碳信号见表2。再结合 ^1H - ^1H COSY和HMBC相关数据,该化合物NMR数据与文献报道的化合物Conocandin为相似结构^[14],其化合物基本骨架一致(见图2),但是化合物**2**的C-3的C-4的化学位移值由 δ_{C} : 55.0, 63.0分别变为 δ_{C} : 73.1, 85.3。结合其质谱数据,推测为Conocandin的C-3的C-4的环氧基变为邻二醇结构,即鉴定该化合物为3,4-二羟基-10-甲基-2-亚甲基十六碳-9-烯酸。

表2 化合物**2**的 ^1H NMR(400 MHz)和 ^{13}C NMR(100 MHz)数据(CDCl_3)Table 2 ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) data of compound **2** (CDCl_3)

No.	2		Conocandin
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	-	168.3(s)	171.0(s)
2	-	139.0(s)	137.2(s)
2'	6.43(1H, s); 5.96(1H, s)	125.7(t)	126.6(t)
3	4.51(1H, d)	73.1(d)	55.0(d)
4	4.24(1H, m)	85.3(d)	63.0(d)
5	1.71(2H, m)	33.6(t)	32.0(t)

续表 2 (Continued Tab. 2)

No.	2		Conocandin
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
6	1.44 ~ 1.32 (2H, m)	24.6 (t)	25.4 (t)
7	1.32 ~ 1.19 (2H, m)	31.8 (t)	31.9 (t)
8	1.95 (2H, m)	27.6 (t)	27.8 (t)
9	5.09 (1H, m)	123.7 (d)	124.0 (d)
10	-	135.9 (s)	135.6 (s)
10'	1.57 (3H, br, s)	15.9 (q)	15.9 (q)
11	1.99 (2H, m)	39.7 (t)	39.8 (t)
12	1.32 ~ 1.19 (2H, m)	28.0 (t)	28.0 (t)
13	1.44 ~ 1.32 (2H, m)	29.5 (t)	29.6 (t)
14	1.44 ~ 1.32 (2H, m)	29.0 (t)	29.0 (t)
15	1.32 ~ 1.19 (2H, m)	22.7 (t)	22.7 (t)
16	0.88 (3H, t)	14.1 (q)	14.1 (q)

化合物 3 白色粉末状固体,易溶于甲醇、二氯甲烷和氯仿等有机溶剂;分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.08 (2H, s, H-1, 1'), 7.66 (2H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, H-5, 5'), 7.39 ~ 7.32 (2H, m, H-8, 8'), 7.25 ~ 6.98 (6H, m, H-2, 2', 6, 6', 7, 7'), 4.76 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-10), 4.56 (1H, td, $J = 6.9, 3.6$ Hz, H-11), 3.71 (2H, m, H-12); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 122.7 (C-2), 119.4 (C-3), 127.3 (C-4), 116.8 (C-5), 119.7 (C-6), 122.3 (C-7), 111.2 (C-8), 136.4 (C-9), 37.0 (C-10), 74.8 (C-11), 65.3 (C-12), 122.4 (C-2'), 119.3 (C-3'), 126.9 (C-4'), 115.4 (C-5'), 119.52 (C-6'), 122.2 (C-7'), 111.2 (C-8'), 136.3 (C-9')。以上数据与文献^[15]报道一致,故鉴定该化合物为 3,3-二-(3-吡啶)丙烷-1,2-二醇。

化合物 4 白色粉末状固体,易溶于甲醇、二氯甲烷和氯仿等有机溶剂;分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$; HR-ESI-MS: m/z 284.139 4 [M + H]⁺ (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$, 284.139 4)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.15 (1H, s, H-16), 7.59 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 7.40 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3), 7.31 (1H, s, H-9), 7.25 ~ 7.21 (1H, m, H-4), 7.13 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-5), 5.72 (1H, s, H-11), 4.38 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-14), 3.77 (1H, dd, $J = 15.1, 3.0$ Hz, H-10), 3.71 ~ 3.54 (1H, m, H-10), 2.97 (2H, dd, $J = 15.1, 10.8$ Hz, H-17), 2.40 ~ 2.28 (2H, m, H-18), 2.03 ~ 2.01 (2H, m, H-19); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ :

136.7 (C-2), 111.6 (C-3), 122.9 (C-4), 120.1 (C-5), 118.5 (C-6), 126.7 (C-7), 110.0 (C-8), 123.3 (C-9), 26.9 (C-10), 54.5 (C-11), 165.1 (C-12), 59.2 (C-14), 169.4 (C-15), 45.5 (C-17), 22.6 (C-18), 28.4 (C-19)。以上数据与文献中的两个同分异构体 brevianamide F 与环(*D*-色-*L*-脯)二肽进行比较^[16],发现化合物 4 与环(*D*-色-*L*-脯)二肽的数据一致,故鉴定该化合物为环(*D*-色-*L*-脯)二肽。

化合物 5 白色粉末状固体,易溶于甲醇、二氯甲烷和氯仿等有机溶剂;分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.38 (1H, s, 6-OH), 6.33 (1H, s, H-5), 4.73 ~ 4.62 (1H, m, H-3), 3.98 (3H, s, H-11), 2.84 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-4), 2.83 (1H, s, H-4), 1.51 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.1 (C-1), 20.7 (C-2), 75.9 (C-3), 34.4 (C-4), 105.3 (C-5), 154.9 (C-6), 133.0 (C-7), 155.5 (C-8), 102.2 (C-9), 135.6 (C-10), 60.9 (C-11)。以上数据与文献^[17]报道一致,故鉴定该化合物为 6-demethylkigelin。

化合物 6 白色粉末状固体,易溶于甲醇、二氯甲烷和氯仿等有机溶剂;分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.60 (1H, s, H-5), 4.45 (2H, m, H-3, 4), 3.83 (3H, s, H-11), 1.44 (3H, d, $J = 5.8$ Hz, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 170.5 (C-1), 18.3 (C-2), 81.4 (C-3), 69.5 (C-4), 106.7 (C-5), 158.9 (C-6), 135.8 (C-7), 157.5 (C-8), 100.9 (C-9), 140.3 (C-10), 60.9 (C-11)。以上

数据与文献^[18]报道一致,故鉴定该化合物为 lignicol。

化合物 7 白色粉末状固体,易溶于甲醇、二氯甲烷和氯仿等有机溶剂;分子式为 C_9H_7NO 。¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 10.08 (1H, s, H-1), 8.74 (1H, s, H-10), 8.33 (1H, t, $J = 8.0, 4.0$ Hz, H-5), 7.86 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, H-2), 7.49 ~ 7.40 (1H, m, H-8), 7.34 ~ 7.32 (2H, m, H-6, 7); ¹³C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 136.6 (C-2), 119.8 (C-3), 124.5 (C-4), 124.4 (C-5), 122.0 (C-6), 123.1 (C-7), 111.5 (C-8), 135.2 (C-9), 185.2 (C-10)。以上数据与文献^[19]报道一致,故鉴定化合物为 indole-3-carboxaldehyde。

化合物 8 白色粉末状固体,易溶于甲醇;分子式为 $C_{14}H_{20}N_2O_5$ 。¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.03 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-2, 6), 6.70 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 4.36 (1H, s, H-8), 4.04 (1H, dd, $J = 10.6, 6.3$ Hz, H-2'), 3.55 (1H, dd, $J = 20.3, 8.5$ Hz, H-5'), 3.36 (1H, dd, $J = 12.4, 6.1$ Hz, H-5'), 3.09 (1H, dd, $J = 14.2, 5.1$ Hz, H-7), 3.02 (1H,

dd, $J = 14.2, 4.6$ Hz, H-7), 2.13 ~ 2.05 (1H, m, H-3'), 1.80 (2H, s, H-4'), 1.28 ~ 1.13 (1H, m, H-3'); ¹³C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 127.6 (C-1), 132.1 (C-2, 6), 116.2 (C-3, 5), 157.7 (C-4), 37.7 (C-7), 57.9 (C-8), 167.0 (C-9), 170.8 (C-1'), 60.1 (C-2'), 29.4 (C-3'), 22.7 (C-4'), 45.9 (C-5')。以上数据与文献^[20]报道一致,故鉴定化合物为 *N*-(5-amino-2-hydroxy-1-oxopentyl)-tyrosine。

2.2 单体化合物最低抑菌浓度的测定

对单体化合物对植物病原细菌的抗菌活性测试结果见表3,金霉素为阳性对照。化合物 2 对不同革兰氏阴性细菌的活性不同,其中对青枯劳尔氏菌的抑菌活性较强, MIC 值为 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对水稻黄单胞菌其次, MIC 值为 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,化合物 3 对青枯劳尔氏菌有明显抗菌活性, MIC 值为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。化合物 1、5 和 6 表现了微弱的抗菌活性,化合物 4、7 和 8 没有表现出特别明显的抗菌活性。化合物 1 与 Sch53825 结构类似,据文献报道螺二萜类化合物具有较好的生物活性^[21-24],但化合物 1 的抑菌活性弱于 Sch53825。

表 3 化合物的最低抑菌浓度

Table 3 MIC of compounds

化合物 Compound	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	青枯劳尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>	水稻黄单胞菌 <i>X. oryzae</i>	丁香假单胞菌 <i>P. syringae</i>	甘蓝黑腐黄单胞菌 <i>X. campestris</i>
1	500	500	-	-
2	7.81	31.25	500	250
3	62.5	250	250	500
4	-	-	-	-
5	500	500	500	500
6	500	500	500	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
金霉素 Chlortetracycline	0.98	0.98	3.92	1.96

注:“-”为无抑制效果。

Note:“-” means no inhibitory effect.

3 讨论与结论

本研究在三株大兴安岭森林凋落物真菌 SGSF622、SGSF289 和 SGSF062 中分离获得 8 个化合物,包括两个新化合物,1-甲氧基-Sch53825 (1) 与 3,4-二羟基-10-甲基-2-亚甲基十六碳-9-烯酸 (2),解析了它们的平面结构,但它们的立体构型还有待进

一步研究,它们的旋光数据及其他波谱数据,也有待进一步补充。本文中化合物的立体结构是通过对比文献的核磁数据得出,其准确绝对构型还有待进一步研究。本研究的三株真菌隶属的真菌属,都曾被报道过天然产物结构及其生物活性: *Berkleasium* 属真菌曾被报道过具有抗真菌、抗细菌及抗肿瘤活

性^[21-24],2009年Cai等^[22]报道从内生菌 *Berkleasmi-um* sp. Dzf12 发酵液中分离 diepoxin η 和 diepoxin ζ 的混合物以及 diepoxin κ ,它们与本文中化合物 **1** 具有类似结构同属于螺二萜类化合物,该文还报道了它们对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、番茄疮痂病菌 (*X. vesicatoria*)、黄瓜角斑病菌 (*P. lachrymans*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等有较好的抑制活性。*Oidiodendron* 真菌曾分离到 10-methoxydihydrofusicin、fusicinarin 和 fusicin。这些化合物被发现可以有效地与巨噬细胞炎症蛋白 (MIP)-1R 结合到人类 CCR5 上,CCR5 是一个重要的抗 HIV-1 靶点,可以干扰 HIV 进入细胞^[25],本研究中未发现这些化合物。Qiu^[3] 在 *Parapyrenchaeta* 属真菌 SGSF449 分离其天然产物,从其发酵物中分离代谢产物 4,6,8-三羟基-7-甲氧基-3-甲基二氢异香豆素,该化合物首次于柱顶孢霉属 (*Scytalidium*) 中分离出来,命名为 lignicol^[18],与本文化合物 **6** 的化学结构一致。本研究首次报道化合物 **1** 与化合物 **2** 的波谱数据,以及化合物 **2** 和化合物 **3** 抑制细菌的活性。除化合物 **6** 外,其余化合物均为首次从三株真菌所属的真菌属中分离得到^[3]。本研究丰富了大兴安岭森林凋落物真菌的天然产物的研究,为进一步开发利用大兴安岭森林真菌资源打下了基础。

参考文献

- Xu L, Meng W, Cong C, et al. Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi [J]. Mar Drugs, 2015, 13: 3479-3513.
- Zhang ZD, Liang J, Li ZY, et al. Litter fungi in the boreal forests and their antibacterial compounds in the Greater Khingan Mountains [J]. Chin Agr Sci Bull (中国农学通报), 2021, 37(6): 104-110.
- Qiu TY. Isolation, identification and material analysis of culturable fungi from forest litter in the Great Khingan Range [D]. Harbin: Heilongjiang University (黑龙江大学), 2021.
- Fromling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, et al. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts [J]. Antimicrob Agents Ch, 1993, 37(1): 39.
- Chu M, Patel M, Pai JK, et al. SCH 53823 and SCH 53825, novel fungal metabolites with phospholipase D inhibitory activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1996, 6: 579-584.
- Bode HB, Wegner B, Zeeck A. Biosynthesis of cladosporone bisepoxide, a member of the spirobisnaphthalene family [J]. J Antibiot, 2000, 53: 153-157.
- Bode HB, Zeeck A. UV mutagenesis and enzyme inhibitors as tools to elucidate the late biosynthesis of the spirobisnaphthalenes [J]. Phytochemistry, 2000, 55: 311-316.
- Cai YS, Guo YW, Krohn K. Structure, bioactivities, biosynthetic relationships and chemical synthesis of the spirodioxynaphthalenes [J]. Nat Prod Rep, 2010, 27: 1840-1870.
- Chu M, Truumees I, Patel M, et al. Sch 50673 and Sch 50676, two novel antitumor fungal metabolites [J]. J Antibiot, 1995, 48: 329-331.
- Thiergardt R, Rihs G, Hug P, et al. Cladosporone bisepoxide: definite structure assignment including absolute configuration and selective chemical transformations [J]. Tetrahedron, 1995, 51: 733-742.
- Krohn K, Steingröver K, Zsila F. The absolute configuration of the palmarumycins C9, C10, and C12 by quantum-mechanical calculations of CD spectra [J]. Tetrahedron-Asymmetry, 2001, 12: 1961-1964.
- Kanoh K, Okada A, Adachi K, et al. Ascochyatin, a novel bioactive spirodioxynaphthalene metabolite produced by the marine-derived fungus, *Ascochyta* sp. NGB4 [J]. J Antibiot, 2008, 61(3): 142-148.
- Krohn K, Michel A, Florke U, et al. Palmarumycins C1-C16 from *Coniothyrium* sp.: isolation, structure elucidation, and biological activity [J]. ChemInform, 2010, 26: 1099-1108.
- Müller JM, Fuhrer H, Gruner J, et al. Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. 160. mitteilung. Conocandin, ein fungistatisches antibiotikum aus *Hormococcus conorum* (Sacc. et Roum.) Roback [J]. Helv Chim Acta, 1976, 59: 2506-2514.
- Wang FF, Li QS. Studies on the chemical constituents of the fermentation broth from mangrove *Aegiceras corniculatum* endophyte GT20021545 [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物杂志), 2010, 29(2): 40-43.
- Asiri IA, Badr JM, Youssef DT. Penicillivincine, antimigratory diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Penicillium vinaceum* [J]. Phytochem Lett, 2015, 13: 53-58.
- Shimada A, Inokuchi T, Kusano M, et al. 4-Hydroxykigelin and 6-demethylkigelin, root growth promoters, produced by *Aspergillus terreus* [J]. Z Naturforsch C, 2004, 59(3-4): 218-222.
- Ayer WA, Lu PP, Orszanska H, et al. Deoxyscytalidin and

- Lignicol; new metabolites from *Scytalidium* species [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56:1835-1838.
- 19 Abdel LA, Alarif WM, Asfour HZ, et al. Cytotoxic effects of three new metabolites from red sea marine sponge, *Petrosia* sp. [J]. *Environ Toxicol Phar*, 2014, 37:928-935.
- 20 Lee YG, Cho JY, Moon JH. Isolation and antioxidative activity of amino acid derivatives produced by *Leuconostoc mesenteroides* [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2016, 25(1):329-334.
- 21 Zhong L, Wang L, Shan T, et al. Evaluation of antifungal activity of plant and microbial metabolites by microplate-MTT colorimetric assay [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24(1):20-24.
- 22 Cai X, Shan T, Li P, et al. Spirobisnaphthalenes from the endophytic fungus Dzf12 of *Dioscorea zingiberensis* and their antimicrobial activities [J]. *Nat Prod Commun*, 2009, 4:1469-1472.
- 23 Shan T, Tian J, Wang X, et al. Bioactive spirobisnaphthalenes from the endophytic fungus *Berkleasium* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77:2151-2160.
- 24 Zhou L, Zhao J, Shan T, et al. Spirobisnaphthalenes from fungi and their biological activities [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2010, 10:977-89.
- 25 Yoganathan K, Rossant C, Ng S, et al. 10-Methoxydihydrofusicin, fusicinarin, and fusicin, novel antagonists of the human CCR5 receptor from *Oidiodendron griseum* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66:1116-1117.
-
- (上接第 1529 页)
- 16 Li XF, Hu XR, Dai Z, et al. Isolation and identification of two sesquiterpenes from flowers of *Carthamus tinctorius* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43:1685-1687.
- 17 Xu X, Zhang YQ, Xu JW, et al. Chemical constituents of alcohol extract of *Mori fructus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2020, 51:1476-1480.
- 18 Yang CQ, Peng W, Yang BJ, et al. A new sesquiterpenoid from *Polyalthia petelotii* [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30:1565-1570.
- 19 Jiang PP, Wang JH, Ji MH, et al. Chemical constituents of *Crotalaria mucronata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42:1925-1928.
- 20 Xue DQ, Wang JD, Guo YW. A new sulphated nor-sesquiterpene from mangrove *Laguncularia racemose* (L.) Gaertn. F [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(3-4):319-321.
- 21 Baek S, Xia XK, Byung SM, et al. Trogopterins A-C; three new neolignans from feces of *Trogopterus xanthipes* [J]. *Beilstein J Org Chem*, 2014, 10:2955-2962.