

怀山药内生真菌 *Chaetomium* sp. 的次生代谢产物研究盛蒙珂<sup>1</sup>, 赵莹菲<sup>1</sup>, 田若丹<sup>1</sup>, 文春南<sup>1,2</sup>, 刘淼<sup>1,2\*</sup>, 麻兵继<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>河南农业大学农学院; <sup>2</sup>郑州市中药材种质资源创新与代谢工程重点实验室, 郑州 450046

**摘要:**以一株怀山药内生毛壳菌 *Chaetomium* sp. L-45 为研究对象, 对其次生代谢产物进行分离和结构鉴定。对毛壳菌进行大米发酵, 通过硅胶柱色谱、Sephadex LH-20、半制备高效液相色谱等分离技术分离发酵物的乙酸乙酯提取物, 利用 NMR、HR-ESI-MS 等波谱解析技术进行化合物的结构鉴定。从目标菌株的乙酸乙酯提取物中分离得到 4 个化合物, 分别鉴定为 3,4-二甲氧基-5-羟基-6-丙基-苯甲酸(1)、5-异戊烯基-吡啶-3-羧酸(2)、lecanorin(3) 和麦角甾醇(4), 其中, 化合物 1 为新化合物, 化合物 2 和 3 系首次从毛壳菌属真菌中分离得到。

**关键词:**毛壳菌; 次生代谢产物; 提取分离; 结构鉴定

中图分类号: R284.1; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)6-0982-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.6.008

Secondary metabolites from the endophytic *Chaetomium* sp. of *Dioscorea opposita*SHENG Meng-ke<sup>1</sup>, ZHAO Ying-fei<sup>1</sup>, TIAN Ruo-dan<sup>1</sup>, WEN Chun-nan<sup>1,2</sup>, LIU Miao<sup>1,2\*</sup>, MA Bing-ji<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>College of Agronomy, Henan Agricultural University; <sup>2</sup>Zhengzhou Key Laboratory of Germplasm Resources Innovation and Metabolic Engineering of Traditional Chinese Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China

**Abstract:** In this study, the secondary metabolites of an endophytic *Chaetomium* sp. L-45 from *Dioscorea opposita* were isolated and identified. The ethyl acetate extract of the rice fermentation of the fungus were separated by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20, semi-preparative High-performance liquid chromatography, etc., and the chemical structures of the compounds were identified by NMR and HR-ESI-MS analysis. As a result, four compounds were isolated and identified as 3,4-dimethoxy-5-hydroxy-6-propyl-benzoic acid (1), 5-isoprenylindole-3-carboxylic acid (2), lecanorin (3), and ergosterol (4). Among them, compound 1 is a new compound, compounds 2 and 3 were isolated from genus *Chaetomium* for the first time.

**Key words:** *Chaetomium* sp.; secondary metabolites; extraction and isolation; structure elucidation

植物内生菌是定殖在植物内部组织而不引起任何疾病的微生物<sup>[1]</sup>, 在寄主生活中扮演着重要的生理和生态角色<sup>[2]</sup>, 对植物的生长、发育、抗逆性和适应性发挥着不可或缺的作用<sup>[3,4]</sup>。药用植物内生真菌不仅能够促进宿主植物活性代谢产物的积累<sup>[5]</sup>, 还可代谢产生新的活性物质<sup>[6]</sup>, 在医药、农业等领域具有广阔的应用潜力<sup>[7]</sup>。

毛壳菌属真菌是自然界中分布广泛的一大类丝状真菌, 常见于土壤、空气和植物体内。该属真菌能够代谢产生结构复杂多样的天然产物, 如细胞松弛

素类、azaphilones、萜醌类、色酮、萜类和甾体等, 一些化合物表现出抗菌、抗病毒、抗疟、抗肿瘤等活性<sup>[8-10]</sup>。该属真菌代谢产物的化学结构和生物活性的多样性吸引了广泛关注<sup>[11-13]</sup>。

不同生长环境中植物的内生真菌次生代谢产物可能有显著差别, 而怀山药内生毛壳菌属真菌的次生代谢产物研究尚未见文献报道。为进一步挖掘毛壳菌属真菌的次生代谢产物, 本研究以前期从怀山药中分离得到的一株毛壳菌属真菌为研究对象, 对其大米发酵物的乙酸乙酯提取物进行化学成分研究, 通过各种色谱分离方法分离单体化合物, 利用波谱分析手段鉴定其化学结构, 以期从中发现结构新颖的生物活性成分。本研究进一步丰富了毛壳属真菌次生代谢产物的研究内容, 为挖掘山药内生真菌中次生代谢产物奠定了一定的研究基础。

收稿日期: 2024-02-26

接受日期: 2024-04-29

基金项目: 国家自然科学基金(U1604169); 河南省自然科学基金(232300421127); 河南农业大学博士启动基金(30500662)

\* 通信作者 E-mail: liumiao@henau.edu.cn, mbj123@sina.com

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

DRX 400/600 MHz 核磁共振仪(布鲁克);Waters Xevo G2-XS QToF 高分辨质谱(沃特世);Thermo Evolution 350 紫外可见分光光度计(赛默飞);EYE-LA-N1300 旋转蒸发仪(东京理化);Agilent 1100 高效液相色谱仪(安捷伦);Waters 1525 半制备高效液相色谱仪(沃特世);色谱柱:YMC-Triart-C<sub>18</sub> 半制备色谱柱(5 μm, 10 × 250 mm);LDZF-50KB 型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);GXZ 型智能光照培养箱(宁波江南制造厂);RP-C18(YMC, 50 μm);Sephadex LH-20(Amersham Biosciences AB);柱色谱硅胶(80~100、100~200 目,青岛海洋化工厂);色谱乙腈和色谱甲醇(美国天地);柱层析用甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚等均为分析纯。

### 1.2 试验材料

本研究所用菌株系采集河南温县铁棍山药,用孟加拉红琼脂培养基(rose bengal agar)从山药叶中分离,并利用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)纯化获得。经 ITS 测序并比对 GenBank 数据库,鉴定为毛壳菌属真菌(*Chaetomium* sp.), ITS 序列已保存至 GenBank(No. OR976500)。菌种(*Chaetomium* sp. L-45)保存于河南农业大学农学院中药材系实验室。

### 1.3 菌种的培养与发酵

在灭菌后的超净工作台中将已活化的毛壳菌接种于灭菌后的 PDA 中,置于智能光照培养箱(28 ℃)中培养三天。将 PDA 培养基培养的真菌于无菌条件下接种至 PDB 培养基中,于恒温摇床(28 ℃、120 r/min)中培养一周得到发酵种子液。将大米培养基(每瓶 100 g 大米和 100 mL 水,大米总量 20 kg)置于高压蒸汽灭菌锅中,121 ℃ 灭菌 20 min。在无菌条件下将种子液接种到大米培养基中,置于智能光照培养箱,28 ℃ 条件下培养 28 d。

### 1.4 提取与分离

将毛壳菌的大米发酵物以乙酸乙酯浸泡 3 次,每次 3 d,进行抽滤,得到滤液通过减压浓缩除去有机溶剂得到乙酸乙酯浸膏(205.3 g)。乙酸乙酯浸膏经硅胶柱层析用不同比例的石油醚-丙酮(1:0、10:1、2:1)洗脱,得到 Fr. A~Fr. C 三个组分。

Fr. B(41.8 g)经硅胶柱层析用不同比例石油醚-乙酸乙酯(150:1、50:1、10:1、2:1)和甲醇依次洗脱得到 Fr. B1~Fr. B5。Fr. B1 部分析出大量晶体,

即为化合物 4(4.6 g)。Fr. B4(3.8 g)经凝胶再结合 C-18 反相中压柱色谱分离,以不同比例甲醇-水(初始比例为 20%,以 5% 进行递增至纯甲醇)洗脱得到 Fr. B4.1~Fr. B4.17。Fr. B4.5(20.5 mg)通过半制备高效液相色谱(35% 乙腈-水)得到化合物 1(2.1 mg,  $t_R = 11.5$  min)。

Fr. C(76.5 g)经 C-18 反相中压柱色谱分离,以不同比例甲醇-水(20%、40%、60%、80%、100%)洗脱得到 Fr. C1~Fr. C5。Fr. C3(7.1 g)经硅胶柱层析,用不同比例二氯甲烷-丙酮(1:0、100:1、20:1、5:1)和甲醇依次洗脱得到 Fr. C3.1~Fr. C3.5。Fr. C3.2(104.8 mg)通过半制备高效液相色谱(40% 乙腈-水)得到化合物 2(10.4 mg,  $t_R = 16.4$  min)和 3(11.1 mg,  $t_R = 15.2$  min)。

## 2 结果与分析

**化合物 1** 黄褐色固体;UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 206(4.63);通过 HR-ESI-MS:  $m/z$  241.106 2 [M + H]<sup>+</sup> (计算值 C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>, 241.107 6), 确定其分子式为 C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, 不饱和度为 5。该化合物的<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 显示五组氢信号(见表 1), 其中一个烯氢或芳氢信号  $\delta_H$  6.41(s, 1H, H-2), 两个甲氧基信号  $\delta_H$  3.92(3H, s)、3.87(3H, s), 两个亚甲基信号  $\delta_H$  2.79(2H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-7), 1.63(2H, m, H-8) 以及一个甲基信号  $\delta_H$  0.97(3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-9), 推测其结构中包含一个丙基结构片段。该化合物的<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 图谱共出现 12 个碳信号(表 1), 其中一个酯羰基或羧基碳信号  $\delta_C$  171.9(C-10), 六个烯碳或芳碳信号  $\delta_C$  156.9(C-4)、156.0(C-3)、140.7(C-5)、116.7(C-1)、115.0(C-6)、94.4(C-2), 两个甲氧基碳信号  $\delta_C$  56.4、56.3, 三个烷基碳信号  $\delta_C$  33.7(C-7)、22.9(C-8)、14.3(C-9)。从该化合物的<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C NMR 数据推测, 化合物 1 的结构中包含一个苯环, 且为五取代, 其中两个甲氧基取代, 一个羧基取代, 一个丙基取代, 以及一个羟基取代, 与化合物 1 的不饱和度吻合。该化合物的<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 图谱(见图 1)中可以看到 H-7 与 H-8, H-8 与 H-9 相关, 进一步证实了丙基的存在。化合物 1 的 HMBC 图谱(见图 1)中可以看到两个甲氧基分别与  $\delta_C$  156.9(C-4)、156.0(C-3) 相关, 证实了甲氧基连接在苯环上; H-2 与 C-1、C-3、C-4、C-6 和 C-10 的 HMBC 相关表明羧基连接在 C-1 位, 而 C-5 位为羟基取代; H-9 与 C-7、C-8, H-8 与 C-7 以及 H-7 与 C-1、C-5、C-6 的 HMBC 相关进一步证实了苯环上

丙基取代的存在,且其取代位置在 C-6 位。故将化合物 **1** 的化学结构鉴定为 3,4-二甲氧基-5-羟基-6-丙基-苯甲酸 (3,4-dimethoxy-5-hydroxy-6-propyl-benzoic acid) (见图 2), 化合物 **1** 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))。

表 1 化合物 **1** 的  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR (600 和 150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 数据

Table 1  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data (600 and 150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of **1**

No.	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	116.7(s)
2	6.41(1H,s)	94.4(d)
3	-	156.0(s)
4	-	156.9(s)
5	-	140.7(s)
6	-	115.0(s)
7	2.79(2H,t, $J = 8.0$ Hz)	33.7(t)
8	1.63(2H,m)	22.9(t)
9	0.97(3H,t, $J = 7.2$ Hz)	14.3(q)
10	-	171.9(s)
3-OMe	3.92(3H,s) <sup>a</sup>	56.4(q) <sup>a</sup>
4-OMe	3.87(3H,s) <sup>b</sup>	56.3(q) <sup>b</sup>

注: a 和 b 可交换。

Note: a and b can be interchanged.

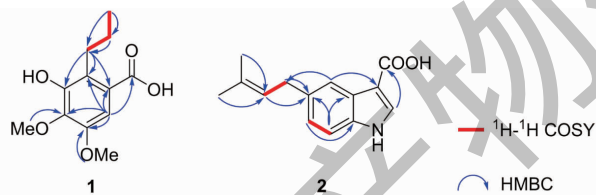


图 1 化合物 **1** 和 **2** 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 及关键的 HMBC 相关

Fig. 1  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and key HMBC correlations of **1** and **2**

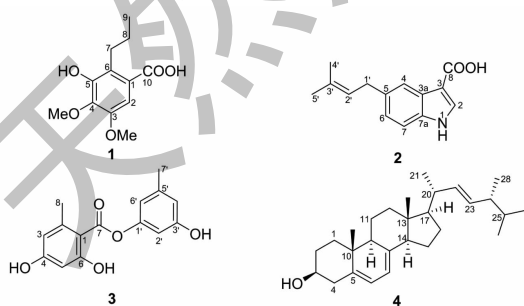


图 2 化合物 **1**~**4** 的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of compounds **1**-**4**

化合物 **2** 黄褐色固体; 通过 HR-ESI-MS  $m/z$  252.1003 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> (计算值 for  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{Na}$ , 252.1000), 确定其分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ , 不饱和度

为 8。该化合物的  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 显示五个芳氢或烯氢信号  $\delta_{\text{H}}$  7.79 (1H, s, overlap, H-2), 7.79 (1H, s, overlap, H-4), 7.22 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-7), 6.91 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6), 5.27 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-2'); 一个双峰亚甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  3.33 (2H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1'), 两个单峰甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  1.66 (3H, s, H-5'), 1.64 (3H, s, H-4')。化合物 **2** 的  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 仅显示 12 个碳信号, 其中 9 个芳碳或烯碳信号  $\delta_{\text{C}}$  136.7 (C-7a)、136.0 (C-5)、127.9 (C-3a)、133.3 (C-2)、124.4 (C-6)、121.2 (C-4)、111.3 (C-7)、125.7 (C-2')、132.4 (C-3'), 一个亚甲基  $\delta_{\text{C}}$  35.6 (C-1'), 两个甲基  $\delta_{\text{C}}$  26.0 (C-4')、17.9 (C-5')。该化合物的碳信号与其分子式不符, 进一步分析 HSQC 和 HMBC 图谱发现, 化合物 **2** 的碳谱中尚有两个不明显的碳信号  $\delta_{\text{C}}$  170.0 (C-10)、108.9 (C-3), 推测分别为羧基碳信号和双键碳信号。

该化合物的核磁共振信号 (见表 2) 与已知化合物 5-isoprenylindole-3-carboxylic acid 的核磁数据相似<sup>[14]</sup>。化合物 **2** 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 图谱中存在 H-1' 与 H-2' 相关, 其 HMBC 图谱中 (见图 1), H-1' 与 C-2'、C-3'、C-4、C-5 相关, H-4' 与 C-2'、C-3'、C-5' 相关, H-5' 与 C-2'、C-3'、C-4' 相关, 确定异戊烯基支链的存

表 2 化合物 **2** 的  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR (400 和 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 数据

Table 2  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) of **2**

No.	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	7.79(1H, overlap)	133.3(d)
3	-	108.9(s)
3a	-	127.9(s)
4	7.79(1H, overlap)	121.2(d)
5	-	136.0(s)
6	6.91(1H, d, $J = 8.4$ Hz)	124.4(d)
7	7.22(1H, d, $J = 8.4$ Hz)	111.3(d)
7a	-	136.7(s)
8	-	170.0(s)
1'	3.33(2H, d, $J = 7.2$ Hz)	35.6(t)
2'	5.27(1H, t, $J = 7.2$ Hz)	125.7(d)
3'	-	132.4(s)
4'	1.64(3H, s)	26.0(q)
5'	1.66(3H, s)	17.9(q)

在。芳环上氢信号 7.79 (1H, s, overlap, H-4), 7.22 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-7), 6.91 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6) 说明苯环为 1,2,4-三取代。通过 H-6 与 H-7 的 COSY 相关, H-1' 与 C-4、C-5、C-6 的 HMBC 相关, 以及 H-6 与 C-1'、C-4、C-7a 的 HMBC 相关, 确定异戊烯基连接在 C-5 位。综上, 确定该化合物为 5-异戊烯基-吲哚-3-羧酸 (5-isoprenylindole-3-carboxylic acid) (见图 2), 为已知化合物。

**化合物 3** 黄褐色固体;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 6.55 (1H, s, H-4'), 6.49 (1H, s, H-6'), 6.43 (1H, s, H-2'), 6.28 (1H, s, H-5), 6.21 (1H, s, H-3), 2.56 (3H, s, H-8), 2.29 (3H, s, H-7');  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 105.4 (s, C-1), 164.4 (s, C-2), 101.9 (d, C-3), 166.6 (s, C-4), 112.8 (d, C-5), 144.7 (s, C-6), 171.5 (s, C-7), 24.4 (q, C-8), 152.2 (s, C-1'), 107.3 (d, C-2'), 159.4 (s, C-3'), 114.8 (d, C-4'), 141.6 (s, C-5'), 114.5 (d, C-6'), 21.4 (q, C-7')。化合物 3 的核磁数据与文献<sup>[15]</sup>报道一致, 该化合物鉴定为 lecanorin。

**化合物 4** 白色结晶性固体 (二氯甲烷);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.57 (1H, dd,  $J = 5.5, 2.2$  Hz, H-6), 5.38 (1H, m, H-7), 5.22 (1H, m, H-22), 5.18 (1H, m, H-23), 3.64 (1H, m, H-3), 1.04 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-28), 0.83 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-27), 0.81 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-26), 0.63 (3H, s, H-18)。  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 38.4 (t, C-1), 32.0 (t, C-2), 70.5 (d, C-3), 40.8 (t, C-4), 139.8 (s, C-5), 119.6 (d, C-6), 116.3 (d, C-7), 141.4 (s, C-8), 46.3 (d, C-9), 37.0 (s, C-10), 21.1 (t, C-11), 39.1 (t, C-12), 42.8 (s, C-13), 54.6 (d, C-14), 23.0 (t, C-15), 28.3 (t, C-16), 55.7 (d, C-17), 12.1 (q, C-18), 16.3 (q, C-19), 40.4 (d, C-20), 21.1 (q, C-21), 135.6 (d, C-22), 132.0 (d, C-23), 42.8 (d, C-24), 33.1 (d, C-25), 20.0 (q, C-26), 19.7 (q, C-27), 17.6 (q, C-28)。该化合物的核磁数据与文献<sup>[16]</sup>报道基本一致, 故化合物 4 鉴定为麦角甾醇。

### 3 讨论与结论

本研究从怀山药来源的一株毛壳菌中分离得到 4 个化合物, 其中化合物 1 为新化合物; 化合物 2 是 Motohashi 等<sup>[14]</sup> 2008 年从链霉菌的代谢产物中首次分离鉴定, 本研究系第二次从天然产物中发现该化

合物; 化合物 3 多见于地衣中, 本研究系首次从毛壳菌属真菌中分离得到。毛壳属真菌作为生防菌在防治作物病害方面具有重要价值, 文献报道, 化合物 2 的同分异构体 6-isoprenylindole-3-carboxylic acid 具有显著的抗细菌和抗真菌活性<sup>[17]</sup>, 可为下一步开展化合物的生物活性筛选提供参考。化合物 3 具有显著的脲酶抑制活性 ( $\text{IC}_{50} = 34.06 \mu\text{mol/L}$ )<sup>[6]</sup>; 还具有抑制幼苗胚根生长和萌发的作用<sup>[18]</sup>。麦角甾醇 (4) 是生产维生素 D2 的前体, 也可作为重要的医药化工原料, 用于生产“可的松”“激素黄体酮”等甾醇类药物。化合物 4 在本实验菌株的大米发酵产物的乙酸乙酯提取物中含量可达 2% 以上, 是该菌株的主要代谢产物。本研究采用两步硅胶柱层析结合重结晶的方法可高效快捷地分离得到高纯度麦角甾醇。后续可优化培养条件, 进一步提高麦角甾醇的产量, 同时简化麦角甾醇的制备工艺以及减少制备过程中有机溶剂的使用, 为从该菌株高效发酵并制备麦角甾醇提供依据。

毛壳菌属真菌次生代谢产物, 尤其是细胞松弛素类和 azaphilones 类代谢产物结构丰富多样, 是该属真菌中最为被广泛关注的化合物, 同时这两类化合物也被认为可作为毛壳属真菌的化学分类学标记物<sup>[11]</sup>。但本研究尚未从该株真菌中发现广泛存在于毛壳属真菌的细胞松弛素类化合物, 其次生代谢产物仍有待进一步深入挖掘。

### 参考文献

- 1 Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites [J]. *Chem Biol*, 2012, 19: 792-798.
- 2 Tintjer T, Rudger AJ. Grass-herbivore interaction altered by strains of a native endophyte [J]. *New Phytol*, 2006, 170: 513-521.
- 3 Digra S, Nonzom S. An insight into endophytic antimicrobial compounds: an updated analysis [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2023, 17: 427-457.
- 4 Wani ZA, Ashraf N, Mohiuddin T, et al. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2015, 99: 2955-2965.
- 5 Li Q, Liu J, Zhou DP, et al. Advance on exploitation and research of endophyte [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2006, 22: 33-37.