

恒山黄芪内生真菌 *Rhizopus* sp. 次生代谢产物的分离和鉴定

张弘弛, 刘瑞, 李慧, 安志鹏, 周凤*

(大同大学 生命科学学院, 应用生物技术研究所, 山西 大同 037009)

[摘要] 目的:研究恒山黄芪内生真菌 *Rhizopus* sp. 的次生代谢产物的类别。方法:通过组织学的方法从恒山黄芪中分离到 AR02,真菌的鉴定采用形态学法结合分子生物学法,内生真菌大量发酵采用固体培养的方法,次生代谢产物的分离采用硅胶柱色谱法,Sephadex LH-20 凝胶色谱法结合 HPLC 进行分离纯化,分离到的代谢产物的化学结构通过理化分析测定结合光谱分析进行鉴定。结果:从黄芪根部分离到的内生真菌 AR02 被鉴定为根霉属 *Rhizopus* sp., 从该菌株的固体发酵产物中分离得到 7 个化合物,经结构鉴定,分别为色胺酮(1),lawsaritol A(2),曲菌酸(3),trypacidin(4),monomethylsulochrin(5),emodin 8-*O*-methylether(6)和 cannabifolactone A(7)。结论:化合物 1~3,6 和 7 均为首次从恒山黄芪内生真菌中分离得到,且黄芪内生真菌 *Rhizopus* sp. 的次生代谢产物呈现出多个类别,可以作为活性物质的新来源。

[关键词] 内生真菌; 黄芪; 根霉属; 次生代谢产物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)04-0071-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040071

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161130.0917.020.html>

[网络出版时间] 2016-11-30 9:17

Isolation and Identification of Secondary Metabolites from Endophytic *Rhizopus* sp. in Astragali Radix

ZHANG Hong-chi, LIU Rui, LI Hui, AN Zhi-peng, ZHOU Feng*

(College of Life Science, Applied Biotechnology Institute, Datong University, Datong 037009, China)

[Abstract] **Objective:** To study on secondary metabolites of endophytic fungus *Rhizopus* sp. from Astragali Radix. **Method:** AR02 was isolated from Astragali Radix by the method of histology. The fungus was identified by morphological method combined with molecular biology method. Large-scale fermentation of endophytic fungi used solid culture method. The compounds were isolated by column chromatography, Sephadex LH-20, and HPLC. They were identified on the basis of physic-chemical constants and spectral analysis. **Result:** Endophytic fungi AR02 isolated Astragali Radix were identified as *Rhizopus* sp. Seven compounds were obtained and elucidated as tryptanthrin (1), lawsaritol A (2), kojic acid (3), trypacidin (4), monomethylsulochrin (5), emodin 8-*O*-methylether (6) and cannabifolactone A (7). **Conclusion:** Compounds 1-3, 6 and 7 were isolated from the endophytic fungi of Astragali Radix for the first time. The secondary metabolites of *Rhizopus* sp. appear in several categories and the endophytic fungus, *Rhizopus* sp. from Astragali Radix is a promising source for active substances.

[Key words] endophytic fungi; Astragali Radix; *Rhizopus* sp.; secondary metabolites

[收稿日期] 20160514(002)

[基金项目] 山西省科技攻关项目(20130311011-6);大同市科技攻关项目(201468-1)

[第一作者] 张弘弛,博士,讲师,从事天然产物化学的研究工作,Tel:0352-7158938,E-mail:zhanghelw@163.com

[通讯作者] *周凤,硕士,教授,从事农业基础相关研究工作,Tel:0352-7158938,E-mail:linzhoufeng@163.com

内生真菌指在其一定阶段或全部阶段的生命周期寄居于健康植物各种组织和器官内部的一类特殊的真菌,被其感染的宿主植物不表现出外在病症,可通过组织学方法或从严格表面消毒的植物组织中分离。内生真菌在与植物共生的阶段内,能产生多种活性代谢产物,具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化,杀虫等活性,内生真菌被认为是筛选活性物质的潜在资源^[1-2]。寄生于药用植物组织内的内生真菌,因为与寄主植物的长期和谐发展,共同提高共生体系的抗逆性,因而被认为蕴含着更多的活性物质。

本课题组一直致力于恒山黄芪内生真菌的研究,近年已经研究了多株恒山黄芪内生真菌的代谢产物^[3-5],目前的研究也证实了从恒山黄芪内生真菌的代谢产物中可以发掘出更多的活性物质,这也激励着笔者更加深入地去研究不同环境和生态条件下恒山黄芪内生真菌的更多类别的代谢产物。本研究以恒山黄芪根部的内生真菌 *Rhizopus* sp. (编号 AR02) 为研究对象,经生物分离从其固体发酵产物中发现了 7 个次生代谢产物,分别为色胺酮(1), lawsaritol A (2), 曲菌酸(3), 杀锥曲菌素(4), monomethylsulochrin (5), 大黄素甲醚(6) 和 cannabifolactone A(7)。本文进一步完善了恒山黄芪内生真菌代谢产物的研究。

1 材料

柱色谱硅胶(200~300目,青岛海洋化工厂分厂);薄层色谱硅胶 G(青岛海浪硅胶干燥剂厂); LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20,上海浩然生物技术有限公司)。HPLC 用试剂色谱纯(上海星可生化有限公司),其他试剂均为分析纯。

JEOL SX102A 型 ESI-MS 质谱仪(日本电子株式会社),ADVANCE 400 MHz 型超导核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司,TMS 作为内标),XT5 型显微熔点测定仪(未校正,北京市科仪电光仪器厂),1200 型高效液相色谱(美国惠普公司),Welch material XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)。

2 内生真菌的来源和分离

从 2013 年 8 月采自山西省北岳恒山阳坡的恒山黄芪,植物样品由大同大学生命科学学院周凤教授鉴定为豆科膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的根部,分离得到内生真菌 AR02,该菌株现保存于山西大同大学应用生物技术研究所。

3 内生真菌的鉴定

将菌株 AR02 接种于 PDA 平板上,27℃ 暗箱培养 3 d 后,记录其生长形态以及外观培养性状;采用

玻片培养法,显微观察孢子梗的分枝状况和孢子形态等情况。同时,AR02 转接到 PDA 平板上,培养 10~15 d 后,液氮中将菌丝块研磨成粉末状,选用 CTAB 法来提取该内生真菌 DNA。以提取到的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增序列。PCR 扩增产物送交三联兄弟生物医药研究(北京)有限公司测序,测序结果通过 Blast 比对分析,构建系统发育树。

AR02 生长缓慢,菌落颜色为褐色且较大,表面干燥,菌丝较稠密,边缘有显著的爬壁现象,表面干燥;显微观察发现,菌核形状不一,表面粗糙,菌核外表和内部的颜色相似;菌丝在分枝处有缢缩(图 1),呈现弧形。孢子囊从白色,变成黑色,初步鉴定为根霉属。经过 PCR 扩增后获得的 ITS 序列长 629 bp,聚类分析(图 2)该菌株与多株根霉属具有同源性,综合形态学特征和 ITS 序列分析,将 AR02 鉴定为 *Rhizopus* sp.。

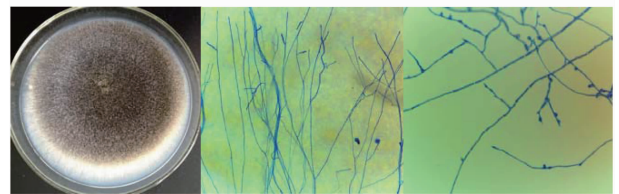


图 1 菌株 AR02 菌落形态
Fig.1 Colonial morphology of strain AR02

4 内生真菌 AR02 的发酵及代谢产物提取和分离

内生真菌 AR02 平板活化后,接种于含 100 mL 察氏液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,于 28℃,150 r·min⁻¹ 振荡培养 7 d,制备得种子液。大量发酵在含查氏液体 400 mL 培养基 1 000 mL 的锥形瓶中按照 10% 接种量接种种子液(共接种 50 瓶),28℃,150 r·min⁻¹ 摇床上振荡培养 15 d 后,采用 4 层纱布过滤得菌丝和发酵滤液,发酵滤液在 60℃ 浓缩至 3 L 以下,然后用乙酸乙酯萃取 5 次(共计收集萃取液 3 L),浓缩后得粗提物 56 g。粗提物经硅胶柱色谱,以乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱(1:0,100:1,50:1,20:1,10:1,5:1,2:1,1:1,0:1)得到 9 个部分 Fr. A~Fr. I。Fr. B 以石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱(体积比分别为 1:0,20:1,10:1,5:1,10:3,5:2,2:1,5:3,10:7,5:4,1:1,1:2),得 sFr. B(1~12),sFr. B3 再次经硅胶柱色谱洗脱,得化合物 1(163 mg),化合物 2(172 mg)和化合物 3(263 mg);Fr. C 以石油醚-乙酸乙酯为流动相梯度洗脱(1:0,10:1,5:1,5:2,2:1,5:3,5:4,1:1,1:2,0:1),得组分 sFr. C(1~10),sFr. C2 经半制备 HPLC,以甲醇-水为流动

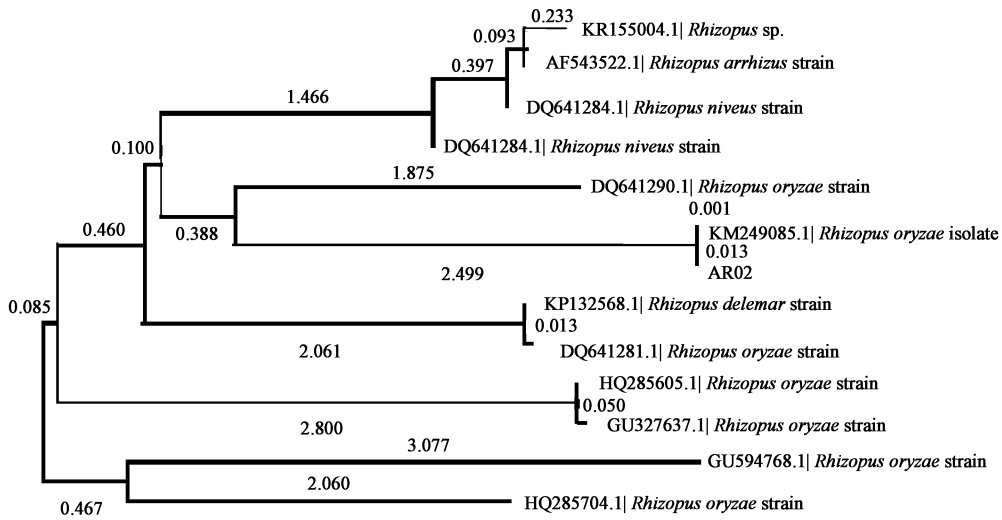


图 2 菌株 AR02 系统发育分析

Fig. 2 Polymeric analysis of strain AR02

相(2:3, 流速 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), 分离纯化得化合物 **4** (51 mg) 和化合物 **5** (36 mg); sFr. C3 再次经硅胶柱色谱洗脱和 Sephadex LH-20 纯化, 得到化合物 **6** (98 mg); sFr. C4 再经硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 纯化, 得化合物 **7** (75 mg)。

5 内生真菌代谢产物的结构鉴定

7 个代谢产物经过光谱分析, 鉴定为 tryptanthrin (**1**), lawsaritol A (**2**), kojic acid (**3**), tryptacidin (**4**), monomethylsulochrin (**5**), emodin 8-O-methylether (**6**), cannabifolactone A (**7**), 结构见图 3。

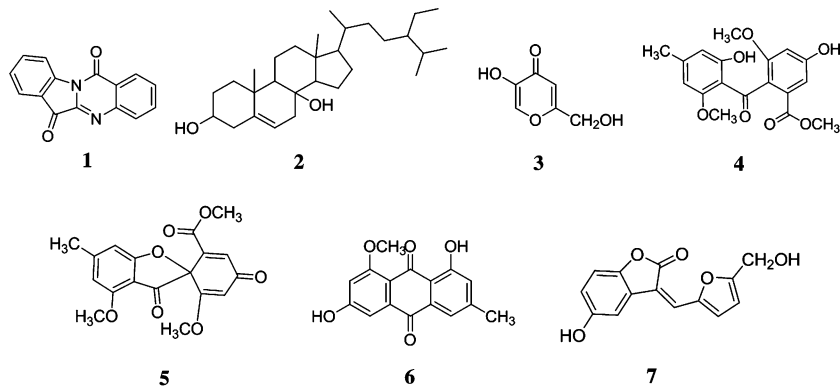


图 3 黄芪内生真菌 AR02 的代谢产物

Fig. 3 Compounds isolated from strain AR02 of Astragalus membranaceus

化合物 **1** 黄色针状结晶(三氯甲烷), mp $268 \sim 269 \text{ }^\circ\text{C}$, ESI-MS m/z 249.06 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.63 (1H, d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, H-1), 7.67 (1H, t, $J = 8.4 \text{ Hz}$, H-2), 7.85 (1H, t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-3), (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-4), 7.92 (1H, d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, H-7), 7.42 (1H, t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, H-8), 7.78 (1H, t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-9), 8.04 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 ,) δ : 127.57 (C-1), 130.28 (C-2), 135.16 (C-3), 130.75 (C-4), 146.63 (C-4a), 144.34 (C-5a), 182.64 (C-6), 121.93 (C-

6a), 125.44 (C-7), 127.23 (C-8), 138.32 (C-9), 117.99 (C-10), 146.36 (C-10a), 158.13 (C-12), 123.75 (C-12a)。核磁数据与文献[6]报道一致, 鉴定化合物为色胺酮 tryptanthrin。

化合物 **2** 白色粉末(三氯甲烷), mp $110 \sim 111 \text{ }^\circ\text{C}$, ESI-MS m/z 431.38 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.53 (1H, br m, H-3), 2.29 (1H, m, H-4), 1.50 (1H, m, H-5), 5.36 (1H, t, $J = 5.2 \text{ Hz}$, H-6), 0.68 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J = 6.4 \text{ Hz}$, H-21), 0.84 (3H, d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, H-26), 0.80 (3H, d, $J = 5.2$

Hz, H-27), 0.83 (3H, d, $J = 1.6$ Hz, H-29); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 37.23 (C-1), 31.65 (C-2), 71.81 (C-3), 42.29 (C-4), 140.89 (C-5), 121.74 (C-6), 31.88 (C-7), 77.22 (C-8), 50.10 (C-9), 36.49 (C-10), 21.07 (C-11), 39.75 (C-12), 42.31 (C-13), 56.75 (C-14), 24.30 (C-15), 28.25 (C-16), 56.02 (C-17), 11.98 (C-18), 19.83 (C-19), 36.14 (C-20), 18.77 (C-21), 33.91 (C-22), 26.00 (C-23), 45.80 (C-24), 29.10 (C-25), 19.40 (C-26), 19.01 (C-27), 23.04 (C-28), 11.86 (C-29)。核磁数据与文献[7]报道一致, 鉴定化合物为 lawsaritol A。

化合物3 白色片状晶体(甲醇), mp 154 ~ 155 °C, ESI-MS m/z 143.03 [M + H]⁺。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.33 (1H, s, H-3), 8.02 (1H, s, H-6), 4.28 (2H, s, H-7), 9.06 (1H, s, 5-OH), 5.67 (1H, s, 7-OH); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 168.06 (C-2), 109.79 (C-3), 173.97 (C-4), 145.59 (C-5), 139.30 (C-6), 59.39 (C-7)。核磁数据与文献[8]中报道一致, 确定化合物为曲菌酸(kojic acid)。

化合物4 白色粉末(甲醇), mp 197 ~ 198 °C, ESI-MS m/z 347.11 [M + H]⁺。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.46 (1H, s, H-5), 2.64 (3H, s, H-6a), 5.81 (1H, s, H-7), 7.20 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.60 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-4'), 3.91 (3H, s, 4-OCH₃), 3.69 (6H, s, 6'-OCH₃, 5'-OCH₃)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 83.96 (C-2), 190.44 (C-3), 107.95 (C-3a), 158.31 (C-4), 105.50 (C-5), 152.45 (C-6), 23.32 (C-6a), 105.77 (C-7), 173.85 (C-7a), 138.52 (C-1'), 137.34 (C-2'), 185.00 (C-3'), 103.20 (C-4'), 168.83 (C-5'), 163.11 (C-6'), 56.29 (4-OCH₃), 52.87 (6'-OCH₃), 56.87 (5'-OCH₃)。以上数据与文献[9]报道的一致, 故鉴定该化合物为杀锥曲菌素(trypacidin)。

化合物5 无色粉末, mp 179 ~ 182 °C, ESI-MS m/z 345.09 [M + H]⁺。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.62 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-4), 7.04 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 3.71 (6H, s, 7-OCH₃, H-8), 6.48 (1H, s, H-3'), 6.08 (1H, s, H-5'), 2.31 (3H, s, H-7'), 3.39 (3H, s, H-9'), 13.01 (1H, s, 2'-OH)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 128.35 (C-1), 127.94 (C-2), 156.27 (C-3), 102.92 (C-

4), 157.02 (C-5), 107.98 (C-6), 166.24 (C-7), 56.19 (C-8), 111.00 (C-1'), 164.28 (C-2'), 110.37 (C-3'), 148.18 (C-4'), 103.23 (C-5'), 160.94 (C-6'), 22.54 (C-7'), 199.76 (C-8'), 55.69 (C-9'), 52.31 (7-OCH₃)。以上数据与文献[10]报道的一致, 故鉴定该化合物为 monomethylsulochrin。

化合物6 橘黄色片状晶体(乙醇), mp 286 ~ 287 °C, ESI-MS m/z 285.07 [M + H]⁺。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.12 (1H, dd, $J = 1.6$, 0.8 Hz, H-2), 7.42 (1H, d, $J = 1.6$, 0.4 Hz, H-4), 7.19 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 6.84 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-7), 2.39 (3H, s, 3-CH₃), 13.23 (1H, s, 1-OH), 3.90 (3H, s, 8-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 162.16 (C-1), 124.64 (C-2), 147.10 (C-3), 119.59 (C-4), 107.42 (C-5), 164.89 (C-6), 105.41 (C-7), 163.84 (C-8), 186.82 (C-9), 182.80 (C-10), 137.24 (C-11), 113.06 (C-12), 114.80 (C-13), 132.46 (C-14), 21.79 (3-CH₃), 56.85 (8-OCH₃)。以上数据与文献[11]报道的一致, 故鉴定该化合物为大黄素-8-甲醚(emodin 8-O-methylether)。

化合物7 橘黄色粉末(甲醇), mp 224 ~ 226 °C, ESI-MS m/z 259.06 [M + H]⁺。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.84 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-5), 6.81 (1H, dd, $J = 2.5$, 8.6 Hz, H-7), 7.07 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-8), 7.47 (1H, s, H-10), 7.37 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-12), 6.70 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-13), 4.70 (2H, s, H-15), 9.52 (1H, s, OH-6), 5.61 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH-15); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 169.68 (C-2), 115.33 (C-3), 122.31 (C-4), 111.02 (C-5), 153.80 (C-6), 116.87 (C-7), 110.84 (C-8), 146.36 (C-9), 123.26 (C-10), 149.43 (C-11), 124.27 (C-12), 110.93 (C-13), 161.99 (C-14), 56.24 (C-15)。以上数据与文献[12]报道基本一致, 故鉴定该化合物为 cannabifolactone A。

6 讨论

分离的7个次生代谢产物包含多个类别, 化合物1~3, 6和7首次从黄芪内生真菌中分离得到, 其中色胺酮是一种喹唑啉酮生物碱, 主要被用来治疗刀伤、溃烂、蛇咬、痔疮及各种炎症; 曲菌酸是一种黑色素专属性抑制剂, 它进入皮肤细胞后能阻止酪氨酸酶的活化, 从而抑制黑色素的形成; 杀锥曲菌素是

一种特异杀菌剂;大黄素-8-甲醚对多种细菌均有抑制作用对人体宫颈癌 HeLa 细胞也有抑制作用;cannabifolactone A 被发现可以作为流感病毒核酸内切酶 PAN 抑制剂。因而恒山产黄芪内生真菌 *Rhizopus* sp. 可以作为多种活性物质的新的来源。

[参考文献]

[1] Nisa H, Kamili A N, Nawchoo I A, et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products; a review [J]. *Microb Pathogenesis*, 2015, 82: 50-59.

[2] WANG Y, DAI C C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation [J]. *Ann Microbiol*, 2011, 61:207-215.

[3] ZHOU F, ZHANG H C, LIU R, et al. Isolation and biological evaluation of secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* from *Astragalus membranaceus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2012, 49(3): 568-570.

[4] LIU X C, LI H, ZHOU F, et al. Secondary metabolites of *Fusarium* sp., an endophytic fungus in *Astragalus membranaceus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2015, 51(6): 1199-1201.

[5] 周凤, 张弘弛, 刘瑞, 等. 恒山黄芪内生真菌 *Aspergillus* sp. 代谢产物的分离和生物活性的测定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4): 125-129.

[6] Hosoe T, Nozawa K, Kawahara N, et al. Isolation of a

new potent cytotoxic pigment along with indigotin from the pathogenic basidiomycetous fungus *Schizophyllum commune* [J]. *Mycopathologia*, 1999, 146(1): 9-12.

[7] Gupta S, Ali M, Alam M S, et al. Isolation and characterization of a dihydroxysterol from *Lawsonia inermis* [J]. *Nat Prod Lett*, 1994, 4(3): 195-201.

[8] LI X, Jeong J H, Lee K T, et al. γ -pyrone derivatives, kojic acid methyl ethers from a marine-derived fungus *Altenaria* sp. [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(7): 532-534.

[9] Balan J, Kjaer A, Kovac S, et al. The structure of trypacidin [J]. *Acta Chem Scand*, 1965, 19: 528-530.

[10] LIU J Y, SONG Y C, ZHANG Z, et al. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites [J]. *J biotech*, 2004, 114(3): 279-287.

[11] Fujimoto H, Fujimaki T, Okuyama E, et al. Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47(10): 1426-1432.

[12] WU B, WU L J, WANG L Q. A new lactone from *Senecio cannabifolius* less [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2002, 4(4): 315-317.

[责任编辑 顾雪竹]