

白地霉的化学成分研究

刘亚男^{1,2}, 冯娜^{1,2}, 薛璟花¹, 吴萍¹, 魏孝义^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:白地霉(*Geotrichum candidum* Link)固体发酵培养物,经乙醇提取、柱层析分离得到了7个化合物。通过光谱分析,分别鉴定为亮氨酸(1)、尿嘧啶(2)、胸腺嘧啶(3)、焦儿茶酸(4)、4-羟基苯甲酸(5)、3,5-二羟基苯甲酸(6)和7,8-dimethylalloxazine(7)。7个化合物均是首次从白地霉中得到。

关键词:白地霉; 苯甲酸; 生物碱; 核酸

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)01-0057-04

Chemical Constituents from *Geotrichum candidum*

LIU Ya-nan^{1,2}, FENG Na^{1,2}, XUE Jing-hua¹, WU Ping¹, WEI Xiao-yi^{1*}

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences., Guangzhou 510650, China;

2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Seven compounds were isolated from the cultures of *Geotrichum candidum* Link. On the basis of their spectral data, they were identified as leucine (1), uracil (2), thymine (3), pyrocatechuic acid (4), *p*-hydroxybenzoic acid (5), 3,5-dihydroxybenzoic acid (6), and 7,8-dimethylalloxazine (7). All compounds are isolated from this fungus for the first time.

Key words: *Geotrichum candidum*; Benzoic acid; Alkaloid; Nucleic acid

白地霉(*Geotrichum candidum* Link)是一种常见真菌,属于半知菌亚门、丛梗孢科、卵形孢霉族、地霉属^[1],可从土壤、粪、肥料、食品、烂菜、酒醅等中分离得到^[2]。其细胞内含丰富蛋白质和脂肪,可供食用及饲用。国外普遍用它来生产乳酪^[3-4]。国内多用酒精废水、豆腐废水、豆腐酸浆、曲酒丢糟等废弃物来发酵产生白地霉^[5-8],作为菌体蛋白使用。白地霉具有对培养基营养要求低、适应性强、生长快、生产方法简单(可敞口发酵)、宜于工业化生产等特点,因而是一种极具发展潜力的工业微生物^[9-10]。目前的研究大多集中在其菌体蛋白的开发利用上,并未对其次生代谢进行研究。我们在对鼎湖山自然保护区中真菌的抗菌活性筛选中,发现一株白地霉菌菌株(SC0581)的培养物对荔枝霜疫霉(*Peronophythora litchei*)具有较强的抑制作用。为了寻找其抑菌活性成分,对这株菌

的代谢产物进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

白地霉菌(*Geotrichum candidum* Link)菌株 SC0581于2002年6月从采自广东省肇庆市鼎湖山自然保护区珍稀濒危植物园的土壤样品(DH0264)中分离得到,由中国科学院微生物研究所刘杏忠研究员鉴定。菌种保存于10%甘油水溶液的冷冻管中。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯300 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水1 L;酵母麦芽汁葡萄糖培养基(YMG):葡萄糖4 g,麦芽提取物10 g,酵母提取物4 g,蒸馏水1 L, pH 5.5 ± 0.2。

收稿日期:2007-03-09 接受日期:2007-05-14

基金项目:国家自然科学基金项目(20672114);中国科学院华南植物园主任基金项目(PL200617)资助

* 通讯作者 Corresponding author

1.3 仪器

ESIMS 用 MDS SCIEX API 2000 LC/MS/MS 仪, 以甲醇为溶剂, 直接进样测定。¹H NMR 谱和 ¹³C NMR 谱用 Bruker DRX-400 核磁共振仪, 以四甲基硅烷(TMS)为内标测定。

1.4 发酵培养

用接种针挑取一环原保存菌种, 接种到新配制灭菌过的 PDA 平面培养基上, 在 25℃ 下无光照培养 7 d, 以使菌种活化。在 20 个容量为 100 ml 的三角瓶内分别加入 YMG 培养基 30 ml, 将活化的菌种在无菌条件下接种于三角瓶内, 放入旋转式摇床, 转速为 150 r min⁻¹, 25℃ 下无光照培养 5 d, 然后在无菌的条件下将其转入 20 个装有 150 ml YMG 培养基的 500 ml 三角瓶中, 得到种子培养液。最后, 在 20 个容量为 5 L 的三角瓶中各装入 YMG 培养基 1 L, 小麦粒 550 g, 灭菌后于每个三角瓶转入 500 ml 种子培养液, 在 25℃ 下无光照静止培养 40 d, 得发酵培养物。

1.5 提取分离

将白地霉菌 SC0581 菌丝体发酵物在室温下用 95% 乙醇浸提 3 次, 每次 48 h, 将提取液减压浓缩, 抽干乙醇后加水(500 ml)使成混悬液, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇分别萃取 3-4 次。乙酸乙酯萃取液减压浓缩得到乙酸乙酯提取部分(14.8 g), 正丁醇萃取液减压浓缩得到正丁醇提取部分(42.7 g)。

正丁醇提取部分经硅胶柱层析(100-200 目), 氯仿-甲醇(99:1-4:1)梯度洗脱, 每份收集 200 ml, 合并 108-110 流份(90 mg), 重结晶得到化合物 1 (20 mg)。

乙酸乙酯提取部分经硅胶柱层析(100-200 目), 氯仿-甲醇(99:1-4:1)梯度洗脱, 经 TLC 薄层层析检测合并相同的流份, 得到 F1-F9 九个组分。其中, F6(1.19 g)析出粉末状固体, 经甲醇冲洗后得到化合物 2(500 mg)。F5(2.24 g)经硅胶柱层析(100-200 目), 氯仿-甲醇(99:1-4:1)梯度洗脱, 每份收集 100 ml, 合并 9-11 流份, 再经过 Sephadex LH-20 柱(用甲醇洗脱)分离, 得到化合物 3(40 mg); 合并 1-8 流份, 再经过 RP-18 柱(用 60% 甲醇洗脱)和硅胶 TLC [氯仿-甲醇(4:1)]制备纯化得到化合物 4(40 mg)。F2 (1.2 g)再经过 RP-18 柱(用 80% 甲醇洗脱)和 Sephadex LH-20 柱(用甲醇洗脱)分离纯化

得到化合物 5(10 mg)。F7 (900 mg)组分上硅胶柱(100-200 目), 氯仿-甲醇(95:5-4:1)梯度洗脱, 每份收集 100 ml, 合并 29-57 流份(470 mg), 上 Sephadex LH-20 柱, 用甲醇洗脱, 每份收集 2 ml, 合并 29-35 流份, 再用硅胶 TLC [氯仿-甲醇(4:1)]制备纯化得化合物 6(30 mg); 合并 17-23 流份, 得化合物 7(10 mg)。

1.6 结构鉴定

亮氨酸(1) 白色粉末, 分子式为 C₆H₁₃NO₂; 正离子 ESIMS *m/z* 263 [2M+H]⁺, 154 [M+Na]⁺, 132 [M+H]⁺, 负离子 ESIMS *m/z* 261 [2M-H]⁻, 130 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 0.79 (3H, d, *J* = 10.8 Hz, H-5), 0.84 (3H, d, *J* = 10.8 Hz, H-6), 0.87 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, H-4), 1.57 (2H, m, H-3), 3.60 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, H-2)。波谱数据与文献[11]报道的亮氨酸(leucine)一致。

尿嘧啶(2) 褐色粉末, 分子式为 C₄H₄N₂O₂; 正离子 ESIMS *m/z* 247 [2M+Na]⁺, 146 [M+Na]⁺, 负离子 ESIMS *m/z* 147 [M+Cl]⁻, 111 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.43 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.37 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-6), 10.79 (1H, s, H-1), 10.99 (1H, s, H-3); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 101.0 (C-5), 142.9 (C-6), 152.3 (C-2), 165.1 (C-4); 波谱数据与文献[12]报道的尿嘧啶(uracil)一致。

胸腺嘧啶(3) 棕色粉末, 分子式为 C₅H₆N₂O₂; 正离子 ESIMS *m/z* 275 [2M+Na]⁺, 149 [M+Na]⁺, 127 [M+H]⁺; 负离子 ESIMS *m/z* 251 [2M-H]⁻, 161 [M+Cl]⁻, 125 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.71 (1H, s, Me-5), 7.23 (1H, s, H-6), 10.57 (1H, s, H-1), 10.99 (1H, s, H-3); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.8 (Me-5), 107.7 (C-5), 137.7 (C-6), 151.5 (C-2), 164.9 (C-4); 波谱数据与文献[13]报道的胸腺嘧啶(thymine)一致。

焦儿茶酸(4) 褐色粉末, 分子式为 C₇H₆O₄; 正离子 ESIMS *m/z* 309 [2M+H]⁺, 177 [M+Na]⁺, 负离子 ESIMS *m/z* 153 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.34 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-5), 6.64 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-4), 7.69 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 113.2 (C-1), 118.6 (C-5), 120.0 (C-4), 120.8

(C-5), 145.9 (C-3), 150.5 (C-2), 172.5 (1-COOH); 波谱数据与文献[14]报道的焦儿茶酸(pyrocatechuic acid)一致。

对羟基苯甲酸(5) 棕黄色油状物, 分子式为 $C_7H_6O_3$; 正离子 ESIMS m/z 331 $[2M + Na]^+$, 178 $[M + Na]^+$; 负离子 ESIMS m/z 275 $[2M - H]^-$, 173 $[M + Cl]^-$, 137 $[M - H]^-$; 1H NMR (400 MHz, $DM-SO-d_6$): δ 6.81 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3 和 H-5), 7.77 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2 和 H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 116.2 (C-3 和 C-5), 122.1 (C-1), 132.9 (C-2 和 C-6), 161.5 (C-4), 170.9 (1-COOH); 波谱数据与文献[15]报道的对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid)一致。

3,5-二羟基苯甲酸(6) 棕色固体, 分子式为 $C_7H_6O_4$; 正离子 ESIMS m/z 331 $[2M + Na]^+$, 178 $[M + Na]^+$, 负离子 ESIMS m/z 307 $[2M - H]^-$, 189 $[M + Cl]^-$, 153 $[M - H]^-$; 1H NMR (400 MHz, $DM-SO-d_6$): δ 6.39 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H-4), 6.78 (2H, s, H-2 和 H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 106.8 (C-4), 107.3 (C-2 和 C-6), 132.5 (C-1), 158.3 (C-3 和 C-5), 167.3 (1-COOH); 波谱数据与文献[16]报道的 3,5-二羟基苯甲酸(3,5-dihydroxybenzoic acid)一致。

7,8-dimethylalloxazine(7) 黄色无定形粉末, 分子式为 $C_{12}H_{10}N_4O_2$, 正离子 ESIMS m/z 485 $[2M + H]^+$, 265 $[M + Na]^+$, 243 $[M + H]^+$, 负离子 ESIMS m/z : 241 $[M - H]^-$; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 1.15 (3H, s, Me-7), 1.22 (3H, s, Me-8), 7.69 (H, s, H-6), 7.89 (H, s, H-9); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 19.6 (7- CH_3), 20.2 (8- CH_3), 125.8 (C-9), 128.7 (C-6), 130.2(C-5a), 138.4(C-7), 138.9(C-9a), 141.6(C-4a), 144.7(C-8), 146.4(C-2), 150.1(C-10a), 160.7(C-4); 光谱数据与文献[17]报道的 7,8-dimethylalloxazine 一致。

2 结果和讨论

应用柱层析法对白地霉 SC0581 菌株的固体发酵物进行分离, 从正丁醇部分提取物中得到化合物 1; 从乙酯部分提取物中分别分离得到化合物 2-7。通过对其波谱数据进行分析并与文献报道对比, 7 个化合物分别鉴定为亮氨酸(leucine, 1)、尿嘧啶(uracil, 2)、胸腺嘧啶(thymine, 3)、焦儿茶酸(pyrocatechuic acid, 4)、4-羟基苯甲酸(*p*-hydroxy-

benzoic acid, 5)、3,5-二羟基苯甲酸(3,5-dihydroxybenzoic acid, 6)、7,8-dimethylalloxazine(7)。这些化合物均是首次从白地霉中得到。据文献报道, 化合物 4 有抗氧化和抗 HIV 活性^[18-19], 化合物 5 有抗菌活性^[20], 化合物 7 为光色素^[21]。

参考文献

- [1] Wei J C(魏景超). Manual for Fungal Identification [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 487-489. (in Chinese)
- [2] Dai F L(戴芳澜). Collections of Chinese Fungi [M]. Beijing: Science Press, 1979: 967. (in Chinese)
- [3] Boutrou R, Guéguen M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology [J]. Inter J Food Microbiol, 2005, 102: 1-20.
- [4] Boutrou R, Kerriou L, Gassi J. Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese [J]. Inter Dairy J, 2006, 16: 775-783.
- [5] Chen B(谌斌), Liu Q Y(刘庆业). Study on production of *Geotrichum candidum* with alcohol wastewater [J]. Biotechnology(生物技术), 2001, 11(5): F003, F002. (in Chinese)
- [6] Qu J R(曲静然), Liu Y(刘玉), Song J M(宋俊梅). Study on production of *Geotrichum candidum* with Tofu wastewater [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2005, 26(3): 99-102. (in Chinese)
- [7] Liu Y(刘玉), Song J M(宋俊梅), Qu J R(曲静然). Applications of Tofu Suanjiang microbe producing high-yield protein in the treatment of wastewater [J]. Guangzhou Food Sci Techn(广州食品工业科技), 2004, 20(2): 14-16. (in Chinese)
- [8] Lu B S(陆步诗), Li X S(李新社). Selection of the microbe species producing single cell protein from Daqu distiller's grains [J]. Liquor-making Sci Techn(酿酒科技), 2006, 7: 25-26. (in Chinese)
- [9] Guo W L(郭维烈). Practical Microbial Technology [M]. Beijing: Scientific and Technical Documents Publishing House, 1991: 88-91. (in Chinese)
- [10] Zhang J Z(张纪中). Microbial Taxonomy [M]. Shanghai: Fudan University Press, 1990: 329-330. (in Chinese)
- [11] Charles J P, Behnke J. Aldrich Library of ^{13}C and 1H FT NMR Spectra [M]. Wisconsin, USA: Aldrich Chemical Company Publications, 1992: 1, 875B.
- [12] Imaizumi M, Kano F, Sakata S. Novel uracil derivatives: newly synthesized centrally acting agents [J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40(7): 1808-1813.
- [13] Tarpley A R, Goldstein J H. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of uracil, thymine, and the 5-halouracils [J]. J Amer Chem Soc, 1971, 93: 3573-3578.
- [14] Sakushima A, Coskun M, Maoka T. Hydroxybenzoic acid from *Boreava orientalis* [J]. Phytochemistry, 1995, 40(1): 257-261.
- [15] Scott K N. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of biologically important aromatic acids. I. Chemical shifts of benzoic acid and derivatives [J]. J Amer Chem Soc, 1972, 94: 8564.
- [16] Charles J P, Behnke J. Aldrich Library of ^{13}C and 1H FT NMR

- Spectra [M]. Wisconsin, USA: Aldrich Chemical Company Publications, 1992;2, 1137C.
- [17] Kwon H C, Kim K R, Zee S D, et al. A new indolinepeptide from *Paecilomyces* sp. J300 [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(6):604-609.
- [18] Hayashi K, Suzuki K, Kawaguchi M, et al. Isolation of an antioxidant from *Penicillium roquefortii* IFO 5956 [J]. Biosci Biotechn Biochem, 1995, 59(2):319-320.
- [19] Rashid M A, Gustafson K R, Cardellina J H, et al. A benzoic acid glycoside from *Geniostoma antherotrichum* [J]. Phytochemistry, 1996, 41(4):1205-1207.
- [20] Zhao X R(赵希荣), Xia W S(夏文水). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of para-hydroxybenzoate chitosan ester [J]. Food Sci(食品科学), 2005, 26(9):192-195. (in Chinese)
- [21] Yang L H(杨立宏), Jin X Q(金向群), Zhang W(张薇). Studies on the chemical constituents from the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2000, 17(4):292-295. (in Chinese)