

绿僵菌 SC0924 酚酸类代谢产物及其抗荔枝霜疫霉活性

徐良雄^{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:从绿僵菌 SC0924 固体发酵物中分离得到 8 个酚酸类化合物,通过波谱分析,分别鉴定为香草酸(1)、丁香酸(2)、邻氨基苯甲酸(3)、苯乙酸(4)、阿魏酸(5)、二氢阿魏酸(6)、2-羟基-3-苯丙酸(7)和 2-羟基-3-对羟基苯丙酸丁酯(8)。以滤纸片琼脂扩散法对以上化合物进行抗荔枝霜疫霉活性试验,结果表明除化合物 2 和 6 外,其余化合物均有抑菌活性。

关键词: 绿僵菌; 酚酸; 荔枝霜疫霉; 抗真菌活性

中图分类号: Q946.819

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)02-0140-04

Phenolic Acids from *Metarhizium* sp. SC0924 and Their Antifungal Activities against *Peronophythora litchii*

XU Liang-xiong^{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: Eight phenolic acids were isolated from the solid cultures of *Metarhizium* sp. SC0924. They were identified as vanillic acid (1), syringic acid (2), anthranilic acid (3), phenylacetic acid (4), ferulic acid (5), dihydroferulic acid (6), 3-phenyllactic acid (7) and latifolicin A (8). All compounds except 2 and 6 exhibited antifungal activities against *Peronophythora litchii* by the agar diffusion method using paper disks.

Key words: *Metarhizium*; Phenolic acids; *Peronophythora litchii*; Antifungal activity

荔枝霜疫霉(*Peronophythora litchii* Chen ex Ko et al.)是荔枝霜疫霉病(又称霜霉病)的主要病原菌,此病主要危害接近成熟荔枝果实,亦可危害青果、果柄、结果的小枝,是广西、广东、福建等省区荔枝的主要病害之一。传统的化学合成药剂容易使病原菌产生抗药性,长期使用造成药效减弱,且在环境中不易分解,残留药剂会流失到周围环境中去,对农林业生态系统及人类健康造成危害。而天然产物对防治对象有高度选择性,对人、畜和有益生物相对安全,环境污染较小,是近年植物病害防治研究的重点之一。

为了得到有较强抗荔枝霜疫霉活性的天然产

物,我们对鼎湖山自然保护区菌种库中菌种的代谢物进行了抗荔枝霜疫霉活性筛选,得到几株具有较强活性的菌株,其中 SC0924 菌株固体发酵物的抗荔枝霜疫霉活性较强,故对其代谢成分进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种鉴定和发酵

菌种 SC0924 来自鼎湖山自然保护区菌种库,由中国科学院广州微生物研究所鉴定为绿僵菌属 *Metarhizium* sp., 是子囊菌丛赤壳科种类 *Anamorphic* Nectriaceae 的无性型。

菌种经马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基活化后,转入酵母麦芽汁葡萄糖(YMG)液体培养基中,150 r min⁻¹,25℃黑暗条件下摇床培养4 d,制备好的种子液转入装有经 YMG 液体培养基浸泡的小麦培养基中,25℃黑暗条件下静置培养12 d。其中 PDA 培养基为:马铃薯汁 1 000 ml (200 g 马铃薯煮沸 20 min 后过滤的滤液),葡萄糖 20 g,琼脂 20 g; YMG 液体培养基为:葡萄糖 4 g,麦芽提取物 10 g,酵母提取物 4 g,蒸馏水 1 000 ml,pH 5.5±0.2。

1.2 仪器

核磁共振谱用 Bruker DRX-400 核磁共振仪,以四甲基硅烷(TMS)为内标测定。电喷雾质谱(ESIMS)用 MDS SCIEX API 2000 LC/MS/MS 仪,以甲醇为溶剂,直接进样测定。紫外光谱用 Perkin Elmer Lambda 25 紫外分光光度计测定,甲醇为溶剂。

1.3 提取和分离

发酵物以 95% 乙醇提取 3 次,合并浓缩后依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇分部萃取,分别浓缩得到各部分提取物,对活性跟踪结果显示具有抗荔枝霜疫霉活性的氯仿、乙酸乙酯和正丁醇部分进行分离。氯仿部分提取物(19.2 g)经硅胶柱层析,氯仿:甲醇(98:2-90:10)梯度洗脱,流份 17~19 经硅胶柱层析,石油醚:丙酮(85:15)洗脱,得到化合物 **7** (6 mg);乙酸乙酯部分提取物(39.3 g)经硅胶柱层析,氯仿:甲醇(98:2-90:10)洗脱,流份 12~21 经硅胶柱层析,石油醚:丙酮(90:10-60:40)梯度洗脱,流份 9~12、15~29、36~40、41~46 和 47~54 再经葡聚糖凝胶 Sephadex-LH20 柱层析,甲醇洗脱,分别纯化得到化合物 **4** (66 mg)、**3** (15 mg)、**1** (20 mg)、**6** (12.5 mg)、**5** (5 mg) 和 **2** (18 mg);正丁醇部分(69.4 g)经硅胶柱层析,氯仿:甲醇(95:5)洗脱,流份 5~6 经硅胶柱层析,石油醚:丙酮(85:15)洗脱,流份 6~10 再经葡聚糖凝胶 Sephadex-LH20 柱层析,纯化得到化合物 **8** (10 mg)。

1.4 结构鉴定

化合物 1 黄色针晶(MeOH),分子式为 C₈H₈O₄,UV(MeOH) λ_{max} nm (log ε):208 (4.17),255 (3.35),286 (2.96);正离子 ESIMS *m/z*:169 [M+H]⁺,337 [2M+H]⁺,359 [2M+Na]⁺。¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆): δ 7.58 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.3 Hz, H-6),7.55 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-2),6.90 (1H, d,

J = 8.3 Hz, H-5),3.89 (3H, s, 3-OCH₃)。¹H NMR 谱显示化合物有 1 个 1,3,4 位三取代的苯环和 1 个甲氧基,结合 ESIMS,推断此化合物为简单的酚类化合物,分子式为 C₈H₈O₄,对照文献[1]数据,确定该化合物为香草酸(vanillic acid)。

化合物 2 黄色粉末,分子式为 C₉H₁₀O₅,UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε):208 (4.26),262 (3.27),268 (3.24);正离子 ESIMS *m/z*:199 [M+H]⁺,221 [M+Na]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.37 (2H, s, H-2 和 H-6),3.94 (6H, s, 3-OCH₃ 和 5-OCH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.0 (C-7),146.7 (C-3 和 C-5),140.0 (C-4),120.1 (C-1),107.2 (C-2 和 C-6)。¹H NMR 谱显示化合物 **2** 有 1 个完全对称的四取代苯环和 2 个化学等价的甲氧基,再结合 ESIMS,推断其分子式为 C₉H₁₀O₅,对照文献[2]数据,确定该化合物为丁香酸(syringic acid)。

化合物 3 黄色粉末,分子式为 C₇H₇NO₂,UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε):208 (4.13),248 (3.13),268 (2.89);正离子 ESIMS *m/z*:138 [M+H]⁺,160 [M+Na]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.82 (1H, dd, *J* = 1.4, 8.0 Hz, H-6),7.23 (1H, m, H-4),6.78 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3),6.55 (1H, m, H-5)。¹H NMR 谱显示化合物 **3** 可能有 1 个邻位二取代的苯环,且 ESIMS 显示其分子量为 137,说明含有奇数氮原子,推断其分子式为 C₇H₇NO₂,对照文献[3]数据,确定该化合物为邻氨基苯甲酸(anthranilic acid)。

化合物 4 无色片状固体,分子式为 C₈H₈O₂,UV(MeOH) λ_{max} nm (log ε):208 (4.10),262 (2.73),268 (2.67);负离子 ESIMS *m/z*:135 [M-H]⁻,271 [2M-H]⁻。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.25~7.35 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5 和 H-6),3.64 (2H, s, H-7)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.5 (C-8),133.2 (C-1),129.3 (C-2 和 C-6),128.6 (C-3 和 C-5),127.3 (C-4),41.0(C-7)。¹H NMR 谱显示化合物 **4** 可能有 1 个单取代苯环和一个亚甲基,结合 ESIMS,推断其分子式为 C₈H₈O₂,对照文献[4]数据,确定该化合物为苯乙酸(phenylacetic acid)。

化合物 5 浅黄色粉末,分子式为 C₁₀H₁₀O₄,UV(MeOH) λ_{max} nm (log ε):2.15 (4.68),262 (3.82),268 (3.80);正离子 ESIMS *m/z*:195 [M+H]⁺,217 [M+Na]⁺。¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆): δ 7.58 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-7),7.33 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2),7.13 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.3 Hz, H-6),6.86 (1H, d,

$J = 8.1$ Hz, H-5), 6.37 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8)。¹H NMR谱显示化合物 **5** 可能有 1 个 1、3、4 位三取代的苯环, 1 个反式双键和 1 个甲氧基, 再结合 ESIMS, 推断其分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$, 对照文献[5]数据, 确定该化合物为阿魏酸(ferulic acid)。

化合物 6 浅黄色粉末, 分子式为 $C_{10}H_{12}O_4$, UV(MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 211 (3.92), 261 (2.86), 268 (2.82); 正离子 ESIMS m/z : 197 [M + H]⁺, 219 [M + Na]⁺。¹H NMR (400 MHz, Acetone- d_6): δ 6.86 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-5), 6.72 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3), 6.67 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, H-2), 2.81 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-7), 2.56 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-8)。¹H NMR 谱显示化合物 **6** 有 1 个 1、3、4 位三取代的苯环, 1 个甲氧基和另外 4 个质子信号(δ 2.81 ~ 2.56), 与化合物 **5** 比较少了 2 个双键上质子信号, 而多了两个亚甲基信号, 结合 ESIMS, 推断此化合物的分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$, 说明化合物 **6** 可能是二氢阿魏酸, 对照文献[6]数据, 确定该化合物为二氢阿魏酸(dihydroferulic acid)。

化合物 7 无色针晶 (MeOH), 分子式为 $C_9H_{10}O_3$, UV(MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 210 (4.17), 262 (3.14), 268 (3.10); 负离子 ESIMS m/z : 165 [M - H]⁻, 201 [M + Cl]⁻。¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.22 ~ 7.33 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5 和 H-6), 4.49 (1H, dd, $J = 4.4, 7.2$ Hz, H-8), 3.18 (1H, dd, $J = 4.4, 14.0$ Hz, H-7a), 2.97 (1H, dd, $J = 7.2, 14.0$ Hz, H-7b)。¹H NMR 谱显示化合物 **7** 有 1 个单取代苯环和另外 3 个质子信号, 从后 3 个质子的化学位移值和耦合常数来看应该是一个相互连接的亚甲基和次甲基上的质子信号, 且次甲基可能与氧相连, 结合 ESIMS, 推断此化合物的分子式为 $C_9H_{10}O_3$, 对照文献[7]数据, 确定该化合物为 2-羟基-3-苯丙酸(3-phenyllactic acid)。

化合物 8 黄色固体, 分子式为 $C_{13}H_{18}O_4$, UV(MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 212 (4.47), 262 (3.43), 269 (3.45); 正离子 ESIMS m/z : 239 [M + H]⁺, 261 [M + Na]⁺, 277 [M + K]⁺, 499 [2M + Na]⁺。¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.04 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2 和 H-6), 6.71 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3 和 H-5), 4.38 (1H, dd, $J = 4.5, 6.5$ Hz, H-8), 4.13 (2H, m, H-1'), 3.03 (1H, dd, $J = 4.5, 14.1$ Hz, H-7a), 2.87 (1H, dd, $J = 6.6, 14.1$ Hz, H-7a), 1.61 (2H, m, H-2'), 1.35 (2H, m, H-3'), 0.92 (3H, t, $J = 7.4, H-4'$)。¹³C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 174.4 (C-9), 154.7 (C-4), 130.6 (C-2 和

C-6), 128.1 (C-1), 115.3 (C-3 和 C-5), 71.4 (C-8), 65.6 (C-1'), 39.6 (C-7), 30.5 (C-2'), 19.0 (C-3'), 13.6 (C-4')。¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱显示化合物 **8** 含有 1 个对位取代的苯环, 1 个连氧丁基和类似化合物 **7** 的“-OCH-CH₂-”结构片断, 因此推断化合物 **8** 可能是对位取代的 2-羟基-3-苯丙酸丁酯衍生物。对照文献[8]数据, 确定该化合物为 2-羟基-3-对羟基苯丙酸丁酯(latifolicinin A)。

1.5 抗荔枝霜疫霉活性的测定

用滤纸片琼脂扩散法进行, 具体方法如文献[9]所述。活性测定结果表明, 除了化合物 **2** 和 **6** 之外的其余 6 个化合物均有不同强度的抑菌活性, 每滤纸片含 600 μ g 样品时抑菌圈宽度分别为 2 mm (**1**)、2.5 mm (**3**)、2.5 mm (**4**)、1 mm (**5**)、2 mm (**7**) 和 4.5 mm (**8**)。

2 结果和讨论

本研究从活性菌株绿僵菌 SC0924 菌株的固体发酵物中通过活性跟踪的方法共分离和鉴定了 8 个酚酸类化合物: 香草酸(**1**)、丁香酸(**2**)、邻氨基苯甲酸(**3**)、苯乙酸(**4**)、阿魏酸(**5**)、二氢阿魏酸(**6**)、2-羟基-3-苯丙酸(**7**) 和 2-羟基-3-对羟基苯丙酸丁酯(**8**)。其中化合物 **1** ~ **3** 为苯甲酸衍生物, **4** 为苯乙酸, **5** ~ **8** 则是苯丙酸衍生物。

用滤纸片琼脂扩散法对上述化合物进行抗荔枝霜疫霉活性试验, 结果显示化合物 **1, 3, 4, 5, 7, 8** 具有一定活性。这些化合物结构简单, 大多是已工业化生产的药物中间体或食品添加剂, 而其抗荔枝霜疫霉活性属首次发现。这一发现使其在荔枝等水果保鲜应用上有进一步研究价值。

参考文献

- [1] Yuan Y G(苑艳光), Wang L Q(王录全), Wu L J(吴立军), et al. Studies on the chemical constituents of the stems of *Acanthopanax senticosus* Harms [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2002, 19(5): 325-327.(in Chinese)
- [2] Zhang X(张雪), Gao H(高昊), Wang N L(王乃利), et al. Phenolic components from *Endrobium nobile* [J]. Chin Trad Herb Drugs(中草药), 2006, 37(5): 652-655.(in Chinese)
- [3] Charles J P, Behnke J. Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra [M]. Wesconsin, USA: Barre. Aldrich Chemical Company Publications, 1992: 2, 1066B.
- [4] Zhou S M(周淑梅), Ma W J(马伟杰), Xiao D J(肖定军), et al. Studies on chemical constituents of the marine sponge *Topsentia* sp. from the South China Sea [J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物),

- 2004, 23(5): 18-20.(in Chinese)
- [5] Yi J H(易进海), Chen Y(陈燕), Li B G(李伯刚), et al. Studies on the chemical constituents of the tubers of *Curcuma longa* [J]. Nat Prod Res Devel(天然产物研究与开发), 2003, 15(2): 98-100.(in Chinese)
- [6] Sun B H(孙博航), Yashikawa, Chen Y J(陈英杰), et al. Chemical constituents of *Stellaria dichatoma* L. var. *ianceolata* Bge [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2006, 23(2): 84-87.(in Chinese)
- [7] Wu T S, Hsu M Y, Kuo P C, et al. Constituents of leaves of *Phellodendron amuranse* var. *wilsonii* and their bioactivity [J]. J Nat Prod, 2003, 66(9): 1207-1211.
- [8] Siddiqui B S, Perwaiz S, Begum S. Studies on the chemical constituents of the fruits of *Cordia latifolia* [J]. Nat Prod Res, 2006, 20(2): 131-137.
- [9] Ma W, Huang Y, Lin L, et al. Two new biologically active illudane sesquiterpenes from the mycelial cultures of *Patmeolus retirugis* [J]. J Antibiot, 2004, 57(11): 721-725.