

枝顶孢属真菌的抑菌活性及其代谢产物研究

姚磊^{1,2}, 徐良雄¹, 薛璟花¹, 魏孝义¹, 吴萍^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:用组织分离法从采集于广东鼎湖山的腐殖质中分离得到一株枝顶孢属真菌(*Acremonium* sp. SC0105), 其固体发酵物的乙醇提取物对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)有较强的抑制作用。经多种柱层析, 从固体发酵物中分离得到 5 个化合物。通过光谱分析, 分别鉴定为姜糖脂 B (1)、姜糖脂 C (2)、D-甘露醇(3)、酒渣碱(4)、枝顶孢素 F(5)。其中酒渣碱是首次从枝顶孢属真菌中分离得到。

关键词:枝顶孢属; 抑菌; 姜糖脂; 酒渣碱; 枝顶孢素 F

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.02.014

Antibacterial Activity and Metabolites of an *Acremonium* Fungus

YAO Lei^{1,2}, XU Liang-xiong¹, XUE Jing-hua¹, WEI Xiao-yi¹, WU Ping^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A fungal strain of *Acremonium* sp. SC0105 was obtained from tissue culture of humus collected at Dinghushan, Guangdong Province, China. The EtOH extract of this fungal strain showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. From the solid cultures of this fungus, five compounds were isolated by repeated column chromatography. On the basis of their spectral data, they were identified as gingerglycolipid B (1), gingerglycolipid C (2), D-Mannitol (3), flazine (4), and acremine F (5). Among them, flazine (4) was isolated from fungus of *Acremonium* genus for the first time.

Key words: *Acremonium* sp.; Antibacterium; Gingerglycolipid; Flazine; Acremine F

枝顶孢属真菌(*Acremonium* sp.)为一种常见真菌,分布广泛,约有 130 余种,主要为腐生、植物寄生和自生。系统发育学的研究表明,枝顶孢属的来源至少与 3 种子囊菌类真菌相关:肉座菌科、麦角菌科和毛壳菌科^[1]。其次生代谢产物有酚类^[2]、萜类^[3]、环肽^[4]、萜醌类^[5]等,且具有良好的生物活性,如二羟基细格菌素对哺乳动物 DNA 聚合酶 α 具有抑制作用^[6],倍半萜类化合物有抗炎作用,杂萜醌化合物具有抑菌作用,酚苷类化合物具有抗疟作用^[7], γ -内酯 δ -内酰胺环的化合物具有细胞毒性^[8],高度甲基化的八肽链具有细胞毒性和抗菌作用^[9],以及枝顶孢素对葡萄霜霉的孢子萌发具有抑制作用^[10-11]。

我们在对鼎湖山自然保护区真菌的抗菌活性筛选中,获得一株枝顶孢属真菌菌株(*Acremonium* sp. SC0105),其固体发酵产物对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)具有较强的抑制作用。为了寻找枝顶孢属真菌的抑菌活性成分,对该菌株的次生代谢产物进行了活性跟踪分析研究。本文报道其抑菌活性成分的分离、结构鉴定和生物活性测定,为枝顶孢属真菌的开发利用提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 菌株

枝顶孢属真菌(*Acremonium* sp. SC0105)菌株于

收稿日期: 2011-04-27 接受日期: 2011-07-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(20672114)资助

作者简介: 姚磊,男,硕士生。研究方向为天然产物化学。E-mail: yao.lei727@gmail.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wuping@scib.ac.cn

2001年10月从采自广东省肇庆市鼎湖山国家自然保护区飞瀑潭的土壤腐殖质样品中(DH011)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。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538 购自广东省微生物所。

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)。

1.3 仪器

HPLC采用日本岛津公司LC-64D型液相色谱仪和RID-10A示差折光监测器、日本YMC公司YMC-Pack ODS-A色谱柱(粒径5 μm,孔径12 nm,250 mm×20 mm);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,以四甲基硅烷为内标测定。

1.4 菌种的活化

用接种针挑取一环原保存菌种,接种到新配制的灭菌的PDA平面培养基上,在28℃下无光照培养12 d,使菌种活化。

1.5 最佳发酵时间的选择

在2个容量为150 mL的三角瓶中分别加入YMG培养基30 mL,从活化的PDA培养基上挑取6个菌块在无菌条件下接种于三角瓶内,放入旋转式摇床,转速为105 r min⁻¹,在25℃下无光照培养2 d,得到种子液。在10个容量为100 mL的三角瓶中分别加入25 g小麦和30 mL YMG培养基,灭菌后每瓶中加入2 mL种子液。从发酵第6天开始用乙醇对菌丝体进行超声提取,每瓶提取3次,每次30 min。

用滤纸片琼脂扩散法对菌株固体发酵物的乙醇提取物进行抑菌活性测试,在每张滤纸片上加入样品1 mg,阳性对照为头孢拉定20 μg。28℃恒温倒置培养48 h,观察是否有清晰透明的抑菌圈出现,并测量抑菌圈的直径大小。

1.6 发酵培养

在2个容量为500 mL的三角瓶内分别加入YMG培养基150 mL,从活化的PDA培养基上挑取

6个菌块在无菌条件下接种于三角瓶内,放入旋转式摇床,转速为105 r min⁻¹,在25℃下无光照培养2 d。然后在无菌条件下将其转入20个装有150 mL YMG培养基的三角瓶及10个装有60 mL YMG培养基的容量为300 mL三角瓶中,得到种子培养液。最后,在10个容量为1 L的三角瓶中各装入YMG培养基450 mL和小麦粒300 g,灭菌后于每个三角瓶转入60 mL种子培养液;在10个容量为2 L的发酵盒内装入YMG培养基750 mL和小麦粒500 g,灭菌后往每个发酵盒转入100 mL种子培养液;在100个容量为500 mL的组培瓶中装入YMG培养基150 mL和小麦粒125 g,灭菌后往每个发酵盒转入15 mL种子培养液。在28℃无光照静止培养16 d,得到菌丝体发酵培养物。

1.7 发酵物的提取、萃取及抑菌活性测试

将菌丝体发酵物在室温下用96%乙醇浸提3次,时间分别为24 h、48 h、48 h,将提取液减压浓缩得粗提物1817 g,依次用石油醚萃取3次,氯仿萃取11次,乙酸乙酯萃取4次,正丁醇萃取10次。减压浓缩后得到石油醚部分23.3 g、氯仿部分164 g、乙酸乙酯部分8.9 g、正丁醇部分171 g。对粗提物和各萃取部位分别进行抑菌活性测试,结果见图1。结果表明氯仿部分和正丁醇部分的抑菌活性较显著(抑菌直径大于20 mm)。

1.8 分离及纯化

氯仿部分经硅胶(100~200目,青岛海洋化工厂产品)柱层析,以氯仿-甲醇(100:0~70:30)梯度洗脱,每份收集1000 mL,经TLC(薄层层析)检查后合并为C1~C14共14个组分。C11(4.16 g)经反相硅胶ODS(粒径75 μm,日本野村化学株式会社产品)柱层析,用甲醇-水(20:80~80:20)梯度洗脱,每份收集200 mL,经TLC检查后合并为C11-a~C11-g共7个组分;C11-e以82%甲醇-水为流动相进行HPLC制备,得到化合物1(63 mg);C11-f以85%甲醇-水为流动相进行HPLC制备,得到C11-f-1~C11-f-3共3个组分,C11-f-3经Sephadex LH-20(瑞典Amersham Biosciences产品)柱层析,以甲醇洗脱得到化合物2(2 mg)。

正丁醇部分析出结晶,得到化合物3(20 mg)。母液经大孔吸附树脂HP-20(日本三菱化学株式会社产品)柱层析,以乙醇-水(0:100~96:4)梯度洗脱,得到B00、B20、B40、B60、B80、B96共6个组分。

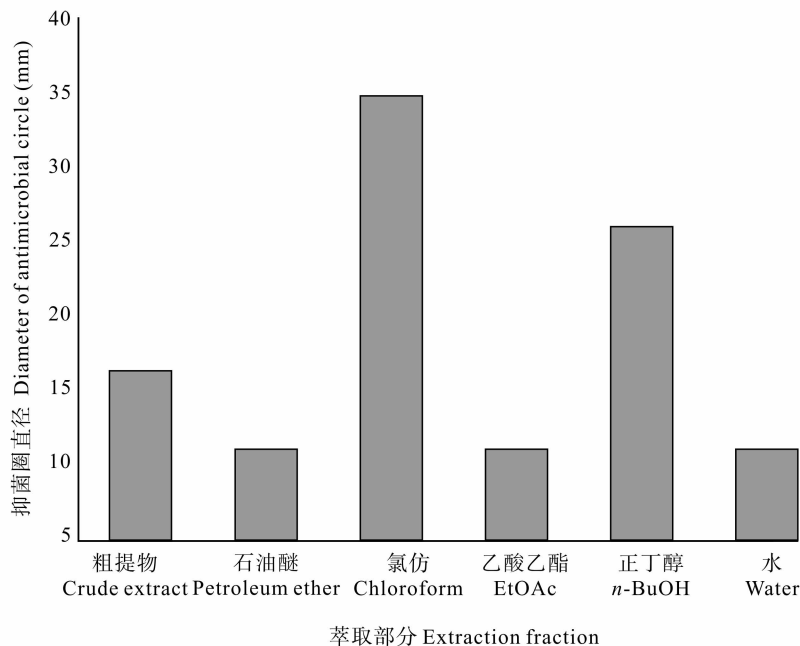


图 1 粗提物及其萃取部分的抑菌活性
Fig. 1 Antibacterial activities of crude extract and its fractions

组分 B60 经硅胶柱层析,以氯仿-甲醇(98 : 2 ~ 70 : 30)梯度洗脱,得到 B60-1 ~ B60-10 共 10 个组分,其中 B60-5 组分析出沉淀,得到化合物 **4** (10 mg); B60-2 经 ODS 柱层析,甲醇-水(40 : 60 ~ 100 : 0)梯度洗脱,每份收集 30 mL,经 TLC 检查后合并为 B60-2-1 ~ B60-2-6 共 6 个组分。B60-2-1 经 Sephadex LH-20 柱层析,甲醇洗脱物以 20% 甲醇-水为流动相进行 HPLC 制备,收集保留时间为 90 min 的流份,再经 TLC 制备(氯仿-甲醇-水 = 15 : 3 : 1),得到化合物 **5** (18 mg)。

1.9 结构鉴定

姜糖脂 B (1) 白色粉末; 分子式为 $C_{33}H_{58}O_{14}$, $[\alpha]_D^{25} + 61.0^\circ (c\ 0.6\ MeOH)$; 正离子 ESIMS m/z 701 $[M + Na]^+$, 717 $[M + K]^+$, 1379 $[2M + Na]^+$, 负离子 ESIMS m/z 677 $[M - H]^-$, 713 $[M + Cl]^-$, 1355 $[2M - H]^-$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 0.86 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H_3 -18), 1.26 ~ 1.31 (14H, m, H_2 -4, 5, 6, 7, 15, 16, 17), 1.49 (2H, m, H_2 -3), 2.01 (4H, m, H_2 -8, 14), 2.30 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H_2 -2), 2.75 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H_2 -11), 4.39 (2H, d, $J = 4.4$ Hz, H -3'), 4.52 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H -1''), 5.32 (4H, m, H -9, 10, 12, 13); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 13.9 (C-18), 22.0 (C-17), 24.4 (C-3), 25.2 (C-11), 28.5 (C-8, C-14), 26.6 ~ 30.9 (C-4 ~ C-

7, C-15, C-16), 33.4 (C-2), 60.6 (C-6'''), 65.5 (C-3'), 66.5 (C-6''), 67.4 (C-2'), 68.1 (C-4''), 68.4 (C-2'''), 68.9 (C-4'''), 69.6 (C-3'''), 70.4 (C-1'), 70.5 (C-5'''), 71.2 (C-2'), 72.9 (C-5''), 73.1 (C-3''), 99.5 (C-1'''), 104.0 (C-1''), 127.8 (C-12, C-13), 129.7 (C-9, C-10), 172.9 (C-1)。以上数据与文献[12]报道一致,确定为姜糖脂 B。

姜糖脂 C (2) 白色粉末; 分子式为 $C_{33}H_{60}O_{14}$, $[\alpha]_D^{25} + 25.5^\circ (c\ 0.2\ MeOH)$; 正离子 ESIMS m/z 703 $[M + Na]^+$, 负离子 ESIMS m/z : 679 $[M - H]^-$, 715 $[M + Cl]^-$; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.91 (3H, t, $J = 8$ Hz, H_3 -18), 1.30 ~ 1.63 (22H, m, H_2 -3 ~ H_2 -17), 2.07 (4H, m, H -8, 11), 2.37 (2H, t, $J = 7$ Hz, H_2 -2), 4.16 (2H, m, $J = 5$ Hz, H_2 -3'), 4.25 (1H, d, $J = 7$ Hz, H -1''), 5.35 (2H, ddd, $J = 5, 11, 16$ Hz, H -9, 10); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 14.4 (C-18), 23.7 (C-17), 28.1 (C-8, C-14), 30.2 ~ 33.0 (C-4 ~ C-7, C-15, C-16), 34.9 (C-2), 62.7 (C-6'''), 67.8 (C-6''), 69.7 (C-2'), 70.1 (C-4''), 70.2 (C-2'''), 71.1 (C-4'''), 71.5 (C-3'''), 72.1 (C-1'), 72.5 (C-5'''), 72.6 (C-2''), 74.6 (C-5''), 74.7 (C-3''), 101.3 (C-1'''), 106.1 (C-1''), 131.6 (C-10), 131.7 (C-9), 176.2 (C-1)。以上数据与文献[12]报道一致,确定为姜糖脂 C。

D-甘露醇 (3) 白色结晶; 分子式为 $C_6H_{14}O_6$, $[\alpha]_D^{25} -2.0^\circ (c\ 3.0\ H_2O)$; 正离子 ESIMS $m/z\ 205\ [M + Na]^+$, $221\ [M + K]^+$, $387\ [2M + Na]^+$; $^1H\ NMR\ (400\ MHz,\ Pyridine-d_5)$: $\delta\ 4.36\ (1H,\ dd,\ J = 11\ Hz,\ 6.4\ Hz,\ H-1), 4.56\ (1H,\ dd,\ J = 10.8\ Hz,\ 4.4\ Hz,\ H-1),$

$4.73\ (1H,\ m,\ H-2), 4.86\ (1H,\ d,\ J = 7.6\ Hz,\ H-3); ^{13}C\ NMR\ (100\ MHz,\ Pyridine-d_5)$: $\delta\ 65.6\ (C-1), 72.2\ (C-2), 73.4\ (C-3)$ 。以上数据与商业标准品的波谱数据对比, 确定为 D-甘露醇。

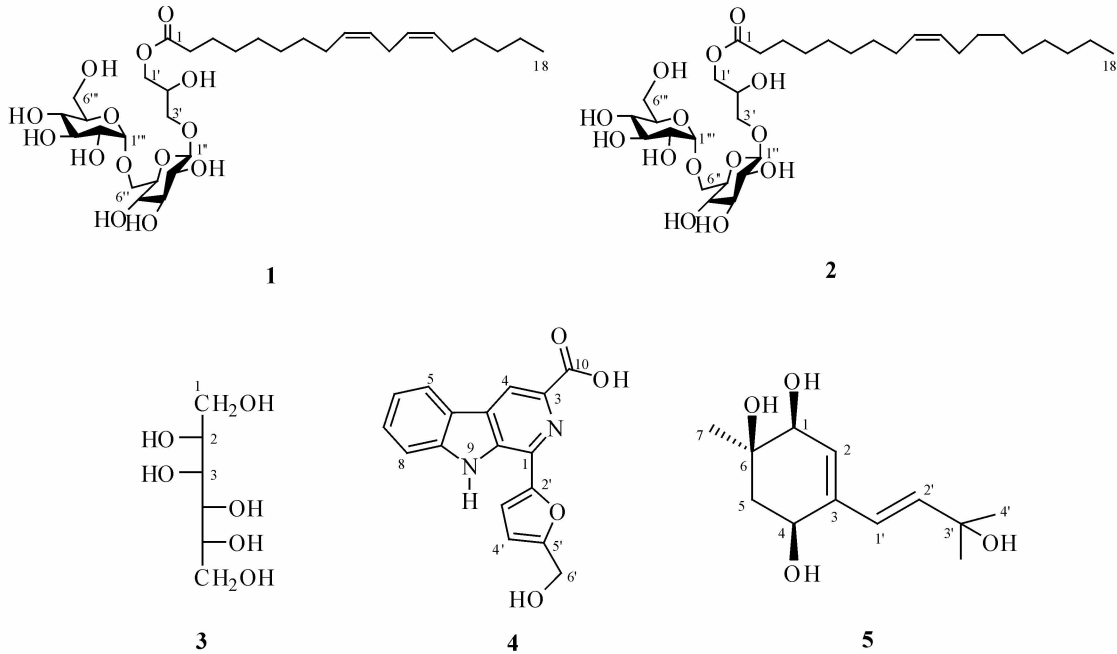


图 2 化合物 1~5 的结构
Fig. 2 Structures of compounds 1-5

酒渣碱 (4) 淡绿色粉末; 分子式为 $C_{17}H_{12}O_4N_2$; 正离子 ESIMS $m/z\ 308.9\ [M + H]^+$, 负离子 ESIMS $m/z\ 307.4\ [M - H]^-$, $343.2\ [M + Cl]^-$, $615.7\ [2M - H]^-$; $^1H\ NMR\ (400\ MHz,\ DMSO-d_6)$: $\delta\ 4.67\ (2H,\ H_2-6'), 6.62\ (1H,\ H-4'), 7.34\ (1H,\ H-6), 7.41\ (1H,\ H-3'), 7.64\ (1H,\ H-7), 7.80\ (1H,\ H-8), 8.41\ (1H,\ H-5), 8.83\ (1H,\ H-4), 11.59\ (1H,\ H-9); ^{13}C\ NMR\ (100\ MHz,\ DMSO-d_6)$: $\delta\ 56.0\ (C-6'), 109.3\ (C-4'), 111.1\ (C-3'), 112.8\ (C-8), 115.8\ (C-4), 120.6\ (C-6), 121.0\ (C-5a), 122.1\ (C-5), 128.9\ (C-7), 129.9\ (C-4a), 131.9\ (C-1), 132.5\ (C-9a), 137.1\ (C-3), 141.4\ (C-8a), 151.3\ (C-2'), 157.3\ (C-5'), 166.5\ (C-10)$ 。以上数据与文献[13]报道一致, 确定为酒渣碱。

枝顶孢素 F (5) 白色粉末; 分子式为 $C_{12}H_{20}O_4$, $[\alpha]_D^{25} + 23.8^\circ (c\ 0.2\ MeOH)$; 正离子 ESIMS $m/z\ 250.8\ [M + Na]^+$, $478.9\ [2M + Na]^+$; 负离子 ESIMS $m/z\ 263.4\ [M + Cl]^-$; $^1H\ NMR\ (400\ MHz,\ CD_3OD)$: $\delta\ 1.24\ (3H,\ s,\ H_3-7), 1.30\ (3H,\ s,\ H_3-4'),$

$1.83\ (1H,\ dd,\ J = 14.4\ Hz,\ 4.4\ Hz,\ H-5a), 2.06\ (1H,\ dd,\ J = 14.4\ Hz,\ 4.4\ Hz,\ H-5b), 3.41\ (2H,\ d,\ J = 5.2\ Hz,\ H_2-5'), 3.94\ (1H,\ d,\ J = 2.4\ Hz,\ H-1), 4.34\ (1H,\ t,\ J = 3.6\ Hz,\ H-4), 5.61\ (1H,\ d,\ J = 2.8\ Hz,\ H-2), 6.05\ (1H,\ d,\ J = 16.0\ Hz,\ H-2'), 6.16\ (1H,\ d,\ J = 16.0\ Hz,\ H-1'); ^{13}C\ NMR\ (100\ MHz,\ CD_3OD)$: $\delta\ 26.5\ (C-7), 29.9\ (C-4'a), 30.0\ (C-4'b), 42.0\ (C-5), 65.4\ (C-4), 71.4\ (C-3'), 72.0\ (C-6), 73.7\ (C-1), 127.1\ (C-2), 130.9\ (C-1'), 139.2\ (C-2'), 139.2\ (C-3)$ 。以上数据与文献[10]报道一致, 确定为枝顶孢素 F。

2 结果和讨论

利用琼脂平板扩散法测定了枝顶孢属真菌 SC0105 固体发酵不同天数的发酵物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性, 结果表明发酵 16 d 的活性最强。应用不同极性溶剂对菌株发酵物的乙醇提取物进行萃取, 结果氯仿部分和正丁醇部分具有较好的抑菌活性。应用柱层析从氯仿部分分离得到化合物 1 和 2; 从正丁醇部分分离得到化合物 3~5。通过波

谱数据分析并与文献对比,5 个化合物分别鉴定为姜糖脂 B (gingerglycolipid B, **1**)、姜糖脂 C (gingerglycolipid C, **2**)、D-甘露醇(D-Mannitol, **3**)、酒渣碱(flazine, **4**)、枝顶孢素 F(acremine F, **5**)。其中酒渣碱(flazine, **4**)是首次从枝顶孢属真菌中分离得到。据报道,酒渣碱(flazine, **4**)具有作为癌症预防药物的潜质^[13],并在抗 HIV^[14] 及抗菌^[15] 方面也具有潜在活性。另据报道枝顶孢素 F(acremine F, **5**)能抑制葡萄霜霉孢子的萌发^[10]。我们对所获得的 5 个化合物进行了初步抗菌活性分析,结果表明它们的活性不显著,该真菌潜在具体的抗真菌活性成分尚需进一步发掘研究。

参考文献

- [1] Wang Y Z(王有智), Guo F(郭芳), Zhou Y G(周宇光). Survey of *Acremonium* species from China with three new records [J]. *Mycosystema*(菌物学报), 2002, 21(2): 192–195.(in Chinese)
- [2] Izumikawa M, Khan S T, Komaki H, et al. JBIR-37 and -38, novel glycosyl benzenediols, isolated from the sponge-derived fungus, *Acremonium* sp. SpF080624G1f01 [J]. *Biosci Biotechn Biochem*, 2009, 73(9): 2138–2140.
- [3] Zhang P, Bao B Q, Dang H T, et al. Anti-inflammatory sesquiterpenoids from a sponge-derived fungus *Acremonium* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(2): 270–275.
- [4] Liermann J C, Thines E, Anke H, et al. Anthranicine, an unusual cyclic hexapeptide from *Acremonium* sp. A29-2004 [J]. *Z Naturforsch*, 2009, 64(6): 727–730.
- [5] Isaka M, Palasarn S, Auncharoen P, et al. Acromoxanthones A and B, novel antibiotic polyketides from the fungus *Acremonium* sp. BCC 31806 [J]. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50(3): 284–287.
- [6] Kuriyama I, Fukudome K, Kamisuki S, et al. The specific inhibitory effect of demethoxydehydroaltenusin, a derivative of dehydroaltenusin, on mammalian DNA polymerase [J]. *Inter J Mol Med*, 2008, 22(6): 793–799.
- [7] Bunyapaiboonsri T, Yoiprommarat S, Khonsanit A, et al. Phenolic glycosides from the filamentous fungus *Acremonium* sp. BCC14080 [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(5): 891–894.
- [8] Jang J H, Kanoh K, Adachi K, et al. Awajanomycin: A cytotoxic γ -lactone- δ -lactam metabolite from marine-derived *Acremonium* sp. AWA16-1 [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(9): 1358–1360.
- [9] Boot C M, Tenney K, Valeriote F A, et al. Highly N-methylated linear peptides produced by an atypical sponge-derived *Acremonium* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(1): 83–92.
- [10] Assante G, Dallavalle S, Malpezzi L, et al. Acremine A-F: Novel secondary metabolites produced by a strain of an endophytic *Acremonium*, isolated from sporangiophores of *Plasmopara viticola* in grapevine leaves [J]. *Tetrahedron*, 2005, 61(32): 7686–7692.
- [11] Arnone A, Assante G, Bava A, et al. Acremine H-N: Novel prenylated polyketide metabolites produced by a strain of *Acremonium byssoides* [J]. *Tetrahedron*, 2009, 65 (4): 786–791.
- [12] Mei W L(梅文莉), Ni W(倪伟), Liu H Y(刘海洋), et al. Studies on the constituents of *Cinnamomum zeylanicm* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2002, 14(3): 14–17.(in Chinese)
- [13] Su B N, Chang L C, Park E J, et al. Bioactive constituents of the seeds of *Brucea javanica* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(8): 730–733.
- [14] Wang Y H, Tang J G, Wang R R, et al. Flazinamide: A novel β -carboline compound with anti-HIV actions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(4): 1091–1095.
- [15] Shiomi K, Hatae K, Hatano H, et al. A new antibiotic, antimycin Ag, produced by *Streptomyces* sp. K01-0031 [J]. *J Antibiot*, 2005, 58(1): 74–78.