

两株南海红树内生真菌混合发酵产生新生物碱 marinamide 和其甲酯

朱峰 林永成

(佛山科学技术学院化学与化工系, 佛山 528000; 中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275. E-mail: zhufeng@fosu.edu.cn)

摘要 把混合发酵技术应用于两株南海红树内生真菌(菌株编号 1924 和 3893)的培养, 结果产生了 1 个新的 1-异喹啉酮类生物碱 marinamide(A)和其甲酯(B). 通过完整的波谱数据(主要是二维核磁共振谱)解析其结构分别为 4-(2-吡咯基)-1-异喹啉酮-3-甲酸(A)和 4-(2-吡咯基)-1-异喹啉酮-3-甲酸甲酯(B). 在相同条件下, 通过单独培养这两株内生真菌未能得到 marinamides. 实验结果表明, 混合发酵技术有可能成为寻找新颖代谢产物的有效途径.

关键词 内生真菌 混合发酵 代谢产物 生物碱

陆生微生物一直以来是人类丰富的天然药物资源, 但随着对陆生微生物研究的深入, 已经越来越难从中寻找到新的微生物种属和有特殊机能性状的微生物, 同样, 从中发现新的代谢产物的速度也在变慢. 另一方面, 由于药物的滥用, 导致许多病原菌产生了抗药性, 特别是新病原菌和新病毒不断出现, 人们迫切需要寻找到新的有效药物. 因此, 海洋微生物成为寻找新颖药物先导化合物的新源泉^[1]. 由于海洋环境的特殊性和微生物在生态系统的功能, 海洋微生物已发展出独特的代谢方式, 并提供了陆生微生物未能产生的代谢产物. 近年来, 不断有结构新颖的生物活性代谢产物从海洋真菌^[2~5]、海洋放线菌^[6~10]和海洋细菌^[11~14]中分离得到. 自 20 世纪 90 年代以来, 我们开始从南海红树林内生海洋真菌寻找结构新颖的活性代谢产物, 发现了许多有意义的新颖结构^[15~25].

然而, 虽然对海洋微生物的研究被证明可以发现大量新的种属和新的化合物, 但与陆生微生物一样, 很多海洋微生物只是当存在特定营养成分, 或为了竞争营养物质、防范天敌的进攻并维持物种之间的信息传递等情况下, 才会发展出独特的代谢方式并产生特殊的化学成分, 而在一般生长条件下并不产生独特的代谢产物. 因此仍然需要发展新的技术和手段用于从海洋微生物中寻找更多的新颖活性代谢产物. 在研究微生物的过程中, 人们不断发现很多重要的生化过程是单株微生物不能完成或只能微弱地进行, 必须依靠两种或多种微生物共同作用才能完

成. 因此, 许多特定的代谢产物是单株微生物不能合成而必须通过两种或两种以上微生物才能共合成. 所以启发了人们采用两种或两种以上的微生物共同发酵培养(即混合发酵)以获得单株微生物不能达到的效果. 基于此, 我们开始探索发展混合发酵技术作为从海洋微生物寻找新颖天然产物的一种手段. 本文把该技术应用于两株来源于南海红树林植物的内生海洋真菌(菌株编号为 1924 和 3893)的培养, 结果从菌丝体乙醇粗提物分离获得了 1 个新的生物碱 marinamide (A)和其甲酯(B). 经波谱分析解析它们的结构分别为 4-(2-吡咯基)-1-异喹啉酮-3-甲酸(A)和 4-(2-吡咯基)-1-异喹啉酮-3-甲酸甲酯(B). 化合物A和B在相同条件下单独培养这两株海洋真菌时未能分离得到^[26,27]¹⁾.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: 德国 Bruker 公司 VECTOR 22 型傅里叶变换红外光谱仪; 美国 Varian 公司 INOVA 500NB 超导核磁共振谱仪; 英国 VG 公司 ZAB-HS 双聚焦磁质谱仪; 德国 ELEMETAR 公司 VARIO EL CHNS-O 元素分析仪, 美国 Varian 公司 Cary100 型紫外可见分光光度计, X4 型显微熔点测定仪.

试剂均为市售 C.P., A.R.或 B.R.试剂.

1.2 菌种培养

菌种: 海洋真菌 1924#和 3893#均分离自香港江

1) Zhu F, Lin Y C, Zhou S N. Metabolites of mangrove endophytic fungus #3893 from the South China Sea. Chem & Indus Fore Prod (待发表)

口红树植物, 种属未定. 菌种由香港城市大学 L. L. P. Vrijmoed 和 E. B. G. Jones 教授提供. 菌种分别保存在广州中山大学和香港城市大学.

培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 1 g, 粗海盐 3.5 g, 自来水 1 L, pH 7.0.

菌种培养: 60 L 培养基分装 500 mL 三角瓶, 每瓶装培养基 200 mL, 1.25×10^5 Pa 灭菌 15 min, 冷却后接入 1924# 和 3893# 菌种, 在 25 °C 静置混合培养 12 d.

1.3 提取与分离

60 L 发酵总物纱布过滤得菌丝体, 菌丝体风干后重 220 g, 用乙醇充分浸提(5 L $\times$ 5), 乙醇提取液合并减压回收溶剂得粗提物约 20 g. 粗提物拌硅胶 H 过柱, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱后, 再用乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱. 乙酸乙酯洗脱组分和乙酸乙酯-甲醇(9:1)洗脱组分反复硅胶柱层析, 重结晶纯化分别得到化合物 A(20 mg) 和 B(40 mg).

1.4 实验数据

化合物 A(图 1): 黄色固体, m.p. > 300 °C, 快原子轰击质谱(FABMS) (m/z): 255[M+H]⁺, 237; NMR 数据见表 1; IR(KBr) ν : 3430, 3333, 3128, 1643, 1614, 1452, 1401, 1133, 942, 872, 819, 779, 753 cm⁻¹; UV(MeOH) $\lambda_{\max}$: 216, 316, 348, 356 nm.

化合物 B(图 1): 淡黄色针状晶体, m.p. > 300 °C, FABMS(m/z): 269[M+H]⁺, 237; NMR 数据见表 2; IR(KBr) ν : 3431, 3332, 3195, 1642, 1614, 1560, 1454, 1401, 1354, 1297, 1234, 1138, 1003, 905, 881, 807, 738 cm⁻¹; UV(MeOH) $\lambda_{\max}$: 216, 284, 332 nm; 元素分析实测值(计算值)%: C 67.06(67.16), H 4.612(4.508), N 10.324(10.442).

2 结果与讨论

化合物 B 的 FABMS 谱在 m/z 269 给出分子离子

峰[M+H]⁺, NMR 谱给出 15 个碳和 12 个质子信号, 结合元素分析推出其分子式为 C₁₅H₁₂N₂O₃.

分析 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 DEPT(不失真地极化转移增强谱)表明化合物 B 存在 2 个羰基(δ_C 173.5 和 167.5), 5 个不饱和季碳, 7 个不饱和 CH 和 1 个—OCH₃. 化合物 B 遇 FeCl₃ 不呈正反应, 说明它不是酚类物质, 并进一步证明 δ_H 11.61 和 11.56 不是酚羟基的活泼氢信号. ¹H-¹H 同核位移相关谱(¹H-¹H COSY)中 H-8, H-7, H-6 和 H-5 互相相关, 结合检出 ¹H 的异核多键相干谱(HMBC)谱中 C-1 与 H-8 相关, C-9 与 H-8 相关, C-8 与 H-7 相关, C-7 与 H-6 相关, C-6 与 H-5 相关, C-5 与 H-6 相关, C-10 与 H-5 相关推出存在邻二取代苯结构片段. ¹H-¹HCOSY 谱中 H-11, H-13, H-14 和 H-15 互相相关, 结合 HMBC 中 C-12 与 H-13, H-11 相关, C-13 与 H-14 相关, C-14 与 H-15 相关, C-15 与 H-11, 14 相关, 推出存在 α -取代吡咯结构片段. HMBC 中 C-16 与 H-17 相关推出取代甲酸甲酯结构片段. 由于 HMBC 中 C-4 与 H-2 和 H-11 均有相关, 因此推断 α -取代吡咯结构片段与 C-4 相连. HMBC 中 C-3 没有找到相关, 推断取代甲酸甲酯结构片段与 C-3 相连. 综合分析图谱推出化合物 B 的结构为 4-(2-吡咯基)-1-异喹啉酮-3-甲酸甲酯.

分析化合物 A 的 NMR 谱图发现与化合物 B 的 NMR 谱图非常相似. 不同的是其 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱中少了化合物 B 中的—OCH₃ 信号, 而多了羧基活泼质子信号(δ_H 16.13(br s)). 很明显, 化合物 A 是化合物 B 的—OCH₃ 被—OH 取代的产物. 综合分析图谱(特别是 HMQC(检出 ¹H 的异核多量子相干谱), ¹H-¹H COSY 和 HMBC 谱)推出化合物 A 为 4-(2-吡咯基)-1-异喹啉酮-3-甲酸.

早在 1988 年, Maeda 等^[28]在寻找具有选择性中

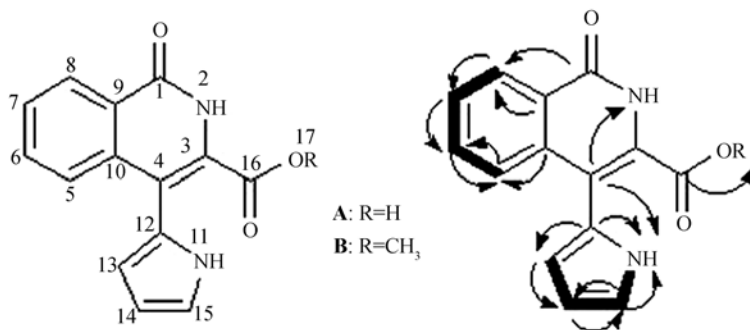


图 1 化合物 A 和 B 的结构式和主要 HMBC(—)和 ¹H-¹H COSY(—)相关

表1 化合物A的NMR数据(500 MHz, DMSO-*d*₆)

位置 编号	δ_c	δ_H (J^a)	HMBC	1H - 1H COSY
1	178.4(s)		H-8	
2		12.34(br s, NH)		
3	147.5(s)			
4	106.2(s)			
5	119.1(d)	7.88(d, 8.0 Hz, 1H)	H-6, 7, 8	H-6, 7, 8
6	125.3(d)	7.52(t, 8.0 Hz, 1H)	H-5, 7, 8	H-5, 7, 8
7	133.6(d)	7.83(t, 8.0 Hz, 1H)	H-5, 6, 8	H-5, 6, 8
8	124.9(d)	8.24(d, 8.0 Hz, 1H)	H-5, 6, 7	H-5, 6, 7
9	138.7(s)		H-5, 6, 7, 8	
10	122.8(s)		H-5, 6	
11		11.81(br s, NH)		H-13, 14, 15
12	123.5(s)		H-13, 14, 15	
13	113.6(d)	6.84(m, 1H)	H-14, 15; 11-NH	H-14, 15; 11-NH
14	108.7(d)	6.28(m, 1H)	H-13, 15	H-13, 15; 11-NH
15	123.0(d)	7.14(m, 1H)	H-13, 14	H-13, 14; 11-NH
16	166.1(s)		OH	
17		16.13(br s, OH)		

a) 由检出 1H 的异核多量子相干谱归属表2 化合物B的NMR数据(500 MHz, DMSO-*d*₆)

位置 编号	δ_c	δ_H (J^a)	HMBC	1H - 1H COSY
1	173.5(s)		H-8	
2		11.61 (br s, 1H, NH)		
3	140.6(s)			
4	113.5(s)		2-NH, 11-NH	
5	118.4(d)	7.66 (d, 8.0 Hz, 1H)	H-6	H-6, 7, 8
6	123.5(d)	7.35 (t, 8.0 Hz, 1H)	H-5, 7	H-5, 7, 8
7	132.2(d)	7.69 (t, 8.0 Hz, 1H)	H-6, 8	H-5, 6, 8
8	124.7(d)	8.07 (d, 8.0 Hz, 1H)	H-5, 6, 7	H-5, 6, 7
9	139.4(s)		H-5, 7, 8	
10	124.2(s)		H-5, 6; 2-NH	
11		11.56 (br s, 1H, NH)		H-13, 14, 15
12	122.9(s)		H-13, 14, 15; 11-NH	
13	111.8(d)	6.47 (m, 1H)	H-14, 15	H-14, 15; 11-NH
14	109.6(d)	6.25 (m, 1H)	H-13, 15	H-13, 15; 11-NH
15	122.4(d)	7.12 (m, 1H)	H-13, 14; 11-NH	H-13, 14; 11-NH
16	167.5(s)		H-17	
17	51.7(q)	3.67 (s, 3H)		

a) 由检出 1H 的异核多量子相干谱归属

枢神经系统作用的化合物时, 制备了一系列促甲状腺素释放激素(TRH)的类似物及相关衍生物, 其中TRH中的焦谷氨酸残基由 1,2,3,4-四氢-1-异喹啉酮-3-甲酸替代。并且制备了本文不含吡咯环的母核 1-异喹啉酮-3-甲酸。2001 年, Ukita等^[29]报道设计合成了一系列 4-芳基-1-异喹啉酮类化合物并研究了它们作为 型磷酸二酯酶(PDE5)抑制剂的构效关系, 发现这是一类有效的和高选择性的PDE5 抑制剂, 结果筛选到化合物 2-(4-氨基苯基)-1,2-二氢-1-氧代-7-(2-吡

啶甲氧基)-4-(3,4,5-三甲氧基苯基)-3-异喹啉甲酸甲酯的硫酸盐(T-1032)可以作为治疗勃起功能障碍的药物, 进一步进行生物学和药理学评价。与上述化合物不同的是, 新化合物marinamide(A)和其甲酯(B)是 4-位被吡咯环取代的 1-异喹啉酮类生物碱。本文在初步抗菌活性实验中发现marinamide(A)和其甲酯(B)在浓度为 1 mg/mL时对革兰氏菌*Escherichia coli*(抑菌圈直径/cm: 1.4(A); 2.0(B))、*Pseudomonas pyocyanea* [0.9(A); 1.7(B)]和*Staphylococcus aureus* [1.0(A); 1.3(B)]表现出明显的抑菌活性。

混合发酵技术曾广泛应用于食品工业^[30]和用于提高酶的产量^[31], 应用于药物工业以寻找新的代谢产物方面还不多见。由于抗生素的本能产生可能是为了提供一种竞争优势^[32], 因此有些特定化合物的生源合成途径就有可能受到某种微生物发出的而由另一种微生物探测得到的信号所调节。这种假设有证据支持, 比如Burgess等^[33]发现通过微生物的拮抗作用可以诱导海洋微生物产生抗生素。Sonnenbichler等^[34]则报道当存在拮抗物时菌株特定次级代谢产物的产量可以提高 400 倍。Cueto等^[35]发现海洋真菌*Pestalotia* sp. CNL-365 和一株对抗生素有抗药性的海洋细菌CNJ-328 混合发酵培养时可以产生一个新的抗生素pestalone, 而单独培养则不产生pestalone。最近, Oh等^[36]又发现同一株海洋细菌CNJ-328 与另一株海洋真菌*Libertella* sp. 混合发酵培养时又诱导该真菌产生了4个细胞毒性代谢产物libertellenones, 而单独培养时均不产生libertellenones。本文通过混合发酵技术培养两株南海红树林内生海洋真菌1924#和3893#获得了一个新生物碱marinamide(A)和其甲酯(B), 进一步显示混合发酵技术有可能成为寻找新颖代谢产物的有效途径。

致谢 感谢香港城市大学 L. L. P. Vrijmoed 教授和 E. B. G. Jones 教授提供海洋真菌菌种。本工作为国家高技术研究发展计划(批准号: 2003AA624010)、广东省自然科学基金(批准号: 04300674)、广东省科技计划(批准号: 2004B30101017)和佛山市科技发展专项资金(批准号: 2005081871)资助项目。

参 考 文 献

- Blunt J W, Copp B R, Munro M H G, et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2005, 22: 15—61 [DOI]
- Wei H, Itoh T, Kinoshita M, et al. Shimalactone A, a novel polyketide, from marine derived fungus *Emericella varicolor* GF10.

- Tetrahedron, 2005, 61(33): 8054—8058 [\[DOI\]](#)
- 3 Wei H, Itoh T, Kinoshita M, et al. Cytotoxic sesterterpenes, 6-epi-ophiobolin G and 6-epi-ophiobolin N, from marine derived fungus *Emericella varicolor* GF10. *Tetrahedron*, 2004, 60(28): 6015—6019 [\[DOI\]](#)
- 4 Klemke C, Kehraus S, Wright A D, et al. New secondary metabolites from the marine endophytic fungus *Apiospora montagnei*. *J Nat Prod*, 2004, 67(6): 1058—1063 [\[DOI\]](#)
- 5 Tsukamoto S, Miura S, Yamashita Y, et al. Aspermytin A: a new neurotrophic polyketide isolated from a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. *Bioorg & Med Chem Lett*, 2004, 14(2): 417—420 [\[DOI\]](#)
- 6 Koch I, Maskey R P, Biabani M A F, et al. 1-hydroxy-1-norresistomycin and resistoflavinmethyl ether: New antibiotics from marine-derived streptomycetes. *J Antibiot*, 2005, 58(8): 530—534
- 7 Li F C, Maskey R P, Qin S, et al. Chinikomycins A and B: Isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. Isolate M045. *J Nat Prod*, 2005, 68(3): 349—353 [\[DOI\]](#)
- 8 Maskey R P, Helmke E, Kayser O, et al. Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. *J Antibiot*, 2004, 57(12): 771—779
- 9 Stritzke K, Schulz S, Laatsch H, et al. Novel caprolactones from a marine streptomycete. *J Nat Prod*, 2004, 67(3): 395—401 [\[DOI\]](#)
- 10 Maskey R P, Sevvana M, Uson I, et al. Gutingimycin: A highly complex metabolite from a marine streptomycete. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43(10): 1281—1283 [\[DOI\]](#)
- 11 Liu H W, Fujiwara T, Nishikawa T, et al. Lissoclibadins 1-3, three new polysulfur alkaloids, from the ascidian *Lissoclinum cf. badium*. *Tetrahedron*, 2005, 61(36): 8611—8615 [\[DOI\]](#)
- 12 Silipo A, Leone S, Molinaro A, et al. Complete structural elucidation of a novel lipooligosaccharide from the outer membrane of the marine bacterium *Shewanella pacifica*. *Eur J Org Chem*, 2005, (11): 2281—2291
- 13 Matsuo Y, Imagawa H, Nishizawa M, et al. Isolation of an algal morphogenesis inducer from a marine bacterium. *Science*, 2005, 307(5715): 1598 [\[DOI\]](#)
- 14 Hickford S J H, Kupper F C, Zhang G P, et al. Petrobactin sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J Nat Prod*, 2004, 67(11): 1897—1899 [\[DOI\]](#)
- 15 Wu X Y, Liu X H, Jiang G C, et al. Xyloketal G, a novel metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. 2508. *Chem Nat Comp*, 2005, 41(1): 27—29 [\[DOI\]](#)
- 16 Yin W Q, Zou J M, She Z G, et al. Two cyclic peptides produced by the endophytic fungus #2221 from *Castaniopsis fissa* on the South China Sea coast. *Chin Chem Lett*, 2005, 16(2): 219—222
- 17 Li H J, Lin Y C, Yao J H, et al. Two new metabolites from the mangrove endophytic fungus No. 2524. *J Asian Nat Prod Res*, 2004, 6(3): 185—191 [\[DOI\]](#)
- 18 Li H J, Lin Y C, Vrijmoed L L P, et al. A new cytotoxic sterol produced by an endophytic fungus from *Castaniopsis fissa* at the South China Sea coast. *Chin Chem Lett*, 2004, 15(4): 419—422
- 19 Zhu F, Lin Y C, Zhou S N. Anthroquinone derivatives isolated from marine fungus #2526 from the South China Sea. *Chin J Org Chem*, 2004, 24(9): 1114—1117
- 20 Chen G Y, Lin Y C, Wen L, et al. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. *Tetrahedron*, 2003, 59(26): 4907—4909 [\[DOI\]](#)
- 21 Lin Y C, Li H J, Jiang G C, et al. A novel γ -lactone, eutypoid-A and other metabolites from marine fungus *Eutypa* sp. (#424) from the South China Sea. *India J Chem Sec B*, 2002, 41B: 1542—1544
- 22 Lin Y C, Wang J, Wu X Y, et al. A novel compound enniatin G from the mangrove fungus *Halosarpheia* sp. (strain 732) from the South China Sea. *Aust J Chem*, 2002, 55: 225—227 [\[DOI\]](#)
- 23 Lin Y C, Wang J, Zhou S N, et al. New isocoumarins from the mangrove endophytic fungus #2533. *Chem J Internet*, 2001, 3(7): 30—33
- 24 Lin Y C, Wu X Y, Feng S, et al. A novel N-cinnamoylcyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain #2508) from the South China Sea. *Tetrahedron Lett*, 2001, 42: 449—451 [\[DOI\]](#)
- 25 Lin Y C, Wu X Y, Feng S, et al. Five unique compounds: Xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. From the South China Sea coast. *J Org Chem*, 2001, 66: 6252—6256 [\[DOI\]](#)
- 26 Zhu F, Liu X H, Wen L, et al. Metabolites of marine fungus #1924 from the South China Sea. *Acta Scientia Natur Univ Sunyatseni*, 2005, 44(4): 66—69
- 27 Zhu F, Lin Y C. Two sphingolipids isolated from a mangrove endophytic fungus. *Chin J Org Chem*, 2005, 25(S2): 584
- 28 Maeda H, Suzuki M, Sugano H, et al. Synthesis and central nervous system actions of thyrotropin-releasing hormone analogs containing a 1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline moiety. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(1): 190—201
- 29 Ukita T, Nakamura Y, Kubo A, et al. Novel, potent, and selective phosphodiesterase 5 inhibitors: Synthesis and biological activities of a series of 4-aryl-1-isoquinolinone derivatives. *J Med Chem*, 2001, 44: 2204—2218 [\[DOI\]](#)
- 30 Wiesel I, Rehm H J, Bisping B. Improvement of tempe fermentations by application of mixed cultures consisting of *Rhizopus* sp. and bacterial strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47: 218—225 [\[DOI\]](#)
- 31 Gutierrez-Corres M, Tengerdy R P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnol Lett*, 1998, 20: 45—47 [\[DOI\]](#)
- 32 Strongman D B, Miller J D, Calhoun L, et al. The biochemical basis for interference competition among some lignicolous marine fungi. *Bot Mar*, 1987, 30(1): 21—26
- 33 Burgess J G, Jordan E M, Bregu M, et al. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J Biotechnol*, 1999, 70: 27—32 [\[DOI\]](#)
- 34 Sonnenbichler J, Dietrich J, Peipp H. Secondary fungal metabolites and their biological activities, 5. Investigations concerning the induction of the biosynthesis toxic secondary metabolites in basidiomycetes. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1994, 375(1): 71—79
- 35 Cueto M, Jensen P R, Kauffman C, et al. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *J Nat Prod*, 2001, 64: 1444—1446 [\[DOI\]](#)
- 36 Oh D C, Jensen P R, Kauffman C A, et al. Libertellenones A-D: Induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(17): 5267—5273 [\[DOI\]](#)

(2005-10-11 收稿, 2006-01-23 接受)