

木霉菌 KK19L1 发酵液中的一个新化合物

俞 和, 王香粉, 纪彦南, 徐 燕, 田沙沙, 朱华结*

河北大学药物化学与分子诊断重点实验室, 河北 071000

摘要: 对菌株 *Trichoderma* sp. KK19L1 液体发酵, 在该菌发酵液的乙酸乙酯层分离得到三个化合物, 运用¹H NMR、¹³C NMR 和 HR-ESI-MS 等光谱学方法并参考相应的文献, 确定其结构分别为 (*E*)-3-acetylbenzyl but-2-enoate (**1**)、1-羟基-6-甲基-9,10-蒽醌 (**2**)、2-甲基-3-羟甲基-5-羟基-7-甲氧基色原酮 (**3**), 其中化合物 **1** 为新的化合物, 化合物 **3** 为首次在该菌株中分离得到。

关键词: 木霉菌; 次级代谢产物; 色原酮; 蒽醌

中图分类号: R931.76

文献标识码: A

A New Compound from *Trichoderma* sp. KK19L1

YU He, WANG Xiang-fen, JI Yan-nan, XU Yan, TIAN Sha-sha, ZHU Hua-jie*

Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnostics, Hebei University, Hebei Baoding 071000, China

Abstract: Three compounds with one new compound were isolated from the fermentation broth of *Trichoderma* sp. KK19L1. Based on 1D NMR, 2D NMR, high resolution MS and IR analyses, their structures were elucidated as (*E*)-3-acetylbenzyl but-2-enoate (**1**), 1-hydroxy-6-Methyl-9, 10-anthraquinone (**2**), 5-hydroxy-3-hydroxymethyl-2-methyl-7-methoxychromone (**3**). Compound **1** is a new compound, and compound **3** was isolated from this genus of fungus for the first time.

Key words: *Trichoderma*; secondary metabolite; chromone; anthraquinone

木霉 (*Trichoderma*) 是一类普遍存在的真菌, 常见于土壤中, 是土壤微生物的重要群落, 从植物根围、叶围、种子及球茎表面, 植物残体及腐朽木材上都可以分离到。某些木霉具有活性很强的纤维素酶、几丁质酶等水解酶类, 可用于生产纤维素酶和微生物源的糖蛋白以及用于植病生防^[1]。绿色木霉、里氏木霉和哈茨木霉由于能够产生多种酶系, 对其研究也比较深入^[2-5]。木霉中次级代谢产物也比较丰富, 刘淑莹等在哈茨木霉中分离得到了一系列的蒽醌类化合物^[6], 杜林等从海洋木霉中分离得到 11 个 sorbicillinoid 类化合物^[7]。为进一步研究木霉菌的次级代谢产物, 我们对木霉 *Trichoderma* sp. KK19L1 的代谢产物进行了分离纯化和结构鉴定。

1 仪器与材料

德国 Bruker Avance III 600 MHz 核磁共振仪 (TMS 为内标, δ 为 ppm, J 为 Hz); 高分辨傅里叶变

换离子回旋质谱仪 (德国 Bruker); 循环半制备色谱仪 (日本岛津公司); Polarimeter Type AA-55 型数字式旋光仪。

Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司产品); C18 反相填料 (北京慧得易科技有限责任公司分装); 薄层色谱和正向柱色谱硅胶 (青岛海洋化工); 薄层硅胶 GF254 (烟台市化学工业研究所); 石油醚、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、甲醇等有机溶剂均为工业纯经重蒸后使用。

2 实验方法

2.1 菌株的分离、筛选

从河北省保定市河北大学的校园内采集一份土样, 在无菌条件下将土样溶于 200 mL 无菌水中, 震荡使之溶解充分, 取上清液进行梯度稀释, 浓度依次为原液的 10^{-1} ~ 10^{-9} 倍。取各个梯度稀释液 0.2 mL 涂布在 PDA 培养基的平板中, 待生长出菌落时挑出, 在新的平板中培养纯化, 最终得到并鉴定为木霉菌 (*Trichoderma* sp. KK19L1) 菌株。

2.2 提取与分离纯化

对木霉菌 (*Trichoderma* sp. KK19L1) 进行扩大培养, 共发酵 120 L。过滤、浓缩后得到水相 10 L, 用乙酸乙酯进行萃取, 减压浓缩后得到乙酸乙酯层浸膏 20 g, 经硅胶(200~300 目)柱层析, 二氯甲烷-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱, 合并相同组分, 各组分再经反复硅胶柱层析, Sephadex LH-20 和 RP-18 反相柱色谱分离纯化以及 C_{18} 高效液相制备得: 化合物 **1** (17.5 mg)、化合物 **2** (10 mg)、化合物 **3** (7 mg) (图 1)。

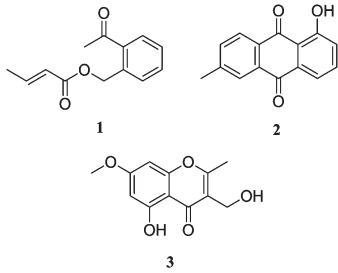


图 1 化合物 1~3 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of 1-3

3 结构鉴定

化合物 1 淡黄色粉末, 溶于二氯甲烷, 分子式为 $C_{13}H_{14}O_3$; mp. 60 °C; UV (CH_2Cl_2) λ_{max} 347 nm; IR (VCD) ν_{max} 1756, 1667, 1607, 1590, 1248 cm^{-1} ; HR-ESI-MS (positive): m/z [$M + Na$] $^+ = 241.08336$ (calcd. for: 241.08352)。计算得到不饱和度为 7。从 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱可以判断化合物有 2 个甲基, 一个连氧的亚甲基, 2 个双键上的次甲基, 一个 2 取代的苯环, 2 个羰基, 其中一个为酯羰基 (172.3 ppm, 单位下同)。通过 COSY 相关, 确定 H-3 (6.34)、H-4 (7.24)、H-5 (6.52)、H-6 (7.06) 依次相连接且为苯环上的氢, 由此可断定苯环上为邻位取代。H-2' (6.32)、H-3' (7.08)、H-4' (1.94) 依次连接, 同时 H-3' (7.08) 和 H-4' (1.94) 为双键上的氢。通过 HMBC 谱, 发现羰基 (C-8, 197.6) 连接 C-2 (125.0)。同时 C-9 (27.8) 与羰基 (C-8, 197.6) 相连。H-7 (4.94) 与 C-1 (125.0)、C-5 (128.6)、C-6 (147.8) 有强相关, 且 C-6 为季碳, 所以确定 C-7 与 C-6 相连接。C-7 为连氧的亚甲基且 H-7 (4.94) 与 C-1' (172.3) 有强相关, 可确定 C-7 与 C-1' 中间连氧, 为酯基结构。其核磁数据及二维相关数据见表 1。通过 2D NMR (HMQC、HMBC、COSY) 数据确定

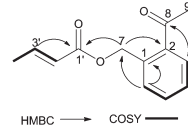


图 2 化合物 1 的主要 HMBC 和 COSY 相关

Fig. 2 Key HMBC and COSY correlations of compound 1

表 1 化合物 1 的核磁数据

Table 1 1H NMR, ^{13}C NMR and COSY data of compound 1

编号 No.	^{13}C NMR	1H NMR	COSY
1	147.8		
2	125.0		
3	133.6	6.34 (overlap, 1H)	H-4
4	140.9	7.24 (m, 1H)	H-3, H-5
5	132.3	6.52 (m, 1H)	H-6, H-4
6	128.6	7.07 (overlap, 1H)	H-5
7	68.1	4.94 (s, 2H)	
8	197.8		
9	27.8	2.34 (s, 3H)	
1'	172.3		
2'	118.5	6.32 (overlap, 1H)	H-3'
3'	136.1	7.08 (overlap, 1H)	H-4', H-2'
4'	19.6	1.94 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)	H-3'

其平面结构为 **1**。通过文献检索发现, 该化合物为一新化合物。命名为 (*E*)-3-acetylbenzyl but-2-enoate。其主要二维相关如图 2。

化合物 2 黄色粉末, 溶于二氯甲烷, 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.27 (1H, m, H-2), 7.62 (1H, m, H-3), 7.79 (1H, m, H-4), 8.27 (2H, m, H-5, H-8), 7.09 (1H, d, $J = 7.56$ Hz, H-7), 12.54 (1H, s, OH); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 162.8 (C-1), 124.2 (C-2), 134.4 (C-3), 120.0 (C-4), 127.3 (C-5), 148.6 (C-6), 134.1 (C-7), 126.8 (C-8), 188.0 (C-9), 182.6 (C-10), 133.6 (C-11), 133.1 (C-12), 116.1 (C-13), 133.3 (C-14), 22.2 (CH_3)。以上波谱数据与文献^[7]报道一致, 因此鉴定为 1-hydroxy-6-Methyl-9,10-anthraquinone。

化合物 3 白色针晶, 溶于二氯甲烷, 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.54 (1H, s, OH), 6.36 (2H, m, H-6, H-8), 4.62 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_2OH), 3.88 (3H, s, OCH_3), 3.04 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, OH),

4.48(3H, s, CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 164.6 (C-2), 118.3 (C-3), 182.3 (C-4), 104.9 (C-4a), 162.1 (C-5), 98.1 (C-6), 165.6 (C-7), 92.3 (C-8), 157.7 (C-8a), 17.9 (CH₃), 56.7 (CH₂OH), 55.8 (OCH₃)。以上波谱数据与文献^[8]报道一致,因此鉴定为5-羟基-3-羟甲基-2-甲基-7-甲氧基色原酮(5-hydroxy-3-hydroxymethyl-2-methyl-7-methoxychromone),在该木霉菌中首次发现。

致谢:感谢河北大学人才引进计划项目支持。

参考文献

- 1 Zhang CL(章初龙), Xu T(徐同). Classification research of *Trichoderma* sp. *J Yunnan Agric Univ* (云南农业大学学报), 2000, 15(3):269-274.
- 2 HvanJP, MohulatsiM. Biodegradation of waste paper by cellulase from *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 1996, 86:21-23.
- 3 Korenaga T, Fu S. Separation and enzymatic Saccharification of cellulose from Wakame. *J of Food Composition and Analysis*, 2000, 13:865-871.
- 4 Altom C, Norvell W, Bjorkman T. Applied and environmental microbiology, 1999, 65:2926-2933.
- 5 Estela M, Caryn J, Hussnain A, et al. Degradation of low rank coal by *Trichoderma reesei* ES11. *Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34:625-631.
- 6 Liu SY(刘淑莹). Study on the anthraquinones separated from the cultivation of *Trichoderma harzianum* strain Th-R16 and their biological activity. *J Agric Food Chem*, 2009, 57:7288-7292.
- 7 Knut D. Anthraquinones by cyclisation of benzoylbenzoic acids produced by the AlCl₃-mediated Friedel-Crafts reaction of phthalic anhydrides with aromatic compounds. *Acta Chemica Scandinavica*, 1996, 50:954-957.
- 8 Liu T(刘涛), Li ZL(李占林), Wang Y(王宇), et al. The secondary metabolites research of marine fungus *Hypocreavirens*. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2012, 29(2):93-97.