



一株海泥来源真菌 *Talaromyces flavus* 210331 次级代谢产物及其抗氧化活性

陈炜康^{1,2}, 罗运展^{1,2}, 陈世季^{1,2}, 黄国雷^{1,2}, 李诗川³, 郑彩娟^{1,2}

(1. 海南师范大学 化学与化工学院/热带药用资源化学教育部重点实验室, 海南 海口 571158;

2. 海南省热带药用植物化学重点实验室, 海南 海口 571158;

3. 海南东寨港国家级自然保护区管理局, 海南 海口 571129)

摘要:为从 *Talaromyces* 属中获得更多生物活性显著的次级代谢产物, 对一株红树植物白骨壤(*Avicennia marina*)根际海泥来源真菌 *Talaromyces flavus* 210331 的次级代谢产物及其抗氧化活性进行研究。综合利用正相硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、半制备 HPLC 等色谱分离技术, 对该菌发酵产物的乙酸乙酯萃取物进行次级代谢产物分离纯化; 综合运用 NMR、MS 波谱对纯化的次级代谢产物进行结构鉴定, 并评价鉴定次级代谢产物的抗氧化活性。结果显示从真菌 *T. flavus* 210331 中分离鉴定 7 个单体化合物, 包括 2 个异香豆素类化合物 hypoxymarin C (**1**) 和 peniciliocoumarin F (**2**), 1 个联烯类化合物 penicilactone A (**3**), 4 个苯衍生物 diorcinol (**4**)、*p*-hydroxy-benzaldehyde (**5**)、trans-ferulic acid (**6**) 和 agidol 10 (**7**)。抗氧化活性测试结果表明化合物 **1**~**3** 具有显著的抗氧化活性, 其 IC_{50} 值分别为 (0.180 ± 0.025) 、 (0.180 ± 0.037) 和 (0.230 ± 0.013) mmol/L, 强于阳性对照 trolox [$IC_{50} = (0.290 \pm 0.011)$ mmol/L]。

关键词:海泥; *Talaromyces flavus*; 次级代谢产物; 抗氧化活性

中图分类号: R281.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-4942(2023)02-0138-05

Secondary Metabolites and Their Antioxidant Activities of a Sea Mud-derived Fungus *Talaromyces flavus* 210331

CHEN Weikang^{1,2}, LUO Yunzhan^{1,2}, CHEN Shiji^{1,2}, HUANG Guolei^{1,2},
LI Shichuan³, ZHENG Caijuan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical Medicinal Resource Chemistry of Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158, China;

2. Key Laboratory of Hainan Provincial Tropical Medicinal Phytochemistry, Hainan Normal University, Haikou 571158, China;

3. Hainan Dongzhaigang National Nature Reserve Administration, Haikou 571129, China)

Abstract: In order to obtain more secondary metabolites with significant biological activities from the genus *Talaromyces*, the secondary metabolites and biological activities of the fungus *Talaromyces flavus* 210331 isolated from sea mud of the rhizosphere of *Avicennia marina* were studied. The secondary metabolites were isolated and purified by normal phase sili-

收稿日期: 2022-11-21

基金项目: 海南省重大科技计划项目(ZDKJ202008); 国家自然科学基金项目(32160108); 海南省院士创新平台科研专项(YSPTZX202030)

第一作者: 陈炜康(1999—), 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 1905610098@qq.com

*通信作者: 郑彩娟(1983—), 山东潍坊人, 教授, 研究方向为天然药物化学。E-mail: caijuan2002@163.com

ca gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography, semi-preparative HPLC and other chromatographic separation methods from the EtOAc extracts. Their structures were identified by comprehensive NMR, MS spectral and other spectral analysis methods. The antioxidant activities of the isolated secondary metabolites were also tested. Seven compounds were isolated and identified from *T. flavus* 210331, including two isocoumarins hypoxymarin C (1), peniciisocoumarin F (2) a diene penicilactone A (3), four benzene derivatives diorcinol (4), *p*-hydroxy-benzaldehyde (5), trans-ferulic acid (6), and agidol 10 (7). Compounds 1-3 showed good antioxidant activity, with the IC_{50} values of 0.18 ± 0.025 , 0.18 ± 0.037 and 0.23 ± 0.013 mmol/L, respectively, better than positive control trolox with the IC_{50} value of 0.29 ± 0.011 mmol/L.

Keywords: sea mud; *Talaromyces flavus*; secondary metabolites; antioxidant activity

海洋环境高压、低温、高盐、寡营养的特殊性赋予了海洋微生物有别于陆生微生物的代谢途径及适应机制,从而产生结构独特、生物活性显著的次级代谢产物,因此海洋是药物先导化合物的重要来源,被认为是天然药物资源的新宝库^[1-2]。海洋来源蓝状属真菌 *Talaromyces* 能够产生结构新颖且生物活性独特的次级代谢产物,如从该属真菌中发现具有抗人类致病菌活性的 $3\beta, 15\beta$ -dihydroxyl-(22*E*, 24*R*)-ergosta-5, 8(14), 22-trien-7-one^[2]、抗炎活性的 rubratoxin acid A^[3]、抗伪狂犬病病毒(PRV)活性的 talaromyolide D^[4]、抑制胃癌细胞 MGC803 和 MKN28 以及金黄色葡萄球菌的 taladrimanin A^[5]。为从 *Talaromyces* 属真菌中分离获得更多生物活性显著的次级代谢产物,从红树植物白骨壤(*Avicennia marina*)根际海泥的真菌 *T. flavus* 210331 中分离鉴定出 7 个化合物(1~7),结构分别为: hypoxymarin C (1)、peniciisocoumarin F (2)、penicilactone A (3)、diorcinol (4)、*p*-hydroxy-benzaldehyde (5)、trans-ferulic acid (6)和 agidol 10 (7)(图 1)。

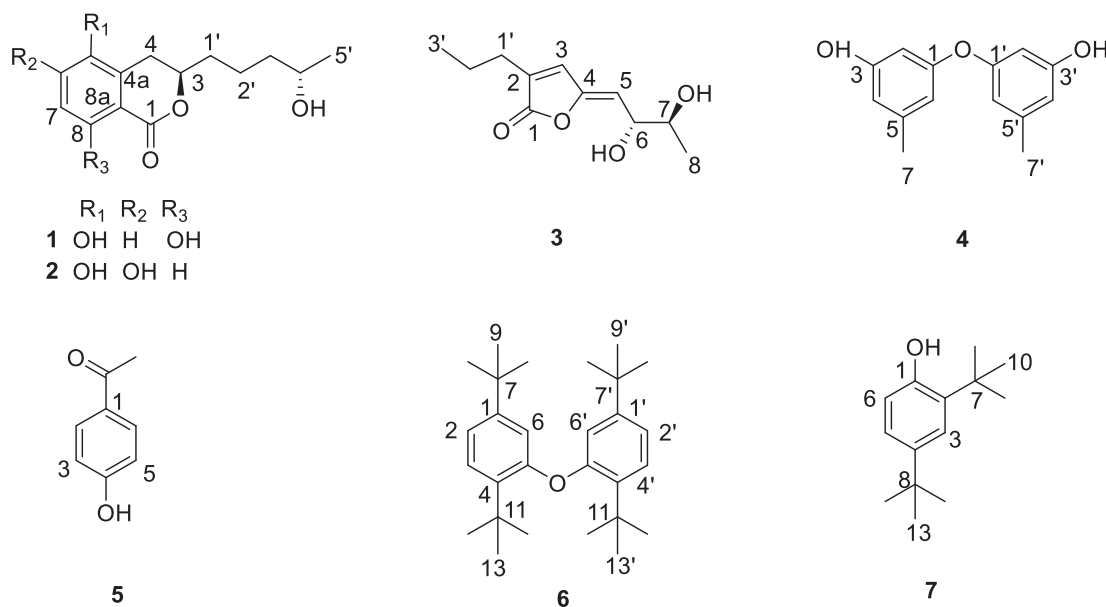


图 1 化合物 1~7 的化学结构

Figure 1 Structures of compounds 1-7

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

GAA076 LC 质谱仪,瑞士 Bruker 公司;Agilent 1100 分析型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;EYELAN-100 旋转蒸发仪,日本东京理化有限公司;YOKO-ZK 紫外分析暗箱,武汉药科新技术开发有限公司;Sephadex LH-20 凝胶,英国 Amersham Biosciences 公司;Bruker AV-400 MHz 超导核磁共振仪,瑞士 Bruker 公司;恒温水浴锅 B-220,上海亚荣生化仪器厂;薄层硅胶 GF254、柱色谱硅胶,青岛海洋化工厂;总抗氧化能力检测

试剂盒(ABTS法),海南科贸生物科技有限公司;全波长多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;灭菌锅,上海申安医疗器械厂;超净台,苏州净化设备有限公司。实验操作过程中所使用的化学试剂均来自广州西陇化工股份有限公司。

1.2 菌株的分离与筛选

1.2.1 菌株来源

海泥采自海南东寨港国家级自然保护区红树植物白骨壤(*Avicennia marina*)的根际部位(110.578 6°E, 19.949 09°N),从海泥中分离、鉴定、筛选出一株命名为210331的真菌。通过18S rRNA扩增和ITS区域测序,结合真菌的形态特征将该真菌鉴定为*Talaromyces flavus* 210331,序列数据已提交至GenBank,登录号为OP493180。菌种现保存于海南师范大学化学与化工学院热带药用资源化学教育部重点实验室(PDA培养基,4℃保存)。

1.2.2 菌株的培养

菌株*T. flavus* 210331经过活化后,分别接种到3瓶马铃薯液体培养基中(300 mL/1 000 mL)以获得种子培养液,28℃恒温振荡培养72 h。将900 mL种子培养液转移到50瓶马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中(每个1 L锥形瓶中含有1.8 g马铃薯葡萄糖浸粉和200 mL海水),静置培养(28℃,30 d)。

1.3 提取与分离

对发酵产物用纱布过滤,分为菌液和菌丝体,将菌液部分(20 L)用乙酸乙酯(EtOAc)萃取3次得到发酵液浸膏,菌丝体部分用甲醇(MeOH)萃取3次后,提取物经减压蒸发得到浸膏,然后用乙酸乙酯萃取,得到菌丝体部位乙酸乙酯浸膏。将发酵液浸膏和菌丝体浸膏通过薄层色谱分析(TLC)后发现,两者非常相似,将两部分浸膏合并得到总浸膏(9.6 g)。总浸膏通过正相硅胶柱层析(75~120 μm)梯度洗脱,用石油醚/EtOAc(*v/v*,梯度100:0→0:100)和EtOAc/MeOH(*v/v*,梯度100:0→0:100)分成5个组分(Fr.1~Fr.5)。Fr.2(1.2 g)通过正相硅胶柱(200~300目)进行柱层析洗脱,使用石油醚/EtOAc(*v/v*,9:1→1:1)梯度洗脱,通过TLC分析后合并为4个组分(Fr.2.1~Fr.2.4);Fr.2.2(0.8 g)通过Sephadex LH-20凝胶柱(石油醚-CHCl₃-MeOH,*v/v*,2:1:1),并经半制备HPLC分离纯化,得到化合物1(7.2 mg)、2(7.3 mg)和4(5.4 mg)。Fr.4(1.8 g)经凝胶柱Sephadex LH-20(CHCl₃-MeOH,*v/v*,1:1)洗脱,得到5个组分(Fr.4.1~Fr.4.5);Fr.4.3(1.0 g)经过正相硅胶柱(200~300目)梯度洗脱后,通过半制备型HPLC纯化得到化合物3(6.6 mg)和5(13.2 mg)。组分Fr.5(1.1 g)用正相硅胶柱(200~300目)石油醚/EtOAc(*v/v*,5:1→0:1)梯度洗脱,得到3个组分(Fr.5.1~Fr.5.3);Fr.5.2(0.4 g)进行凝胶柱Sephadex LH-20和半制备HPLC分离纯化,得到化合物6(11.4 mg)和7(10.2 mg)。

1.4 抗氧化活性测试

参考文献[6]的检测方法,测试化合物1~7的抗氧化活性。PBS缓冲液作为空白对照,二甲基亚砷(DMSO)为阴性对照,trolox为阳性对照,平行实验3次。使用全波长功能酶标仪测试734 nm波长处的吸光度 A ,再根据公式抑制率 $=[(A_{\text{空白}}-A_{\text{样品}})/A_{\text{空白}}] \times 100\%$,计算出各样品的抑制率并通过SPSS软件计算出IC₅₀值。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

化合物1:黄色油状液体,低分辨质谱ESI-MS在 m/z 267.0处给出准分子离子峰 $[M+H]^+$,推测分子量为266.0,结合¹H NMR和¹³C NMR波谱数据,推断其相对分子式为C₁₄H₁₈O₅,不饱和度为6。核磁波谱数据:¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 10.6(OH, s, 8-OH), 7.12(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6), 6.71(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-7), 4.63(1H, m, H-3), 3.77(1H, m, H-4'), 3.19(1H, dd, $J=10.4, 16.8$ Hz, H-4 β), 2.68(1H, dd, $J=3.6, 16.8$ Hz, H-4 α), 1.89(2H, d, $J=8.8$ Hz, H-1'), 1.62(2H, m, H-2'), 1.48(2H, m, H-3'), 1.14(3H, d, $J=6.4$ Hz, H-5');¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 170.8(C, C-1), 156.2(C, C-8), 146.3(C, C-5), 125.6(C, C-4a), 124.7(CH, C-6), 116.1(CH, C-7), 109.3(C, C-8a), 80.5(CH, C-3), 67.4(CH, C-4'), 39.3(CH₂, C-3'), 35.7(CH₂, C-1'), 27.4(CH₂, C-4), 24.1(CH₃, C-5'), 22.0(CH₂, C-2')。根据其¹H和¹³C NMR数据并与文献[7]数据比对,确定化合物1为hypoxymarin C。

化合物2:黄色油状液体,低分辨质谱ESI-MS在 m/z 265.0处给出准分子离子峰 $[M-H]^-$,推测相对分子质

量为266.0,结合 ^1H NMR和 ^{13}C NMR波谱数据,推断其相对分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5$,不饱和度为6。核磁波谱数据: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} 7.04 (H, d, $J=8.8$ Hz, H-7), 6.74 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-8), 4.59 (H, m, H-3), 3.78 (1H, m, H-4'), 2.66 (1H, dd, $J=6.8, 11.5$ Hz, H-4 α), 3.18 (1H, dd, $J=11.5, 16.8$ Hz, H-4 β), 1.79 (2H, m, H-1'), 1.63 (2H, m, H-2'), 1.50 (2H, m, H-3'), 1.20 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-5'); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 170.3 (C, C-1), 155.0 (C, C-6), 145.6 (C, C-5), 124.5 (C, C-4a), 123.7 (CH, C-7), 115.1 (CH, C-8), 108.0 (C, C-8a), 79.9 (CH, C-3), 67.0 (CH, C-4'), 38.4 (CH_2 , C-3'), 34.6 (CH_2 , C-1'), 26.4 (CH_2 , C-4), 22.1 (CH_3 , C-5'), 20.9 (CH_2 , C-2')。仔细对比文献[8],确定化合物2为 peniciisocoumarin F。

化合物3:黄色油状液体,低分辨质谱ESI-MS在 m/z 225.2处给出准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$,推测分子量为226.2,结合 ^1H NMR和 ^{13}C NMR波谱数据,推断其相对分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_4$,不饱和度为4。核磁波谱数据: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} 7.37 (1H, s, H-3), 5.34 (1H, d, $J=4.3$ Hz, H-5), 4.52 (1H, dd, $J=4.3, 9.1$ Hz, H-6), 3.83 (1H, m, H-7), 2.31 (2H, m, H-1'), 1.60 (2H, m, H-2'), 1.09 (3H, d, $J=6.7$ Hz, H-8), 0.95 (3H, t, $J=7.4$ Hz, H-3'); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 170.8 (C, C-1), 150.1 (C, C-4), 138.7 (CH, C-3), 135.0 (C, C-2), 114.0 (CH, C-5), 71.3 (CH, C-6), 71.0 (CH, C-7), 27.9 (CH_2 , C-1'), 21.7 (CH_2 , C-2'), 19.0 (CH, C-8), 14.1 (CH_3 , C-3')。根据其 ^1H 和 ^{13}C NMR并与文献[9]数据比对,确定化合物3为 penicilactone A。

化合物4:无色油状液体,低分辨质谱ESI-MS在 m/z 229.0处给出准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$,推测分子量为230.0,结合 ^1H NMR和 ^{13}C NMR波谱数据,推断其相对分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$ 。不饱和度为8。核磁波谱数据: ^1H NMR (400 MHz, $\text{Acetone}-d_6$) δ_{H} 6.42 (2H, s, H-6/H-6'), 6.40 (2H, s, H-4/H-4'), 6.30 (2H, t, $J=2.1$ Hz, H-2/H-2'), 2.27 (6H, s, H-7/H-7'); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{acetone}-d_6$) δ_{C} 158.1 (C, C-3/C-3'), 156.5 (C, C-1/C-1'), 141.0 (C, C-5/C-5'), 112.2 (CH, C-6/C-6'), 111.2 (CH, C-4/C-4'), 103.5 (CH, C-2/C-2'), 21.5 (CH_3 , C-7/C-7')。以上波谱数据与文献[10]数据对照,确定化合物4为 diorcinol。

化合物5:黄色油状液体,低分辨质谱ESI-MS在 m/z :137.1处给出准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$,推测出其分子量为136.1。结合 ^1H NMR和 ^{13}C NMR波谱数据,推断其相对分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$,不饱和度为5。核磁波谱数据: ^1H NMR (400 MHz, $\text{Acetone}-d_6$) δ_{H} 9.85 (1H, s, 4-OH), 7.82 (2H, d, $J=8.2$ Hz, H-2/H-6), 6.99 (2H, d, $J=8.2$ Hz, H-3/H-5); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{Acetone}-d_6$) δ_{C} 191.5 (C, 1-CHO), 162.0 (C, C-4), 132.7 (CH, C-2/C-6), 129.9 (C, C-1), 116.2 (CH, C-3/C-5)。仔细对比文献[11],确定化合物5为 *p*-hydroxy-benzaldehyde。

化合物6:黄色油状液体,低分辨质谱ESI-MS在 m/z 395.6处给出准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$,推测分子量为394.6,结合 ^1H NMR和 ^{13}C NMR波谱数据,推断其相对分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}$,不饱和度为8。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{Acetone}-d_6$) δ_{H} 7.58 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-6/H-6'), 7.47 (2H, t, $J=2.0$ Hz, H-3/H-3'), 7.25 (2H, dd, $J=8.4, 2.0$ Hz, H-2/H-2'), 1.37 (18H, s, H-12/H-12'/H-13/H-13'/H-14/H-14'), 1.30 (18H, s, H-8/H-8'/H-9/H-9'/H-10/H-10'); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{Acetone}-d_6$) δ_{C} 148.6 (C, C-5/C-5'), 148.1 (C, C-1/C-1'), 139.3 (C, C-4/C-4'), 125.4 (CH, C-3/C-3'), 124.8 (CH, C-6/C-6'), 119.8 (CH, C-2/C-2'), 35.5 (C, C-7/C-7'), 35.1 (C, C-11/C-11'), 31.7 (CH_3 , C-8/C-9/C-10/C-8'/C-9'/C-10'), 30.6 (CH_3 , C-12/C-13/C-14/C-12'/C-13'/C-14')。比对文献[12]数据,确定化合物6为 *trans*-ferulic acid。

化合物7:黄色油状液体,低分辨质谱ESI-MS在 m/z 205.0处给出准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$,推测分子量为206.0,结合 ^1H NMR和 ^{13}C NMR波谱数据,推断其分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$,不饱和度为4。核磁波谱数据: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.31 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-3), 7.17 (1H, dd, $J=8.3, 2.5$ Hz, H-5), 6.65 (1H, d, $J=6.2$ Hz, H-6), 1.40 (9H, s, H-8/H-9/H-10), 1.28 (9H, s, H-8'/H-9'/H-10'); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 149.1 (C, C-1), 148.8 (C, C-2), 139.8 (CH, C-3), 125.9 (C, C-4), 125.2 (CH, C-5), 120.0 (CH, C-6), 35.9 (C, C-7), 34.5 (C, C-7'), 31.6 (CH_3 , C-8/C-9/C-10), 31.2 (CH_3 , C-8'/C-9'/C-10')。根据其 ^1H NMR和 ^{13}C NMR并与文献[13]数据比对,确定化合物7为 agidol 10。

2.2 抗氧化活性测试结果

对化合物1~7进行了抗氧化活性测试,结果表明化合物1~3具有抗氧化活性, IC_{50} 值分别为 (0.180 ± 0.025) 、 (0.180 ± 0.037) 和 (0.230 ± 0.013) mmol/L,强于阳性对照 trolox [$\text{IC}_{50} = (0.290 \pm 0.011)$ mmol/L]。其余化合

物在质量浓度为 1 mmol/L 时均无明显的抗氧化活性。

3 结论

本文综合运用多种色谱分离技术和波谱鉴定技术,从海泥来源内生真菌 *T. flavus* 210331 中分离鉴定了 7 个已知单体化合物。通过抗氧化活性筛选发现化合物 1~3 具有显著的抗氧化活性,强于阳性对照药 trolox。本研究从海泥来源的 *Talaromyces* 属真菌中分离获得了具有抗氧化活性的次级代谢产物,为抗氧化剂的研发提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 柏凤月,倪孟祥.海洋微生物来源的抗菌活性物质研究进展[J].化学与生物工程,2016,33(5):15-25.
- [2] 陈必婷,梁振益,温珍昌,等.红树林来源内生真菌活性产物研究进展[J].海南师范大学学报(自然科学版),2022,35(4):373-385.
- [3] ZHAO J Y, WANG X J, ZHEN L, et al. Nonadride and spirocyclic anhydride derivatives from the plant endophytic fungus *Talaromyces purpurogenus*[J]. Journal of Natural Products, 2019, 82(11):2953-2962.
- [4] CAO X, SHI Y T, WU X D, et al. Talaromyolides A-D and talaromytin polycyclic meroterpenoids from the fungus *Talaromyces* sp. CX11[J]. Organic Letters, 2019(16):6539-6542.
- [5] HONG X, GUAN X Q, LAI Q L, et al. Characterization of a bioactive meroterpenoid isolated from the marine-derived fungus *Talaromyces* sp.[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 8(106):2927-2935.
- [6] ZENG W N, CAI J, WANG B, et al. A new bioactive isocoumarin from the mangrove-derived fungus *Penicillium* sp. TGM112[J]. Natural Product Research, 2021, 24(7):1-6.
- [7] HUANG L M, DING L J, LI X H, et al. A new lateral root growth inhibitor from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. LS45[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2019, 13(29):1593-1596.
- [8] CHEN S H, LIU Y Y, LIU Z M, et al. Isocoumarins and benzofurans from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* possess α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities[J]. Royal Society of Chemistry Advances, 2016, 6(31):26412-26420.
- [9] FINDLAY J A, LI G Q, MILLER J D, et al. Insect toxins from spruce endophytes[J]. Canadian Journal of Chemistry, 2003, 81(4):284-292.
- [10] HAYASAKA A, HASHIMOTO K, KONNO K, et al. Isolation, identification, and DFT-Based conformational analysis of sesquikarahanadienone and its congeners from freshwater *Dothideomycetes neohelicascus* aquaticus KT4120[J]. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2022, 95(5):833-845.
- [11] LIN H, SHEN Z H, LIU J K. The chemical constituents of basidiomycetes *Boletopsis grisa*[J]. Plant Diversity, 2002, 24(5):1-3.
- [12] 孙变娜,沈和定,吴洪喜,等.紫色疣石磺化学成分分离与鉴定[J].中国药房,2014,25(11):1019-1021.
- [13] WU J H, ZHANG M. Application of efficient pre-treatment by physical fields for improving the taste and flavor of processed chicken enzymatic hydrolysate[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020:e16921.