

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_

学号: 21720090153570

UDC\_\_

廈門大學

博 士 学 位 论 文

一株植物内生真菌和三株鬼伞属担子菌的  
次生代谢产物研究

Research on Secondary Metabolites from One Strain of Endophytic  
Fungi and Three Strains of Basidiomycetes

刘源振

指导教师姓名: 苏文金 教授、沈月毛 教授

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2012 年 9 月

论文答辩时间: 2013 年 1 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2013年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 英文缩略词 (Abbreviations)

缩写	全称	中文
COSY	Correlated Spectroscopy	相关波谱
<i>d</i>	doublet	二重峰
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate	二乙基焦碳酸
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	极化转移实验技术
dNTP	Deoxy-ribonucleoside triphosphate	三磷酸脱氧核糖核苷
EA	Ethyl Acetate	乙酸乙酯
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry	电喷雾质谱
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation	异核远程相关谱
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	异核单量子关系
HTS	High-Throughput Screening	高通量筛选
LB	Luria-Bertani	溶菌肉汤培养基
IC <sub>50</sub>	50% Inhibition Concentration	半抑制浓度
IR	Infrared Rays	红外线
ITS	Internal Transcribed Spaces	核糖体基因转录间隔区
<i>m</i>	multiplet	多重峰
MEB	Malt-extract broth	麦芽糖提取物液体培养基
MTT	Methylthiazolyte Trazolium	噻唑蓝
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	核磁共振

---

OR	Optical Rotation	旋光度
PBS	Phosphate-Buffered Saline	磷酸缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链反应
PDA	Potato Dextrose Agar	马铃薯葡萄糖琼脂 培养基
PE	Petroleum Ether	石油醚
PKSs	Polyketide Synthases	聚酮合酶
ppm	Part per Million	百万分之一
<i>q</i>	quartet	四重峰
RP-18	Reversed-Phase Octadecyl Silica Gel C <sub>18</sub>	十八烷基键合反相 硅胶
<i>s</i>	singlet	单重峰
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基磺酸钠
<i>t</i>	triplet	三重峰
TLC	Thin Layer Chromatography	薄层层析
UV	Ultraviolet Rays	紫外线
$\delta$	chemical shift	化学位移

摘要.....	I
Abstract.....	III
本论文分离鉴定结构的化合物.....	V
第一章 前 言.....	1
1.1 引言.....	1
1.1.1 天然产物与药物发现.....	1
1.1.2 微生物次级代谢与天然药物.....	5
1.1.3 现代天然产物开发与药物发现新策略.....	9
1.1.3.1 利用自然选择力产生新活性化合物：共培养可能是有效的途径 之一.....	9
1.1.3.2 激活沉默基因的表达：发现新的活性化合物之关键.....	13
1.2 植物内生真菌代谢产生的部分活性化合物.....	15
1.2.1 抗肿瘤活性化合物.....	16
1.2.1.1 生物碱和含氮杂环.....	16
1.2.1.2 内酯.....	18
1.2.1.3 聚酮类.....	19
1.2.1.4 倍半萜.....	21
1.2.2 抗菌活性化合物.....	21
1.2.3 抗氧化活性化合物.....	23
1.3 担子菌代谢产生的部分活性化合物.....	24
1.3.1 萜类.....	25
1.3.1.1 倍半萜.....	25
1.3.1.2 二萜.....	31
1.3.1.3 三萜和甾体.....	32

1.3.2 聚酮类和脂肪酸衍生物.....	35
1.3.3 氨基酸衍生物.....	38
1.3.4 其它生源途径.....	38
<b>1.4 本课题选题依据、研究内容和意义.....</b>	<b>39</b>
<b>第二章 材料与方法.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 材料.....</b>	<b>41</b>
2.1.1 菌株来源.....	41
2.1.2 抗菌活性测定指示菌.....	41
2.1.3 肿瘤细胞株.....	41
2.1.4 试剂与耗材.....	41
2.1.5. 主要仪器.....	42
2.1.6. 培养基与溶液.....	43
<b>2.2 方法.....</b>	<b>44</b>
2.2.1 技术路线.....	44
2.2.2 菌株的 ITS 鉴定方法.....	45
2.2.3 真菌发酵培养及代谢产物提取方法.....	46
2.2.3.1 琼脂平板固体发酵及代谢产物提取.....	46
2.2.3.2 大米培养基固态发酵及代谢产物提取.....	46
2.2.3.3 液体静置发酵及代谢产物提取.....	47
2.2.4 天然产物的分离纯化方法.....	47
2.2.5 化合物结构测定方法.....	49
2.2.6 化合物生物活性测定方法.....	49
<b>第三章 结果与分析.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 <i>Diaporthe</i> sp. SXZ-19 次级代谢产物分离纯化与结构鉴定.....</b>	<b>51</b>
3.1.1 引言.....	51
3.1.2 菌株形态及分类鉴定.....	52
3.1.3 菌株发酵及发酵产物提取.....	52
3.1.4 发酵产物的分离纯化.....	53

3.1.5 化合物的结构解析.....	55
3.1.5.1 化合物 D3.....	56
3.1.5.2 化合物 D4.....	57
3.1.5.3 化合物 D7.....	58
3.1.5.4 化合物 D12.....	60
3.1.5.5 化合物 D8.....	61
3.1.5.6 化合物 D10.....	63
3.1.5.7 化合物 D9.....	65
3.1.5.8 化合物 D11.....	67
3.1.5.9 化合物 D13 和 D15.....	70
3.1.5.10 化合物 D16.....	71
3.1.5.11 化合物 D17.....	73
<b>3.2 <i>Coprinus cinereus</i> 120 次级代谢产物分离纯化与结构鉴定.....</b>	<b>75</b>
3.2.1 引言.....	75
3.2.2 菌株形态及分类鉴定.....	76
3.2.3 菌株发酵及发酵产物提取.....	76
3.2.4 发酵产物的分离纯化.....	77
3.2.5 化合物的结构解析.....	80
3.2.5.1 化合物 Ab-0.....	80
3.2.5.2 化合物 Ea3.....	81
3.2.5.3 化合物 B2.....	81
3.2.5.4 化合物 Ea1 和 Ea2.....	82
3.2.5.5 化合物 F1a2.....	82
3.2.5.6 化合物 P1.....	83
3.2.5.7 化合物 P2.....	85
3.2.5.8 化合物 K4 和 F2c4.....	86
3.2.5.9 化合物 K3 和 F2c3, F2a3.....	91
3.2.5.10 化合物 K13b.....	95
3.2.5.11 化合物 K13a.....	97



3.2.5.12	化合物 K11.....	100
3.2.5.13	化合物 K7.....	102
3.2.5.14	化合物 K1 和 K2.....	103
3.2.5.15	化合物 K6 和 K5.....	103
3.2.5.16	化合物 K9.....	104
3.2.5.17	化合物 K12.....	105
3.2.5.18	化合物 F4b3 和 F4b5.....	106
3.2.5.19	化合物 F2A0.....	107
<b>3.3</b>	<b><i>Coprinus plicatilis</i> 82 次级代谢产物分离纯化与结构鉴定.....</b>	<b>109</b>
3.3.1	菌株形态及分类鉴定.....	109
3.3.2	菌株发酵及发酵产物提取.....	110
3.3.3	发酵产物的分离纯化.....	112
3.3.4	化合物的结构解析.....	116
3.3.4.1	化合物 Cr1.....	116
3.3.4.2	化合物 Cr4.....	117
3.3.4.3	化合物 Cr2 和 Cr8.....	118
3.3.4.4	化合物 Cr3.....	122
3.3.4.5	化合物 Cr6.....	125
3.3.4.6	化合物 Cr5 和 Cm5, Cp2.....	127
3.3.4.7	化合物 Cr9.....	131
3.3.4.8	化合物 Cr10.....	133
3.3.4.9	化合物 Cm1.....	135
3.3.4.10	化合物 Cm3.....	137
3.3.4.11	化合物 Cm4.....	138
3.3.4.12	化合物 Cp1.....	140
3.3.5	新化合物细胞毒活性.....	142
<b>3.4</b>	<b><i>Coprinus nieveus</i> 349 次级代谢产物分离纯化与结构鉴定.....</b>	<b>143</b>
3.4.1	菌株形态及分类鉴定.....	143
3.4.2	菌株发酵及发酵产物提取.....	143

---

3.4.3 发酵产物的分离纯化.....	144
3.4.4 化合物的结构解析.....	145
3.4.4.1 化合物 Cn1.....	145
3.4.4.2 化合物 Cn4.....	146
3.4.4.3 化合物 Cn3.....	147
3.4.4.4 化合物 Cn2.....	148
3.4.4.5 化合物 Cn9.....	148
<b>第四章 结论与讨论.....</b>	<b>151</b>
4.1 植物内生真菌可产生丰富的次级代谢产物.....	151
4.2 担子菌能够产生多种具生物学活性萜类.....	152
4.3 <b>Guanacastane</b> 型二萜研究进展.....	153
4.4 结论与展望.....	156
<b>参考文献.....</b>	<b>158</b>
<b>附录.....</b>	<b>168</b>
<b>攻读博士期间发表学术文章.....</b>	<b>192</b>
<b>致谢.....</b>	<b>193</b>

---

**CONTENTS**

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	III
<b>Chemical structures of compounds identified in this thesis</b> .....	V
<b>Chapter 1 Preface</b> .....	1
<b>1.1. Introduction</b> .....	1
1.1.1. Nature products and drug discovery.....	1
1.1.2. Microbial secondary metabolites and natural products.....	5
1.1.3. Modern natural products R & D and new strategies for drug discovery .....	9
1.1.3.1. Co-culture may be an efficient approach: using the force of natural selection to produce more bioactive natural compounds.. ..	9
1.1.3.2. Activation of silent genes expression: key of the discovery of novel bioactive natural products.....	13
<b>1.2. Bioactive secondary metabolites from Plant Endophytic Fungi</b> .....	15
1.2.1. Antitumor compounds.....	16
1.2.1.1. Alkaloids and nitrogen-containing heterocycles.....	16
1.2.1.2. Lactones.....	18
1.2.1.3. Polyketides.....	19
1.2.1.4. Sesquiterpenes.....	21
1.2.2. Antimicrobial compounds.....	21
1.2.3. Antioxidant compounds.....	23
<b>1.3. Bioactive secondary metabolites from Basidiomycetes</b> .....	24

1.3.1. Terpenoids.....	25
1.3.1.1. Sesquiterpenoids.....	25
1.3.1.2. Diterpenoids.....	31
1.3.1.3. Triterpenoids and steroids.....	32
1.3.2. Polyketides, Fatty acid derivatives.....	35
1.3.3. Amino acid derivatives.....	38
1.3.4. Compounds of Unclear biogenetic origin.....	38
<b>1.4. The Significance of this thesis.....</b>	<b>39</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1. Materials.....</b>	<b>41</b>
2.1.1. Fungal strains.....	41
2.1.2. Indicator microbes.....	41
2.1.3. Tumor cell lines.....	41
2.1.4. Reagents and Materials.....	41
2.1.5. Apparatus.....	42
2.1.6. Media and Solution.....	43
<b>2.2. Methods.....</b>	<b>44</b>
2.2.1. Technical route.....	44
2.2.2. Identification of strains.....	45
2.2.3. Cultivation and Extraction.....	46
2.2.3.1. Solid state fermentation based on PDA medium.....	46
2.2.3.2. Solid state fermentation based on rice medium.....	46
2.2.3.3. Liquid static fermentation based on MEB medium.....	47
2.2.4. Isolation of nature products.....	47
2.2.5. Structure elucidation of compounds.....	49
2.2.6. Biological activity assay.....	49
<b>Chapter 3 Results.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. The isolation and structure elucidation of secondary metabolites     from <i>Diaporthe sp.</i> SXZ-19.....</b>	<b>51</b>

---

3.1.1. Introduction.....	51
3.1.2. Morphology and identification of strain SXZ-19.....	52
3.1.3. Cultivation and Extraction.....	52
3.1.4. Isolation.....	53
3.1.5. Structure elucidation.....	55
3.1.5.1. Compound D3.....	55
3.1.5.2. Compound D4.....	57
3.1.5.3. Compound D7.....	58
3.1.5.4. Compound D12.....	60
3.1.5.5. Compound D8.....	61
3.1.5.6. Compound D9.....	63
3.1.5.7. Compound D10.....	65
3.1.5.8. Compound D11.....	67
3.1.5.9. Compound D13 and D15.....	70
3.1.5.10. Compound D16.....	71
3.1.5.11. Compound D17.....	73
<b>3.2. The isolation and structure elucidation of secondary metabolites     from <i>Coprinus cinereus</i> 120.....</b>	<b>75</b>
3.2.1. Introduction.....	75
3.2.2. Morphology and identification of strain 120.....	76
3.2.3. Cultivation and Extraction.....	77
3.2.4. Isolation.....	76
3.2.5. Structure elucidation.....	80
3.2.5.1. Compound Ab-0.....	80
3.2.5.2. Compound Ea3.....	81
3.2.5.3. Compound B2.....	81
3.2.5.4. Compound Ea1 and Ea2 .....	82
3.2.5.5. Compound F1a2.....	82
3.2.5.6. Compound P1.....	83
3.2.5.7. Compound P2.....	85

---

3.2.5.8. Compound K4 and F2c4.....	86
3.2.5.9. Compound K3 and F2c3, F2a3.....	91
3.2.5.10. Compound K13b.....	95
3.2.5.11. Compound K13a.....	97
3.2.5.12. Compound K11.....	100
3.2.5.13. Compound K7.....	102
3.2.5.14. Compound K1 and K2.....	103
3.2.5.15. Compound K6 and K5.....	103
3.2.5.16. Compound K9.....	104
3.2.5.17. Compound K12.....	105
3.2.5.18. Compound F4b3 and F4b5.....	106
3.2.5.19. Compound F2A0.....	107
<b>3.3. The isolation and structure elucidation of secondary metabolites from <i>Coprinus plicatilis</i> 82.....</b>	<b>109</b>
3.3.1. Morphology and identification of strain 82.....	109
3.3.2. Cultivation and Extraction.....	110
3.3.3. Isolation.....	112
3.3.4. Structure elucidation.....	116
3.3.4.1. Compound Cr1.....	116
3.3.4.2. Compound Cr4.....	117
3.3.4.3. Compound Cr2 and Cr8.....	118
3.3.4.4. Compound Cr3.....	122
3.3.4.5. Compound Cr6.....	125
3.3.4.6. Compound Cr5 and Cm5, Cp2.....	127
3.3.4.7. Compound Cr9.....	131
3.3.4.8. Compound Cr10.....	133
3.3.4.9. Compound Cm1.....	135
3.3.4.10. Compound Cm3.....	137
3.3.4.11. Compound Cm4.....	138
3.3.4.12. Compound Cp1.....	140

---

3.3.5. Cytotoxicity of the new compounds.....	142
<b>3.4. The isolation and structure elucidation of secondary metabolites</b>	
<b>from <i>Coprinus niveus</i> 349.....</b>	<b>143</b>
3.4.1. Morphology and identification of strain 349.....	143
3.4.2. Cultivation and Extraction.....	143
3.4.3. Isolation.....	144
3.4.4. Structure elucidation.....	145
3.4.4.1. Compound Cn1.....	145
3.4.4.1. Compound Cn4.....	146
3.4.4.1. Compound Cn3.....	147
3.4.4.1. Compound Cn2.....	148
3.4.4.1 Compound Cn9.....	148
<b>Chapter 4 Discussion.....</b>	<b>151</b>
<b>4.1. Plant endophytic fungi produce abundant metabolites.....</b>	<b>151</b>
<b>4.2. Basidiomycetes produce novel bioactive terpenoids.....</b>	<b>152</b>
<b>4.3. Guanacastane-type diterpenoids.....</b>	<b>153</b>
<b>4.4. Conclusion.....</b>	<b>156</b>
<b>References.....</b>	<b>158</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>168</b>
<b>Publications.....</b>	<b>192</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>193</b>

## 摘 要

天然产物在新药开发和人类健康中占有重要地位。进入 20 世纪 90 年代后，基于天然产物的药物研发，在经历了抗生素发现的黄金时期后不可避免地进入了衰退期，但仍占有 30% 左右的比例。随着人们对微生物次级代谢产物的产生机制及其生理生态功能的深入了解，以及微生物发酵方法系统的改进，来源于微生物的天然产物研究再次受到重视。

本论文以一株药用植物内生真菌和三株鬼伞属 (*Coprinus* sp.) 担子菌为研究对象，对它们的次级代谢产物进行分离纯化和结构鉴定，共计分离并鉴定了 57 个单体化合物。通过去重复实际上得到了 46 个化学实体结构。其中 13 个为新结构。对其中部分新化合物的生物学活性进行了初步研究。

其中从喜树内生真菌 *Diaporthe* sp. SXZ-19 的次级代谢产物中分离并鉴定了 12 个化合物，主要为聚酮类化合物；其中化合物 **D17** 为新天然产物，仅有微弱细胞毒活性，10  $\mu\text{M}$  浓度下对人结肠癌细胞 (HCT 116) 生长抑制率为 11.4%。值得注意的是，化合物 **D9** (oblongolide P) 和 **D11** (oblongolide H) 互为立体异构体，为首次报道从同一株菌分离得到了 Oblongolides 差向异构体。

从灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*) 120 的次级代谢产物中分离得到了 25 个化合物，结构类型包括小分子有机酸类，真菌色素，脂肪酸，甾体化合物，倍半萜以及三萜类化合物。其中 4 个高度乙酰化的羊毛甾烷型三萜为新结构。*Coprinus cinereus* 120 的主要代谢产物 **K4** 和 **K3** (新结构) 分别命名为 Coprinacin A 和 B，它们对人宫颈癌细胞 (HeLa) 表现出中等细胞毒性， $\text{IC}_{50}$  值分别为 34.6  $\mu\text{M}$  和 41.0  $\mu\text{M}$ 。

从褶纹鬼伞 (*Coprinus plicatilis*) 82 的次级代谢产物中分离得到了 15 个化合物，主要结构类型为具 Guanacastane 型骨架的二萜。首先从大米培养基固态发酵提取物中分离得到了 5 个新的二萜，随后为发掘新的代谢产物，采用 PDA 培养基和 MEB 液体静置发酵获得了 3 个新 Guanacastane 型二萜。新化合物 **Cr2**, **Cr3**, **Cr6** 和 **Cr5** 分别命名为 plicatilisins A-D，并测试了它们对 6 种肿瘤细胞株 (HepG2, HeLa, MDA-MB-231, BGC-823, HCT 116 和 U2OS) 的抑制作用，其中 plicatilisins A 活性最强，其  $\text{IC}_{50}$  值均在 6.0  $\mu\text{M}$  以下 (U2OS 除



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫