

沉香中苜基丙酮及其在黄绿墨耳真菌 中的生物转化

戚树源 林立东 叶勤法

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

沉香是我国名贵药材和香料,是白木香(*Aquilaria sinensis*(Lour.) Gilg.)木材组织与感染的黄绿墨耳真菌相互作用形成的^[1],沉香的品质由沉香倍半萜及沉香色酮类化合物决定^[2,3]。沉香色酮类化合物与常见的具有 C₆-C₃-C₆ 结构的黄酮类化合物不同,沉香色酮类化合物的 B 环是 2-[2-苜基],具有 C₆-C₃-C₂-C₆ 的结构模式,为新的色酮类化合物结构^[4]。在真菌代谢和沉香形成研究中发现苜基丙酮可被真菌代谢并与沉香色酮类化合物形成有关。本文从应用黄绿墨耳真菌感染白木香木材组织产生的沉香中分离鉴定苜基丙酮,研究其对黄绿墨耳真菌生长和代谢的影响,为进一步研究沉香形成机理提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

参照文献[5]的方法,在中国科学院华南植物研究所华南植物园用黄绿墨耳真菌(*Melanotus flavotivens* (B. & C.) Sing.)感染白木香木材组织制备沉香,黄绿墨耳真菌购自中国科学院微生物研究所菌种保藏室,苜基丙酮(Benzylacetone)标准品购自 Sigma 公司。

1.2 真菌培养及生长测定。

黄绿墨耳真菌在马铃薯固体培养基培养,置 10℃ 冰箱保存,每 2~3 个月继代一次。真菌体培养在马铃薯液体培养基中进行。150ml 三角瓶,加入 25ml 马铃薯液体培养液,接入真菌菌丝,于 25℃,转速为 120r/min,振荡培养,每隔 24h 取出 3 瓶培养物,用尼龙网滤出菌丝体,60℃ 干燥 24h,称重,测定真菌生长。马铃薯培养液为每升培养液添加 20% 马铃薯汁,葡萄糖 20g,磷酸二氢钾 3g,硫酸镁 1.5g, B₁ 1mg。马铃薯固体培养基添加 8g 琼脂。

1.3 苜基丙酮的分离鉴定

沉香材料,粉碎,按文献[5]方法提取和皂化,中性部分用硅胶柱层析和薄层层析分离,苜基丙酮单体经质谱和氢谱鉴定。黄绿墨耳真菌菌丝材料 60℃ 干燥,按上述方法分离鉴定苜基丙酮等化合物。

EI-MS(m/e):148(M⁺), 133(M⁺-CH₃), 115, 105, 91, 71

¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 7.14~7.32(m, 5H), 2.14(s, 3H), 2.77(t, 2H, J=9.09Hz), 2.90(t, 2H, J=9.09Hz)

光谱数据与苜基丙酮标准品相同。

1.4 苜基丙酮生物转化

按上述条件接种培养 5d 后,加入 0.8g/L 的苜基丙酮继续培养,每隔 24h 取出 3 瓶,用尼龙网滤出菌丝体,培养液和菌丝体分别用乙醚提取,回收乙醚,用高效液相色谱分析苜基丙酮转化产物;或在培养

广东省自然科学基金资助项目(960474)。

收稿日期:1997-07-21,修回日期:1998-03-31。

5d 的真菌液体培养液中,分别加入 0.25, 0.50, 0.80, 1.00, 2.50 和 10.00g/L 苜基丙酮,每组 3 瓶,继续培养 10d,用上述方法分析苜基丙酮转化产物。

1.5 HPLC 分析

HPLC 分析仪为 Beckman 421, ALTEX Ultrasphere™-Si 柱, dp5u, ϕ4.6mm × 25cm, 溶剂为环己烷:乙酸乙酯(60:40), 流速 0.8ml/min。

1.6 GC-MS 分析

GC-MS 分析参照文献[5]的方法进行。

1.7 苜基-2-丙醇和苯乙醇的分离鉴定

用 HPLC 分析苜基丙酮生物转化产物,表明苜基丙酮被转化为 2 个产物。用薄层层析分离,光谱鉴定其结构分别为:

苜基-2-丙醇:

EI-MS(m/e):150(M⁺), 132(M⁺-H₂O), 117(100), 105, 91, 78

¹H-NMR(CDCl₃)σppm:7.20~7.35(m, 5H), 3.85~3.90(m, 2H), 2.64~2.80(m, 2H), 1.63~1.85(m, 2H), 1.27(d, 3H, J=5.30Hz)

苯乙醇:

EI-MS(m/e):122(M⁺), 104, 91(100), 77

¹H-NMR(CDCl₃)σppm:7.26~7.40(m, 5H), 3.87~3.91(m, 2H), 2.9(t, 2H, J=6.60Hz)

2 结果

2.1 黄绿墨耳真菌生长

黄绿墨耳真菌在 20% 马铃薯液体培养基中生长呈标准 S 型曲线,第 3 天进入对数生长期,第 11 天开始进入细胞生长静止期,在对数生长期期间,细胞平均生产率为 2.28g/L·d(图 1)。

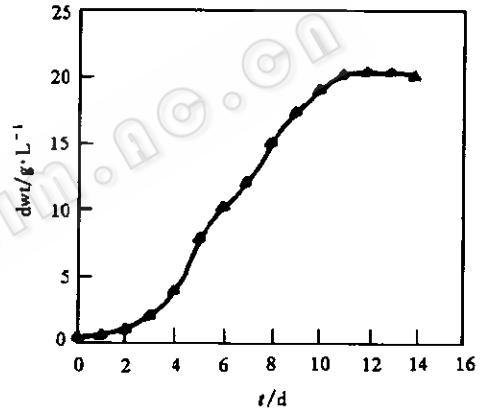


图 1 黄绿墨耳真菌生长

2.2 苜基丙酮生物转化及对黄绿墨耳真菌生长的影响

在黄绿墨耳真菌中,苜基丙酮被转化为苜基-2 丙醇和苯乙醇。苜基丙酮在培养液中浓度大于 1g·L⁻¹时,真菌生长完全受抑制,苜基丙酮浓度为 2.5g·L⁻¹时,苜基丙酮的转化产物为苜基-2-丙醇,随着培

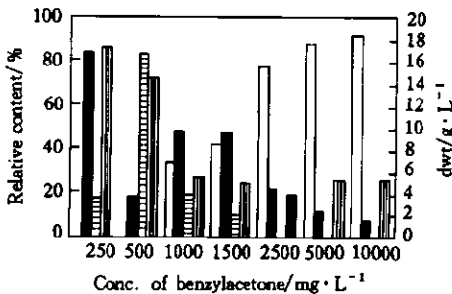


图 2 苜基丙酮浓度对黄绿墨耳真菌生长和代谢的影响

□ 苜基丙酮; ■ 苜基-2-丙醇; ▨ 苯乙醇; ▤ dwt/g·L⁻¹

养液中苜基丙酮浓度增加,苜基丙酮转化率下降,当培养液浓度为 10g·L⁻¹时,只有 8% 的苜基丙酮转化为苜基-2-丙醇(图 2)。

2.3 在黄绿墨耳真菌中苜基丙酮生物转化产物的形成

在黄绿墨耳真菌中加入苜基丙酮,培养 12h,26% 的苜基丙酮被转化为苜基-2-丙醇,但未检出苯乙醇,培养 96h 后,检出 4% 的苯乙醇,此后苯乙醇产物含量随培养时间增加而增加,216h 后,苯乙醇产物含量为 48%,是苜基丙酮在黄绿墨耳真菌中生物转化的主要产物(图 3)。

3 讨论

3.1 苜基丙酮的形成

在白木香木材组织感染黄绿墨耳真菌形成的沉香中检出苜基丙酮,与杨峻山等人在国产沉香^[6]和国外学者在沉香植物(*A. agallacha* Roxb)中检出的结果一致^[7],但健康的白木香木材组织没有苜基丙酮^[5]。正常生长的黄绿墨耳真菌菌丝的提取物,经GC-MS分析,也没有检出苜基丙酮、苜基-2-丙醇和苯乙醇等有关化合物。苜基丙酮对黄绿墨耳真菌生长有抑制作用,说明苜基丙酮是白木香木材组织感染黄绿墨耳真菌后产生的一种植物抗毒素,苜基丙酮的形成可能与白木香木材组织细胞的自我保护机制有关。

3.2 苜基丙酮生物转化途径

在黄绿墨耳真菌中,苜基丙酮首先被转化为苜基-2-丙醇,真菌加入苜基丙酮培养72h,近50%苜基丙酮被转化为苜基-2-丙醇,培养96h,只有近4%的苯乙醇产生,培养216h后,苜基丙酮为16%,苜基-2-丙醇为35%,苯乙醇为49%(图3)。根据生物转化产物被检出的先后顺序,苜基丙酮生物转化模式可能是:苜基丙酮→苜基-2-丙醇→苯乙醇(图4)。

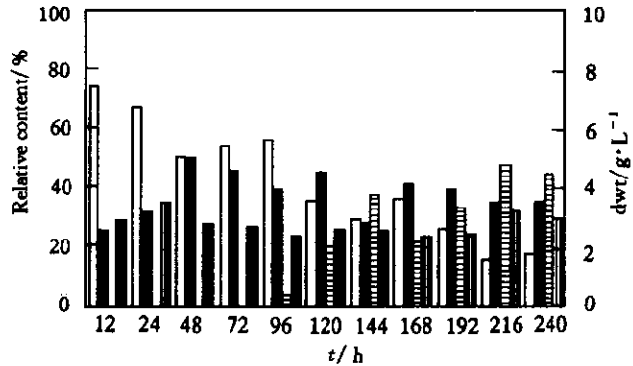


图3 苜基丙酮生物转化

□ 苜基丙酮; ■ 苜基-2-丙醇; ▨ 苯乙醇; ▤ dwt/g·L⁻¹

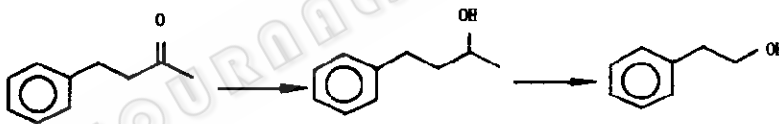


图4 苜基丙酮生物转化途径

在白木香木材组织感染黄绿墨耳真菌形成的沉香中没有检出苜基-2-丙醇和苯乙醇,进口沉香也没有检出上述化合物的报道。但在沉香中检出近30种沉香色酮类化合物^[1],沉香色酮类化合物的B环具有独特的2-[2-苜基乙基]的结构,在沉香的形成中,苜基丙酮被真菌生物转化产生的苯乙醇可能参与沉香色酮类化合物B环生物合成。

参 考 文 献

- Qi S Y. In: Bajaj Y P S ed, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 33, *Medicinal and Aromatic Plants V II*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995, pp36~46
- Yamagta E, Yoneda K. *Shoyakugaku Zasshi*. 1986, 40:275~280
- Shimada Y, Tominaga T, Kiyosawa S. *Yakugaku Zasshi*. 1986, (106):391~397
- Yoshii E, Koizumi T, Oribe T. *Tetrahedron Letter*, 1978, (41):3921~3924
- 戚树源, 陆碧瑶, 朱亮峰等. *植物生理学通讯*, 1992, 28(5):336~339
- 杨峻山, 王玉兰, 苏亚伦等. *药学报*, 1989, 24(4):264~268

7 杨峻山, 陈玉斌. 药学学报, 1983, 18(3): 191~198

Benzylacetone in Agarwood and Its Biotransformation By *Melanotus Flavolivens*

Qi Shuyuan Lin Lidong Ye Qinfa

(South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650)

Abstract Benzylacetone is a component in agarwood. Benzylacetone can be biotransformed into benzyl-2-propylalcohol and phenylethanol by fungi *Melanotus flavolivens* (B & C) Sing. The formation of benzylacetone in agarwood and the biotransformation of benzylacetone may be relative to the biosynthesis of 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives in agarwood.

Key words *Melanotus flavolivens* (B. & C.) Sing, biotransformation, benzylacetone, benzyl-2-propylalcohol, phenylethanol