

## 南海红树林内生真菌 ZZF13 次级代谢产物的研究\*

夏雪奎<sup>1,2</sup>, 李 庆<sup>2</sup>, 邵长伦<sup>2</sup>, 刘昌衡<sup>1</sup>, 余志刚<sup>2</sup>, 林永成<sup>2</sup>

(1. 山东省科学院应用微生物重点实验室//中日友好生物技术研究中心, 山东 济南 250014;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

**摘 要:** 红树林内生真菌 ZZF13, 为湛江红树林秋茄内生真菌, 种属尚未鉴定。从该菌的培养液中分离得到 5 个化合物, 通过波谱解析以及文献对照, 分别鉴定为 skyrin (1), lichenxanthone (2), griseoxanthone C (3), 1, 3, 6-三羟基-8-甲基-Xanthone (4), 5, 7-二羟基-2-甲基色原酮 (5), 初步的药理活性显示, 化合物 1 和 5 对 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 的 MIC 分别为 100 和 100  $\mu\text{g/mL}$ 。

**关键词:** 红树林内生真菌; 次级代谢产物; 生物活性

**中图分类号:** O629 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 04-0133-04

## The Secondary Metabolites of the Mangrove Endophytic Fungus (ZZF13) from the South China Sea

XIA Xuekui<sup>1,2</sup>, LI Qing<sup>2</sup>, SHAO Changlun<sup>1</sup>, LIU Changheng<sup>1</sup>, SHE Zhigang<sup>2</sup>, LIN Yongcheng<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory for Applied Microbiology of Shandong Province, Biotechnology Center of

Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The secondary metabolites of the fungus ZZF13 were first isolated from the leaves of the mangrove sample *Kandelia candel* in Zhanjiang. Five compounds were isolated from the culture of this strain. They were determined to be skyrin (1), lichenxanthone (2), griseoxanthone C (3), 1, 3, 6-trihydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one (4) and 5, 7-dihydroxy-2-methyl-4H-chromen-4-one (5) by comprehensive spectroscopic analysis. Compounds 1 and 5 showed inhibitory activities against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 with MIC values of 100 and 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

**Key words:** mangrove endophytic fungus; secondary metabolites; biological activity

红树林是生长在热带和亚热带海湾河口潮间带的植被, 属常绿阔叶林, 它覆盖了全球海岸线的将近 1/4, 但绝大部分分布在南北纬 20° 之间。红树林生态系统中蕴藏中丰富的动植物资源和微生物资源。红树林栖息地被证明是真菌新种属的丰富来源, 形成了海洋真菌第二大的生态学亚类。本研究小组率先开展了南海红树林真菌的研究工作, 已经分离出一批骨架新颖、生物活性较好的化合物<sup>[1-4]</sup>。

红树林内生真菌 ZZF13, 为湛江红树林秋茄内生真菌, 种属尚未鉴定。通过继续培养并研究该菌株的次级代谢产物<sup>[5]</sup>, 又发现了 1 个醌类化合物 (quinones) 和 4 个吡喃酮类 (Xanthenes) 化合物。

### 1 结果和讨论

1.1 结构解析 化合物 1 是黄色固体。EIMS  $m/z$  538  $[\text{M}]^+$ , 化合物分子式为  $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ , 提示分子中可能存在着芳香环。

\* 收稿日期: 2009-01-07

基金项目: 国家“863”科技攻关计划资助项目 (2006AA09Z422, 2006AA09Z419); 国家自然科学基金资助项目 (20572136); 广东省自然科学基金资助项目 (05003268)

作者简介: 夏雪奎 (1980 年生), 男, 博士; 通讯作者: 余志刚, 林永成; E-mail: ceshzhg@sysu.edu.cn

在 $^1\text{H}$  NMR谱中,化学位移低场值( $\delta$  11.17, 12.03, 12.76)暗示分子中有3个整合羟基。 $\delta_{\text{H}}$  7.27 (1H, d)和7.13 (1H, d)为苯环上间位氢,6.7 (s)为苯环上的氢, $\delta_{\text{H}}$  2.23 (3H, s)为甲基氢; $^{13}\text{C}$  NMR显示1个 $\text{CH}_3$  ( $\delta$  21.3),2个羰基( $\delta$  189.3, 181.9),12个不饱和碳( $\delta$  107.0, 108.7, 113.0, 120.2, 123.3, 123.3, 131.1, 133.1, 147.9, 160.9, 160.9, 164.2),其中3个为叔碳,11个为季碳,共15个碳原子,结合质谱,这说明1具有对称结构,EIMS谱中的碎片峰( $m/z$  269)也验证了这个推测。综合上述谱图信息,推断化合物1属于蒽醌类化合物。和文献[6]对照,最后确定该化合物为skyrin。

化合物2,为无色针状晶体,溶于甲醇。从FABMS谱得到其分子离子峰 $m/z$  287  $[\text{M} + 1]^+$ ;结合NMR推出其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ ,计算得其不饱和度10。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , TMS)中,8组信号峰出现,其中 $\delta_{\text{H}}$  13.36 (1H, s)位于低场,并且是尖峰,说明其为一活泼氢信号,此氢原子应与羰基相邻形成分子内氢键, $\delta_{\text{H}}$  6.86 (1H, d)、6.80 (1H, d)、6.44 (1H, d)、6.29 (1H, d)为苯环上间位氢信号, $\delta_{\text{H}}$  3.96 (3H, s)和3.92 (3H, s)为甲氧基上的氢信号, $\delta_{\text{H}}$  2.81 (3H, s)应为与苯环相连的甲基氢。 $^{13}\text{C}$  NMR和DEPT谱图中,化合物2结构中有9个季碳,其中包括1个羰基季碳 $\delta_{\text{C}}$  182.51,另外的为163.88, 96.81, 165.94, 92.09, 157.06, 159.52, 98.53, 163.89, 115.45, 143.60, 113.05, 104.20,两个甲氧基碳 $\delta_{\text{C}}$  55.60和55.65,一个甲基碳 $\delta_{\text{C}}$  23.3。与标准谱图对照<sup>[7]</sup>,推测化合物为Lichenxanthone。

George等<sup>[8]</sup>从巴西坚树 *Gustavia hexapetala* 中分到Lichenxanthone,并其细胞毒活性进行了测定,体外实验表明,Lichenxanthone对淋巴白血病P388、胰腺癌细胞BXPC-3、乳腺癌细胞MCF-7、中枢神经胶质母细胞瘤SF268、肺大细胞癌NCI-H460、结肠腺癌细胞KM20L2、前列腺癌细胞DU-145的具有良好的抗癌、抗肿瘤活性。此外,也有文献[9]报道,化合物2有较好的抑菌活性,可以对其进行进一步的结构改造。

此外,从真菌ZZF13的培养液中分离还得到化合物2的类似化合物—Griseoxanthone C (3),二者的区别在于2的一个甲氧基变成了羟基。FABMS  $[\text{M}]^+$ 为272,的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ,计算不饱和度为7; $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , TMS)中, $\delta_{\text{H}}$

13.40 (1H, s), 9.79 (br s)为活泼氢信号, $\delta_{\text{H}}$  6.40 (1H, d)和6.26 (1H, d), 6.72 (1H, d), 6.72 (1H, d)为苯环上间位氢, $\delta_{\text{H}}$  2.23 (3H, s)为甲基,3.92 (s)为氧甲基。最后确定该化合物为Griseoxanthone C。

化合物4,白色晶体,从FABMS谱得到其分子离子峰 $m/z$  259  $[\text{M} + 1]^+$ ;推出其分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_5$ ,计算得其不饱和度为10。

$^1\text{H}$  NMR中,6组信号峰出现,其中 $\delta_{\text{H}}$  13.43 (1H, s)为一活泼氢信号,并且由于在低场的尖峰,说明这个活泼应与羰基碳相邻,形成分子内氢键; $\delta_{\text{H}}$  9.65 (2H, br s)是苯环上的2个酚羟基氢; $\delta_{\text{H}}$  6.30 (1H, d, 2.0)和6.18 (1H, d, 2.0)为苯上间位的氢信号,另外还有 $\delta_{\text{H}}$  6.69 (2H, s)和2.78 (3H, s)这2个信号出现。

$^{13}\text{C}$  NMR和DEPT谱图中,化合物4结构中有9个季碳,其中包括1个羰基季碳 $\delta_{\text{C}}$  182.0,另外的为 $\delta_{\text{C}}$  164.4, 163.9, 162.4, 159.3, 157.1, 143.4, 111.7, 102.8;4个烯碳的CH  $\delta_{\text{C}}$  115.9, 100.5, 97.7, 93.0和一个甲基碳 $\delta_{\text{C}}$  22.4。与文献[10]对照,确定为1,3,6-三羟基-8-甲基-Xanthone。

化合物5,为淡黄色针状晶体,FABMS  $[\text{M}]^+$ 为192,化合物的分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$ ,计算不饱和度为7; $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , TMS)中, $\delta_{\text{H}}$  11.12 (1H, s)为活泼氢信号, $\delta_{\text{H}}$  6.38 (1H, d)和6.37 (1H, d)为苯环上间位氢,其它的位于 $\delta_{\text{H}}$  6.36 (1H, s)和2.23 (3H, s),查阅文献[11],综合以上信息,推得化合物5为5,7-二羟基-2-甲基色原酮。

1.2 抗菌活性测试 化合物1和5的活性较弱,其最小抑制浓度为100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以氨苄青霉素为阳性对照,最小抑制浓度为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 2 实验部分

2.1 实验试剂及仪器 美国Varian公司INOVA 300NB超导核磁共振仪;VG ZAB-HS质谱仪;德国Elementar公司VarioEL CHNS-O元素分析仪;北京泰克仪器公司的X-4数字显示显微熔点测试仪。所用试剂均为广州化学试剂厂生产,化学纯,溶剂经重蒸后使用。柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的200~300目硅胶,硅胶H,薄层硅胶GF254。

2.2 菌种及其测试菌 内生真菌ZZF13由生命科学院周世宁教授提供。菌种保存在中山大学。测试菌株 *Bacillus subtilis* ATCC 6633由中山大学生命

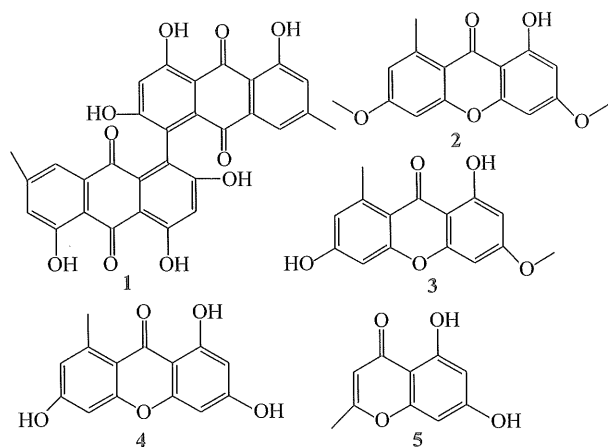


图1 化合物1, 2, 3, 4, 5的化学结构式

Fig. 1 Structure of 1, 2, 3, 4, 5

科学学院陈志仕博士惠赠, 保存在中山大学化学学院天然产物实验室。

**2.3 菌种发酵培养** 采用悬浮培养方式发酵培养基 ( $w/\%$ ): 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.2, 酵母膏 0.1, 粗海盐 0.25, pH 7.0。500 mL 三角瓶, 内装培养液 300 mL, 经 121 °C (0.1 MPa) 高温灭菌 25 min 后在超净工作台上接种。共接种 150 L, 25 °C 静置培养 28 d。

**2.4 提取分离** 发酵液用纱布过滤将菌体和培养液分离并分别收集, 培养液浓缩, 150 L 浓缩至 4 L, 乙酸乙酯提取。提取浓缩物分别拌硅胶过柱, 以石油醚/乙酸乙酯/甲醇梯度淋洗。收集各组份再经反复柱层析, 制备薄层层析和重结晶纯化后分别得到化合物 1 (200 mg), 2 (12 mg), 3 (13 mg), 4 (25 mg), 5 (15 mg)。

**2.5 抗菌活性实验** 采用液体二倍稀释法<sup>[12]</sup>测定了化合物对 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 的抗菌活。

**2.6 化合物的物理和波谱数据** 化合物 1, 黄色固体,  $\theta_{mp} > 300$  °C。EIMS  $m/z$  538  $[M]^+$ ,  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 12.76 (s, 1H), 12.03 (s, 1H), 11.17 (s, 1H), 7.27 (d, 1.5 Hz, 1H), 7.13 (d, 1H), 6.70 (s, 1H), 2.33 (s);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta_C$ : 189.3 (C), 181.9 (C), 164.2 (C), 160.9 (C), 160.9 (C), 147.9 (C), 133.1 (C), 131.8 (C), 123.3 (C), 123.3 (CH), 120.2 (CH), 113.0 (C), 108.7 (C), 107.0 (CH), 21.3 (CH<sub>3</sub>)。

化合物 2, 无色针状晶体,  $\theta_{mp}$  175 ~ 176 °C。FABMS: 287  $[M + 1]^+$ 。  $^1H$  NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, TMS)  $\delta_H$ : 13.36 (1H, s), 6.86 (1H, d), 6.80

(1H, d), 6.77 (1H, d), 6.29 (1H, d), 3.96 (3H, s), 3.92 (3H, s), 2.81 (3H, s);  $^{13}C$  NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, TMS)  $\delta_C$ : 182.51 (C), 165.94 (C), 163.88 (C), 163.89 (C), 159.52 (C), 157.06 (C), 143.60 (C), 115.45 (CH), 103.08 (C), 104.2 (C), 98.53 (CH), 96.81 (CH), 92.09 (CH), 55.65 (CH<sub>3</sub>), 55.60 (CH<sub>3</sub>), 23.31 (CH<sub>3</sub>)。

化合物 3, 白色晶体,  $\theta_{mp}$  209 ~ 211 °C。FABMS  $m/z$  272  $[M]^+$ 。  $^1H$  NMR (Acetone- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 13.40 (1H, s), 9.62 (1H, br s), 6.69 (2H, s), 6.30 (1H, d, 2.0), 6.18 (1H, d, 2.0), 3.92 (3H, s), 2.78 (3H, s);  $^{13}C$  NMR (Acetone- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta_C$ : 182.0 (C), 164.4 (C), 163.9 (C), 162.4 (C), 159.3 (C), 157.1 (C), 143.4 (C), 111.7 (C), 102.8 (C), 115.9 (CH), 100.5 (CH), 97.7 (CH), 93.0 (CH), 56.3 (CH<sub>3</sub>), 22.4 (CH<sub>3</sub>)。

化合物 4, 黄色针状,  $\theta_{mp}$  227 ~ 229 °C。FABMS  $m/z$  259  $[M + 1]^+$ 。  $^1H$  NMR (Acetone- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 13.43 (1H, s, 1-OH), 9.65 (2H, br s, -OH), 6.18 (1H, d, 2.0), 6.30 (1H, d, 2.0, H), 6.69 (1H, s, H), 6.69 (1H, s, H), 2.78 (3H, s, CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (Acetone- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta_C$ : 182.0 (C), 164.4 (C), 163.9 (C), 162.4 (C), 159.3 (C), 157.1 (C), 143.4 (C), 111.7 (C), 115.9 (CH), 102.8 (C), 100.5 (CH), 97.7 (CH), 93.0 (CH), 22.4 (CH<sub>3</sub>)。

化合物 5, 红色粉末,  $\theta_{mp}$  273 ~ 274 °C。EIMS  $m/z$  192  $[M]^+$ 。  $^1H$  NMR (Acetone- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 11.12 (1H, s, OH), 6.38 (1H, d, 1.2 Hz), 6.37 (1H, d, 1.2 Hz), 6.36 (1H, s), 2.23 (3H, s, CH<sub>3</sub>)。致谢: 菌株 ZZF13 由中山大学生命科学院周世宁教授提供, 在此表示感谢。

#### 参考文献:

- [1] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. A novel *N*-cinnaomoylcyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain #2508) from the South China Sea[J]. Tetrahedron Letters, 2001, 42: 449.
- [2] 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]. J Org Chem, 2001, 66: 6252.
- [3] XIA X K, SHE Z G, LIN Y C, et al. Methoxyvermistatin and hydroxyvermistatin from the mangrove endophytic fungus *Guignardia* sp. (NO. 4382) from the South China

- Sea[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2007, 90: 1925.
- [4] XIA X K, SHE Z G., LIN Y C., et al.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR assignments for five anthraquinones from the mangrove endophytic fungus *Halorosellinia* sp. (No. 1403) [J]. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2007, 45: 1006.
- [5] XIA X K, YANG L G., SHE Z G., et al. Two new acids from mangrove Endophytic fungus (No. ZZ13) [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2008, 44: 416.
- [6] 何亚琼, 胡丰林, 左登平, 等. 一种被毛抱中天然色素的提取分离和结构鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(11): 121.
- HE Y Q, HU F L, ZUO D P, et al. Isolation and identification of a natural pigment from mycelia of a strain of *Hirsutella* sp. [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(11): 121.
- [7] PETTIT G R, ZHANG Q W, PINILLA V, et al. Isolation and structure of Gustastatin from the Brazilian Nut Tree *Gustavia hexapetala* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67: 983.
- [8] JEAN D W, JEAN W, ALAIN F K W, et al. Alkaloids from *Oriopsis glaberrima* Engl. (Rutaceae) [J]. *Phytochemistry*, 2006, 57: 475.
- [9] DAI J Q, KARSTEN K, ULRICH F, et al. Metabolites from the Endophytic Fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre* [J]. *Eur J Org Chem*, 2006: 3498.
- [10] MUTANYATTA J, MATAPA B G, SHUSHU D D, et al. Homoisoflavonoids and xanthenes from the tubers of wild and *in vitro* regenerated *Ledebouria graminifolia* and cytotoxic activities of some of the homoisoflavonoids [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 797.
- [11] MANTAS Deretey E, FERRETTI F H, et al. Structural analysis of flavonoids with anti-HIV activity [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2000, 504: 171.
- [12] 李安生, 吴绍熙. 体外抗真菌药物敏感性实验的方法学进展 [J]. *国外医学: 皮肤性病学分册*, 1997, 23(5): 265.
- LI A S, WU S X. Process in methodology of *in vitro* anti-fungal susceptibility tests [J]. *Foreign Medical Sciences: Section of Dermatology and Venereology*, 1997, 23(5): 265.
- 
- (上接第 129 页)
- [7] 郑振华, 周培疆, 吴振斌. 复合污染研究的新进展 [J]. *应用生态学*, 2001, 16(3): 469-473.
- ZHENG Zhenhua, ZHOU Peijian, WU Zhenbin. New advances in research of combined pollution [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(3): 469-473.
- [8] TESSIER A, COMBELL P G C, BISSON M. Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals [J]. *Analytical Chemistry*, 1979, 51(7): 844-850.
- [9] GOMMY C, PERDRIX E, GALLOO J C, et al. Metal speciation in soil: extraction of exchangeable cations from a calcareous soil with a magnesium nitrate solution [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1998, 72: 27-45.
- [10] 徐畅, 高明. 土壤中镁的化学行为及生物有效性研究进展 [J]. *微量元素与健康研究*, 2007, 24(5): 51-54.
- XU Chang, GAO Ming. The development of research about transfoemation and bioavailability of magnesium in soil [J]. *Study of Trace Element and Health*, 2007, 24(5): 51-54.
- [11] PUEYO M, LÓPEZ-SANCHEZ J F, RAURET G. Assessment of  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 504: 217-226.
- [12] SINGH B R, NARWAL R P. Plant Availability of Heavy Metals in a Sludge-Treated Soil: II. Metal Extractability Compared with Plant Metal Uptake [J]. *Journal of Environment Qulity*, 1984, 13: 344-349.
- [13] 邹晓锦, 仇荣亮, 黄穗虹. 大宝山矿区重金属污染对作物的生态毒性研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2006, 26(增刊): 479-483.
- ZOU Xiaojin, QIU Rongliang, HUANG Suihong. Effect of mining contamination in Dabao mountain on plant ecotoxicity [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(Sup.): 479-483.
- [14] FENG M H, SHAN X Q, ZHANG S Z, et al. A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA,  $\text{CaCl}_2$ , and  $\text{NaNO}_3$  extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley [J]. *Environmental Pollution*, 2005, 137: 231-240.
- [15] BRUN L A, MAILLET J, HINSINGER P, et al. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils [J]. *Environmental Pollution*, 2001, 111: 293-302.
- [16] CHAIGNON V, SANCHEZ-NEIRA I, HERRMANN P, et al. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area [J]. *Environmental Pollution*, 2003, 123: 229-238.