

Cu(II)促进海洋真菌 *Fusarium* sp. ZZF51 产生代谢产物二(5-丁基-2-吡啶甲酸-N1,O2)合铜(II)的研究

谭倪^{1,2}, 邵长伦^{2,3}, 何丽仙², 潘嘉慧², 余志刚², 林永成²

(1. 南华大学化学化工学院, 湖南 衡阳 421001;

2. 中山大学化学化工学院, 广东 广州 510275;

3. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 从南海红树林内源真菌 *Fusarium* sp. ZZF51 的培养液中分离得到一金属络合物(1), 通过波谱数据和单晶衍射数据解析其结构为二(5-丁基-2-吡啶甲酸-N1, O2)合铜(II)。为提高其产量, 研究了 Cu(II) 对络合物(1) 产量和菌株生长的影响, 结果表明: 在参与真菌 *Fusarium* sp. ZZF51 代谢活动的过程中, Cu(II) 能显著促使络合物(1) 的产生, 但对真菌的生长影响甚微。

关键词: Cu(II); *Fusarium* sp. ZZF51; 代谢产物; 二(5-丁基-2-吡啶甲酸-N1, O2)合铜(II)

中图分类号: O656.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 04-0059-04

海洋微生物代谢产物经过近四十多年来的研究, 到目前为止, 已有一万多种化合物被分离出来^[1], 而且每年还有几百种新化合物陆续被发现^[2-3]。本研究组在不断从海洋微生物筛选新药的过程中, 已发现多种结构奇特而且具有强生理活性的化合物^[4-8]。

红树林内源真菌 *Fusarium* sp. ZZF51, 采自湛江, 菌种保存在中山大学。使用 GYP 培养基, 于实验室静置发酵培养真菌 ZZF51 140 L, 从该菌培养液的乙酸乙酯萃取部分分离得到一金属络合物(1), 通过波谱数据和单晶衍射数据等解析它为: 二(5-丁基-2-吡啶甲酸-N1, O2)合铜(II) bis(5-butyl-2-pyridinecarboxylato-N1, O2)-copper。络合物(1) 是首次从自然界中被发现, 它对4种细菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌)和3种癌细胞(KB、KBv200、HepG2)具有较强抑制活性, 前者最低抑菌浓度(MIC值)分别为12.5、25、12.5和50 $\mu\text{g/mL}$, 后者 IC₅₀ 值分别为3.54、3.68和25.12 $\mu\text{g/mL}$ 。为提高络合物(1)的产量, 研究了 Cu(II) 对络合物(1) 产量和菌株生长的影响, 结果表明: Cu(II) 在参与真菌 *Fusarium* sp. ZZF51 代谢活动的过程中, 能够大大促

使络合物(1) 的产生, 而对真菌的生长几乎没有影响。

1 结果与讨论

1.1 络合物(1) 的结构鉴定

真菌培养液的乙酸乙酯提取物经硅胶柱层析, 从乙酸乙酯/石油醚(体积比为90/10)的洗脱液中得到了络合物(1), 络合物(1) 为蓝色晶体, 熔点 253~254 $^{\circ}\text{C}$ 。氢谱所提供的信息很简单, 仅在化学位移 δ 0.896~1.668 和 10.013~11.326 出现两个大包, 碳谱信息更少, 可能出现偏场现象, 这暗示分子内很可能存在着金属元素。事实上, 显微电镜(能谱)分析证实了化合物中含有铜元素(图1)。红外光谱显示分子中存在羰基(1653 cm^{-1})及饱和脂肪烃(2929, 1342, 701 cm^{-1})等基团。碳、氢、氧、氮、硫元素分析表明分子中含有碳、氢、氧、氮四种元素, 结合 HR-EIMS (m/z 419.1019, 计算值为 419.1027) 可以得出该化合物的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{CuN}_2\text{O}_4$ 。不饱和度 $U=10$, 提示分子中可能存在两个芳环。X射线单晶衍射数据很直观地表征了分子的结构(图2)。综合上述信息可推知络合物(1) 为二(5-丁基-2-吡啶甲酸-N1, O2)合铜(II)。

* 收稿日期: 2008-03-03

基金项目: 国家863计划资助项目(2006AA09Z422); 国家自然科学基金资助项目(20072058); 广东省自然科学基金重点资助项目(021732); 南华大学博士启动基金资助项目(5-2007-XQD-002)

作者简介: 谭倪(1970年生), 男, 博士, 副教授; 通讯联系人: 林永成; E-mail: ceslyc@mail.sysu.edu.cn

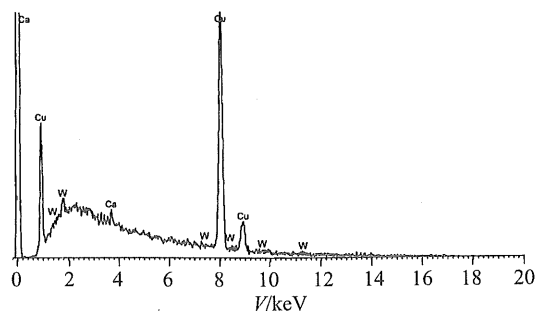


图 1 二(5-丁基-2-吡啶甲酸-N1, O2)

合铜(II)的显微电镜(能谱)分析图

Fig. 1 Energy dispersive X-ray pattern of coordination bis(5-butyl-2-pyridinecarboxylato-N1, O2)-copper(II)

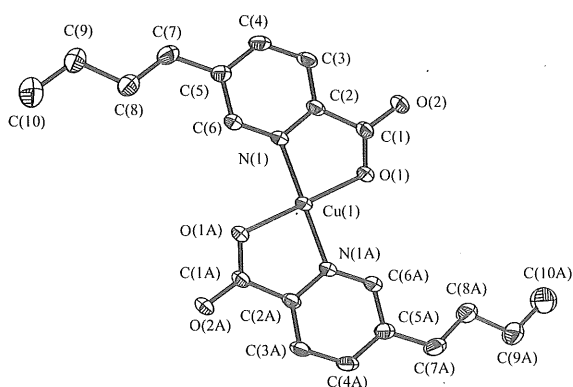


图 2 二(5-丁基-2-吡啶甲酸-N1, O2)

合铜(II)的分子结构图

Fig. 2 Molecular structure of coordination

bis(5-butyl-2-pyridinecarboxylato-N1, O2)-copper(II)

1.2 Cu(II)对真菌产生络合物(1)的影响

配制一系列含不同 Cu(II) 浓度的 GYP 培养基, 经接种, 静置发酵培养后, 以乙酸乙酯进行提取, 观察到乙酸乙酯提取物的颜色随 GYP 培养基中 Cu(II) 浓度的升高而呈现出从浅红到浅绿, 再到浅蓝的变化规律。为更深层次探索到 Cu(II) 对真菌产生络合物(1)的影响, 以络合物(1)紫外光谱中的一个特征吸收波长光(λ 269.50 nm)为入射光源, 对前面一系列乙酸乙酯提取液进行紫外吸收检测, 检测结果表明溶液吸光度随着 GYP 培养基中 Cu(II) 浓度的升高而增大(图 3), 当 CuCl₂ 浓度在 0 ~ 8.33 mg/L 之间时, 这种现象表现得尤为突出。这就是说, 真菌产生络合物(1)在很大程度上受到了培养基中 Cu(II) 浓度的影响。

1.3 Cu(II)对真菌生长的影响

实验表明, 真菌 ZZF51 具有忍耐高浓度 Cu

(II) 的能力, 它的生长几乎不受 Cu(II) 浓度的影响。当 GYP 培养基中 CuCl₂ 浓度从 0 ~ 300.0 mg/L 变化时, 真菌菌体干质量的变化很少, 而且没有任何规律性可言(图 4)。在真菌发酵培养过程中, 观察到各时间段真菌的生长态势与 Cu(II) 浓度并没有多大联系。

在不外加 Cu(II) 的条件下, 真菌 ZZF51 的常规生长曲线图(图 5)与其它真菌类似。

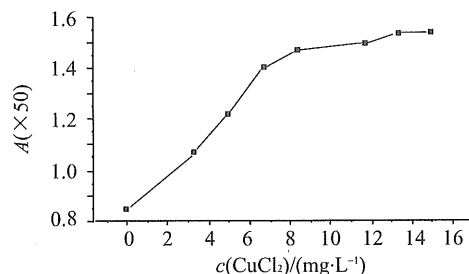


图 3 培养液乙酸乙酯提取物的吸光度(UV)随铜离子浓度的变化曲线

Fig. 3 UV absorption curve of the ethyl acetate extract of culture broth

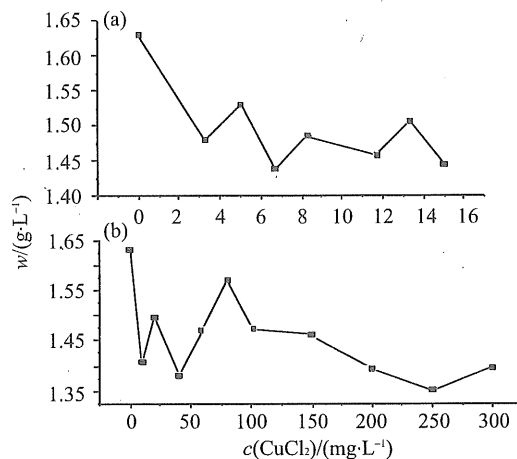


图 4 Cu(II)浓度对菌体干质量的影响曲线

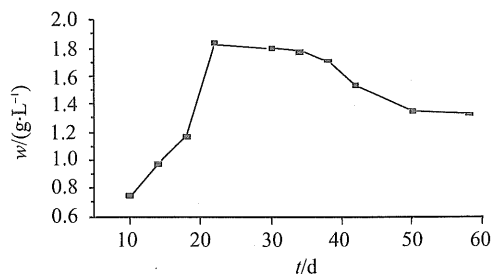
Fig. 4 The amount of CuCl₂ as a function of biomasses

图 5 真菌 ZZF51 生长曲线

Fig. 5 Growth curve of the fungus ZZF51

2 实验部分

2.1 实验试剂与仪器

实验试剂: 石油醚、乙酸乙酯、甲醇、氯仿为工业纯试剂, 使用前重蒸; 葡萄糖 CR, 蛋白胨 BR, 酵母膏 BR, 粗海盐(微生物养殖用), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (AR); 薄层层析硅胶 GF₂₅₄ 和柱层析硅胶(200~300 目粗硅胶及硅胶 H) 为青岛海洋化工厂生产。上述试剂均由市场购得。

实验仪器: 北京 X₄ 型显微熔点仪; Varian INOVA 500NB (¹H NMR 谱 500MHz, ¹³C NMR 谱 125 MHz, TMS 内标) 核磁共振仪; Thermo MAT95XP 高分辨质谱仪, Thermo DSQ 电子轰击电离质谱仪; EQUINOX55-A590/3F (Bruker) 红外仪; 日本岛津公司 UV-2501PC 紫外和可见吸收光谱仪; 德国 Elementar 公司的 Vario EL CHNSO 元素分析仪; Bruker Smart 1000 CCD X-射线衍射仪; 能量分散 X-射线光谱仪。

2.2 菌种培养

红树林内源真菌 ZZF51, 采自湛江, 由中山大学生命科学学院生物控制国家重点实验室周世宁教授提供。通过用真菌 ITS 引物 ITS1F (fungus specific: 5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') 和 ITS4 (universal: 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 扩增真菌 rDNA 的间隔序列(含 ITS1 区、5.8S 区、ITS2 区), 所得到的序列在 Genbank 中用 Blast 进行相似性分析, 菌株 ZZF51 属于 *Fusarium* sp., 菌种保存在中山大学。菌种以 PDA 为培养基, 4℃ 保存。发酵培养基为 GYP: 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 酵母膏 1 g/L, 粗海盐 2 g/L, pH 7.0。500 mL 三角瓶, 内装培养液 300 mL, 经 121℃ (0.1 mPa) 高温灭菌 15 min 后接种, 共接种 140 L, 25℃ 静置培养 22 d, 过滤, 收集发酵液和菌体。

2.3 提取和分离

发酵培养液由 140 L 浓缩至 2 L, 乙酸乙酯提取。将提取物拌硅胶装柱, 以石油醚—乙酸乙酯—甲醇梯度洗脱, 从乙酸乙酯/石油醚(体积比为 90/10)的洗脱液中得到络合物(1)粗品。经反复柱层析, 制备薄层层析, 重结晶纯化后得到纯品 23.6 mg。

2.4 络合物(1)单晶结构测试

取 0.62 mm × 0.51 mm × 0.24 mm 的单晶, 采用德国 Bruker 公司 SMART 1000 CCD X-单晶衍射仪, 以石墨单色化的 Mo-K α 辐射($\lambda = 0.071\ 073$ nm)在 294(2) K 收集数据。在 $1.92^\circ < \theta <$

27.00° 范围内收集衍射点, 衍射强度数据应用经验吸收校正。结构用 SHELXTL Ver. 6.12 程序计算, 以直接法解析, 以差值傅立叶合成法定出非氢原子坐标, 并以各向异性热参数用全矩阵最小二乘法对其进行修正。氢原子坐标由理论方法获得, 并参与结构因子计算。

2.5 Cu(II)对真菌产生络合物

络合物(1)的影响 分别将 0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 35.0, 40.0, 45.0 mg CuCl_2 加入到 3 L GPY 培养基中, 接种后发酵培养(培养条件如实验部分 2.2)。22 d 后, 过滤, 收集发酵液, 以等量的乙酸乙酯对发酵液萃取 3 次。萃取液浓缩蒸干后, 以甲醇溶解, 然后转移至 25 mL 容量瓶中, 以甲醇定容。之后, 分别置于紫外可见分光光度计测试它们的吸光度, 以络合物(1)的特征波长 $\lambda_{269.50}$ nm 为入射光, 使用 1 cm 石英比色皿, 光线狭缝宽度为 2.0 nm。每个样品的吸光度均以纯甲醇为空白对照。

2.6 Cu(II)对真菌生长的影响

分别将 0, 3.3, 5.0, 6.7, 8.3, 10.0, 11.7, 13.3, 15.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0 mg CuCl_2 加入到 1 L GPY 培养基中, 接种后发酵培养(培养条件如实验部分 2.2)。22 d 后, 过滤, 收集菌体, 然后将之彻底洗净, 干燥, 称量。

2.7 生长曲线测试

培养条件和方法如实验部分 2.2。10 d 后, 每隔 4 d 收集一瓶真菌菌体(内含 300 mL GPY 培养液), 直到第 58 天。每瓶菌体须彻底洗净和充分干燥后才能称量。

2.8 物理常数与波谱数据

络合物(1), 蓝色片状晶体, θ_{mp} 253~254℃, 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{CuN}_2\text{O}_4$; HR-EIMS (m/z 419.101 9, 计算值为 419.102 7), EIMS m/z 419 [M]⁺; EA: C (56.92%), H (6.05%), N (6.910%); UV: λ (MeOH) 204.50 (log ϵ 3.16), 208.50 (log ϵ 3.15), 228.00 (log ϵ 3.02), 269.50 nm (log ϵ 2.70); IR (KBr) ν_{max} /cm⁻¹: 3 112, 3 081, 2 929, 2 862, 1 653, 1 603, 1 576, 1 462, 1 342, 1 288, 1 219, 1 163, 1 123, 1 042, 829, 701。

络合物(1) X-单晶衍射数据: 晶体属单斜晶系, 空间群 P2 (1)/n; 晶胞参数 $a = 0.845\ 73$ (14) nm, $b = 0.661\ 00$ (11) nm, $c = 2.149\ 6$ (4) nm, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 99.848$ (3)°, $\gamma = 90^\circ$; volume = 1184.0 (3) nm³, $Z = 2$, $D_{\text{calcd}} = 1.358$

mg/m^3 , $m = 0.961 \text{ mm}^{-1}$, $F(000) = 510$ 。结构偏离因子 $R = 0.0348$, $wR2 = 0.0984$ [$I > 2\sigma(I)$]。

参考文献:

- [1] PROKSCH P, EDRADA R A, EBEL R. Drugs from the seas—current status and microbiological implications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 125 - 134.
- [2] FAULKNER D J. Marine pharmacology [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000, 77: 135 - 145.
- [3] FAULKNER D J. Marine natural products [J]. Nat Prod Rep, 2002, 19: 1 - 48.
- [4] LIN Y C, SHAO Z Y, JIANG G C, et al. Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4H-5,6-dihydro-1,2-oxazine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (Strain 386) from the South China Sea [J]. Tetrahedron, 2000, 56(49): 9607 - 9609.
- [5] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. A novel N-cinnamoylcyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain #2508) from the South China Sea [J]. Tetrahedron Lett, 2001, 42(3): 449 - 451.
- [6] 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(19): 6252 - 6256.
- [7] CHEN G Y, LIN Y C, WEN L, et al. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast [J]. Tetrahedron, 2003, 59(26): 4907 - 4909.
- [8] WU X Y, LIU X H, LIN Y C, et al. Xyloketal F: a strong L-calcium channel blocker from the mangrove fungus *Xylaria* sp. (#2508) from the South China Sea coast [J]. Eur J Org Chem, 2005, 19: 4061 - 4064.

Investigation of the Relation between Cu (II) and the Metabolite Bis (5-butyl-2-pyridinecarboxylato-N1 , O2) - copper from the Marine Fungus *Fusarium* sp. ZZ51

TAN Ni^{1,2}, SHAO Chang-lun^{2,3}, HE Li-xian², PAN Jia-hui², SHE Zhi-gang², LIN Yong-cheng²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, University of South China, Hengyang 421001, China;

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

3. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A metal complex (1), named as bis (5-butyl-2-pyridinecarboxylato-N1, O2) -copper, was first found in the nature. It was isolated from the culture media of a mangrove endophytic fungus *Fusarium* sp. ZZ51 from the South China Sea coast. Its structure was characterized using spectroscopic methods and single crystal X-ray diffraction analysis. The relation between the amount of CuCl₂ and the fungus ZZ51 growth was investigated in order to improve the output of complex (1). The result indicated CuCl₂ showed great efficiency for producing complex (1), but had little effect on the growth of the fungus ZZ51.

Key words: Cu (II); *Fusarium* sp. ZZ51; metabolites; bis (5-butyl-2-pyridinecarboxylato-N1, O2) - copper