

# 柳珊瑚共附生真菌 *Aspergillus sclertoiorum* 和 *Penicillium citrinum* 共培养代谢产物的研究

鲍洁<sup>1,2</sup>, 张晓勇<sup>1</sup>, 姚期凤<sup>1,2</sup>, 徐新亚<sup>1</sup>, 农旭华<sup>1</sup>, 漆淑华<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室  
广东省海洋药物重点实验室, 广州 510301; <sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 利用柱色谱技术, 分离纯化来源于柳珊瑚的两株海洋真菌 (*Aspergillus sclertoiorum* 和 *Penicillium citrinum*) 共培养发酵代谢产物, 通过 NMR 等波谱学数据进行结构鉴定, 并利用 HPLC 分析 *A. sclertoiorum* 分别共培养和纯培养时主要次生代谢产物产量的差异。从共培养的乙酸乙酯提取物中分离鉴定了 4 个化合物, 分别为青霉素(1), 5,6-dihydropenicillic acid(2), 6-dihydro-6-hydroxy penicillic acid(3), 2-hydroxy-3,6-dimethylbenzoic acid(4), 其中化合物 4 为首次从海洋来源真菌中得到, 并且共培养不同程度地提高了化合物 1~4 的产量。

**关键词:** 柳珊瑚共附生真菌; *Aspergillus sclertoiorum*; *Penicillium citrinum*; 共培养; 代谢产物

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

## Secondary Metabolites from the Co-culture of Gorgonian-associated Fungi *Aspergillus sclertoiorum* and *Penicillium citrinum*

BAO Jie<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-yong<sup>1</sup>, YAO Qi-feng<sup>1,2</sup>, XU Xin-ya<sup>1</sup>, NONG Xu-hua<sup>1</sup>, Qi Shu-hua<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology/ Guangdong Key Laboratory of Marine Material Medical, South China sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 164 West Xingang Road, Guangzhou 510301, China;

<sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Four compounds were yielded by a microbial co-culture of the gorgonian-associated fungus *Aspergillus sclertoiorum* and *Penicillium citrinum*, including penicillic acid(1), 5,6-dihydropenicillic acid(2), 6-dihydro-6-hydroxy penicillic acid(3) and 2-hydroxy-3,6-dimethylbenzoic acid(4). The structures of them were elucidated by the analysis of NMR data and comparison with literatures. HPLC was applied for the analysis of the production of 1-4 and they were enhanced in different level in the co-culture compared with *A. sclertoiorum* cultured individually. Compound 4 was obtained from marine fungus for the first time.

**Key words:** Gorgonian-associated fungus; *Aspergillus sclertoiorum*; *Penicillium citrinum*; co-culture; secondary metabolites

海洋来源微生物的代谢产物已经成为发现药用先导化合物的重要资源, 越来越多结构新颖的活性代谢产物被报道<sup>[1]</sup>。但是, 目标活性化合物往往产率较低、样品量不足, 使得这些化合物的进一步开发利用受到了极大的限制。因此, 提高目标化合物的产量以用于进一步的药理临床研究以及规模化生产成为微生物代谢产物研究开发的关键问题。

通过菌种改良获得高产菌株是提高代谢产物产量的重要方法, 如传统选育方法、代谢工程策略、基

因组改组技术、系统生物技术、核糖体工程、表观修饰等<sup>[2]</sup>, 同时培养环境对微生物代谢也有着至关重要的

作用, 因此培养条件的改变也成为丰富微生物代谢产物, 提高代谢产物产量的重要手段之一。而不同菌种间的共培养, 由于竞争作用, 可以诱导产生更好活性的代谢产物、或提高化合物产量、或激活沉默基因、产生新的代谢产物等, 越来越受到重视<sup>[3]</sup>。这种诱导作用可以发生在细菌与细菌之间、真菌与真菌之间, 也可发生在细菌与真菌之间。现已有许多微生物共培养的相关报道, 如通过真菌-真菌共培养, 使得 *Gloephyllum abietinum* 产 oospoglycol 的产量提高了 14 倍<sup>[4]</sup>, *Monascus* 产色素的产量提高了 30-

收稿日期: 2014-01-22 接受日期: 2014-04-22

基金项目: 国家自然科学基金(41376160), 广东省海洋经济创新发展区域示范专项(GD2012-D01-002)

\* 通讯作者 Tel: 86-20-89022112; E-mail: shuhuaqi@scsio.ac.cn

40 倍<sup>[5]</sup>;细菌-细菌共培养,提高了 *Streptomyces tenjariensis* 产 *istamycin* 的能力<sup>[6]</sup>,通过共培养发现新颖的活性代谢产物等<sup>[7-9]</sup>。本文中,对来源于柳珊瑚的真菌 *Aspergillus sclertoiorum* SCSGAF0053 和 *Penicillium citrinum* SCSGAF0052 进行共培养,从其代谢产物中分离到 4 个化合物,过 NMR、MS 以及文献比对,鉴定为青霉酸(1),5,6-dihydropenicillic acid(2),6-dihydro-6-hydroxy penicillic acid(3),2-hydroxy-3,6-dimethylbenzoic acid(4)。利用 HPLC 分析代谢产物的产量,与 *A. sclertoiorum* SCSGAF0053 纯培养相比,该两株真菌共培养可以显著提高化合物 1~4 的产量。

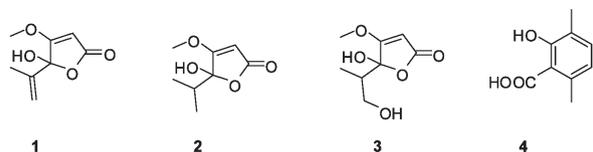


图 1 化合物 1~4 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-4

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

Avance DRX 500 核磁共振波谱仪 (Brucker, TMS 为内标); microTOF-QII 质谱仪 (Bruker); LC-20A 高效液相色谱 (Shimadzu); 1100V-W 型旋转蒸发器 (EYELAN); SHZ-C 型循环水式多用真空泵和 CCA-20 型冷却水循环泵 (河南巩义市予花仪器厂); Sephadex LH-20 凝胶 (Pharmacia Biotech Sweden); 检测用 GF<sub>254</sub> 薄层色谱硅胶及分离用柱色谱硅胶 (青岛海洋化工有限公司); 分离提取用试剂均为分析纯试剂, 高效液相使用色谱纯试剂 (美国 Merck 公司)。

菌株 SCSGAF 0052 和 SCSGAF 0053 是从采自南海三亚 (18°11' N, 109°25' E) 的柳珊瑚 *Muricella flexuosa* 分离得到。菌种保存于中国科学院海洋微生物中心。

培养基: 葡萄糖 10 g/L, 可溶性淀粉 10 g/L, MgSO<sub>4</sub> 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, 蛋白胨 1 g/L, 海盐 30 g/L, PH 6.5~7.0。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌株的鉴定<sup>[10]</sup>

提取真菌的总 DNA, 使用 ITS1 (5'-TCCGTAG-GTGAACCTG CGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT-

### TGA

TATGC-3') 进行 ITS 序列的扩增, 回收纯化 PCR 产物, 连接到 PCR2.1 载体中, 测定 ITS 序列 (上海美吉生物医药科技有限公司)。将测出的基因序列进行 BLAST 分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

#### 1.2.2 菌种发酵

共培养发酵: 用上述淀粉平板培养基培养菌种, 用接种环挑取适量 *Aspergillus sclertoiorum* 孢子于 1L 的三角瓶 (内含 300 mL 培养基), 同时接种微量 *Penicillium citrinum* 孢子, 共 40 L, 28 °C 静置培养 30 天。

SCSGAF0053 纯培养: 用上述淀粉平板培养基培养菌种, 用接种环挑取适量孢子于 1L 的三角瓶 (内含 300 mL 培养基), 共 20 L, 28 °C 静置培养 30 天。

#### 1.2.3 发酵产物的提取与分离

将所得发酵液用纱布过滤分为菌液和菌丝体两部分。菌液部分直接用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 减压浓缩得到浸膏 A; 菌丝体部分先用丙酮浸泡超声, 浸取液回收丙酮后剩余水相再用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩得到浸膏 B。两部分浸膏合并得到总提取物。共培养发酵得浸膏 60 g, 纯培养发酵得浸膏 20 g。

共培养所得浸膏经硅胶柱层析, 以氯仿/甲醇 (1:0~0:1) 梯度洗脱, 结合 TLC 检测, 合并得到 9 个流分 (Fr. 1 - Fr. 9)。Fr. 3 经重结晶的到化合物 4 (200 mg); Fr. 5 通过进一步的硅胶柱层析, 以氯仿/丙酮 (1:0~0:1) 梯度洗脱, 结合 TLC 检测, 合并得到 7 个亚流分 (Fr. 5-1 - Fr. 5-7), Fr. 5-3 经中压柱层析 (MPLC) 纯化、HPLC 制备 (乙腈/水, v/v 20:80, 3 mL/min) 得到化合物 1 ( $t_R = 17.7$  min, 50 mg) 和化合物 2 ( $t_R = 22.8$  min, 30 mg); Fr. 6 经硅胶柱层析, 以氯仿/丙酮 (1:0~0:1) 梯度洗脱, 结合 TLC 检测, 合并得到 7 个亚流分 (Fr. 6-1-Fr. 6-7), Fr. 6-5 经凝胶 Sephadex LH-20 (氯仿/甲醇 1:1) 纯化, 通过进一步的 MPLC (甲醇/水, v/v 7:93, 20 mL/min) 得到化合物 3 (600 mg)。由于化合物 1~4 的含量较高, 上述仅对化合物 1~4 进行了部分纯化制备。

#### 1.2.4 化合物 1~4 产率的理论计算

将化合物 1~4 分别配制成浓度为 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $C_1$ ) 的甲醇溶液, 用 HPLC 进行梯度洗脱 (洗脱剂:

水(W)/甲醇(M);洗脱条件:1~35 min 5%~100% M, 35~45 min 100% M, 45~50 min 100%~5% M, 50~60 min 5% M;检测波长:210 nm;进样量  $V_1:3 \mu\text{L}$ ,检测峰面积为  $S_1$ 。计算单位峰面积代表的化合物含量  $m$ ,  $m = C_1 \times V_1/S_1$ ;

将发酵所得浸膏取少量配制浓度为  $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $C_2$ ) 的甲醇溶液,用 HPLC 进行梯度洗脱(洗脱剂、洗脱条件及检测波长同上,进样量  $V_2:5 \mu\text{L}$ ),检测相应化合物的峰面积为  $S_2$ 。分别计算化合物 1-4 的产率  $P$ (单位体积发酵所得化合物重量),  $P = M \times m \times S_2/(V \times C_2 \times V_2)$  [ $M$ (mg) 表示总浸膏重量,  $V$ (L) 表示发酵液总体积]。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株鉴定

菌株 SCSSGAF 0052 和 SCSSGAF 0053 是从采自南海三亚( $18^\circ 11' \text{N}$ ,  $109^\circ 25' \text{E}$ ) 的柳珊瑚 *Muricella flexuosa* 分离得到,分别鉴定为 *Penicillium citrinum* 和 *Aspergillus sclertoiorum*<sup>[10]</sup>。

### 2.2 化合物结构鉴定

**化合物 1** 无色油状固体;ESI-MS  $m/z$ : [ $M + H$ ]<sup>+</sup> 171, [ $2M + H$ ]<sup>+</sup> 363, 显示分子量为 170;<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.87(1H, s, 4-OH), 5.40(1H, s, H-6a), 5.30(1H, s, H-6b), 5.11(1H, s, H-2), 3.85(3H, s, H-8), 1.65(3H, s, H-7)。以上波谱数据与文献报道的青霉酸一致,因此鉴定化合物 **1** 为青霉酸<sup>[11]</sup>。

**化合物 2** 粉末状固体;<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.41(1H, s, 4-OH), 5.31(1H, s, H-2), 3.85(3H, s, H-8), 2.03(1H, m, H-5), 0.95(3H, d,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ , H-6), 0.79(3H, d,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ , H-7)。以上波谱数据与文献报道的 5,6-dihydropenicillic acid 一致,因此鉴定化合物 **2** 为 5,6-dihydropenicillic acid<sup>[11]</sup>。

**化合物 3** 淡黄色油状固体;<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.50(1H, s, 4-OH), 5.24(1H, s, H-2), 3.85(3H, s, H-8), 3.77(1H, s, H-6a), 3.17(1H, s, H-6b), 2.06(1H, m, H-5), 0.76(3H, d,  $J = 6.5 \text{ Hz}$ , H-7);<sup>13</sup>C NMR(125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 170.5(C-1), 89.6(C-2), 180.4(C-3), 104.9(C-4), 40.4(C-5), 62.0(C-6), 11.5(C-7), 60.0(C-8)。与化合物 **2** 的 NMR 数据对比,比化合物 **2** 多了一个氧化亚甲基信号,少了一个甲基信号,因此推测该化

合物为 5,6-dihydro-6-hydroxy penicillic acid,该化合物仅在 1991 年的一篇专利中做过相关报道<sup>[12]</sup>。

**化合物 4** 无色针状固体;<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 13.02(1H, s, 7-OH), 10.49(1H, s, 2-OH), 7.61(1H, d,  $J = 8.5 \text{ Hz}$ , H-4), 6.46(1H, d,  $J = 9.0 \text{ Hz}$ , H-5), 2.50(3H, s, 6-CH<sub>3</sub>), 1.96(3H, s, 3-CH<sub>3</sub>)。以上波谱数据与文献报道的 2-hydroxy-3,6-dimethylbenzoic acid 一致,因此鉴定化合物 **4** 为 2-hydroxy-3,6-dimethylbenzoic acid<sup>[13]</sup>。

### 2.3 共培养对真菌 *A. sclertoiorum* SCSSGAF 0053 产化合物 1-4 的促进作用

真菌 SCSSGAF 0053 在淀粉培养基中生长迅速,菌丝体呈白色,孢子黄色。40 L 共培养发酵液得提取物 60 g,20 L 纯培养发酵液提取物 20 g。通过 HPLC 分析,在两种培养条件下,代谢产物的相对含量有明显差别:根据峰面积理论计算,在 *A. sclertoiorum* 纯培养中,化合物 **1~4** 的产率大约分别为 300.8, 18.5, 23.4, 13.7 mg/L; *A. sclertoiorum* 和 *P. citrinum* 共培养中,化合物 **1~4** 的产率分别为 772.1, 237.6, 70.4, 154.1 mg/L,四个化合物产率均有不同程度的提高,其中化合物 **2** 的产量提高了 12.8 倍,化合物 **4** 的产量提高了 11.2 倍。

## 3 讨论

本文中,通过对两株真菌(*A. sclertoiorum* 和 *P. citrinum*)共培养代谢产物的分离,共从中鉴定了 4 个化合物。其中,化合物 **1** 是一种霉菌毒素类化合物,在食品及饲料中都非常常见,具有一定的肝毒性、肾毒性、植物毒性、免疫抑制等作用<sup>[14]</sup>,同时又有一定的抗病毒、抗真菌、抗肿瘤等作用<sup>[15,16]</sup>;化合物 **2** 具有遗传毒性<sup>[17]</sup>;化合物 **3** 具有神经生长促进作用,在阿尔茨海默型老年痴呆症治疗方面有一定的应用前景<sup>[12]</sup>;化合物 **4** 具有调节昼夜节律的作用,可以治疗一些情绪相关疾病,如抑郁症等<sup>[13]</sup>。该两株真菌的共培养诱导活性代谢产物 **1~4** 的产量显著提高,最高达到 12.8 倍,这对化合物 **1~4** 的进一步研究及应用具有重要意义。

另外,产 penicillic acid 的微生物在一定条件下可以将其向 dihydropenicillic acid 转化,例如在富营养环境中、与细菌共培养时<sup>[18,19]</sup>,本文中通过真菌 SCSSGAF 0052 和 SCSSGAF 0053 的共培养,也产生了类似的结果,促进了 penicillic acid 向 dihydropenicillic acid 的转化。由此,共培养对于诱导活性代谢产

物的产生、激活沉默基因的表达、提高活性化合物的产量方面具有重要的意义,在微生物应用领域具有广阔的应用前景。

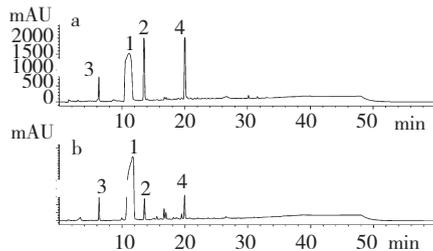


图2 *Aspergillus scleroitorum* 和 *Penicillium citrinum* 共培养提取物的 HPLC 分析图; b) *Aspergillus scleroitorum* 纯培养提取物的 HPLC 分析图

Fig. 2 a) HPLC analysis of extract from co-cultured of *Aspergillus scleroitorum* and *Penicillium citrinum*; b) HPLC analysis of extract from *Aspergillus scleroitorum*

#### 参考文献

- Xiong ZQ, Wang JF, Hao YY, *et al.* Recent advances in the discovery and development of marine microbial natural products. *Mar Drugs*, 2013, 11 :700-717.
- Zhao WT(赵文婷), Zou Y(邹懿), Hu CH(胡昌华). Novel methods and strategies for strain improvement. *Chin J Biotech(生物工程学报)*, 2009, 25 :801-805.
- Cho JY, Kim MS. Induction of antifouling diterpene production by *Streptomyces cinnabarinus* PK209 in co-culture with marine-derived *Alteromonas* sp. KNS-16. *Biosci Biotech Bioch*, 2011, 76 :1849-1854.
- Sonnenbichler J, Dietrich J, Peipp H. Secondary fungal metabolites and their biological activities, V. Investigations concerning the induction of the biosynthesis of toxic secondary metabolites in basidiomycetes. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1994, 375 :71-80.
- Shin CS, Kim HJ, Kim MJ, *et al.* Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Bio*, 1998, 59 :576-581.
- Slattery M, Rajbhandari I, Wesson K. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. *Microbial Ecol*, 2001, 41 :90-96.
- Wang JP, Lin WH, Wray V, *et al.* Induced production of decapeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begoniae*. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54 :2492-2496.
- Park HB, Kim, YJ, Park JS, *et al.* Glionitrin B, a cancer invasion inhibitory diketopiperazine produced by microbial coculture. *J Nat Prod*, 2011, 74 :2309-2312.
- Pettit RK. Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Appl Microbiol Biot*, 2009, 83 :19-25.
- Zhang XY, Bao J, Wang GH, *et al.* Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi isolated from six species of the South China sea gorgonians. *Microbial Ecol*, 2012, 64 :617-627.
- Kimura Y, Nakahara S, Fujioka S. Aspyrone, a nematocidal compound isolated from the fungus, *Aspergillus melleus*. *Biosci Biotech Bioch*, 1996, 60 :1375-1376.
- Maruhashi M, Ito M, Hanada K. Penicillin analog. 03-184968, 1991-12-08.
- Miho I, Hideki U, Motoki T, *et al.* JBIR-26, a novel natural compound from *Streptomyces* sp. AK-AH76, regulates mammalian circadian clock. *Antibiot*, 2008, 61 :756-758.
- Wang D(王頔), Jia JS(贾金生). Progress in studies on penicillic acid. *Jilin Anim Sci Vet Med(吉林畜牧兽医)*, 2010, 31 :14-16.
- Suzuki S, Kimura T, Saito F, *et al.* Antitumor and antiviral properties of penicillic acid. *Agric Biol Chem*, 1971, 35 :287-290.
- Keromnes J, Thouvenot D. Role of penicillic acid in the phytotoxicity of penicillium cyclopium and penicillium canescens to the germination of corn seeds. *Appl Environ Microb*, 1985, 49 :660-663.
- Obana H, Kumeda Y, Nishimune T, *et al.* Direct detection using the drosophila DNA-repair test and isolation of a DNA-damaging mycotoxin, 5, 6-dihydropenicillic acid, in fungal culture. *Food Chem Toxicol*, 1994, 32 :37-43.
- Obana H, Kumeda Y, Nishimune T. Mutagenicity of 5, 6-dihydropenicillic acid (DHPA) in drosophila melanogaster and bacterial conversion of penicillic acid to DHPA. *J Food Protect*, 1995, 58 :1375-1378.
- Obana H, Kumeda Y, Nishimune T. *Aspergillus ochraceus* production of 5, 6-dihydropenicillic acid in culture and foods. *J Food Protect*, 1995, 58 :519-523.