

环境胁迫对珊瑚共附生真菌 *Aspergillus ochraceus* LCJ11-102 次生代谢产物的影响

周雅琳, 王义, 刘培培, 王智颖, 朱伟明*

(中国海洋大学医药学院, 青岛 266003)

摘要:【目的】研究环境胁迫对珊瑚共附生真菌 *Aspergillus ochraceus* 的次生代谢的影响, 寻找活性代谢产物。【方法】采用仿生培养和高盐胁迫两种不同的发酵条件对菌株进行液体大发酵, 运用 HPLC 指纹图谱考察发酵产物的化学多样性, 采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和 HPLC 等方法对发酵产物进行分离、纯化, 运用波谱和 Mosher 方法鉴定化合物的结构。【结果】发现菌株在两种环境胁迫条件下产生了不同的次生代谢产物, 从中分别鉴定了 4 个(1–4)和 1 个主要化合物 5: $R(-)$ -mellein (1)、(5,6-*trans*, 8,9-*threo*-)-9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyaspyrone (2)、(5,6-*erythro*-, 8,9-*threo*-)-9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyasperlactone (3)、(5*S*,6*R*,9*S*)-dihydroaspyrone (4)和 $R(+)$ -*semi*-vioxanthin (5)。【结论】环境胁迫可以诱导海洋微生物产生不同的次生代谢产物, 仿生培养是从海洋微生物中获得氯代产物的有效途径。

关键词: 珊瑚共附生微生物; 赭曲霉; 仿生培养; 高盐胁迫; 次生代谢; 蕾二歧灯芯柳珊瑚

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-07-1023

珊瑚系低等腔肠动物, 全球共有 6100 多种, 中国海域分布有 496 种。近年来对珊瑚次生代谢产物的化学与药理学研究一直是海洋天然产物研究的热点^[1], 珊瑚、海绵和海洋微生物构成海洋天然产物的三大来源^[2]。海洋大型生物中的活性物质的实际生产者可能是与之共附生的微生物^[3], 而微生物的次生代谢产物随菌株来源和培养条件的改变而变化^[4]。因此, 通过改变纯培养条件, 可以诱导微生物产生不同的次生代谢产物。海水中氮和碳的含量只有陆地土壤中的 0.8% 和 0.14%, 而氯和溴的含量却是陆地土壤中的 193 倍和 7 倍^[5], 处于寡营养和局部高盐环境中的海洋微生物也因此形成了有别于陆地土壤微生物的耐盐或嗜盐、耐饥(寡营养)等独特生理特征。基于珊瑚资源的有限性和海洋微生物的可培养性, 而珊瑚共附生微生物次生代谢产物的研究却极少开展, 仅有 1 篇文献报道了从 1 株珊

瑚来源的曲霉次生代谢产物中鉴定了 2 个曲霉毒素类化合物^[6]。本文旨在探索“仿生培养基”(低氮源 + 低碳源 + 2% 人工海盐或天然海水)和“高盐胁迫”(10% 人工海盐)对海洋微生物次生代谢产物的影响, 从珊瑚共附生微生物中获得结构多样的活性化合物。根据这一思路, 作者从蕾二歧灯芯柳珊瑚 (*Dichotella gemmacea*) 中分离鉴定了 1 株共附生真菌——赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*) LCJ11-102, 并对其次生代谢产物进行了研究。发现该菌株在这 2 种环境胁迫条件下的次生代谢产物完全不同, 对这两个发酵条件下的次生代谢产物进行了初步研究, 从中分别鉴定了 4 个化合物(1–4)和 1 个主要产物 5: $R(-)$ -mellein (1)、9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyaspyrone (2)、9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyasperlactone (3)、(5*S*,6*R*,9*S*)-dihydroaspyrone (4)和 $R(+)$ -*semi*-vioxanthin (5)。

基金项目: 国家“863 计划”(2007AA09Z447)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-532-82031268; E-mail: weimingzhu@ouc.edu.cn

作者简介: 周雅琳(1984–), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋天然产物。E-mail: zhouyalincpu@tom.com

收稿日期: 2010-03-09; 修回日期: 2010-04-29

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞株:①赭曲霉(*A. ochraceus*) LCJ11-102 分离自海南临高附近海域的珊瑚样品蕾二歧灯芯柳珊瑚(*Dichotella gemmacea*), 菌种由武汉大学菌种保藏中心方呈祥教授鉴定并保藏。②测试化合物抑菌活性时用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、产气杆菌(*Bacillus aerogenes*)。③细胞毒活性测试用 Hela 细胞。

1.1.2 培养基:①菌株保藏培养基: PDA(土豆 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 20 g/L、氯霉素 0.1 g/L、海水素 10%, pH 7.0 - 7.5)。②发酵培养基之一、仿生培养基(淀粉 1%, 蛋白胨 0.1%, 海水素 2%)发酵 90 升, 静置 30 天(28℃)。③发酵培养基之二、高盐培养基(葡萄糖 1%、甘露醇 2%、麦芽糖 2%、玉米粉 0.05%、味精 1%、磷酸二氢钾 0.05%、硫酸镁 0.03%、酵母浸膏 0.3%、海水素 10%, pH 7.0 - 7.5)发酵 40 升, 摇床培养 9 天(28℃、120 r/min)。④培养活性测试菌株的培养基: LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L、酵母浸膏 5 g/L、氯化钠 10 g/L)。

1.1.3 仪器与试剂:质谱用 Autospec Ultima TOF 型质谱仪, 核磁共振谱用日本 JEOL JNM ECP600 型核磁共振仪测定。分析用高效液相色谱仪: Waters 公司产品[Waters 600, Waters 996 二极管阵列检测器, Millennium32 工作站, Capcell Pak C18 柱: (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)]。制备用高效液相色谱仪: 日本岛津公司产品[LC 6AD, SPD M20 AVP 检测器, SCL 10AV 型系统控制器, Capcell Park C18 柱: (20 mm × 250 mm, 5 μm)]。柱层析及薄层层析用硅胶 H(10 - 40 μm): 青岛海洋化工集团公司。Sephadex TM LH 20: Pharmacia 公司。高压灭菌用 SANYO 公司高压灭菌锅(MLS3750)。菌株培养用摇床: 高崎科学器械株式会社产品旋转式振动培养箱(TC-C-100R)。二氧化碳培养箱为 SANYO 公司产品(MCO175)。酶标仪用美国 Molecular 公司的 SPECTRAMAXplus 型酶标仪。丽丝胺罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)为美国 Sigma 公司产品。

1.2 菌种发酵

按培养微生物的常规方法取适量孢子, 接种到 PDA 琼脂固体斜面培养基上, 在 28℃ 培养箱中培养 7d。用接种针挑取适量孢子和菌体, 分别接种于发

酵培养液中, 用培养基一和二进行大量发酵。

1.3 菌株提取物的制备

将菌株的发酵培养液过滤, 分为上清液和菌丝体。上清液用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 得上清液的乙酸乙酯萃取液。菌丝体用 80% 丙酮水溶液超声破碎提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩至不含丙酮后, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 萃取液与上清液的乙酸乙酯萃取液合并, 减压浓缩至干, 得到菌株的乙酸乙酯提取物(粗提物)。

1.4 两种发酵条件所得提取物的指纹图谱特征考察

摸索 HPLC 条件, 通过指纹图谱考察菌株发酵产物的化学多样性。柱系统: YMC-Pack ODSA, 250 × 4.6 mm, 样品浓度为 10 g/L(甲醇为溶剂), 进样量: 10 μL。洗脱方式: 甲醇/水混合溶剂梯度洗脱, 在 0 - 45 min 内甲醇浓度从 5% 变化到 100%。

1.5 代表性成分的提取分离

菌株在仿生条件下的粗提物约 40 克, 经减压硅胶柱色谱分为 Fr1-Fr8, Fr1 经硅胶加压柱色谱后所得组分 Fr1-1 经凝胶及 HPLC 制备得化合物 **1** (200 mg)。Fr5 经石油醚/丙酮加压柱洗脱后的组分 Fr5-5, 再经甲醇凝胶柱和 HPLC(20% 甲醇)制备得化合物 **2** (40 mg)。Fr6 经石油醚/丙酮加压柱洗脱后得组分 Fr6-6, 经 HPLC(20% 甲醇)制备得化合物 **3** (20 mg)。Fr8 经石油醚/丙酮加压柱洗脱后得组分 Fr8-5, Fr8-5 经 HPLC(50% 甲醇)制备得化合物 **4** (80 mg)。

菌株在高盐胁迫条件下的粗提物约 40 克, 经减压硅胶柱色谱分为 Fr1-Fr9, Fr1 经硅胶加压柱色谱后所得组分 Fr1-6 经凝胶及 HPLC(75% 甲醇)制备得主要产物 **5** (100 mg)。

1.6 化合物 4 中 9-OH 位绝对构型的确定

采用改良的 Mosher 法^[7]: 分别称取 1 mg 的化合物 **4** 置于 2 个反应瓶中, 各加催化量的 DMAP, 与微量注射器一起置干燥器中过夜干燥。在氮气保护下向每个反应瓶中加入 2 mL 干燥的吡啶, 搅溶后分别加入 5 μL R-型和 S-型的 MTPA 试剂, 室温下搅拌反应 12h。反应结束后加水终止, 然后用乙酸乙酯萃取 3 次, 有机相蒸干后通过 HPLC 制备得终产物。分别测定 R-MTPA 酯(**4a**)和 S-MTPA 酯(**4b**)的¹H-NMR, 计算 $\Delta\delta_{(S,R)}$, 结果如图 2 中所示。

1.7 抑菌和细胞毒活性评价

抑菌活性采用滤纸片二倍稀释法^[8]: 将化合物配成 100、50、25、12.5 μg/mL 的甲醇溶液, 用移液枪取 10 μL 样品溶液加到直径为 6 mm 的无菌滤纸

片,置于无菌风下吹干。将金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、产气杆菌 (*Bacillus aerogenes*) 制成菌悬液,取 0.1 mL 滴到凝固好的无菌平板上,用无菌涂布棒涂布均匀。放置 1 h 后,用无菌镊子夹取已干燥的含药滤纸片贴在涂布好的平板上,以相应的空白溶剂做阴性对照,样品与对照各设 3 个平行。然后置于培养箱中 37°C 下培养 24 h,以不长菌的浓度为最小抑菌浓度 (MIC)。

细胞毒活性采用 SRB 法^[9]:取对数生长期的 HeLa 细胞,用新鲜培养基配成浓度为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液,按每孔 200 μ L 接种于 96 孔板中,于 37°C 通入 5% CO_2 的培养箱中培养 4 h。接着每孔加入 2 μ L 不同浓度样品溶液,37°C 培养 72 h。然后在 4°C、3000 rpm 条件下离心 3 min,吸去上清。

每孔细胞中加入预冷的 80% 三氯乙酸 (TCA) 50 μ L,置于 4°C 冰箱固定 1.5 h,再用去离子水冲洗 5 次并空气干燥。每孔加入 0.5% SRB 的 1% TCA 溶液 50 μ L 并于室温静置 30 min,用预冷的 1% TCA 水溶液清洗 4 次,除去未结合的 SRB 染料。每孔加入 150 μ L Tris 溶液 (10 mmol/L, pH 10.5) 溶解蛋白结合染料,用酶标仪于 520 nm 下测定每孔吸光度 OD 值。在 96 孔板中样品每个浓度设置 3 孔,另设空白对照 3 孔,取 3 孔平均值,按 $\text{IR}(\%) = (\text{OD}_{\text{空白}} - \text{OD}_{\text{样品}}) / \text{OD}_{\text{空白}} \times 100\%$ 计算细胞增殖抑制率。

2 结果和分析

2.1 两个发酵条件下代谢产物的指纹图谱特征

从图 1 中可以清楚地看到,在两个不同条件下菌株 *A. ochraceus* LCJ11-102 的次生代谢产物有明

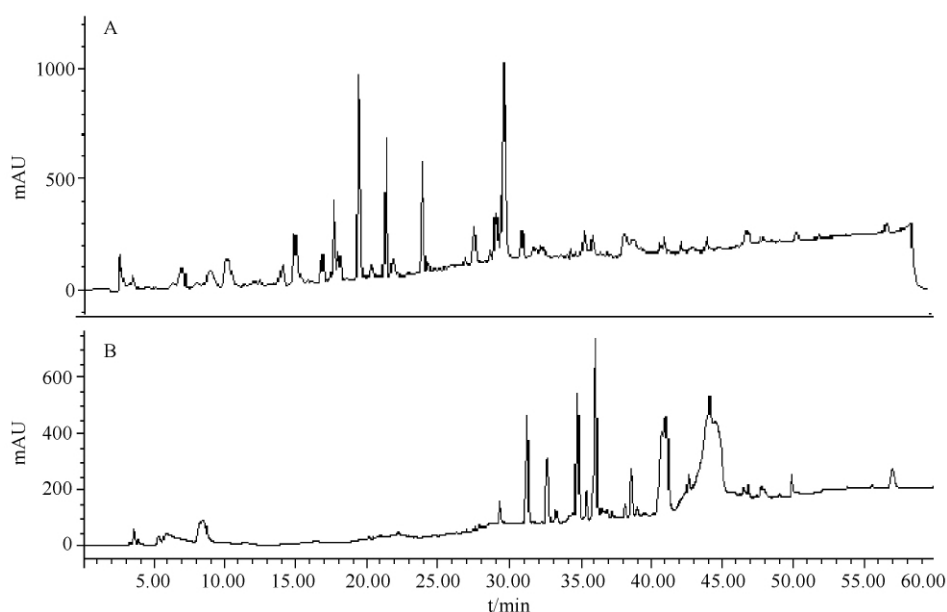


图 1 菌株在仿生培养 (A) 和高盐胁迫 (B) 下发酵产物的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of secondary metabolites of *Aspergillus ochraceus* under biomimetic culture (A) and high salt stress (B).

显的差别,仿生条件下的主要产物集中在 20–30 min,而高盐胁迫的主要产物集中在 31–45 min,主要代谢产物峰几乎没有重合。结果说明“仿生培养”和“高盐胁迫”能诱导海洋微生物产生不同

的次生代谢产物。

2.2 化合物的结构解析

化合物 1,浅黄色油状物, $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -27.8$ (c 0.2, CHCl_3)。 δ 7.49 (t, $J = 8.2, 7.7$ Hz)、6.86 (d, J

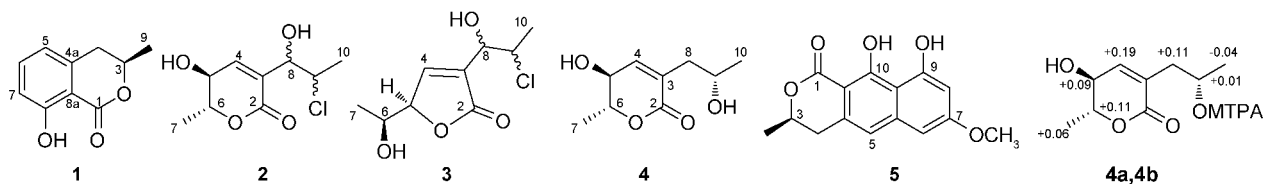


图 2 化合物 1–5 的结构和化合物 4 MTPA 酯的 $\Delta\delta_{(S-R)}$ 值

Fig. 2 Structures of compounds 1–5 and the $\Delta\delta_{(S-R)}$ values of MTPA ester of compound 4.

= 8.2 Hz)和 δ 6.80 (d, $J = 7.7$ Hz)的氢信号提示含有一个1,2,3-三取代的苯环,此外,分子中还存在着1个连氧次甲基(δ 4.78, m)、1个亚甲基(δ 2.93, 2H, m)、1个甲基(δ 1.41, d, $J = 6.1$ Hz)和1个酚羟基(δ 10.96, brs)。碳谱显示有6个芳香碳信号(δ 108.8 ~ 161.6,其中3个季碳、3个叔碳)、1个酯羰基碳(δ 169.9)、1个连氧叔碳(δ 76.6)、1个亚甲基碳(δ 34.1)和1个甲基碳(δ 20.8),因此推测化合物具有苯并六元内酯结构。文献调查表明,其波谱数据和比旋光与文献^[10]值相符($[\alpha]_D^{24} - 30.0$ (c 0.6, CHCl₃)),故化合物**1**的结构确定为*R*(-)-mellein。

化合物**2**,浅黄色油状物, $[\alpha]_D^{24} + 16.6$ (c 0.1, CHCl₃)。阳离子ESI-MS在*m/z* 243和*m/z* 245处有3:1的含氯同位素分子离子峰[M + Na]⁺,结合氢谱碳谱推测分子式为C₉H₁₃ClO₄。氢谱显示有2个甲基(δ 1.31, 3H, d, $J = 6.6$ Hz; δ 1.30, 3H, d, $J = 6.6$ Hz)、4个连氧或连氯的次甲基(δ 4.46, brt, $J = 4.4, 5.5$ Hz; δ 4.35, m; δ 4.23, dq, $J = 6.6, 7.7$ Hz; δ 4.18, ddd, $J = 2.2, 6.6, 7.7$ Hz)、1个烯氢信号(δ 6.87, brs)和2个羟基(δ 5.85, d, $J = 6.6$ Hz; δ 5.72, d, $J = 5.5$ Hz);碳谱显示了2个甲基碳信号(δ 18.9, q; δ 18.5, q)、4个连氧或连氯的次甲基(δ 79.4, d; δ 71.8, d; δ 66.6, d; δ 60.4, d)、2个sp²杂化碳信号(δ 146.6,

d; δ 131.0, s)和1个酯羰基信号(δ 163.5, s);表明分子中存在1个六元不饱和内酯环。其波谱数据与文献^[11]报道的9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyaspyrone相符。5,6-位质子间较大的偶合常数($^3J_{(H5, H6)} = 7.7$ Hz)表明其构型为反式;由于2-氯丙醇类衍生物的邻位质子的偶合常数 3J 值为苏式(*threo*-, 4.5 Hz)大于赤式(*erythro*-, 4.0 Hz)^[12],故化合物**2**中8,9-位构型为苏式($^3J_{(H8, H9)} = 4.4$ Hz)。因此化合物**2**的结构确定为(5,6-*trans*-, 8,9-*threo*-)-9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyaspyrone。

化合物**3**,浅黄色油状物, $[\alpha]_D^{24} + 27.0$ (c 0.015, CHCl₃)。阳离子ESI-MS在*m/z* 243和*m/z* 245处有3:1的含氯同位素分子离子峰[M + Na]⁺,结合氢谱碳谱推测分子式为C₉H₁₃ClO₄,提示化合物**3**是**2**的同分异构体。氢谱、碳谱与化合物**2**相似,但羰基碳、双键碳和1个连氧叔碳明显向低场位移(δ 172.4, 151.2, 134.7, and 85.9),表明六元不饱和内酯环变成了五元不饱和内酯环。其氢谱和碳谱数据与文献报道的9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyasperlactone相符^[11],与化合物**2**类似,8,9-位质子间较大的偶合常数($^3J_{(H8, H9)} = 4.6$ Hz)表明其构型为苏式。5,6-位质子间的偶合常数($^3J_{(H5, H6)} = 5.5$ Hz)表明其5,6-位的构型为赤式^[11]。故化合物**3**的结构确定为(5,6-*erythro*-, 8,9-*threo*-)-9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyasperlactone。

表1 化合物1-5的NMR数据归属

Table 1 NMR data of compound 1-5. Recorded at 600 MHz (¹H) and at 150 MHz (¹³C) in DMSO-d₆ (compound 4 in CDCl₃)

Position	1	2	3	4	5					
	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C
1		169.9, s								171.3, s
2				163.5, s		172.4, s		165.8, s		
3	4.78, m	76.6, d		131.0, s		134.7, s		128.5, s	4.79, m	76.7, d
4	2.93, m (2H)	34.1, t	6.87, brs	146.6, d	7.62, brs	151.2, d	6.66, brs	145.7, d	2.98, m (2H)	39.8, t
4a		140.9, s								134.8, s
5	6.80, d (7.7)	115.9, d	4.18, ddd (2.2, 6.6, 7.7)	66.6, d	4.93, ddd (1.4, 1.4, 5.5)	85.9, d	4.18, brt (7.7, 8.8)	67.4, d	7.01, s	116.1, d
5a										141.1, s
6	7.49, t (8.2, 7.7)	136.8, d	4.23, dq (6.6, 7.7)	79.4, d	3.78, dq (5.5, 6.6)	67.0, d	4.37, dq (5.5, 8.8)	79.6, d	6.75, d (2.3)	101.6, d
7	6.86, d (8.2)	118.8, d	1.30, d (3H, 6.6)	18.5, q	1.11, d (3H, 6.6)	19.5, q	1.43, d (3H, 5.5)	18.2, q		162.7, s
8		161.6, s	4.46, brt (4.4, 5.5)	71.8, d	4.40, brt (4.6, 5.5)	70.1, d	2.39, m (2H)	39.5, t	6.45, d (2.3)	100.1, d
8a		108.8, s								
9	1.41, d (3H, 6.1)	20.8, q	4.35, m	60.4, d	4.36, m	59.8, d	3.98, m	66.7, d		162.5, s
9a			1.31, d (3H, 6.6)							99.7, s
10				18.9, q	1.36, d (3H, 6.6)	19.8, q	1.20, d (3H, 5.5)	23.2, q		158.4, s
10a										108.7, s
3-CH ₃									1.43, d (3H, 5.4)	20.9, q
5-OH			5.85, d (6.6)				4.84, d (7.7)			
6-OH					5.19, d (5.0)					
7-OCH ₃									3.83, s (3H)	55.9, q
8-OH	10.96, brs		5.72, d (5.5)		5.91, d (5.5)					
9-OH							3.82, s		13.31, brs	
10-OH									9.83, brs	

化合物 **4**, 浅黄色油状物, $[\alpha]_D^{24} + 40.0$ (c 0.6, CHCl_3)。阳离子 ESI-MS 在 m/z 209 处给出分子离子峰 $[M + \text{Na}]^+$ 峰, 结合氢谱碳谱推测分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_4$ 。氢谱 (δ 6.66, brs) 和碳谱 (δ 165.8, s; δ 145.7, d; δ 128.5, s) 提示分子中含有 1 个 α , β -不饱和六元内酯结构。另外, 氢谱还显示有 3 个连氧次甲基 (δ 4.37, dq, $J = 5.5, 8.8$ Hz; δ 4.18, brt, $J = 7.7, 8.8$ Hz; δ 3.98, m)、1 个亚甲基 (δ 2.39, 2H, m) 和 2 个甲基 (δ 1.43, 3H, d, $J = 5.5$ Hz; δ 1.20, 3H, d, $J = 5.5$ Hz); 碳谱还显示 3 个连氧次甲基 (δ 79.6, d; δ 67.4, d; δ 66.7, d)、1 个亚甲基 (δ 39.5, t) 和 2 个甲基 (δ 23.2, q; δ 18.2, q)。这些波谱数据与文献报道的化合物 dihydroaspyrone 相符^[13], 5,6-位质子间较大的偶合常数 ($^3J_{(\text{H}5, \text{H}6)} = 7.7$ Hz) 表明其构型为反式, 与 dihydroaspyrone 具有同样的相对构型。其比旋光方向与 dihydroaspyrone^[13] 和 (5*S*, 6*R*)-5, 6-dihydro-5-hydroxy-6-methyl-2*H*-pyran-2-one^[14] 相同, 表明 5,6-位的构型应为 (5*S*, 6*R*)-; 但旋光值与 dihydroaspyrone 差别较大, 为了确定 9-OH 的绝对构型, 应用了改良的 Mosher 方法^[7], 结果表明其构型为 *S*- (图 1)。因此, 化合物 **4** 的结构鉴定为 (5*S*, 6*R*, 9*S*)-dihydroaspyrone^[13]。

化合物 **5**, 黄色针状结晶, $[\alpha]_D^{24} + 7.0$ (c 0.1, CHCl_3)。阳离子 ESI-MS 在 m/z 275 处给出分子离子峰 $[M + \text{H}]^+$ 峰, 结合氢谱碳谱推测分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$ 。氢谱中提示含有两个缩合的酚羟基 (δ 13.31, brs; δ 9.83, brs)、3 个芳香氢信号 (δ 7.01, s; δ 6.75, d, $J = 2.3$ Hz; δ 6.45, d, $J = 2.3$ Hz)、1 个甲氧基 (δ 3.83, 3H, s)、1 个连氧次甲基 (δ 4.79, m)、1 个亚甲基 (δ 2.98, 2H, m) 和 1 个甲基 (δ 1.43, 3H, d, $J = 5.4$ Hz)。碳谱中提示含有 1 个羰基 (δ 171.3)、10 个芳香碳 (δ 162.7 - 99.7, 其中 7 个为季碳)、1 个连氧次甲基 (δ 76.7, d)、1 个甲氧基 (δ 55.9)、1 个亚甲基 (δ 39.8, t) 和 1 个甲基 (δ 20.9, q)。这些数据提示化合物 **5** 是萘酚内酯类化合物, 其波谱数据与文献报道的化合物 semi-vioxanthin 相符^[15], 但旋光方向与 *S*(-)-semi-vioxanthin ($[\alpha]_D^{24} - 10.6$ (c 0.56, CHCl_3)) 相反^[16], 故化合物 **5** 的结构确定为 *R*(+)-semi-vioxanthin。

2.3 化合物的活性评价结果

化合物抑菌活性和细胞毒活性的初步评价表明, 化合物 **1-5** 具有一定的抑菌活性, 其对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、产气杆菌 (*Bacillus aerogenes*) 的 MIC 分别

为 50、25、25、25、50 和 50、50、50、50、50 以及 25、25、25、25、50 mg/L (环丙沙星为阳性对照, MIC 小于 12.5 mg/L)。此外, 化合物 **5** 还具有一定的细胞毒活性, 其对宫颈癌 Hela 细胞的 IC_{50} 值为 23.2 mg/L (5-氟尿嘧啶为阳性对照, IC_{50} 值小于 3.2 mg/L)。

3 讨论

海洋微生物生存环境特殊, 其次生代谢产物的化学多样性丰富, 是新活性先导化合物的重要来源。如何挖掘海洋微生物次生代谢能力, 是微生物天然产物化学家思考的关键问题。研究已经表明微生物次生代谢能力是可以多种途径加以调节的, 例如环境胁迫、调节生成途径以及基因调控等。其中环境胁迫包括采用极端条件培养、菌株混合培养等^[4]。本文对一株珊瑚共附生真菌采用了两种不同的环境胁迫条件 (仿生培养和高盐胁迫), 获得了具有不同化学多样性的发酵产物, 其中化合物 **2, 3** 均为含氯化合物。可能是在寡营养低盐 (2% 人工海盐或天然海水) 的仿生培养基中, 海洋耐盐微生物有更多的机会利用氯来合成氯代产物。我们从土壤青霉 (*Penicillium terrus*) LM₂ 的仿生培养产物中也分离鉴定了 6 个结构新颖的氯代化合物^[17]。表明: 仿生培养是从海洋微生物中获得氯代产物的有效途径。

化合物 **1** 最早是从曲霉 *Aspergillus melleus* 次生代谢产物中分离得到的^[18], 后来发现许多真菌都可以产生^[19], 一些植物和昆虫的自我防卫分泌物中也含有该化合物^[20], 化合物 **1** 有强烈的杀真菌和藻类活性, 可作为除草剂^[21]。化合物 **2** 和 **3** 最早是从海绵共附生真菌 *Aspergillus ostianus* 次生代谢产物中分离得到的^[11], 对细菌 *Ruegeria atlantica*、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有抑制作用^[11]。化合物 **4** 最早是从曲霉 *Aspergillus ochraceus* 次生代谢产物中分离得到^[22]。我们也发现化合物 **1-4** 具有一定的抗真菌和抗细菌活性。化合物 **5** 最早是从青霉 *Penicillium citreoviride* 次生代谢产物中分离得到的^[15], 我们发现化合物 **5** 具有一定的抑菌和细胞毒活性, 有趣的是 **5** 的对映体 *S*(-)-semi-vioxanthin 也具有抗肿瘤活性^[23]。

化合物 **1-4** 是在仿生培养条件下产生的, 而化合物 **5** 是在高盐胁迫下产生的, 且为主要产物 (含量约为粗浸膏的 30%), 说明不同的环境胁迫可以诱导耐盐微生物产生不同的活性化合物。

参考文献

- [1] 张文,郭跃伟. 海洋生物柳珊瑚的化学成分及生物活性研究进展. *中国天然药物 (Chinese Journal of Natural Medicines)*, 2003, 1: 69-75.
- [2] Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2009, 26: 170-244.
- [3] 宁, 林永成, 姜广策. 海洋微生物的生物活性物质研究. *海洋科学 (Marine Sciences)*, 1997, 3: 27-29.
- [4] Bode HB, Bethe B, Hofs R, Zeeck A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 2002, 3: 619-627.
- [5] 王夔. 生命科学中的微量元素. 北京: 中国计量出版社. 1991.
- [6] Parvatkar RR, D' Souza C, Tripathi A, Naik CG. Asperolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry*, 2009, 70: 128-132.
- [7] Kusumi T, Ooi T, Ohkubo Y, Yabuuchi T. The Modified Mosher's Method and the Sulfoximine Method. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2006, 79: 965-980.
- [8] Zaika LL. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 1988, 9: 97-118.
- [9] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, 82: 1107-1112.
- [10] Sumarah MW, Pumiani E, Blackwell BA, Miller JD. Characterization of polyketide metabolites from foliar endophytes of *Picea glauca*. *Journal of natural products*, 2008, 71: 1393-1398.
- [11] Namikoshi M, Negishi R, Nagai H, Dmitrenok A, Kobayashi H. Three new chlorine containing antibiotics from a marine-derived fungus *Aspergillus ostianus* collected in Pohnpei. *Journal of Antibiotics*, 2003, 56: 755-761.
- [12] Abrell LM, Borgeson B, Crews P. Chloro polyketides from the cultured fungus (*Aspergillus*) separated from a marine sponge. *Tetrahedron Letters*, 1996, 37: 2331-2334.
- [13] Kito K, Ookura R, Yoshida S, Namikoshi M, Ooi T, Kusumi T. Pentaketides relating to aspinonene and dihydroaspyrone from a marine-derived fungus *Aspergillus ostianus*. *Journal of Natural Products*, 2007, 70: 2022-2025.
- [14] Ono M, Zhao XY, Shida Y, Akita H. δ -Lactone formation from δ -hydroxy-*trans*- α , β -unsaturated carboxylic acids accompanied by *trans*-*cis* isomerization: synthesis of (L)-tetra-*O*-acetylosmundalin. *Tetrahedron*, 2007, 63: 10140-10148.
- [15] Zeeck A, Russ P, Laatsch H, Loeffler W, Wehrle H, Zaehner H, Holst H. Metabolic products of microorganisms. 172. Isolation of the antibiotic semi-vioxanthin from *Penicillium citreo-viride* and synthesis of xanthomegnin. *Chemische Berichte*, 1979, 112: 957-978.
- [16] Yada H, Sato H, Toshima H, Deura M, Ichihara A. (-)-Semi-vioxanthin, a new abscisic compound against hinoki cypress leaves isolated from *Cryptosporiopsis abietina*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65: 484-486.
- [17] Chen L, Fang YC, Zhu TJ, Gu QQ, Zhu WM. Gentsyl alcohol derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. *Journal of Natural Products*, 2008, 71: 66-70.
- [18] Nishikawa, H. *Nippon Nogeikagaku Kaishi (Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan)*, 1933, 9: 772.
- [19] Hill RA. Naturally occurring isocoumarins. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1986, 49: 1-78.
- [20] Rukachaisirikul V, Naklue W, Sukpondma Y, Phongpaichit S. An antibacterial biphenyl derivative from *Garcinia bancana* MIQ. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 53: 342-343.
- [21] Schulz B, Sucker J, Aust H J, Krohn K, Ludwig K, Jones PG, Doering D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycological Research*, 1995, 99: 1007-1015.
- [22] Fuchser J, Zeeck A. Secondary metabolites by chemical screening. Part 34. Aspinolides and aspinonene/aspyrone co-metabolites, new pentaketides produced by *Aspergillus ochraceus*. *Liebigs Annalen/Recueil*, 1997, 1: 87-95.
- [23] Yang XY, Cai SX, Zhang WJ, Tang XL, Shin HY, Lee JY, Gu QQ, Park H. Semi-vioxanthin isolated from marine-derived fungus regulates tumor necrosis factor- α , cluster of differentiation (CD) 80, CD86, and major histocompatibility complex class II expression in RAW264.7 cells via nuclear Factor-k B and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31 (12): 2228-2233.

Effects of environmental stress on secondary metabolites of *Aspergillus ochraceus* LCJ11-102 associated with the coral *Dichotella gemmacea*

Yalin Zhou, Yi Wang, Peipei Liu, Zhiying Wang, Weiming Zhu *

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

Abstract: [**Objective**] To explore the secondary metabolites of fungus *Aspergillus ochraceus* LCJ11-102 associated with the coral *Dichotella gemmacea* under environmental stress and to obtain characteristic compounds with biological activities. [**Methods**] A nutrient-deprived culture medium (biomimetic culture) and a high salt culture medium were used for fermentation. Fingerprints of HPLC of the fermentation broth were used to investigate the diversity of secondary metabolites. Compounds were isolated by column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20, and preparative HPLC. Their structures were identified by spectroscopic analyses and the modified Mosher's method. [**Results**] Different secondary metabolites were produced by *A. ochraceus* LCJ11-102 under two different culture conditions. (*R*)-mellein (**1**), (5,6-*trans*, 8,9-*threo*-)-9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyaspyrone (**2**), (5,6-*erythro*-, 8,9-*threo*-)-9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyasperlactone (**3**), and (5*S*,6*R*,9*S*)-dihydroaspyrone (**4**) were identified from the biomimetic cultures, and *R*(+)-*semi*-vioxanthin (**5**) was identified from the high salt cultures, respectively. [**Conclusion**] Environmental stress obviously induces microbes to produce different secondary metabolites. And biomimetic culture is an effective approach to obtain active chloro compounds from marine microorganisms.

Keywords: coral-associated fungus; *Aspergillus ochraceus*; biomimetic culture; salt stress; secondary metabolites; *Dichotella gemmacea*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA09Z447)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-82031268; E-mail: weimingzhu@ouc.edu.cn

Received: 19 March 2010/Revised: 29 April 2010

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的J1上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。