

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11): 1289–1295; 4 November 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.006

海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 与细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE001 共培养次生代谢产物

董杰杰^{1,2}, 张晓勇¹, 鲍洁^{1,2}, 徐新亚¹, 农旭华¹, 漆淑华^{1*}

¹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, 广东 广州 510301

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】阐明海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 与细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 在平板上共培养时产生的主要抗菌物质和红色素的化学结构。【方法】在固体淀粉培养基上分别进行 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 纯培养、以及 SCSGAF 0076 和 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 共培养, 培养 3 d 后分别对纯培养和共培养的培养基进行萃取浓缩得到浸膏, 运用高效液相色谱分析比较纯培养和共培养所得浸膏的化学成分的差异, 并采用抗菌活性追踪法, 结合硅胶柱层析、凝胶柱层析和高效液相色谱等分离方法从共培养浸膏中分离纯化抗菌物质和红色素, 运用波谱解析法鉴定化合物的结构。【结果】通过高效液相色谱分析发现, 共培养与纯培养的主要次生代谢产物没明显差异, 但抗菌物质和红色素的含量差别明显。从这两株菌共培养的发酵产物中分离鉴定了 4 个化合物, 包括抗菌物质青霉素 (1)、青霉素类似物 5 (6)-dihydropenicillie acid (2) 和 9-chloro-8-hydroxy-8, 9-deoxyasperlactone (3)、以及红色素 viopurpurin (4)。【结论】初步阐明了 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 与 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 共培养时由 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 产生的主要抗菌活性化合物是青霉素, 伴随明显增多的主要红色素是 viopurpurin, 二者产率均比 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 纯培养时高。

关键词: 真菌 *Aspergillus* sp., 细菌 *Bacillus* sp., 共培养, 抗菌, 青霉素, 红色素

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1289-07

微生物共培养在生产生活以及天然产物发现方面常有所应用。比如, 仲紫斌等发现运用微生物共培养用来净化工业污水、生物废水以及氧化塘污水的效率远大于单独菌种的效率^[1]; 周杰民等利用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的共培养使得果胶酶的产率较之黑曲霉

的纯培养提高 63.6%^[2]; Shin 等发现当真菌 *Monascus* sp. J101 与酿酒酵母或者米曲霉 (*A. oryzae*) 混合培养时色素产率比单独 *Monascus* sp. J101 培养时提高 30–40 倍^[3]; Cueto 等发现海洋来源的 *Pestalotia* sp. CNL-365 只有在单细胞海洋细菌 CNJ-328 的作用下才会产生新的抗肿瘤和抗感染活

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

* 通信作者。Tel: + 86-20-89022112; E-mail: shuhuaqi@scsio.ac.cn

作者简介: 董杰杰 (1987–), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋天然产物。E-mail: 991764332@qq.com

收稿日期: 2014-01-15; **修回日期:** 2014-04-01

性化合物 pestalone^[4]。

在研究海洋微生物次生代谢产物的过程中,我们发现来源于南海柳珊瑚的曲霉属真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 与芽孢杆菌属细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 在固体淀粉培养基上共培养与这两菌株分别纯培养所产生的现象差异明显(图 1),其中图 1-A 和图 1-C 是利用相同的“之”字型方式分别接种细菌和真菌,而图 1-B 首先利用“之”字型方式接种真菌,接着将细菌点在划有真菌的部位。对比图 1-A 和 1-B,可清楚地从图 1-B 中看到生长在真菌附近的细菌周围有明显抑菌圈,且细菌单独生长比与真菌共培养时长势更加饱满;对比图 1-B 和 1-C,



图 1. 细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 和真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 的培养情况

Figure 1. Coculture and coculture of *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 and *Bacillus* sp. MNMCCE 001. A: monoculture of *Bacillus* sp. MNMCCE 001; B: coculture of *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 and *Bacillus* sp. MNMCCE 001; C: monoculture of *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076.

1 材料和方法

1.1 主要仪器

旋光仪, MCP 300 (安东帕公司) 25 °C 下测定; 超导核磁共振光谱仪, Bruker DRX-500 型, 内标为 TMS; ESI-MS 质谱仪, Finnigan LCQDECAXXP HPLC-MASS; 正相柱层析硅胶 (200 – 300 目), 青岛海洋所化工厂; 高效薄层预制板, 烟台市化学工业研究所 (型号: HSG-FR254R); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20, Amersham Pharmacia; 半制备型高效液相色谱仪, SHIMADZU LC-20A (DAD 检测器), YMC-Pack, ODS (250 mm × 10.0 mm, 5 μm), Gemini C18, 110A (250 mm × 10.0 mm, 5 μm); 旋转蒸发器, 日本东京理化株式会社 (EYELAN-1100V-W 型); 液相用甲醇为色谱纯 (MERCK 公司)。

1.2 实验用菌株

柳珊瑚共附生真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 是本实验室从采自南海海域的鳞海底柏柳珊瑚

发现在细菌附近生长的真菌长势明显被阻断, 也就是说真菌的生长被抑制, 且伴随着真菌代谢产物中红色素明显增多。根据该现象, 我们猜测 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 与 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 之间的生长是相互抑制的。为了探究该现象, 本文对这两菌株的共培养代谢产物进行了研究, 采用抗菌活性追踪法从粗提取物中分离鉴定了 4 个化合物, 包括抗菌化合物青霉酸 (penicillic acid) (1)^[5-6]、5 (6) – dihydropenicillic acid (2)^[7]、9-chloro-8-hydroxy-8, 9-deoxyasperlactone (3)^[8-9]、以及红色素 viopurpurin^[10-11] (4)。

(*Melitodessquamata*) 样品中分离得到的, 细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 同样分离自鳞海底柏柳珊瑚 (*Melitodessquamata*) 中, 二者皆保存在中国科学院海洋微生物中心, 抗菌实验用细菌为 *Bacillus* sp. MNMCCE 001、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

1.3 真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 纯培养与共培养的液相色谱 (HPLC) 图分析对比

取 2 根含有新配置的固体淀粉培养基的试管, 其中 1 根试管只接种真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076, 另外 1 根试管同时接种真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 和细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001, 28 °C 培养箱中培养 3 天, 可观察到红色素产量趋于稳定, 用工业酒精萃取, 得到浸膏, 用甲醇稀释到相同浓度后 HPLC 分析, 整个分析条件为 MeOH/H₂O 梯度洗脱: 0 – 35 min: MeOH/H₂O = 5% – 100%; 35 – 45 min: MeOH/H₂O = 100%; 45 – 55 min: MeOH/H₂O = 100% – 5%; 55 – 60 min: MeOH/H₂O = 5%, Inertsil ODS-SP, DAD 检测器, 流速为 1 mL/min。

1.4 菌株共培养发酵与提取

菌株 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 保存在试管斜面固体淀粉培养基 (葡萄糖 1%、淀粉 1%、 KH_2PO_4 0.01%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%、蛋白胨 0.01%、琼脂 2%、海盐 3%) 上, 刮取少量孢子至新配置的淀粉固体平板培养基上, 28 °C 培养箱中培养; 菌株 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 用同样方法接种至 LBA 培养基 (细菌学蛋白胨 1%、酵母膏 0.5%、琼脂 2%、海盐 3%) 上, 30 °C 活化。2 d 后将活化好的 SCSGAF 0076 和 MNMCCE 001 菌种同时接种在 100 个淀粉培养基平板上进行共培养, 28 °C 培养箱中培养 3 d, 观察到红色素产量明显增加并趋于稳定, 用工业酒精萃取固体培养基, 最后得到浸膏 100 mg。

1.5 化合物的提取分离纯化

将共培养浸膏 100 mg 过硅胶正相柱层析, 用石油醚-乙酸乙酯 (体积比依次为 3:1、1:1)、乙酸乙酯-甲醇 (体积比依次为 1:0、20:1、5:1、1:1、0:1) 作为洗脱剂, TLC 点板合并得到组分 Fr. 1-Fr. 5; 抗菌活性追踪显示在 50 μg /纸片 (6 mm) 浓度时组分 Fr. 1 能显著抑制细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 的生长, 抑菌圈为 11 mm-12 mm, 而其它组分无明显抑菌圈。利用制备型薄层层析板对 Fr. 1 进行分离, 以氯仿-甲醇 (9:1) 为展开剂得到两个主要组分 Fr. 1-1 和 Fr. 1-2, 其中 Fr. 1-1 经半制备型高效液相色谱仪 (洗脱剂为甲醇-水/30:70) 纯化得到化合物 3 (6 mg, t_{R} = 16.5 min, YMC-Pack, DAD 检测器), Fr. 1-2 经半制备型高效液相色谱仪 (洗脱剂为甲醇-水/24:76) 纯化得到化合物 1 (7 mg, t_{R} = 21.5 min, Gemini C18, DAD 检测器) 和 2 (4 mg, t_{R} = 32.5 min, Gemini C18, DAD 检测器); 含红色素组分 Fr. 4 经半制备型高效液相色谱仪 (洗脱剂为甲醇-水/68:32) 制备得到化合物 4 (1mg, t_{R} = 47.5 min, YMC-Pack, DAD 检测器)。

1.6 抗菌实验

采用纸片法^[12]进行抗菌实验, 平板是在 1h 内新倒的固体淀粉培养基平板, 等培养基凝固之后用涂布棒将 *Bacillus* sp. MNMCCE 001、大肠杆菌和枯草芽胞杆菌分别均匀涂在固体平板上, 将负载有待测化合物的 6 mm 滤纸片 (每个滤纸片负载 50 μg 待测化合物) 用镊子紧贴在平板上, 用青霉素做阳性对照 (每个滤纸片负载 25 μg 青霉素), 然后放在

30 °C 培养箱中培养 1 天后观察现象。每个实验做 3 个平行。

1.7 96 孔板法确定青霉酸的 MIC 值

MIC 值测定中用到的 3 个指示菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001、大肠杆菌和枯草芽胞杆菌的菌液利用 10^{-5} CFU/mL 标准接种菌液稀释法来准备, 参考文献^[13]设计实验, 用二甲基亚砜 (DMSO) 作溶剂, 将青霉素配制成不同的浓度, 分别为: 20.48、10.24、5.12、2.56、1.28、0.64、0.32 和 0.16 mg/mL, 青霉素阳性对照浓度为: 5.12、2.56、1.28、0.64、0.32 和 0.16 mg/mL, 每个 96 孔板小孔中加入 95 μL 指示菌菌液, 每种菌液占用小孔为 (8 × 4), 每种指示菌小孔中分别加入不同浓度的青霉素、青霉素、DMSO、培养基 5 μL (2 组平行), 其中 DMSO 和培养基作为阴性对照, 隔天观察现象。

2 结果

2.1 菌株鉴定

通过 ITS (internal transcribed spacer, 内转录间隔区) 基因序列分析, 实验用真菌 SCSGAF 0076 (KJ564278) 与 *Aspergillus* sp. NRRL 4752 (EF661429) 的相似性为 99%, 故鉴定为 *Aspergillus* sp.。

利用通用引物 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') 和 1525R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCA GCC-3') 以所提的总 DNA 为模板对实验用细菌进行扩增 16S rRNA 基因序列, 纯化测序后, 菌株 MNMCCE 001 (KJ564277) 的 16S rRNA 基因序列 DNA 总长度为 966 bp, 经比较基因序列的同源性, 与 *Bacillus* sp. B3 (EU281629) 序列 99% 吻合, 故鉴定为 *Bacillus* sp.。

2.2 真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 纯培养与共培养的液相色谱 (HPLC) 分析对比

通过 HPLC 分析 (图 2) 发现, 真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 与细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 的共培养的代谢产物中抗菌化合物青霉素和红色素 viopurpurin 的峰面积均大于真菌纯培养中相应峰的峰面积。

2.3 化合物鉴定

化合物 1: 无色油状物, ESI-MS m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+ 171$, $[2\text{M} + \text{H}]^+ 363$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.87 (1H, s, 4-OH), 5.48 (1H, s, H-

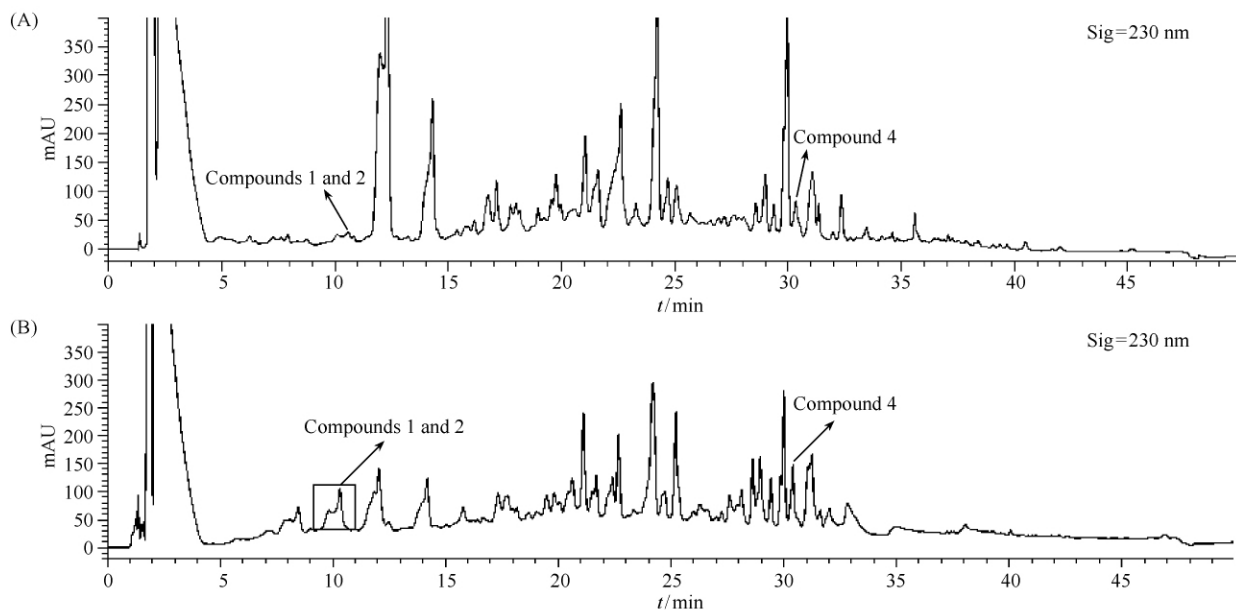


图 2. 代谢产物 HPLC 分析图

Figure 2. HPLC analysis of monoculture and co-culture. A: monoculture of *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076. B: coculture and coculture of *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 and *Bacillus* sp. MNMCCE 001.

6a), 5.22 (1H, s, H-6b), 5.12 (1H, s, H-2), 3.91 (3H, s, H-8), 1.78 (3H, s, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} 179.6 (qC, C-3), 170.4 (qC, C-1), 139.9 (qC, C-5), 116.5 (CH_2 , C-6), 103.2 (qC, C-4), 89.4 (CH, C-2), 59.8 (CH_3 , C-8), 17.4 (CH_3 , C-7)。以上波谱数据与文献报道一致^[5-6], 因此鉴定化合物 **1** 为青霉素。

化合物 **2**: 白色粉末状固体, ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} 7.41 (1H, s, 4-OH), 5.32 (1H, s, H-2), 3.85 (3H, s, H-8), 2.03 (1H, m, H-5), 0.95 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-6), 0.79 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 179.7 (qC, C-3), 169.9 (qC, C-1), 104.7 (qC, C-4), 89.3 (CH, C-2), 59.5 (CH_3 , C-8), 32.9 (CH, C-5), 16.2 (CH_3 , C-6), 15.5 (CH_3 , C-7)。以上波谱数据与文献报道一致^[7], 因此鉴定化合物 **2** 为 5(6)-dihydropenicillanic acid。

化合物 **3**: 浅黄色油状物, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 14.6^\circ$ (c 0.60, MeOD); HRESIMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+ 243$; ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} 7.55 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-4), 5.00 (1H, ddd, $J = 1.5, 1.5, 4.5$ Hz, H-5), 4.59 (1H, dd, $J = 1.5, 4.5$ Hz, H-8), 4.44 (1H, qd, $J = 6.5, 4.5$ Hz, H-9), 4.01 (1H, qd, J

$= 7.0, 4.5$ Hz, H-6), 1.49 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-10), 1.26 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} 174.1 (qC, C-2), 151.8 (CH, C-4), 136.2 (qC, C-3), 86.9 (CH, C-5), 71.6 (CH, C-8), 68.3 (CH, C-6), 59.8 (CH, C-9), 19.6 (CH_3 , C-10), 19.1 (CH_3 , C-7)。以上波谱数据与文献报道一致^[8-9], 因此鉴定化合物 **3** 为 9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyasperlactone。

化合物 **4**: 紫色粉末状固体, ESI-MS m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+ 545$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} 1.54 (6H, d, $J = 6.5$ Hz, 8- CH_3 , 7'- CH_3), 3.20 (4H, d, $J = 6.0$ Hz, 7- CH_2 , 8'- CH_2), 4.81 (2H, m, 8-H, 7'-H) 为 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2$ -上氢; δ_{H} 4.12 (3H, s, 2'- OCH_3) 为氧化甲基; δ_{H} 7.78 (1H, s, H-9'), 7.84 (1H, s, H-6) 为苯环上 2 个氢; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} 180.2 (C, C-4), 173.2 (C, C-1), 161.9 (C, C-5), 160.5 (C, C-9), 160.1 (C, C-6'), 158.0 (C, C-2), 157.7 (C, C-5'), 150.3 (C, C-4'), 147.5 (C, C-6a), 147.1 (C, C-1'), 145.9 (C, C-2'), 139.0 (C, C-8'a), 136.9 (C, C-9b), 134.7 (C, C-9'a), 126.3 (C, C-3), 126.1 (C, C-9a), 121.5 (C, C-6), 116.5 (CH, C-9'), 116.5 (C, C-4'a), 116.1 (C, C-3'), 115.2 (C, C-5'a), 114.8 (C,

C-4a), 74.5 (CH, C-8, C-7'), 61.9 (CH₃, 2'-OCH₃), 36.4 (CH₂, C-7, C-8a), 20.6 (CH₃, 8-CH₃, 7'-CH₃)。以上波谱数据与文献报道一致^[10-11], 因此鉴定化合物 **4** 为 viopurpurin。

2.4 抗菌活性测试结果

纸片法抗菌活性实验显示在 50 μg/纸片时, 化合物 **1** 抑制 *Bacillus* sp. MNMCCE 001、大肠杆菌和枯草芽胞杆菌生长的抑菌圈分别为 28、31 和 39 mm

(甚至与青霉素的抑菌圈连在一起), 而化合物 **2** 和 **3** 除了对枯草芽胞杆菌有微弱活性外, 对另外 2 株细菌均无明显抑制作用 (图 3), 阳性对照青霉素在 25 μg/纸片时抑制 *Bacillus* sp. MNMCCE 001、大肠杆菌和枯草芽胞杆菌的抑菌圈分别为 44、41 和 51 mm; 96 孔板法测试显示化合物 **1** 抑制这 3 株指示菌生长的 MIC 值均为 256 μg/mL。

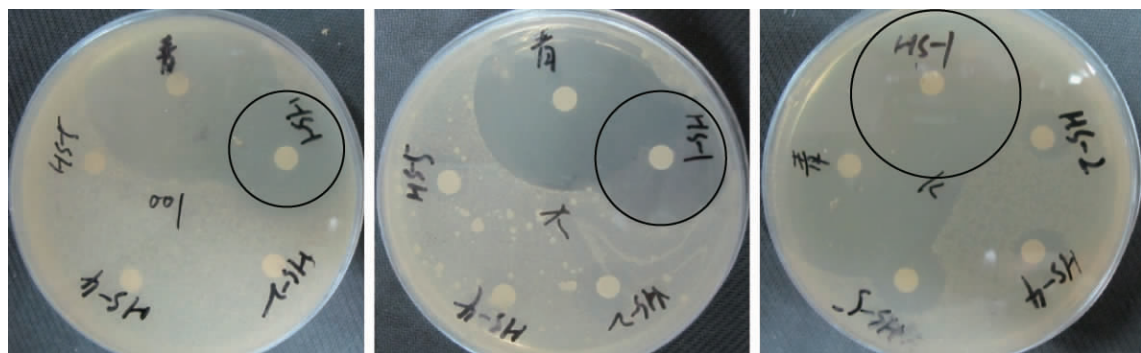


图 3. 化合物 **1**–**3** 对 *Bacillus* sp. MNMCCE 001、大肠杆菌和枯草芽胞杆菌的抗菌活性 (纸片法)

Figure 3. Antibacterial activity of compounds **1**–**3** against *Bacillus* sp. MNMCCE 001, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (by disk diffusion method). Compound **1**: HS-1; compound **2**: HS-2; compound **3**: HS-4.

3 讨论

本研究中分离到的化合物 **1**、**2**、**4** 都属于真菌毒素, 具有不同程度的毒性。其中有关青霉酸 (**1**) 的研究已经非常多, 青霉酸不仅具有抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗肿瘤活性、以及抑制乙酰胆碱酶的活性, 且对各种动物都具有毒性, 主要引起心脏、肝脏和肾脏等器官的损伤, 并具有潜在致癌性^[5, 13, 14]。Frisvad 等在 2004 年对具有生物活性的胞外分泌物进行归类总结时指出, 能够产生青霉酸的物种 (如 *P. aurantiogriseum*, *P. carneum*, *P. cyclopium*, *P. freii*, *P. melanoconidium*, *P. neoehinulatum*, *P. polonicum*, *P. radicola*, *P. viridicatum* 等) 都具有抗细菌、抗病毒、抗肿瘤活性、以及细胞毒性和致癌性^[15]。此外, 青霉酸是一种真菌群体效应抑制剂 (QSI), 近期人们对 50 种青霉属真菌进行筛选, 发现 66% 的菌株能产生具有 QSI 活性的次生代谢产物, 其中的两种主要次生代谢产物为青霉酸和棒曲霉素, 以铜绿假单胞杆菌 (*P. aeruginosa*) 为例, 青霉酸和棒曲霉素能够对铜绿假单胞杆菌 (*P. aeruginosa*) 中群体效应控制的基因进行抑制, 其中

青霉酸的抑制率高达 60%^[16], 考虑到青霉酸本身的毒性, 或许进行修饰变成无毒的衍生物之后可以成为抗感染的药物。文献报道 9-chloro-8-hydroxy-8, 9-deoxyasperlactone (**3**) 在 100 μg/纸片时能抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长 (抑菌圈分别为 10.8 和 13.1 mm), 但 50 μg/纸片时则对大肠杆菌无明显抑制作用^[8], 这与我们的研究结果相一致。

本文通过对柳珊瑚共附生真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 与细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 共培养次生代谢产物的研究, 阐明了这两株菌株共培养时所产生的主要抗菌物质和含量显著增加的主要红色素的化学结构。有文献表明^[17], 两种微生物菌株竞争时, 其中一种在抵抗另外一个物种时由于某种变化而分泌更多的水解酶, 而红色素或许就是这一过程的水解产物。此实验中我们肉眼观察到的产量明显提高的红色素可能是真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 抵抗细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 时由真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 分泌更多水解酶而得到的水解产物。共培养可使代谢产物丰富, 并且可以提高某些代谢产物的产量, 因此在食品工业以及提高酶产量方面经常有所应用, 但是其具体作用机制因菌而异, 并且带有偶然性, 因此, 在药物

方面的应用还未成为主流。

参考文献

- [1] Zhong C, Yu H, Feng S, Zhang Z. Microbial co-culture and sewage purification. *Journal of Microbiology*, 2001, 21 (1) : 41-43. (in Chinese)
仲崇斌, 于海, 冯树, 张忠泽. 微生物共培养与污水净化. *微生物学杂志*, 2001, 21 (1) : 41-43.
- [2] Zhou J, Kang C, Ge X, Zhang W. Study on mixture-culture fermentation at high temperature inpectinase production. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33 (3) : 160-166. (in Chinese)
周杰民, 康传利, 葛向阳, 张伟国. 高温混菌发酵生产果胶酶的研究. *食品工业科技*, 2012, 33 (3) : 160-166.
- [3] Shin CS, Kim HJ, Kim MJ. Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 59 (5) : 576-581.
- [4] Cueto M, Jensen PR, Kauffman C. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *Journal of Natural Products*, 2001, 64 (11) : 1444-1446.
- [5] Kang SW, Kim SW. New antifungal activity of penicillic acid against *Phytophthora* species. *Biotechnology Letters*, 2004, 26 (9) : 695-698.
- [6] Suzuki S, Kimura T, Saito F, Ando K. Antitumor and antiviral properties of penicillic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1971, 35 (2) : 287-290.
- [7] Sassa T, Hayakaru S, Ikeda M. Plant-growth inhibitors produced by Fungi. 1. isolation and identification of penicillic acid and dihydropenicillic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1971, 35 (13) : 2130-2131.
- [8] Namikoshi M, Negishi R, Nagai H, Dmitrenok A, Kobayashi H. Three new chlorine containing antibiotics from a marine-derived fungus *Aspergillus ostianus* collecting in Pohnpei. *The Journal of Antibiotics*, 2003, 56 (9) : 755-61.
- [9] Zhou Y, Wang Y, Liu P, Wang Z, Zhu W. Effects of environmental stress on secondary metabolites of *Aspergillus ochraceus* LCJ11-102 associated with the coral *Dichotellagemmacea*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (8) : 1023-1029. (in Chinese)
周雅琳, 王义, 刘培培, 王智颖, 朱伟明. 环境胁迫对珊瑚共附生真菌 *Aspergillus ochraceus* LCJ11-102 次级代谢产物的影响. *微生物学报*, 2010, 50 (8) : 1023-1029.
- [10] Durley RC, MacMillan J, Simpson TJ, Glen AT, Turner WB. Fungal products. Part XIII. Xanthomegnin, viomellin, rubrosulphin, and viopurpurin, pigments from *Aspergillus sulphureus* and *Aspergillus melleus*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1975 (2) : 163-169.
- [11] Simpson TJ. ¹³C Nuclear magnetic resonance spectra and biosynthetic studies of xanthomegnin and related pigments from *Aspergillus sulphureus* and *melleus*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1977 (6) : 592-595.
- [12] Acar JF, Goldstein FW, Kitzis MD, Eyquem MT. Resistance pattern of anaerobic bacteria isolated in a general hospital during a two-year period. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1981, 8 : 9-16.
- [13] Schürmann BTM, Sallum WST, Takahashi JA. Austin, dehydroaustin and other metabolites from *Penicillium brasilianum*. *Química Nova*, 2010, 33 (5) : 1044-1046.
- [14] Guo L, Yan H, Yuan H. Advance in toxicity of penicillic acid. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29 (3) : 94-96. (in Chinese)
郭乐, 晏晖云, 袁慧. 青霉酸毒性研究进展. *动物医学进展*, 2008, 29 (3) : 94-96.
- [15] Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 2004, 49 : 201-241.
- [16] Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, Phipps RK, Christensen KB, Jensen PO, Andersen JB, Koch B. Identity, Larsen TO, Hentzer M, Eberl L, Hoiby N, Givskov M. Identify and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*, 2005, 151 (5) : 1325-1340.
- [17] Suh JH, Shin CS. Analysis of the morphologic changes of *Monascus* sp. J101 cells cocultured with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 193 (1) : 143-147.

Secondary metabolites of the co-culture of *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 and *Bacillus* sp. MNMCCE 001

Jiejie Dong^{1, 2}, Xiaoyong Zhang¹, Jie Bao^{1, 2}, Xinya Xu¹, Xuhua Nong¹,
Shuhua Qi^{1*}

¹Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong Province, China

²Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] To elucidate the chemical structures of the main antibacterial compound and red pigment produced by the co-culture of marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 and bacterium *Bacillus* sp. MNMCCE 001.

[Methods] The monoculture of strain SCSGAF 0076 and co-culture of strains SCSGAF 0076 and MNMCCE 001 were done on amylum solid medium for three days, then the crude extracts of the cultures were obtained, and subsequently, the chemical profiles of the extracts of monoculture and co-culture were analyzed by HPLC. Using antibacterial bioassay-guided fractionation, we isolated the crude extract of the co-culture by silica gel column chromatogram, Sephadex LH-20, and semi-preparative HPLC to obtain the main antibacterial compound and red pigment. The compounds' structures were determined by spectroscopic analysis. [Results] We found that the main secondary metabolites produced by the monoculture of strain SCSGAF 0076 and co-culture of strains SCSGAF 0076 and MNMCCE 001 were almost the same, however, the contents of the main antibacterial compound and red pigment were obviously different. Totally, four compounds including the antibacterial compound penicillic acid, 5 (6)-dihydropenicillic acid, 9-chloro-8-hydroxy-8,9-deoxyasperlactone and red pigment viopurpurin were isolated from the crude extract of the co-culture medium.

[Conclusion] The main antibacterial compound of the co-culture of strains SCSGAF 0076 and MNMCCE 001 was penicillic acid, the main red pigment was viopurpurin, and the yields of the two compounds were proved by the co-culture.

Keywords: fungus *Aspergillus* sp., bacterium *Bacillus* sp., co-culture, antibacterial activity, penicillic acid, red pigment

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Science Foundation of China (grant 41376160) and by the Regional Innovation Demonstration Project of Guangdong Province Marine Economic Development (GD2012-D01-002)

* Corresponding author. Tel: +86-20-89022112; Fax: +86-20-84458964; E-mail: shuhuaqi@scsio.ac.cn

Received: 15 January 2014 / Revised: 1 April 2014