



南海珊瑚来源真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 的分离鉴定及其次级代谢产物研究

叶伟霞^{1,2}, 赵梦冉^{2,3}, 王璐^{2,3}, 蒋晓东^{2,3}, 张文军^{2,3}, 张长生^{2,3}, 田海妍^{1*}

1 暨南大学药学院中药及天然药物研究所, 广州 广东 510632

2 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 中国科学院海洋微生物中心广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301

3 中国科学院大学, 北京 100049

叶伟霞, 赵梦冉, 王璐, 蒋晓东, 张文军, 张长生, 田海妍. 南海珊瑚来源真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 的分离鉴定及其次级代谢产物研究. 微生物学报, 2022, 62(5): 1819–1831.

Ye Weixia, Zhao Mengran, Wang Lu, Jiang Xiaodong, Zhang Wenjun, Zhang Changsheng, Tian Haiyan. Isolation, identification, and bioactive metabolites of coral-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 from the South China Sea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1819–1831.

摘要:【目的】南海珊瑚共附生真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 次级代谢产物分离鉴定及抑菌活性筛选。【方法】利用稀释涂布平板法分离珊瑚共附生真菌。采用单菌多代谢产物方法(one strain many compounds, OSMAC)对分离菌株进行化学多样性筛选, 并采用滤纸片扩散法对真菌发酵产物进行抑菌活性分析。通过 ITS 测序鉴定活性菌株 SCSIO 40435 的分类地位, 运用多种色谱手段从其粗提物中分离纯化单体化合物, 并利用各种波谱手段(HRESIMS、1D 和 2D NMR、单晶 X-ray 衍射法等)确定化合物的结构。最后, 采用微量肉汤稀释法对单体化合物的抑菌活性进行评估。【结果】从南海珊瑚样品中分离得到 19 株共附生真菌, 结合化学多样性和抑菌活性分析, 筛选出 1 株产物丰富且具有多种抑菌活性的菌株 SCSIO 40435。利用 ITS 测序分析将其鉴定为曲霉属真菌(*Aspergillus* sp.), 进一步从其发酵产物中分离鉴定了 4 个对三联苯类化合物: dicandidusin

基金项目: 国家自然科学基金(41676165); 国家重点研发计划(2019YFC0312503); 海南省重大科技计划(ZDKJ202018); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDJ-SSW-DQC004)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41676165), by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC0312503), by the Key Science and Technology Project of Hainan Province (ZDKJ202018) and by the Key Research Program of Frontier Sciences (QYZDJ-SSW-DQC004)

*Corresponding author. E-mail: tianhaiyan1982@163.com

Received: 25 September 2021; Revised: 3 November 2021; Published online: 25 November 2021

A (1)、candidusin A (2)、terphenyllin (3)和 4"-deoxyterphenyllin (4), 其中化合物 1 为一个对三联苯同源二聚体类新化合物。此外, 首次对化合物 4 的单晶结构进行了报道。【结论】本研究表明, 南海珊瑚中含有丰富的共附生真菌资源, 且具有产生结构新颖的活性次级代谢产物的潜力, 有望成为药物发现和开发的重要来源。

关键词: 珊瑚共附生真菌; 活性次级代谢产物; 对三联苯二聚体

Isolation, identification, and bioactive metabolites of coral-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 from the South China Sea

YE Weixia^{1,2}, ZHAO Mengran^{2,3}, WANG Lu^{2,3}, JIANG Xiaodong^{2,3}, ZHANG Wenjun^{2,3}, ZHANG Changsheng^{2,3}, TIAN Haiyan^{1*}

1 Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, College of Pharmacy, Ji'nan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

2 Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, Key Laboratory of Tropical Marine Bio-Resources and Ecology, RNAM Center for Marine Microbiology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] To investigate the antimicrobial activity and secondary metabolites from the coral-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO 40435. [Methods] The coral-associated fungi were isolated by dilution-plating method. One strain-many compounds (OSMAC) approach was used for the analysis of metabolite diversity, and the antibacterial activities of fungal metabolites were tested via the standard disk diffusion method. The bioactive strain SCSIO 40435 was identified by rDNA ITS sequence analysis. The active metabolites of *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 were isolated and purified from the crude extract by chromatographic methods, and their chemical structures were characterized by HRESIMS, 1D and 2D NMR, and single crystal X-ray diffraction analysis. The antibacterial activities of the isolated compounds were measured by the broth microdilution method. [Results] A total of 19 fungal strains were isolated from corals in the South China Sea. The strain SCSIO 40435 with abundant products and multiple antibacterial activities was screened out and identified as *Aspergillus* sp. SCSIO 40435. Four *p*-terphenyl compounds were isolated from the crude extract of *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 and identified as dicandidusin A (1), candidusin A (2), terphenyllin (3), and 4"-deoxyterphenyllin (4), among which compound 1 is a new *p*-terphenyl homodimer. In addition, the single crystal structure of compound 4 was obtained for the first time. [Conclusion] This study demonstrates that corals from the South China Sea are rich in fungal resources and have the potential to produce novel active secondary metabolites, which are expected to become an important source for drug discovery and development.

Keywords: coral-associated fungi; active secondary metabolites; *p*-terphenyl dimer

南海海域辽阔, 生物资源种类繁多, 是我国最重要的海岛和珊瑚礁、红树林、海草床等生态系统分布区, 也是全球海域生物多样性最高的地区之一^[1]。珊瑚礁生态系统是由生物和非生物构建的复杂、独特的生态系统, 是海洋中的“热带雨林”。珊瑚礁生态系统除为种类繁多的动植物提供栖息场所外还共附生着丰富的微生物种群^[2]。这些微生物长期处于极端的生境下(高压、高盐度、寡营养、低温、黑暗等), 寄生或共生于宿主之中, 从而与宿主之间产生特殊的交流方式^[3-4]。这种相互关系往往使共附生微生物进化出独特的代谢途径和防御机制, 具有产生新颖结构的活性物质的潜能^[5-6]。近年来, 研究人员逐渐把目光从珊瑚礁的生态学意义、珊瑚微生物群的特征等研究领域转向珊瑚共附生真菌活性次级代谢产物的发掘上, 并取得了巨大进展。目前, 从珊瑚共附生真菌中获得的活性物质种类多样, Wang 等从珊瑚共附生真菌次级代谢产物中分离得到具有新颖结构的

硫代甘油酸酯取代的骨架重排混元二萜类化合物 Alternarin A, 该化合物有显著的神经药理活性^[7]。Chao 等以二级 MS 为指导从珊瑚来源的真菌中分离得到 4 个新颖的 7 元环肽, 并半合成了一系列环七肽衍生物, 其合成衍生物显示出中等强度的抗结核杆菌活性^[8]。Cheng 等从珊瑚来源真菌中分离得到新颖的三元螺环橘霉素衍生物^[9]。至今已从珊瑚来源真菌中分离得到萜类、聚酮、肽类、葱醌类以及生物碱等多种结构类型天然产物, 这些天然产物呈现出抗癫痫、抗病毒、抗结核、抗炎以及抗肿瘤等多种生物活性^[10-13], 珊瑚来源真菌已经成为当前最具开发前景的天然产物新药源之一。

近期, 我们从南海来源珊瑚中筛选出 1 株产物丰富且具有多种抑菌活性的真菌 SCSIO 40435, 结合 ITS 测序鉴定为曲霉属真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435, 进一步从其大米培养物中分离鉴定了 4 个对三联苯类化合物(1-4, 图 1)。结合 HRESIMS、1D 和 2D NMR、

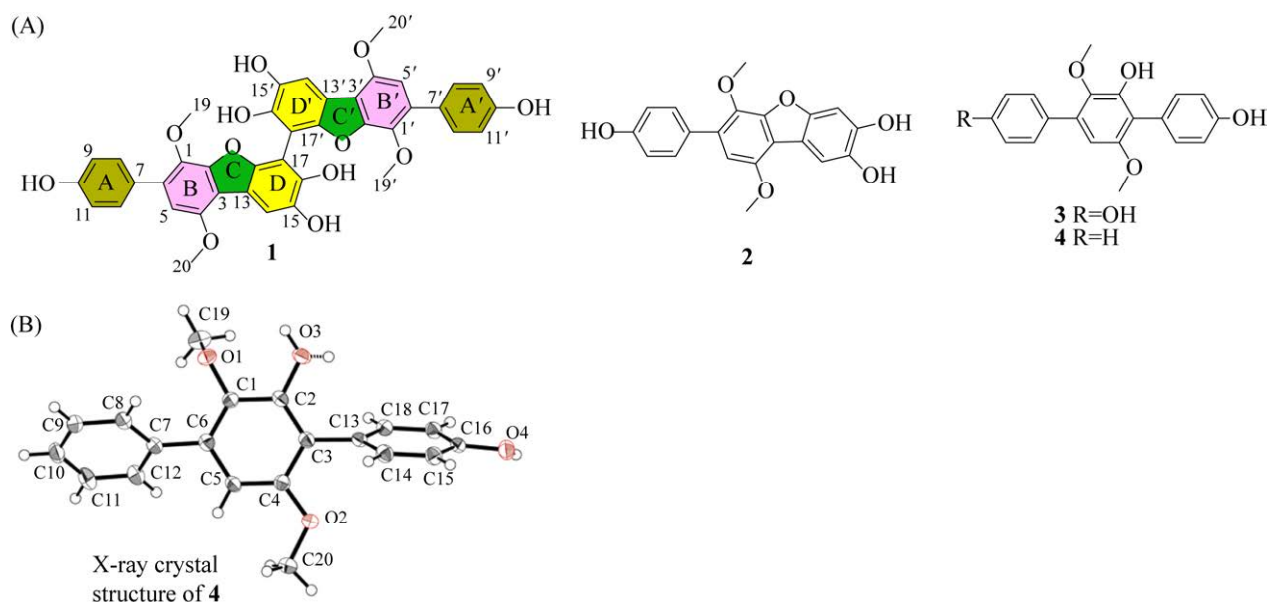


图 1 化合物的结构图

Figure 1 The structures of compounds. A: structures of compounds 1-4; B: X-ray crystal structure of compound 4.

X-ray 单晶衍射等波谱数据, 确定化合物 dicandidusin A (1) 为新的对三联苯同源二聚体, 2–4 为已知化合物, 分别为 candidusin A (2)、terphenyllin (3) 和 4"-deoxyterphenyllin (4)。本文报道曲霉属真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 的分离筛选及其次级代谢产物的分离鉴定与活性评价。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

供试珊瑚由中国科学院南海海洋研究所蒋晓东博士采集于中国南海, 样品采集后立即放置于无菌塑料样品袋中, 保存于 4 °C, 低温运输至实验室后用于真菌的分离。

1.1.2 培养基

(1) 菌株分离固体培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯葡萄糖水 24, 琼脂粉 20, 海盐 30。GPSA 培养基(g/L): 葡萄糖 10, 细菌学蛋白胨 1, 可溶性淀粉 10, K_2HPO_4 10, $MgSO_4$ 1, 琼脂粉 20, 海盐 30, pH 7.0–7.4。甘油-酪素培养基(g/L): 甘油 10, 酪蛋白胨 10, KNO_3 2, NaCl 2, K_2HPO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $CaCO_3$ 0.2, 琼脂粉 20, 海盐 30, pH 7.0–7.4。

(2) 菌株发酵筛选培养基

PDB 培养基(g/L): 马铃薯葡萄糖水 24, 海盐 30。大米培养基: 大米 10 g, 海盐 0.45 g, 蒸馏水 15 mL。小米培养基: 小米 10 g, 海盐 0.45 g, 蒸馏水 15 mL。燕麦培养基: 燕麦 10 g, 海盐 0.6 g, 蒸馏水 20 mL。

(3) 抑菌活性筛选培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 调 pH 7.0。

MH 培养基(g/L): 水解酪蛋白胨肉汤 21。

1.1.3 指示菌种类

测试病原菌包括: 大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213), 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 1064), 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606), 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300) 和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* SCSIO ML01)。

1.1.4 主要试剂和仪器

PCR 扩增仪(Thermo Fisher Scientific ABI Veriti 96 well 型, 德国 Eppendorf 公司); 多功能组合式摇床(HYG-C, 太仓实验设备厂); 超导核磁共振仪(Bruker AVANCE 700M 型, 德国 Bruker 公司); 高分辨飞行时间质谱(Bruker maXis, 德国 Bruker 公司); 柱色谱硅胶(100–200 目, 烟台江友硅胶开发有限公司), 硅胶薄层板(HS-GF 254, 烟台江友硅胶开发有限公司); 高效液相色谱仪(Agilent 1260, 美国 Agilent 公司); 半制备高效液相色谱仪(Hitachi Primaide, 日本日立公司); 色谱柱(Phenomenex ODS column 250 mm×10.0 mm, 5 μm; Phenomenex, USA); 培养箱(MJ01, 湖北黄石恒丰医疗器械有限公司)。试剂: 色谱纯乙腈(安徽时联公司); 其他试剂均为国产分析纯(广州化学试剂厂)。

1.2 真菌的分离和纯化

将采集到的样品置于超净台中, 用经 75% 乙醇消毒的剪刀剪取珊瑚样品约 10 g, 置于装有已灭菌人工海水的烧杯中, 对其表面进行清洗, 用已灭菌的搅拌机将样品充分碾碎, 得组织原液。随后将原液稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} , 用移液枪吸取 200 μL 加到分离培养基的平板上, 用一次性涂布棒涂布均匀, 吹干后置于 28 °C 培养箱中倒置培养 7–30 d, 每隔 3 d 左右观察菌落生长状态。所有长出的真菌菌落均接

种于 PDA 平板上, 并多次纯化直至获得纯的菌株。

1.3 菌株发酵筛选及活性测试

将分离得到的真菌菌株接种至 PDB 液体培养基中(50 mL/250 mL), 28 °C、200 r/min 振荡培养 2 d 作为发酵培养的种子液, 将生长良好的种子液以 10% (V/V) 的接种量接种至 3 种固体培养基中, 静置培养 30 d。收菌后以体积比 (V/V) 1:1 加入丁酮浸泡提取、旋干, 提取物均分成 2 份。一份用甲醇溶解, HPLC 进样检测; 另一份提取物加 DMSO 配成 20 mg/mL 的溶液, 并采用滤纸片扩散法^[14]进行抑菌活性筛选。

1.4 真菌 SCSIO 40435 的菌种鉴定

1.4.1 真菌基因组 DNA 提取及 ITS 基因序列扩增

利用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA, 以通用引物 ITS1 (5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC-3')对菌株 ITS 区域进行扩增。PCR 扩增体系为 20 μ L: ddH₂O 13 μ L, 1 ng/ μ L 的 DNA 模板 0.5 μ L, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 1.2 μ L, 5 \times FastPfu 缓冲液 4 μ L, 5 units/ μ L 的 FastPfu 酶 0.4 μ L, 10 μ mol/L 的 ITS1 引物 0.5 μ L, 10 μ mol/L 的 ITS4 引物 0.5 μ L。PCR 程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 40 s, 55 °C 35 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物由广州擎科生物技术有限公司回收纯化, 完成测序。

1.4.2 系统发育分析

利用软件 SeqMan 将测序得到的序列结果进行校对拼接, 将拼接得到的完整序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 选择同源性较高且具有代表性的真菌作为参考序列, 下载相应菌株的序列和信息。使用软件 MEGA-X 以邻接法(neighbor-joining, NJ)对菌株进行系统发育分析^[15-17]。

1.5 真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 大规模固体发酵和萃取

将菌株 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 接种至 PDB 液体培养基中(50 mL/250 mL), 28 °C、200 r/min 振荡培养 2 d 作为放大发酵培养的种子液, 将生长良好的种子液以 20% (V/V) 的接种量接种至 15 kg 大米固体培养基中, 静置培养 30 d。收集菌体以体积比 (V/V) 1:2 加入丙酮浸泡提取 3 次, 减压浓缩回收丙酮。将 3 次浓缩浸膏合并, 水混旋, 乙酸乙酯萃取 3 次, 经减压浓缩后获得 118 g 粗浸膏。

1.6 真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 中活性次级代谢产物的提取分离

乙酸乙酯萃取部位(118 g), 经硅胶柱色谱梯度洗脱(氯仿-甲醇: 100/0, 95/5, 90/10, 85/15, 70/30, 50/50, 0/100), 通过薄层色谱法(TLC)检视, 结合 HPLC 分析检测合并得馏分 Fr. 1–Fr. 4。其中 Fr. 1 经硅胶柱色谱, 石油醚/乙酸乙酯(100/0, 5/1, 4/1, 7/3, 6/4, 5/5, 3/7, 2/8, 0/100)以及乙酸乙酯/甲醇(100/0, 7/3, 5/5, 3/7, 0/100)梯度洗脱, 经 TLC 及 HPLC 分析合并得 11 个子馏分 Fr.1-A–Fr. 1-K, 其中 Fr.1-F 经反相中压色谱(ODS), 采用乙腈/水体系(A 相: 0.08% HCOOH/H₂O; B 相: CH₃CN)梯度洗脱(V_B:V_A=5:95–95:5, 流速 10 mL/min)得到 20 个馏分 Fr. 1-F-01–Fr. 1-F-20。Fr.1-F-08 经凝胶色谱(Sephadex LH-20), 采用氯仿/甲醇(1:1)体系得到 4 个馏分 Fr.1-F-08-L1–Fr.1-F-08-L4, 其中 Fr.1-F-08-L4 经半制备液相, 以乙腈/水体系(A 相: 0.08% HCOOH/H₂O; B 相: CH₃CN)梯度洗脱(0–15 min, 50% B 相; 15–25 min, 50%–70% B 相; 25.1–33.0 min, 100% B 相)得到化合物 1 (2.9 mg)和化合物 2 (46.1 mg)。Fr.1-F-08-L3 经半制备液相, 以乙腈/水体系(A 相: 0.08% HCOOH/H₂O; B 相: CH₃CN)等

梯度洗脱 ($V_B:V_A=50:50$)得到化合物 **3** (25.2 mg)。将馏分 Fr.1-D 通过重结晶法, 纯化得到化合物 **4** (41.0 mg)。化合物 **1-4** 结构如图 1。

1.7 真菌 *Aspergillus sp.* SCSIO 40435 中次级代谢产物的活性评价

采用微量肉汤稀释法^[18]测定化合物 **1-4** 的最小抑菌浓度(MIC)。将化合物以 DMSO 为溶剂配成终浓度为 2.56 mg/mL 的母液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏备用。在 96 孔板上第 1 列的每孔加入 MH 液体培养基 200 μL , 第 2 列的每孔加入 MH 液体培养基 100 μL , 第 3 列加入 190 μL MH 液体培养基, 其余每列加入 MH 液体培养基 100 μL 。然后在第 3 列每孔加入样品母液 10 μL , 吹吸混匀, 再从第 3 列吸取 100 μL 液体到第 4 列, 吹吸混匀, 同理依次往下 2 倍稀释到第 12 列, 最后 1 列取 100 μL 弃去。按照同样的方法分别加入 DMSO 和环丙沙星作为对照组。

用无菌的 MH 液体培养基将培养好的菌液稀释 1 000 倍, 除第 1 列外每孔加入稀释菌液

100 μL , 使化合物的终浓度分别为 64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g/mL}$ 。以上实验每组做 3 个平行, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养。16 h 后观察菌株生长情况, 按照 CLSI 中“甲氧苄胺嘧啶或磺胺药物的肉汤稀释法”的终点判断, 与阳性生长对照管比较, 抑制 80% 细菌生长管药物浓度为受试菌的 MIC。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离鉴定和筛选

对分离获得的 19 株真菌分别采用 3 种不同的固体培养基(大米、小米及燕麦培养基)培养, 通过 HPLC-DAD 检测样品的化学多样性, 通过纸片法筛选抑菌活性, 发现菌株 SCSIO 40435 的次级代谢产物丰富(图 2), 且对 4 种革兰氏阳性菌: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 1064)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300)和藤

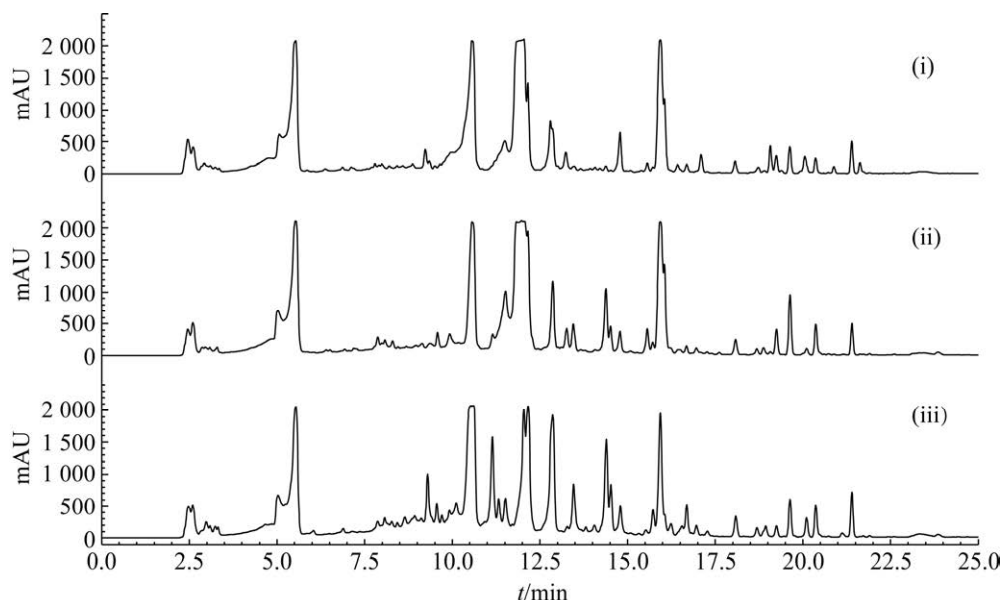


图 2 真菌 *Aspergillus sp.* SCSIO 40435 发酵粗提物的 HPLC 检测分析

Figure 2 HPLC analysis of fermentation extracts of the *Aspergillus sp.* SCSIO 40435. i: rice medium; ii: millet medium; iii: oatmeal medium.

黄微球菌(*Micrococcus luteus* SCSIO ML01)均具有抑制作用, 其中对枯草芽孢杆菌和藤黄微球菌的抑菌作用较强(表 1)。将菌株 SCSIO 40435 的 ITS 测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 并下载同源性较高的序列构建进化树分析(图 3), 发现菌株 SCSIO 40435 的 ITS 序列与 *Aspergillus candidus* (MT524443.1)的相

似性最高, 以 100%可信度聚在一个分支。综合以上分析结果, 将菌株鉴定为 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435。

2.2 真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 中化合物结构鉴定

通过大米固体培养基对真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 进行放大发酵, 从中分离得到 4 个

表 1 真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 三种发酵培养基粗提取物对革兰氏阳性菌抑菌活性结果

Table 1 The antibacterial activities of fermentation extracts of *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 against Gram-positive bacteria

Crude extract	Indicator			
	<i>Bacillus subtilis</i> 1064	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	<i>Micrococcus luteus</i> SCSIO ML01
Rice medium	++	+	+	++
Millet medium	++	+	+	+
Oatmeal medium	+	++	+	+
Vancomycin	++	++	++	+++
Trimethoprim	+++	+++	+++	+++

+: $0 \leq d < 7$ mm; ++: $7 \leq d < 12$ mm; +++: $12 \text{ mm} \leq d$.

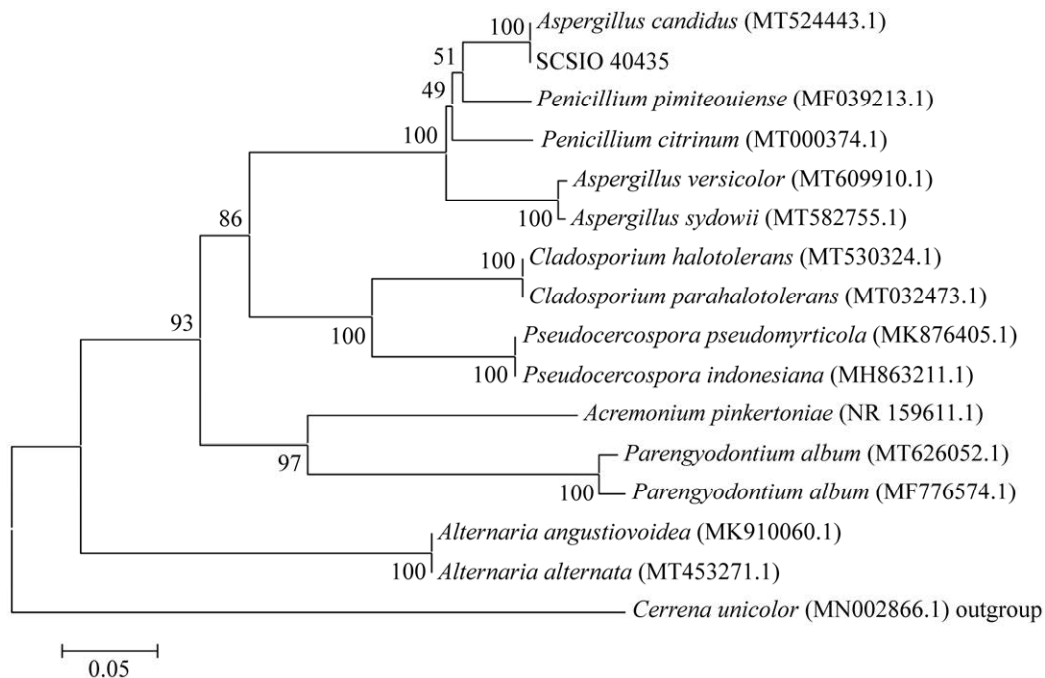


图 3 真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 的 neighbor-joining (N-J) 进化树

Figure 3 Neighbor-joining tree of strain of *Aspergillus* sp. SCSIO 40435.

对三联苯类化合物: dicandidusin A (**1**)、candidusin A (**2**)、terphenyllin (**3**)和 4''-deoxyterphenyllin (**4**), 其中化合物 **1** 为对三联苯同源二聚体新化合物。

2.2.1 新化合物结构解析

化合物 **1** 为灰褐色无定形固体, 正离子高分辨电喷雾质谱(HRESIMS)显示其准分子离子峰为 m/z 703.178 6 $[M+H]^+$ ($C_{40}H_{31}O_{12}$ 计算值为 703.181 0), 不饱和度为 26。分析化合物 **1** 的 1H 、 ^{13}C NMR 以及 HSQC 数据(表 2, 图 S1)发现有 2 个氧甲基、6 个 sp^2 杂化的次甲基、12 个季碳和 3 个活泼质子信号, 仅为元素组成信号的一半, 提示化合物 **1** 可能是同源二聚体。对其核磁数据进一步分析发现化合物 **1** 的核磁数据与已知化合物 Candidusin A (**2**)的核磁数据高度相似, 不同之处在于化合物 **1** 比 **2** 少了一个 sp^2

杂化的次甲基(δ_H 6.76, H-17; δ_C 114.8, C-17), 推测 **1** 通过 C-17/C-17'相连。由于 **1** 中 3 个活泼质子信号位于同一处, 因此无法利用 HMBC 相关(图 S1)判断二聚体的连接位置。分析 **1** 的 NOESY 相关, 发现 H-5、H-14 与 H₃-20 有相关(图 4A, 图 S1), 表明化合物 **1** 中 2 个 sp^2 杂化的次甲基分别位于 C-14 (δ_H , 7.29; δ_C , 102.4) 及 C-5 位(δ_H , 6.63; δ_C , 105.1), 进而证实化合物 **1** 的 2 个单体通过 C-17/C-17'相连, 进一步详细地归属 **1** 的核磁信号确证了平面结构。化合物 **1** 的 D 环与 D'环之间的联苯键可能具有轴手性, 对化合物 **1** 的旋光值进行测定, 发现其旋光值近乎为零(-0.0007°), $[\alpha]_D^{25} -2$ (c 0.025, MeOH), 推测其为外消旋体。鉴于化合物 **1** 的含量较少, 未对其进行手性拆分。最后, 我们推测了化合物 **1** 的生物合成机理(图 4B): 化合

表 2 化合物 **1** 的 1H 和 ^{13}C NMR 数据(DMSO- d_6)

Table 2 The 1H NMR (700 MHz) and ^{13}C NMR (175 MHz) data of compound **1** in DMSO- d_6

No.	δ_C , type	δ_H , mult (J in Hz)	COSY	HMBC (H to C)	NOESY
1	136.0, C				
2	148.5, C				
3	109.6, C				
4	148.9, C				
5	105.1, CH	6.63, s		C-1, C-3, C-4, C-7, C-13	H-20
6	128.3, C				
7	129.3, C				
8	130.5, CH	7.33, d (8.5)	H-9	C-6, C-10, C-12	H-9
9	115.1, CH	6.80, d (8.5)	H-8	C-7, C-10, C-11	H-8
10	156.5, C				
11	115.1, CH	6.80, d (8.5)	H-12	C-7, C-10, C-9	H-12
12	130.5, CH	7.33, d (8.5)	H-11	C-6, C-10, C-8	H-11
13	115.1, C				
14	102.4, CH	7.29, s		C-13, C-15, C-16, C-18	H-20
15	145.3, C				
16	147.3, C				
17	107.4, C				
18	151.2, C				
19	60.2, CH ₃	3.49, s		C-1	
20	55.8, CH ₃	3.99, s		C-4	
10/15/16-OH		9.43, s			

The first line means the atomic number of compound **1**.

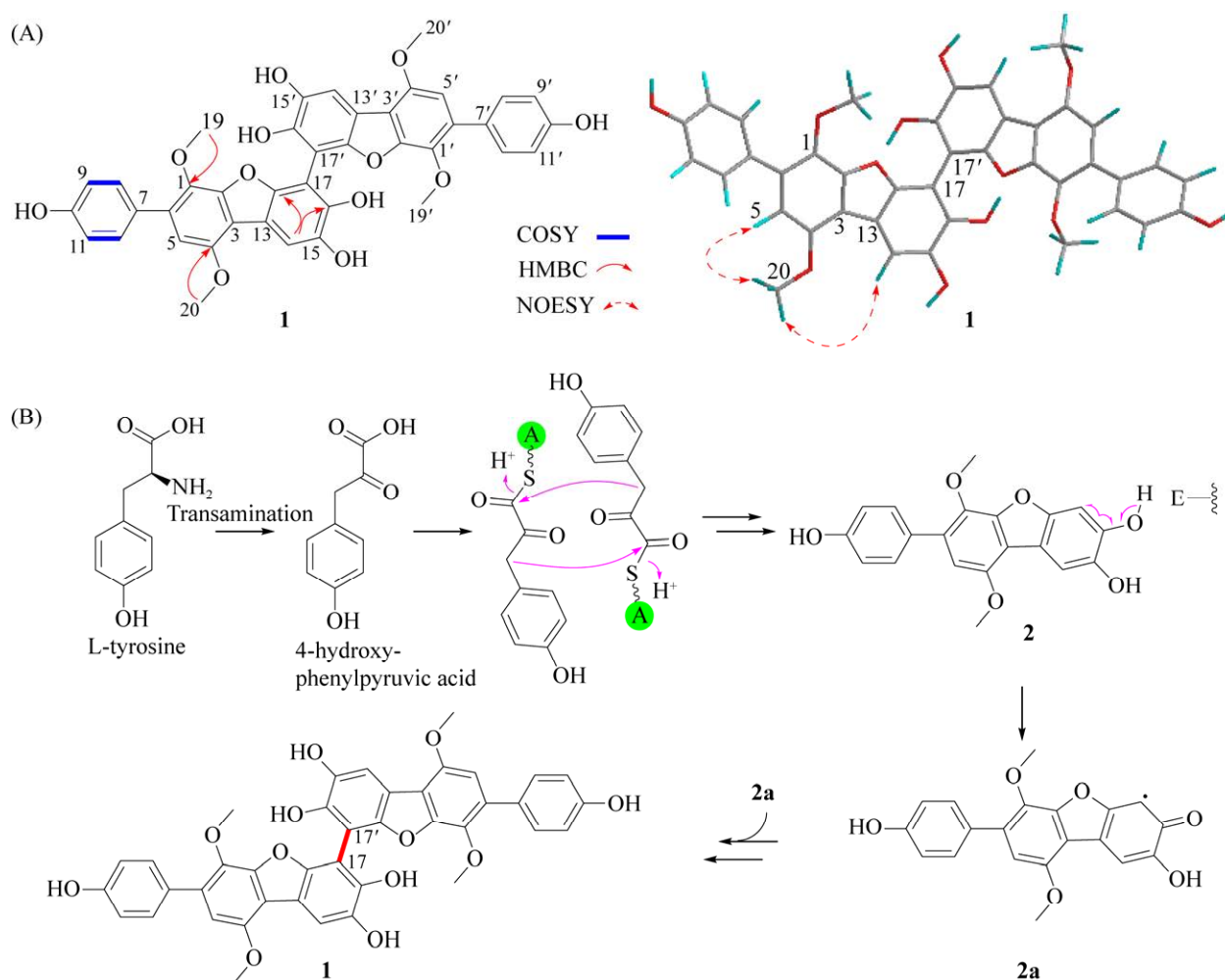


图 4 化合物 **1** 的 2D NMR 相关图及其生物合成路径推导

Figure 4 Key 2D NMR correlations and proposed biosynthetic pathway of compound **1**. A: key ^1H - ^1H COSY, HMBC and NOESY correlations of compound **1**; B: proposed biosynthetic pathway of compound **1**.

物 **1** 的生物合成起源于酪氨酸，在生物体内酪氨酸经转氨酶的作用转化为 4-羟基苯丙酮酸，2 个 4-羟基苯丙酮酸缩合，生成对三联苯前体，经烯醇互变、还原、脱水等形成对三联苯单体化合物 **2**^[19]，化合物 **2** 可能在 P450 氧化酶的催化下形成自由基化合物 **2a**，2 个 **2a** 发生自由基偶合、烯醇互变形成化合物 **1**^[20]。已报道的 P450 氧化酚羟基引发的自由基偶合反应多数发生于分子内、形成分子内的 C-C 键，分子间的、能形成具有轴手性的联苯键自由基偶合反应也有

报道，但相对较少^[20]。

2.2.2 已知化合物结构鉴定

Candidusin A (2): 灰褐色固体，HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 353.102 8 ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{O}_6$ 计算值 353.102 0)。 ^1H NMR (700 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{H} 9.37 (3H, s, 10-OH/15-OH/16-OH), 7.42 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-8/12), 7.38 (1H, s, H-14), 7.08 (1H, s, H-17), 6.86 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-9/11), 6.70 (1H, s, H-5), 3.97 (3H, s, 20-OCH₃), 3.75 (3H, s, 19-OCH₃)。 ^{13}C NMR (175 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{C}

157.1 (C-10), 149.9 (C-18), 149.8 (C-4), 148.9 (C-2), 146.3 (C-16), 143.0 (C-15), 136.4 (C-1), 131.0 (C-6), 130.8 (C-8/C-12), 129.1 (C-7), 115.6 (C-9/C-11), 114.5 (C-3), 114.1 (C-14), 107.5 (C-5), 106.0 (C-13), 99.0 (C-17), 61.0 (C-20), 56.3 (C-19)。波谱数据与文献[21]报道基本一致。

Terphenyllin (3): 白色固体, HRESIMS m/z $[M+H]^+$ 339.122 6 ($C_{20}H_{19}O_5$ 计算值 339.122 7)。 1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6): δ_H 9.58 (1H, s, 10-OH), 9.34 (1H, s, 16-OH), 8.51 (1H, s, 2-OH), 7.44 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-8/12), 7.10 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-14/18), 6.85 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-9/11), 6.76 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-15/17), 6.39 (1H, s, H-5), 3.64 (3H, s, 20-OCH₃), 3.29 (3H, s, 19-OCH₃)。 ^{13}C NMR (175 MHz, DMSO- d_6): δ_C 157.2 (C-16), 156.3 (C-10), 153.5 (C-4), 148.6 (C-2), 139.7 (C-1), 132.8 (C-6), 132.3 (C-14/C-18), 130.2 (C-8/C-12), 129.2 (C-7), 125.0 (C-13), 117.3 (C-3), 115.6 (C-9/C-11), 114.8 (C-15/C-17), 103.4 (C-5), 60.5 (C-20), 56.0 (C-19)。波谱数据与文献[22]报道基本一致。

4''-deoxyterphenyllin (4): 白色固体, HRESIMS m/z $[M+H]^+$ 323.128 5 ($C_{20}H_{18}O_4$ 计算值 323.127 8)。 1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6): δ_H 9.33 (1H, s, 16-OH), 8.61 (1H, s, 2-OH), 7.62 (2H, dt, $J=7.0, 1.3$ Hz, H-8/12), 7.47 (2H, t, $J=7.6$ Hz, H-9/11), 7.38 (H, tt, $J=7.4, 1.2$ Hz, H-10), 7.12 (2H, dt, $J=8.5, 2.0$ Hz, H-14/18), 6.78 (2H, dt, $J=8.5, 2.0$ Hz, H-15/17), 6.45 (1H, s, H-5), 3.64 (3H, s, 20-OCH₃), 3.30 (3H, s, 19-OCH₃)。 ^{13}C NMR (175 MHz, DMSO- d_6): δ_C 156.5 (C-16), 153.6 (C-4), 148.7 (C-2), 139.9 (C-10), 138.7 (C-1), 132.9 (C-6), 132.3 (C-14/C-18), 129.1 (C-8/C-12), 127.7 (C-7), 124.9 (C-13), 118.2 (C-3), 128.8 (C-9/C-11), 114.8 (C-15/C-17),

103.7 (C-5), 60.8 (C-20), 56.1 (C-19)。波谱数据与文献[21]报道基本一致。

4''-deoxyterphenyllin (4)的晶体数据:

三斜晶系, 空间群 P-1 (No. 2), 晶体大小为 0.01 mm×0.01 mm×0.01 mm; 晶胞参数: $a=8.933 3$ (7) Å, $b=9.805 5$ (8) Å, $c=10.267 6$ (10) Å, $\alpha=85.119$ (7)°, $\beta=65.971$ (9)°, $\gamma=72.469$ (7)°, 晶胞体积 $V=782.57$ (13) Å³, $Z=2$, 计算密度 1.368 g/cm³, Cu-K α 辐射($\lambda=1.541 84$ Å); 收集总衍射点 7 224, 独立衍射点 3 050; $R_1=0.046 6$, $wR_2=0.148 7$ 。该晶体数据已上传至剑桥晶体学数据库(CCDC-2116133)。

2.3 真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 中化合物抑菌活性实验

采用微量肉汤稀释法^[18]评估了化合物 1-4 对 2 株革兰氏阴性致病菌大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)和鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606)和 4 株革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 1064)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* SCSIO ML01)的抑菌活性。结果表明(表 3)化合物 1 对 6 株致病菌无明显抑制活性, MIC 均大于 64 $\mu\text{g/mL}$ 。化合物 2 和 3 对革兰氏阴性的大肠杆菌具有显著生长抑制活性, MIC 分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 其中化合物 2 对鲍曼不动杆菌有生长抑制活性, MIC 为 64 $\mu\text{g/mL}$ 。此外, 化合物 2 对革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌也表现出中等强度生长抑制活性, MIC 分别为 32 $\mu\text{g/mL}$ 和 16 $\mu\text{g/mL}$; 但其对枯草芽孢杆菌及藤黄微球菌无明显抑制作用, MIC 大于 64 $\mu\text{g/mL}$ 。不同的是, 化合物 4 对枯草芽孢杆菌及藤黄微球菌则表现出

表 3 化合物 1-4 的抑菌活性结果

Table 3 The antibacterial activities of compound 1-4 (MIC, $\mu\text{g/mL}$)

Compounds	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MRSA ATCC 43300	<i>B. subtilis</i> 1064	<i>M. luteus</i> SCSIO ML01
1	>64	>64	>64	>64	>64	>64
2	1	64	32	16	>64	>64
3	0.5	>64	>64	>64	>64	>64
4	>64	>64	>64	>64	64	32
Ciprofloxacin	0.125	0.125	0.125	0.125	0.03	0.125

E. coli is *Escherichia coli* ATCC 25922; *A. baumannii* is *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606; *S. aureus* is *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; MRSA is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300; *B. subtilis* is *Bacillus subtilis* 1064; *M. luteus* is *Micrococcus luteus* SCSIO ML01. Ciprofloxacin is a positive control.

一定的抑制作用, 其 MIC 分别为 64 $\mu\text{g/mL}$ 和 32 $\mu\text{g/mL}$, 而对其他 4 株指示菌无明显生长抑制活性, MIC 大于 64 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论与结论

珊瑚等海洋无脊椎动物是海洋生态系统的重要组成部分, 蕴含着大量的共附生微生物资源。曲霉属真菌不仅是海洋常见真菌种属之一, 也是活性次级代谢产物主要产生菌^[23]。迄今为止, 从海洋来源曲霉属真菌中已发现多种结构类型的次级代谢产物, 如生物碱^[24]、聚酮^[25]、萜类^[26]、萜醌类^[27]、异香豆素类^[28]、肽类^[29]和对三联苯类^[30]等。Terphenyllin 是最先发现的对三联苯类化合物, 由 Takahashi 等^[31]在 1976 年分离于 *Aspergillus candidus*。此外, 2016 年 Andernach 等^[32]从菌株 *Allantophomopsis lycopodina* 中分离获得对三联苯与萘并呋喃三联苯的二聚体 allantophomofuran A-C。至今, 已报道的对三联苯衍生物已超过 230 个^[33], 但对三联苯类化合物二聚体鲜有报道。对三联苯类衍生物具有多种生物活性, 如神经氨酸酶抑制、 α -葡萄糖苷酶抑制、抗氧化、细胞毒性、抗菌和免疫抑制活性^[33-34]。本文对化合物 1-4

的抑菌活性进行了评估, 发现已知化合物 2 不仅对革兰氏阳性菌耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑制作用(16 $\mu\text{g/mL}$)微强于金黄色葡萄球菌(32 $\mu\text{g/mL}$), 还对革兰氏阴性菌大肠杆菌具有较强的抑制作用, MIC 达到 1 $\mu\text{g/mL}$ 。此外, 对鲍曼不动杆菌也表现出微弱的抑制活性(64 $\mu\text{g/mL}$), 为潜在的抗菌药物先导化合物。遗憾的是, 其同源二聚体化合物 1 并没有观察到明显的抑菌活性。

综上所述, 本研究通过化学多样性与抗菌活性分析, 从南海珊瑚中筛选了一株真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 进行次级代谢产物分离, 从中鉴定了 4 个对三联苯类化合物(1-4), 其中化合物 dicandidusin A (1)为首次报道的新颖对三联苯化合物同源二聚体。本研究还对 4 个单体化合物进行了抗菌活性评估, 结果显示已知化合物 2 的抑菌活性明显强于化合物 3 和 4, 推测化合物 2 中形成的呋喃环单元可能对抑菌活性发挥重要作用。但其同源二聚体化合物 1 无明显抑菌活性, 因此, 关于其具体活性作用机理的研究, 还有待进一步探索。本研究不仅丰富了对三联苯类化合物的多样性, 而且为后续利用珊瑚来源的真菌生产活性代谢产物奠定了基础。

参考文献

- [1] 王庆琳, 陈水浩, 陈冬妮, 刘岚, 余志刚, 陆勇军. 中国南海海洋真菌资源及其活性次级代谢产物研究评述. *生物资源*, 2020, 42(5): 505–514.
Wang QL, Chen SH, Chen DN, Liu L, She ZG, Lu YJ. Review on the research of marine fungus resources and their bioactive secondary metabolites from the South China Sea. *Biotic Resources*, 2020, 42(5): 505–514. (in Chinese)
- [2] Góes-Neto A, Marcelino VR, Verbruggen H, Silva FF, Badotti F. Biodiversity of endolithic fungi in coral skeletons and other reef substrates revealed with 18S rDNA metabarcoding. *Coral Reefs*, 2020, 39(1): 229–238.
- [3] Krediet CJ, Ritchie KB, Paul VJ, Teplitski M. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013, 280(1755): 20122328.
- [4] Kvennefors ECE, Sampayo E, Kerr C, Vieira G, Roff G, Barnes AC. Regulation of bacterial communities through antimicrobial activity by the coral holobiont. *Microbial Ecology*, 2012, 63(3): 605–618.
- [5] 张长生, 李文利. 海洋微生物学: 新机遇, 新挑战. *微生物学通报*, 2018, 45(9): 1841–1842.
Zhang CS, Li WL. Marine microbiology: new opportunities and new challenges. *Microbiology China*, 2018, 45(9): 1841–1842. (in Chinese)
- [6] Modolon F, Barno AR, Villela HDM, Peixoto RS. Ecological and biotechnological importance of secondary metabolites produced by coral-associated bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(6): 1441–1457.
- [7] Wang HL, Li R, Li J, He J, Cao ZY, Kurtán T, Mándi A, Zheng GL, Zhang W. Alternarin A, a drimane meroterpenoid, suppresses neuronal excitability from the coral-associated fungi *Alternaria* sp. ZH-15. *Organic Letters*, 2020, 22(8): 2995–2998.
- [8] Chao R, Hou XM, Xu WF, Hai Y, Wei MY, Wang CY, Gu YC, Shao CL. Targeted isolation of asperheptatides from a coral-derived fungus using LC-MS/MS-based molecular networking and antitubercular activities of modified cinnamate derivatives. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(1): 11–19.
- [9] Cheng MM, Li PL, Jiang Y, Tang XL, Zhang WJ, Wang Q, Li GQ. Penitol A and penicitols E-I: citrinin derivatives from *Penicillium citrinum* and the structure revision of previously proposed analogues. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(4): 1345–1352.
- [10] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2021, 38(2): 362–413.
- [11] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2020, 37(2): 175–223.
- [12] Ren XH, Xie XY, Chen BX, Liu L, Jiang CQ, Qian Q. Marine natural products: a potential source of anti-hepatocellular carcinoma drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 64(12): 7879–7899.
- [13] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2019, 36(1): 122–173.
- [14] Singh R, Jain A, Panwar S, Gupta D, Khare SK. Antimicrobial activity of some natural dyes. *Dyes and Pigments*, 2005, 66(2): 99–102.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [16] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(30): 11030–11035.
- [17] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [18] Ruan XC, Deng XL, Tan ML, Yu CB, Zhang MS, Sun Y, Jiang NH. *In vitro* antibiofilm activity of resveratrol against avian pathogenic *Escherichia coli*. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 1–9.
- [19] Braesel J, Götze S, Shah F, Heine D, Tauber J, Hertweck C, Tunlid A, Stallforth P, Hoffmeister D. Three redundant synthetases secure redox-active pigment production in the basidiomycete *Paxillus involutus*. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(10): 1325–1334.
- [20] Tang MC, Zou Y, Watanabe K, Walsh CT, Tang Y. Oxidative cyclization in natural product biosynthesis. *Chemical Reviews*, 2017, 117(8): 5226–5333.
- [21] Shan TJ, Wang YY, Wang S, Xie YY, Cui ZH, Wu CY, Sun J, Wang J, Mao ZL. A new *p*-terphenyl derivative from the insect-derived fungus *Aspergillus candidus* Bdf-2 and the synergistic effects of terphenyllin. *PeerJ*, 2020, 8: e8221.

- [22] 刘芬, 夏金梅, 王伟毅, 许建中, 许晨, 陈建明, 王宏涛. 亮白曲霉代谢物中两种联苯化合物的分离鉴定. 厦门大学学报: 自然科学版, 2013, 52(5): 670–674.
Liu F, Xia JM, Wang WY, Xu JZ, Xu C, Chen JM, Wang HT. Isolation and identification of two terphenyl compounds from *Aspergillus candidus* metabolites. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2013, 52(5): 670–674. (in Chinese)
- [23] 赵成英, 刘海珊, 朱伟明. 海洋曲霉来源的新天然产物. 微生物学报, 2016, 56(3): 331–362.
Zhao CY, Liu HS, Zhu WM. New natural products from the marine-derived *Aspergillus* fungi. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(3): 331–362. (in Chinese)
- [24] Xu WF, Chao R, Hai Y, Guo YY, Wei MY, Wang CY, Shao CL. 17-Hydroxybrevianamide N and its N1-Methyl derivative, quinazolinones from a soft-coral-derived *Aspergillus* sp. fungus: 13S enantiomers as the true natural products. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(4): 1353–1358.
- [25] Neuhaus GF, Adressa DA, Bruhn T, Loesgen S. Polyketides from marine-derived *Aspergillus porosus*: challenges and opportunities for determining absolute configuration. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(10): 2780–2789.
- [26] Fang ST, Liu XH, Yan BF, Miao FP, Yin XL, Li WZ, Ji NY. Terpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. RR-YLW-12, associated with the red alga *Rhodomela confervoides*. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(6): 1763–1771.
- [27] Zhao DL, Han XB, Wang M, Zeng YT, Li YQ, Ma GY, Liu J, Zheng CJ, Wen MX, Zhang ZF, Zhang P, Zhang CS. Herbicidal and antifungal xanthone derivatives from the alga-derived fungus *Aspergillus versicolor* D5. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(40): 11207–11214.
- [28] Ma X, Liang X, Huang ZH, Qi SH. New alkaloids and isocoumarins from the marine gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO 41501. *Natural Product Research*, 2020, 34(14): 1992–2000.
- [29] Luo MH, Zang RC, Wang X, Chen ZM, Song XX, Ju JH, Huang HB. Natural hydroxamate-containing siderophore acremonpeptides A-D and an aluminum complex of acremonpeptide D from the marine-derived *Acremonium persicinum* SCSIO 115. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(9): 2594–2600.
- [30] Sangsopha W, Lekphrom R, Schevenels FT, Saksirirat W, Bua-Art S, Kanokmedhakul K, Kanokmedhakul S. New *p*-terphenyl and benzoquinone metabolites from the bioluminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. *Natural Product Research*, 2020, 34(15): 2186–2193.
- [31] Takahashi C, Yoshihira K, Natori S, Umeda M. The structures of toxic metabolites of *Aspergillus candidus*. I. The compounds A and E, cytotoxic *p*-terphenyls. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1976, 24(4): 613–620.
- [32] Andernach L, Sandjo LP, Liermann JC, Schlämann R, Richter C, Ferner JP, Schwalbe H, Schöffler A, Thines E, Opatz T. Terphenyl derivatives from *Allantophomopsis lycopodina*. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(10): 2718–2725.
- [33] Li W, Li XB, Lou HX. Structural and biological diversity of natural *p*-terphenyls. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2018, 20(1): 1–13.
- [34] Guo ZK, Yan T, Guo Y, Song YC, Jiao RH, Tan RX, Ge HM. *p*-Terphenyl and diterpenoid metabolites from endophytic *Aspergillus* sp. YXf3. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(1): 15–21.

(本文责编 张晓丽)

补充材料

图 S1 Dicandidusin A (1) 的相关图谱

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。