

α -蒎烯促进海洋真菌 *Aspergillus* sp. 产真菌毒素青霉酸的研究*

李厚金¹, 谢莹璐¹, 邱小忠², 蓝文健³

1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;
2. 南方医科大学解剖教研室, 广州 510515;
3. 中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 采自南海软珊瑚 *Sarcophyton tortuosum* 的内生真菌 *Aspergillus* sp. 在由葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 2 g/L, 100% 海水, pH 为 7.5 的培养基 (GPY) 中能够产生真菌毒素青霉酸, 产量为 5.5 mg/L。在 GPY 培养基中添加 200 mg/L 的单萜 α -蒎烯, 能改变代谢产物的组成和含量, 并显著促进该真菌产生青霉酸, 产量可提高至 29.15 mg/L。结果表明 α -蒎烯在该菌的作用下主要得到系列氧化产物, 并进一步发生氧化降解。单萜 α -蒎烯可以作为一个有效的诱导子, 引起微生物的氧化应激反应, 改变膜上酶系的活性, 使代谢活动得到调控, 改变代谢产物组成或产量, 在微生物发酵工业上有潜在应用。

关键词: 真菌 *Aspergillus* sp.; 青霉酸; α -蒎烯; 生物转化; 诱导子

中图分类号: O629.9 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2011) 02 - 0066 - 04

α -Pinene Induces Marine Fungus *Aspergillus* sp. to Produce Mycotoxin Penicillic Acid

LI Houjin¹, XIE Yinglu¹, QIU Xiaozhong², LAN Wenjian³

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Department of Anatomy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
3. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Fungus *Aspergillus* sp., which was isolated from soft coral *Sarcophyton tortuosum*, could produce mycotoxin penicillic acid with the yield of 5.5 mg/L in GPY medium containing glucose 10 g/L, peptone 5 g/L, yeast extract 2 g/L, sea water 1 L, at pH 7.5. Interestingly, while the GPY medium supplied with α -pinene at a dose of 200 mg/L, the constitute and content of the metabolites of *Aspergillus* sp. altered obviously. Furthermore, the yield of penicillic acid in the culture broth increased dramatically from 5.5 mg/L in control group (GPY medium) to 29.15 mg/L in biotransformation group. Based on the gas chromatography-mass spectrometry analysis, the major biotransformed products of α -pinene were characterized as oxygenated monoterpenoids, which were undergone further biodegradation. This finding suggested that monoterpene substrate, α -pinene could used to be an elicitor. It can alter the oxidase activities, trigger and modulate microbial metabolic pathways, and has potential application in fermentation.

Key words: *Aspergillus* sp.; penicillic acid; α -pinene; biotransformation; elicitor

* 收稿日期: 2010-11-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20502036, 20602044, 30973633); 广东省科技计划资助项目 (2010B030600011, 2010B030800002)

作者简介: 李厚金 (1974年生), 男, 副教授; 通讯作者: 蓝文健; E-mail: lanwj@mail.sysu.edu.cn

软珊瑚 *Sarcophyton tortuosum* 在海南三亚珊瑚礁海区分布较广, 采集容易。我们已从该软珊瑚中分离发现了一系列新的、结构独特的、具有抗肿瘤活性的四萜化合物 methyl sartortuoate, methyl isosartortuoate, methyl tortuoate A-D^[1-5]。软珊瑚体内共附生了大量的微生物, 而共附生微生物则是潜在的活性物质的丰富来源。

我们对 *Sarcophyton tortuosum* 的内生微生物进行了分离培养, 得到一批真菌和细菌。对其中的 1 株内生真菌 *Aspergillus* sp. (采集编号 SF005) 进行了发酵培养, 该菌在含葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 2 g/L, 100% 海水, pH 7.5 的培养基 (GPY) 中, 生长良好, 能产真菌毒素青霉酸 (penicillic acid), 产量为 5.5 mg/L。当在 GPY 培养基中添加 200 mg/L 的单萜 α -蒎烯, 能显著促进该真菌产青霉酸, 产量可提高至 29.15 mg/L。研究发现该菌能将 α -蒎烯转化成系列氧化产物, 并进一步发生氧化降解。该研究结果表明单萜 α -蒎烯是一个有效的诱导子, 能引起真菌的氧化应激反应, 可提高微生物次生代谢物的产量。

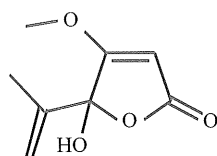


图1 青霉酸的结构式

Fig. 1 Structure of penicillic acid

1 实验部分

1.1 菌种

真菌 *Aspergillus* sp. (菌株编号 SF005), 分离自海南三亚西岛海域软珊瑚 *Sarcophyton tortuosum* 的体内。用 PDA (potato/ dextrose/ agar) + 100% 海水为培养基, pH 7.5, 4 °C 保存。菌种保藏于中山大学化学与化学工程学院天然产物研究室。

1.2 仪器和试剂

日本岛津公司高效液相色谱仪: LC20AT 泵, SPD-20A 检测器。分析型色谱柱 Inertsil[®] ODS-SP, 5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm; 制备型色谱柱 Shim-pack PRC-ODS, 15 μ m, 250 mm \times 20 mm。美国 Finnigan 公司 TRACE DSQ GC-MS 联用仪。

α -蒎烯, 分析纯; 乙腈, HPLC 级, 均购于 Sigma 公司。乙酸乙酯为市售 AR 试剂。葡萄糖、蛋白胨、酵母膏为生化试剂, 购于广东环凯微生物

科技有限公司。

1.3 实验方法

真菌 *Aspergillus* sp. 发酵的 GPY 培养基配方为: 葡萄糖 (10 g/L)、蛋白胨 (5 g/L)、酵母膏 (2 g/L)、100% 海水, pH 7.5。

配制 20 L GPY 培养液, 均分成 2 组, 120 °C 灭菌 20 min。接入菌种, 120 r/min 摇瓶室温培养。待培养至第 5 d, 在其中 1 组培养瓶中添加 200 mg/L 的 α -蒎烯, 继续培养 15 d。真菌培养液用乙酸乙酯提取 3 次, 提取液经低温旋转蒸发浓缩得到 2 种培养条件下的代谢产物提取物。

配制 10 L GPY 培养液, 均分成 10 组, 灭菌后接入真菌 *Aspergillus* sp., 培养至第 10 天, 分别收集菌体, 菌体分别在无菌条件下转接入 1 L 已稀释至 20% 的 GPY 培养基中, 同时添加 200 mg α -蒎烯。每隔 24 h 收取 1 组真菌的培养液, 用乙酸乙酯提取 3 次, 浓缩得到不同时间条件下 α -蒎烯的转化产物提取物。

液相色谱实验条件: 取 1 mg 提取物, 用 2 mL 乙腈溶解, 进样 5 μ L。以水和乙腈为洗脱剂, 以 ϕ = 30% 的乙腈洗脱 10 min, 然后梯度提高乙腈含量, 至 40 min 达 100%, 并继续恒定至 60 min。

气质联用色谱条件: DB-5MS 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m)。程序升温: 初始温度 80 °C, 保持 3 min, 以 3 °C/min 升至 150 °C, 保持 10 min, 再以 5 °C/min 升至 250 °C, 保持 15 min。进样口温度 250 °C, 氦气为载气, 流速为 1 mL/min。分流比为 30:1, 样品用氯仿溶解, 进样量 1.0 μ L。质谱条件: 离子源为 EI 源, 离子源、连接口温度均为 230 °C。

2 结果与讨论

2.1 α -蒎烯对真菌 *Aspergillus* sp. 产青霉酸的促进作用

真菌 *Aspergillus* sp. 在 GPY 培养基中生长迅速, 菌丝体呈白色, 并能长出小圆粒状的孢子。其培养液为浅黄色。

10 L GPY 培养液提取物为 2.28 g, 经液相分析, 青霉酸为最强峰, 保留时间为 7.2 min (见图 2a), 经制备分离得到纯的青霉酸为 55 mg。在添加了 α -蒎烯的 GPY 培养组中, 10 L GPY 培养液提取物为 3.11 g, 液相分析其青霉酸的保留时间也为 7.2 min (见图 2b), 经制备分离得到纯的青霉酸为 291.5 mg。由此可见, 加入 α -蒎烯后可以使青霉酸的产量由 5.5 提高到 29.15 mg/L。

从其 HPLC 的分析结果还可以看出,在两种培养条件下,其它代谢产物的组成和含量也具有显著的不同。在 GPY 培养条件下,具有结构独特性的吡嗪类化合物^[6],如 3-异丁基-6-(1-羟基-2-甲基-丙基)-2(1H)-吡嗪酮($t_R = 26.5$ min)和 3,6-二异丁基-2(1H)-吡嗪酮($t_R = 28.2$ min),在添加了 α -蒎烯的 GPY 培养组中并没有检测到。

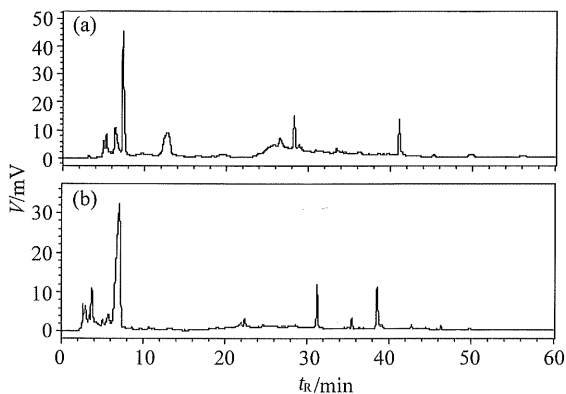


图 2 真菌 *Aspergillus* sp. 培养液提取物的高效液相分析结果

(a) GPY 培养液提取物;
(b) GPY + α -蒎烯的培养液提取物

Fig. 2 HPLC analysis of the culture extracts of fungus *Aspergillus* sp.

(a) GPY medium; (b) GPY medium supplied with α -pinene

2.2 真菌 *Aspergillus* sp. 对 α -蒎烯的转化

在 α -蒎烯的转化培养组中,由于采用了稀释的培养基,有效地去除了代谢产物的干扰。从第 1~第 10 天的转化提取物的 GC-MS 分析结果来看(第 3 天的结果见图 3),其转化产物主要为氧化产物(见图 4)。在真菌的作用下, α -蒎烯中的碳碳双键易于发生环氧化;其张力相对较大的四元环也易于开环,形成新的不饱和碳碳双键,或者转化成羟基或环氧化物。

在第 1~第 10 天的结果分析中,仍难以描绘出各种转化产物的变化途径。其原因可能是各种转化反应同时发生的,呈多途径,并有交叉。另外,转化变化也是持续的,各种转化产物都将进一步发生开环、降解,最终生成水溶性的小分子化合物,并有可能被真菌吸收利用。

3 结论

大量报道表明,海洋微生物代谢产物的产生跟培养条件有很大的关系,同一菌株用不同的培养基

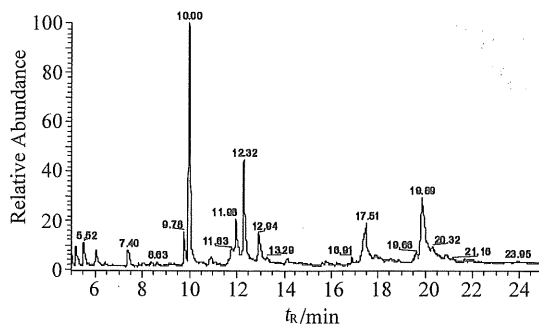


图 3 真菌 *Aspergillus* sp. 对 α -蒎烯转化产物的气相色谱-质谱总离子流图

Fig. 3 GC-MS total ion chromatogram of biotransformation products of α -pinene by fungus *Aspergillus* sp.

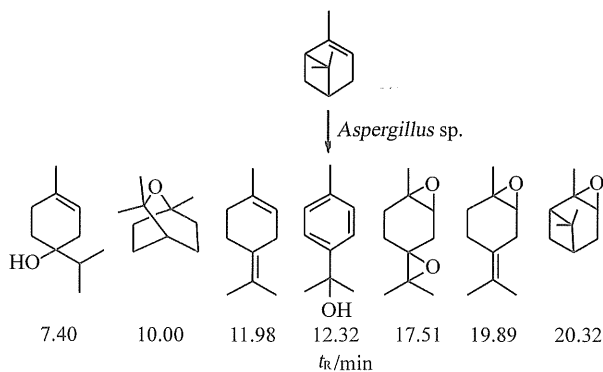


图 4 α -蒎烯的主要转化产物

Fig. 4 The major biotransformation products of α -pinene

可以得到完全不同的代谢产物。目前,人们在研究海洋微生物时,究竟该选用何种培养方法,具有很大的主观性、随机性,而且,对于具体的微生物菌株在某种培养基里能产生何种结构类型的代谢产物也无法预测。在常规培养条件下,很多微生物活性物质的产量低,而且由于结构复杂,也不易于人工合成,对于拿到足够的样品量以满足药理与临床研究,仍有相当困难。因此,深入研究海洋微生物的代谢规律,发展独特的培养技术,实现可人为调控的结构多样的有用代谢产物(包括活性物质)的高效生产,已成为海洋微生物代谢产物研究与开发必须解决的关键问题。

天然单萜的微生物生物转化,能得到大量具有高附加值的含氧芳香萜类产品,在日用化工行业应用前景广阔。然而,此前的研究几乎全是专注于转化产物,并未涉及到微生物的代谢产物变化^[7-8]。真菌 *Aspergillus* sp. 在 GPY 培养基中添加 200 mg/L 的单萜 α -蒎烯,可以使青霉酸的产量由 5.5 提高到 29.15 mg/L,提高了 5.3 倍。转化产物分析发现该菌能将 α -蒎烯转化成系列氧化产物,并进一

步发生氧化降解。亲脂性单萜可与微生物细胞膜上的磷脂双分子层作用,可改变细胞膜的结构和功能,是“有毒的”,但由于细胞膜具有动态调节能力,维持膜结构,它通过膜上酶活性的调节,对萜类进行氧化转化,进行“解毒”。细胞膜上的酶是复杂多样的,它们的活性变化,尤其是氧化酶活力的增强,将直接影响到正常的代谢活动,结果必将导致代谢产物的组成和含量改变。本研究结果表明单萜 α -蒎烯可以作为一个有效的诱导子,能引起微生物的过敏反应,可提高微生物次生代谢物的产量。

天然单萜,资源极其丰富。微生物培养操作简单、条件温和、无毒、环境友好。研究单萜底物对海洋微生物代谢产物的调控机制,并最终实现可人为调控的有用物质的高效率可持续性规模化生产,也为丰富的天然单萜资源的开发与利用提供新的途径和方法,无疑具有广阔的基础理论研究和应用前景。

参考文献:

- [1] 苏镜娉,龙康侯,彭唐生,等. 中国软珊瑚化学成分的研究 12. 一种新颖独特的四萜酯——扭曲肉芝甲酯的结构测定[J]. 化学学报,1985,43(8):796-797.
- [2] SU J Y, LONG K H, PENG T S, et al. The structure of methyl isosartortuoate, a novel tetracyclic tetraterpenoid from the soft coral *Sarcophyton tortuosum* [J]. Journal of the American Chemical Society, 1986, 108(1): 177 - 178.
- [3] ZENG L M, LAN W J, SU J Y, et al. Two new cytotoxic tetracyclic tetraterpenoids from the soft coral *Sarcophyton tortuosum* [J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(11): 1915 - 1918.
- [4] LAN W J, LI H J, YAN S J, et al. New tetraterpenoid from the soft coral *Sarcophyton tortuosum* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2007, 9(3): 267 - 271.
- [5] LAN W J, WANG S L, LI H J. Additional new tetracyclic tetraterpenoid, methyl tortuoate D from soft coral *Sarcophyton tortuosum* [J]. Natural Product Communications, 2009, 4(9): 1193 - 1196.
- [6] LI H J, CAI Y T, CHEN Y Y, et al. Metabolites of marine fungus *Aspergillus* sp. collected from soft coral *Sarcophyton tortuosum* [J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2010, 26(3): 415 - 419.
- [7] 蓝文健,李厚金,蔡创华,等. 海洋细菌 *Aeromonas hydrophila* 和 *Vibrio vulnificus* 对单萜柠檬烯的生物转化产物分析[J]. 中山大学学报:自然科学版,2006,45(2):126-128.
- [8] 李厚金,蓝文健,蔡创华,等. 海洋细菌对柠檬烯的生物转化及萜类产物鉴定[J]. 分析化学,2006,34(7):946-950.
- [3] WANG Z L, LIANG H B, WANG J, et al. Red-light-emitting diodes fabricated by near-ultraviolet InGaN chips with molybdate phosphors[J]. Appl Phys Lett, 2006, 89(7): 071921/1-071921/3.
- [4] SOHN K S, PARK D H, CHO S H, et al. Computational evolutionary optimization of red phosphor for use in tricolor white LEDs [J]. Chem Mater, 2006, 18(7): 1768 - 1772.
- [5] CHI L S, LIU R S, LEE B J. Synthesis of $Y_2O_3:Eu$, Bi red phosphors by homogeneous coprecipitation and their photoluminescence behaviors [J]. J Electrochem Soc, 2005, 152: J93 - J98.
- [6] 张新民,梁宏斌,余瑞金,等. 一种新型发红光材料 $SrGdGa_3O_7:Eu^{3+}$ 及其性质研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2008,47(2):62-64.
- [7] CZAYA R. Preparation and crystallographic data of calcium silicate calcium chloride[J]. Zeitschrift fuer Anorganische und Allgemeine Chemie, 1970, 375(2): 124 - 127.
- [8] 叶瑞伦,吴伯麟,曾科,等. 高温型 $Ca_2SiO_4 \cdot CaCl_2$ 的晶体结构[J]. 硅酸盐学报,1984,12(4):504-507.
- [9] WANMAKER W L, VERRIET J G. Luminescence of phosphors with tricalcium monosilicate dichloride as the host lattice[J]. Philips Research Reports, 1973, 28(1): 80 - 83.
- [10] LIU J, LIAN H Z, SUN J Y, et al. Characterization and properties of green emitting $Ca_3SiO_4Cl_2:Eu^{2+}$ power phosphor for white light-emitting diodes[J]. Chem Lett, 2005, 34(10): 1340 - 1341.
- [11] LIU J, LIAN H Z, SHI C S, et al. Eu^{2+} -doped high-temperature phase $Ca_3SiO_4Cl_2$ a yellowish orange phosphor for white light-emitting diodes[J]. J Electrochem Soc, 2005, 152(11): G880 - G884.

(上接第 65 页)