

海绵共生真菌 *Emericella varicolor* XSA-07-2 化学诱变突变株中的新颖聚酮类化合物

韩鹏杰¹, 龙海林², 刘东^{2*}, 吴紫薇¹, 孙坤来^{1*} (1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江 舟山 316022; 2. 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

摘要:目的 通过硫酸二乙酯化学诱变法从海绵共生真菌 *Emericella varicolor* XSA-07-2 中发现新颖活性次级代谢产物。方法 用硫酸二乙酯对菌株进行化学诱变, 并通过化学指纹筛选, 获得 XSA-07-2 突变株 M8; 采用硅胶、ODS、半制备 HPLC 等方法对菌株发酵提取物中的全新成分进行分离纯化, 运用 NMR、MS 等现代波谱学方法鉴定化合物的结构。结果 从 XSA-07-2 的化学诱变突变株 M8 中发现了 3 个新颖的聚酮类化合物, 化合物 3 具有抗氧化活性, DPPH 清除率的 IC₅₀ 为 (13.58 ± 0.14) μg · mL⁻¹。结论 利用硫酸二乙酯化学诱变可以刺激海绵共生真菌 XSA-07-2 的突变株产生新颖抗氧化活性聚酮化合物。

关键词: 海洋真菌; 化学诱变; 聚酮类化合物; 抗氧化

doi:10.11669/cpj.2019.15.005 中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2019)15-1221-05

New Polyketides from Chemical Mutant Strain of Sponge-Associated Fungus *Emericella varicolor* XSA-07-2

HAN Peng-jie¹, LONG Hai-lin², LIU Dong^{2*}, WU Zi-wei¹, SUN Kun-lai^{1*} (1. School of Food and Medical, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316002, China; 2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To study the new bioactive secondary metabolites of diethyl sulfate chemical mutant strain of sponge-associated fungus *Emericella varicolor* XSA-07-2. **METHODS** Diethyl sulfate was used to make chemical mutagenesis of strain XSA-07-2, and one mutant strain M8 was chosen for large-scale fermentation to generate new secondary metabolites. The compounds were isolated and purified by chromatography on silica gel and ODS reversed-phase column and semi-preparative HPLC techniques. And their structures were identified by their physicochemical properties and NMR, MS data analysis. **RESULTS** Three new polyketides 1-3 were isolated from the extract of the solid fermentation culture of mutant strain M8. Compound 3 showed moderated antioxidant activity with IC₅₀ of (13.58 ± 0.14) μg · mL⁻¹ by DPPH assay. **CONCLUSION** Diethyl sulfate chemical mutagenesis can stimulate sponge-associated fungus *Emericella varicolor* XSA-07-2 mutant strain M8 to produce new antioxidant polyketides.

KEY WORDS: marine-derived fungi; chemical mutagenesis; polyketide; antioxidant

海洋微生物因生存在海洋特殊生态环境, 进化出了与陆地环境微生物不同的独特的代谢调控体系, 进而能够代谢产生多种结构新颖、生物活性显著的次级代谢产物, 成为了新药先导化合物发现的重要源头^[1-6]。然而, 基因组学与化学研究表明, 海洋微生物中存在大量的沉默次级代谢合成基因簇, 其在实验室常规发酵条件下往往无法表达^[7-8], 如能有效激活这些沉默合成基因, 将大大加快海洋微生物

中新颖活性功能小分子的发现速率。目前已开发了一些方法可激活沉默基因获得新颖化合物, 比如, 单株菌多次级代谢产物 (OSMAC) 策略^[9]、共培养^[10]、化学表观遗传学方法^[11-12]。此外, 引入硫酸二乙酯 (DES) 诱变^[13]也是一种行之有效的方法。烷化剂 DES 能够与碱基反应, 导致 DNA 复制时碱基不能正常配对而发生遗传变异, 相比于其他策略, 该方法操作性强、实用性好、正突变率高, 能够在较短时间

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (81803423, 21502004); 浙江省自然科学基金青年基金项目资助 (LQ18D060005); 北京自然科学基金项目资助 (7182086)

作者简介: 韩鹏杰, 女, 硕士研究生 研究方向: 海洋天然产物研究 * **通讯作者:** 孙坤来, 男, 讲师 研究方向: 海洋药物、海洋活性天然产物研究 Tel: 17858805767 E-mail: sunqinlai@126.com; 刘东, 男, 助理研究员 研究方向: 海洋微生物天然产物学 Tel: 17858805767 E-mail: liudong_1982@126.com

内获得更多优良变异类型。

菌株 *Emericella varicolor* XSA-07-2 是课题组从一种中国南海海绵中分离得到的共生真菌,前期化学成分研究发现,该真菌能够产生一系列具有降脂活性的新颖聚酮类化合物^[14]。为了进一步挖掘该菌株的次级代谢潜力,有效激活菌株中的沉默合成基因簇,课题组尝试对野生菌株进行了化学诱变,并筛选获得一株化学指纹信号明显增多的阳性突变株。通过规模化固体发酵突变菌株,并开展特征指纹为导向的化学分离,从菌株发酵提取物中分离并鉴定了3个新颖的聚酮类化合物1~3(图1)。初步DPPH自由基清除活性筛选发现,化合物3具有较好的抗氧化活性。

1 仪器与材料

Bruker Avance 400 型核磁共振仪(德国,布鲁克公司);APEX IV型质谱仪(美国,Waters公司);柱色谱硅胶(160~200目,青岛海洋化工厂);反相 ODS 填料(50 μm,日本 YMC 公司);半制备型 Alltech 高效液相色谱仪[包括 426 HPLC 泵、UV-Vis 200 检测器和 YMC-Pack C8 色谱柱(10 mm × 250 mm, 5 μm)];开放柱溶剂为分析纯,高效液相色谱(HPLC)所用试剂为色谱纯(Sigma 公司);化学诱变剂 DES(安耐吉化学)。

2 诱变株选育

培养野生菌株孢子悬液,将孢子悬液浓度稀释

到 OD 值为 0.35(OD 值过大,培养时不易挑取到突变菌丝体,OD 值过低,不能保证平板上能接到孢子)。随后取 700 μL 孢子悬液于 EP 管中,再分别加入终体积比为 0.5% 和 1% (V/V) 的 DES DMSO 溶液 300 μL,置于 4 °C 冰箱,分别诱变 12 和 24 h。将经过 DES 诱变后的菌株孢子悬液滴入 PDA 培养基上,用涂布棒涂布使孢子分布均匀,放入恒温培养箱 28 °C 培养,3~5 d 后陆续长出菌落,不断挑取单菌落菌丝体进行纯化和传代培养,考察突变的稳定性,最终从 1% DES 诱变 24 h 条件下筛选出 9 株稳定的诱变株 M1~M9(图2)。

3 提取分离与活性测试

3.1 诱变菌株的指纹分析

为提高次生代谢产物产量,便于后期研究,使用大米固体培养基对诱变获得的形态差异明显的 9 株

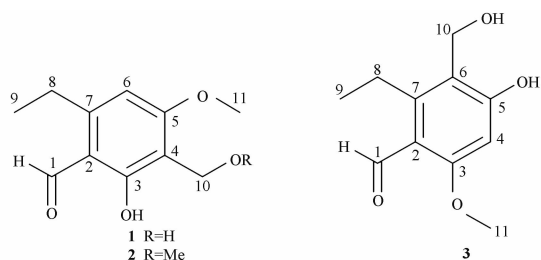


图1 菌株 *Emericella varicolor* XSA-07-2 中新化合物 1~3 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of new compounds 1~3 of *Emericella varicolor* XSA-07-2

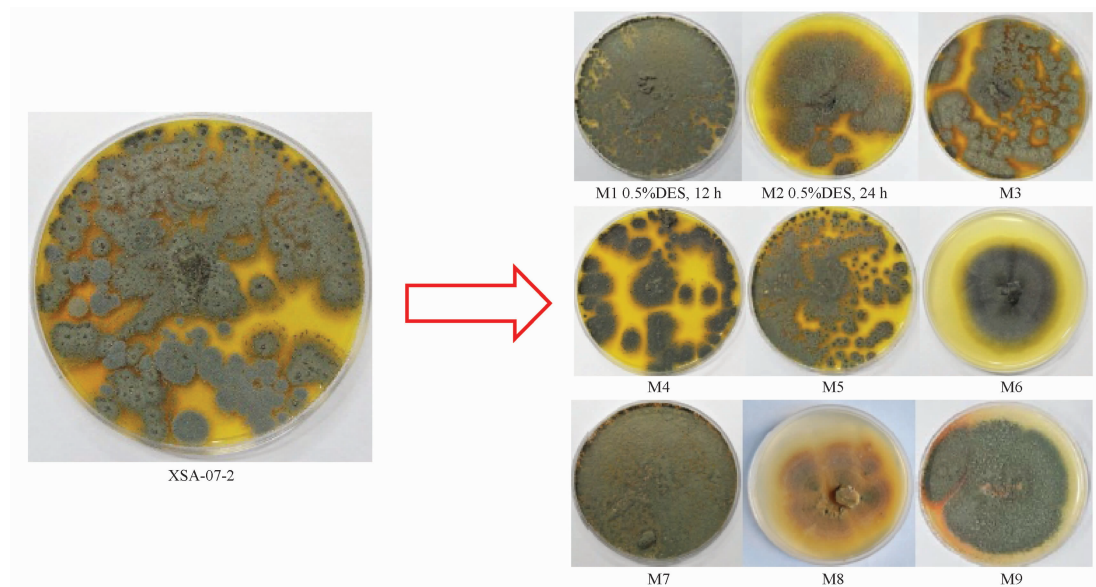


图2 *E. varicolor* XSA-07-2 的野生株和化学诱变株(M1~M9)形态图

Fig. 2 The morphology of *E. varicolor* XSA-07-2 and its chemical mutant strains of M1~M9

突变株进行发酵,发酵 30 d 后进行次生代谢产物萃取及 HPLC-UV 指纹对比分析(M1 ~ M9,图 3),寻找与野生菌株指纹变化差异明显的突变株,发现突变株 M8 化学指纹明显增多,选作阳性突变株,并从其次生代谢产物中分离鉴定 3 个新化合物 1 ~ 3 (图 3, M8)。

3.2 提取与分离

挑取阳性诱变株 M8 接种于 PDA 平板进行活化,活化后接种于大米固体培养基上进行规模化发酵,500 mL 三角瓶 25 °C 静置发酵 50 瓶。发酵 30 d 后,乙酸乙酯提取 3 次,合并提取液减压浓缩得到粗提物浸膏。根据 HPLC 指纹导向,对浸膏进行快速减压液相色谱(VLC)分离,洗脱溶剂为石油醚-丙酮(50:1→1:1, V/V),富集含有目标指纹峰部位。后经 ODS 柱色谱,以甲醇-水(30%→100%, V/V)梯度洗脱,最后通过半制备 HPLC 对目标化合物进行纯化,获得化合物 1(20.2 mg)、2(15.7 mg)和 3(26.5 mg)。

3.3 抗氧化活性测定

采用 DPPH 方法,在文献[15]方法基础上改进操作,测定化合物 1~3 的抗氧化活性。化合物用乙醇溶解,配制成 50,40,20,10,5,2.5,1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 DPPH 溶液 2 mL,加入 1 mL 样品液,避光静置 30 min 后,测 516 nm 下吸收值。以维生素 C(Vc)作为阳性对照,无水乙醇作为空白对照,每个样品平行测 3 次,取平均值。

4 结果与分析

4.1 新化合物结构解析

化合物 1:白色粉末,高分辨电喷雾质谱(HRESI-MS)显示其准分子离子峰为 m/z 209.0816 [M-H]⁻(calcd for C₁₁H₁₃O₄,209.0814),提示其相对分子质量为 210,分子式为 C₁₁H₁₄O₄,不饱和度为 5;紫外光谱显示最大吸收波长为 $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 228,308 nm;在¹H-NMR 中,高场有一乙基信号 δ_{H} 1.23 (t,3H, $J=7.5$ Hz,H-9)、2.95 (q,2H, $J=7.5$ Hz,H-8),还有一甲氧基信号 δ_{H} 3.89 (s,3H,H-11), δ_{H} 4.43 (brs,2H,H-10)为羟甲基信号,很明显还有一个苯环氢信号 δ_{H} 6.57 (s,1H,H-6),在低场区域,结合 HSQC 图谱,发现 δ_{H} 10.14 (s,1H,H-1)为醛基信号;¹³C-NMR 图谱显示有 11 个碳原子,其中有一醛基碳信号 δ_{C} 195.0(C-1),另外还存在一组苯环碳信号 δ_{C} 164.8,163.0,151.9,114.1,112.5 以及 104.8。化学位移 δ_{C} 164.8,163.0 推测结构含有 2 个酚

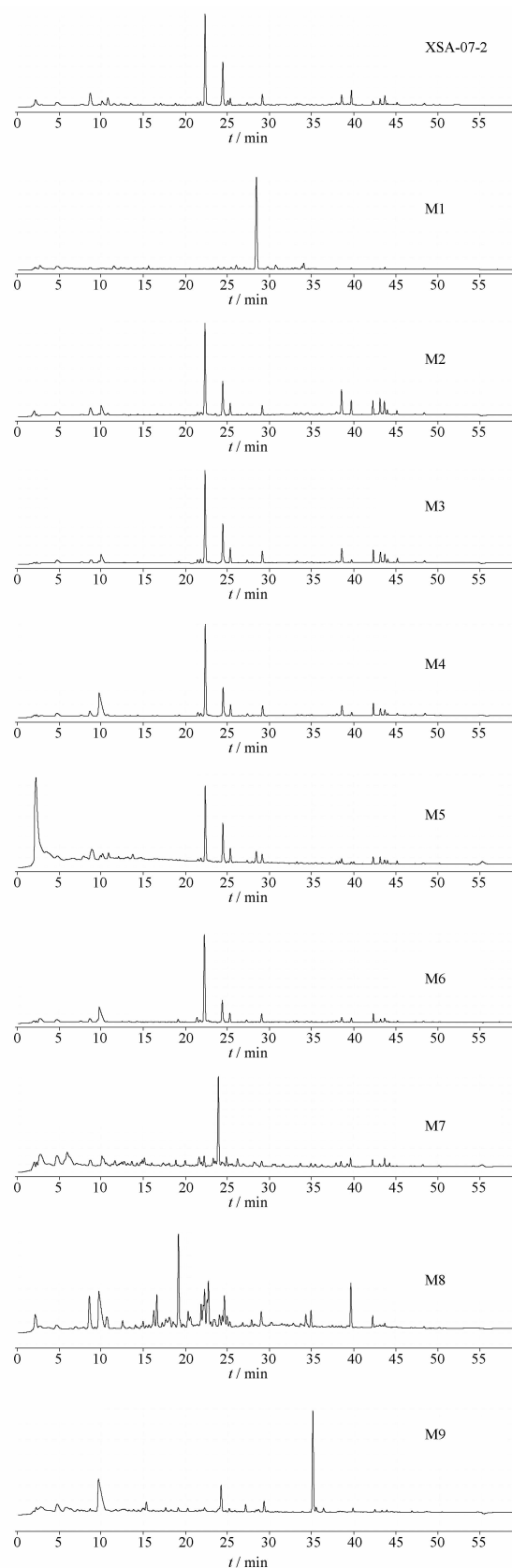


图 3 XSA-07-2 的野生株及化学诱变株 M1 ~ M9 的 HPLC-UV 指纹分析. $\lambda=210$ nm

Fig. 3 HPLC-UV analysis of wild and mutant strains M1 - M9 of XSA-07-2. $\lambda=210$ nm

羟基; δ_C 151.9 为醛基 β 碳信号, 其可通过 HMBC 谱中醛基氢 δ_H 10.14 与 δ_C 163.0 (C-3), 112.5 (C-2) 以及 151.9 (C-7) 的偶合相关进一步证实。HMBC 谱中, 连氧亚甲基 δ_H 4.43 (brs, 2H, H-10) 与 δ_C 164.8, 163.0, 及 114.1 偶合相关, 推测该亚甲基连接于苯环 4 位碳上。通过其他 HMBC 相关信号确定了化合物 **1** 的平面结构 (图 4, 碳氢核磁数据见表 1), 为新化合物。

化合物 **2**: 白色粉末, 高分辨电喷雾质谱 (HRESI-MS) 显示其准分子离子峰为 m/z 247.094 7 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{12}H_{16}O_4Na$, 247.094 6), 说明其相对分子质量为 224, 分子式为 $C_{12}H_{16}O_4$, 不饱和度为 5; 分析 1H -NMR 谱图, 发现化合物 **2** 与化合物 **1** 非常相似, 不同之处在于化合物 **2** 多了一个甲基信号 δ_H 3.20 (s, 3H, H-12), 其他信号基本一致。通过 HMBC 谱中 δ_H 3.20 与 δ_C 165.4 的相关信号, 推测该甲基连接于苄醇上, 而高分辨质谱数据也进一步证实上述推测, 进而确定了化合物 **2** 的结构 (碳氢核磁数据见表 1)。

化合物 **3**: 白色粉末, 高分辨电喷雾质谱 (HRESI-MS) 显示其准分子离子峰为 m/z 209.081 2 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{11}H_{13}O_4$, 209.081 4), 说明其相对分子质量为 210, 分子式为 $C_{11}H_{14}O_4$, 不饱和度为 5; 紫外光谱显示最大吸收波长为 λ_{max}^{MeOH} 285, 356 nm; 对比化合物 **3** 与化合物 **1** 的 1H -NMR 图谱, 发现 2 个化合物的信号基本一致, 同样有一乙基信号 δ_H 1.20 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, H-9)、2.74 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz, H-8), 还有一甲氧基信号 δ_H 3.89 (s, 3H, H-11), 同样有一个羟甲基信号 δ_H 4.46 (d, 2H, $J = 3.5$

Hz, H-10), 另有一苯环氢信号位于 δ_H 6.49 (s, 1H, H-4)。化合物 **3** 与化合物 **1** 是同分异构体, 结构十分类似, 主要区别在于连氧亚甲基在苯环上的取代位置不同。通过 HMBC 谱中, δ_H 4.46 (d, 2H, $J = 3.5$ Hz, H-10) 与 δ_C 161.5 (C-5), 119.6 (C-6) 以及 157.2 (C-7) 的偶合相关推断其连接于苯环片段的 6 位; 而甲基氢信号 δ_H 3.89 与 δ_C 161.7 (C-3) 存在相关偶合信号, 推测其连接于苯环 3 位酚羟基上, 进而推测出化合物 **3** 的结构 (图 3, 碳氢核磁数据见表 1)。

4.2 化合物抗氧化活性结果

DPPH 自由基清除实验结果显示, 化合物 **1** 和 **2** 对 DPPH 没有明显的清除作用, 化合物 **3** 对 DPPH 自由基具有一定的清除作用, 说明新聚酮化合物 **3** 具有一定的抗氧化能力 (表 2)。由活性结果分析, 该类化合物中起抗氧化活性的功能基团为酚羟基。化合物 **1**、**2** 在其 C-3 位存在酚羟基, 但其 β 位为醛羰基, 二者可以形成分子内氢键, 使酚羟基不易被氧化, 从而影响了其分子的抗氧化作用。化合物 **3** 中 C-5 位为游离酚羟基, 易被氧化为羰基, 从而表现出良好的抗氧化活性。

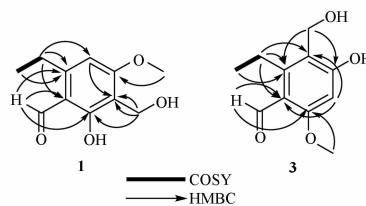


图 4 化合物 **1** 和 **3** 的主要 COSY 和 HMBC 相关

Fig. 4 Key COSY and HMBC correlations of compounds **1** and **3**

表 1 化合物 **1**~**3** 的 1H 和 ^{13}C -NMR 数据 (DMSO- d_6 , 400 MHz)

Tab. 1 1H and ^{13}C -NMR data of compounds **1**–**3** (DMSO- d_6 , 400 MHz for 1H -NMR)

No.	1		2		3	
	δ_C mult.	δ_H mult. (J in Hz)	δ_C mult.	δ_H mult. (J in Hz)	δ_C mult.	δ_H mult. (J in Hz)
1	195.0 (d)	10.14, s	195.2 (d)	10.15, s	194.0 (d)	10.18, s
2	112.5 (s)		112.5 (s)		108.6 (s)	
3	163.0 (s)	12.48, brs	163.0 (s)	12.37, brs	161.7 (s)	
4	114.1 (s)		112.5 (s)		102.6 (d)	6.48, brs
5	164.8 (s)		165.4 (s)		161.5 (s)	12.61, brs
6	104.8 (d)	6.57, brs	104.9 (d)	6.60, brs	119.6 (s)	
7	151.9 (s)		152.6 (s)		157.2 (s)	
8	25.2 (t)	2.95, q(7.5)	25.1 (t)	2.97, q(7.5)	26.8 (t)	2.74, q(7.5)
9	17.5 (q)	1.23, t(7.5)	17.5 (q)	1.23, t(7.5)	15.6 (q)	1.20, t(7.5)
10	51.1 (t)	4.43, brs	61.2 (t)	4.35, brs	52.7 (t)	4.46, d(3.5)
11	56.5 q	3.89, s	56.6 q	3.90, s	56.4 q	3.89, s
12			57.6 q	3.20, s		

表2 化合物1~3的DPPH自由基清除活性. $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab.2 DPPH radical scavenging activity of compounds 1-3.

$n=3, \bar{x} \pm s$

Compound	DPPH IC ₅₀ /μg · mL ⁻¹
1	>100
2	>100
3	13.58 ± 0.14
Vc	4.47 ± 0.05

5 结论

本实验通过化学诱变手段,成功诱导海洋真菌 *Emericella varicolor* XSA-07-2 突变株 M8 代谢产生与野生株具有明显差异的代谢产物,并从中获得了结构新颖、且具有抗氧化活性的聚酮类化合物。该研究丰富了海洋微生物天然产物的结构多样性,再次验证了化学诱变法激活微生物沉默基因表达的有效性,为深入挖掘海洋微生物的次级代谢潜力提供了方法学参考。

REFERENCES

- [1] BLUNT J W, COPP B R, KEYZER R A, *et al.* Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34: 235-294.
- [2] BLUNT J W, COPP B R, KEYZER R A, *et al.* Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33: 382-431.
- [3] BLUNT J W, COPP B R, KEYZER R A, *et al.* Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2015, 32: 116-211.
- [4] ZHANG Q H, TIAN L, YAN Z, *et al.* Chemical Constituents of a Marine Fungus *Nigrospora sphaerica*[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2014, 49(1):26-29.
- [5] WANG Y, LI Z L, BAI J, *et al.* Alkaloids from the Marine - Derived Fungus *Aspergillus fumigatus* YK-7 and Their Antitumor Activities[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2017, 52(15):21-25.
- [6] REN H, CAO X L, GU Q Q, *et al.* Antitumor Metabolites from Marine - Derived Fungus *Gliocladium catenulatum* T31[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2010, 45(22):1720-1723.
- [7] MARTIN J F, LIRAS P. Evolutionary formation of gene clusters by reorganization: the meleagrin/roquefortine paradigm in different fungi [J]. *Appl Microbiol Blot*, 2016, 100(4):1579-1587.
- [8] SLOT J C, HIBBETT D S. Horizontal transfer of a nitrate assimilation gene cluster and ecological transitions in fungi: a phylogenetic study [J]. *PLoS One*, 2007, 2(10):e1097.
- [9] GROND S, PAPSTAVROU I, ZEECK A. Novel a-L-rhamnopyranosides from a single strain of streptomyces by supplement-induced biosynthetic steps [J]. *Eur J Org Chem*, 2002, 2002(19):3237-3242.
- [10] CUETO M, JENSEN P R, KAUFFMAN C, *et al.* A new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(11):1444-1446.
- [11] SUN K L, ZHU G L, HAO J J, *et al.* Chemical-epigenetic method to enhance the chemodiversity of the marine algicolous fungus, *Aspergillus terreus* OUCMDZ-2739 [J]. *Tetrahedron*, 2017, 74(1):84-87.
- [12] LIU W, WANG L P, SUN K L, *et al.* Diketopiperazine and diphenylether derivatives from marine algae-derived *Aspergillus versicolor* OUCMDZ-2738 by epigenetic activation [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(1):6.
- [13] LONG H L, CHENG Z B, HUANG W, *et al.* Diasteltoxins A - C, asteltoxin-based dimmers from a mutant of the sponge-associated *mericella varicolor* fungus [J]. *Org Lett*, 2016, 18:4678-4681.
- [14] WU Q, WU C M, LONG H L, *et al.* Varioxiranols A - G and 19-O-methyl-22-methoxypryamixanthone, PKS and hybrid PKS-derived metabolites from a sponge-associated *Emericella varicolor* Fungus [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(10):2461-2470.
- [15] MENSOR L L, MENEZES F S, LEITAO G G, *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by use of DPPH free radical method [J]. *Phytother Res*, 2001, 15(2):127-130.

(收稿日期:2018-12-11)