

◆海洋生态◆

添加前体对 2 株真菌次级代谢产物及其生物活性的影响^{*}薛欣怡¹, 张翼^{1,2,3}, 廖清楠¹, 冯昀铨¹, 胡雪琼¹, 刘亚月^{1,2,3**}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省海洋生物制品工程实验室, 广东省海洋食品工程技术研究中心, 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 湛江市脑健康海洋药物与营养品重点实验室, 广东海洋大学海洋药物研究所, 广东湛江 524088; 2. 广东海洋大学深圳研究院海洋医药研发中心, 广东深圳 518120; 3. 大连工业大学, 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁大连 116034)

摘要:为探究添加前体物质对红树植物杨叶肖槿(*Thespesia populnea*)来源内生真菌 *Talaromyces* sp. YX-001 和 *Penicillium* sp. YX-002 次级代谢产物及其生物活性的影响, 选取马铃薯葡萄糖液体 (Potato Dextrose Broth, PDB) 培养基和察氏 (Czapek's) 培养基, 分别在其中添加 2 种前体物质 (甲戊二羟酸和酪氨酸), 采用 12 孔板对菌株进行微量发酵培养。通过分析菌株次级代谢产物的产量、HPLC 指纹图谱、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制活性、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除活性和卤虫致死活性, 探究添加前体物质前后菌株次级代谢产物的化学多样性和生物活性的变化情况。结果表明: 添加 2 种前体物质均可使菌株次级代谢产物的产量和化学多样性增加, 但生物活性的变化有所不同。酸性环境可能会促进菌株中具有较好 DPPH 自由基清除活性的次级代谢产物的合成, 但其具体机制还有待进一步研究。本研究为深入研究杨叶肖槿内生真菌 *Talaromyces* sp. YX-001 和 *Penicillium* sp. YX-002 的次级代谢产物奠定了基础。

关键词:前体物质 杨叶肖槿 *Talaromyces* sp. *Penicillium* sp. 次级代谢产物

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2022)05-0854-09

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20221116.005

微生物来源次级代谢产物是目前药物先导化合物的重要来源之一。传统研究主要集中在单一培养条件下微生物发酵液和菌丝体中活性化合物的提取分离, 这导致经常重复发现已被研究过的化合物^[1]。

收稿日期: 2022-05-18

修回日期: 2022-06-27

* 国家自然科学基金项目 (21807015), 广东海洋大学博士启动项目 (R18008), 湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目 (2020A01030), 广东省扬帆计划引进紧缺拔尖人才项目 (201433009), 深圳市科创委基础研究面上项目 (JCYJ20190813105005619), 深圳市大鹏新区科技研发项目 (KJYF202001-07), 广东省普通高校重点领域专项“生物医药与健康” (2021ZDZX2064), 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2021A50114) 和湛江市海洋经济创新发展示范市建设项目 (XM-202008-01B1) 资助。

【作者简介】

薛欣怡 (1997-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋天然产物研究, E-mail: xuexinyi_3630@163.com。

【**通信作者】

刘亚月 (1989-), 女, 讲师, 主要从事海洋天然产物研究, E-mail: yayue_liu@163.com。

【引用本文】

薛欣怡, 张翼, 廖清楠, 等. 添加前体对 2 株真菌次级代谢产物及其生物活性的影响 [J]. 广西科学, 2022, 29(5): 854-862.

XUE X Y, ZHANG Y, LIAO Q N, et al. Effects of Adding Precursors on Secondary Metabolites and Their Activities of Two Fungal Strains [J]. Guangxi Sciences, 2022, 29(5): 854-862.

研究人员对多种真菌和细菌进行全基因组测序发现,能够编码化合物的基因数目非常庞大,真菌和细菌可产生的化合物远远超过目前被发现的化合物数量,表明微生物在单一培养条件下产生生物活性化合物的潜力被严重低估,很多基因可能处于沉默状态。现有研究发现,通过敲除、引入异源表达微生物基因、调节启动子、诱导突变或改变培养条件等方式挖掘微生物次级代谢产物的生物合成基因簇,也许会产生更多的次级代谢产物^[2-4]。而添加前体物质是一种简单有效的策略,它是指在发酵培养基中添加一种在微生物生物合成过程中能易于或直接结合到最终化合物的物质,使某些次级代谢产物的产量有较大提高或可能产生新的化合物^[5]。Valente等^[6]研究在培养基中添加不同前体物质对内生真菌 *Penicillium crustosum* 次级代谢产物的影响,结果发现,添加 ferulic/quinic acids 和添加 cinnami/3,4-(methylenedioxy)能够产生新化合物 5-hydroxy-7-methoxy-4-methylphthalide。Wang等^[7]在对内生真菌 *Spicaria elegans* KLA03 培养过程中添加 L-色氨酸和 D-色氨酸,从其次级代谢产物中分离得到3种新的细胞松弛素,活性研究结果表明三者对 A-549 细胞系显示出细胞毒活性,半数抑制浓度(IC₅₀)值分别为 8.2 μmol/L、20.0 μmol/L 和 3.1 μmol/L。自然界中存在大量的微生物,但是目前添加前体物质对先导化合物影响的研究只涉及天然资源中的一小部分,尤其是内生微生物的研究中关于通过添加前体物质针对性改变菌株次级代谢产物的工作尚少,此方向具有巨大的研究潜力。

本研究在前期研究中发现,红树植物杨叶肖槿 (*Thespesia populnea*) 来源内生真菌 *Talaromyces* sp. YX-001 和 *Penicillium* sp. YX-002 中的次级代谢产物中可能具有丰富的生物碱和萜类化合物。通过查阅文献得知,这两类化合物的前体物质多为氨基酸和甲戊二羟酸^[8,9]。因此在前期研究的基础上^[10,11],本研究选取马铃薯葡萄糖液体(Potato Dextrose Broth, PDB)培养基和察氏(Czapek's)培养基,分别添加2种前体物质(甲戊二羟酸和酪氨酸)对菌株 YX-001 与 YX-002 进行微量发酵,通过分析菌株次级代谢产物的产量、HPLC 指纹图谱、乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制活性、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除和卤虫致死率的变化,探究添加前体物质对菌株次级代谢产物的影响,拟为进一步开展菌株 *Talaromyces* sp. YX-001 和 *Penicillium* sp. YX-

002 次级代谢产物的研究及药物先导化合物的发现奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

内生真菌 *Talaromyces* sp. YX-001 和 *Penicillium* sp. YX-002 分别采集于广东湛江红树林国家级自然保护区的红树植物杨叶肖槿 (*Thespesia populnea*) 的根部和叶部,通过用真菌 ITS 引物 ITS1 和 ITS4 扩增真菌 DNA 序列,所得的碱基序列在 Genbank 中用 Blast 进行进化树相似性分析,分别鉴定为 *Talaromyces* sp. (Genbank 登录号: MN826194) 和 *Penicillium* sp. (Genbank 登录号: MN826202), 现均保存于广东海洋大学食品科技学院海洋药物研究所。

1.1.2 培养基

PDB 培养基:称取马铃薯汁 500 mL、葡萄糖 20 g、蛋白胨 5 g 和海盐 20 g,加入纯水定容至 1 L,置于高压灭菌锅灭菌 30 min (1×10⁵ Pa),备用。

Czapek's 培养基:称取蔗糖 30 g、K₂HPO₄ 1 g、KCl 0.5 g、MgSO₄ 0.5 g、FeSO₄ 0.01g、NaNO₃ 2 g 和海盐 20 g,加入纯水定容至 1 L,调节 pH 值至 7.2±0.2,置于高压灭菌锅灭菌 30 min (1×10⁵ Pa),备用。

1.1.3 试剂与仪器

前体物质甲戊二羟酸以水为溶剂,酪氨酸以 5% 的稀盐酸为溶剂,均配制成 10 mg/mL 的溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后备用。

试剂: AChE (C3389)、碘代硫代乙酰胆碱 (Acetylthiocholine Iodide, ATCI, DA0048)、牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA, A1933)、DPPH (D9132)、海盐 (S9883) 均购自 Sigma-Aldrich, 5,5'-二硫代二硝基苯甲酸 (Dithiobisnitrobenzoic acid, DTNB, D8130) 购自 Ruibio 公司, 卤虫卵购自中国爱家水族馆,其他试剂均为国产分析纯。

仪器: WFH-201B 多功能紫外透射仪(上海精科实业有限公司),霉菌培养箱及生物安全柜(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),1260 Infinity II 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Epoch2 酶标仪(美国 BioTek 公司),R-300 旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司),薄层层析板 (GF254, 青岛邦凯高新技术材料有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 种子液的制备

将待培养的2株海洋真菌放进霉菌培养箱中活化过夜(28℃、湿度80%),而后将活化的菌种接种到预先灭菌的PDB培养基(200 mL)中,置于霉菌培养箱(28℃)中摇床(转数120 r/min)培养3-4 d,待菌落孢子生长茂盛,备用。

1.2.2 前体物质的添加

采用12孔板对菌株进行微量培养,每孔分别加入2 mL培养基(PDB培养基/Czapek's培养基)和200 μL种子液,置于霉菌培养箱(28℃)培养3 d后,分别加入一定量的溶剂或前体物质(甲戊二羟酸/酪氨酸),使样品的终浓度为1 mg/mL,每组做3个平行,而后继续培养14 d。

前体组:2 mL培养基、200 μL种子液、245 μL前体溶液(甲戊二羟酸/酪氨酸)。

对照组:2 mL培养基、200 μL种子液、245 μL水。

盐酸组:2 mL培养基、200 μL种子液、245 μL 5%稀盐酸。

1.2.3 菌株次级代谢产物的产量及HPLC分析

将上述培养好的菌株分别加入等体积的甲醇浸提3次后,离心15 min(3 000 r/min),取上层清液。减压浓缩获得粗提物的水溶液后,用乙酸乙酯萃取3次,再次减压浓缩,干燥得到粗浸膏,即为样品,称量并做好记录。

HPLC分析条件:样品用色谱纯甲醇溶解,配制成浓度为5 mg/mL的溶液,进样量为10 μL。洗脱条件为0-10 min,5%-95%的乙腈-水梯度洗脱;10-13 min,95%乙腈-水等度洗脱;13-17 min,95%-5%的乙腈-水梯度洗脱;17-20 min,5%的乙腈-水等度洗脱,流速为0.6 mL/min。DAD检测器信号采集波长为190-400 nm,本实验检测波长为210 nm。

1.2.4 菌株次级代谢产物的生物活性分析

(1)AChE抑制活性测试

采用优化的Ellmans比色法测定AChE的体外抑制活性^[12]。称取一定量的样品,用甲醇溶解至10 mg/mL,在96孔板的每个孔中加入100 μL样品溶液,待样品中的有机溶剂挥发干,依次将1 μL二甲基亚砜(DMSO)、49 μL PBS、10 μL 0.2 U/mL AChE和20 μL DTNB加入每个孔中,置于培养箱保温10

min(37℃)。将孔板取出后再加入20 μL乙酰硫代胆碱(ATCh),继续孵育20 min(37℃,恒温恒湿),通过酶标仪测定λ=405 nm处的吸光度 D_{405} ,以盐酸多奈哌齐作为AChE抑制活性测试的阳性对照。抑制率的计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{[(D_{\text{control}} - D_{\text{blank}}) - (D_{\text{sample}} - D_{\text{sample blank}})]}{(D_{\text{control}} - D_{\text{blank}})} \times 100\%$$

其中, $D_{\text{sample blank}}$ 表示加入样品和BSA组的吸光度, D_{sample} 表示加入样品和AChE组的吸光度, D_{control} 表示只加入AChE组的吸光度, D_{blank} 表示只加入BSA组的吸光度。

(2)DPPH自由基清除活性测试

采用Sharma等^[13]描述的方法,在96孔板中测定DPPH自由基清除活性。样品用甲醇溶解至10 mg/mL,备用。各反应体系均为100 μL。将96孔板置于暗处30 min后,通过酶标仪测定λ=517 nm处各反应体系的吸光度A,以维生素C为阳性对照,每组设置3个平行。DPPH自由基清除率的计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{[(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}})]}{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})} \times 100\%$$

其中, A_{sample} 表示含有50 μL DPPH和50 μL样品的DMSO溶液反应体系的吸光度, A_{control} 表示含有50 μL DPPH和50 μL DMSO溶液的反应体系的吸光度, $A_{\text{sample blank}}$ 表示含有50 μL甲醇和50 μL样品的DMSO溶液反应体系的吸光度, A_{blank} 表示含有50 μL甲醇和50 μL DMSO溶液的反应体系的吸光度。

(3)卤虫致死活性测试

采用96孔板测试样品对卤虫的致死活性^[14]。每孔加199 μL含卤虫幼体的溶液(每孔约含20只卤虫),制成测试培养板。样品以DMSO为溶剂,浓度为10 mg/mL,每个培养板孔中加入1 μL样品,终浓度为50 μg/mL,设3个平行样。在恒温培养箱中培养24 h(28℃,保持光照)后,统计各孔中卤虫的总数和死亡数,阴性和阳性对照分别为DMSO和秋水仙碱。卤虫致死率计算公式如下:

$$\text{卤虫致死率}(\%) = \frac{[\text{样品组致死率} - \text{对照组致死率}]}{\text{对照组存活率}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 添加前体物质前后菌株次级代谢产物的产量和 HPLC 指纹图谱变化情况

2.1.1 产量变化情况

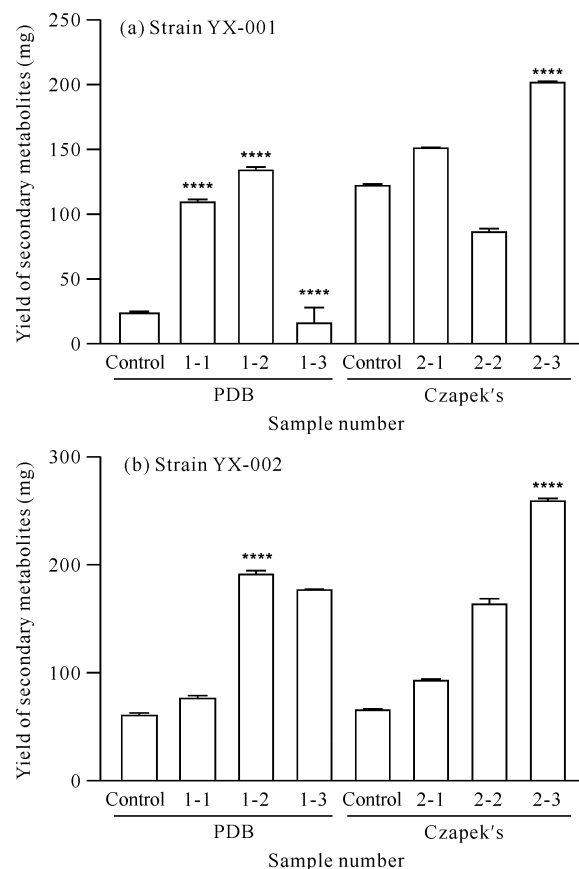
对菌株 YX-001[图 1(a)]而言,在两种培养基中添加甲戊二羟酸都可使菌株次级代谢产物的产量提高。在 PDB 培养基中添加酪氨酸,可使菌株 YX-001 的次级代谢产物的产量降低,而在 Czapek's 培养基中添加酪氨酸,可使该产量提高。进一步分析可知,在 PDB 培养基中,酪氨酸前体组中菌株次级代谢产物的产量远低于盐酸组,表明菌株 YX-001 次级代谢产物的产量增加主要是由酸性环境引起,酪氨酸的加入反而会抑制菌株 YX-001 的代谢;在 Czapek's 培养基中,盐酸组中菌株次级代谢产物的产量低于对照组,但酪氨酸前体组中菌株次级代谢产物的产量显著高于盐酸组,表明酸性环境可能会抑制菌株 YX-001 的代谢,但酪氨酸的加入可显著促进菌株 YX-001 的代谢。

对菌株 YX-002[图 1(b)]而言,添加甲戊二羟酸和酪氨酸均可使菌株 YX-002 的次级代谢产物产量提高,尤其是盐酸组和酪氨酸前体组,其代谢产物显著增加($P < 0.0001$)。进一步分析可知,在 PDB 培养基中,酪氨酸前体组中菌株次级代谢产物的产量低于盐酸组,表明菌株 YX-002 次级代谢产物的产量增加主要是由酸性环境引起;在 Czapek's 培养基中,酪氨酸前体组中菌株次级代谢产物的产量显著高于盐酸组,表明酸性环境下,酪氨酸的加入可促进菌株 YX-002 的代谢。

2.1.2 HPLC 指纹图谱变化情况

对菌株 YX-001(图 2)而言,与对照组相比,在添加甲戊二羟酸和酪氨酸 2 种前体物质后,除在 PDB 培养基中酪氨酸前体组中菌株次级代谢产物的吸收峰减少外,其余各实验组中菌株次级代谢产物的吸收峰均有增加,表明这些条件下菌株 YX-001 可能产生了新的次级代谢产物。

对菌株 YX-002(图 3)而言,与对照组相比,在添加甲戊二羟酸和酪氨酸 2 种前体物质后,无论是 PDB 培养基还是 Czapek's 培养基中菌株次级代谢产物的吸收峰都明显增多。与对照组相比,在保留时间 $t_R = 9.5 \text{ min}$ 处的新的吸收峰仅在甲戊二羟酸和酪氨酸前体组中出现,而盐酸组没有,表明该吸收峰可能是由于添加甲戊二羟酸和酪氨酸前体产生的。



$x - y$ is sample number, x represents medium (1 represents PDB medium, 2 represents Czapek's medium), y represents added precursor or solvent (1 for mevalondihydroxy acid, 2 for hydrochloric acid and 3 for tyrosine). * * * * indicates comparison with the control group, $P < 0.0001$

图 1 菌株 YX-001 和 YX-002 在不同培养条件下的产量

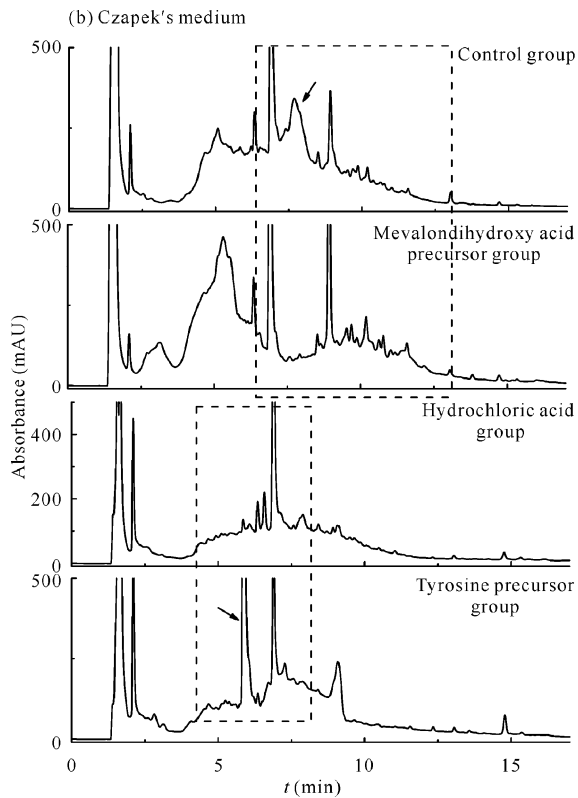
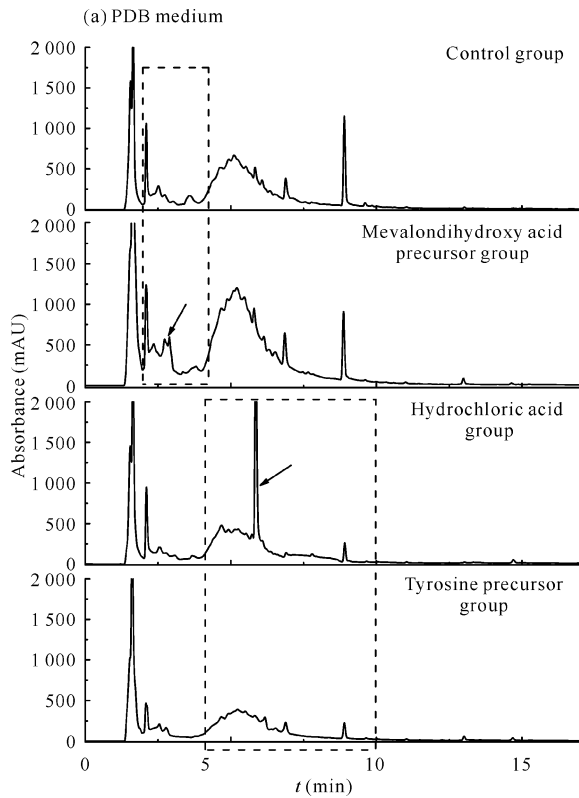
Fig. 1 Yield of strains YX-001 and YX-002 obtained under different media conditions

2.2 添加前体物质前后菌株次级代谢产物生物活性的变化情况

2.2.1 AChE 抑制活性

对菌株 YX-001[图 4(a)]而言,在 PDB 培养基中,添加甲戊二羟酸可降低菌株次级代谢产物的 AChE 抑制活性,而添加酪氨酸可使该活性增加。由于盐酸组的 AChE 抑制活性低于对照组,表明在 PDB 培养基中,使 AChE 抑制活性增加的原因在于酪氨酸,而不是盐酸。在 Czapek's 培养基中,添加甲戊二羟酸和酪氨酸均可增加菌株次级代谢产物的 AChE 抑制活性。

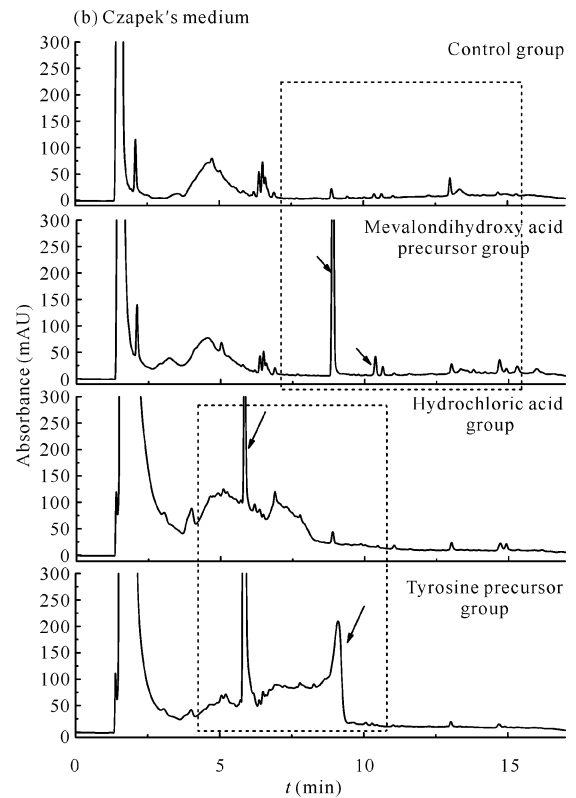
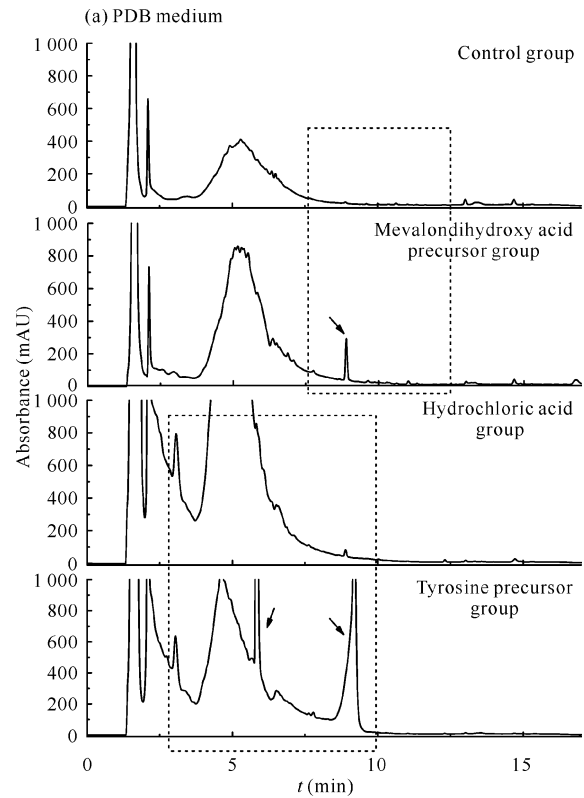
对菌株 YX-002[图 4(b)]而言,在 PDB 培养基中,添加甲戊二羟酸和酪氨酸均可降低 AChE 抑制



Dotted boxes indicate areas of change in emphasis, arrow points to newly added or disappeared absorption peak

图2 添加前体物质前后菌株 YX-001 次级代谢产物的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of secondary metabolites of strain YX-001 before and after feeding precursor

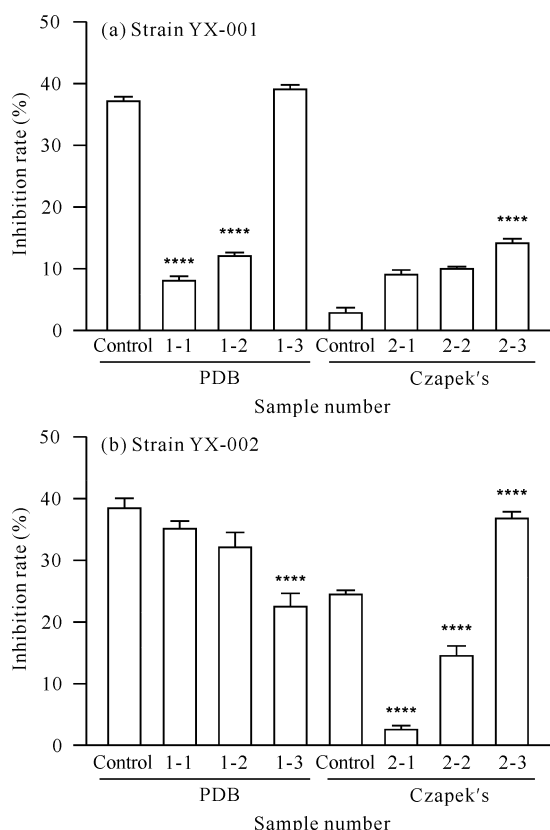


Dotted boxes indicate areas of change in emphasis, arrow points to newly added or disappeared absorption peak

图3 添加前体物质前后菌株 YX-002 次级代谢产物的 HPLC 指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprints of secondary metabolites of strain YX-002 before and after feeding precursor

活性,且酪氨酸的效果更为显著;在 Czapek's 培养基中,添加甲戊二羟酸可显著降低菌株次级代谢产物的 AChE 抑制活性,而添加酪氨酸可使该活性增加。由于盐酸组的 AChE 抑制活性低于对照组,表明在 Czapek's 培养基中,使菌株 AChE 抑制活性增大的原因在于酪氨酸,而不是盐酸。



$x - y$ is sample number, x represents medium (1 represents PDB medium, 2 represents Czapek's medium), y represents added precursor or solvent (1 for mevalondihydroxy acid, 2 for hydrochloric acid and 3 for tyrosine). * * * * indicates comparison with the control group, $P < 0.0001$

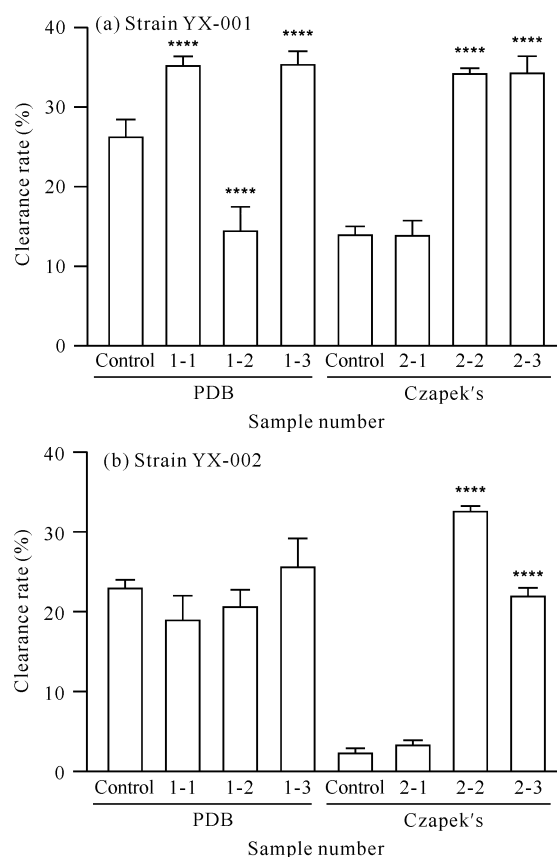
图4 菌株 YX-001 和 YX-002 次级代谢产物的 AChE 抑制活性

Fig. 4 AChE inhibitory activity of secondary metabolites of strains YX-001 and YX-002

2.2.2 DPPH 自由基清除活性

对菌株 YX-001[图 5(a)]而言,在 PDB 培养基中,添加甲戊二羟酸和酪氨酸可增加菌株次级代谢产物的 DPPH 自由基清除活性。由于盐酸组的 DPPH 自由基清除活性低于对照组,说明使 DPPH 自由基清除活性增加的原因在于酪氨酸,而不是盐酸。在 Czapek's 培养基中,添加甲戊二羟酸对菌株次级代谢产物的 DPPH 自由基清除活性无明显变化,而添加酪氨酸可增加 DPPH 自由基清除活性。盐酸组的

DPPH 自由基清除活性高于对照组,且与酪氨酸前体组效果基本一致。由此推测,在 Czapek's 培养基中使 DPPH 自由基清除活性增加的可能是盐酸,而不是酪氨酸。



$x - y$ is sample number, x represents medium (1 represents PDB medium, 2 represents Czapek's medium), y represents added precursor or solvent (1 for mevalondihydroxy acid, 2 for hydrochloric acid and 3 for tyrosine). * * * * indicates comparison with the control group, $P < 0.0001$

图5 菌株 YX-001 和 YX-002 次级代谢产物的 DPPH 自由基清除活性

Fig. 5 DPPH free radical scavenging activity of secondary metabolites of strains YX-001 and YX-002

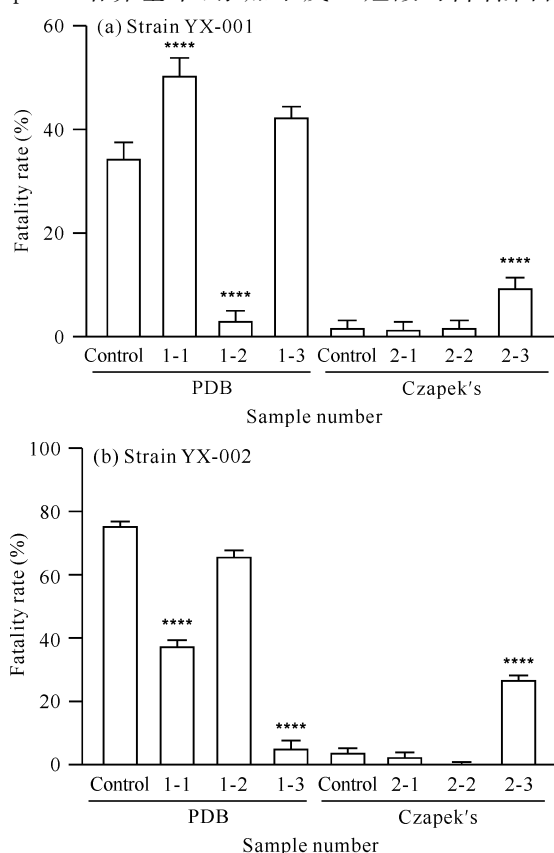
对菌株 YX-002[图 5(b)]而言,在 PDB 培养基中,添加甲戊二羟酸可降低菌株次级代谢产物的 DPPH 自由基清除活性,而添加酪氨酸可提高该活性。与对照组相比,盐酸组对菌株的 DPPH 自由基清除活性具有抑制作用,表明在 PDB 培养基中,使菌株 YX-002 DPPH 自由基清除活性增大的原因在于酪氨酸,而不是盐酸。在 Czapek's 培养基中,添加甲戊二羟酸和酪氨酸均可增加菌株次级代谢产物的 DPPH 自由基清除活性。但盐酸组的 DPPH 自由基清除活性增加量大于酪氨酸组,由此推测该条件下使菌

株 YX-002 DPPH 自由基清除活性增大的原因在于盐酸, 而不是酪氨酸。

2.2.3 卤虫致死活性

对菌株 YX-001[图 6(a)]而言, 在 PDB 培养基中, 添加甲戊二羟酸和酪氨酸可增加菌株次级代谢产物的卤虫致死活性。由于盐酸组的卤虫致死活性低于对照组, 说明酪氨酸的加入是卤虫致死活性增加的原因。在 Czapek's 培养基中, 添加甲戊二羟酸后菌株次级代谢产物的卤虫致死活性无明显变化, 而添加酪氨酸可使该活性明显增加。综上表明, 添加前体物质甲戊二羟酸和酪氨酸可能会增加菌株 YX-001 次级代谢产物的卤虫致死活性。

对菌株 YX-002[图 6(b)]而言, 在 PDB 培养基中, 添加前体物质甲戊二羟酸和酪氨酸对菌株次级代谢产物的卤虫致死活性均具有一定的降低作用; 在 Czapek's 培养基中, 添加甲戊二羟酸可降低菌株次



$x - y$ is sample number, x represents medium (1 represents PDB medium, 2 represents Czapek's medium), y represents added precursor or solvent (1 for mevalondihydroxy acid, 2 for hydrochloric acid and 3 for tyrosine). * * * * indicates comparison with the control group, $P < 0.0001$

图6 菌株 YX-001 和 YX-002 次级代谢产物的卤虫致死活性
Fig. 6 Artemia lethal activity of secondary metabolites of strains YX-001 and YX-002

级代谢产物的卤虫致死活性, 添加酪氨酸可使卤虫致死活性显著增加。在 Czapek's 培养基中, 与对照组相比, 盐酸组对菌株次级代谢产物的卤虫致死活性具有抑制作用, 表明使菌株 YX-002 次级代谢产物卤虫致死活性增大的原因在于酪氨酸, 而不是盐酸。

3 讨论

自 20 世纪 60 年代末开始, 海洋微生物次级代谢产物作为一种新的活性物质来源, 其相关研究越来越受到国内外海洋科技工作者的重视, 并且由于基因工程、DNA 重组、发酵工程等生物技术的发展, 使得近 20 年来从海洋微生物中分离得到的次级代谢产物逐年增加^[15]。而作为海洋微生物重要组成部分的海洋真菌, 因其种类繁多, 次级代谢产物类型丰富等优势而受到广泛的关注^[16]。2019 年共报道了 1 490 个新化合物, 其中来源于海洋真菌的新化合物占将近一半 (47%), 并且每年新发现的海洋真菌次级代谢产物数量仍在逐年上升, 海洋真菌已成为海洋活性次级代谢产物的主力军^[17]。据文献报道, 产活性物质的真菌多来自青霉属 *Penicillium* sp.、拟青霉属 *Paecilomyces* sp.、曲霉属 *Aspergillus* sp.、木霉属 *Trichoderma* sp.、腐质霉属 *Humicola* sp.、毛壳菌属 *Chaetomium* sp.、链格孢属 *Alternaria* sp.、枝孢属 *Cladosporium* sp. 等^[17]。

目前对青霉属和蓝状菌属 *Talaromyces* sp. 真菌的研究主要集中于利用传统方式对其次级代谢产物的分离鉴定与生物活性初步筛选评价^[18-21], 而通过改变培养条件、化学诱导或基因敲除等方式挖掘微生物次级代谢产物的生物合成基因簇, 使之产生更多具有较好活性的次级代谢产物的文献报道仍然较少。陈夏雨等^[22]采用单菌多次级代谢产物 (OSMAC) 策略对 1 株采自南海深海沉积环境的白黄笋顶孢霉属真菌 *Acrostalagmus luteoalbus* SCSIO F457 进行化学多样性的初步研究, 通过在不同培养基、pH 与盐度条件下对菌株进行培养调控, 筛选出 2 种适宜条件进行小规模发酵培养, 最终从发酵产物中共新增分离鉴定 11 个单体化合物。陈海立^[23]以两株三七内生真菌 (*Preussia isomera* XL-1326 和 *Talaromyces purpureogenus* XL-025) 为研究对象, 分别使用 8 种不同培养基小规模发酵, 通过比较其次级代谢产物的合成能力, 选取下一步扩大发酵的最佳培养基, 最终共分离得到 30 个具有较好抗植物病原真菌、抗耐药性致病细菌等药理活性的单体化合物。Wang 等^[24]

在真菌 *Penicillium citreonigrum* 的发酵过程中添加浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 DNA 甲基化酶抑制剂 5-azaC, 结果发现菌丝体形态与对照组相比发生了很大变化, 而且通过 HPLC 分析发现, 激活后的菌株产生了 10 个新色谱峰, 进一步对其次级代谢产物分离纯化后得到 2 个新的萜类化合物(atlantione A 和 atlantione B)。上述研究表明, 通过改变培养条件或添加诱导剂等方式, 可使目标菌株的次级代谢产物发生变化, 使之产生更多活性丰富、结构独特的化合物。

杨叶肖槿由于具有强大的增强记忆功效和抗氧化、抗炎等活性, 是潜在的 AChE 抑制剂先导化合物来源^[25]。目前, 国内外对红树植物杨叶肖槿的研究主要集中在植物本身的化学成分及药理活性上, 尚未见对其来源内生真菌的次级代谢产物及生物活性的有关报道。本研究首次探究了添加不同前体物质对杨叶肖槿内生真菌 *Talaromyces* sp. YX-001 和 *Penicillium* sp. YX-002 的次级代谢产物的影响。研究结果表明, 除菌株 YX-001 在 PDB 培养基条件下, 添加酪氨酸前体后其次级代谢产物的产量和化学多样性降低外, 其余情况均能增加 2 株菌株次级代谢产物的产量和化学多样性, 但生物活性的变化有所不同。同时, 本研究发现酸性环境可能会促进具有较好 DPPH 自由基清除活性的次级代谢产物的生成, 但其具体机制还有待进一步研究。部分实验现象并没有达到明显变化的预期效果, 可能有两种原因: (1) 菌株前体物质选择不合适。由于次级代谢产物在生物体内合成途径的复杂性, 其中可能含有多种结构类型的活性化合物, 这些化合物并不是单纯的以甲戊二羟酸或酪氨酸为前体, 而是以更复杂的组合形式或者由它们的复合途径作为前体, 从而导致实验现象变化不明显, 具体的结论有待后续进一步探索。(2) 发生变化的次级代谢产物本身比较微量或者痕量, 而主产物的产量过大, 导致其实验现象变化不明显, 因此在后期实验中可以考虑扩大规模培养或去除主产物, 进而探究添加前体物质对那些微量次级代谢产物的影响。

4 结论

本研究表明, 添加甲戊二羟酸和酪氨酸前体物质对 2 株菌株次级代谢产物的产量和化学多样性整体具有较好的促进效果, 但对 AChE 抑制活性、DPPH 自由基清除活性和卤虫致死活性等生物活性在不同条件下的影响有较大差异。同时发现, 酸性环境可能会促进具有较好 DPPH 自由基清除活性的次级代谢

产物的生成, 但其具体机制的确定还有待进一步研究。本研究为深入研究杨叶肖槿内生真菌 *Talaromyces* sp. YX-001 和 *Penicillium* sp. YX-002 的次级代谢产物奠定了基础。

参考文献

- [1] 杨康敏, 高向东, 顾觉奋. 激活沉默基因簇发掘微生物次级代谢产物的研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2015, 10(1): 77-80.
- [2] MEKALA L P, MOHAMMED M, CHINTALAPATI S, et al. Precursor-feeding and altered-growth conditions reveal novel blue pigment production by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2 [J]. Biotechnology Letters, 2019, 41(6/7): 813-822.
- [3] KUMAR K, KUMAR S R, DWIVEDI V, et al. Precursor feeding studies and molecular characterization of geraniol synthase establish the limiting role of geraniol in monoterpene indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* leaves [J]. Plant Science, 2015, 239: 56-66.
- [4] SELEGATO D M, FREIRE R T, PILON A C, et al. Improvement of bioactive metabolite production in microbial cultures - A systems approach by OSMAC and deconvolution-based ¹H NMR quantification [J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2019, 57: 458-471.
- [5] 黄淑燕, 郑郁善. 前体物质对雷公藤组织培养不定根诱导及甲素含量的影响[J]. 亚热带植物科学, 2017, 46(3): 240-243.
- [6] VALENTE A M, FERREIRA A G, DAOLIO C, et al. Production of 5-hydroxy-7-methoxy-4-methylphthalide in a culture of *Penicillium crustosum* [J]. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 2013, 85(2): 487-496.
- [7] WANG F Z, WEI H J, ZHU T J, et al. Three new cytochalasins from the marine-derived fungus *Spicaria elegans* KLA03 by supplementing the cultures with L- and D-tryptophan [J]. Chemistry & Biodiversity, 2011, 8(5): 887-894.
- [8] 刘秀玉, 罗凌龙, 马莹, 等. 植物天然产物途径创建[J]. 药学报, 2021, 56(12): 3285-3299.
- [9] 徐镇祥, 李美洁, 门潇, 等. 甲羟戊酸途径的代谢支路调控策略的研究进展[J]. 生物加工过程, 2020, 18(1): 44-51.
- [10] 刘亚月, 梁健文, 薛欣怡, 等. 基于 OSMAC 策略的 3 株海洋真菌发酵条件筛选与优化[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(3): 65-72.
- [11] 刘亚月, 薛欣怡, 黎卓怡, 等. 化学诱导对 2 株海洋真菌次级代谢产物及其生物活性的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2022, 42(1): 50-58.
- [12] KAUFMANN D, DOGRA A K, WINK M. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, 63(10): 1368-1371.
- [13] SHARMA O P, BHAT T K. DPPH antioxidant assay revisited [J]. Food Chemistry, 2009, 113: 1202-1205.
- [14] SOLIS P N, WRIGHT C W, ANDERSON M M, et al.

- A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp) [J]. *Planta Medica*, 1993, 59(3): 250-252.
- [15] 柏凤月, 倪孟祥. 海洋微生物来源的抗菌活性物质研究进展[J]. *化学与生物工程*, 2016, 33(5): 15-19, 25.
- [16] 吴园涛. 海洋生物高值利用研究进展与发展战略思考[J]. *地球科学进展*, 2013, 28(7): 829-833.
- [17] CHEN S H, CAI R L, LIU Z M, et al. Secondary metabolites from mangrove-associated fungi: Source, chemistry and bioactivities [J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39(3): 560-595.
- [18] 张鹏. 海洋植物来源内生真菌化学多样性及其生物活性研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2015.
- [19] 张涵. 三株海洋真菌次级代谢产物在新药开发中的应用研究[D]. 桂林: 桂林医学院, 2021.
- [20] ZHENG C J, LIAO H X, MEI R Q, et al. Two new benzophenones and one new natural amide alkaloid isolated from a mangrove-derived Fungus *Penicillium citrinum* [J]. *Natural Product Research*, 2019, 33(8): 1127-1134.
- [21] XIAO Y W, LIANG W Z, LIU D, et al. Isolation and acetylcholinesterase inhibitory activity of asteric acid derivatives produced by *Talaromyces aurantiacus* FL15, an endophytic fungus from *Huperzia serrata* [J]. *3 Biotech*, 2022, 12(3): 60.
- [22] 陈夏雨, 仲伟茂, 曾奇, 等. 基于 OSMAC 策略对深海来源真菌 *Acrostalagmus luteoalbus* SCSIO F457 化学多样性的初步研究[J]. *中国海洋药物*, 2020, 39(4): 7-15.
- [23] 陈海立. 基于“OSMAC”策略挖掘两株三七内生真菌次级代谢产物的合成潜能[D]. 重庆: 重庆大学, 2020.
- [24] WANG X R, SENA FILHO J G, HOOVER A R, et al. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum* [J]. *Journal of Natural Products*, 2010, 73(5): 942-948.
- [25] VASUDEVAN M, PARLE M. Pharmacological actions of *Thespesia populnea* relevant to Alzheimer's disease [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(9/10): 677-687.

Effects of Adding Precursors on Secondary Metabolites and Their Activities of Two Fungal Strains

XUE Xinyi¹, ZHANG Yi^{1,2,3}, LIAO Qingnan¹, FENG Yunkai¹, HU Xueqiong¹,
LIU Yayue^{1,2,3*}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Guangdong Province Engineering Laboratory for Marine Biological Products, Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Seafood, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Product of Guangdong Higher Education Institution, Zhanjiang Municipal Key Laboratory of Marine Drugs and Nutrition for Brain Health, Research Institute for Marine Drugs and Nutrition, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong, 524088, China; 2. Center for Marine Drugs Research & Development, Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen, Guangdong, 518120, China; 3. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning, 116034, China)

Abstract: In order to explore the effect of adding precursor substances on the secondary metabolites and their bioactivity of endophytic fungi *Talaromyces* sp. YX-001 and *Penicillium* sp. YX-002 from the mangrove plant *Thespesia populnea*, Potato Dextrose Broth (PDB) and Czapek's medium were selected, and two kinds of precursors (mevalondihydroxy acid and tyrosine) were added to them respectively. The strain was cultured by micro-fermentation in 12-well plates. By analyzing the yield of secondary metabolites, HPLC fingerprint, acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity, 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) free radical scavenging activity and artemia lethal activity, the chemical diversity and biological activity of secondary metabolites before and after the addition of precursor substances were investigated. The results showed that the addition of two precursors could increase the yield and chemical diversity of secondary metabolites, but the changes in biological activity were different. The acidic environment might promote the synthesis of secondary metabolites with good DPPH free radical scavenging activity in the strain, but the specific mechanism remains to be further studied. The study lays a foundation for further research on the secondary metabolites of the endophytic fungi *Talaromyces* sp. YX-001 and *Penicillium* sp. YX-002.

Key words: precursor substances; *Thespesia populnea*; *Talaromyces* sp.; *Penicillium* sp.; secondary metabolites

责任编辑: 梁 晓