

海洋真菌 *Alternaria alternata* YX-25 和放线菌 *Streptomyces exfoliates* YX-32 共培养的次级代谢产物研究

贺小平, 粟登权, 丁立建*, 何 山

宁波大学 李达三叶耀珍伉俪李本俊海洋生物医药研究中心, 浙江 宁波 315800

摘要: **目的** 研究来源于福建云霄红树林底泥中的链格孢属真菌 *Alternaria alternata* YX-25 和链霉菌属放线菌 *Streptomyces exfoliatus* YX-32 共培养产生的次级代谢产物。**方法** 通过硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱以及半制备 HPLC 等色谱技术对共培养所产生的次级代谢产物进行分离纯化。采用 MS 和 NMR 等波谱方法及文献对比鉴定化合物的结构。**结果** 从 2 株共培养的发酵产物中分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为 gliotoxin (1)、12,13-dihydroxy-fumitremorgin C (2)、fumitremorgin (3)、bisdethiobis (methylthio) gliotoxin (4)、demethoxyfumitremorgin C (5)、vermistatin (6)、cyclo-(L-Trp-L-Pro) (7)、6-methoxyspirotryprostatin B (8) 和 citrinolactone D (9)。**结论** 首次从海洋真菌 *Alternaria alternata* YX-25 和放线菌 *Streptomyces exfoliatus* YX-32 共培养发酵产物中发现了 9 个化合物, 为吲哚二酮哌嗪类、聚酮类、环肽类化合物。共培养方法可使代谢产物丰富, 可作为一种诱导次级代谢产物的新方法。

关键词: 红树林真菌; 次级代谢产物; 海洋真菌; 放线菌; gliotoxin; vermistatin

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)24-5772-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.007

Secondary metabolites of co-culture of *Alternaria alternata* YX-25 and *Streptomyces exfoliatus* YX-32

HE Xiao-ping, SU Deng-quan, DING Li-jian, HE Shan

Li Dak Sum Yip Yio Chin Kenneth Li Marine Biopharmaceutical Research Center, Ningbo University, Ningbo 315800, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of the co-culture of fungus *Alternaria alternata* YX-25 and *Streptomyces exfoliatus* YX-32 isolated from mangrove mud in Yunxiao Country of Fujian Province. **Methods** The compounds were purified by silica gel and Sephadex LH-20, followed by semi-preparative chromatography. The structures of the compounds were determined by MS and NMR. **Results** Nine compounds were isolated from the crude extract, which were identified as gliotoxin (1), 12,13-dihydroxy-fumitremorgin C (2), fumitremorgin (3), bisdethiobis(methylthio)gliotoxin (4), demethoxyfumitremorgin C (5), vermistatin (6), cyclo-(L-Trp-L-Pro) (7), 6-methoxyspirotryprostatin B (8), and citrinolactone D (9). **Conclusion** Nine compounds were isolated for the first time from co-culture of the fungus *Alternaria alternata* YX-25 and *Streptomyces exfoliates* YX-32, including indole diketopiperazines, polyketides, and cyclopeptides. The co-cultivation method can be as a new method for enrichment of secondary metabolites.

Key words: mangrove-derived fungi; secondary metabolites; marine fungi; actinomycetes; gliotoxin; vermistatin

海洋真菌是海洋微生物中具有代表性的一类类群, 已成为近年来海洋天然产物研究的热门对象。据报道已从海洋真菌中分离出大量结构新颖的天然产物^[1], 具有一定生物活性的化合物占到总化合

物的 70%~80%^[2], 其中一些已经通过临床研究成为商品药物上市^[3]。但是, 随着研究的不断深入, 研究者发现, 实验室条件下不能完全模拟自然环境, 大量可被观察到的微生物在实验室难以培养, 导致

收稿日期: 2018-04-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41776168); 国家自然科学基金资助项目 (41706167); 浙江省教育厅科研项目 (Y201737271); 宁波大学科研基金资助项目 (XYL17016)

作者简介: 贺小平 (1992—), 男, 硕士研究生。E-mail: 18892628896@163.com

*通信作者 丁立建, 博士, 讲师。E-mail: dinglijian@nbu.edu.cn

筛选得到的微生物重复率不断上升,一些海洋来源的微生物的次级代谢产物途径不被表达或抑制^[4],进而导致分离得到具有新结构、新活性化合物的几率逐年下降。针对这种情况,研究人员通过优化培养条件、增加样品采集的多样性、基因改造等措施,使海洋微生物在人工培养条件下能够合成化学多样性更丰富、活性更显著的次级代谢产物,其中一种有效方法就是共培养。海洋微生物在共培养条件下可能表现出更强的抗菌活性或者产生更多的新活性物质。有许多通过共培养发现新化合物的例子,Yu 等^[5]通过一株链霉菌与细菌共培养,对其进行分离得到 5 个在纯培养时不能得到的色胺衍生物,Wang 等^[6]将真菌与放线菌共培养得到 5 个新的聚酮类化合物。诱导共培养在海洋微生物培养中作为一种新研究方法,越来越引起人们的关注。

本研究小组从福建云霄红树林底泥中分离得到 30 株放线菌、3 株真菌。对它们进行单独小量发酵,并将其浸膏进行活性检测以及 HPLC 分析,发现活性不显著,同时次级代谢产物较少。于是利用共培养的方法诱导活性代谢产物。本研究选择 1 株真菌 *Alternaria alternata* YX-25 分别和另外 30 株放线菌

共培养,取小量发酵后的浸膏做活性检测,发现其中一株真菌与放线菌 *Streptomyces exfoliatus* YX-32 共培养代谢产物活性较好,对副溶血弧菌、哈维弧菌的最小抑菌浓度(MIC)为 8~32 $\mu\text{g/mL}$,且次级代谢产物丰富。于是将其大量共培养发酵,对发酵产物浸膏进行次级代谢产物分离,得到 9 个化合物,分别鉴定为 gliotoxin (1)、12,13-dihydroxy-fumitremorgin C(2)、fumitremorgin(3)、bisdethiobis-(methylthio)gliotoxin(4)、demethoxyfumitremorgin C(5)、vermistatin(6)、cyclo-(L-Trp-L-Pro)(7)、6-methoxyspirotryprostatin B(8)和 citrinolactone D(9),结构见图 1。本实验首次从海洋真菌 *Alternaria* sp. YX-25 和放线菌 *Streptomyces* sp. YX-32 共培养中发现了 9 个化合物,为吡啶二酮哌嗪类、聚酮类、环肽类化合物。

1 仪器与材料

超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司);恒温培养摇床(德国艾本德公司);W2695 分析型液相色谱、W2998 PDA 检测器(美国沃特世公司);YMC-Pack ODS-A 制备柱(250 mm $\times$ 10 mm, 5 μm);YMC-Pack

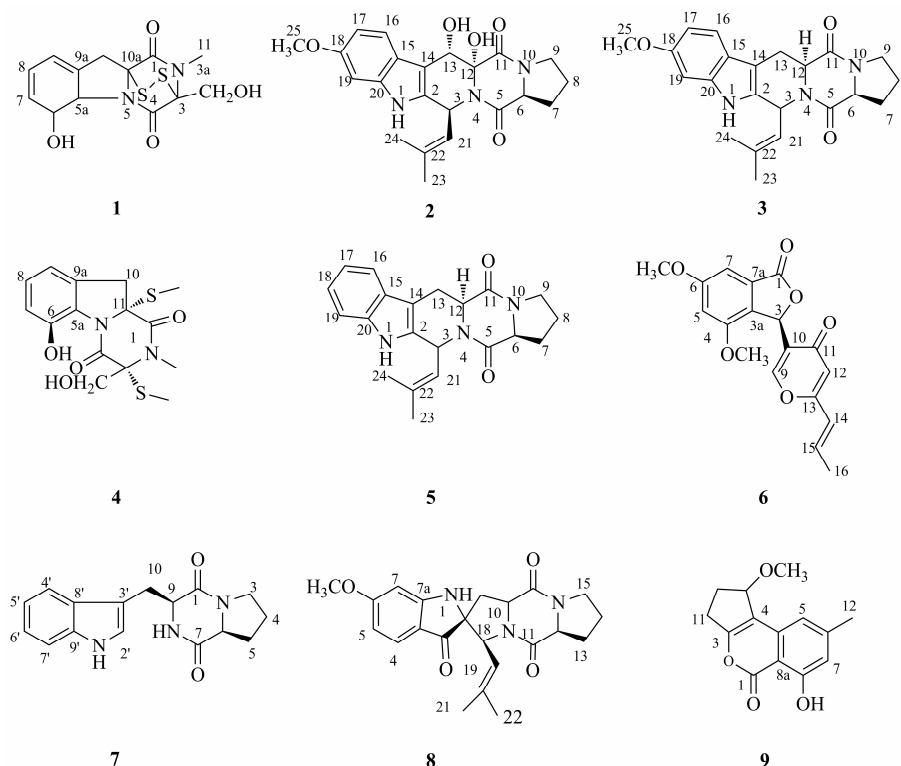


图 1 化合物 1~9 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—9

ODS-A 分析柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 高效液相色谱质谱联用系统 (上海沃特世科技有限公司); 核磁共振波谱仪 (德国布鲁克公司)。常规柱色谱硅胶 (200~300 目)、薄层色谱 (TLC) GF₂₅₄ 硅胶板, 青岛海洋化工厂; Sephadex LH-20 (北京英莱克科技发展有限公司)。提取分离试剂均为分析纯, 液相色谱试剂为色谱纯 (上海国药集团公司)。

2 方法

2.1 菌株来源及纯化

菌株分离自福建云霄红树林泥土。取泥土 1 g, 加入 9 mL 的无菌水, 使用涡旋振荡器震荡 5 min 后得到悬浊液。在 55 °C 恒温水浴 5 min, 使用常规的稀释涂布法涂布于 5 种分离培养基, 28 °C 恒温培养 3~5 d。挑取形态差异较大的单菌落, 平板上划线培养, 放置于恒温培养箱中, 得到单一菌落后放置于 4 °C 冰箱平板保存。通过菌落形态、颜色等外在特点, 进行初步排重, 最终从样品中得到 3 株真菌、30 株放线菌。甘油保藏于 -80 °C 冰箱。

2.2 培养基筛选

2.2.1 PDB 马铃薯浸出粉 10 g、葡萄糖 20 g、海盐 17.5 g、纯水 1 L。

2.2.2 ISP4 可溶性淀粉 10 g、CaCO₃ 2 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 1 g、NaCl 1 g、FeO₄·7H₂O 0.001 g、MnCl 0.001 g、(NH₄)₂SO₄ 2 g、海盐 17.5 g、纯水 1 L。

2.3 大量发酵培养基

PDB: 马铃薯浸出粉 10 g、葡萄糖 20 g、海盐 17.5 g、纯水 1 L。

2.4 菌株鉴定

分别提取真菌、放线菌基因组 DNA, 真菌通用引物为 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 放线菌特异性引物 S-C-Act-235-a-S-20 (5'-CGCGGCC-TATCAGCTTGTTG-3') 和 S-C-Act-878-a-A-19 (5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3'), 将真菌菌株基因序列以及放线菌基因序列进行 PCR 电泳及测序, 将真菌、放线菌测序结果分别与 GenBank 中已知菌株相应序列比对。

2.5 菌株共培养大量发酵

将保藏的菌株活化备用, 分别配制 3 瓶 PDB、ISP4 液体培养基作为种子液培养基, 同时配制 100 瓶 PDB 灭菌备用。将纯化后真菌、放线菌分别接种到 PDB、ISP4 培养基 25 °C、150 r/min 的条件下培

养 3 d 作为种子液。各接种真菌、放线菌 10 mL 种子液到配好的 PDB 培养基中 (400 mL/瓶), 100 瓶 PDB 培养基同等条件摇床培养 15 d。

2.6 提取与分离

15 d 发酵完成后, 共收集发酵产物约 40 L。用纱布将菌液菌体分离, 得到发酵液和菌丝体。发酵液用同体积的醋酸乙酯萃取 3 次。菌丝体中加入甲醇、二氯甲烷 (甲醇-二氯甲烷 1:1) 浸泡 8 h, 重复 3 次, 将菌体得到的浸膏用纯水溶解, 再用醋酸乙酯萃取 3 次, 最后将菌液和菌体的醋酸乙酯萃取物旋转蒸干合并得到浸膏 45.6 g。将菌液菌体萃取得到的次级代谢产物与硅胶粉混合均匀。以石油醚-醋酸乙酯 (100:0、100:10、100:3、100:50、100:100、10:50、0:100) 为洗脱剂梯度洗脱, 以醋酸乙酯-甲醇 (40:1、30:1、0:1) 梯度洗脱, TLC 跟踪, HPLC 检测合并, 共得到 9 个组分 Fr. 1~9。

从 9 个组分中挑选 2 个组分 Fr. 4、Fr. 5 进一步分离纯化。其中组分 Fr. 4 (2.8 g) 进行 Sephadex LH-20 分离, 在分析后合并成 3 个亚组分 Fr. 4A~4C。将其组分 Fr. 4B 进行中压柱色谱得到 40 个小组分 Fr. 4B-1~4B-40, Fr. 4B-15 组分通过半制备型 HPLC 制备 (乙腈-水 45:55, 体积流量 2 mL/min) 得到化合物 **1** (25 mg)、**2** (10 mg)。Fr. 4B-19 组分通过半制备型 HPLC 制备 (乙腈-水 42:58, 体积流量 2 mL/min) 得到化合物 **3** (6 mg)、**4** (7.5 mg)。Fr. 4B-23 组分通过半制备型 HPLC 制备 (乙腈-水 35:65, 体积流量 2 mL/min) 得到化合物 **5** (4.5 mg)、**6** (5.5 mg)。Fr. 4B-33 组分通过半制备型 HPLC 制备 (乙腈-水 33:67, 体积流量 2 mL/min) 得到化合物 **7** (12 mg)。Fr. 5 先经过 Sephadex LH-20 分离, 经分析后合并为 3 个亚组分 Fr. 5A~5C。将其组分 Fr. 5B 进行中压柱色谱, 得到 50 个小组分 Fr. 5B-1~5B-50, Fr. 5B-19 组分通过半制备型 HPLC 制备 (乙腈-水 58:42, 体积流量 2 mL/min) 得到化合物 **8** (15 mg)、**9** (11.8 mg)。

3 结果与分析

3.1 培养基筛选与共培养

通过不同培养基对真菌 YX-25、放线菌 YX-32 小量培养以及对其共培养筛选, 发现在 PDB 和 ISP4 培养基条件下单独培养, 2 株菌株的次级代谢产物都不丰富, 见图 2~4。但是共培养对菌株的次级代谢产物影响较大, 促进微生物的次级代谢产物途径的表达, 菌株次级代谢产物较丰富, 见图 5。

3.2 菌株鉴定

将真菌测得 ITS rDNA 序列以及放线菌 16 S rDNA 与 GenBank 数据库中已有的序列进行 BLAST 比对。结果证明菌株 YX-25 与 *Alternaria* sp. 的同源

性最高为 99%。结合已观察到的菌落特征，鉴定为 *Alternaria alternata*。菌株 YX-32 与 *Streptomyces* sp. 的同源性最高为 100%。结合已观察到的菌落特征，鉴定为 *Streptomyces exfoliatus*，见图 6、7。

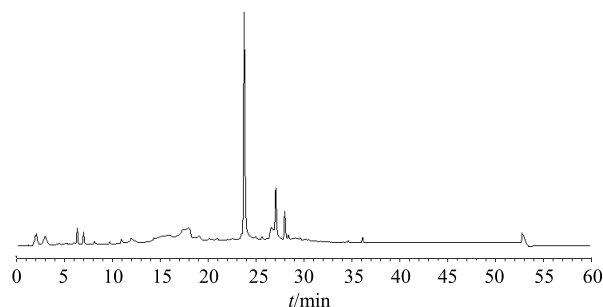


图 2 菌株 YX-25 在 PDB 培养基上发酵液提取物液相色谱图
Fig. 2 HPLC of extracts from strain YX-25 cultured on PDB medium

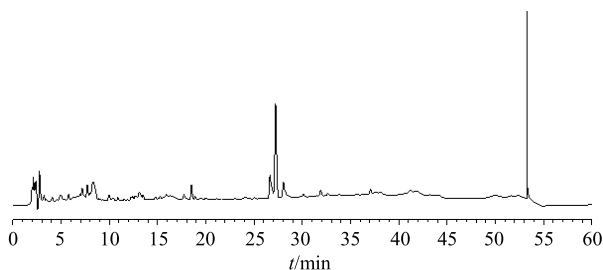


图 3 菌株 YX-32 在 PDB 培养基上发酵液提取物液相色谱图
Fig. 3 HPLC of extracts from strain YX-32 cultured on PDB medium

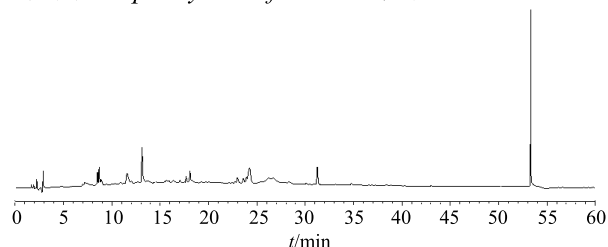


图 4 菌株 YX-32 ISP4 培养基发酵液提取物液相色谱图
Fig. 4 HPLC of extracts from strain YX-32 cultured on ISP4 medium

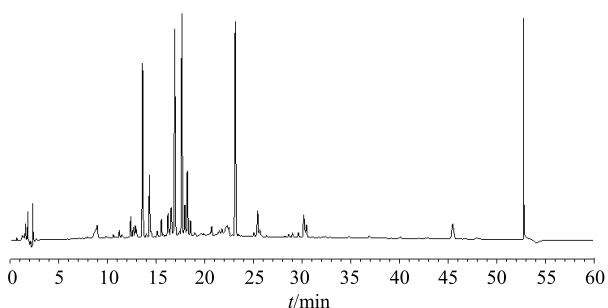
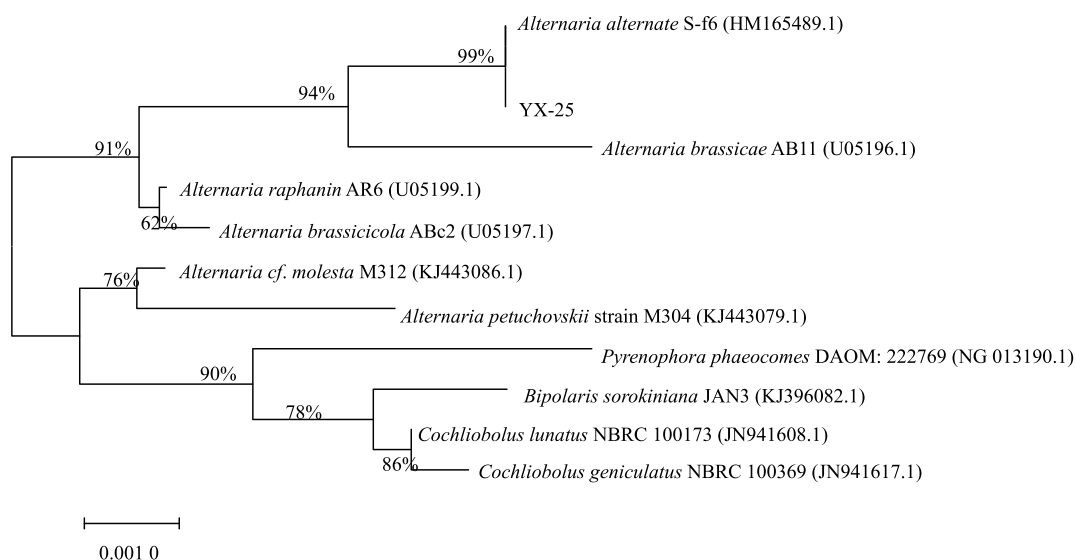


图 5 菌株 PDB 培养基共培养发酵液提取物液相色谱图
Fig. 5 HPLC of extracts from co-culture strains (YX-25 and YX-32) cultured on PDB medium



进化树数字代表置信度，下同

The number in evolutionary tree represents confidence, same as below

图 6 基于菌株 YX-25 ITS 基因片段序列构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on sequence construction of strain YX-25 ITS gene fragment

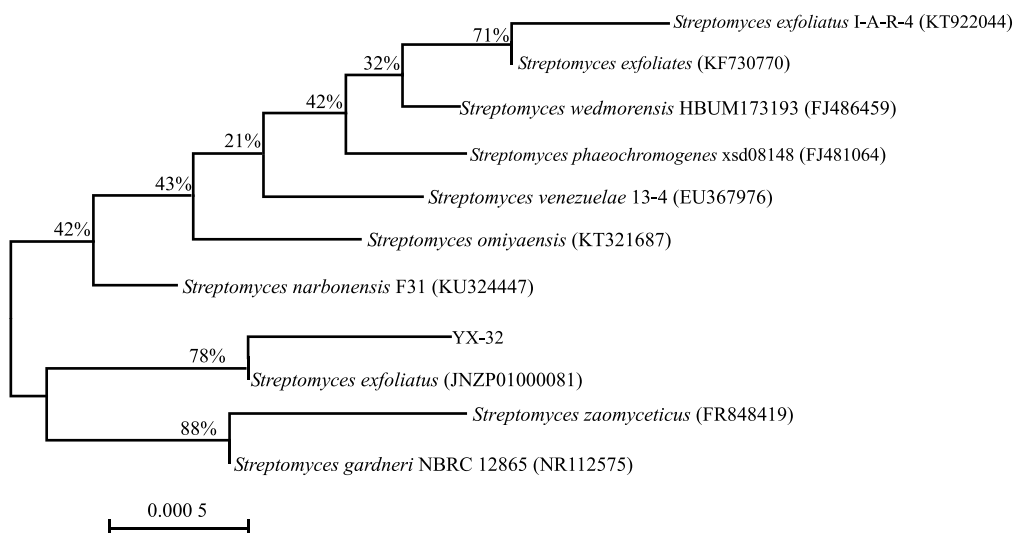


图 7 基于菌株 YX-32 16 S rRNA 基因片段序列构建的系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of strain YX-32 based on 16 S rRNA gene sequence

3.3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色粉末。ESI-MS m/z : 325.3 $[M-H]^-$, 结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{13}H_{14}N_2O_4S_2$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.00 (1H, m, H-9), 5.95 (1H, m, H-8), 5.79 (1H, dd, $J = 9.9, 1.5$ Hz, H-7), 4.84 (1H, m, H-6), 4.41 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-5a), 4.27 (1H, dd, $J = 12.9, 7.7$ Hz, H-3a), 3.74 (1H, d, $J = 17.9$ Hz, H-10), 3.42 (1H, dd, $J = 12.4, 5.6$ Hz, H-3a), 3.19 (3H, s, H-11), 2.96 (1H, d, $J = 17.9$ Hz, H-10); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.1 (C-1), 165.5 (C-4), 130.8 (C-9a), 130.2 (C-7), 123.4 (C-8), 120.4 (C-9), 77.4 (C-3), 75.7 (C-6), 73.3 (C-10a), 69.9 (C-5a), 60.9 (C-3a), 36.7 (C-10), 27.6 (C-11)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为 gliotoxin。

化合物 **2**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 410.2 $[M-H]^-$, 结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{22}H_{25}N_3O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.80 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-16), 7.69 (1H, s, NH), 6.84 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-19), 6.80 (1H, dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, H-17), 5.87 (1H, dd, $J = 9.5, 1.3$ Hz, H-3), 5.74 (1H, dd, $J = 2.7, 1.3$ Hz, H-13), 4.80 (1H, dt, $J = 9.6, 1.5$ Hz, H-21), 4.67 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, 13-OH), 4.43 (1H, dd, $J = 9.8, 6.7$ Hz, H-6), 4.15 (1H, s, 12-OH), 3.83 (3H, s, 18- OCH_3), 3.64 (2H, m, H-9), 2.47 (1H, m, H-7), 2.12 (1H, m, H-7'), 2.11 (1H, m, H-8), 2.07 (1H, H-8'), 2.00 (2H, d, $J = 1.3$ Hz, H-23), 1.67 (3H, d, $J =$

1.4 Hz, H-24); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 171.1 (C-11), 166.2 (C-5), 156.8 (C-18), 137.6 (C-20), 134.7 (C-22), 130.2 (C-2), 124.1 (C-21), 121.3 (C-16), 120.8 (C-15), 110.0 (C-17), 105.5 (C-14), 95.1 (C-19), 83.1 (C-12), 68.7 (C-13), 58.8 (C-3), 55.8 (C-25), 50.3 (C-6), 45.4 (C-9), 29.3 (C-7), 25.8 (C-23), 22.6 (C-8), 18.4 (C-24)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为 12,13-dihydroxy-fumitremorgin C。

化合物 **3**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 378.3 $[M-H]^-$, 结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{22}H_{25}N_3O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.73 (1H, brs, NH), 7.44 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-16), 6.86 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-19), 6.81 (1H, dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, H-17), 5.98 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 4.90 (1H, dt, $J = 9.9, 1.5$ Hz, H-21), 4.18 (1H, ddd, $J = 11.6, 5.0, 1.3$ Hz, H-12), 4.11 (1H, ddd, $J = 8.8, 7.1, 1.3$ Hz, H-6), 3.84 (3H, s, CH_3O -18), 3.64 (2H, m, H-9), 3.51 (1H, dd, $J = 15.9, 5.0$ Hz, H-13), 3.11 (1H, ddd, $J = 16.0, 11.6, 1.2$ Hz, H-13), 2.41 (1H, m, H-7), 2.23 (1H, m, H-7'), 2.07 (1H, m, H-8), 2.01 (1H, H-8'), 1.99 (2H, d, $J = 1.3$ Hz, H-24), 1.65 (3H, d, $J = 1.4$ Hz, H-23); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.7 (C-5), 165.8 (C-11), 156.7 (C-18), 137.1 (C-20), 134.1 (C-22), 132.2 (C-2), 124.3 (C-21), 121.3 (C-16), 120.8 (C-15), 119.0 (C-16), 109.7 (C-17), 106.5 (C-14), 95.4 (C-19), 59.3 (C-6), 56.9 (C-12), 55.9 (C-25), 45.5 (C-9), 28.7 (C-7), 25.8 (C-23), 23.2 (C-8), 18.2 (C-24)。以上波谱

数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为 fumitremorgin C。

化合物 **4**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 355.4 $[M-H]^-$, 结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{15}H_{20}N_2O_4S_2$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.93 (1H, dq, $J = 5.2, 2.4$ Hz, H-9), 5.88 (1H, m, H-7), 5.73 (1H, dt, $J = 9.2, 1.2$ Hz, H-8), 4.91 (1H, m, H-6), 4.88 (1H, m, H-5a), 4.37 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-15), 3.88 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-15), 3.14 (3H, s, 13-NCH₃), 3.06 (1H, m, H-10), 2.96 (1H, m, H-10), 2.27 (3H, s, 14S-CH₃), 2.24 (3H, s, 12S-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.9 (C-4), 166.0 (C-1), 131.7 (C-9a), 130.2 (C-8), 123.2 (C-7), 120.2 (C-9), 74.5 (C-6), 72.1 (C-3), 71.7 (C-11), 69.7 (C-5a), 63.7 (C-15), 39.1 (C-10), 28.8 (C-13), 15.3 (C-12), 13.8 (C-14)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为 bisdethiobis (methylthio) gliotoxin。

化合物 **5**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 349.2 $[M-H]^-$, 结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{21}H_{23}N_3O_2$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.87 (1H, brs, NH), 7.58 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-16), 7.34 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-19), 7.2 (1H, ddd, $J = 8.1, 7.1, 1.3$ Hz, H-18), 7.15 (1H, td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, H-17), 6.03 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 4.90 (1H, dt, $J = 9.5, 1.4$ Hz, H-21), 4.20 (1H, dd, $J = 11.5, 5.0$ Hz, H-12), 4.12 (1H, m, H-6), 3.65 (2H, m, H-9), 3.57 (1H, dd, $J = 15.8, 4.9$ Hz, H-13), 3.13 (1H, ddd, $J = 15.8, 11.5, 1.0$ Hz, H-13), 2.41 (1H, m, H-7), 2.24 (1H, m, H-7), 2.06 (1H, m, H-8), 2.01 (3H, s, H-24), 1.94 (1H, m, H-8'), 1.65 (3H, d, $J = 1.4$ Hz, H-23); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.7 (C-5), 165.9 (C-11), 136.3 (C-20), 134.4 (C-22), 133.6 (C-2), 126.4 (C-15), 124.1 (C-21), 122.3 (C-18), 120.2 (C-17), 118.5 (C-16), 111.3 (C-19), 106.4 (C-14), 59.4 (C-6), 57.0 (C-12), 51.2 (C-23), 45.4 (C-9), 28.7 (C-7), 25.9 (C-23), 23.2 (C-8), 22.0 (C-13), 18.3 (C-24)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **5** 为 demethoxyfumitremorgin C。

化合物 **6**: 淡黄色粉末。ESI-MS m/z : 327.3 $[M-H]^-$, 结合 1H - 及 ^{13}C -NMR 推测分子式为 $C_{18}H_{16}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.01 (1H, s, H-9), 6.98 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-7), 6.86 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-5), 6.78 (1H, dq, $J = 13.9, 6.9$ Hz, H-15), 6.31 (1H,

s, H-3), 6.26 (1H, m, H-12), 6.19 (1H, s, H-14), 3.89 (3H, s, CH₃O-6), 3.82 (3H, s, CH₃O-4), 1.94 (3H, dd, $J = 6.9, 1.4$ Hz, H-16); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 179.6 (C-11), 172.3 (C-1), 164.8 (C-6), 164.7 (C-13), 157.9 (C-4), 156.5 (C-9), 138.2 (C-15), 130.8 (C-7a), 130.5 (C-3a), 128.9 (C-14), 123.9 (C-10), 114.9 (C-12), 106.0 (C-5), 100.1 (C-7), 76.1 (C-3), 56.5 (6-OCH₃), 56.4 (4-OCH₃), 18.6 (C-16)。以上波谱数据与文献数据对比基本一致^[11], 确定化合物 **6** 为 vermistatin。

化合物 **7**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 282.4 $[M-H]^-$, 结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{16}H_{17}N_3O_2$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.23 (1H, brs, NH), 7.59 (1H, dt, $J = 8.0, 0.8$ Hz, H-4'), 7.40 (1H, m, H-7'), 7.24 (1H, m, H-2'), 7.15 (1H, ddd, $J = 7.9, 7.0, 0.8$ Hz, H-6'), 7.11 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-5'), 5.73 (1H, s, NH), 4.38 (1H, ddd, $J = 10.8, 4.1, 1.5$ Hz, H-9), 4.08 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-6), 3.76 (1H, m, H-10b), 3.66 (1H, dt, $J = 12.0, 8.0$ Hz, H-3), 3.60 (1H, dt, $J = 12.0, 8.0$ Hz, H-3), 2.97 (1H, dd, $J = 15.1, 10.8$ Hz, H-10a), 2.33 (1H, dt, $J = 10.4, 6.9$ Hz, H-5), 2.03 (1H, dt, $J = 10.4, 6.9$ Hz, H-5), 2.02 (1H, m, H-4), 1.91 (1H, m, H-4); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.5 (C-1), 165.6 (C-7), 136.8 (C-9'), 126.8 (C-8'), 123.4 (C-2), 122.9 (C-6'), 120.1 (C-5'), 118.6 (C-4'), 111.7 (C-7'), 110.0 (C-3'), 59.3 (C-6), 54.7 (C-9), 45.5 (C-3), 28.4 (C-5), 27.0 (C-10), 22.7 (C-4)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **7** 为 cyclo-(L-Trp-L-Pro)。

化合物 **8**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 392.1 $[M-H]^-$, 结合 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{22}H_{23}N_3O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.98 (1H, brs, NH), 6.94 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-4), 6.50 (1H, dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, H-5), 6.43 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7), 5.75 (1H, s, H-8), 5.37 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-18), 5.18 (1H, dt, $J = 8.9, 1.5$ Hz, H-19), 4.33 (1H, dd, $J = 10.5, 6.1$ Hz, H-12), 3.82 (1H, m, H-15), 3.79 (3H, s, 6-OCH₃), 3.56 (1H, m, H-15'), 2.47 (1H, m, H-13), 2.11 (1H, m, H-14), 2.00 (1H, m, H-13), 1.98 (1H, m, H-14), 1.59 (3H, s, H-21), 1.29 (3H, s, H-22); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 178.8 (C-2), 162.7 (C-11), 160.8 (C-6), 155.3 (C-17), 141.8 (C-7a), 138.4 (C-20), 137.9 (C-9), 128.6 (C-4),

120.6 (C-19), 119.1 (C-3a), 117.0 (C-7a), 107.2 (C-5), 97.2 (C-7), 64.2 (C-18), 61.7 (C-12), 61.5 (C-3), 55.6 (CH₃O-6), 44.9 (C-15), 29.3 (C-13), 25.5 (C-21), 22.2 (C-14), 18.4 (C-22)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **8** 为 6-methoxyspirotryprostatin B。

化合物 **9**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 245.0 [M-H]⁻, 结合 ¹H- 和 ¹³C-NMR 数据推测分子式为 C₁₄H₁₄O₄。 ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 12.56 (1H, brs, OH-8), 6.70 (1H, s, H-5), 6.62 (1H, s, H-7), 4.93 (1H, d, J = 6.7 Hz, H-9), 3.49 (3H, s, CH₃O-9), 3.16 (1H, dt, J = 16.5, 7.9 Hz, H-11a), 2.77 (1H, m, J = 17.9, 9.4 Hz, H-11b), 2.39 (3H, s, 12-CH₃), 2.30 (1H, ddd, J = 14.1, 9.2, 7.1 Hz, H-10b), 2.15 (1H, m, H-10a); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 181.2 (C-1), 173.9 (C-3), 161.1 (C-8), 157.4 (C-4a), 146.8 (C-6), 120.0 (C-4), 112.7 (C-7), 109.1 (C-8a), 107.7 (C-5), 79.5 (C-9), 57.8 (CH₃O-9), 30.2 (C-11a), 27.7 (C-10a), 22.4 (C-12)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **9** 为 citrinolactone D。

4 讨论

本实验对红树林来源的一株真菌以及放线菌进行共培养, 并对其次级代谢产物进行研究, 利用各种色谱及波谱技术从菌株浸膏分离得到 9 个化合物, 分别属于吡啶二酮哌嗪类、聚酮类、环肽类等成分。其中吡啶二酮哌嗪类具有多种生物活性如抗菌^[15]、抗氧化^[16]、抗癌等^[17], 在真菌中大量存在, 尤其在曲霉和青霉^[18]。聚酮类化合物因具有较好的生物活性, 在目前上市的医药或农用抗生素的比例中居 6 大类天然产物首位, 具有重要的商业价值^[19]。另外本研究发现的环肽类化合物具有抗污损^[12]及调节钾离子通道作用^[20]。随着对海洋微生物的挖掘, 越来越多的科研工作者发现传统纯培养得到新化合物的概率越来越小, 因此共培养技术得到更多的关注。所以共培养在海洋微生物的相关研究尤其是海洋天然产物领域将会有广阔的发展和应用前景。通过本研究发现共培养使菌株次级代谢产物变丰富, 产生具有较好活性的化合物。分离到的化合物多样性为以后研究放线菌、真菌共培养提供资料。但仍然有很多问题需要进一步研究, 如共培养菌株产生的次级代谢产物是其中哪种微生物产生的? 共培养的生物合成激活机制是什么? 均有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 魏美燕, 邵长伦, 谭 倪, 等. 南海海洋真菌 *Penicillium* sp. (386) 次级代谢产物再研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2010, 49(4): 77-80.
- [2] 李越中, 陈 琦. 海洋微生物资源及其产生生物活性代谢产物的研究 [J]. 生物工程进展, 2000, 20(5): 28-31.
- [3] Shu Y Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(8): 1053-1071.
- [4] Pettit R K. Mixed fermentation for natural product drug discovery [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2009, 83(1): 19-25.
- [5] Yu L Y, Hu Z F, Ma Z J. Production of bioactive tryptamine derivatives by co-culture of marine *Streptomyces* with *Bacillus mycoides* [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(22): 2087-2091.
- [6] Wang Y, Wang L P, Zhuang Y B, et al. Phenolic polyketides from the co-cultivation of marine-derived *Penicillium* sp. WC-29-5 and *Streptomyces fradiae* 007 [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(4): 2079-2088.
- [7] Nguyen V T, Lee J S, Qian Z J, et al. Gliotoxin isolated from marine fungus *Aspergillus* sp. induces apoptosis of human cervical cancer and chondrosarcoma cells [J]. *Mar Drugs*, 2013, 12(1): 69-87.
- [8] Abraham W R, Arfmann H A. 12, 13-Dihydroxy-fumitremorgin C from *Aspergillus fumigatus* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(3): 1025-1026.
- [9] Cui C B, Kakeya H, Osada H. Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B, and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. Part 2. Physico-chemical properties and structures [J]. *Cheminformation*, 2010, 27(47): 534-540.
- [10] Afifyatulloev S S, Kalinovskii A I, Pivkin M V, et al. Alkaloids from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2005, 41(2): 236-238.
- [11] Füska J, Uhrin D, Proksa B, et al. The structure of vermistatin, a new metabolite from *Penicillium vermiculatum* [J]. *J Antibiot*, 1986, 39(11): 1605-1608.
- [12] Li X, Dobretsov S, Xu Y, et al. Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus* [J]. *Biofouling*, 2006, 22(3): 201-208.
- [13] Zhang M, Wang W L, Fang Y C, et al. Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* [J]. *J Nat*

- Prod*, 2008, 71(6): 985-989.
- [14] Wang M L, Lu C H, Xu Q Y, *et al.* Four new citrinin derivatives from a marine-derived *Penicillium* sp. fungal strain [J]. *Molecules*, 2013, 18(5): 5723-5734.
- [15] Zheng C J, Park S H, Koshino H, *et al.* Verticillin G, a new antibacterial compound from *Bionectra byssicola* [J]. *J Antibiot*, 2007, 60(1): 61-64.
- [16] Kuramochi K, Ohnishi K, Fujieda S, *et al.* Synthesis and biological activities of neoechinulin A derivatives: New aspects of structure-activity relationships for neoechinulin A [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(12): 1738-1743.
- [17] Wang F, Fang Y, Zhu T, *et al.* Seven new prenylated indole diketopiperazine alkaloids from holothurian-derived fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(34): 7986-7991.
- [18] Li G Y, Yang T, Luo Y G, *et al.* Brevianamide J, a new indole alkaloid dimer from fungus *Aspergillus versicolor* [J]. *Org Lett*, 2009, 11(16): 3714-3717.
- [19] 刘少斌, 王延亮, 张庆林, 等. 埃博霉素异源表达研究进展 [J]. *军事医学*, 2009, 33(1): 84-87.
- [20] Jamie H, Kilian G, Dyason K, *et al.* The effect of the isomers of cyclo-(Trp-Pro) on heart and ion-channel activity [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2002, 54(12): 1659-1665.