

OSMAC策略在费希新萨托菌次级代谢产物研究中的应用

邹诺婷, 叶依婷, 王楠, 刘彩琴, 王石磊*

浙江树人大学, 生物与环境工程学院, 浙江 杭州
Email: *wangshilei1105@163.com

收稿日期: 2021年2月8日; 录用日期: 2021年2月28日; 发布日期: 2021年3月9日

摘要

本研究选取根据基因预测结果存在大量生物合成基因簇但目前次级代谢产物研究的仍较少的费希新萨托菌(*Neosartorya fischeri* NRRL 181)作为研究对象, 先利用OSMAC策略研究了不同培养基下费希新萨托菌的次级代谢产物情况, 再选择了大米作为培养基对该菌进行了大规模发酵。发酵结束后对95%乙醇提取所得的浸膏利用传统的柱层析手段进行了系统的次级代谢产物分离工作, 共分离并鉴定了8个化合物。

关键词

OSMAC, 次级代谢产物, 分离, 费希新萨托菌

Study on the Secondary Metabolites of *Neosartorya fischeri* via the OSMAC Method

Nuoting Zhou, Yiting Ye, Nan Wang, Caiqin Liu, Shilei Wang*

College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou Zhejiang
Email: *wangshilei1105@163.com

Received: Feb. 8th, 2021; accepted: Feb. 28th, 2021; published: Mar. 9th, 2021

Abstract

It seems that *Neosartorya fischeri* NRRL 181 has a large number of biosynthetic gene clusters

*通讯作者。

文章引用: 邹诺婷, 叶依婷, 王楠, 刘彩琴, 王石磊. OSMAC策略在费希新萨托菌次级代谢产物研究中的应用[J]. 微生物前沿, 2021, 10(1): 14-20. DOI: 10.12677/amb.2021.101003

based on the predicting results of gene. But its secondary metabolites are still less studied at present. In this study, the OSMAC strategy was used to study the secondary metabolites of *N. fischeri* in different media. Then the rice was selected as the medium for large-scale fermentation. After fermentation, the extract obtained from 95% ethanol was used to separate the secondary metabolites using traditional column chromatography. A total of 8 compounds were separated and identified.

Keywords

OSMAC, Secondary Metabolites, Separation, *Neosartorya fischeri*

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来,对微生物基因组序列的分析结果显示,对于任意给定真菌,目前已经得到的次级代谢物不管在数量还是种类上都远不及它基因序列所显示的可能编码次级代谢物的生物合成基因簇数(BGCs) [1] [2]。这也就意味着目前绝大部分已知微生物仍具有巨大的研究潜力,只要实验设计得当,仍能获得大量结构新颖的活性化合物。造成这种现象的最主要原因是许多生物合成基因簇在实验室条件下不表达,通常被认为是沉默或隐蔽的。诱导这些沉默基因的表达可以解锁它们所控制的化学多样性,从而发现在医学和生物技术上具有巨大潜力的活性新分子。为了刺激这些沉默生物合成基因簇的表达,目前已有较多的方法,包括了遗传手段及培养手段的综合运用[3]。

OSMAC (one strain many compounds)策略是其中较为巧妙,也是应用最为广泛且成熟的方法。OSMAC 方法不是针对特定的沉默基因簇的激活,而是针对易于获取的培养参数的系统改变,包括了对培养基成分(碳源、氮源及盐), pH 值, 培养通气和培养温度的改变[4] [5] [6] [7] [8]。这使得 OSMAC 方法成为用于调节微生物代谢一种可用、通用、廉价且相对简单的研究方法。通过更改培养基或加入一些物质,尽可能的打破或在一定程度上打破基因沉默现象,利用多种培养条件获得尽可能多类型的次级代谢产物。

费希新萨托菌 *Neosartorya fischeri* NRRL 181 是一种生长迅速的曲霉属真菌,已完成全基因测序,目前只发现了有限类型的化合物[9]-[15]。antiSMASH 的生物信息学预测却显示 *N. fischeri* 的基因组含有 39 个生物合成基因簇,其中 25 个与以前报道的任何天然产物无关,非常值得进行深入研究。本课题尝试了利用不同的培养基对费希新萨托菌进行培养,根据液相结果和薄层显色的结果选择了大米作为培养基进行大规模发酵,再对发酵浸膏进行了次级代谢产物研究,从代谢产物中共分离得到 8 个次级代谢产物。

2. 实验材料与研究方法

2.1. 实验仪器与实验材料

2.1.1. 实验仪器

高效液相色谱(安捷伦 1100)、恒温摇床(上海福玛 QYC-2112)、生化培养箱(上海博讯)、旋转蒸发仪(上海亚荣)、高压灭菌锅(日本 Hirayama)、双人单面净化工作台(苏州 SW-CJ-2FD)、超声波清洗器(昆山市

KQ3200E)、电热恒温鼓风干燥箱(上海森信 DGG-9140A)。

2.1.2. 实验材料

N. fischeri NRRL 181 (购自德国菌种保藏中心 DSMZ)、乙酸乙酯(江苏强盛, 分析纯)、色谱甲醇(美国 TEDIA)、葡萄糖(AR)、硝酸钠(AR)、磷酸氢二钾(AR)、氯化钾(AR)、七水合硫酸镁(AR)、硫酸亚铁(AR)、石油醚(分析纯)、无水甲醇(分析纯)、氯仿(分析纯)、丙酮(分析纯)、MCI (上海 BOS-M0001)、YMC ODS C-18 反相填料(日本 YMC)等。

2.2. 实验方法

2.2.1. OSMAC 策略筛选较优的培养基

主要采用了在液体培养基(以察氏培养基作为起始培养基)中分别加入金属元素(Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Na^{+} 、 Mg^{2+} 等)、抗菌药物(酮康唑、氟康唑)、其它微生物(面包酵母), 或采用低氮(氮源比例降至原来的 1/10)及低碳(碳源比例降至原来的 1/10)策略、用富含营养成分的天然培养基(大米、豆粕、小麦麸、土豆培养基等)进行培养等方法对费希新萨托菌进行培养。

2.2.2. 大规模发酵

根据 2.2.1 的实验结果, 选取了大米作为培养基进行了大规模发酵。发酵温度 $28^{\circ}C$, 发酵时间 30 d, 发酵结束后用 95%乙醇浸泡, 每次浸泡 5 天, 浸泡 3 次, 过滤并合并滤液。

2.2.3. 次级代谢产物分离、纯化与结构鉴定

对 2.2.2 的中得到的滤液浓缩获得浸膏, 再用乙酸乙酯萃取, 分层后将乙酸乙酯层浓缩, 后面反复利用普通硅胶、MCI、YMC ODS C-18 反相填料、HW-40C 凝胶等进行柱层析分离, 利用制备型 HPLC 等仪器, 结合重结晶等手段对化合物进行纯化, 得到目标单体化合物。然后, 综合运用现代波谱学方法(NMR、MS、IR、UV 等)确定化合物的结构。

3. 研究结果和讨论

3.1. OSMAC 策略筛选较优的培养基

3.1.1. 加入重金属对 *N. fischeri* 代谢产物的影响

实验结果表明, 在培养基中加入较大量的 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Na^{+} 等金属离子后, 菌株无法很好的在这些环境中生长, 因此代谢产物也无法产生, 而在 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 下生长状况良好。对比液相图(如图 1, 箭头指示的为色谱图中新出现的色谱峰或者化合物量明显增大的色谱峰, 1#培养基代表相同实验条件下在原察氏培养基中培养 *N. fischeri* 的代谢产物, 下同)可知加入 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 后对 *N. fischeri* 代谢产物均有大幅度提高, 甚至产生了一些原本不产生的化合物, 对比普通察氏培养基, 20 分钟以后几乎为一条直线, 因此, 这些新的突出峰均为 *N. fischeri* 产生得到的新的代谢产物, 特别是在加入 Mg^{2+} 后产生了三个新的峰位。研究可以证明, 加入不同金属离子, Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 可能会增加 *N. fischeri* 代谢产物量, 而其他金属离子大多对 *N. fischeri* 产生抑制甚至致命的作用。

3.1.2. 加入抗菌药物对 *N. fischeri* 代谢产物的影响

实验结果表明酮康唑浓度对菌株生长的抑制作用成正比。观察液相图(如图 2), 加入氟康唑和酮康唑后, 在 20 分钟的时候的代谢产物均有增加, 而其中加入氟康唑后没有其他代谢产物产生, 加入酮康唑后在 28 分钟处产生了一个新的峰位, 对比普通察氏培养基 28 分钟处为一条直线, 可以得出该化合物为 *N. fischeri* 新的代谢产物, 而且产生量特别大。

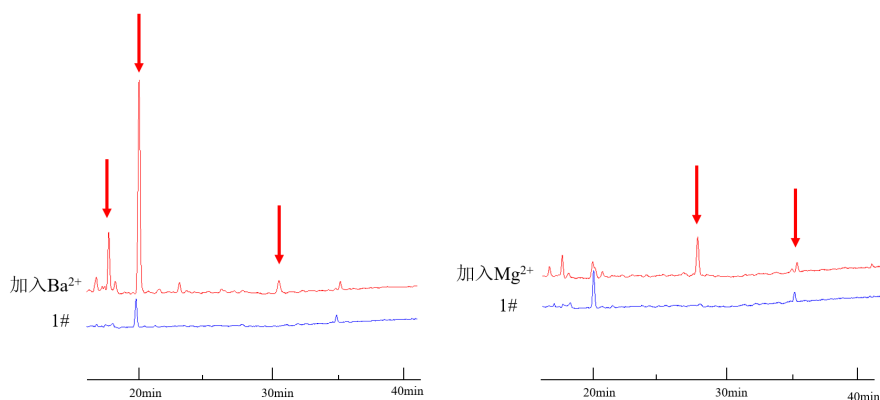


Figure 1. The changes of *N. fischeri* metabolites after adding metal ions
图 1. 加入金属离子对 *N. fischeri* 代谢产物的变化

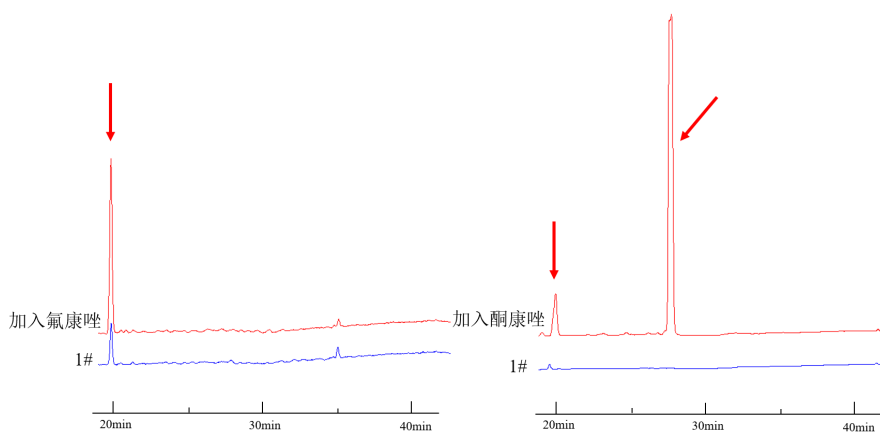


Figure 2. The changes of *N. fischeri* metabolites after adding ketoconazole or fluconazole
图 2. 加入酮康唑和氟康唑对 *N. fischeri* 代谢产物的变化

3.1.3. 降低氮源比例对 *N. fischeri* 代谢产物的影响

氮源比例降低后的 *N. fischeri* 代谢产物明显比在正常的察氏培养基中培养得到的代谢产物要丰富的多，产生了很多原本不产生的化合物(图 3)。

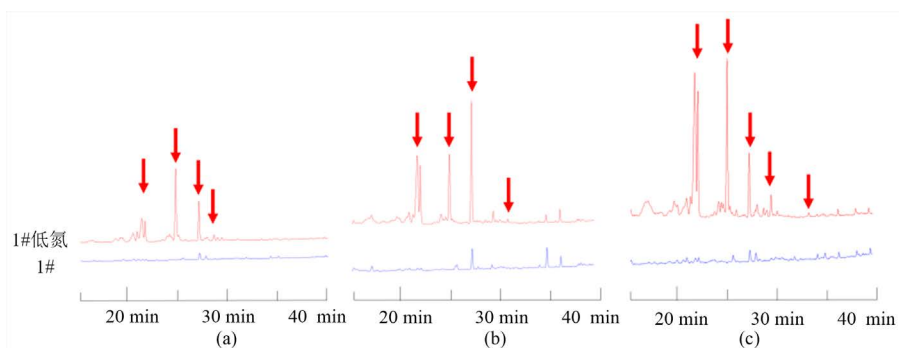


Figure 3. The differences of *N. fischeri*'s metabolites in low nitrogen source czapek's medium and normal czapek's medium. (a, b and c indicate the difference of the chromatograms detected at 225 nm, 254 nm, and 280 nm wavelengths respectively)

图 3. *N. fischeri* 在低氮察氏培养基和正常察氏培养基中代谢产物的差异。(a、b、c 分别表示采用 225 nm、254 nm、280 nm 波长进行检测的色谱图差异)

3.1.4. 降低碳源比例对 *N. fischeri* 代谢产物的影响

碳源比例降低后的 *N. fischeri* 代谢产物种类与正常的察氏培养基中培养得到的代谢产物相近,但是其中某些化合物的代谢产物量得到了大幅度提高(图 4)。

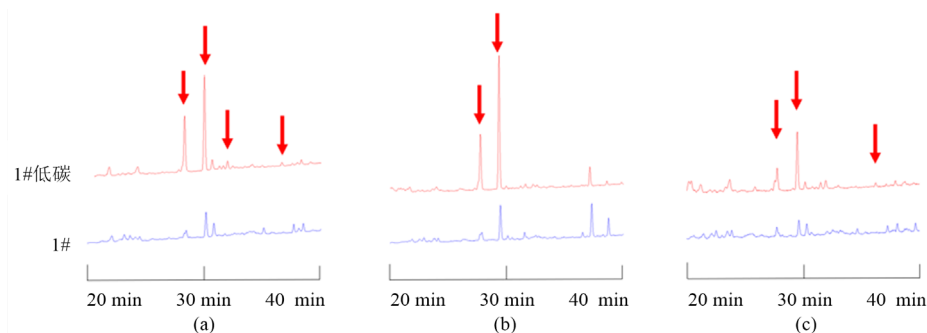


Figure 4. The differences of *N. fischeri*'s metabolites in low carbon source czapek's medium and normal czapek's medium. (a, b and c indicate the difference of the chromatograms detected at 225 nm, 254 nm, and 280 nm wavelengths respectively)

图 4. *N. fischeri* 在低碳察氏培养基和正常察氏培养基中代谢产物的差异。(a、b、c 分别表示采用 225 nm、254 nm、280 nm 波长进行检测的色谱图差异)

3.1.5. 加入其它微生物对 *N. fischeri* 代谢产物的影响

发现加入面包酵母后, *N. fischeri* 代谢产物中某些化合物的量得到了大幅度提高,甚至产生了一些原本不产生的化合物(结果见图 5,如 43.0 min 的色谱峰)。从基因簇来分析可知面包酵母几乎没什么次级代谢产物,在相同条件下培养相同时间的面包酵母的代谢产物几乎为一条直线,这些都表明增加的化合物应该属于 *N. fischeri* 的代谢产物。

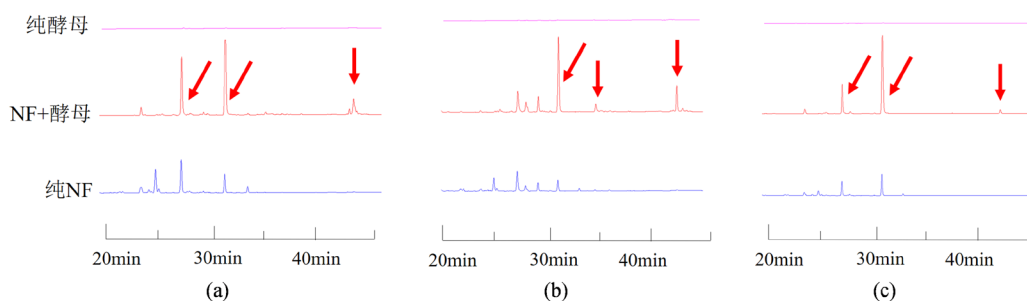


Figure 5. Effects on the secondary metabolites of *N. fischeri* after co-culture with yeast. (a, b and c indicate the difference of the chromatograms detected at 225 nm, 254 nm, and 280 nm wavelengths respectively)

图 5. 与酵母共培养对 *N. fischeri* 次级代谢产物的影响(a、b、c 分别表示采用 225 nm、254 nm、280 nm 波长进行检测的色谱图差异)

3.1.6. *N. fischeri* 在天然培养基中的培养结果

实验结果表明大米培养基培养下 *N. fischeri* 代谢产物均较前文中涉及的液体培养的代谢产物更为丰富,且代谢产物量更大,为此选取了大米培养基这种天然培养基作为大规模发酵的培养基进行后续实验。

3.2. 大米培养基下获得的 *N. fischeri* 次级代谢产物

对在大米培养基中进行培养的 *N. fischeri* 代谢产物进行分离纯化后得到 8 个化合物,再通过核磁手段鉴定了它们的结构(如图 6),分别为 aszonalenin (1) [16]、acetylaszonalenin (2) [16]、麦角甾醇(3) [17]、(14 α ,

22E)-14-hydroxyergosta-7, 22-diene-3, 6-dione (4) [18]、 β -胡萝卜素(5) [19]、过氧麦角甾醇(6) [20]、(22E, 24R)-24-methyl-6 β -methoxy-5 α -cholesta-7,22-diene-3 β , 5-diol (7) [21]、cyathisterol (8) [22]。

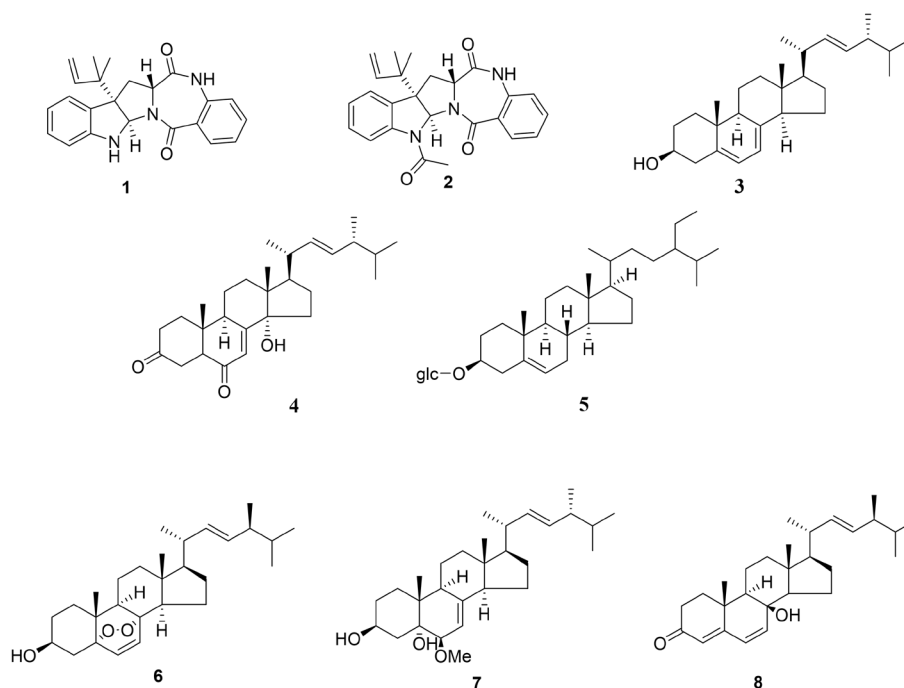


Figure 6. Secondary metabolites of *N. fischeri* grow on rice
图 6. 大米培养基培养下的 *N. fischeri* 代谢产物

4. 结论

1) 通过 OSMAC 策略对费希新萨托菌的次级代谢产物进行研究, 我们发现:

- ① 加入不同重金属元素对费希新萨托菌的次级代谢产物有不同的影响, 尤其是 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 会增加 *N. fischeri* 次级代谢产物的量, 而其他金属离子在达到一定浓度后大多对 *N. fischeri* 产生抑制甚至致死作用。
- ② 加入酮康唑和氟康唑均会对 *N. fischeri* 代谢产物量产生一定的影响, 其中酮康唑的影响较为明显。
- ③ 降低氮源和碳源比例均会丰富 *N. fischeri* 代谢产物量。
- ④ 加入其它微生物后会刺激 *N. fischeri* 产生一些原来培养基中不产的化合物。
- ⑤ 富含营养的天然培养基培养下 *N. fischeri* 代谢产物较为丰富。

2) 对大米作为培养基培养 *N. fischeri* 结果的浸膏中的次级代谢产物进行研究, 共分离并鉴定了其中 8 个化合物。

基金项目

国家级大学生创新创业训练计划项目(201911842009)、浙江省基础公益研究计划项目(LGF18B020001)、浙江树人大学省属高校基本科研业务费专项资金项目资助(2020XZ012)、浙江树人大学省属高校基本科研业务费专项资金项目资助(2020XZ007)。

参考文献

- [1] 何庆, 李青连, 王丽非, 洪斌. 基于微生物基因组的新型天然产物发现策略[J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(1): 1-6+25.

- [2] 赵琪, 闵涛玲, 胡海峰. 激活微生物沉默基因簇合成新型天然产物的研究[J]. 世界临床药物, 2014, 35(8): 501-505.
- [3] Gomez-Escribano, J.P. and Bibb, M.J. (2014) Heterologous Expression of Natural Product Biosynthetic Gene Clusters in *Streptomyces coelicolor*: From Genome Mining to Manipulation of Biosynthetic Pathways. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **41**, 425-431. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1348-5>
- [4] 谢绵测, 李先国, 张大海. OSMAC 策略及其在烟曲霉菌次级代谢产物研究中的应用[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(9): 1668-1673.
- [5] 卢轩, 陈刚, 裴月湖. 单菌多产物策略及其在药物先导化合物研发中的应用[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(8): 640-645.
- [6] 韦洪娟, 林贞建, 李德海, 顾谦群, 朱天骄. 单菌多次级代谢产物方法及其在微生物代谢产物研究中的应用[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 701-709.
- [7] 刘俊慧. 基于 OSMAC 策略的海洋微生物次级代谢产物研究[D]: [硕士学位论文]. 大连: 大连理工大学, 2015.
- [8] 于桂洪, 李德海, 朱天骄, 顾谦群. 基于 OSMAC 策略的深海来源真菌 *Cladosporium* sp. 2005-01-E3 次级代谢产物研究[C]/中国海洋湖沼学会. “全球变化下的海洋与湖沼生态安全”学术交流会议论文摘要集, 2014: 1.
- [9] Wong, S.M., Musza, L.L., Kydd, G.C., Kullnig, R., Gillum, A.M. and Cooper, R. (1993) Fiscalins: New Substance P Inhibitors Produced by the Fungus *Neosartorya fischeri*. Taxonomy, Fermentation, Structures, and Biological Properties. *Journal of Antibiotics*, **46**, 545-553.
- [10] Morino, T., Nishimoto, M., Itou, N. and Nishikiori, T. (1994) NK372135s, Novel Antifungal Agents Produced by *Neosartorya fischeri*. *Journal of Antibiotics*, **47**, 1546-1548.
- [11] Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Nozawa, K., Okada, K., Takaki, G.M.D., Yaguchi, T., Fukushima, K. and Kawai, K. (2006) Isolation of Isoterrein from *Neosartorya fischeri*. *Mycotoxins*, **56**, 3-5.
- [12] Tan, Q.W., Ouyang, M.A., Shen, S. and Li, W. (2012) Bioactive Metabolites from a Marine-Derived Strain of the Fungus *Neosartorya fischeri*. *Natural Product Research*, **26**, 1402-1407. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.592834>
- [13] Eamvijarn, A., Gomes, N.M., Dethoup, T., Buaruang, J., Manoch, L., Silva, A., Pedro, M., Marini, I., Roussis, V. and Kijjoa, A. (2013) Bioactive Meroditerpenes and Indole Alkaloids from the Soil Fungus *Neosartorya fischeri* (KUFC 6344), and the Marine-Derived Fungi *Neosartorya laciniosa* (KUFC 7896) and *Neosartorya tsunoda* (KUFC 9213). *Tetrahedron*, **69**, 8583-8591. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.07.078>
- [14] Zheng, Z.Z., Shan, W.G., Wang, S.L., Ying, Y.M., Ma, L.F. and Zhan, Z.J. (2014) Three New Prenylated Diketopiperazines from *Neosartorya fischeri*. *Helvetica Chimica Acta*, **97**, 1020-1026. <https://doi.org/10.1002/hlca.201300416>
- [15] Chen, B.Y., Wang, Z., Ying, Y.M., Jiang, L.X., Zhan, Z.J., Wang, J.L. and Zhang, W. (2014) Neofipiperzine D, a New Prenylated Indole Alkaloid Metabolite of the Fungus *Neosartorya fischeri*. *Journal of Chemical Research*, **38**, 539-541. <https://doi.org/10.3184/2F174751914X14097355956467>
- [16] Yin, W.B., Grundmann, A., Cheng, J. and Li, S.M. (2009) Acetylaszonalenin Biosynthesis in *Neosartorya fischeri*. Identification of the Biosynthetic Gene Cluster by Genomic Mining and Functional Proof of the Genes by Biochemical Investigation. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 100-109. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807606200>
- [17] Kang, J., Wang, H.-Q. and Chen, R.-Y. (2003) Studies on the Constituents of the Mycelia Produced from Fermented Culture of *Flammulina velutipes*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **5**, 391-396.
- [18] Huang, H.C., Liaw, C.C., Yang, H.L., Hseu, Y.C., Kuo, H.T., Tsai, Y.C., Chien, S.C., Amagaya, S., Chen, Y.C. and Kuo, Y.H. (2012) Lanostane Triterpenoids and Sterols from *Antrodia camphorate*. *Phytochem*, **84**, 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.08.011>
- [19] 唐京生, 陈谨, 田军, 王幼平, 吴凤镔. 峨眉海桐化学成分的研究[J]. 四川大学学报, 2002, 39(3): 538-541.
- [20] 马伟光, 李兴从, 王德祖. 松橄榄中的麦角甾醇类过氧化物[J]. 云南植物研究, 1994, 16(2): 196-200.
- [21] Ciminiello, P., Fattorusso, E., Magno, S., Mangoni, A. and Pansini, M. (1990) Incisterols, a New Class of Highly Degraded Sterols from the Marine Sponge Dictyonella Incise. *Journal of the American Chemical Society*, **112**, 3505-3509. <https://doi.org/10.1021/ja00165a039>
- [22] Kawahara, N., Sekita, S. and Satake, M. (1994) Steroids from *Calvatia cyathiformis*. *Phytochemistry*, **37**, 213-215. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85028-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85028-3)