

## 研究报告

## 茶叶培养基对海洋冠突散囊菌代谢路径的调控

任鸿宇, 张宁, 韩晓玉, 凌铁军\*

安徽农业大学 茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 安徽 合肥 230036

任鸿宇, 张宁, 韩晓玉, 凌铁军. 茶叶培养基对海洋冠突散囊菌代谢路径的调控[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4181-4194.

REN Hongyu, ZHANG Ning, HAN Xiaoyu, LING Tiejun. Regulation of metabolic pathways of ocean originated *Eurotium cristatum* by tea leaf medium[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4181-4194.

**摘要:**【背景】为更好地适应生境, 真菌会产生种类多样的次级代谢物。【目的】探究来自茯砖茶和海洋 2 种生境下的冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)在 PDA 培养基中的次级代谢物差异、茶叶培养基对海洋冠突散囊菌代谢产物的调控规律及其可能的机制。【方法】利用液相色谱-质谱联用技术并结合基于特征物信息的质谱分子网络方法, 分析了 2 种冠突散囊菌在 PDA 培养基中的次级代谢物差异, 并利用多种多元统计方法分析了海洋冠突散囊菌在茶叶培养基中的非挥发性代谢物变化规律。此外, 我们还研究了直接和非直接碳源对其次级代谢物的影响规律。【结果】2 种生境中的冠突散囊菌在聚酮的合成能力方面相似, 而在非核糖体肽的合成方面有显著区别。其中, 茯砖茶冠突散囊菌能产生异戊烯基环二肽, 而海洋冠突散囊菌则能产生寡肽。5 d 左右的茶叶培养基驯化, 促使海洋冠突散囊菌的次级代谢通路发生了变化。海洋冠突散囊菌在茶叶培养基中的一些次级代谢物与其在非直接碳源培养基中相同。【结论】来自 2 种生境的冠突散囊菌的次级代谢路径有显著差异, 茶叶培养基短时间的驯化促使海洋冠突散囊菌的次级代谢路径发生了一些变化, 部分原因可能是源于其碳代谢抑制的解除。

**关键词:** 生境; 真菌; 冠突散囊菌; 次级代谢物; 碳代谢抑制; 质谱分子网络

资助项目: 安徽农业大学大学生创新创业训练计划(XJDC2021073, S202010364014)

This work was supported by the Innovation and Entrepreneurship Training Program for Undergraduates of Anhui Agricultural University (XJDC2021073, S202010364014).

\*Corresponding author. E-mail: lingtj@ahau.edu.cn

Received: 2024-01-23; Accepted: 2024-03-23; Published online: 2024-04-26

# Regulation of metabolic pathways of ocean originated *Eurotium cristatum* by tea leaf medium

REN Hongyu, ZHANG Ning, HAN Xiaoyu, LING Tiejun\*

State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

**Abstract:** [Background] Fungi produce diverse secondary metabolites to adapt to their habitats. [Objective] To compare the secondary metabolites of *Eurotium cristatum* strains from two habitats (Fuzhuan brick tea and ocean) in PDA and explore the regulatory effect and mechanism of the tea leaf medium on the metabolites of ocean originated *E. cristatum*. [Methods] Liquid chromatography-mass spectrometry combined with feature-based molecular networking was employed to analyze the differences of secondary metabolites of the two strains of *E. cristatum*, and the changes in non-volatile metabolites of the ocean originated strain in the tea leaf medium were analyzed by the multivariate statistical method. In addition, we investigated the effects of indirect and direct carbon sources on the secondary metabolites of the ocean originated strain. [Results] Firstly, the two strains of *E. cristatum* presented similar polyketone synthesis capacity but significant differences in non-ribosomal peptide synthesis. Specifically, the tea-derived strain produced isopentenyl cyclic dipeptide, while the ocean originated strain produced oligopeptides. Secondly, the domestication in the tea leaf medium for 5 days induced changes in the secondary metabolic pathways of the ocean originated strain. Finally, some metabolites of the ocean originated strain in the tea leaf medium were identical to those in the medium with indirect carbon source. [Conclusion] There were significant differences in the secondary metabolic pathways between *E. cristatum* strains from the two habitats. The short-term domestication in the tea leaf medium changes the secondary metabolic pathways of the ocean originated strain, which may be partly due to the lifting of carbon catabolite repression.

**Keywords:** habitat; fungi; *Eurotium cristatum*; secondary metabolite; carbon catabolite repression; feature-based molecular networking

为更好地适应生境，真菌会产生结构种类多样的次级代谢物<sup>[1]</sup>。这些次级代谢物具有物种间交流，保护真菌自身免受紫外线伤害等功能<sup>[2]</sup>。真菌次级代谢物可作为药物或者先导化合物，广泛用于医药和保健<sup>[3]</sup>。此外，许多真菌也被用来制作发酵食品，从而赋予这些食品一定的风味和功效<sup>[4]</sup>。例如，茯砖茶在加工过程中有一步称为“发花”的工序，是冠突散囊菌 (*Eurotium cristatum*) 成为茶叶生境中的优势真

菌、形成金色闭囊壳的过程<sup>[5]</sup>。该菌在此过程产生多种次级代谢产物，并对茶叶成分进行转化修饰<sup>[6]</sup>，在茯砖茶的风味、品质形成中起着重要作用<sup>[7]</sup>。来自茯砖茶的冠突散囊菌能产生异戊烯基环二肽、异戊烯基苯甲醛和萹醌等三大类次级代谢物，它们已被证明具有众多生物和药理活性<sup>[8]</sup>。另外，一项针对海洋冠突散囊菌次级代谢物的研究只报道了来自聚酮生物合成途径的异戊烯基苯甲醛和醌类化合物，却无来

自非核糖体肽合成途径的异戊烯基环二肽类<sup>[9]</sup>。研究发现,真菌次级代谢物的合成路径在特定环境条件下被激活<sup>[10]</sup>,这些环境条件包括光照强度、碳源、氮源、环境 pH 和氧化还原状态等。基于环境的重要作用,本研究预测茶叶培养基的驯化可以促使来自海洋的冠突散囊菌的次级代谢通路发生一定改变。

基于此,本研究首先运用全球天然产物社区分子组网(Global Natural Products Social Molecular Networking, GNPS)环境下的基于特征物信息的分子网络(feature-based molecular networking, FBMN)技术,分析了来自 2 种生境的冠突散囊菌在马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基中的次级代谢物差异<sup>[11]</sup>,之后利用多元统计分析和 FBMN 探究海洋冠突散囊菌在茶叶培养基中短时间段驯化后的非挥发性代谢物变化。此外,有研究表明碳源种类是影响真菌次级代谢的重要因素之一<sup>[12]</sup>。PDA 中的葡萄糖是一种容易被微生物吸收利用的直接碳源(direct carbon source, DCS)<sup>[13]</sup>,而茶叶富含的纤维素和果胶则是不太容易被微生物吸收利用的非直接碳源(indirect carbon source, ICS),所以我们还研究了这 2 种碳源对其次级代谢物的影响规律。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

茯砖茶冠突散囊菌(*E. cristatum*)来自茯砖茶,由本实验室分离、保存(GenBank 登录号为 MT669259.1)<sup>[6]</sup>。海洋冠突散囊菌来自广东省湛江市徐闻珊瑚礁自然保护区(20°13'18"N, 109°55'28"E)浅海下的海百合,由中山大学海洋科学学院李静副教授提供(GenBank 登录号 MH496725.1)<sup>[9]</sup>。冠突散囊菌标准株(*E. cristatum*) (GenBank 登录号为 GU784865.1),对比菌株赭

曲霉(*Aspergillus ochraceus*) (GenBank 登录号为 MT669255.1, MN202670.1)<sup>[6]</sup>。

### 1.2 培养基、主要试剂和仪器

PDA 培养基,杭州微生物试剂有限公司。DCS 和 ICS 培养基的共同配方(g/L):植物蛋白胨 3.00, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.00, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50, KCl 0.50, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 琼脂 15.00; 二者的碳源配方分别为葡萄糖 15.00 g/L 和 CMC-Na 15.00 g/L。

茶叶培养基配方为黑毛茶(直径为 0.63–1.25 mm),由湖南省益阳茶厂有限公司提供。

植物蛋白胨、葡萄糖、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 和 KCl, 上海麦克林生化有限公司; 琼脂, 北京索莱宝科技有限公司; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 和羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na), 成都科龙化工有限公司; 液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass, LC-MS)分析所需的甲醇、乙腈和甲酸(LC-MS 级), 赛默飞世尔科技有限公司; 水(LC-MS 级), 德山化工技术(苏州)有限公司; 海胆灵、新海胆灵 A、咖啡碱、可可碱、没食子酸、茶氨酸和一些黄烷-3-醇类化合物, 上海源叶生物科技有限公司。上述标准品以及本课题组在前期研究中分离鉴定的黄烷-3-醇 B 环裂变类似物和黄酮醇苷类化合物, 均用于本研究中的特征物一级注释<sup>[14-15]</sup>。DL-4-氯苯丙氨酸, 上海皓元生物医药科技有限公司, 作为 LC-MS 测量的内标。

高速离心机和超高效液相色谱串联四极杆-轨道阱高分辨质谱仪, 赛默飞世尔科技有限公司; 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 冷场发射扫描电镜, 日立公司; 电子显微镜, 深圳市卓创富科技有限公司。

### 1.3 两种冠突散囊菌的系统发育树构建、代谢产物获取及扫描电镜拍摄前样品准备

基于 1.1 中所筛选菌株的 ITS 序列, 采用

neighbor-joining 法构建它们的系统发育树。本研究将 2 种不同来源的冠突散囊菌分别接种 PDA 培养基, 30 °C 培养 10 d 对其菌落形态进行观察, 拍照后从培养皿中取 0.2 g 部分真菌与培养基置于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 含有 5 mg/L DL-4-氯苯丙氨酸的甲醇进行提取, 用于之后的 LC-MS 检测。

将 2 种不同来源的冠突散囊菌接种于贴有玻璃纸的 PDA 培养基表面, 30 °C 培养 10 d 后从玻璃纸表面揭下整个菌体, 随后进行冷场发射扫描电镜前处理, 方法为临界点干燥法<sup>[16]</sup>。

#### 1.4 海洋冠突散囊菌在茶叶培养基中的驯化

将海洋冠突散囊菌的孢子接种在贴有玻璃纸的直径 6 cm 的 PDA 培养基表面, 培养 6 d 直至其进入生殖阶段并产生足够的生物量后再取出表面全部真菌菌落, 转移至 6 孔板孔内的 2 g 黑毛茶(0.63–1.25 mm)上, 之后每孔加入 800  $\mu$ L 无菌水, 将 6 孔板加盖密封, 并置于 30 °C 条件下培养。培养的第 1–5 天每 12 h 取样 1 次, 第 6–8 天每 24 h 取样 1 次, 每个样品设置 3 个生物学重复。同时, 设置未接种真菌的黑毛茶作为对照, 每隔 24 h 取样 1 次。每次取样前均使用电子显微镜拍摄观察样品中真菌的生长状态。

#### 1.5 海洋冠突散囊菌在 2 种不同碳源培养基上的培养

配制 DCS 和 ICS 培养基时, 本研究将无机盐、葡萄糖与琼脂分开灭菌, 避免过氧化氢影响微生物生长<sup>[17]</sup>。海洋冠突散囊菌分别接种于上述 2 种不同的培养基上, 在 30 °C 培养 10 d 后进行取样, 具体操作见 1.3。

#### 1.6 LC-MS 检测、数据处理与统计分析

样品前处理、LC-MS 详细测试条件以及测试所得原始数据的数据处理与统计分析方法分别参考文献[18]。(GNPS 网站运行参数见 [http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=](http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=2200eb9333744611a9c8d0ca21f8fd68)

2200eb9333744611a9c8d0ca21f8fd68, <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=2f1e2f075ef24708b647f4ce0b4ef441> 和 <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=75070d3eceb6475195320b6ee8d7c146>。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种生境的冠突散囊菌的次级代谢通路存在明显差异

基于 ITS 序列, 采用 neighbor-joining 构建的茯砖茶和海洋 2 种生境下的冠突散囊菌的系统发育树表明二者的亲缘关系较近(图 1), 但扫描电镜的观察结果显示它们的群落形态和繁殖方式有着较大的差异。茯砖茶冠突散囊菌进行有性繁殖, 产生金色的闭囊壳和有性孢子, 而海洋冠突散囊菌则是进行无性繁殖, 产生分生孢子, 菌落呈灰绿色(图 2)。

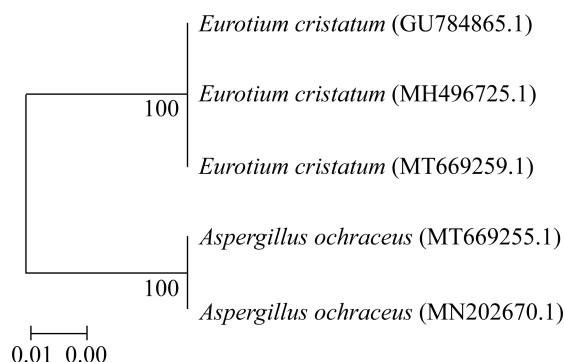


图 1 基于来自茯砖茶和海洋的冠突散囊菌 ITS 序列构建的系统发育树 括号中分别为各菌株的 GenBank 登录号; 分支点数字表示置信度; 标尺 0.01 代表序列的进化差异

Figure 1 Phylogenetic tree based on ITS sequence of *Eurotium cristatum* strains from Fuzhuan brick tea and ocean. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Numbers at branch nodes represent the confidence degree; Scale 0.01 represents the evolutionary difference of the sequence, which represents the genetic distance.

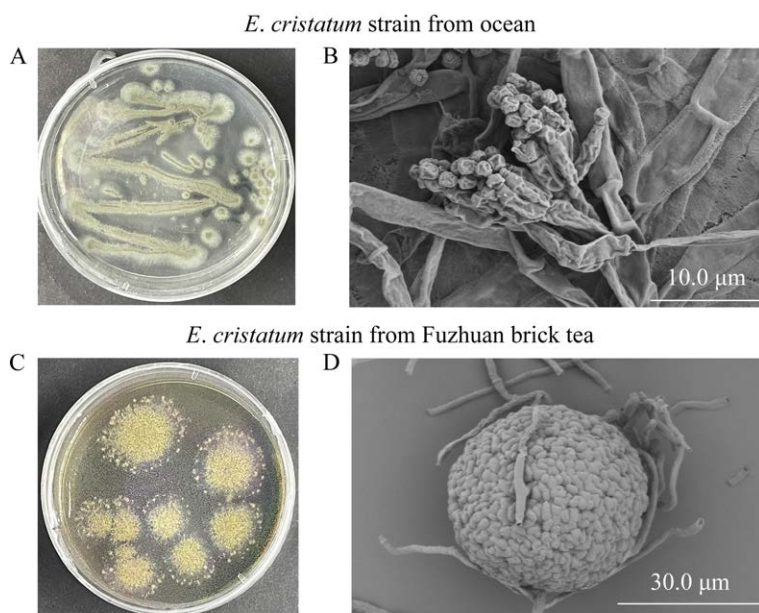


图 2 来自茯砖茶和海洋的冠突散囊菌菌株的形态特征 A: 海洋冠突散囊菌的菌落形态. B: 海洋冠突散囊菌的扫描电镜照片. C: 茯砖茶冠突散囊菌的菌落形态. D: 茯砖茶冠突散囊菌的扫描电镜照片

Figure 2 Morphological characteristics of *Eurotium cristatum* strains from Fuzhuan brick tea and ocean. A: The colony morphology of *Eurotium cristatum* strain from ocean. B: Scanning electron microscope (SEM) photo of *Eurotium cristatum* strain from ocean. C: Colony morphology of *Eurotium cristatum* strain from Fuzhuan brick tea. D: SEM photo of *Eurotium cristatum* strain from Fuzhuan brick tea.

如图 3A 所示, 2 种冠突散囊菌的次级代谢物存在显著差异, 韦恩图显示二者共有的次级代谢物只占很小的比例(17.4%)。本研究结合 FBMN (图 3B)对来自 2 种生境冠突散囊菌的次级代谢物进行可视化展示。FBMN 中每个节点代表一个代谢物, 节点之间连接的边表示代谢物之间二级质谱的相似性。FBMN 据此将质谱相似的节点连成簇, 提示着其相应的代谢物拥有共同的结构属性<sup>[11]</sup>。2 种生境中的冠突散囊菌均可以合成异戊烯基苯甲醛类和蒽醌类化合物, 而在非核糖体肽的合成上有显著区别, 其中茯砖茶冠突散囊菌能产生异戊烯基环二肽, 而海洋冠突散囊菌则能产生一些独特的寡肽(图 4)。上述结果表明, 二者虽然具有相似的遗传物质, 但它们的次级代谢物却有很大的不同, 造成这种差异的原因可能是 2 种差异巨大的生

境对该真菌的长期驯化<sup>[19]</sup>。

## 2.2 茶叶培养基对海洋冠突散囊菌代谢通路的调控

通过主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)发现, 海洋冠突散囊菌菌株在茶叶培养基中驯化过程的代谢物轮廓分布随着时间而变化。Bray-Curtis 距离算法提示了样品代谢物轮廓分为 1–5 d 和 6–8 d 两个阶段(置换多元方差分析  $R^2=0.26$ ,  $P<0.001$ , 图 5A), 表明茶叶培养基对海洋冠突散囊菌的驯化使其代谢通路从第 2 阶段即 5 d 后开始发生显著改变(期刊附件数据 NMDCX0000271 存储在国家微生物科学数据中心(NMDC), 链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/attachment/detail/NMDCX0000271>)。

样品中的代谢物数量呈现上升和下降交替的特点(图 5B)。将这一趋势与生长期间拍摄的

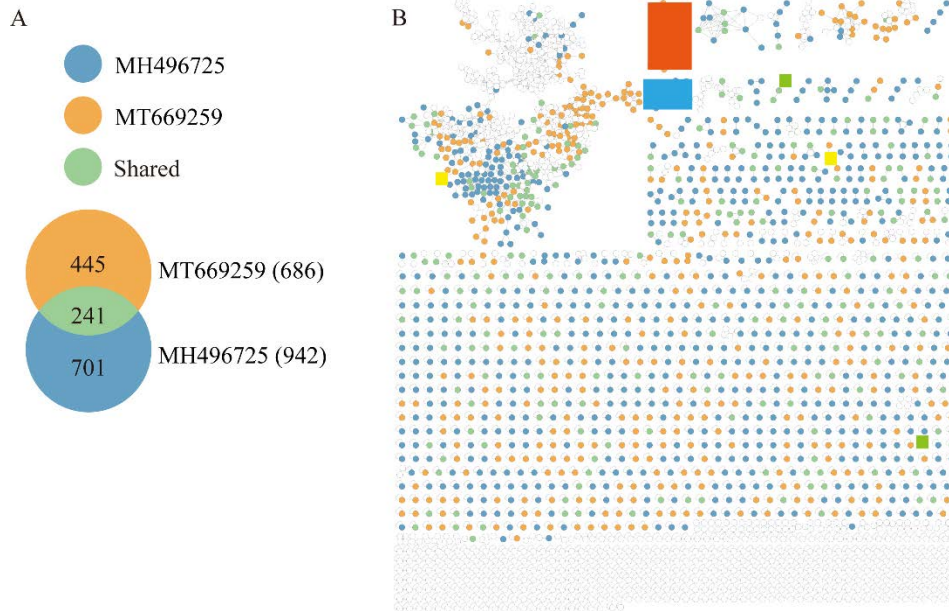


图3 来自茯砖茶和海洋2种生境的冠突散囊菌在PDA培养基中的次级代谢物的差异分析 A: 韦恩图显示了2种冠突散囊菌次级代谢物之间的数量差异. B: 2种冠突散囊菌次级代谢物的FBMN, 节点的颜色根据它们的生物来源标记, 其中一些特定的节点簇由色块标记

Figure 3 The differences of secondary metabolites in PDA of the *Eurotium cristatum* strains from two habitats of Fuzhuan brick tea and ocean. A: Venn diagram showing the number of features differed between the two strains of *E. cristatum*. B: FBMN of the features from the two strains of *E. cristatum*; The colors of nodes were signed according to their bio-origins, some of these specific node clusters are marked by color blocks.

形态结构显微照片进行对比, 发现代谢物数量最初的增加早于无性孢子的出现(图5C)。真菌的次级代谢物通常与孢子形成过程有关, 主要包括激活孢子形成的亚油酸物质、孢子结构所需的色素及在孢子形成时合成的有毒代谢物<sup>[20]</sup>。研究表明曲霉属无性孢子的形成大约需要15 h<sup>[21]</sup>。因此, 我们推测样品中的代谢物数量的浮动可能是真菌产生某些用于孢子形成的信号分子的结果。这些信号分子在孢子形成前被合成又在其形成后被消解。

为了筛选出对样品代谢物轮廓的改变贡献显著的化学成分, 本研究选择正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)变量重要性投

影(variable importance in projection, VIP)>1和组间  $U$ -检验  $P < 0.05$  的102个特征物作为2个阶段间的辨别特征物。辨别特征物的注释方法包括标准品比对(一级注释)、GNPS多库匹配以及利用一些算法(SIRIUS ver5.6.3)结合MS/MS谱注释化学结构(二级注释)或代谢物类别(三级注释)<sup>[15]</sup>。结果显示, 这些辨别特征物包括寡肽类、黄烷-3-醇及其衍生物类、氨基酸及其衍生物和溶血磷脂酰胆碱等(图6)。

热图显示, 某些特征物(ID: 1012, ID: 2552)的丰度随着时间而逐渐下降, 但在第二阶段即120 h后保持稳定。茶叶中主要的黄烷-3-醇类化合物儿茶素没食子酸酯(catechin gallate, CG) (ID: 1908)和没食子儿茶素(epigallocatechin,

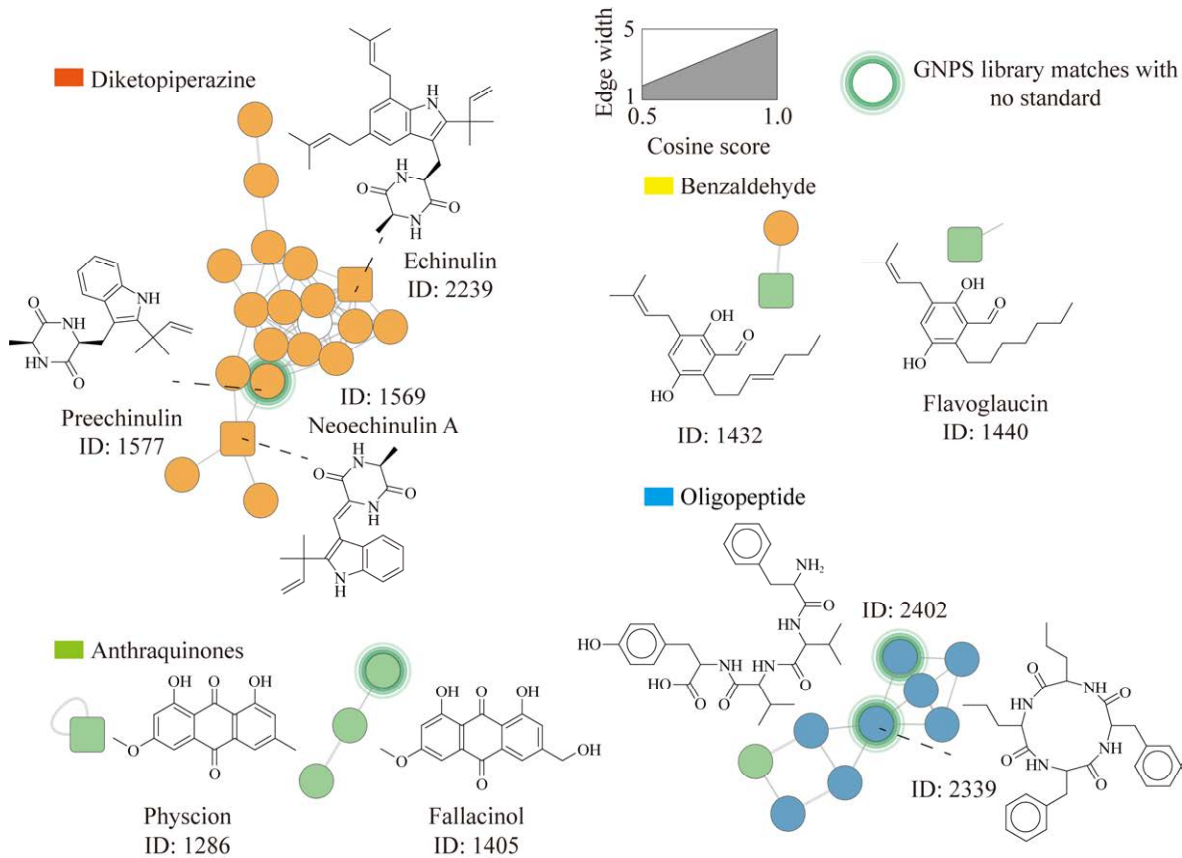


图 4 某些特定的节点簇及其化合物类别 方形节点表示标注级别为 1 的相应特征;边(即节点之间的连线)的宽度表示配对质谱之间的余弦值(0.5–1.0)

Figure 4 Some specific node clusters and their metabolite families. The square nodes indicate the corresponding features with annotation level 1; The widths of the edges represent the cosine score (0.5–1.0) between paired mass spectra.

EGC) (ID: 1330)等的丰度在此过程表现出相似的下降趋势(图 6)。另外,我们发现海洋冠突散囊菌也可以对茶叶中的 EGCG 进行结构修饰,产生茯砖素 A (图 7),类似于茯砖茶冠突散囊菌的代谢特征<sup>[6]</sup>。海洋冠突散囊菌在茶叶中生长后开始合成其原本不会合成的寡肽(ID: 2138)、scalusamide A (ID: 1184)和中链酮酸(ID: 1192)等代谢物。其中 scalusamide A (ID: 1184)和中链酮酸(ID: 1192)在第 2 阶段开始大量产生,而寡肽(ID: 2138)的产生较早,它在第 1 阶段内产生,但丰度在第 2 阶段出现明显的上升。提示这些新产生的次级代谢物影响海洋冠突散囊菌在茶

叶培养基中驯化过程的代谢物轮廓分布。这说明茶叶培养基短时间的驯化促使海洋冠突散囊菌的次级代谢路径发生了变化,即使很多这类特征物尚缺乏确切的结构信息(注释等级 4)。

与此同时,我们还注意到海洋冠突散囊菌本身产生的一些次级代谢物(ID: 964, 1325 等)在前期丰度基本保持不变,但在接种于茶叶培养基一段时间后开始大量产生。环境中的信号主要是大气、光线及其他压力(渗透压或碳饥饿),被整合成一个或多个信号,然后协调营养菌丝生长的停止、无性发育的启动及次级代谢物的产生<sup>[10]</sup>。因此,本研究推测这些次级代谢

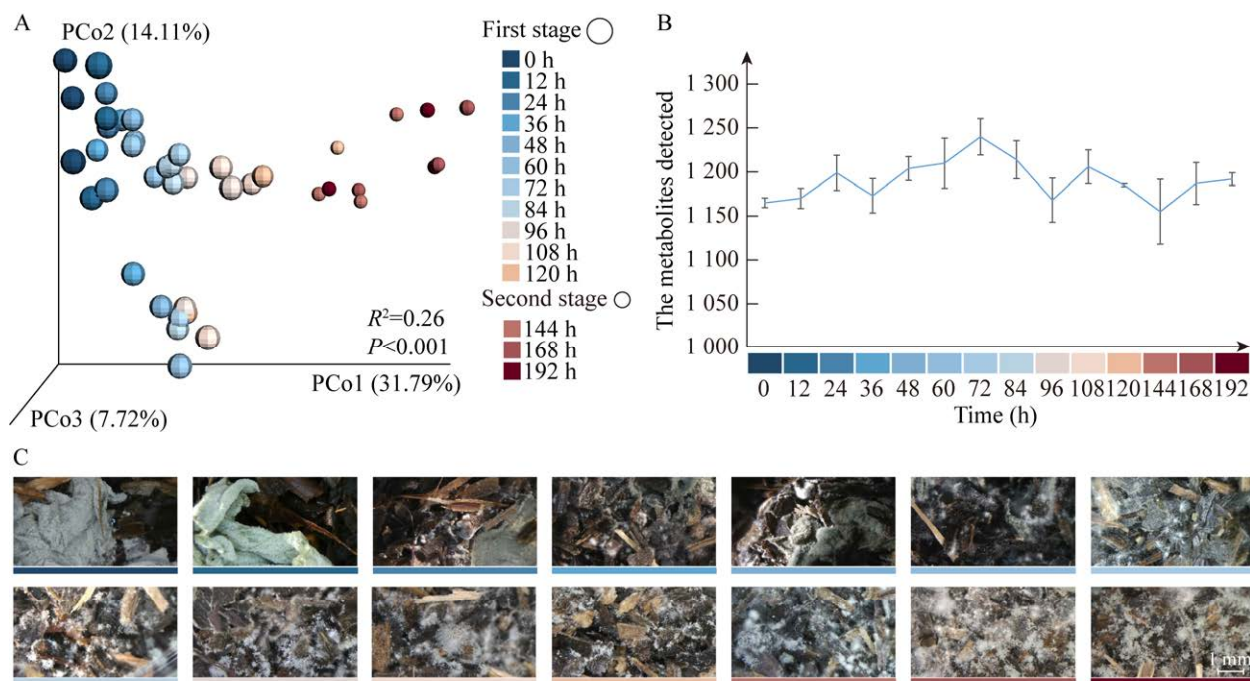


图 5 海洋冠突散囊菌在茶叶培养基中驯化过程样品的非挥发性代谢物  $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性 A: 基于 Bray-Curtis 距离值的 PCoA 散点图. B: 海洋冠突散囊菌在茶叶培养基中驯化过程样品的非挥发性代谢物数量分析. C: 海洋冠突散囊菌接种于茶叶培养基上的生长过程

Figure 5 Alpha diversities and beta diversities of the nonvolatile metabolites of samples from the ocean originated *Eurotium cristatum* during its domestication in the tea leaf medium. A: PCoA scatter plot based on Bray-Curtis dissimilarities. B: Quantity analysis of the nonvolatile metabolites of samples from the growing process of ocean originated *E. cristatum* on tea leaf medium. C: The growth process of ocean originated *E. cristatum* inoculated on tea leaf medium.

物在海洋冠突散囊菌接触茶叶培养基一段时间后大量产生的原因是该菌刚接触茶叶培养基时,与它们相关的调控因子受到抑制。一段时间的茶叶培养基驯化使得海洋冠突散囊菌逐渐适应环境,这些调控因子不再受到抑制,开始大量产生相关次级代谢物。

### 2.3 ICS 和 DCS 培养基对海洋冠突散囊菌的次级代谢物的影响规律

在图 8 的 FBMN 中,我们发现海洋冠突散囊菌接种于这 2 种碳源培养基所产生的次级代谢物有许多是相同的(55.4%)。例如,线性二肽和寡肽这 2 种活性物质(图 9)。而接种于 ICS 培养基上的海洋冠突散囊菌能够产生一些与接种

在 DCS 培养基上不同的次级代谢产物(15.8%),如 N-甲基天冬氨酸(ID: 162)等。

在许多真菌和细菌中存在一种被称为碳代谢抑制(carbon catabolite repression, CCR)的现象,它会导致一些酶和次级代谢物的产生受到抑制<sup>[12]</sup>。当碳源是易于微生物吸收和利用的 DCS 时,微生物的生长速度将大大加快,一些次级代谢产物将被抑制甚至不产生<sup>[12]</sup>。例如,在青霉菌中,葡萄糖抑制青霉素生物合成基因 *pcbAB*、*pcbC* 和 *penDE* 的转录,葡萄糖对 *pcbAB*、*pcbC* 和 *penDE* 基因的启动子有负面影响<sup>[22]</sup>。同样,与构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)产生头孢菌素相关的生物合成基因 *aatA* 和 *ipnA* 也受



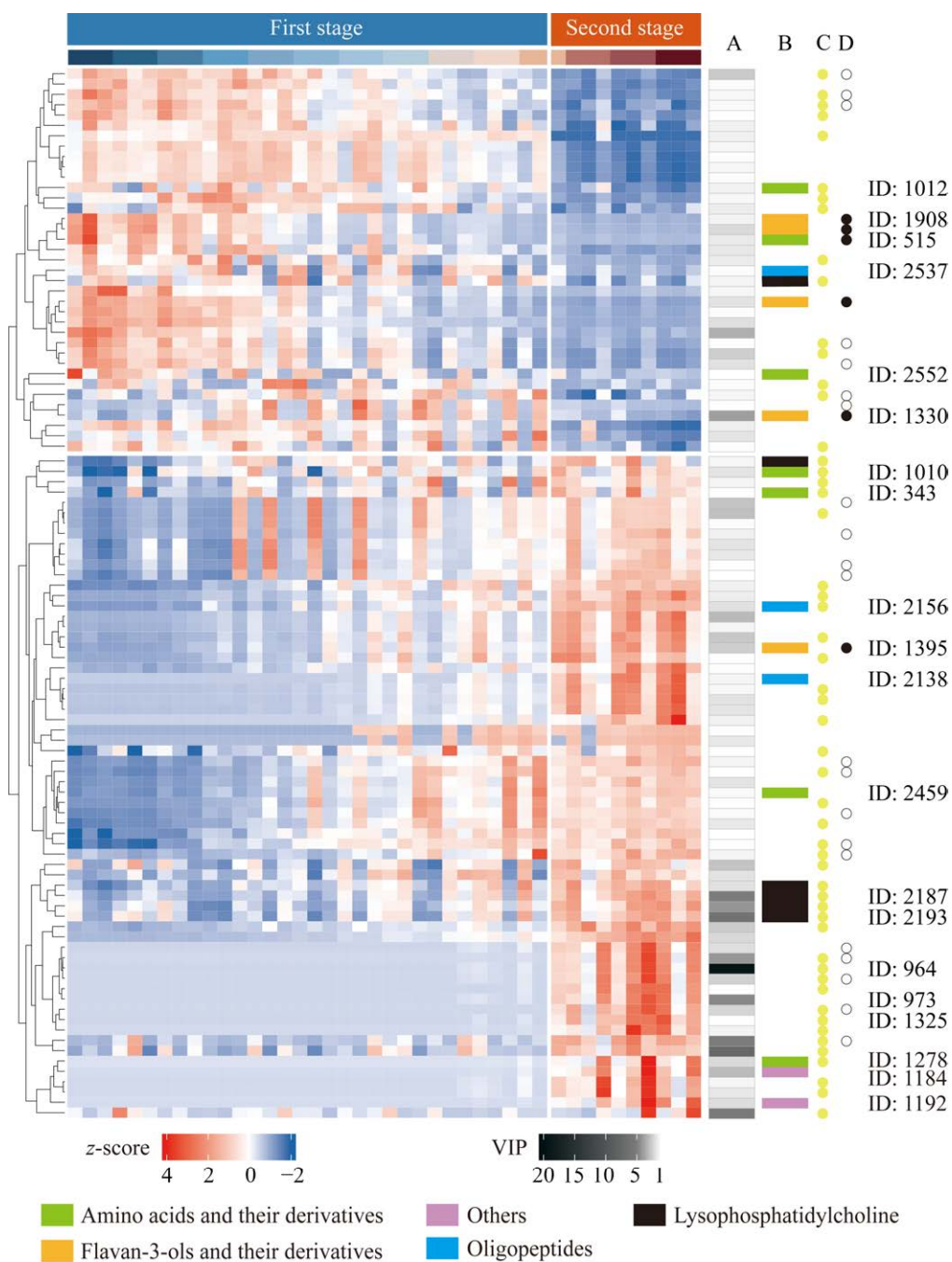


图 6 海洋冠突散囊菌经茶叶培养基驯化发生代谢路径变化前后的辨别特征物热图 A: 热图中特征物的 VIP 值. B: 选定的特征物类别. C: 黄色圆点代表接种了海洋冠突散囊菌的 PDA 中也存在这些特征物. D: 标注级别为 1 和 4 的特征物分别用黑点和圆圈表示

Figure 6 The heatmap of distinguishing features of the metabolic pathway changes of ocean originated *Eurotium cristatum* before and after domestication in tea leaf medium. A: The VIP values are assigned to features in the heatmap. B: The selected metabolite families. C: The yellow dots represent ocean originated *E. cristatum* inoculated to PDA, which also produced this feature. D: The features with annotation level 1 and level 4 were signed by black dots and circles, respectively.

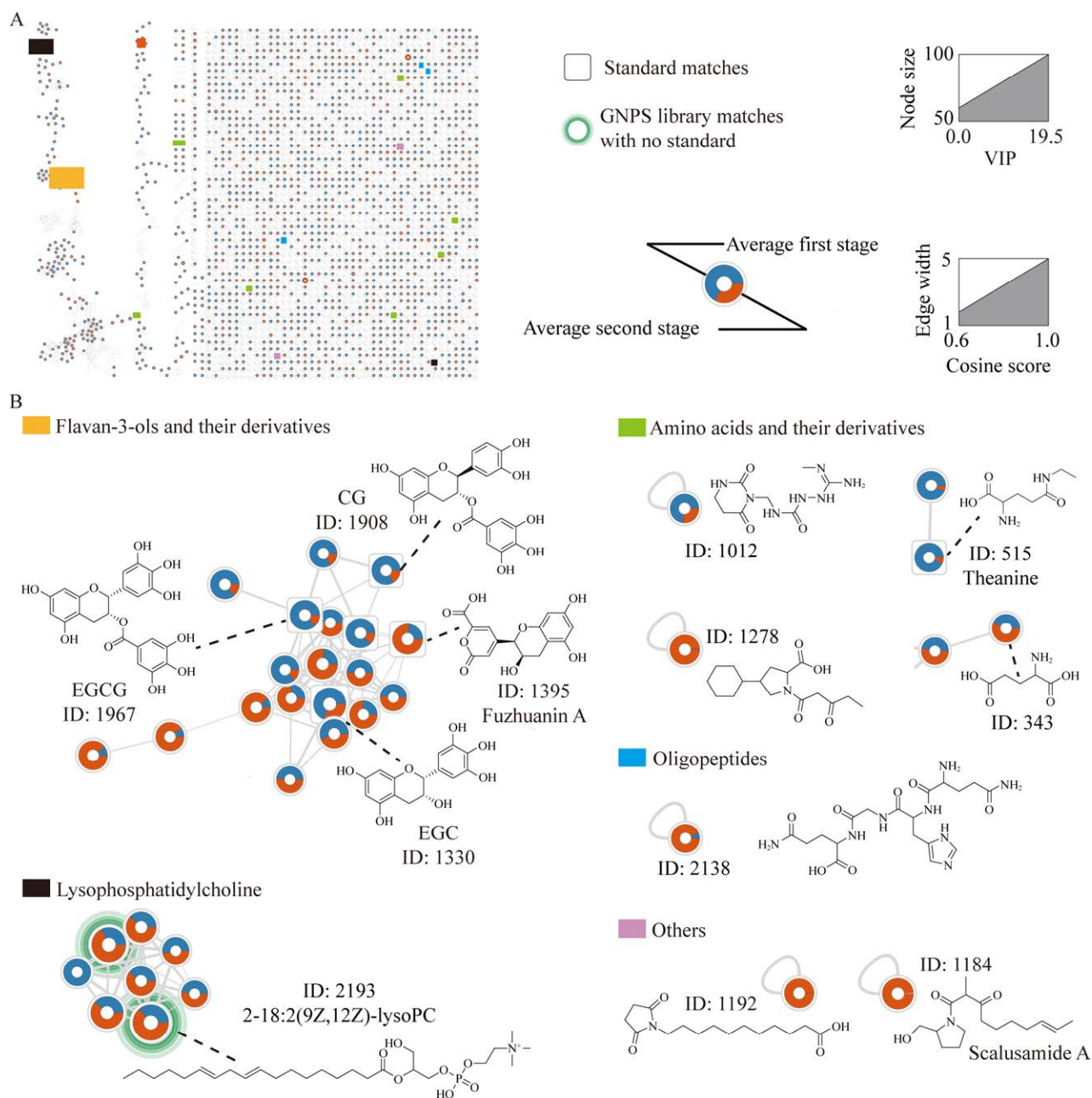


图7 部分特征物的基于特征化合物信息的质谱分子网络 特征物 ID 对应图6中的特征物 ID. A: 完整的网络, 其中一些特定的节点簇用颜色标记出来, 网络中节点的直径响应于相应特征物的 VIP 值. 边缘的宽度表示配对质谱之间的余弦值(0.6–1.0). B: 辨别特征物的注释类别以及丰度信息的分组展示

Figure 7 Feature-based molecular networking of partial features. The feature's ID correspond to those in figure 6. A: Full network where some specific node clusters were signed by colors. The diameters of the nodes in the network respond to the VIP values of the corresponding features. The widths of the edges represent the cosine score (0.6–1.0) between paired mass spectra. B: Some key annotated metabolite families of the discriminating features.

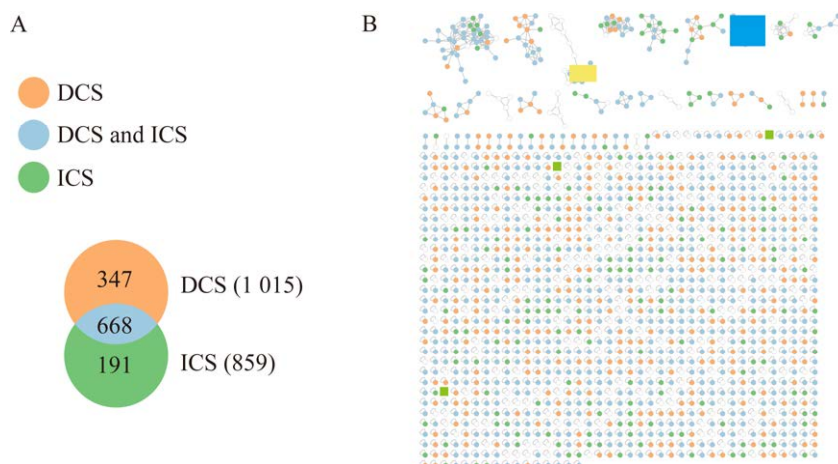


图 8 DCS 和 ICS 培养基对海洋冠突散囊菌次级代谢物影响的展示图 A: 韦恩图显示海洋冠突散囊菌接种于 2 种培养基之间不同的特征物数量. B: 海洋冠突散囊菌接种于 DCS 和 ICS 培养基上的代谢产物 FBMN, 节点的颜色是根据它们的生物起源来标记的

Figure 8 Illustration of the effects of DCS and ICS mediums on secondary metabolites of ocean originated *Eurotium cristatum*. A: Venn diagram showing the number of features differed between ocean originated *E. cristatum* inoculated on two mediums. B: FBMN of the features from ocean originated *E. cristatum* inoculated on DCS and ICS mediums, and the nodes are signed with color based on their bio-origins.

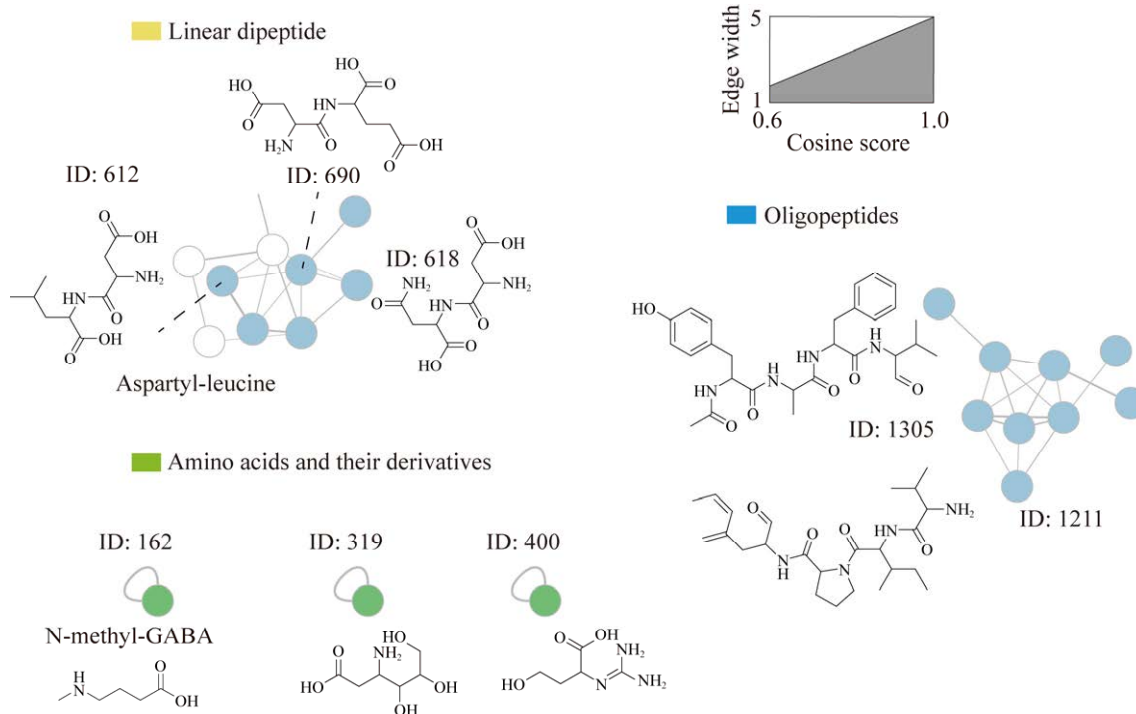
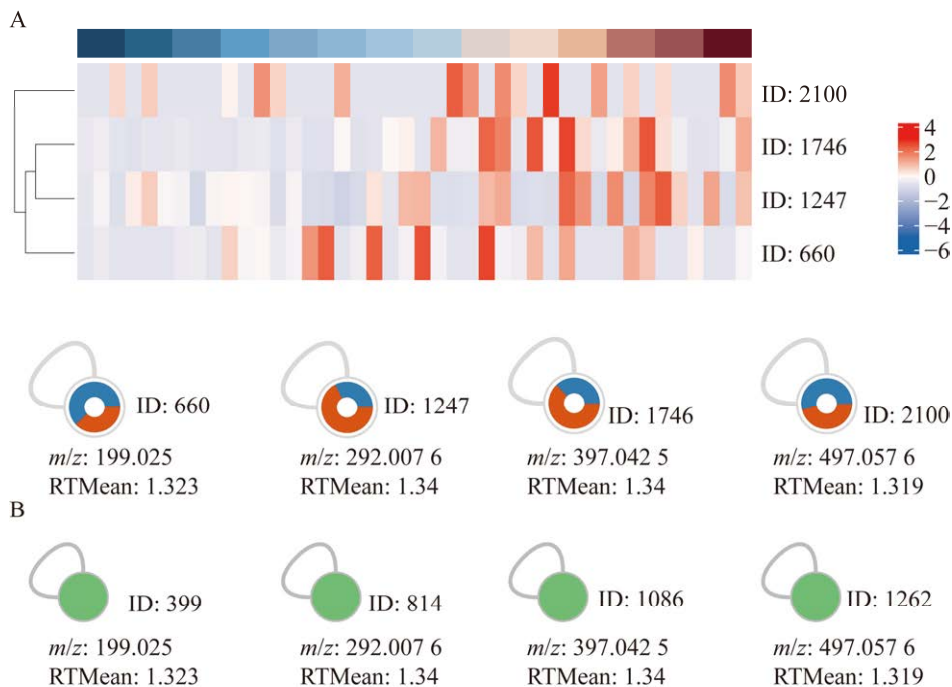


图 9 几类特殊代谢产物的 FBMN 节点簇及结构式 边缘的宽度表示配对质谱之间的余弦值(0.6–1.0)

Figure 9 Some specific node clusters and their metabolite families. The widths of the edges represent the cosine score (0.6–1.0) between paired mass spectra.

到生境中过量葡萄糖的抑制<sup>[23]</sup>。然而,当碳源是纤维素这种不利于微生物直接吸收利用的 ICS 时,它降低微生物的生长速度并消除了次级代谢物合成的干扰。真菌次级代谢物的一个显著特征与其低生长水平有关<sup>[12]</sup>。因此,我们推测出现上述现象是因为 DCS 培养基中的葡萄糖抑制了这些代谢物的产生,而 CMC-Na 作为一种不易被真菌直接分解利用的 ICS,可以解除 CCR。能够被真菌快速吸收利用的葡萄糖和不易被真菌吸收利用的 CMC-Na 都不影响海洋冠突散囊菌产生线状二肽、寡肽等小分子活性肽,但 CMC-Na 与葡萄糖相比可以解除它的 CCR,并帮助其产生某些次级代谢物,如一些氨基酸衍生物。

黑毛茶中的碳源大多也是不易被真菌直接吸收利用的碳源,如茶梗中含有较多的纤维素、果胶、淀粉等,所以在尝试解释茶叶培养基对海洋冠突散囊菌次级代谢的影响机制时,本研究使用了 CMC-Na 来模拟茶叶碳源。基于相同的色谱保留时间(retention time, RT)和质荷比(mass charge ratio,  $m/z$ ),本研究发现海洋冠突散囊菌受茶叶培养基驯化后产生的一些代谢物(ID: 660, 1247, 1746, 2100)等同于其在 ICS 培养基上的代谢物(ID: 399, 814, 1086, 1262),并且这些代谢物在其生长于 DCS 培养基中时不会产生(图 10),所以,海洋冠突散囊菌次级代谢路径发生的变化,部分原因可能是源于茶叶培养基中 CCR 的解除。



**图 10** 海洋冠突散囊菌在 2 种培养基下产生的共有次级代谢物热图及 FBMN 节点簇 A: 海洋冠突散囊菌接种于茶叶培养基。B: 海洋冠突散囊菌接种于 ICS 培养基

**Figure 10** Heatmap and FBMN node clusters of common metabolites produced by ocean originated *Eurotium cristatum* in two mediums. A: The ocean originated *E. cristatum* was inoculated in tea leaf medium. B: The ocean originated *E. cristatum* was inoculated in ICS medium.

### 3 讨论与结论

自古以来,微生物被人们广泛用于发酵食品的制作。相较于野外生活的微生物种群,这些长期生活在发酵食品环境中的微生物种群无论是形态还是产生的代谢物都有着较大的区别<sup>[24]</sup>。例如,人类生产清酒、酱油和味噌时所使用的米曲霉,它与野生菌株黄曲霉关系密切,但它不会产生强效天然致癌物黄曲霉毒素<sup>[25]</sup>。相较于自然环境,发酵食品环境代表了一个稳定、丰富、简单的生态位,在这个生态位中,人工选择可以迅速推动微生物基因组优化<sup>[4]</sup>。在茯砖茶漫长的加工历史中<sup>[26]</sup>,冠突散囊菌在稳定的化学和温湿度环境下长期生长繁殖,重复迭代。这一过程是在人为选择下对冠突散囊菌进行了驯化。可能正是由于长期生活环境的不同,所以来自茯砖茶的冠突散囊菌和来自海洋的冠突散囊菌的菌落形态与次级代谢物有较大的差别。

本研究运用FBMN详细分析了2种不同来源的冠突散囊菌在PDA培养基中的次级代谢物,发现2种生境中的冠突散囊菌在聚酮的合成能力方面相似,而在非核糖体肽的合成方面有显著区别。其中,茯砖茶冠突散囊菌能产生异戊烯基环二肽,而海洋冠突散囊菌则能产生寡肽。接着我们将海洋冠突散囊菌接种到黑毛茶上,驯化8 d后,结果显示其次级代谢通路发生变化,但它此时未像茯砖茶冠突散囊菌一样产生异戊烯基环二肽类化合物。对于此种情况,我们推测可能是因为茶叶培养基对海洋冠突散囊菌的驯化时间还较短,它的驯化还需要一个比较长的过程,也有可能是因为缺乏茯砖茶中其他微生物与海洋冠突散囊菌进行相互作用,所以想要探究其他环境中的冠突散囊菌如何在人为的选择下变成如今的“金花菌”,还需要构建更加完善的茯砖茶“发花”过程中的微生

物群落模型,以及更长的驯化时间。

### 致谢

非常感谢中山大学海洋科学学院的李静副教授提供海洋冠突散囊菌菌株。

### REFERENCES

- [1] SPITELLER P. Chemical ecology of fungi[J]. *Natural Product Reports*, 2015, 32(7): 971-993.
- [2] BILLS GF, GLOER JB. Biologically active secondary metabolites from the fungi[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016.
- [3] SCHUEFFLER A, ANKE T. Fungal natural products in research and development[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(10): 1425-1448.
- [4] WOLFE BE, DUTTON RJ. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems[J]. *Cell*, 2015, 161(1): 49-55.
- [5] LI J, XU R, ZONG LX, BRAKE J, CHENG LZ, WU J, WU XB. Dynamic evolution and correlation between metabolites and microorganisms during manufacturing process and storage of fu brick tea[J]. *Metabolites*, 2021, 11(10): 703.
- [6] XIE HF, KONG YS, LI RZ, NOTHIAS LF, MELNIK AV, ZHANG H, LIU LL, AN TT, LIU R, YANG Z, KE JP, ZHANG P, BAO GH, XIE ZW, LI DX, WAN XC, DAI QY, ZHANG L, ZHAO M, AN MQ, et al. Feature-based molecular networking analysis of the metabolites produced by *in vitro* solid-state fermentation reveals pathways for the bioconversion of epigallocatechin gallate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(30): 7995-8007.
- [7] XIAO Y, ZHONG K, BAI JR, WU YP, GAO H. Insight into effects of isolated *Eurotium cristatum* from Pingwu Fuzhuan brick tea on the fermentation process and quality characteristics of Fuzhuan brick tea[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(9): 3598-3607.
- [8] DENG J, LI YL, YUAN Y, YIN FY, CHAO J, HUANG JN, LIU ZH, WANG KB, ZHU MZ. Secondary metabolites from the genus *Eurotium* and their biological activities[J]. *Foods*, 2023, 12(24): 4452.
- [9] ZHANG PP, JIA CX, DENG YL, CHEN SH, CHEN B, YAN SJ, LI J, LIU L. Anti-inflammatory prenylbenzaldehyde derivatives isolated from *Eurotium cristatum*[J]. *Phytochemistry*, 2019, 158: 120-125.

- [10] BRAKHAGE AA. Regulation of fungal secondary metabolism[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11: 21-32.
- [11] NOTHIAS LF, PETRAS D, SCHMID R, DÜHRKOP K, RAINER J, SARVEPALLI A, PROTSYUK I, ERNST M, TSUGAWA H, FLEISCHAUER M, AICHELER F, AKSENOV AA, ALKA O, ALLARD PM, BARSCH A, CACHET X, CARABALLO-RODRIGUEZ AM, da SILVA RR, DANG T, GARG N, et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment[J]. Nature Methods, 2020, 17(9): 905-908.
- [12] SÁNCHEZ S, CHÁVEZ A, FORERO A, GARCÍA-HUANTE Y, ROMERO A, SÁNCHEZ M, ROCHA D, SÁNCHEZ B, AVALOS M, GUZMÁN-TRAMPE S, RODRÍGUEZ-SANOJA R, LANGLEY E, RUIZ B. Carbon source regulation of antibiotic production[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(8): 442-459.
- [13] FRISVAD JC. Media and growth conditions for induction of secondary metabolite production[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 944: 47-58.
- [14] LUO ZM, DU HX, LI LX, AN MQ, ZHANG ZZ, WAN XC, BAO GH, ZHANG L, LING TJ. Fuzhuanins A and B: the B-ring fission lactones of flavan-3-ols from Fuzhuan brick-tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(28): 6982-6990.
- [15] SUMNER LW, AMBERG A, BARRETT D, BEALE MH, BEGER R, DAYKIN CA, FAN TWM, FIEHN O, GOODACRE R, GRIFFIN JL, HANKEMEIER T, HARDY N, HARNLY J, HIGASHI R, KOPKA J, LANE AN, LINDON JC, MARRIOTT P, NICHOLLS AW, REILY MD, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) metabolomics standards initiative (MSI)[J]. Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society, 2007, 3(3): 211-221.
- [16] 肖媛, 刘伟, 汪艳, 左艳霞, 胡锐, 李婷婷, 崔宗斌. 生物样品的扫描电镜制样干燥方法[J]. 实验室研究与探索, 2013, 32(5): 45-53, 172.  
XIAO Y, LIU W, WANG Y, ZUO YX, HU R, LI TT, CUI ZB. Drying methods of biological sample preparation for scanning electron microscope[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2013, 32(5): 45-53, 172 (in Chinese).
- [17] TANAKA T, KAWASAKI K, DAIMON S, KITAGAWA W, YAMAMOTO K, TAMAKI H, TANAKA M, NAKATSU CH, KAMAGATA Y. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7659-7666.
- [18] KONG YS, REN HY, LIU R, da SILVA RR, AKSENOV AA, MELNIK AV, ZHAO M, LE MM, REN ZW, XU FQ, YAN XW, YU LJ, ZHOU Y, XIE ZW, LI DX, WAN XC, LONG YH, XU ZZ, LING TJ. Microbial and nonvolatile chemical diversities of Chinese dark teas are differed by latitude and pile fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(18): 5701-5714.
- [19] BLEUVEN C, LANDRY CR. Molecular and cellular bases of adaptation to a changing environment in microorganisms[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2016, 283(1841): 20161458.
- [20] CALVO AM, WILSON RA, BOK JW, KELLER NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 447-459.
- [21] ETXEBESTE O, GARZIA A, ESPESO EA, UGALDE U. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules[J]. Trends in Microbiology, 2010, 18(12): 569-576.
- [22] GUTIÉRREZ S, MARCOS AT, CASQUEIRO J, KOSALKOVÁ K, FERNÁNDEZ FJ, VELASCO J, MARTÍN JF. Transcription of the *pcbAB*, *pcbC* and *penDE* genes of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78 is repressed by glucose and the repression is not reversed by alkaline pHs[J]. Microbiology, 1999, 145(Pt 2): 317-324.
- [23] LITZKA O, THEN BERGH K, BRAKHAGE AA. Analysis of the regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *aat* (*penDE*), which encodes acyl coenzyme A: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1995, 249(5): 557-569.
- [24] STEENSELS J, GALLONE B, VOORDECKERS K, VERSTREPEN KJ. Domestication of industrial microbes[J]. Current Biology: CB, 2019, 29(10): R381-R393.
- [25] GIBBONS JG, SALICHOS L, SLOT JC, RINKER DC, McGARY KL, KING JG, KLICH MA, TABB DL, McDONALD WH, ROKAS A. The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. Current Biology: CB, 2012, 22(15): 1403-1409.
- [26] 侯爱香, 李宗军, 李珂. 茯砖茶的历史、流通和加工[J]. 轻工科技, 2015, 31(9): 1-3.  
HOU AX, LI ZJ, LI K. History, circulation and processing of Fuzhuan tea[J]. Light Industry Science and Technology, 2015, 31(9): 1-3 (in Chinese).