

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(10):1385-1391; 4 October 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

红海榄根际土壤来源的泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) F12 及其代谢产物的抗菌活性分析

常敏, 王娟, 田峰, 张庆华, 叶波平*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要:【目的】鉴定一株来自于红海榄根际土壤并具有分泌抑菌活性代谢产物的真菌菌株 F12, 并从其发酵液乙酸乙酯浸膏中分离抑菌活性成分。【方法】通过形态学观察以及 ITS 序列分析方法对菌株 F12 进行鉴定; 利用色谱技术分离发酵液乙酸乙酯浸膏中的次生代谢产物, 根据化合物的质谱、氢谱、碳谱以及理化性质确定其结构, 并检测它们对细菌生长的抑制作用。【结果】菌株 F12 被鉴定为 *Aspergillus awamori* strain F12; 从其发酵液乙酸乙酯浸膏中分离到 3 种化合物: 1,4-二甲氧基苯(1)、大黄素(2)和 3,6-二苯甲基哌嗪-2,5-二酮(3), 其中化合物 1 属于在本属真菌中首次报道。化合物 2 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的生长具有明显的抑制作用, 最低抑菌浓度(MIC)分别为 16ng/L 和 32ng/L, 化合物 1 和 3 对上述菌株的生长无明显的抑制活性。【结论】首次发现从红海榄根际土壤中分离到的泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 菌株 F12 具有合成 1,4-二甲氧基苯和大黄素的能力, 其中后者对微生物的生长具有明显的抑制作用。

关键词: 红海榄; 根际土壤; 泡盛曲霉; 次生代谢产物; 抑菌活性

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010)10-1385-07

分布于热带和亚热带沿海潮间带的红树林生态系统蕴藏着丰富的微生物资源, 它们在自然界的元素循环中起着重要的作用^[1]。真菌是红树林生态系统中主要的微生物类群, 常具有分泌多种活性次生代谢产物的能力^[2-4], 在相关药物的研究和开发中显示出良好的应用前景。

在前期研究中, 我们已从我国南部的 6 个红树林群落中分离到 200 余株真菌, 初步的形态学鉴定发现这些真菌主要以青霉属 *Penicillium*、曲霉属 *Aspergillus* 以及枝孢属 *Cladosporium* 等为主, 它们的培养液普遍具有抑菌和细胞毒活性。目前, 已完成对其中部分菌株的鉴定、活性代谢产物的分离纯化以及活性筛选研究工作^[5-7]。进一步开展并完成对其它菌株的鉴定和活性代谢产物的分离纯化工作, 将不仅有助于丰富我国微生物种植资源库, 同时也

将为相关药物的筛选提供更多的先导化合物。本研究对一株来自于红海榄根际土壤的曲霉属真菌菌株 F12 进行了系统的鉴定, 并从其发酵液中分离到 3 种化合物, 初步探讨了这些化合物的抑菌活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 曲霉属真菌菌株 F12 为从海南省海口市东寨港红树林保护区的红海榄根际土壤中分离得到的一株真菌, 保存于本实验室。活性测试菌株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: 1 × PCR buffer、MgCl₂、dNTP、Taq-Plus DNA 聚合酶均购自上海生工生物工程技术有限公司; 柱层析及薄层层析用硅胶购

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-05-0496); 国家自然科学基金(81072571)

* 通信作者。Tel: +86-25-83271016; Fax: +86-25-83271249; E-mail: yebp2001@yahoo.com.cn

作者简介: 常敏(1986-), 女, 江苏省泰州人, 硕士研究生, 主要从事微生物活性代谢产物的研究。

收稿日期: 2010-03-24; **修回日期:** 2010-05-06

自青岛海洋化工有限公司;化合物分离纯化过程中使用的通用显色剂为含 10% 硫酸的乙醇溶液以及碘蒸气;除特别注明的试剂外,本研究中所用试剂均为国产分析纯试剂。电镜观察采用日立 H-7650 扫描电子显微镜;质谱用 MDS-QSTAR 型质谱仪;核磁共振谱用 Bruker Avance 500 型核磁共振仪(TMS 为内标)测定;熔点用 Fister-John 熔点测定仪测定(温度未校正)。

1.1.3 培养基:菌种保存培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)斜面培养基;菌种鉴定培养基为 CA 和 CYA 培养基^[8];发酵培养基为在前期研究中优化过的 SDA 培养基,组成为:4% 蔗糖,1% 蛋白胨 A, pH 6.5;活性测定培养基为肉汤培养基^[9]。

1.2 菌株 F12 的形态学鉴定

1.2.1 培养特性观察:菌落形态观察采用点植培养法,在 PDA 斜面培养基上蘸取极少量的孢子,分别点植于 CA 和 CYA 培养基平板上,置于 28℃ 恒温培养箱中,培养 3 d、5 d、7 d 后观察和记录不同时间的菌落颜色、大小、质地等特征。

1.2.2 菌体形态鉴定:将菌株在 SDA 固体培养基上进行划线培养,并将盖玻片以 45°角插入培养基中,培养 7 d 后获得生长有菌丝体的盖玻片,将其用 2.5% 的戊二醛溶液固定后,PBS 缓冲液进行洗涤,梯度脱水并经 CO₂ 临界点干燥,表面喷金后,用日立 H-7650 扫描电子显微镜观察其菌体形态并照相记录。

1.3 ITS rDNA 序列分析

1.3.1 基因组 DNA 的提取:基因组 DNA 的提取方法参照 SDS-CTAB 法^[10]。

1.3.2 ITS 序列扩增与序列分析:真菌 ITS rDNA 扩增时使用的通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并经 PAGE 纯化。

25 μL PCR 反应体系组成如下:1 × PCR buffer、2.5 mmol/L MgCl₂、240 μmol/L dNTP、0.5 μmol/L ITS1 和 ITS4 引物、1% DMSO、100 ng 基因组 DNA、1.5 U Taq-Plus DNA 聚合酶。混合上述体系后,95℃ 预变性 3 min,按 95℃ 变性 1 min、56℃ 退火 1 min 和 72℃ 延伸 1 min 扩增 35 个循环,最后于 72℃ 延伸 10 min 结束反应。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离和纯化后,在南京金斯瑞生物科技有限公司完成测序。

1.3.3 基于 ITS 序列的系统发育树构建:将获得的

ITS 序列提交到 GenBank 获得序列号后,利用 BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 对其进行同源性分析,并利用 CLUSTAL X 软件^[11]将该序列与 GenBank 中同源性较高的序列进行多序列联配分析,进一步利用 PHYLIP 3.65 软件中的 N-J 方法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,自举分析(boot strap)次数设置为 1000。

1.4 菌株 F12 的发酵

从斜面保存培养基上挑取 F12 菌株接种到含 100 mL 种子培养液的 250 mL 三角烧瓶中,在 28℃、160 r/min 条件下振荡培养 24 h,获得种子培养液。取该种子培养液,按 1% 的接种量接种到内装 200 mL 发酵培养液的 500 mL 三角烧瓶中,置于 28℃、160 r/min 的摇床上振荡培养 7 d,使用四层纱布过滤收集并积累发酵培养液。

1.5 代谢产物的分离纯化与结构解析

将收集到的发酵液(150 L)于 60℃ 减压浓缩后,用乙酸乙酯萃取,将乙酸乙酯萃取液减压浓缩后得到总浸膏 82.6 g。将该浸膏上样到硅胶柱中,以二氯甲烷-甲醇(200:1-0:1)为洗脱液进行梯度洗脱,分部收集洗脱液,经薄层层析(TLC)分析后合并相似的洗脱液,再经反复硅胶柱层析、sephadex LH-20 及重结晶等方法分离得到纯化合物 1 (22.4 mg)、2(5.3 mg)和 3(10.5 mg)。测定化合物的¹H-NMR、¹³C-NMR 谱和质谱,并测定化合物的熔点。

1.6 抗菌活性活性测试

向无菌 96 孔板的第 1-10 孔分别加入 100 μL 用肉汤培养基倍比稀释的待测化合物,使各孔的最终药物浓度为:256、128、64、32、16、8、4、2、1 和 0.5 ng/L,再向每孔中分别加入 1 × 10⁵ cfu/mL - 2 × 10⁵ cfu/mL 病原菌菌悬液 100 μL,以不同浓度的万古霉素(0、0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10.0 ng/L)作为阳性对照,设不加样品的阴性对照和 不加菌液的空白对照各一。每组样品设置 3 个平行处理,37℃ 培养 12 h 后观察菌株的生长状况^[12]。

2 结果和分析

2.1 菌株 F12 的形态学特征

菌株 F12 在 CA 和 CYA 培养基上生长良好,其中在 CYA 培养基中 28℃ 培养 7 d 后的直径可达 50-75 mm。培养初期的菌落为白色,中央带黄褐色,后转为黑褐色,棉絮状,无渗出液,菌落背面为黄色。

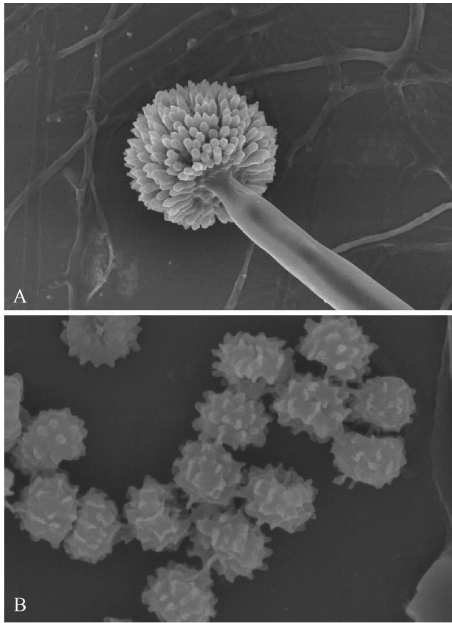


图1 菌株 F12 的形态特征

Fig. 1 Morphological characters of strain F12. A: Morphological character of the conidial head (bar = 50 μm); B: Morphological character of the conidium (bar = 5 μm).

菌株 F12 的分生孢子头呈球形, 直径 70 - 100 μm ; 分生孢子梗发生于基质, 分生孢梗茎大小为 (600 - 1000) μm \times (5 - 10) μm , 壁光滑, 梗基一般长 (10 - 20) μm \times (3 - 5) μm , 顶囊球形, 直径 40 - 55 μm , 表面全部可育, 产孢结构双层 (图 1-A); 分生孢子为近球形, 直径 2.5 - 4 μm , 壁粗糙 (图 1-B)。上述形态与曲霉属 *Aspergillus* 环绕亚属 *Subgen. circumdati* 黑色组 *Sect. nigri* 中的 *A. awamori* 和 *A. niger*^[8] 相似, 但从菌株 F12 的菌落颜色以及孢梗茎长度来看, 其在形态上更接近于 *A. awamori* (表 1)。

2.2 基于 ITS 序列基础上的系统发育分析

将测序后获得的 ITS 序列提交到 GenBank 中获得序列号 bankit1331524, BLAST 分析结果显示该序列与曲霉属 *Aspergillus* sp. 真菌的 ITS 序列具有很高的同源性, 其中与菌株 *Aspergillus* sp. LZ1、*A. awamori* 和 *A. tubingensis* 的 ITS 序列 (序列号分别为 GU258410.1、AM087614.1 和 GQ461899.1) 同源性均在 99% 以上。基于 ITS 序列基础上的系统发

表 1 菌株 F12 与 *A. awamori* 和 *A. niger* 的形态比较

Table 1 Morphological comparison of strain F12 with *A. awamori* and *A. niger*

Morphology	Strain F12	<i>A. awamori</i> (MQ347)	<i>A. niger</i> (MQ5334, MQ9376)
Colony size (mm)	50 - 75	65 - 70	50 - 70
Clone color	Black brown	Black brown or dark chocolate - brown	Sooty
Stipe length (μm)	600 - 1000 \times 5 - 10	400 - 1000 \times 9 - 15	1500 - 4000 \times 9 - 20
Vesicle	Sphericity	Sphericity or nealy sphericity	Sphericity or nealy sphericity
Vesicle diameter (μm)	40 - 55	(20 -)30 \times 45(- 60)	(30 -)40 \times 70(- 80)
Conidium	Nealy sphericity, coarse wall	Sphericity or nealy sphericity, coarse wall	Sphericity or nealy sphericity, coarse wall
Conidium diameter (μm)	2.5 - 4	3.5 - 4.5(- 5)	3 - 4.8(- 5.4)

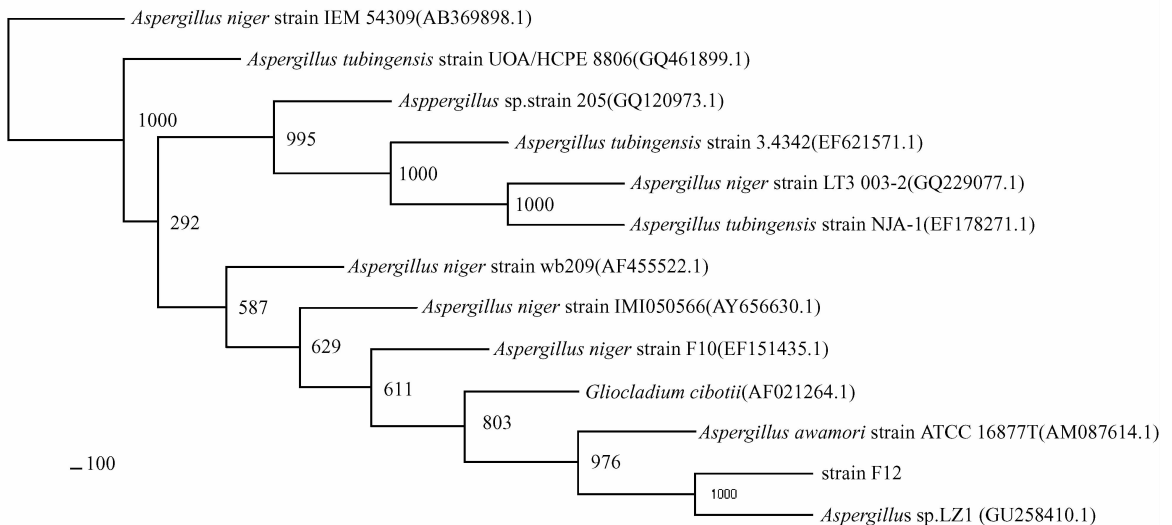


图 2 基于 ITS 序列基础上的菌株 F12 与其它曲霉属真菌的系统发育分析

Fig. 2 Polymeric analysis of strain F12 and other *Aspergillus* strains based on the sequence of ITS.

育分析结果(图2)表明菌株 F12 为曲霉属 *Aspergillus* 环绕亚属 *Subgen. circumdati* 黑色组 *Sect. nigri* 真菌的一种。

结合菌株 F12 的形态特征,本研究将该菌株鉴定为 *A. awamori*。

2.3 菌株 F12 发酵液中次生代谢产物的鉴定

从菌株 F12 发酵液的乙酸乙酯浸膏中共分离到 3 种次生代谢产物,其中:

化合物 1: 白色片状固体(氯仿), θ_{mp} : 55 - 56 $^{\circ}$ C。该化合物 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 在低场区的信号 δ : 6.86 (s, 4H), 在 $^1\text{H-NMR}$ 谱高场区 3.81 (s, 6H) 信号为甲氧基吸收信号; $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO) δ : 165.31 (C), 133.26 (CH), 52.22 (CH₃)。 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 与标准图谱 (SDBS No. 1160HPM-00-091) 相同,故将化合物 1 鉴定为 1,4-二甲氧基苯(1,4-dimethoxybenzene)。

化合物 2: 橙黄色粉末(甲醇), θ_{mp} : 250 - 252 $^{\circ}$ C。结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 确定分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ : 12.10 (s, 1H), 12.04 (s, 1H), 11.18 (s, 1H), 7.52 (d, J = 0.5 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 0.5 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 3.29 (s, 3H), 2.42 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO) δ : 189.63 (C), 181.40 (C), 165.61 (C), 164.40 (C), 161.36 (C), 148.16 (C), 135.10 (C), 132.82 (C), 124.07 (CH), 120.41 (CH), 118.40 (C), 109.81 (C), 108.78 (CH), 107.87 (CH), 21.43 (CH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 显示分子中存在 10 个季碳 (δ : 189.63, 181.40, 165.61, 164.40, 161.36, 148.16, 135.10, 132.82, 113.38, 109.81, 其中 2 个为羰基)、4 个叔碳 (δ : 124.07,

120.41, 108.78, 107.87) 和 1 个伯碳 (δ : 21.43), 这些均具有蒽醌骨架特征化合物的典型信息; 从 $^1\text{H-NMR}$ 谱数据可以看出: 4 个芳环上质子 (δ : 7.52, 7.19, 7.13, 6.60) 间的偶合常数较小, 表示其为间位关系, $^1\text{H-NMR}$ 的低场区域 (δ : 12.10, 12.04) 是与分子内羰基形成了分子内氢键的酚羟基信号, δ : 11.18 处显示一宽峰说明该羟基与分子内羰基不发生螯合作用。上述理化性质及质谱、 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 与大黄素(emodin)^[13] 相同, 故将化合物 2 鉴定为大黄素。

化合物 3: 白色无定形粉末(DMSO), θ_{mp} : 120 - 124 $^{\circ}$ C, 遇体积分数为 10% 的硫酸乙醇不显色, 无荧光。EI-MS 谱给出了分子离子峰 m/z 294 [M]⁺, 317 [M + Na]⁺。结合核磁数据推断分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ : 7.88 (s, 1H), 7.28 (t, J = 15 Hz, 2H), 7.21 (t, J = 14.5 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 3.97 (s, 1H), 2.58 (dd, J = 5 Hz, 5Hz, 1H), 2.25 (dd, J = 6 Hz, 6.5 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO) δ : 166.1 (C), 136.5 (C), 129.7 (CH), 128.1 (CH), 126.4 (CH), 55.36 (CH), 37.10 (CH₂)。它的 $^1\text{H-NMR}$ 谱和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱分别显示有具有相同化学位移的酰胺质子信号 δ 7.88 (s) 和羰基碳信号 δ 166.1, 表明该化合物是一个由 2 个相同的氨基酸残基构成的对称的环二肽。进一步分析其核磁数据推测分子中存在苯丙氨酸残基, 确定该化合物为两个苯丙氨酸组成的环二肽。化合物 3 的波谱数据和文献^[14, 15] 数据一致, 故鉴定该化合物为 3,6-二苯甲基哌嗪-2,5-二酮(3,6-dibenzylpiperazine-2,5-dione)。

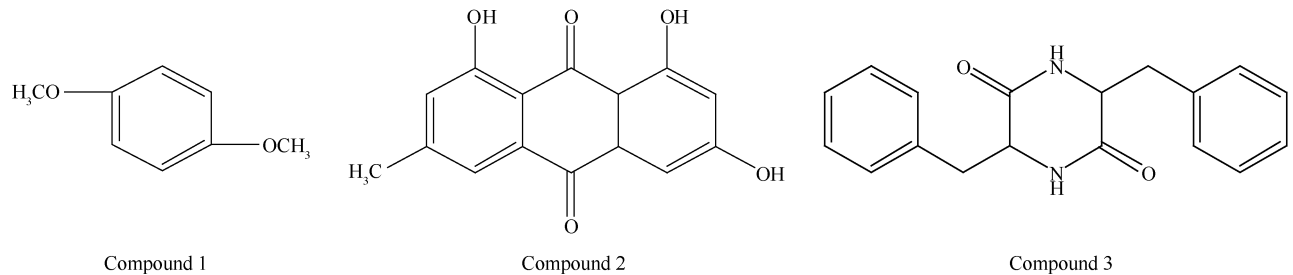


图3 化合物 1-3 的化学结构式

Fig.3 Structures of compound 1-3.

2.4 代谢产物的抗菌活性分析

利用 *Staphylococcus aureus* 和 *Bacillus subtilis* 测定了上述 3 种化合物的体外抑菌活性, 结果表明: 化

合物 1 和化合物 3 的抑菌活性不显著, 而化合物 2 对 *Staphylococcus aureus* 和 *Bacillus subtilis* 的生长具有较强的抑制作用, MIC 分别为 16 ng/L 和 32 ng/L

(表 2)。

表 2 化合物 1-3 的抑菌活性

Compound	The minimum inhibitory concentration (MIC, ng/L)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
	Compound 1	> 256
Compound 2	16.0	32.0
Compound 3	> 256	> 256
Vancomycin	2.0	0.5

3 讨论

曲霉属真菌是自然界中常见的一类腐生真菌, 在传统的酿造业以及现代化工和医药业中具有广泛的用途。近年来的研究显示: 从海水^[16]、海底沉积物^[17]、海洋动物^[18-19]以及海洋植物^[20]中分离到的多种曲霉属真菌具有分泌抗菌、抗肿瘤以及抗氧化等多种活性次生代谢产物的能力。

在前期研究中, 我们从广西、广东和海南的 6 个红树群落中分离到 200 余株真菌, 其中曲霉属菌株 F3^[5] 和 F7^[7] 已分别被鉴定为 *Aspergillus fumigatus* 和 *Aspergillus flavus*, 其它曲霉属菌株的鉴定工作正在进行中。来自于红海榄根际土壤的菌株 F12 在形态上与已鉴定的菌株 F3 和菌株 F7 明显不同, 其在 CA 和 CYA 培养基中培养时的特征接近于曲霉属 *Aspergillus* 环绕亚属 *Subgen. circumdati* 黑色组 *Sect. nigri* 成员中的 *A. awamori* 和 *A. niger*^[8], 且与 *A. awamori* 更为接近。鉴于其 ITS 序列与来自于 *Aspergillus* sp. LZ1 的 ITS 序列 (GU258410.1) 具有 100% 的同源性, 而与来自于 *A. niger* 的 ITS 序列同源性为 99%, 在本研究中将菌株 F12 鉴定为泡盛曲霉 (*A. awamori*)。

泡盛曲霉在早期主要用于酿造业中, 近年来也被用作宿主菌表达多种外源蛋白质^[21], 但很少见有该类真菌分泌活性物质的报道^[22]。在本研究中, 我们从其发酵液的乙酸乙酯浸膏中分离到 3 种化合物, 其中化合物 1 (1,4-二甲氧基苯) 属于首次从曲霉属真菌中发现, 化合物 2 和 3 为首次在泡盛曲霉中发现。

化合物 1 是一种重要的化工原料, 常被用作食用香料及定香剂 (特别是用于配制坚果类香精), 并可用作合成药物及有机化工的中间体^[23], 市场的需求量比较大。目前, 该化合物主要来自于风信子的精油^[24], 其产量受环境和季节的影响相对较大。本研究中分离到的菌株 *A. awamori* F12 为该化合物的生产提供了一个新的来源。化合物 2 同样来自于植

物, 是中药大黄的主要有效成分, 在中医临床上被认为具有泻下的作用。现代药理学研究发现其还具有抗菌消炎、抗肿瘤、免疫抑制、保肝和抗肾纤维化等作用^[25-27], 具有良好的市场开发价值。在本研究中, 我们发现该化合物显示出很强的抑菌活性, 它可能是菌株 F12 主要的抗菌活性代谢产物之一。化合物 3 属于环二肽类化合物, 该类化合物被认为是生物内源性物质的前体化合物^[28], 在微生物次生代谢产物中比较常见, 其生物合成途径与微生物体内的非核糖多肽合成酶类或者一些新的酶类 (如 l-amino acid α -ligase) 等有关^[29]。本研究中分离到的 Cyclo-(Phe-Phe) 最先报道自 *Streptomyces nourse*^[30], 在植物^[31] 以及其它一些放线菌的发酵液^[32, 33] 中也曾分离到过这种化合物, 具有抗菌、抗肿瘤、抗虫和酶抑制剂活性^[32, 34, 35] 等, 但在本研究中并未发现该化合物具有抑制 *Staphylococcus aureus* 和 *Bacillus subtilis* 生长的作用, 其在抗肿瘤以及其它药理活性方面的筛选和评价工作正在进行中。

总之, 从红海榄根际土壤中分离到的 *Aspergillus awamori* 菌株 F12 具有分泌一些原本来自于植物的次生代谢产物 (如: 1,4-二甲氧基苯和大黄素) 的能力, 有望通过菌株的改造成为生产这些化合物的工程菌株, 具有潜在的利用价值。

致谢 本研究工作中的化合物结构鉴定得到第二军医大学长征医院海洋药学部林厚文教授以及中国药科大学中药学院博士生罗俊和硕士生张耀的帮助, 在此一并感谢。

参考文献

- [1] Kathiresan K, Bingham BL. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*, 2001, 40: 81-251.
- [2] Xue CM, Li T, Deng ZW, Fu HZ, Lin WH. Janthinolide A-B, two new 2, 5-piperazinedione derivatives from the endophytic *Penicillium janthinellum* isolated from the soft coral *Dendronephthya* sp.. *Pharmazie*, 2006, 61(12): 1041-1044.
- [3] Xu MJ, Gessner G, Groth I, Lange C, Christne A, Bruhn T, Deng ZW, Li X, Heinemann SH, Grabley S, Bringmann G, Sattler I, Lin WH. Shearinines D - K, new indole triterpenoids from an endophytic *Penicillium* sp. (strain HKI0459) with blocking activity on large-conductance calcium-activated potassium channels. *Tetrahedron*, 2007, 63(2): 435-444.

- [4] 李想, 姚燕华, 孙光芝, 郑毅男, 林文翰, Satfler I. 红树植物内生真菌 *Penicillium* sp. 中一个醌类化学成分的研究. 分析测试学报 (*Fenxi Ceshi Xuebao*), 2007, 26(2): 195-197.
- [5] 王治维, 窦莹颖, 祝兴伟, 叶波平. 盐度和 pH 对红树根际土壤来源的曲霉属真菌 F3 的生长及分泌活性物质的影响. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2008, 35(12): 1873-1878.
- [6] 许婷婷, 吴垠, 贾阳阳, 刘冰, 叶波平. 红海榄根际土壤来源的青霉属真菌 XGH2321 及其抑菌活性. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2009, 36(11): 1682-1687.
- [7] 叶波平, 贾阳阳, 许婷婷, 刘冰, 李明月. 来自红海榄根际土壤的曲霉属真菌 F7 菌株及其生物活性分析. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2010, 29(2): 241-248.
- [8] 齐祖同. 中国真菌志-曲霉属及其相关有性型. 北京: 科学出版社, 1997.
- [9] 范秀蓉, 李广武, 沈萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1989.
- [10] Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Detection and taxonomic placement of entophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 20(1): 1-13.
- [11] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 4876-4882.
- [12] Castillo GU, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H, Jensen JB, Albert H, Robison R, Condron MAM, Teplow DB, Stevens D, Yaver D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, entophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*, 2002, 148: 2675-2685.
- [13] 谭倪, 邵长伦, 陶李明, 何丽仙, 余志刚, 林永成. 南海红树林内生真菌#2240 的 3 个萘醌类次级代谢产物的鉴别和药理活性. 应用化学 (*Chinese Journal of Applied Chemistry*), 2009, 26(3): 277-281.
- [14] Kricheldorf HR. Spectroscopic characterization of cyclodipeptides (2, 5-dioxopiperazines). *Organic Magnetic Resonance*, 1980, 13(1): 52-58.
- [15] 朱峰, 林永成, 周世宇, Vrijmoed LLP. 南海红树林内生真菌 2534 号代谢产物的研究. 中山大学学报 (自然科学版) (*Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*), 2003, 42(1): 52-54.
- [16] Sallenave NC, Pouchus YF, Robiou T, Lassus P, Verbist JF. Toxicogenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Springer Netherlands*, 2000, 49(1): 21-25.
- [17] Capon RJ, Skene C, Stewart M, Ford J, O'Hair RAJ, Williams L, Lacey E, Gill JH, Heiland K, Friede T. Aspergillins A-E: five novel depsipeptides from the marine derived fungus *Aspergillus carneus*. *Organic Biomolecular Chemistry*, 2003, 1: 1856-1862.
- [18] Yamada T, Imaia E, Nakatujia K, Numata A, Tanaka R. Cephalimysin A, a potent cytotoxic metabolite from an *Aspergillus* species separated from a marine fish. *Tetrahedron Letters*, 2007, 48(36): 6294-6296.
- [19] Kato H, Yoshida T, Tokue T, Nojiri Y, Hirota H, Ohta T, Williams RM, Tsukamoto S. Notoamides A-D: new prenylated indole alkaloids isolated from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp.. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 119(13): 2304-2306.
- [20] LI Y, Li XF, Kim SK, Kang JS, Choi HD, Rho JR, Son BW. Golmaenone, a new diketopiperazine alkaloid from the marine-derived Fungus *Aspergillus* sp.. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 52(3): 375-376.
- [21] Hessing JGM, Rotterdam C, Verbakel JMA, Roza M, Maat J, Gorcom RFM, Hondel CAM. Isolation and characterization of a 1, 4- β -endoxylanase gene of *A. awamori*. *Current Genetics*, 1994, 26: 228-232.
- [22] 张志华, 洪葵, 高昊, 姚新生. 具有细胞毒活性红树林真菌 094811 的鉴定. 微生物学杂志 (*Journal of Microbiology*), 2006, 26(4): 6-11.
- [23] Yadav GD, Pimparkar KP. Insight into Friedel-Crafts acylation of 1, 4-dimethoxybenzene to 2, 5-dimethoxyacetophenone catalysed by solid acids-mechanism, kinetics and remedies for deactivation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2007, 264(1): 179-191.
- [24] Bauer K, Garbe D, Surburg H. Common fragrance and flavor materials. New York: Wiley-Vch, 2001.
- [25] Hazni H, Ahmad N, Hitotsuyanagi Y, Takeya K, Choo CY. Phytochemical constituents from *Cassia alata* with inhibition against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Planta Medica*, 2008, 74(15): 1802-1805.
- [26] Tong HF, Lin SZ, Yang X, He J. Empirical study on effect of emodin on acute rejection after orthotopic liver transplantation in rats. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2009, 24(1): 49-52.
- [27] Bhadauria M, Nirala SK, Shrivastava S, Sharma A, Johri S, Chandan BK, Singh B, Saxena AK, Shukla S. Emodin reverses CCl₄ induced hepatic cytochrome P450 (CYP) enzymatic and Ultra structural changes: The in vivo evidence. *Hepatology Research*, 2009, 39(11): 290-300.

- [28] Jongheon S, Youngman S. A new cyclic peptide from a marine derived bacterium of the genus *Nocardiopsis*. *Journal of Natural Products*, 2003, 66: 883.
- [29] Hashimoto S. Occurrence, biosynthesis, and biotechnological production of dipeptides. Springer Berlin / Heidelberg, 2006.
- [30] Brown R, Kelley C, Wiebley SE. The production of 3-benzylidene-6-isobutylidene-2, 5-Dioxopiperazine, 3, 6-dibenzylydene-2, 5-dioxoperazine, 3-benzyl-6-benzylidene-2, 5-dioxoperazine and 3, 6-dibenzyl-2, 5-dioxoperazine by a variant of *Streptomyces noursei*. *Journal of Organic Chemistry*, 1965, 30: 277-230.
- [31] Zhou J, Tan N. Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45: 1825-1831.
- [32] 李春远, 丁唯嘉, 余志刚, 林永成. 海洋放线菌 *Streptomyces* sp. (#195-02) 的代谢产物研究. 中药材 (*Zhong Yao Cai*), 2008, 31(5): 645-647.
- [33] Lautru S, Gondry M, Genet R, Pernodet JL. The albonoursin gene cluster of *S. noursei*: biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and biology*, 2002, 9(12): 1355-1364.
- [34] 周世宁, 姜广策, 吴雄宇, 林永成. 从海洋沉积物分离的产抗菌素和环肽的放线菌. 中山大学学报(自然科学版) (*Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*), 1997, 36(6): 129-130.
- [35] Davidson BS, Schumacher RW. Isolation and synthesis of caprolactins A and B, new caprolactams from a marine bacterium. *Tetrahedron*, 1993, 49(30): 65-69.

Antibacterial activity of secondary metabolites from *Aspergillus awamori* F12 isolated from rhizospheric soil of *Rhizophora stylosa* Griff

Min Chang, Juan Wang, Feng Tian, Qinghua Zhang, Boping Ye*

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: [**Objective**] To identify *Aspergillus awamori* strain F12 isolated from rhizospheric soil of *Rhizophora stylosa* Griff and to characterize antibacterial compounds from the ethyl acetate extracts of its fermentation broth. [**Methods**] Strain F12 was identified based on its morphological characters and internal transcribed spacer (ITS) sequence. Its secondary metabolites were purified by chromatography, and elucidated by mass spectroscopy, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and physicochemical characters. The antibacterial activities of these compounds were tested against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. [**Results**] Strain F12 was identified as *Aspergillus awamori*. Three compounds, including 1, 4-dimethoxybenzene (**1**), emodin (**2**) and 3, 6-dibenzylpiperazine-2, 5-dione (**3**), were purified and elucidated from the ethyl acetate extracts of fermentation broth, among which compound **1** was first reported for the genus of *Aspergillus*. Compound **2** suppressed the growth of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* with MIC values of 16 μg/mL and 32 μg/mL respectively, while the other two compounds have no effects on these bacteria. [**Conclusion**] *Aspergillus awamori* strain F12 isolated from rhizospheric soil of *Rhizophora stylosa* Griff can produce 1, 4-dimethoxybenzene and emodin, among which the latter can suppress the growth of bacteria apparently.

Keywords: *Rhizophora stylosa* griff; rhizospheric soil; *Aspergillus awamori*; secondary metabolites; antibacterial activity

(本文责编: 张晓丽)