

文章编号: 1004-2490(2020)04-0466-10

# 南极大磷虾肠道曲霉菌 *Aspergillus sydowii* NJF7 的分离与代谢产物的研究

常俊男<sup>1,4</sup>, 李灵智<sup>1,2</sup>, 樊成奇<sup>1,2</sup>, 韩清华<sup>1</sup>, 黄洪亮<sup>1,2</sup>,  
马丽艳<sup>1</sup>, 陆亚男<sup>1,2</sup>, 李月月<sup>1,4</sup>, 田晓清<sup>1,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 农业农村部远洋与极地渔业创新重点实验室, 上海 200090; 3. 农业农村部东海渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090; 4. 上海海洋大学, 上海 201306)

**摘要:** 通过对2017年第34次“雪龙号”南极考察采集的南极大磷虾 (*Euphausia superba*) 共生微生物进行分离, 并对有价值菌株的次级代谢产物进行了研究。采用在3种选择性培养基中添加不同抗生素的稀释平板涂布法, 从南极大磷虾中分离出一株有价值的真菌进行扩大培养, 运用 TLC、柱色谱(正相硅胶、C18 硅胶、MCI、Sephadex LH-20 凝胶)和半制备型 HPLC 等色谱方法对其代谢产物进行高效快速地分离纯化, 结合现代波谱学手段 (ESI HR MS、<sup>1</sup>H-NMR), 鉴定次级代谢产物结构。首先经过形态学、18S rDNA-ITS 序列分析, 鉴定分离到一株真菌为曲霉 *Aspergillus* sp. NJF7; 从曲霉 NJF7 中分离到 13 个代谢产物, 分别鉴定为环(脯氨酸-酪氨酸)(1)、环(色氨酸-酪氨酸)(2)、环(脯氨酸-苯丙氨酸)(3)、环(缬氨酸-脯氨酸)(4)、环(缬氨酸-色氨酸)(5)、环(异亮氨酸-色氨酸)(6)、环(谷氨酰胺-色氨酸)(7)、对羟基肉桂酸甲酯(8)、尿嘧啶(9)、对羟基苯乙胺(10)、苯乙胺(11)、N-甲基酪胺(12)、大麦芽碱(13), 其中化合物 7 为新的天然产物。

**关键词:** 南极大磷虾; 南极真菌; 次级代谢产物; 分离纯化; 结构鉴定

**中图分类号:** S 98      **文献标志码:** A

南极大磷虾 (*Euphausia superba*) 因其区域特色、资源保有量优势以及广泛应用价值为世界主要发达国家所青睐, 国际上已形成磷虾捕捞技术支撑、高附加值产品驱动为一体的产业链<sup>[1-3]</sup>。我国更将南极大磷虾商业化开发纳入国家海洋发展战略, 积极培育这一海洋生物精深利用新兴产业。南极大磷虾自身富含多种活性物质, 包括 DHA/EPA 等不饱和脂肪酸、磷脂、多种活性低温酶等<sup>[4-8]</sup>。而肠道作为磷虾等动物体内重要的消化吸收器官, 其中栖息着数量庞大、结构复杂的肠道微生物组 (intestinal microbiota), 与宿主的营养代谢、遗传、发育及进化、免疫防御等重要生命

过程休戚相关<sup>[9-11]</sup>。有学者研究发现南极大磷虾肠道菌群包含大量未知微生物新种属, 随后通过菌株代谢产物及其生物活性筛选, 从南极大磷虾可培养菌株代谢产物中鉴定化合物 48 个, 具有抗海洋病毒、抗海洋病原菌及抗污损等多种生态学活性<sup>[12-16]</sup>。因此, 我国亟需继续大力加强南极大磷虾基础生物学研究, 积极拓展其资源综合利用新途径。本小组成员在参与第 29 次极地科学考察时, 分离出南极大磷虾共附生微生物 133 株, 其中 7% 为未知种<sup>[17]</sup>, 并且全部为细菌。丁壮等<sup>[18]</sup>总结了极地真菌的代谢产物, 发现其代谢产物多样性较好, 且具有抗菌、增强抗癌

**收稿日期:** 2019-05-05

**基金项目:** 国家重点研发计划(南极磷虾绿色高效连续捕捞关键技术与装备研发, 2018YFC1406803); 国家高技术研究发展计划(极地微生物资源及其活性产物功能的发现与利用研究, 2012AA092105); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2020TD68)

**作者简介:** 常俊男(1990—), 河南安阳人, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: 13262601452@163.com

**通信作者:** 田晓清, 助理研究员。E-mail: tianxq@ecsf.ac.cn

药物活性、核苷转移抑制剂等活性。

因此,本文在前人研究的基础上对第34次“雪龙号”南极考察采集到的南极大磷虾共附生菌进行真菌菌株分离鉴定,并对其次级代谢产物进行初步研究,以期为极地真菌以及南极大磷虾综合利用提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

南极大磷虾由2017年第34次“雪龙号”南极考察船采用框架拖网采获。

培养基:孟加拉红固体培养基<sup>[19]</sup>;PDA固体培养基;YPD固体培养基;YPD液体培养基。用于分离真菌菌株时每种培养基添加抗生素:青霉素、链霉素、氯霉素各 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

色谱材料:柱层析硅胶(200-300目)及预制GF254 TLC硅胶板:青岛海洋化学公司;MCI gel(CHP 20P, 75-150  $\mu\text{m}$ );C18反相硅胶(150-200目):Merck公司;凝胶Sephadex LH-20;Pharmacia Biotech, Sweden。

试剂:乙腈、甲醇(色谱级,Merck公司);其他试剂,如乙酸乙酯、甲醇、丙酮、正丁醇、石油醚、三氯甲烷等(AR,上海国药集团);标准品尿嘧啶( $5\ \text{g}\cdot\text{瓶}^{-1}$ )(上海国药集团)。

### 1.2 实验仪器

微生物恒温培养箱(上海一恒科学有限公司,DHP9162A);大型恒温摇床培养箱(上海天星实验仪器制造有限公司,TS-211C);超声波清洗器(上海汉克科学仪器有限公司,SK250LH);光学显微镜(上海光学仪器一厂,XSP-44X.9);半制备HPLC仪器(Shimadzu, SPD-M20A PDA);半制备HPLC仪器(Waters, 2545);液质联用仪(HR-ESI-MS, Agilent, 1290 HPLC-6224 TOF MS, 分辨率 $\geq 20\ 000$ );旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂,RE3000A);反相半制备色谱柱:YMC-Pack ODS-AQ column ( $250\times 10\ \text{mm}$ , S-5  $\mu\text{m}$ , 12 nm, 分离流速 $2.5\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ );正相半制备色谱柱:YMC-Pack SIL-06 column ( $250\times 10\ \text{mm}$ , S-5  $\mu\text{m}$ , 6 nm, 分离流速 $4.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ );核磁共振波谱仪(Bruker AM-400 spectrometer)。

### 1.3 菌株的分离鉴定

将南极大磷虾样品在超净工作台内用无菌海水冲洗表面,用研钵研碎,将处理好的样品加

入装有10 mL无菌海水的50 mL无菌管中,样品震荡混匀后梯度稀释 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ ,不同梯度分别取300  $\mu\text{L}$ 菌液涂布于孟加拉红、PDA和YPD 3种固体培养基上,每个梯度样品做3个平行。涂布好的平板倒置于 $15\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养;培养约3~4周后长出菌落,依据菌落特征进行分离,挑取菌落接种至相应培养基上划线分离纯化培养,直至得到纯菌落。分离得一株真菌NJF7,菌株保存于YPD或孟加拉红斜面固体培养基,置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱进行保种;另用30%的甘油保种于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 的冰箱进行长期保存。然后转移到液体培养基送至上海美吉生物医药科技有限公司进行一代测序。

同时将灭菌的载玻片 $45^\circ$ 倾斜插入涂布真菌菌种的固体培养皿中, $28\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养3~5 d,用光学显微镜观察菌丝形态特征,如菌落形状、大小、色泽、质地、有没有产生孢子等特点,并作记录。再参考张新军<sup>[20]</sup>和孙晶晶等<sup>[21]</sup>的研究对真菌进行初步的分类、鉴定。

### 1.4 菌株的次级代谢产物分离纯化

#### 1.4.1 发酵液的获取

NJF7菌株接种在2只50 mL试管中(内有5 mL的YPD液体培养基),摇床恒温 $27\ ^\circ\text{C}$ 培养活化5~7 d。将活化的NJF7菌株接种至2只1 000 mL三角瓶(内含500 mL YPD液体培养基)中,置于 $20\ ^\circ\text{C}$   $160\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床培养箱中,发酵培养5 d后得到种子发酵液。将发酵的种子液按一定比例接到装有YPD液体培养基的2 L三角瓶中,在 $20\ ^\circ\text{C}$   $160\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床培养箱中发酵培养,共得到培养发酵液约35.5 L。

#### 1.4.2 次级代谢产物的提取分离

NJF7菌株发酵液35.5 L用布氏漏斗及定性中速(直径18 cm)的滤纸真空抽滤分为菌丝体和胞外滤液两部分。菌丝体置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中冷冻,48 h后取出放在室温解冻,解冻后依次加入3 L的丙酮和甲醇,用超声清洗器超声提取,各提取2次,得到菌丝体部分浸膏。胞外滤液约35.5 L,每1.6 L菌液分别用200 mL的乙酸乙酯和正丁醇萃取各2次,旋转浓缩得乙酸乙酯部分浸膏157.3 g,正丁醇部分浸膏19.0 g。乙酸乙酯部分与菌丝体提取浓缩的浸膏合并,质量为163.2 g,用650 mL的纯水溶解充分,再用325 mL的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇3种试剂各萃取3次。萃取

液真空低温旋蒸,除去有机溶剂,得到石油醚部分浸膏 10.5 g;乙酸乙酯部分浸膏 0.32 g;正丁醇部分浸膏与第一次正丁醇部分合并共 31.3 g。

乙酸乙酯部分经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离,通过 TLC 硅胶板点样分析得到 NJF7I ~ VII 7 部分。NJF7I 部分经 Waters 正向柱制备,流动相为乙酸乙酯-石油醚。NJF7III 部分过硅胶分为 IIIa 和 IIIb,然后再用 HPLC 制备,各部分 HPLC 梯度洗脱程序以及化合物见表 1。

用 MCI 柱分离正丁醇部分:用 1 000 mL 水洗脱 MCI 柱 4 个柱体积,后用 400 mL 甲醇:水(V:V = 10:90)淋洗,除去盐、糖、蛋白等杂质;依次用甲醇:水(20:80→50:50→80:20→100:0)洗脱,每梯度洗脱液的用量为 1 000 mL。洗脱下来的液体用旋转蒸发仪依次浓缩得到 20% 甲醇、50% 甲醇、80% 甲醇和 100% 甲醇 4 个部分。50% 和 80% 甲醇部分经过硅胶分离后再通过 HPLC 制备,流动相为乙腈-水(水含 0.1% 三氟乙酸),各部分梯度洗脱程序以及化合物见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种鉴定结果

曲霉属菌种 NJF7 在孟加拉红培养基培养,

其培养特征(A)和在光学显微镜目镜 10 倍、物镜 40 倍条件下形态(B)见图 1。

真菌 NJF7 菌落特点:菌落的颜色为黄绿色;质地丝绒状,形成放射状沟纹;没有渗出液;分生出来的孢子头形成疏松放射状;顶囊近球形;分生的孢子形状为球形、近球形。根据姚栗等<sup>[22]</sup>的研究结果,对照实验菌种的培养特征和显微形态,其与黄曲霉菌颜色形态一致。

菌株序列与生物信息学数据库 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行序列的相似性比较分析,寻找最高相似性在 98% 左右的菌株,选取比对结果中与其相似性较高的模式株,然后对菌株构建系统发育树(图 2)。

基因序列同源性比对分析发现,菌株 NJF7 与 *Aspergillus* 属模式种 *A. sydowii* (KX958084.1) 相似性最高,为 99%,与 *A. sydowii* (JN851025.1) 在同一枝节。根据真菌的形态学特点,鉴定 NJF7 为曲霉 *Aspergillus sydowii*。

### 2.2 次级代谢产物鉴定结果

从菌株 NJF7 的代谢产物中分离出化合物,分别经 HR-ESI-MS、<sup>1</sup>H-NMR 波谱学方法,鉴定了其中 13 个化合物。结构见图 3。

表 1 乙酸乙酯各部分梯度洗脱程序表及化合物

Tab.1 Gradient elution procedures and compounds of EA

分离部分 Fraction	时间 /min Time	流动相比例 Mobile phase ratio	化合物 Compounds	分离部分 Fraction	时间 /min Time	流动相比例 Mobile phase ratio	化合物 Compounds	分离部分 Fraction	时间 /min Time	流动相比例 Mobile phase ratio	化合物 Compounds
NJF7I	0 ~ 5.00	30%	11(17.28 min)	NJF7IIIa	0 ~ 2.00	25%	8(12.52 min) 5(14.03 min) 6(16.43 min)	NJF7IIIb	0 ~ 2.00	20%	9(14.73 min) 10(17.49 min) 13(16.18 min) 2(23.27 min)
	12.00	50%			21.00	50%			21.00	50%	
	20.00	70%			22.00	70%			24.50	80%	
	26.00	95%			24.50	70%			25.00	80%	
					25.00	25%			27.50	20%	

表 2 正丁醇部分梯度洗脱程序表及化合物

Tab.2 Gradient elution procedures and compounds of n-butyl alcohol

分离部分 Fraction	时间 /min Time	流动相比例 Mobile phase ratio	化合物 Compounds	分离部分 Fraction	时间 /min Time	流动相比例 Mobile phase ratio	化合物 Compounds
50% 甲醇	0 ~ 2.00	20%	1(6.24 min) 12(18.69 min) 4(8.25 min)	80% 甲醇	0.01	28%	3(10.80 min) 7(12.45 min)
	27.50	30%			15.00	30%	
	28.50	70%			26.00	55%	
	29.50	70%			27.50	55%	
	30.00	20%			28.50	28%	

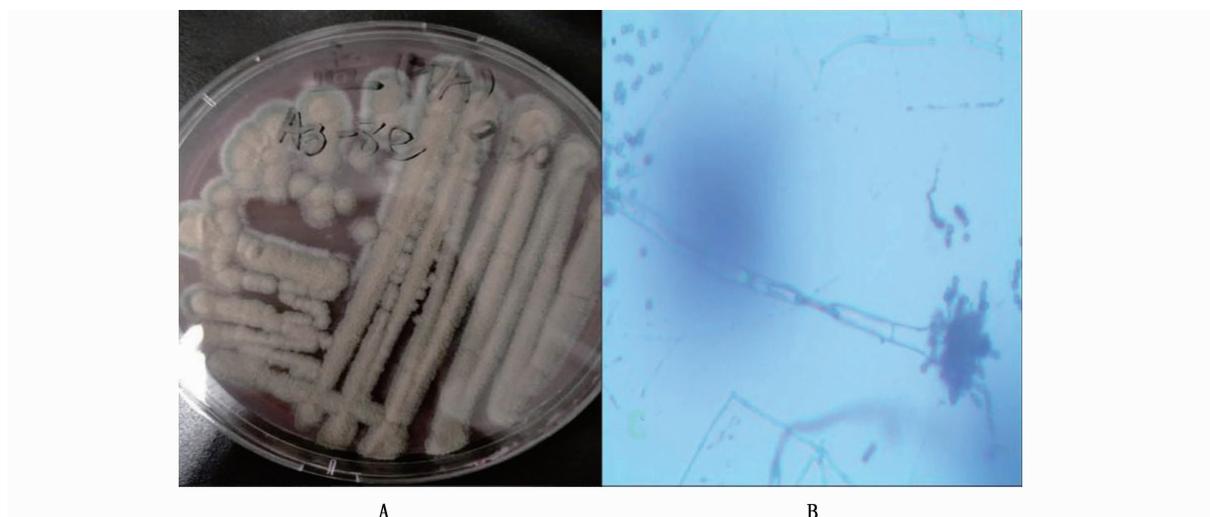


图1 菌落图(A)和光学显微镜图(B)

Fig. 1 Colony map (A) and optical microscope diagram (B)

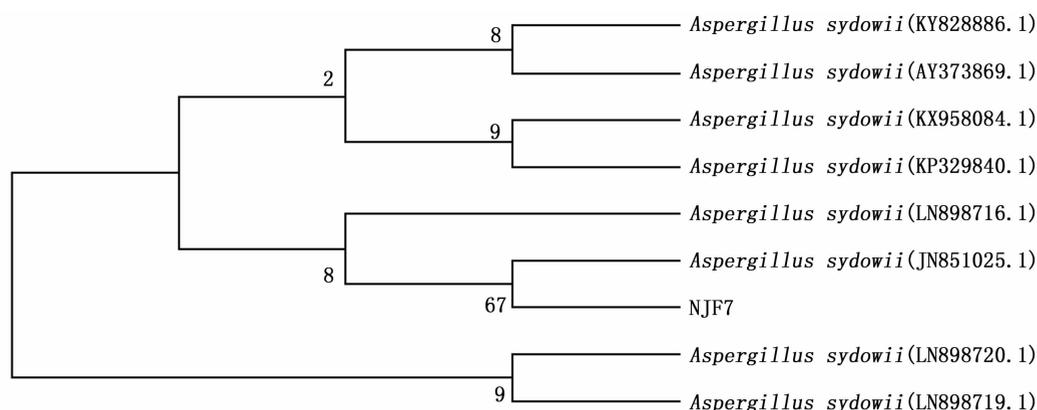


图2 基于菌株 NJF7 及其相应模式菌株的 18S rDNA 构建的系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 18S rDNA gene sequence for the position of strain NJF7

化合物 1: 浅黄色粉末, HR-ESI-MS 谱得出准分子离子峰  $m/z$  261.117 7 ( $[M+H]^+$ , 计算值为 261.116 1), 提示其分子式为  $C_{14}H_{16}N_2O_3$ 。 $^1H$ -NMR (pyr, 600 MHz) 数据如下:  $\delta_H$  1.53 (m, 2H), 1.81 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 3.29 (dd,  $J=14.7, 6.3$  Hz, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.58 (m, 3H), 4.09 (t,  $J=8.0, 8.5$  Hz, 1H), 4.52 (t,  $J=5.2, 5.5$  Hz, 1H), 7.08 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 7.39 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H), 8.58 (s, 1H)。该化合物数据与文献[23]报道一致, 因此化合物 1 结构鉴定为环(脯氨酸-酪氨酸)。

化合物 2: 浅黄色粉末, HR-ESI-MS 谱得出准分子离子峰  $m/z$  350.149 9 ( $[M+H]^+$ , 计算值为 350.146 0), 提示其分子式为  $C_{20}H_{19}N_3O_3$ 。 $^1H$ -

NMR ( $CD_3OD$ , 600 MHz) 数据如下:  $\delta_H$  2.61 (dd,  $J=13.4, 6.3$  Hz, 1H), 2.83 (dd,  $J=14.5, 5.7$  Hz, 1H), 3.03 (dd,  $J=14.7, 4.1$  Hz, 1H), 3.51 (dd,  $J=11.4, 6.6$  Hz, 1H), 3.58 (m, 1H), 3.65 (m, 3H), 3.90 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 6.60 (m, 2H), 7.04 (s, 1H), 7.07 (m, 1H), 7.13 (m, 1H), 7.17 (m, 3H), 7.35 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.60 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H)。该化合物数据与文献[24]报道一致, 因此化合物 2 结构鉴定为环(色氨酸-酪氨酸)。

化合物 3: 黄色油状物, HR-ESI-MS 谱得出准分子离子峰  $m/z$  245.127 9 ( $[M+H]^+$ , 计算值为 245.121 2), 提示其分子式为  $C_{14}H_{16}N_2O_2$ 。 $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ , 600 MHz) 数据如下:  $\delta_H$  1.25 (m,

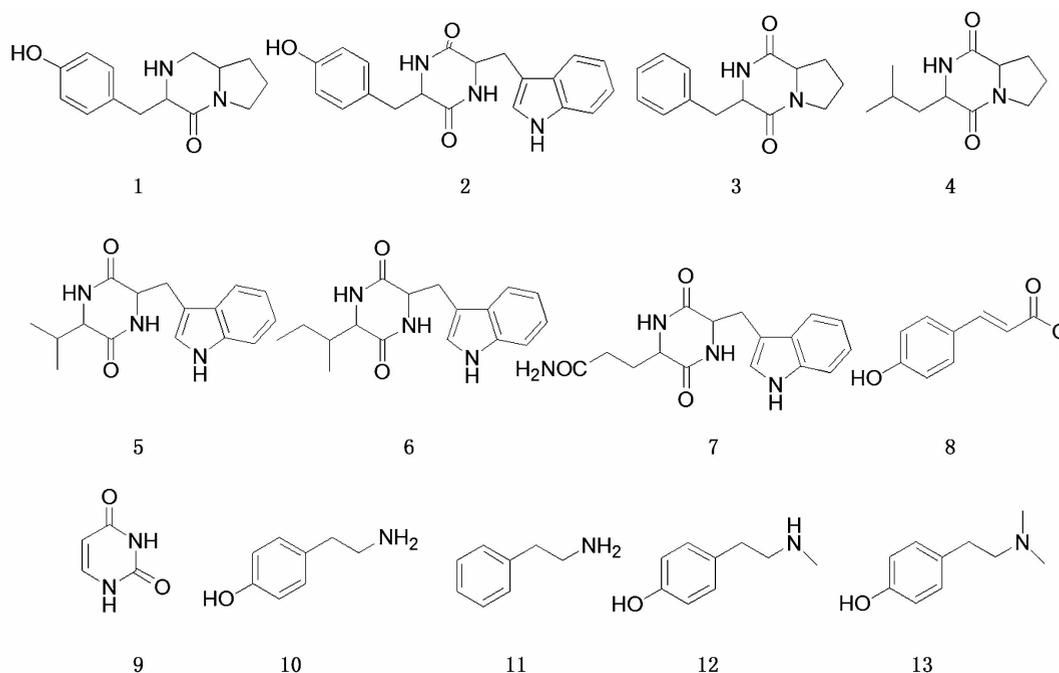


图3 从NJF7中分离得到的化合物结构式

Fig. 3 Structure formulas of compounds isolated from NJF7

1H), 1.82(m, 2H), 2.11(m, 1H), 3.18(m, 2H), 3.38(m, 1H), 3.55(m, 1H), 4.08(m, 1H), 4.46(m, 1H), 7.46(m, 5H)。该化合物数据与文献[25]报道一致,因此化合物3结构鉴定为环(脯氨酸-苯丙氨酸)。

化合物4:黄色胶状物,HR-ESI-MS谱得出准分子离子峰  $m/z$  211.1419 ( $[M+H]^+$ , 计算值为211.1402),提示其分子式为  $C_{11}H_{18}N_2O_2$ 。 $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ , 400 MHz)数据如下: $\delta_H$ 0.97(m, 6H), 1.56(m, 1H), 1.67(m, 1H), 1.77(m, 1H), 1.92(m, 2H), 2.02(m, 1H), 2.33(m, 2H), 3.48(m, 1H), 3.56(m, 1H), 3.83(dd,  $J=9.7, 6.0$  Hz, 1H), 4.26(m, 1H)。该化合物数据与文献[26]报道一致,因此化合物4结构鉴定为环(缬氨酸-脯氨酸)。

化合物5:黄褐色无定型粉末,HR-ESI-MS谱得出准分子离子峰  $m/z$  286.1552 ( $[M+H]^+$ , 计算值为286.1511),提示其分子式为  $C_{16}H_{19}N_3O_2$ 。 $^1H$ -NMR ( $D_2O$ , 600 MHz)数据如下: $\delta_H$ 0.13(d,  $J=7.3$  Hz, 2H), 0.69(d,  $J=7.3$  Hz, 2H), 1.33(m, 1H), 3.34(dd,  $J=15.1, 5.3$  Hz, 1H), 3.43(s, 2H), 3.54(dd,  $J=15.0, 5.4$  Hz, 1H), 3.77(m, 3H), 4.56(td,  $J=4.6, 1.7$

Hz, 1H), 7.24(m, 1H), 7.29(m, 2H), 7.55(d,  $J=9.3$  Hz, 1H), 7.74(d,  $J=6.7$  Hz, 1H)。该化合物数据与文献[27]报道一致,因此化合物5结构鉴定为环(缬氨酸-色氨酸)。

化合物6:浅黄色粉末,HR-ESI-MS谱得出准分子离子峰  $m/z$  300.1841 ( $[M+H]^+$ , 计算值为300.1667),提示其分子式为  $C_{17}H_{21}N_3O_2$ 。 $^1H$ -NMR (pyr, 600 MHz)数据如下: $\delta_H$ 0.83(t,  $J=7.3, 7.5$  Hz, 3H), 1.10(d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 1.18(m, 1H), 1.56(m, 1H), 2.15(m, 1H), 3.72(dd,  $J=14.5, 8.1$  Hz, 1H), 3.95(dd,  $J=14.5, 4.6$  Hz, 1H), 4.19(s, 1H), 4.77(m, 1H), 7.28(d,  $J=1.1$  Hz, 1H), 7.33(m, 1H), 7.53(s, 1H), 7.60(m, 1H), 8.11(d,  $J=8.1$  Hz, 1H), 9.10(d,  $J=26.0$  Hz, 2H), 11.98(s, 1H)。该化合物数据与文献[27-28]报道一致,因此化合物6结构鉴定为环(异亮氨酸-色氨酸)。

化合物7:浅黄色粉末,HR-ESI-MS谱得出准分子离子峰  $m/z$  315.1693 ( $[M+H]^+$ , 计算值为315.1412),提示其分子式为  $C_{16}H_{18}N_4O_3$ 。 $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ , 600 MHz)数据如下: $\delta_H$ 0.98(m, 1H), 1.50(m, 1H), 1.70(m,

1H), 1.99(m, 1H), 3.29(m, 1H), 3.48(m, 1H), 4.02(m, 1H), 4.43(m, 1H), 7.03(m, 1H), 7.11(m, 2H), 7.35(dt,  $J=8.2, 0.8$  Hz, 1H), 7.59(dt,  $J=8.0, 0.9$  Hz, 1H)。该化合物数据比文献[29]报道的环(天门冬酰胺-色氨酸)的数据多一个亚甲基信号,因此化合物7结构鉴定为环(谷氨酰胺-色氨酸)。

化合物8:白色粉末,<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O, 600 MHz)数据如下: $\delta_H$ 3.43(s, 2H), 6.48(d,  $J=17.2$  Hz, 1H), 7.02(m, 2H), 7.64(m, 3H)。该化合物数据与文献[30]报道一致,因此化合物8结构鉴定为对羟基肉桂酸甲酯。

化合物9:浅黄色针状结晶,与标准品作对照鉴定化合物为尿嘧啶。

化合物10:黄色无定形粉末,HR-ESI-MS谱得出准分子离子峰  $m/z$  138.0899 ( $[M+H]^+$ , 计算值为 138.0874), 提示其分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO。<sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)数据如下: $\delta_H$ 2.53(t,  $J=7.7, 7.6$  Hz, 1H), 2.80(t,  $J=7.6, 7.7$  Hz, 1H), 6.69(m, 1H), 7.02(m, 1H)。该化合物数据与文献[31]报道一致,因此化合物10结构鉴定为对羟基苯乙胺。

化合物11:黄色油状物,HR-ESI-MS谱得出准分子离子峰  $m/z$  122.0966, ( $[M+H]^+$ , 计算值为 122.0964), 提示其分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)数据如下: $\delta_H$ 2.71(m, 1H), 2.98(t,  $J=7.7, 8.0$  Hz, 1H), 7.23(m, 1H), 7.31(m, 1H)。该化合物数据与文献[32]报道一致,因此化合物11结构鉴定为苯乙胺。

化合物12:白色粉末,<sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)数据如下: $\delta_H$ 2.56(t,  $J=7.7, 7.5$  Hz, 1H), 2.80(t,  $J=7.7, 7.7$  Hz, 1H), 3.62(s, 1H), 6.67(d,  $J=8.1$  Hz, 1H), 7.00(d,  $J=8.6$  Hz, 1H)。该化合物数据与文献[33]报道一致,因此化合物12结构鉴定为N-甲基酪胺。

化合物13:无色针状晶体,<sup>1</sup>H-NMR(pyr, 600 MHz)数据如下: $\delta_H$ 2.82(t,  $J=7.9, 7.5$  Hz, 1H), 3.08(t,  $J=7.7, 7.7$  Hz, 1H), 3.57(s, 3H), 7.10(d,  $J=9.4$  Hz, 1H), 7.26(d,  $J=5.7$  Hz, 1H)。该化合物数据与文献[34]报道一致,因此化合物13结构鉴定为大麦芽碱。

### 3 讨论

曲霉 NJF7 是本课题组在南极大磷虾肠道微

生物中分离到的第一株真菌,从其发酵液提取物中鉴定了13个代谢产物结构,化合物结构类型包含二酮哌嗪(1~7)、芳香酸(8)、生物碱类(9~13)。化合物7环(谷氨酰胺-色氨酸)(天然成分)首次从曲霉属真菌中分离。环肽作为天然产物的一类,通常单独存在或嵌入在更大、更复杂的结构中,在真菌、细菌、海洋海绵和植物中的次级代谢产物中都有获得<sup>[35]</sup>。环肽类化合物由于具有抗肿瘤、抗菌、抗真菌等生物活性而备受研究者关注<sup>[29]</sup>。例如化合物2对L-929、K-562和HeLa细胞系具有较弱的抗增殖和细胞毒作用<sup>[23]</sup>。目前已发现的上百个环肽类化合物绝大部分来自于海洋生物,其中海洋微生物所产生的一些特殊环肽显示出很好的抗肿瘤活性。本研究获得的芳香酸和生物碱类化合物也表现出良好的活性,例如化合物12可以刺激胃泌素的释放,在低剂量(25  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )时就可获得最大的释放活性<sup>[33]</sup>。后期对化合物7的活性将继续探讨。

但是,通过对NJF7次级代谢产物的研究,发现目前鉴定的次级代谢产物种类少、结构单一、新颖性不足,结构比较复杂的化合物未能被获得,因此未进一步开展化合物的活性筛选。这可能由于本实验只使用了YPD一种发酵培养基且培养条件比较简单的缘故。后期将从培养基种类以及培养条件进行优化,以期得到较为新颖、具有较好生物活性的化合物乃至具有新药开发前景的天然产物。RUI等<sup>[27]</sup>在海绵中结合宏基因组学的方法分离到11个环肽成分,在以后的研究中可以考虑首先通过宏基因组学对样品中具有生物活性的小分子进行预估,以节省分离时间,提高分离效率。

### 参考文献:

- [1] 陈雪忠,徐兆礼,黄洪亮. 南极大磷虾资源利用现状与中国的开发策略分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 451-457.  
CHEN X Z, XU Z L, HUANG H L. Development strategy on Antarctic krill resource utilization in China [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(3): 451-457.
- [2] HAIDER J, MAJEED H, WILLIAMS P A, et al. Formation of chitosan nanoparticles to encapsulate krill oil (*Euphausia superba*) for application as a

- dietary supplement [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017 (63): 27–34.
- [3] TOU J C, JACZYNSKI J, CHEN Y C. Krill for human consumption: Nutritional value and potential health benefits [J]. *Nutrition Reviews*, 2007, 65 (2): 63–77.
- [4] FAN Y, LI Z, XUE Y, *et al.* Identification of volatile compounds in Antarctic krill (*Euphausia superba*) using headspace solid-phase microextraction and GC-MS [J]. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20(sup1): S820–S829.
- [5] YIN L, JIANG X, FAN Y, *et al.* Preparation, gel electrophoresis analysis, and nutritional evaluation of a functional krill protein concentrate with low fluoride level from Antarctic krill (*Euphausia superba*) [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2017, 26(8): 958–968.
- [6] ZHENG W, WANG X, CAO W, *et al.* E-configuration structures of EPA and DHA derived from *Euphausia superba* and their significant inhibitive effects on growth of human cancer cell lines in vitro [J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 2017, 117: 47–53.
- [7] XIA G, ZHAO Y, YU Z, *et al.* Phosphorylated peptides from Antarctic krill (*Euphausia superba*) prevent estrogen deficiency induced osteoporosis by inhibiting bone resorption in ovariectomized rats [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(43): 9550–9557.
- [8] PARK SY, JE JY, KANG N, *et al.* Antihypertensive effects of Ile-Pro-Ile-Lys from krill (*Euphausia superba*) protein hydrolysates: Purification, identification and in vivo evaluation in spontaneously hypertensive rats [J]. *European Food Research and Technology*, 2017, 243(4): 719–725.
- [9] HARVEY A L, EDRADA-EBEL R A, QUINN R J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(2): 111–129.
- [10] KLEIGREWE K, GERWICK L, DAVID H, *et al.* Unique marine derived cyanobacterial biosynthetic genes for chemical diversity [J]. *Natural Product Reports*, 2016(33): 348–364.
- [11] WANG Y, KUANG Z, YU X, *et al.* The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock [J]. *Science*, 2017, 357 (6354): 912–916.
- [12] YUAN L, LI L, TIAN X, *et al.* Biodiversity and phylogenetic analysis of the gut microbiome of *Euphausia superba* Dana from the Rose Sea of the Antarctic Ocean [J]. *Advances in Polar Science*, 2016, 27(1): 48–55.
- [13] YANG Q, ZHANG X L. Taxonomic identification and bioactivity screening of the symbiotic bacteria strains of *Euphausia superba* from Antarctic Ocean [J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2013 (295): 173–177.
- [14] WANG C, TIAN X Q, YANG Q, *et al.* Diversity of secondary metabolites from two Antarctic microbes *Rhodococcus* sp. NJ-008 and *Pseudomonas* sp. NJ-011 [J]. *Open Journal of Marine Science*, 2014, 4 (3): 214–220.
- [15] 张晓玲, 杨 桥, 樊成奇, 等. 一株南极大磷虾共附生细菌的分离鉴定及一氧化氮靶向抑制活性筛选 [J]. *海洋渔业*, 2011, 33(4): 436–441.
- ZHANG X L, YANG Q, FAN C Q, *et al.* Isolation, identification and screening of nitric oxide targeted inhibition bioactivity of a symbiotic/epiphytic bacterium from *Euphausia superba* [J]. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 436–441.
- [16] 樊成奇, 杨 桥, 田晓清, 等. 一种冰冻南极大磷虾总虾青素的快速低温提取方法 [P]. 2011, 中国, ZL2011102013411.1.
- FAN C Q, YANG Q, TIAN X Q, *et al.* A rapid low-temperature extraction method of total astaxanthin from frozen Antarctic Krill [P]. 2011, China, ZL2011102013411.1.
- [17] LI L Z, TIAN X Q, TANG Y Y. Isolation and identification cultivable microbes from the Antarctic krill (*Euphausia superba*) and other Antarctic samples [J]. *International Journal of Ecology*, 2018, 7(1): 29–36.
- [18] 丁 壮, 李德海, 顾谦群, 等. 极地微生物次级代谢产物及其活性研究进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(1): 6–13
- DING Z, LI D H, GU Q Q, *et al.* Research progress of polar microorganisms secondary metabolites and their bioactivities [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2014, 39(1): 6–13

- [19] 张初署, 刘 阳, 邢福国, 等. 七种培养基对黄曲霉分离效果的比较[J]. 核农学报, 2013, 27(02):208-212.  
ZHANG C S, LIU Y, XING F G, *et al.* The effect comparison of seven kinds of culture medium to *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27(2):208-212.
- [20] 张新军. 极小种群野生植物大树杜鹃的形态解剖特征及内生真菌多样性研究[D]. 昆明: 云南大学, 2015.  
ZHANG X J. Studies on the anatomical characteristic and endophytic fungi diversity of the wild plants with extremely small populations *Rhododendron protistum* var. *giganteum* [D]. Kunming: Yunnan University, 2015.
- [21] 孙晶晶, 刘 阳, 邢福国. 曲霉属真菌的分类鉴定方法[C]. 农产品质量安全与现代农业发展专家论坛论文集, 2011.  
SUN J J, LIU Y, XING F G. Classification and identification methods of *Aspergillus* [C]. Proceedings of the Expert Forum on Quality and Safety of Agricultural Products and Modern Agricultural Development, 2011.
- [22] 姚 粟, 李 辉, 程 池. 23株曲霉属菌种的形态学复核鉴定研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(12):37-43.  
YAO L, LI H, CHENG C. Studies oil identification of 23 *Aspergillus* sp. strains in morphology [J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(12):37-43.
- [23] JAYATILAKE G S, THORNTON M P, LEONARD A C, *et al.* Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Natural Products, 1996, 59(3):293-296.
- [24] VENETA I, HARTMUT L, MARIANA K, *et al.* Structure elucidation of a new natural diketopiperazine from a *Microbispora aerata* strain isolated from Livingston Island, Antarctica [J]. Natural Product Research, 2013, 27(2):164-170.
- [25] YIN W Q, LIN Y C, ZHOU S N, *et al.* The cyclopeptides from marine fungus 2516 from the South China Sea [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2002, 41(4):56-58.
- [26] 王 成. 几株南极微生物的代谢产物多样性和化学成分研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.  
WANG C. Studies on the diversity and chemical constituents of metabolites of several Antarctic microorganisms [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [27] RUI H, WANG B, WAKIMOTO T, *et al.* Cyclodipeptides from metagenomic library of a Japanese marine sponge [J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2013, 24(12):1926-1932.
- [28] 韩文菊, 卢小玲, 许强芝, 等. 海洋芽孢杆菌次生代谢产物的分离、鉴定及生物学活性的初步研究[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(10):1234-1238.  
HAN W J, LU X L, XU Q Z, *et al.* Isolation, identification and biological characterization of secondary metabolites produced by a marine *bacillus subtilis* [J]. Journal of the Second Military Medical University, 2008, 29(10):1234-1238.
- [29] 孟旭鹏, 田 黎, 林文翰, 等. 海洋细菌 *Roseobacter* sp. 发酵液中化学成分的研究[J]. 中国海洋药物, 2009(2):6-10.  
MENG X P, TIAN L, LIN W H, *et al.* Studies on the chemical constituents of fermentation liquid from marine bacteria *Roseobacter* sp. [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2009(2):6-10.
- [30] 冯 宁, 卢成淑, 南 国, 等. 梔子花的化学成分研究[J]. 中草药, 2016, 47(2):200-203.  
FENG N, LU C S, NAN G, *et al.* Chemical constituents from flowers of *gardenia jasminoides* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drug, 2016, 47(2):200-203.
- [31] 张建同. 海鞘降血脂有效部位的利用技术研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.  
ZHANG J T. The study on utilization technology of anti-hyperdemic extracts from ascidians [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [32] AL-YAHYA M A, AL-REHAILA A J, AHMAD M S, *et al.* New alkaloids from *Haplophyllum tuberculatum* [J]. Journal of Natural Products, 1992, 55(7):899-903.
- [33] YOKOO Y, KOHDA H, KUSUMOTO A, *et al.* Isolation from beer and structural determination of a potent stimulant of gastrin release [J]. Alcohol & Alcoholism, 1999, 34(2):161.

- [34] SHABANA M, GONAIID M, SALAMA M M, *et al.* Phenylalkylamine alkaloids from *Stapelia hirsuta* L. [J]. *Natural Product Research*, 2006, 20(8):710 - 714.
- [35] BORTHWICK A D. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products [J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(7): 3641 - 3716.
- [36] 乔玉宝,樊成奇,唐莹莹,等. 2 株海鞘共附生真菌的次生代谢产物研究[J]. *海洋渔业*, 2018, 41(4):487 - 493.
- QIAO Y B, FAN C H, TANG Y Y, *et al.* Secondary metabolites from two strains *Purpureocillium* sp. FBZ - 1 and *Penicillium* sp. BNG - 1[J]. *Marine Fisheries*, 2018, 41(4):487 - 493.

## Isolation of *Aspergillus sydowii* NJF7 from *Euphausia superba* intestines and study on its metabolites

CHANG Junnan<sup>1,4</sup>, LI Lingzhi<sup>1,2</sup>, FAN Chengqi<sup>1,2</sup>, HAN Qinghua<sup>1</sup>, HUANG Hongliang<sup>1,2</sup>,  
MA Liyan<sup>1,2</sup>, LU Yanan<sup>1,2</sup>, LI Yueyue<sup>1,4</sup>, TIAN Xiaoqing<sup>1,3</sup>

- (1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. Key Laboratory of Oceanic and Polar Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 200090, China;
3. Key Laboratory of East China Sea Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 200090, China;
4. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Antarctic krill (*Euphausia superba*) are rich in DHA/EPA, phospholipids, and a variety of active psychrophilic enzymes, etc. Intestinal tract of *E. superba* is an important organ for digestion and absorption. There are numerous intestinal microbiotas with complex structure, which are relative to nutrition metabolism, genetics, development and evolution, immune defense and other important life processes of the host. Some scholars found that there were a large number of new species microorganisms in the intestinal tract of *E. superba*. Then, the secondary metabolites and biological activities of these strains were studied. 48 compounds were identified and found to have various biological activities, such as anti-marine virus, anti-marine pathogen and anti-fouling. Therefore, it is necessary to study the general biology of *Euphausia superba* in order to extremely expand comprehensive utilization of this resource in China. In this study, the secondary metabolites of a valuable fungus strain obtained firstly from *E. superba* were studied. First the fungus strain was isolated by serial dilutions and plate coating method in which different antibiotics were added to Rose Bengal Agar, PDA Broth and YPD Broth selective media. Then the fungi were subjected to batch culture. The metabolites were separated and purified efficiently and rapidly by TLC, column chromatography (normal phase silica gel, C18 silica gel, MCI, Sephadex LH-20 gel) and semi-preparative HPLC, and with combined modern spectroscopic methods (ESI HR MS, 1H-NMR), their structures were identified. The strain was identified as *Aspergillus* sp. NJF7 by the homologies and genetic distances for the ITS region and 18S rDNA-ITS sequence analysis. Thirteen compounds were isolated from *Aspergillus* sp. NJF7, which were elucidated as cyclo (Pro-Tyr) (1), cyclo (try-tyr) (2), cyclo (Pro-Phe) (3), cyclo (Val-Prol) (4), cyclo (Val-Trp) (5), cyclo (Ile-Trp) (6), cyclo (Gln-Trp) (7), methyl p-hydroxycinnamate (8), uracil (9), p-hydroxyphenylethylamine (10), phenylethylamine (11), N-methyltyramine (12), hordenine (13). Among them, compound 7 was isolated as a new natural product for the first time. The bioactivity of cyclopeptides including antitumor, antibacterial and antifungal bioactivities will be further studied. The secondary metabolites of *Aspergillus* sp. NJF7 were mainly aromatic acids, alkaloids, and diketoperazines, and their structures were relatively simple. There were many factors contributing to this result. The fermentation medium used in this experiment was one of the elements. The second was the culture condition. Therefore, in the future, the medium types and culture conditions will be optimized in order to obtain novel compounds with better biological activities and even natural products with prospects for new drug development.

**Keywords:** *Euphausia superba*; Antarctic fungi; secondary metabolites; isolation and purification; identification structures