



# 一株海洋真菌 *Aspergillus jensenii* LW128 的次级代谢产物及其抗菌活性研究

张金新<sup>1,2#</sup>, 段园园<sup>3#</sup>, 毕洪凯<sup>3</sup>, 蔡磊<sup>1,2</sup>, 刘玲<sup>1,2\*</sup>

1 中国科学院微生物研究所 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 南京医科大学基础医学院, 江苏 南京 211166

张金新, 段园园, 毕洪凯, 蔡磊, 刘玲. 一株海洋真菌 *Aspergillus jensenii* LW128 的次级代谢产物及其抗菌活性研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 419-429.

ZHANG Jinxin, DUAN Yuanyuan, BI Hongkai, CAI Lei, LIU Ling. Secondary metabolites of the marine-derived *Aspergillus jensenii* LW128 and the antibacterial activity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 419-429.

**摘要:**【目的】研究一株西北太平洋深海沉积物来源真菌 *Aspergillus jensenii* LW128 的次级代谢产物及其抗菌活性。【方法】利用硅胶柱色谱(silica gel column chromatography)、凝胶柱色谱(Sephadex LH-20 column chromatography)和反相高效液相色谱(reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)等方法对菌株的发酵粗提物进行分离纯化得到单体化合物;将核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)、质谱(mass spectrometry, MS)数据与相关文献报道数据进行比对后确定化合物结构;采用肉汤微量稀释法测定化合物的抗菌活性。【结果】从海洋真菌 *Aspergillus jensenii* LW128 中分离并鉴定了 10 个已知化合物, 分别为 diorcinol D (1)、diorcinol K (2)、diorcinol I (3)、(+)-(7S)-7-O-methylsydonic acid (4)、(+)-sydonic acid (5)、pseudaboydin B (6)、anthraquinone aversin (7)、6,8-di-O-methylnidurufin (8)、5-methoxysterigmatocystin (9)和 sterigmatocystin (10); 抗菌活性测试结果表明, 化合物 1、2 和 3 具有一定的抑菌作用。【结论】*Aspergillus jensenii* LW128 具有被开发成抗菌药物的潜力。

**关键词:** 海洋真菌; 次级代谢产物; 抗菌活性

资助项目: 国家自然科学基金(32022002); 国际海底区域资源研究开发项目前沿性课题(DY125-22-QY-33)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32022002) and the Program of China Ocean Mineral Resources Research and Development Association (DY125-22-QY-33).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. Tel: +86-10-64807043, E-mail: liul@im.ac.cn

Received: 2022-05-11; Accepted: 2022-07-29; Published online: 2022-08-12

## Secondary metabolites of the marine-derived *Aspergillus jensenii* LW128 and the antibacterial activity

ZHANG Jinxin<sup>1,2#</sup>, DUAN Yuanyuan<sup>3#</sup>, BI Hongkai<sup>3</sup>, CAI Lei<sup>1,2</sup>, LIU Ling<sup>1,2\*</sup>

1 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] To study the secondary metabolites of the *Aspergillus jensenii* LW128 isolated from the deep-sea sediment of northwest Pacific and the antibacterial activity. [Methods] Based on silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), secondary metabolites were isolated from the crude extract of the fermentation broth of strain LW128 and purified. Their structures were elucidated on the basis of nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) data, and by comparison with the data of literature. The antibacterial activity of secondary metabolites was evaluated by broth microdilution. [Results] Ten known compounds, diorcinol D (1), diorcinol K (2), diorcinol I (3), (+)-(7*S*)-7-*O*-methylsydonic acid (4), (+)-sydonic acid (5), pseudaboydin B (6), anthraquinone aversin (7), 6,8-di-*O*-methylnidurufin (8), 5-methoxysterigmatocystin (9), and sterigmatocystin (10), were isolated and identified. Compounds 1–3 showed inhibitory effect on the growth of several pathogens. [Conclusion] *Aspergillus jensenii* LW128 can be a potential resource for antibacterial drugs.

**Keywords:** marine-derived fungus; secondary metabolites; antibacterial activity

海洋面积约占全球总面积的 70%，地球物种的 80% 栖息在海洋中。由于海洋具有高压、低温、缺氧和黑暗等极端生态环境特征，导致了海洋生物的多样性及其独特的生物代谢途径，使得海洋生物的次级代谢产物的化学多样性是丰富的，从简单的线性肽和脂肪酸到复杂的生物碱、萜烯和聚酮等<sup>[1-3]</sup>，这些海洋生物次级代谢产物通常显示出较好的抗肿瘤、抗真菌、抗细菌、抑制细胞有丝分裂以及抗氧化等活性<sup>[4-6]</sup>。真菌是地球上最多样化和最丰富的真核生物，生活在海洋环境中的真菌是活性天然产物和新药开发的理想来源。Cephalosporin C 是第一个

分离自海洋真菌的药物<sup>[7]</sup>，环孢素 cyclosporin A 是从海洋真菌 *Trichoderma polysporum* 的发酵产物中分离得到的免疫抑制剂药物<sup>[8]</sup>，之后从海洋真菌中分离得到越来越多的活性代谢产物，例如，Zhu 等从一株海洋曲霉属真菌 *Aspergillus* sp. ZA-01 的粗提物中分离得到 3 个新化合物 aspergixanthenes I–K，其中化合物 aspergixanthone I 对 3 种霍乱弧菌表现出较强的抑制作用，最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 值分别为 1.56、1.56 和 3.12  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[9]</sup>；Park 等对一株海洋曲霉属真菌 *Aspergillus ochraceopetaliformis* 进行代谢产物

研究, 从其发酵粗提物中分离得到 3 个新化合物, 其中化合物 ochraceopetalin 具有新颖骨架且对 K562 和 A549 细胞系具有非常明显的抑制作用,  $IC_{50}$  值分别为 9.5 和 6.8  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[10]</sup>; Yao 等从海洋曲霉属真菌中分离得到 3 个新的环脂肽类化合物 maribasins C-E, 这 3 个化合物对多种植物病原菌的生长具有明显的抑制作用<sup>[11]</sup>。

海洋真菌来源的活性天然产物已经引起了学者的广泛关注, 对后续寻找具有良好活性的药物具有很好的指示作用。本研究以海洋真菌 *Aspergillus jensenii* LW128 为研究对象, 对其次级代谢产物进行分离鉴定, 以期获得具有较好抗菌活性的化合物, 为抗菌药物研发奠定物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

该菌株由中国科学院微生物研究所蔡磊课题组合自西北太平洋深海沉积物, 使用 30% 甘油管保藏于中国科学院微生物研究所-80 °C 冰箱。

#### 1.1.2 培养基

PDA 培养基: 新鲜去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15-20 g, 蒸馏水 1 L。YMG 培养基: 葡萄糖 4 g, 酵母提取物 4 g, 麦芽糖提取物 10 g, 蒸馏水 1 L。大米培养基: 大米 80 g, 蒸馏水 120 mL。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷和甲醇(分析纯, 北京化工厂); 色谱甲醇、色谱乙腈(色谱纯, Fisher Scientific 公司); 旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); 高压灭菌锅(三洋公司); 甲硝唑(批号: C12550319, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 氨苄青霉素(批号: B11000614, 上

海创赛仪器有限公司); DMSO (批号: 196055, 深圳市益百顺科技有限公司); 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); RP-C18 键合硅胶色谱柱(250 mm×9.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Agilent 公司); Sephadex LH-20 凝胶柱(青岛海洋化工有限公司); 反相硅胶(YMC 公司); 正相硅胶(青岛海洋化工厂)。

### 1.2 菌种鉴定

在超净工作台中使用灼烧冷却后的接种环在培养皿上刮取适量菌株 LW128 的菌丝(约为 500 mg)置于无菌的 2 mL 离心管内, 采用 CTAB 法<sup>[12]</sup>进行 DNA 提取。分别采用 ITS1/ITS4<sup>[13]</sup>、Cmd5/Cmd6<sup>[14]</sup>、Bt2a/Bt2b<sup>[15]</sup>和 RPB2-5F2/fRPB2-7cR<sup>[16-17]</sup>引物对 ITS、*CaM*、*BenA* 和 *RPB2* 片段进行扩增, 送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。使用 MEGA 7.0<sup>[18]</sup>对所获得的序列进行质控, 对于双向测序序列进行拼接。采用最大似然法(maximum likelihood, ML)进行多基因系统发育树的构建。使用 RAxML-HPC v. 8.2.7<sup>[19]</sup>, 选用 GTR-GAMMA 模型进行计算, 得到 ML 值最大的系统发育树, 经 1 000 次重复自展(bootstrap)检验获得 ML 树各节点的支持率, 自展支持率 $\geq 50\%$ 认为分支可信。将菌株 LW128 接种到 MEA 和 CYA 培养基上, 于室温下(25±2 °C)培养 10 d 后观察菌落形态, 并测量菌落生长速率。使用普通光学显微镜观察产孢结构和分生孢子的形态, 并测量其大小。

### 1.3 发酵培养

将保藏在冻存管中的菌株 LW128 接种在 PDA 平板上, 然后倒置于 28 °C 恒温培养箱中培养 5 d。在无菌操作台中, 切取约 2 cm<sup>2</sup>的真菌菌块接种至 YMG 培养基(125 mL×2)摇床培养 48 h (28 °C、200 r/min)获得种子液。用移液枪向 20 瓶固体大米培养基中加入 10 mL 种子液, 28 °C 条件下静置培养 30 d。

## 1.4 化合物分离纯化

大米培养基中加入乙酸乙酯超声提取 3 次, 利用旋转蒸发仪减压浓缩得到粗浸膏(15.8 g)。之后使用石油醚/乙酸乙酯(15:1-0:1, 体积比)为流动相进行正相硅胶柱分离, 得到 7 个馏分(Fr. 1-Fr. 7)。Fr. 4 (石油醚:乙酸乙酯=1:1) (2.5 g) 馏分经 ODS 反相硅胶柱层析分离, 甲醇/水梯度洗脱(3:7-10:0, 体积比), 得到 5 个馏分(Fr. 4-1-Fr. 4-5), 其中 Fr. 4-2 (甲醇:水=3:2) (280.0 mg) 经 RP-HPLC (60%-65%乙腈/0.1%甲酸水; 30 min; 2 mL/min) 分离纯化得到 **4** (3.0 mg,  $t_R$  26.1 min) 和 **6** (96.5 mg,  $t_R$  25.1 min)。Fr. 4-3 (甲醇:水=2:3) (30.0 mg) 经 RP-HPLC (60%-65%甲醇/0.1%甲酸水; 30 min; 2 mL/min) 分离纯化得到 **5** (3.8 mg,  $t_R$  11.5 min)。Fr. 4-4 (甲醇:水=7:3) (28.0 mg) 经 RP-HPLC (60%-75%乙腈/0.1%甲酸水; 30 min; 2 mL/min) 分离纯化得到 **7** (2.5 mg,  $t_R$  13.7 min) 和 **8** (1.5 mg,  $t_R$  15.5 min)。Fr. 5 (石油醚:乙酸乙酯=1:2) (1.7 g) 馏分经 ODS 反相硅胶柱层析分离, 甲醇/水梯度洗脱(3:7-10:0, 体积比), 得到 7 个馏分(Fr. 5-1-Fr. 5-7), 其中 Fr. 5-5 (90.5 mg) 经 RP-HPLC (65%-70%乙腈/0.1%甲酸水; 30 min; 2 mL/min) 分离纯化得到 **1** (4.1 mg,  $t_R$  17.8 min)、**2** (1.3 mg,  $t_R$  31.2 min) 和 **3** (2.0 mg,  $t_R$  28.4 min)。Fr. 3 (石油醚:乙酸乙酯=3:1) (0.8 g), 用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析分离, 以甲醇:二氯甲烷 1:1 洗脱, 经 TLC 分析、合并, 得到 5 个馏分 Fr. 3-1-Fr. 3-5。Fr. 3-2 (31.0 mg) 经 RP-HPLC (55%-60%乙腈/0.1%甲酸水; 30 min; 2 mL/min) 得到化合物 **9** (3.0 mg,  $t_R$  17.3 min) 和 **10** (1.7 mg,  $t_R$  19.8 min)。

## 1.5 微量稀释法测试抗菌活性

使用肉汤微量稀释法对分离得到的化合物 **1-10** 进行抗菌活性测试。实验所用致病菌株为幽门螺杆菌 G27 (*Helicobacter pylori* G27)、

三重耐药(耐甲硝唑、克拉霉素和左氧氟沙星)幽门螺杆菌 159 (*H. pylori* 159)、二重耐药(耐克拉霉素和阿莫西林)幽门螺杆菌(*H. pylori* 129) 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)。在 96 孔板中第 1 孔加 188  $\mu$ L 的相应培养基(其中幽门螺杆菌培养应用脑心浸出液培养基(BHI), 金黄色葡萄球菌菌株培养用 M-H 培养基)和 2  $\mu$ L 浓度为 6.4 mg/mL 的化合物母液; 在 96 孔板中进行二倍倍比稀释后, 每孔中加入 10  $\mu$ L 的待测菌液使其菌液浓度为  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  CFU/mL, 使得每孔中的化合物浓度分别为 64、32、16、8、4、2 和 1  $\mu$ g/mL。之后将幽门螺杆菌培养液在 37  $^{\circ}$ C 的微需氧培养箱中培养 3 d, 金黄色葡萄球菌培养液在 37  $^{\circ}$ C 的培养箱中培养 1 d。对培养液进行浑浊度观察, 培养液最澄清时的化合物浓度为该化合物的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC), 甲硝唑和氨苄青霉素作为阳性对照, DMSO 作为阴性对照, 空培养基作空白对照。该实验重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株鉴定

通过构建 ITS、*CaM*、*BenA* 和 *RPB2* 多基因系统发育树发现, 菌株 LW128 在 *Aspergillus* 亚属 *Versicolores* 中与 *Aspergillus jensenii* 的其他 7 个菌株聚类在一起(图 1), 且无明显的分支。基于形态分析(图 2), LW128 菌株在 CYA 培养基室温下培养 10 d 后, 直径达 15-20 mm, 菌落有深沟, 中央下沉, 正面白色, 背面棕色; 在 MEA 培养基室温下培养 10 d 后, 直径达 10-12 mm, 菌落平坦, 正面白色, 背面白色至淡黄色。光学显微镜下, 分生孢子柄顶端有顶囊, 近球形, 梨形至匙形, 直径 5-17  $\mu$ m; 分生孢子球形至近球形, 少数椭圆形至梨形, 壁粗糙,

直径为 2.4–3.7  $\mu\text{m}$ 。与 Jurjevic 等<sup>[20]</sup>关于 *Aspergillus jensenii* 描述的形态结构十分相似, 因此, 结合系统发育分析结果, 最终鉴定菌株 LW128 为 *Aspergillus jensenii*。

## 2.2 结构解析

使用多种色谱方法从菌株 LW128 的发酵粗提物中分离得到 10 个化合物, 通过与文献中

的波谱数据比对确定其结构。化合物 1–10 的化学结构见图 3。

化合物 1: 黄色粉末。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  299.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合其  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据推测其分子式为  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$ , 提示有 9 个不饱和度。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.47 (d,  $J=2.5$  Hz, 1H, H-4), 6.34 (s, 1H, H-2'),

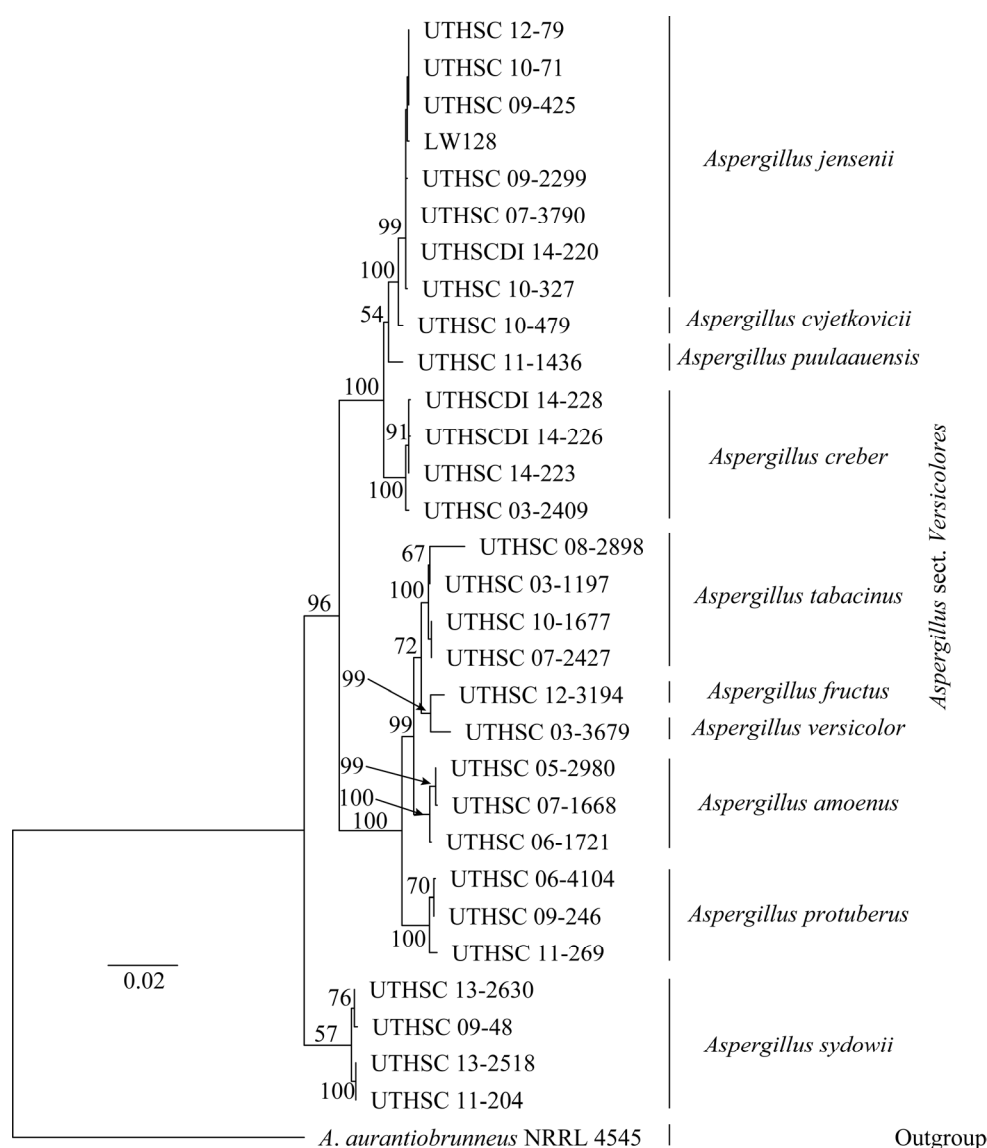


图 1 基于 ITS、*CaM*、*BenA* 和 *RPB2* 基因序列的 *Aspergillus* sect. *Versicolores* 多基因系统发育树  
Figure 1 Maximum likelihood tree of *Aspergillus* sect. *Versicolores* based on ITS, *CaM*, *BenA* and *RPB2* gene sequences. The RAxML bootstrap support values BS above 50% are presented at the nodes. The tree was rooted to *A. aurantiobrunneus* NRRL 4545.

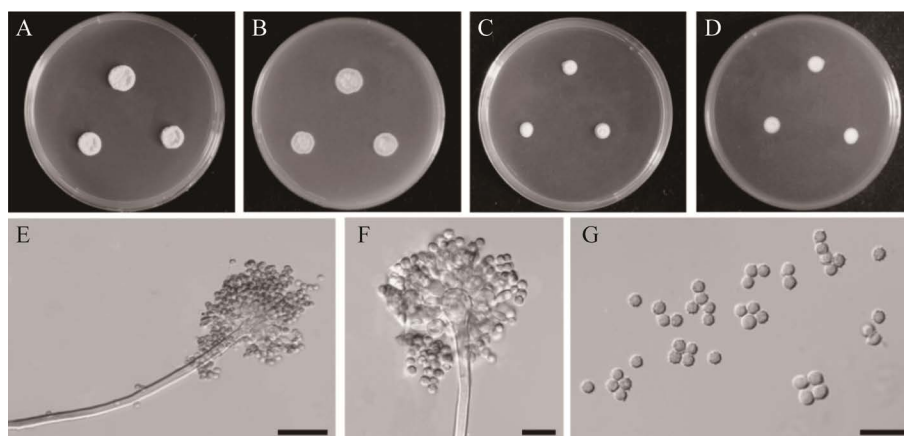


图 2 菌株 LW128 的菌落和显微形态特征

Figure 2 The colony feature and micromorphology of strain LW128. A–D: Surface and reverse of colony on CYA and MEA after 10 days. E–F: Conidiophores and conidiogenous cells. G: Conidia. Scale bars: E–G=10  $\mu\text{m}$ .

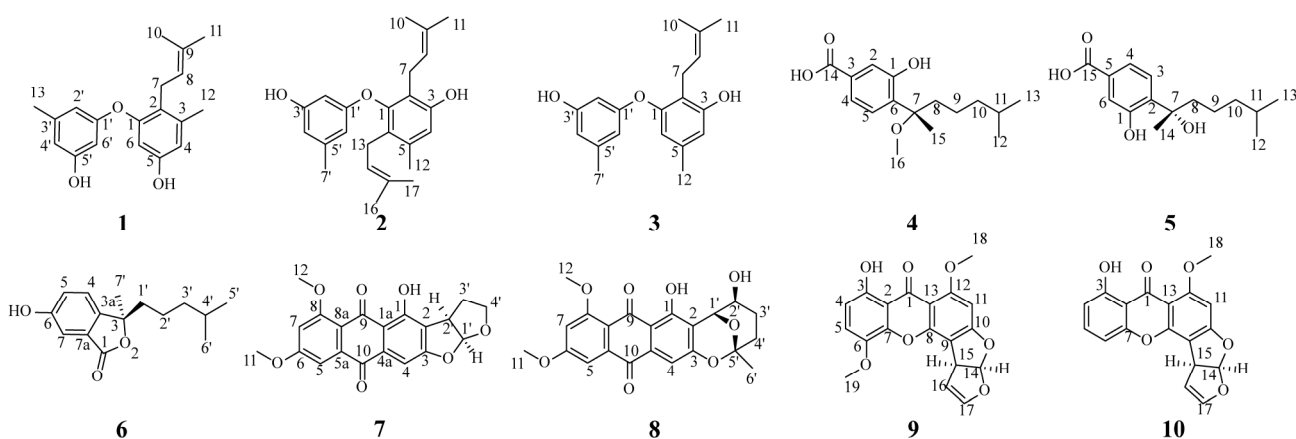


图 3 1–10 化合物结构

Figure 3 Chemical structures of compounds 1–10.

6.31 (s, 1H, H-4'), 6.27 (d,  $J=2.5$  Hz, 1H, H-6), 6.20 (m, 1H, H-6'), 5.04 (m, 1H, H-8), 3.24 (s, 1H, H-7a), 3.23 (s, 1H, H-7b), 2.27 (s, 3H, H-12), 2.24 (s, 3H, H-13), 1.65 (s, 3H, H-11), 1.63 (d,  $J=1.4$  Hz, 3H, H-10).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 159.3 (C-1'), 156.6 (C-5'), 155.0 (C-5), 154.1 (C-1), 140.9 (C-3'), 139.6 (C-3), 131.4 (C-9), 124.4 (C-8), 122.6 (C-2), 113.2 (C-4), 111.1 (C-2'), 110.4 (C-4'), 105.1 (C-6), 102.4 (C-6'), 25.8 (C-10), 25.3 (C-7), 21.6 (C-13), 19.9 (C-12), 17.9 (C-11)。化合物 1 的  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR

谱信号与文献[21]报道基本一致,从而证实化合物 1 为 diorcinol D。

化合物 2: 黄色粉末。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  367.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 结合其  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据推测其分子式为  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_3$ , 提示有 10 个不饱和度。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.58 (s, 1H, H-4), 6.26 (s, 1H, H-4'), 6.17 (s, 1H, H-6'), 6.02 (s, 1H, H-2'), 5.13 (m, 1H, H-8), 4.97 (m, 1H, H-14), 3.19 (d,  $J=7.0$  Hz, 2H, H-13), 3.10 (d,  $J=6.6$  Hz, 2H, H-7), 2.24 (s, 3H, H-12),

2.21 (s, 3H, H-7'), 1.67 (s, 3H, H-16), 1.67 (s, 3H, H-17), 1.58 (s, 3H, H-10), 1.58 (s, 3H, H-11)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 160.0 (C-1'), 156.7 (C-3'), 153.8 (C-3), 150.5 (C-1), 140.7 (C-5'), 136.9 (C-5), 134.9 (C-15), 131.3 (C-9), 125.9 (C-6), 122.7 (C-14), 121.8 (C-8), 118.1 (C-2), 115.1 (C-4), 109.3 (C-4'), 108.5 (C-6'), 99.7 (C-2'), 26.1 (C-17), 25.9 (C-11), 25.8 (C-13), 23.9 (C-7), 21.7 (C-7'), 19.6 (C-12), 17.9 (C-16), 17.9 (C-10)。上述数据经与文献[22]比对, 确定化合物 **2** 为 diorcinol K。

化合物 **3**: 黄色粉末。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  299.1 [M+H]<sup>+</sup>, 结合其 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据推测其分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>, 提示有 9 个不饱和度。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 6.49 (s, 1H, H-4), 6.37 (s, 1H, H-4'), 6.34 (s, 1H, H-6), 6.31 (s, 1H, H-6'), 6.18 (s, 1H, H-2'), 5.21 (m, 1H, H-8), 3.32 (d,  $J=7.1$  Hz, 2H, H-7), 2.25 (s, 3H, H-7'), 2.22 (s, 3H, H-12), 1.73 (s, 3H, H-10), 1.70 (s, 3H, H-11)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 160.0 (C-1'), 156.6 (C-3'), 155.8 (C-3), 154.2 (C-1), 141.0 (C-5'), 138.0 (C-5), 134.9 (C-9), 121.8 (C-8), 116.5 (C-2), 113.7 (C-4), 112.8 (C-6), 110.6 (C-4'), 110.2 (C-6'), 101.8 (C-2'), 25.9 (C-10), 23.0 (C-7), 21.6 (C-7'), 21.3 (C-12), 17.9 (C-11)。该化合物 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 与文献[22]的数据基本一致, 确定该化合物为 diorcinol I。

化合物 **4**: 黄色油状。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  281.1 [M+H]<sup>+</sup>, 结合其 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据推测其分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>, 提示有 5 个不饱和度。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 9.03 (s, 1H, 1-OH), 7.57 (s, 1H, H-2), 7.57 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H, H-4), 7.11 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H, H-5), 3.24 (s, 3H, H-16), 1.85 (m, 1H, H-8a), 1.82 (m, 1H, H-8b), 1.62 (s, 3H, H-15), 1.49 (m, 1H, H-11), 1.33 (m, 2H, H-9), 1.14 (m, 1H, H-9), 1.14 (m, 1H, H-10), 0.82 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H, H-13), 0.82 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H, H-12)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 170.8 (C-14), 156.2 (C-1), 134.0 (C-6), 130.1

(C-3), 127.7 (C-5), 121.4 (C-4), 118.8 (C-2), 83.2 (C-7), 50.8 (C-16), 40.0 (C-8), 39.2 (C-10), 27.9 (C-11), 22.7 (C-12), 22.6 (C-13), 22.3 (C-15), 21.7 (C-9)。以上数据与文献[23]所报道的化合物数据一致, 鉴定化合物 **4** 为 (+)-(7*S*)-7-*O*-methylsydonic acid。

化合物 **5**: 无色油状。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  267.1 [M+H]<sup>+</sup>, 结合其 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据推测其分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>, 提示有 5 个不饱和度。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 7.57 (s, 1H, H-6), 7.54 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H, H-4), 7.08 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H, H-3), 1.93 (m, 1H, H-8b), 1.81 (m, 1H, H-8a), 1.67 (s, 3H, H-14), 1.50 (m, 1H, H-11), 1.30 (m, 2H, H-10), 1.16 (m, 1H, H-9), 0.82 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H, H-13), 0.82 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H, H-12)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 171.1 (C-15), 156.3 (C-1), 135.3 (C-2), 129.9 (C-5), 126.5 (C-3), 121.3 (C-4), 119.5 (C-6), 79.3 (C-7), 43.0 (C-8), 39.1 (C-10), 29.2 (C-14), 27.9 (C-11), 22.7 (C-13), 22.7 (C-12), 21.8 (C-9)。化合物 **5** 的 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 谱信号与文献[24]报道基本一致, 从而证实化合物 **5** 为 (+)-sydonic acid。

化合物 **6**: 白色粉末。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  249.1 [M+H]<sup>+</sup>, 结合其 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据推测其分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>, 提示有 6 个不饱和度。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 9.37 (br s, 1H, 6-OH), 7.56 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H, H-7), 7.52 (dd,  $J=8.1, 1.8$  Hz, 1H, H-5), 7.08 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H, H-4), 1.91 (m, 1H, H-1'a), 1.81 (m, 1H, H-1'b), 1.67 (s, 3H, H-7'), 1.49 (m, 1H, H-4'), 1.30 (m, 2H, H-2'), 1.15 (m, 2H, H-3'), 0.82 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H, H-5'), 0.82 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H, H-6')。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 171.5 (C-1), 156.2 (C-6), 135.4 (C-3a), 129.9 (C-7a), 126.5 (C-4), 121.3 (C-5), 119.5 (C-7), 79.2 (C-3), 43.0 (C-1'), 39.1 (C-3'), 29.1 (C-7'), 27.9 (C-4'), 22.7 (C-5'), 22.6 (C-6'), 21.8 (C-2')。分析其 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据并与文献[25]比对, 确定

化合物 **6** 为 pseudaboydin B。

化合物 **7**: 黄色粉末。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  369.1  $[M+H]^+$ , 结合其  $^1H$  NMR 和  $^{13}C$  NMR 数据推测其分子式为  $C_{20}H_{16}O_7$ , 提示有 13 个不饱和度。 $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 13.51 (s, 1H, 1-OH), 7.46 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H, H-5), 7.23 (s, 1H, H-4), 6.79 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H, H-7), 6.26 (d,  $J=5.7$  Hz, 1H, H-1'), 4.15 (m, 2H, H-4'), 4.03 (s, 3H, H-12), 3.98 (s, 3H, H-11), 3.67 (m, 1H, H-2'), 2.37 (m, 1H, H-3'a), 2.27 (m, 1H, H-3'b)。  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 187.3 (C-9), 182.7 (C-10), 165.3 (C-3), 165.2 (C-6), 163.0 (C-8), 160.4 (C-1), 137.7 (C-5a), 135.0 (C-4a), 120.3 (C-2), 115.1 (C-8a), 113.1 (C-1'), 112.8 (C-1a), 105.0 (C-7), 104.3 (C-5), 101.4 (C-4), 67.9 (C-4'), 56.8 (C-12), 56.2 (C-11), 44.6 (C-2'), 30.9 (C-3')。将上述数据与文献[26]比对, 鉴定化合物 **7** 为 anthraquinone aversin。

化合物 **8**: 红色粉末。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  413.1  $[M+H]^+$ , 结合其  $^1H$  NMR 和  $^{13}C$  NMR 数据推测其分子式为  $C_{22}H_{20}O_8$ , 提示有 13 个不饱和度。 $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 13.59 (s, 1H, 1-OH), 7.46 (d,  $J=2.5$  Hz, 1H, H-5), 7.22 (s, 1H, H-4), 6.79 (d,  $J=2.5$  Hz, 1H, H-7), 5.25 (s, 1H, H-2'), 4.06 (s, 1H, H-1'), 4.02 (s, 3H, H-11), 3.98 (s, 3H, H-12), 2.20 (m, 1H, H-4'a), 1.95 (m, 1H, H-4'b), 1.73 (m, 1H, H-3'), 1.63 (s, 3H, H-6')。  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 186.9 (C-9), 182.7 (C-10), 165.2 (C-6), 163.0 (C-8), 160.0 (C-1), 159.4 (C-3), 137.77 (C-5a), 133.3 (C-4a), 115.3 (C-2), 114.9 (C-8a), 110.2 (C-1a), 107.4 (C-4), 105.1 (C-7), 104.2 (C-5), 101.0 (C-5'), 71.5 (C-2'), 65.4 (C-1'), 56.8 (C-11), 56.2 (C-12), 31.1 (C-4'), 27.8 (C-6'), 23.4 (C-3')。以上数据与文献[26]基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为 6,8-di-*O*-methylnidurufin。

化合物 **9**: 黄色针状。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  355.1  $[M+H]^+$ , 结合其  $^1H$  NMR 和  $^{13}C$  NMR 数据推测其分子式为  $C_{19}H_{14}O_7$ , 提

示有 13 个不饱和度。 $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 12.61 (s, 1H, 3-OH), 7.20 (d,  $J=8.9$  Hz, 1H, H-5), 6.94 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H, H-14), 6.69 (d,  $J=8.9$  Hz, 1H, H-4), 6.50 (t,  $J=2.5$  Hz, 1H, H-17), 6.46 (s, 1H, H-11), 5.52 (t,  $J=2.5$  Hz, 1H, H-16), 4.88 (dt,  $J=7.2, 2.5$  Hz, 1H, H-15), 4.00 (s, 3H, H-18), 3.94 (s, 1H, H-19)。  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 181.5 (C-1), 164.8 (C-10), 163.5 (C-12), 155.4 (C-3), 154.2 (C-7), 145.4 (C-17), 144.9 (C-8), 139.6 (C-6), 120.6 (C-6), 113.5 (C-14), 109.8 (C-4), 109.7 (C-2), 107.0 (C-9), 106.3 (C-13), 102.8 (C-16), 90.8 (C-11), 57.9 (C-19), 57.0 (C-18), 48.3 (C-15)。化合物 **9** 的核磁数据与文献[26]的报道一致, 确定化合物 **9** 为 5-methoxysterigmatocystin。

化合物 **10**: 白色固体。根据 ESI-MS 显示其分子离子峰  $m/z$  325.1  $[M+H]^+$ , 结合其  $^1H$  NMR 和  $^{13}C$  NMR 数据推测其分子式为  $C_{18}H_{12}O_6$ , 提示有 13 个不饱和度。 $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 13.22 (s, 1H, 3-OH), 7.50 (t,  $J=8.3$  Hz, 1H, H-5), 6.84 (m, 1H, H-14), 6.83 (m, 1H, H-6), 6.76 (dd,  $J=8.3, 0.9$  Hz, 1H, H-4), 6.51 (dd,  $J=2.8, 2.1$  Hz, 1H, H-15), 6.44 (s, 1H, H-11), 5.45 (t,  $J=2.6$  Hz, 1H, H-16), 4.81 (dt,  $J=7.2, 2.3$  Hz, 1H, H-17), 4.00 (s, 1H, H-18)。  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 181.6 (C-1), 164.8 (C-10), 163.5 (C-12), 162.5 (C-3), 155.1 (C-7), 154.2 (C-8), 145.6 (C-15), 135.9 (C-5), 113.4 (C-14), 111.4 (C-4), 109.2 (C-2), 106.7 (C-9), 106.1 (C-13), 106.1 (C-6), 102.7 (C-16), 90.7 (C-11), 57.0 (C-18), 48.2 (C-17)。综合其核磁数据与文献[27]对比, 确定化合物 **10** 为 sterigmatocystin。

### 2.3 体外抗菌活性

使用肉汤微量稀释法对得到的化合物 **1-10** 进行体外的抗菌活性测试。化合物 **1** 对菌株 *H. pylori* G27、*H. pylori* 159 和 *S. aureus* ATCC 25923 的生长表现出一定的抑制作用, MIC 值分别为 16、16 和 4  $\mu g/mL$ ; 化合物 **2** 对 *S. aureus* ATCC 25923 的生长具有抑制作用, MIC 值为



8  $\mu\text{g/mL}$ ; 化合物 **3** 对 *S. aureus* ATCC 25923 也存在抑制作用, MIC 值为 16  $\mu\text{g/mL}$ ; 其余化合物对被试菌株没有表现出明显的抑制作用。菌株 *H. pylori* G27、*H. pylori* 159 和 *H. pylori* 129 的阳性对照为甲硝唑, MIC 值分别为 2、32 和 4  $\mu\text{g/mL}$ ; *S. aureus* ATCC 25923 的阳性对照为氨苄青霉素, MIC 值为 0.125  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 3 讨论与结论

本研究对一株分离自西北太平洋深海沉积物中的真菌 *Aspergillus jensenii* LW128 的次级代谢产物及抗菌活性进行研究。通过硅胶柱层析、凝胶柱层析和高效液相色谱等分离纯化技术从其大米发酵粗提物中分离得到 10 个单体化合物, 其中化合物 **6** 是首次从曲霉属中分离得到。根据文献报道多个化合物具有抗菌活性: 化合物 **1** 对白色念珠菌、化脓性链球菌和金黄色葡萄球菌的生长具有一定的抑制作用<sup>[28-30]</sup>, 对 HeLa 和 K562 细胞具有一定的抗增殖活性<sup>[21]</sup>; 化合物 **2** 对金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌具有显著的抑菌活性<sup>[22]</sup>; 化合物 **3** 对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的生长具有抑制作用<sup>[22,30]</sup>; 化合物 **5** 对多种致病菌的生长具有抑制作用<sup>[31-33]</sup>; 化合物 **7** 具有抑制枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的作用<sup>[26]</sup>; 化合物 **9** 具有抑制巨大芽孢杆菌和大肠杆菌的作用<sup>[29]</sup>。本研究对分离得到的 10 个单体化合物进行了多种致病菌的抗菌活性测试, 发现化合物 **1** 对幽门螺杆菌 *H. pylori* G27、三重耐药幽门螺杆菌 *H. pylori* 159 和 *S. aureus* ATCC 25923 的生长均具有抑制作用, 且是首次报道其对幽门螺杆菌的抑制能力; 化合物 **2** 和 **3** 均具有抑制金黄色葡萄球菌 *S. aureus* ATCC 25923 生长的能力, 推测是芳香环上取代基的位置不

同导致了活性的差异, 丰富了抑菌天然产物的相关报道。菌株 LW128 相较于活性化合物最初报道菌株, 活性物质更丰富。本研究结果表明海洋来源真菌是活性天然产物的重要来源, 研究海洋真菌对药物先导化合物的发现具有重要意义。

### 参考文献

- [1] CARROLL AR, COPP BR, DAVIS RA, KEYZERS RA, PRINSEP MR. Marine natural products[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(1): 122-173.
- [2] CARROLL AR, COPP BR, DAVIS RA, KEYZERS RA, PRINSEP MR. Marine natural products[J]. Natural Product Reports, 2020, 37(2): 175-223.
- [3] CHOUDHARY A, NAUGHTON LM, MONTÁNCHEZ I, DOBSON ADW, RAI DK. Current status and future prospects of marine natural products (MNPs) as antimicrobials[J]. Marine Drugs, 2017, 15(9): 272.
- [4] CEN SY, JIA J, GE YC, MA YH, LI XY, WEI JH, BAI YF, WU XD, SONG JF, BI HK, WU B. A new antibacterial 3,5-dimethylorsellinic acid-based meroterpene from the marine fungus *Aspergillus* sp. CSYZ-1[J]. Fitoterapia, 2021, 152: 104908.
- [5] NIU SW, XIE CL, XIA JM, LIU QM, PENG GZ, LIU GM, YANG XW. Botryotins A-H, tetracyclic diterpenoids representing three carbon skeletons from a deep-sea-derived *Botryotinia fockeliana*[J]. Organic Letters, 2020, 22(2): 580-583.
- [6] WANG JH, COX DG, DING WJ, HUANG GH, LIN YC, LI CY. Three new resveratrol derivatives from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp.[J]. Marine Drugs, 2014, 12(5): 2840-2850.
- [7] ZAIN UL ARIFEEN M, MA YN, XUE YR, LIU CH. Deep-sea fungi could be the new arsenal for bioactive molecules[J]. Marine Drugs, 2019, 18(1): 9.
- [8] DREYFUSS M, HÄRRI E, HOFMANN H, KOBEL H, PACHE W, TSCHERTER H. Cyclosporin A and C[J]. European Journal of Applied Microbiology, 1976, 3(2): 125-133.
- [9] ZHU A, ZHANG XW, ZHANG M, LI W, MA ZY, ZHU HJ, CAO F. Aspergixanthonones I-K, new anti-*Vibrio* prenylxanthonones from the marine-derived

- fungus *Aspergillus* sp. ZA-01[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(9): 312.
- [10] PARK SC, LEE JH, HWANG JY, KWON OS, LIAO LJ, OH DC, OH KB, SHIN J. Ochraceopetalin, a mixed-biogenetic salt of polyketide and amino acid origins from a marine-derived *Aspergillus ochraceopetaliformis* fungus[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(8): 413.
- [11] YAO FH, LIANG X, CHENG X, LING J, DONG JD, QI SH. Antifungal peptides from the marine gorgonian-associated fungus *Aspergillus* sp. SCSIO41501[J]. *Phytochemistry*, 2021, 192: 112967.
- [12] DOYLE JJ, DOYLE JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19: 11-15.
- [13] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//PCR Protocols[M]. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [14] PETERSON SW, VEGA FE, POSADA F, NAGAI C. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences[J]. *Mycologia*, 2005, 97(3): 659-666.
- [15] GLASS NL, DONALDSON GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1323-1330.
- [16] LIU YJ, WHELEN S, HALL BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(12): 1799-1808.
- [17] SUNG GH, SUNG JM, HYWEL-JONES NL, SPATAFORA JW. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44(3): 1204-1223.
- [18] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [19] STAMATAKIS A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [20] JURJEVIC Z, PETERSON SW, HORN BW. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny[J]. *IMA Fungus*, 2012, 3(1): 59-79.
- [21] GAO HQ, ZHOU LN, CAI SX, ZHANG GJ, ZHU TJ, GU QQ, LI DH. Diorcinols B-E, new prenylated diphenyl ethers from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* ZLN-60[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2013, 66(9): 539-542.
- [22] XU XL, YANG HJ, XU HT, YIN LY, CHEN ZK, SHEN HH. Diphenyl ethers from a marine-derived isolate of *Aspergillus* sp. CUGB-F046[J]. *Natural Product Research*, 2018, 32(7): 821-825.
- [23] TRISUWAN K, RUKACHAISIRIKUL V, KAEWPET M, PHONGPAICHIT S, HUTADILOK-TOWATANA N, PREEDANON S, SAKAYAROJ J. Sesquiterpene and xanthone derivatives from the sea fan-derived fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154[J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(7): 1663-1667.
- [24] 郑彩娟, 邵长伦, 王开玲, 赵栋霖, 王亚楠, 王长云. 一株软珊瑚共附生真菌 *Aspergillus versicolor* (ZJ-2008015)的次级代谢产物及其生物活性研究[J]. *中国海洋药物*, 2012, 31(2): 7-13.
- ZHENG CJ, SHAO CL, WANG KL, ZHAO DL, WANG YN, WANG CY. Secondary metabolites and their bioactivities of a soft coral-derived fungus *Aspergillus versicolor* (ZJ-2008015)[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2012, 31(2): 7-13 (in Chinese).
- [25] LAN WJ, LIU W, LIANG WL, XU Z, LE X, XU J, LAM CK, YANG DP, LI HJ, WANG LY. Pseudoboydins A and B: novel isobenzofuranone derivatives from marine fungus *Pseudallescheria boydii* associated with starfish *Acanthaster planci*[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(7): 4188-4199.
- [26] LIU XB, ZHENG N, LIANG LF, ZHAO DM, QIN YY, LI J, YANG RY. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Fusarium equiseti* and their antibacterial activities[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2019, 55(6): 1141-1144.
- [27] OLEINIKOVA GK, DENISENKO VA, SLINKINA NN, AFIYATULLOV SS. Secondary metabolites of

- the marine fungus *Aspergillus ustus* KMM 4640[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2012, 48(3): 467-469.
- [28] LI Y, CHANG WQ, ZHANG M, LI XB, JIAO Y, LOU HX. Diorecinol D exerts fungicidal action against *Candida albicans* through cytoplasm membrane destruction and ROS accumulation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128693.
- [29] HU SS, JIANG N, WANG XL, CHEN CJ, FAN JY, WURIN G, GE HM, TAN RX, JIAO RH. Prenylated diphenyl ethers from the mantis-associated fungus *Aspergillus versicolor* GH-2[J]. *Tetrahedron Letters*, 2015, 56(25): 3894-3897.
- [30] LI XB, ZHOU YH, ZHU RX, CHANG WQ, YUAN HQ, GAO W, ZHANG LL, ZHAO ZT, LOU HX. Identification and biological evaluation of secondary metabolites from the endolichenic fungus *Aspergillus versicolor*[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2015, 12(4): 575-592.
- [31] LI XD, LI XM, XU GM, ZHANG P, WANG BG. Antimicrobial phenolic bisabolanes and related derivatives from *Penicillium aculeatum* SD-321, a deep sea sediment-derived fungus[J]. *Journal of Natural Products*, 2015, 78(4): 844-849.
- [32] WANG JF, LIN XP, QIN C, LIAO SR, WAN JT, ZHANG TY, LIU J, FREDIMOSSES M, CHEN H, YANG B, ZHOU XF, YANG XW, TU ZC, LIU YH. Antimicrobial and antiviral sesquiterpenoids from sponge-associated fungus, *Aspergillus sydowii* ZSDS1-F6[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2014, 67(8): 581-583.
- [33] CHUNG YM, WEI CK, CHUANG DW, EL-SHAZLY M, HSIEH CT, ASAI T, OSHIMA Y, HSIEH TJ, HWANG TL, WU YC, CHANG FR. An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(13): 3866-3872.