

研究报告

抗副溶血弧菌海洋真菌 HL-3 菌株的鉴定及其活性物质的分离

李祥荣^{1,2}, 郑洪利¹, 张宗艺¹, 徐燕妮¹, 郭雷^{*1,2}

1 江苏海洋大学江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005

2 江苏海洋大学江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005

李祥荣, 郑洪利, 张宗艺, 徐燕妮, 郭雷. 抗副溶血弧菌海洋真菌 HL-3 菌株的鉴定及其活性物质的分离[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 1999-2008

Li Xiangrong, Zheng Hongli, Zhang Zongyi, Xu Yanni, Guo Lei. Identification of marine fungus HL-3 with activity against *Vibrio parahaemolyticus* and separation of its active substances[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 1999-2008

摘要:【背景】目前水产养殖中副溶血弧菌等水产致病菌的预防和治疗主要使用的是抗生素, 短期内能够起到较好的效果, 但是长期使用抗生素不仅使得病原菌的耐药性增加, 而且会产生一系列问题。因此, 寻找安全有效的抗生素替代品迫在眉睫。【目的】筛选具有抗副溶血弧菌活性的海洋微生物, 鉴定其种类并优化其培养条件, 并对其活性物质进行初步分离。【方法】利用稀释涂布平板法和平板划线法分离纯化海洋微生物, 通过牛津杯法筛选具有抗副溶血弧菌活性的菌株。根据菌株的形态特征和 ITS 序列分析对活性菌株进行鉴定。通过筛选培养基种类和盐度确定其培养条件。通过半制备高效液相色谱制备化合物, 并利用核磁共振波谱数据鉴定化合物的结构。【结果】从海螺、小黄鱼、对虾等 11 种样品中分离出海洋微生物菌株 76 株, 其中真菌 26 株。筛选得到一株具有抗副溶血弧菌活性的真菌菌株 HL-3, 鉴定为黄曲霉。黄曲霉 HL-3 菌株在改良沙氏培养基条件下, 产物化学多样性和抗菌活性较好。黄曲霉 HL-3 菌株在真菌 5 号培养基中产物单一且抗菌活性较好, 纯化出来的化合物结构被鉴定为曲酸。曲酸对副溶血弧菌的最小抑菌浓度为 4.0 mg/mL。【结论】实验结果为进一步利用各种色谱手段分离纯化 HL-3 菌株产生的抗副溶血弧菌活性次生代谢产物提供了一定的理论依据。

关键词: 海洋真菌; 副溶血弧菌; 抗菌活性; 菌种鉴定; 培养条件

基金项目: 江苏省高校自然科学基金(19KJB350001); 江苏省研究生实践创新计划(KYCX20_2898)

Supported by: Natural Science Foundation for Colleges and Universities in Jiangsu Province (19KJB350001); Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX20_2898)

*Corresponding author: E-mail: guol@jou.edu.cn

Received: 2021-10-15; Accepted: 2021-12-21; Published online: 2022-01-12

Identification of marine fungus HL-3 with activity against *Vibrio parahaemolyticus* and separation of its active substances

LI Xiangrong^{1,2}, ZHENG Hongli¹, ZHANG Zongyi¹, XU Yanni¹, GUO Lei^{*1,2}

1 Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

2 Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

Abstract: [Background] At present, the prevention and control of aquatic pathogens such as *Vibrio parahaemolyticus* in aquaculture mainly rely on antibiotics, which are effective in a short term. However, long-term use of antibiotics causes the enhancement of drug resistance in pathogens and other problems. Therefore, it is urgent to explore safe and effective antibiotic alternatives. [Objective] To screen marine microorganisms with anti-*V. parahaemolyticus* activity, identify the species, optimize the culture conditions, and preliminarily separate the active substances. [Methods] Marine microorganisms were isolated and purified with spread plate method and streak plate method, and the strains with anti-*V. parahaemolyticus* activity were screened with Oxford cup method. The active strains were identified based on the morphological characteristics and ITS sequences. The medium type and salinity were tested to optimize the culture conditions. The compound was prepared by semi-preparative high performance liquid chromatography, and the structure of the compound was identified based on nuclear magnetic resonance spectroscopy data. [Results] A total of 76 strains were isolated from 11 types of samples, such as conch, little yellow croaker, and prawn, including 26 fungal strains. A fungal strain HL-3 with anti-*V. parahaemolyticus* activity was screened out and identified as *Aspergillus flavus*. strains HL-3 produced diverse metabolites and showed strong antibacterial activity in the modified Sabouraud's medium. It synthesized only one metabolite and demonstrated high antibacterial activity on fungus No. 5 medium. The metabolite was identified as kojic acid, and the minimum inhibitory concentration of kojic acid against *V. parahaemolyticus* was 4.0 mg/mL. [Conclusion] The experimental results lay a theoretical basis for the further separation and purification of secondary metabolites of strains HL-3 against *V. parahaemolyticus* with various chromatographic methods.

Keywords: marine fungus; *Vibrio parahaemolyticus*; antibacterial activity; strain identification; culture conditions

随着水产养殖集约化的不断提高,各种病害频繁发生。副溶血弧菌是水产养殖中一种主要的有害细菌,同时也是常见的五大食源性致病菌之一^[1]。人如果食用了感染副溶血弧菌的鱼、虾、贝类等海产品后会引起一系列的症状,甚至会威胁生命安全。副溶血弧菌不仅严重地

影响了水产养殖业的可持续发展,而且使得食品安全事件频发。在水产养殖中,抗生素的使用一方面能够杀灭大部分容易导致水产品感染疾病的微生物,有效地控制了许多水产疾病的发生;另一方面,抗生素的不断使用产生了一系列的弊端,破坏水产生物体内的有益菌、降

低水产养殖动物的免疫力、产生耐药菌株等^[2-3]。即使是目前相对来说应用广泛、敏感度强、毒副作用低、抗菌范围广、临床应用比较成功的氟苯尼考,长期使用仍然不可避免地产生上述一系列的问题。因此,抗生素替代品的研究与开发不仅是当前人们最关心的一个问题,也是科研工作者们的一个研究热点。目前已发现的新型、环保型的抗生素替代品种类主要有益生菌、中草药、噬菌体、免疫糖类、植物精油及微生物代谢物等^[4-8]。

海洋微生物以其快速的适应能力和特殊的应变机制在复杂的海洋环境中形成了独特的代谢体系,成为新型活性天然产物的重要来源^[9]。海洋微生物来源的抗菌活性化合物多具有活性强、毒副作用小和对水体的污染小等优点,在水产用抗生素替代品开发等方面有很大的应用潜能^[10]。本研究从海产品共附生微生物中筛选具有抗副溶血弧菌活性的菌株,并对筛选的活性菌株进行鉴定、优化其合成抗副溶血弧菌活性物质的培养条件,同时在真菌 5 号培养基中提取大量纯品曲酸,以期为曲酸从该菌株中的提取分离提供一种高效的手段,更为后期分离纯化该菌株产生的强抗副溶血弧菌活性次生代谢产物提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

文蛤、红毛虾、白玉虾、海螺、螃蟹、面包蟹、扇贝、海蛰、花蛤、小白虾、海蛎子 11 种海产品,购自连云港本地的海鲜市场。

1.1.2 指示菌株

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* 1.1997)购自中国普通微生物菌株保藏管理中心,由本实验室保存。

1.1.3 培养基

沙氏固体培养基(g/L): 葡萄糖 40.0, 蛋白胨 10.0, 琼脂 15.0; 2216E 液体培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0; 牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 琼脂 20.0; MH 肉汤培养基(g/L): 牛肉粉 2.0, 可溶性淀粉 1.5, 酪蛋白水解物 17.5。以上培养基均由陈海水配制。

1.1.4 主要试剂和仪器

葡萄糖(分析纯)、蛋白胨(生化试剂)、琼脂粉(生化试剂)、甲醇(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯),国药集团化学试剂有限公司。

恒温鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司;真空灭菌锅,上海博讯医疗设备厂;单人净化工作台,苏州净化设备有限公司;高效液相色谱仪,安捷伦科技公司;水浴恒温振荡器,江苏金坛亿通电子有限公司;扫描电镜,JEOL 公司。

1.2 微生物的分离

利用稀释涂布平板法进行微生物的分离。先用 75% 的乙醇浸泡样品 30 s 后倒掉,重复此步骤 3 次,再用无菌水洗涤 5-6 次。用研钵将样品捣碎,加少量无菌水,依次稀释 2 个 10 倍比梯度,将稀释液涂布在牛肉膏蛋白胨培养基和沙氏固体培养基上。于 32 °C 培养箱中培养,定期观察,待长出单菌落,采用平板划线法进行再一次纯化,将纯化好的菌落用接种棒接种于固体斜面培养基上,待菌落在 32 °C 培养箱中培养 5 d 后放到 4 °C 冰箱中保存。

1.3 抗菌活性微生物菌株的筛选

将纯化好的菌落接种到装有沙氏液体培养基的锥形瓶中,在 32 °C 水浴摇床中 160 r/min 振荡培养 7 d。在每 500 mL 的三角烧瓶中加入与培养基等量的乙酸乙酯,于超声波清洗仪中超声 1 h 后静置一夜,取有机相浓缩至浸膏状。

以甲醇为溶剂将浸膏配制成 10 mg/mL, 用牛津杯法检测其抑制副溶血弧菌的活性^[11]。在培养皿中倒入 20 mL MHB 肉汤培养基, 30 min 后加入 200 μ L 的指示菌并用涂布棒涂布均匀, 然后用镊子夹着牛津杯将其放在培养基上, 最后用移液枪加入 200 μ L 的样品溶液, 32 $^{\circ}$ C 培养 16 h。每组实验重复 3 次, 测量其抑菌圈, 以 3 次结果的平均值作为最终样品的抗菌活性。

1.4 菌株 HL-3 的鉴定

1.4.1 形态观察

将经筛选得到的 HL-3 活性菌株用接种棒接种在沙氏固体培养基上, 于 32 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 3–5 d, 每天分别记录其形态特征和形态变化; 同时用全电动显微镜观察其分生孢子梗、菌丝体的特征, 用扫描电镜观察其孢子特征^[12–13]。

1.4.2 ITS 序列分析

将真菌 HL-3 菌株接种在沙氏固体培养基上, 32 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后送交至北京新时代众合科技有限公司进行 ITS 测序分析。将所测得的 ITS 序列提交到 GenBank 中, 通过 BLAST 软件查

找具有相似性的序列, 利用 Clustal (1.83) 软件比对相似序列, 进而证明序列间的同源性, 采用 MEGA 软件中的邻接法(neighbor-joining method)构建系统进化树, 自展次数设置为 1 000 次。

1.5 菌株 HL-3 合成抗副溶血弧菌活性物质培养条件的确定

1.5.1 种子液制备

将具有抗副溶血弧菌活性的 HL-3 菌株接种到沙氏培养基上, 于 32 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 3–5 d。用接种棒挑取活化的 HL-3 菌株接种到 SD 沙氏液体培养基中, 水浴摇床的温度设置为 32 $^{\circ}$ C, 转速设置为 160 r/min, 将装有活性菌株的三角烧瓶放入水浴摇床中培养 16 h 后作为种子液备用。

1.5.2 培养基的筛选

供筛选培养基的种类及组成成分如表 1 所示。将制备好的种子液按照 2% 的体积分数分别加入到装有 200 mL 供筛选培养基的 500 mL 三角瓶内, 32 $^{\circ}$ C 水浴摇床 160 r/min 培养 7 d。发酵产物中加入与培养基等量的乙酸乙酯, 超

表 1 发酵培养基的种类及其组分

Table 1 Types and components of fermentation media

培养基种类	组成成分
Medium type	Compositions (g/L)
寡营养培养基	淀粉 10.0, 蛋白胨 1.0
Oligotrophic medium	Amylum 10.0, Peptone 1.0
沙氏培养基	葡萄糖 40.0, 蛋白胨 10.0
Sabouraud's medium	Glucose 40.0, Peptone 10.0
改良沙氏培养基	葡萄糖 30.0, 蛋白胨 10.0, 七水硫酸镁 0.5
Modified Sabouraud's medium	Glucose 30.0, Peptone 10.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5
查氏酵母膏培养基	蔗糖 30.0, 酵母膏 10.0, 七水硫酸镁 0.5, 硫酸亚铁 0.05, 磷酸氢二钾 1.0, 硝酸钠 3.0, 氯化钾 0.5
Czapek yeast extract medium	Sucrose 30.0, Yeast extract 10.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, FeSO_4 0.05, K_2HPO_4 1.0, NaNO_3 3.0, KCl 0.5
真菌 5 号培养基	葡萄糖 10.0, 麦芽糖 20.0, 味精 2.0, 酵母膏 3.0, 七水硫酸镁 0.5
Fungal No.5 medium	Glucose 10.0, Maltose 20.0, Aginomoto 2.0, Yeast extract 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5
大米培养基	称取 50 g 大米, 加入 100 mL 陈海水, 放置过夜后将水倒掉, 再加入 150 mL 陈海水
Rice medium	Weigh 50 g rice and add 100 mL stale sea water. After leaving overnight, pour the water away and add another 150 mL stale sea water

声 1 h 后静置过夜, 将上层有机相取出, 重复上述操作 1 次, 合并乙酸乙酯相减压浓缩至干燥。以甲醇为溶剂, 将样品配制成 10 mg/mL, 按 1.3 操作步骤测定其抗菌活性。

1.5.3 HPLC 分析

通过 HPLC 指纹图谱分析 HL-3 菌株次生代谢产物的化学成分多样性。柱系统: Shim-Pack CLC-ODS 柱, 样品的进样浓度为 5 mg/mL (甲醇为溶剂), 进样量设置为 10 μ L, 检测波长为 254 nm。洗脱方式: 利用甲醇和水系统, 在 0–15 min 内进行等梯度洗脱, 甲醇的浓度设置为 50%; 在 16–25 min 内, 甲醇浓度从 50% 变化到 100% 并保持 5 min。

1.5.4 培养基盐度的筛选

在确定发酵培养基的基础上, 将菌株 HL-3 的种子液按照 2% 的体积分数分别加入到含有 0–5% NaCl 的蒸馏水配制的改良沙氏培养基中, 32 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 7 d, 按 1.5.2 操作制备样品溶液, 进行抑菌活性检测。

1.6 最小抑菌浓度的测定

将曲酸用甲醇配制成 3.0–8.0 mg/mL, 采用上述 1.3 部分牛津杯法测定曲酸对副溶血弧菌的抗菌活性。实验重复 2 次, 测量其抑菌圈, 以同时能够产生抑菌圈的最小浓度为样品的最小抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 微生物的分离及筛选

2.1.1 微生物分离

从花蛤、文蛤、红毛虾、白玉虾、海螺、螃蟹、面包蟹、小白虾、扇贝、海蛰、海蛎子 11 种海产品中分离得到微生物 76 株, 其中真菌 26 株。

2.1.2 抗菌活性菌株的筛选

以 0.1 mg/mL 的氟苯尼考作为阳性对照, 其

对副溶血弧菌的抑菌圈直径为(19.77 \pm 0.78) mm。50 株细菌的抑菌圈直径均小于 10.0 mm (牛津杯外径约为 8.0 mm), 活性普遍较弱。26 株真菌普遍具有较好的抗菌活性, 通过复筛抑菌活性稳定的真菌菌株有 10 株(抑菌圈直径>16.0 mm), 具体的抑菌效果见表 2。其中抑菌圈直径大于阳性对照的有 2 株, 分别为海螺来源的 HL-3 菌株和螃蟹来源的 PX-2 菌株。本实验对真菌 HL-3 菌株进行了鉴定并且优化了其合成副溶血弧菌活性物质的培养条件(PX-2 菌株有待进一步研究)。

2.2 菌株 HL-3 的鉴定

2.2.1 形态学特征

菌株 HL-3 在 32 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中生长 7 d 后, 直径为 8–9 cm, 菌落的质地干燥且无凸起。菌丝的颜色最开始的时候是纯白色附带有少许的淡黄色, 慢慢地变为深黄色最终变为棕褐色, 菌落在沙氏固体培养基上背面的颜色为浅黄

表 2 10 株真菌菌株对副溶血弧菌的抗菌活性
Table 2 Antibacterial activity of 10 fungal strains against *Vibrio parahaemolyticus*

样品来源	菌株编号	抑菌圈
Source of sample	Strain No.	Inhibition zone ($\bar{X}\pm$ SD, $n=3$, mm)
蛤蜊 Clam	GL-1	18.2 \pm 0.3de
	GL-7	18.7 \pm 0.2d
	GL-10	17.0 \pm 0.1f
海螺 Conch	HL-1	18.4 \pm 0.1d
	HL-3	24.1 \pm 0.4a
螃蟹 Crab	PX-1	17.6 \pm 0.2ef
	PX-2	20.1 \pm 0.4b
小黄鱼 Small yellow croaker	XHY-1	16.8 \pm 0.5fg
扇贝 Scallop in shell	SB-1	18.3 \pm 0.2d
海蛰 Razor clam	HC-1	19.4 \pm 0.2c

注: 不同小写字母表示不同菌株抑菌活性水平之间存在显著差异($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate that there are significant differences between the levels of antibacterial activity of different strains ($P<0.05$).

褐色。用扫描电镜观察分生孢子的形状为球状, 表面有类似鳞状的凹凸, 直径长度为 $3\ \mu\text{m}$ 。具体的形态特征见图 1, 参考相关文献可初步鉴定为曲霉属^[14]。

2.2.2 ITS 序列分析结果

具有抗副溶血弧菌活性的 HL-3 菌株的 ITS 序列长度为 573 bp, 将其 ITS 序列提交至 GenBank, 得到的登录号为 MZ613327.1。通过 BLAST 软件搜索比对, 采用 Clustal (1.83) 软件进行比对分析相似序列之间的同源性, 最后采用 MEGA 软件中邻接法构建进化树(设置自展次数 1 000 次)。如图 2 的进化树所示, 菌株 HL-3

与 *Aspergillus flavus* A107P (MN095189.1)、*A. flavus* A80R (MN095186.1)、*A. flavus* A20R (MN095163.1) 序列的相似性为 100%, 在进化树上聚为同一簇群, 结合菌株 HL-3 的形态特征, 将其鉴定为黄曲霉(*Aspergillus flavus*)。

2.3 菌株 HL-3 产抗菌活性物质的培养条件

2.3.1 培养基的筛选

黄曲霉 HL-3 菌株分别在寡营养培养基、沙氏培养基、改良沙氏培养基、查氏酵母膏培养基、真菌 5 号培养基和大米培养基上培养后, 其抗副溶血弧菌的活性如表 3 所示。可以看出, 沙氏培养基、改良沙氏培养基、查氏酵母膏培

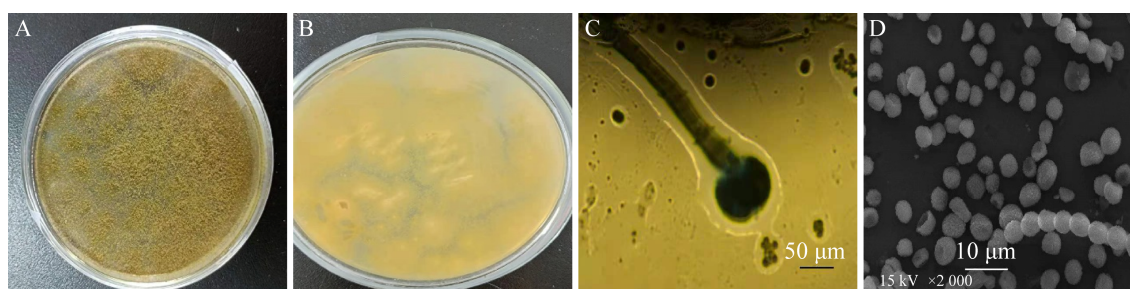


图 1 真菌 HL-3 的形态特点 A: 菌落特征(正面); B: 菌落特征(背面); C: 分生孢子梗; D: 分生孢子

Figure 1 Morphological characteristics of fungus HL-3. A: Colony characteristics (front); B: Colony characteristics (reverse); C: Conidiophore; D: Conidia.

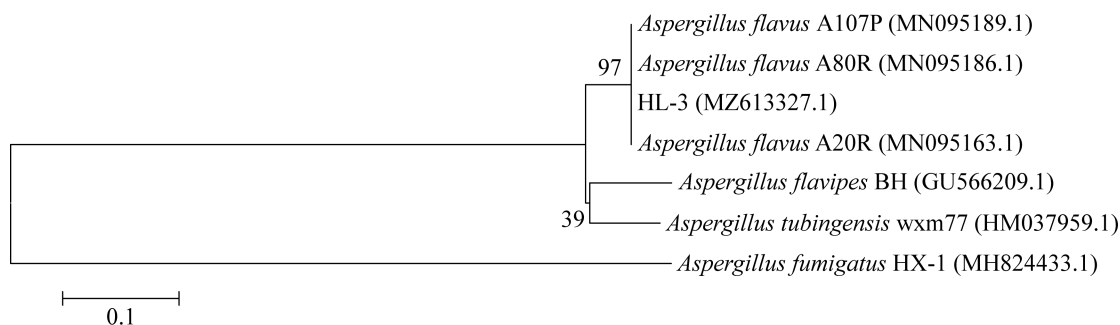


图 2 菌株 HL-3 基于 ITS 序列的系统进化树 括号中的序号为菌株的 GenBank 登录号, 标尺 0.1 代表序列偏差值, 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率

Figure 2 Phylogenetic analysis of strain HL-3 based on ITS sequence. The serial number in brackets is the GenBank login number of the strain, and the value of 0.1 represents the sequence deviation value. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees.

表 3 培养基的种类与抑制效果

Table 3 Types of culture medium and inhibitory effect

培养基种类 Medium type	抑菌圈 Inhibition zone ($\bar{X}\pm\text{SD}$, $n=3$, mm)
寡营养培养基 Oligotrophic medium	8.0 \pm 0.5d
沙氏培养基 Sabouraud's medium	18.0 \pm 0.2b
改良沙氏培养基 Modified Sabouraud's medium	19.4 \pm 0.4a
查氏酵母膏培养基 Czapek yeast extract medium	17.8 \pm 0.5b
真菌 5 号培养基 Fungal No.5 medium	18.3 \pm 0.3b
大米培养基 Rice medium	15.0 \pm 0.4c

注:不同小写字母表示不同培养基抑菌活性水平之间存在显著差异($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate that there are significant differences between the levels of antibacterial activity of different medium ($P<0.05$).

培养基和真菌 5 号培养基的培养效果均较好, HPLC 指纹图谱显示改良沙氏培养基培养时菌株 HL-3 的次生代谢产物较丰富(图 3), 从中分离得到抗菌活性化合物的几率更大, 因此选择改良沙氏培养基作为 HL-3 菌株进一步放大培养的发酵培养基。同时, 在真菌 5 号培养基的培养条件下, 菌株 HL-3 的发酵产物单一且产量大(图 4)。

2.3.2 培养基的盐度

培养基为改良沙氏培养基的条件下, 以不同浓度的 NaCl 替代陈海水进行盐度的筛选, 结果如表 4 所示。当 NaCl 的浓度为 2%时, 菌株 HL-3 次生代谢产物的抑菌效果最好, HPLC 指纹图谱表明其化学多样性无改变。因此, 选择 NaCl 浓度为 2%的改良沙氏培养基及 32 °C 和 160 r/min 条件下摇床培养 7 d 作为菌株 HL-3 合成抗副溶血弧菌活性物质的培养条件。

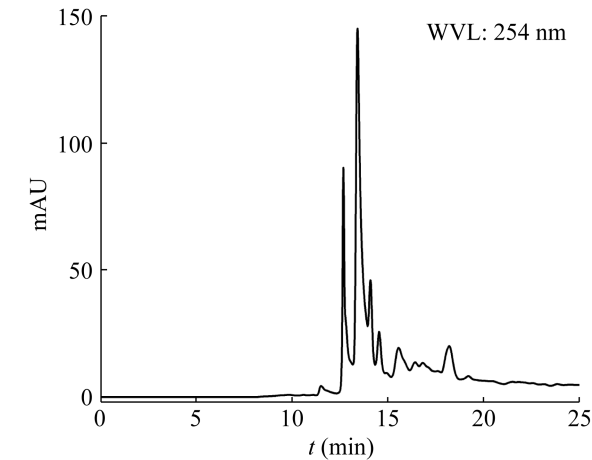


图 3 菌株 HL-3 在改良沙氏培养基中发酵产物 HPLC 指纹图

Figure 3 HPLC finger-print of fermentation products in modified Sabouraud's medium of strain HL-3.

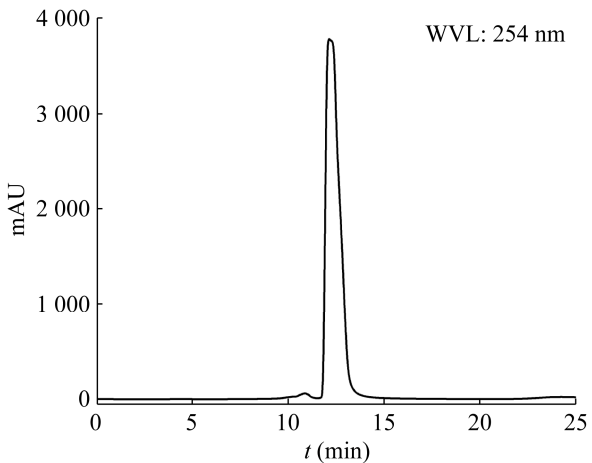


图 4 菌株 HL-3 在真菌 5 号培养基中的发酵产物 HPLC 指纹图

Figure 4 HPLC finger-print of fermentation products in fungal No. 5 medium of strain HL-3.

2.4 化合物的结构鉴定和活性测定

通过高效液相色谱分析, 在真菌 5 号培养基的培养条件下, 菌株 HL-3 的活性萃取物可以在甲醇:水的体积比为 80:20 条件下制备得到一个纯的化合物。化合物的核磁共振波谱和质谱数

表 4 不同盐度条件下发酵产物的抑菌圈

Table 4 The inhibition zone of fermentation products under different salinity conditions

NaCl 浓度	抑菌圈
Salinity of NaCl (%)	Inhibition zone ($\bar{X} \pm SD$, $n=3$, mm)
0	17.5 \pm 0.3c
1	15.9 \pm 0.4d
2	19.5 \pm 0.1a
3	18.3 \pm 0.2b
4	17.5 \pm 0.6c
5	17.5 \pm 0.5c

注:不同小写字母表示不同 NaCl 浓度抑菌活性水平之间存在显著差异($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate that there are significant differences between the levels of antibacterial activity of different salinity of NaCl ($P<0.05$).

据为:无色棱柱状晶体; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 7.9 (1H, s, H-6), 6.5 (1H, s, H-3), 4.4 (2H, s, H-7), ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO): δ 174.4 (C-4), 168.6 (C-2), 146.2 (C-5), 139.7 (C-6), 110.3 (C-3), 59.9 (C-7); ESI-MS m/z 143.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。以上数据与文献[15]的报道一致,因此鉴定该化合物为曲酸,结构如图 5 所示。

曲酸抗副溶血弧菌活性的测定结果表明,其对副溶血弧菌的最小抑菌浓度为 4.0 mg/mL (表 5)。与文献[16]报道的曲酸对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制活性接近。

3 讨论与结论

研究表明,环境微生物之间存在着竞争的关系。因此,可以从水产品共附生微生物中筛选对水产致病菌具有拮抗活性的菌株。本研究从海产品中分离筛选对水产病原菌具有拮抗活性的微生物菌株,筛选得到了一株抗副溶血弧菌活性的真菌 HL-3 菌株。通过菌株的形态特征和 ITS 序列分析,将 HL-3 菌株鉴定为黄曲霉。黄曲霉是一种众所周知的腐生菌和条件致病菌,能够产生萜类、肽类、聚酮类和酚类等不同

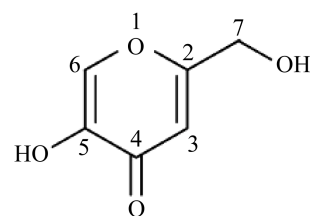


图 5 曲酸的化学结构

Figure 5 Chemical structure of kojic acid.

表 5 牛津杯法测定曲酸的 MIC

Table 5 Determination of MIC of kojic acid by Oxford cup method

曲酸浓度	抑菌圈
Concentration of kojic acid (mg/mL)	Inhibition zone ($\bar{X} \pm SD$, $n=3$, mm)
3	None
4	8.4 \pm 0.4d
5	9.2 \pm 0.4c
6	9.9 \pm 0.3c
7	12.4 \pm 0.4b
8	14.7 \pm 0.3a

注:不同小写字母表示不同曲酸浓度抑菌活性水平之间存在显著差异($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters superscript indicate that there are significant differences between the levels of antibacterial activity of different concentration of kojic acid ($P<0.05$).

类型的次级代谢产物,其中某些化合物表现出一定的抗菌、细胞毒性和抗氧化等生物活性^[17-21]。

微生物中生物活性化合物的产生可能会受到许多不同因素的强烈影响,例如遗传或生态潜力及培养基的组成^[22]。本研究对真菌 HL-3 菌株合成抗副溶血弧菌活性次生代谢产物的发酵培养基进行了筛选,确定 2% NaCl 浓度的改良沙氏培养基作为 HL-3 菌株进一步放大培养的发酵培养基。值得注意的是,在培养基筛选过程中,真菌 5 号培养基的培养产物具有单一性,可从中大量地分离出化合物曲酸。曲酸是大多数曲霉属和青霉属真菌所产生的一种常见的代谢产物,属弱酸性化合物。曲酸具有抑制酪氨

酸酶活性、抗菌、与金属离子螯合等作用^[23-26], 使其在化妆品增白、食品护色防腐、农药杀虫和铁分析试剂等方面有广泛的应用。从实验结果来看, 虽然曲酸抗副溶血弧菌的活性未达到预期的效果, 但为生物合成曲酸提供了一种可能高效的途径。进一步利用 2% NaCl 浓度的改良沙氏培养基对黄曲霉 HL-3 菌株进行放大培养, 有望从其代谢产物中分离得到抗副溶血弧菌活性的更优良化合物。

REFERENCES

- [1] Cao JJ, Liu H, Wang Y, He XX, Jiang HY, Yao JJ, Xia F, Zhao YN, Chen XF. Antimicrobial and antivirulence efficacies of citral against foodborne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633[J]. Food Control, 2021, 120: 107507
- [2] Golet EM, Alder AC, Hartmann A, Ternes TA, Giger W. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(15): 3632-3638
- [3] Sharma L, Siedlewicz G, Pazdro K. The toxic effects of antibiotics on freshwater and marine photosynthetic microorganisms: state of the art[J]. Plants, 2021, 10(3): 591
- [4] Jiang Y, Zhang Z, Wang YG, Jing YY, Liao MJ, Rong XJ, Li B, Chen GP, Zhang HS. Effects of probiotic on microfloral structure of live feed used in larval breeding of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2018, 36(3): 1002-1012
- [5] 王洪彬, 朱利霞, 杨楠, 吴同垒, 张志强, 高桂生, 史秋梅. 常用中草药对水产动物致病菌体外抑菌效果研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(5): 1357-1366
- [6] Wang HB, Zhu LX, Yang N, Wu TL, Zhang ZQ, Gao GS, Shi QM. Study on antibacterial effects of common Chinese herbs against aquatic animal pathogens *in vitro*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(5): 1357-1366 (in Chinese)
- [7] Zheng ZL, Tan JYW, Liu HY, Zhou XH, Xiang X, Wang KY. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Aquaculture, 2009, 292(3/4): 214-218
- [8] Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives[J]. Aquaculture, 2014, 433: 50-61
- [9] Guo L, Wang C. Optimized production and isolation of antibacterial agent from marine *Aspergillus flavipes* against *Vibrio harveyi*[J]. 3 Biotech, 2017, 7(6): 1-9
- [10] Wang C, Tang SY, Cao SG. Antimicrobial compounds from marine fungi[J]. Phytochemistry Reviews, 2021, 20(1): 85-117
- [11] Guo L, Zhang F, Wang XT, Chen H, Wang QQ, Guo JC, Cao X, Wang L. Antibacterial activity and action mechanism of questin from marine *Aspergillus flavipes* HN4-13 against aquatic pathogen *Vibrio harveyi*[J]. 3 Biotech, 2019, 9(1): 1-7
- [12] 郭雷, 朱文成, 刘玮炜, 丁国伟, 张越乾, 张守禄, 邱月, 谢宇. 抗菌活性海洋真菌 HN4-13 的鉴定及其发酵优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(6): 951-958
- [13] Guo L, Zhu WC, Liu WW, Ding GW, Zhang YQ, Zhang SL, Qiu Y, Xie Y. Identification and fermentation optimization of marine fungus HN4-13 with antibacterial activity[J]. Microbiology China, 2013, 40(6): 951-958 (in Chinese)
- [14] 陈慧, 曹曦, 王鑫彤, 张菲, 王乐, 郭雷. 具有抗哈维氏弧菌活性共生真菌 HLZ-3 菌株的筛选、鉴定及其培养条件[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2475-2481
- [15] Chen H, Cao X, Wang XT, Zhang F, Wang L, Guo L. Screening, identification and culture conditions of symbiotic fungus HLZ-3 with antibacterial activity against *Vibrio harveyi*[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2475-2481 (in Chinese)
- [16] Guo L, Wang XT, Feng J, Xu XW, Li XR, Wang WB, Sun YY, Xu FQ. Extraction, identification and mechanism of action of antibacterial substances from *Galla chinensis* against *Vibrio harveyi*[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2020, 34(1): 1215-1223
- [17] 齐祖同. 曲霉属及其相关有性型[A]//中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 66-68
- [18] Qi ZT. *Aspergillus* and its related sexual forms[A]//Mycology of China[M]. Beijing: Science Press, 1997: 66-68 (in Chinese)
- [19] Li XF, Jeong JH, Lee KT, Rho JR, Choi HD, Kang JS, Son BW. Γ -pyrone derivatives, kojic acid methyl ethers from a marine-derived fungus *Altenaria* sp.[J]. Archives of Pharmacal Research, 2003, 26(7): 532-534

- [16] 李凤梅. 曲酸对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(6): 190-192
Li FM. Studies on the inhibition of kojic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Research and Development, 2008, 29(6): 190-192 (in Chinese)
- [17] Lin AQ, Lu XM, Fang YC, Zhu TJ, Gu QQ, Zhu WM. Two new 5-hydroxy-2-pyrone derivatives isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus flavus*[J]. The Journal of Antibiotics, 2008, 61(4): 245-249
- [18] Sun KL, Li Y, Guo L, Wang Y, Liu PP, Zhu WM. Indole diterpenoids and isocoumarin from the fungus, *Aspergillus flavus*, isolated from the prawn, *Penaeus vannamei*[J]. Marine Drugs, 2014, 12(7): 3970-3981
- [19] Youssef FS, Singab ANB. An updated review on the secondary metabolites and biological activities of *Aspergillus ruber* and *Aspergillus flavus* and exploring the cytotoxic potential of their isolated compounds using virtual screening[J]. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021: 8860784
- [20] Cary JW, Gilbert MK, Lebar MD, Majumdar R, Calvo AM. *Aspergillus flavus* secondary metabolites: more than just aflatoxins[J]. Food Safety: Tokyo, Japan, 2018, 6(1): 7-32
- [21] Uka V, Cary JW, Lebar MD, Puel O, De Saeger S, Diana Di Mavungu J. Chemical repertoire and biosynthetic machinery of the *Aspergillus flavus* secondary metabolome: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(6): 2797-2842
- [22] Xu XW, Guo SY, Chen H, Zhang ZY, Li XR, Wang WB, Guo L. Bioassay-guided isolation and characterization of antibacterial compound from *Aspergillus fumigatus* HX-1 associated with Clam[J]. 3 Biotech, 2021, 11(4): 193
- [23] Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 110: 582-593
- [24] Sano M. *Aspergillus oryzae nrtA* affects kojic acid production[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2016, 80(9): 1776-1780
- [25] Yan SB, Tang HJ, Wang SC, Xu LT, Liu HY, Guo YH, Yao JM. Improvement of kojic acid production in *Aspergillus oryzae* B008 mutant strain and its uses in fermentation of concentrated corn stalk hydrolysate[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(6): 1095-1103
- [26] El-Kady IA, Zohri ANA, Hamed SR. Kojic acid production from agro-industrial by-products using fungi[J]. Biotechnology Research International, 2014, 2014: 642385