

抗菌活性海洋真菌 HN4-13 的鉴定及其发酵优化

郭雷^{1,2*} 朱文成¹ 刘玮炜¹ 丁国伟¹ 张越乾¹ 张守禄¹ 邱月¹ 谢宇¹

(1. 淮海工学院 海洋学院 江苏 连云港 222005)

(2. 江苏省海洋资源开发研究院 江苏 连云港 222004)

摘要: 【目的】鉴定一株来源于连云港近岸海域沉积物并具有分泌抗菌活性代谢产物的真菌菌株 HN4-13, 优化其合成抗菌活性物质的发酵条件。【方法】通过形态学观察及 ITS 序列分析方法对菌株 HN4-13 进行鉴定; 通过基础发酵培养基筛选、碳氮源及无机盐的单因素试验, 继而采用正交试验设计优化其合成抗菌活性物质的发酵条件。【结果】菌株 HN4-13 被鉴定为黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*), 其分泌抗菌活性产物的发酵条件为: 4%蔗糖、0.5%蛋白胨、0.1% KCl、0.06% NaH₂PO₄、28 °C、1%接种量、160 r/min 培养 9 d。【结论】实验结果为进一步分离纯化菌株 HN4-13 所产抗菌活性代谢产物提供了基础。

关键词: 海洋真菌, 抗菌活性, 鉴定, 发酵优化

Identification and fermentation optimization of marine fungus HN4-13 with antibacterial activity

GUO Lei^{1,2*} ZHU Wen-Cheng¹ LIU Wei-Wei¹ DING Guo-Wei¹
ZHANG Yue-Qian¹ ZHANG Shou-Lu¹ QIU Yue¹ XIE Yu¹

(1. School of Ocean, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

(2. Jiangsu Institute of Marine Resources Research & Development,
Lianyungang, Jiangsu 222004, China)

Abstract: [Objective] To identify marine fungus HN4-13 isolated from Lianyungang coastal

基金项目: 连云港市科技攻关项目(No. CG1131); 国家暨江苏省大学生实验创新项目(No. 201211641008)

*通讯作者: Tel: 86-518-85895427; ✉: leiguoo@hhit.edu.cn

收稿日期: 2012-07-29; 接受日期: 2012-11-28

sea sediments with antibacterial activity and to optimize the fermentation conditions of synthesizing antibacterial active substances. **[Methods]** Strain HN4-13 was identified based on its morphological characters and internal transcribed spacer (ITS) sequence; The optimization of fermentation conditions for antibacterial production by strain HN4-13 were investigated by the one-factor-at-a-time method and the orthogonal design method. **[Results]** Strain HN4-13 was identified as *Aspergillus flavipes*, and the optimal fermentation conditions can be recognized as follows: 4% sucrose, 0.5% peptone, 0.1% KCl, 0.06% NaH_2PO_4 , 1% inoculation concentration, 28 °C, 160 r/min for 9 days. **[Conclusion]** The results provide the clues for further separation and purification of the antibacterial active metabolites derived from strain HN4-13.

Keywords: Marine fungus, Antibacterial activity, Identification, Fermentation optimization

自从 20 世纪 50 年代 Newton 等从海洋真菌 *Cephalosporium acremonium* 的发酵产物中发现抗菌化合物 Cephalosporin C 以来, 海洋微生物抗菌活性物质的研究日益成为药物研究的热点领域。海洋真菌迥异于陆生真菌的独特生存环境(如寡营养、高盐、弱碱性等)使海洋真菌形成特殊的代谢和防御体系, 从而能够产生不同于陆生真菌的结构特异和活性优良的次生代谢产物^[1-2]。到目前为止, 已从海洋真菌的发酵产物中发现了一千多种新的次生代谢产物, 结构类型涉及生物碱、聚酮、大环内脂和萜类等, 这些代谢产物呈现出良好的抗菌、抗肿瘤、抗病毒等生物活性^[3-5]。

近十几年来, 我国水产品养殖业发展迅速, 水产品产量居世界首位, 但也不断出现各种动物疾病。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是引起养殖鱼类疾病的主要病原细菌^[6-7]。水产养殖中抗菌药物的长期使用或滥用所引起的致病菌耐药性、高残留和环境污染问题日益严重^[8]。因此, 开发新的高效、广谱和低污的水用抗生素受到研究者的极大重视。

海洋真菌 HN4-13 为本实验室采用活性-化学集成的筛选方法, 从连云港近岸海域沉积物来源的真菌中筛选得到的具有较好抗菌活性并能产

生系列生物碱类化合物的菌株。本研究将鉴定 HN4-13 菌株, 优化其合成抗特征水产病原菌活性物质的发酵条件, 并初步研究其活性物质的理化性质, 为进一步分离鉴定其活性物质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 菌株 HN4-13 为连云港近岸海域沉积物中分离得到的一株真菌, 保存于本实验室。活性测试菌株鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)由本实验室保存。

1.1.2 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; 菌种鉴定培养基为沙氏固体培养基(SDA)培养基; 活性测定培养基为牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2 菌株 HN4-13 的鉴定

1.2.1 培养特征: 将 HN4-13 菌株接种于沙氏琼脂培养基(SDA, 4%葡萄糖、1%蛋白胨, 琼脂 1.5%)平板上, 28 °C 培养 7 d, 观察并描述菌落形状、质地和颜色等形态特征。

1.2.2 菌体形态鉴定^[9]: 将菌株 HN4-13 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 7-14 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, 扫描电子显微镜观察其菌体形态并拍照。

1.2.3 ITS 序列分析^[10]: ITS 序列扩增引物为: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (上游引物), 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (下游引物), 由北京三博远志生物科技有限公司合成。建立 25 μL PCR 反应体系: 2.5 μmol/L dNTPs、10 μmol/L 上游引物(ITS1)或下游引物(ITS4)、3 U *Taq* plus DNA 聚合酶(上海生工)、1×PCR 反应缓冲液(含 2.5 mmol/L 的 MgCl₂, 上海生工)以及 50-100 ng 模板 DNA。将 PCR 反应液混匀, 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 57 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 产物经回收和测序后, 序列提交到 GenBank 中, 利用 BLAST 软件进行相似序列搜索, 进一步采用 ClustalX (Ver. 1.83)对高同源序列进行多序列联配分析, 然后利用 MEGA 软件中的 N-J 法(Neighbor-Joining)构建系统发育树, 设置自展次数为 1 000 次。

1.3 菌株 HN4-13 产抗菌活性物质的发酵条件优化

1.3.1 菌株培养与种子液制备: 将 HN4-13 菌株接种于沙氏琼脂(SDA)斜面培养基, 28 °C 培养 3-4 d, 挑取活化的菌株, 接种于装有 100 mL 沙氏液体培养基(SD)的 250 mL 锥形瓶中, 28 °C、160 r/min 培养 24 h 后作为种子液备用。

1.3.2 基础培养基筛选: 按 1% (V/V)的比例将制备的种子液分别加入到马铃薯葡萄糖液体培养基(PD, 20% 土豆, 2% 葡萄糖)、沙氏液体培养基(SD)、查氏酵母膏液体培养基(CY, 3% 蔗糖, 1% 酵母膏, 0.30% NaNO₃, 0.05% KCl, 0.05%

MgSO₄·7H₂O, 0.001% FeSO₄, 0.10% K₂HPO₄)中, 28 °C、160 r/min 培养 7 d 后, 抽滤, 收集发酵液。以鳗弧菌、嗜水气单胞菌为指示菌, 利用牛津杯法对以不同基础培养基培养时获得的发酵液进行抑菌活性分析, 活性大小以抑菌圈直径(mm)表示。

1.3.3 碳源的筛选: 在确定基础培养基后, 按 1% (V/V)的比例将 1.3.1 中制备的种子液分别加入到含有 3% 各种碳源(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、乳糖)的培养基中, 按 1.3.2 中的方法对菌株 HN4-13 进行培养, 并对其发酵液进行抑菌活性检测。

1.3.4 氮源的筛选: 在确定培养基碳源的基础上, 按 1% (V/V)的比例将 1.3.1 中制备的种子液分别加入到含有 1% 各种氮源(蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、KNO₃)的培养基中, 按 1.3.2 中的方法对菌株 HN4-13 进行培养, 并对其发酵液进行抑菌活性检测。

1.3.5 无机盐的筛选: 在确定培养基碳氮源的基础上, 按 1% (V/V)的比例将 1.3.1 中制备的种子液分别加入到含有 0.05% 各种无机盐(KH₂PO₄、MgSO₄、CaCl₂、KCl、Na₂HPO₄、K₂HPO₄)的培养基中, 按 1.3.2 中的方法对菌株 HN4-13 进行培养, 并对其发酵液进行抑菌活性检测。

1.3.6 培养基组分优化: 采用正交试验设计方法对 HN4-13 菌株的培养基组分进行优化, 因素及水平见表 1。

1.3.7 发酵培养时间的确定: 按 1% (V/V)的比例将 1.3.1 中制备的种子液加入到优化后的培养基中, 按 1.3.2 中的方法对菌株进行培养 4-10 d。每天取出 1 瓶, 检测发酵液的抑菌活性并计算菌体干重(90 °C 烘 12 h), 考察 HN4-13 菌株的抑菌活性和生物量分别随时间的变化规律, 确定发酵培养时间。

表 1 正交试验因素与水平
Table 1 The factors and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors			
	A 蔗糖 Sucrose (%)	B 蛋白胨 Peptone (%)	C 氯化钾 KCl (%)	D 磷酸二氢钠 NaH ₂ PO ₄ (%)
1	2	0.5	0.02	0.02
2	3	1.0	0.06	0.06
3	4	1.5	0.10	0.10

2 结果

2.1 菌株 HN4-13 的鉴定

2.1.1 形态学特征: 菌落 HN4-13 在沙氏琼脂上 28 ℃ 培养 7 d 直径可达 14 mm–21 mm, 质地较厚, 丝绒状, 具辐射状沟纹; 菌丝初为白色, 渐变为土黄色, 渗出液较多, 有时呈大滴, 浅褐色; 在光学显微镜和扫描电镜下, 菌株 HN4-13 的分生孢子头初为辐射形, 后期为疏松柱形; 分生孢子结构多, 初为浅黄褐色, 老后变深; 菌落背面黄褐色(图 1)。参考相关文献[11], 初步鉴定菌株 HN4-13 为子囊菌亚门曲霉属黄柄曲霉 *Aspergillus flavipes* (Bain. & Sart.) Thom & Church。

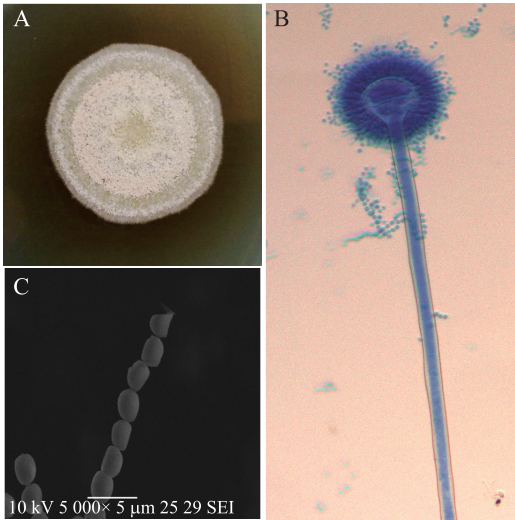


图 1 菌株 HN4-13 的形态特征
Fig. 1 Morphological characteristics of strain HN4-13
注: A: 菌落特征; B: 分生孢子梗; C: 分生孢子 (Bar=5 μm).
Note: A: Colony; B: Conidiophore; C: Conidia (Bar=5 μm).

2.1.2 ITS 序列分析: 经 PCR 扩增后菌株 HN4-13 的 ITS 序列全长为 556 bp (GenBank 中的序列号为 JX287370)。BLASTn 分析结果显示该序列与曲霉属真菌(*Aspergillus* sp.)的 ITS 序列具有很高的同源性, 其中与菌株 *Aspergillus flavipes* UWFP 1022、*A. flavipes* BH (序列号分别为 AY214443.1 和 GU566209.1)的 ITS 序列相似性为 99%, 在以 N-J 法构建的系统发育树上聚为同一簇群(图 2)。因此, 结合形态学特征, 该菌株被鉴定为黄柄曲霉 *Aspergillus flavipes*, 菌株命名为 *Aspergillus flavipes* strain HN4-13。

2.2 菌株 HN4-13 产抗菌活性物质的发酵条件优化

2.2.1 基础培养基筛选: 沙氏液体培养基(SD)中培养的发酵液, 对鳗弧菌和嗜水气单胞菌均有抑菌活性且活性较高, 抑菌圈直径分别为 13.74 mm 和 14.63 mm。而马铃薯葡萄糖液体培养基(PD)和查氏酵母膏液体培养基(CY)中培养的发酵液仅对嗜水气单胞菌表现出抑菌活性, 抑菌圈直径分别为 15.07 mm 和 13.02 mm, 对鳗弧菌没有抑制活性。因此选择沙氏液体培养基作为发酵优化的初始培养基。

2.2.2 碳源和氮源的筛选: 碳、氮源筛选的数据(表 2)表明, 蔗糖和蛋白胨分别作为碳源、氮源的发酵液对鳗弧菌、嗜水气单胞菌的抑菌活性较大, 因此选择蔗糖和蛋白胨作为培养时的碳氮源。

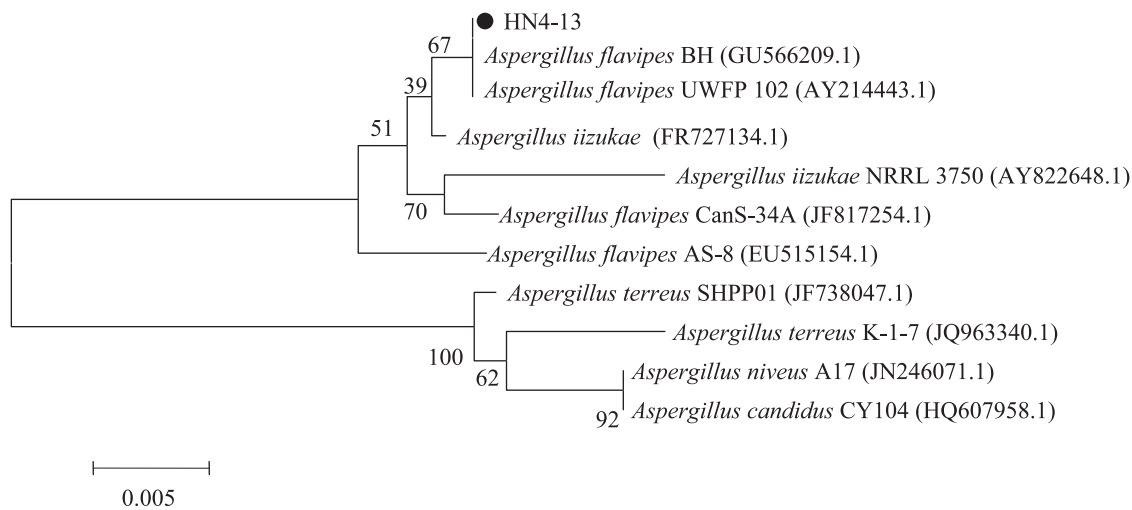


图 2 基于 ITS 序列的菌株 HN4-13 与其它曲霉属真菌的系统发育分析

Fig. 2 Polymeric analysis of strain HN4-13 and other *Aspergillus* strains based on the sequence of ITS

注: 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率; 标尺刻度代表 0.5% 的序列差异.

Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-straped trees. The scale bar means 0.5% sequence difference.

表 2 不同碳源和氮源条件下菌株 HN4-13 发酵液的抑菌圈									
Table 2 Inhibition zone of the fermentation broth of strain HN4-13 cultured in different carbon and nitrogen sources (mm)									
测试菌 Bacterium	碳源 Carbon source					氮源 Nitrogen source			
	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	麦芽糖 Maltose	果糖 Fructose	乳糖 Lactose	蛋白胨 Peptone	酵母膏 Yeast extract	牛肉膏 Beef extract	硝酸钾 KNO ₃
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	11.20	14.40	11.17	13.42	—	16.20	13.15	—	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	11.70	13.80	12.21	12.51	13.51	15.53	15.38	—	—

注: —: 无抑菌活性.

Note: —: No antibacterial activity.

2.2.3 无机盐的筛选: 无机盐筛选的实验数据 (表 3)表明, KCl 和 NaH₂PO₄ 分别作为发酵培养基中添加的无机盐时, 其发酵液同时表现出对鳃弧菌和嗜水气单胞菌较强的抑制作用, 所以将 KCl 和 NaH₂PO₄ 作为培养时的无机盐。

2.2.4 培养基组分的优化: 在单因素试验的基础上, 选择蔗糖、蛋白胨、KCl 和 NaH₂PO₄ 作为优化时的 4 个因素, 设计了 L₉(3⁴) 正交实验。如表 4

所示, 对试验结果进行直观分析和方差分析后可知, 抑制鳃弧菌的最优组合为 A3B1C3D2, 抑制嗜水气单胞菌的最优组合为 A3B1C3D3, 只有 D 因素的水平不同。分别以这两个优化组合进行验证试验, 在 D2 和 D3 水平条件下, 发酵液对鳃弧菌的抑菌活性分别为 16.09 mm±0.71 mm 和 15.92 mm±0.67 mm (n=6), 对嗜水气单胞菌的抑菌活性分别为 11.72 mm±0.98 mm 和

表 3 不同无机盐条件下菌株 HN4-13 发酵液的抑菌圈
Table 3 Inhibition zone of the fermentation broth of strain HN4-13 cultured in different inorganic salts (mm)

测试菌 Bacterium	无机盐 Inorganic salts					
	KCl	CaCl ₂	MgSO ₄	NaH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄
鳗弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	13.57	15.54	15.89	14.28	14.71	13.12
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	14.06	—	—	12.01	—	—

注: —: 无抑菌活性.
Note: —: No antibacterial activity.

表 4 L₉(3⁴)正交试验设计及结果
Table 4 L₉(3⁴) orthogonal experimental design and results

试验号 No.	因素 Factors				响应值 Response value (x±s, n=3, mm)	
	蔗糖 Sucrose (%)	蛋白胨 Peptone (%)	氯化钾 KCl (%)	磷酸二氢钠 NaH ₂ PO ₄ (%)	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
1	1 (2)*	1 (0.5)	1 (0.02)	1 (0.02)	8.69±0.13	9.15±0.23
2	1	2 (1.0)	2 (0.06)	2 (0.06)	8.76±0.11	9.13±0.67
3	1	3 (1.5)	3 (0.10)	3 (0.10)	7.98±0.10	10.36±0.23
4	2 (3)	1	2	3	10.79±0.50	10.80±0.10
5	2	2	3	1	11.18±0.21	9.87±0.24
6	2	3	1	2	9.93±0.16	9.17±0.09
7	3 (4)	1	3	2	15.54±0.30	11.53±0.13
8	3	2	1	3	10.04±0.16	12.07±0.24
9	3	3	2	1	12.71±0.26	11.77±0.16
K ₁ - <i>V. (A.)</i>	25.43 (28.64) [#]	35.02 (28.64)	28.66 (30.39)	32.58 (30.79)		
K ₂ - <i>V. (A.)</i>	31.90 (29.84)	29.98 (31.07)	32.26 (31.70)	34.23 (29.83)		
K ₃ - <i>V. (A.)</i>	38.29 (35.37	30.62 (31.30)	34.70 (31.76)	28.81 (33.23)		
S _j - <i>V. (A.)</i>	27.56 (8.59)	5.02 (0.03)	6.16 (0.40)	5.15 (2.05)		
主次顺序 Primary and secondary order			A>C>D>B (A>D>C>B)			
优水平 Optimal level	A3 (A3)	B1 (B1)	C3 (C3)	D2 (D3)		
优组合 Optimal com- bination			A3B1C3D2 (A3B1C3D3)			
综优组合 Final optimal combination			A3B1C3D2			

注: *: 括号内表示因素的实际水平; #: 括号外表示鳗弧菌(*V. anguillarum*)的响应, 括号内表示嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)的响应.
Note: *: The inside of bracket shows the actual level of factors; #: The outside of bracket shows the response of *V. anguillarum* and the inside shows the response of *A. hydrophila*.

11.53 mm±0.99 mm ($n=6$)。可以看出因素 D2 和 D3 水平条件下发酵液的抑菌活性差异不显著, 从节约原料角度考虑, 选择 D2 作为优化的水平, 即优化的培养基组成为: 4%蔗糖、0.5%蛋白胨、0.1% KCl、0.06% NaH₂PO₄。

2.2.5 发酵培养时间的确定: 通过对图 3 的观察发现, 菌株 HN4-13 的生物量在 4–9 d 的时间范围内都有增加, 在第 9 天达到最大, 第 9–10 天生物量趋于稳定。对于发酵液的抑菌活性而言, 优化培养基的发酵液抑菌活性在第 8–9 天达到最大, 第 9 天的发酵液对鳗弧菌和嗜水气单胞菌的抑菌圈直径分别为 15.65 mm 和 12.75 mm, 因此确定菌株 HN4-13 摇瓶发酵天数为 9 d。这和已报道的一些水产病原菌拮抗菌的活性非常接近^[12–13]。

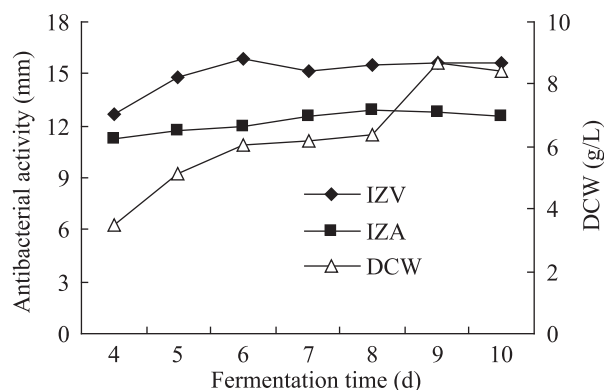


图 3 菌株 HN4-13 摇瓶发酵培养过程中发酵液抑菌活性和菌体干重的变化

Fig. 3 The variation of antibacterial activity and dry cell weight of strain HN4-13 during the fermentation time course in a 1-1 flask

注: IZV: 发酵液对鳗弧菌的抑菌活性; IZA: 发酵液对嗜水气单胞菌的抑菌活性; DCW: 菌体干重。

Note: IZV: The antibacterial activity against *V. anguillarum* of HN4-13 broth; IZA: The antibacterial activity against *A. hydrophila* of HN4-13 broth; DCW: Dry cell weight.

3 讨论

据估计, 海洋真菌至少有 1 500 种。但到 2000 年为止, 被描述过的海洋真菌仅有 444 种, 不到陆地真菌总数(约 5 万种)的 1%^[14]。因此, 海洋真

菌仍处于被探索和研究阶段。研究表明, 海洋真菌次生代谢产物的类型主要以含氮类化合物和聚酮类化合物为主, 并产生特征性的卤代化合物^[15]。目前已上市的 7 种海洋药物全部为生物碱, 表明生物碱是成药性最高的一类天然产物^[16]。

“天才菌株”是指那些代谢产物化学多样性丰富、产量高并具有较好生物活性的微生物菌株。虽然微生物的种类繁多, 但“天才菌”很少, 只有将生物学筛选与化学筛选相结合, 才能从众多的海洋真菌中发现“天才菌株”^[2]。

海洋真菌 HN4-13 菌株是本研究室采用抗菌/抗肿瘤活性和化学(TLC、HPLC)相集成的筛选方法, 从连云港海域来源真菌中筛选得到的一株具有抗菌活性的海洋真菌“天才菌株”。本研究基于 HN4-13 菌株的形态学特征和 ITS 序列分析结果, 将其鉴定为黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*)。黄柄曲霉是一种分布广泛的真菌, 国内外关于黄柄曲霉的研究主要集中于产酶和次生代谢产物方面。黄柄曲霉可以产生果胶酶^[17]、L-蛋氨酸酶^[18]、 α -半乳糖苷酶^[19]和酪氨酸酶^[20]等。此外, 黄柄曲霉还可以产生喹啉生物碱^[21]、土曲霉酸^[22]、丁内酯^[23]、脑苷脂类^[24]、Aspochalasin L^[25]和异苯并呋喃类化合物^[26]等, 具有抗菌、抗病毒等生物活性。这些研究提示了黄柄曲霉有产生抗菌活性物质的潜力, 通过优化发酵条件或改变发酵策略, 有可能诱导黄柄曲霉产生新结构类型的活性化合物^[27]。进一步对 *Aspergillus flavipes* strain HN4-13 中的抗菌活性成分进行分离纯化工作, 将有助于发现结构新颖的抗菌活性化合物, 相关工作正在进行。

参考文献

- [1] Blunt JW, Copp BR, Hu WP, et al. Marine natural products[J]. Natural Product Report, 2009, 26(2): 170–244.
- [2] 朱伟明, 王俊锋. 海洋真菌生物活性物质研究之

- 管见[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 218–228.
- [3] Saleem M, Ali MS, Hussain S, et al. Marine natural products of fungal origin[J]. Natural Product Report, 2007, 24(5): 1142–1152.
- [4] 郭雷, 王淑军, 宋晓凯. 连云港市发展海洋药物产业的探讨[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2620–2622.
- [5] Newman DJ, Cragg GM. Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets[J]. Current Drug Targets, 2006, 7(3): 279–304.
- [6] 张翠娟, 于宙亮, 赵宝华, 等. 嗜水气单胞菌研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(7): 46–47.
- [7] 陈吉祥, 于德华, 李筠. 鱼类病原鳃弧菌致病相关因子及分子生物学[J]. 海洋科学, 2003, 27(8): 11–15.
- [8] 苏振霞, 肖辉, 陈列欢. 3种抗生素对3种常见鱼类病原菌的抑菌活性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(6): 483–486.
- [9] 叶波平, 贾阳阳, 许婷婷, 等. 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[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 241–248.
- [10] 郭雷, 刘春宏, 王淑军, 等. 抗肿瘤海洋真菌的筛选及菌株 HGQ6的初步研究[J]. 淮海工学院学报, 2011, 20(3): 85–88.
- [11] 齐祖同. 中国真菌志: 曲霉属及其相关有性型[M]. 第五卷. 北京: 科学出版社, 1997: 66–68.
- [12] 张新明, 李健, 刘淇. 弧菌拮抗菌的筛选及其效果[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 325–332.
- [13] 蒋启欢, 叶应旺, 胡王, 等. 银鲫肠道内抑制嗜水气单胞菌的潜在益生菌筛选及其特性研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(2): 22–27.
- [14] Hyde KD, Jones EBG, Leão E, et al. Role of fungi in marine ecosystems[J]. Biodiversity and Conservation, 1998, 7(9): 1147–1161.
- [15] Bugni TS, Ireland CM. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms[J]. Natural Product Reports, 2004, 21(1): 143–163.
- [16] 郭雷, 宋晓凯, 王淑军, 等. 海洋抗肿瘤药物的临床研究进展[J]. 海洋科学, 2010, 34(3): 82–87.
- [17] Martínez-Trujillo A, Arreguín-Rangel L, García-Rivero M, et al. Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(2): 202–209.
- [18] El-Sayed ASA. Purification and characterization of a new L-methioninase from solid cultures of *Aspergillus flavipes*[J]. The Journal of Microbiology, 2011, 49(1): 130–140.
- [19] Ozsoy N, Berkkan H. Production and characterization of α -galactosidase from *Aspergillus flavipes*[J]. Cell Biochemistry and Function, 2003, 21(4): 387–389.
- [20] Gukasyan GS. Purification and some properties of tyrosinase from *Aspergillus flavipes* 56003[J]. Biochemistry (Mosc), 1999, 64(4): 417–420.
- [21] Barrow CJ, Sun HH. Spiroquinazoline, a novel substance P inhibitor with a new carbon skeleton, isolated from *Aspergillus flavipes*[J]. Journal of Natural Products, 1994, 57(4): 471–476.
- [22] 李淑彬, 王军, 杨劲松, 等. 抗真菌抗生素179M产生菌的分离鉴定和生理特性研究[J]. 菌物系统, 2001, 20(3): 362–367.
- [23] Nagia MM, El-Metwally MM, Shaaban M, et al. Four butyrolactones and diverse bioactive secondary metabolites from terrestrial *Aspergillus flavipes* MM2: isolation and structure determination[J]. Organic and Medicinal Chemistry Letters, 2012, 2(1): 9–16.
- [24] Jiang T, Li T, Li J, et al. Cerebroside analogues from marine-derived fungus *Aspergillus flavipes*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2004, 6(4): 249–257.
- [25] Rochfort S, Ford J, Ovenden S, et al. A novel aspochalasin with HIV-1 integrase inhibitory activity from *Aspergillus flavipes*[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(4): 279–283.
- [26] Kwon YJ, Zheng CJ, Kim WG. Isolation and identification of FR198248, a hydroxylated 1, 3-dihydroisobenzofuran, from *Aspergillus flavipes* as an inhibitor of peptide deformylase[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, 74(2): 390–393.
- [27] Lu ZY, Zhu HJ, Fu P, et al. Cytotoxic polyphenols from the marine-derived fungus *Penicillium expansum*[J]. Journal of Natural Products, 2010, 73(5): 911–914.