

尖瓣海莲叶内生真菌 *Penicillium* sp. B21 代谢产物 挥发油成分及抑菌活性

牛燕燕, 罗由萍, 郑彩娟*, 邓鹏飞*
(海南师范大学 化学与化工学院, 海口 571158)

[摘要] 目的:对尖瓣海莲叶内生真菌 *Penicillium* sp. B21 的发酵液挥发油成分进行分析,并对其抑菌活性进行初筛。方法:水蒸气蒸馏法提取海桑叶内生真菌 *Penicillium* sp. B21 的发酵液挥发油,GC-MS 鉴定挥发油成分,96 孔板酶标法对挥发性组分抑菌活性初筛。结果:水蒸气蒸馏法提取的挥发性组分,每 100 g 发酵产物得到挥发油 1.82 g。GC-MS 共鉴定出挥发油组分 39 个,占挥发油总质量的 93.89%。抑菌活性测试表明,在质量浓度 20 mg·L⁻¹ 下,挥发油对大肠埃希菌和白色葡萄球菌具有较好的抑菌活性。结论:尖瓣海莲叶内生真菌 *Penicillium* sp. B21 发酵液挥发油成分具有一定的抑菌活性,拓展了其在医药、食品等领域的应用和研究。

[关键词] 尖瓣海莲; 挥发油; 水蒸气蒸馏; 气相色谱-质谱联用; 抑菌活性

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)14-0070-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140070

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160603.1148.040.html>

[网络出版时间] 2016-06-03 11:48

Volatile Constituents and Antibacterial Activity of Endophytic Fungus *Penicillium* sp. B21 from *Bruguiera sexangula*

NIU Yan-yan, LUO You-ping, ZHENG Cai-juan*, DENG Peng-fei*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

[Abstract] **Objective:** To identify chemical components in volatile oil from fermentation liquid of endophytic fungus *Penicillium* sp. B21 from *Bruguiera sexangula* and the activity of antibacterial of the volatile oil. **Method:** Volatile oil from fermentation liquid of endophytic fungus *Penicillium* sp. B21 was extracted by hydrodistillation. GC-MS was adopted to analyze chemical constituents in volatile oil. Also, the antibacterial activity of the volatile components were detected with enzyme standard method. **Result:** Yield of volatile oil was 1.82%, 39 kinds of compounds were identified which were accounted for 93.89% of total mass of volatile oil. Antibacterial activity tests indicated that, with 20 mg·L⁻¹ concentration, volatile oil has good antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus albus*. **Conclusion:** The volatile oil from fermentation liquid of Endophytic Fungus *Penicillium* sp. B21 from *B. sexangula* was investigated by antimicrobial activities. It extended the research of chemical medicine and food industry areas.

[Key words] *Bruguiera sexangula*; volatile oil; water steam distillation; GC-MS; antibacterial activity

[收稿日期] 20151005(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21162009)

[第一作者] 牛燕燕, 硕士, 实验员, 从事天然产物化学研究, E-mail: niuyanyan1986@126.com

[通讯作者] * 郑彩娟, 博士, 副教授, 从事天然有机化学研究, Tel:0898-65889422, E-mail: caijuan2002@163.com;

* 邓鹏飞, 博士, 副教授, 从事天然有机化学研究, Tel:0898-65889422, E-mail: dengpengfei@gmail.com

在植物的生长环境中,存在着各种各样的微生物,有的附着于植物表面,有的存在于植物体内。有研究表明,在长期演化过程中,植物内生真菌与宿主互惠共生,一方面内生真菌从宿主植物中吸收营养物质供个体存活,另一方面,内生真菌的代谢产物刺激植物的生长发育,提高植物对病虫害的抵抗力。植物内生真菌种类丰富,数量庞大,其代谢产物是许多活性物质的来源,因此逐步受到研究学者的广泛关注,成为目前的研究热点之一^[1-2]。挥发油是一类具有芳香气味、低沸点并且不与水相混溶的油状混合物,组分一般较为复杂,常具有发散解表、祛风除湿、清热解毒、杀虫抗菌等作用^[3],常采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)快速分析挥发油中低沸点化学成分,操作简单、分析速度快、分离效能高、灵敏度高,大大简化了检测过程,而且得到的质谱图可以由数据处理系统检索分析,并结合相关文献资料快速准确性^[4-5]。目前,对于多种植物多部位挥发油化学成分的研究比较广泛,研究方法和实验手段也都较为成熟,但对微生物代谢产物的挥发油组分研究则较少。

本研究选择海南红树植物尖瓣海莲^[6]为宿主植物,因其生长环境较陆生植物特殊复杂,可能得到结构新颖或具有较强药理活性的目标产物。分离纯化叶中内生真菌,并对分离得到的微生物代谢产物进行活性筛选,选择其中一株青霉菌 *Penicillium* sp. B21 作为目标菌株,次级代谢产物经乙酸乙酯萃取,对提取物的挥发性组分及抗菌活性进一步研究,为尖瓣海莲叶内生真菌资源的开发和利用奠定了基础^[7-10]。

1 材料

尖瓣海莲叶于 2015 年 1 月采自海南东寨港红树林自然保护区,由海南师范大学化学与化工学院郑彩娟副教授鉴定为尖瓣海莲 *Bruguiera sexangula*。采摘后的叶片置于冰箱 4 ℃ 保存,3 d 内完成叶片内生真菌的分离,共分离出 9 株内生真菌。初筛发酵培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,大量发酵培养基为固体大米培养基。

5975B/6890N 型 GC-MS (美国安捷伦公司)。DB-5 型石英毛细管柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm),水为娃哈哈纯净水,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 目标菌株的选取 以分离得到的 9 株内生真菌为研究对象,采用 PDA 培养基,每株菌发酵 600

mL,发酵时间为 30 d。9 株菌的代谢产物经乙酸乙酯萃取,HPLC 和抗菌实验初筛,选取代谢产物较丰富,并具有一定抗菌活性的 *Penicillium* sp. B21 为最终目标菌株,进行大量固体培养基发酵(300 mL/瓶,共 180 瓶)。

2.2 挥发油提取 采用水蒸气蒸馏法。内生真菌 *Penicillium* sp. B21 固体培养基发酵代谢产物经乙酸乙酯萃取,挥干溶剂得到浸膏,称取浸膏 116 g,加水 200 mL,按照挥发性组分随水蒸气蒸馏而出,经冷凝后收集流出液。

2.3 化学组分 GC-MS 鉴定 进样条件为样品温度 100 ℃,定量环(1.0 mL),温度 110 ℃,传输线温度 120 ℃,气相平衡时间 5.5 min,样品平衡时间 7.0 min,样品瓶加压时间 0.1 min,定量环增量时间 0.5 min,样品环平衡时间 0.05 min,进样时间 1.0 min。

GC-MS 条件为 HP-FFAP 石英毛细管柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm),起始温度 40 ℃,以 5 ℃·min⁻¹ 速率升温至 200 ℃ 维持 5 min,以 8 ℃·min⁻¹ 速率升温至 280 ℃ 维持至完成分析,载气氦气(99.999%),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样口温度 250 ℃,分流比 50:1。EI 电离源 70 eV,离子源温度 230 ℃,四极杆温度 180 ℃,溶剂延迟 2.5 min,扫描范围 m/z 50 ~ 550。

2.4 抑菌活性测试 供试菌株为 7 种陆地致病菌:大肠埃希菌 (*Escherichia coli*),白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus*),金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*),枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*),四联球菌 (*Micrococcus tetragenus*) 和藤黄八叠球菌 (*M. luteus*)。

采用 96 孔板酶标法初筛活性。将待测挥发油及阳性对照药品环丙沙星溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,移取菌悬液加到 96 孔板中,样品及对照药品设 3 个平行,将 96 孔板置于 28 ℃ 恒温恒湿培养箱中培养 12 h。

2.5 结果分析

2.5.1 挥发油成分及相对含量 内生真菌 *Penicillium* sp. B21 发酵代谢产物的乙酸乙酯提取部分,经水蒸气蒸馏法提取得到淡黄色油状透明的具有特殊气味的挥发油产物。挥发油总离子流色谱图共分离得到 48 个色谱峰,见图 1,每个色谱峰经质谱扫描得到相应的质谱图,经计算机质谱数据系统检测(质谱数据库 NIST05 库),并结合保留时间和相关文献资料,共鉴定出 39 个具有较高匹配度的化合物,占挥发油总质量的 93.89%。由

于挥发油中化合物的结构和性质差异比较小,而且各成分含量也不高,含量较少的组分比较多,因此在挥发油的 GC-MS 鉴定过程中会出现重叠峰等现象,导致所测质谱与谱库中标准质谱的相似度较低,从而无法确定其结构,同时,含量较少的组分也会受到仪器和化学背景的干扰,影响其定性定量的准确性^[3]。

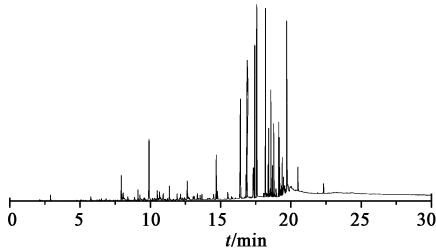


图 1 内生真菌 *Penicillium* sp. B21 发酵液代谢产物挥发油总离子流 GC-MS

Fig.1 GC-MS of total ion of Endophytic Fungus *Penicillium* sp. B21 from *Bruguiera sexangula*

对各组分的相对质量分数按色谱峰面积归一化法计算,结果见表 1。根据表 1 的分析数据看出,相对质量分数较高的分别为十六烷酸(棕榈酸, 19.91%),丁基-异丁基-邻苯酸二甲酯(17.16%),亚油酸乙酯(6.54%),十六酸乙酯(棕榈酸乙酯, 6.26%)和十八碳烷酸(硬脂酸, 5.36%)。在鉴定出的 39 个组分中,出现了含量较大的丁基-异丁基-邻苯酸二甲酯增塑剂组分,这可能是试验过程中使用塑料桶进行乙酸乙酯萃取代谢产物引入的杂质,也可能是微生物自身的代谢产物。对此补充一个对照试验,以分析该成分的来源。将萃取过代谢产物的塑料桶再次经乙酸乙酯同等时间浸泡,得到对照物 A,将对照物 A 同样试验条件下水蒸气蒸馏,并在同样条件下 GC-MS 分析,发现塑料桶乙酸乙酯浸泡产物中含有少量邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(DEHP),未见有丁基-异丁基-邻苯酸二甲酯,而在挥发油组分中没有发现 DEHP 组分,因此推测挥发油组分中的丁基-异丁基-邻苯酸二甲酯来源于微生物自身的代谢产物。此外,挥发油组分中还发现一个含氯化物(氯乙酸十八烷基酯, 0.06%),这可能是红树植物特殊的高盐生长环境,导致内生真菌代谢产生的特异性产物。

2.5.2 挥发油抑菌活性检测 采用 96 孔板酶标法对微生物代谢产物乙酸乙酯提取物中挥发油组分的抑菌活性进行检测,实验表明挥发油组分在质量浓度 20 mg·L⁻¹ 下对大肠埃希菌和白色葡萄球菌表现出较好的抑菌活性,而对其他 5 种菌株均未表现出

表 1 内生真菌 *Penicillium* sp. B21 发酵液代谢产物挥发油化学成分鉴定及其相对质量分数

Table 1 Volatile oil chemical composition identification and content determination of Endophytic Fungus *Penicillium* sp. B21 from *Bruguiera sexangula*

No.	<i>t</i> _R /min	化学成分	相对质量分数
1	2.90	正己醛	0.12
2	5.76	2-乙基己醇(异辛醇)	0.11
3	6.85	壬醛	0.05
4	7.94	L-薄荷醇(天然薄荷脑)	0.67
5	8.07	正辛酸(羊脂酸)	0.56
6	8.87	顺式柠檬醛	0.14
7	9.12	反式-2-癸烯醛	0.25
8	9.26	反式柠檬醛	0.14
9	9.91	反式-2,4-癸二烯醛	1.95
10	10.50	2-十一烯醛	0.23
11	12.16	正十五烷	0.18
12	12.63	2,4-二叔丁基苯酚	0.06
13	13.06	11-十八碳二烯酸甲酯	0.13
14	13.13	1-十六烯(鲸蜡烯)	0.09
15	13.35	正十六烷(鲸蜡烷)	0.17
16	13.55	十四醛(肉豆蔻醛)	0.13
17	13.67	柏木脑(柏木醇)	0.14
18	14.25	氯乙酸十八烷基酯	0.06
19	14.51	甲基十七烷基甲酮	0.16
20	14.70	1,2-环氧正十五烷	0.94
21	14.78	十四烷酸甲酯	0.21
22	15.51	十四酸乙酯	0.23
23	16.41	(Z)-13-十八碳烯醛	3.08
24	16.82	十六烷基环氧乙烷(1,2-环氧十八烷)	0.53
25	16.88	十六烷酸甲酯(棕榈酸甲酯)	4.02
26	17.43	丁基-异丁基-邻苯酸二甲酯	17.16
27	17.57	十六酸乙酯(棕榈酸乙酯)	6.26
28	18.18	十六烷酸(棕榈酸)	19.91
29	18.42	正十五烷酸	1.78
30	18.53	9,12-十八烷二烯酸甲酯(亚油酸甲酯)	4.20
31	18.58	9-十八碳烯酸甲酯(反式油酸甲酯)	4.45
32	18.69	十四酸(肉豆蔻酸)	0.97
33	18.78	15-甲基十七烷酸甲酯	3.62
34	19.13	亚油酸乙酯	6.54
35	19.17	十八烯酸乙酯(油酸乙酯)	4.32
36	19.38	二十碳饱和脂肪酸(花生酸)	4.65
37	19.70	十八碳烷酸(硬脂酸)	5.36
38	20.52	十八碳-9,12,15-三烯酸(α-亚麻酸)	0.09
39	22.33	邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯	0.23

活性。

3 讨论

自然界中存在的微生物种类繁多、生长周期短,具有可持续利用的优势,不会造成生态环境的失衡,通过大规模发酵培养可以实现工业化生产,红树植物高盐潮湿的特殊生长环境造就了其内生微生物可能具有代谢途径的特异性,从而产生结构新颖或较强活性的代谢产物^[11]。本试验采用水蒸气蒸馏法提取微生物发酵产物挥发油成分,共得到具有特殊气味的浅黄色透明油状黏稠液体 2.11 g,挥发油提取率 1.82%。挥发油是多种类型化合物的混合物,其中含有脂肪族化合物和芳香族化合物,以单萜和倍半萜的萜类衍生物为主^[4-5]。对于大多数挥发油来说,不含氧的烃类成分虽然量大但一般没有香味且不是重要成分,含氧衍生物醇、醛、酮、醚、酸、酯、酚等,往往含量较少但具有特别的芳香气味,是挥发油的重要成分。

采用 GC-MS 对挥发油成分进行分析鉴定,由于样品采用水蒸气蒸馏法制得,沸点低,相对分子质量小,因此离子源温度和进样口温度不宜过高,进样口温度 250 ℃,离子源温度 230 ℃,确保样品可以气化,四极杆温度 180 ℃(该区域均为离子,温度可略低)。EI 电离源 70 eV 时电离效率较大,质谱图重复性好,且与标准谱库中质谱图(70 eV)具有可对比性。共鉴定出 39 个化合物,其中 5 个相对质量分数较大的组分,十六烷酸(棕榈酸,19.91%),丁基-异丁基-邻苯酸二甲酯(17.16%),亚油酸乙酯(6.54%),十六酸乙酯(棕榈酸乙酯,6.26%)和十八碳烷酸(硬脂酸,5.36%)。有研究表明,棕榈酸具有抗肿瘤活性,在高浓度时能将小鼠乳腺癌 tsFT210 细胞的细胞周期抑制在 G2/M 期并诱发 tsFT210 细胞发生凋亡^[12],同时,它也是合成棕榈酸异丙酯、棕榈酸异辛酯的基本原料,这些产品与皮肤相容性较好,渗透能力强,广泛应用于各种人体护理品中^[13]。丁基-异丁基-邻苯酸二甲酯是一种增塑剂,有研究^[14-15]表明这种化合物具有显著的 α -葡萄糖苷酶非竞争性抑制活性,是一种抗糖尿病的民间药物,在海带根部分离得到。亚油酸乙酯是不饱和脂肪酸,能和胆固醇结合成酯,并可能促使胆固醇降解为胆酸而排泄,可用于降低胆固醇的药物。十六酸乙酯(棕榈酸乙酯)是一种高级脂肪酸乙酯,具有奶油香味,天然存在于杏、菠萝、葡萄酒、黑加仑等水果中,常用于酒用香精和配制奶油、牛奶、香辛料等香料香精中。十八碳烷酸(硬脂酸)属于高级饱和

脂肪酸,以动物油炼制来源较多,乳化效果较好,是化妆品(如膏霜、沐浴露、剃须膏、护肤品、各种肥皂等)制造中不可缺少的原料,也可用于制造增塑剂、稳定剂等,此外,在食品工业、制鞋工业、橡胶工业、水泥行业和 PVC 领域也有应用。

[参考文献]

- [1] 戈惠明,谭仁祥. 共生菌——新活性天然产物的重要来源[J]. 化学进展,2009,21(1):30-46.
- [2] 马养民,赵洁. 植物内生真菌抗菌活性物质的研究进展[J]. 有机化学,2010,30(2):220-232.
- [3] 吴海. 质谱法结合化学计量学在中药分析及脂组学中的应用研究[D]. 长沙:中南大学,2009.
- [4] 潘为高,李勇,朱小勇,等. 剑叶耳草挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):130-134.
- [5] 朱琳. 花椒挥发油 GC-MS 指纹图谱及其成分的研究[D]. 成都:西南大学,2010.
- [6] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 52 卷[M]. 北京:科学出版社,1983:53.
- [7] 张晓蓉,彭光花,陈功锡,等. 黄花蒿残渣挥发油化学成分及其抑菌活性分析[J]. 中草药,2011,42(12):2418-2421.
- [8] 鞠秀云,冯友建,陈凤美,等. 银杏内生镰刀菌 GI024 挥发油成分及溶栓活性[J]. 微生物学通报,2006,33(6):8-11.
- [9] 周丽娟,郑琳,刘煜宇,等. 荔枝产香内生菌的挥发性成分分析及其在卷烟中的应用研究[J]. 精细化工,2010,27(10):1013-1015.
- [10] 韩壮,梅文莉,崔海滨,等. 红树植物海杧果内生真菌 *Penicillium* sp. 中的抗菌活性成分[J]. 高等学校化学学报,2008,29(4):749-752.
- [11] 王长云,邵长伦,傅秀梅,等. 中国海洋药物资源及其药用研究调查[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2009,39(4):669-675.
- [12] 刘睿,顾谦群,崔承彬,等. 密脉鹅掌柴的化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中草药,2005,36(3):328-332.
- [13] 窦全丽,张仁波,肖仲久,等. 小婆婆纳挥发油的化学成分的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(32):18132-18133,18149.
- [14] 卜同. 海带根中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的提取及其酶抑制作用动力学研究[D]. 青岛:中国科学院海洋研究所,2009.
- [15] 中国科学院海洋研究所. 一种化合物丁基-异丁基-邻苯酸二甲酯的应用:中国,CN101461800[P]. 2009-06-24.

[责任编辑 顾雪竹]