

虎奶菇发酵液抑菌成分的理化性质及其分离鉴定

林陈强¹, 严 军², 王衍霖², 陈济琛¹, 林新坚^{1*}

¹福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福州 350013; ²福建农林大学生命科学学院, 福州 3500021

摘要: 为探明虎奶菇发酵液中的抑菌成分, 本文以金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 为指示菌, 研究了温度、pH、紫外线、蛋白酶 K 对虎奶菇发酵液抑菌活性的影响; 并采用硅胶柱层析及反相中压液相层析追踪分离抑菌活性物质, 通过核磁共振并结合相关资料对分离到的单体化合物进行了结构鉴定。结果显示, 发酵液抑菌成分对蛋白酶较为稳定, 对紫外照射敏感, 可在 90 °C 以下、pH1 ~ 9 的范围内较好的保持其抑菌活性; 活性追踪分离得到 1 个抑菌物质 PtrA, 经鉴定为 2-呋喃甲酸 (2-furoic acid)。

关键词: 发酵液; 抑菌活性; 理化性质; 分离鉴定

中图分类号: Q936; Q586

文献标识码: A

Physical-chemical Properties, Isolation and Identification of Antimicrobial Substances from *Pleurotus tuber-regium* Fermenting Borth

LIN Chen-qiang¹, YAN Jun², WANG Yan-lin², CHEN Ji-chen¹, LIN Xin-jian^{1*}

¹ The Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350001, China;

² College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, 350021, China.

Abstract: In order to look for the antimicrobial substances from *Pleurotus tuber regium* fermenting liquor, the effects of temperature, UV, pH changes and protease on the antimicrobial substances from *Pleurotus tuber-regium* fermenting broth were studied. Then the antimicrobial substances were isolated, purified by silica gel column chromatography and reversed-phase medium-pressure liquid chromatography, and a kind of antimicrobial compound was identified by combining ¹H NMR and ¹³C NMR with related papers. The results show that the antimicrobial substances in fermenting liquor are stable when influenced by protease, sensitive to ultraviolet radiation and better activity below 90 °C and at pH1-9. Guided by antimicrobial activity, a kind of antimicrobial compound PtrA was isolated and its structure was elucidated as 2-furoic acid.

Key words: fermenting liquor; antimicrobial activity; physical-chemical properties; isolation and identification

高等真菌属于“创造系数”很高的生物资源, 它们所含的次生代谢产物化学结构多样且新颖^[1]。高等真菌在液体发酵过程中, 除菌丝或孢子会大量增殖外, 还会在发酵液中产生多肽、生物碱、萜类化合物、甾醇、有机酸及具有抗生素作用的各种化合物等多种具有生理活性的物质。人们对高等真菌的液体发酵, 除获得菌丝体外, 还以获取上述具有活性的次生代谢产物为目的, 并已获得多种天然活性产物, 其中包括抑菌活性产物^[2-4]。虎奶菇 [*Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing] 隶属担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、侧耳科、侧耳属, 是一种产于亚洲热带地区的

珍稀药用菌, 在中国主要分布于云南省的腾冲、章凤等地^[5]。虎奶菇菌丝及其发酵液具有抑菌活性, 特别是对一些革兰氏阳性菌具有较强的抑制作用^[6]。目前国内外对虎奶菇抗菌活性物质报道较少^[7], 为了进一步探索虎奶菇发酵液中的抑菌活性成分, 本文研究了虎奶菇发酵液抑菌活性成分的理化性质, 并采用各种色谱层析方法追踪分离抑菌活性物质, 以期探明发酵液抑菌活性物质的具体成分, 为虎奶菇的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

虎奶菇 (*Pleurotus tuber-regium*), 引自福建三明真菌研究所。

收稿日期: 2013-03-15 接受日期: 2013-05-08

基金项目: 福建省公益类科研院所项目 (2011R1024-4); 福建省科技厅重点项目 (2013Y1003)

* 通讯作者 Tel: 86-591-87862915; E-mail: xinjianlin@163.net

1.2 指示菌

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)福建师范大学提供。

1.3 培养基

液体培养基:黄豆粉 15 g,葡萄糖 10 g,甘露醇 10 g,蒸馏水 1000 mL,pH 自然。

牛肉膏-蛋白胨斜面培养基:牛肉膏 3 g,NaCl 5 g,蛋白胨 10 g,蒸馏水 1000 mL,pH7.2。

1.4 实验方法

1.4.1 虎奶菇发酵液制备^[8,9]

500 mL 三角瓶装 160 mL 液体培养基,高压湿热灭菌(0.1 MPa,121 °C,20 min),接斜面菌种(1 cm×1 cm)两块,160 rpm 摇床 30 °C 培养 6 d,发酵液 120 目过筛,5000 rpm 离心,取上清液备用。

1.4.2 虎奶菇发酵液抑菌成分理化性质研究

1.4.2.1 热稳定性试验

将发酵液分别在 40,50,60,70,80,90,100 °C 水浴中分别加热 30 min,及 0.1MPa 灭菌 30 min,待自然冷却后,以发酵原液为对照,打孔法($d = 8$ mm)比较各处理液对金黄色葡萄球菌的抑菌活性,活性检测方法下同。

1.4.2.2 pH 稳定性试验

取发酵液,将其 pH 分别调到 1,3,5,7,9,11,处理 4 h,然后将各 pH 反调回对照(即原液 pH 4.7),以发酵原液为对照,检测各处理液抑菌活性。

1.4.2.3 抗紫外线试验

将发酵液在无菌间 15 W 紫外灯下,距离 25 cm,照射 10,20,30,60,90,120 min,以发酵原液为对照,检测各处理液抑菌活性。

1.4.2.4 酶稳定性试验

将蛋白酶 K 加入发酵液中,使其浓度分别为 50,100,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37 °C 作用 2 h 后,以发酵原液为对照,检测各处理液抑菌活性。

1.4.3 虎奶菇发酵液抑菌成分分离纯化

1.4.3.1 抑菌粗提物制备

将发酵液进行浓缩后用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和甲醇反复萃取,有机相在 45 °C、60 rpm 条件下旋转蒸发至恒重,原试剂稀释至相同浓度(5 mg/mL),打孔法($d = 8$ mm)比较活性,选择最佳活性粗提物 4 °C 冰箱中密封保存待用。

1.4.3.2 正相硅胶柱层析

抑菌粗提物通过氯仿-甲醇(体积比为 100:1、80:1、60:1、40:1、20:1、10:1、1:1、0:1)反复梯度洗

脱,收集的各个组分用旋转蒸发仪 40 °C 左右减压浓缩,采用硅胶 GF254 薄层层析分析合并相同组分,纸片法检测抑菌活性。

1.4.3.3 反相中压液相制备色谱

将硅胶柱层析后具有活性的组分通过 BUCHI 中压液相制备色谱系统进一步分离纯化。反相柱:liquid chromatography YMC* GEL ODS-A AA12S50;甲醇-水(水,30:70,50:50,70:30,甲醇)梯度洗脱。收集组分同 1.4.3.1 处理。

1.4.4 虎奶菇发酵液抑菌成分鉴定

样品溶解于 0.5 mL 的氘代溶剂中,装入干净的核磁管进行测试。测试项目包括¹H NMR、¹³C NMR,比对相关数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 热处理对发酵液抑菌活性的影响

发酵液在不同温度下处理 30 min 后进行抑菌试验,以未经热处理的试样(30 °C)作为对照,实验结果如下图 1。

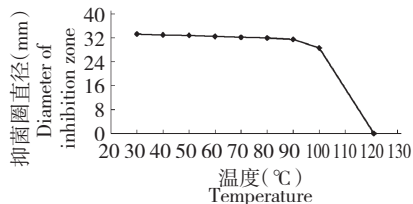


图 1 热处理对发酵液抑菌能力的影响

Fig. 1 Effect of heat treatment on antibacterial activity of fermentation broth

如图 1 所示,随着处理温度的升高,发酵液抑菌能力略有下降。在 100 °C 高温处理后仍对金黄色葡萄球菌保持较高的抑菌活性,与对照相比达差异极显著水平($P < 0.01$)。经 121 °C 高温处理 30 min 后,发酵液完全失去抑菌活性,可见发酵液抑菌成分在高温下易失活,但在 30 到 90 °C 之间可以较好的保持其抑菌活性。

2.2 pH 对发酵液抑菌活性的影响

从图 2 可看出,强酸条件下,发酵液的抑菌活性受到抑制,pH1 和 pH3 的抑菌活性与对照相比均达差异极显著水平($P < 0.01$)。在 pH3 到 7 之间抑菌活性较稳定,在此范围内抑菌活性基本不受 pH 的影响,表明抗菌活性成分在酸性和中性条件下较稳定;当 pH > 9 时抑菌活性呈下降趋势,在 pH11 时发酵液已无抑菌活性,抗菌成分在强碱性条件下失活,

推断其对强碱敏感,可能为酸性物质。

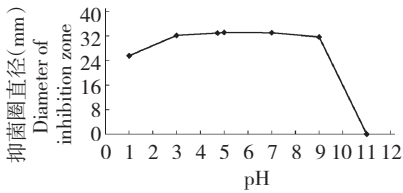


图2 pH对发酵液抑菌能力的影响

Fig. 2 Effect of pH on antibacterial activity of fermentation broth

2.3 UV照射时间对抗菌活性物质稳定性的影响

从图3可以看出,当虎奶菇发酵液经紫外线照射时,抑菌活性随辐射时间延长而明显降低,辐射30 min后的各处理与对照相比,均达差异极显著水平($P < 0.01$),说明抑菌活性物质对于紫外线比较敏感,发酵液需避光保存。

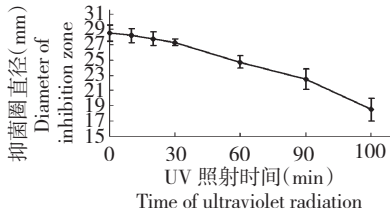


图3 UV照射时间对发酵液抑菌能力的影响

Fig. 3 Effect of time of radiation on antibacterial activity of fermentation broth

2.4 蛋白酶对抗菌活性物质稳定性的影响

由图4可以看出,虎奶菇发酵液在不同剂量的蛋白酶K处理2 h后,抑菌活性成分的活性均未受到影响,表明发酵液中抑菌活性成分对蛋白酶k稳定,推测活性成分不属于蛋白类物质。

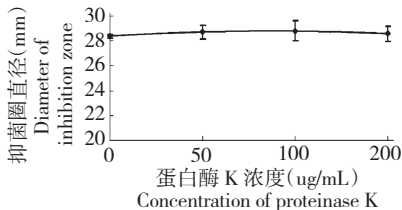


图4 蛋白酶k对发酵液抑菌能力的影响

Fig. 4 Effect of proteinase K on antibacterial activity of fermentation broth

2.5 发酵液抑菌活性物质提取

选择不同试剂(石油、氯仿、乙酸乙酯物、正丁醇、甲醇)对发酵液抑菌活性成分进行提取,以提取试剂为空白,比较各个提取物的抑菌能力,结果如表所示。

表1 不同试剂提取物抑菌效果

Table 1 The antimicrobial ability of different extract

提取物 Sample	提取率 extraction efficiency (g/L)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
空白 Blank control	-	0
发酵液 Fermentation broth	-	27.2 ± 1.7 aA
石油醚提取物 Petroleum ether extract	0.005	8.8 ± 0.7 dD
氯仿提取物 Chloroform extract	0.029	13.8 ± 0.8 cC
乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract	0.170	21.8 ± 1.6 bB
正丁醇提取物 n-Butanol extract	0.332	14.7 ± 1.2 cC
甲醇提取物 Carbinol extract	0.783	15.6 ± 1.0 cC

注:数据为3次重复的平均值,不同大小写字母分别表示在0.01和0.05水平上差异显著。

Note: Values are means of 3 replicates ± s. d, Different lower case letters: difference significant at $P < 0.05$, different higher case letters: difference significant at $P < 0.01$.

从表1可以看出,同浓度(5 mg/mL)提取物抑菌能力依次为乙酸乙酯 > 甲醇 > 正丁醇 > 氯仿 > 石油醚,推测抑菌成分为极性较大的物质。用甲醇提取时提取率最高,但由于用甲醇提取时杂质相对较多,不利于抑菌活性物质分离,因此从分离效率的角度考虑选用乙酸乙酯作为提取试剂。

2.6 发酵液抑菌活性物质分离纯化

2.6.1 乙酸乙酯粗提物正相硅胶柱层析

采用硅胶柱层析分离虎奶菇发酵液乙酸乙酯粗提物,氯仿/甲醇梯度洗脱收集得到8个组分,抑菌试验结果如表2所示,在氯仿(V):甲醇(V) = 40:1-20:1之间洗脱获得的组分具有较好的抑菌活性,将其合并为Ptr I,共占粗提物的35.31%;将Ptr I继续采用硅胶柱层析分离,石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱,合并浓缩得18个组分,其中组分2、9、10、12、13、14、15、16具有抑菌活性,抑菌试验结果如图5所示。

表2 发酵液粗提物硅胶柱层析(I)所得组分得率及其抑菌活性

Table 2 Extracting rate and the antibacterial activity of each fraction of ethyl acetate extract separated by silica gel column chromatography(I)

组分 component	氯仿:甲醇 Chloroform(V): Carbinol(V)	得率 extraction efficiency(%)	抑菌效果 antibacterial activity
1	100:1	4.02%	-
2	80:1	7.01%	+
3	60:1	3.70%	-

4	40:1	7.36%	+++
5	20:1	8.18%	+
6	10:1	19.77%	++
7	1:1	24.49%	+
8	0:1	5.01%	-

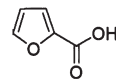


图6 化合物 Pt1 结构式

Fig. 6 The chemical structures of compounds Pt1

“-”表示无抑菌效果,“+”表示有抑菌效果,随着“+”增加抑菌效果增强。

“-” no antibacterial activity. “+” antibacterial activity, “+”→“++”→“+++” show from weak to strong activity

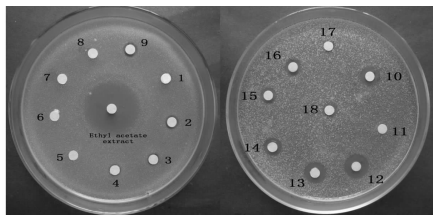


图5 硅胶柱层析(II)所得组分抑菌活性

Fig. 5 The antibacterial activity of each fraction by silica gel column chromatography(II)

如图5所示,洗脱获得的组分中大部分具有抑菌活性,其中第12、13组分的抑菌效果明显,合并为Ptr II, TLC(香草醛-硫酸显色)结果显示Ptr II不是单一组分,因此采用反相中压液相制备色谱进一步纯化。

2.6.2 Ptr II 反相中压液相层析

采用BUCHI中压液相制备色谱系统,甲醇-水梯度洗脱。收集的各个组分用旋转蒸发仪40℃左右减压浓缩,采用硅胶GF₂₅₄薄层层析分析合并相同组分,纸片法检测抑菌活性。活性组分静置结晶,得到一个具有抑菌作用的化合物PtrA,白色单斜长棱形结晶,mp 132~133℃,溴甲酚绿反应阳性,表示羧基的存在。

2.7 化合物PtrA的结构鉴定

¹H NMR(CD₃OD, 400 Hz): ¹H NMR谱中由于溶剂为氘代甲醇所以羧基中活泼氢质子被沉默, δ7.224(1H, d, J = 3.3 Hz, H-3), 6.603(1H, d, J = 3.3 Hz, 1.6 Hz, H-4), 7.738(1H, brs, H-5)为三组相互间有偶合的芳香氢信号。¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ7.224(H-3), 6.603(H-4), 7.738(H-5)。¹³C NMR(CD₃OD, 400 Hz): δ160.44(C-1), 146.58(C-2), 145.08(C-3), 117.59(C-4), 111.53(C-5)。将上述理化性质、波谱数据与文献^[10]中2-呋喃甲酸数据对照基本一致,鉴定其为2-呋喃甲酸(2-furoic acid),分子式为C₅H₄O₃,分子量为112.08。

3 讨论

虎奶菇作为一种珍稀药用菌,对其发酵产物的研究主要集中在多糖等大分子上,而对发酵液中次生代谢产物的研究较少。我们发现虎奶菇发酵液具有抑菌作用,且效果优于常见的化学防腐剂^[11],因此,对发酵液中抑菌成分的研究具有一定的意义和前景。

本文首次从虎奶菇发酵液中分离获得一种抑菌物质,并鉴定为2-呋喃甲酸,这与前期对发酵液抑菌成分的理化性质如高温、强碱条件下易失活等研究结果基本吻合。已有报道从食药菌中发现酸类抑菌成分,如凌建亚^[12]等人通过GC-MS联机分析研究浓香乳菇(*Lactarius camphouatus*)的主要抑菌成分,发现主要抑菌成分为有机酸和一些带苯环的不饱和化合物,此外还有一些抑菌辅助成分;李鹏^[13]在杨树菇(*Agrocybe aegerita*)发酵上清液中分离得到一个具有抗菌活性的小分子物质,结合紫外扫描、红外光谱和核磁共振图谱初步判定该抑菌物质为酸类物质。到目前为止,食药菌产生的抗菌活性物质多属于聚乙炔化合物、萜类化合物、类固醇化合物、二萜糖苷、有机酸、多元醇、芳香酚酯类化合物以及与核酸有关的化合物,虎奶菇发酵液中是否还有其他抑菌物质,有待进一步研究。

不同的培养基成分和培养条件均会对虎奶菇发酵液的抑菌能力产生影响^[8,9],可见虎奶菇发酵具有极其复杂的代谢途径及次生代谢产物。因此,本文采用活性追踪法对虎奶菇发酵液抑菌成分进行追踪分离,即从发酵液制备→浓缩→萃取→正相柱层析→反相柱层析→结晶到最后结构鉴定等过程中,每个环节只是将具有较高活性的组分进行下一步分析,因此可能出现以下几种情况:发酵液中还存在其他的抑菌活性物质,但由于含量较少而未能测得并分离出;发酵液的抑菌作用是由多种抑菌物质协同产生的,分离后导致活性丧失;分离过程的某个环节导致活性物质失活从而未能进入下一步骤等。综上所述,虎奶菇发酵液抑菌成分是否仅为2-呋喃甲酸一种抑菌成分,有待进一步验证。

参考文献

- Liu JK(刘吉开). Mycochemistry(高等真菌化学). Beijing: China Scientific and Technical Publishers, 2004. 1-3.
- Ishikawa NK, Yamaji K, Tahara S, *et al.* Highly oxidized cuparene-type sesquiterpenes from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*, 2000, 54: 777-782.
- Mazur X, Becker U, Anke T, *et al.* Two new bioactive diterpenes from *Lepista sordida*. *Phytochemistry*, 1996, 43: 405-407.
- Boonphong S, Kittakoop P, Isaka M, *et al.* Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria multiplex*. *J Nat Prod*, 2001, 64: 965-967.
- Huang NL(黄年来), Guo MY(郭美英), Huang LH(黄黎红). Tiger milk mushroom (*Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing.) and its cultivation. *Edible fungi chin* (中国食用菌), 1997, 16: 13-14.
- Chen JC(陈济琛), Lin RB(林戎斌), Zheng YB(郑永标), *et al.* Screening of C-sources and N-sources for mycelial growth of *Pleurotus tuber-regium* and its antimicrobial effect. *J Natl Sci Fujian agriculture and forestry univ*(福建农林大学学报, 自科版), 2005, 34: 373-375.
- Fang XJ(方熹君), Xu HY(许泓瑜), Lu ZM(陆震鸣), *et al.* Antibacterial activity of submerged cultures of *Pleurotus tuber-regium*. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报), 2009, 16: 50-53.
- Cai HS(蔡海松), Lin RB(林戎斌), Lin CQ(林陈强), *et al.* Effect of selected fermentation conditions on the anti-microbial activity of *Pleurotus tuber-regium* spent culture liquid. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报), 2006, 13: 74-77.
- Lin RB(林戎斌), Cai HS(蔡海松), Lin CQ(林陈强), *et al.* Effects of compositions of liquid fermentation on *Pleurotus tuber-regium* and its antimicrobial actions. *Edible fungi chin* (中国食用菌), 2006, 25: 46-48.
- Yu DQ, Yang JS. Handbook of Analytical Chemistry Analysis of NMR Spectrum(分析化学手册 核磁共振波谱分析), Vol VII. Beijing: Chemical Industry Press, 1999. 112.
- Lin CQ(林陈强), Lin RB(林戎斌), Cai HS(蔡海松), *et al.* Anti-microbial activity of ethyl acetate extracts of *Pleurotus tuber-regium* spent culture liquid. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报), 2007, 14: 62-66.
- Ling JY(凌建亚), Qin HM(秦红敏), Zhang CK(张长恺). Study on antimicrobial activity of *Lactarius camphoratus* Fs extract. *Food Sci* (食品科学), 2000, 21, (4): 40-42.
- Li P(李鹏). The study of antibiotic substance product by *Agrocybe aegerita*. Shandong: Shandong University (山东大学), PhD. 2005.
- Zhang L(张磊), Chen GR(陈国荣), Zheng RY(郑荣远), *et al.* Light microscopic and ultrastructural studies on experimental carotid atherosclerosis in rabbits. *J Clin Exp Pathol* (临床与实验病理学杂志), 2001, 17: 333-335.
- Yang YZ(杨永宗). Atherosclerotic Cardiovascular Disease (动脉粥样硬化性心血管疾病). Beijing: Cornell University Press, 2004. 50: 269-270.
- Gong HR(龚海荣), Li XP(李向平), Liang SY(梁思宇). Bette class research progress of lipid-regulating drugs. *Central South Pharm* (中南药学), 2011, 9: 539-541.
- Xi SY(奚胜艳), Gao XM(高学敏), Zhao JH(赵敬华). Application of the exquisite malpractice safflower experience. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2008, 49: 668-669.
- Wang NS(王宁生), Liang MR(梁美蓉), Liu QD(刘启德), *et al.* Borneol "Zuo is active" study. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 1994, 35: 46-47.
- Zhen YJ(甄艳军), An J(安杰), Zhou XH(周晓红), *et al.* The effect of Equisetum on early atherosclerosis of equisetum hiemale rat serum IL-1 and the IL-8 and the TNF- α . *Chin J Gerontol* (中国老年杂志), 2003, 23: 538-539.

(上接第 508 页)

- Wu YH(伍迎红), Wang YL(王彦礼), Xiong YL(熊玉兰), *et al.* WuFu Xinnaoqing research on clear protective effect on cardiovascular system in rats. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30: 876-877.
- Zhu LM(朱黎明). Clinical observation on WuFu Xinnaoqing soft capsule for 41 patients with Alzheimer's disease of Qi stagnation and blood stasis syndrome. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2012, 53: 581-584.
- Wu QF(吴启富). Clinical observation of WuFu Xinnaoqing capsule on the treatment of angina due to coronary heart disease and hyperlipemia. *Chin Med Mod Dist Edu China* (中国中医药现代远程教育), 2012, 10(4): 11-13.
- Xiong YL(熊玉兰), Wang YL(王彦礼), Wu YH(伍迎红), *et al.* Studies on the main pharmacological effects of WuFu Xinnaoqing. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2004, 11: 393-395.
- Zhang Y, Xie ML, Zhu LJ, *et al.* Therapeutic effect of osthole on hyperlipidemic fatty liver in rats. *Acta Pharm Sin*, 2007, 28: 398-403.