

文章编号:1001-6880(2014)7-1030-04

苦参内生真菌 BS002 菌株有效代谢产物的分离及结构鉴定

于 娜,何 璐*,杜文敬,刘丹丹

辽宁科技大学化工学院,鞍山 114044

摘要:本论文采用硅胶柱层析的方法,以苦参内生真菌 BS002 菌株为研究对象,对 BS002 菌株的有效代谢产物进行了分离,并最终得到两种有效活性成分。论文确定了有效产物提取分离的最适温度为 40 ℃、pH 为 5。柱层析分离选用硅胶(GF₂₅₄)为固定相,CHCl₃:CH₃OH = 5:1 为流动相进行,并经 TLC 生物自显影法跟踪生物活性物质,最终产物经浓缩、冻干,利用 HPLC、IR、GC-MS 等方法确定其分别为:1,2-苯二甲酸丁基环己基酯,1,2-苯二甲酸-单(2-乙基己基)酯。

关键词:苦参;内生真菌;代谢产物;硅胶柱层析;结构鉴定

中图分类号:S432.4⁺4

文献标识码:A

Isolation and Identification of Active Ingredients in Metabolites of Endophytic Fungus BS002 from *S. flavescentis*.

YU Na, HE Lu*, DU Wen-jing, LIU Dan-dan

University of Science and Technology Liaoning, School of Chemical Engineering, Anshan 114044, China

Abstract: Silica gel column chromatography was used to isolate active metabolites from fermentation liquid of endophytic fungus BS002 isolated from *S. flavescentis*, and eventually two effective active ingredients were obtained in this paper. The optimal temperature 40 ℃ and pH 5 were determined to separate effective product. GF₂₅₄ was selected as the stationary phase, and CHCl₃:CH₃OH = 5:1 was selected as the mobile phase in the test while bioactive metabolites were tracked by TLC. Biological active ingredients were separated, concentrated and lyophilized, then identified to be 1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester and 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl cyclohexyl ester by methods of HPLC, IR, GC-MS.

Key words: *S. flavescentis*; Endophytic fungus BS002; metabolites; silica gel column chromatography; structural identification

植物内生真菌(Plant endophytic fungi)是指在健康植物的各种组织和器官内部或细胞间隙中度过全部或几乎全部生活周期,而植物未表现出任何病症的一类真菌。内生真菌可以产生大量具有与其宿主植物相同作用功效的活性物质。目前已有大量报道,从植物内生真菌次级代谢产物中分离得到抗肿瘤物质,植物生长调节剂类物质等多种活性天然化合物^[1-10]。药用植物内生菌是继土壤微生物、海洋微生物、极端微生物之后的又一重要的微生物药物来源,同时为解决某些药用植物生长缓慢、资源短缺等因素带来的药源紧张和生态破坏问题提供了新渠道,从中寻找新的天然活性化合物是当前内生菌研

究的热点之一^[11-13]。药用植物苦参(*Sophora flavescentis* Ait)为豆科槐属植物^[14],现代临床应用表明,其具有减慢心率失常、扩张血管、平喘的功能,可用于治疗热痢、便血、皮肤瘙痒、滴虫性阴道炎等药效。从苦参中分离经鉴定的化学成分主要有两大类:生物碱类,黄酮类化合物^[15]。

目前国内外关于苦参内生真菌及其代谢产物的研究报道不多。本论文以苦参内生真菌 BS002 菌株为研究对象,以苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria benengriana f. sp piricola*)为指示菌,对 BS002 菌株代谢产物进行了初步分离,并最终得到两种有效代谢产物,苹果轮纹病菌能在培养基及活体内产生一系列果胶酶,是苹果轮纹病的重要致病物质,而且该病菌具有潜伏特性,不但侵染在生长的苹果还是引起采后果实的腐烂^[16],本试验也可为苹果轮纹病的防治提供一定的参考价值。

1 材料与仪器

100 LC-MS APCI 质谱仪(由安捷伦公司提供), IR 光谱仪(由日立公司提供), UV 光谱仪(由安捷伦公司提供), SBSZ100 数控计滴自动部份收集器(由上海沪西分析仪器厂有限公司提供), HL-2S 恒流泵(上海沪西分析仪器厂有限公司提供), 旋转蒸发仪(由巩市予华仪器有限责任公司提供), 硅胶 GF254(青岛海洋化工有限公司提供), 冷冻干燥机(由德国 Martin Christ 公司提供)

供试药用植物苦参(*Sophora flavescens Ait*)的种子采于辽宁省开原市象牙山野生苦参, 内生真菌 BS002 菌株, 分离于苦参种子, 属青霉属的一个变种。BS002 菌株和苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria berengriana f. sp piricola*)均由辽宁科技大学生物工程实验室生物制药工艺室提供。

2 方法

2.1 发酵液抑菌试验

固体培养基(PDA): 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 15~20 g/L, pH 值自然。

优化液体发酵培养基及条件: 马铃薯 246.47 g/L, 葡萄糖 27.81 g/L, 结晶乙酸钠 1.95 g/L, 接种量 10^7 cfu/mL, 装液量 100 mL/250 mL, 温度 25 °C, 酵母膏 1.0 g/L, 转速为 150 rpm, 4 d。经离心, 减压抽滤, 收集发酵液。并采用滤纸片法, 以苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria berengriana f. sp piricola*)为指示菌种, 测定发酵液抑菌效果。

2.2 环境因素对活性成分的影响

pH 对发酵液活性成分的影响: 取备用发酵液, 利用 0.1 mol/L 的盐酸及 NaOH 溶液调节 pH 值, 分别调至 pH = 4、5、6、7, 采用滤纸片法, 观察并测定不同 pH 发酵液对指示菌的抑菌效果; 温度对发酵液活性成分的影响: 取备用发酵液分别置于 30、40、50、60 °C 下, 恒温处理 30 min, 采用上述同种方法观察抑菌效果。

2.3 TLC 法跟踪测试

点样: 在已活化硅胶板底端 1 cm 处用铅笔划一条细线, 并且平行于底边, 在线上等距离标记点样点, 点样采用 5 μL 微量进样器, 点样直径不大于 2 mm^[17]。

展开: 采用立式玻璃展开槽展开, 薄层层析展开

系统为氯仿-甲醇系统, V: V = 5: 1, 展开剂注入后静置 30 min, 待饱和气体充满展开槽内部, 将硅胶板放入展开槽, 操作迅速使槽内溶剂展开系统的饱和状态尽量不被破坏, 使其线性上行展开。层析过程结束时取出硅胶板, 及时用铅笔标记溶剂前沿, 在室温条件下, 溶剂自然挥发至干, 待测^[17]。

生物自显影: 在无菌操作下将用无菌水浸湿的滤纸片贴在层析板上 30 min, 再取下滤纸片贴在已凝固的 PDA 培养基上 30 min, 后取下滤纸片, 平板在 25 °C 倒置培养, 通过特定的培养, 非活性部位会被生长出的病原微生物所覆盖而呈现背景色, 活性部位因抑制了病原微生物的生长而呈现抑制斑点, 从而筛选出活性成分^[10,17,18]。

2.4 产物分离纯化及结构鉴定

将备用发酵液 pH 调至 5 进行粗分离, 用乙酸乙酯(2:1)萃取, 所得萃取液浓缩至 1/20, 拌硅胶减压蒸干, 即为备用样品。采用正相硅胶柱层析方法分离, 湿法灌柱, 流动相为氯仿-甲醇系统(体积比为 5:1), 分部收集; 经薄层层析法(展开剂系统为 V_{氯仿}: V_{甲醇} = 5:1)检测洗脱液生物活性。多次硅胶柱分离, 合并相同流分, 得到两个化合物。

利用生物自显影检测, 富集 R_f 值相同的产物, 经浓缩, 冻干, HPLC 检测物质纯度, 利用 IR、GC-MS 等方法进行结构鉴定。

3 结果与讨论



图 1 对苹果轮纹病的抑制效果 (400 ×)

Fig. 1 The braking effect of the apple rot fungi strains (400 ×)

3.1 发酵液抑菌效果

如图 1 所示, 发酵液中含有抑制指示菌的未知活性物质, 抑菌直径可达到 20 mm。

3.2 环境因素对活性成分的影响

3.2.1 pH 值对活性成分的影响

随着 pH 值的升高, 抑菌圈直径增大, pH = 5 时抑菌圈直径最大, pH > 5 时生物活性迅速减弱(表 1)。

表 1 pH 值对抑菌作用的影响

Table 1 The effect of pH to bacteriostatic action

pH	苹果轮纹菌的抑菌直径 Bacteriostatic diameter of <i>Botryosphaeria berengriana f. sp piricola</i> (mm)
4	18
5	25
6	21
7	18

3.2.2 温度对发酵液活性的影响

表 2 温度对抑菌效果的影响

Table 2 the effect of temperature to bacteriostatic action

温度 Temperature(℃)	苹果轮纹菌的抑菌直径 Bacteriostatic diameter of <i>Botryosphaeria berengriana f. sp piricola</i> (mm)
30	25
40	27
50	19
60	11

随着温度的升高,抑菌圈直径增大,当温度达到40 ℃时抑菌圈直径最大,但温度超过50 ℃时生物活性迅速减弱,达到60 ℃后活性较小(表2)。

3.3 化合物结构鉴定

化合物1 闪点184.4 ℃,沸点385.8 ℃(760 mmHg),熔点<25 ℃;经HPLC检测纯度为97.646%, $t_{min}=4.237$,色谱柱为Agilent Extend-C₁₈,流动相甲醇-水系统(7:3);IR(KBr) ν_{max} 1730,1381,802 cm⁻¹;GC-MS m/z 304 [M]⁺(5),278(10),205(11),167(20),149(100),135(15),121(8),91(17),76(27),56(17),确定该物质为1,2-苯二甲酸丁基环己基酯,相对分子质量304.38,分子式C₁₈H₂₄O₄。

化合物2 闪点144.1 ℃,沸点408.9 ℃(760 mmHg),熔点<25 ℃;经HPLC法检测纯度为99%, $t_{min}=6.112$,色谱柱条件同上;IR(KBr) ν_{max} 1732,1261,1096,802 cm⁻¹;GC-MS m/z 278.3 [M]⁺(5),207(9),167(47),149(100),132(10),113(20),93(11),71(56),57(64),确定该物质为1,2-苯二甲酸-单(2-乙基己基)酯,分子式C₁₆H₂₂O₄,相对分子质量为278.38。

4 结论

本试验中,苦参内生真菌BS002菌株对指示菌

(苹果轮纹病菌)具有明显抑制作用,通过生物自显影法跟踪活性物质,利用硅胶柱层析法分离内生真菌BS002菌株的次级代谢产物中活性物质有效可行,经HPLC,IR,GC-MS等手段对化合物**1**、化合物**2**进行检测和鉴定,分别得到化合物为1,2-苯二甲酸丁基环己基酯(分子式C₁₈H₂₄O₄,闪点184.4 ℃,沸点385.8 ℃ at 760 mmHg,熔点<25 ℃);1,2-苯二甲酸-单(2-乙基己基)酯(分子式C₁₆H₂₂O₄,闪点144.1 ℃,沸点408.9 ℃ at 760 mmHg,熔点<25 ℃)。据文献报道,化合物**1**是辣椒根系分泌的主要化感物质之一^[19],而化合物**2**具有防腐杀菌作用,被用作农药,驱虫剂,化妆品,香饰品,润滑剂,去污剂的生产原料^[20]。翟熙伦^[21]报道从蒙氏假单胞菌发酵代谢产物中分离得到活性小分子物质,具有抗烟草花叶病毒的抗病毒作用,化合物**2**即是小分子物质之一。

因此,1,2-苯二甲酸丁基环己基酯与1,2-苯二甲酸-单(2-乙基己基)酯是首次从苦参内生真菌BS002菌株次级代谢产物中分离纯化,本文为获得上述两种化合物提供了新方法,新途径;同时也发现了上述两种化合物抗苹果轮纹病菌的新用途,具有一定的实际应用价值,为通过生物发酵法大规模工业生产该两种化合物奠定了基础。

参考文献

- Cao XL(曹晓东), Zhou LG(周立刚), Li D(李端), et al. Advances on bioactive compounds produced by plant endophytic fungi. *Jour. of Northwest Sci-Tech Univ Agri For, Nat Sci Ed*(西北农林科技大学学报,自科版), 2005, 33(Suppl.): 201-208.
- Bao F(包飞). Screening of ginkgolideB-producing endophytic fungi and optimization of cultivation conditions. Yangling: Northwest A&F University(西北农林科技大学), MSc. 2008.
- Wiyakrutta SW, Sriubolmas N, Panphut W, et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer, anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World journal of microbiology and biotechnology*, 2004, 20: 265-272.
- Wagenaar MM, Corwin J, Strobel G, et al. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochlaudiella*. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1692-1695.
- Jiang AB(江爱兵), Wang KM(王开梅), Zhang F(张凤). Research progress of agro-activation plant endophytic fungi and their secondary metabolites. *Hunan Agric Sci*(湖南农业科学), 2010, 21(15): 7-10.

- 6 Strobel GA, Miller RV, Miller C, et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf quercina*. *Microbiology*, 1999, 145: 1919-1926.
- 7 Lu H, Zou WX, Meng CJ, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci*, 2000, 151: 67-73.
- 8 Xu TT(许婷婷), Wu Y(吴垠), Jia YY(贾阳阳), et al. A *Penicillium* sp. XGH2321 isolated from the rhizospheric soil of rhizophora stylosa Griff and its antibacterial activity. *Microbiology(微生物学通报)*, 2009, 36: 1682-1687.
- 9 Ding RW(丁仁伟), Deng Y(邓毅). Pharmacodynamic study and active ingredient of endophyte in medicinal plants. *West J Trad Chin Med(西部中医药)*, 2012, 25: 109-113.
- 10 He L(何璐), Ji MS(纪明山). Isolation and identification of the antagonistic substance of the endophytic fungi from *sophora flavescens* and its function mechanism. Shengyang: Shengyang Agricultural University(沈阳农业大学), PhD. 2012.
- 11 Zhao ZZ, Wang QS, Wang KM, et al. Study of the antifungal activity of bacillus vallismortis ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 292.
- 12 Wang J(王娟), Wang L(王辂), Chang M(常敏), et al. The endophytic fungus AGR12 in the stem of *Rhizophora stylosa* Griff and its antibacterial metabolites. *Chin J. Antibiotics(中国抗生素杂志)*, 2011, 36: 102-106.
- 13 Ye BP(叶波平), Jia YY(贾阳阳), Xu TT(许婷婷), et al. Aspergillus sp. strain F7 from the rhizospheric soil of *Rhizophora Stylosa* and its biological activity evaluation. *Mycosistema(菌物学报)*, 2010, 29: 241-248.
- 14 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)*. Beijing: China Medical Science Press, 2005. Vol I, 141.
- 15 Miao LK(苗抗立), Zhang JZ(张建中), Dong Y(董颖). Research progress on the chemical compounds and pharmacology of *sophora flavescens*. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2001, 13(2): 69-73.
- 16 Li GX(李广旭), Shen YB(沈永波), Gao YM(高艳敏), et al. Study on the infection mechanism of apple ring rot disease. *J Fruit Sci(果树学报)*, 2007, 24: 16-20.
- 17 Hao SX(郝淑贤), Huang H(黄卉), Liu X(刘欣), et al. Application of biological development technique in qualitative analysis for antimicrobial components of puchiin extract. *Food Ferm Ind(食品与发酵工业)*, 2004, 30(5): 88-91.
- 18 Gu LH(谷丽华), Wu T(吴弢), Zhang ZJ(张紫佳), et al. Evaluation of antioxidant activity of *Radix Linderae* and other two Chinese drugs using TLC-bioautography. *Acta Pharm Sin(药学学报)*, 2006, 41: 956-962.
- 19 Geng GD(耿广东), Zhang SQ(张素勤), Cheng ZH(程智慧). Allelopathy and allelochemicals of root exudates in hot pepper. *Acta Hortic Sin(园艺学报)*, 2009, 36: 873-878.
- 20 Che JM(车健美), Chen Z(陈峥), Chen B(陈波), et al. Functional components in *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX determined by GC/MSD. *Fujian J Agric Sci(福建农业学报)*, 2012, 27: 1106-1111.
- 21 Zhai XL(翟熙伦). The inhibition activity of small molecular substances of *Pseudomonas monteilii* on TMV and PVY. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences(中国农业科学院), MSc. 2012.