

冠突散囊菌抑菌产物培养基优化及分离鉴定

张 雯, 王明钰, 尤静观, 倪 莉*
(福州大学 食品科学技术研究所 福州 350108)

摘要 采用响应面法优化冠突散囊菌 FS-10 产抑菌活性物质的发酵培养基配方,采用高效液相色谱、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱和傅里叶红外光谱对其抑菌活性产物进行分离纯化及结构鉴定。结果表明,冠突散囊菌 FS-10 产抑菌物质最佳培养基的配方为:碳源(无水葡萄糖)7.5%、氮源(硝酸钠)0.65%、氯化钾 4.5%,优化后发酵液对浓度为 1×10^5 CFU/mL 嗜冷菌菌悬液的抑菌率为 54.4%。经分离纯化获得两个抑菌活性组分 FS-IV、FS-VI, 分子质量分别为 1 630.8 u 和 840.5 u,推测其结构分别为杂多糖的衍生化合物和酰胺类衍生化合物。这两个组分对食源性腐败菌,包括假单胞菌、希瓦氏菌和嗜冷菌有显著的抑制作用,并具有良好的热稳定性和酸碱稳定性。

关键词 冠突散囊菌; 响应面法; 培养基优化; 抑菌活性; 产物鉴定

文章编号 1009-7848(2022)02-0345-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.037

冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)是发菌科散囊菌属的一种益生真菌,俗称“金花”菌,是茯砖茶“发花”过程中的优势菌。目前报道的散囊菌属真菌在生长代谢过程中会产生多种次级代谢产物,被认为有抑菌活性^[1-5]。冠突散囊菌在茯砖茶中生长,该过程中会产生具有抑菌活性的代谢产物,抑制其它微生物的生长,并大量的繁殖成为优势菌^[6]。从黑茶中分离得到的冠突散囊菌发酵液的乙酸乙酯提取物,对枯草芽孢杆菌和白色链球菌具有抑菌性,且有良好的热稳定性和酸碱稳定性^[7]。Du 等^[8]从冠突散囊菌 EN-220 中分离得到多种芳香族糖苷,对大肠杆菌具有抑制活性。

本课题组在前期研究中分离得到 1 株冠突散囊菌 FS-10,其发酵滤液对鱼源腐败菌具有明显的抑制作用。为此,本研究采用响应面法优化冠突散囊菌 FS-10 产抑菌活性物质的液体发酵培养基;采用高效液相色谱(HPLC)、基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和傅里叶红外光谱(FT-IR)对冠突散囊菌 FS-10 发酵液中的抑菌活性物质进行分离纯化和鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验用菌和培养

1.1.1 供试菌株 冠突散囊菌(*E. cristatum*)FS-10,保藏于福州大学食品科学技术研究所;食源性腐败菌,包括嗜冷菌(*Psychrophile*)DHY-1,希瓦氏菌(*Shewanella* spp.)JC-20、HC-44、R3-2,假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)LP-3、LP-6,分离自大黄鱼肉与鱼肠,保藏于福州大学食品科学技术研究所。

1.1.2 菌体培养 抑菌活性测定用菌液体培养。用无菌接种环取 1 环供测菌,接入牛肉膏蛋白胨液体培养基(牛肉膏 0.5 g,氯化钠 0.5 g,蛋白胨 1 g,蒸馏水定容 100 mL,pH 7.0~7.2,121 ℃、高压灭菌 30 min),于恒温振荡培养箱中 30 ℃,200 r/min 培养 24 h,将菌液稀释至 1 000 倍,得到浓度约为 1×10^5 CFU/mL 的供测菌菌悬液,备用。

冠突散囊菌菌株 FS-10 发酵无菌上清液的制备方法:采用菌块接种法制备发酵上清液^[9]。将菌株 FS-10 在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)(马铃薯 200 g,无水葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然)平板上培养 7 d,取 1 个直径为 8 mm 的菌块接入马铃薯葡萄糖液体(PDL)培养基中,在恒温振荡培养箱中以 28 ℃,200 r/min 条件培养 7 d。培养结束后,13 000 r/min 离心 15 min,上清液用 0.22 μm 滤膜过滤,得到无菌发酵滤液,于 4 ℃保存,备用。

收稿日期: 2021-02-16

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(31601532);福州市科技局科技计划项目(2020-GX-13);福州市科技重大项目【榕科(2017)325 号】

作者简介: 张雯(1980—),女,博士,副教授

通信作者: 倪莉 E-mail: nili@fzu.edu.cn

1.2 发酵滤液抑菌活性的测定

采用浊度法测定抑菌活性^[10-11]。取 1 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基注入微孔板中,加入 10 μ L 1.1.2 节得到的指示菌悬液,在试验组中加入 100 μ L 无菌发酵滤液或待测组分,在对照组中加入 100 μ L PDL 培养基,将试验组和对照组同时置于 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 的培养箱中振荡培养 24 h。

培养结束后,测定并记录各组在波长 600 nm 处的吸光值,抑菌率计算公式如下:

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{A_{600\text{nm}}' - A_{600\text{nm}}}{A_{600\text{nm}}} \times 100 \quad (1)$$

式(1)中, $A_{600\text{nm}}'$ ——对照组样品的吸光值;
 $A_{600\text{nm}}$ ——试验组样品的吸光值。

1.3 响应面法优化产抑菌物质培养基成分

1.3.1 Plackett-Burman 试验设计 以无菌发酵滤液的抑菌率为响应值(以嗜冷菌 DHY-1 为供测菌),以葡萄糖为碳源、硝酸钠作为氮源,采用 Plackett-Burman 试验设计研究碳源、氮源以及微量元素(氯化钠、氯化钾、硫酸锌、硫酸锰)对抑菌活性的影响。采用 Minitab 软件对所选水平进行试验设计、数据处理及模型的建立,设计六因素二水平试验优化抑菌效果,试验因素与水平见表 1。

1.3.2 最陡爬坡试验 以 Plackett-Burman 试验得出的回归方程的系数(正、负)确定各因素的爬坡方向,以各因素效应值的大小确定变化步长,从而快速逼近最大值响应值。最陡爬坡试验除去影响显著因子,其它各因素均保持不变。

1.3.3 Box-Behnken 试验设计 从 Plackett-Burman 试验结果确定培养基中对冠突散囊菌的抑菌物质具有显著影响的因子,结合最陡爬坡试验结果和实际情况,选择下一步试验水平的中心点和各水平的步长。设计三因素三水平试验优化抑菌效果,试验因素与水平见表 2。

1.3.4 验证试验 用优化得到的培养基成分、质量分数条件做 3 次平行验证试验。若所得试验值与预测值较接近,则说明该响应面模型有参考价值。

1.4 抑菌活性物质的分离纯化和鉴定

1.4.1 超滤和透析 各组分抑菌活性比较采用截留分子质量为 10 ku 的超滤膜和 7 ku 的透析袋分步收集。首先采用截留分子质量为 10 ku 的超滤

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素及编码水平

Table 1 The factor and code level of Plackett-Burman experimental design

因素	编码水平	
	-1	1
A(碳源,葡萄糖)/%	2	4
B(氮源,硝酸钠)/%	2	4
C(氯化钾)/%	1	2
D(氯化钠)/%	1	2
E(硫酸锌)/g·L ⁻¹	0.1	0.2
F(硫酸锰)/g·L ⁻¹	0.1	0.2

表 2 Box-Behnken 试验设计因素及编码水平

Table 2 The factor and code level of Box-Behnken experimental design

因素	编码水平		
	-1	0	1
G(葡萄糖)/%	5.50	6.50	7.50
H(硝酸钠)/%	0.55	0.65	0.75
I(氯化钾)/%	3.50	4.00	4.50

膜分离菌株 FS-10 无菌发酵滤液,得到分子质量范围大于 10 u 的浓缩液和分子质量小于 10 ku 的滤液。冻干后复溶为质量浓度为 4 mg/mL 的溶液,分析 2 个组分的抑菌活性。将活性高的滤液采用截留分子质量为 7 ku 的透析袋,将其置于 10 倍于样品溶液体积的去离子水中透析 4 h,得到 2 个组分(截留液、透过液),冷冻干燥后,将冻干粉末复溶为 4 mg/mL 溶液,做抑菌试验。

1.4.2 凝胶色谱柱层析 以葡聚糖凝胶 G-75 为填料,选用 30 cm \times Φ 2.6 cm 的层析柱,将 1.4.1 节所得抑菌活性组分的冻干粉加少许缓冲液稀释,用 0.22 μ m 滤膜过滤后上样,用去离子水以 0.3 mL/min 的流速洗脱,在波长 280 nm 处检测吸光度,收集各洗脱峰,冷冻干燥备用。将冻干粉末复溶为 4 mg/mL 的溶液,做抑菌试验,选出具有抑菌活性的洗脱峰。

1.4.3 反相高效液相色谱 将 1.4.2 节所得具有抑菌活性的洗脱峰冻干粉加少许缓冲液稀释,用 0.22 μ m 滤膜过滤后上样,采用 C18 柱进行液相色谱分离。检测波长分别为 280 nm 和 220 nm;流

动相 A 为 0.01% 三氟乙酸水溶液, 流动性 B 为 0.01% 三氟乙酸乙腈溶液; 进样量 10 μL , 流速 0.3 mL/min。梯度洗脱条件: 0~10 min, 80% A、20% B; 10~40 min, A 变化为 80%~20%, B 为 20%~80%; 40~50 min, 20% A、80% B; 50~60 min, A 变化为 20%~80%, B 为 80%~20%。富集各组分后, 减压浓缩除去有机溶剂, 取沉淀物质用去离子水复溶为 0.4 mg/mL 的样品溶液, 做抑菌试验。

1.4.4 结构鉴定 活性组分委托福建中医药大学采用基质辅助激光诱导解析飞行时间质谱进行分子质量鉴定。质谱分析采用 Autoflex speed MALDI-TOF 质谱仪, 电喷雾 (ESI) 正离子模式。采用 Nicolet iS50 傅里叶红外光谱仪对纯化的抑菌组分进行结构鉴定。利用溴化钾压片法, 在 400~4 000 cm^{-1} 波段对样品进行扫描分析。

1.5 冠突散囊菌 FS-10 抑菌活性物质的特性

1.5.1 抑菌谱测定 按 1.1.2 节所述制备嗜冷菌 DHY-1、希瓦氏菌 (JC-20、HC-44、R3-2)、假单胞菌 (LP-3、LP-6) 等 6 株细菌的菌悬液, 用 1.4.3 节抑菌活性组分测定抑菌率。

1.5.2 抑菌浓度测定 采用两倍连续稀释方法将 1.4.3 节纯化得到的抑菌活性组分配成质量浓度分别为 2 000, 1 000, 500, 250, 25, 62.5, 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液, 以 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素为阳性对

照, 水为空白对照, PDL 培养基为阴性对照, 以嗜冷菌 DHY-1 为指示菌, 采用琼脂扩散法^[10]做抑菌试验, 试验重复 3 次。

1.5.3 热稳定性的测定 取等量 (0.4 mg/mL) 将 1.4.3 节纯化得到的抑菌活性组分分别置于 -20, 4, 25, 100, 121 $^{\circ}\text{C}$ 环境中 30 min, 在室温放置 10 min 后, 以嗜冷菌 DHY-1 为指示菌, 做抑菌试验, 试验重复 3 次。

1.5.4 酸碱稳定性的测定 取等量 (0.4 mg/mL) 1.4.3 节纯化得到的抑菌活性组分, 调节 pH 值分别为 2.0, 5.0, 7.0, 9.0, 13.0, 室温放置 30 min 后, 采用 3 mol/L HCl 溶液和 NaOH 溶液将样品调回原始 pH 5.0, 加去离子水定容 1.5 mL。以嗜冷菌 DHY-1 为指示菌, 做抑菌试验, 试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 冠突散囊菌 FS-10 产抑菌活性物质培养基的优化

2.1.1 Plackett-Burman 试验设计与分析 采用 Plackett-Burman 试验设计, 以抑菌率为响应值, 对葡萄糖、硝酸钠、氯化钠、氯化钾、硫酸锌、硫酸锰 6 个成分进行考察。试验设计及结果见表 3, 各因子效应分析见表 4。

表 3 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 3 Design and results of Plackett-Burman experiments

试验号	A(葡萄糖)	B(硝酸钠)	C(氯化钠)	D(氯化钾)	E(硫酸锌)	F(硫酸锰)	Y(抑菌率)/%
1	-1	-1	-1	1	1	1	25.1
2	1	1	-1	1	1	-1	44.8
3	1	1	1	-1	1	1	45.9
4	-1	1	1	1	-1	1	42.3
5	-1	1	-1	-1	-1	1	39.9
6	1	-1	1	-1	-1	-1	34.8
7	1	1	-1	1	-1	-1	43.5
8	-1	1	1	-1	1	-1	42.1
9	-1	-1	1	1	1	-1	28.0
10	1	-1	1	1	-1	1	37.3
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	22.1
12	1	-1	-1	-1	1	1	31.4

经回归分析得回归方程: Y (抑菌率) = $0.36434 + 0.03191A + 0.06667B + 0.01972C + 0.00416D - 0.00214E + 0.00556F$ 。由表 4 可知, 系数项 A (葡萄

糖)、B (硝酸钠)、C (氯化钾) 3 项因子是培养基中影响菌株 FS-10 发酵液抑菌效果的关键因子 ($P < 0.05$)。

表4 Plackett-Burman 试验设计回归各因子效应分析

Table 4 Regression factor analyses of Plackett-Burman experimental design

系数项	系数	效应 <i>F</i>	<i>T</i> 值	<i>P</i> 值
常量	0.36434	34.90	68.61	0.001**
<i>A</i>	0.03191	34.90	6.01	0.001**
<i>B</i>	0.06667	36.10	12.56	0.002**
<i>C</i>	0.01972	157.63	3.71	0.000**
<i>D</i>	0.00416	13.80	0.78	0.014*
<i>E</i>	-0.00214	0.61	-0.40	0.469
<i>F</i>	0.00556	0.16	1.05	0.703

注:*.差异显著, $P<0.05$;**.差异极显著, $P<0.01$;下表同。

2.1.2 最陡爬坡试验 通过 Plackett-Burman 试验设计筛选出关键因子,即葡萄糖、硝酸钠、氯化

钾。最陡爬坡试验以这3者为考察对象,固定其它条件不变。试验结果见表5。

表5 最陡爬坡试验梯度设计及结果

Table 5 Design and results of steepest ascent experiments

试验号	葡萄糖/%	硝酸钠/%	氯化钾/%	抑菌率/%
1	2.00	0.20	1.00	33.8
2	3.50	0.35	2.00	41.8
3	5.00	0.50	3.00	38.7
4	6.50	0.65	4.00	50.3
5	8.00	0.80	5.00	30.2

由表5可得,最陡爬坡试验5组试验的抑菌率整体呈先上升后下降的趋势。在质量分数为6.50%无水葡萄糖、0.65%硝酸钠、4.00%氯化钾时,所对应的发酵液抑菌率最高,为三因素的最大响应值区域。选择第4组作为响应面的中心点。

2.1.3 响应曲面与验证模型的建立 结合 Plackett-Burman 试验设计和最陡爬坡试验所得结果,利用 Minitab 软件进行 Box-Behnken 试验设计和数据分析,其试验结果见表6。

表6 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 6 Design and results of Box-Behnken experiments

试验号	编码水平			<i>Y</i> (抑菌率) /%	试验号	编码水平			<i>Y</i> (抑菌率) /%
	<i>G</i> (葡萄糖)	<i>H</i> (硝酸钠)	<i>I</i> (氯化钾)			<i>G</i> (葡萄糖)	<i>H</i> (硝酸钠)	<i>I</i> (氯化钾)	
1	0	1	-1	46.4	9	1	-1	0	42.6
2	0	-1	-1	41.2	10	1	1	0	50.1
3	0	0	0	49.6	11	-1	0	-1	44.1
4	1	0	1	54.4	12	-1	1	0	39.9
5	1	0	-1	50.8	13	0	0	0	49.2
6	-1	-1	0	40.2	14	-1	0	1	44.3
7	0	1	1	52.2	15	0	-1	1	51.6
8	0	0	0	48.3					

表 7 Box-Behnken 试验设计回归系数和显著性验证

Table 7 Significance test and coefficient of Box-Behnken experimental design

项	系数	系数标准误差	<i>T</i> 值	<i>P</i> 值
常量	0.4904	0.0121	40.41	< 0.001**
<i>G</i> (葡萄糖)	0.03689	0.00743	4.96	0.004**
<i>H</i> (硝酸钠)	0.01613	0.00743	2.17	0.082
<i>I</i> (氯化钾)	0.02521	0.00743	3.39	0.019*
G^2	-0.0265	0.0109	-2.42	0.060
H^2	-0.0319	0.0109	-2.91	0.033*
I^2	0.0201	0.0109	1.84	0.126
<i>GH</i>	0.0193	0.0105	1.84	0.125
<i>GI</i>	0.0085	0.0105	0.81	0.457
<i>HI</i>	-0.0114	0.0105	-1.09	0.326

表 8 Box-Behnken 试验设计回归模型分析

Table 8 Variance analysis of Box-Behnken experimental design

变异来源	自由度	Adj SS	Adj MS	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
回归	9	0.028452	0.003161	7.15	0.022*
<i>G</i>	1	0.010886	0.010886	24.64	0.004**
<i>H</i>	1	0.00208	0.00208	4.71	0.082
<i>I</i>	1	0.005085	0.005085	11.51	0.019*
G^2	1	0.002586	0.002586	5.85	0.06
H^2	1	0.003754	0.003754	8.5	0.033*
I^2	1	0.00149	0.00149	3.37	0.126
<i>GH</i>	1	0.001498	0.001498	3.39	0.125
<i>GI</i>	1	0.000287	0.000287	0.65	0.457
<i>HI</i>	1	0.000524	0.000524	1.19	0.326
纯误差	2	0.000087	0.000043		
失拟项	3	0.002123	0.000708	16.34	0.058
$R^2=92.79\%$		$R^2_{Adj}=79.82\%$			

由表 7 可得,*G*(葡萄糖)和*I*(氯化钾)显著性较高,对于抑菌率的影响较大($P<0.05$)。二次项中 H^2 、 G^2 、 I^2 的*P*值依次增大, H^2 的显著性较高。交互项中 3 项的*P*均大于 0.05,因此*GH*、*GI*、*HI*之间的交互作用不是很明显。

根据试验设计和数据分析,得出冠突散囊菌 FS-10 发酵液抑菌率对葡萄糖(碳源)、硝酸钠(氮源)、氯化钾的二次多项回归方程为: Y (抑菌率)= $0.4904+0.03689G+0.01613H+0.02521I-0.0265G^2-0.0319H^2+0.0201I^2+0.0193GH+0.0085GI-0.0114HI$ 。

由表 8 可以看出该模型的 $P=0.022$,在一定程

度上可看出该二次多项模型具有显著性($P<0.05$),方差分析该模型的 $R^2=92.79\%$,说明模型与试验数据的吻合性较好。 $R^2_{Adj}=79.82\%$,大于 70%,存在相关性,而与 R^2 值之间差距仍较大。

根据上述回归方程运用 Minitab 软件绘制响应曲面图与等值线图,见图 1。

由图 1a、1b 可知,当硝酸钠质量分数保持不变时,随着葡萄糖质量分数的增加,抑菌率提高;当葡萄糖质量分数在 7.0%~7.5%,硝酸钠质量分数在 0.65%~0.75%范围时,抑菌率较高。该响应曲面图初具模型,若将葡萄糖和硝酸钠质量分数增大,则出现响应曲面完整的高位点。

由图 1c、1d 可知,当葡萄糖质量分数较低时,抑菌率随氯化钾质量分数变化不大;当葡萄糖质量分数大于 6.5% 时,抑菌率增大。抑菌率响应面高点出现在高质量分数葡萄糖和高质量分数氯化钾区域。

由图 1e、1f 可知,当氯化钾质量分数不变时,抑菌率随着硝酸钠质量分数的增加呈先升后降的趋势,抑菌率响应面高点出现在硝酸钠中质量分数区域。

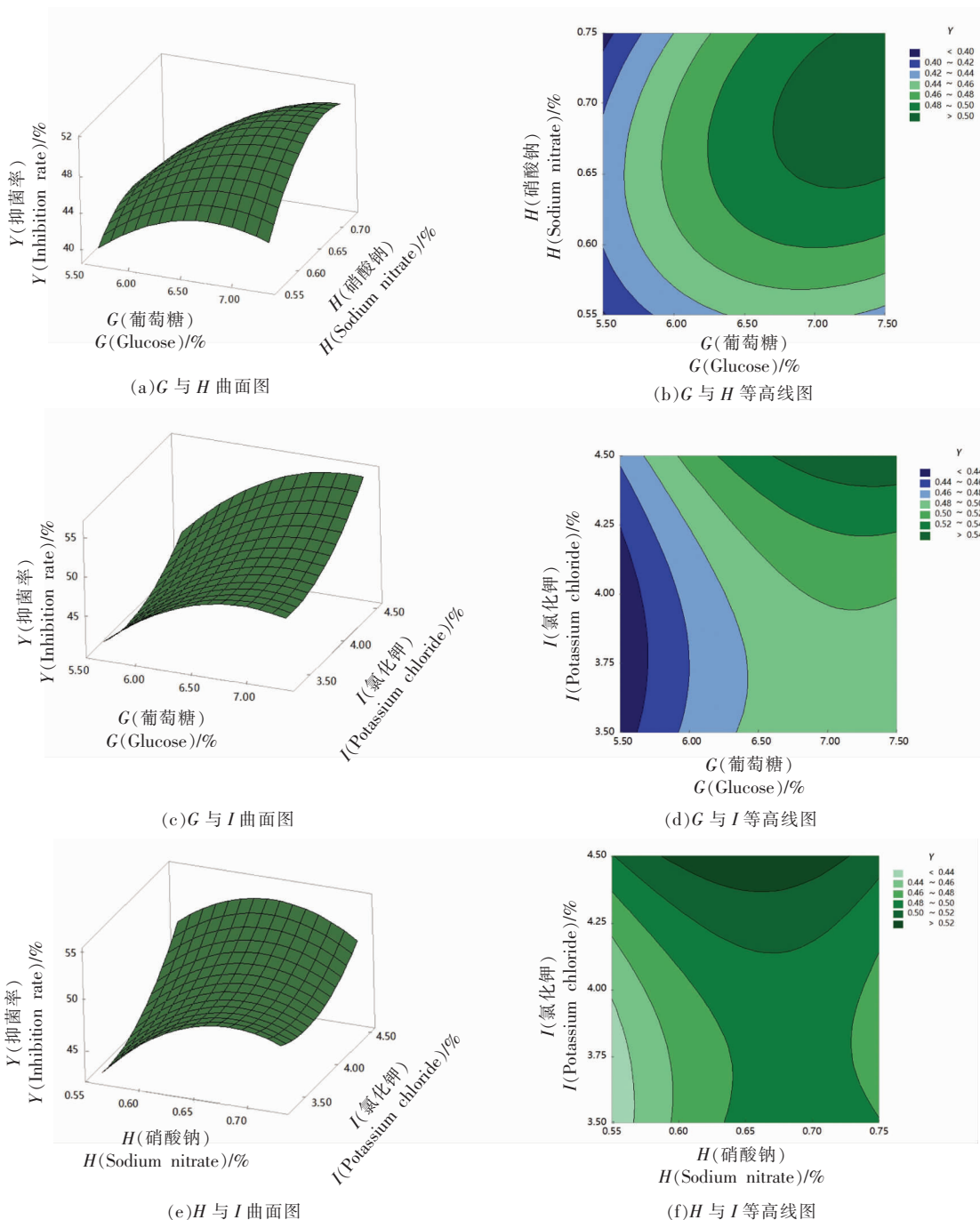


图 1 各因子交互作用的响应曲面和等高线图

Fig.1 Surface maps and contour maps for each factor interaction

2.1.4 回归模型验证试验 利用响应优化器证实预测值与真实值之间的拟合程度, 得出培养基最优条件为 7.5% 葡萄糖、0.65% 硝酸钠、4.5% 氯化钾, 预测抑菌率为 54.44%。以此条件做验证试验, 其抑菌率为 (51.0±4.4)%, 说明利用响应面法优化得到的培养基配方条件有参考价值。

2.2 冠突散囊菌 FS-10 抑菌活性物质分离纯化和鉴定

将发酵液经 10 ku 超滤膜过滤后, 活性较高的过滤液进一步采用 7 ku 的透析膜透析, 各组分进行活性测定, 如表 9 所示。该透过液冻干后经凝胶色谱分离, 得到 1 个高纯度的单峰, 见图 2, 经

抑菌活性测定, 该峰 (4 mg/mL) 抑菌率为 74.5%。进一步利用反相高效液相色谱分离得到 6 个组分 (FS-I、FS-II、FS-III、FS-IV、FS-V、FS-VI), 如图 3 所示。收集各组分峰, 检测各组分的抑菌活性, 结果组分 FS-IV 和 FS-VI 具有明显的抑菌效果, 对嗜冷菌 DHY-1 的半抑制质量浓度 (IC₅₀) 分别为 0.4 mg/mL 和 0.3 mg/mL。其余 4 个组分均无明显的抑菌作用。具有抑菌活性 FS-IV 和 FS-VI, 采用基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析, 结果见图 4, 两个目标抑菌活性组分的分子质量分别为 1 630.8 u 和 840.5 u。

表 9 超滤和透析后各组分的抑菌活性

Table 9 Antibacterial activity of each component after ultrafiltration and dialysis

组分	分离步骤			
	超滤		透析	
	浓缩液 (>10 ku)	滤过液 (<10 ku)	截留液 (>7 ku)	透过液 (<7 ku)
抑菌率/%	6.9	54.3	9.1	63.9

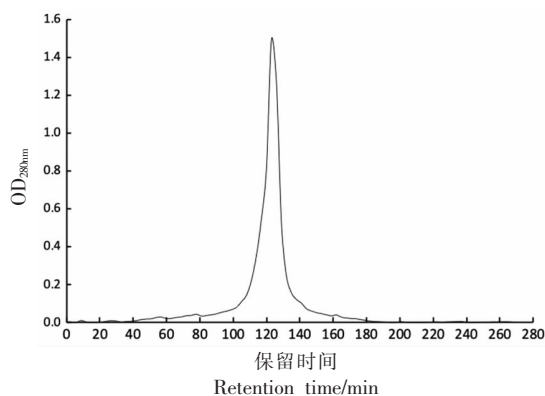


图 2 凝胶过滤柱层析洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of gel filtration column chromatography

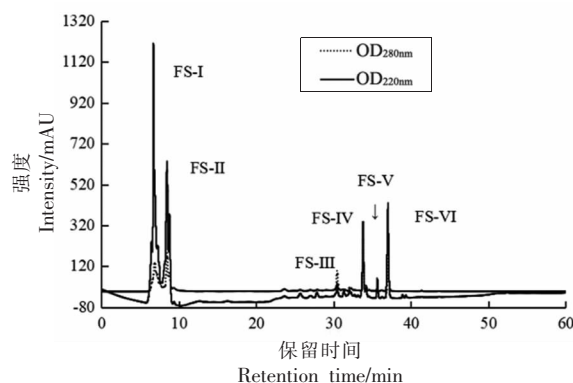
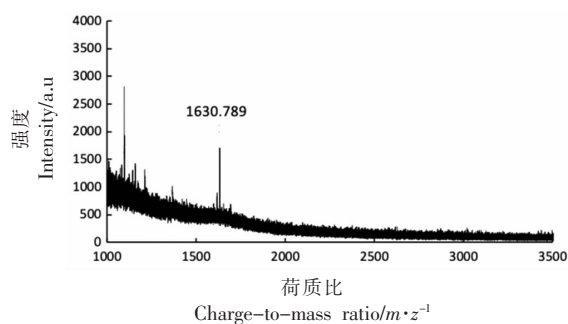
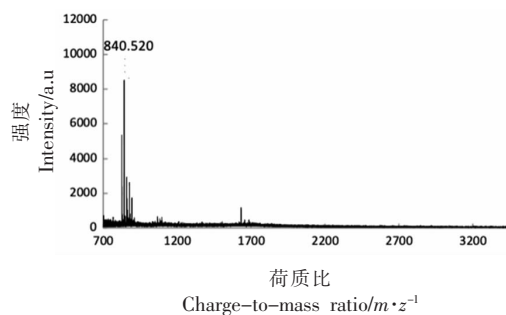


图 3 反相高效液相色谱图

Fig.3 RP-HPLC absorption of active compounds



(a)FS-IV



(b)FS-VI

图 4 组分 FS-IV 和 FS-VI 的 MALDI-TOF-MS 图

Fig.4 MALDI-TOF-MS of components FS-IV and FS-VI

利用傅里叶红外光谱分别扫描经由高效液相色谱分离得到的两个抑菌组分 FS-IV 和 FS-VI (图 5)。组分 FS-IV 和组分 FS-VI 在 $3\ 550\sim 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 范围出现宽而散的吸收峰,存在缔合型羟基;在 $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 附近显示 C=C 振动;在 $1\ 300\ \text{cm}^{-1}$ 附近显示 C-N 振动。

如图 5a 所示,标志组分 FS-IV 在 $2\ 934.163\ \text{cm}^{-1}$ 处的弱吸收峰为 C-H 的不对称伸缩振动; $1\ 150\sim 1\ 060\ \text{cm}^{-1}$ 范围为醚或其它化合物中 C-O-C 的不对称伸缩振动; $900\ \text{cm}^{-1}$ 附近为 C-C 振动; $<500\ \text{cm}^{-1}$ 为 C-C-C 振动。综上,推测组分 FS-IV 是杂多糖衍生化合物。

如图 5b 所示,标志组分 FS-VI 在 $1\ 092.477\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰和在 $905.4153, 854.3109\ \text{cm}^{-1}$ 和 $781.9933\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为酯类化合物中 C-O 键的两个吸收峰;在 $1\ 000\sim 700\ \text{cm}^{-1}$ 范围明显的吸收峰为烯烃 C=C-H 振动; $614.2167\ \text{cm}^{-1}$ 处为炔烃 C≡C-H 的变形振动。综上,推测组分 FS-VI 是酰胺类衍生化合物。

多位学者从冠突散囊菌发酵液中分离得到多

种吡啶生物碱^[12-14],对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等致病菌有不同的抑制作用。吡啶生物碱是一类含氮的化合物,由色氨酸衍生而来,多为环状结构。彭晓赞等^[15]从冠突散囊菌中分离到多种苯甲醛类化合物,认为冠突散囊菌中的主要代谢产物是苯甲醛类化合物,试验分离得到的灰绿曲霉黄色素、2-(2', 3-环氧基-1', 3'-庚二烯基)-6-羟基-5-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲醛、2-(2', 3-环氧基-1', 3' 5'-庚三烯基)-6-羟基-5-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲醛、酪醇、对羟基苯甲酸、苔黑酚等对多种肠道致病菌有抑制作用。李莹^[6]从冠突散囊菌中分离纯化得到大黄素等多种蒽醌类活性化合物,蒽醌是一类具有环状结构的化合物,颜色多为橙色和黄色,具有抑菌活性。前期研究分离自冠突散囊菌发酵液的抑菌活性物质分子质量均小于 $500\ \text{u}$ ^[14-15, 17-21],而本研究首次得到分子质量大于 $800\ \text{u}$ 的两种抑菌活性组分,推测得活性物质中含有杂多糖的衍生化合物、带有酰胺类衍生化合物等多种物质。

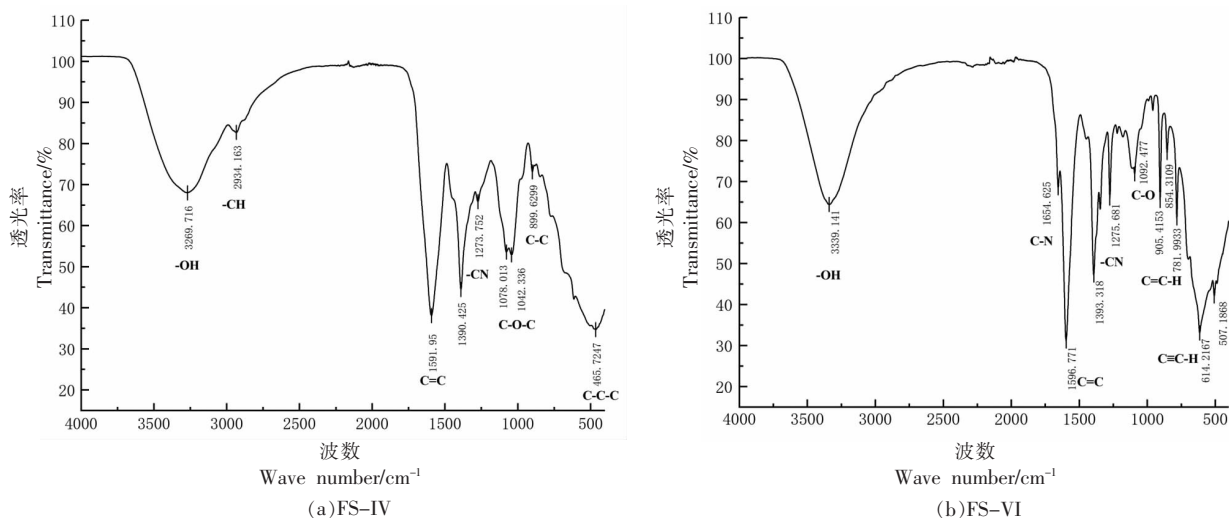


图 5 组分 FS-IV 和 FS-VI 的傅里叶红外吸收光谱

Fig.5 FT-IR absorption of components FS-IV and FS-VI

2.3 冠突散囊菌 FS-10 抑菌活性物质的特性

2.3.1 抑菌广谱性和抑菌浓度 两个活性组分 (FS-IV、FS-VI)对嗜冷菌 DHY-1、希瓦氏菌(JC-20、HC-44、R3-2)、假单胞菌(LP-3、LP-6)的抑制活性见图 6。活性组分对这 6 株细菌均有抑制作用,其中对嗜冷菌 DHY-1 和希瓦氏菌 R3-2 的抑

菌率超过 50%,且组分 FS-VI 抑菌活性略高于组分 FS-IV。图 7 所示,两个抑菌活性组分(FS-IV、FS-VI)对嗜冷菌的抑制作用都随活性组分质量浓度的增加而增强, $0.25\ \mu\text{g/mL}$ 氯霉素对嗜冷菌的抑制活性与 $250\sim 500\ \mu\text{g/mL}$ 的 FS-IV、FS-VI 相当(抑菌圈 $17.3\sim 18.8\ \text{mm}$)。

乳酸链球菌素 Nisin 是目前少数允许用作食品添加剂的生物保鲜剂,其对金黄色葡萄球菌、肉毒梭状芽孢杆菌、溶血链球菌、李斯特菌等一些革兰氏阳性菌有较为明显的抑制作用,而对革兰氏阴性菌抑制效果不明显,且存在单一保鲜剂效果有限,易受环境因素影响,抗菌时效短等不足^[22]。有研究表明,冠突散囊菌 PDA 发酵液对枯草芽孢

杆菌、金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌和大肠杆菌有抑制作用^[6]。有研究人员从冠突散囊菌中分离出次级代谢产物,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和普通变形杆菌有不同程度的抑制作用^[14-15]。本研究从发酵液中分离得到新的活性组分,对多种食源性革兰氏阴性菌有较强的抑制活性。综上,冠突散囊菌在生物保鲜剂领域的开发和应用前景广阔。

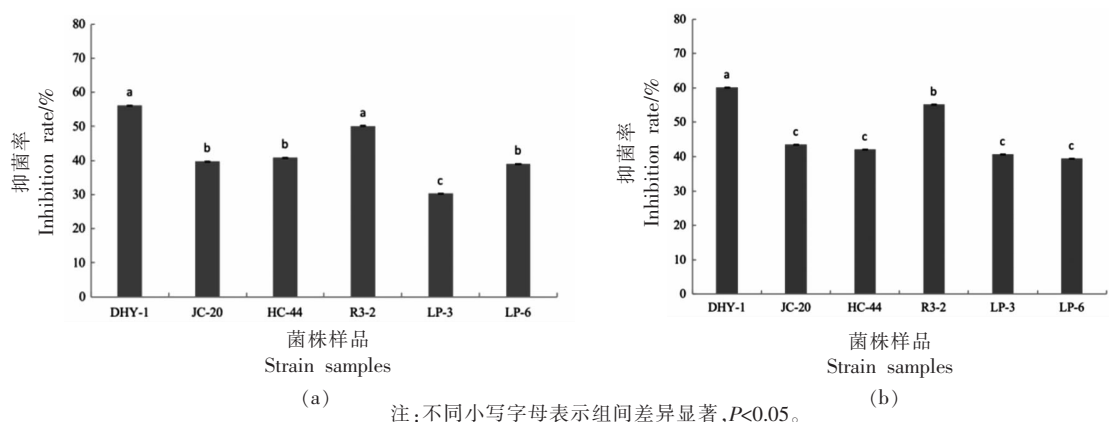
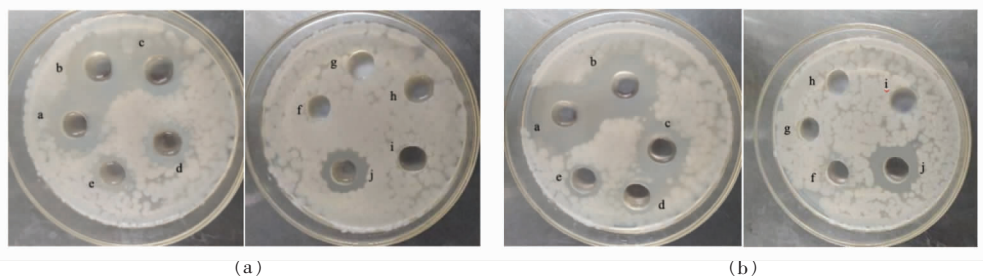


图 6 组分 FS-IV(a)和 FS-VI(b)对食源腐败细菌的抑制

Fig.6 Inhibition of components FS-IV (a) and FS-VI (b) on foodborne spoilage bacteria



注:作用质量浓度:a;2 000 $\mu\text{g/mL}$;b;1 000 $\mu\text{g/mL}$;c;500 $\mu\text{g/mL}$;d;250 $\mu\text{g/mL}$;e;125 $\mu\text{g/mL}$;f;62.5 $\mu\text{g/mL}$;g;31.25 $\mu\text{g/mL}$;h;水(空白对照);i;PDL培养基(阴性对照);j;0.25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素(阳性对照)。

图 7 组分 FS-IV(a)和 FS-VI(b)拮抗嗜冷菌 DHY-1

Fig.7 Inhibition effect of components FS-IV (a) and FS-VI (b) against *Psychrophile* DHY-1

2.3.2 稳定性 两个活性组分 (FS-IV、FS-VI)在 $-20\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围稳定,甚至在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温处理后抑菌活性几乎未损失(图 8a)。处理温度 $-20\sim 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 对组分的抑菌活性稳定性无显著影响,表明两个抑菌活性组分的热稳定性较好。

两个活性组分(FS-IV、FS-VI)在 pH 2~13 对嗜冷菌 DHY-1 有较好的抑制作用(图 8b)。在 pH 5 时抑菌能力最佳,这可能与冠突散囊菌的自然生长环境呈弱酸性相关,此条件下其代谢产物的活性也较高。在 pH 2 的过酸条件或 pH 13 的

过碱条件下抑菌率稍有下降,不显著,两个抑菌活性组分具有较好的酸、碱稳定性。

3 结论

3.1 冠突散囊菌 FS-10 产抑菌活性物质的培养基成分

碳源对活性物质的产生影响最为显著。通过 Plackett-Burman 试验设计与响应面法相结合优化,经回归模型验证得到的冠突散囊菌 FS-10 产抑菌活性物质发酵培养基最佳配方为无水葡萄糖

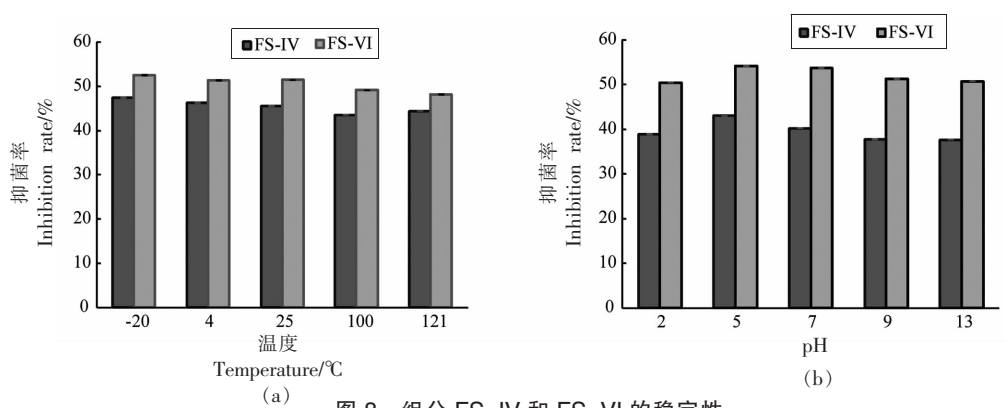


图8 组分FS-IV和FS-VI的稳定性

Fig.8 The stability of components FS-IV and FS-VI

(碳源)7.5%、硝酸钠(氮源)0.65%、氯化钾4.5%，发酵液对浓度为 1×10^5 CFU/mL嗜冷菌菌悬液抑菌率达54.4%。

3.2 冠突散囊菌FS-10抑菌活性物质的生物学及理化性质

冠突散囊菌FS-10发酵液经超滤、透析、凝胶过滤层析、高效液相色谱等一系列分离纯化,得到两个尚未报道的抑菌活性组分(FS-IV、FS-VI)。采用MALDI-TOF-MS和傅里叶红外光谱对其进行鉴定,组分FS-IV和FS-VI的分子质量分别为1630.8 u和840.5 u,推测组分FS-IV是杂多糖的衍生化合物,组分FS-VI是酰胺类衍生化合物。两个抑菌活性组分对嗜冷菌、希瓦氏菌、假单胞菌等革兰氏阴性食源性腐败细菌有不同的抑制作用,且均有良好的热稳定性和酸、碱稳定性。冠突散囊菌及其发酵液中存在多种抑菌活性物质,它们之间可能存在协同作用。

参 考 文 献

- [1] 刘颖慧,高荔.散囊菌属次级代谢产物研究进展[J].药学研究,2017,36(9):542-547.
LIU Y H, GAO L, Research progress on the secondary products of *Eurotium*[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2017, 36(9): 542-547.
- [2] YAN H J, LI X M, LI C S, et al. Alkaloid and anthraquinone derivatives produce by the marine-derived endophytic fungus *Eurotium rubrum*[J]. Helvetica Chimica Acta, 2012, 95(1): 163-168.
- [3] GAO J, RADWAN M M, LEON F, et al. Antimicrobial and antiprotozoal activities of secondary

metabolites from the fungus *Eurotium repens*[J]. Med Chem Res, 2012, 21(10): 3080-3086.

- [4] MAY ZIN W W, BUTTACHON S, DETHOUP T, et al. Antibacterial and antibiofilm activities of the metabolites isolated from the culture of the mangrove-derived endophytic fungus *Eurotium chevalieri* KUFA 0006[J]. Phytochemistry, 2017, 141: 86-97.
- [5] GAO J, LEOÓN F, RADWAN M M, et al. Benzyl derivatives with *in vitro* binding affinity for human opioid and cannabinoid receptors from the Fungus *Eurotium repens*[J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(7): 1636-1639.
- [6] 李佳莲,胡博涵,赵勇彪,等.冠突散囊菌发酵液的抑菌作用[J].食品科学,2011,32(11):157-160.
LI J L, HU B H, ZHAO Y B, et al. Anti-microbial activity of fermentation supernatants of *Eurotium cristatum*[J]. Food Science, 2011, 32(11): 157-160.
- [7] 张芳芳,刘飞,袁超,等.冠突散囊菌发酵产物的抑菌作用及特性研究[J].食品与药品,2019,21(1):62-65.
ZHANG F F, LIU F, YUAN C, et al. Research on antimicrobial effects and characteristics of fermentation products of *Eurotium cristatum* [J]. Food and Drug, 2019, 21(1): 62-65.
- [8] DU F Y, LI X M, SONG J Y, et al. Anthraquinone derivatives and an orsellinic acid ester from the marine alga-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220[J]. Helvetica Chimica Acta, 2014, 97(7): 973-978.
- [9] 张志军,罗莹,李淑芳,等.液体菌种培养时间对灵芝液体发酵的影响[J].中国医药生物技术,2008,3(4):289-292.

- ZHANG Z J, LUO Y, LI S F, et al. Effect of culture time on fermentation of liquid strain of *Ganoderma lucidum*[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2008, 3(4): 289-292.
- [10] 张雯, 卞丹, 沈燕秋, 等. 枯草芽孢杆菌抑菌活性物质鉴定、抑菌特性及发酵条件优化[J]. 中国食品学报, 2017, 17(12): 105-115.
- ZHANG W, BIAN D, SHEN Y Q, et al. Identification and characterization of antibacterial metabolites and optimization of cultural conditions for *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(12): 105-115.
- [11] 张雯, 倪莉, 陈雅静, 等. 枯草芽孢杆菌 BS08 对大黄鱼腐败菌的抑制及培养基优化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 102-109.
- ZHANG W, NI L, CHEN Y J, et al. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* BS08 on spoilage bacteria isolated from *Pseudosciaena crocea* and optimization of fermentation medium for BS08[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(8): 102-109.
- [12] ZOU X, LI Y, ZHANG X, et al. A new prenylated indole diketopiperazine alkaloid from *Eurotium cristatum*[J]. Molecules, 2014, 19(11): 17839-17847.
- [13] 刘丽萍, 唐雨薇, 王若娴, 等. 茯茶冠突散囊菌发酵生产吲哚生物碱的研究[J]. 茶叶科学, 2017, 37(5): 503-512.
- LIU L P, TANG Y W, WANG R X, et al. Production of bioactive indole alkaloids through fermentation of *Eurotium cristatum* from Fuzhuan tea[J]. Journal of Tea Science, 2017, 37(5): 503-512.
- [14] DU F Y, LI X M, LI C S, et al. Cristatamins A-D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(14): 4650-4653.
- [15] 彭晓赞, 梁法亮, 李冬利, 等. 茯砖茶中冠突散囊菌的次级代谢产物及其生物活性研究[J]. 中草药, 2013, 44(14): 1881-1886.
- PENG X Y, LIANG F L, LI D L, et al. Secondary metabolites of *Eurotium cristatum* from Fu Brick tea and their biological activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(14): 1881-1886.
- [16] 李莹. 冠突散囊菌化学成分及其抗氧化活性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- LI Y. Study on chemical constituents and antioxidant activity of *Eurotium cristatum*[D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2014.
- [17] DA Q, XIE X, XU S, et al. Total syntheses of tardioxopiperazine A, isoechinulin A, and variecolorin C[J]. Organic Letters, 2011, 13(9): 2302-2305.
- [18] 张梁, 楼志华, 陶冠军, 等. 一种蒽醌类色素的提取分离和结构分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1645-1646.
- ZHANG L, LOU Z H, TAO G J, et al. Extraction, separation and structure analysis of an anthraquinone pigment[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2006, 31(19): 1645-1646.
- [19] INOUE S, HASHIZUME K, TAKAMATSU N, et al. Synthetic studies on echinulin and related natural products. IV.: Isolation, structure and synthesis of flavoglucan-auroglucan type natural products isolated from *Aspergillus amstelodami*[J]. Yakugaku Zasshi, 1977, 97(5): 569-575.
- [20] WANG S, LI X M, TEUSCHER F, et al. Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from chaetomium globosum, an endophytic fungus derived from the marine red alga polysiphonia urceolata[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(11): 1622-1625.
- [21] HAMASAKI T, FUKUNAGA M, KIMURA Y, et al. Isolation and structures of two new metabolites from aspergillus ruber[J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1980, 44(7): 1685-1687.
- [22] 熊玲, 张立彦, 刘启莲. 不同阴离子对乳酸链球菌素抑菌稳定性的影响研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 306-313.
- XIONG L, ZHANG L Y, LIU Q L. Influence of various ions on the antimicrobial stability of nisin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(23): 306-313.

Fermentation Optimization of Culture Medium and Isolation and Identification of Antimicrobial Active Substances from *Eurotium cristatum*

Zhang Wen, Wang Mingyu, You Jingguan, Ni Li*

(Institute of Food Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108)

Abstract In this work, response surface methodology was used to optimize the fermentation medium components of *E. cristatum* FS-10 producing antibacterial active substances. Meanwhile, the antibacterial activity products were isolated and preliminary identification through highperformance liquid chromatography (HPLC), matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometry. The results showed that the optimal medium components were determined as follows: anhydrous glucose (carbon source) 7.5%, sodium nitrate (nitrogen source) 0.65%, and potassium chloride 4.5%. Under the optimized fermentation conditions, the bacteriostasis rate reached 54.4% against the suspension of *Psychrophile* bacteria (1×10^5 CFU/mL). Two antibacterial active components (FS-IV and FS-VI) were isolated and identified. The molecular mass of component FS-IV and FS-VI were 1 630.8 u and 840.5 u, respectively, which might imply the existence of heteropolysaccharide derivative compounds and amide derivative compounds. Antibacterial compounds could inhibit the growth of some foodborne bacteria, including *Pseudomonas*, *Shewanella* and *Psychrophile*. They were stable to heat and acid-base conditions.

Keywords *Eurotium cristatum*; response surface methodology; culture medium optimization; bacteriostatic activity; product identification