



决明草内生真菌拮抗菌株筛选鉴定及桔青霉 ZH-11 抗菌物质分析

后文¹ 韦海新¹ 袁恩² 杨炽光¹ 朱向东^{*1}

1 江西农业大学生物科学与工程学院 江西 南昌 330045

2 江西中医药大学药学院 江西 南昌 330004

摘要:【背景】由于抗生素的滥用,导致“超级细菌”出现,寻找新的抗菌药物将有效地应对细菌耐药问题,因为大多数抗菌药物都是从微生物中发现的,所以药用植物内生真菌的研究拓宽了药用资源,并且具有巨大的应用价值。【目的】对采自江西九江庐山植物园的决明草进行内生真菌分离,筛选出拮抗菌株,并对拮抗菌株的次级代谢产物进行分离,分析其抗菌物质理化性质,为新型抗菌物质的研究提供基础数据。【方法】用管碟法筛选拮抗菌株,并根据形态学特征和分子生物学的方法鉴定菌株,采用硅胶柱层析、葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析和 RP-C18 柱层析对其次级代谢产物进行分离,并用液质联用(高分辨飞行时间质谱)和能谱仪分析所得抗菌物质的分子量和分子式。【结果】筛选到一株广谱拮抗活性菌株桔青霉 ZH-11,通过管碟法显示其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、水稻黄单胞菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、白色念珠菌、蜡样芽孢杆菌这 8 株指示菌均有较好的抑菌效果。从桔青霉 ZH-11 次级代谢产物中分离得到纯化合物 Y3,其分子量为 410.169 1,分子式为 C₂₄H₂₆O₆。当 Y3 浓度为 10 μg/mL 时,其对大肠杆菌和苏云金芽孢杆菌的抑菌圈直径分别为 16.23 mm 和 17.27 mm。【结论】菌株桔青霉 ZH-11 的活性物质与已知的来源于桔青霉类的抗菌活性物质不同,该研究结果为进一步挖掘桔青霉属的活性产物奠定基础,同时丰富了人们对决明草内生真菌的认识。

关键词: 中药, 内生菌, 抑菌活性, 次级代谢产物, 分离纯化

Screening and identification of the endophytic fungi antagonistic strain of *Cassia tora* Linn. and the analysis of antibacterial substances of *Penicillium citrinum* ZH-11

HOU Wen¹ WEI Haixin¹ YUAN En² YANG Chiguang¹ ZHU Xiangdong^{*1}

1 College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China

2 College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China

Abstract: [Background] Considering the emergence of “super bacteria” due to the abuse of antibiotics, the search for new antibacterial drugs is necessary for effectively conquering the problem of bacterial

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21366012); Jiangxi Provincial Department of Education Science and Technology Project (GJJ170286)

*Corresponding author: Tel: 86-791-83813459; E-mail: zhuxdau@jxau.edu.cn

Received: 11-01-2021; Accepted: 06-04-2021; Published online: 13-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金(21366012); 江西省教育厅科技计划(GJJ170286)

*通信作者: Tel: 0791-83813459; E-mail: zhuxdau@jxau.edu.cn

收稿日期: 2021-01-11; 接受日期: 2021-04-06; 网络首发日期: 2021-05-13

resistance. Since most antibacterial drugs are found from microorganisms, the research on endophytic fungi in medicinal plants can expand the medicinal resources, so it has a promising future for application.

[Objective] To isolate the endomycete from the *Cassia tora* Linn. collected from Lushan Botanical Garden of Jiujiang, Jiangxi Province; screen out the antagonistic strains; isolate the secondary metabolites of such strains and analyze the physical and chemical properties of their antibacterial substances to prepare for the research of new antibacterial substances. **[Methods]** The antagonistic strains were screened by the cup-plate method and then identified based on morphological characteristics and molecular biology. Their secondary metabolites were isolated by silica gel, Sephadex LH20 and RP-C18 column chromatography, and the molecular weight and molecular formula of antibacterial substances were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (GCMS) and EDS spectrometer. **[Results]** *Penicillium citrinum* ZH-11, a broad-spectrum antagonistic strain was screened out. As shown by the cup-plate method, it had a good bacteriostatic effect on eight indicator bacteria such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Xanthomonas oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Candida albicans* and *Bacillus cereus* etc. Active pure compound Y3 was isolated from the secondary metabolite of endomycete *Penicillium citrinum* ZH-11 with a molecular weight of 410.169 1 and a formula of $C_{24}H_{26}O_6$. When the concentration of Y3 was 10 $\mu\text{g/mL}$, the diameter of the inhibition zone against *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* was 16.23 mm and 17.27 mm, respectively. **[Conclusion]** This active substance is different from the known antibacterial active substances derived from *Penicillium citrinum*. The results laid a foundation for further exploration of the active products of *Penicillium citrinum*, and expanded our recognition of the endophytic fungi in *Cassia tora* Linn.

Keywords: traditional Chinese medicine, endophytic bacteria, antibacterial activity, secondary metabolites, separation and purification

由于植物内生菌对植物具有专一性,目前已知植物种类繁多,然而记载的植物内生菌尚不足植物数量的 1/10^[1],植物内生菌资源分布广泛,其研究任重而道远^[2]。微生物产生的活性次级代谢产物是微生物药物研发的重要资源,已有不少研究者从植物内生菌代谢产物中提取具有抑菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等功能的活性物质^[3-5],如从短叶红豆杉中分离得到能合成抗癌物质紫杉醇的紫杉霉属内生菌^[6];梅荣清等^[7]从红树内生菌 *Daldinia eschscholtzii* HJ001 发酵液中分离到具有强抗氧化活性的产物 Kojic Acid;杨显志等^[8]从长春花内生菌 *Mycelia sterilia* 97CY3 代谢物中提取到抗肿瘤的长春新碱;文琰章等^[9]从矮坨坨内生菌 *Fusarium oxysporum* 次级代谢产物中分离到抗肝癌的活性物质脱氢镰刀菌酸;旷歧轩等^[10]从川芎内生菌 *Fusarium proliferatum* 的代谢物中分离到的白僵菌素对肠癌和白血病细胞均有抑制作用。据报道,已从植物内生菌中分离出脂肪族类、醌类、肽类、萜类等活性产物^[11-12],所以对药用植物内生真菌的研

究拓宽了药用资源且具有巨大的应用价值。

决明子具有保肝护目、抗肿瘤、抗菌消炎、神经保护和改善肾功能等作用,可以作为肝保护剂和治疗便秘、抗肿瘤的药物,所以决明子既可作为保健品食用,也可药用于疾病治疗^[13-14]。决明属植物中分离得到的化合物主要类型有糖苷类^[15]、生物碱类^[16]、大环内酯类^[17]、蒽醌类^[18-19]、脂肽类^[20]等,它们具有不同程度的抗菌作用。关于决明草植物化学成分和生物活性的报道较多,但对其内生真菌的化学成分及其生物活性的研究未见报道。本研究对决明草内生菌进行分离,筛选活性菌株,并对菌株的活性产物进行分析,以期为内生菌株资源利用及新型微生物抗菌药物的开发提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试植物

决明草整体植株于 2019 年 10 月采自江西九江庐山植物园,采样后装入保鲜袋避光保存于 4 °C 冰箱。

1.1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, 蒸馏水 1 L。不加琼脂为 PDB 培养基。

LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 20.0, 蒸馏水 1 L, 调 pH 至 7.2。不加琼脂为 LB 液体培养基。

分离培养基: PDA 培养基加 100 mg/L 氨基青霉素。

1.1.3 指示菌菌株

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、蜡芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、意大利青霉(*Penicillium italicum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、指状青霉(*Penicillium digitatum*)共 12 种指示菌由江西农业大学生物科学与工程学院实验室保藏。

1.1.4 主要试剂和仪器

正丁醇、氯仿、甲醇、乙酸乙酯试剂等均为分析纯, 广东西陇科学股份有限公司; 硅胶板, 青岛海洋有限公司。旋转蒸发仪, EYELA 公司; 高分辨飞行质谱联用仪, AB SCIEX 公司; 能谱仪, 牛津仪器(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 决明草内生真菌的分离纯化

将决明草的枝、茎、叶、果实用纯净水洗净、晾干, 枝和果实用 75%酒精浸泡 2 min, 无菌水冲洗 3 次, 0.1%氯化汞浸泡 5 min; 茎和叶用 75%酒精浸泡 1 min, 无菌水冲洗 4 次, 0.1%氯化汞浸泡 3 min, 最后均用无菌水冲洗 5 次, 切成 1 cm 小块接种于有 100 mg/L 氨基青霉素的 PDA 培养基表面, 置于 28 °C 培养箱中培养 5–7 d。当观察到试验材料边缘有菌长出后, 挑取内生细菌接种至 LB 固体培养基, 置于 30 °C 恒温培养 2 d, 挑取内生

真菌到 PDA 培养基, 置于 30 °C 恒温培养 3 d, 纯化数次至培养基中菌落单一均匀, 菌丝形态颜色一致, 将纯化好的菌种接种到斜面培养基上, 30 °C 恒温培养 2 d 后 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 内生抗菌活性菌株的筛选

将 4 °C 保藏的从决明草分离获得的内生菌菌株接种至 PDA 培养基, 于 28 °C 培养 3 d 后并传代 2 次使菌株达到稳定状态生长时, 切取直径为 1 cm 的菌块接入 100 mL 的无菌水中制成孢子液, 按 2% (体积分数, 下同)的接种量将孢子液接入 PDB 培养基中, 28 °C、220 r/min 摇床培养 7 d, 经抽滤得到发酵液, 再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤处理。指示菌为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 利用管碟法测试发酵液的抑菌活性, 无菌水为空白对照。37 °C 恒温培养箱培养 12 h, 每个发酵液的测试平行重复操作 3 次, 观察是否有抑菌圈并测量其大小, 筛选具有抑菌效果的拮抗菌株。

1.2.3 内生抗菌活性菌株形态学特征

将甘油 4 °C 保藏的拮抗菌株接种至 PDA 培养基并传代 2 次使菌株的生长状态最佳, 活化后接种至 PDA 培养基, 28 °C 恒温培养 4 d, 观察菌株的菌落和菌丝形态特征。挑取少量菌丝制临时玻片镜检, 观察菌丝和分生孢子形态特征。

1.2.4 内生抗菌活性菌 rDNA ITS 序列分子鉴定

挑取活性菌体经过变性处理, 用真菌基因组提取试剂盒提取活性菌基因组 DNA, 以通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 rDNA ITS 序列的 PCR 扩增^[21]。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测后切胶回收, 送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。将测序获得的序列提交至 GenBank, 并在 NCBI 数据库中进行 BLAST 序列比对, 用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树, 确定拮抗菌株的种属地位。

1.2.5 内生菌株抗菌活性试验

(1) 指示菌菌株的活化: 挑取 4 °C 保藏的细菌菌株接种至 LB 固体培养基中, 30 °C 培养 24 h,

待菌落长出后再接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 摇床培养 12 h 至 OD_{600} 值为 0.5–0.6 左右。挑取冷冻保藏的真菌菌种接种至 PDA 培养基上, 28 °C 培养 3 d 后, 切 1 cm 菌块至无菌水中制成孢子液。

(2) 管碟法进行抗菌活性筛选: 将 1.2.4 中鉴定的活性菌株发酵 7 d 后, 抽滤菌体得到菌液, 在经 0.22 μ m 微孔滤膜后制得无菌发酵液。采用管碟法测试发酵液的抑菌活性, 首先每个平皿放置 3 个牛津杯, 将指示菌菌液按照 2% 的比例加入冷却至 50 °C 的培养基, 轻轻摇匀后, 向已放置好牛津杯的平皿倒入 40 mL 的 LB 培养基, 凝固后拔出牛津杯, 向 2 个孔加入 200 μ L 经处理的无菌发酵液, 另一孔加入 200 μ L 的无菌水为空白对照, 每个指示菌的测试平行重复操作 3 次, 37 °C 恒温培养 12 h, 待菌长满平板后测量抑菌圈的直径。

1.3 内生桔青霉 ZH-11 抗菌物质的初步分离与纯化

1.3.1 内生桔青霉 ZH-11 发酵液的制备

切取直径为 3 cm 的桔青霉 ZH-11 菌块接入 1 L 的无菌水中, 轻轻摇晃 2 min 制成孢子液, 按照 2% 的接种量加入到 PDB 培养基中, 选用装液量为 300 mL/500 mL 的锥形瓶, 制备 120 瓶, 28 °C、180 r/min 恒温摇床培养 7 d, 抽滤发酵液过滤掉菌丝球后, 将发酵液 5 倍浓缩并用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 萃取液旋蒸浓缩成粗品并称重。

1.3.2 内生桔青霉 ZH-11 抗菌活性物质粗品的分离

(1) 薄层色谱(Thin Layer Chromatography, TLC)分析: 取 200 μ L 用甲醇:氯仿体积比为 1:1 混合溶剂溶解的粗品, 2 mL 甲醇溶解后, 选用展开剂为氯仿:甲醇的 8:2 体积比进行硅胶板薄层层析。分别在 254 nm 及 360 nm 紫外灯下观察是否有荧光, 碘缸显色后立即用 10% 硫酸乙醇加热显色。

(2) 装柱及伴样: 将获得的发酵粗品用少量甲醇:氯仿体积比为 1:1 的混合溶剂完全溶解后, 与 200–300 目硅胶粉按照质量比为 1:1 的比例均匀拌样后作为样品备用。

(3) 洗脱: 按氯仿:甲醇=100:0、100:2、100:4、100:6、100:8、100:10、100:12、100:14 (体积比) 的比例, 每个比例洗脱 400 mL 且收集的样品流分是 30 mL/瓶。每瓶样品都需要进行硅胶板薄层层析分析, 合并 R_f 值相同的组分。

(4) 活性组分追踪: 按照 1.2.5 方法, 以大肠杆菌为指示菌, 用管碟法对各个分离组分进行活性检测, 并对量大的活性组分继续分离。

1.3.3 抗菌活性组分进一步分离

对于量大的活性组分, 根据薄层层析检测结果选用葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析进一步分离, 洗脱剂为氯仿:甲醇=1:1 (体积比), 洗脱流速为 20 s/滴, 流分每 8 mL 收集一瓶, 每瓶都需硅胶板薄层层析检测。根据检测结果选用 RP-C18 色谱柱继续对活性组分分离, 洗脱剂为水:甲醇=100%–10% (体积分数) 洗脱, 每个流分收集 30 mL, 根据活性组分追踪和薄层层析检测纯度的结果, 活性组分反复通过葡聚糖凝胶 LH-20 和 RP-C18 柱层析进行分离, 最后用 TLC 硅胶板刮板法进行纯化。

1.3.4 对抑菌活性组分的测定

通过液-质联用(高分辨飞行质谱联用仪)和能谱仪对抑菌活性组分进行分析, 可获得抑菌活性组分的精确分子量和分子式。

2 结果与分析

2.1 决明草内生真菌的分离纯化

从决明草的枝、叶、果实共分离培养出 22 株真菌, 编号为 ZH-01–ZH-22。分别对这些菌株的菌落特征进行观察, 其中, ZH-01、ZH-04、ZH-08 的形态特征一样, 统一归为 ZH-A 菌株; ZH-05、ZH-012、ZH-22 的形态特征一样, 统一归为 ZH-B 菌株; ZH-09、ZH-14、ZH-17 统一归为 ZH-C 菌株; ZH-10、ZH-18、ZH-19 统一归为 ZH-D 菌株; ZH-06、ZH-16、ZH-21 的形态特征一样, 统一归为 ZH-E 菌株。经比较, 这 22 株真菌根据菌落形态特征初步分为 12 种, 其菌落培养特征如图 1 和表 1 所示, 这些菌株纯化至平板上供后续实验。

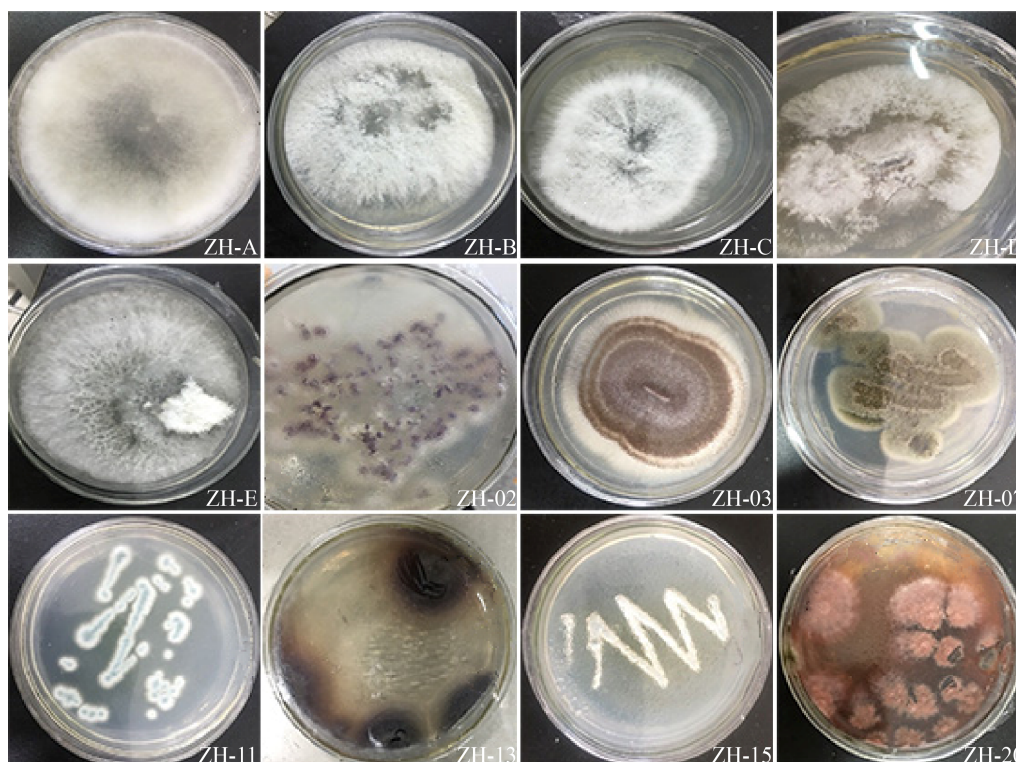


图 1 12 株决明草内生菌在 PDA 培养基培养 7 d 的菌落形态

Figure 1 The colony morphology cultured on PDA medium for 7 days of 12 endophytic fungi of *Cassia tora* Linn.

表 1 决明草内生真菌的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of the endophytic fungi of *Cassia tora* Linn.

菌株 Strain	菌落形态 Colony morphology	培养基颜色 Medium color
ZH-A	The mycelium was cottony, the colony was fluffy and white	Transparent and colorless
ZH-B	The mycelium was filamentous, the colony was a long and white flocculent	Transparent and colorless
ZH-C	The mycelium was filamentous and dense, the colony was white	Transparent and colorless
ZH-D	The mycelium was filamentous, the colony was a short and white flocculent	Transparent and colorless
ZH-E	The mycelium was cottony, the colony was fluffy and white	Transparent and colorless
ZH-02	The mycelium was purple in the form of dense fibrous filaments, the margins of colony were white	Black
ZH-03	The middle of colony was brown and the margin was white	Transparent and colorless
ZH-07	The colony was swelling, and the mycelium was villiform with greyish-green	Transparent and colorless
ZH-11	The mycelium was pea-green in the form of dense fibrous tomentellate. The middle of colony was pea-green and the margin was white	Yellow
ZH-13	The mycelium was black filamentous and the colony was black	Black
ZH-15	The mycelium was white in the form of dense fibrous tomentellate, the colony was white	Black
ZH-20	The mycelium was red filamentous and the colony was red	Red

2.2 决明草内生菌抗菌活性菌株的筛选

利用管碟法,以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌株,对从决明草分离的 12 株真菌进行抗菌活性检测实验,其中菌株 ZH-11 对 2 种指示菌株均有抗菌活性,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑

菌圈直径分别为 36.53 mm 和 19.33 mm。基于此,选取菌株 ZH-11 做进一步的研究。

2.3 决明草内生真菌菌株 ZH-11 的形态学特征

菌株 ZH-11 在 PDA 培养基上生长 3 d 后,培养基正面的菌落扁平凸起,菌落中心呈绿色紧密绒

毛状,边缘是白色短绒毛状,培养基背面菌落呈黄色。光学显微镜下可见菌丝是圆柱状颜色为豆绿色,呈树枝状分布不均一,细而长,分生孢子呈球形,其分生孢子梗经过多次分枝,孢子体的排列呈扫帚状(图 2)。

2.4 决明草内生真菌菌株 ZH-11 的分子生物学鉴定

将决明草内生真菌 ZH-11 的 rDNA ITS 测序序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析,上传 GenBank 获得序列号为 MW024141,挑选 22 个与真菌 ZH-11 有较近亲源关系的菌株构建系统发育树(图 3),发现真菌 ZH-11 与 *Penicillium citrinum* strain CBS 122726 聚于同一分支,亲缘关系最近,相似度达到 98%,因此确定真菌 ZH-11 为桔青霉(*Penicillium citrinum*),并命名为 *Penicillium citrinum* ZH-11。

2.5 内生桔青霉 ZH-11 抗菌活性

待指示菌长满平板时,用十字交叉法测量抑菌圈直径。如图 4 和表 2 所示,内生桔青霉 ZH-11

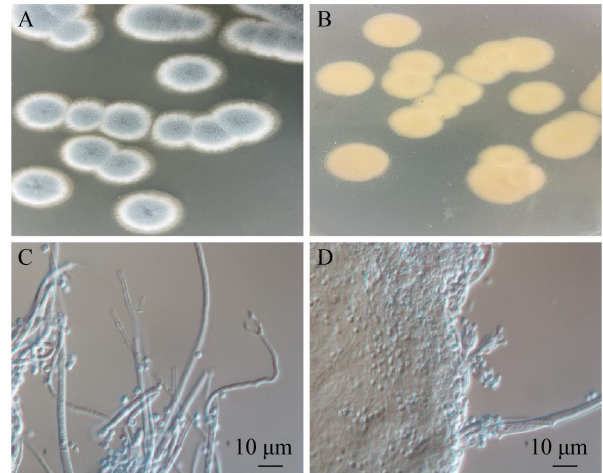


图 2 菌株 ZH-11 的形态特征

Figure 2 Morphological characters of the strain ZH-11

注: A: PDA 培养基上培养 7 d 的菌落形态(正面); B: PDA 培养基上培养 7 d 的菌落形态(背面); C: 分生孢子梗的形态,标尺=10 µm; D: 分生孢子形态,标尺=10 µm

Note: A: The colony morphology cultured on PDA medium for 7 days (front view); B: The colony morphology cultured on PDA medium for 7 days (back view); C: Morphology of the conidiophore, bar=10 µm; D: Morphology of the conidia, bar=10 µm

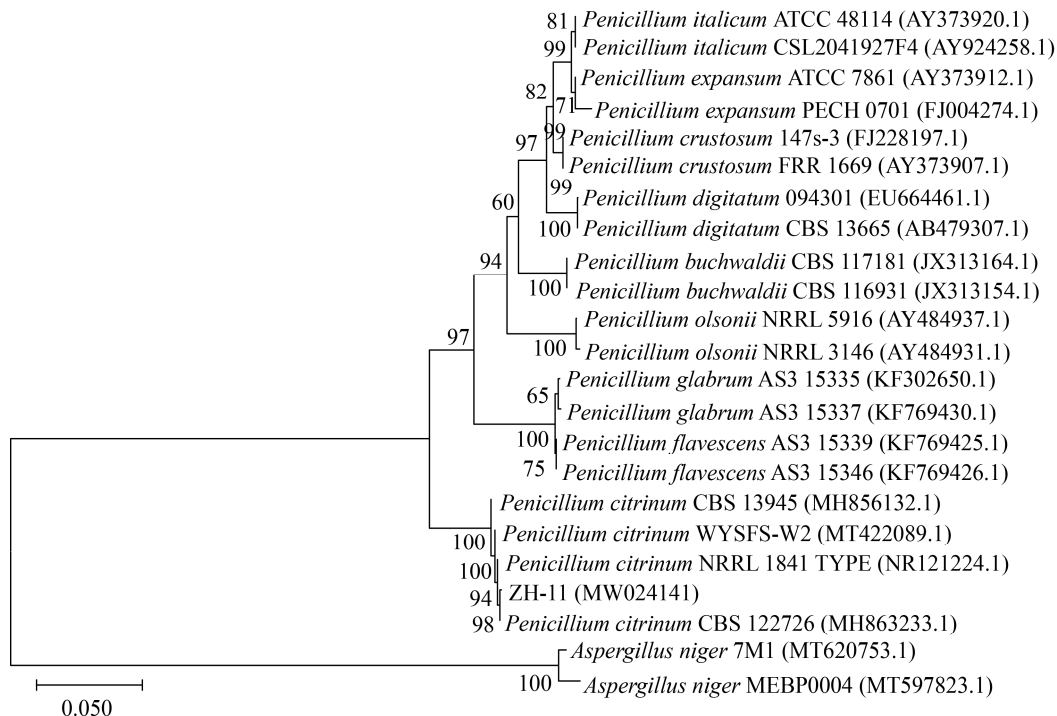


图 3 运用邻接法基于 rDNA ITS 序列构建菌株 ZH-11 的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain ZH-11 constructed by neighbor-joining method based on rDNA ITS sequence

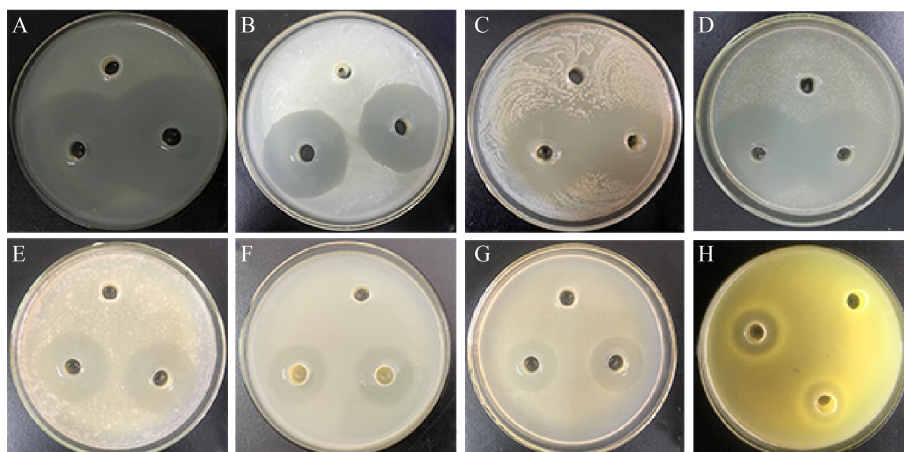


图 4 内生拮抗真菌桔青霉 ZH-11 发酵液抗菌活性

Figure 4 Antibacterial activity of antagonistic endophytic fungus *Penicillium citrinum* ZH-11 fermentation broth

注: A: 白色念珠菌; B: 水稻黄单胞菌; C: 地衣芽孢杆菌; D: 大肠杆菌; E: 苏云金芽孢杆菌; F: 蜡样芽孢杆菌; G: 枯草芽孢杆菌; H: 金黄色葡萄球菌

Note: A: *Candida albicans*; B: *Xanthomonas oryzae*; C: *Bacillus licheniformis*; D: *Escherichia coli*; E: *Bacillus thuringiensis*; F: *Bacillus cereus*; G: *Bacillus subtilis*; H: *Staphylococcus aureus*

的发酵液对测试的 8 种指示菌全部具有抑菌效果, 发酵液对意大利青霉、黑曲霉、指状青霉、铜绿假单胞菌等指示菌无抑菌效果, 表明内生桔青霉 ZH-11 具有较强的广谱抑菌能力。

表 2 内生拮抗真菌桔青霉 ZH-11 的抗菌活性鉴定
Table 2 Identification of antibacterial activity of antagonistic endophytic fungus *Penicillium citrinum* ZH-11

病原指示菌 Pathogenic indicator bacteria	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	42.28±0.03
水稻黄单胞菌 <i>Xanthomonas oryzae</i>	36.73±0.02
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	34.33±0.05
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	36.53±0.04
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	28.55±0.04
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	22.37±0.02
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	21.28±0.02
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	19.33±0.05
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	0
意大利青霉 <i>Penicillium italicum</i>	0
指状青霉 <i>Penicillium digitatum</i>	0
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	0

注: 数据为平均值±标准偏差

Note: The data are mean ± SD

2.6 内生桔青霉 ZH-11 抗菌物质初步分离与纯化

2.6.1 抗菌活性物质粗品的初步分离

收集桔青霉 ZH-11 发酵液 35 L, 发酵液经萃取浓缩称重为 12.58 g, 经硅胶柱初步分离, 并通过薄层层析检测分析, 如表 3 所示, 共得到 9 个分离组分, 活性测试的组分浓度均为 200 μg/mL, 组

表 3 桔青霉 ZH-11 发酵液 9 个组分拮抗大肠杆菌活性检测
Table 3 Activity test of 9 components from *Penicillium citrinum* ZH-11 fermentation broth against *E. coli*

组分 Fraction	质量 Quality (g)	浓度 Concentration (μg/mL)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)
F1	2.50	200	22.07±0.28
F2	1.50	200	19.56±0.12
F3	0.10	200	20.37±0.11
F4	0.45	200	0
F5	0.30	200	20.56±0.47
F6	0.67	200	0
F7	0.12	200	0
F8	0.10	200	18.44±0.50
F9	1.50	200	20.36±0.44

注: 数据为平均值±标准偏差

Note: The data are mean ± SD

分 F4、F6、F7 对大肠杆菌均无抗菌活性；组分 F1 的抗菌活性最强，抑菌圈直径为 22.07 mm，质量为 2.5 g。将组分 F1 进行下一步分离。

2.6.2 活性组分进一步分离

将 F1 组分反复进行葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析和 RP-C18 柱层析分离，结合硅胶板薄层层析分析，经抗菌活性追踪，得到活性纯品 Y3。如图 5 所示，图 5A 中展开剂为乙酸乙酯， R_f 值为 0.32，而且点 3、4、5 为单点，在 360 nm 紫外灯下观察有荧光，碘不显色，10% 硫酸乙醇不显色，按照 1.2.5 方法，经活性测定对大肠杆菌有抑制作用，合并组分 3-5。经硅胶刮板法纯化得到纯品 Y3，Y3 点板为单点，如图 5B 所示，图 5B 中展开剂为乙酸乙酯， R_f 值为 0.31，而且样品 Y3 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ ，对大肠杆菌和苏云金芽胞杆菌的抑菌圈直径分别为 16.23 mm 和 17.27 mm。

2.6.3 对抑菌活性组分的测定

通过液质联用和能谱仪对 Y3 的分子量和分子组成分析，获得了抑菌活性组分的精确分子量和分子式。如图 6 所示，高分辨飞行时间质谱数据表明，

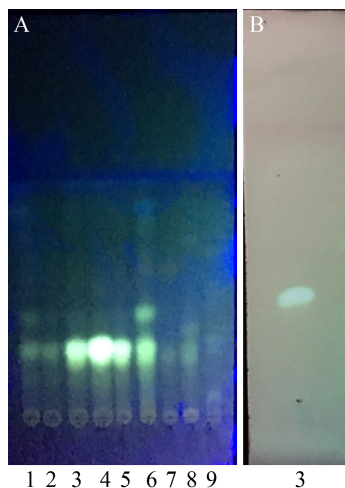


图 5 桔青霉 ZH-11 发酵液抑菌组分 Y3 的 TLC 观察
Figure 5 TLC observation of bacteriostatic component Y3 of *Penicillium citrinum* ZH-11 fermentation broth

注：A：编号 1-9 分别表示经反向色谱柱分离所得组分；B：3 号表示得到的纯化合物

Note: A: Numbers 1-9 are the components separated by RP-C18 column; B: 3 is purified compound

在保留时间 16.601 min 观察到 1 个峰，在正离子模式下，分子离子峰 m/z 410.169 1 失去 1 个氢原子生成 m/z 409.164 7 (图 6B)。能谱仪分析 Y3 的分子组成只有 C、H、O，结合数据库分析，通过出峰时间以及二级质谱比对，经 Peakview 色谱工作站模拟，推定菌株 ZH-11 次生代谢产物中抑菌活性组分 Y3 的分子量为 410.169 1，分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_6$ ，Y3 易溶于甲醇、丙酮，具有共轭体系，颜色为柠檬黄色，可能属于酚类物质。

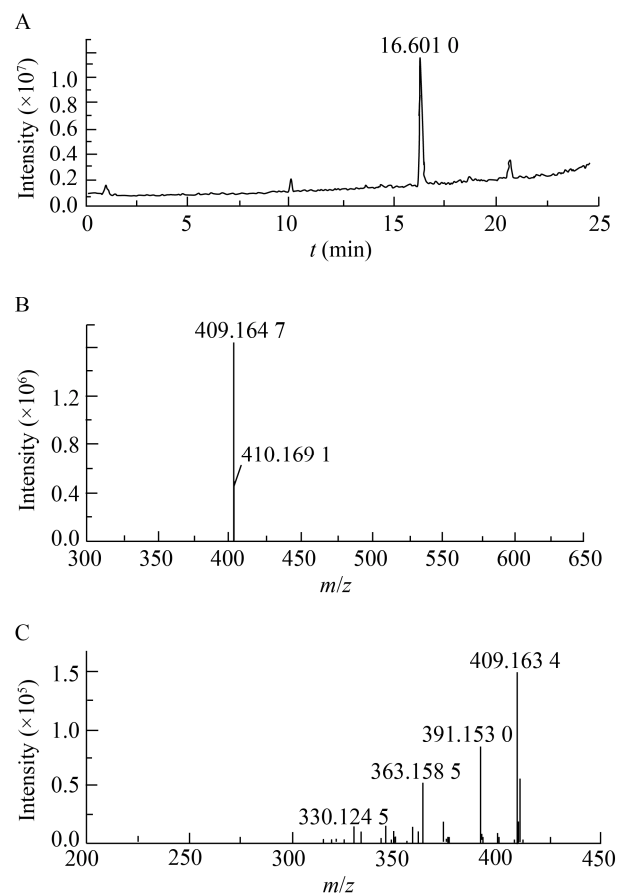


图 6 桔青霉 ZH-11 发酵液抑菌组分 Y3 的高分辨飞行时间质谱分析

Figure 6 High resolution time-of-flight mass spectrometry analysis of bacteriostatic fraction Y3 of *Penicillium citrinum* ZH-11 fermentation broth

注：A：Y3 在正离子模式下总离子图；B：Y3 的一级质谱图；C：二级质谱图

Note: A: Extracted ion chromatogram of Y3; B: A mass of Y3; C: The secondary MS of fragment

3 讨论与结论

本研究从决明草内生菌分离到一株广谱拮抗活性菌株桔青霉 ZH-11。从该菌株的发酵液对 12 种病原菌的抑菌活性测试结果来看, 其对其中 8 种指示菌有抑菌能力, 包括白色念珠菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌等人体致病菌, 表明其有较好的开发成微生物药物的价值和潜力。水稻黄单胞菌是植物病原菌, 能引起水稻白叶枯病, 桔青霉 ZH-11 对水稻黄单胞菌的抑菌圈直径高达 36.73 mm, 因此该菌株在生防领域具有开发应用潜力。

据文献报道, 已从桔青霉分离到一些具有抗菌^[22-24]和抗动脉粥样硬化^[25]的活性代谢产物, 如: Penicillenol B2 在 30 $\mu\text{mo/L}$ 浓度下对 HL-60 细胞的抑制率达到 100%^[26]; Penicitol 对 HCT-116 和 HeLa 细胞株有细胞毒性^[27]; Ni 等从海洋来源桔青霉菌株中分离的 Penicitrinol L 对 HL-60 细胞有中等抑制活性^[28]; Danagoudar 等^[29]从灰岩粗毛藤内生菌分离的桔青霉菌株 CGJ-C2 有抗氧化性, 而且对 MCF-7 和 MOLT-4 细胞系有很好的细胞毒活性; Tsuda 等^[30]从源自红藻的桔青霉菌株代谢产物中分离到一个结构新颖的生物碱 Citrinadin A, 对人表皮癌细胞 KB 有抑制作用; 乔云明从越南槐内生菌分离得到的桔青霉菌株对田七根腐病原菌、田七炭疽病原菌、田七黑斑病原菌抑制率均达到 50% 以上^[31]。本研究从决明子内生真菌桔青霉 ZH-11 次级代谢产物中也分离到 6 个抑菌组分, 其中, 抑菌组分 Y3 的分子量和分子式与已知来源于桔青霉类的活性物质不同, 抑菌组分 F2、F3 为针状黄色结晶, F5 为黄色固体, F8、F9 为黄色粉末, 而且都易溶于甲醇和丙酮, 与已报道的一些桔青霉活性代谢产物的理化性质相似, 如桔霉素^[32]、大黄素^[27]、Penicitrinol A^[23]等, 但这些化合物的结构和功能有待后续进一步研究。此外, 本研究从桔青霉 ZH-11 分离获得的抑菌组分 Y3 与决明草活性成分萘啶吡喃酮类决明子苷(分子式

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_9$, 分子量 404)^[33]的分子量及分子式最为接近, 其是否与决明子苷具有相似的结构与功能也有待后续研究。

内生真菌是一种具有可持续发展的生物活性和化学新产品资源, 并能产生与宿主植物相同或相似的次级代谢产物。本研究获得的数据将为进一步挖掘桔青霉属的活性产物奠定基础, 同时丰富了对决明草内生菌真菌代谢产物的认识, 为新型抗菌物质的研究提供了资源。

REFERENCES

- [1] Ding SW, Zhang P, Liu MM. Research progress of plant entophytic effect on plant growth[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(11): 132-134 (in Chinese)
丁绍武, 张鹏, 刘梦铭. 植物内生菌对植物生长的影响研究进展[J]. 现代农业科技, 2020(11): 132-134
- [2] Chen L, Liang ZN, Zhu H. Research advances in the studies of plant entophytic[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(8): 30-34 (in Chinese)
陈龙, 梁子宁, 朱华. 植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 30-34
- [3] Tao AL, Su C, Yu DQ, Guo QQ, Cao LL, Cao DJ, Feng XH. Research progress and prospect of microbial pharmacy[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2012, 40(16): 17-19 (in Chinese)
陶阿丽, 苏诚, 余大群, 郭乔乔, 曹玲玲, 曹殿洁, 冯学花. 微生物制药研究进展与展望[J]. 广州化工, 2012, 40(16): 17-19
- [4] Munakata Y, Gavira C, Genestier J, Bourgaud F, Hehn A, Slezack-Deschaumes S. Composition and functional comparison of vetiver root endophytic microbiota originating from different geographic locations that show antagonistic activity towards *Fusarium graminearum*[J]. Microbiological Research, 2021, 243: 126650
- [5] Surya Hakim S, Yuwati TW. The use of fungal endophyte *Penicillium citrinum* on tree seedling: applicability and limitation[J]. Bio Web of Conferences, 2020, 20: 03005
- [6] Xi XY, Zhao SY, Zhang P, Song FJ, Lei SK, Ning Y. Isolation and identification of taxol-producing endophytic fungus N-15[J]. Natural Product Research and Development, 2016, 28(8): 1219-1222, 1283 (in Chinese)
席晓圆, 赵盛英, 张鹏, 宋发军, 雷世康, 宁祎. 产紫杉醇内生真菌 N-15 的分离及鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(8): 1219-1222, 1283
- [7] Mei RQ, Li C, Wang B, Huang GL, Yi JL, Chen GY, Zheng CJ. Studies on bioactive secondary metabolites from a mangrove-derived fungus *Daldinia eschscholtzii* HJ001[J].

- Chinese Journal of Marine Drugs, 2019, 38(6): 30-34 (in Chinese)
梅荣清, 李灿, 王斌, 黄国雷, 易继凌, 陈光英, 郑彩娟. 1 株红树来源真菌 *Daldinia eschscholtzii* HJ001 的活性次级代谢产物研究[J]. 中国海洋药物, 2019, 38(6): 30-34
- [8] Yang XZ, Zhang LQ, Guo B, Guo SP. Preliminary study of a vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2004, 35(1): 79-81 (in Chinese)
杨显志, 张玲琪, 郭波, 郭仕平. 一株产长春新碱内生真菌的初步研究[J]. 中草药, 2004, 35(1): 79-81
- [9] Wen YZ, Lyu JN, Chen H, Hao J, Huang M, Yang J, Dai CX, Yang XZ, Lin QX. Study on the metabolites and their anti-hepatoma activity of *Fusarium oxysporum* isolated from *Munronia delavayi* Franch.[J]. Journal of Central China Normal University: Natural Sciences, 2018, 52(5): 686-693 (in Chinese)
文琰章, 吕静南, 陈豪, 郝吉, 黄密, 杨洁, 戴晨曦, 杨新洲, 林亲雄. 矮坨坨内生真菌 *Fusarium oxysporum* 代谢产物及其抗肝癌活性的研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2018, 52(5): 686-693
- [10] Kuang QX, Tan L, Luo Y, Feng D, Zhou Y, Guo DL, Ren B, Deng Y. Chemical constituents of the endophytic fungus *Fusarium proliferatum* from *Ligusticum chuanxiong* Hort.[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020. DOI: 10.19675/j.cnki.1006-687x.2020.0606 (in Chinese)
旷歧轩, 谭璐, 罗禹, 冯丹, 周煜, 郭大乐, 任波, 邓赞. 川芎内生真菌 *Fusarium proliferatum* 的化学成分[J]. 应用与环境生物学报, 2020. DOI: 10.19675/j.cnki.1006-687x.2020.06069
- [11] Waqas M, Khan AL, Shahzad R, Ullah I, Khan AR, Lee IJ. Mutualistic fungal endophytes produce phytohormones and organic acids that promote Japonica rice plant growth under prolonged heat stress[J]. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 2015, 16(12): 1011-1018
- [12] Sadahiro Y, Kato H, Williams RM, Tsukamoto S. Irpexine, an isoindolinone alkaloid produced by coculture of endophytic fungi, *Irpex lacteus* and *Phaeosphaeria oryzae*[J]. Journal of Natural Products, 2020, 83(5): 1368-1373
- [13] Yan TT, Ding WJ, Liu HW, Wang PM, Zheng DQ, Xu JZ. New pyridone alkaloids from marine-derived fungus *Penicillium* sp.[J]. Tetrahedron Letters, 2020, 61(19): 151843
- [14] Sun JH, Huang YY, Guo LP, Kang LP. Research progress of chemical ingredients and pharmacological activity of plants from *Cassia*[J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 33(9): 145-159 (in Chinese)
孙建慧, 黄圆圆, 郭兰萍, 康利平. 决明属植物化学成分与药理作用研究进展[J]. 西部中医药, 2020, 33(9): 145-159
- [15] Pang X, Li NN, Yu HS, Kang LP, Yu HY, Song XB, Fan GW, Han LF. Two new naphthalene glycosides from the seeds of *Cassia obtusifolia*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2019, 21(10): 970-976
- [16] Zhu YX, Peng C, Ding WX, Hu JF, Li JY. Chromenopyridin A, a new N-methoxy-1-pyridone alkaloid from the endophytic fungus *Penicillium nothofagi* P-6 isolated from the critically endangered conifer *Abies beshanzuensis*[J]. Natural Product Research, 2020: 1-7
- [17] Youn IS, Han AR, Choi JS, Seo EK. A new naphthalenic lactone glycoside from the seeds of *Cassia obtusifolia*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2017, 53(3): 429-431
- [18] Jang DS, Lee GY, Kim YS, Lee YM, Kim CS, Yoo JL, Kim JS. Anthraquinones from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on protein glycation and aldose reductase[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(11): 2207-2210
- [19] Cao LJ, Miao J, Liu JX, Gao WY, Li X. Research on contents of anthraquinones in *Cassia semen* by principal component analysis[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(13): 2589-2593 (in Chinese)
曹丽娟, 苗静, 刘洁秀, 高文远, 李霞. 基于主成分分析的决明子中蒽醌类成分含量研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2589-2593
- [20] Mageshwaran V, Walia S, Annapurna K. Isolation and partial characterization of antibacterial lipopeptide produced by *Paenibacillus polymyxa* HKA-15 against phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* M-5[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(3): 909-917
- [21] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics[M]. PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322
- [22] Shahid MG, Nadeem M, Gulzar A, Saleem M, Rehman HU, Ghafoor GZ, Hayyat MU, Shahzad L, Arif R, Nelofer R. Novel ergot alkaloids production from *Penicillium citrinum* employing response surface methodology technique[J]. Toxins, 2020, 12(7): 427
- [23] Wakana D, Hosoe T, Itabashi T, Okada K, Campos Takaki GM, Yaguchi T, Fukushima K, Kawai KI. New citrinin derivatives isolated from *Penicillium citrinum*[J]. Journal of Natural Medicines, 2006, 60(4): 279-284
- [24] Chakravarti R, Sahai V. Optimization of compactin production in chemically defined production medium by *Penicillium citrinum* using statistical methods[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(4): 481-486
- [25] Jiang Y, Tang XL, Wang KX, Li PL, Li GQ. Secondary metabolites and their bioactivities of the fungus *Penicillium citrinum* isolated from a soft coral[J]. Chinese Journal of

- Marine Drugs, 2018, 37(5): 36-40 (in Chinese)
姜芸, 唐旭利, 王康熙, 李平林, 李国强. 1 株软珊瑚共附生真菌 *Penicillium citrinum* 次级代谢产物及其活性研究[J]. 中国海洋药物, 2018, 37(5): 36-40
- [26] Bao DY, Hu QQ, Li PL, Tang XL, Li GQ. Secondary metabolites and their bioactivities of the fungus *Penicillium citrinum* isolated from the soft coral *Sarcophyton* sp.[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2019, 38(6): 21-24 (in Chinese)
鲍道洋, 胡倩倩, 李平林, 唐旭利, 李国强. 西沙软珊瑚 *Sarcophyton* sp. 共附生青霉菌 *Penicillium citrinum* 次级代谢产物和生物活性研究[J]. 中国海洋药物, 2019, 38(6): 21-24
- [27] Li MY, Chang M, Zhang QH, He RF, Ye BP. The endophytic fungus strain ZD6 isolated from the stem of *Bruguiera gymnorrhiza* and the antibacterial activity of its metabolites[J]. Mycosystema, 2010, 29(5): 739-745 (in Chinese)
李明月, 常敏, 张庆华, 何仁发, 叶波平. 木榄内生真菌菌株 ZD6 及其代谢产物的抑菌活性[J]. 菌物学报, 2010, 29(5): 739-745
- [28] Ni M, Lin WL, Yang P, Mao SC. A novel citrinin derivative from the marine-source fungus *Penicillium citrinum*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2015, 50(2): 203-206
- [29] Danagoudar A, Joshi C, Ravi S, Kumar HR, Ramesh B. Antioxidant and cytotoxic potential of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Tragia involucrata* L.[J]. Pharmacognosy Research, 2018, 10(2): 188-194
- [30] Tsuda M, Kasai Y, Komatsu K, Sone T, Tanaka M, Mikami Y, Kobayashi J. Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*[J]. Organic Letters, 2004, 6(18): 3087-3089
- [31] Qiao YM. Research on the antagonistic phytopathogen constituent of endophytic fungi from the seeds of *Sophora tonkinensis*[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2016 (in Chinese)
乔云明. 山豆根种子内生真菌及其抑菌活性成分研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2016
- [32] Chen L, Liu W, Hu X, Huang K, Wu JL, Zhang QQ. Citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2011, 59(4): 515-517
- [33] Wang L, Zhou DY, Jiang LJ, Zhang JH, Zhang W, Jiang YY, Liu B. UPLC-MSⁿ analysis and certification evaluation of main chemical composition in naphthopyrone reference extract of *Cassia semen*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(10): 2102-2109 (in Chinese)
王路, 周德勇, 蒋丽娟, 张金华, 张薇, 姜艳艳, 刘斌. 决明子萘啉吡喃酮类对照提取物中主要化学成分 UPLC-MSⁿ 分析及定值研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 2102-2109