

蝙蝠蛾拟青霉的抑菌活性与菌丝体发酵化学组分的研究

刘俊¹⁾, 杨本寿^{1,2,3)}, 姜国银¹⁾

(1) 曲靖医学高等专科学校微生物研究所, 云南 曲靖 655000; 2) 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650091; 3) 云南大学中草药生物资源研究所云百草实验室, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 检测从云南省德钦县白马雪山采集的冬虫夏草分离到的内生真菌蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 的抑菌活性, 了解其菌丝体发酵物的部分化学组分. **方法** 选择 26 种病原指示菌, 采用纸片扩散法对蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 进行抑菌活性试验. 采用检测方法 NY/T 1653 和 GB 5009.5 分别检测蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 菌丝体发酵物干品中 8 种矿质元素和总氮的含量. **结果** 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 对病原细菌、植物病原真菌和皮肤致病真菌共 19 种病原微生物有较为明显的抑制作用. 菌丝体发酵物中含有 8 种矿质元素, 总氮平均含量是 3.19%. **结论** 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 中存在抗菌活性物质, 菌丝体发酵物中化学组分全面, 为进一步开发保健药物提供了资源.

[关键词] 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8; 抗菌谱; 化学组分

[中图分类号] R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 06-0032-04

Antibiotic Activities and Chemical Composition of Mycelia of a Strain *Paecilomyces Hepiali* Chen et Dai

LIU Jun¹⁾, YANG Ben-shou^{1,2, 3)}, JIANG Guo-yin¹⁾

(1) Institute of Microbiology, Qujing Medical College, Qujing Yunnan 655000; 2) Institute of Landscape and Horticulture, Yunnan Agriculture University, Kunming Yunnan 650091; 3) Yunnan Herbal Laboratory, Institute of Herb Biotic Resources, Yunnan University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To detect the antimicrobial activities of an endophytic fungus strain *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 isolated from wild *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. on white horse mountain in Deqin of Yunnan Province, and to understand partial chemical composition of mycelia fermented products. **Methods** The antimicrobial activities of endophytic fungus strain *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 were screened against 26 microbes by paper disc diffusion method. The mineral elements and total nitrogen content of mycelia fermented dry products were detected by the method of NY/T 1653 and GB 5009.5 respectively. **Results** Antimicrobial experiment showed the strain *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 had broad-scope, high activities against nineteen pathogenic microorganisms of human and plants. The test of chemical composition of mycelia fermented products showed that the fermented products had the 8 kinds of mineral elements and the average total nitrogen content was 3.19%. **Conclusion** Diverse antimicrobial natural products are existed in the strain *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8, which could be the resources for new health-care drugs.

[Key words] *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8; Antibiotic spectrum; Chemical composition

[基金项目] 云南省教育厅科研基金资助项目 (2010Y226)

[作者简介] 刘俊 (1966~), 男, 云南宜良县人, 大学本科, 副教授, 主要从事微生物次生代谢产物化学工作.

[通讯作者] 杨本寿. E-mail: yangbenshou@163.com

冬虫夏草是麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体^[1],具有广泛的药理作用和独特的药用价值,具有能使机体细胞免疫增强或减弱的双向调节作用^[2].由于天然虫草的产地、生长环境和寄生条件极其特殊,加上人们不断地采挖,环境不断遭到破坏,冬虫夏草天然资源非常紧张^[3].因此,冬虫夏草无性型菌株的人工培植和液体深层培养及其有效活性成分的研究与开发就成为了国内外研究的热点.国家药品与食品药品监督管理局颁布的《真菌类保健食品评审规定》明文规定,用于人工虫草生产的菌种仅有蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai 和蝙蝠蛾被毛孢 *Hirsutella hepiali* Chen et Shen 两种符合法规.

现将从德钦县白马雪山(海拔3900 m)野生冬虫夏草分离、筛选得到的一株蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 菌丝体的菌丝体发酵产物的抑菌活性及部分发酵物化学组分含量报道如下.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 菌株蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8,从云南省德钦县白马雪山海拔3900 m处采集的野生冬虫夏草中分离得到.

1.1.2 培养基和培养条件 冬虫夏草菌纯化、活化培养基:PDA 固体培养基.种子、扩大发酵培养基:PDA 液体培养基;细菌类指示菌采用牛肉膏蛋白胨培养基;皮肤致病真菌类指示菌采用沙博氏培养基;植物病原真菌类指示菌采用 PDA 培养基.各种细菌病原指示菌、皮肤致病真菌指示菌培养温度为37℃,植物致病真菌指示菌培养温度为28℃.

1.1.3 指示菌 (1)革兰氏阳性细菌:金黄色葡萄球菌,蜡状芽孢杆菌,枯草芽孢杆菌,白色葡萄球菌,结核分枝杆菌(人型结核),藤黄八叠球菌,耻垢分枝杆菌,表皮葡萄球菌;(2)革兰氏阴性细菌:大肠杆菌,铜绿色假单胞菌,伤寒沙门氏菌,宋内氏志贺菌;(3)皮肤致病真菌:紧密单孢枝霉,石膏样小孢子菌,皮炎单孢枝霉,裴氏着色真菌,星形石膏样毛癣菌,疣状毛癣菌;(4)植物病原真菌:灰葡萄孢,棒束孢,玉蜀黍长蠕孢,小长喙霉,黑曲霉,毛壳菌,燕麦镰孢,赤霉

菌.上述供试指示菌均由云南省微生物研究所提供.

1.2 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 的抗菌活性测定

1.2.1 发酵样品的制备 将种子培养基中培养、活化的蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 接种到7 mL PDA 液体培养基中,28℃,200 r/min 摇床培养5 d,无菌条件下滤去菌丝体,在得到的发酵液中加入等体积的95%乙醇,浸提48 h后过滤除去菌体,浓缩至干,加入无菌水制成发酵样品,做抗菌活性试验.

1.2.2 指示菌的培养 取各病原指示菌的新鲜斜面培养物分别接入5 mL 无菌水稀释制成菌悬液.

1.2.3 含菌平板的制备 无菌条件下分别取供试指示菌悬液各0.2 mL,加入相应的固体培养基制成含菌平板.

1.2.4 抑菌试验 采用滤纸片法(直径6 mm)测定抗菌活性,将浸泡于冬虫夏草无性型发酵液的无菌滤纸片3片叠加在一起放入培养基平板内,细菌置于37℃,真菌置于28℃,培养48 h后,分别测量抑菌圈直径的大小.

1.3 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 菌丝体发酵物部分化学组分的测定

1.3.1 菌丝体发酵 将蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 接种到PDA 液体种子培养基中,28℃,200 r/min 摇床培养5 d后,无菌条件下接种到PDA 液体扩大发酵培养基中,28℃,200 r/min 摇床培养5 d,无菌条件下过滤获得菌丝体,置于烘箱内至干.

1.3.2 检测所用主要仪器 等离子体发射光谱仪、氨基酸分析仪等.

1.3.3 检测方法 检测发酵物矿质元素所用方法为NY/T 1653-2008,总氮用GB 5009.5-2010.

1.3.4 检测委托单位 农业部农产品质量监督检验测试中心(昆明)NO:20115041.

2 结果

2.1 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 的抑菌实验

滤纸片法对蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 发酵液的无菌水提液进行抑菌试验,结果显示,该菌株发酵的水提液对所测定的26株病原菌中的6种革兰氏阳性菌和4种革兰氏阴性细菌指示菌、3种皮肤致病真菌和4种植物

病原真菌均表现出中度以上的抑菌活性（抑菌圈直径 10~15 mm），对革兰氏阳性菌蜡状芽孢杆菌具有高度抑菌活性（抑菌圈直径 > 16 mm），达到了 17 mm。

2.2 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 菌丝体发酵物化学组分的检验扩大发酵培养蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces*

hepiali Chen et Dai JY 8-8，无菌条件下过滤得到菌丝体样品无异常干品 10 g，样品干品送交云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所进行菌丝体发酵物化学组分检测。主要进行发酵菌丝体中矿物质元素，总氮含量等检验项目。检验结果见表 1、表 2。

表 1 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 的抑菌试验结果

Tab. 1 The results of antipathogenic activities of *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8

指示菌株	抑菌圈直径 (mm)	指示菌株	抑菌圈直径 (mm)
金黄色葡萄球菌	7	石膏样小孢子菌	-
蜡状芽孢杆菌	17	皮炎单孢枝霉	-
枯草芽孢杆菌	10	裴氏着色真菌	13
白色葡萄球菌	11	星形石膏样毛癣菌	13
结核分枝杆菌	11	疣状毛癣菌	-
藤黄八叠球菌	8	灰葡萄孢	10
耻垢分枝杆菌	10	棒束孢	-
表皮葡萄球菌	13	玉蜀黍长蠕孢	-
铜绿假单胞菌	11	小长喙霉	10
伤寒沙门氏菌	15	黑曲霉	-
宋内氏志贺菌	11	毛壳菌	10
大肠杆菌	12	燕麦镰孢	-
紧密单孢枝霉	10	赤霉菌	-

表 2 蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 菌丝体发酵干品化学组分检验结果

Tab. 2 The results of chemical composition *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 dried sample

项目名称	检测方法	实测数据
硫 (以 S 计, %)	NY/T 1653	0.272
磷 (以 P 计, %)	NY/T 1653	0.464
钾 (以 K 计, %)	NY/T 1653	1.36
钙 (以 Ca 计, %)	NY/T 1653	0.750
镁 (以 Mg 计, %)	NY/T 1653	0.109
铁 (以 Fe 计, mg/kg)	NY/T 1653	27.6
锌 (以 Zn 计), mg/kg)	NY/T 1653	266
铜 (以 Cu 计), mg/kg)	NY/T 1653	21.0
锰 (以 Mn 计), mg/kg)	NY/T 1653	13.2
总氮 (%)	GB 5009.5	3.19

3 讨论

体外生物活性检测实验是一种定性而非定量的实验，实验结果受到不同发酵培养基、不同菌株接种量以及同一培养基不同的发酵条件等诸多因素的

影响，但却能够在菌株筛选中起到一个很好的瓶颈效应，为定向研究有价值的菌株做到了很好的筛选作用。因此，还需要继续摸索优化最佳的活性检测条件。菌株蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 菌丝体发酵代谢产物在现有检测条件下，表现出对多种病原指示细菌和真菌有抑菌活性，说明菌株蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 菌丝体中含有抑菌活性成分。

蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai 是一种符合《真菌类保健食品评审规定》法规可以用于人工生产的真菌，对其发酵菌丝体的化学组分进行研究非常必要。通过检测，可以看出有发酵条件下，蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai JY 8-8 菌丝体发酵物中含有所测的所有 8 种矿物质元素，总氮平均含量是 3.19%。需要继续摸索优化扩大发酵培养的培养基成分组成，继续探索菌丝体产量高峰期的时间及最高产物含量的时间。进一步进行虫草素、虫草多糖、虫草酸等含量指标的测定研究工作^[4]。

(下转第 38 页)

- [4] 李秀丽,叶峰,俞腾飞. 余甘子的药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(2):266-267.
- [5] 吴荣书,戈振扬. 滇橄榄系列产品的开发利用[J]. 农牧产品开发,1996,10:13-15.
- [6] 吴雪辉,谢治芳,黄永芳. 余甘子的化学成分和保健功能作用[J]. 中国野生植物资源,2003,22(6):69-71.
- [7] 郭鲁宏,杨亚力,金丹,等. 黑曲霉单宁酶产生菌的筛选及处理滇橄榄汁的研究[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(4):16-18.
- [8] 程伟贤,陈鸿雁,张义平,等. 余甘子功能食品的开发及其类SOD活力测定 [J]. 食品与生物技术学报,2006,25(4):113-115
- [9] 刘晓丽,赵谋明. 余甘子果汁活性成分与抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(5):151-154.
(2012-03-24 收稿)

(上接第 34 页)

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典2010版一部1.2版 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:106.
- [2] 陈国栋. 冬虫夏草类生态、培植应用[M]. 北京:科学技术出版社,1995:91-100.
- [3] 许超德. 冬虫夏草的研究进展[J]. 菌物研究,2006,4(2):60.
- [4] 魏鑫丽,印象初,郭英兰,等. 冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析[J]. 菌物学报,2006,25(2):192-202.
(2012-03-03 收稿)