

一株海洋真菌 *Trichoderma* sp. Q98 合成产物分析*

孟繁梅, 艾云灿

(中山大学生物防治国家重点实验室 // 教育部基因工程重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 海洋真菌 *Trichoderma* sp. Q98 菌株有 4 个新颖特征: 菌丝产生天然红色素; 菌丝产生饱和脂肪酸 (1.44% 14: 0; 17.52% 16: 0) 及不饱和脂肪酸 (2.9% 16: 1^{△9}, 39.16% 18: 2^{△8,11}, 37.12% 18: 3^{△9,12,15}); 培养液含有 2 组多肽类物质 (毛细管电泳迁移时间分别为 5.2 min 和 10.6 min); 培养液原液对多重耐药性菌株 EN (3) 23 (Ap^r, Cm^r, Sm^r, Tet^r, Ery^r) 具有强烈抑制作用。

关键词: 海洋真菌; 天然色素; 脂肪酸; 多肽; 抗菌作用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 03-0124-02

近年来“苏丹红”有毒色素作为食品添加剂致癌问题已引起国际社会广泛关注。使用天然色素和天然抗氧化剂及新型抗菌活性物质, 成为近年来食品保健工业的发展方向, 海洋微生物资源被认为有独到优势^[1]。本文报道一株海洋真菌 *Trichoderma* sp. Q98 菌株的新颖产物特征: 菌丝产生天然红色素, 菌丝产生饱和脂肪酸, 培养液含有 2 种多肽类物质, 培养液原液对多重耐药性菌株有强烈抑制作用, 在食品和医药领域具有重要研究开发价值。

1 菌种和培养基

供试菌株 *Trichoderma* sp. Q98, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. EN (3) 23 (Ap^r, Cm^r, Sm^r, Tet^r, Ery^r) 均为本实验室保藏。肉汤培养基 (LB) 和马铃薯固体培养基 (PDA) 配方见文献 [2], PDA 用做摇瓶液体培养基时不加琼脂。

2 方法与结果

2.1 *Trichoderma* sp. Q98 菌株的固体和液体培养特征 *Trichoderma* sp. Q98 菌株在马铃薯固体培养基 (PDA)^[2] 平板培养 4 d 观察菌落, 可见菌丝产生红色素, 不能扩散到培养基中, 是水不溶性的。在 250 mL 三角瓶中加入 100 mL 液体 PDA 培养基, 接种 Q98 斜面保藏菌种 100 r/min, 22 °C 培养 4~5 d, 每隔 24 h 显微镜观察, 培养 4 d 后可产生棒状分生孢子。

2.2 *Trichoderma* sp. Q98 菌丝脂肪酸 GC-MS 分析 液体培养 4 d 后培养物经过 4 000 r/min, 离心 20 min, 收取菌丝, 加入 10 mL 带塞玻璃管中, 再加入 6 mL 甲醇浓硫酸混合液 (10: 1) 55 °C 水浴 4 h, 冷却后加入 6 mL 正己烷充分振荡静置分层, 吸取上层己烷层, 加入无水硫酸钠过滤。滤液经过 15 000 r/min, 离心 20 min, 做 GC-MS 分析。美国 Finnigan Voyager GC 条件为分流比 50: 1, 流速 1 mL/min, 起始温度为 100 °C 保持 2 min, 保持 20 min 后以每分钟 10 °C 逐渐升到 240 °C。MS 条件为离子源 EI 温度 230 °C, 极杆 150 °C, 质谱接口温度 280 °C。结果显示菌株 Q98 菌丝中含有饱和 (1.44% 14: 0; 17.52% 16: 0) 和不饱和脂肪酸 (2.90% 16: 1^{△9}; 39.16% 18: 2^{△8,11}; 37.12% 18: 3^{△9,12,15}), 其中亚油酸, 亚麻酸及三烯酸含量较高, 属于营养价值高的优质不饱和脂肪酸。

2.3 培养液 UV-VIS 全波长扫描光谱分析 液体培养 4 d 后取培养液少许经过 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液置于比色皿中, 在日本岛津 UV-2501 进行全波长 (200~800 nm) 扫描, 显示培养液中含有典型的多肽类物质吸收峰 (280 nm 和 320 nm 处强吸收)。

2.4 培养液毛细管电泳分析 液体培养 4 d 后取培养液 2 mL 经过 15 000 r/min 离心 20 min, 吸取少量上清液, 置于毛细管电泳仪特定测量瓶中。美国 BECKMAN PACE TM MDQ 毛细管电泳图谱分析条件为 50 cm 熔融石英毛细管, OD375 μm, ID75 μm,

* 收稿日期: 2005-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40376046); 广东省自然科学基金资助项目 (031624)

作者简介: 孟繁梅 (1965 年生), 女, 讲师, 通讯联系人, 艾云灿; E-mail: ls08@zsu.edu.cn

0.5 psi 压力进样，分离电压 20000 V，缓冲液为 TAE。结果确证含有 2 组多肽（迁移时间分别为 5.2 min 和 10.6 min）。

2.5 培养液抑菌作用试验 将指示菌株接种到 LB 培养基^[2]中培养 12 h。取培养液少许经过 15 000 r/min 离心 20 min，吸取 5 μ L 培养液置于菌苔上，再放入 37 $^{\circ}$ C 继续培养过夜，观察抑菌效果。发现培养液原液对常见的革兰氏阳性 *Staphylococcus aureus* 和阴性 *Escherichia coli* 指示菌都有抑菌作用，特别是 *Salmonella* sp. 菌株 EN (3) 23 (Ap^r ， Cm^r ， Sm^r ， Tet^r ， Ery^r) 针对青霉素、氯霉素、链霉素、四环素、红霉素类等抗生素具有多重耐药性，也能够被 Q98 菌株的培养液原液所强烈抑制。

3 结 论

海洋真菌 *Trichoderma* sp. Q98 的菌丝产生天然

红色素，还产生不饱和脂肪酸，培养液含有 2 种多肽类物质，培养液原液对多重耐药性菌株有强烈抑制作用。菌丝及提取物可作为天然色素添加剂、天然抗氧化剂、天然抗菌活性物质源，在食品和医药领域具有重要研究开发价值^[3]。下一步将进行多肽成分及抗菌活性成分的分离鉴定及作用机理研究，为开发应用奠定基础。

参考文献:

[1] 胡萍, 王雪青. 海洋微生物抗菌物质研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 397—402.

[2] 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2000.

[3] 贾素娟, 路福平. 生物抗菌多肽[J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(4): 5—8

Preliminary Studies on Products by a Marine Fungus *Trichoderma* sp. Q98

MENG Fan mei, Ai Yun tan

(State Key Lab for Biocontrol, Key Lab for Genetic Engineering of MOE,
Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A strain of marine fungus *Trichoderma* sp. Q98 shows four interesting characteristics: the mycelium produces natural red pigment; the mycelium produces saturated fat acids (1.44% 14 :0; 17.52% 16 :0) and unsaturated fat acids (2.9% 16 :1 ^{Δ_9} , 39.16% 18 :2 ^{$\Delta_{8,11}$} , 37.12% 18 :3 ^{$\Delta_{9,12,15}$}) detected by GC MS; the culture supernatant contains two types of peptides detected by capillary electrophoresis (the values of immigration time are 5.2 and 10.6 minutes, respectively); the culture supernatant has strong inhibition effects on a strain with multiple antibiotics resistance, EN (3) 23 (Ap^r ， Cm^r ， Sm^r ， Tet^r ， Ery^r).

Key words: marine fungus; natural pigment; fat acids; peptides; antibacterial activity