

液体或固体培养对环链棒束孢 (*Isaria cateinannulata*) 菌丝体中挥发性成分组成的影响

张德龙, 王小董, 陆瑞利, 李康乐, 胡丰林*

安徽省微生物防治省重点实验室, 安徽农业大学, 合肥 230036

摘要: 【目的】测定环链棒束孢 (*Isaria cateinannulata*) 在不同培养方式下, 其菌丝中挥发性代谢物组成, 分析代谢产物差异与培养方式间的相互联系。【方法】分别用 SDAY 培养基固体平板与 SDY 培养基液体摇瓶的培养方式进行培养; 培养温度为 25℃, 培养周期为 8 天; 用同时蒸馏萃取装置提取菌丝的挥发性成分; 用气质联用仪进行数据采集及分析。【结果】固体培养菌丝体含有较多种类的挥发性成分, 共鉴定 41 种化合物, 其中酯类、醌类和脲类化合物为其特有。液体培养菌丝体含有的挥发性成分相对较少, 共鉴定 32 种化合物, 其中羧酸类化合物为其特有, 同时酚类含量远高于固体菌丝。固体和液体培养菌丝体的主要挥发性成分都是烃类物质, 其中烯烃类物质分别占固体培养菌丝和液体培养菌丝总挥发物的 57.6% 和 7.85%, 烷烃类物质分别占固体培养菌丝和液体培养菌丝总挥发物的 9.19% 和 22.4%。【结论】固体或液体培养条件对环链棒束孢菌丝体中挥发性成分的组成有影响。

关键词: 环链棒束孢, 液体培养, 固体培养, 菌丝体, 气质联用

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 12-1616-09

环链棒束孢 (*Isaria cateinannulata*) 是棒束孢属中重要的虫生病原真菌, 不仅在自然界中分布广泛, 而且具有易于人工培养, 培养周期短等优点。目前对于该属真菌的研究主要以玫瑰色棒束孢 (*Isaria fumosorosea*)、粉棒束孢 (*Isaria farinose*) 等研究报道较多^[1-2]。对于环链棒束孢主要集中在生物防治领域, 特别是在植物病虫害防治方面已经有许多报道^[3]。刘爱英^[4]等发现环链棒束孢对稻飞虱和菜青虫的室内致病效果较好, 姚丽娟^[5]研究表明, 环链棒束孢的代谢产物对小菜蛾和菜青虫都具有一定作用。朱新燕等^[6]还分别对环链棒束孢的不同菌株的培养条件进行过研究。但对于环链棒束孢的代谢

物质, 特别是挥发性物质的研究报道较少。现代代谢组学研究表明代谢物是形成生物表型和生物学功能的直接因素, 基因表达的微小变化会在代谢物上得到放大^[7-10], 因此通过研究不同培养方式下真菌代谢物的变化可望为进一步深入揭示真菌基因表达与培养方式间的关系提供理论依据, 同时, 有关研究还将为虫生真菌代谢物的开发利用积累科学素材。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 供试菌种为一株环链棒束孢 (编号为

基金项目: 国家自然科学基金 (30871676); 安徽自然科学基金 (11040606M69)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-551-5786887; E-mail: hufenglin@hotmail.com

作者简介: 张德龙 (1985-), 男, 山东临沂人, 硕士, 研究方向为微生物与生物制药。

收稿日期: 2011-08-03; 修回日期: 2011-10-11

RCEF2763) ,采自安徽宣城 ,分离于卷叶蛾幼虫 ,由安徽农业大学微生物防治省重点实验室提供。

1.1.2 培养基:固体平板培养基(g/L):蛋白胨 10、酵母浸出粉 10、葡萄糖 40、琼脂 20 ,蒸馏水定容。液体摇瓶培养基(g/L):蛋白胨 10、酵母浸出粉 10、葡萄糖 40 ,蒸馏水定容。

1.1.3 仪器及试剂:YXQ-LS-30 立式压力蒸汽灭菌锅 ,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;AIR TECH 超净工作台 ,购自苏净集团安泰公司;HZQ-F160 全温震荡培养箱 ,哈尔滨东联电子公司;LRH-250G 光照培养箱 ,广东省医疗器械厂;SHZ-D 循环水式真空泵 ,河南巩义予华仪器有限责任公司;FreeZone12 ,购自美国 LABCONCO 公司;AE200 型梅特勒电子天平 ,上海分析仪器厂;采用美国 Agilent 公司气相色谱与质谱联用仪 (Hewlett Packard 6890GC · 5973MSD) 色谱柱为 BP-20 毛细柱 (50 m ,0.25 mm × 25 μm);微量进样器 10 μL ,上海兴正医疗仪器有限公司 ,同时蒸馏萃取 (SDE) 装置。分析纯无水乙醚为上海振企化学试剂有限公司产品;高纯氦气 ,纯度 99.999% ,购自合肥众益化工产品有限公司。

1.2 样品制备

1.2.1 按 1.1.1 配制培养基 ,121℃ 高压灭菌 20 min ,固体平板培养基冷却至 50 - 60℃ 后倒平板 ,每皿控制在 20 mL。待凝固后用灭过菌的玻璃纸覆盖在培养基表面 ,用接种针接入斜面种子 ,置于恒温培养箱中培养 ,培养温度为 25℃ ,周期为 8 d。液体摇瓶培养基接种量为 5% ,置于全温震荡培养箱中 25℃ 培养 ,周期为 8 d ,取培养物真空抽滤 ,用纯净水洗涤 3 遍 ,得液体培养菌丝体。将菌丝体分别冻干、粉碎 ,置于 -70℃ 冰箱中 ,备用。

1.2.2 气质样品准备:分别取固体培养菌丝粉与液体培养菌丝粉各 15 g ,加 250 mL 水 ,于 SDE 装置中 ,用无水乙醚萃取蒸出液 3 小时 ,取无水乙醚层旋转蒸发至 1 mL 左右 ,放于样品瓶中 ,4℃ 保存 ,备用。

1.3 GC/MS 分析

仪器采用美国 Agilent 公司气相色谱与质谱联用仪 (Hewlett Packard 6890GC · 5973MSD);气相色谱部分:采用 BP-20 毛细柱 (50 m ,0.25 mm × 25 μm);载气为高纯氦气 (99.999%) ,流量为 1 mL/min;手动进样 1 μL ,升温程序:起始温度 60℃ ,保持 1 min ,以 5℃ /min 上升到 200℃ ,保持 5 min ,然后以 20℃ /min 上升到 250℃ ,程序结束。

质谱部分:离子源温度为 230℃ ,进样口温度为 250℃ ,质谱轰击电压 70 eV ,扫描的质量范围为 50 - 550 amu。

1.4 代谢物鉴定

采用 NIST08 数据库检索 ,采用峰匹配系数大于等于 95 的最大匹配度化合物数据。

2 结果和分析

2.1 RCEF2763 液体培养菌丝体挥发性成分分析

液体培养菌丝挥发性成分的 GC/MS 分析结果见图 1-A (总离子流图)。

经 Nist08 标准谱图库检索分析 ,共鉴定出 34 种化合物 (见表 1)。从表 1 可看到:液体培养菌丝体的挥发性提取物中主要含有 32 种化合物。另外两种化合物:十甲基环五硅氧烷和十二甲基环六硅氧烷可能为色谱柱固定相的流失物。在 32 种化合物中 ,烷类有 6 种 ,占挥发物总峰面积的 22.372% ,占鉴定的菌丝挥发物总量的 23.116%;酚类化合物有 2 种 ,占挥发物总峰面积的 17.894%;杂环类化合物有 4 种 ,占挥发物总峰面积的 12.569%;稠环芳香烃类有 7 种 ,占挥发物总峰面积的 10.553%。醇类、烯类、胺类和酸类化合物分别占挥发物总峰面积的 9.421%、7.854%、6.039% 和 4.588%。

在上述 32 种天然化合物中含量较高的几种物质 (以占挥发物总峰面积计) 分别是 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (12.938%)、十六烷 (11.533%)、7-甲基-7 [H]-二苯并 [b,g] 呋唑 (9.331%)、N-甲酰苯胺 (6.039%)、反式-2-辛烯-1-醇 (5.089%)、2,5-二叔丁基酚 (4.956%)、蘑菇醇 (4.336%)、十三烷 (4.225%) 和 1-二十烯 (3.978%)。

2.2 RCEF2763 固体培养菌丝体挥发性成分分析

固体培养菌丝挥发性成分的 GC/MS 分析结果见图 1-B (总离子流图)。

经 Nist08 标准谱图库检索分析 ,共鉴定出 42 种化合物 (见表 1)。从表 1 可看到:固体培养菌丝体的挥发性提取物中主要含有 41 种化合物。另外一种化合物:八甲基环四硅氧烷可能为色谱柱固定相的流失物。

该 41 种化合物中 ,烯类占 8 种 ,占挥发物总峰面积的 57.653% ,占鉴定的菌丝挥发物总量的 65.507%;烷类化合物 4 种 ;占挥发物总峰面积的

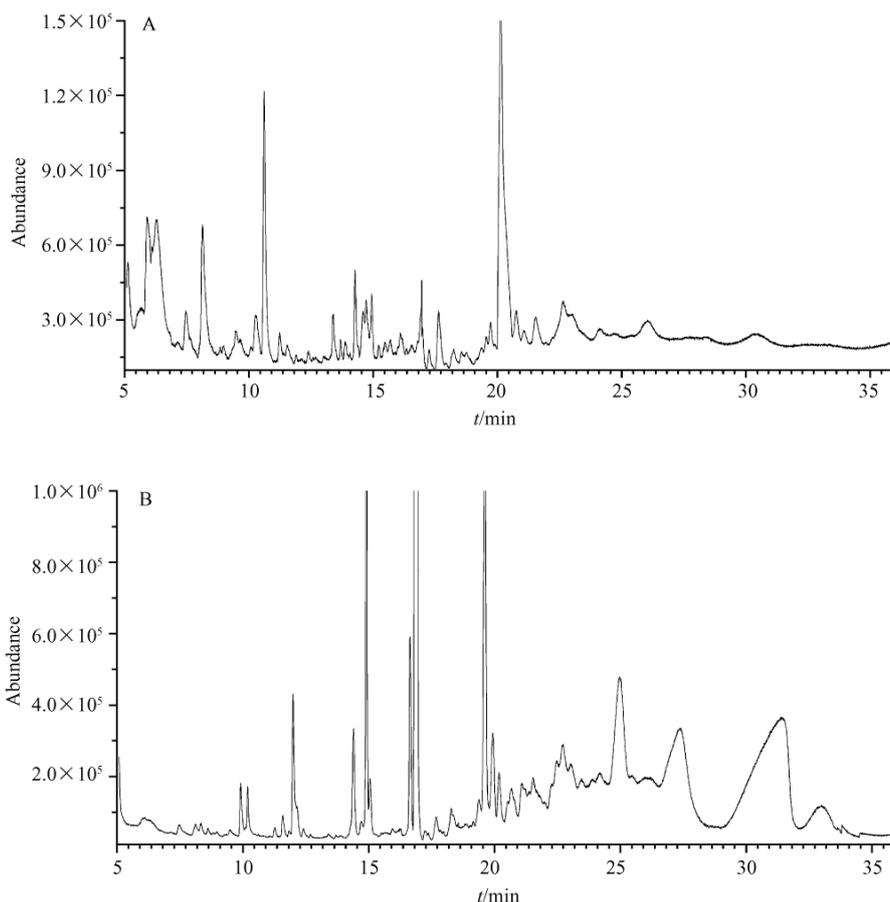


图1 液体培养(A)和固体培养(B)菌丝中挥发物的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of volatile extract from Liquid cultured (A) and solid cultured mycelia (B).

9.193%,占鉴定的菌丝挥发物总量的13.31%;苯类化合物占4种,占挥发性物质总峰面积的5.232%;杂环类、酯类和稠环类化合物分别占鉴定的挥发性物质总峰面积的4.174%、3.447%和3.249%。在上述41种天然化合物中,相对含量较高的几种物质分别是(以占挥发物总峰面积计): β -榄香烯(20.621%)、2,4-二甲基-5-(2,2-二甲基环丙基)-1,3-戊二烯(15.568%)、2-异丙烯基-5-甲基己基-3,5-二烯(13.727%)、十三烷(7.45%)、7-环外(1-环己稀-1-基)-二环辛烯(4.565%)、[(2,2,3,3-四甲基环丙基)甲基](4.402%)、2,5-二甲基-3-乙炔-4-己烯酸甲酯(2.901%)和2-甲基-3-乙基-1,3-己二烯(2.554%)。

2.3 固体培养与液体摇瓶培养菌丝体共同含有物质比较

通过表1的物质成分分析比较发现:固体培养基与液体摇瓶培养基都含有苯乙醛、2,6-二叔丁基

萘、2,7-二甲基萘、2,6-二甲基萘、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚、十三烷等六种物质,但它们的相对含量有较大差别(见图2)。

在共同含有的物质中,2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚在液体摇瓶培养菌丝体中相对含量占挥发物总峰面积的12.938%,是固体培养菌丝中相对含量的8.813倍,说明液体培养有利于酚类物质的产生。目前对少数微生物的研究结果表明酚类化合物的合成主要以醋酸-丙二酸途径为主,在丙二酸单酰辅酶A的催化作用下生成间苯三酚,再与莽草酸途径生成的肉桂酸结合而生成一系列的酚类及其衍生物^[11-14],然而,有关真菌中的酚类合成尚没有系统的研究报道。对微生物酚氧化酶的研究表明,较高的含氧量和适当的含水率能提高酚氧化酶的活性^[15-16],显然,固体培养时氧气供应较充足,而且水分含量和水活度较适中,因此其酚氧化酶活性较强,从而使酚类物质氧化分解而含量降低。固体菌丝体

表 1 固体培养和液体培养菌丝中挥发性化学成分及相对含量

Table 1 The compounds and relative concentrations of volatile extract from solid and liquid cultured mycelia

No.	Liquid cultured mycelia			Solid cultured mycelia				
	RT	Compound name	Formula	Relative content / %	RT	Compound name	Formula	Relative content / %
1	5.693	2-Pentanone, 4-cyclohexylidene-3, 3-diethyl-	C ₁₅ H ₂₆ O	1.137	6.106	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄	0.336
2	5.916	1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	4.332	7.473	Benzeneacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	0.159
3	6.288	7H-Dibenzo [b g] carbazole, 7-methyl-	C ₂₁ H ₁₅ N	9.331	8.12	Benzaldehyde, 4-methyl-	C ₈ H ₈ O	0.149
4	7.473	Benzeneacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	1.653	8.337	Procainamide-n-propionyl	C ₁₆ H ₂₅ N ₃ O ₂	0.141
5	8.137	2-Octen-1-ol, (E)-	C ₈ H ₁₆ O	5.089	8.623	1-β-Dimethylcyclopentanol	C ₇ H ₁₄ O	0.076
6	9.481	Benzene, 1, 2, 4, 5-tetramethyl-	C ₁₀ H ₁₄	1.91	9.502	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-	C ₁₀ H ₁₄	0.155
7	10.288	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	C ₁₀ H ₃₀ O ₅ Si ₅	2.045	9.926	2-Cyclopentene-1-carboxylic acid, 1, 2, 3-trimethyl-, ethyl ester, (+, -)-	C ₁₁ H ₂₁ O ₂	0.444
8	10.620	Formamide, N-phenyl-	C ₈ H ₉ NO	6.039	10.120	2-Cyclohexen-1-one, 3, 5-dimethyl-, O-methyloxime	C ₃ H ₄ N ₄ O ₂	0.194
9	11.249	Naphthalene	C ₁₀ H ₈	0.587	11.284	2(3H)-Furanone, 5-hexyldihydro-	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.102
10	13.401	Naphthalene 2, 6-bis (1, 1-dimethylethyl)-	C ₁₈ H ₂₄	1.247	11.604	8-Pentadecanol	C ₁₅ H ₃₂ O	0.204
11	13.698	Hexadecane, 7-methyl-	C ₁₇ H ₃₆	0.313	11.862	Cyclooctane, (1-methylpropyl)-	C ₁₁ H ₂₂	0.053
12	13.887	Benzene, pentamethyl-	C ₁₁ H ₁₆	0.517	12.022	1H-Imidazole-4-methanol	C ₄ H ₆ N ₂ O	1.332
13	14.276	Naphthalene, 1-methyl-	C ₁₁ H ₁₀	1.696	12.428	Benzothiazole	C ₇ H ₅ NS	0.097
14	14.597	5H-1-Pyridine	C ₈ H ₉ N	1.124	12.714	Cyclohexane, 1-(cyclohexylmethyl)-4-ethyl-, cis-	C ₁₅ H ₂₈	0.024
15	14.728	Naphthalene, 2-methyl-	C ₁₁ H ₁₀	1.472	13.443	Naphthalene, 2, 6-bis (1, 1-dimethylethyl)-	C ₁₈ H ₂₄	0.072
16	14.946	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	1.174	14.432	3-Buten-2-one, 4-(2-furanyl)-	C ₈ H ₈ O ₂	0.979
17	16.102	9-Eicosene, (E)-	C ₂₀ H ₄₀	0.635	14.738	Benzocycloheptatriene	C ₁₀ H ₁₀	0.161
18	16.988	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	2.255	14.894	2, 4-Decadienal, (E, E)-	C ₁₀ H ₁₆ O	0.127
19	17.257	Naphthalene, 1, 6-dimethyl-	C ₁₂ H ₁₂	1.121	15.089	2, 5-Cyclohexadiene-1, 4-dione, 2, 5-dimethyl-	C ₈ H ₈ O ₂	0.61
20	17.641	Naphthalene, 2, 7-dimethyl-	C ₁₂ H ₁₂	3.561	15.687	1, 2, 3, 5-Tetramethylbenzene, 2-oxime-	C ₁₀ H ₁₃ NO	0.091
21	18.247	Cyclotetradecane	C ₁₄ H ₂₈	1.331	15.988	Naphthalene, 6-ethyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-	C ₁₂ H ₁₆	0.11
22	18.562	Naphthalene, 2, 6-dimethyl-	C ₁₂ H ₁₂	0.869	16.32	3-Eicosene, (E)-	C ₁₀ H ₁₅ O ₄	0.096
23	18.762	Nonahexacontanoic acid	C ₆₉ H ₁₃₈ O ₂	0.892	16.695	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2, 4-bis (1-methylethenyl)-, [1S-(1. alpha. 2. beta. 4. beta.)]-	C ₁₅ H ₂₄	20.621
24	19.375	Benzenethiol, 4-(1, 1-dimethylethyl)-2-methyl-	C ₁₁ H ₁₆ S	1.106	17.313	Naphthalene, 2, 7-dimethyl-	C ₁₂ H ₁₂	1.127
25	19.558	Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-	C ₂₆ H ₅₄	1.338	18.388	Naphthalene, 1, 2, 3, 4-tetrahydro-2, 5, 8-trimethyl-	C ₁₃ H ₁₈	0.831
26	19.729	Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	2.688	18.627	Naphthalene, 2, 6-dimethyl	C ₁₂ H ₁₂	0.33
27	20.141	Butylated Hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	12.938	18.891	Benzene, octyl-	C ₁₄ H ₂₂	0.416
28	20.765	Phenol, 5-bis (1, 1-dimethylethyl)-	C ₁₄ H ₂₂ O	4.956	19.104	Naphthalene, 1, 2, 3, 4-tetrahydro-1, 6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	C ₁₅ H ₂₂	0.361
29	21.074	3-(2-Methyl-propenyl)-1H-indene	C ₁₃ H ₁₄	2.183	19.223	Benzene, 1, 2, 3, 4-tetramethyl-4-(1-methylethenyl)-	C ₁₂ H ₁₈	0.259
30	21.543	Benzoic acid, 4-ethoxy-	C ₉ H ₁₀ O ₃	3.696	19.452	Ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.865
31	22.653	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	11.553	19.686	Naphthalene, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8a-octahydro-4a, 8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R-(2. alpha. 4. alpha. 8a. beta.)]-	C ₁₅ H ₂₄	0.51

续表 1

Liquid cultured mycelia					Solid cultured mycelia			
No.	RT	Compound name	Formula	Relative content / %	RT	Compound name	Formula	Relative content / %
32	24.152	1,2-Benzisothiazole,3-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-,1,1-dioxide	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	1.008	20.072	1,3-Hexadiene,3-ethyl-2-methyl-,(Z)-	C ₉ H ₁₆	2.554
33	26.035	Dodecane	C ₁₃ H ₂₈	4.225	20.295	Butylated Hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	1.468
34	30.487	1-Eicosene	C ₂₀ H ₄₀	3.978	20.761	Bicyclo[4.2.0]oct-1-ene,exo-7-(1-cyclohexen-1-yl)-	C ₁₄ H ₂₀	4.565
35					21.616	2,5-Dimethyl-3-phenylfuran	C ₁₂ H ₁₂ O	1.914
36					22.354	Naphthalene,1-(2-propenyl)-	C ₁₃ H ₁₂	1.1
37					23.1	Tridecane	C ₁₃ H ₂₈	7.45
38					24.049	Methyl santoninate	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	2.901
39					24.874	Benzene,[(tetramethylcyclopropylidene)methyl]-	C ₁₄ H ₁₈	4.402
40					25.167	Cyclopropane,1-ethoxy-2-dimethyl-3-(2-phenylethynyl)-	C ₁₅ H ₁₈ O	1.666
41					28.203	2-Isopropylidene-3-methylhexa-3,5-dienal	C ₁₀ H ₁₄ O	13.727
42					32.796	1,3-Pentadiene,5-(2,2-dimethylcyclopropyl)-2,4-dimethyl-,(Z or E)-	C ₁₂ H ₂₀	15.568

中发现有酚类物质的氧化产物——醌类物质,初步证实了前面的推断,然而即使将醌类物质含量加到固体培养物的酚类含量中,其含量仍远小于液体培养中的酚类含量,可见上述差异产生原因并不完全是由分解差异造成的,酚类合成的差异可能才是主要因素,表明液体环境可能有利于有关2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚合成的相关酶的表达或作用效率的提高。当然,由于液体培养基中的养分进入菌体的传质阻力较固体培养基小^[17],因此在液体培养前期(对数生长期),一些可作为2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚合成底物的成分能快速被菌体利用也是造成差异的原因之一,但随着培养时间的延长,液体培养基中有关成分会被快速消耗,2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚合成速度会快速下降,而固体培养基中养分的传质阻力虽然较大,但随着培养时间的延长,其养分也被逐渐消耗,最终养分对固体和液体培养影响趋于一致。本研究的培养时间较长,养分都基本消耗殆尽,因此养分传质速度的影响可能不是主要因素,而养分的利用效率和相关合成和分解酶的活性可能才是最终的决定因素。

烷类物质十三烷在两种菌丝体中都有较高的相对含量。虽然十三烷在固体菌丝体中含量更高,占鉴定的菌丝挥发物的8.464%,但液体菌丝中各类饱和烷烃的总量高于固体培养菌丝(图3)。

液体摇瓶培养菌丝体中的苯乙醛的相对含量大于固体培养菌丝体中苯乙醛的相对含量。在微生物

体内苯乙醛的合成一般是以L-苯丙氨酸为起始物质,在脱羧酶作用下形成苯乙胺,苯乙胺在单胺氧化酶作用下形成苯乙醛^[18]。液体培养菌丝中苯乙醛含量较高,表明在液体培养时,供试菌的苯丙氨酸脱羧酶和单胺氧化酶等相关酶类的表达量较大,或较高的含水率或水活度有利于提高这些酶的作用效率。另外,在培养前期培养基中的养分传质阻力不同可能也是造成差异的原因之一,但随着培养时间的延长和养分的消耗,菌体中的苯乙醛最终含量是其相关合成和分解酶的活性及底物利用效率决定的。

萘类物质可能来源于培养基,由生产蛋白胨等物质的原料受到污染所致,具体来源还有待于进一步证实。

2.4 固体培养与液体培养菌丝体成分种类和相对含量比较

由表1的物质成分分析比较发现:固体平板培养菌丝体与液体摇瓶培养菌丝体物质成分含量有很大差别。固体平板培养与液体摇瓶培养成分含量见图3。由图3可以看出,在固体菌丝体中含量最多的物质种类为烯类物质,烯类物质占鉴定的菌丝挥发物总量的65.507%,含量最少的为胺类物质,其相对含量仅占总挥发性物质的0.16%。液体摇瓶培养菌丝体含量最多的物质为烷类物质,其相对含量占鉴定的菌丝挥发物总量的23.116%,含量最少的为酮类物质,其相对含量仅占总挥发物的1.175%。

2 种菌丝体中含量差异最大的物质是烃类物质,其中固体培养菌丝的烯烃相对含量是液体培养菌丝的 7.3 倍;固体培养菌丝中烃类总量是液体发酵菌丝的 2.2 倍。烃类挥发物被认为是脂肪的分解产物^[19-22],而脂肪的代谢与虫生真菌穿透昆虫体壁时密切相关,其中脂肪的分解产物甘油的渗透压是菌丝穿透直接动力^[23],因此固体菌丝中较高的烃类物质含量具有重要的生物学意义,值得深入研究。

从图 3 还可以看出,液体摇瓶培养菌丝体各类挥发性物质之间的相对含量差别较小,而固体平板培养菌丝体中各类挥发性物质之间的相对含量差别大,其中烯烃类物质含量占有绝对优势。液体培养菌丝中各成分含量相对差异较小的原因可能是因为液体培养过程中,菌丝始终处于摇动状态,所有菌丝细胞具有同等的机会得到氧气和养分,同时菌丝的

含水率和水的活度都很高,有利于酶类与底物的结合。而固体培养条件较接近虫生真菌寄生虫体表面时的天然生长条件,较充分的氧气、较低的含水率和水活度,可能激发了虫生真菌有关脂肪代谢的酶类(用于分解虫体的脂质成分^[24])的超表达,从而使与脂肪代谢有关的烃类物质含量明显升高。

在液体摇瓶培养菌丝体中醇类、酚类、醛类、酮类物质相对含量均高于固体培养菌丝体中上述各类物质的相对含量。通常情况下上述物质均可以被进一步氧化分解,但在液体培养后期,由于菌丝浓度大大增加,而摇瓶的转速没变,导致菌丝供氧不足,使上述物质不能进一步被氧化而积累;固体培养时上述四类物质可以进一步被氧化,同时固体培养时由于体系更加开放,挥发性物质还可能会更多地挥发到外部环境,所以相对含量偏低。

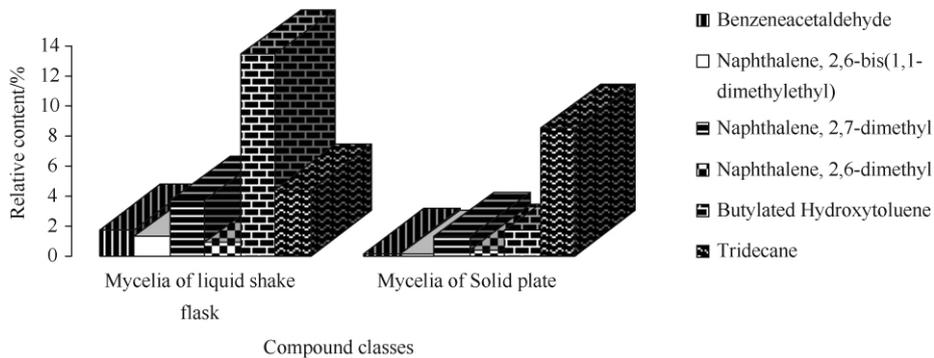


图 2 固体培养与液体培养菌丝体共同含挥发物的相对含量

Fig. 2 Relative concentration of the common volatile compounds of the solid and liquid cultured mycelia.

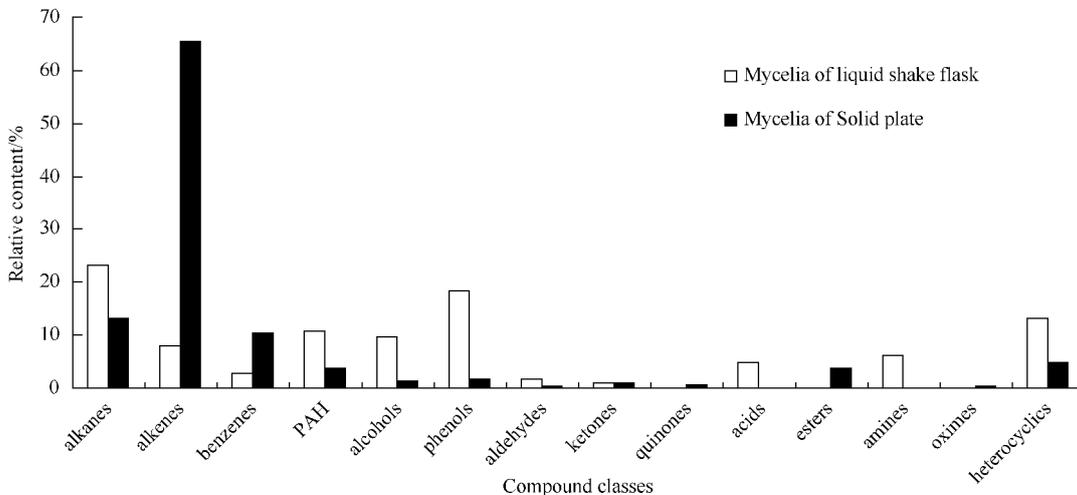


图 3 固体培养与液体培养菌丝挥发成分种类和相对含量

Fig. 3 Type and relative concentration of the volatile compounds from solid and liquid cultured mycelia.

在物质种类差异方面(图 4),固体平板培养菌

丝体一共产生 13 类 41 种挥发性物质,而液体摇瓶

培养产生 11 类 32 种挥发性物质,固体培养产生物质种类的多样性高于液体摇瓶培养,表明固体培养更有利于低沸点的挥发性物质的产生。

由图 3 和 4 可知,在固体菌丝体中不含有羧酸类物质而含有酯类物质,而液体菌丝体中含有两种羧酸类物质却没有酯类物质。显然,固体培养有利于羧酸与醇反应生成酯类物质,从而没有羧酸积累。液体培养条件下并不缺乏合成酯类的原料(羧酸和醇),但却没有酯类物质生成,表明液体培养条件使得有关合成酶的表达或催化效率受到抑制。

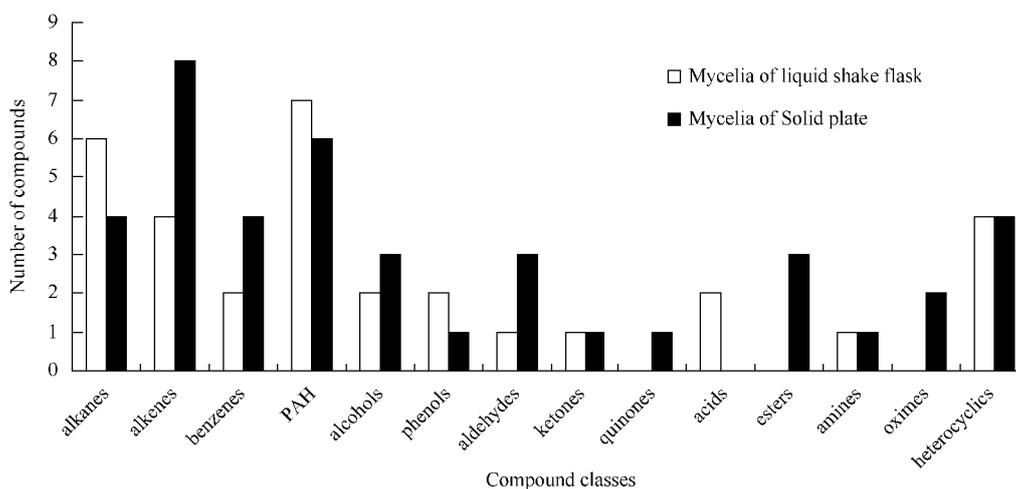


图 4 固体培养与液体培养菌丝中各类挥发性化合物的数目

Fig. 4 The numbers of different type volatile compounds of the solid and liquid cultured mycelia.

3 结论和讨论

从上面的分析可得到以下结论:培养条件对菌株 RCEF2763 挥发性代谢产物的种类、数目及含量有很大影响。固体培养产生代谢产物种类要多于液体培养。固体平板培养菌丝与液体摇瓶培养菌丝仅有 6 种相同的挥发性物质。液体培养有利于酚类物质的产生与积累,固体培养有利于酯类物质的产生与积累。酯类、醌类和脲类为固体菌体所特有,同时其烃类物质的总含量也高于液体菌丝,而醇类、酚类、醛类、酮类物质相对含量则低于液体菌体。这些差异的产生可能与固体培养及液体培养过程中的氧气供给、含水率(或水活度)及传质阻力差异有关,其中氧气及含水率或水活度差异可能直接影响到供试菌株中有些酶类基因表达或酶促反应的效率,从而使相关成分的含量及种类产生较大的差异,但这

些差异现象产生的具体机理有待进一步深入研究,其研究结果将一方面有利于揭示虫生真菌代谢规律,同时有利于一些具有经济价值代谢物的生物合成和调控。

另外,从本研究的分析结果来看,环链棒束孢的挥发性代谢物中大部分可以用作化工、医药的中间体,如蘑菇醇,目前已用于日化和食用香精^[26-27],该成分在虫生真菌中尚属首次发现;烯炔类物质如 β -榄香烯被用于治疗癌症^[28-29],环十四烯用于麝香酮中间体仿生合成^[30],可以用于治疗冠心病、心绞痛、血管性头痛、坐骨神经痛和白癜风等;醛类物质如苯乙醛是具有甜清香气味的无色液体,类似风信子,应用于香精中^[31],为天然香味物质资源的开发利用开辟了新途径;酚类物质如 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚具有很强的抗氧化活性,不仅可以应用于食品工业,在医药领域也具有广泛的应用前景^[32];杂环类物质如 2,3-环戊烯并吡啶具有抗溃疡、抗癌等重要生理

活性,是合成抗炎、抗菌活性强的头孢匹罗等药物的重要中间体,主要用于药物、杀菌剂和抗菌剂的合成^[33]。这对于充分开发微生物资源在医药领域的应用具有重要意义。

参考文献

- [1] 胡丰林,李增智. 虫草及相关真菌的次生代谢产物及其活性. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2007, 26 (4): 607-632.
- [2] 陆瑞利,胡丰林,黄勃,李春如,李增智. 一株蛹拟青霉 (*Paecilomyces militaris*) 发酵液中抗肿瘤活性物质分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49 (10): 1132-1340.
- [3] Shimazu M. *Paecilomyces cateniannulatus* Liang, a commonly found, but an unrecorded entomogenous fungus in Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 2001, 36 (3): 283-288.
- [4] 刘爱英,陈月碧,梁宗琦,胡文俊,唐安辉. 环链拟青霉和玫烟色拟青霉对菜青虫致病条件的研. 贵州农业科学 (*Guizhou Agricultural Sciences*), 1982, 1: 59-61.
- [5] 姚丽娟. 几株真菌代谢产物的杀虫效果试验简报. 昆虫天敌 (*Natural Enemies of Insects*), 1996, 18 (1): 42-43.
- [6] 朱新燕,李增智,樊美珍,鲍素敏,杨震元. 3株环链拟青霉固体培养条件的研究. 安徽农业大学学报 (*Journal of Anhui Agricultural University*), 2008, 35 (1): 38-41.
- [7] Schauer N, Fernie AR. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends in plant science*, 2006, 11 (10): 508-516.
- [8] Wetmore DR, Joseloff E, Pilewski J, Lee DP, Lawton KA, Mitchell MW, Milburn MV, Ryals JA, Lining Guo. Metabolomic profiling reveals biochemical pathways and biomarkers associated with pathogenesis in cystic fibrosis cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (40): 30516-30522.
- [9] Zhang JJ, Wang X, Yu O, Tang JJ, Gu XG, Wan XC, Fang CB. Metabolic profiling of strawberry during fruit development and maturation. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 11: 1-16.
- [10] Ricroch AE, Bergé JB, Kuntz M. Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling techniques. *Plant Physiology*, 2011 Feb 24. [Epub ahead of print]
- [11] 赵权,王军,段长青. 山葡萄发育过程中花色苷和非花色苷酚成分及其含量的变化. 植物生理学通讯 (*Plant Physiology Communications*), 2010, 46 (1): 80-86.
- [12] Herrmann KM, Weaver LM. The shikima pathway. *Annual Review of Plant Physiology*, 1999, 50 (1): 473-503.
- [13] Herrmann KM. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology*, 1995, 107 (1): 7-12.
- [14] 胡燕梅,韩晓红,周全. 银杏液体悬浮细胞培养产生黄酮的研究. 江西农业大学学报 (*Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*), 2011, 33 (2): 360-363.
- [15] Shibata T, Kawaguchi S, Hama Y. Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 2004, 16 (4): 291-296.
- [16] 赵淑娟,王坤波,傅冬和,李园莉,雷玉国,李勤. 微生物多酚氧化酶研究进展. 中国茶叶 (*China Tea*), 2008, 3: 18-20.
- [17] 李增胜,张庆,徐世艾. 搅拌和溶氧对黄原胶发酵的影响. 食品科学 (*Food Science*), 2009, 30 (17): 253-257.
- [18] Etschmann M, Schrader J. An aqueous-organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71 (4): 440-443.
- [19] 徐永霞,陈清婵,缪文华,李里,王可兴,潘思轶. 不同来源猪脂挥发性成分比较研究. 食品科学 (*Food Science*), 2010, 31 (8): 177-180.
- [20] 张爱文,邓春生,农向群,任淑仙,徐崇仁. 亚洲玉米螟感染白僵菌后组织病理学研究. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 1994, 10 (4): 151-156.
- [21] 梁华正,张燮,饶军,陈焕文. 微生物挥发性代谢产物的产生途径及其质谱检测技术. 中国生物工程杂志 (*Journal of Chinese Biotechnology*), 2008, 28 (1): 124-133.
- [22] 安建梅. 粉质拟青霉侵染菜青虫致病过程的研究. 植物保护 (*Plant Protection*), 2002, 28 (4): 14-16.
- [23] Wang C, St Leger RJ. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure and virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (29): 21110-21115.
- [24] 吕丁丁,李增智,王成树. 虫生真菌分子致病机理及基因工程改造研究进展. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 2008, 35 (3): 43-49.
- [25] 张晓佳,崔建国,李莹,陈思静. 具有生理活性甾体脂类化合物的研究进展. 有机化学 (*Chinese Journal of*

- Organic Chemistry*), 2010, 30 (5): 655-661.
- [26] 杨永利, 郭守军, 郭劲刚. 粤东产重瓣臭茉莉叶挥发油化学成分的 GC-MS 分析. 热带亚热带植物学报 (*Journal of Tropical and Subtropical Botany*), 2009, 17 (4): 409-412.
- [27] 李秦, 海洋, 师会勤, 杜阅光, 席宇, 郭灵燕, 朱大恒. 平菇与香菇挥发性香气成分的 GC-MS 分析比较. 化学与生物工程 (*Chemistry & Bioengineering*), 2010, 27 (2): 87-89.
- [28] 李悦, 杨向红, 刘政操. β -榄香烯对肝癌细胞增殖及细胞周期的影响. 山西医药杂志 (*Shanxi Medical Journal*), 2010, 39 (2): 115-116.
- [29] 陈浩, 师亮, 王素云, 杨敬慈, 潘峻. β -榄香烯抑制人骨髓瘤细胞增殖. 中成药 (*Chinese Traditional Patent Medicine*), 2010, 32 (5): 730-732.
- [30] 史真, 强璐莉, 李铮. 麝香酮中间体的仿生合成. 科学通报 (*Chinese Science Bulletin*), 2000, 45 (18): 1949-1952.
- [31] 郭德建, 仲小青, 汪程远, 陈舜宏, 余海虎. 五种常用香料的抗氧化活性研究. 食品科学 (*Food Science*), 2007, 28 (12): 454-457.
- [32] 徐志斌, 郭宗儒. 二叔丁基取代的苯酚类化合物的生物活性及研究进展 (英文). 药学学报 (*Acta Pharmaceutica Sinica*), 2001, 36 (11): 877-880.
- [33] 李卫锋, 张志德, 刘钦胜. 2,3-环戊烯并吡啶的合成与应用进展. 化工技术与开发 (*Technology & Development of Chemical Industry*), 2008, 37 (9): 28-33.

Influence of liquid or solid culture conditions on the volatile components of mycelia of *Isariacateinannulata*

Delong Zhang, Xiaodong Wang, Ruili Lu, Kangle Li, Fenglin Hu*

Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: [Objective] To determine the volatile components of mycelia of *Isaria cateinannulata* cultured under different culture conditions, and to analyze the relationships between the culture conditions and volatile metabolites. [Methods] Mycelia were cultured in solid plates with SDAY medium and liquid shake flasks with SDY medium. The culture conditions were at 25°C and 8 days. Volatile components in the mycelia of *I. cateinannulata* were extracted with simultaneous distillation extraction and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. [Result] Alkenes, alkanes, heterocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) were existed abundantly both in the mycelia of liquid and solid cultures, but the kinds and relative concentrations of the volatile components in mycelia of liquid and solid cultures were very different. Forty-one compounds were identified from the mycelia of solid culture and 32 compounds were identified from the mycelia of liquid culture. Esters, quinones and oximes were only found in solid cultured mycelia whereas carboxylic acids were only discovered in the mycelia of liquid culture. At the same time, mycelia of liquid culture contained much more phenols. The most abundant compounds in mycelia of liquid and solid cultures were hydrocarbons. The volatile extracts of solid cultured mycelia contained 57.6% alkenes and 9.19% alkanes. The volatile extracts of liquid cultured mycelia contained 7.85% alkenes and 22.4% alkanes. [Conclusion] Liquid or solid culture conditions influenced the volatile components of mycelia of *I. cateinannulata*.

Keywords: *Isaria cateinannulata*, liquid culture, solid culture, mycelia, gas chromatography-mass spectrometry

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871676) and by the National Natural Science Foundation of Anhui (11040606M69)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-551-5786887; E-mail: hufenglin@hotmail.com

Received: 13 August 2011 / Revised: 11 October 2011