

# 黑曲霉超临界萃取物抑制链格孢作用 机制的初步研究

张 素<sup>1</sup>, 袁洪威<sup>2</sup>, 李 祝<sup>1\*</sup>, 肖 洋<sup>3</sup>, 吉玉玉<sup>1</sup>, 唐婧红<sup>1</sup>

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025; 2. 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875;

3. 贵州省产品质量检验检测院, 贵阳 550003)

**摘要** 本试验对黑曲霉菌丝体超临界萃取物(SE)抑制链格孢的机制进行了初步研究。采用超临界萃取从黑曲霉菌丝体中获得样品 SE, 使用气相色谱-质谱(GC-MS)对其萃取物进行分离鉴定, 并通过细胞膜渗透性测定、核酸和总蛋白含量测定、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)荧光染色法、活性氧(ROS)含量测定、呼吸代谢途径等方法对 SE 的抑菌机制进行研究; 电导率及核酸、蛋白结果显示, SE 能影响链格孢细胞膜的完整性, SE 处理菌体 4.5 h, 电导率比阴性对照增加了 37.2%, 胞外核酸蛋白含量显著增加。DAPI 染色结果显示, DAPI 可以和链格孢内的核酸结合, 经 SE 作用 30 min, SE 可引起细胞核染色质异常弥散。ROS 试验结果显示, SE 可以激发菌体产生过多的活性氧, SE 作用链格孢 40 min 时 ROS 含量比阴性对照增加了 79.67%。呼吸代谢试验结果显示, SE 能抑制三羧酸循环(TCA)中的琥珀酸脱氢酶的活性, 其抑制率为 35.4%。SE 具有较强的抑菌活性, 其抑菌机制是通过影响细胞膜的正常功能、损伤细胞结构和抑制真菌的呼吸代谢等方面实现的。

**关键词** 黑曲霉; 超临界萃取; 链格孢; 抑菌机制; 琥珀酸脱氢酶; DAPI

**中图分类号:** S 482.292 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018193

## Preliminary studies on the antifungal mechanism of supercritical extraction from *Aspergillus niger* against *Alternaria alternata*

ZHANG Su<sup>1</sup>, YUAN Hongwei<sup>2</sup>, LI Zhu<sup>1</sup>, XIAO Yang<sup>3</sup>, JI Yuyu<sup>1</sup>, TANG Jinghong<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Life Sciences,

Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. Institute of Products Detection &

Determination of Guizhou Province, Guiyang 550003, China)

**Abstract** To investigate the antifungal mechanism of supercritical extraction (SE) from *Aspergillus niger* against *Alternaria alternata*, the chemical constituents from *A. niger* were extracted by supercritical extraction and analyzed by GC-MS, and the conductivity and content of macromolecules (nucleic acids and total protein), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, active oxygen (ROS) content and respiratory metabolism were studied. The results showed that SE could affect the membrane integrality, increase electrical conductivity by 37.2% with SE treated for 4.5 h, significantly increase the content of extracellular nucleic acids and total protein, respectively, compared with that of the negative control. The fluorescence microscopy and fluorescence spectrophotometer studies manifested that DAPI could integrate with *A. alternata*, and anomalous dispersion occurred in nuclear chromatin treated with SE for 30 min. In addition, SE stimulated the cells to produce excessive reactive oxygen, and the content of ROS increased by 79.67% with SE treated for 40 min compared with that of the negative control. The succinate dehydrogenase (SDH) activity of *A. alternata* was significantly inhibited by SE and the SDH activity of *A. alternata* was reduced by 35.4% compared to the negative control. SE had obvious antifungal activity against *A. alternata*. The mechanism might be that it could affect fungal membrane integrality, damage the cell

收稿日期: 2018-05-05 修订日期: 2018-07-13

基金项目: 国家自然科学基金(31460486; 31660533); 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2017]5613); 贵州省烟草公司毕节市公司项目(201752050024100); 贵州省科技厅农业攻关项目(黔科合 NY[2014]3033 号)

\* 通信作者 E-mail: zhuliluck@163.com

structures and inhibit fungal metabolic pathways to exert its antifungal functions.

**Key words** *Aspergillus niger*; supercritical extraction; *Alternaria alternata*; antifungal mechanism; DH; DAPI

链格孢 *Alternaria alternata* 是分布广泛的一类真菌,大多数兼性寄生于植物上,能引起多种农作物病害,如:烟草赤星病、棉花叶斑病、辣椒腐烂病、马铃薯黑腐病等,给农业生产和贮运中的农产品造成重大损失<sup>[1-2]</sup>。一些链格孢主要的致病机理是产生多种致病毒素,引起被侵染植物组织的病理反应和伤害。目前国内对该病菌的防治以化学防治为主,但随着人类对食品安全、环境保护和克服有害生物抗性问题的日益重视,化学杀菌剂的使用正受到越来越严格的限制<sup>[3-4]</sup>,如欧盟和新加坡于 2003 年 6 月 1 日明文规定,禁止在特定领域使用多菌灵、百菌清、环丙唑和甲霜灵等杀菌剂。因此,研究和开发微生物抗菌活性物质,对于确保食品安全和生态环境安全都具有十分重要的意义。黑曲霉 *Aspergillus niger* 是生物技术应用中一种非常重要的微生物,早在 1919 年就被应用于工业中用来发酵柠檬酸和葡萄糖酸<sup>[5]</sup>,此外黑曲霉还是果胶酶、蛋白酶和淀粉转葡萄糖苷酶丰富的来源<sup>[6]</sup>。尽管黑曲霉是一个安全的优势发酵菌种(GRAS),但运用在抗菌药物研究与开发中的报道甚少<sup>[7]</sup>,并且其抑制真菌病害的能力更是鲜有报道。Kittura 等<sup>[8]</sup>研究发现黑曲霉中的抗菌物质壳聚糖对蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌有抑制作用。李祝等<sup>[9]</sup>从土壤中分离得到一株 *Aspergillus niger* (xj),其对 5 种常见病原真菌腐霉 *Pythium pringsheim*、茄镰刀菌 *Fusarium solani*、绿色木霉 *Trichoderma viride*、西瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare*、橘青霉 *Penicillium citrinum* 等均具有抑制作用。左祥等<sup>[10]</sup>从飞龙掌血 *Toddalia asiatica* 内分离了内生真菌 F-001 并确定为黑曲霉后,发现黑曲霉具有广谱抗菌效果。本文通过超临界萃取,从黑曲霉菌丝体中分离出具有抑制作用的活性化合物 SE,并对 SE 抑制链格孢的机理进行了研究,着重考察了 SE 对菌体细胞膜的通透性、大分子物质核酸和蛋白含量变化、ROS 氧含量变化和呼吸代谢的影响,旨在为开发环境友好型微生物杀菌剂提供一定的理论基础和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

黑曲霉 *Aspergillus niger* 菌株 xj 由贵州大学

真菌资源研究所分离,保藏于中国典型培养物保藏中心,CCTCC 编号: M206021。链格孢 *Alternaria alternata*, 贵州大学微生物实验室分离,筛选、鉴定、保存。PDA、PDB 为试验用普通培养基。DMSO, 生工生物工程(上海)有限公司;糠醛(furfural),Sigma 公司;80%代森锰锌可湿性粉剂,华北制药股份有限公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、二硫苏糖醇(DTT),上海碧云天生物技术研究所;活性氧(ROS)检测试剂盒、琥珀酸脱氢酶(SDH)试剂盒、苹果酸脱氢酶(MDH)试剂盒,南京建成生物工程研究所。

### 1.2 黑曲霉超临界萃取物的制备及分析

#### 1.2.1 黑曲霉菌丝体的制备

将黑曲霉 xj 菌株接种于 PDA 固体斜面培养基上,27℃静置培养 3~5 d,重复 2~3 次,于 4℃保存备用;将活化好的菌株,制成均一孢子悬浮液;将孢子悬浮液以 8%~12%(V/V)接种量接种于装有 PDB 液体培养基的 10 L 发酵罐中,26~28℃,100~120 r/min,通气量控制在 500~700 L/h,小罐培养 2~3 d,得到 xj 菌株的种子液;取种子液按 10%~15%(V/V)接种于装有 PDB 发酵培养基的 80 L 发酵罐中,26~28℃,搅拌速度 80 r/min,通气量控制在 2.5 L/h,大罐培养 3~5 d 终止发酵,4 层无菌纱布过滤除去发酵液,收集菌丝体,即得。

#### 1.2.2 黑曲霉菌丝体的超临界萃取

将 200 g 干燥菌丝体研磨成粉末并混合均匀,取 50 g 作为设备清洗之用,余下 150 g 分 2 次萃取完成。萃取压力为 5 MPa,温度 50℃,流量 160~200 L/h,得到超临界萃取段样品 SE。称量所得提取物质量,计算得率,样品置于 4℃冰箱中保存备用。

#### 1.2.3 超临界萃取物的 GC-MS 分析

将超临界萃取段样品 SE 用甲醇配制成 10 μg/mL 溶液,利用气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪对试样进行分析。气相色谱条件:HP-5MS (0.25 mm×30 m,0.25 μm);柱温 50℃,保留 2 min,升温至 280℃(5℃/min),保持 3 min;汽化室温度为 250℃;以高纯氮为载体;柱前压 7.62 psi,载气流量 1.0 mL/min;进样量 1 μL;分流比 50:1。质谱条件:离子源为 EI 源;接口温度 280℃;离子源温度 230℃;倍增器电压 1 785 V;四极杆温度 150℃;电子能量 70 eV;发射

电流 34.6  $\mu\text{A}$ ; 质量范围 10~550 amu; 溶剂延迟 3 min。

### 1.3 抑菌机制研究

#### 1.3.1 SE 对菌落生长的影响

参照吴新安等<sup>[11]</sup>的方法,制备终浓度为 750  $\mu\text{g/mL}$  的 SE 含药培养基,培养皿直径为 90 mm。以 PDA 培养基平板作空白对照,含 750  $\mu\text{g/mL}$  代森锰锌的培养基平板作阳性对照,以加入等体积 DMSO 的 PDA 平板作溶剂对照。接种链格孢菌饼( $d=4$  mm)于培养皿中央,置于 28℃ 恒温光照培养箱中培养,每处理设 3 次重复。定期观察菌落形态,7 d 后测定菌落直径。

#### 1.3.2 培养液电导率的测定

接种链格孢菌饼( $d=4$  mm)于 50 mL PDB 培养基中,28℃ 恒温光照培养 7 d。按 Lee 等<sup>[12]</sup>的方法测定终浓度为 750  $\mu\text{g/mL}$  的 SE 处理链格孢 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5 h 后上清液的电导率值。以等体积的 DMSO 作阴性对照,以 750  $\mu\text{g/mL}$  代森锰锌作对照。试验重复 3 次,取平均值。

#### 1.3.3 核酸、蛋白等大分子物质的测定

接种链格孢菌饼( $d=4$  mm)到 50 mL PDB 培养液中,28℃ 恒温光照培养 7 d。按 Chen 等<sup>[13]</sup>的方法测定终浓度为 750  $\mu\text{g/mL}$  的 SE 处理链格孢 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5 h 后上清液中核酸、蛋白等大分子物质的吸光值。以等体积的 DMSO 作为阴性对照,以 750  $\mu\text{g/mL}$  代森锰锌作对照。试验重复 3 次,取平均值。

#### 1.3.4 菌体荧光强度变化的检测

将链格孢接种于 PDB 中培养至对数期,加入 SE 使其终浓度为 750  $\mu\text{g/mL}$ ,分别处理 10、20、30 min,取 1 mL 菌液 3 000 r/min 离心 1 min, PBS(1×)洗涤 2 次,重悬细胞于 80% 乙醇中,室温固定 10 min。3 000 r/min 离心 1 min,弃上清, PBS(1×)洗涤 1 次,重悬于 DAPI 染液(1  $\mu\text{g/mL}$ )中,室温避光孵育 15 min,制片在倒置荧光显微镜(OLYMPUS IX73)下观察、拍照。荧光强度采用 Image J 定量。

#### 1.3.5 活性氧含量的测定

测定过程严格按照活性氧(ROS)检测试剂盒说明书进行。采用软件 Image J 进行荧光强度定量分析,计算公式如下:荧光强度 =  $\frac{\text{取样面积内荧光强度}}{\text{取样面积}}$ ,每个处理 3 次重复,取平均值。

### 1.3.6 琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶活性测定

样品的制备按照古力娜·达吾提等<sup>[14]</sup>的方法。向培养至对数生长期的链格孢中加入终浓度为 750  $\mu\text{g/mL}$  的 SE, 28℃ 振荡培养 2 h。取菌丝体用 PBS(1×)缓冲溶液漂洗 3 次, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入 PBS(1×)缓冲溶液 1 mL, 冰浴超声破碎细胞, -20℃ 放置过夜, 次日反复冻融 2 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清测定酶活性。以等体积的 DM-SO 作为阴性对照, 以加入代森锰锌作对照, 试验重复 3 次, 取平均值。

采用 Bradford 法<sup>[15]</sup>制作蛋白质标准曲线, 以小牛血清蛋白为对照。SDH 和 MDH 活性测定严格按照试剂盒说明书操作。

### 1.4 数据处理

以 Image J 17.0 进行荧光定量数据采集, 以 GraphPad Prism 7.03 和 Microsoft Excel 2010 进行数据分析。所有试验均重复 3 次, 结果以“ $\bar{x} \pm \text{SD}$ ”表示, 用 SPSS Statistics 17.0 进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 超临界萃取段的成分分析

超临界萃取段样品共 15 g, 得率为 1%。通过 GC-MS 检测, 共得到 5 种已知化合物, 组分含量见图 1 及表 1, 其中 5-羟甲基糠醛(90.194%)和 5,5'-(氧二甲基)-双-2-呋喃甲醛(7.843%)含量最高。

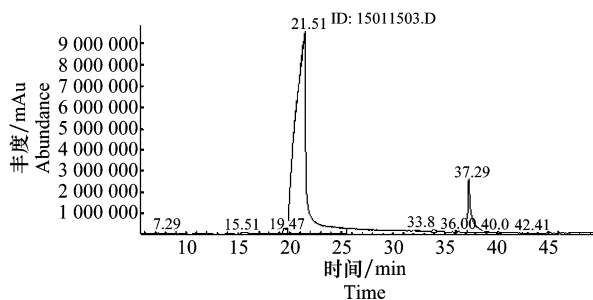


图 1 超临界萃取段的总离子流图(Tic 图)

Fig. 1 Tic map of supercritical extraction section

5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl-furfural)通常被认为是淀粉、多糖的降解产物, 文献报道其对人体横纹肌及内脏有损害, 具有神经毒性。近年来, 关于 5-羟甲基糠醛的生物活性逐渐被发掘, 主要包括抗氧化活性、抗心肌缺血作用、抗肿瘤细胞增殖活性、改善血液循环、调节  $\text{Ca}^{2+}$  平衡、抗酪氨酸酶、影响甘草酸代谢、杀虫作用等<sup>[16]</sup>。糠醛(furfural)又称 2-呋

喃甲醛,由于其化学性质活泼被广泛应用于工业生产,例如合成树脂、化工原料、合成医药<sup>[17]</sup>和农药<sup>[18]</sup>等。糠醛较易分解,很少有农药残毒问题。以糠醛为原料生产的农药有数十种,包括灭菌剂、杀虫剂、

杀螨剂及其他具有生物活性的农药<sup>[19-20]</sup>。从上可知黑曲霉超临界萃取物中含有的化学成分在医药和农药方面都具有一定的价值,这对深入研究黑曲霉超临界萃取物生物活性提供了一定的科学依据。

表 1 黑曲霉超临界萃取物化学成分分析结果

Table 1 Chemical constituents from *Aspergillus niger* by supercritical extraction

| 峰号<br>Peak no. | 保留时间/min<br>Retention time | 化合物<br>Compound                                                                         | 分子式<br>Molecular formula                                      | 相对分子质量<br>Relative molecular mass | 相对含量/%<br>Relative content |
|----------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| 1              | 7.29                       | 糠醛 Furfural                                                                             | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                  | 96                                | 0.079                      |
| 2              | 19.47                      | 5-甲酰-2-糠醛 5-Formyloxymethyl-2-furfural                                                  | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>                  | 154                               | 0.745                      |
| 3              | 21.51                      | 5-羟甲基糠醛 5-Oxymethylfurfurol                                                             | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                  | 126                               | 90.194                     |
| 4              | 36.00                      | 1,4-二氮杂-2,5-二氧化-3-异丁基双环[4.3.0]壬烷<br>1,4-Diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 210                               | 0.128                      |
| 5              | 37.29                      | 5,5'-(氧二甲基)-双-2-呋喃甲醛<br>5,5'-(Oxydimethylene)-di-2-furaldehyde                          | C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>                | 234                               | 7.843                      |

2.2 SE对菌落生长的影响

SE对链格孢的生长有显著的抑制作用(图2)。由图2e可知,空白对照和溶剂对照对链格孢的生长

影响无显著差异( $P>0.05$ ),表明溶剂DMSO对试验指标无显著影响,后期试验以溶剂DMSO作阴性对照。

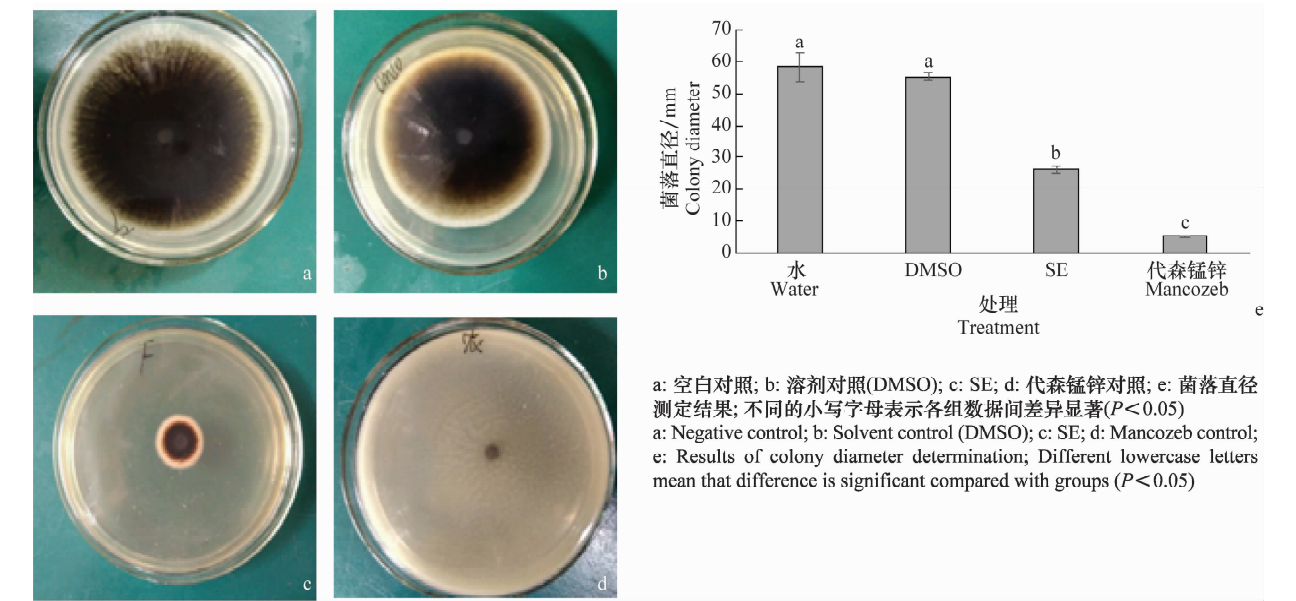


图 2 SE对链格孢菌落生长的影响

Fig. 2 Effects of SE on growth of *Alternaria alternata* colonies

2.3 SE对菌体细胞膜的影响

培养液电导率的改变可以反映细胞膜渗透性的改变。本研究的测定结果显示,SE作用菌体初期,上清液电导率随时间的增加而增大。当作用4.5 h时,SE组电导率达到峰值,比阴性对照增加了37.2%( $P<0.05$ )(图3),说明SE能影响链格孢细胞膜的通透性。有文献报道可测定加药前后DNA和RNA等大分子物质的变化推测药物对细

胞膜完整性的影响<sup>[21]</sup>。为考虑SE影响链格孢细胞膜的通透性程度,测定了SE作用后菌体大分子物质泄漏情况。如图4所示,SE作用菌体初期核酸和蛋白质含量明显高于阴性对照组,虽然随时间推移呈逐渐下降趋势,但差异依旧显著( $P<0.05$ )。以上两个试验说明,SE不仅引起链格孢细胞膜渗透性的改变,还可导致核酸和蛋白等大分子物质外漏。

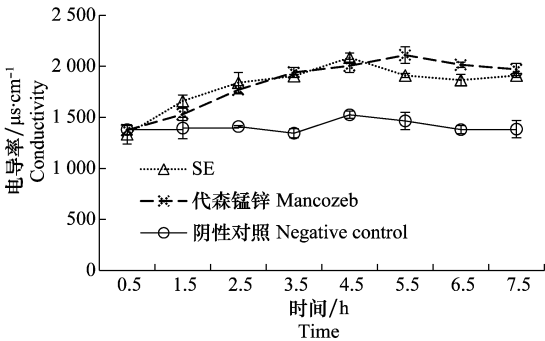


图 3 SE 作用链格孢后培养液电导率的变化  
Fig. 3 Change of conductivity after treatment of *Alternaria alternata* with SE

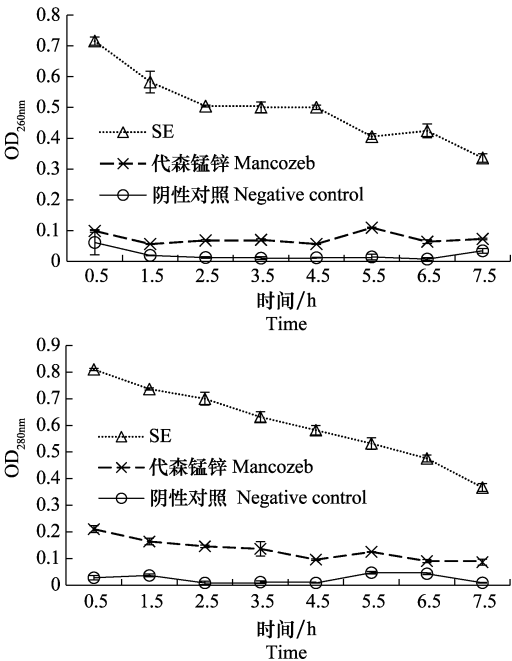


图 4 SE 作用链格孢后大分子物质 OD 值的变化  
Fig. 4 Change of OD value of macromolecules after treatment of *Alternaria alternata* with SE

## 2.4 SE 对链格孢核酸含量的影响

DAPI 是一种能够与 DNA 和 RNA 结合的荧光染料,核酸量越大,荧光亮度越强。通过倒置荧光显微镜(OLYMPUS IX73)观察,DAPI 可以穿透细胞膜进入细胞内部,与核酸相结合。阴性对照与 SE 处理链格孢 30 min 内的荧光显微镜观察结果见图 5。与阴性对照相比 SE 处理链格孢后该细胞核染色质出现异常弥散,推测可能是 SE 导致的急性细胞核破碎,随时间推移,细胞核损伤程度逐渐降低。

## 2.5 SE 对链格孢活性氧含量的影响

胞内 ROS 过度积累,会对膜脂、蛋白质、核酸等产生氧化损伤,进而触发或者加速细胞凋亡进程<sup>[22]</sup>。Image J 荧光定量分析结果(图 6)显示:SE

可以激发链格孢菌体产生过多的活性氧,SE 胞质中 ROS 含量呈先升后降趋势,在处理 40 min 时出现峰值,与阴性对照相比差异极显著( $P<0.01$ )。SE 处理会导致链格孢菌体内大量的 ROS 产生,从而影响细胞的正常代谢过程。

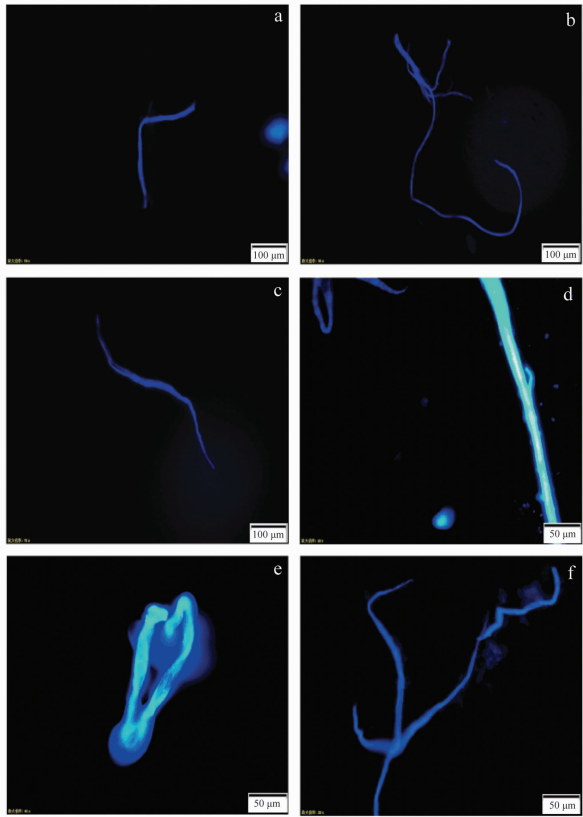
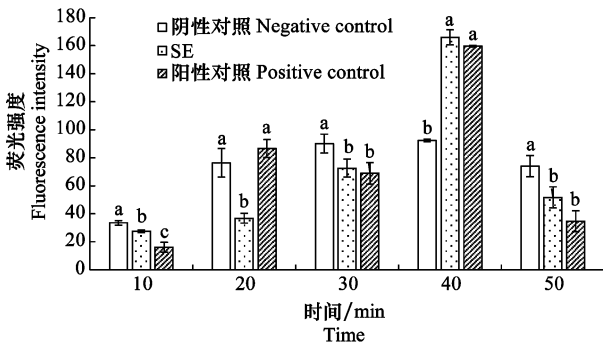


图 5 链格孢荧光显微镜图  
Fig. 5 Fluorescent microscopic image of *Alternaria alternata*

图 5 链格孢荧光显微镜图  
Fig. 5 Fluorescent microscopic image of *Alternaria alternata*

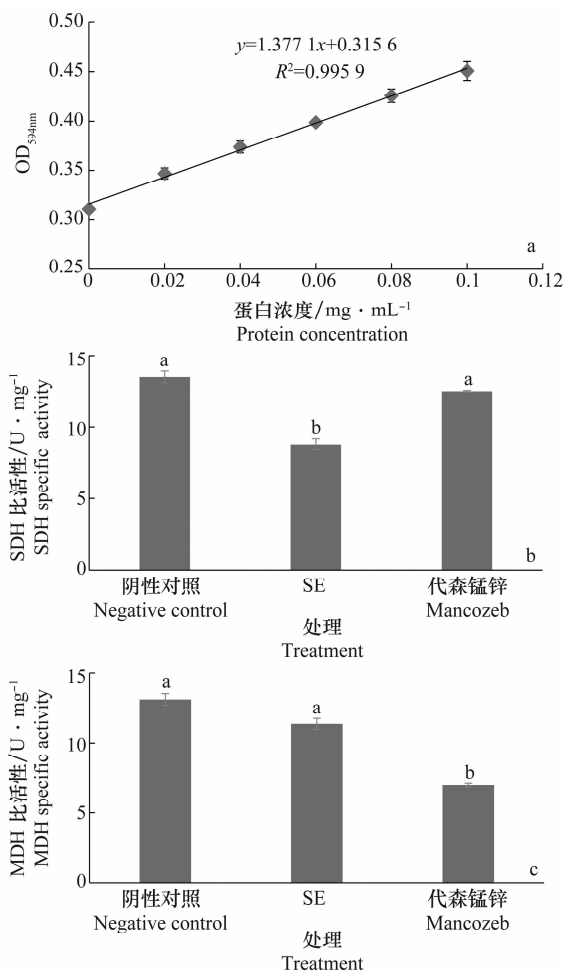


不同的小写字母表示相同时间内不同处理数据间差异显著( $P<0.05$ )  
Different lowercase letters mean that difference is significant compared with treatment groups in the same time ( $P<0.05$ )

图 6 链格孢菌体 ROS 含量荧光定量分析  
Fig. 6 Fluorescent quantitative analysis of ROS in *Alternaria alternata*

## 2.6 SE对菌体三羧酸循环关键酶的影响

琥珀酸脱氢酶(SDH)和苹果酸脱氢酶(MDH)是真核细胞和原核细胞进行TCA循环途径中的关键酶,在细胞能量代谢中起着重要的作用,其活性变化可反映细胞的能量代谢状况<sup>[23]</sup>。图7a为采用Bradford法制作的标准曲线,回归方程 $y=1.3771x+0.3156$ ,相关系数 $R^2=0.9956$ ,具有良好线性关系,满足样品测试要求。SE对链格孢的SDH酶具有明显的抑制作用。SE组SDH比活性与阴性对照相比降低了35.4%。SE组MDH比活性与阴性对照相比虽呈下降趋势,但未有显著差异( $P>0.05$ );由上可知,SE处理后会导正常的三羧酸循环过程受阻,影响细胞的正常代谢。



a: OD<sub>594nm</sub> 波长下蛋白质标准吸收曲线; b: SDH活性; c: MDH活性。  
不同的小写字母表示各组数据间差异显著( $P<0.05$ )  
a: Protein standard curve at OD<sub>594nm</sub>; b: SDH activity; c: MDH activity.  
Different lowercase letters mean that difference is significant compared with groups ( $P<0.05$ )

图7 SDH和MDH酶比活性变化

Fig. 7 Change of SDH and MDH enzyme activities

## 3 讨论

近年来随着绿色化学的兴起,研究者们已经从生物中发现大量有活性的天然产物,很大程度地丰富了化学资源。真菌化学成分种类丰富,包括甾醇、萜、生物碱、氨基酸、肽类、多糖等,已成为探索和发掘新化合物的重要领域。超临界萃取是一种高效的提取技术,目前已广泛应用于天然产物的分离提取过程。本文通过超临界萃取从黑曲霉菌丝体中提取得到萃取物SE。经GC-MS分析出5种已知化合物,含量最高的两种物质为5-羟甲基糠醛(90.194%)和5,5'-(氧二亚甲基)-双-2-呋喃甲醛(7.843%)。有文献报道5-羟甲基糠醛具有一定的医药价值,糠醛可用于农药合成,因此推测黑曲霉超临界萃取物SE可能具有生物活性,本文对SE的抑菌机制进行了研究。

研究结果显示,SE对链格孢具有明显的抑菌活性。通过对培养液、胞外核酸和蛋白质等大分子物质的测定结果表明,SE不仅引起链格孢细胞膜渗透性的改变,还破坏了细胞膜的完整性,导致胞内核酸、蛋白质等大分子物质的泄漏。其作用效果与刘海燕等<sup>[24]</sup>用细辛挥发油处理土生链格孢后结果相一致,SE处理导致链格孢的细胞膜完整性受到破坏。DAPI是一种能够与DNA和RNA结合的荧光染料,核酸含量越高,荧光亮度也就越强。ALLEN<sup>[25]</sup>研究表明糠醛能导致核染色质异常,造成细胞核损伤。DAPI染色结果显示经SE作用后链格孢与阴性对照相比细胞核染色质出现异常弥散,推测可能是SE导致急性的细胞核破碎化,而且随时间推移,细胞核损伤程度降低。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一类分子氧部分还原的分子或离子,具有很强的氧化活性,过量的ROS能够使生物大分子如DNA、蛋白质、脂类发生过氧化链式反应,造成细胞结构的损伤,影响生理活性<sup>[26-27]</sup>。SE可以激发菌体中产生过多的活性氧,SE作用链格孢40 min时ROS含量比阴性对照增加了79.67%,试验结果与ALLEN等<sup>[25]</sup>所描述糠醛导致胞内活性氧积累,从而损伤细胞结构一致。呼吸代谢是生物体进行生命活动的重要表现形式,其实质是细胞内糖的氧化代谢过程,一旦糖的氧化代谢被抑制,供给细胞生命活动所需的能量和合成代谢所需要的碳架及还原力就无法生成,使生物体的生长和繁殖受阻。琥珀酸脱氢酶是三羧酸循环中的关键酶,对细胞生长代谢和繁殖是必需的。本研究结果显示,SE

对链格孢 SDH 的活性具有明显的抑制作用,SE 作用链格孢 SDH 酶的比活性比阴性对照降低了 35.4%,这与 SE 会抑制参与 TCA 循环和糖酵解的相关酶活论证相一致<sup>[28]</sup>。推测其原因可能是 SE 与 SDH 相结合,导致酶的分子结构发生了变化,使酶的活性降低,从而导致菌体 ATP 和 NADH 的合成受阻,最终抑制其呼吸代谢系统。

综上所述,SE 通过影响细胞膜的正常功能、损伤细胞结构和抑制真菌的呼吸代谢等方面抑制链格孢的生长,其抑菌活性可能与萃取物中的活性物质相关。本试验中得到的萃取物是多种化学成分的混合物,抑菌活性是一种主要成分的作用,还是多种化学成分协同作用,它们的反应机制等问题目前还未知,要解决这些问题还有待于进一步的科学研究。本文通过试验明确了黑曲霉超临界萃取物主要成分的含量,并对其抑制链格孢的机制进行了初探,为黑曲霉真菌资源和微生物农药的进一步开发应用提供了理论基础和依据。

## 参考文献

- [1] 张天宇. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 1-30.
- [2] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 390-397.
- [3] JANISIEWICZ W J, KORSTEN L. Biological control of post-harvest diseases of fruits [J]. Annual Reviews of Phytopathology, 2002, 40(1): 411-441.
- [4] TRIPATHI P, DUBEY N K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables [J]. Postharvest Biology and Technology, 2004, 32(3): 235-245.
- [5] ROUKAS T. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger*, using solid-state fermentation [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000, 25(6): 298-304.
- [6] SCHUSTER E, DUNN-COLEMAN N, FRISVAD J C, et al. On the safety of *Aspergillus niger*, -a review [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4/5): 426-435.
- [7] 刘吴娟, 陈青, 王婧, 等. 黑曲霉菌丝体抗菌活性及石油醚部分化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 125-128.
- [8] KITTURA F S, VISHU KUMAR A B, VARADARAJ M C, et al. Chitoooligosaccharides-preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(6): 1239-1245.
- [9] 李祝, 葛永怡, 陈青, 等. 黑曲霉发酵液抗真菌活性及稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(7): 141-143.
- [10] 左祥, 白现广, 杨本寿, 等. 一株内生真菌黑曲霉的活性检测及鉴定[J]. 生物技术世界, 2012, 10(9): 1-3.
- [11] 吴新安, 花日茂, 岳永德, 等. 中草药提取物对几种植物病原菌的抗菌活性研究[J]. 安徽农业大学学报, 2002(4): 330-332.
- [12] LEE H J, CHOI G J, CHO K Y. Correlation of lipid peroxida-

tion in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1998, 46(2): 737-741.

- [13] CHEN C Z, COOPER S L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes [J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3359-3368.
- [14] 古力娜·达吾提, 安惠霞, 斯拉甫·艾白, 等. 地锦草有效部位对真菌琥珀酸脱氢酶活性的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(11): 34-38.
- [15] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(12): 248-254.
- [16] 傅紫琴, 王明艳, 蔡宝昌. 5-羟甲基糠醛(5-HMF)在中药中的研究现状探讨[J]. 中华中医药学刊, 2008(3): 508-510.
- [17] ZEITSCH K J. The chemistry and technology of furfural and its many by-products [J]. Chemical Engineering Journal, 2001, 81(1/3): 338-339.
- [18] HEITZ M, CAPEK-MENARD E, KOEBERELE P G, et al. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using STAKE II technology [J]. Bioresource Technology, 1991, 35(1): 23-32.
- [19] 王瑞芳, 石蔚云. 糠醛的生产及应用[J]. 河南化工, 2008(5): 14-15.
- [20] 江俊芳. 糠醛的生产及应用[J]. 化学工程与装备, 2009(10): 137-139.
- [21] 王倩, 谢明杰. 木犀草素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及其机制[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1180-1184.
- [22] 张小华, 孙业盈, 卞伟华, 等. 真菌细胞壁抑制剂刚果红诱导酵母细胞凋亡及其机制的研究[J]. 河南农业科学, 2015, 44(12): 65-69.
- [23] BOYD E F, NELSON K, WANG, F S, et al. Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (mdh) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(4): 1280-1284.
- [24] 刘海燕, 高微微, 樊瑛, 等. 细辛挥发油抗植物病原真菌活性初步研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 95-98.
- [25] ALLEN S A, CLARK W, MCCAFERY J M, et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2010, 3(1): 2.
- [26] HANLY T J, HENSON M A. Dynamic model-based analysis of furfural and HMF detoxification by pure and mixed batch cultures of *S. cerevisiae* and *S. stipitis* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 111(2): 272-284.
- [27] STORZ G, CHRISTMAN M F, SIES H, et al. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(24): 8917-8921.
- [28] ZHENG D, BAO J G, LU J M, et al. Isolation and characterization of a furfural-degrading bacterium *Bacillus cereus* sp. strain DS1 [J]. Current Microbiology, 2015, 70(2): 199-205.

(责任编辑: 田 喆)