

野生桦褐孔菌及其深层发酵产物的弱极性成分研究

项小燕^{1,2}, 顾 琪², 郑维发^{2*}, 张小平¹, 魏江春³

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116;

3. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* 属担子菌亚门、层菌纲、非褐菌目、多孔菌科、褐卧孔菌属。分布于北美、芬兰、波兰、俄罗斯及我国黑龙江、吉林等地区, 寄生于桦树、榆树、赤杨等的树皮或活立木的树皮或砍伐后树木的枯干上^[1]。该菌在俄罗斯已有一百多年的应用历史, 是具有显著的药理活性而对人体没有任何副作用的一种药用真菌^[2]。研究表明, 桦褐孔菌对糖尿病、传染性病毒及多种癌症有显著的疗效^[3]。化学成分研究显示, 桦褐孔菌含有甾体类^[4]、黄酮类^[5]和黑色素^[6]类等化合物。现代药理学表明, 三萜类化合物有改善血液循环、调整血压、降胆固醇的作用^[7], 并可在体外抑制 HIV 的增殖^[2]。因此, 桦褐孔菌具有重大的药学价值。然而, 桦褐孔菌在野生环境下生长极为缓慢, 远远满足不了日益增长的市场需求。为此, 有很多学者开始尝试人工固体栽培研究。然而, 大量实践证明, 固体栽培生长周期长, 极易被杂菌污染, 并且受场地和季节的限制^[8], 目前国内外尚无培养成功的先例。而深层发酵培养则生长周期短, 产量高, 不受场地和季节的限制, 是解决桦褐孔菌资源危机的重要途径。本研究对两种培养基培养的桦褐孔菌深层发酵产物和野生子实体的弱极性物质作了比较, 以期对桦褐孔菌深层培养体系甾体和芳香类化合物代谢研究奠定基础。

1 实验部分

1.1 实验材料: 桦褐孔菌采自牡丹江镜泊湖火山口, 标本由俄罗斯真菌学家 Margarita A B 教授鉴定。菌种经 PDA 斜面纯化培养后接入液体培养基, 在 26 ℃、140 r/min 的黑暗条件下振荡培养 10 d 形成一级种子, 分别接入装有 300 mL 基本培养基和桦树汁培养基的三角瓶中, 接种量为 10%, 培养条件同上。基本培养基(A)的配方为(%): 葡萄糖 2.5, 蛋白胨 0.3, 酵母膏 0.1, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, CaCl₂ 0.01, pH 自然。桦树汁培养基(B)的配方为在基本培养基的基础上加 5% 桦树木屑。

培养结束后, 离心分离菌丝体, 并用蒸馏水洗涤数次, 60 ℃ 烘干至恒重。

1.2 样品的提取: 精确称取基本培养基(A)和桦树汁培养基(B)的发酵产物以及干燥的野生子实体(C)各 5.0 g, 充分粉碎后, 用 60~90 ℃ 石油醚 50 mL 在索式提取器中回流提取 2 次, 每次 2 h。合并提取液, 离心取上清。低温减压回收溶剂, 得浅黄色粉末, 提取率分别为 0.34%(A)和 0.26%(B)和 1.02%(C)。精确称取各提取物 0.1 mg, 溶于 1 mL 丙酮(色谱纯), 作为进样样品。

1.3 GC-MS 分析: 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司 HP6890/5973N 型)。气相色谱条件: 色谱柱, 为弹性石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 气化室温度: 280 ℃; 载气: 高纯 He; 流量: 1 mL/min; 程序升温: 初温 70 ℃, 以 10 ℃/min 的速度升至 270 ℃, 等热 5 min; 分流比 50:1; 进样量: 1 μL。质谱条件: EI 源; 离子源温度: 230 ℃; 电子能量: 70 eV; 质量范围: 30~550 amu; 扫描周期, 1 s; 扫描范围, 30~550 m/z。各组分成分鉴定: 将分离的各化合物质谱图在质谱图库中电脑检索比较, 选择与质谱图库中匹配度在 95% 以上的化合物作为被鉴定化合物^[9]。各成分的质量分数用峰面积归一化法分析。

2 结果

从桦褐孔菌基本培养基的发酵产物中检测出 30 个化合物, 包括 7 种甾体类衍生物(质量分数和为 40.1%), 4 种芳香类化合物(质量分数和为 2.33%) 和 18 种脂肪族化合物; 从桦树汁培养基发酵产物中检测出 29 个化合物, 其中甾体类化合物 3 种(质量分数和为 18.11%), 芳香族化合物 2 种(质量分数和为 2.7%), 脂肪族化合物 24 种; 从野生子实体中检测出 25 种化合物, 其中甾体类化合物 7 种(质量分数和为 69.04%), 芳香族化合物 2 种(质量分数和为 2.96%), 脂肪族化合物 14 种。从甾体类化合物组成

收稿日期: 2005-08-25

基金项目: 江苏省高校自然科学基金计划重大项目(2005KJA36012)

* 通讯作者 郑维发 Tel/Fax: (0516)83403179 E-mail: yyzw@xznu.edu.cn

来看,野生桦褐孔菌子实体弱极性成分以羊毛甾醇为主,占 61.38%,远远高于两种培养基发酵产物甾体类化合物质量分数和。而基本培养基深层发酵产物中出现质量分数较高的麦角甾醇及其衍生物,桦树汁培养基深层发酵产物中则出现质量分数较高的桦褐孔菌醇和麦角甾醇。就芳香族化合物而言,深层发酵产

物和野生子实体在种类和质量分数基本一致。两种培养基的深层发酵产物中都含有邻苯二甲酸单-2-乙基己酯,质量分数分别为 1.49%(A)和 2.35%(B),而野生子实体则含有总量仅为 3.96%的邻苯二甲酸酯衍生物,见表 1。

3 讨论

表 1 野生桦褐孔菌与其深层发酵产物的弱极性成分及相对质量分数

Table 1 Non-polar constituents and relative contents from wild *I. obliquus* and its submerged zymotic products

编号	化合物	质量分数%			编号	化合物	质量分数%		
		A	B	C			A	B	C
甾体类化合物									
1	羊毛甾醇	3.47	1.72	61.38	27	二十七烷	—	0.29	0.45
2	桦褐孔菌醇	8.71	25.04	—	28	二十八烷	—	—	2.04
3	24-亚甲基(3β)-羊毛甾-8-烯-3-醇	0.38	3.48	—	29	2,6,10-三甲基十四烷	—	—	0.10
4	9(11)-二氢麦角甾基苯甲酸酯	0.24	—	—	30	2,6,10-三甲基十五烷	—	0.20	0.83
5	苯甲酸蕈麦角四烯酯	—	—	0.27	31	2,6,10-三甲基十六烷	—	0.21	1.92
6	麦角甾醇	21.53	27.35	3.51	32	2,6,10,14-四甲基十六烷	—	0.25	1.31
7	c-麦角甾醇	0.23	—	0.65	33	2,6,11,15-四甲基十六烷	0.09	—	—
8	(3α,5α,22E)-麦角甾-7,22-二烯-3-醇	—	—	0.47	34	9-己基十七烷	—	0.75	—
9	羽扇豆醇	—	—	0.52	35	5,5-二甲基-4-(3-甲基-1,3-丁二烯基)1-氧癸[2.5]辛烷	0.99	—	—
10	4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-八甲基-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14b-十八氢甾-3-醇	—	—	2.24	36	(9,12)-十八二烯酸乙酯	0.83	0.73	—
11	(5R,6R)-(5,6-二氢)-5,6-二羟基-10'-脱辅基-α-阿洛胡萝卜酸甲酯	5.95	—	—	37	油酸	—	0.87	—
芳香族化合物									
12	邻苯二甲酸单-2-乙基己酯	1.49	2.35	—	38	(6E)-2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯	0.93	1.48	—
13	2-甲基-2-苯基十三烷	0.13	—	—	39	2-己基-1-癸醇	—	—	0.73
14	邻苯二甲酸二-2-甲基庚酯	0.53	—	1.94	40	戊二酸二丁酯	—	0.14	—
15	邻苯二甲酸二异丁酯	0.18	0.35	1.02	41	甲基丁二酸二丁酯	0.10	—	—
脂肪族化合物									
16	十六烷	0.08	—	0.51	42	十六烷酸乙酯	0.29	—	—
17	十七烷	0.11	0.43	—	43	己二酸二异丁酯	0.04	—	—
18	十八烷	—	0.49	0.93	44	十八酸乙酯	1.40	—	—
19	十九烷	—	0.57	1.88	45	十六甲基十七酸甲酯	—	0.29	—
20	二十烷	0.42	0.65	—	46	十六烷酸-2-羟基-1,3-丙二酯	0.59	—	—
21	二十一烷	0.34	0.48	0.95	47	(Z)-9-十八烯酸-2-羟基-1-羟甲基乙酯	—	0.67	—
22	二十二烷	—	0.71	—	48	(Z,Z)-9,12-十八二烯酸-2-羟基-1-羟甲基乙酯	3.19	13.72	—
23	二十三烷	—	—	1.57	50	(Z,Z)-9,12-十八二烯酸-2,3-二羟基丙酯	0.76	0.50	—
24	二十四烷	—	0.31	1.23	51	(Z)-9-十八酰胺	1.02	0.60	—
25	二十五烷	—	0.21	—	其他类化合物				
26	二十六烷	0.09	0.14	0.91	52	6α,7,10α-三甲基-十二氢-1H-苯并[f]苯并吡喃	0.65	0.22	—
					53	2,4α,8,8-四甲基十氢环丙内丙[d]萘	1.06	—	—

A: 基本培养基发酵产物; B: 桦树汁培养基发酵产物; C: 野生子实体

A: zymotic products on basic medium; B: zymotic products on birch juice medium; C: wild sporophore

自然条件下,桦褐孔菌受到多种病菌的感染和昆虫吞噬的压力,导致桦褐孔菌体内合成大量的抗病毒、抗细菌和真菌以及昆虫拒食物质。研究表明,羊毛甾醇类化合物具有抗病毒^[10]、杀虫^[11]活性。这可能是野生桦褐孔菌子实体积累大量羊毛甾醇的原因。深层发酵产物中只含有少量的羊毛甾醇类化合物而积累大量的麦角甾醇。从真菌的甾体类化合物生物合成途径来看,麦角甾醇是羊毛甾醇经过多个酶促反应后形成的产物。深层发酵条件下由于没有病菌感染和昆虫吞噬

的压力,导致羊毛甾醇类化合物进一步转化生成麦角甾醇。这可能是发酵产物中羊毛甾醇的含量低于野生子实体的主要原因。从生物合成途径来看,芳香类化合物的生物合成或源自莽草酸途径,或源自多酮的环化^[13],但无论是哪种途径其最初的前体都是与甾体类化合物生物合成的最初前体相同,即都是乙酰辅酶 A。因此,生长环境的改变导致乙酰辅酶 A 参与不同类别化合物合成的比例发生改变。

生长条件的变化是桦褐孔菌深层发酵产物与野

生子实体的弱极性成分组成差异的主要原因。从发酵产物中笔者获得了高于野生子实体的活性物质——麦角甾醇。它是维持真菌生物膜结构和功能的必须成分^[14,15],也是合成维生素 D₂ 的前体^[16]。因此,以基本培养基培养的桦褐孔菌深层发酵产物也具有重要的药学价值。至于桦树汁培养基和基本培养基在弱极性成分组成差异的原因以及如何提高发酵产物甾体类化合物的量有待于进一步研究。

References:

- [1] Huang L N. Mysterious folk medical fungi in Russia—*Inonotus obliquus* [J]. *Edib Fungi China* (中国食用菌), 2002, 21(4): 7-8.
- [2] Lin B X. Medical fungi—*Inonotus obliquus* [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2004, 16(6): 74-76.
- [3] Wass S P, Weis A L. Therapeutic effect of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms; a modern perspective [J]. *Crit Rev Innun*, 1999, 19: 65-69.
- [4] He J, Feng X Z. Studies on chemical constituents of *Fuscoporia oblique* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(1): 4-6.
- [5] Cui Y, Kim D S, Park K C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus* [J]. *J Ethnopharm*, 2005, 96: 79-85.
- [6] Babitskaya V G, Scherba V V, Liionnikova N V, et al. Melanin complex from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* Pilat (Chaga) (Aphyllophoromycetidae) [J]. *Inter J Med Mush*, 2001, 4: 139-145.
- [7] Rzymowska J. The effect of aqueous extracts from *Inonotus obliquus* on the mitotic index and enzyme activities [J]. *Boll Chim Garm*, 1998, 137(1): 13-16.
- [8] Jiang Y J. Studies on cultivated character of *Inonotus obliquus* [J]. *Fujian J Agric Sci* (福建农业学报), 2004, 19(2): 92-95.
- [9] Zheng W F, Shi F, Wang L, et al. Chemical components of non-polar fractions from ethanol extract of radices of *Daphne genkwa* and their inhibition to acute inflammation [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2004, 20(1): 18-21.
- [10] Ge X C, Wu J Y. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag+ and yeast elicitor [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 487-491.
- [11] Liu Z R, Hu Y C. Extraction, separation and bio-assay of *Daphne genkwa* active components [J]. *J Central South Forest Univ* (中南林学院学报), 2000, 20(4): 15-19.
- [12] Veen M, Stahl U, Lang C. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2003, 4: 87-95.
- [13] Dewick P M. *Medicinal Natural Products* [M]. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- [14] Parks L W and Casey W M. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 95-116.
- [15] Arnezeder C, Hample W A. Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast-cells [J]. *Biotechnol Lett*, 1990, 12: 277-282.
- [16] Mattila P, Maija A. Sterol and vitamin D₂ contents in some wild and cultivated mushrooms [J]. *Food Chem*, 2002, 76: 293-298.

白马骨叶的化学成分研究

张 强, 孙隆儒*

(山东大学药学院, 济南 250012)

茜草科白马骨属植物有两种——白马骨 *Serissa serissoides* DC. 和六月雪 *S. japonica* Thunb., 主要分布于中国和日本^[1]。这两种植物的根均可作为中药“白马骨根”入药^[2]。其全草具有清热利湿、解毒退黄的功效, 并在中国多种民族医药中广泛用于治疗消化不良和急性慢性肝炎。近年来发现, 白马骨的水提取物和甲醇提取物均具有抑制 HBV DNA 转染细胞表达 HBsAg、HBeAg 和抗肿瘤活性^[3,4]。本实验特别对白马骨植物合成代谢最为旺盛的叶部分进行了化学成分的研究, 并从中分离得到了 5 个化合物: β -谷甾醇(I)、齐墩果酸(II)、胡萝卜苷(III)、(+)-松脂素(pinosesinol, IV)和(+)-麦迪奥脂素(medioresinol, V)其中化合物 III 为首次从该属的植物中分离得到的

已知化合物, 化合物 IV 和 V 为首次从该属植物分离得到的已知木脂素类化合物。

1 材料和仪器

药材采自安徽省黄山地区汤口和浮溪一带, 经安徽中医学院王德群教授鉴定, 确定为白马骨属植物白马骨。薄层色谱和柱色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂产品, 聚酰胺为浙江省台州市四甲生化塑料厂产品。熔点测定用 X4 型显微熔点测定仪测定。红外光谱用 Nicolet Nexus 470 FT 型红外分光光度计测定。NMR 仪器型号为 Bruker DRX600, 质谱仪型号为 API4000。

2 提取分离

将干燥的白马骨叶 5.0 kg 粉碎, 用于 95% 乙醇