

两株长喙壳属真菌挥发性香气成分分析

张志超¹, 张 彧¹, 李建梅¹, 徐可成¹, 宋 红¹, 李 雪¹, 杨 虹^{2*}, 黄 琼^{1*}

¹云南农业大学 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201; ²云南省农药检定所, 昆明 650034

摘要:长喙壳属真菌具有产香特性, 本文比较了长喙壳菌株 PPI-1PG、WYB 的菌落形态、rDNA-ITS 序列等特征, 并利用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析其有机化合物组成。结果表明, 菌株在 PSA 培养基上菌丝不发达, 为有隔菌丝。菌株 PPI-1PG 在 ITS 基因序列系统进化树上与 *Ceratocystis fimbriata* 聚为一支, 菌株 WYB 与 *Ceratocystis paradoxa* 聚为一组。GC-MS 分析表明, 两个菌株产生的挥发性香气物质组成主要为乙酸乙酯、乙酸异丁酯、苯乙烯等, 其中乙酸乙酯、乙酸异丁酯相对含量最高, 二者之和在两个菌株中分别达到 45.85% 与 61.02%。本研究首次在菌株 PPI-1PG 中检测到重要的香料物质苯甲醛(安息香醛), 为开发利用苯甲醛提供了参考依据。

关键词:长喙壳属真菌; ITS 序列; 挥发性物质; GC-MS 分析

中图分类号: R284.1; Q939.95

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.11.015

The Aroma Components Analysis of Two *Ceratocystis* Strains

ZHANG Zhi-chao¹, ZHANG Yu¹, LI Jian-mei¹, XU Ke-cheng¹,

SONG Hong¹, LI Xue¹, YANG Hong^{2*}, HUANG Qiong^{1*}

¹State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Biology Resources of Yunnan Province, Yunnan Agriculture University, Kunming, Yunnan 650201, China;

²Pesticide Inspection and Identification Institute of Yunnan, Kunming 650034, China

Abstract: The genus *Ceratocystis* produces a range of flavoring compounds, in this study, strains PPI-1PG and WYB were compared on the basis of characteristics of colony morphology and ITS sequences. The volatile components were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Septate mycelia were observed on PSA substrates for both strains. Based on the ITS phylogeny, strain PPI-1PG was clustered with *Ceratocystis fimbriata*-forming a distinct clade while strain WYB was clustered with *Ceratocystis paradoxa*. Analyzing the volatile components by GC-MS, it is known that the most materials produced by two strains were ethyl acetate, isobutyl acetate and styrene, which the relative contents of ethyl acetate and isobutyl acetate were 45.85% and 61.02% in two strains. Benzaldehyde, a widely used flavour substance, was detected from strain PPI-1PG for the first time, providing chemical basis and foundation for the comprehensive development and the search for this substance.

Key words: *Ceratocystis* spp.; ITS sequence; volatile compounds; GC-MS analysis

挥发性有机化合物(Volatile organic compounds, VOCs)是指在气压为 0.01kPa 的室温条件下(20℃), 能够完全蒸发变为气相的碳基化合物, 绝大多数为液体物质, 且为脂溶性, 由微生物代谢产生的天然非化学合成的挥发性有机化合物被称作 Microbial volatile organic compounds (mVOCs)^[1]。自 1923 年首次对微生物产香进行报道以来^[2], 微生物产香技

术的应用得到了快速发展, 如利用曲霉分解大豆中的蛋白质, 产生各种类型的氨基酸, 形成特定香气风味的酱油^[3]; 用脂肪酶催化己酸与乙醇反应, 产生的己酸乙酯用于勾兑白酒、调配香精^[4]; 从桂树中分离得到的内生真菌 *Muscodor albus* 产生的芳香性气体物质可以有效地抑制多种植物病原微生物并被开发为预防和控制植物病害的生物熏蒸剂^[5]; 担子菌中一些种类的代谢产物具有怡人的香味, 其化合物组成包括多种酯类、醇类等食用香料物质, 具有潜在的工业开发利用价值^[6]。

甘薯长喙壳菌 (*Ceratocystis fimbriata* Ellis &

收稿日期: 2017-10-30 接受日期: 2018-03-16

基金项目: 国家自然科学基金(31860522); 福建农林开放项目(NYST-2017-03)

* 通信作者 Tel: 86-018787489367; E-mail: huangqiong88hs@163.com, yanghongkm@163.com

Halsted) 是一类寄主广泛、危害严重的土壤习居菌^[7],其之所以成为如此重要的病原物与其自身代谢活动可产生具有水果等香气类型的代谢产物密切相关。因香气吸引昆虫危害,由于昆虫的迁飞、移动大范围传播该病菌^[8-10],由此激发人们对其产香功能的研究。甘薯长喙壳在生长过程中能够产生浓郁的类似香蕉气味的挥发性有机物^[11],其主要组成为醇类(乙醇、异丙醇、丁醇)、酯类(乙酸乙酯、丙酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸异丁酯、乙酸异戊酯、酸类(乙酸、戊酸)、酮类、烷烃、羧酸等^[12-14]。研究表明,甘薯长喙壳菌产生的芳香性气体物质对桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)、苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、火龙果烂果病的病原菌镰刀菌(*Fusarium sp.*)和弯孢菌(*Curvularia sp.*)具有抑制作用,且随着培养时间增长,气体物质含量增加,抑菌作用增强^[15]。本实验选取两个长喙壳菌株,通过菌落形态观察、rDNA-ITS 序列分析和固相微萃取-气质联用的方法,为菌株的开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌株 PP1-1PG 从四川石榴植株上分离,菌株 WYB 从云南七彩竹芋叶片表面分离,均由本实验室保存。

1.1.1 供试培养基

马铃薯蔗糖琼脂培养基:马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂粉 17 g、水 1000 mL。

MEA 培养基:麦芽提取物 20 g、琼脂粉 20 g、水 1000 mL。

1.1.2 分析仪器

LRH-250-GS 人工气候箱、TGL-16C 低速离心机、LX-100 手掌型离心机、低温冰箱、超净工作台、移液枪、PCR 仪(ependorf)、DYCZ-24B 电泳槽(北京六一仪器厂)、DYY-6C 型电泳仪、凝胶成像分析系统、7890B/5977A 气质联用仪(美国安捷伦公司生产 Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA),固相微萃取装置(美国 Supelco 公司生产),DVB/CAR/PDMS 固相微萃取头(美国 Supelco 公司生产)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌落形态鉴定

将菌株接种在 PSA 培养基上,25 °C 黑暗条件下

恒温培养 10 d 观察菌落形态。

1.2.2 菌株显微形态观察

将菌株接种到 MEA 培养基上,于 25 °C 恒温培养箱中培养 7~15 d 后,用解剖针挑取少许菌丝体制片,在蔡司光学显微镜下观察分生孢子、厚垣孢子、子囊壳及子囊孢子形态,并测量其大小。

1.2.3 分子生物学鉴定

采用 Chelex-100 法提取菌丝 DNA:用无菌接种针挑取少量菌丝加入盛有 150 μ L Chelex-100DNA 提取液的离心管中,100 °C 加热 3 min,取出后 12000 rpm 离心 3 min。再将以上两步重复一次,所得的上清液中即含有 DNA,-20 °C 保存。ITS 区域 PCR 扩增循环反应条件:94 °C 预变性 95 s;94 °C 变性 35 s,52 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 60s;35 个循环;最终 72 °C 延伸 15 min,4 °C 冰箱保存。用 MEGA6.06 软件,以邻接法(Neighbor-Joining)构建 ITS 基因序列系统进化树。

1.2.4 挥发性物质提取

将培养基切碎,装入固相微萃取瓶中。将平衡后的 DVB/CAR/PDMS 固相微萃取头插入萃取瓶中,压下活塞使纤维头伸出,暴露于样品上层空气中,40 °C 条件下固相微萃取 1 h。

1.2.5 挥发性物质 GC-MS 分析条件

色谱柱为 DB-wax 石英毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m),程序升温,柱初温 40 °C,保持 5 min,以 5 °C 的升温速率升至 200 °C,再以 10 °C 的升温速率升至 240 °C,保持 5 min;载气为高纯氦气,流速 1.0 mL/min;进样模式为分流进样,分流比为 10:1;质谱条件:EI 离子源,电子能量 70 eV,扫描范围 33-350 amu。

2 结果与分析

2.1 形态特征

菌株 PP1-1PG、WYB 接种于 PSA 培养基上,25 °C 培养 10 天后,菌落均为近圆形。PP1-1PG 菌落绿褐色,菌丝较短,为有隔菌丝,光学显微镜下能观察到黑色子囊壳,约 130~300 μ m,具有一个 450~800 μ m 的长喙;成串粘稠的子囊孢子从长喙的顶端溢出呈卷状盘绕,子囊孢子小而透明,帽形,长约 3.8~5 μ m,宽 2.3~4 μ m。25 °C 黑暗条件下 13 天菌丝长满培养皿,散发出蜂蜜香气。WYB 菌落中央浅绿色,边缘灰白色,菌丝较短,为有隔菌丝,分生孢子圆形,透明,暗绿色,通常 10 个或 10 个以上的分生孢

子连成链状,单个分生孢子长 8 ~ 17 μm ,宽 6 ~ 15 μm ;厚垣孢子球形或椭圆形,深绿褐色,直径 8 ~ 20 μm 。25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下 14 天菌丝长满培养皿,散发出浓烈的香蕉香气。

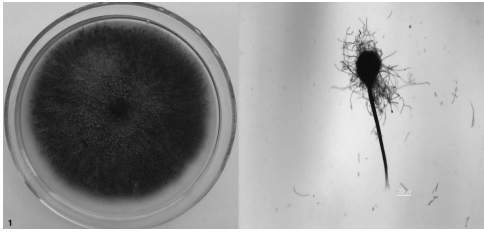


图 1 菌株 PP1-1PG 的菌落特征和子囊壳

Fig. 1 Colony morphology and perithecium of strain PP1-1PG

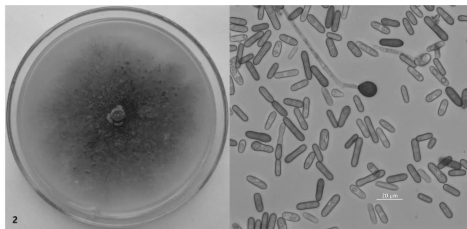


图 2 菌株 WYB 的菌落特征和分生孢子、厚垣孢子

Fig. 2 Colony morphology and conidia, chlamydo-spore of strain WYB

2.2 基于 rDNA-ITS 的系统发育分析

经 PCR 扩增和序列测定,获得菌株 PP1-1PG 和 WYB 的 ITS 序列片段,经 Blast 在线比对后,与相近种的菌株构建系统发育树(图 3)。系统发育树表明,菌株 PP1-1PG (KY440175) 与菌株 ZOR-2 和 C1988 聚为一组,为甘薯长喙壳;菌株 WYB (KT963166) 与菌株 my2 聚为一组,为奇异长喙壳 (*Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau)。

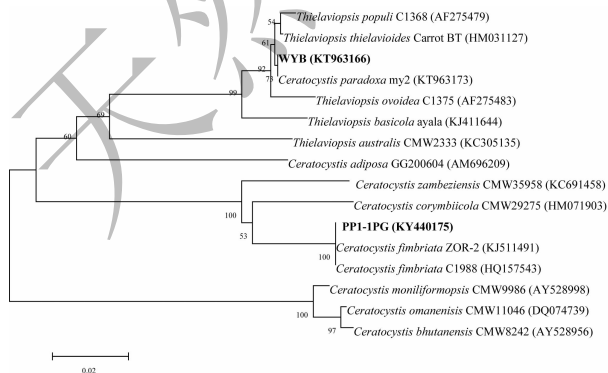


图 3 基于 rDNA-ITS 序列同源性构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on rDNA-ITS sequences homology

2.3 挥发性香气成分分析

考虑到生产应用,本研究选用顶空式气相色谱质谱联用(GC-MS)方法对两株长喙壳菌产生的挥发性有机化合物进行收集和定性分析(图 4、图 5),气体物质各组分通过面积归一法计算相对百分含量,经 NIST14.0 谱库检索进行组分分析后确认各种组分,结果见表 1。

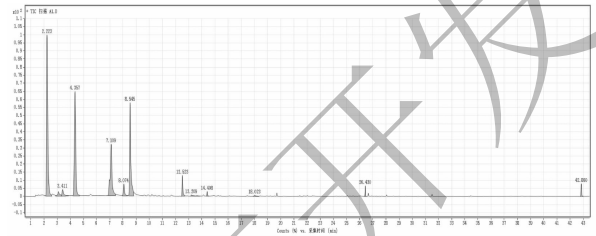


图 4 菌株 PP1-1PG 产生的挥发性有机化合物总离子流色谱图

Fig. 4 Total ion chromatogram for volatile organic compounds (VOCs) produced by *Ceratocystis fimbriata* strain PP1-1PG

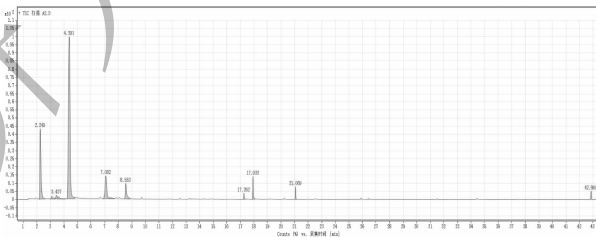


图 5 菌株 WYB 产生的挥发性有机化合物总离子流色谱图

Fig. 5 Total ion chromatogram for volatile organic compounds (VOCs) produced by *Ceratocystis paradoxa* strain WYB

3 讨论

本实验选取两个产香菌株 PP1-1PG 与 WYB,对其菌落形态及 rDNA-ITS 序列进行了探究,鉴定菌株 PP1-1PG 为 *Ceratocystis fimbriata*,菌株 WYB 为 *Ceratocystis paradoxa*。鉴于两个菌株在培养时散发出浓烈香气及其潜在的工业应用价值,本研究采用 GC-MS 手段,检测了两个菌株在 PSA 培养基上培养产生的挥发性化合物成分。结果表明:两个菌株产生的挥发性成分以酯类为主,其中相对含量最大的两个组分为乙酸乙酯、乙酸异丁酯,二者相对含量之和在两个菌株中分别高达 45.85%、61.02%,同之前的报道存在差异^[7],推测与菌株培养条件及挥发性物质的萃取方式有关。此外,在菌株 PP1-1PG 产生

的挥发性物质中首次检测到香味物质苯甲醛(安息香醛)。苯甲醛是在化工行业中应用广泛的化学原料及有机中间体^[16],其既是苯甲醛系香料最基本的原料,也可用于生产月桂酸、月桂醛和品绿等其他香味物质^[17]。目前我国的苯甲醛大部分由苜叉二氯水解法工艺生产,因产品中含有氯化物而限制了其在香料和医药工业中的应用^[18],而另一种甲苯氧化

法合成的苯甲醛中虽然不含氯,但苯甲醛只是该工艺的副产物,产量较低,不能满足市场需要^[19]。随着人们环境保护和可持续发展理念的日益提升,利用生物反应器合成有机物的途径备受青睐。本研究为进一步开发利用微生物资源,从甘薯长喙壳菌中提取苯甲醛提供了科学依据。

表1 菌株 PPI-1PG 和 WYB 产生的部分挥发性成分

Table 1 Volatile compounds produced by strains PPI-1PG and WYB

PPI-1PG				WYB			
保留时间 Retention time (min)	挥发物 Compound	分子式 Molecular formula	峰面积百分比 Peak area percentage	保留时间 Retention time (min)	挥发物 Compound	分子式 Molecular formula	峰面积百分比 Peak area percentage
2.223	乙酸乙酯 Ethyl Acetate	C ₄ H ₈ O ₂	27.00%	4.392	乙酸异丁酯 Isobutyl acetate	C ₆ H ₁₂ O ₂	47.57%
4.355	乙酸异丁酯 Isobutyl acetate	C ₆ H ₁₂ O ₂	18.85%	2.251	乙酸乙酯 Ethyl Acetate	C ₄ H ₈ O ₂	13.45%
8.546	苯乙烯 Styrene	C ₈ H ₈	15.64%	8.553	苯乙烯 Styrene	C ₈ H ₈	4.55%
7.108	对二甲苯 p-Xylene	C ₈ H ₁₀	11.23%	21.068	乙酸香茅酯 6-Octen-1- ol, 3,7-dimethyl-, acetate)	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	1.10%
12.521	苯甲醛 Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	2.17%	17.264	苯乙醇 Phenylethyl Alcohol	C ₈ H ₁₀ O	0.74%
8.071	对二甲苯 p-Xylene	C ₈ H ₁₀	2.14%	6.978	乙苯 Ethylbenzene	C ₈ H ₁₀	1.84%
3.41	乙酸正丙酯 n-Propyl acetate	C ₅ H ₁₀ O ₂	1.70%	14.407	3-甲基丁酸丁酯 Butanoic acid, 3-hydroxy-, butyl ester	C ₈ H ₁₆ O ₃	0.51%

参考文献

- Pagans E, Font X, Sánchez A. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration [J]. *J Hazard Mater*, 2006, 131: 179-186.
- Omeliński VL. Aroma-producing microorganisms [J]. *J Bacteriol*, 1923, 8: 393-419.
- Hong KJ, Lee CH, Kim SW. *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals [J]. *J Med Food*, 2004, 7: 430-435.
- Wei JP (魏纪平), Xiong NB (熊宁波), Zhang GZ (张国政). Synthesis of ethyl hexanoate by immobilized lipase [J]. *Guangzhou Food Sci Tech* (广州食品工业科技), 2003, 19(1): 15-17.
- Mercier J, Jimenez JI. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus* [J]. *Postharvest Biol Tec*, 2004, 31(1): 1-8.
- Zhang BH (张炳火), Li HQ (李汉全), Yang JY (杨建远), et al. Identification and volatile component analysis of aro-

matic fungi strain JXJ 01 [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 536-541.

- Li Q (李倩). Diversity of *Ceratocystis fimbriata* and bioactivity of its volatile organic compounds [D]. Beijing: China Agricultural University (中国农业大学), PhD. 2015.
- Iton EF. Studies on a wilt disease of cacao at River Estate. II. Some aspects of wind transmission [J]. *Annu Rep Cacao Res*, 1960, 47-58.
- Iton EF. *Ceratocystis* wilt. In: annual report on cacao research [J]. *Annu Rep Cacao Res*, 1966, 44-56.
- Crone JL. Symptoms, spread, and control of canker stain of plane trees [J]. *Dissertation Abstracts*, 1963, 23: 1857-1858.
- Christen P, Meza JC, Revah S. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*; influence of the substrate type and the presence of precursors [J]. *Mycol Res*, 1997, 101: 911-919.
- Bramorski A, Soccol CR, Christen P, et al. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes [J]. *Braz J Microbiol*, 1998, 29: 208-212.

(下转第 1956 页)