

# 蛋白核小球藻脂溶性化合物的抑菌活性及成分分析

江红霞, 郑怡, 林雄平

(福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007)

**摘要:** 利用纸片法对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* Chick.)脂溶性化合物的粗脂以及经硅胶柱层析分离后的不同组分进行了抑菌实验。结果表明,蛋白核小球藻的粗脂有极强的抑菌活性,其石油醚洗脱组分占总脂的63.9%,抑菌活性最弱;乙醇洗脱组分占总脂的32.2%,抑菌活性最强;苯洗脱组分只占总脂的3.9%,对玉米大斑病菌(*Helminthosporium turcicum* Pass)有极强的抑制活性。各洗脱组分及粗脂对革兰氏阴性菌均无抑制活性。成分分析结果表明,石油醚洗脱组分以烷烃类化合物为主,其中1-十九烯含量最高;苯洗脱组分以6,10,14-三甲基-2-十五酮、十六碳酮和2-十一烷酮这3种酮类化合物为主;而乙醇洗脱组分含有大量的脂肪酸,其中 $\gamma$ -亚麻酸含量最高(56.673%)。蛋白核小球藻脂溶性化合物的抑菌活性是其各种化学成分相互作用的结果。

**关键词:** 蛋白核小球藻;脂溶性化合物;硅胶柱层析;抑菌活性

中图分类号: Q946.8; R978.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2003)01-0001-05

**Antimicrobial activities and chemical compositions of liposoluble compounds of *Chlorella pyrenoidosa***  
JIANG Hong-xia, ZHENG Yi, LIN Xiong-ping (Bioengineering College, Fujian Teacher's University, Fuzhou 350007, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(1): 1-5

**Abstract:** Crude grease and different elution fractions after the separation of the silica gel column chromatography in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. were tested for the antimicrobial activities using the agar disc diffusion method. The crude grease has strong antimicrobial activities. The petroleum ether fraction occupied 63.9% of the total grease and has the most weak antimicrobial activities. The ethanol fraction occupied 32.2% of the total grease and has the strongest antimicrobial activities. The benzene fraction only occupied 3.9% of the total grease, but has stronger antimicrobial activity to *Helminthosporium turcicum* Pass. Every elution fractions and crude grease have no antimicrobial activity to Gram-negative bacteria. The petroleum ether fraction was dominated by hydrocarbon, in which the content of 1-nonadecene is the highest. The benzene fraction was dominated by 3 ketone compounds including 6, 10, 14-trimethyl-2-pentadecanone, Hexadecanone and 2-undecanone. The ethanol fraction has rich fatty acid, in which the content of  $\gamma$ -linolenic acid is the highest (56.673%). The antimicrobial activities of liposoluble compounds in *C. pyrenoidosa* were the results of the work in coordination with its various chemical compositions.

**Key words:** *Chlorella pyrenoidosa* Chick.; liposoluble compounds; antimicrobial activity

近年来的研究表明,许多微藻中含有抗生物质。抗生素是由一类微生物自然产生的,而对其他微藻、细菌、真菌、病毒或原生动物有毒性的抗微生物化合物。微藻所产生的抗生物质大多没有鉴定清楚,已知的有脂肪酸、有机酸、溴酚等酚类抑制剂及丹宁、类萜、多糖和其他碳水化合物以及醇类<sup>[1]</sup>。Pratt等1944年就已从小球藻(*Chlorella vulgaris* Beij.)中分离到1种抗生物质,称为小球藻素(Chlorellin),为脂肪酸混合物,具有抗细菌和自身毒性的功能<sup>[2]</sup>。蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*

Chick.)属于小球藻属(*Chlorella* Beij.),为单细胞生物。本文从蛋白核小球藻提取脂溶性化合物,进行了抗细菌和抗真菌活性实验,并对其化学成分进行了初步的分析,为进一步开发利用微藻资源提供有用的资料。

收稿日期: 2002-08-06

基金项目: 福建省科学技术厅资助项目(K1-142)

作者简介: 江红霞(1974-),女,河南确山人,硕士,主要从事藻类学研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 蛋白核小球藻样品及脂溶性化合物粗提液的制备

蛋白核小球藻干藻粉于2002年5月购于福建莆田神州生物工程有限公司。准确称取15 g藻粉,在索氏提取器上用乙醚(分析纯)回流抽提72 h,减压蒸去有机溶剂后,获得藻细胞的脂溶性化合物粗提物。低温干燥,称重,再加乙醚制成0.2 g/mL的粗提物溶液,保存于4℃冰箱中,以用于抑菌试验。

### 1.2 脂溶性化合物粗提物的分离

对粗提物进行硅胶(60型)柱层析分离。先后用石油醚、苯和无水乙醇为溶剂进行洗脱,根据脂溶性化合物的极性差异,分离获得它们的石油醚洗脱组分(非极性脂)、苯洗脱组分(弱极性脂)和乙醇洗脱组分(强极性脂),并对各部分进行低温干燥称重,再分别加入石油醚、苯和无水乙醇配制成0.2 g/mL的溶液,保存于4℃冰箱中,以用于抑菌实验。

### 1.3 抑菌实验

**1.3.1 受试微生物** 本实验受试微生物共有6种细菌和6种真菌(见表1),菌种均来自福建师范大学生物工程学院微生物实验室和福建农林大学植保系(植物病原菌)。

**1.3.2 抑菌实验方法** 采用纸片法,按陈寅山等(1997)<sup>[3]</sup>的方法制作微生物平板,待冷却后,取已消毒过的直径6 mm的圆形纸片2片,重叠后,分别用微量吸液管加入各种含脂溶液20 μL,略干后,贴于培养基平板上。同时作同一溶剂的空白对照。尔后置于恒温培养箱中倒置培养,18~24 h(细菌琼脂平板)和48~72 h(真菌琼脂平板)后分别观察结果,测量抑菌圈的宽度和大小。

### 1.4 脂溶性化合物化学成分分析

**1.4.1 色谱-质谱(GC-MS)分析** 采用安捷伦6890/5973n色质联用仪,对石油醚和苯洗脱组分各化合物进行分离和结构分析。色谱柱为HP-FFAP毛细管柱,程序升温70~290℃,炉温40~220℃,进样口温度250℃。质谱仪电子轰击能量70 eV,分流进样,分流比20:1,载气为氮气,进样量1.0 μL。

**1.4.2 气相色谱(GC)分析** 乙醇部分极性较强,难以气化,且含有大量色素,先用活性碳吸附除去色素,再按Carreau等(1978)<sup>[4]</sup>的方法甲酯化,然后采用

日本岛津公司GC-17A气相色谱仪进行GC分析。毛细管色谱柱为DB-Was(0.25mm×30m);进样温度280℃;检测器温度295℃;炉温为恒温230℃;载气为N<sub>2</sub>,压力100 kPa,流速为20 mL/min;氢气80 kPa;空气50.5 kPa;进样量1.0 μL。对照样品为标准混合酸甲酯,以归一化法(峰面积法)计算相对含量。

## 2 实验结果

### 2.1 蛋白核小球藻脂溶性化合物含量

15 g干藻粉经乙醚抽提,共获得脂溶性化合物2.429 g,为藻体干重的16.2%。硅胶柱层析后获得石油醚洗脱组分1.552 g,苯洗脱组分0.094 g,乙醇洗脱组分0.783 g,分别占全部洗脱组分的63.9%、3.9%和32.2%。说明蛋白核小球藻脂溶性化合物中以非极性脂为主,其次为强极性脂,弱极性脂的含量极少。

### 2.2 脂溶性化合物粗提物及各洗脱组分的抑菌实验结果

蛋白核小球藻脂溶性化合物洗脱组分的抑菌活性见表1。蛋白核小球藻脂溶性化合物粗提物的抑菌活性极强,在对12种菌的抑菌实验中,只对2种革兰氏阴性菌——大肠杆菌(*Escherichia coli* Castellani et Chalmers)和普通变形杆菌(*Proteus vulgaris* Hauser)没有抑制活性,对其他10种菌都有较强的抑制活性,其中对玉米大斑病菌(*Helminthosporium turcicum* Pass)的抑制活性最强。经层析后,不同洗脱组分显示了不同的抑菌结果。其中,非极性脂的抑菌活性最弱,只对几种敏感菌如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* Cohn)、中华根霉(*Rhizopus chinensis* Saito)和玉米大斑病菌有痕迹量的抑菌活性;强极性脂抑菌活性最强,对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)和中华根霉有较强的抑菌活性;而弱极性脂部分对玉米大斑病菌有较强的抑制作用。脂溶性化合物粗提物及各洗脱组分对革兰氏阴性菌均无抑制活性。

### 2.3 脂溶性化合物各洗脱组分化学成分分析

**2.3.1 石油醚洗脱组分(非极性脂)化学成分分析** 蛋白核小球藻脂溶性化合物石油醚洗脱组分的气相色谱见图1。经过GC-MS分析,分离和鉴定出其化学组成和分子结构。结果表明,石油醚组分以正烷烃系列化合物为主(见图1),其中以1-十九烯炔(峰

1)含量最高,其次为十七烷(峰2),另外还有一定含量的1-十九醇(峰3)和双环[10,8,0]二十碳烷(峰4)。

2.3.2 苯洗脱组分(弱极性脂)化学成分分析 蛋白核小球藻脂溶性化合物的苯洗脱组分的气相色谱见图2。经过分离与鉴定,证明其化学组成以6,10,14-三甲基-2-十五酮(峰1)、十六碳酮(峰2)和2-十一烷酮这3种成分为主。

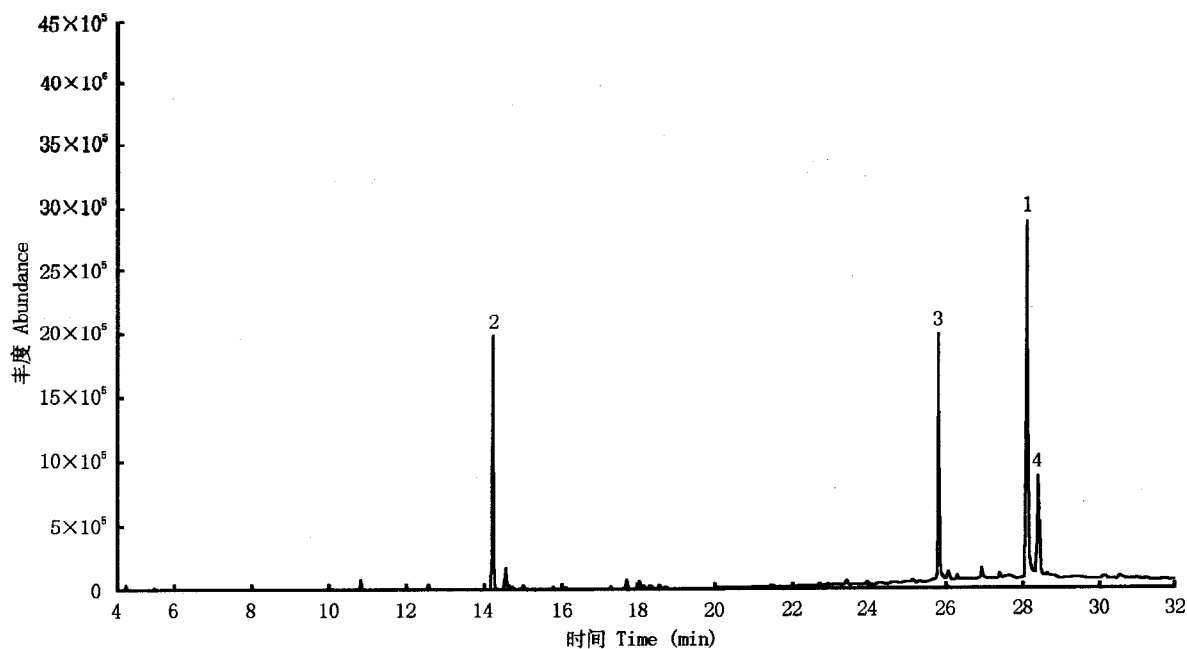
2.3.3 乙醇洗脱组分(强极性脂)化学成分分析 蛋白核小球藻乙醇洗脱组分极性极强,甲酯化后经GC分析共检出12种成分,鉴定出了其中9种主要成分,均为脂肪酸化合物(表2)。其中 $\gamma$ -亚麻酸含量最高,占56.673%;其次为亚油酸和棕榈酸,分别占15.053%和12.486%;另外还含有一定量的棕榈油酸、硬脂酸、油酸和 $\alpha$ -亚麻酸,含量分别为1.472%、1.443%、3.887%和1.665%。

表1 蛋白核小球藻脂溶性化合物粗提物及各洗脱组分的抑菌活性<sup>1)</sup>

Table 1 The antimicrobial activities of crude grease and various elution fractions from *Chlorella pyrenoidosa* Chick.<sup>1)</sup>

脂溶性化合物 Liposoluble Compounds (0.2 $\mu$ L)	细菌 Bacteria						真菌 Fungi					
	革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria				革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria		A.n	R.c	P.c	S.c	H.p	A <sub>15</sub>
	B.s	S.a	S.l	F.o	E.c	P.v						
粗提物 Crude grease	3.5	2.5	7.0	3	-	-	7.5	7.0	7	7.5	16.0	5
石油醚组分 Petroleum ether fraction	tr	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	tr	-
苯组分 Benzene fraction	1.0	1.0	tr	tr	-	-	1.0	tr	2	1.0	5.0	1
乙醇组分 Ethanol fraction	2.0	3.0	1.5	1	-	-	-	3.5	-	-	1.5	2

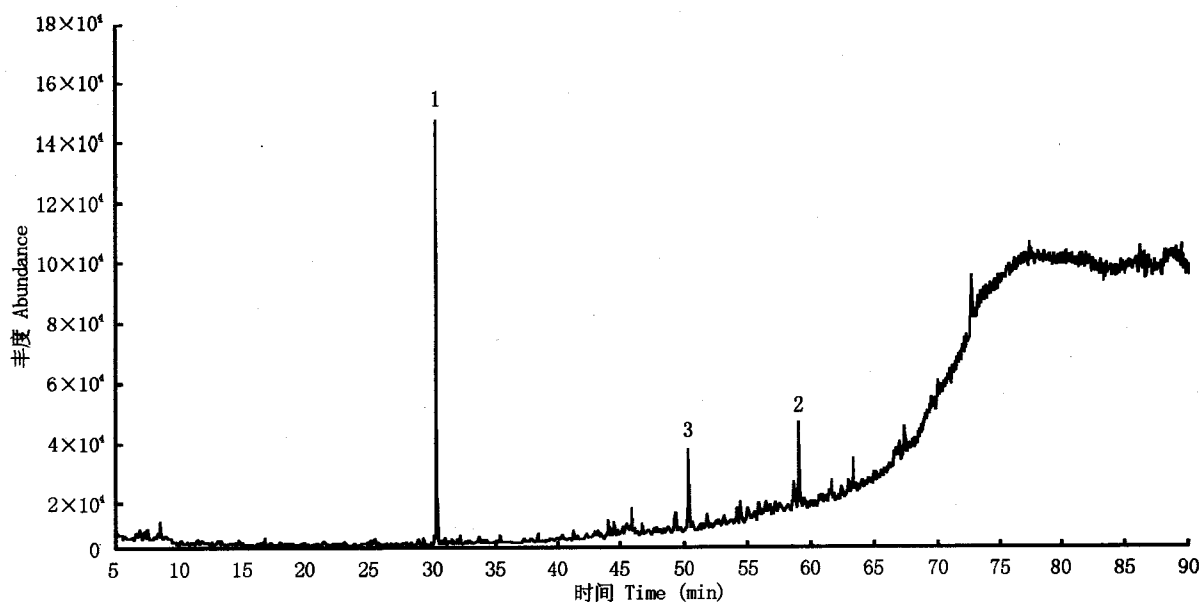
<sup>1)</sup> 表中数字为抑菌圈的宽度,单位为 mm, tr 痕迹量, - 无抑菌活性。The figures in table were the width of inhibitory zone (mm), tr: trace, -: no antimicrobial activity. B.s: 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* Cohn; S.a: 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach; S.l: 膝黄八叠球菌 *Sarcina lutea* Schroeter; F.o: 甘薯薯瘟病原细菌 *Fasarium oxysporum*; E.c: 大肠杆菌 *Escherichia coli* Castellani et Chalmers; P.v: 普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* Hauser; A.n: 黑曲霉 *Aspergillus niger* V. Tiegh; R.c: 中华根霉 *Rhizopus chinensis* Saito; P.c: 产黄青霉 *Penicillium chrysogenum* Thom.; S.c: 啤酒酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen; H.p: 玉米大斑病菌 *Helminthosporium turcicum* Pass; A<sub>15</sub>: 稻瘟病 *Pyricularia oryzae* Cav. A<sub>15</sub>.



Peak 1: 1-十九烯炔 1-nonadecene; Peak 2: 十七烷 Heptadecane; Peak 3: 1-十九醇 1-nonadecanol; Peak 4: 双环[10,8,0]二十碳烷 Bicyclo [10,8,0] eicosane

图1 蛋白核小球藻脂溶性化合物粗提物的石油醚洗脱组分气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatographic spectra of petroleum ether fraction of crude grease from *Chlorella pyrenoidosa* Chick.



Peak 1: 6,10,14-三甲基-2-十五酮 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone; Peak 2: 十六碳酮 Hexadecanone; Peak 3: 2-十一烷酮 2-undecanone

图2 蛋白核小球藻脂溶性化合物粗提物的苯洗脱组分气相色谱图

Fig. 2 Gas chromatographic spectra of benzene fraction of crude grease from *Chlorella pyrenoidosa* Chick.

表2 蛋白核小球藻脂溶性化合物粗提物的乙醇洗脱组分脂肪酸成分

Table 2 The fatty acid compositions in ethanol fraction of crude grease from *Chlorella pyrenoidosa* Chick.

脂肪酸 Fatty acid	保留时间 Retention time(min)	相对含量 Relative content(%)
棕榈酸 C(16:0) Palmitic acid	3.778	12.486
棕榈油酸 C(16:1) Palmitoleic acid	4.032	1.472
硬脂酸 C(18:0) Stearic acid	5.047	1.443
油酸 C(18:1) Oleic acid	5.278	3.887
亚油酸异构体 I C(18:2) Linoleic acid mutamer I	5.578	5.264
亚油酸异构体 II C(18:2) Linoleic acid mutamer II	5.741	2.100
亚油酸异构体 III C(18:2) Linoleic acid mutamer III	5.859	7.689
$\alpha$ -亚麻酸 C(18:3) $\alpha$ -Linolenic acid	6.474	1.665
$\gamma$ -亚麻酸 C(18:3) $\gamma$ -Linolenic acid	6.910	56.673

### 3 讨论

微藻不仅可作为植物蛋白源,还含有多种生物活性物质,一些研究表明,许多微藻的有机溶剂提取物都具有抑菌活性<sup>[5-7]</sup>。Richard等(1988)<sup>[5]</sup>在对微藻的抑菌活性实验中发现,受试微藻提取物对革兰氏阳性菌——枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌有抑制作用,而对革兰氏阴性菌——大肠杆菌均无抑制

作用。在本实验对蛋白核小球藻的研究中,无论是其脂溶性化合物的粗提物,还是其各洗脱组分,均对2种革兰氏阴性菌——大肠杆菌和普通变形杆菌没有抑制活性。说明蛋白核小球藻的脂溶性化合物对革兰氏阳性菌的抑制活性大于对革兰氏阴性菌的抑制活性。

有关藻类提取物对细菌和真菌抑制活性的比较,通常是对细菌的抑制活性大于对真菌的抑制活性<sup>[8,9]</sup>。在本实验对蛋白核小球藻的研究中,其脂溶性化合物的粗提物对真菌的抑制活性明显大于对细菌的抑制活性。因此,不同的藻类对细菌和真菌的抑制活性有明显的差异。

本实验中的蛋白核小球藻以非极性脂为主,占63.9%,其次为强极性脂,占32.2%,弱极性脂只占3.9%。而吴庆余等(1989)<sup>[10]</sup>在对弱细颤藻(*Oscillatoria tenuis* Ag.)脂溶性化合物进行分析时,发现其强极性脂占优势,占藻体干重的96.45%,而非极性脂和弱极性脂含量极少。吴庆余等(1993)<sup>[11]</sup>在对微绿色自养小球藻与乳黄色异养小球藻(*Chlorella protathecoides*)脂溶性化合物分析时发现,绿色自养小球藻也以强极性脂为主,占藻体干重的66%,而乳黄色异养小球藻则以弱极性脂为主,占69%。由此可见,微藻脂溶性化合物不同极性脂的含量不仅与不同的属种有关,同一藻种的不同营养方式也可造成

其不同极性脂含量的显著差异。

在本实验对不同极性脂的抑菌活性比较中发现,非极性脂抑菌活性极弱,强极性脂的抑菌活性最强。非极性脂以各种烷烃类化合物为主,说明烷烃类化合物基本无抑菌活性。弱极性脂的抑菌活性略大于非极性脂,其化学成分以6,10,14-三甲基-2-十五酮、十六碳酮和2-十一烷酮为主,其对玉米大斑病菌有极强的抑制活性,说明玉米大斑病菌对酮类化合物较敏感。强极性脂抑菌活性最强,其中含有大量的 $\gamma$ -亚麻酸、亚油酸、棕榈酸等脂肪酸化合物,说明蛋白核小球藻的脂肪酸化合物有较强的抑菌活性。

从表1的结果可以看出,粗提物的抑菌活性普遍高于各分离组分之和,可能是由于在层析、干燥和用各种溶剂处理过程中部分化合物丧失活性,具体原因有待于进一步的研究确定。

Pratt等<sup>[2]</sup>1944年确定小球藻中的抗生素物质为脂肪酸混合物。本实验的研究也表明,蛋白核小球藻脂溶性化合物中的脂肪酸类化合物有较强的抑菌活性,但弱极性脂中的酮类化合物对某些菌也有较强的抑制作用。总之,蛋白核小球藻的抑菌活性是其脂溶性化合物中各种化学成分相互综合作用的结果。

#### 参考文献:

- [1] 张成武. 微藻中的生物活性物质[J]. 中国海洋药物, 1992, 43(3): 20-29.
- [2] Metting B. 微藻生物活性化合物[J]. 朱明珍译. 海洋药物, 1987, 23(3): 46-49.
- [3] 陈寅山, 郑怡, 卢海声, 等. 福建沿海16种海洋动物抗菌活性的筛选[J]. 中国海洋药物, 1997, 64(4): 24-26.
- [4] Carreau J P, Dubacq J P. Adaptation of macro-scale method to the micro-scale for the fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts[J]. J Chromatogr, 1978, 151: 384-390.
- [5] Richard J P C, Ania M O, John M W. Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae[J]. Br Phycol J, 1988, 23: 41-44.
- [6] Stephen J K, John M W. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture[J]. Br Phycol J, 1989, 24: 191-194.
- [7] 江红霞, 郑怡. 8种微藻抗菌活性研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2002, 18(2): 117-120.
- [8] Padmakumar K, Ayyakkanna K. Seasonal variation of antibacterial and antifungal activities of the extracts of marine algae from Southern Coasts of India[J]. Bot Mar, 1997, 40: 507-515.
- [9] Pesando D, Caram B. Screening of marine algae from French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity[J]. Bot Mar, 1984, 27: 381-386.
- [10] 吴庆余, 己引, 盛国英, 等. 弱细胞藻脂溶性化合物分析[J]. 植物学报, 1989, 31(10): 789-802.
- [11] 吴庆余, 盛国英, 傅家谟. 自养与异养小球藻脂溶性化合物对比研究[J]. 植物学报, 1993, 35(11): 849-858.

## 《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物品种资源研究所和中国农学会遗传资源分会联合主办的专业性学术期刊,由中国工程院院士董玉琛研究员担任主编,2000年创刊,2003年始向国内外公开发刊。报道内容:大田、园艺作物,观赏、药用植物,林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源研究成果和高水平综述或评论。诸如,种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新、信息学和管理学等;以及起源、演化和分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立和遗传多样性研究等。

读者对象:从事植物遗传资源科学研究工作的人员,各有关大专院校的师生,农业行政和推广人员。

季刊,大16开本,96页。定价10元,全年40元。自办发行,可直接向编辑部办理订阅手续,如需邮挂每期另加2元。

地址:100081 北京市中关村南大街12号《植物遗传资源学报》编辑部;电话:010-62186657,62180257;传真:010-62180279