

产 pseurotin A 内生真菌 GYP8 的鉴定

姜 硕^{1,2}, 许哲祥^{1,2}, 王宇晴^{1,2}, 郑春英^{1,2*} (1. 黑龙江大学农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江哈尔滨 150500; 2. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省普通高校微生物重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080)

摘要 [目的]研究甘草内生真菌 GYP8 活性代谢物, 丰富 pseurotin A 植物内生真菌资源库。[方法]利用 HPLC 法对 GYP8 发酵液进行分析; 采用柱色谱分离法对 GYP8 活性成分进行分离、纯化; 采用形态特征观察法及 18SrDNA 序列分析对内生真菌 GYP8 进行菌种鉴定。[结果]内生真菌 GYP8 发酵液中含有 pseurotin A, 经鉴定该菌为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)。[结论] GYP8 是 pseurotin A 产生菌, 该菌的获得可为 pseurotin A 成分的生产提供新方法。
关键词 pseurotin A; 内生真菌; 鉴定
中图分类号 R 931 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)32-0085-03

Identification of Psurotin A-producing Endophytic Fungus GYP8
JIANG Shuo^{1,2}, XU Zhe-xiang^{1,2}, WANG Yu-qing^{1,2} et al (1. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150500; 2. Key Laboratory of Microbiology, College of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080)
Abstract [Objective] To study the active metabolites of endophytic fungi GYP8 from *Glycyrrhiza uralensis* and enrich the pseurotin A endophyte resource pool. [Method] The fermentation broth of GYP8 was analyzed by HPLC. The positive components of GYP8 were separated and purified by column chromatography. Strain identification of the endogenous fungi GYP8 was performed by morphological observation and 18SrDNA sequence analysis. [Result] Compound pseurotin A was isolated from the fermentation broth of GYP8 and endophytic fungus GYP8 was identified as *Aspergillus fumigatus*. [Conclusion] GYP8 is a pseurotin A-producing endophytic fungus, which provides a new means for development and application of pseurotin A.
Key words Psurotin A; Endophytic fungus; Identification

pseurotin A 为重要的微生物次生代谢产物, 是酰胺类生物碱^[1], 也是重要的生化试剂, 是阿朴吗啡拮抗剂, 能抑制壳聚糖合成和单胺氧化酶活性, 具有诱导细胞分化、抗菌和免疫调节作用, 其主要生产渠道为从微生物代谢产物中分离得到^[2]。

笔者在课题组前期研究的基础上, 对具有潜在应用价值的乌拉尔甘草内生真菌 GYP8 发酵液进行分析检测, 发现其发酵液中含有 pseurotin A, 该化合物首次从子囊菌(*Pseudeurotium ovalis* STORK)发酵液中分离得到^[3]。随着对 pseurotin A 活性的深入研究, 人们开始对 pseurotin A 及其类似物进行化学合成以提高产量, 但化学合成生产 pseurotin A 具有环境污染、试剂消耗高、成本高等缺点, 因此发掘新型高产 pseurotin A 菌株是目前研究的课题。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养 供试菌为内生真菌 GYP8, 分离自野生乌拉尔甘草叶(采集地为黑龙江省大庆地区)。PDA 培养基同参考文献[4]。

1.2 仪器与试剂 FL2200 高效液相色谱仪(浙江温岭)。18SrDNA 扩增通用引物 NS1(5'-GTAGTCATATGCTT-GTCTC-3')和 NS6(5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3'), 由上海生工生物工程股份有限公司合成。

试剂: 甲醇为色谱纯级别, 其他试剂均为分析纯。

1.3 内生真菌 GYP8 发酵液制备 取已活化的甘草内生真

菌 GYP8 接种于 60 mL 液体马铃薯培养基中(摇床培养 28 ℃, 140 r/min, 3 d), 制成 1×10⁷ CFU/mL 种子培养液。取种子液以 5%(V/V)的接种量转接至 300 mL 液体马铃薯培养基中(摇床培养 28 ℃, 140 r/min, 14 d), 抽滤, 滤液于 50 ℃减压浓缩, 作为发酵液供试品。

1.4 GYP8 发酵液中活性成分分析与分离

1.4.1 GYP8 发酵液中活性成分分析。取“1.3”供试品, 40 ℃真空减压抽干后, 加入 1 mL 甲醇溶解, 微孔滤膜(0.45 μm)过滤, 取滤液作为供试品溶液。采用 HPLC 法, 分别精密吸取 0.5 mg/mL 的 pseurotin A 对照品液及供试品液各 10 μL 注入 HPLC 仪器, HPLC 检测条件为 Venusil XBP-C₁₈ 柱(柱 4.6 mm×250 mm, 5 μm, USA); 流动相为甲醇: 水: 甲酸(60:40:0.5); 流速 1 mL/min; 柱温 25 ℃; 检测波长 254 nm。

1.4.2 GYP8 发酵液中活性成分分离。取“1.3”制备 GYP8 菌株发酵液 10 L, 50 ℃减压浓缩至 200 mL, 以乙酸乙酯萃取 3 次(3×100 mL), 合并萃取液后减压浓缩, 进行硅胶柱分离, 以石油醚: 乙酸乙酯=15:5 为洗脱剂, 用薄层鉴别(TLC)对其进行检测(GF₂₅₄ 薄层板, 石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸=15:15:2)(100 mm×200 mm), 依据 TLC 检识结果, 合并成分相似或相同的洗脱液; 得粗晶体后二次硅胶柱层析, 以石油醚: 乙酸乙酯=15:15 为洗脱剂, 根据薄层鉴别结果合并洗脱液, 回收溶剂, 重结晶, 得到化合物单体。

1.5 内生真菌 GYP8 的鉴定

1.5.1 内生真菌 GYP8 形态学鉴定。参考文献[5]方法进行。采用平板 PDA 培养基培养 GYP8(28 ℃, 7 d), 观察形态特征; 同时取同培养 2 d 的 GYP8 PDA 平板, 将灭菌盖玻片倾斜插入该平板中, 继续培养 3 d, 取出, 取盖玻片, 清除背面附

基金项目 黑龙江省自然科学基金项目(面上项目)(H2015003)。
作者简介 姜硕(1997—), 女, 黑龙江大庆人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物制药。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事微生物制药研究。
收稿日期 2018-09-27

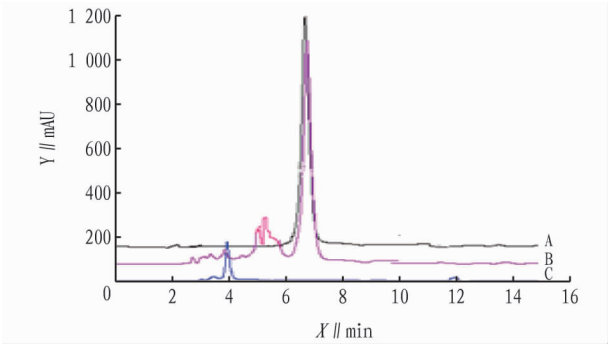
着物,显微镜下观察 GYP8 菌株的孢子显微特征,初步确定菌株的分类地位^[6]。

1.5.2 内生真菌 GYP8 18SrDNA 序列扩增及序列分析。参阅文献[7]方法进行。PCR 产物纯化后,测序工作委托上海生工生物工程股份有限公司完成。所测得序列提交 GenBank 数据库,利用 MEGA5.05 构建系统发育树,确定 GYP8 菌株的分类地位。

2 结果与分析

2.1 GYP8 发酵液中活性成分分离结果

2.1.1 GYP8 发酵液中活性成分分析结果。按“1.4.1”HPLC 分析,甘草内生真菌 GYP8 发酵液中可能含有 pseurotin A,供试品色谱中,在与 pseurotin A 对照品相同保留时间位置上,有相同的色谱峰出现(图 1),PDA 空白培养基相应保留时间位置未见任何色谱峰出现。



注:A.pseurotin A 对照品;B.GYP8 发酵液;C.PDA
Note:A.Pseurotin A reference substance;B.GYP8 fermentation broth;
C.PDA

图1 菌株 GYP8 发酵液分析结果
Fig.1 The HPLC results of GYP8 strain

2.1.2 GYP8 发酵液中活性成分分离结果。按“1.4.2”分离方法所得为无色粉末状结晶。薄层鉴别结果显示,该晶体与 pseurotin A 对照品在相同位置显相同颜色斑点(图 2)。MS 鉴定结果为 Positive MS: 454.3 [M+Na]⁺, 885.4 [2M+Na]⁺, Negative MS: 429.9 [M-H]⁻, 861.5 [2M-H]⁻。¹H-NMR (MeOD, 400 MHz) δ: 4.57 (dd, J=6.4, 8.8 Hz, H-11), 5.36 (dd,



注:左为 pseurotin A 对照品;右为 GYP8 发酵液中晶体
Note:Left is pseurotin A reference substance;right is crystal in GYP8 fermentation broth

图2 菌株 GYP8 发酵液薄层鉴别结果
Fig.2 The TLC results of GYP8 strain

J=8.8, 9.8 Hz, H-12), 5.52 (dt, J=7.6, 9.8 Hz, H-13), 0.87 (t, J=7.2 Hz, H-15), 8.25 (d, J=7.6 Hz, H-19, 23), 7.4 (t, J=7.6 Hz, H-20, 22), 7.55 (t, J=7.6 Hz, H-21)。以上数据与文献[8]报道的 pseurotin A 完全一致,结果确定所得结晶为 pseurotin A,分子量为 431.44,分子式为 C₂₂H₂₅NO₈,元素分析 C 61.25;H 5.84;N 3.25;O 29.67,其结构如图 3 所示。

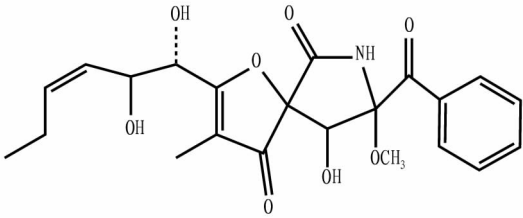


图3 pseurotin A 的结构
Fig.3 The structure of pseurotin A

2.2 内生真菌 GYP8 鉴定结果

2.2.1 内生真菌 GYP8 形态学鉴定结果。甘草内生真菌 GYP8 菌落翠绿色,边缘白色,产生翠绿色粉末,基质淡黄色(图 4);甘草内生真菌 GYP8 菌株的分生孢子呈穗圆筒形,颜色深浅不一,分生孢子梗绿色光滑无突起,顶囊向外突出呈现烧瓶状,且只有上半部产生孢子(图 5)。

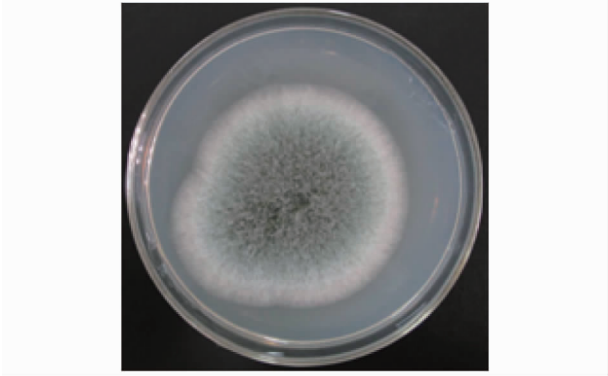


图4 内生真菌 GYP8 的菌落形态
Fig.4 The colony morphology of GYP8

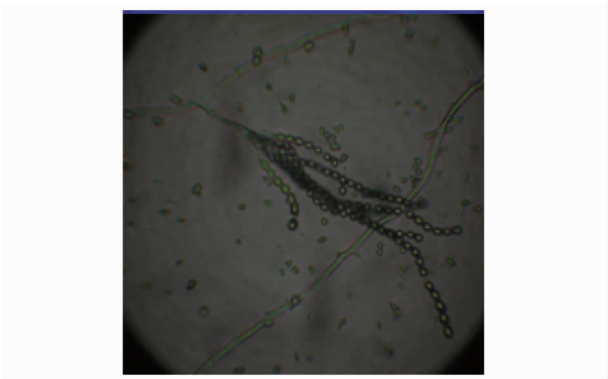


图5 内生真菌 GYP8 的孢子显微结构
Fig.5 The spore microstructure of GYP8

2.2.2 内生真菌 GYP8 18SrDNA 序列扩增及序列分析结果。甘草内生真菌 GYP8 DNA 经 PCR 扩增获得 1 条 1 305 bp 的特异性条带(图 6),将测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源性比对,然后用 MEGA5.05 软件构建系统发育树(图 7),内

生真菌 GYP8 序列(登录号:KR233004)与 *Aspergillus fumigatus*(M60300.1)序列的同源性最高,相似性为 99%。综合鉴定结果,确定甘草内生真菌 GYP8 为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)。

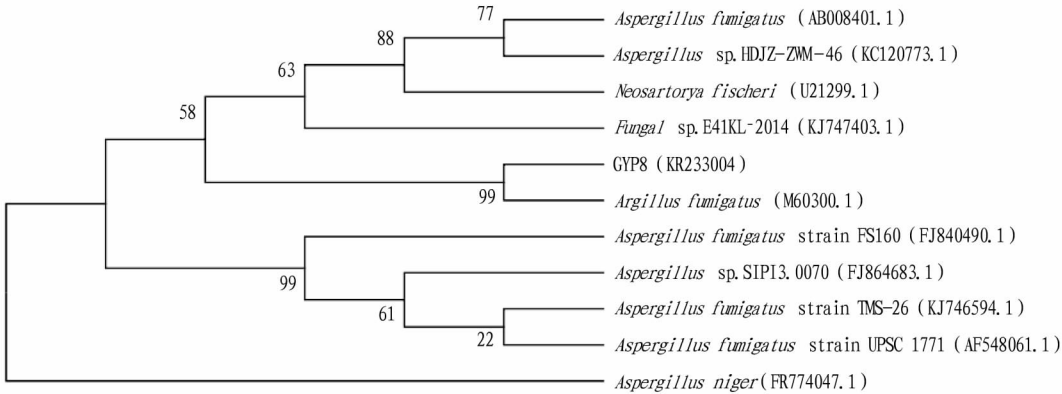


图 6 菌株 GYP8 的系统进化树
Fig.6 The phylogenetic tree of GYP8 strain

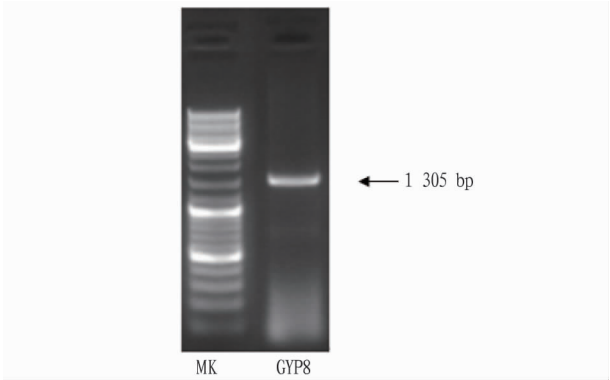


图 7 GYP8 菌株 PCR 产物扩增结果
Fig.7 The PCR products of GYP8 strain

3 结论

该研究从乌拉尔甘草叶片中分离得到内生真菌 GYP8, 对其进行活性代谢物研究发现,在其发酵液中存在大量活性化合物,并且存在与宿主植物乌拉尔甘草相似的化合物。选择内生真菌 GYP8 作为研究对象,对其进行系统研究,从其发酵液中分离得 pseurotin A,对菌株 GYP8 进行菌种鉴定,结

果为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*),该菌株为 pseurotin A 产生菌。

参考文献

[1] LI X J,ZHANG Q,ZHANG A L,et al.Metabolites from *Aspergillus fumigatus*,an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*,and their anti-fungal,antifeedant,and toxic activities[J].J Agric Food Chem,2012,60(13):3424-3431.
[2] MITCHELL J M,FINNEY N S.Synthetic studies of pseurotin A;Preparation of an advanced lactam aldehyde intermediate [J].Org Biomol Chem,2005,3(23):4274-4281.
[3] ISHIKAWA M,NINOMIYA T,AKABANE H,et al.Pseurotin A and its analogues as inhibitors of immunoglobuline E production[J].Bioorganic & medicinal chemistry letters,2009,19(5):1457-1460.
[4] 徐慧超,孙婷媛,翟李欣,等.产甘草次酸内生真菌 RE7 的鉴定及抑菌活性研究[J].中国新药杂志,2016,25(1):102-105.
[5] 吴桐,白长胜,谭佳音,等.乌拉尔甘草内生真菌的分离及其抑菌活性研究[J].中国食品学报,2014,14(2):154-160.
[6] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
[7] YANG Q X,ZHANG J,ZHU K F,et al.Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil[J].Journal of environmental sciences,2009,21(7):954-959.
[8] RATEB M E,HALLYBURTON I,HOUSSEN W E,et al.Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture [J].RSC Adv,2013,3(34):14444-14450.

名词解释

- 来源文献量:指来源期刊在统计当年发表的全部论文数,它们是统计期刊引用数据的来源。
- 文献选出率:按统计源的选取原则选出的文献数与期刊的发表文献数之比。
- 参考文献量:指来源期刊论文所引用的全部参考文献数,是衡量该期刊科学交流程度和吸收外部信息能力的一个指标。
- 平均引文数:指来源期刊每一篇论文平均引用的参考文献数。
- 平均作者数:指来源期刊每一篇论文平均拥有的作者数,是衡量该期刊科学生产能力的一个指标。
- 地区分布数:指来源期刊登载论文所涉及的地区数,按全国 31 个省区市计(不包括港澳台)。这是衡量期刊论文覆盖面和全国影响力大小的一个指标。
- 机构分布数:指来源期刊论文的作者所涉及的机构数。这是衡量期刊科学生产能力的另一个指标。
- 海外论文比:指来源期刊中,海外作者发表论文占全部论文的比例。这是衡量期刊国际交流程度的一个指标。
- 基金论文比:指来源期刊中,各类基金资助的论文占全部论文的比例。这是衡量期刊论文学术质量的重要指标。
- 引用半衰期:指该期刊引用的全部参考文献中,较新一半是在多长一段时间内发表的。通过这个指标可以反映出作者利用文献的新颖度。