

18 株海洋内生真菌发酵产物初步筛选及活性研究

Preliminary screening and biological activity of fermentation products of 18 marine endophytic fungi strains

孙彬秩 田振华 刘旭

SUN Bin-zhi TIAN Zhen-hua LIU Xu

(山东大学海洋学院, 山东 威海 264200)

(Marine College, Shandong University, Weihai, Shandong 264200, China)

摘要:对海洋内生真菌进行化学筛选和生物活性筛选,并对由不同碳源、氮源、生长因子培养基发酵得到的样品进行评估。采用高效液相色谱法对 18 株海洋内生真菌发酵产物的乙酸乙酯提取物进行分析,并进行体外抗氧化和抗菌活性筛选。结果表明,样品 150103(培养基 1)乙酸乙酯提取物在浓度 10 mg/mL 时对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌有强烈的抑制效果,抑菌圈直径分别为 12, 11 mm; 对大肠杆菌无明显抑菌效果,且对 DPPH 自由基的清除率大于 90%。高效液相色谱分析结果显示,样品 150103(培养基 1)提取物所含的次生代谢产物种类较多,含量丰富。样品 150103(培养基 1)提取物所含次生代谢产物较多、含量较大,且在体外具有较强的抗菌、抗氧化活性,值得深入研究。

关键词:内生真菌; 次生代谢产物; 抗氧化; 抗菌

Abstract: A total of 18 strains of marine endophytic fungi were fermented by three fermentation media with significantly different carbon sources, nitrogen sources and growth factors, which was gotten from 54 fermentation products. These 54 fermentation products were evaluated through chemical screening and bioactivity screening. The ethyl acetate extract of 18 strains of marine endophytic fungus was screened by HPLC, antioxidant activity in vitro and antibacterial activities. Ethyl acetate extract (10 mg/mL) of the strain 150103 (medium 1) could inhibit *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* effectively. The diameter of inhibition zone is 12 mm and 11 mm respectively. It couldn't inhibit *Escherichia coli* evidently. It could remove more than 90% of DPPH free radicals. According to the HPLC results, extract of the Strain 150103 (medium 1) is rich of secondary metabolites. The Strain 150103 (medium 1) is rich of secondary metabolites, has strong antibacterial and antioxidant activity in vitro,

and deserves deep research.

Keywords: endophytic fungus; secondary metabolites; antioxidant; antibacterial

内生真菌是指生活在健康动植物的组织、器官内部细胞内或细胞间隙的一类微生物,在长期的进化过程中和宿主形成了互惠互利、相互制约的共生关系^[1]。由于独特的生存环境,内生真菌往往可以产生与宿主相同或相似生理活性的次生代谢产物,如从短叶红豆杉韧皮部分离的内生真菌 *Taxomyces andreanae* 能够产生具有抗癌活性的紫杉醇及其类似物^[2]。目前已有的报道^[3]显示,内生真菌的代谢产物具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化等生理活性。内生真菌产生的抗菌成分种类较多,因为宿主不同而产生的具有抗菌活性的次生代谢产物有丰富的多样性,现已报道的具有抗菌活性的次生代谢产物包括生物碱、环肽、萜类、醌类、甾体、脂肪酸等^[4]。Afra 等^[5]研究显示内生真菌的提取物有较好的抗氧化活性,表明内生真菌能够产生抗氧化活性的次生代谢产物,同时也是抗氧化活性物质的重要来源。因此,内生真菌作为一类次生代谢产物丰富且生理活性较好的微生物资源愈发受到人们的青睐。

海洋内生真菌研究相对较晚,主要集中在近 20 年,但发展迅速。迄今,从海洋内生真菌中分离得到的新化合物已超过 1 000 种^[6]。海洋内生真菌具有培养条件简单、生长迅速、易生产等优点,并且为了适应海洋环境高压、高盐、低温、低营养等特点,往往会产生新的代谢途径,从而在生长代谢过程中产生、积累大量的结构新、活性强的代谢产物,是新药开发的资源宝库。

本试验拟对 18 株来源于海洋的内生真菌采用化学筛选和生物活性筛选双重模式,并综合考虑生物量、生物活性两方面,旨在筛选次生代谢产物丰富、生物活性较好的菌株,为开发利用海洋内生真菌提供试验方法和手段。

作者简介:孙彬秩(1994—),男,山东大学在读本科生。

E-mail: SUNbz1001@163.com

收稿日期:2015-12-02

1 材料与方法

1.1 菌株来源

18株内生真菌:分离自鼠尾藻、松节藻、蜈蚣藻、凹顶藻和海洋动物海绵(2015年春季于威海金海湾、国际海水浴场近海的潮间带采得),山东大学(威海)国际生物技术研发中心。

1.2 指示菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*):山东大学(威海)海洋学院。

1.3 培养基配方

1.3.1 分离培养基

(1) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA):200 g 土豆去皮,加入 1 L 纯水,煮沸 30 min,过滤。在滤液中加入葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,氯霉素 0.1 g,用蒸馏水补足 1 L, pH 值自然。

(2) 马丁氏培养基(Martin's agar medium, MA):葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,磷酸二氢钾 1 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,孟加拉红 0.03 g/L,氯霉素 0.1 g/L,琼脂 15 g/L,蒸馏水 500 mL,陈海水 500 mL, pH 值自然。

(3) YM 琼脂培养基(YM agar medium, YM):葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,麦芽浸粉 3 g/L,酵母浸膏 3 g/L,氯霉素 0.1 g/L,琼脂 18 g/L,蒸馏水 500 mL,陈海水 500 mL,调整 pH 值为 6.3±0.2。

1.3.2 发酵培养基

(1) 培养基 1:山梨醇 20 g/L,麦芽糖 20 g/L,味精 10 g/L,酵母膏 3 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ 0.3 g/L,蒸馏水 500 mL,陈海水 500 mL。

(2) 培养基 2:葡萄糖 4 g/L,麦芽糖 10 g/L,酵母膏 4 g/L,蒸馏水 500 mL,陈海水 500 mL。

(3) 培养基 3:葡萄糖 20 g/L,酵母膏 5 g/L,30%土豆浸出汁 500 mL,陈海水 500 mL。

1.3.3 抗细菌活性测试培养基

水解酪蛋白胨培养基(mueller-hiton medium, MH):牛肉粉 2 g/L,可溶性淀粉 1.5 g/L,酸水解酪蛋白 17.5 g/L,琼脂 17 g/L,调整 pH 值为 7.4±0.2。

1.4 仪器

立式压力蒸汽灭菌锅: DZX-50KBS 型,上海申安医疗器械厂;

超净工作台: DL-CJ-1F 型,北京东联哈尔滨仪器制造有限公司;

普通培养箱: 1535 型,丹麦 heto 公司;

旋转蒸发仪: N-1001 型,上海爱朗仪器有限公司;

紫外可见分光光度计: T6 新世纪,北京普析通用仪器有限公司;

高效液相色谱: Agilent 1100 型,安捷伦科技有限公司。

1.5 方法

1.5.1 内生真菌的分离、纯化 无菌条件下用无菌水洗去海藻及海绵表面杂质,75%乙醇浸泡 15 s,活性氯浓度为 3.6%的次氯酸钠溶液浸泡 30 s,无菌水冲洗表面 3 次。对表面消毒后的海藻和海绵采用漂洗液检验法做阴性对照^[7]。将待分离的海藻去除褐变部分,于无菌玻璃皿上切成小块,并切口处向下插入培养基内。取适量海绵于无菌研钵内,加入 4 mL 无菌水,研磨,吸取 100 μL 研磨液加入培养基中,并涂布。

每一个样品同种分离培养基做 2 个平行对照,28 °C 恒温培养 4~14 d,当培养基上长出大小适当的菌落时,于菌落边缘挑取小块转接于无菌的马铃薯葡萄糖琼脂培养基中进行纯化^[8]。纯化菌株于 4 °C 保存。

1.5.2 内生真菌发酵培养及待测样品的制备 100 mL 试管中加入 30 mL 发酵培养基,无菌环境下挑取适量纯化菌株的菌丝体接入发酵培养基内。每种菌株选用 3 种培养基进行发酵,室温下静置 35 d。

发酵结束后,向试管内加入适量乙酸乙酯,静置灭菌。48 h 后充分振荡,待静置分层后取上层萃取液(乙酸乙酯相),减压浓缩,得到发酵物粗提物。粗提物用二氯甲烷-甲醇(二氯甲烷:甲醇=1:5)溶液配置成 10 mg/mL,备用。

1.5.3 高效液相色谱分析条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-水;洗脱顺序: 梯度淋洗,洗脱梯度为: 0~5 min, 5% 甲醇; 5~35 min, 5%~100% 甲醇; 35~50 min, 100% 甲醇;检测波长: 215 nm;进样量: 10 μL。

1.5.4 抗细菌活性的测定 试验前将指示菌株于 37 °C 活化 24 h 后,用涂布法接种到水解酪蛋白胨培养基上备用。采用滤纸片扩散法测定内生真菌次生代谢产物的抗菌活性^[9]。

无菌环境下吸取粗提物溶液 10 μL,溶于滤纸片(Φ=0.6 cm)上,充分吸收、晾干后贴在含有指示菌株的培养皿中。每一个样品做 2 个平行。以纯甲醇作为空白对照,氯霉素和氨苄西林为阳性。将制备好的培养皿于 37 °C 恒温培养 24 h 后,观察结果,记录抑菌圈直径。

1.5.5 抗氧化活性的测定 采用 DPPH 自由基(1,1-二苯基-2-苦肟基自由基)清除体系来测定样品的抗氧化活性^[10]。配置浓度为 0.16 mmol/L 的 DPPH 甲醇溶液,以 V_c 作为阳性对照,按式(1)的方法加样,室温下暗处反应 30 min,在波长 517 nm 处测定吸光度 A 值。每个样品测 3 次,取平均值。清除率按式(1)计算:

$$R = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R——清除率, %;

A_{sample}——1.8 mL 甲醇中加入 200 μL 样品后,再加入 2 mL DPPH,暗处反应 30 min 后所测得 A 值;

A_{blank}——3.8 mL 甲醇中加入 200 μL 样品,暗处反应 30 min 后所测得 A 值;

A_{control} ——2 mL 甲醇加入 2 mL DPPH,暗处反应 30 min 后所测得的 A 值。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱分析

HPLC—UV 指纹图谱是最直接、最清晰反应菌株次生代谢产物多样性的生物手段,根据 HPLC 谱图中的色谱峰数目、保留时间、吸收强度等选出极性适中、含量较多、紫外吸收较强的菌株作为进一步试验研究的对象。

高效液相色谱分析结果显示,18 株内生真菌在不同培养基上所产生的次生代谢产物在成分和含量上均有一定的差异。在 54 个样品中,样品 150702(培养基 1)、151203(培养基 3)、151501(培养基 3)所含的次生代谢产物成分最为丰富、含量最大。由图 1 可知,150702(培养基 1)的乙酸乙酯提取物的峰数相对较多,说明菌株 150702 在培养基 1 中所产生的次生代谢产物种类最多。

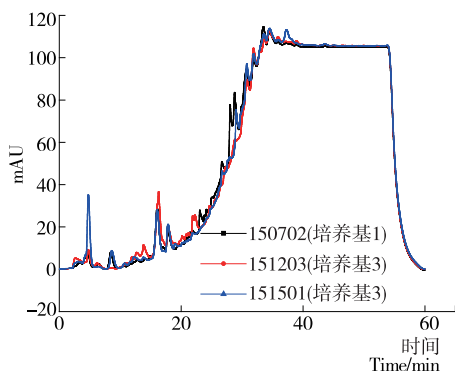


图 1 不同样品乙酸乙酯提取物的 HPLC 图

Figure 1 The HPLC analysis of the ethyl acetate of samples

2.2 抗菌活性试验结果与分析

内生真菌是一个庞大而特殊的真菌类群,其产生的次生代谢产物也具有多样性和较好的生物活性。高敬红等^[11]从 1 株镰刀菌属的内生真菌中,分离得到了具有抗革兰氏阳性菌的环脂肽类抗生素——恩镰孢菌素 B(enniatin B)。苏印泉等^[12]以金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌为指示菌株,对从杜仲分离得到的 20 株内生真菌及其次生代谢物进行抗菌活性筛选。结果表明,有 19 株的代谢产物至少对 1 种指示菌株具有抑菌活性,其中有 3 株内生真菌的次生代谢产物对所有的指示菌株均有较强抑制作用。

当 18 株海洋内生真菌经发酵得到的 54 个提取物的浓度为 10 mg/mL 时,150103(培养基 1)、151205(培养基 1)、151205(培养基 2)、150703(培养基 2)、150702(培养基 2)5 个样品对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌显示了不同程度的抑菌效果(见表 1),但所有样品对大肠杆菌均无明显抑制效果。

2.3 抗氧化活性试验结果与分析

自由基是机体产生的具有较强氧化性的有害化合物,可对人体的组织和细胞产生损害,从而引起机体的衰老或慢性疾病。DPPH 是一种比较稳定的自由基,常被用于体外抗氧化活性评价^[13-14]。由图 2 可知:除 150404 和 150601 两菌株

经 3 种培养基发酵得到的样品具有相似的 DPPH 自由基清除能力外,其余菌株的均显示出较大差异。当粗提物浓度为 10 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率在 50% 以上的样品有 14 个,其中 150103(培养基 1)、151203(培养基 1)、151205(培养基 3)、151204(培养基 3)4 个样品清除率达到 90% 以上。

表 1 部分内生菌发酵提取物的抗菌活性[†]

Table 1 The antibacterial activity of endophytic fungi

菌株编号	培养基	抑菌圈直径/mm		
		金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌
150103	培养基 1	11	12	—
151205	培养基 1	13	10	—
151205	培养基 2	9	9	—
150703	培养基 2	9	8	—
150702	培养基 2	10	9	—

† “—”代表没有抗菌活性。

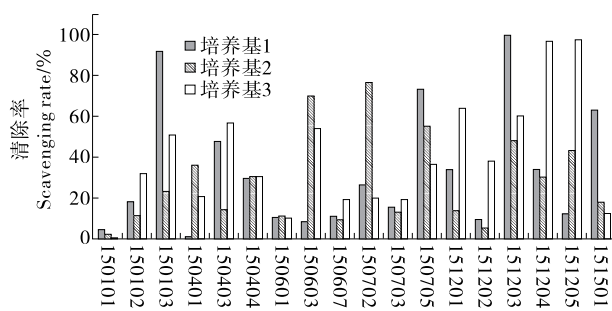


图 2 各样品清除 DPPH 的效果

Figure 2 The scavenging effect of the samples of DPPH

3 结论

本试验综合采用生物活性筛选和化学筛选(高效液相色谱分析)双重模式对海洋内生真菌发酵产物进行筛选。相较于单一的生物活性筛选模式,双重筛选模式在关注海洋内生真菌次生代谢产物生物活性的同时,还对次生代谢产物的种类及生物量进行了考量。综合考虑生物量、生物活性两方面,能够筛选出次生代谢产物丰富、生物活性较强的菌株,为从海洋内生真菌中分离得到新化合物和生物活性较强的化合物提供了较好的研究手段。

此外,考虑到微生物可能会因为培养基差异而采取不同的代谢方式,本试验中选择 3 种碳源、氮源及生长因子有一定差异的液体培养基对分离的内生真菌进行发酵。所选用的 3 种培养基之中,培养基 1 和培养基 2 相较于培养基 3,在营养成分上较为贫乏,迟效营养物质相对较多,更有利于内生真菌发酵生产次生代谢产物。当然,内生真菌产生的次生代谢产物除了和发酵培养基成分有一定关系,还与自身的代谢方式紧密相关。

综合试验结果分析,尽管样品 150103(培养基 1)的次生代谢产物种类较少,但显示出较好的抗菌、抗氧化活性,可作为潜在的具有良好生物活性的次生代谢产物继续研究。但活性菌株粗提取物成分分离和菌株鉴定还有待进一步研究。

(下转第 74 页)

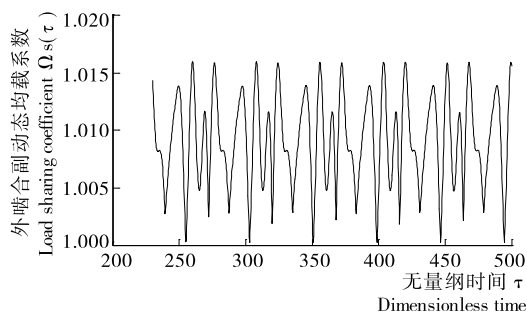


图7 优化后系统外啮合副均载性能

Figure 7 Load sharing property of external gear pair after optimization

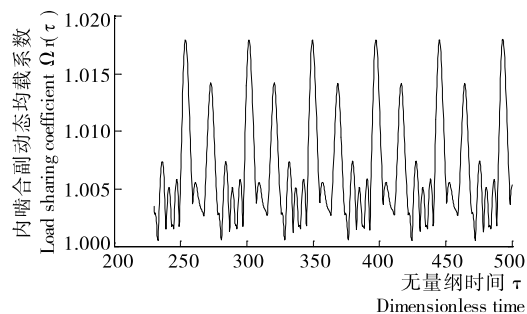


图8 优化后系统内啮合副均载性能

Figure 8 Load sharing property of internal gear pair after optimization

动力学优化的本质,基于遗传算法搜索技术以及行星齿轮传动系统的弯扭耦合振动模型,完成了某2K-H型行星齿轮减速器动态均载性能的优化设计。

(2) 数值试验表明,采于遗传算法进行行星齿轮减速器均载性能的动力学优化是非常高效的,优化后的行星齿轮减

速器均载性能较优化前有了显著提高。

参考文献

- [1] 张媛, 冷崇杰, 王晶. 行星齿轮减速器内齿圈模态分析[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 110-112.
- [2] 叶福民, 朱如鹏, 鲍和云, 等. 非等模数非等压力角行星齿轮系的动力学均载特性[J]. 华南理工大学学报, 2011, 39(1): 117-123.
- [3] 陆俊华, 朱如鹏, 靳广虎. 行星传动动态均载特性分析[J]. 机械工程学报, 2009, 45(5): 85-90.
- [4] Kahraman A. Load sharing characteristics of planetary transmissions[J]. ASME, Mechanism and Machine Theory, 1994, 29(8): 1 151-1 165.
- [5] 周建星, 董海军. 基于非线性动力学的行星传动均载性能研究[J]. 机械科学与技术, 2008, 27(6): 808-811.
- [6] Singh A. Application of a system level model to study the planetary load sharing behavior[J]. ASME, Journal of Mechanical Design, 2005, 127(12): 469-476.
- [7] 袁茹, 王三民, 沈允文. 行星齿轮传动的功率分流动态均衡优化设计[J]. 航空动力学报, 2000, 15(4): 410-412.
- [8] 李同杰, 朱如鹏, 鲍和云, 等. 行星齿轮系扭转非线性振动建模与运动分岔特性研究[J]. 机械工程学报, 2011, 47(21): 76-83.
- [9] Li Tong-jie, Zhu Ru-peng, Bao He-yun. Stability of motion state and bifurcation properties of planetary gear train[J]. Journal of Central South University of Technology, 2012, 19: 1 543-1 547.
- [10] 方宗德, 沈允文, 黄镇东. 2K-H行星减速器的动态特性[J]. 西北工业大学学报, 1990, 10(4): 361-371.
- [11] 成大先. 机械设计手册[M]. 5版. 北京: 化学工业出版社, 2008: 14-120.

(上接第43页)

参考文献

- [1] Kleoppe J W, Schipper B, Bakker P. Proposed elimination of the term endorhizosphere [J]. Phytopathology, 1992, 82: 726-727.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew[J]. Science, 1993, 260: 214-216.
- [3] Joseph B, Priya R M. Bioactive compound from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review[J]. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 1(3): 291-309.
- [4] 卢轩, 靳立春, 冯宝民. 具有抗菌活性的植物内生微生物代谢产物研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(11): 892-899.
- [5] Afra Khiralla, Ietidal Mohamed, Justinme Thomas, et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from Sudanese medicinal plants[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2015, 8(9): 701-704.
- [6] Rateb ME, Ebel R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats[J]. Nat Prod Rep, 2011, 28(2): 290-344.
- [7] 何佳, 刘笑洁, 赵启美, 等. 植物内生真菌分离方法的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(15): 180-183.
- [8] 张玲, 张庆波, 陈玉婵, 等. 18株南海海洋真菌的初步鉴定及其发酵产物的细胞毒活性和抗菌活性筛选[J]. 热带海洋学报, 2013, 32(3): 47-51.
- [9] 马养民, 田从丽, 张弘驰. 杜仲内生真菌的分离鉴定及抗菌活性筛选[J]. 李时珍国医国药, 2011, 22(3): 552-554.
- [10] Moon J K, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(5): 1 655-1 666.
- [11] 高敬红, 易大为, 邹宇, 等. 一株银杏内生真菌抗菌代谢产物的分离与鉴定[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(10): 728-731.
- [12] 苏印泉, 朱红薇, 马希汉, 等. 杜仲内生真菌的抑菌活性筛选[J]. 西北植物学报, 2005, 25(6): 1 153- 1 157.
- [13] 金莹, 孙爱东, 胡晓丹, 等. 苹果多酚的超声波提取及其抗氧化性作用研究[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(5): 137-141.
- [14] 王淑霞, 张爱梅, 张俊杰, 等. 龙眼核多酚物质的液质联用分析及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 196-203.