

产甘油三油酸酯的薏苡内生真菌 *Gibberella moniliformis* AH13 发酵培养基的筛选

文 先^{1,2}, 程 诺², 韩 婷², 陈贵林^{1,2}, 贾 敏^{2,①}, 秦路平^{2,①}

(1. 内蒙古大学生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010021; 2. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433)

Screening on fermentation medium of endophytic fungi *Gibberella moniliformis* AH13 producing triolein from *Coix lacryma-jobi* WEN Xian^{1,2}, CHENG Nuo², HAN Ting², CHEN Guilin^{1,2}, JIA Min^{2,①}, QIN Luping^{2,①} (1. College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(3): 118–120

Abstract: Fermentation medium of endophytic fungi *Gibberella moniliformis* AH13 producing triolein from *Coix lacryma-jobi* Linn. was screened. The results show that fermentation products of *G. moniliformis* AH13 in potato dextrose liquid medium (PDB), *C. lacryma-jobi* seed medium (Adlay) and rice medium (Rice) all contain triolein with contents of 10.27, 87.48 and 152.65 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, while that in MS medium and B₅ medium does not contain triolein. It is indicated that Rice medium is suitable for fermentation culture of *G. moniliformis* AH13 to produce triolein. With enhancing of mass concentration (5–30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) of Rice medium, triolein content in fermentation product increases gradually and it is the highest (213.79 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) in 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Rice medium. It is suggested that 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Rice medium is the suitable medium for fermentation culture of *G. moniliformis* AH13 in *C. lacryma-jobi* to produce triolein.

关键词: 薏苡; 内生真菌; *Gibberella moniliformis* AH13; 甘油三油酸酯; 培养基筛选

Key words: *Coix lacryma-jobi* Linn.; endophytic fungi; *Gibberella moniliformis* AH13; triolein; medium screening

中图分类号: Q939.9; Q948.12⁺2.3 文献标志码: A 文章编号: 1674–7895(2015)03–0118–03

DOI: 10.3969/j.issn.1674–7895.2015.03.18

薏苡 (*Coix lacryma-jobi* Linn.) 为禾本科 (Poaceae) 薏苡属 (*Coix* Linn.) 1 年生草本植物, 其干燥成熟种仁为薏苡仁, 药食兼用; 薏苡仁中粗蛋白含量 13% ~ 14%, 脂类含量 2% ~ 8%, 且富含薏苡仁酯^[1]。薏苡仁具有抗肿瘤^[2–5]、提高机体免疫力^[6]、降血糖^[7–8]、抗炎镇痛^[9]、调节血脂代谢^[10]和抑制骨质疏松^[11]等药理作用。薏苡仁油中的主要抗肿瘤活性成分是甘油三酯类成分, 该成分也是评价薏苡仁药材质量的指标成分^[5], 以其为有效成分制成的注射用乳剂 (即康莱特注射液) 现已作为中国临床普遍应用的抗肿瘤药^[5]。

1993 年, Stierle 等首次分离获得与宿主产生相同成分 (即紫杉醇) 的内生真菌^[12], 此后, 国内外研究人员发现植物内生真菌产生与宿主相同或相似的生物活性成分并不是个别现象, 不仅先后从红豆杉属 (*Taxus* Linn.) 的其他植物中再次分离得到产生紫杉醇的内生真菌^[13], 还分别从喜树 (*Camptotheca acuminata* Decne.)、长春花 [*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don]、蛇足石杉 [*Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev.]、贯叶连翘 (*Hypericum perforatum* Linn.)、足叶草 (*Podophyllum peltatum* Linn.)、平贝母 (*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)、杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliver)、秦艽 (*Gentiana macrophylla* Pall.)

和甘肃棘豆 (*Oxytropis kansuensis* Bunge) 等药用植物中分离获得能产生宿主具有的喜树碱^[14]、长春新碱^[15]、石杉碱甲^[16]、金丝桃素^[17]、鬼臼毒素^[18]、西贝母碱^[19]、绿原酸^[20]、龙胆苦苷^[21]和苦马豆碱^[22–23]等成分的内生真菌菌株^[24]。此外, 内生真菌还能够产生一些结构新颖的活性化合物。由于内生真菌生物多样性高, 其次生代谢产物也是一个巨大的天然产物资源库, 因此, 内生真菌是许多重要药用成分的新来源。

为探索甘油三油酸酯 (triolein) 工厂化生产的新途径、扩大其资源基础, 作者以分离自薏苡的内生真菌 *Gibberella moniliformis* AH13 为研究对象, 对其适宜培养基进行筛选, 以期 triolein 的人工发酵生产提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试内生真菌 *Gibberella moniliformis* AH13^[5] 分离自薏苡, 该菌种的 ITS 序列已提交 GenBank (登录号为 KF775590), 并保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏号为 AF2013030, 4 °C 斜面保存。

收稿日期: 2014–12–08

作者简介: 文 先 (1990—), 女, 蒙古族, 内蒙古通辽人, 硕士研究生, 主要从事药用植物化学方面的研究。

①通信作者 E-mail: jm7.1@163.com; qinluping@126.com

主要仪器和试剂:HYG-A 全温摇瓶柜(太仓市实验设备厂);LC-2010A-HT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);SEDEX 80 ELSD 蒸发光散射器(法国 Sedere 公司);LCQ Deca XP MAX 离子阱液质联用仪(美国 Finnigan 公司),配有标准电喷雾离子源(ESI)和大气压大气压力化学电离源(APCI),分析软件为 MassHunter 在线工作站和 Qualitative Analysis 离线分析软件;KQ5200B 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);XTP-7000 型旋转蒸发仪(上海青浦沪西仪器厂);DFY-500 型高速重要粉碎机(上海鼎广机械设备有限公司);AL104 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];ZORBAX SB-C18 色谱柱(美国 Agilent 公司)。Triolein 标准品(纯度大于 99%)购自美国 Sigma 公司;主要试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 产 triolein 的液体发酵培养基筛选及培养体系优化 参照 Jia 等^[5]的方法、分别采用马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)、薏苡仁培养基(Adlay)、大米培养基(Rice)、MS 培养基和 B₅培养基对 *G. moniliformis* AH13 菌株进行液体培养;采用下述方法分别测定不同培养基发酵产物中 triolein 的含量,据此筛选出 triolein 产量最高的液体发酵培养基。

以 triolein 产量最高的 Rice 培养基为基本培养基,对培养体系参数进行优化。用质量浓度 0、5、10、15、20、25 和 30 g·L⁻¹ 的 Rice 培养基对 *G. moniliformis* AH13 菌株进行发酵培养,并按照下述方法测定发酵产物中 triolein 含量,据此筛选出 triolein 产量最高的最佳发酵培养基。

1.2.2 质谱和色谱分析条件 高效液相色谱串联大气压化学电离质谱(HPLC-APCI-MS)条件:正离子检测模式,喷雾电压 3 000 V,毛细管温度 250 ℃,大气压电离源温度 400 ℃,corona 电流 4 μA,鞘气(高纯液氮)压力 35 kPa。质谱扫描范围 300~900 amu,扫描时间 1 s,Q1 宽度 0.7。高效液相色谱(HPLC)条件:Discovery C₁₈液相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-二氯甲烷(体积比 66:34)混合溶液 1 000 mL;流速 0.7 mL·min⁻¹;柱温 30 ℃;蒸发光散射检测器;漂移管温度 45 ℃;氮气流速 1.5 L·min⁻¹,进样量 10 μL。

1.2.3 对照品溶液的配制和分析 精密称取 0.035 6 g triolein 标准品,用乙腈-二氯甲烷(体积比 66:34)混合溶液溶解并定容至 25 mL,配成质量浓度 1.424 mg·mL⁻¹的 triolein 对照品溶液。按照上述质谱和色谱分析条件进行分析。

1.2.4 样品溶液的制备和分析 精密称定 *G. moniliformis* AH13 发酵产物的乙酸乙酯提取物粉末 0.6 g(过 100 目筛),用乙腈-二氯甲烷(体积比 66:34)混合溶液溶解并定容至 50 mL,称定质量;浸泡 2 h 后超声处理 30 min,冷却后称定质量;用乙腈-二氯甲烷(体积比 66:34)混合溶液补足损失的质量,混匀后依次用滤纸和微孔滤膜(0.45 μm)过滤,滤液即为样品溶液。按照上述质谱和色谱分析条件进行分析。

1.3 数据处理

采用峰面积归一化法根据标准品的峰面积计算样品中的

triolein 含量。

2 结果和分析

2.1 培养基的筛选结果

分别用 PDB、Adlay、Rice、MS 和 B₅培养基对 *G. moniliformis* AH13 菌株进行液体发酵培养,结果显示:PDB、Adlay 和 Rice 培养液的产物中均含有 triolein, triolein 含量分别为 10.27、87.48 和 152.65 μg·mL⁻¹;而 MS 和 B₅培养液中均未检测出 triolein。因 Rice 培养液中 triolein 含量最高,故可初步确定 Rice 培养基对内生真菌 *G. moniliformis* AH13 产 triolein 的发酵培养较为适宜。

2.2 培养基的优化

采用不同质量浓度的 Rice 培养基对 *G. moniliformis* AH13 菌株进行液体发酵培养,产物中 triolein 含量的测定结果见表 1。结果表明:随 Rice 培养基质量浓度的提高(5~30 g·L⁻¹), triolein 含量逐步提高。其中质量浓度 30 g·L⁻¹ 的 Rice 培养基中 triolein 含量最高,分别是 5、10、15、20 和 25 g·L⁻¹ Rice 培养基中 triolein 含量的 2.21、1.58、1.44、1.30 和 1.14 倍。表明质量浓度 30 g·L⁻¹ Rice 培养基是 *G. moniliformis* AH13 菌株产 triolein 发酵培养的适宜培养基。

表 1 不同质量浓度大米培养基对薏苡内生真菌 *Gibberella moniliformis* AH13 发酵产物中 triolein 含量的影响
Table 1 Effect of Rice medium with different mass concentrations on triolein content in fermentation product of endophytic fungi *Gibberella moniliformis* AH13 in *Coix lacryma-jobi* Linn.

培养基质量浓度/g·L ⁻¹ Mass concentration of medium	triolein 含量/μg·mL ⁻¹ Content of triolein
0(CK)	0.00
5	96.82
10	135.31
15	148.97
20	164.18
25	186.71
30	213.79

3 讨论和结论

本研究结果表明:在马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)、薏苡仁培养基(Adlay)和大米培养基(Rice)中,内生真菌 *G. moniliformis* AH13 均能产生 triolein,其中在 Rice 培养基中 triolein 含量最高(为 152.65 μg·mL⁻¹),而在 B₅和 MS 培养基中 *G. moniliformis* AH13 不能产生 triolein。这可能是由于 B₅和 MS 培养基不能为 *G. moniliformis* AH13 提供合成 triolein 所需的底物,而 PDB、Adlay 和 Rice 培养基则能满足 *G. moniliformis* AH13 合成 triolein 所需的底物和营养成分。综合研究结果表明:30 g·L⁻¹ Rice 培养基适宜于薏苡内生真菌 *G. moniliformis* AH13 产 triolein 的发酵培养。

碳源是微生物合成油脂必需的关键营养成分,常用的碳源有糖类、油脂、有机酸和低碳醇,蛋白质和氨基酸也可用作碳源。Rice 培养基的有机碳源为大米,具有含氮少、疏松、表面积大等特点,是较好的孢子培养基,可以供真菌孢子发芽、生长和大量繁殖菌丝体,并使菌丝体粗壮,从而提高发酵产物的产量;而 PDB 和 Adlay 培养基中的马铃薯和薏苡仁也均富含有机碳源及其他各种营养成分,因而对 *G. moniliformis* AH13 合成 triolein 也有一定的促进作用。但这些培养基中与 triolein 合成相关的关键成分还需进一步研究确定。

参考文献:

- [1] 刘应泉,谭供根. 油脂与健康[M]. 北京:人民卫生出版社, 1989: 206.
- [2] CHANG H C, HUANG Y C, HUANG W C. Antiproliferative and chemopreventive effects of adlay seed on lung cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 3656–3660.
- [3] WOO J H, LI D, WILSBACH K, et al. Coix seed extract, a commonly used treatment for cancer in China, inhibits NF κ B and protein kinase C signaling[J]. Cancer Biology Therapy, 2007, 6: 2005–2011.
- [4] 史周印,李天晓,王秋萍,等. 薏苡仁注射液在中晚期肝癌化疗栓塞中的应用研究[J]. 肿瘤, 2001, 21(3): 233–234.
- [5] JIA M, MING Q L, ZHANG Q Y, et al. *Gibberella moniliformis* AH13 with antitumor activity, an endophytic fungus strain producing triolein isolated from adlay (*Coix lacryma-jobi*: Poaceae) [J]. Current Microbiology, 2014, 69: 381–387.
- [6] 苗明三. 薏苡仁多糖对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中医药学报, 2002, 30(5): 49–50.
- [7] 徐梓辉,周世文,黄林清. 薏苡仁多糖的分离提取及其降血糖作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 578–581.
- [8] 张云霞,张丽微,孙晶波. 薏苡仁醇提物的降糖作用研究[J]. 中国中医药杂志, 2007, 5(8): 65–66.
- [9] 高 岚,张仲一,张 莉,等. 薏苡仁汤镇痛消炎作用的实验研究[J]. 天津中医学院学报, 2005, 24(1): 17–19.
- [10] YEH P H, CHIANG W, CHIANG M T, et al. Effects of dehulled adlay on plasma glucose and lipid concentrations in streptozotocin-induced diabetic rats fed a diet enriched in cholesterol [J]. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 2006, 76: 299–305.
- [11] YANG R S, CHIANG W, LU Y H, et al. Evaluation of osteoporosis prevention by adlay using a tissue culture model[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2008, 17: 143–146.
- [12] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, et al. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260: 214–216.
- [13] ZHOU X W, ZHU H F, LIU L, et al. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86: 1707–1717.
- [14] PU X, QU X X, CHEN F, et al. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 9365–9375.
- [15] YIN H, SUN Y H. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*[J]. Phytomedicine, 2011, 18: 802–805.
- [16] WANG Y, ZENG Q G, ZHANG Z B, et al. Isolation and characterization of endophytic huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata* [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38: 1267–1278.
- [17] KUSARI S, LAMSHÖFT M, ZÜHLKE S, et al. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin [J]. Journal of Natural Products, 2008, 71: 159–162.
- [18] EYBERGER A L, DONDAPATI R, PORTER J R, et al. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69: 1121–1124.
- [19] YIN H, CHEN J L. Sipeimine-producing endophytic fungus isolated from *Fritillaria ussuriensis* [J]. Zeitschrift Für Naturforschung C, 2008, 63: 789–793.
- [20] CHEN X M, SANG X X, LI S H, et al. Studies on a chlorogenic acid-producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, 37: 447–454.
- [21] YIN H, ZHAO Q, SUN F M, et al. Gentiopicroin-producing endophytic fungus isolated from *Gentiana macrophylla* [J]. Phytomedicine, 2009, 16: 793–797.
- [22] COOK D, GARDNER D R, RALPHS M H, et al. Swainsonine concentrations and endophyte amounts of *Undifilum oxytropis* in different plant parts of *Oxytropis sericea* [J]. Journal of Chemical Ecology, 2009, 35: 1272–1278.
- [23] YU Y, ZHAO Q, WANG J, et al. Swainsonine-producing fungal endophytes from major locoweeds species in China [J]. Toxicon, 2010, 56: 330–338.
- [24] ZHAO J, SHAN T, MOU Y, et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi [J]. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2011, 11: 159–168.

(责任编辑:张明霞)