

小连翘内生放线菌YBL-02菌株的初步鉴定和发酵产物分离

袁保红¹, 杜青平², 胡立勇¹ (1.广东药学院基础学院, 广州 510006; 2.广东工业大学环境科学与工程学院, 广州 510006)

摘要: 目的 对小连翘(*Hyperioums Sampsonii* Hance.) 内生放线菌 YBL-02 菌株的进行分类、发酵及产物的提取和初步鉴定。
方法 根据形态学, 培养特征等初步鉴定 YBL-02 菌株, 并采用薄层色谱和红外光谱等对 YBL-02 发酵产物进行分离和初步鉴定。
结果 根据菌株的形态学, 培养特征等初步将 YBL-02 菌株归属为链霉菌属。对 YBL-02 菌株发酵产物进行分离纯化, 最后得到具有活性的片状白色结晶体, 测其熔点为 117~119 °C。对该物质进行红外光谱分析后可得出为一种酰胺类化合物。
结论 YBL-02 菌株是一种链霉菌, 其发酵产物中活性成分为一种酰胺类化合物。

关键词: 内生菌; 小连翘; 放线菌; 发酵

中图分类号: R282.71; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0360-04

基金项目: 广东省科技计划项目 (2006A10601005)

作者简介: 袁保红, 男, 讲师 Tel: (020) 39352196 Email: yuanbh2002@yahoo.com.cn

Taxonomy, Fermentation and Products Characterization of Actinomycete Strain YBL-02 from *Hyperioums Sampsonii* Hance

YUAN Baohong¹, DU Qingping², HU Liyong¹(1.Guangdong College of Pharmacy,Guangzhou 510006,China; 2.Faculty of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006 ,China)

ABSTRACT:OBJECTIVE Taxonomy of strain YBL-02 isolated from the roots of *Hyperioums Sampsonii* Hance was studied. And the fermentative products of strain YBL-02 were collected and identified primarily.**METHODS** The characteristics of substrate mycelium , aerial mycelium and growth on the different culture media were used to identify the strain YBL-02. Some techniques, such as thin-layer chromatography, infra-red spectrum, were used to collected and identified the products of fermentation of strain YBL-02.**RESULTS** Strain YBL-02 was an actinomycete by the primary taxonomic study. The fermentative products of strain YBL-02 were a kind of lamellar white crystalline form. The melting point of the crystalline form was 117-119°C.It was identified as a kind of chemical compound containing amide groups. **CONCLUSION** Strain YBL-02 is an actinomycete, and its fermentative products were a kind of chemical compounds containing amide groups.

KEY WORDS:endophytic fungi;*hyperioums sampsonii* hance; actinomycetes;fermentation

近来研究表明某些药用植物中个别内生菌能够产生与宿主相同或者相似药理活性的成分^[1],由此对药用植物内生真菌的研究引起人们的广泛关注。文献报道,小连翘中含有聚(异)戊二烯二苯甲酮类衍生物、萜烯双萜酮类和黄酮类等多种化学成分,这些成分是小连翘药理作用的主要有效成分,但是要提取和分离这些药物成分还有很多困难^[2]。如果在小连翘内生菌中能够发现类似的活性物质,无疑找到了一种可替代小连翘植物的新型生物资源。从笔者前期对小连翘内生菌研究中,发现小连翘具有丰富内生真菌,并且代谢产物中具有潜在活性物质^[3]。菌株 YBL-02 是在研究小连翘内生菌的过程中得到的一株放线菌。该菌株的发酵液对革兰氏阳性菌和肿瘤 KB 细胞都有较强的杀伤抑制作用,具有潜在的研究价值。本研究对小连翘内生放线菌 YBL-02 菌株参照阎逊初^[4]的放线菌分类和鉴定标准,对 YBL-02 菌株从形态学方法,即观察基内菌丝、气生菌丝在各种培养基上的形态特征,有无可溶性色素产生及生长状况,其细胞壁生化类型和生理生化特征等方面进行了初步分类、对 YBL-02 的发酵产物的提取过程进行探索,并对提取物做了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株来源 菌株 YBL-02 分离所用材料为小连翘根内部,采自中国科学院华南植物园(广州)。采集其健康的组织,无其他病虫害,放于密封袋中,于 4℃ 存放,尽快进行内生菌的分离,分离平板为葡萄糖-天冬素培养基。

1.2 方法

1.2.1 形态及培养特征观察 菌株 YBL-02 在改良的高氏培养基上涂菌并插入盖玻片,28℃ 培养 7~10 d,用光学显微镜观察孢子丝与孢子形态。

1.2.2 生理生化特征及碳源利用 采用国际链霉菌计划(ISP)规定的培养基和方法^[5]进行培养特征和生理生化特性研究。分别用 4 种不同的培养基,观察 YBL-02 在这 4 种培养基上的特征。碳源利用的测定采用常规鉴定方法^[6],配制缺碳源培养基,添加各种碳源以检测放线菌对碳源的利用情况。

1.2.3 细胞壁化学类型分析 细胞壁 LL-二氨基庚二酸(DAP)和甘氨酸分析和糖的分析参照 Lechevalier 的方法^[7-8]。

1.2.4 YBL-02 菌株的发酵培养基 种子培养基(%):葡萄糖 0.5,可溶性淀粉 2.4,酵母膏 0.5,蛋白胨 0.5,牛肉膏 0.3,玉米浆 0.4,CoCl₂ 0.000 2, CaCO₃ 0.3, pH 自然。

发酵培养基(%):甘油 2,糊精 2,酵母膏 0.3,大豆蛋白胨 1,(NH₄)₂SO₄ 0.2, CaCO₃ 0.3, pH 7.2。

1.2.5 发酵产物分离与提取 YBL-02 菌株的孢子接种于种子培养基中,500 mL 三角瓶装 100 mL 培养基。28℃ 旋转(220 r·min⁻¹)培养 48 h,以 2%的接种量转种至发酵培养基中,500 mL 三角瓶装 100 mL 培养基。28℃ 旋转(220)培养,96 h 后收获发酵液。对发酵液进行产物分离摸索,获得最佳分离条件,并利用红外技术、核磁共振氢谱、质谱仪等对发酵产物进行初步鉴定。

2 结果与分析

2.1 形态及培养特征

发现菌株 YBL-02 菌丝呈少分枝状,气生菌丝直形,成熟后形成孢子丝,孢子丝呈波曲状。基内菌丝

无横隔,不断裂,没有观察到孢囊和孢核等结构。孢子链直,带有10个左右圆柱形孢子,孢子表面光滑,大小为(0.4~0.5) μm \times (0.7~0.8) μm ,见图1。

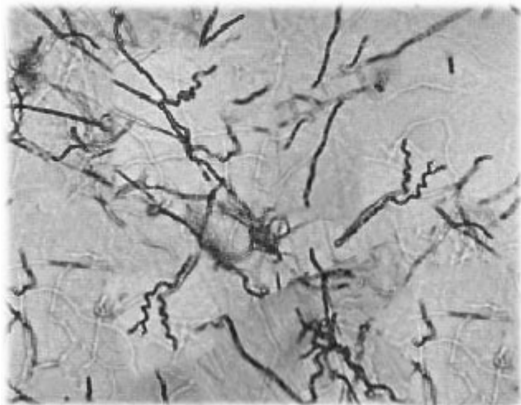


图1 菌株 YBL-02 的孢子丝形态 ($\times 400$)

Fig1 Spore chains of strain YBL-02 ($\times 400$)

2.2 生理生化特征及碳源利用

YBL-02 在这4种培养基上均能生长,且均无色产生,各培养基的培养特征见表1。

表1 菌株 YBL-02 在不同鉴定培养基上的培养特征

Tab 1 Cultural characteristics of YBL-02 on different culture media

培养基特征	葡糖天门冬素	蔗糖察氏琼脂	淀粉琼脂	马铃薯块
生长情况	良好	良好	一般	一般
气生菌丝 ¹⁾	灰白	浅灰	浅灰	浅灰
基内菌丝	白色	灰白色	灰白色	灰变皱,薯块变黑
可溶性色素	无	无	无	无

注: ¹⁾颜色以《链霉菌鉴定手册》^[6]彩页为标准

Note: ¹⁾Mycelin colors identification compared with 《Taxonomic outline of streptomyces strins》

菌株 YBL-02 具有较弱的液化明胶能力,在27 $^{\circ}\text{C}$ 下可使牛奶凝固且胨化,淀粉水解弱养性,不能利用纤维素生长,不能利用酪氨酸产黑色素,也不能在培养基上产生 H_2S 气体。该菌株可利用葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖、鼠李糖而不能利用肌醇、果糖、棉子糖做为碳源生长,结果见表2。

表2 菌株 YBL-02 的生理生化特性

Tab 2 Physiological and biochemical characteristics of strain YBL-02

生理生化试验	结果	碳源	利用情况
明胶液化	+(弱)	葡萄糖	+
牛奶凝固与胨化	+	果糖	-
淀粉水解	+(弱)	蔗糖	+
纤维素水解	-	阿拉伯糖	+
产 H_2S	-	甘露糖	+
利用酪氨酸产色素	-	肌醇	-
		木糖	+
		鼠李糖	+
		棉子糖	-

注: +代表可利用或阳性, -代表不能利用或阴性

Note: + is available or positive result, - is unavailable or negative result

2.3 类型分析

菌株 YBL-02 的全细胞水解物中含 LL-二氨基庚二酸(LL-DAP)和甘氨酸;无特征性糖;说明该菌细胞壁属胞壁 I 型。

2.4 YBL-02 菌株发酵产物分离

YBL-02 菌株的发酵液(96 h)经离心(2 800 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)、减压抽滤后,呈灰白色,然后用 NaOH 调至 pH 8.0,以乙酸乙酯提取。提取液经无水硫酸钠脱水后减压浓缩,得到灰白色的 YBL-02 粗品。粗品溶于氯仿-甲醇(10:1)上硅胶柱(GF254)层析,用氯仿-甲醇(30:1, 20:1, 10:1, 5:1)梯度洗脱,分部收集样品。浓缩后得3份样品,分别溶于甲醇,进行 SephadexLH-20 柱层析,以甲醇洗脱,收集活性组分。减压浓缩后再经反相中压液相柱层析(YMC-ODS, 50 $\text{cm}\times 1.5\text{ cm}$),用乙腈-10 mmol 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)(45:55, 50:50, 55:45, 60:40)梯度洗脱,用高效液相色谱(HPLC)进行跟踪检测。收集活性成分。HPLC 条件:层析柱为 InertisI ODS-2 (250 $\text{mm}\times 4.6\text{ mm}$),流动相为乙腈-10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0)(70:30),流速为 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为 210 nm。经上述提取和分离得到1个活性组分。再用乙酸乙酯洗提并收集到试管内,经反复结晶纯化后得到片状白色晶体物质。

2.5 发酵产物的初步鉴定

取小片白色晶体置于测定熔点的仪器上,测得其熔点约为 117~119 $^{\circ}\text{C}$ 。对其进行红外光谱测定和分析。从红外图谱可知,3 525.2 cm^{-1} 为 OH 基团的吸收峰,3 209.7 cm^{-1} 为 NH 基的吸收峰,1 720.0 cm^{-1} 和 1 685.0 cm^{-1} 为羰基的吸收峰(出现肩峰),由于 3 209.7 cm^{-1} 和 1 685.0 cm^{-1} 有酰胺基团的特征吸收峰,因此可推断此类化合物含有酰胺基团。从核磁共振氢谱(¹H-NMR)可知,化学位移 δ_{H} 7.884 可证实此化合物含有一个 NH 基, δ_{H} 4.222 和 δ_{H} 4.201 可知该化合物有一个亚甲基(- CH_2 -), δ_{H} 0.980, δ_{H} 0.993 和 δ_{H} 1.228, δ_{H} 1.206 可知含有两个甲基(- CH_3),另外根据质谱仪测定该化合物的分子量为 281。因此获得其分子式为: $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ 。

3 讨论

从分离的内生真菌的发酵产物中寻找出与宿主相同或相似的生理活性成分,毫无疑问对于解决生态问题、开发新的药物资源具有重要的理论和现实意义。近年来,已有多种药用植物内生真菌分离出来,并且有些内生菌的药用活性成分已经能够鉴

定和合成出来^[9-11]。在前期研究中发现,小连翘内生真菌中多数种类(约 54.32%)能够抑制一种或者多种病原菌的生长,这表明小连翘内生真菌中存在着广泛的抗菌生物活性资源,这些内生真菌及其代谢产物在植物对抗病原菌的过程中占有一定的地位^[3]。因此,本研究对小连翘植株内一株有潜在研究价值的内生放线菌进行了进一步研究。根据 YBL-02 的形态特征、培养特征及生理生化特征,参考《放线菌的分类和鉴定》^[4],发现 YBL-02 菌株的各项形态特征、培养特征和生理生化特征与链霉菌很类似,因此可初步确定 YBL-02 为链霉菌。在此基础上,对 YBL-02 菌株进行发酵,并获得发酵产物白色片状结晶体。通过红外技术,确定该白色结晶物质是一种带有酰胺集团的化合物,其分子结构为 $C_{16}H_{27}NO_3$ 。

植物内生菌作为一种新的微生物资源,从内生菌中寻找和发现新的活性化合物是植物内生菌研究的一个热点。植物内生菌狭义上是指生活在植物活组织内而不引起植物病变的一大类真菌微生物^[12]。但是,近年的研究发现,植物内生菌种类不仅仅局限于真菌,放线菌和细菌的研究也时有报道^[13];在药用植物内生菌的利用方面,人们希望通过内生菌发酵合成药用活性成分。目前已有多种药用植物内生菌分离出来,其药用活性成分得到鉴定和合成的报道^[10-11,14]。药用植物内存在着广泛的内生菌,这些内生菌可能成为生物防治和生物制药中有潜力的生物因子,在生态农业和生物农药研制方面具有重要的用途^[15]。研究内生菌的各种次生代谢产物及其作用机制,在农业和(或)医药业中具有重要的应用潜力。因此从药用植物的内生菌的发酵液中发现、开发出新一代高效低毒的药物不仅可能,而且很有前途。对小连翘内生放线菌发酵产物的进一步研究将为寻找新的活性物质开辟了新的途径,具有诱人的研究前景。

REFERENCES

- [1] WU F T, CHEN DJM, QIAN X P. Recent studies of bioactive substances produced by endophyte [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2004, 29(3): 184-192.
- [2] WANG Z J, LIANG C L, MAO Z H M. Progress of Extract of St. John's Wort in Clinic Research [J]. Foreign Med Sci (Cerebrovasc) Dis (国外医学脑血管疾病分册), 2003, 11(3): 212-214.
- [3] YUAN B H, DU Q P, DANG Z J. Studies on communities of endophytic fungi from *Hypericum sampsonii* Hance and their antipathogenic activities *In vitro* [J]. J Guangdong Coll Pharm (广东药学院学报), 2007, 22(3): 14-18.
- [4] YAN S C. Taxonomy and Discrimination of Actinomycetes (放线菌的分类和鉴定) [M]. 1st ed, Beijing: Science press, 1992.
- [5] WILLIAMS S T, GOODFELLOW M, ALDERSON G, et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera [J]. J Gen Microbiol, 1983, 129(6): 1743-1813
- [6] Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Taxonomic Outline of *Streptomyces* Strains (链霉菌鉴定手册) [M]. 1st ed, Beijing: Science press, 1975.
- [7] LECHEVALIER M P. Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance [J]. J Lab Clin Med, 1968; 71: 934-944.
- [8] LECHEVALIER M P, LECHEVALIER H A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes [J]. Int J Syst Bacteriol, 1970, 20(2): 435-443.
- [9] WANG Y Z, XIAO Y Z. Endophytes and their bioactive products [J]. J Bio (生物学杂志), 2004, 21(4): 1-5.
- [10] CHEN Y J, ZHANG Z, WANG Y, et al. Screening endophytic fungus to produce taxol from *Taxus yunnanensis* [J]. Biotechnology (生物技术), 2003, 13(2): 10-11.
- [11] ZHANG L Q, GU S, SHAO H, et al. Isolation, determination and aroma product characterization of fungus producing irone [J]. Mycosystema (菌物系统), 1999, 18(1): 49-54.
- [12] STROBEL G, DAISY B, CASTILLO U, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. J Nat prod, 2004, 67(2): 257-268.
- [13] HALLMANN J, QUADT HALLMANN A, MAHAFFEE W F, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops [J]. Can J Microbiol, 1997, 43(10): 895-914.
- [14] STROBEL G, STIERLE A, STIERLE D, et al. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. Mycotaxon, 1993, 47: 71-80.
- [15] MILLER S L. Functional diversity in fungi [J]. Can J Bot, 1995, 73(Suppl 1): 50-57.