

产银杏内酯内生真菌的分离与鉴定

Isolation and identification of ginkgolides-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* Linn.

陈小明^{1,2,3,4} 何福林^{1,2,3} 李志忠⁵ 袁志辉^{1,2,3}

CHEN Xiao-ming^{1,2,3,4} HE Fu-lin^{1,2,3} LI Zhi-zhong⁵ YUAN Zhi-hui^{1,2,3}

(1. 湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199; 2. 湖南省银杏工程技术研究中心, 湖南 永州 425199; 3. 湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室, 湖南 永州 425199; 4. 湖南省恒伟药业股份有限公司, 湖南 永州 425199; 5. 永州市畜牧水产局, 湖南 永州 425199)

(1. College of Chemistry and Bioengineering in Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425199, China; 2. Hunan Provincial Engineering Research Center for Ginkgo Biloba, Yongzhou, Hunan 425199, China; 3. Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South, Yongzhou, Hunan 425199, China; 4. Hunan Hengwei Pharmaceutical Co., Ltd., Yongzhou, Hunan 425199, China; 5. Yongzhou Bureau of Animal Husbandry and Fishery, Yongzhou, Hunan 425199, China)

摘要:利用组织块培养法从健康的银杏根、茎中分离得到 116 株内生真菌。通过高效液相色谱(HPLC)法对内生真菌的代谢产物进行分析,最终筛选出 1 株能够产银杏内酯的内生真菌,利用标准曲线法测定其发酵液和菌丝体中总内酯产量约为 11.4 mg/L。形态学特征和真菌 rDNA 间隔序列(internal transcribed spacer, ITS)的系统进化分析结果表明,该菌株属于毛霉属,为产银杏内酯内生真菌的首次报道。

关键词:银杏; 内生真菌; 内酯类化合物; 鉴定

Abstract: In the present study, the method of tissue culturing was used to isolate the endophytic fungi from healthy ginkgo roots and stems. After repeated separation and purification, 116 Ginkgo endophytes were isolated. Metabolites of these fungi were preliminarily analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), and a ginkgolide producing endophyte strain was finally screened out. The production of ginkgolides by this strain was more than 11.4 mg/L. The endophytic fungi strain was identified as *Mucor* spp. by morphology characteristics and phylogenetic analysis of internal transcribed spacer (ITS), and It was the first report in the ginkgolides producing endophytic fungus from *Ginkgo biloba*.

基金项目:湖南省教育厅科研项目(编号:15C0585);湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室开放基金项目(编号: XNZW15C11)

作者简介:陈小明,男,湖南科技学院讲师,硕士。

通信作者:袁志辉(1981—),男,湖南科技学院副教授,硕士。

E-mail: zhh_yuan@126.com

收稿日期:2017—05—22

Keywords: *Ginkgo biloba*; endophytes; ginkgolides; identification

植物内生微生物是指在植物组织内部度过其全部或部分生命周期的所有微生物^[1-2]。内生微生物对药用植物具有重要的诱导作用^[3],能转化植物次生代谢产物^[4],可促进植物有效成分的合成和积累^[5]。且部分植物内生微生物可体外培养,通过基因工程或工业发酵手段可大量获得结构新颖、活性独特的次生物质,使得内生微生物成为活性天然产物资源开发和研究的热点之一^[6]。

银杏是一种古老的药食两用植物^[7],多个部位均可入药,如银杏果中的某些蛋白质具有抗氧化剂和抗菌的作用^[8]。最常见的人药物质是银杏提取物(Extracts of *Ginkgo biloba*, EGb),其主要有效成分是黄酮类和萜内酯类化合物^[9],且 EGb 是目前得到银杏内酯的唯一途径^[10],且受限于含量低、分离纯化困难和来源单一。银杏内生微生物具有合成与宿主植物相同或相似的活性成分的功能^[11],但产银杏内酯内生真菌的分离研究仅集中在中国少数几家单位。严铸云等从银杏组织中分离到的内生真菌发酵液进行检测发现,4 株曲霉属、1 株盘长孢属、1 株色串孢属和 1 株组丝菌属共 7 株内生真菌能够产生银杏内酯 C 或其类似物^[12];在此基础上进一步筛选出一株银杏内酯 B 产量较高的烟曲霉原变种 FG052,总内酯产量为 0.13 mg/mL^[13];对该菌株进行紫外线和亚硝酸复合诱变并优化发酵条件后,其产量较出发菌株提高了 56%^[14]。包飞等^[15]从分离到的 109 株银杏内生真菌中筛选出一株产银杏内酯 B 的卵形孢霉属菌株,发酵产

量为 9.3 mg/L。Qian 等^[10] 也获得了一株产白果内酯的银杏内生真菌 *Pestalotiopsis uvicola* GZUYX13。Cui 等^[16] 筛选到一株同时产银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的内生菌株尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)SY0056。而对于自然界常见且已在银杏组织中检测到的毛霉属(*Mucor* sp.)真菌,尚未见其具有产萆内酯类物质能力的报道。本研究以银杏为研究对象,利用组织块分离法从根、茎等部位分离内生真菌,并从中筛选出产银杏内酯的菌株,为后期利用微生物发酵生产内酯类化合物提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

银杏组织材料:取自湖南省永州市双牌县桐子坳村,树约为 800 年龄的银杏根、茎组织。样品放入经灭菌的广口瓶,在 24 h 内运至实验室进行处理。内生真菌分离采用 PDA 培养基和马丁氏(MMN)培养基,用前按 30 mg/L 加入链霉素。发酵采用不加琼脂的 PDA 培养液,即 PDB 培养液。

- 银杏内酯 A、B、C 标准品:美国 Sigma 公司;
- 白果内酯标准品:上海哈灵生物科技有限公司;
- KNO₃、K₂ HPO₄、MgSO₄ · 7H₂ O、NaCl、FeSO₄ · 7H₂ O、乙醇、盐酸、链霉素、葡萄糖、琼脂:分析纯;
- 乙酸乙酯、甲醇:色谱纯。

1.2 试验方法

1.2.1 银杏组织的表面消毒 参考文献[17]的方法,略作修改,分别选取新鲜银杏根、茎,用清水洗净后,流水冲洗0.5 h,放入装有蒸馏水的烧杯中。

洗净的材料各取 5 g,首先用体积分数为 75%酒精漂洗 1 min,无菌水冲洗 3 次;再用 0.1%的次氯酸钠漂洗(根 1.5 min,茎 0.5 min),无菌水冲洗 3 次;最后一次洗液置于灭菌的小烧杯中。

表面消毒后的材料在空白 PDA 培养基上滚动数圈,将培养基置于 37 ℃培养 2 d,检测消毒效果。

1.2.2 银杏内生真菌的分离、纯化和保藏 经无菌处理后,样品表面用无菌滤纸吸干,在超净工作台内,用灭菌的剪刀将茎剪成约 0.5 cm 长小段;根剪成大小适中的组织块。每个 PDA 和 MMN 平板放置 4~5 块组织块,将切口面置于培养基上。将无菌处理过程中样品的最后一次清洗液涂于培养基上培养,作为对照,分别编号记录。操作完成后置于 28 ℃恒温培养箱中培养,每天观察并记录内生微生物生长情况。

待样品表面或边缘长出菌丝后,在超净工作台中用无菌剪刀或挑针挑取菌丝转接到新的对应培养基上,进行编号。继续置于 28 ℃恒温箱中闭光培养,每天观察菌落生长情况。

待接种的菌体萌发后,用菌丝顶端分离法对分离得到的内生真菌进行多次传代直至获得典型的纯化菌落。将已纯化的菌株分别转移至固体斜面培养基上,每株保存 2 支斜

面,28 ℃恒温箱中培养,待菌株生长旺盛时,取出置 4 ℃保藏。1~2 月后转接入新的斜面。

1.2.3 检测样品的制备 用打孔器在长满菌丝的培养基上打孔,将其接入装有 100 mL PDA 培养液的 250 mL 三角瓶中,每瓶接入 3 个菌丝块;置于恒温震荡培养箱中,28 ℃,120 r/min 培养 5~7 d,3 层纱布过滤分离菌体和发酵液。

取过滤后的发酵液 50 mL,加入等体积乙酸乙酯萃取 2 次,合并萃取液后旋转蒸发至近干,加入 5 mL 甲醇溶解固体物质,并用 0.22 μm 滤膜过滤待用;菌丝体在 55 ℃烘箱中烘干后取 2 g 于研钵中,加入 10 mL 50%甲醇溶液充分研磨,加入 20 mL 乙酸乙酯进行萃取,萃取液旋转蒸发至近干,加入 2 mL 甲醇溶解固体物质,并用 0.22 μm 滤膜过滤待用。

1.2.4 样品中内酯类物质的测定 采用 HPLC-UV 法银杏内酯类物质的含量标准曲线法计算,标准品为银杏内酯 A、B、C 和白果内酯。

1.2.5 产银杏内酯内生真菌的鉴定 采用形态学特征和 ITS 序列分析方法进行鉴定。

(1) 形态学特征分析:挑取纯化的菌株尖端菌丝接种于 PDA 培养基上,培养一段时间后观察菌落的大小、颜色等形态特征;然后采用插片法进行菌丝体制片,在显微镜下观察菌丝体和分生孢子的形态等特征,根据《真菌鉴定手册》^[18] 进行初步鉴定。

(2) ITS 序列分析:采用 CTAB 法提取目标菌株的基因组 DNA^[19]。ITS 序列特异性引物^[20] (北京六合华大基因科技有限公司合成) 为 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1 min,55 ℃退火 0.5 min,72 ℃延伸 1 min,25 个循环,72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。扩增片段与 pMD19-T 载体[宝生物工程(大连)有限公司]连接并转化至大肠杆菌感受态细胞,阳性克隆经菌落 PCR 鉴定正确后,交由北京六合华大基因科技有限公司测序。测序结果提交 NCBI 进行序列比对分析,选取同源性最高的前几条序列,利用 MEGA7.0 软件^[21],基于邻接法(Neighbor Joining Method)构建系统发育树,Bootstrap 检验值≥50%,1 000 次重复。

2 结果与分析

2.1 产银杏内酯内生真菌的筛选

从银杏根、茎组织中共分离出内生真菌 116 株,其中根茎中分别为 76,40 株。采用 HPLC 对发酵液和菌丝提取物样品进行分析。由图 1、2 可知,菌株 Gbph112 的发酵液和菌丝提取物中均含有与标准品银杏内酯 A、B、C 和白果内酯相对应的色谱峰,表明菌株 Gbph112 可产生银杏内酯 A、B、C 和白果内酯,并且白果内酯、银杏内酯 B 和 C 大部分分泌到细胞之外,而银杏内酯 A 有相当一部分存在于菌丝细胞内。除此之外,HPLC 色谱图上还存在对应 3 种标准品之外的吸收峰,说明发酵液和菌体中还含有其它种类的化合物。标准

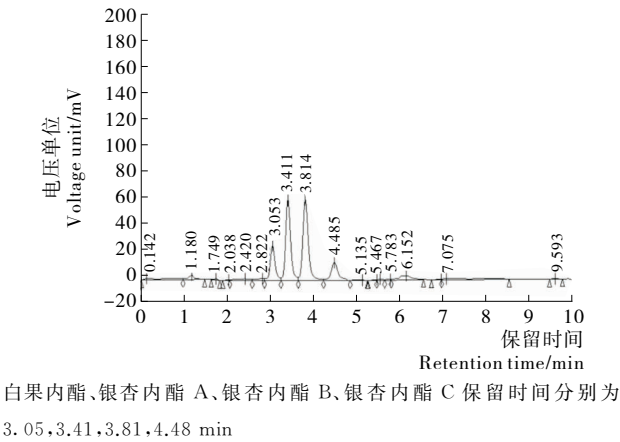


图 1 银杏内酯类物质标准品的 HPLC 图谱
Figure 1 HPLC chromatograms of four ginkgolides standards

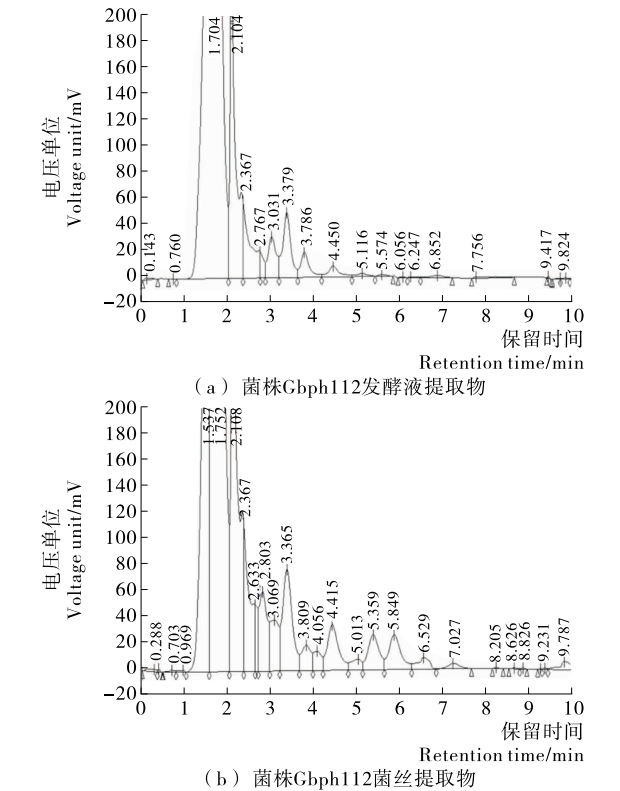


图 2 银杏内生真菌 Gbph112 产内酯类物质的 HPLC 图谱
Figure 2 HPLC chromatograms of the ginkgolides produced by *Ginkgo biloba* endophytic fungus strain Gbph112

曲线法测定菌株 Gbph112 的发酵液和菌丝提取物中内酯类物质总量分别为 (7.60 ± 0.12) , (3.80 ± 0.06) mg/L。

2.2 产银杏内酯菌株的鉴定

菌株 Gbph112 菌落及其分生孢子呈现毛霉属真菌典型特征见图 3。在 28℃ 于 PDA 平板上生长较快, 菌落形状多样, 初期为疏松白色菌丝, 中后期菌丝逐渐生长密集, 颜色渐变为浅黄色, 产生孢子后菌落整体呈浅黄至褐色茸毛状, 菌落背面呈黄色。气生菌丝无隔, 呈分枝状, 无匍匐菌丝和假根; 菌丝体上直接生出总状分枝的孢囊梗, 顶端着生球形孢

子囊, 无囊托, 产圆形、光滑的孢囊孢子。其 ITS 序列通过 BLAST 搜索后获取相关种属的 ITS 序列, 用 MEGA 7.0 软件按邻接法构建系统进化树。结果显示, 菌株 Gbph112 与 *Mucor amphibiorum* 的序列最大相似性达到 99%, 见图 4。综合菌落、菌体形态和 ITS 序列分析信息, 将该菌株鉴定为毛霉属。

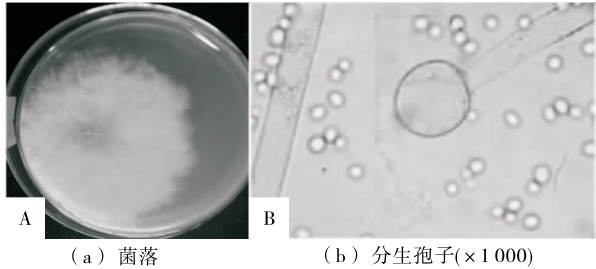


图 3 菌株 Gbph112 菌落及其分生孢子形态
Figure 3 Clone and conidiophore characters of strain Gbph112

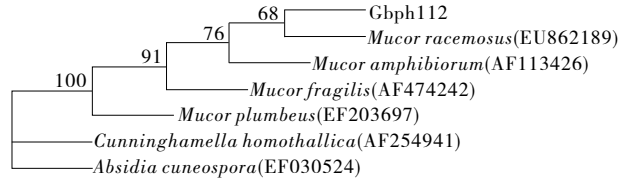


图 4 基于 ITS 序列的菌株 Gbph112 与其相关种系统进化树
Figure 4 Phylogenetic tree of *Ginkgo biloba* endophytic fungus strain Gbph112

3 结论

本研究从银杏根、茎组织中分离出内生真菌 116 株。通过 HPLC 检测分析, 从中筛选出 1 株产银杏内酯内生真菌, 即菌株 Gbph112, 形态学和分子生物学鉴定结果显示其为毛霉属真菌, 为首次从银杏组织中分离筛选到的能够产银杏内酯的毛霉属菌株。利用标准曲线法测定该菌发酵液和菌丝体中总内酯产量约为 11.4 mg/L, 高于包飞等^[15]分离到的卵形孢霉属菌株, 但低于严铸云等^[12-14]筛选和诱变之后的烟曲霉原变种 FG052。

研究^[22]表明, 银杏提取物中含有 30 余种黄酮化合物和萜类、酚类、微量元素及氨基酸等有效成分, 其研究和药效利用已较为成熟。同时, 对银杏提取物的植物病原菌如柑橘青霉菌^[23]的抑制活性研究也正逐步开展。而利用内生真菌生产药用活性成分才刚刚起步, 许多基础性工作有待深入研究。就银杏内生微生物而言, 虽然本研究筛选到的产银杏内酯内生真菌相对来说有较高的产量, 但目前发现的内生微生物极少达到工业化生产标准。所以, 应继续扩大内生微生物分离的数量和种类, 筛选产量更高且植物体外传代产量稳定的菌株, 对分离得到菌株进行生理特性和菌体内内酯类物质代谢途径的研究, 并通过诱变选种、生长培养基设计、发酵条件和工艺优化等方法 and 手段, 提高微生物发酵内酯类物质的

产量及内生微生物植物体外传代的稳定性,使利用微生物发酵生产内酯类物质成为可能。

参考文献

[1] HARDOIM P R, VAN OVERBEEK L S, BERG G, et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. Microbiology and Molecular Biology Review, 2015, 79 (3): 293-320.

[2] 袁志辉, 蒋琼凤, 何福林. 植物内生微生物及其“暗物质”开发技术的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(7): 1 156-1 163.

[3] YAN J F, BROUGHTON S J, YANG S L, et al. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically[J]. Fungal Ecology, 2015, 13: 53-59.

[4] 刘颖, 魏希颖. 内生菌对植物次生代谢产物的转化[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(2): 300-303.

[5] 王兴红. 内生真菌与天然药物研究进展[J]. 中草药, 2007, 38 (1): 140-143.

[6] STROBEL G, DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiology and Molecular Biology Review, 2003, 67(4): 491-502.

[7] 韩宏伟, 谢博文, 许旦, 等. 漂烫对真空油炸银杏果品质的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 179-182, 212.

[8] 张灿, 宫彩娥, 范龚健, 等. 酶解银杏蛋白制备 α -葡萄糖苷酶抑制肽的研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 137-141.

[9] 雷爱秋, 华洋林, 孙为正. 含银杏叶提取物胶囊中黄酮类化合物检测方法改进[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 88-91.

[10] QIAN Yi-xin, KANG Ji-chuang, LUO Yi-kai, et al. A bilobalide-producing endophytic fungus, pestalotiopsis uvicola from medicinal plant *Ginkgo biloba*[J]. Current Microbiology, 2016, 73(2): 280-286.

[11] 杜慧竟, 苏静, 余利岩, 等. 药用植物内生放线菌的分离和生物学特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(1) : 15-23.

(上接第 9 页)

[12] 孙维思, 张仁堂, 乔旭光. 不同品种马铃薯混配粉面团流变学特性及对馒头品质的影响[J/OL]. 食品与发酵工业, 2017, 43 (2): 95-100.

[13] 刘振峰, 陈洁, 田少君, 等. 绿豆粉及其蛋白质对面条品质影响的研究[J]. 粮油食品, 2007(3): 75-77.

[14] 张月巧, 陈龙, 卢可可, 等. 添加不同粉碎处理香菇粉对面团流变学特性的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 12-17.

[15] 罗登林, 陈瑞红, 刘娟, 等. 短链菊粉对中筋粉面团流变学特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(6): 1-4.

[16] 单珊. 紫薯—小麦混合粉的性质及面条品质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 14-19.

[17] 周爱梅, 杨慧, 杨磊, 等. 不同品种南瓜淀粉的理化特性对比研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(8): 1 784-1 790.

[12] 严铸云, 庞蕾, 罗静. 银杏内生真菌中产生银杏内酯类菌株的筛选[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(5): 491-493.

[13] 严铸云, 罗静, 郭晓恒, 等. 产银杏内酯内生真菌的筛选及培养条件研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(4): 554-558.

[14] 罗静, 严铸云, 郭晓恒, 等. 产银杏内酯内生真菌的选育及发酵条件研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2009, 46(4): 1 161-1 165.

[15] 包飞, 樊明涛, 贺江. 产银杏内酯 B 内生真菌的分离与筛选[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 328-331.

[16] CUI Yu-na, YI Da-wei, BAI Xiu-feng, et al. Ginkgolide B produced endophytic fungus (*Fusarium oxysporum*) isolated from *Ginkgo biloba*[J]. Fitoterapia, 2012, 85(3): 913-920.

[17] 席晓圆, 赵盛英, 张鹏, 等. 产紫杉醇内生真菌 N-15 的分离及鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(8): 1 219-1 222, 1 283.

[18] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 60-75.

[19] MAROPOLA M K, RAMOND J B, TRINDADEA M. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench) [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 112: 104-117.

[20] GONZALEZ-TEUBER M, VILO C, BASCUNAN-GODOY L. Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile [J]. Genomics Data, 2017, 11: 109-112.

[21] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1 870-1 874.

[22] 杜若源, 谢晶, 王婷, 等. 超声波辅助提取银杏叶中总黄酮的工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 167-170.

[23] 喻林华, 李晓烈, 蓝华, 等. 银杏叶提取物对柑橘青霉病菌的抑菌效果[J]. 食品与机械, 2010, 26(6): 60-62.

[18] 艾志录, 孙茜茜, 潘治利, 等. 不同来源淀粉特性对水晶皮质构品质的影响[J]. 农业工程学报, 2016, 32(1): 318-214.

[19] 孔霜霜. 紫薯熟粉的加工及其自发粉研制[D]. 无锡: 江南大学, 2015: 30-31.

[20] 宋一诺, 谢新华, 艾志录, 等. 月桂酸对不同直链淀粉含量小麦淀粉黏滞性和质构特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2016, 31 (9): 52-56.

[21] 陈颖, 陈勉, 王曦, 等. 几种淀粉的相对分子质量分布、微晶结构及相貌研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(3): 19-23.

[22] 程东, 洪雁, 庞艳生, 等. 交联和羟丙基改性对蜡质玉米淀粉糊化和流变性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(3): 18-23.

[23] 徐虹, 高思思, 王思宇, 等. 紫薯面包配方和工艺研究[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(6): 54-58.