

一株转化白藜芦醇苷虎杖内生真菌的筛选和鉴定

刘华金^{1,2} 易有金^{1,2} 杨建奎³ 钟英丽⁴ 陈雪^{1,2} 唐玲^{1,2}

(¹湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙 410128; ²湖南省食品科学与生物技术重点实验室, 长沙 410128;

³湖南农业大学理学院, 长沙 410128; ⁴湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128)

湖南农业大学

一株转化白藜芦醇苷虎杖内生真菌的筛选和鉴定


湖南农业大学食品科技学院
报告人: 刘华金
指导教师: 易有金 教授

湖南农业大学

1 具有转化能力虎杖内生真菌初筛

初筛培养基: 10g/100mL虎杖煮提液代替碳源、氮源, 添加无机离子;

新鲜野生虎杖植株取根、茎秆, 表面消毒方法后去除韧皮部, 取木质部用无菌剪刀剪成0.5cm × 0.5cm小块, 无菌水冲洗3-4次, 研磨成浆液后无菌水稀释10倍, 取0.1mL于初筛培养基上常规涂布, 28℃培养72-120h, 挑选不同形态菌落于PDA平板划线纯化后, 保存备用。



湖南农业大学

白藜芦醇

虎杖中白藜芦醇是一种天然活性多酚物质, 不仅能预防癌症, 还能抑制血小板凝集, 防止心肌梗死和脑梗死的发生, 被列为抗心血管病、抗癌最有前途的药物之一;

白藜芦醇在虎杖、葡萄、花生中含量较高;

虎杖中白藜芦醇往往以虎杖苷的形式存在, 干燥虎杖根茎中白藜芦醇含量仅为0.1%-0.2%, 而白藜芦醇苷含量约2%。



湖南农业大学

2 HPLC法检测

初筛菌种接入复筛培养基(10g/100mL虎杖煮提液)中进行发酵, HPLC检测发酵液中白藜芦醇苷转化率。

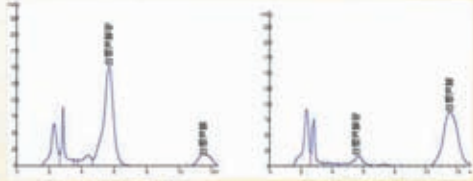


图1: J4菌株培养液HPLC图
Fig.1 HPLC chromatogram of culture medium broth before fermenting by J4

图2: J4菌株96h发酵液HPLC图
Fig.2 HPLC chromatogram of fermentation after fermenting 96 hours by J4

湖南农业大学

研究技术路线

```

    graph TD
      A[野生虎杖根、茎] --> B[内生真菌分离]
      B --> C[初筛]
      C --> D[复筛]
      D --> E[HPLC检测]
      E --> F[菌种鉴定]
    
```

湖南农业大学

表1 内生真菌J1、J2、J3、J4、J5、J6对白藜芦醇苷转化能力HPLC检测
Table 1 Polydatin conversion capacity by HPLC of the endophytic fungus strains J1, J2, J3, J4, J5, J6

内生真菌	白藜芦醇苷质量浓度 / (μg/mL)	白藜芦醇质量浓度 / (μg/mL)	转化率/%
空白对照	58.4096	5.3146	-
J1	27.1617	14.0675	25.6
J2	36.4152	6.5033	3.5
J3	30.6673	10.6033	15.5
J4	41.4551	6.0153	2.1
J5	35.4532	7.2332	5.6
J6	31.5148	8.1634	8.4

湖南农业大学

- 根据峰面积计算发酵液中白藜芦醇苷转化率，结果见表1，表明6株初筛菌株均对白藜芦醇苷有不同程度转化能力，其中J1转化率最高；
- 比较图1、图2可知，虎杖煮提液经内生真菌J1发酵后，保留时间5.07min白藜芦醇苷的吸收峰面积明显减小，保留时间11.094min白藜芦醇的吸收峰面积明显增加，说明内生真菌J1能有效转化虎杖煮提液中白藜芦醇苷为目标物白藜芦醇。

$$\text{转化率} = \frac{\text{发酵前白藜芦醇苷总摩尔数}}{\text{白藜芦醇苷总摩尔数}} \times 100\%$$

湖南农业大学

•3.2.2 ITS-5.8S rDNA序列分析
 全长571bp，该序列在GenBank数据库登录号为HQ732137。将序列输入生物技术信息网页 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行同源性比对，结果表明：内生真菌J1与草酸青霉 *Penicillium oxalicum* (FJ977097.1) 同源性最高，相似性分别为99%。

•3.2.3 系统发育分析和系统发育树的构建
 在GenBank中索取同源性高的相似菌株13株，用MEGA4软件进行序列分析，采用N-J法绘制系统发育树(见图7)。

菌株鉴定结果：结合形态学和分子生物学特征结果，确定内生菌株J1为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*。

湖南农业大学

3 转化力最强菌株J1菌株鉴定

J1菌株鉴定

形态学鉴定 分子生物学鉴定

湖南农业大学

图7 内生真菌J1种相关菌株的系统发育树
 Fig.7 Phylogenetic tree of J1 and other related strains

湖南农业大学

•3.1 内生真菌J1形态学鉴定结果

- 显微镜下观察J1菌丝细长，交织分布，有隔膜，分生孢子梗光滑，帚状枝单轮生成双轮生，小梗4-6个轮生，分生孢子链状分布，圆形，见图4；
- 根据内生真菌J1菌落、菌丝和分生孢子形态特征，初步鉴定内生真菌J1为青霉属草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*)；

图3 J1在PDA培养基上颜色形态
 Fig.3 Colour morphology of J1 on PDA

图4 J1菌株显微形态(100×)
 Fig.4 The J1 spore microstructure (100×)

湖南农业大学

讨论及展望

本研究从野生虎杖茎中初筛得到6株内生真菌，HPLC法检测表明6株内生真菌均具有转化白藜芦醇苷能力，其中J1转化力最强，转化后发酵液中白藜芦醇含量达14.068 μg/mL，为未发酵前的2.65倍。

利用植物内生真菌发酵转化与植物所产相同或相似的生理活性物质，比直接化学提取法原材料利用率高，与有机合成法相比，反应条件温和，发酵条件简单，易控制，环境污染小。但分离得到的内生真菌J1为野生型菌株，目前转化率为25.6%，需要通过诱变育种、发酵条件优化等提高其转化率，为进一步微生物发酵提高虎杖中白藜芦醇苷得率提供技术支持。

湖南农业大学

•3.2 内生真菌J1分子生物学鉴定

•3.2.1 基因组DNA提取与ITS-5.8S rDNA扩增

- SDS法提取J1菌株基因组DNA，经电泳检测见图5；
- 选择通用引物ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTCGG-3'，ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'进行PCR扩增，得到约600bp的PCR扩增产物，电泳图谱见图6；

图5 内生真菌J1 DNA电泳图
 Fig.5 Electrophoretogram of genomic DNA of J1

图6 内生真菌J1 ITS-5.8S rDNA PCR扩增产物电泳图
 Fig.6 Electrophoretogram of PCR amplified products from ITS-5.8S rDNA of J1

湖南农业大学

谢谢!