

文章编号: 1000-5862(2016)06-0569-05

# 内生真菌 SF4 的鉴定及产乙酰胆碱酯酶抑制剂发酵条件的初步优化

李希茜<sup>1,2</sup>, 颜日明<sup>2</sup>, 张志斌<sup>2</sup>, 杨慧琳<sup>2</sup>, 朱 笃<sup>2,3</sup>, 汪 涯<sup>3,4\*</sup>

(1. 江西中医药大学科技学院, 江西 南昌 330025;

2. 江西师范大学生命科学学院, 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022;

3. 江西科技师范大学生命科学学院, 江西省生物加工过程重点实验室, 江西 南昌 330013;

4. 宜春学院江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000)

**摘要:** 基于菌株菌落和显微形态特征以及 ITS-rDNA 序列分析结果, 将产乙酰胆碱酯酶抑制剂( AChEI) 的内生真菌 SF4 鉴定为枝顶孢霉属 *Acremonium* sp. SF4. 通过对菌株 SF4 发酵的基础培养基、发酵温度、发酵时间、摇床转速进行初步优化, 确定了其最适产 AChEI 的摇瓶发酵条件为: 沙氏培养基, 发酵温度 28 ℃, 摇床转速为 150 r · min<sup>-1</sup>, 发酵培养 14 d. 在此条件下可发酵获得含 AChEI 的发酵浸膏 0.331 g · L<sup>-1</sup>, 对乙酰胆碱酯酶的抑制率可达 60.27%, 相比优化前均有提高. 研究有助于后期规模化高效发酵, 为分离、纯化和结构解析单一组分 AChEI 奠定基础.

**关键词:** 内生真菌; 乙酰胆碱酯酶抑制剂; 乙酰胆碱酯酶; 鉴定; 发酵

**中图分类号:** R 284.2 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2016.06.05

## 0 引言

乙酰胆碱酯酶抑制剂( Acetylcholinesterase Inhibitors, AChEI) 是目前治疗阿尔茨海默氏病( Alzheimer's disease, AD) 最具前景的药物之一, 寻找高效、低副作用的 AChEI 一直是国内外研究开发 AD 治疗药物的一个重要方向<sup>[1-2]</sup>. 近年来, 国内外已有关于化学合成 AChEI 的研究报道, 但其工艺复杂, 成本及技术要求较高, 且副作用较大; 而从植物材料中分离提取 AChEI 也受到药源植物稀缺、提取率低等诸多因素的限制<sup>[2-6]</sup>. 相比之下, 若能采用微生物合成 AChEI 的方法不仅能有效地解决其药物来源、保护生态环境, 而且天然产物的毒副作用较小, 是一种比较理想的方法<sup>[7-8]</sup>.

植物内生真菌是指它的全部生活史或一定阶段生长在植株组织内部, 而被定殖的宿主植株不表现明显病态或是暂时不显露病状的真菌. 它们具有产生与寄主植物相同或相似的生物活性物质的能力, 已成为目前国内外合成药用活性物质来源新的有效途径<sup>[9-11]</sup>. 本课题组在对药用蕨类植物蛇足石杉( *Huperzia serrata*) 茎中内生真菌进行分离筛选时获得一株产 AChEI 的内生真菌 SF4. 鉴于药用植物内

生真菌具有的潜在重要应用价值, 本文利用真菌菌落及显微形态特征, 同时结合 ITS-rDNA 序列分析对菌株 SF4 进行分离鉴定, 并优化其摇瓶发酵产 AChEI 的基础培养基, 旨在为后续实验室大规模发酵培养, 开展分离、纯化和结构解析 AChEI 以及今后试图利用微生物发酵生产 AChEI 奠定实验基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试内生真菌 SF4 为本实验室自行分离获得, 现保存于江西师范大学江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室. 碘化硫代乙酰胆碱( ATCI) 、5, 5-二硫代-2-硝基苯甲酸( DTNB) 和乙酰胆碱酯酶( AChE) 都购自 Sigma 公司; 石杉碱甲( HupA) 购自中国药品生物制品检定所; 其它试剂均为国产分析纯试剂. 菌株发酵采用沙氏液体培养基( Sabouraud's dextrose broth, SDB) <sup>[12]</sup>、查氏培养基( Czapek broth, CB) <sup>[13]</sup>、马铃薯葡萄糖液体培养基( Potato dextrose broth, PDB) <sup>[12]</sup>.

### 1.2 实验方法

1.2.1 形态鉴定 参照《真菌鉴定手册》<sup>[14]</sup> 观察菌株的菌落及孢子生长特征, 对比分析从而确定菌株

收稿日期: 2016-06-01

基金项目: 国家自然科学基金( 81260617, 31300051) 和江西省自然科学基金( 20142BAB214020) 项目资助.

通信作者: 汪 涯( 1986-), 男, 江西弋阳人, 讲师, 主要从事微生物与天然产物领域研究.

的分类学地位.

1.2.2 ITS-rDNA 序列扩增和测定 采用 CTAB 的方法提取总 DNA<sup>[15]</sup> PCR 扩增体系参照文献[7]进行.

1.2.3 ITS-rDNA 系统发育分析 测序后,参照文献[7]以 Neighbour-joining 法构建分子系统发育树,进行植株分析鉴定.

1.2.4 菌株培养 种子液制备:在 205 mL 的摇瓶中装 60 mL PDB 培养基,接入已培养 3 d 的固体菌块,在 25 °C 下 150 r·min<sup>-1</sup> 培养 3 d 作为种子液.

摇瓶发酵:500 mL 的摇瓶中装 120 mL 待测培养基,按体积比为 8% 的比例将制备的种子液接到摇瓶中,按一下标注的条件进行培养.

1.2.5 发酵粗提物提取及制备 粗提物提取:发酵结束后采用双层纱布过滤,分布收集菌体及发酵液.发酵液采用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,减压浓缩干燥后称重待用.菌体经自然风干、碾磨后,用 95% 乙醇浸提 2 d,收集浸提液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,减压浓缩干燥后称质量待用.

样品制备:分别取 1 mg 上述菌体和发酵液萃取样品超声溶解于 1 mL PBS 溶液(pH 值为 7.7)中,均配成 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的样品溶液,然后逐渐稀释至 20 μg·mL<sup>-1</sup>,用于 AChE 抑制活性检测.

1.2.6 AChE 抑制活性检测 参考 G. L. Ellman 等<sup>[16]</sup>和承曦等<sup>[17]</sup>的方法进行检测.抑制率(*I*)的计算公式为

$$I = \frac{OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{对照组}}} \times 100\%.$$

1.2.7 培养条件初步优化 1) 基础培养基的筛选

按体积比为 8% 的比例将制备的种子液分别加入到 PDB 培养基、SDB 培养基、CB 培养基中,25 °C 下 150 r·min<sup>-1</sup> 培养 10 d 后,然后分别采用本文 1.2.5 节和 1.2.6 节所述方法制备获得样品粗提物和测定 AChE 抑制活性,筛选确定合适的基础培养基.2) 发酵温度的筛选 经前述步骤,确定采用 SDB 培养基作为后续发酵培养基,按上述同样的接种方法接种后,分别置于 25 °C、28 °C 和 30 °C 的恒温摇床上,以

160 r·min<sup>-1</sup> 的转速培养 10 d.然后分别采用本文 1.2.5 节和 1.2.6 节所述方法制备获得样品粗提物和测定 AChE 抑制活性,筛选确定合适的发酵温度.

3) 摇床转速的筛选 在优化确定发酵培养基和发酵温度后,分别设定摇床转速为 80、150 和 200 r·min<sup>-1</sup>,并摇床培养 10 d.然后分别采用本文 1.2.5 节和 1.2.6 节所述的方法制备获得样品粗提物和测定 AChE 抑制活性,筛选确定合适的摇床转速.4) 发酵时间的筛选 采用上述优化的条件,摇瓶发酵时间分别 10、14 和 18 d.然后分别采用本文 1.2.5 节和 1.2.6 节所述的方法制备获得样品粗提物和测定 AChE 抑制活性,筛选确定合适的发酵时间.

1.2.8 优化后发酵验证 采用本文 1.2.7 节优化的培养条件进行发酵验证,进行 AChE 抑制活性检测.

## 2 结果与讨论

### 2.1 内生真菌的形态鉴定

菌株 SF4 在 PDA 培养基上 25 °C 培养 7 d 菌落直径可达 25 ~ 35 mm,圆形;菌落较致密且厚,质地丝绒状;菌落颜色随着孢子的形成而由起白色变成灰白色,菌落边缘较整齐,菌落背面近乎无色(见图 1).显微形态观察结果显示,菌丝体无色,或渐变为桃红或淡色,分生孢子梗单生,直立,瓶形,直接长在菌丝上,基部附近偶见分枝,有隔膜,分生孢子拟卵形或橄榄形,单生,无色,呈圆团状分布(见图 2).参考《真菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>和《半知菌分属图册》<sup>[18]</sup>中对真菌形态的描述,初步判断菌株 SF4 为半知菌亚门丝孢纲(*Hyphomycetes*)中丛梗孢目(*Moniliales*)丛梗孢科(*Moniliaceae*)丛梗孢科单胞亚科(*Amerosporoideae* of *Moniliaceae*)葡萄孢族(*Botrytidae*)的枝顶孢霉属(*Acremonium*)真菌.

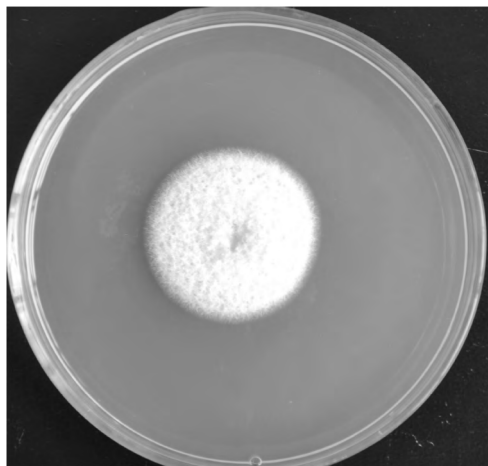


图1 菌株 SF4 在 PDA 培养基上培养菌落形态

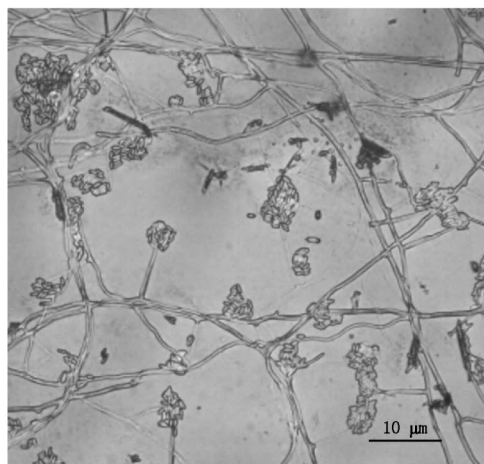


图2 菌株 SF4 显微分生孢子形态

2.2 菌株 SF4 ITS-rDNA 序列登录号及系统发育分析

ITS-rDNA 序列分析是目前真菌分类鉴定的重要参考标准. 以 ITS1 和 ITS4 为引物扩增出一条 549 bp 的 rDNA 序列( 登入号为 GU985205) 经 Blast 对比分析发现 ,其与枝顶孢霉属菌株 *Acremonium*

sp. P42E5 的序列同源性高达 99% 图 3 中系统进化发育分析结果也发现两者聚在一支. 结合形态学特征和 ITS-rDNA 序列分析结果 ,将菌株 SF4 确定为枝顶孢霉属 *Acremonium* sp. 真菌 ,命名为 *Acremonium* sp. SF4.

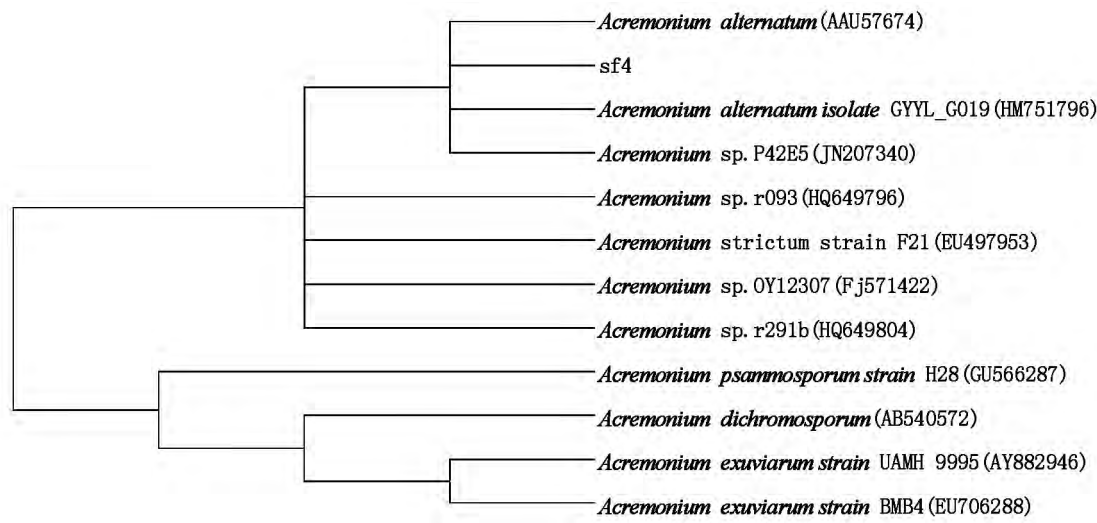


图 3 菌株 SF4 基于 ITS-rDNA 的系统发育分析

2.3 菌株 SF4 菌体及发酵液浸提物的 AChE 抑制活性

由图 4 可以看出 ,菌株 SF4 在 PDB 培养基发酵后发酵液浸提物几乎没有 AChE 抑制活性 ,抑制率仅为 11. 23%; 而菌体浸提物对 AChE 的抑制活性达到 46. 94% ,这表明菌株 SF4 代谢产的 AChEI 主要集中在菌体细胞内部而不是发酵液中 ,即很可能是菌株 SF4 的细胞内代谢产物. 因此 ,在进行发酵条件优化时 ,可直接选用菌株 SF4 发酵后菌体浸提物进行 AChE 抑制活性检测.

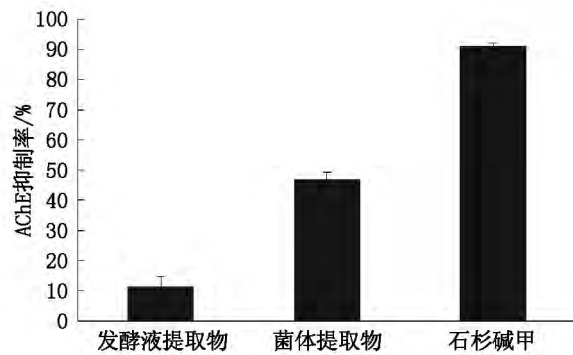


图 4 菌株 SF4 发酵液提物和菌体提物对 AChE 的抑制率

2.4 摇瓶发酵条件优化

鉴于发酵浸提物成分相对复杂 ,对 AChE 产生抑制作用的物质基础可能来源于多种成分 ,所以在进行基础培养基和发酵条件初步优化时 ,不仅要参照 AChE 抑制率的高低 ,还应关注发酵浸提物的产量. 即发酵浸提物的产量越高 ,内含的 AChEI 组份

含量亦就越高 ,也更有利于后续分离纯化发酵浸提物内的 AChEI.

2.4.1 基础培养基的确定 表 1 结果显示 ,采用 PDB 培养基与 SBD 培养基进行发酵培养 ,其发酵浸膏产量比 CB 培养基有较大提高. 于此同时 ,在 SBD 培养基中获得的发酵浸膏对 AChE 的抑制作用高于 PDB 培养基发酵获得的浸膏 ,综合发酵浸膏的产量以及对 AChE 的抑制率 ,选择 SBD 培养基进行后续优化发酵条件的基础培养基.

表 1 培养基种类对内生真菌 SF4 发酵的影响

培养基	SBD	PDB	CB
发酵浸膏产量/ (g · L <sup>-1</sup> )	0. 191 ± 0. 006	0. 185 ± 0. 009	0. 089 ± 0. 012
AChE 抑制率/%	57. 25 ± 3. 18	46. 94 ± 2. 19	45. 36 ± 1. 63

2.4.2 发酵温度的确定 发酵温度的选择直接关系到微生物次级代谢产物合成所需酶的活力. 表 2 的结果显示 ,在 SBD 培养基中 ,30 ℃ 发酵培养获得的浸膏量最高 ,28 ℃ 发酵获得的浸膏量次之 ,25 ℃ 发酵获得的浸膏量最低. 但是 ,28 ℃ 发酵培养获得的浸膏对 AChE 的抑制作用最强 ,抑制率高达 65. 13% ,而 30 ℃ 和 25 ℃ 发酵培养获得的浸膏对 AChE 的抑制作用较低 ,表明 28 ℃ 有利于菌株 SF4 代谢产 AChEI. 此外 ,菌株 SF4 在 25 ℃ 发酵培养中生长缓慢 ,相对其它两组温度 ,在同等条件下菌体生物量较低. 综合考虑发酵浸膏的产量以及对 AChE

的抑制率 确定较为适宜的发酵温度为 28 ℃.

表 2 培养温度对内生真菌 SF4 发酵的影响

培养温度/℃	25	28	30
发酵浸膏产量/ (g · L <sup>-1</sup> )	0.211 ± 0.026	0.289 ± 0.014	0.315 ± 0.016
AChE 抑制率/%	51.95 ± 2.56	65.13 ± 3.21	37.89 ± 2.42

2.4.3 摇床转速的确定 摇床转速是影响发酵过程中的重要参数之一,高摇床转速可以增加液体发酵培养过程中的溶解氧.此外,摇床转速还会影响菌株发酵培养过程中的菌体形态,进而影响次级代谢产物的合成途径.表 3 的结果显示,在 SBD 培养基中,控制发酵温度 28 ℃,摇床转速为 150 r · min<sup>-1</sup> 条件下发酵获得的浸膏量最高,转速为 200 r · min<sup>-1</sup> 条件下发酵获得的浸膏量最低.推测其原因可能是由于过高的转速使得菌株在摇瓶内所受剪切力过大,不利于菌株生长和生物量的积累.当在转速为 80 r · min<sup>-1</sup> 条件下发酵,菌体生长缓慢,可能与低转速导致溶氧不足有关.结果还显示,在 3 种不同的摇床转速下发酵获得的浸膏对 AChE 的抑制作用均较高且抑制率大小相当.因此,确定发酵的摇床转速为 150 r · min<sup>-1</sup>.

表 3 摇床转速对内生真菌 SF4 发酵的影响

摇床转速/ (r · min <sup>-1</sup> )	80	150	200
发酵浸膏产量/ (g · L <sup>-1</sup> )	0.276 ± 0.031	0.319 ± 0.023	0.257 ± 0.008
AChE 抑制率/%	62.05 ± 2.56	60.18 ± 3.17	63.33 ± 1.26

2.4.4 发酵时间的确定 微生物发酵生产的活性化合物多为次级代谢产物,多在发酵培养的后期才代谢合成.因此,确定合适的发酵周期,对于提高发酵生产的强度至关重要.表 4 的结果显示,发酵培养 14 d 后,菌株 SF4 代谢合成的次级代谢产物最高,发酵浸膏产量为 0.327 g · L<sup>-1</sup>,发酵培养 18 d 获得的发酵浸膏最少,可能是由于发酵后期出现了菌体自溶现象,导致产量合成降低.于此同时,在 3 种不同发酵时间下获得的浸膏对 AChE 的抑制作用相当.综合考率,确定发酵培养的时间为 14 d.

表 4 发酵时间对内生真菌 SF4 发酵的影响

发酵时间/d	10	14	18
发酵浸膏产量/ (g · L <sup>-1</sup> )	0.251 ± 0.021	0.327 ± 0.013	0.237 ± 0.006
AChE 抑制率/%	65.05 ± 1.71	63.18 ± 2.39	61.38 ± 1.18

## 2.5 优化后发酵验证

在进行发酵优化前,其摇瓶发酵培养条件为: PDB 培养基、发酵温度 25 ℃,摇床转速为 150 r · min<sup>-1</sup>、发酵培养 10 d.可发酵获得浸膏(0.185 ± 0.009) g · L<sup>-1</sup>,对 AChE 的抑制率为(46.94 ±

2.19) %.而优化后的摇瓶发酵条件为: SBD 培养基、发酵温度 28 ℃,摇床转速为 150 r · min<sup>-1</sup>、发酵培养 14 d.在此条件下可发酵获得浸膏(0.331 ± 0.017) g · L<sup>-1</sup>,对 AChE 的抑制率为(60.27 ± 3.01) %.结果表明,优化后的发酵条件能够提高菌株 SF4 发酵浸膏的产量,且适合其产 AChEI.

## 3 结论

近年来,利用植物内生真菌代谢合成天然药用活性化合物的研究越来越多<sup>[7,19-20]</sup>.但植物内生真菌生境独特,野生型菌株稳定性相对较差,代谢合成活性化合物的产量也较低<sup>[7-8]</sup>.因此,对其发酵培养条件的优化显得尤为重要.本研究对 1 株分离自江西庐山野生药用蕨类植物蛇足石杉内生真菌 SF4 进行了菌种鉴定及产 AChEI 发酵条件的初步优化.旨在为进一步高效发酵获得足够量的含 AChEI 的发酵浸膏并分离纯化单一活性 AChEI 奠定前期基础.研究发现,基础培养基的选择及发酵条件(发酵温度、时间、摇床转速)都会影响内生真菌 SF4 的生长与代谢产物的积累.通过优化,确定较适合内生真菌 SF4 摇瓶发酵培养产 AChEI 的条件为:采用 SBD 培养基,接种量为 8%,发酵温度 28 ℃,在摇床转速为 150 r · min<sup>-1</sup>下发酵培养 14 d.在此条件下可发酵获得浸膏(0.331 ± 0.017) g · L<sup>-1</sup>,对 AChE 的抑制率可达(60.27 ± 3.01) %.同时结合菌株菌落形态、显微形态及 ITS-rDNA 序列分析,将内生真菌 SF4 鉴定为枝顶孢霉属 *Acremonium* sp. 菌株,命名为 *Acremonium* sp. SF4.以上研究结果对进一步研究和利用该内生真菌奠定了前期基础.

## 4 参考文献

- [1] Blusztajn J K, Berse B. The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease [J]. *Metabolic Brain Disease* 2000, 15(1): 45-64.
- [2] Zhao Qin, Tang Xican. Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine [J]. *European Journal of Pharmacology* 2002, 455(2/3): 101-107.
- [3] Ma Xiaoqiang, Gang D R. The Lycopodium alkaloids [J]. *Natural Product Reports* 2004, 21(6): 752-772.
- [4] 张君诚, 邢建宏, 宋育红, 等. 药用植物蛇足石杉研究新进展 [J]. *中国野生植物资源* 2008, 27(2): 1-5.
- [5] 赖政, 李希茜, 汪涯, 等. 蛇足石杉中石杉碱甲含量测定及其时空动态 [J]. *江西师范大学学报: 自然科学版*, 2014, 38(5): 489-495.
- [6] Ma Xiaoqiang, Tan Changheng, Zhu Dayuan, et al. Hu-

- perzine A from *Huperzia* species: an ethnopharmacological review [J]. Journal of Ethnopharmacology 2007 ,113( 1) : 15-34.
- [7] Wang Ya ,Zeng Qinggui ,Zhang Zhibin ,et al. Isolation and characterization of endophytic Huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2011 ,38( 9) : 1267-1278.
- [8] Yan Riming ,Zhang Zhibin ,Wang Ya ,et al. Efficient strategy for maintaining and enhancing the huperzine A production of *Shiraia* sp. S1f14 through inducer elicitation [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology , 2014 ,41( 7) : 1175-1179.
- [9] Stierle A ,Strobel G ,Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* ,an endophytic fungus of *Pacific Yew* [J]. Science ,1993 ,260( 9) : 214-216.
- [10] Stone J K ,Bacon C W ,White J F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined [M]. Bacon C W , White JF Jr Microbial Endophytes ,New York: Marcel Dekker 2000.
- [11] Wang Ya ,Gao Boliang ,Li Xixi ,et al. Phylogenetic diversity of culturable endophytic fungi in Dongxiang wild rice ( *Oryza rufipogon* Griff) ,detection of polyketide synthase gene and their antagonistic activity analysis [J]. Fungal Biology 2015 ,119( 11) : 1032-1045.
- [12] 张玲. 微生物学实验指导 [M]. 北京: 北京交通大学出版社 2007.
- [13] 齐祖同. 中国真菌志 [M]. 第5卷. 北京: 科学出版社 , 1997.
- [14] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社 ,1979.
- [15] Guo L D ,Hyde K D ,Liew E C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences [J]. New Phytologist ,2000 ,147( 3) : 617-630.
- [16] Ellman G L ,Courtney K D ,Andre V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochemical Pharmacology ,1961 ,7( 2) : 88-95.
- [17] 承曦 陈钧 朱大元. 蛇足石杉内生真菌 g5 的乙酰胆碱酯酶抑制活性初步研究 [J]. 微生物学通报 ,2008 ,35( 11) : 1764-1768.
- [18] 喻璋 张猛. 半知菌分属图册 [M]. 北京: 科学出版社 , 2009.
- [19] Rivera-Chaávez J ,Figueroa M ,González MDC ,et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from a *Xylaria feejeensis* associated with *Hintonia latiflora* [J]. Journal of Natural Products , 2014 ,78( 4) : 730-735.
- [20] Liu Ling ,Gao Hao ,Chen Xulin ,et al. Brasilamides A-D: sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense* [J]. European Journal of Organic Chemistry 2010 ,17: 3302-3306.

## The Identification and Optimization of Fermentation Conditions of Acetylcholinesterase Inhibitors-Producing Endophytic Fungi Strain SF4

LI Xixi<sup>1,2</sup> ,YAN Riming<sup>2</sup> ,ZHANG Zhibin<sup>2</sup> ,YANG Huilin<sup>2</sup> ,ZHU Du<sup>2,3</sup> ,WANG Ya<sup>3,4\*</sup>

( 1. Science and Technology College ,Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine ,Nanchang Jiangxi 330025 ,China;

2. Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China;

3. Key Lab of Bioprocess Engineering of Jiangxi Province ,College of Life Sciences ,Jiangxi Science and Technology Normal University ,Nanchang Jiangxi 330013 ,China;

4. Key Laboratory for Research on Active Ingredients in Natural Medicine of Jiangxi Province ,Yichun University ,Yichun Jiangxi 336000 ,China)

**Abstract:** The acetylcholinesterase inhibitors( AChEI) -producing endophytic fungi strain SF4 was identified as *Acremonium* sp. SF4 based on its morphological characteristics and ITS-rDNA sequence analysis. The effects of fermentation medium ,temperature ,rotation speed and cultural time on acetylcholinesterase( AChE) inhibitory activity and AChEI metabolites amount were analyzed. It was indicated that the appropriate fermentation condition was: sabouraud dextrose broth( SDB) medium ,28 °C ,150 r · min<sup>-1</sup> for 14 d. Under the optimized conditions of fermentation ,the amount of AChEI metabolites and AChE inhibitory activity cytotoxic activity is 0.331 g · L<sup>-1</sup> and 60.27% respectively ,higher than initial conditions. These results can lay the foundation for the further separation and purification of the AChEI metabolites.

**Key words:** endophytic fungi; acetylcholinesterase inhibitors; acetylcholinesterase; identification; fermentation

( 责任编辑: 刘显亮)