

文章编号: 1000-5862(2019)05-0490-06

## 不同碳源对内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 产花醌类色素的影响

汤丽娟<sup>1</sup>, 包建莹<sup>1</sup>, 颜日明<sup>1</sup>, 汪 涯<sup>2</sup>, 杨慧林<sup>1</sup>, 张志斌<sup>1</sup>, 朱 笃<sup>1,2\*</sup>

(1. 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;

2. 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)

**摘要:** 花醌类化合物是一类具有抗癌、抗病毒活性的光敏性色素。该文比较了不同碳源对蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 液态发酵产花醌类化合物的影响。结果表明: 可溶性淀粉有利于 *Shiraia* sp. Slf14 菌体的生长, 而果糖则有利于花醌类化合物的生物合成。当果糖浓度为  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 菌体花醌类化合物总产量可达  $1\,566.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 同时果糖能提升竹红菌甲素组分的含量。菊粉作为一种来源于菊芋的果糖基生物物质, 同样有利于花醌类色素的生物合成, 当其浓度为  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 色素总产量可达  $1\,322.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 且其有利于蒽醌酮素 A 组分积累。

**关键词:** 竹黄菌; 碳源; 花醌类化合物; 竹红菌素; 代谢调控

**中图分类号:** S 326 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2019.05.09

### 0 引言

花醌类化合物(Perylenequinones, PQ) 是以花醌为母核的一类化合物, 因其含 5 环共轭生色团结构, 颜色较深, 故亦称为花醌类色素。花醌类色素包括竹红菌素(Hypocrellins)、尾孢素(Cercosporin)、蒽醌酮素(Elsinochromes)、弗莱菌素(Phleiochrome) 和金丝桃素(Hypericin) 等一系列化合物<sup>[1]</sup>。花醌类色素作为传统中药, 可用于治疗胃病、类风湿性关节炎、多种浅层微血管疾病等<sup>[2-5]</sup>。同时, 花醌类色素可杀伤肿瘤细胞, 抑制艾滋病病毒(HIV-1)<sup>[6]</sup>。此外, 花醌类化合物类色素因其色泽鲜红、着色力好, 可用于食用天然色素开发, 显示出广阔的应用前景<sup>[7]</sup>。

迄今, 竹红菌素等花醌类色素主要来源于天然竹黄子座, 但由于天然竹黄受地域限制, 且存在生长季节短、天然产物含量低等问题, 远无法满足人们的需求<sup>[8]</sup>。竹黄液体发酵生产竹红菌素具有周期短、生产效率高等优势, 受到人们的高度重视。在过去 20 余年中, 人们对液态发酵生产花醌类色素开展了探讨, 围绕菌种筛选和诱变、培养基及培养条件优化、诱导子诱导等方面开展了较多研究, 并取得了一

定的进展。如 Shen Xiaoye 等<sup>[9]</sup>开展了竹红菌素高产菌株筛选, 并通过培养基优化, HA 产量达到  $921.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Du Wen 等<sup>[10-11]</sup>添加 *Trametes* sp. 与 *Aspergillum niger* 菌丝体至 *S. bambusicola* 发酵液中, 竹红菌素产量分别提高了 7.4 倍和 6.2 倍; Cai Yujie 等<sup>[12]</sup>和 Lei Xiuyun 等<sup>[13]</sup>分别在 *Shiraia* sp. SUPER-H168 和 *S. bambusicola* 发酵培养基中添加表面活性剂 Triton X-100, 色素产量最高分别达到  $780.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $96.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Sun Chunxiao 等<sup>[14]</sup>利用低强度的超声波处理 *S. bambusicola*, HA 产量增加 177.2%, 达到  $247.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

碳源是发酵培养基的主要组成成分, 能为细胞生长、代谢提供主要能源, 对菌株合成次生代谢产物也具有重要影响。因此, 碳源优选是发酵培养基优化的首要研究问题。人们对适合于花醌类化合物生物合成的碳源进行了筛选, 竹红菌素等花醌类色素产量获得较明显提升<sup>[15-18]</sup>。本实验室前期从蕨类植物蛇足石杉中筛选到 1 株高产花醌类色素的内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14<sup>[19]</sup>, 通过在发酵培养基中添加  $\text{Ca}^{2+}$ , 其花醌类色素产量最高可达  $(1\,894.66 \pm 21.93) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[20]</sup>。本文研究了不同碳源及浓度对内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 发酵产花醌类色素的影

收稿日期: 2019-04-08

基金项目: 国家自然科学基金(31460021) 和江西省自然科学基金(20151BAB204002) 资助项目。

通信作者: 朱 笃(1971-) 男, 江西高安人, 教授, 博士, 主要从事微生物资源及代谢调控研究。E-mail: zhudu12@163.com

响,旨在为将来大规模发酵生产花醌类色素、降低发酵生产成本提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC M209294),是本实验室前期从江西省庐山自然保护区采集的蕨类植物蛇足石杉中分离获得的<sup>[21]</sup>。

1.1.2 培养基 斜面培养基( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20,pH 值 7.0;种子培养基( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):马铃薯 200,葡萄糖 20;发酵培养基( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):马铃薯 200.碳源依据实验设计需要而改变。

1.1.3 主要试剂 葡萄糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、乳糖和可溶性淀粉均为分析纯(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),丙酮为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),菊粉为分析纯(北京美亚斯喇旨技术有限公司),乙腈为色谱纯(西陇化工有限公司),5种花醌类色素 HA、HB、EA、EB 和 EC 标准品均为本实验室前期自制,其结构经核磁和质谱鉴定,HPLC 纯度 $\geq 98\%$ 。

1.1.4 仪器与设备 Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪(美国沃特世科技有限公司),ZWY-2112B 恒温摇床(上海智城有限公司),RE-5299 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),KQ5200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),LDZM-80KCS 高压自动灭菌锅(上海申实医疗器械厂),UV755B 可见紫外分光光度计(上海分析仪器总厂),电子天平 CP114(德国赛多利斯仪器)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 种子制备 用竹签挑取小块斜面培养基上的菌体,转接入 PDA 培养基中,于  $28^\circ\text{C}$  下培养 7 d 后,再用竹签于平板上挑取小块菌体,转接于种子培养基( $120\text{ mL}/500\text{ mL}$ ),在  $28^\circ\text{C}$ 、 $150\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下光照培养 3 d。

1.2.2 发酵培养 将  $8\text{ mL}$  上述种子液接入发酵培养基( $120\text{ mL}/500\text{ mL}$ )中,在  $28^\circ\text{C}$ 、 $150\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  及光照条件下培养 14 d。

1.2.3 菌体干质量的测定 发酵液经 200 目筛过滤,收集菌体,用蒸馏水洗涤后,将其放入  $45^\circ\text{C}$  烘箱中烘干至恒质量后用分析天平测其质量。

1.2.4 花醌类化合物的提取 称取烘干后的菌体  $1\text{ g}$ ,经粉碎,用  $100\text{ mL}$  丙酮于  $70^\circ\text{C}$  水浴中进行索

氏抽提,直至回流液体呈无色,然后将所得萃取液在  $40^\circ\text{C}$  条件下旋转蒸干,加入  $20\text{ mL}$  乙腈复溶,稀释相应倍数后用于 HPLC 分析。

1.2.5 花醌类化合物总量及组成成分含量的测定 参照文献[22]的方法,采用分光光度法测定花醌类色素总量,检测波长为  $465\text{ nm}$ 。花醌类色素各组分(HA、HB、EA、EB、EC)分析采用 HPLC 法测定,分析柱为 YMC-Triart C18 column( $250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ , Tokyo, Japan),流动相为 70% 乙腈和 30% 水,流速为  $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长为  $460\text{ nm}$ 。

1.2.6 不同碳源对 *Shiraia* sp. Slf14 液态发酵产花醌类色素的影响 将 *Shiraia* sp. Slf14 分别接种至 20% 的马铃薯、0.06% 的  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和 2% 的不同碳源组成的培养基中进行培养,每组 3 个平行,发酵完成后进行花醌类化合物分离提取及分析。

1.2.7 碳源浓度对 *Shiraia* sp. Slf14 液态发酵产花醌类色素的影响 在含 20% 的马铃薯、0.06% 的  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  的基础培养基中,分别添加 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7% 和 8% 不同浓度的果糖和菊粉,将 *Shiraia* sp. Slf14 接种培养,每组实验 3 个平行,比较不同碳源浓度下 *Shiraia* sp. Slf14 发酵产花醌类化合物的产量及其组成。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同碳源对 *Shiraia* sp. Slf14 生长及花醌类化合物产量的影响

比较葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖和可溶性淀粉对 *Shiraia* sp. Slf14 生长和花醌类色素的影响,结果见表 1。表 1 表明:可溶性淀粉有利于菌体生长( $16.36\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),蔗糖次之,而乳糖中菌体生物量最低。当以果糖为碳源时,花醌类色素产量最高,达到  $544.77\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (含量  $40.15\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{ dcw}$ )。蔗糖次之(产量为  $490.28\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,含量为  $31.77\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{ dcw}$ ),而乳糖条件下色素产量也最低。当以葡萄糖作为碳源时,其色素产量为  $305.07\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,仅为果糖中色素产量的 56%。鉴于果糖有利于 *Shiraia* sp. Slf14 花醌类色素的生产,考虑到菊粉生物质主要成分为果聚糖,为了探讨菊粉作为花醌类色素发酵生产碳源的可行性,进一步考察了 *Shiraia* sp. Slf14 利用菊粉发酵产色素的情况。结果表明:当以菊粉作为碳源时,菌体色素产量与果糖非常接近,达到  $541.56\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (含量为  $38.29\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{ dcw}$ )(见表 1)。由此可见,可溶性淀粉与蔗糖有利于 *Shiraia* sp. Slf14 菌体生长,而果糖与菊粉则有利于

*Shiraia* sp. Sif14 发酵生产花醌类化合物.

表 1 不同碳源对菌株生物量及花醌类色素生成的影响

碳源	生物量/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	色素浓度/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
蔗糖	$15.43 \pm 0.33^*$	$490.28 \pm 17.25^*$
果糖	$14.37 \pm 0.22$	$544.77 \pm 12.36^*$
麦芽糖	$15.21 \pm 0.29^*$	$345.25 \pm 17.36^*$
可溶性淀粉	$16.36 \pm 0.42^*$	$133.16 \pm 9.40^*$
葡萄糖	$14.36 \pm 0.24$	$305.07 \pm 10.94$
乳糖	$10.50 \pm 0.20^*$	$67.56 \pm 5.22^*$
菊粉	$14.14 \pm 0.20$	$541.56 \pm 12.12^*$

注: \* 表示与葡萄糖培养下相比有显著差异( $P < 0.05$ ). 每组 3 个平行, 并给出了相应的误差值.

2.2 不同的碳源对内生真菌 *Shiraia* sp. Sif14 花醌类色素组成的影响

不同碳源对 *Shiraia* sp. Sif14 色素组成影响的结果见表 2. 表 2 表明: 分别在 7 种碳源中培养 *Shiraia* sp. Sif14 均能合成 5 种花醌类色素, 且当以果糖与菊粉为碳源时, 菌体色素产量及组成最为接近. 当以果糖为碳源时, HA 产量最高, 达  $270.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 这表明果糖能促进菌体 HA 的合成; 当以葡萄糖为碳源时, 菌体中 EC 产量高于其他碳源, 为  $50.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 在蔗糖中 EA 产量最高, 为  $161.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 在供试碳源中, HB 的产量相比于其他组成成分含量都明显较低.

表 2 不同的碳源对花醌类化合物各组分含量的影响

碳源	色素浓度/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )				
	EC	EB	EA	HA	HB
葡萄糖	$50.55 \pm 4.23$	$21.87 \pm 1.76$	$42.77 \pm 4.98$	$137.68 \pm 13.06$	$8.79 \pm 0.53$
果糖	$21.25 \pm 1.87^*$	$39.54 \pm 3.13^*$	$138.04 \pm 11.33^*$	$270.31 \pm 18.92^*$	$1.04 \pm 0.11^*$
麦芽糖	$17.30 \pm 1.54^*$	$30.80 \pm 3.25$	$95.15 \pm 10.36^*$	$146.04 \pm 16.17^*$	$7.42 \pm 0.37^*$
蔗糖	$28.98 \pm 2.46^*$	$33.61 \pm 2.18^*$	$161.45 \pm 17.78^*$	$208.91 \pm 19.38^*$	$10.20 \pm 0.67^*$
乳糖	$10.35 \pm 0.75^*$	$5.99 \pm 0.88^*$	$13.07 \pm 0.81^*$	$28.73 \pm 3.11^*$	$1.86 \pm 0.41^*$
可溶性淀粉	$12.28 \pm 1.03^*$	$13.00 \pm 1.04^*$	$35.35 \pm 2.64^*$	$57.58 \pm 4.34^*$	$3.13 \pm 0.25^*$
菊粉	$12.20 \pm 0.94^*$	$46.12 \pm 4.31^*$	$144.08 \pm 14.27^*$	$262.35 \pm 24.87^*$	$4.67 \pm 0.48^*$

注: \* 表示与葡萄糖培养下相比有显著差异( $P < 0.05$ ). 每组 3 个平行, 并给出了相应的误差值.

2.3 不同浓度的果糖和菊粉对 *Shiraia* sp. Sif14 生长及花醌类色素产量的影响

分别选用不同浓度( $10 \sim 80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的果糖和菊粉, 探究不同浓度下菌体生长及其色素含量( 见图 1). 结果表明: 随着果糖和菊粉浓度的增加, 对菌体生物量和花醌类化合物产量均有明显的影响. 从生物量上看, 在  $10 \sim 60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内, 碳源浓度的增加有利于菌体生长, 但碳源浓度超过  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  后继续增加, 菌体生长呈现明显下降. 在  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  果糖和菊粉时菌体生物量均为最高, 分别达到  $34.46 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $25.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 果糖较之菊粉更有利于菌体生长( 见图 1(a)). 从色素产量上看, 果糖浓度在  $0 \sim$

$60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  范围, 浓度增加有利于色素的合成, 但当果糖浓度高于  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 色素产量急剧下降. 而当菊粉浓度低于  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 增加其浓度有利于色素合成, 但当菊粉浓度高于  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时则不利于色素生产. 当果糖浓度和菊粉浓度分别为  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 花醌类色素产量均达到最大值, 分别为  $1566.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1322.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( 见图 1(b)). 虽然 *Shiraia* sp. Sif14 在菊粉中生长明显低于在果糖中, 但更有利于菌体色素的积累. 在最适产色素条件下, 菊粉中菌体最高色素含量( $69.62 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dcw}$ ) 明显高于果糖中的最高含量( $45.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dcw}$ ).

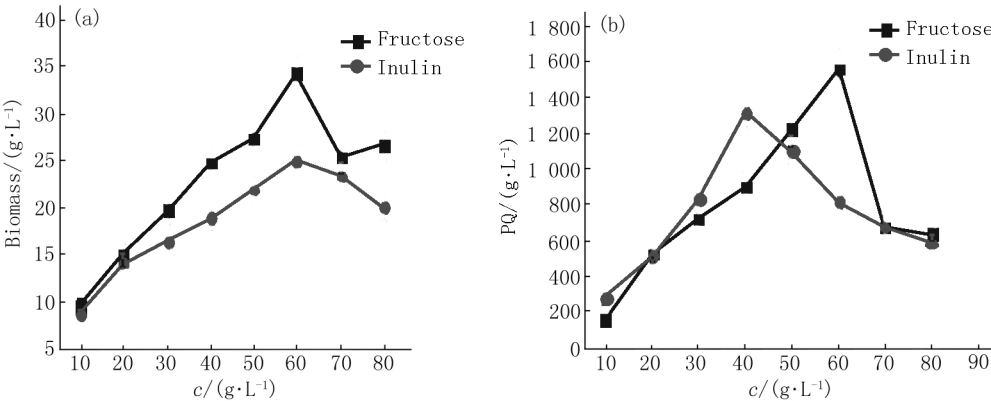


图 1 果糖和菊粉对菌株 *Shiraia* sp. Sif14 生物量 (a) 和花醌类色素产量 (b) 的影响

2.4 不同浓度的果糖和菊粉对 *Shiraia* sp. Slf14 产花醌类色素组成的影响

改变果糖浓度, *Shiraia* sp. Slf14 产花醌类色素组成基本保持稳定, 且果糖有利于 HA 的生物合成. 当果糖浓度为  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 各色素组分产量均达最大值, 其中 HA 产量为  $682.34\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , EA 产量为  $393.54\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (见表 3). 不同浓度的菊粉对 *Shira-*

*ia* sp. Slf14 产花醌类色素组成影响显著 (见表 4), 虽然  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的菊粉与等浓度果糖中色素组分相差不大, 但在菊粉超过  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, EA 和 HA 组分发生明显变化, EA 在总色素中的占比上升至 50% 左右, 而 HA 的占比下降至 35% 左右. 这表明以菊粉为碳源时更有利于色素 EA 产生, 但不利于色素 HA 合成.

表 3 果糖浓度对色素组成的影响

果糖浓度/ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	色素浓度/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )				
	EC	EB	EA	HA	HB
10	$5.01\pm0.14$	$12.45\pm0.79$	$37.67\pm1.24$	$62.24\pm5.79$	$0.31\pm0.02$
20	$21.25\pm1.82^*$	$39.54\pm2.52^*$	$138.04\pm8.29^*$	$270.31\pm24.24^*$	$1.04\pm0.09$
30	$23.01\pm2.75^*$	$51.86\pm3.74^*$	$185.63\pm14.08^*$	$320.97\pm12.17^*$	$1.48\pm0.11^*$
40	$26.08\pm2.27^*$	$56.65\pm5.34^*$	$208.03\pm17.3^*$	$351.98\pm33.44^*$	$1.62\pm0.08^*$
50	$30.16\pm1.67^*$	$63.91\pm3.47^*$	$225.55\pm20.41^*$	$397.16\pm37.62^*$	$1.82\pm0.13^*$
60	$50.29\pm4.36^*$	$108.85\pm7.73^*$	$393.54\pm27.75^*$	$682.34\pm66.43^*$	$3.13\pm0.21^*$
70	$21.07\pm1.35^*$	$46.48\pm5.06^*$	$167.84\pm16.89^*$	$282.95\pm31.25^*$	$1.33\pm0.05^*$
80	$19.67\pm1.13^*$	$43.17\pm4.69^*$	$155.12\pm12.56^*$	$269.35\pm13.46^*$	$1.23\pm0.05^*$

注: \* 表示与果糖浓度为  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  培养下相比有显著差异 ( $P<0.05$ ). 每组 3 个平行, 并给出了相应的误差值.

表 4 菊粉浓度对色素组成的影响

菊粉浓度/ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	色素浓度/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )				
	EC	EB	EA	HA	HB
10	$5.96\pm0.23$	$18.66\pm1.23$	$103.58\pm9.13$	$85.62\pm8.25$	$2.12\pm0.15$
20	$12.2\pm0.88^*$	$46.12\pm3.72^*$	$144.08\pm11.14^*$	$262.35\pm15.11^*$	$4.67\pm0.24^*$
30	$23.14\pm1.97^*$	$91.36\pm7.47^*$	$376.98\pm20.56^*$	$259.67\pm18.04^*$	$5.62\pm0.35^*$
40	$30.03\pm2.19^*$	$101.37\pm9.88^*$	$643.65\pm45.32^*$	$406.58\pm29.53^*$	$8.95\pm0.82^*$
50	$28.65\pm1.62^*$	$95.81\pm9.21^*$	$512.31\pm42.91^*$	$385.24\pm31.62^*$	$7.62\pm0.57^*$
60	$21.32\pm1.09^*$	$85.13\pm7.44^*$	$365.21\pm19.43^*$	$264.14\pm25.66^*$	$5.74\pm0.33^*$
70	$15.69\pm1.27^*$	$54.95\pm5.73^*$	$236.99\pm20.45^*$	$189.96\pm15.25^*$	$5.96\pm0.40^*$
80	$12.31\pm0.95^*$	$47.14\pm3.39^*$	$176.98\pm17.57^*$	$165.54\pm11.43^*$	$4.76\pm0.29^*$

注: \* 表示与菊粉浓度为  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  培养下相比有显著差异 ( $P<0.05$ ). 每组 3 个平行, 并给出了相应的误差值.

3 讨论与结论

迄今, 花醌类化合物的来源有限, 且发酵产量相对较低, 这对其研究与应用产生了严重阻碍. 若想拓宽研究范围以及进行大规模的生产, 就必须提高菌株发酵水平, 找到最佳的培养条件和调控方式来提高花醌类化合物的产量, 这是花醌类化合物生物合成研究中需要解决的关键问题. *Shiraia* sp. Slf14 是本实验室前期从蕨类植物蛇足石杉中分离到的 1 株内生真菌, 可同时产石杉碱甲和花醌类色素<sup>[21-23]</sup>, 本课题组已从中分离鉴定了竹红菌甲素 (HA)、竹红菌乙素 (HB)、竹红菌丙素 (HC)、痂囊腔菌素 A (EA)、痂囊腔菌素 B (EB) 和痂囊腔菌素 C (EC) 等 6 种花醌类色素, 并建立了发酵液中色素的同步分析方法<sup>[23-24]</sup>. 此外, *Shiraia* sp. Slf14 全基因组测序已

完成<sup>[24]</sup>, 这也为花醌类色素代谢调控及其生物合成的分子机制研究奠定了坚实基础.

发酵培养基的组成成分, 特别是起主要作用的碳源, 是细胞生长和代谢的主要能源, 对次级代谢产物的合成具有十分重要的作用. 因此, 碳源优选是探究发酵生产大量花醌类化合物的有效途径. 以往竹黄菌的发酵优化研究均发现葡萄糖是合成 PQ 的最好碳源, 如 Yang Hailong 等<sup>[15]</sup> 研究了不同碳源对竹黄 *S. bambusicola* 发酵产竹红菌素的影响, 发现葡萄糖为最适碳源. 通过优化条件, 其竹红菌素产量到达  $185.17\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 文献 [16-17] 均发现葡萄糖是 *S. bambusicola* 合成竹红菌素的最佳碳源. 此外, 韩钱松<sup>[25]</sup> 开展了 *Shiraia* sp. SUPER-H168 液体发酵研究, 也发现葡萄糖为最佳碳源, 其不仅有利于菌体色素合成, 而且能提升其中 HA 和 EA 的含量. 本研究表明, 可溶性淀粉和蔗糖有利于内生真菌 *Shiraia*

sp. Slf14 菌体生长,这与文献[15-16]研究结果一致。但与以往的结果不同是, *Shiraia* sp. Slf14 合成竹红菌素等花醌类色素的最适碳源为果糖。最适碳源不同可能是 *Shiraia* sp. Slf14 具有独特的生理代谢特性,而这种独特代谢特性可归因于菌株来源的不同。一般而言,竹黄菌如 *S. bambusicola* 和 *Shiraia* sp. SUPER-H168 都是分离自竹黄子座和短穗竹 (*Brachystachyum densiflorum*) 组织<sup>[11-12,15]</sup>,而 *Shiraia* sp. Slf14 是从蕨类植物蛇足石杉中分离的内生真菌。同时,分子生物学分析表明, *Shiraia* sp. Slf14 与 *S. bambusicola*、*Shiraia* sp. SUPER-H168 的亲缘关系较远,可能为竹黄属的一个潜在新种<sup>[21]</sup>。

菊粉主要来源于菊科植物菊芋或菊苣,其分子主要由 D-呋喃果糖分子经  $\beta$ -2,1-糖苷键连接而成的一种果聚糖,在稀酸或酶处理下极易水解成果糖,是一类十分重要的生物质资源<sup>[26]</sup>。本研究表明,菊粉能有效促进菌体合成花醌类色素。在优选出的  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  果糖和  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  菊粉条件下,菌体色素产量分别达到  $1\,566.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1\,322.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与已有报道结果相比显示出明显的优势,这表明 *Shiraia* sp. Slf14 可作为 1 株竹红菌素等花醌类色素发酵生产的高产候选菌株。且当以菊粉作为碳源时其花醌类色素产量接近于果糖,同时单位菌体中花醌类色素含量明显高于果糖。由此可见,当以 *Shiraia* sp. Slf14 发酵生产花醌类色素时,可利用廉价碳源菊粉替代果糖,这为低成本规模化发酵生产花醌类色素奠定坚实基础。

#### 4 参考文献

- [1] Mulrooney C A, O'Brien E M, Morgan B J, et al. Perylenequinones: isolation, synthesis, and biological activity [J]. *European J Org Chem* 2012 2012( 21): 3887-3904.
- [2] Zhenjun Diwu, Lown J W. Hypocrellins and their use in photosensitization [J]. *Photochem Photobiol*, 1990, 52( 3): 609-616.
- [3] 梁晓辉, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 药用真菌竹黄的研究进展 [J]. *食品与生物技术学报* 2008 27( 5): 21-26.
- [4] Su Yujie, Sun Jun, Rao Shengqi, et al. Photodynamic antimicrobial activity of hypocrellin A [J]. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2011, 103( 1): 29-34.
- [5] Xu Shangjie, Shen Chen, Zhang Manhua, et al. A novel method for the preparation of amino-substituted hypocrellin B [J]. *Bioorg Medl Chem Lett*, 2001, 11( 15): 2045-2047.
- [6] Xie Wenli, Wei Shaohua, Liu Jihua, et al. Combination antitumor therapy activity studies for the complex of hypocrellin A and gallium ion [J]. *Dyes and Pigments* 2014, 101: 43-50.
- [7] Su Yujie, Si Shaohong, Qiao Liwen, et al. The effect of a hypocrellin A enriched diet on egg yolk quality and hypocrellin A distributions in the meat of laying hens [J]. *Eur Food Res Technol* 2011 232( 6): 935-940.
- [8] Wu Houming, Lao Xiafei, Wang Qiwen, et al. The shiraia-chromes: novel fungal perylenequinone pigments from *Shiraia bambusicola* [J]. *J Nat Prod*, 1989, 52( 5): 948-951.
- [9] Shen Xiaoye, Hu Yingju, Song Liang, et al. Improvement of hypocrellin production by a new fungal source and optimization of cultivation conditions [J]. *Biotechnol Biotech Eq* 2016 30( 4): 819-826.
- [10] Du Wen, Liang Zongqi, Zou Xiao, et al. Effects of microbial elicitor on production of hypocrellin by *Shiraia bambusicola* [J]. *Folia Microbiol* 2013 58( 4): 283-289.
- [11] Du Wen, Liang Jiandong, Han Yanfeng, et al. Nitric oxide mediates hypocrellin accumulation induced by fungal elicitor in submerged cultures of *Shiraia bambusicola* [J]. *Bio-technol Lett* 2015 37( 1): 153-159.
- [12] Cai Yujie, Liao Xiangru, Liang Xiaohui, et al. Induction of hypocrellin production by Triton X-100 under submerged fermentation with *Shiraia* sp. SUPER-H168 [J]. *New Biotechnol* 2011 28( 6): 588-592.
- [13] Lei Xiuyun, Zhang Mingye, Ma Yanjun, et al. Transcriptional responses involved in enhanced production of hypocrellin A by addition of Triton X-100 in submerged cultures of *Shiraia bambusicola* [J]. *J Ind Microbiol Biot*, 2017 44( 10): 1415-1429.
- [14] Sun Chunxiao, Ma Yanjun, Wang Jianwen. Enhanced production of hypocrellin A by ultrasound stimulation in submerged cultures of *Shiraia bambusicola* [J]. *Ultrason Sonochem* 2017 38: 214-224.
- [15] Yang Hailong, Xiao Caixia, Ma Wenxin, et al. The production of hypocrellin colorants by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiraia bambusicola* [J]. *Dyes and Pigments* 2009 82( 2): 142-146.
- [16] 项小燕, 张中信, 谢翎, 等. 竹黄菌液体培养下产竹红菌素的研究 [J]. *广西植物* 2012 32( 2): 264-268.
- [17] 胡明明, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 竹红菌素培养基的初步优化 [J]. *食品与机械* 2010 26( 5): 141-143.
- [18] 史文玉, 吕平, 张同存. 新型食品色素竹红菌素发酵培养基的研究 [J]. *食品研究与开发* 2016 37( 6): 182-185.
- [19] Liu Bin, Bao Jianying, Zhang Zhibin, et al. Enhanced production of perylenequinones in the endophytic fungus *Shiraia* sp. Slf14 by calcium/calmodulin signal transduction [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018 102( 1): 153-163.

- [20] 彭思露, 杨慧林, 李尔汉 等. 蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 中Ⅲ型聚酮合酶的表达、纯化及生物信息学分析 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2015, 39(4): 430-434.
- [21] Zhu Du, Wang Jixiang, Zeng Qinggui, et al. A novel endophytic Huperzine A: producing fungus *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata* [J]. J Appl Microbiol, 2010, 109(4): 1469-1478.
- [22] Tong Zhiwu, Mao Lingwen, Liang Hailin, et al. Simultaneous determination of six perylenequinones in *Shiraia* sp. Slf14 by HPLC [J]. J Liquid Chromatogr Relat Technol, 2017, 40(10): 536-540.
- [23] 颜日明, 李希茜, 汪涯 等. 蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 化学成分及其抑菌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(9): 1393-1397.
- [24] Yang Huilin, Wang Ya, Zhang Zhibin, et al. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Shiraia* sp. strain Slf14, a novel endophytic fungus producing huperzine A and hypocrellin A [J]. Genome Announcements, 2014, 2(1): e00011-e00014.
- [25] 韩钱松. 竹黄菌 *Shiraia* sp. SUPER-H168 液态发酵产竹红菌素的优化 [D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [26] 高教琪, 袁文杰, 陈丽杰 等. 通气量和菊粉浓度对克鲁维酵母乙醇发酵的影响 [J]. 生物工程学报, 2013, 29(3): 325-332.

## The Effects of Different Carbon Sources on Production of Perylenequinones in Endophytic Fungus *Shiraia* sp. Slf14

TANG Lijuan<sup>1</sup>, BAO Jianying<sup>1</sup>, YAN Riming<sup>1</sup>, WANG Ya<sup>2</sup>, YANG Huilin<sup>1</sup>, ZHANG Zhibin<sup>1</sup>, ZHU Du<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China; 2. Key Laboratory of Bioprocess of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang Jiangxi 330013, China)

**Abstract:** Perylenequinones (PQ) are a class of photosensitive pigments with antitumor and antiviral activity. In present study, the effects of different carbon sources on the growth and PQ production of the endophytic fungus *Shiraia* sp. Slf14 are studied. The results show that soluble starch is suitable to fungal growth, while fructose can enhance PQ production significantly. With 60 g · L<sup>-1</sup> fructose as the carbon source, the total PQ yield of 1 566.64 mg · L<sup>-1</sup> is achieved. Moreover, fructose is also conducive to the accumulation of hypocrellin A (HA) component. Besides, the inulin as a kind of fructose based biomass from Jerusalem artichoke also could improve PQ production. By using 40 g · L<sup>-1</sup> inulin, the total PQ yield of 1 322.85 mg · L<sup>-1</sup> is obtained, and inulin could enhance the accumulation of elsinochrome A (EA) component. The results of this study will lay a basis for improving PQ fermentation production of *Shiraia* sp. Slf14.

**Key words:** *Shiraia bambusicola*; carbon sources; perylenequinones; hypocrellins; metabolic regulation

(责任编辑: 刘显亮)