

学校编码: 10384
学号: 21720061152155

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦门大学

硕士学位论文

红树真菌的生物活性以及去乙酰真菌环氧
乙酯的发酵和理化性质的研究

Study on Bioactivity of Fungi from Mangrove and Research
of Fermentation and Properties of Deacetylmucoepoxydiene

徐莹

指导教师姓名: 宋思扬 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2009年 月 日

论文答辩时间: 2009年 月 日

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评阅人:

2009年 6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
前言	1
一、海洋真菌抗肿瘤天然产物概述	1
二、红树真菌的分布及其代谢产物	4
1 红树植物及红树真菌	4
2 红树真菌抗肿瘤活性物质	5
3 红树内生真菌A123及其代谢产物	10
三、微生物发酵常用的优化方法	11
1 Plackett-Burman实验设计	12
2 响应面实验设计	12
四、药物质量标准的制定与稳定性研究	13
1 原料药的质量标准	13
2 稳定性研究	15
五、本课题研究的目的是和意义	17
材料与方法	18
一、实验材料	18
二、实验方法	21
结果与分析	33
一、红树真菌的分离	33
二、红树真菌的活性测定与鉴定	33
1 抗菌活性测定	33
2 抗氧化活性测定	35
3 抗肿瘤活性测定	37
4 菌株 rDNA ITS 区的测序分析	38
三、去乙酰真菌环氧乙酯琼脂表面培养基质的优化	39

1 单因素实验设计	39
2 Plackett-Burman 实验设计	40
3 响应面分析法	42
4 验证实验	47
5 大规模发酵	48
四、去乙酰真菌环氧乙酯质量标准的建立	48
1 性状	48
1.1 溶解度	48
1.2 熔点测定	48
1.3 比旋度测定	48
2 鉴别	48
2.1 薄层色谱法	49
2.2 紫外可见吸收峰	49
2.3 高效液相色谱法	49
2.4 红外吸收光谱法	50
3 杂质检测	50
3.1 有关物质的检查	50
3.1.1 质谱检测纯度	50
3.1.2 HPLC法检测纯度	51
3.2 有机溶剂残留	51
3.2.1 GC-MS法	51
3.2.2 干燥失重法	52
3.3 重金属检查	52
3.4 晶型	52
4 含量测定	53
4.1 HPLC 标准曲线的制作与含量测定	53
4.2 紫外可见标准曲线的制作与含量测定	53
5 抗肿瘤活性测定	54
五、去乙酰真菌环氧乙酯的稳定性试验	54

1 影响因素试验	54
1. 1 高温试验	55
1. 2 高湿试验	56
1. 3 光照试验	56
2 加速试验	57
3 长期试验	58
讨论与结论	60
一、红树真菌是微生物药物的重要资源	60
二、去乙酰真菌环氧乙酯琼脂表面培养基质的优化	62
三、去乙酰真菌环氧乙酯的质量标准和稳定性研究	63
参考文献	66
致谢	72

厦门大学博硕士学位论文摘要

Catalogue

Abstract	I
Abstract in English	III
Introduction	1
I The antitumor bioactive substances from marine fungi	1
II Mangrove fungi and their secondary metabolites	4
1 Mangrove plants and the fungi.....	4
2 The antitumor bioactive substances from mangrove plants.....	5
3 Mangrove plants endophytic fungus A123 and its secondary metabolites	10
III Statistics method of microorganism fermentation	11
1 Design of Plackett-Burman	12
2 Design of response surface methodology	12
IV Establish the quality standard and stability of deacetylmycoepoxydiene	13
1 Establish the quality standard	13
2 Study on the stability.....	15
V Purpose and significance of this thesis	17
Materials and methods	18
I Materials	18
II Methods	21
Results	33
I Isolation for fungi from mangrove	33
II The bioactivities of the fungi from mangrove plants	33
1 The analysis for antimicrobial activity	33
2 The analysis for anti-oxidation..	35
3 The analysis for anti-tumor activity	37
4 Classification of the fungi.....	38
III Medium optimization for deacetylmycoepoxydiene	39
1 Design of One-factor assay.....	39
2 Design of Plackett-Burman	40

3 Design of response surface methodology	42
4 Verification test	47
5 Cultivation of fungus A123	48
IV Establish the quality standard of deacetylmycoepoxydiene	48
1 Character	48
1.1 Determination of the solubility	48
1.2 Determination of the melting point	48
1.3 Determination of the specific optical rotation	48
2 Identification	48
2.1 Thin layer chromatography	49
2.2 Experiment of UV	49
2.3 Experiment of HPLC	49
2.4 Experiment of IR	50
3 Detection of foreign substance	50
3.1 Detection of relevant substance	50
3.1.1 Detection purity using mass spectra	50
3.1.2 Detection purity using HPLC	51
3.2 Detection of reliquous organic solvent	51
3.2.1 Detection purity using GC-MS	51
3.2.2 Loss on drying	52
3.3 Detection of heavy metals	52
3.4 Detection of crystal form	52
4 Assaying	53
4.1 Making standard curve of deacetylmycoepoxydiene in HPLC	53
4.1 Making standard curve of deacetylmycoepoxydiene in UV	53
5 The analysis for anti-tumor activity	54
V Study on the stability of deacetylmycoepoxydiene	54
1 Experiment of influencing factor	54
1.1 High temperature test	55
1.2 High moist test	56

1.3 Violent light test	56
2 Accelerating experiment	57
3 long term experiment	58
Discussion and conclusion.....	60
I Important resource of drugs separating from mangrove fungi	60
II Medium optimization for deacetylmycoepoxydiene.....	62
III Study on the quality standard and stability of deacetylmycoepoxydiene	63
Reference.....	66
Acknowledgements	72

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

海洋微生物特殊的生存环境，决定了其具有独特的代谢途径和机体防御机制，其代谢产物的化学结构呈现复杂性和多样性，因而是筛选和发现具有新颖化学结构的天然活性物质的重要资源。红树林分布于热带与亚热带海岸潮间带，由于生境特殊，其组织中的内生真菌的种类及代谢产物也较为丰富，已成为近年来寻找药物先导化合物的焦点之一。

本论文于 2007 年 3 月，在福建省九龙江口浮宫镇草埔头红树林区采样，从木榄和海莲两种红树植物的新鲜叶片、枯叶、枯枝中分离出真菌 202 株，并对这些菌株的发酵提取物进行了抗菌、抗氧化、抗肿瘤活性的筛选。结果显示，在 202 份受测菌株发酵提取物样品中，有 47 份样品具有一种以上生物学活性，其中 19 份样品对一种以上指示菌显示出抗菌活性，占样品总量的 9.4%；22 份样品具有抗氧化活性，占样品总量的 10.9%；23 份样品对肿瘤细胞具有抑制作用，占样品总量的 11.4 %。

对 68 株真菌进行初步的分类。ITS rDNA 的分析结果表明，68 株菌分布于 10 个属中，优势菌属为拟茎点霉属 (35.3%)、*Diaporthe* sp. (14.7%)、青霉 (8.8%)。与分离自枯萎组织的腐生真菌相比，分离于新鲜组织的内生真菌分类地位更为广泛，显示了红树真菌的种类与植物组织状态之间具有一定的关系。

去乙酰真菌环氧乙酯(Deacetylmycoepoxydiene)是红树植物内生真菌 818 菌株 (*Phomopsis* sp.818) 的代谢产物，是一种骨架独特的环氧二烯类化合物，具有较好的细胞毒作用，但产量很低。本论文经过单因素实验、Plackett-Burman 实验、响应面优化实验，提高了去乙酰真菌环氧乙酯固体培养的产量，优化后的培养基组合为：葡萄糖 25.56 g/L、甘露醇 12 g/L、马铃薯 231.82 g/L。经验证，在该条件下，去乙酰真菌环氧乙酯产量达到 108.9 mg/L，比优化前高 2 倍。

质量标准的制订与稳定性研究是新药开发及药品质量控制的主要研究内容。去乙酰真菌环氧乙酯具有进一步开发成抗肿瘤新药的潜力，而目前尚无相应的质量标准及稳定性方面的系统研究。本论文依据《中国药典》(2005 年版)相应的质量标准的建立和稳定性的研究方法，采用高效液相色谱、红外光谱、热失重等技术，初步制定了质量标准。

对去乙酰真菌环氧乙酯的物化性质和稳定性的研究表明,其对光(5000 Lx)、热(60 °C)、湿(RH 90%)具有较好的稳定性,提示可以在密闭常温条件下贮存。本研究为去乙酰真菌环氧乙酯的后续开发奠定了基础。

关键词: 红树真菌; 去乙酰真菌环氧乙酯; 响应面; 质量标准; 稳定性

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

Because of their special living conditions, marine microorganisms often produce various bioactive substances with novel functions and structures. Therefore marine microorganisms, as the new sources of bioactive substance, have received people's great attention in recent years.

Mangroves are special host plants and habitats of fungi. Mangrove fungi can produce many kinds of metabolites with great potential for anti-microbial and anti-tumor medicinal uses.

In this study, 202 fungi were isolated from fresh leaves, dry twigs and dead leaves of *Bruguiera gymnorhiza* and *Bruguiera sexangula*, which were collected from Fugong, Fujian in 2007. Crude fermentation extractions of these fungi were screened by three different bioactive assays: anti-microbial activity assay, anti-oxidation activity assay and anti-tumor activity assay. The results showed that extractions from 47 strains displayed at least one kind of bioactivities: 19 strains (9.4%) displayed anti-microbial activities on one or more than one of 5 indicator organisms. The strains with anti-oxidation activity were 22 (10.9%). 23 strains (11.4%) displayed anti-tumor activity on Hela cell line, 6 of them also against SW480 cell line.

The identification of 68 fungi by ITS rDNA assay indicated that the strains were distributed in at least 10 genera. And the bioactive fungi were mainly distributed the *Phomopsis* sp. (35.3%), *Diaporthe* sp. (14.7%) and *Penicillium* sp. (8.8%).

Deacetylmycoepoxydiene, a second metabolic product by *Phomopsis* sp.818, containing an oxygen-bridged cyclooctadiene, is novel and represents a new class of fungal metabolites. The IC₅₀ of Raji cell line is 3.0µg/mL. But the low yield hinders the deeply research.

By using Response Surface Method, the yields have increased considerably. Based on the results of One-factor experimental design and

Plackett-Burman design, the most important factors were further investigated with Box-Behnken and Response Surface Analysis. The results showed that mannitol 12 g/L, glucose 25.56 g/L, potatoes 231.82 g/L, the production of deacetylmycoepoxydiene reached to 108.9mg/L, which was double than before.

Deacetylmycoepoxydiene has been proved to be a new and promising anti-tumor drug. By means of influential factor experiment, accelerating experiment and long term experiment, using the techniques of HPLC, IR, UV and so on, we study on the character, identification, purity investigation, content determination, light stability and heat stability of Deacetylmycoepoxydiene.

Based on the results, quality standard was set up. The stability experiment was according to the quality standard. Deacetylmycoepoxydiene is stable under high temperature(60 °C), high moisture(RH 90%) and violet light(5000 Lx). It can be stored at airtight and common temperature conditions. This study laid the foundation for follow-up development.

Key words: mangrove fungi; deacetylmycoepoxydiene; response surface method; quality standard; stability.

前言

近年来，随着肿瘤发病率的升高，人类的生命与健康受到严重威胁。目前，全世界每年新增癌症病人超过 2000 万，死亡人数超过 600 万，寻找活性新化合物成为寻找抗肿瘤药物的有效途径。

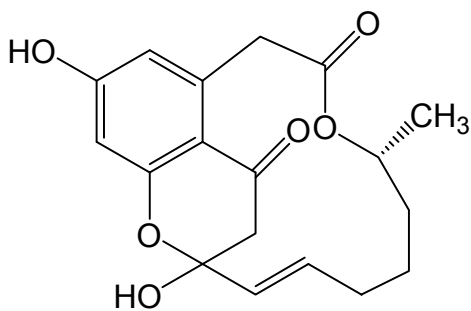
大自然永远是药物的一个重要来源，一直提供十分重要的化合物。传统研究获得有用的代谢产物最主要的方法，主要集中在陆地的植物和微生物上。然而长期大量的筛选已造成来源枯竭、筛选效率降低、费用增加等严重问题，因此许多特殊环境中的微生物开始备受关注。

一 海洋真菌抗肿瘤天然产物概述

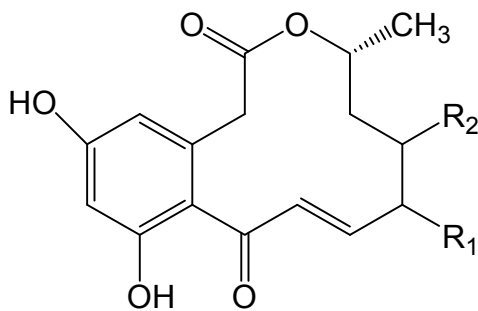
海洋真菌 (marine fungi) 作为潜在药物来源，已备受关注^[1]。海洋真菌生活在海洋中的具真核结构的微生物。大多数栖于某种基质生活，少数自由生活，因此，真菌在海洋中的分布主要取决于寄主的分布。依其栖生的习性，海洋真菌可分成 5 种基本的生态类型：①木生真菌。在海洋水体中数量最多和分布最广的高等真菌，营腐生生活，善分解纤维素。在热带海域和浅海环境中分布更加广泛。已知有子囊菌类 76 种，半知菌类 29 种，担子菌类 2 种；②寄生藻体真菌。约占海洋真菌种数的 1/3，其中以子囊菌类居多。有腐生、寄生和共生等类型；③红树林真菌。多半是腐生菌，其中子囊菌类 23 种，半知菌类 17 种，担子菌类 2 种；④海草真菌。数量很少，多栖居于叶部；⑤寄生动物体真菌。只限寄生在外骨骼和壳部处。

海洋真菌和海洋细菌都参加海洋有机物的分解和无机营养物的再生过程，不断为海洋植物提供有效营养。近年来，随着对海洋微生物研究的深入，从真菌中发现了越来越多的抗肿瘤活性物质，且大多具有新型的结构，海洋真菌成为继海洋放线菌之后的又一研究热点。

Hendrik Greve 等从红藻中分离出真菌 *Curvularia* sp.，其次级代谢产物 apralactone A (1) 是新的大环内酯类化合物，macrolides 2~7 (2~7) 是一类立体化学结构新颖的弯孢霉素。MTT 法测试化合物 1、2、4、5、6 对 36 株人癌细胞的细胞毒活性，平均 IC₅₀ 分别为 9.87 μM、1.25 μM、30.06 μM、6.09 μM、12.99 μM^[2]。



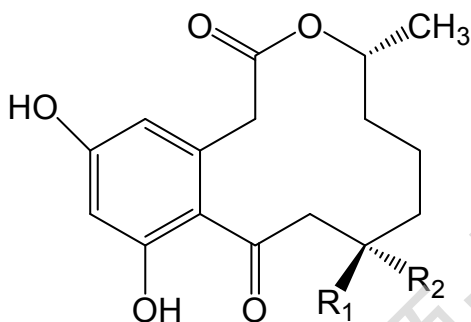
1



2 $R_1=H, R_2=H$

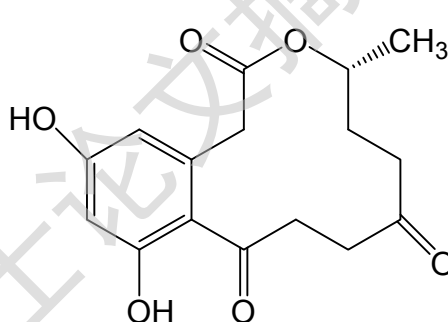
3 $R_1=OH, R_2=H$

4 $R_1=H, R_2=OH$



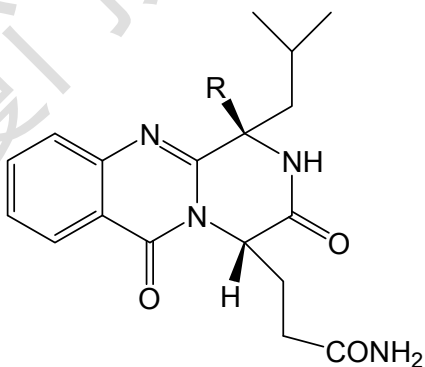
5 $R_1=H, R_2=OH$ (11S)

6 $R_1=OH, R_2=H$ (11R)



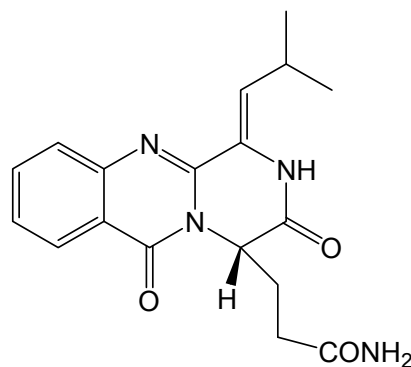
7

AurantiomidesA~C (8~10) 为从海绵来源真菌 *Penicillium aurantiogriseum* SP0-19 代谢产物中分离到的三种新的喹唑啉生物碱。其中化合物 9 表现出抗人急性粒细胞白血病 HL-60 细胞株和鼠白血病 P388 细胞株活性，化合物 10 则表现出抗人肝癌 BEL-7402 细胞株和 P388 细胞株活性^[3]。



8 $R=OCH_3$

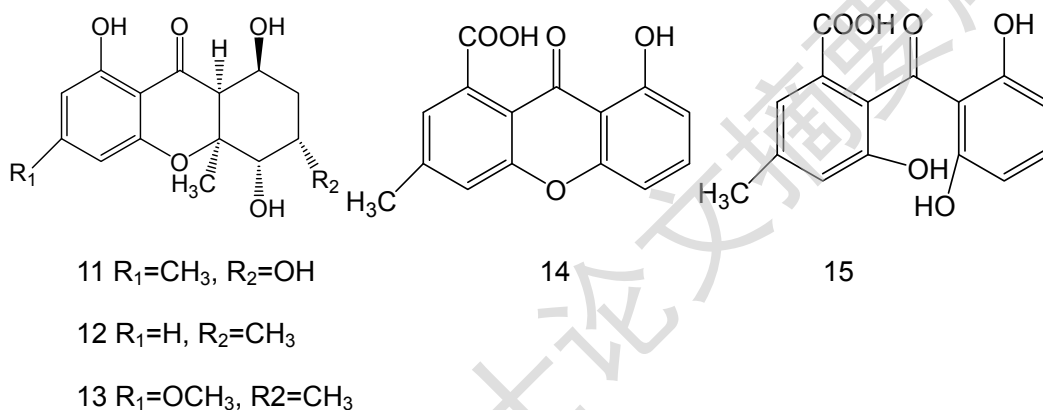
9 $R=OH$



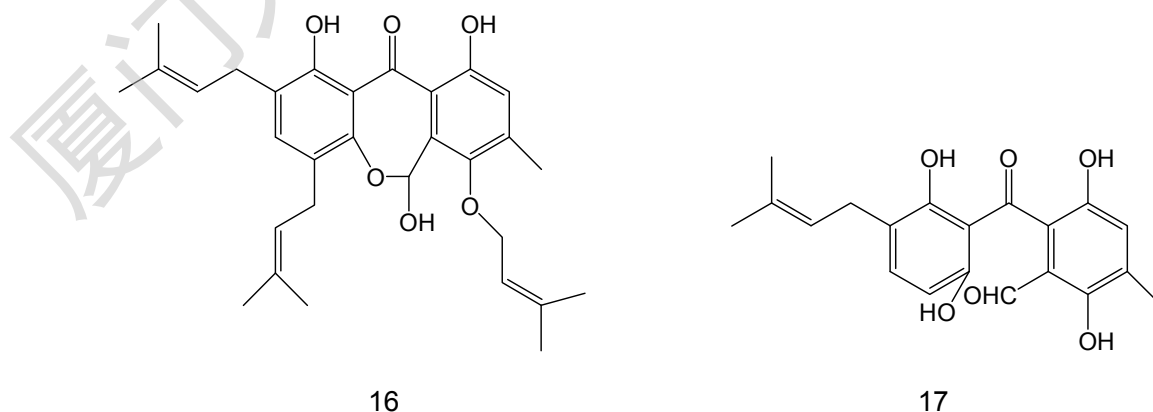
10

MonodictysinsA~C(11~13)、Monodictyxanthone(14)和 Monodictyphone

(15)是从西班牙 Tenerife 海洋绿藻内部组织分离的真菌 *Monodictys putredinis* 的代谢产物中提取到的活性物质。经研究, 这些化合物有化学预防癌症的潜力。化合物 11~13 是同工酶的抑制剂, 同工酶在代谢作用中与前致癌剂转变成致癌物质有关。QR (醌还原酶) 是一种致癌物质解毒酶, 化合物 12 和 13 作为的激活剂也表现出了中等强度活性。另外, 化合物 12 对细胞色素 p4501A 表现出抑制活性, 其 IC_{50} 值为 $3.0 \mu M$, 化合物 13 对雌激素生物合成中起重要作用的芳香酶也表现出了微弱的抑制活性^[4]。



2006年6月, Kralj A^[5]报道了从地中海绿藻分离的真菌 *Emericella nidulans* var. *acristata* 中获得的两个具有较强细胞毒活性的新化合物 Arugosins G (16) 和 H (17), $IC_{50} = 5.5 \mu g/mL$ 。Tropolactones A~D (18~21) 是由 Cueto M 等^[6]于2006年从海洋真菌 *Aspergillus* sp. 中分离到, Tropolactones A~C (18~20) 在体外对肿瘤细胞株 HCT2116 的 IC_{50} 分别为 $13.2 \mu g/mL$ 、 $10.9 \mu g/mL$ 和 $13.9 \mu g/mL$ 。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库