

学校编码: 10384
学号: 21720081152548

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

壳聚糖对去乙酰真菌环氧乙酯合成的调节
作用

Study on the effect of chitosan on Deacetylmicoepoxydiene
production

袁丽峰

指导教师姓名: 黄耀坚教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2011年 4 月

论文答辩时间: 2011年 6 月

学位授予日期: 2011年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人: _____

2011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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要	I
Abstract	III
前 言	1
一. 红树植物内生真菌及拟茎点霉次级代谢产物	1
1. 红树植物及红树真菌简介	1
2. 拟茎点霉次级代谢产物的研究	2
3. 拟茎点霉 A123 及其代谢产物的研究	6
二. 诱导子在微生物中的研究进展	6
1. 诱导子的简介	6
2. 诱导子的分类及研究进展	7
3. 诱导机制的相关研究	11
三. 真菌中的信号转导	12
四. 本论文研究的目的、内容及意义	14
材料与amp;方法	16
一. 实验材料	16
二. 实验方法	19
1. 技术路线	19
2. 诱导子的初筛	19
2.1 种子培养	19
2.2 诱导子的制备	19
2.3 发酵及诱导培养	20
2.4 DAM 的 HPLC 定量检测	20
3. 壳聚糖诱导条件的优化	21
3.1 壳聚糖诱导条件的响应面优化	21
3.2 回归方程的实验验证	21
4. 壳聚糖诱导 DAM 发酵的动力学研究	21
4.1 种子培养	21
4.2 发酵及诱导培养	21
4.3 发酵参数测定	21
5. 壳聚糖对相关信号蛋白表达变化的影响	23
5.1 CTAB 法提取 139 菌体的 DNA	23
5.2 引物设计与合成	23
5.3 基因扩增	25
5.4 PCR 产物纯化及测序	25

5.5 实时荧光定量 PCR 检测	26
6.壳聚糖对 DAM 合成相关基因的转录水平变化的影响	30
6.1 139 菌株 PKS 基因扩增	30
6.2 实时荧光定量 PCR 检测	30
结果与分析	32
一. 诱导子的初筛	32
二. 壳聚糖诱导条件的优化	33
1. 壳聚糖诱导条件的响应面优化	33
2. 回归方程的实验验证	35
三. 壳聚糖诱导 DAM 发酵的动力学	37
1.壳聚糖对菌体形态的影响	37
2.壳聚糖对生物量的影响	38
3.壳聚糖对 DAM 发酵产量的影响	39
4.壳聚糖对糖利用的影响	40
四. 壳聚糖对相关信号蛋白表达变化的影响	41
1.CTAB 法提取 139 菌体的 DNA	41
2.信号蛋白相关基因的扩增	42
3.G 蛋白和 MAPK 蛋白基因表达水平的 Real-time PCR 检测	47
3.1 总 RNA 提取及纯化	47
3.2 Real-time PCR 结果	49
五. 壳聚糖对 DAM 合成相关基因转录水平变化的影响	51
1. DAM 的 HPLC 检测	52
2. DAM 合成相关基因表达水平的 Real-time PCR 检测	52
2.1 总 RNA 提取及纯化	52
2.2 Real-time PCR 结果	53
讨论与结论	57
一. 诱导子的初筛	57
二. 壳聚糖作为 DAM 产量提高的诱导子	57
三. 壳聚糖诱导条件的优化	58
四. 壳聚糖对相关信号蛋白表达变化的影响	59
五. 壳聚糖对 DAM 合成相关基因转录水平变化的影响	60
六. 进展与展望	60
参考文献	63
附 录	73
致 谢	76

Catalogue

Abstract.....	I
Abstract in English.....	III
Introduction	1
I Mangrove fungi and the metabolites from <i>phomopsis</i> sp.....	1
1. Mangrove plants and their endophytic fungi.....	1
2. The metabolites from <i>phomopsis</i> sp.	2
3. Secondary metabolites of <i>phomopsis</i> sp.A123	6
II Elicitation of microbial cell systems	6
1. Elicitor	6
2. The classification of elicitor and their research development	7
3. The mechanism of elicitation.....	11
III Signal transduction in fungi	12
IV Purpose,content and significance of this thesis	14
Materials and methods.....	16
I Materials.....	16
II Methods.....	19
1.Technology roadmap	19
2.Preliminary screening of elicitors	19
2.1 Mycelium cultures.....	19
2.2 Elicitor preparation.....	19
2.3 Fermentation and elicitation.....	20
2.4 Quantitative analysis of DAM	20
3.Optimised the elicitation conditions of chitosan	21
3.1Optimised the elicitation conditions of chitosan by response surface experiments(RSM)	21
3.2Validation of the regression equation	21
4.Dynamics research on elicitation of chitosan	21
4.1Mycelium cultures.....	21
4.2Fermentation and elicitation.....	21
4.3Determination of fermentation parameters	21
5. The effect of chitosan on protein related to signal transduction.....	23
5.1Genome DNA extraction by CTAB methods.....	23
5.2 The primers design and systhesis	23
5.3Gene amplification	25
5.4 PCR products purification and sequence	25
5.5 Real-time PCR	26

6.The effect of chitosan on relative biosynthetic protein of DAM.....	30
6.1 PKS gene amplification.....	30
6.2 Real-time PCR	30
Results and Analysis	32
I Preliminary screening of elicitors.....	32
II Optimised the elicitation conditions of chitosan.....	33
1.Optimised the elicitation conditions of chitosan by RSM	33
2.Validation of the regression equation	35
III Dynamics research on elicitation of chitosan	37
1.Effect of the chitosan on mycelium pattern	37
2.Effect of the chitosan on biomass	38
3.Effect of the chitosan on DAM production	39
4.Effect of the chitosan on glucose utilization.....	40
IV The effect of chitosan on protein related to signal transduction	41
1.Genome DNA extraction by CTAB methods	41
2.Gene amplification.....	42
3.Real-time PCR for expression of G protein and MAPK protein	47
3.1 Extraction and purification of total RNA.....	47
3.2 The results of Real-time PCR.....	49
V The effect of chitosan on relative biosynthetic protein of DAM.....	51
1. The results of HPLC	52
2. Real-time PCR for expression of protein related to DAM synthesis.....	52
2.1Extraction and purification of total RNA.....	52
2.2 The results of Real-time PCR.....	53
Discussion and Conclusion	57
I Preliminary screening of elicitors.....	57
II Chitosan as elicitor to enrich the yield of DAM	57
III Optimised the elicitation conditions of chitosan	58
IV The effect of chitosan on protein related to signal transduction	59
V The effect of chitosan on relative biosynthetic protein of DAM	60
VI Progress and Prospects.....	60
References	63
Appendix	73
Acknowledgement	76

摘 要

海洋微生物生境特殊，具有独特的代谢途径。海洋微生物的次级代谢产物是新药物研究开发的重要资源。如何提高微生物的次级代谢产物的产量，是目前海洋微生物开发亟待解决的问题。近年来，使用诱导子来刺激代谢途径已经成为提高目的产物产量的主要策略之一。

本论文尝试采用诱导子来提高海洋抗肿瘤候选新药去乙酰真菌环氧乙酯 (Deacetylmycoepoxydiene, 缩写为 DAM) 的产量, 并对诱导机制进行初步的探索。DAM 是红树植物内生真菌 A 123 (*Phomopsis* sp. A 123) 产生的一种骨架新颖的环氧二烯类化合物。前期研究表明, DAM 具有较强的细胞毒性, 对 Raji 细胞株 IC_{50} 为 $3.0 \mu\text{g/mL}$, 对胃癌 AGS 细胞株 IC_{50} 为 $1.0 \mu\text{g/mL}$, 具有较好的药用开发前景。但是野生菌株发酵产量极低, PDA 固体发酵产量仅为 0.8 mg/L , 限制了对 DAM 的进一步研究。

在前期摇床培养基优化的基础上, 本文选择和制备了 16 种诱导子, 研究了它们在液体培养条件下对 DAM 高产突变株 139 的 DAM 产量的影响, 结果表明, 白色假丝酵母菌体制备物和壳聚糖具有显著的正调节作用。采用 CCD 设计响应面实验, 得到了壳聚糖诱导子的最佳诱导条件: 壳聚糖接种时间为发酵后的 144 h、浓度 100 mg/L 。DAM 最高产量可比空白对照提高 36 %。进一步对诱导条件进行优化, DAM 的终产量可以提高 1.5 倍, 为工业生产上提高 DAM 产量、缩短生产周期奠定了基础。

为了研究壳聚糖对菌株 139 诱导过程中发生的生理生化变化, 本文对实验组和对照组发酵液分别进行了生物量、DAM 产量、残糖的测定以及菌体形态观察的实验。结果显示壳聚糖的加入促进了菌株的一些生理变化, 尤其是菌体提前产生了自溶现象。

采用 Real-time PCR 等技术, 初步探讨了壳聚糖提高 DAM 产量的可能机制。通过简并引物设计, 从菌株 139 中克隆出信号转导蛋白的保守片段, 得到 G 蛋白的 α 亚基、MAPK 蛋白和 PKA 蛋白的保守序列; 通过 Real-time PCR 检测得出 G 蛋白的表达量在诱导 2 h 内基本没有变化, 5 h 下调了 5.89 倍。而 MAPK 蛋白在诱导 1 h、2 h、5 h 时分别下调了 1.49、2.28、10.57 倍; 推测诱导作用可能是通过信号转导途径将外界信号传递到细胞核, 导致相关基因转录水平变化。其次, 在前人研究基础上, 探究壳聚糖的加入对 DAM 合成相关酶的表达变化影响, 发现酯酶、细胞色素 P450 单氧合酶和 NAD 依赖性的脱水酶这 3 种后修饰酶在发酵第 168 h 和第 216 h 时伴随着

DAM 产量的提高均有不同程度的上调。因此推测壳聚糖提高 DAM 产量的机制可能最终是上调了 DAM 合成相关基因的转录水平，进而促进 DAM 的合成。

关键词：诱导子；去乙酰真菌环氧乙酯；壳聚糖

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Because of their special living conditions, marine microorganisms often produce various bioactive substances with novel functions and structures. However, the yields of secondary metabolites in the marine fungi are usually too low to carry out further studies on bioactivity or pharmacological properties. Looking for methods to enrich the yield of secondary metabolites is the way to overcoming the problem. In recent years, the increased production through elicitation of the secondary metabolites from microbial cultures has opened up a new area of research.

In this article, trying to improve the yield of a marine anti-tumor drug candidate deacetylmycoepoxydiene (DAM) through elicitation and their tentative mechanisms of action were studied. DAM, a second metabolic product of endophytic fungi *Phomopsis* sp. A 123, which contains an oxygen-bridged cyclooctadiene, is novel and represents a new class of fungal metabolites. It showed high cytotoxicities against human tumor Raji and AGS cell lines with IC_{50} 3.0 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. However, the production of DAM was as low as 0.8 mg/L, which hampered further studies on the antitumor mechanisms and in vivo tests of DAM.

Based on previous optimization in shake flask culture, sixteen elicitors were used to treat *Phomopsis* sp.139, a mutant strain of A 123. The results showed that the *Candida albicans* mycelium material and chitosan had a significant influence on DAM production. Then through response surface experiments, the optimal elicitation conditions were obtained. It was that chitosan (100 mg/L) was added after 144 h cultivation. The maximum yield was increased 36 % compared to the control. The elicitation conditions were further optimized, and the maximum yield was increased 1.5 fold compared to that of control. It can lead to increased yields and shorter production times in industrial production.

In order to study the effect of chitosan on physical and chemical properties of *Phomopsis* sp.139, the elicitation dynamics were studied. Research included studying the effect of chitosan on mycelium pattern、biomass、DAM production and glucose utilization. The results showed that some physical changes were observed when

supplemented with chitosan. Especially chitosan can promote the autolysis phenomenon in advance.

The possible mechanism of increasing DAM yield by elicitation was preliminarily investigated by Real-time PCR. Conservative sequence of G protein、MAPK protein and PKA protein were obtained by using degenerate primers PCR amplification. The results of the Real-time PCR showed that a significant 5.59 fold reduced in the expression of G protein was attained when elicitation 5 h. While the expression of MAPK protein was reduced 1.49、2.28、10.57 fold when elicitation 1 h、2 h and 5 h respectively. It seems plausible to speculate that the elicitation in strain 139 cultures occurs through a mechanism involving signal transduction system, possibly triggering a cascade of events inside the cell. Based on previous research, samples which were taken from the elicitor supplemented and control cultures at 168 h and 216 h were used to compare the transcription level of relative biosynthetic genes between control and elicited cultures by using Real-time PCR. The transcription level of the Esterase、Cytochrome P450 monooxygenases and the NAD-dependent dehydratase had different levels of increased. These increases correlate with the increase in DAM yield. The results presented here suggest that the effect of elicitors occurs at the level of transcription of the genes possibly involved in the biosynthesis of DAM.

Key words: elicitor; Deacetylmycoepoxydiene; chitosan

前 言

随着研究热点的转移，新药的研究开发已突破了陆生资源的束缚，拓展到了生态和物种远比陆地生境复杂多样的海洋。海洋真菌作为海洋生境的重要成员，由于其在海洋生境中所处的独特地位，能够在次级代谢过程中产生结构新颖、活性好的化合物，成为天然产物研究中引人注目的焦点。但与其他海洋微生物的次级代谢相同，海洋真菌产生的次级代谢产物的量很低，为提取、分离过程带来了极大的不便，既增加了科研人员的工作量，又造成了人力、物力和财力的浪费，给后续的研究和应用带来困难。如何提高微生物的次级代谢产物产量，是目前海洋微生物开发亟待解决的问题。微生物次级代谢合成的多代谢途径性使得人们通过不同的方法来刺激代谢途径以增加次级代谢物的产量，如改变培养基的组分、诱变获得新种及基因克隆等手段。近年来，人们利用诱导子的作用特点，不断尝试、探索次级代谢物合成的途径及提高次级代谢产物含量的方法，这将开启微生物工业生产的新纪元。

一. 红树植物内生真菌及拟茎点霉次级代谢产物

1. 红树植物及红树真菌简介

红树植物 (mangroves) 是自然分布于热带、亚热带潮间带或河口边缘，受周期性潮水浸淹，以红树植物为主体的常绿灌木或乔木组成的潮滩湿地木本植物群落，大致分布在南北回归线之间，由于暖流的影响可达北纬 32° 和南纬 44° ^[1]。内生真菌 (endophytic fungi) 是指一类生活在植物组织内，但不引起植物明显病害的真菌，它与宿主植物协同进化，具有重要的生物学功能，是植物微生态系统的重要组成部分^[2]。由于红树林生态系统处于海洋和陆地的动态界面，周期性遭受海水的浸渍，所以形成了独特的生态系统，蕴藏着丰富并极具特色的微生物资源，包括对各类污染物有降解能力的类群，高效固氮、溶磷能力的类群，耐盐、嗜盐的类群和能产生各种生理活性物质和代谢产物的类群^[3]。

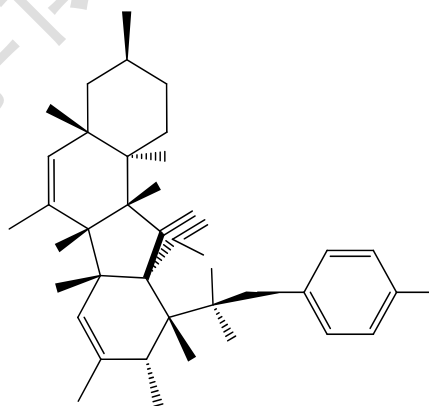
红树林真菌是红树林微生物资源的主要类群，有丰富的多样性。目前已分类鉴定的红树林真菌超过 200 种，成为海洋真菌的第二大类群。目前已报道的红树林内生真菌主要类群是链格孢霉 (*Alternaria*)、曲霉 (*Aspergillus*)、芽枝霉 (*Cladosporium*)、炭疽菌 (*Colletotrichum*)、镰孢霉 (*Fusarium*)、拟青霉 (*Paecilomyces*)、拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis*)、青霉 (*Penicillium*)、茎点霉 (*Phoma*)、拟茎点霉 (*Phomopsis*)、叶点霉 (*Phyllosticta*) 和木霉 (*Trichoderma*) 等，主要以子囊菌 (*Ascomycetes*) 和半知菌 (*fungi*)

imperfecti) 为主。红树林内生真菌共存于宿主红树中, 在长期抵御海洋特殊生态中能产生丰富次级代谢产物, 包括生物碱类(杂环生物碱, 大环生物碱等)、大环内酯、环肽、醌类、萜类、聚醚类、甾醇类、多糖类和不饱和脂肪酸等^[4], 具有抗菌、抗肿瘤等药用价值。因此, 红树林内生真菌成为新药物研究开发的重要资源。

2. 拟茎点霉次级代谢产物的研究

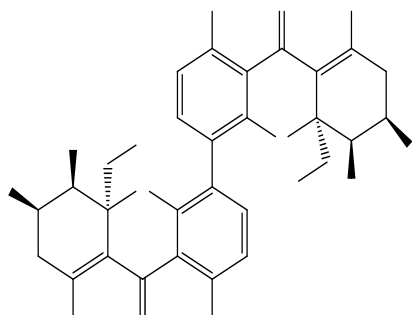
拟茎点霉属 *Phomopsis* (Sacc.) Bubak 真菌主要为植物病原菌, 能引起植物枝枯、溃疡、果腐、叶枯等一系列症状, 种类多, 寄主广, 形态差异小^[5]。拟茎点霉属真菌作为植物内生真菌的一个主要类群, 在自然环境中分布广泛。如 *Phoma* sp. 和 *Phomopsis archeri* 分别作为最优势 and 次优势内生真菌类群着生于凌源油松树皮和凤凰山油松树皮组织中^[6]。一直以来人们主要是以拟茎点霉菌作为指示菌进行抗菌活性检测。相对于别的属种, 拟茎点霉属及其次级代谢产物的系统研究进行的还很少, 因此, 开展对拟茎点霉真菌次级代谢产物的研究是很有意义的。

1995 年, Horn 等从柳树内生真菌拟茎点霉属 *Phomopsis* sp. 分离到新生物碱 Phomopsichalasin (1), 研究发现它能抑制细菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 鸡伤寒沙门氏菌 (*Salmonella gallinarum*), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 热带假丝酵母 (*Yeast Candida tropicalis*)^[7]。

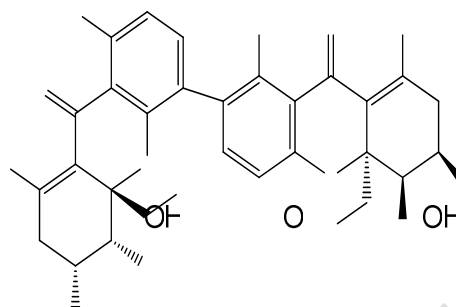


Phomopsichalasin (1)

2001 年, 二个结构新颖的化合物 PhomoxanthonasA(2) 和 PhomoxanthonasB(3) 首次从泰国柏木内生真菌 *Phomopsis* sp. BCC 1323 中分离出来, 它们对 KB, BC21 和 vero 细胞株表现出很强的细胞毒性, 还具有强的抗疟疾、抗结核作用^[8]。



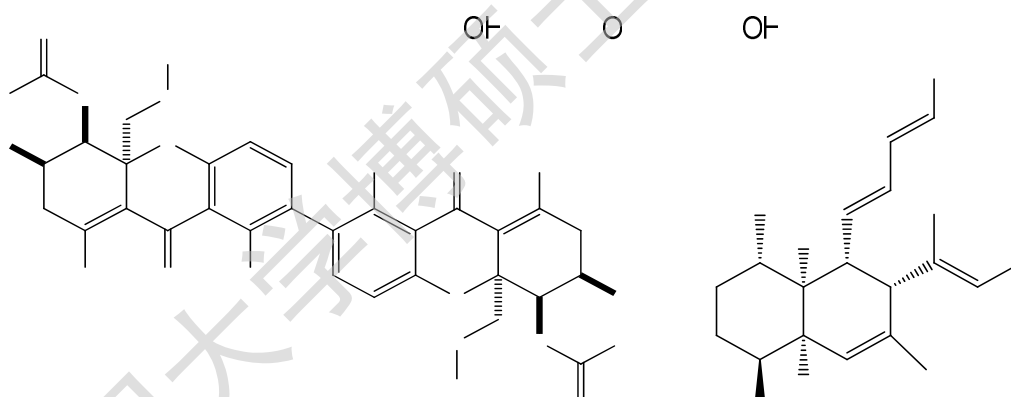
Phomoxanthon A (2)



Phomoxanthon B (3)

同年, Wagenaar 等^[9]从分离自植物 *Dicerandra frutescens* 的内生真菌 *Phomopsis longicolla* 中分离到 3 个同系物 dicerandrols A~C(4~6), 它们都有抗菌和抗肿瘤活性。

2003 年, 具有抑制微管蛋白聚合活性的化合物 Phomopsidin(7)被 Kobayashi 等^[10]从红树植物内生真菌 *Phomopsis* sp.TUF 95F47 中分离出来。



dicerandrols A(4): $R_1=R_2=H$

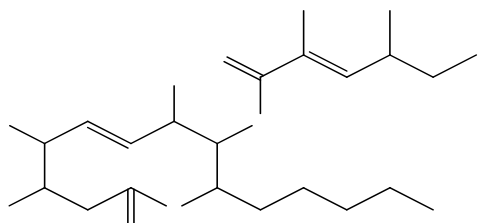
dicerandrols B(5): $R_1=Ac$ $R_2=H$

dicerandrols C(6): $R_1=R_2=Ac$

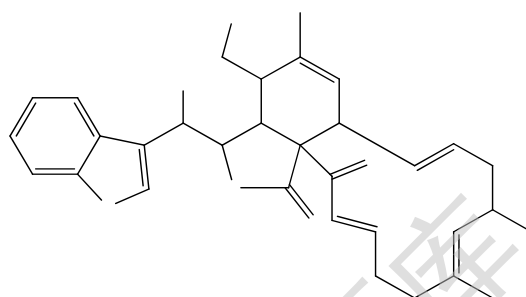
Phomopsidin(7)

2004 年, Weber 等^[11]从阿根廷药用植物 *Erythrina crista-galli* 内生真菌 *Phomopsis* sp.中分离到 1 个结构新颖的聚酮类化合物 Phomol(8), 该化合物具有抗菌、抗肿瘤及抗炎活性。同年 Schwarz 等^[12]从欧洲白桦内生真菌拟茎点霉属 *Phomopsis phaseoli* 中分离到酸类化合物 3- Hydroxypropionic acid, 对寄生植物的黄瓜根结线虫

Meloidogyne incognita 的半致死浓度 IC_{50} 为 12.5~15 $\mu\text{g/mL}$, 比对秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的 IC_{50} 高 5 倍。

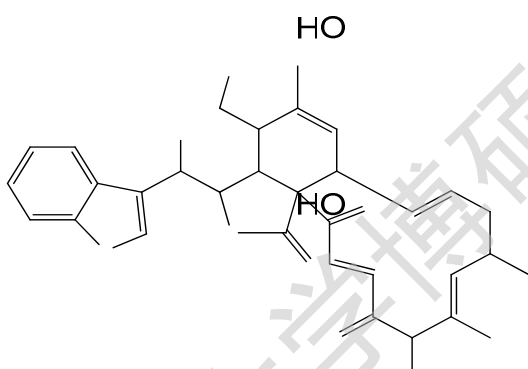


Phomol(8)

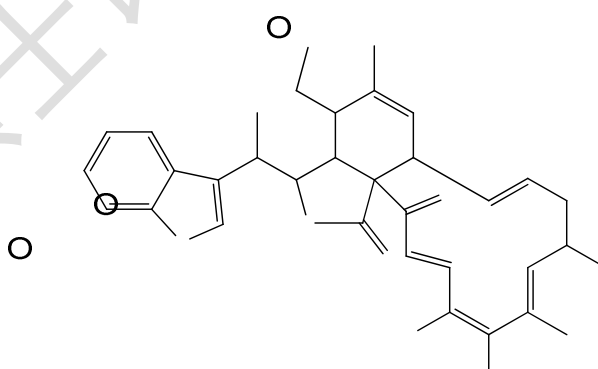


chaetoglobosin-510(9): $R_1=R_2=CH_3$

2005 年, Christian 等^[13]报道从海洋真菌 *Phomopsis asparagi* 中分离到 3 个结构新颖的化合物 chaetoglobosin-510 (9), chaetoglobosin-540 (10), and chaetoglobosin-542 (11), 其中 chaetoglobosin-542 具有抗微纤丝和细胞毒活性。



chaetoglobosin-540(10): $R_1=R_2=CH_3$



chaetoglobosin-542(11)

2008 年, Huang 等^[14]报道从海南东寨红树海漆 (*Excoecaria agallocha*) 树杆的拟茎点霉内生真菌 *Phomopsis* sp.ZSU-H76 中分离获得了三个新的聚酮化合物以及 Cytosporone B 和 Cytosporone C。其中 Cytosporone B, Cytosporone C 对白色念珠菌和尖孢镰刀菌有抑制活性, 最小抑制浓度为 32~64 $\mu\text{g/mL}$ 。同年, Tao 等^[15]报道从湛江一种红树树皮中获得的拟茎点霉内生真菌 *Phomopsis* sp. (ZZF08) 中分离鉴定了一个新的生物碱化合物 Phomopsin A (12) 它对 KB 和 KBv200 细胞株有弱的抑制活性, IC_{50} 分别为 28.0 和 16.8 $\mu\text{g/mL}$ 。Rukachaisirikul 等^[16]还从拟茎点霉 *Phomopsis* sp. PSU-D15 中分离出 3 个化合物 phomoenamide(13), phomonitroester 和

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