

蝙蝠蛾拟青霉与放线菌共培养对次生代谢产物的影响

任朝辉¹, 段婷婷², 陆承云¹, 张传博^{1*}¹贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550001; ²贵州省植物保护研究所, 贵阳 550006

摘要:为了探究蝙蝠蛾拟青霉与放线菌共培养对次生代谢产物的影响。从冬虫夏草周围微生态系统中分离获得一株具有较强抑菌活性的放线菌 TY134, 通过 16S rDNA 序列分析, 鉴定为极暗黄链霉菌 (*Streptomyces fulvissimus*)。以大米固体培养基作为发酵基质分别进行蝙蝠蛾拟青霉单培养、放线菌 TY134 单培养以及蝙蝠蛾拟青霉与放线菌 TY134 共培养, 培养 30 d 之后, 将发酵产物用乙酸乙酯超声辅助提取, 采用高效液相色谱 (HPLC) 和双层平板打孔法分别分析了单培养和共培养乙酸乙酯提取物化学成分和抑菌活性的差异。实验结果表明: 共培养发酵产物的乙酸乙酯提取物在保留时间 Rt = 14.143 min 处出现了一个新增的吸收峰, 而在单培养中并没有这个吸收峰的出现; 而且共培养发酵产物乙酸乙酯提取物的抑菌活性明显要强于单培养, 产生了新的抑菌活性物质。说明共培养可作为一种产生新的生物活性次级代谢产物的有效途径。

关键词:蝙蝠蛾拟青霉; 放线菌; 共培养; 单培养; 次生代谢产物

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.7.001

Co-culture of *Paecilomyces hepiali* with Actinomycete and its Effect on the Secondary Metabolites

REN Chao-hui¹, DUAN Ting-ting², LU Cheng-yun¹, ZHANG Chuan-bo^{1*}¹School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;²Guizhou Institute of Plant Protection, Guiyang 550006, China

Abstract: To explore the production of induced secondary metabolites by a co-culture of *Paecilomyces hepiali* and actinomycete. A strain of actinomycete TY134 with strong antibacterial activity was isolated from the soil microbial flora of *Ophiocordyceps sinensis*. This actinomycete was identified as *Streptomyces fulvissimus* on the basis of 16S rDNA. The monoculture of *P. hepiali*, actinomycete TY134 respectively, and the co-culture were done on rice solid medium for 30 days, then the fermentation products were extracted by the aid of ultrasonic with ethyl acetate respectively. Comparison of the chemical composition and anti-microbial activity of the ethyl acetate extract of monoculture and co-culture were performed by HPLC and double drilling method respectively. The results showed that the co-culture of ethyl acetate extract produced a new absorption peak at the retention time 14.143 min, and there was no evidence of the absorption peak in monoculture. In addition, the anti-bacterial activity of the ethyl acetate extract of the co-culture was stronger than that of the monoculture, produce chemical components with new anti-microbial activities. All the results indicated that co-culture can be used as a promising approach to discover new bioactive secondary metabolites.

Key words: *Paecilomyces hepiali*; actinomycete; co-culture; monoculture; secondary metabolites

冬虫夏草 [*Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) Sung, Sung, Hywel-Jones & Spatafora = *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.] 是麦角菌科 (Clavicipitaceae) 真菌冬虫夏草菌 [*Cordyceps sinensis* (Berk.)

Sacc] 寄生于鳞翅目 Lepidoptera 蝙蝠蛾科 Hepialidae 昆虫的幼虫使其身躯僵化所形成的僵虫菌核与子座的虫菌复合体^[1,2], 是我国特有的传统名贵中药材。现代药理研究证明, 冬虫夏草具有调节免疫、降血糖血脂、抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化、抗衰老、抗疲劳、抗辐射等广泛的药理作用^[3-7]。

中国被毛孢 (*Ophiocordyceps sinensis*) 确认为冬虫夏草的无性型^[8-10]。自 20 世纪 80 年代以来, 诸多学者围绕着冬虫夏草无性型中国被毛孢或者与之

收稿日期: 2017-03-07 接受日期: 2017-05-09

基金项目: 贵州省贵州师范大学研究生创新基金 (2015-22); 国家自然科学基金 (81460585); 贵州省林业厅育林基金 (2012-08); 贵州省社会发展科技攻关计划 (2013-3154)

* 通信作者 Tel: 86-851-86702541; E-mail: Zhangchuanbo2004@163.com

相关的菌株进行了分离与报道:主要有蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali*)、中国金孢霉(*Chrysosporium sinensis*)、中国拟青霉(*Paecilomyces sinensis*)、蝙蝠蛾柱霉(*Scytalidium hepiale*)、中国弯颈霉(*Tolypocladium sinensis*)、蝙蝠蛾被孢霉(*Mortierella hepiali*)、头孢霉新种(*Cephalosporium sinensis*)、顶孢头孢霉(*Cephalosporium acremonium*)等^[11]。其中蝙蝠蛾拟青霉发酵菌丝体具有与冬虫夏草相似的化学成分和药理作用^[12],可作为冬虫夏草药材的替代品,此外,蝙蝠蛾拟青霉已被列入国家食品、药品监督管理局公布的《可用于保健食品的真菌菌种名单》中(卫法监发[2001]84号),其人工发酵产物在保健食品中广泛使用^[13]。野生冬虫夏草微生态区系中除了冬虫夏草无性型中国被毛孢以外,尚还有其他微生物的存在,这些微生物之间可能存在互生、伴生、共生关系,共同形成一个复杂的微生态系统。其中,放线菌就是其中之一,放线菌是一类富含GC含量的革兰氏阳性细菌,能够产生丰富的活性次生代谢产物,尤其是链霉菌,它是天然活性物质与药物活性物质的主要来源之一,是研究生物活性次生代谢产物常用的良好微生物材料,具有潜在的挖掘价值和应用潜力。

沉默基因是指在常规培养条件下,存在于微生物体内的处于不表达或者极低表达水平,但在特定的条件下可以被激活而表达生物活性物质的一系列DNA序列^[14]。随着全基因组测序和基因工程技术的迅速发展,诸多学者在基因组中发现了许多沉默的基因簇,激活这些沉默基因簇能够极大丰富生物活性次级代谢产物的数量和种类。其中,共培养诱导发酵就是激活沉默基因簇的方法之一^[15,16]。共培养也称为混合培养或者混合发酵,它是指两种或者两种以上微生物进行共同培养发酵的技术^[17]。共培养发酵主要是通过微生物之间共生互惠或相互竞争等彼此相互作用从而来影响微生物次生代谢产物的产生,因此,共培养为微生物潜在的生物活性次级代谢产物的开发与利用揭示了一条新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源与靶标菌株

蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali*)和放线菌TY134均分离至野生冬虫夏草(青海省果洛藏族自

治州,海拔约4000~4500 m)微生物区系。靶标菌株为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白色念珠菌(*Candida albicans*),以上菌株均由贵州师范大学微生物重点实验室保藏。

1.1.2 常用仪器与试剂

电子天平:JR2003N(上海精密科学仪器有限公司);高压蒸汽灭菌锅:HVE-50(HIRAYAMA公司);双人双面净化工作台:SW-CJ-2F(苏州净化设备有限公司);恒温摇床:TS-200B(上海天星实验仪器制造厂);电热恒温水浴锅:DK-98-II(天津泰特仪器有限公司);微量高速离心机:TG16-W(长沙湘仪离心机仪器有限公司);PCR仪:BS97MyCycler(Bio-Rad公司);DYY-2C电泳仪电源、DYCP-31DN电泳仪(北京六一生物技术有限公司);凝胶成像系统:Bio-Rad Gel(美国伯乐公司);旋转蒸发器:RE-5286A(上海亚荣生化仪器厂);超声处理器:FS-600N(上海生析超声仪器有限公司);高效液相色谱仪:Agilent 1100(安捷伦科技有限公司)。

十二烷基硫酸钠(SDS)、蛋白酶K(Sigma公司);溴代十六烷基三甲胺(CTAB)(北京索莱宝科技有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

高氏一号培养基(可溶性淀粉20 g, KNO₃ 1 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂粉15 g, 蒸馏水1000 mL, pH7.2~7.4)、PDA培养基(马铃薯200 g, 葡萄糖20 g, 琼脂粉15 g, 蒸馏水1000 mL, pH自然)和牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏3 g, 蛋白胨10 g, NaCl 5 g, 琼脂粉15 g, 蒸馏水1000 mL, pH7.4~7.6)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株活化及菌丝体的制备

将低温保藏的放线菌TY134菌株和蝙蝠蛾拟青霉的菌种分别接种于高氏一号固体培养基和PDA固体培养基的培养皿中,置于25℃黑暗培养,备用。将活化好的放线菌用接种铲接种于高氏一号液体培养基中,在28℃,180 rpm条件下摇床发酵培养7d。

1.2.2 基因组DNA的提取及PCR扩增体系

利用蛋白酶K法^[18]提取放线菌TY134菌株的基因组DNA。采用细菌通用引物27f/1500R^[19](上游:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游:5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')进行其16S rDNA

的 PCR 扩增;PCR 反应体系为 50.0 μL :25.0 μL 2 \times Taq PCR Mix 混合物,10.0 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的正反引物各 1.0 μL ,2.0 μLDNA 模板,21.0 μL ddH₂O;PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,33 次循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 扩增产物的纯度,回收目的片段。

1.2.3 测序及构建系统发育树

将回收纯化的目的片段和扩增引物送往上海英俊生物技术有限公司完成双向测序、拼接,获得 16S rDNA 基因序列,通过 Blast 程序,从 GenBank、NCBI 等公共数据库中进行同源性分析,调出同源性最高且具有代表性菌株的序列,用 clustalx 进行序列比对,利用 MEGA7.0 软件^[20]、使用邻接法^[21] (Neighbour-Joining) 建立系统发育树,并进行 1000 次重复检验,确定放线菌 TY134 菌株的分类地位。

1.2.4 抑菌活性试验

利用菌饼培养法:用 6 mm 灭菌的打孔器在培养好的 TY134 菌株菌落上制备菌饼若干片,将菌饼置于含有金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的牛肉膏蛋白胨培养基上和含有白色念珠菌的 PDA 培养基上,每种靶标菌株做 3 个平行试验。以未接种的牛肉膏蛋白胨培养基和 PDA 培养基琼脂饼置于培养皿中央作为阴性对照(CK)。将制备好的培养皿置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 2d 后观察,测定其抑菌圈直径,取平均值。

1.2.5 放线菌 TY134 菌株与蝙蝠蛾拟青霉单培养和共培养发酵

发酵培养基为大米发酵培养基。配方为:大米与蒸馏水的质量体积比为 2:3(mg:mL),浸泡过夜,121 $^{\circ}\text{C}$,灭菌 30 min。

单培养与共培养发酵:将已灭菌的大米培养基置于无菌条件下冷却至室温,用接种铲挑取放线菌 TY134 菌株的菌块接种于大米培养基中,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 发酵培养,观察放线菌的长势情况。直到放线菌 TY134 菌株基本长满整个大米培养基时,取一半发酵瓶的数量继续培养作为放线菌 TY134 单培养发酵。此外,用接种铲在另外一半的发酵瓶中接入蝙蝠蛾拟青霉菌丝块作为共培养发酵,同时将蝙蝠蛾拟青霉菌丝块接入新的大米培养基中作为蝙蝠蛾拟青霉单培养发酵,继续发酵培养 30 d,单培养发酵与共培养发酵分别做 3 个平行试验。

1.2.6 发酵产物的提取

分别将放线菌 TY134 菌株与蝙蝠蛾拟青霉的单培养和共培养发酵产物用相同体积的有机试剂乙酸乙酯超声提取,合并超声提取液,减压浓缩至干燥后用 5 mL 甲醇重溶得乙酸乙酯提取物,过 0.22 μm 膜后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.7 发酵产物 HPLC 图谱分析

将放线菌 TY134 菌株与蝙蝠蛾拟青霉的单培养和共培养发酵产物乙酸乙酯提取物进行 HPLC 分析检测。色谱条件:Agilent 1100 Durashell C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动:甲醇(A)-水(B),梯度洗脱程序如下:0 ~ 12 min,5% ~ 50% A;12 ~ 15 min,50% ~ 99% A;15 ~ 16 min,99% ~ 100% A;16 ~ 17 min,100% ~ 5% A。流速为 0.8 mL/min,检测波长为 254 nm,进样量为 10 μL ,柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$,洗脱时间为 25 min。

1.2.8 发酵产物提取物抑菌试验

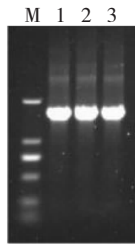
采用双层平板打孔法^[22]测定抑菌活性:首先将配制好的含 1.5% 琼脂的牛肉膏蛋白胨或 PDA 培养基约 10 mL 倒入培养皿中作为下层平板。待配置好的含 1.2% 琼脂的牛肉膏蛋白胨或 PDA 培养基灭菌冷却至 40 $^{\circ}\text{C}$ 左右,用无菌移液枪吸取 1% 体积的供试菌悬液加入到培养基中,轻轻摇晃混匀,立即倒入下层平板上作为上层平板。待冷却后,用无菌打孔器(直径为 6 mm)打孔,在孔径中分别加入共培养与单培养乙酸乙酯提取物 200 μL ,以等体积的甲醇溶液作为空白对照,实验设 3 次重复。静置 30 min 后,含细菌指示菌的平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d,含真菌指示菌的平板置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,测抑菌圈直径,取平均值。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 的鉴定及系统进化树分析

以放线菌 TY134 菌株的基因组 DNA 为模板,利用细菌通用引物 27f/1500R 进行 16S rDNA 扩增目的片段,得到了一条大小约 1400bp 的特征带,与引物设计区域大小相同,且无明显非特异性的扩增产物出现,其琼脂糖凝胶电泳结果见图 1 所示。

通过测序获得目的片段的序列长度为 1437bp。将其与 GenBank 等数据库中的 16S rDNA 序列进行同源性比对可知,TY134 菌株与 GenBank 核酸数据库中绝大部分已知菌株 16S rDNA 序列的同源性均在 99% 以上,且这些已知菌株均是链霉菌属(Streptomyces),由此可知,TY134 菌株为链霉菌属。以 2 株北里孢放线菌 *Kitasatospora arboriphila* HKI 0189



M:2000bp DNA Marker;1~3 均为目的条带

图1 TY134 菌株的 16S rDNA PCR 扩增电泳图

Fig.1 Electrophoresis of 16S rDNA PCR product of actinomycete TY134

(NR042904) 和 *Kitasatospora niigatensis* NBRC 16453 (AB249960) 作为外围群, 选取 16 株同属链霉菌的 16S rDNA 的序列作为参考菌株进行同源性比对分析, 利用 MEGA7.0 软件、使用邻接法 (Neighbour-Joining) 构建 TY134 菌株与参考菌株 16S rDNA 的系统发育树显示, TY134 菌株与 *Streptomyces fulvissimus* NBRC 13482 (AB184434)、*Streptomyces tacrolimicus* ATCC 55098 (FN429653) 处于同一分支上 (见图 2)。由此可以确认 TY134 菌株为极暗黄链霉菌 *Streptomyces fulvissimus*。

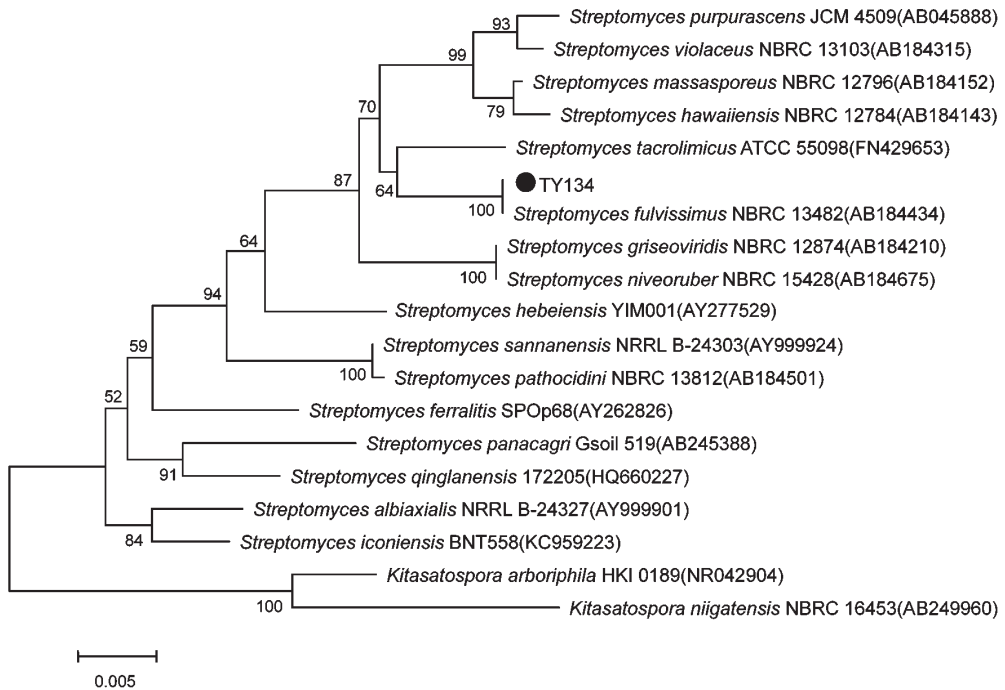


图2 根据 16S rDNA 序列构建的菌株 TY134 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of the strain TY134 based on 16S rDNA sequences

2.2 抑菌试验

利用菌饼法测定了放线菌 TY134 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的抑菌作用 (见表 1)。

由此得知, 放线菌 TY134 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的抑菌作用 (见表 1)。

表1 放线菌 TY134 菌株的抑菌活性

Table 1 Anti-microbial activity of actinomycete TY134 strain

靶标菌 Targeted pathogens	放线菌 TY134 Actinomycete TY134	空白对照 Blank control (CK)
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	+	-
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	++	-
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	+	-
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	-	-

注: “++”表示有强烈的抑菌活性 (抑菌直径 > 15 mm); “+”表示有抑菌活性 (0 < 抑菌直径 < 15 mm); “-”表示无抑菌活性。

Note: “++” indicated strong anti-microbial activity (Diameter > 15 mm); “+” indicated moderate anti-microbial activity (Diameter < 15 mm); “-” indicated no anti-microbial activity.

大肠杆菌和枯草芽孢杆菌具有较强的抑菌作用,而对白色念珠菌没有抑菌作用,说明该放线菌 TY134 菌株能够产生具有抑菌作用的代谢产物。

2.3 单培养与共培养发酵乙酸乙酯提取物的 HPLC 图谱分析

以大米固体培养基作为发酵基质,将放线菌 TY134 和蝙蝠蛾拟青霉分别进行单培养和共培养发酵,发酵产物经乙酸乙酯超声提取,提取物经 HPLC 分析后结果见图 3,其中 A、B 和 C 分别表示蝙蝠蛾拟青霉单培养发酵、二者共培养发酵、放线菌 TY134 单培养发酵乙酸乙酯提取物的 HPLC 分析图谱。

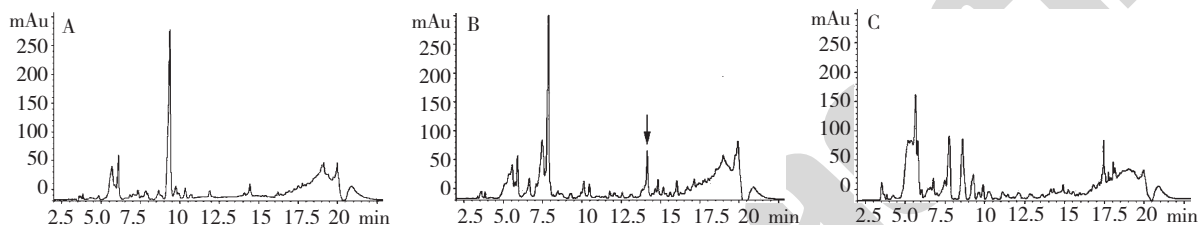


图 3 蝙蝠蛾拟青霉单培养(A)、二者共培养发酵(B)及放线菌 TY134 菌株单培养(C)发酵产物的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of fermentation extracts of monoculture of *P. hepiali* (A), actinomycete TY134 (C) and their co-culture (B)

2.4 重现性试验

精密称取相同质量的放线菌 TY134 菌株与蝙蝠蛾拟青霉单培养和共培养发酵产物,按照 1.2.6 项中步骤制备供试品溶液,在上述色谱条件下分别进样测定。以保留时间 $Rt = 14.143$ min 处出现的新增吸收峰的峰面积值作为参考,计算该吸收峰含量测定的 RSD 值。试验结果表明:该吸收峰的 RSD 值为 1.15% ($<3\%$),表明重现性良好。

2.5 发酵产物提取物抑菌试验

采用双层平板打孔法测定了蝙蝠蛾拟青霉与放线菌 TY134 单培养和共培养发酵产物乙酸乙酯提取物的抑菌活性(结果见表 2)。由表 2 可知,除供

表 2 蝙蝠蛾拟青霉与放线菌 TY134 单培养和共培养发酵产物乙酸乙酯提取物的抑菌活性

Table 2 Anti-microbial activity of ethyl acetate fermentation extracts of monoculture of *P. hepiali*, actinomycete TY134 and their co-culture

供试提取物 Extract	抑菌圈直径 Inhibition diameter (mm)				
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>R. subtilis</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	空白对照 Blank control (CK)
蝙蝠蛾拟青霉单培养 Monoculture of <i>P. hepiali</i>	7.2 ± 0.36	12.2 ± 0.49	10.3 ± 0.42	0	0
放线菌 TY134 单培养 Monoculture of actinomycete TY134	9.9 ± 0.70	8.4 ± 0.41	11.8 ± 0.35	0	0
蝙蝠蛾拟青霉与放线菌 TY134 共培养 Co-culture of <i>P. hepiali</i> and actinomycete TY134	17.2 ± 0.55	18.8 ± 0.56	12.9 ± 0.49	0	0

从图 3B 明显可以看出,放线菌 TY134 与蝙蝠蛾拟青霉共培养图谱中,在保留时间 $Rt = 14.143$ min 处出现了一个新增的吸收峰,而在放线菌 TY134(C)和蝙蝠蛾拟青霉(A)的单培养图谱中并没有这个吸收峰的出现。说明放线菌 TY134 与蝙蝠蛾拟青霉在共培养发酵过程中的相互作用使它们产生了新的次级代谢产物,起到了正调控的作用,因此,可以进一步推测共培养发酵可能会使某些沉默的生物合成基因簇得以激活。这一结论为今后微生物次生代谢产物的开发与利用提供了理论依据。

试菌白色念珠菌以外,蝙蝠蛾拟青霉与放线菌 TY134 单培养发酵产物乙酸乙酯提取物分别对供试菌都有抑菌作用;此外,共培养发酵产物乙酸乙酯提取物对供试菌的抑菌效果明显要强于单培养发酵。由此得知,共培养发酵可以诱导出单培养发酵产物中不产生且具有抑菌作用的代谢产物。

3 讨论与结论

从冬虫夏草土壤微生物区系中分离得到一株具有一定抑菌作用的放线菌 TY134 菌株,对其进行分子鉴定表明属于极暗黄链霉菌 *Streptomyces fulvissimus*。该放线菌 TY134 与蝙蝠蛾拟青霉以大米固体

发酵培养基作为发酵基质,分别进行单培养和共培养发酵,发酵产物经乙酸乙酯超声提取,运用高效液相色谱法和双层平板打孔法比较分析单培养和共培养乙酸乙酯提取物化学成分和抑菌活性的差异。结果显示:共培养相对于单培养在保留时间 $R_t = 14.143 \text{ min}$ 处出现了一个新增的吸收峰,而在单培养中并没有这个吸收峰的出现;而且共培养发酵产物乙酸乙酯提取物的抑菌活性明显要强于单培养,产生了新的抑菌活性物质。因此,可以推测共培养诱导发酵可以使某些处于不表达或者极低表达水平的沉默基因簇得以表达。

微生物的次级代谢产物是天然药物开发的重要来源之一。随着微生物基因组学的深入研究,学者们发现在自然培养条件下很多与合成生物活性次级代谢产物相关的基因未能表达,从而无法获得相应的次级代谢产物。激活这些沉默状态的基因簇,获得更多有益于食品、工业生产、医疗、新型药物等领域的先导化合物。前人总结了关于激活这些沉默的基因簇主要有三种方法:改造调控基因、引入强启动子及添加小分子物质,其中,共培养诱导发酵就是添加小分子物质中的一种方法^[15]。共培养诱导发酵的方法能够促进沉默的基因簇得以更多的激活与表达,从而获得更多数量和种类的生物活性次级代谢产物^[23]。Kurosawa 等^[24]利用链霉菌(*Streptomyces padanus*)与红球菌(*Rhodococcus fascians*)共培养发酵产生了两种新的抗生素 Rhodostreptomycins A 和 B;Oh 等^[25]利用海洋真菌 *Emericella* sp. 与放线菌 *Salinispora arenicola* 共培养获得了具有生物活性物质 emericellamides A 和 B,且产量比真菌纯培养要高得多;Cueto 等^[26]利用海洋细菌 CNJ-328 和海洋真菌盘多毛孢菌 CNL-365 共培养获得了在单培养中未有的抗生素 pestalone,推测合成该抗生素的基因簇处于沉默状态,而且对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐万古霉素屎肠球菌都具有很强的抗菌活性;也有学者将构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)与分离至土壤中的链霉菌(*Streptomyces rapamycinicus*)进行共培养筛选,共培养过程中的相互作用激活了编码苔色酸合酶(orsellinicacid synthase)的沉默 PKS 基因,从而合成了大量的苔色酸(orsellinicacid)及苔色酸衍生物红粉苔酸(lecanoric acid)^[27,28]。由此可见,共培养可作为挖掘新型次级代谢产物的有效途径。

随着科研水平和实验技术的不断提高,利用微

生物基因组学的测序信息并结合激活沉默基因簇的有效方法,使之在自然条件下未能编码的未知代谢产物得以表达,从而挖掘出更多数量和种类的新型次级代谢产物,因此,微生物基因组内沉默的基因簇所编码的未知代谢产物将成为食品、医疗、新型化合物等领域开发的重要源泉之一。

参考文献

- 1 Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *Clavicipitaceae* fungi. *Stud Mycol*, 2007, 57: 5-59.
- 2 Lo HC, Hsieh C, Lin FY, et al. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in Dong-ChongXiaCao and related bioactive ingredients. *J Tradit Complement Med*, 2013, 3: 16-32.
- 3 Li CY, Chiang CS, Tsai ML, et al. Two-sided effect of *Cordyceps sinensis* on dendritic cells in different physiological stages. *J Leukocyte Biol*, 2009, 85: 987-995.
- 4 Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, et al. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci*, 1997, 60: 2349-2359.
- 5 Buenz EJ, Bauer BA, Osmundson TW, et al. The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96: 19-29.
- 6 Liu Y, Wang J, Wang W, et al. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis*. *Evidence-Based Comple Alternative Med*, 2015, 2015: 575063.
- 7 Rathor R, Mishra KP, Pal M, et al. Scientific validation of the Chinese caterpillar medicinal mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes) from India; immunomodulatory and antioxidant activity. *Int J Med Mush*, 2014, 16: 541-553.
- 8 Zhao J(赵锦), Wang N(王宁), Chen YQ(陈月琴), et al. Molecular identification for the asexual stage of *Cordyceps sinensis*. *Acta Scientiarum Nat Univ Sunyatseni, Nat Sci* (中山大学学报, 自科版), 1999, 38: 121-123.
- 9 Li ZZ(李增智), Huang B(黄勃), Li CR(李春如), et al. Molecular evidence for anamorph determination of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. I. relation between *Hirsutella sinensis* and *C. Sinensis*. *Mycosystema* (菌物系统), 2000, 19: 60-64.
- 10 Mo MH(莫明和), Chi SQ(迟胜起), Zhang KQ(张克勤). Microcycle condition of *Cordyceps sinensis* and anamorph isolation. *Mycosystema* (菌物系统), 2001, 20: 482-485.
- 11 Jiang Y(蒋毅), Yao YJ(姚一建). Anamorphic fungi related to *Cordyceps sinensis*. *Mycosystema* (菌物系统), 2003, 22: 161-176.