

培养时间对蛹拟青霉 (*Paecilomyces militaris*) 菌丝体中代谢产物的影响

张德龙, 李淑林, 陆瑞利, 李康乐, 罗飞飞, 彭凡, 胡丰林*

安徽省微生物防治重点实验室, 安徽农业大学, 合肥 230036

摘要: 【目的】通过测定不同培养时间蛹拟青霉 (*Paecilomyces militaris*) 菌丝体中次级代谢产物的变化, 分析蛹拟青霉次级代谢产物与培养时间之间的关系。【方法】液体种子接入 SDAY 固体培养基; 培养温度为 25℃, 培养周期为 9 d, 从第 2 天开始每天取样; 用甲醇与乙酸乙酯分别提取菌丝体中次级代谢产物, 离心、过滤后合并提取液, 用液质联用仪进行分析, 用 MetaboAnalyst software 软件进行数据采集分析。【结果】主成分分析结果表明供试菌株在不同培养时间内其菌丝中次级代谢产物差异显著。聚类分析结果显示, 供试拟青霉对生物碱、肽类和核苷等易形成阳离子类物质的代谢物可分为前中后三个阶段。供试拟青霉对糖类和有机酸等易形成阴离子类物质的代谢主要分为前后两个阶段。差异代谢物及热图分析结果表明, 在培养的第 2 和第 3 天含量显著增加的代谢产物种类较多, 主要有酯类及其水解产物、细胞破坏素 B 和拟青霉素, 以及多种尚未鉴定的含氮化合物等; 在培养第 4 和第 5 天含量显著增加的差异代谢物质种类较少, 主要有细胞破坏素 A 和团囊虫草素等肽类抗菌杀虫物质; 在培养第 6 天至第 9 天含量显著增加的代谢物种类较多, 除多种白僵菌交酯和细胞破坏素等肽类抗生素外, 显著增加的还有多种脂肪酸、氨基酸、鼠李糖、海藻糖、脑苷脂类化合物和核黄素等物质。【结论】培养时间对蛹拟青霉菌丝中次级代谢产物的产生有显著影响。在培养初期, 菌体中酯类及细胞破坏素 B 和拟青霉素等含氮化合物的合成旺盛。在培养中期, 次生代谢物明显减少, 但细胞破坏素 A2 和团囊虫草素等肽类抗生素的合成却仍显著增多。在培养后期, 供试蛹拟青霉除代谢出多种白僵菌交酯等肽类抗生素外, 还大量产生有机酸、氨基酸和海藻糖等物质。虽然在整个培养过程中都有肽类抗生素产生, 但这些抗生素并不相同, 同时后一阶段新的抗生素的产生常常伴随着前一阶段的抗生素减少, 因此前期的抗生素可能是后期产生的抗生素的前体。

关键词: 培养时间, 蛹拟青霉, 菌丝体, 液质联用, 次级代谢物

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 12-1477-12

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 又名北虫草, 北冬虫夏草, 与冬虫夏草同属异种, 有效成分相近, 同时易于大规模人工培养, 已经被应用于食品、药品和保健

品中^[1]。大量研究表明, 蛹虫草代谢物具有免疫调节、抗疲劳、抗惊厥和镇静、抗癌、抗菌、抗肝纤维化、抗糖尿病、抗炎、雄性激素样等作用^[2]。鉴于蛹虫

基金项目: 国家自然科学基金 (30871676); 安徽省自然科学基金 (11040606M69, KJ2012A107)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-551-5786887; E-mail: hufenglin@hotmail.com

作者简介: 张德龙 (1985–), 男, 山东临沂人, 硕士, 研究方向为微生物与生物制药。

收稿日期: 2012-04-23; **修回日期:** 2012-05-25

草的独特药理作用,其无性型——蛹拟青霉(*Paecilomyces militaris*)的研究也日益受到重视^[3]。研究表明蛹拟青霉代谢物也具有抗肿瘤、抗氧化和抑菌等与蛹虫草相似的药理活性^[4-7]。

虽然目前有关蛹拟青霉次生代谢产物的研究已有较多报道^[1-7],但尚未见用代谢组学方法系统研究培养时间对其次级代谢产物影响的研究报道。代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后发展的新技术,它是通过研究生物体系受刺激或扰动后,其代谢产物的变化与外界影响间的变化关系,来研究生物体系的代谢途径的一种技术^[8-9]。通过对蛹拟青霉不同培养时间下的代谢组比较研究,不仅有助于揭示蛹拟青霉代谢规律,同时有关研究还将为虫生真菌特殊代谢产物的合成调控提供理论依据,为进一步开发利用虫生真菌资源奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种:一株蛹拟青霉(编号为RCEF4733),采自安徽黄山飞龙瀑,分离于鳞翅目幼虫,由安徽农业大学微生物防治省重点实验室提供。

1.1.2 培养基:①固体斜面培养基(g/L):蛋白胨10、葡萄糖40、酵母浸出粉10、琼脂20,蒸馏水定容。②固体平板培养基(g/L):蛋白胨10、酵母浸出粉10、葡萄糖40、琼脂20,蒸馏水定容。③液体摇瓶培养基(g/L):蛋白胨10、酵母浸出粉10、葡萄糖40,蒸馏水定容。

1.1.3 主要仪器及试剂:YXQ-LS-30立式压力蒸汽灭菌锅,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;AIRTECH超净工作台,购自苏净集团安泰公司;HZQ-F160全温震荡培养箱,哈尔滨东联电子公司;LRH-250G光照培养箱,广东省医疗器械厂;FreeZone12冻干机,购自美国LABCONCO公司;AE200型梅特勒电子天平,上海分析仪器厂;高分辨液质联用分析仪(6210 Time of flight LC/MS),包括Agilent 1100高效液相色谱(HPLC)、二极管阵列检测器(DAD)、高分辨飞行时间质谱仪(HRTOF)和电喷雾离子源(ESI),购于美国Agilent公司;分析柱为Atlantis C18,5 μm ,3.6 \times 150 mm,美国Waters公司;分析纯甲醇,上海建信化工有限公司;色谱纯甲醇,美国Tedia公司。

1.2 样品制备

1.2.1 实验样品准备:按1.1.2配制培养基,121℃高压灭菌20 min,将水液管中菌种在无菌条件下转接入斜面培养基扩大培养后,接入液体培养基,置于振荡培养箱中25℃,培养3天得液体菌种。固体平板培养基高压灭菌后冷却至50-60℃后倒平板,每皿控制在20 mL。待凝固后用灭过菌的玻璃纸覆盖在培养基表面,用移液器接入液体种子,置于恒温培养箱中培养,培养温度为25℃,分别在培养第2至第9天刮取菌丝,冻干、粉碎,置于-70℃冰箱中,备用。

1.2.2 液质样品准备:分别称取不同培养时间下固体培养菌丝粉各两组,按料液比30 mg:1 mL分别加入甲醇、乙酸乙酯,室温下超声浸提30 min后静置24 h,5600 \times g,离心10 min,合并上清液再次离心,取上清过0.25 μm 滤膜至干净样品瓶中备用,并标号2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d和9 d分为8组。

1.3 LC/MS 条件

质谱条件:ESI离子源的雾化气压为35 Psi,氮气流速为12 L/min,温度为325℃;阳离子模式时离子化电压为4000 V,碎片电压250 V,阴离子模式时离子化电压为3500 V,碎片电压175 V;分析柱的HPLC洗脱条件为:0-3 min用100%水洗脱;3-35 min甲醇由0%上升到100%;100%甲醇继续洗脱15 min。洗脱速度:为1.0 mL/min。每组样品3个重复。检测条件为200 nm到800 nm全波长扫描,以及质谱检测。

1.4 数据分析

将各组数据的阴、阳离子总离子流图利用安捷伦液质联用自带的Masshunter数据分析软件导出以保留时间、分子量和相对高度为列标签的CSV文件导入MetaboAnalyst software软件进行数据分析^[10]。

2 结果和分析

2.1 RCEF4733 菌株代谢物主成分分析模型验证及主因子个数确定

经过PCA计算出的数学模型是否可靠需要进行严格的验证。不可靠的数学模型不仅不能很好地描述代谢组学数据特点,还可能严重影响正确结果的获得甚至误导分析结果^[11]。MetaboAnalyst software软件提供两种模型验证方法,本文采用交叉

验证法^[12] 主要参考 R^2 和 Q^2 两个参数，通常情况下 R^2 和 Q^2 越接近于 1，模型越好。结果见表 1。

表 1 两种离子模式 PCA 分析模型验证相关参数

Table 1 The model validation of PCA analysis of both ionization modes						
Parameters	1comps	2comps	3comps	4comps	5comps	
A	Accuracy	0.0	0.0	0.0	0.125	0.5
	R^2	0.78099	0.97683	0.9979	0.99987	0.99999
	Q^2	0.6024	0.83641	0.97743	0.99965	0.99998
B	Accuracy	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
	R^2	0.90425	0.97996	0.99669	0.99976	0.99997
	Q^2	0.83227	0.96472	0.9895	0.99869	0.99994

A: positive ionization mode, B: negative ionization mode

由表 1 可以得出两种离子模式下 PCA 分析模型在 5 个主成分因子时验证参数 R^2 和 Q^2 均在 0.9999 以上，接近于 1，由此可以确定该模型可靠，且不存在过度拟合现象^[13]。模型验证后还需要根据实验研究需要，确定主因子个数，通常以因子累积贡献率来决定。结果见图 1-A 和图 1-B。

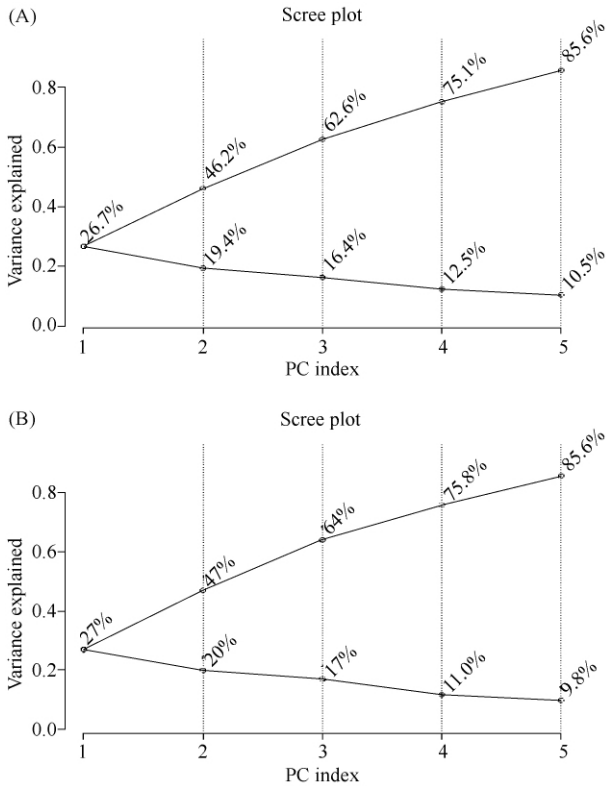


图 1 阴阳离子检测模式碎石图

Fig.1 Scree plot on component number of positive ionization (A) and negative ionization (B) mode.

由图 1-A 和图 1-B 可知，不同培养时间的 8 组样品进行不同离子模式的质谱检测数据进行主成分

分析，均提取出 5 个因子变量，且因子变量的累积贡献率均为 85.6%，即 5 个主成分包含了样品的大部分信息。在阳离子模式中前两个因子的贡献率分别达到了 26.7% 和 19.4%，阴离子模式中前两个因子贡献率分别达到了 27% 和 20%，两者前两个因子的累积贡献率均超过了各自 5 个因子的累积贡献率的一半，由此可见两种离子模式中前两个因子在各自样本中具有显著的代表性。又因为在第 2 个因子时，贡献率出现了显著拐点，因此选取前 2 个因子作为主成分合适。

2.2 RCEF4733 代谢物主成分分析

对 2.1 中确定的主因子个数，对 8 组阳离子和阴离子模式的数据分别进行主成分分析，从主成分得分图可观察样品的聚集、离散程度。样品分布点越靠近，说明这些样品中所含有的变量或分子的组

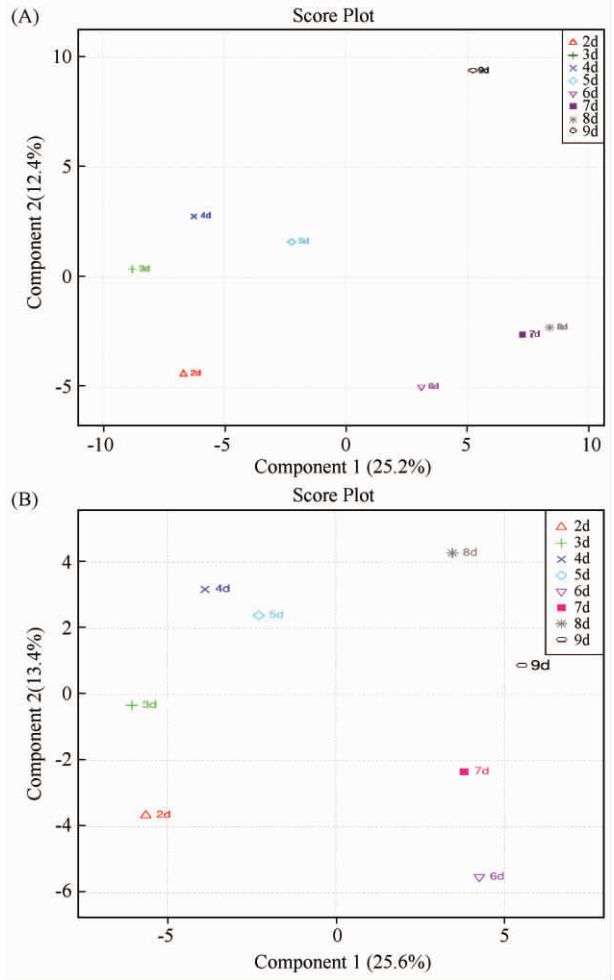


图 2 阴阳离子模式各组样品主成分分析得分图

Fig.2 Scores plot on PCA analysis of positive (A) and negative (B) ionization mode.

成和浓度越接近;反之,样品点越远离,其差异越大^[11]。结果见图 2-A 和图 2-B。

从阳离子主成分分析(图 2-A)可以看出,同一样品重复 3 次实验,样品点重合,表明供试菌株在不同培养时间内次级代谢产物组内差异不明显;而不同培养时间的各组样品间在主成分得分图上可以完全分开,表明培养时间对供试菌株菌丝中代谢物产物的生成具有显著影响。除第 7 天与第 8 天样品分布较靠近(表明供试菌在这两天体内的次级代谢产物变化不明显)外,其它各时间分布差异较大,反映出各组样品随培养时间不同其代谢物呈动态变化,由此可见 PCA 模型可以反映样品代谢随时间连续动态变化过程^[11]。

观察图 2-B 的得分图除了可以发现各组样品完全分开,代谢物水平上存在明显差异外,还发现各组样品在图中分为明显的左右两部分(这一点与阳离子模式下的结果类似),由此可以推断供试菌株在生长前期与后期生成的次级代谢产物存在较大差异,其原因可能是随着培养基中营养物质被不断消耗减少使得某些代谢底物出现不足,或者是由于随着次级代谢产物的积累而出现的反馈调节作用的结果。

2.3 RCEF4733 菌株代谢物聚类分析

本研究采用华德(Ward)法聚类分析^[14-15],距离算法为 Pearson 相关系数。两种离子模式下聚类结果如图 3-A、3-B 所示,图中左侧为不同培养时间聚类,顶端为代谢产物聚类,图的下端表示质谱检测到的次生代谢产物的保留时间及相对分子量(图中略),热图中代谢物由深蓝色到深褐色,表明该物质的数值由低(冷)到高(热)。

由图 3-A 阳离子模式图可知,根据培养时间的不同,供试菌株分为两个大类,第 2、3、4 天聚为一类,第 5 和第 6 天聚为一类,第 7、8、9 天聚为一类;而图 3-B 阴离子模式图中第 2、3、4、5 天聚为一类,第 6、7、8、9 天聚为一类。由于阳离子图中的代谢物主要是一些易形成阳离子的物质,如生物碱、肽类和核苷等,而阴离子图中反应的主要是有机酸、酚类以及糖类和氨基酸等,因此从聚类分析结果可知,供试拟青霉的生物碱、肽类和核苷等易形成阳离子的代谢物的代谢转折点在培养的第 4 到第 5 天,及第 6 到第 7 天之间。有机酸等易形成阴离子物质的代谢转折点在培养的第 5 到第 6 天之间。另外,从代谢

物水平上的聚类分析来看,虽然阴阳离子模式最终都可将代谢物分为两大类,但是在阴离子模式下检测到代谢物相似性更大;从检测到的代谢物数值上看,不同培养时间供试菌株菌丝体内代谢物浓度有较大差异,有些物质在初期浓度高后期浓度低,有些物质则相反,还有些物质出现浓度高低交替出现的现象,这种前后变化可能与营养消耗,代谢产物积累,反馈调节等多方面原因有关,有待于深入研究。

2.4 RCEF4733 菌株差异代谢物分析

差异代谢物的分析可以通过主成分分析的载荷图来研究,载荷图表示了所检测的变量分布情况,载荷图中的变量分布与得分图中样品分布和位置是相对应的^[11],从载荷图中变量点的分布情况可以看出各组样品间代谢物的差异程度。采集的数据通过 MetaboAnalyst software 做 PLS-DA(偏最小二乘法)分析载荷图见图 4-A 和图 4-B。

由图 4-A 阳离子模式载荷图可以看出变量点在图中较为分散,靠近中心位置的变量不多,表明供试拟青霉在不同培养时间内产生的代谢物质有较明显的差异。

由图 4-B 阴离子模式载荷图可以看出,各变量点分散程度较 4-A 中更为明显,但这并不完全表明在阴离子模式下检测到的次级代谢产物组间差异更大,可能还与阴离子质谱检测到的数据较少有关。

根据 PLS-DA 的分析结果,将不同培养时间差异显著的化合物通过 MassBank、Metlin 和 PubChem 等化合物数据库与质谱图匹配查询,并结合有关文献报道和部分标准品对照及化学定性分析,初步鉴定出不同培养时间差异显著的可能化合物,结果见表 2。

由表 2 可知,从培养开始一直到培养结束,阴阳两种离子模式下总共检测分析出 50 种差异明显的物质,表明在不同的培养时间内供试菌株产生的次级代谢产物有较大差异。

培养第 2 天含量显著增高的物质有十二烷酸、二十碳三烯酸、甘油酯、磷脂、胡萝卜苷、细胞破坏素 B、eicosanoyl-EA、conoideocrellide A 以及暂无法确定具体结构的 $C_{41}H_{69}N_3O_7$ 、 $C_{40}H_{62}O_2$ 、 $C_{28}H_{51}NO_6$ 等物质。由于甘油酯类物质在脂肪酶类作用下可水解生成甘油和不饱和脂肪酸^[16],而甘油对虫生真菌穿透昆虫体壁有重要作用^[17],因此,菌丝在生长初期就出现甘油酯等含量显著高于其它阶段的现象正与拟

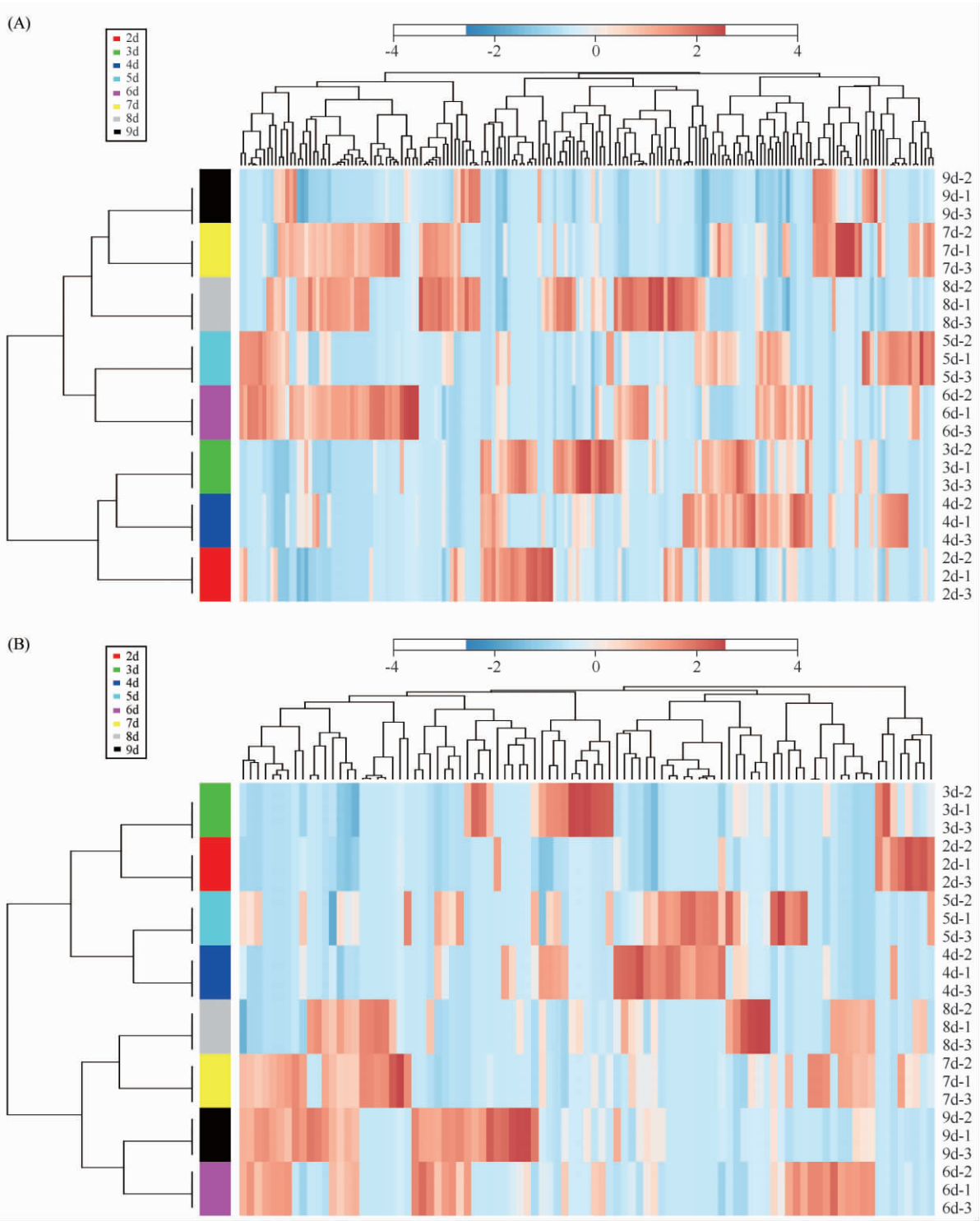


图 3 阴阳离子模式不同培养时间及次级代谢产物聚类分析图

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis for different incubation time and secondary metabolites of positive (A) and negative (B) ionization mode

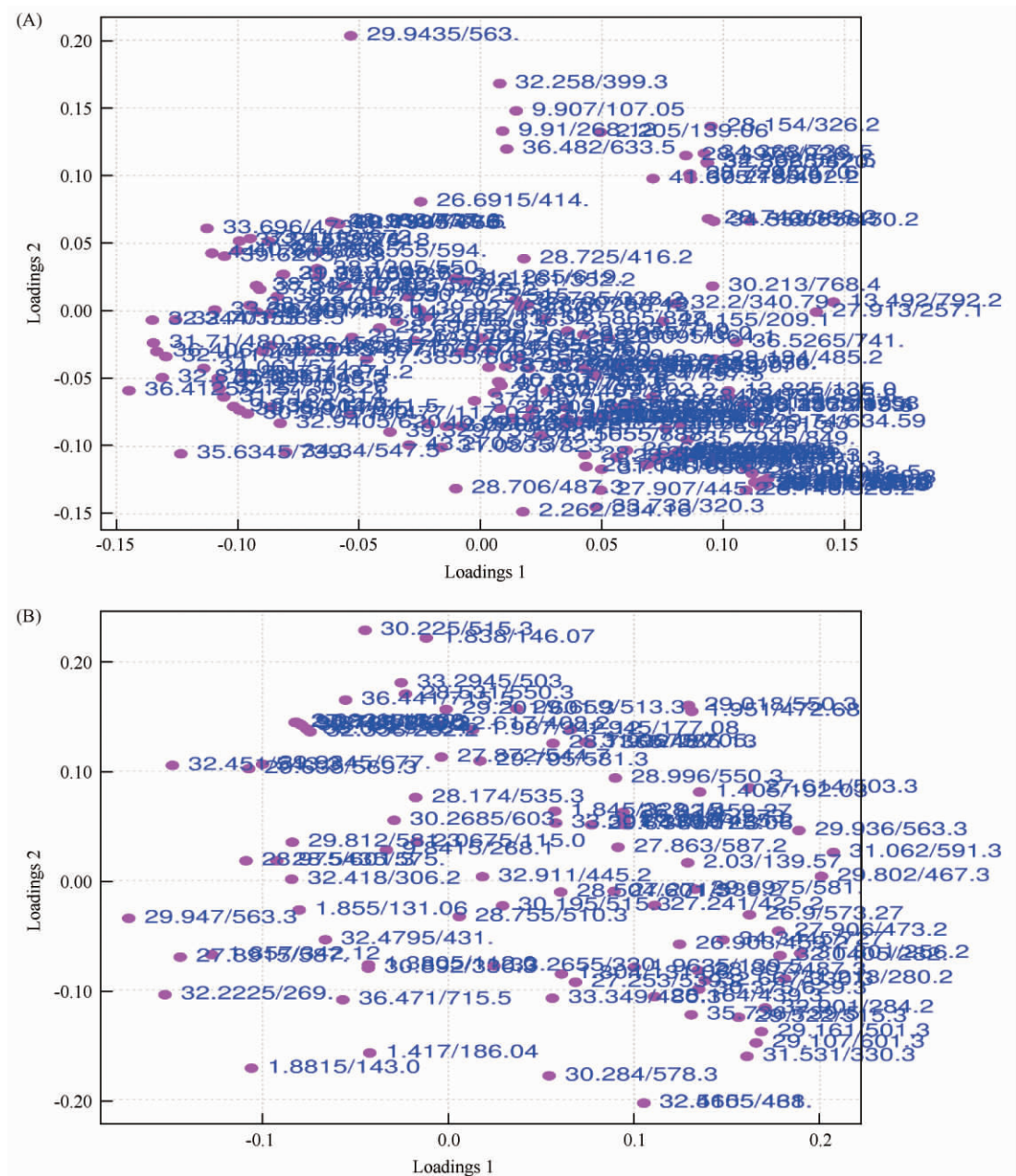


图4 阴阳离子模式载荷图

Fig. 4 Loadings plot of positive (A) and negative (B) ionization mode.

青霉的侵染特性一致^[18]。胡萝卜苷又名谷甾醇-3-O-葡萄糖苷为甾醇类物质, Wiesner 等人研究认为生物体内甾醇类物质合成的前体物质是甲戊二羟酸, 该物质是由两个乙酰辅酶 A 结合后经还原生成^[19], 而乙酰辅酶 A 在体内是脂类、糖类和氨基酸氧化的重要中间产物。由于真菌生长所不可缺少的甾类化

合物是麦角甾醇而非谷甾醇类物质^[20], 因此胡萝卜苷可能是蛹拟青霉合成麦角甾醇的副产物或中间产物, 具体代谢途径尚需进一步研究。Conoideocrellide A 和细胞破坏素 B 是重要的昆虫毒素^[21-22], 但这两种毒素在拟青霉培养初期就大量产生的原因及作用还有待于进一步研究。

表 2 不同培养时间差异显著化合物表

Table 2 Significant different compounds of different incubation time

Number	Retention Time	Possible Compound	Possible Formula	Culture time/d								
				2	3	4	5	6	7	8	9	
1	1.40	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	-	-	-	-	+	-	+	↑	+
2	31.06	Beauverolide C	C ₃₅ H ₄₉ N ₃ O ₅	-	-	-	-	+	+	↑	+	↑
3	29.93	Destruxin A ₂	C ₂₈ H ₄₅ N ₅ O ₇	-	-	-	+	+	↑	+	↓	+
4	31.80	Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₆ O ₂	-	-	-	-	+	+	↓	+	↓
5	32.45	Beauverolide Bor Ba	C ₃₁ H ₄₉ N ₃ O ₅	-	-	+	+	↓	+	↓	-	-
6	29.01	Ophiocordin	C ₂₈ H ₂₆ N ₂ O ₁₀	-	-	-	+	+	↑	+	↓	+
7	32.04	Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-	-	-	-	+	+	↑	+	↓
8	31.21	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	-	-	-	-	+	+	↓	+	↓
9	27.61	Beauverolide N	C ₂₇ H ₄₁ N ₃ O ₆	-	-	-	-	-	+	+	↓	+
10	2.03	Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	-	-	-	-	+	-	-	-	-
11	28.80	Beauverolide I or II	C ₂₇ H ₄₁ N ₃ O ₅	-	-	-	-	+	+	↓	+	↑
12	1.85	D-mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	-	+	+	↓	-	+	↓	-	+
13	27.26	Isariotins B	C ₂₁ H ₃₁ NO ₈	-	-	-	-	-	+	+	↑	-
14	1.95	Trehalose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-	-	-	-	-	-	+	+	↑
15	1.93	Rhamnose	C ₆ H ₁₂ O ₅	-	-	-	-	-	+	+	↑	-
16	26.92	★	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₂	-	-	-	-	-	+	+	↑	-
17	1.36	L-glutamate	C ₅ H ₉ NO ₄	-	-	-	-	-	+	+	↑	-
18	29.63	Variotin	C ₁₇ H ₂₅ NO ₃	-	+	+	↓	+	↓	-	-	-
19	36.41	★	C ₄₁ H ₆₉ N ₃ O ₇	+	+	↓	+	↓	+	↓	-	-
20	35.62	Phosphatidyl ethanolamine	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	+	+	↓	+	↓	+	↓	+	↓
21	13.49	★	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	-	-	-	+	+	↑	+	↑	+
22	36.40	★	C ₄₀ H ₆₂ O ₂	+	+	↓	+	↓	-	-	-	-
23	31.69	Decanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	+	+	↓	+	↓	-	-	-	-
24	32.87	★	C ₃₀ H ₅₃ NO ₇	+	+	↓	+	↑	+	↓	-	-
25	27.91	Stearic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-	-	+	+	↑	+	↑	+	↓
26	32.33	Eicosanoyl-EA	C ₂₂ H ₄₅ NO ₂	+	+	↑	+	↓	-	-	-	-
27	32.44	★	C ₂₈ H ₅₁ NO ₆	+	+	↑	+	↓	+	↓	-	-
28	34.06	Glycerolipids	C ₃₆ H ₆₂ O ₅	+	+	↓	-	+	↓	-	-	-
29	28.15	di (4-hydroxy) benzyl-dioxopiperazine	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₄	-	-	+	-	+	↑	-	-	+
30	31.71	★	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	+	+	↓	-	-	-	-	-	-
31	9.85	L-Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	+	+	↓	-	-	-	-	-	-
32	34.36	Cerebroside	C ₄₁ H ₇₇ NO ₉	-	-	-	-	-	-	+	+	↓
33	32.88	★	C ₃₄ H ₃₆ O ₁₁	-	-	-	-	-	-	+	+	↓
34	33.75	Daucosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	+	+	↓	-	-	-	-	-	-
35	32.27	Eicosatrienoic acid	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	+	+	↑	-	-	-	-	-	-
36	3.07	★	C ₁₁ H ₁₇ N ₅ O	-	-	+	-	-	+	↑	+	↓
37	50.91	Conoideocrellide A	C ₄₀ H ₄₇ N ₅ O ₁₀	+	+	↓	-	-	-	-	-	-
38	31.65	★	C ₂₈ H ₄₉ NO ₆	+	+	↑	-	-	-	-	-	-
39	28.73	Riboflavine	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	-	-	-	-	-	-	+	+	↓
40	35.10	Paecilodepsipeptide B or C	C ₄₀ H ₄₉ N ₅ O ₁₀	-	-	-	-	-	-	+	+	↓
41	34.36	★	C ₃₅ H ₆₅ NO ₃	+	+	↑	-	-	-	-	-	-
42	32.70	★	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₀	+	+	↑	+	↓	-	-	-	-
43	34.55	Aucosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	-	-	-	-	-	-	+	+	↓
44	29.94	Destruxin B	C ₂₈ H ₄₅ N ₅ O ₇	+	+	↓	+	↑	-	-	-	-
45	3.22	★	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ P	+	+	↓	-	-	-	-	-	-
46	27.89	★	C ₃₀ H ₄₁ N ₃ O ₉	+	+	↑	-	-	-	-	-	-
47	1.88	Aminoquinoline	C ₉ H ₈ N ₂	+	+	↓	-	-	+	↑	+	↑
48	1.85	12-hydroxyvalicin	C ₁₆ H ₂₄ O ₆	+	+	↓	-	+	↑	-	+	↑
49	29.80	★	C ₂₅ H ₄₆ N ₃ O ₅	-	-	-	+	+	↑	+	↓	+
50	29.93	★	C ₃₇ H ₄₇ N ₃ O ₉	+	-	+	↑	+	↓	-	+	↑

“★” means Unidentified “+” means detected or content changed significantly (p < 0.05); “-” means not detected or content changed not significantly. “↑” means content increased; “↓” means content decreased.

培养第3天含量显著增高的代谢物质有d-甘露醇和拟青霉素两种物质,其中d-甘露醇分别在第3、4、6、9天都出现显著变化,且相对含量逐步减少;而variotin只在第2、3、4天出现显著变化,其相对含量变化趋势与d-甘露醇一致。真菌中的甘露醇既可以在1-磷酸甘露醇磷酸酯酶催化下生成6-磷酸果糖进入糖酵解循环中^[23-24],参与能量代谢,同时它还可降低真菌孢子水分活度,从而增加其抗旱性^[2]。甘露醇有较强的水溶性并可排泄到胞外,在培养后期由于合成下降,而水溶散失依旧,导致菌体中含量下降。variotin是一种抗真菌抗生素^[24],其在培养初期就产生,随后含量即开始下降,此与次生代谢产物的一般代谢规律并不一致,值得深入研究。

培养第4天含量显著增高的代谢物质有白僵菌交酯B或Ba、di(4-hydroxy) benzyl-dioxopiperazine、C₁₁H₁₇N₅O和硬脂酸4种。白僵菌交酯类因其分子结构上某些位置取代基不同可以形成多种不同衍生物,该类物质具有抗菌杀虫作用,有些种还具抑制脂滴在巨噬细胞中聚集的活性^[2],其代谢途径目前尚不清楚;硬脂酸为饱和脂肪酸类物质,在培养的第4、5、6、7天相对含量逐渐升高,在第8天相对含量开始下降,因差异代谢产物中同时有甘油酯类物质相对含量减少,所以该物质有可能来源于脂类物质水解;在培养的最后两天硬脂酸相对含量开始减少有可能是由于硬脂酸在相关酶的作用下合成其他物质,也有可能是因为随着培养时间的增加,培养基中糖类营养物质迅速减少,供试拟青霉开始进一步利用脂类分解产物所致。

培养第5天含量显著增高的代谢物质主要有细胞破坏素A2和团囊虫草素等物质,它们均为肽类物质,具有抗菌、杀虫等多种活性^[2]。

培养第6天至第9天新出现的差异代谢物质有棕榈酸、油酸、亚油酸、脯氨酸、isariotins B、鼠李糖、l-谷氨酸、2-氨基丁酸、戊酸、缬氨酸、柠檬酸、海藻糖、脑苷脂类化合物、核黄素、以及白僵菌交酯I或II、白僵菌交酯C和白僵菌交酯N等。其中不饱和脂肪酸类物质可能是硬脂酸等饱和脂肪酸的降解过程中的产物,因为在高等微生物如真菌和藻类中,不饱和脂肪酸的生物合成常常是饱和脂肪酸脱饱和而成的^[25]。对于l-谷氨酸在生物体内合成一般认为是以糖类物质代谢的中间代谢物,由 α -酮戊二酸为前体物质,在谷氨酸脱氢酶的催化下形成^[26],该类

物质(包括缬氨酸与脯氨酸)的合成与糖类物质分解代谢关系密切;2-氨基丁酸在培养的第8天出现,而谷氨酸在培养的第7天出现,目前研究认为2-氨基丁酸在体内来源一般认为是谷氨酸脱羧的产物^[27],且谷氨酸相对含量的变化趋势与2-氨基丁酸相对含量的变化趋势相反,由此可以推测该物质来源于谷氨酸的转化;从第7天开始出现了鼠李糖、柠檬酸和海藻糖等物质,其中鼠李糖是由葡萄糖-1-磷酸经NDP-4-酮-6-脱氧-d-葡萄糖合成,该过程还受到多种操纵子的调控^[28-30],海藻糖在体内有3条合成途径,较为常见是6-磷酸海藻糖合成酶催化尿苷二磷酸葡萄糖和6-磷酸葡萄糖合成6-磷酸海藻糖,再在6-磷酸海藻糖磷酸酯酶作用下生成海藻糖,海藻糖对生物染色体、大分子蛋白、生物膜等具有非特异性保护作用^[31-32],对该物质的研究日益受到重视,由于上述3种物质的形成与共同底物葡萄糖糖密切相关,且在培养后期相对含量都逐渐增大,由此可以推断在培养后期供试拟青霉不仅利用葡萄糖作为能量供给原料,还以之合成其它糖类物质,其中海藻糖与真菌的抗逆性及其相关^[33-34],在培养后期出现这些物质,可能与真菌抵抗培养后期有害代谢物质积累和生存环境恶化有关;核黄素为天然水溶性的B族维生素,是机体内许多酶系统的重要辅基,由于较低的葡萄糖浓度有利于其合成^[35-37],因此培养后期检测到较多核黄素可能与葡萄糖被逐渐消耗及核黄素积累有关。

从对表2差异代谢物的总体分析来看,在培养的初期,酯类代谢和含氮化合物代谢都较为活跃,培养中后期糖类和有机酸类代谢活跃;在整个培养过程中都有肽类抗菌杀虫毒类物质产生,但各阶段产生的抗生素都不同,中前期以细胞破坏素、蛹拟青霉素等为主,后期以多种白僵菌交酯为主,并且新的抗生素常常伴随着前期产生的抗生素减少,因此前期的肽类抗生素可能是后期大量产生的白僵菌交酯的前体。由于白僵菌交酯和蛹拟青霉素等的代谢途径目前尚未见报道,有关结论尚待进一步证实。

为更直观地看到培养时间与代谢物变化间的关系,本文将PLS-DA分析的VIP得分最高的25个次级代谢产物做热图分析,图中左边不同颜色代表不同培养时间,右边为相应的样品,底部为VIP得分最高的25个代谢物质的编号(与表2一致),顶部由深蓝色到深褐色,表明该物质的数值由低(冷)到高

(热), 结果如图 5-A 与 5-B 所示(距离用 Pearson 相
关系数, 聚类算法采用华德 (Ward) 法)。

从阳离子模式热图(图 5-A)可直观地看到, 在
培养初期出现含量显著增高的易形成阳离子的代谢

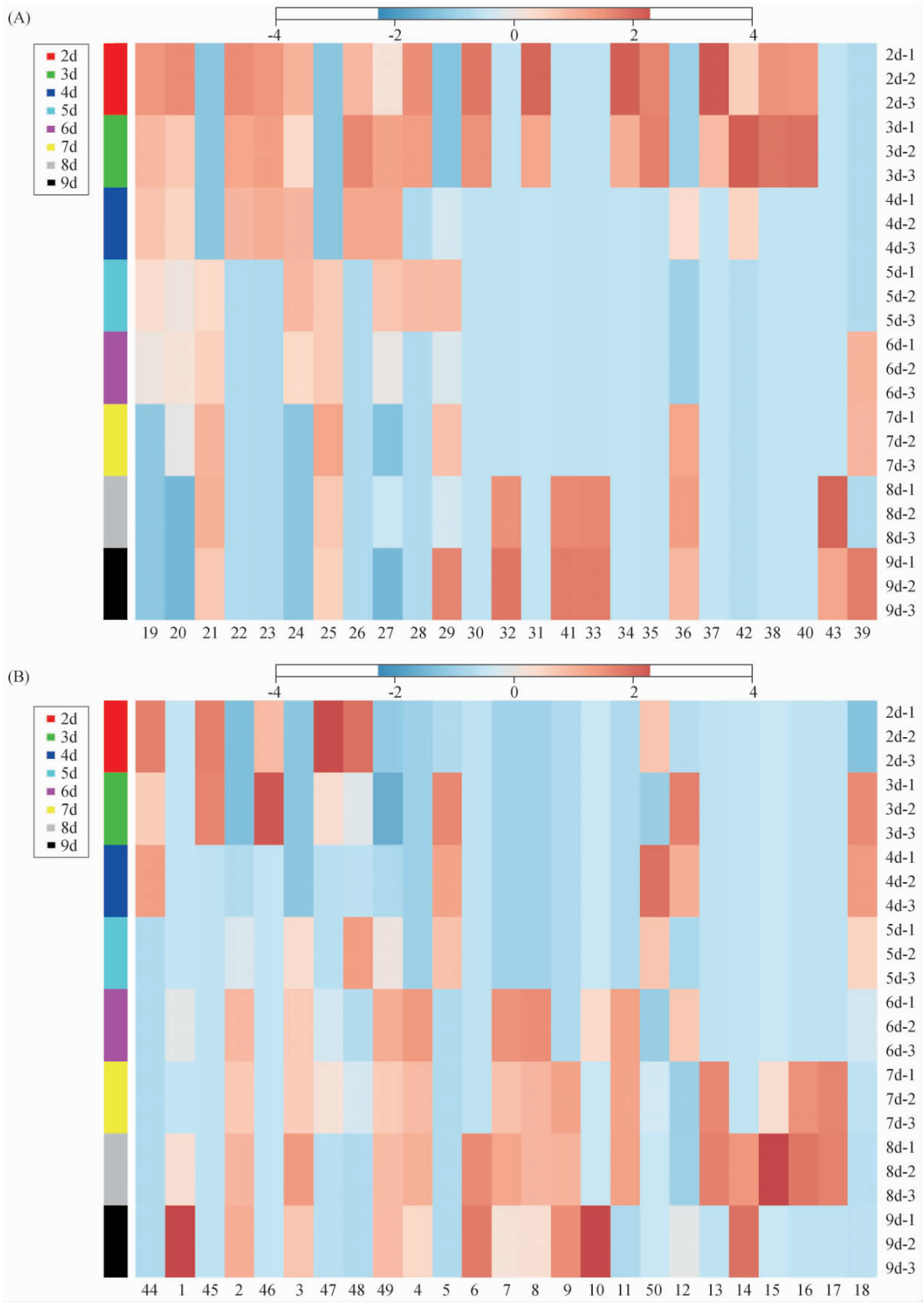


图 5 阴阳离子模式代谢物热图

Fig. 5 Heat map of positive (A) and negative (B) ionization mode

物较多,在 25 个 VIP 得分最高的代谢物质中,有 16 个在培养的前 3 天保持较高的含量,从组成来看这些物质主要是含氮化合物,以及磷酸和甘油酯类物质,表明拟青霉在培养初期能迅速转化利用培养基中的含氮化合物(以肽类为主)和酯类物质,这与虫生真菌的侵染特性一致^[17]。从图中还可直观地看到,在培养的第 4 到第 6 天,次生代谢物明显减少,这可能是因为菌体进入对数生长期后将大部分小分子代谢物转化为菌体结构性大分子物质所致,提示人们如果以得到大量菌丝为目的,此阶段可及时补充营养物质。在培养后期显著增加的易形成阳离子代谢物较少,而易形成阴离子的代谢物却明显增加,并于培养的第 7 和第 8 天达到高峰(图 5-B)。从阴离子模式热图和表 2 可看到,在培养中后期出现显著差异的代谢物主要包括有机酸、海藻糖和抗生素等,这些物质与真菌的抗逆性及生态位竞争有关^[2, 38]。

3 结论和讨论

从上面的分析可以得到以下结论:在培养条件一定的情况下,培养时间对蛹拟青霉代谢产物的产生具有重要影响。主成分分析结果表明供试菌种在不同培养时间内次级代谢产物差异显著。聚类分析结果显示:供试拟青霉对生物碱、肽类和核苷等易形成阳离子类物质的代谢物可分为 3 个阶段,即前期、中期和后期,其代谢物出现显著变化的转折点分别在培养的第 4 到第 5 天,及第 6 到第 7 天之间。前期含量显著增高的易形成阳离子的代谢物种类最多,中期仅少数代谢物含量显著增高,后期含量显著增高的代谢物种类又略增加。对供试拟青霉对糖类和有机酸等易形成阴离子类物质的代谢分析发现,该类物质代谢与易形成阳离子的物质代谢规律并不一致,其代谢可分为前后两个阶段,其转折点在培养的第 5 到第 6 天之间。前期仅有少数代谢物含量显著增高,后期含量显著增高的代谢物种类大量增加,其增加的最高峰在培养的第 7 和 8 两天。

差异代谢物分析结果显示:在培养的第 2 和第 3 天含量显著增加的代谢产物种类较多,主要有酯类及其水解产物、细胞破坏素 B 和拟青霉素等肽类抗菌杀虫类物质,以及多种尚未鉴定的含氮化合物等;在培养第 4 和第 5 天含量显著增加的差异代谢物种类较少,主要有细胞破坏素 A2 和团囊虫草

素等肽类抗菌杀虫物质;在培养第 6 天至第 9 天含量显著增加的代谢物种类较多,除多种白僵菌交酯和细胞破坏素等肽类抗生素外,显著增加的还有多种脂肪酸、氨基酸、鼠李糖、海藻糖、脑苷脂类化合物和核黄素等物质。

在培养初期,菌体中酯类及其水解产物明显增多的现象,与虫生真菌在代谢初期利用酯类水解产生甘油的渗透压作为穿透昆虫体壁的动力是一致的,但在培养初期就有大量细胞破坏素 B 和拟青霉素等肽类抗菌杀虫类物质合成尚属首次发现,其生物学意义有待进一步研究。

在培养中期,由于菌体进入对数生长期而将大部分小分子代谢物转化为菌体结构性大分子物质,使小分子次生代谢物明显减少,但细胞破坏素 A 和团囊虫草素等肽类抗菌杀虫物质的合成却仍显著增多,表明菌体的生长与肽类抗菌杀虫物质的合成是同步的,这种同步合成现象与一般次生代谢产物的合成规律并不一致,值得深入研究。

在培养后期,供试蛹拟青霉除继续代谢出多种肽类抗生素外,还大量产生有机酸、氨基酸和海藻糖等物质。海藻糖是已知与虫生真菌抗逆性有关的物质,但大量产生的多种有机酸和氨基酸的生理意义有待进一步研究。另外,虽然培养后期和培养前期及中期一样,都有较多肽类抗菌杀虫类抗生素产生,但不同阶段产生的化合物种类并不相同,中前期以细胞破坏素、蛹拟青霉素等为主,后期以多种白僵菌交酯为主,并且新的抗生素产生常常伴随着前一阶段产生的抗生素减少,因此前一阶段产生的肽类抗生素可能是后一阶段产生的抗生素前体。由于白僵菌交酯和蛹拟青霉素等的代谢途径目前尚不清楚,其具体代谢关系尚在进一步研究中。

参考文献

- [1] 刘艳芳,唐庆九,杨焱,张劲松,郝瑞霞,唐传红,魏东芝,史国平. 蛹虫草及其培养基中主要核苷类成分的分析比较. *食品科学 (Food Science)*, 2010, 31 (4): 139-142.
- [2] 胡丰林,李增智. 虫草及相关真菌的次生代谢产物及其活性. *菌物学报 (Mycosystema)*, 2007, 26 (4): 607-632.
- [3] 梁宗琦. 蛹虫草无性型——蛹草拟青霉的确证. *食用菌学报 (Acta Edulis Fungi)*, 2001, 8 (4): 28-32.
- [4] 陆瑞利,胡丰林,黄勃,李春如,李增智. 一株蛹拟青霉 (*Paecilomyces militaris*) 深层发酵产物中抗肿瘤活性物质分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49 (10): 1332-1340.

- [5] 邵颖, 陈安徽, 陈宏伟. 蛹拟青霉液体深层发酵菌丝体抗氧化活性和抑菌活性分析. 食品工业(*The Food Industry*), 2011, (7): 66-68.
- [6] Hamburger M, Schmidt K, Günther W, Stoyanova S, Schubert B, Li ZZ. Militarione A, a neurotrophic pyridone alkaloid from *Paecilomyces militaris*. *Organic Letters*, 2002, 4 (2): 197-199.
- [7] Kryukov VY, Yaroslavl'tseva ON, Lednev GR, Borisov BA. Local epizootics caused by teleomorphic cordycipitoid fungi (*Ascomycota: Hypocreales*) in populations of forest lepidopterans and sawflies of the summer-autumn complex in Siberia. *Microbiology*, 2011, 80 (2): 286-295.
- [8] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature Review Drug Discovery*, 2002, 1 (2): 153-161.
- [9] 许国旺, 杨军. 代谢组学及其研究进展. 色谱(*Chinese journal of chromatography*), 2003, 21 (4): 316-320.
- [10] Sun JC, Schnackenberg LK, Pence L, Bhattacharyya S, Doerge DR, Bowyer JF, Beger RD. Metabolomic analysis of urine from rats chronically dosed with acrylamide using NMR and LC/MS. *Metabolomics*, 2010, 6:550-563.
- [11] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析. 中国临床药理学与治疗学(*Chinese journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*), 2010, 15 (5): 481-489.
- [12] Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wold S. Multi- and megavariable data analysis principles and applications. Umeå University, Umeå, Sweden. 2001.
- [13] Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, Velzen EJJ, Duijnhoven JPM, Dorsten FA. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*, 2008, 4 (1): 81-89.
- [14] 李家华, 张广辉, 邵宛芳, 坂田祐介, 根角厚司, 橘本文雄. 基于 PCA 和聚类分析的茶树 F1 代茶多酚遗传分析. 分子植物育种(*Molecular Plant Breeding*), 2011, 9 (4): 491-497.
- [15] 江勇, 倪永年, 朱惠芳. HPLC 测定酱油中的有机酸及其聚类分析. 南昌大学学报(理科版)(*Journal of Nanchang University(Natural Science)*), 2010, 34 (5): 471-475.
- [16] 张羽航, 鲍时翔, 王延平, 郑学勤, 姚汝华. 脂肪酸脱饱和的应用进展. 生物工程进展(*Progress in Biotechnology*), 2001, 22 (2): 46-49 + 45.
- [17] Wang C S, Leger R J S. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (29): 21110-21115.
- [18] 梁宗琦. 真菌次生代谢产物多样性及其潜在应用价值. 生物多样性(*Biodiversity Science*), 1999, 7 (2): 145-150.
- [19] Wiesner J, Hintz M, Altincicek B, Sanderbrand S, Weidemeyer C, Beck E, Jomaa H. Plasmodium falciparum: Detection of the deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase activity. *Experimental Parasitology*, 2000, 96 (3): 182-186.
- [20] 汤锋, 周嫻, 杨建明, 许激扬, 李润乐. 麦角固醇合成抑制剂对促进红酵母累积番茄红素的研究. 药物生物技术(*Pharmaceutical Biotechnology*), 2009, 16 (1): 64-67.
- [21] Matthias S, Alan T, Mohamed AM. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20 (2): 234-240.
- [22] Isaka M, Palasarn S, Supothina S, Komwiji S, Luangsa-Ard JJ. Bioactive Compounds from the Scale Insect Pathogenic Fungus *Conoideocrella tenuis* BCC 18627. *Journal of Natural Products*, 2011, 74 (4): 782.
- [23] 刘俊君, 王海云, 黄绍兴, 柳维波. 转基因烟草的甘露醇合成和耐盐性. 生物工程学报(*Chinese journal of Biotechnology*), 1996, 12 (2): 206-210.
- [24] Novotny MJ, Reizer J, Esch F, Saier JMH. Purification and properties of d-mannitol-1-phosphate dehydrogenase and d-glucitol-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1984, 159 (3): 986-990.
- [25] 徐伟松, 胡美英, 钟国华. 真菌杀虫毒素的研究. 云南农业大学学报(*Journal of Yunnan Agricultural University*), 2005, 20 (3): 339-342.
- [26] 张鹏, 杨培林, 戴美学. 微生物多不饱和脂肪酸的研究进展. 微生物学杂志(*Journal of Microbiology*), 2006, 26 (1): 101-105.
- [27] Kimura E. Metabolic engineering of glutamate production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2003, 79: 37-57.
- [28] Julianna K. Recent advances in GABA research. *Neurochemistry International*, 1999, 34 (5): 353-358.
- [29] Madduri K, Waldron C, Merlo DJ. Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (19): 5632-5638.
- [30] Waldron C, Matsushima P, Rostek PR Jr, Broughton MC, Turner J, Maddun K, Crawford KP, Merlo DJ, Baltz RH. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. *Chemistry & Biology*, 2001, 8 (5): 487-499.
- [31] Takagi Y, Sawada H. The metabolism of l-rhamnose in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*, 1964, 92 (1): 10-17.

- [32] 任媛媛, 刘景芳, 戴秀玉, 向华. 海藻糖代谢途径相关基因及生物工程. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43 (6): 821-825.
- [33] Green JL, Angell CA. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *The Journal of Physical Chemistry*, 1989, 93 (8): 2880-2882.
- [34] Diniz-Mendes L, Bernardes E, deAraujo PS, Panek AD, Paschoalin VMF. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 65 (5): 572-578.
- [35] 荣绍丰, 张海平, 杨静, 段作营, 毛忠贵. 海藻糖生产菌株筛选过程中产物鉴定的研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 41 (1): 104-110.
- [36] 张会图, 姚斌, 范云六. 核黄素基因工程研究进展. *中国生物工程杂志 (Journal of Chinese Biotechnology)*, 2004, 24 (12): 32-38.
- [37] 李晓静, 段云霞. 代谢工程在核黄素生产上的应用. *中国生物工程杂志 (Journal of Chinese Biotechnology)*, 2011, 32 (2): 130-138.
- [38] 陈名君, 黄勃, 李增智. 三种森林生态系统昆虫病原真菌优势种生态位比较. *应用生态学报 (Chinese Journal of Applied Ecology)*, 2011, 22 (5): 1275-1279.

Influence of incubation time on metabolites in mycelia of *Paecilomyces militaris*

Delong Zhang, Shulin Li, Ruili Lu, Kangle Li, Feifei Luo, Fan Peng, Fenglin Hu*

Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: [Objective] To determine the secondary metabolites production in mycelia of *Paecilomyces militaris*. [Methods] Mycelia were cultured in plates with sabouraud dextrose agar yeast medium at 25°C for 9 days. Sampling was done every day from the second to the ninth day. The secondary metabolites in the mycelia of *Paecilomyces militaris* were extracted with either methanol or ethyl acetate. The extracts were blended and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). LC-MS data were collected and analyzed by MetaboAnalyst software. [Result] Principal component analysis indicates different secondary metabolites accumulation with incubation times. Hierarchical clustering analysis shows that the metabolic process of cationic compounds such as alkaloids, peptides and nucleosides can be divided into three stages, and that the metabolic process of anionic compounds such as organic acids and saccharides can be divided into two stages. Metabolites difference and heat map analysis show that: (1) The number of metabolites with significant increased contents was raised significantly in mycelia of *Paecilomyces militaris* on the second and third incubation days. The main species with increased contents were esters and their hydrolyzed products, destruxin B, variotin and some unidentified nitrogen contained compounds. (2) The number of metabolites with significant raised contents was decreased significantly on the fourth and fifth incubation days. The main species with increased contents were ophiocordin and destruxin A. (3) Apart from peptide antibiotics such as several beauverolides, the content increased metabolites included also several organic acids, amino acids, rhamnose, trehalose, cerebroside and riboflavine during the sixth to ninth incubation days. [Conclusion] The secondary metabolites in mycelia of *Paecilomyces militaris* were related significantly to the incubation time.

Keywords: culture time, *Paecilomyces militaris*, mycelia, liquid chromatography-mass spectrometry, secondary metabolites

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871676) and by the National Natural Science Foundation of Anhui Province (11040606M69, KJ2012A107)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-551-5786887; E-mail: hufenglin@hotmail.com

Received: 23 April 2012/Revised: 25 May 2012