

真菌生物碱的研究*

I. 产生生物碱的真菌的筛选

李家藻 朱桂茹 黄国宝 杨涛 唐诗声

(青海生物研究所, 西宁)

用生物碱沉淀试剂预试、薄层层析确试的生物碱筛选方法,对青藏高原土壤中分离的 624 株低等真菌的发酵液和真菌组织提取物中存在的生物碱进行了筛选研究。所得结果表明:有 114 株或 18.3% 的真菌显生物碱阳性反应。40 株生物碱阳性反应较强的真菌包括有青霉、曲霉、镰刀菌、匍柄霉、腐质霉和毛霉属等。除圆弧青霉、顶青霉、淡紫青霉、焦曲霉、黑曲霉、黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉等已有报道外,点青霉、两形青霉、真青霉、荨麻青霉、黑青霉、燕麦镰刀菌、拟直孢镰刀菌、木贼镰刀菌、拟丝孢镰刀菌、弯角镰刀菌、匍柄霉及腐质霉等,均尚未见有报道。

生物碱是一种含氮有机化合物,大多具有明显的生理活性,在医药上用途很广。以往,人们大多从高等植物中寻求生物碱,而微生物一般不大为人们所注意,研究的人不多。六十年代以来,一些科学工作者从微生物中筛选生物碱,发现有些细菌、放线菌、真菌都有合成生物碱的能力^[1-11],并且发现,微生物生物碱大多是不同于已知植物生物碱的新生物碱^[12,13]。微生物作为新生物碱的潜在来源,引起一些科学工作者的重视^[1,10,11,14]。为了考查青藏高原地区低等真菌合成生物碱的能力,为开发利用本地区微生物资源提供科学依据,我们对当地分离的六百多株低等真菌进行了筛选。

材料和方法

(一) 供试菌株

系从青藏高原部分地区土壤中分离的低等真菌,共 624 株。

(二) 筛选用培养基和培养方法

筛选用培养基为 Ooyama 培养基^[15],其成分

为(克): 葡萄糖 100、NaNO₃ 1、尿素 7、KH₂PO₄ 5、MgSO₄·7H₂O 1、玉米浸出液(玉米粉 5、加蒸馏水 100 毫升,60℃ 浸泡 1 小时,过滤即得) 3 毫升,加蒸馏水到 1000 毫升。培养基用 500 毫升三角瓶分装,每瓶 60 毫升,在 10 磅/平方英寸压力下湿热灭菌 20 分钟。用在查氏斜面上 28℃ 培养 7 天的真菌接种后,置于 200 转/分摇床上振荡培养 20 天。

(三) 生物碱筛选方法

1. 生物碱预试: 将真菌发酵液过滤,再将菌体和发酵滤液分开,分别进行试验,取部分发酵滤液分装于 4 只小试管中,每管 1 毫升。用 pH 试纸检查,如发酵滤液呈中性或碱性,加 2% 盐酸数滴使成酸性。多余的发酵滤液留供确试之用。菌体在 55—60℃ 烘箱中烘干后研碎,加酸性乙醇(含盐酸 0.1% 的 95% 乙醇)约 10 毫升浸泡过夜。过滤后,将滤液置 100 毫升瓷蒸发皿中,在 55—60℃ 烘箱中烘干。加 10 毫升 2% 盐酸溶解,过滤,取 4 毫升酸水分装于 4 只小试管中。多余的酸水留供确试之用。在上述盛发酵滤液和菌体

本文于 1978 年 5 月 20 日收到。

* 中国科学院微生物所齐祖调、陈庆涛等同志协助进行菌种鉴定。

赵利华、曾友特、吴翠珍同志参加了部分工作。

提取液的试管中分别滴加德雷根道尔夫试剂 (Dragendorff's reagent), 迈耶试剂 (Mayer's reagent), 瓦格纳试剂 (Wagner's reagent), 和桑能舒因试剂 (Sonnenschein's reagent) 各 2—3 滴, 出现混浊到絮状沉淀为生物碱性反应。

(1) 德雷根道尔夫试剂: 0.85 克次硝酸铋溶于 10 毫升冰醋酸及 40 毫升蒸馏水中, 为溶液甲。8 克碘化钾溶于 20 毫升蒸馏水中, 为溶液乙。甲、乙两液等体积混合。遇生物碱产生浅黄色、桔红色沉淀。

(2) 迈耶试剂: 13.55 克氯化汞及 49.8 克碘化钾各溶于 20 毫升蒸馏水中, 等体积混合并加蒸馏水到 1000 毫升。在酸性溶液中遇生物碱产生白色沉淀。

(3) 瓦格纳试剂: 碘 0.5 克和碘化钾 1.5 克, 共溶于 25 毫升蒸馏水中。在酸性溶液中遇生物碱产生棕色沉淀。

(4) 桑能舒因试剂: 磷钼酸溶于 10 倍重量的硝酸 (浓硝酸: 蒸馏水 = 1:9) 中。遇生物碱产生黄绿色沉淀。

2. 生物碱确试: 将经预试显生物碱性反应的发酵滤液在 55—60°C 烘箱中浓缩到约 10 毫升, 加氨水将 pH 调节到 9—10。显阳性反应的菌体酸性提取液也用氨水调节 pH 到 9—10。将已碱化的发酵滤液和菌体提取液分别移入 50 毫升分液漏斗中, 加等体积氯仿提取, 使生物碱转入氯仿。将氯仿提取液移入刻度小试管, 在 55—60°C 真空干燥器中浓缩到 0.1 毫升, 用毛细管吸取, 进行薄层层析。层析用吸附剂为 80—120 目中性氧化铝; 推进剂为氯仿: 甲醇 = 95:5 (V/V) 的混合溶剂; 显色剂为德雷根道尔夫试剂: 瓦格纳试剂 = 1:1 的混合试剂。层析用玻板的大小为 5×22 厘米。色点的强度用 ± (微弱)、+ (弱)、++ (较强)、+++ (强)、++++ (很强) 表示。

结 果

薄层层析确试的结果表明: 在供试的 624 株真菌中, 显生物碱性反应的共 114 株, 占真菌总数的 18.3%。其中, 仅发酵液显生物碱性反应的共 25 株, 仅菌体显生

物碱性反应的共 51 株, 发酵液和菌体显生物碱性反应的共 38 株, 分别占显生物碱性反应的 114 株的 21.9%、44.7% 和 33.3%。现将生物碱性反应强和较强的 40 株真菌的薄层层析结果列入表 1。

讨 论

由表 1 看出, 经薄层层析筛选得到的生物碱性反应强和较强的 40 株真菌中, 属于曲霉属有烟曲霉、构巢曲霉、焦曲霉、黄曲霉和黑曲霉等 5 个种; 属于青霉属的有两形青霉、真青霉、黑青霉、圆弧青霉、荨麻青霉、顶青霉、淡紫青霉和点青霉等 8 个种; 属于镰刀菌属的有燕麦镰刀菌、拟直孢镰刀菌、木贼镰刀菌、拟丝孢镰刀菌和弯角镰刀菌等 5 个种和燕麦镰刀菌 1 个变种。此外, 还有毛霉属两个种和匍柄霉属和腐质霉属各 1 个种。其中, 除圆弧青霉^[6,8,17-19]、顶青霉^[19]、淡紫青霉^[20]、焦曲霉^[20]、黑曲霉^[6,19,20]、黄曲霉^[9,19,20]、烟曲霉^[4,20]、构巢曲霉^[4]已有报道外, 点青霉、两形青霉、真青霉、荨麻青霉、黑青霉、燕麦镰刀菌、拟直孢镰刀菌、木贼镰刀菌、拟丝孢镰刀菌、弯角镰刀菌、燕麦镰刀菌变种、匍柄霉和腐质霉等, 均尚未见有报道。

关于显生物碱性反应的真菌的比率, 国外一些科学工作者有不同的报道。阿部又三等^[4]用对-二甲基氨基苯甲醛 (DMAD) 试剂检查了 1000 株低等真菌, 发现有吡啶生物碱性反应的菌株占 1.9%; 但 El-Rafai 等^[5]用同样试剂检查了 30 株低等真菌, 有吡啶生物碱性反应的却占 13%。Rosenberg 等^[9]检查了 30 株不同种的真菌的菌体和发酵液, 发现 40% 有生物碱性反应。Бекмахонова 等^[8]检查了 20 株不同种的青霉菌株, 发现有生物碱性反应的为 25%。比率相差悬殊与许多因素有关, 供试菌株、培养方法、用以进行测试的

表 1 真菌生物碱筛选结果

| 真 菌 名 称 | 发 酵 液 | | | 菌 体 | | |
|---|-------|----|------|------|----|------|
| | 色点强度 | 颜色 | Rf 值 | 色点强度 | 颜色 | Rf 值 |
| 烟曲霉 (<i>Aspergillus fumigatus</i>) F.6 | | | | ++ | 棕 | 0.55 |
| 烟曲霉 (") F.8 | ++ | 棕 | 0.51 | | | |
| 烟曲霉 (") F.182 | ++ | 棕 | 0.56 | | | |
| 构巢曲霉 (<i>Aspergillus nidulans</i>) F.68 | | | | +++ | 褐 | 0.49 |
| 焦曲霉 (<i>Aspergillus ustus</i>) F.7 | | | | ++ | 棕 | 0.48 |
| 焦曲霉 (") F.110 | | | | ++ | 棕 | 0.53 |
| 黄曲霉 (<i>Aspergillus flavus</i>) F.242 | ++ | 棕 | 0.31 | | | |
| | +++ | 棕 | 0.59 | | | |
| | +++ | 棕 | 0.77 | | | |
| 黄曲霉 (") F.393 | | | | ++ | 棕 | 0.39 |
| 黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>) F.421 | ++ | 棕 | 0.49 | | | |
| 黑曲霉 (") F.422 | ++ | 棕 | 0.60 | | | |
| | +++ | 棕 | 0.81 | | | |
| 两形青霉 (<i>Penicillium bifforme</i>) F.85 | ++ | 棕 | 0.56 | +++ | 棕 | 0.58 |
| 真青霉 (<i>Eupenicillium</i>) F.86 | ++ | 棕 | 0.58 | | | |
| 黑青霉 (<i>Penicillium nigricans</i>) F.170-1 | | | | ++ | 棕 | 0.18 |
| | | | | ++ | 棕 | 0.67 |
| 圆弧形霉 (<i>Penicillium cyclopium</i>) F.148 | + | 棕 | 0.65 | ++ | 棕 | 0.48 |
| 荨麻青霉 (<i>Penicillium urticae</i>) F.200-1 | ++ | 棕 | 0.52 | +++ | 棕 | 0.47 |
| 荨麻青霉 (") F.564 | | | | ++ | 棕 | 0.41 |
| 顶青霉 (<i>Penicillium corylophilum</i>) F.272 | + | 棕 | 0.53 | + | 棕 | 0.40 |
| | | | | + | 棕 | 0.60 |
| 淡紫青霉 (<i>Penicillium lilacinum</i>) F.363 | ++ | 棕 | 0.52 | ++ | 棕 | 0.63 |
| 点青霉 (<i>Penicillium notatum</i>) F.388 | + | 棕 | 0.51 | + | 棕 | 0.41 |
| | | | | ++ | 粉红 | 0.92 |
| 燕麦镰刀菌 (<i>Fusarium avenaceum</i>) F.19 | ++ | 棕 | 0.46 | | | |
| 燕麦镰刀菌 (") F.39 | | | | +++ | 棕 | 0.50 |
| 燕麦镰刀菌 (") F.347 | ++ | 棕 | 0.42 | | | |
| | +++ | 棕 | 0.54 | | | |
| 燕麦镰刀菌 (") F.411 | | | | +++ | 棕 | 0.20 |
| | | | | +++ | 棕 | 0.29 |
| | | | | +++ | 棕 | 0.50 |
| 燕麦镰刀菌 (") F.452 | ++ | 棕 | 0.42 | +++ | 棕 | 0.34 |
| | | | | +++ | 棕 | 0.35 |
| 燕麦镰刀菌 (") F.562 | | | | +++ | 棕 | 0.49 |

续 表 1

| 真 菌 名 称 | 发 酵 液 | | | 菌 体 | | |
|---|-------|----|------|------------|---------|--------------|
| | 色点强度 | 颜色 | Rf 值 | 色点强度 | 颜色 | Rf 值 |
| 拟直孢镰刀菌 (<i>Fusarium arthrosporioides</i>) F.156 | ++ | 棕 | 0.54 | | | |
| 拟直孢镰刀菌 (") F.158 | | | | +++ +++ | 深蓝 棕 | 0.39 0.46 |
| 拟直孢镰刀菌 (") F.198 | | | | ++++ | 棕 | 0.50 |
| 拟直孢镰刀菌 (") F.548 | | | | +++ | 棕 | 0.55 |
| 燕麦镰刀菌变种 (<i>Fusarium avenaceum</i> var.) F.500 | | | | +++ | 棕 | 0.56 |
| 燕麦镰刀菌变种 (") F.503 | | | | +++ | 棕 | 0.58 |
| 燕麦镰刀菌变种 (") F.529 | | | | +++ | 棕 | 0.47 |
| 木贼镰刀菌 (<i>Fusarium equiseti</i>) F.159 | + | 棕 | 0.06 | | | |
| | + | 棕 | 0.48 | | | |
| | +++ | 棕 | 0.61 | | | |
| 拟丝孢镰刀菌 (<i>Fusarium trichothecioides</i>) F.474 | ++ | 棕 | 0.57 | | | |
| | ++ | 棕 | 0.69 | | | |
| 拟丝孢镰刀菌 (") F.522 | | | | +++ | 棕 | 0.54 |
| 弯角镰刀菌 (<i>Fusarium camptoceras</i>) F.525 | | | | +++ | 棕 | 0.53 |
| 匍柄霉 (<i>Stemphylium botryosum</i>) F.61 | | | | ++ | 棕 | 0.55 |
| 腐质霉种 (<i>Hemicola</i> sp.) F.98 | ++ | 棕 | 0.43 | | | |
| 毛霉种 (<i>Mucor</i> sp.) F.113 | ++ | 棕 | 0.53 | | | |
| 毛霉种 (") F.242-1 | ++ | 棕 | 0.56 | | | |

菌体和培养基的数量以及筛选所用的方法不同,都可能导致得到不同的结果。我们用生物碱沉淀试剂预试,用较为灵敏的薄层层析法确试的筛选方法,在 624 株当地分离的低等真菌中,发现 18.3% 的菌株有生物碱阳性反应,与 Бекмаханова 等的结果较为接近。

真菌生物碱的筛选,国外一般采用植物生物碱筛选常用的方法,预试和确试都用生物碱沉淀试剂鉴别。我们在工作中发现,使用沉淀试剂确试,阳性率较低,漏筛的可能性较大。如用沉淀试剂法确试中漏筛的已知产生物碱的烟曲霉、构巢曲霉等,用薄层层析法检查均显示明显的生物碱阳性反应。在我们预试选用的 4 种沉淀试剂

中,德雷根道尔夫试剂较好,虽有少数假阳性反应,但与薄层层析检查的结果相比较,基本上没有漏筛的。桑能舒因试剂,在发酵液预试中阳性率高达 90% 以上,假阳性率太高,不适于用作预试试剂。

我们的筛选结果表明:不少低等真菌都可能具有合成生物碱物质的能力,它们作为探索新生物碱的来源,是颇有潜力的,是值得深入进行研究的。

参 考 文 献

- [1] Resplandy, R. & A. Resplandy: *Compt. rend.*, 248: 1400—1402, 1959.
- [2] Tyler, V. E. Jr. & D. E. Stuntz: *Lloydia*, 25(4): 225—230, 1962.
- [3] Tyler, V. E. Jr. & D. E. Stuntz: *Lloydia*, 26(3): 158—160, 1963.

- [4] 阿部又三ウ: 日本农芸化学会志, 41(2): 68—71, 1967.
- [5] El-Refai, Abdel-Monam H. et al.: *Japan J. Microbiol.*, 14(2): 91—97, 1970.
- [6] Безородов, А. М. и др.: *Прикладная Биохимия и Микробиология*, 8(6): 918—921, 1972.
- [7] Ефименко, О. М.: *Микология и Фитопатология*, 7(3): 200—202, 1973.
- [8] Бекмаханова, Н. Е. и др.: *Прикладная Биохимия и Микробиология*, 11(1): 131—135, 1975.
- [9] Rosenberg, H., V. Maheshwari & S. J. Stones: *Planta Medica*, 30(2): 146—150, 1976.
- [10] Massingill, John L. Jr. & Joe E. Hodgkins: *Phytochemistry*, 6(7): 977—982, 1967.
- [11] Terashima, T. et al.: *Agr Biol. Chem.*, 34(5): 747—752, 1970.
- [12] Boit, Hans, G.: *Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960*, Akademie Verlag, Berlin, 1961.
- [13] Raffauf, Robert F.: *A Handbook of Alkaloids and Alkaloid-Containing Plants*. Wiley-Interscience, A division of John Wiley & Sons, New York. London. Sydney. Toronto, 1970.
- [14] Li Hui-lin & J. J. Willaman: *Economic Botany*, 26(1): 61—67, 1972.
- [15] Ooyama, J., N. Nakamura & O. Tanabe: *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 24: 7, 1960.
- [16] Euler, K. L. & N. R. Farnsworth: *Lloydia*, 25(4): 296—311, 1962.
- [17] Cunningham, K. G. & G. G. Freeman: *Biochem. J.*, 53: 328, 1953.
- [18] Luckner, M. & K. Mothes: *Arch. Pharm.*, 296(1): 18—33, 1963.
- [19] Бекмаханова, Н. Е.: *Микология и Фитопатология*, 8(2): 152, 1974.
- [20] Spilsburg, J. F. et al.: *J. Chem. Soc.*, 2085, 1961.

STUDIES ON ALKALOIDS OF FUNGI

I. SCREENING OF ALKALOID-PRODUCING FUNGI

Li Jia-zao Zhu Gui-ru Huang Guo-bao Yang Tao Tang Shi-sheng

(Qinghai Institute of Biology, Xining)

Using the preliminary alkaloid precipitating method and confirmatory test with thin layer chromatography, the presence of alkaloids in fungal tissue extracts and in those obtained from the growth medium of 624 strains of lower fungi isolated from the soil of Qinghai-Xizang plateau was investigated. The results obtained showed that the number of fungal strains giving positive confirmatory alkaloid test was 114 or 18.2 percent.

Forty strains of fungi demonstrated comparatively strong positive confirmatory alkaloid test. These included the

genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stemphylium*, *Humicola* and *Mucor*. Besides *Penicillium cyclopium*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium lilacinum*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans* had already been reported, but *Penicillium notatum*, *Penicillium biforme*, *Eupenicillium*, *Penicillium urticae*, *Penicillium nigricans*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium trichothecoides*, *Fusarium camptoceras*, *Stemphylium botryosum* and *Humicola* sp. all have not been previously reported.