



真菌生物碱筛选方法的研究*

李家藻 朱桂如

(青海生物研究所, 西宁)

以往使用的真菌生物碱筛选方法, 灵敏度较低, 为了提高其灵敏度, 我们进行了如下工作。

材料和方法

一、供试菌株

由本地区分离得到的 20 株真菌, 它们分别属于一些不同种属, 并已知均有生物碱阳性反应。

二、培养基

1. 选用了大山培养基^[1]: 但将其成分中的葡萄糖量减半, 其他成分的量同原大山培养基。

2. 阿部培养基^[2]; 查比克 (Czapek) 培养基; 马铃薯葡萄糖培养基; 大山培养基。

3. 麸皮汁培养基: 麸皮 100 克, 加水煮沸 20 分钟, 过滤, 加葡萄糖 20 克, 加水至 1000 毫升。

4. 玉米汁培养基: 玉米粉 100 克, 加水煮沸 20 分钟, 过滤加葡萄糖 20 克, 加水至 1000 毫升。

上述培养基经检查均不含生物碱阳性反应物质。

三、培养方法和时间

1. 静置培养和振荡培养: 500 毫升三角瓶, 盛大山培养基 100 毫升, 灭菌后用在查氏培养基斜面上生长 10 天的真菌接入 4 只三角瓶中, 二瓶于 26℃ 静置培养 40 天, 二瓶在 26℃ 于 200 转/分摇床上振荡培养 20 天。

2. 斜面培养: 大山琼脂培养基灭菌后, 作成斜面, 每株真菌接种二管, 于 26℃ 培养 20 天。

四、真菌生物碱检查方法

1. 制备培养滤液: 将真菌培养液过滤, 使培养滤液和菌体分开。此液称为培养滤液。

2. 制备待测样品: 培养滤液在 55—60℃ 烘箱中烘干, 加 10% 氨水约 10 毫升将固形物溶解, 然后转入 50 毫升分液漏斗中, 并加入等体积氯仿, 摇动一分钟, 静置分层后, 放出氯仿提取液, 并将其分为三等份, 分别按下述方法检查生物碱。

3. 沉淀反应: 将氯仿提取液转入分液漏斗中, 加等体积 2% 盐酸, 摇动 1 分钟, 使生物碱转入酸化水中, 将酸化水分成 5 份, 置 5 只小试管中, 分别滴加碘化铋钾试剂、碘化汞钾试剂、碘-碘化钾试剂、磷钼酸试剂和硅钨酸试剂各二、三滴, 对其中任何两种试剂加入后产生混浊到絮状沉淀者为生物碱阳性反应。其反应的强弱以 ±(微弱)、+(弱)、++(较强)、+++ (强)、++++(很强) 表示。

4. 薄层层析: ①方法 A—将上述上层酸化水中生物碱碱化后转入氯仿中, 然后将氯仿浓缩到 0.1 毫升, 用毛细管吸取 30 微升, 在氧化铝软板上点样后进行薄层层析。②方法 B—将培养滤液的氯仿提取液浓缩后, 直接用氧化铝软板来进行薄层层析。

层析用的支持物为中性氧化铝, 推进剂为氯仿-甲醇混合液 (体积: 体积 = 95:5), 显色剂为碘化铋钾与碘-碘化钾 (体积: 体积 = 1:1) 的混合试剂, 显色后出现桔黄—棕—褐色色点为生物碱阳性反应。反应强弱按色点大小和颜色

* 杨涛同志参加了部分工作。

深浅分别用±(微弱); +(弱); ++(较强); +++(强); ++++(很强)表示。③菌体用蒸馏水洗涤后,在55—60℃烘干、研碎,然后分为三等分,分别按下述三种方法制备待测样品。④酸化水提取一菌体加2%盐酸约10毫升,浸泡过夜然后过滤。滤液置入分液漏斗中,碱化后用氯仿提取,放出氯仿,分为三等分,用与检查培养液同样的各种方法分别检查生物碱。⑤氯仿提取一菌体加氨水碱化,再加氯仿约10毫升浸泡过夜并不时摇动,然后过滤将氯仿提取液分为

三等分。用同上方法检查生物碱。⑥酸性乙醇提取一菌体加酸性乙醇(95%乙醇加浓盐酸0.1%)约10毫升浸泡过夜,然后过滤。滤液在55—60℃烘干,加氨水将残留物溶解,并使pH为9—10,加等体积氯仿提取。放出氯仿提取液,分为三等分,按同上方法检查生物碱。

5. 斜面培养真菌的生物碱检查方法:在培养真菌的斜面试管中,注入酸性乙醇并倾入蒸发皿中,在55—60℃烘干,加10%氨水约2毫升,搅拌使残留物溶解。再加入等体积氯仿搅

表1 真菌菌体生物

真 菌 名 称	100 毫 升 培 养 液 中 菌 体 干 重 (克)	分 别 用 于 酸 水 氯 仿 酸 性 乙 醇 提 取 的 菌 体 干 重 (克)	酸 水 提 取					薄 层 层 析 法**	
			沉 淀 试 剂 法*					方 法 A	方 法 B
			D	M	W	S	B		
烟曲霉 (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	2.24	0.75	—	—	—	—	—	—	±, +
焦曲霉 (<i>Aspergillus ustus</i>)	1.25	0.42	—	—	+	—	—	—	+
构巢曲霉 (<i>Aspergillus nidulans</i>)	2.20	0.73	—	—	—	—	—	—	—
黄曲霉 (<i>Aspergillus flavus</i>)	1.60	0.53	—	—	—	—	—	—	—
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	1.80	0.60	—	—	++	—	—	++	++
曲霉种 (<i>Aspergillus sp.</i>)	2.62	0.87	—	—	—	—	—	—	—
两形青霉 (<i>Penicillium bifforme</i>)	1.83	0.61	—	—	—	—	—	—	+
圆弧青霉 (<i>Penicillium cyclopium</i>)	1.40	0.46	—	—	++	+	+	+	+
黑青霉 (<i>Penicillium nigricans</i>)	1.20	0.40	—	—	—	—	—	—	±
荨麻青霉 (<i>Penicillium urticae</i>)	0.80	0.27	—	—	—	—	—	—	±
顶青霉 (<i>Penicillium corylophilum</i>)	1.15	0.38	—	—	—	—	—	—	±
薄青霉 (<i>Penicillium lilacinum</i>)	1.70	0.57	—	—	—	—	—	—	—
点青霉 (<i>Penicillium nosatum</i>)	0.55	0.18	—	—	—	—	—	—	—
燕麦镰孢菌 (<i>Fusarium avenaceum</i>)	0.65	0.22	—	—	—	—	—	—	—
木贼镰孢菌 (<i>Fusarium equiseti</i>)	0.52	0.17	—	—	—	—	—	—	±
节孢状镰孢菌 (<i>Fusarium arthrosporioides</i>)	1.17	0.39	—	—	—	—	—	—	+
绿色木霉 (<i>Trichoderma viride</i>)	1.45	0.48	—	—	—	—	—	—	—
匍柄霉 (<i>Stemphylium botryosum</i>)	1.90	0.63	—	—	—	—	—	—	—
腐质霉 (<i>Humicola sp.</i>)	0.30	0.10	—	—	—	—	—	—	—
毛霉种 (<i>Mucor sp.</i>)	0.21	0.07	—	—	—	—	—	—	—

* D: 碘化铋钾试剂 M: 碘化汞钾试剂 W: 碘-碘化钾试剂 S: 磷钼酸试剂 B: 硅钨酸试剂

** 方法 A: 氯仿提取液→酸水→氯仿→浓缩→氧化铝板层析 方法 B: 氯仿提取液→浓缩→氧化铝板层析

拌,使生物碱溶于氯仿。静置片刻,用吸管吸出氯仿,置于试管中,待浓缩到 0.1 毫升后,分别在氧化铝软板(5×125 厘米)、氧化铝 G 硬板和硅胶 G 硬板(大小均为 26×76 毫米)上进行层析。层析用的推进剂,显色剂同前。

6. 不同培养基比较试验: 选用了大山、修改大山、阿部、查比克、马铃薯葡萄糖、麸皮汁、玉米汁等 7 种琼脂培养基,制成斜面并接种后,置 26℃ 恒温箱中培养 20 天。按斜面培养真菌的生物碱检查方法用硅胶 G 硬板检查生物碱。

结果和讨论

一、真菌生物碱的检查方法的比较

结果见表 1 和表 2。

从表 1, 2 结果可以看出,不管是真菌的培养滤液或是菌体,用沉淀反应检查得到的生物碱阳性反应率都远远比薄层层析法为低。结果说明: 我们所用的方法 B 较国外一般常用的方法 A, 具有简便、生物碱阳性反应率较高、反应

碱检查方法的比较

氯 仿 提 取						酸 性 乙 醇 提 取							
沉 淀 试 剂 法					薄 层 层 析 法		沉 淀 试 剂 法					薄 层 层 析 法	
D	M	W	S	B	方法 A	方法 B	D	M	W	S	B	方法 A	方法 B
-	-	-	-	-	±	±, +	-	-	-	-	-	±	±
-	-	++	-	-	+	+	-	-	+	-	-	±	±, ±
-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	++	+++
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	++	+	-	+++	+, +, ±, +++	+	-	++	+	+	+++	+, +++
-	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-	-	++	++, ±
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	±, ±, +	+
+	-	++	++	+	+	+	++	-	+++	++	+	+, ++	+, ++, +
-	-	+	-	-	+	+	+	+	++	±	±	-	+
-	-	-	+	-	+, ±	+	±	±	+	-	±	-	++, ++
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	±	-	-	+	-	-	-	±
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
-	-	-	+	+	++	+++	-	-	-	-	-	+	+++
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±
-	-	-	-	-	-	±, ±	-	-	-	-	-	-	±
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±

表 2 真菌培养液生物碱检查方法的比较

真菌名称	沉淀试剂法*					薄层层析法*	
	D	M	W	S	B	方法A	方法B
烟曲霉	-	-	-	-	-	+	+
焦曲霉	+	±	++	+	+	+	+
构巢曲霉	-	-	-	-	-	-	-
黄曲霉	-	-	-	-	-	-	-
黑曲霉	++	-	++	+	+	+++	+,+,+++
曲霉种	-	-	-	-	-	-	+
两形青霉	-	-	-	-	-	-	+
圆弧青霉	++	+	+++	+++	++	+,++	++,+ ++,±
黑青霉	-	-	+	±	±	±	±
荨麻青霉	-	-	-	-	-	-	++
顶青霉	-	-	±	-	±	±	±
薄青霉	-	-	-	±	-	-	±
点青霉	-	-	-	-	-	-	-
燕麦镰孢菌	-	-	-	-	-	-	-
木贼镰孢菌	-	-	-	-	-	+	+
节孢状镰孢菌	-	-	-	-	-	+	++
绿色木霉	-	-	+	-	-	-	-
匍柄霉	-	-	-	-	-	-	-
腐质霉种	-	-	-	-	-	-	-
毛霉种	-	-	-	-	-	±,±,± +	+,+,++

* 试验方法、试剂同前。结果表示方法见正文。

一般也较强的优点。

二、真菌的培养方法及其生物碱的测定

为了寻找一种更加简便的培养方法，采用斜面培养法和国外常用的振荡和静置培养法比较。培养滤液采用在氧化铝软板上进行薄层层析。菌体和斜面采用酸性乙醇提取、碱化、氯仿抽提、浓缩后，用同上的方法进行薄层层析。结

果见表 3。

表 3 真菌不同的培养方法对生物碱筛选的影响*

真菌名称	静置培养		振荡培养		斜面培养
	培养液	菌体	培养液	菌体	
烟曲霉	±	±	+,+,+	+	+
焦曲霉	+	±,±	-	-	±
构巢曲霉	-	-	±	++	+
黄曲霉	+,±	-	-	±	-
黑曲霉	+,+++	+,+++	+,++	+,++	+++
曲霉种	+	++,±	-	+	+
两形青霉	+	+	±	-	+
圆弧青霉	++,+,+,±	+,+,+	-	+	±,+
黑青霉	±,±	+	-	-	+,+
荨麻青霉	++	++,++	-	-	-
顶青霉	±	-	-	±	+
薄青霉	±	-	-	±	-
点青霉	-	-	-	±	-
燕麦镰孢菌	-	-	+	+	+++
木贼镰孢菌	+	-	+,+	±	±
节孢状镰孢菌	++	+++	±	+++	++++
绿色木霉	-	-	-	-	+
匍柄霉	-	±	-	±	±
腐质霉种	-	±	-	-	-
毛霉种	+,+,++	±	±,++	-	±

* 均系用氧化铝软板层析所得的结果，其表示方法见表 1。

三、不同支持物对真菌生物碱薄层层析的筛选的影响

结果见表 4。

从表 4 看出，测定效果最好的是硅胶 G 硬板，不仅生物碱阳性率高，而且分离效果也好。

表 4 不同支持物对真菌生物碱薄层析筛选的影响

真菌名称	色点的 R _f 值和强度			真菌名称	色点的 R _f 值和强度		
	氧化铝板层析	氧化铝-G板层析	硅胶-G板层析		氧化铝板层析	氧化铝-G板层析	硅胶-G板层析
烟曲霉	0.57(+)	0.17(++) 0.34(+) 0.88(+) 0.94(+)	0.17(±) 0.22(+) 0.25(+) 0.30(+) 0.33(+)	荨麻青霉	—	0.05(+) 0.14(+) 0.38(++) 0.74(±)	0.03(+) 0.12(++) 0.19(+) 0.28(+)
焦曲霉	0.56(±)	—	0.24(+) 0.30(+)	顶青霉	0.50(+)	0.10(+) 0.36(++)	0.07(+) 0.12(+) 0.27(±) 0.31(±)
构巢曲霉	0.53(+)	—	0.05(+) 0.33(+)	薄青霉	—	0.09(+)	0.34(+) 0.38(+)
黄曲霉	—	—	0.05(+) 0.33(+) 0.38(+)	点青霉	—	0.11(+) 0.25(±)	0.07(+) 0.13(+) 0.25(+)
黑曲霉	0.63(+++)	0.62(+++)	0.21(+++) 0.25(+)	燕麦镰孢菌	0.65(+++)	0.59(+++)	0.23(+++)
曲霉种	0.45(+) 0.53(++)	0.11(±) 0.38(++)	0.10(++)	木贼镰孢菌	0.55(±)	0.14(+)	0.28(+)
两形青霉	0.39(+)	0.03(++) 0.10(+) 0.15(+)	0.05(+) 0.16(+) 0.28(±) 0.34(+) 0.42(+) 0.65(+)	节孢状镰孢菌	0.29(++++)	0.50(++++)	0.05(+) 0.36(++++)
圆弧青霉	0.46(±) 0.52(+)	0.11(±) 0.20(+) 0.28(++)	0.24(++) 0.33(±)	绿色木霉	0.54(+)	0.11(++)	0.19(++) 0(++)
黑青霉	0.18(+) 0.54(+)	0.24(+++) 0.37(+)	0.35(++) 0.43(±)	匍柄霉	0.62(±)	—	0.35(+)
				腐质霉种	—	—	0.03(+) 0.33(+)
				毛霉种	0.52(±)	0.10(+)	0.22(+) 0.35(+)

表 5 不同培养基对真菌生物碱筛选的影响

真菌名称	大山培养基	修改的大山培养基	阿部培养基	查氏培养基	马铃薯葡萄糖培养基	麸皮汁培养基	玉米汁培养基
烟曲霉	±, +, +, +, +	±, +, +, +	+, +, +, ±	+, +, ±	+, +	±	—
焦曲霉	+, +	+, ±	+, +, +, ++	±	+, +	—	±
构巢曲霉	±, +	+, ±	—	±	—	—	+
黄曲霉	+, +, +	±, +	+, ±, ±	+, ±	—	—	—
黑曲霉	+++ , +	++	++, +	+++ , ±	±, ++	+++ , +++ , ±	++, ±
曲霉种	++	+++	++, ±	+	—	±	—
两形青霉	+, +, ±, +, +, +	+	+	+, ±	±	—	—
圆弧青霉	++, ±	+	+, ++	+, ±, ±	+, ±	±, ±	—
黑青霉	++, ±	+, ±	+, ±	—	—	±	—
荨麻青霉	+, ++, +, +	+, +, +	±, ±	±, +	+, +	+, ±	—
顶青霉	+, +, ±, ±	+, +, +, ±	+, +, +, ±	+	±	±, +	±
薄青霉	+, +	+, ±	+, ±	—	+	+	—
点青霉	+, +, +	—	—	±	—	—	—
燕麦镰孢菌	+++	+++	±, +++	+	—	—	—
木贼镰孢菌	+	+	—	—	—	++	—
节孢状镰孢菌	+, +++	+++	+++	+++	+	++	±
绿色木霉	++, +	+	+	—	—	—	—
匍柄霉	+, +	+	+	±	±	±	±
腐质霉种	+, +	+, +	±	±	—	—	—
毛霉种	+, +	+	+	—	+	—	—

四、不同培养基对真菌生物碱筛选的影响

培养基比较试验采用斜面培养法，用硅胶G硬板检查生物碱。结果见表5。

表5的结果表明，大山培养基和修改的大山培养基对真菌生物碱筛选是最好的培养基。

阿部培养基次之，玉米汁培养基效果最差。

参 考 文 献

- (1) Ooyama, J., et al.: *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, **24** (2):7, 1960.
- (2) Matazo, Abe., et al.: *Biol. Chem. Japan*, **41** (2): 68—71, 1967.