

DOI:10.11686/cyxb2024444

http://cyxb.magtech.com.cn

唐致云, 王文凯, 刘冠兰, 等. 新种苦豆子无毛壳菌 *Achaetomium sophora* HY17 产槐定碱发酵条件优化. 草业学报, 2025, 34(10): 151—163.
TANG Zhi-yun, WANG Wen-kai, LIU Guan-lan, et al. Optimization of culture conditions for the sophoridine-producing new fungal species *Achaetomium sophora* strain HY17 isolated from seeds of *Sophora alopecuroides*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(10): 151—163.

新种苦豆子无毛壳菌 *Achaetomium sophora* HY17 产槐定碱发酵条件优化

唐致云¹, 王文凯², 刘冠兰¹, 顾沛雯^{1*}

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 巴彦淖尔市水利科学研究所, 内蒙古 巴彦淖尔 015000)

摘要: 本研究旨在从苦豆子内生真菌中筛选获得高产槐定碱的菌株, 并对其进行分类鉴定和产碱发酵条件优化, 提高碱产率, 为发酵过程提供优良的菌种资源。以前期从苦豆子健康种子中分离的 50 株内生真菌为材料, 采用生物碱沉淀法和酸性染料比色法初筛, 利用高效液相色谱法复筛得到高产槐定碱菌株, 通过形态学和分子生物学确定其分类地位; 通过单因素试验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken design 试验考察培养基成分(培养基种类、碳源和氮源)、发酵条件(培养天数和 pH)、前体物质和诱导子对该菌株碱产率的影响, 确定最佳产碱培养基、发酵条件和前体物质。结果表明, 筛选获得一株高产槐定碱的菌株 HY17, 经鉴定为新种, 命名为苦豆子无毛壳菌。 *Achaetomium sophora* HY17 菌株产槐定碱的最佳发酵参数为: 在初始 pH=6, 碳源和氮源分别为玉米粉和干酪素的 SDY 液体培养基上培养 8 d, 添加 L-赖氨酸、L-缬氨酸和苯丙氨酸浓度分别为 $1.044 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.081 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.995 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 碱产率达到最大, 为 $1.369 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。与对照相比, 优化后碱产率提高了 61.95%。 *A. sophora* HY17 菌株能够稳定高产槐定碱, 这为通过微生物发酵生产槐定碱提供了一种新方法。

关键词: 苦豆子无毛壳菌 *Achaetomium sophora* HY17; 筛选鉴定; 槐定碱; 发酵条件优化; 响应面法分析

Optimization of culture conditions for the sophoridine-producing new fungal species *Achaetomium sophora* strain HY17 isolated from seeds of *Sophora alopecuroides*

TANG Zhi-yun¹, WANG Wen-kai², LIU Guan-lan¹, GU Pei-wen^{1*}

1. Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Water Conservancy Research Institute of Bayannur City, Bayannur 015000, China

Abstract: The aim of this study was to screen for endophytic fungal strains of *Achaetomium sophora* infecting *Sophora alopecuroides* that produce sophoridine alkaloid, classify and identify them, and then identify in-vitro culture conditions that optimize the alkaloid production of the endophyte fungus. The overall goal was to improve alkaloid yield and obtain excellent strains for culture. Fifty strains of *A. sophora* isolated from healthy *S. alopecuroides* seeds were screened using alkaloid precipitation, acid dye colorimetry, and high-performance liquid chromatography analyses. The strains were identified through morphological and molecular analyses. Subsequently, a series of methods including the single factor test, Plackett-Burman (PB) test, steepest climb test, and response surface test (Box-Behnken test) were used to investigate the effects of medium composition (medium type, carbon and nitrogen sources), culture conditions (incubation time and pH), and precursors and inducers on the alkali yield of selected

收稿日期: 2024-11-15; 改回日期: 2025-01-22

基金项目: 宁夏重点研发计划项目“贺兰山东麓酿酒葡萄根部病害生物防控专用菌剂的研制与应用”(2023BCF01026)资助。

作者简介: 唐致云(1998—), 男, 东乡族, 甘肃临夏人, 在读硕士。E-mail: tzy183522487@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: gupeiwen2019@nxu.edu.cn

fungal strains. From the results of these analyses, the optimal alkali-producing medium, culture conditions, and precursors for sophoridine alkaloid production were determined. The fungal strain HY17 producing sophoridine at high levels was identified as a new species, *Achaetomium sophora*. The optimal culture conditions for *A. sophora* HY17 were determined to be SDY liquid medium with an initial pH of 6 and a culture period of 8 days, with maize flour as the carbon source and casein as the nitrogen source. Tyrosine, L-lysine, L-piperidinic acid, and phenylalanine had significant effects on sophoridine production by strain HY17 during culture. The addition of L-lysine ($1.044 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), L-piperidinic acid ($0.081 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), and phenylalanine ($1.995 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) resulted in a maximum alkaloid yield of $1.369 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ mycelium under these optimized conditions, representing a remarkable increase of 61.95% compared with that obtained under the original culture conditions. *A. sophora* HY17 produced sophoridine at a high and stable rate. Optimization of the culture conditions resulted in a notable increase in alkaloid production. The results of this study offer a novel approach for sophoridine production through in-vitro culture of the fungal endophyte, *A. sophora* strain HY17 isolated from *S. alopecuroides*.

Key words: *Sophora alopecuroides* HY17; screening and identification; sophoridine; optimization of fermentation conditions; response surface methodology (RSM)

槐定碱(sophoridine)是一种重要的喹诺里西啶类生物碱(quinolizidine alkaloids),具有抗菌、杀虫、抗炎、抗肿瘤等多种生物学活性^[1],在植物病虫害生物防治、医药和畜牧业生产等方面应用广泛^[2]。现阶段,喹诺里西啶类生物碱的提取和利用通常依赖于野生苦豆子(*Sophora alopecuroides*)植株,然而,野生苦豆子资源十分有限,过度采收不仅会导致大量天然草场退化,还会严重破坏草地的生态平衡^[3]。而人工栽培苦豆子面临诸多问题,如发芽率低、生长缓慢、成本较高,且有效成分活性较低等,使得人工栽培难以满足农业与药用市场对苦豆子的巨大需求^[4]。研究发现,植物中普遍存在内生真菌,内生真菌能产生与宿主相同或相似的次生代谢产物,是潜在的活性成分提取原材料^[5-6]。Cao等^[7]发现从蛇足石杉(*Huperzia serrata*)中分离出治疗阿尔兹海默症的天然产物石杉碱甲,同样可从蛇足石杉分离的内生真菌中得到。Toghueo等^[8]从小叶榄仁(*Terminalia mantaly*)叶片中分离出的真菌 *Phomopsis* sp. N114,在筛选出的马铃薯葡萄糖肉汤培养基中添加有机激发剂1-丁醇培养时,其提取物抗疟疾活性放大了数倍。由此可见,通过挖掘筛选功能性内生真菌和优化发酵培养条件可源源不断地合成与药用植物相同的活性物质^[9],成为突破这一困境的重要手段。

苦豆子中蕴含着丰富的内生真菌,但目前对于苦豆子的研究多集中在植物生态学和药理上,而对于苦豆子可培养内生真菌菌种资源的挖掘和利用研究报道较少^[10]。Ju等^[11]通过高通量测序(high-throughput sequencing)和高效液相色谱分析(high-performance liquid chromatography, HPLC)发现苦豆子种子中部分内生真菌的种类、数量与宿主槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱等喹诺里西啶类碱的含量呈正相关,表明苦豆子种子中存在产生物碱的菌株,且具有合成积累与宿主相同活性成分的潜力。余永涛等^[12]利用酸性染料比色法(acid dye colorimetry)等从宁夏苦豆子健康种子中筛选出3株能够产生苦参碱的内生真菌菌株,均为 *Simplicillium* 属真菌,其菌丝中苦参碱的含量分别为 20.4、17.4 和 37.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。当前,人们已经确定苦豆子内生真菌与宿主植物生物碱的合成密切相关^[13-14],但筛选的功能菌株产生物碱含量较低,不能满足生产需求。

为了提高功能真菌次生代谢产品的生产能力,优化生产工艺、强化前体合成和使用外源性诱导子是提高次生代谢产物产量最直接的方法。Chen等^[15]从人参(*Panax ginseng*)中分离出可产总皂苷的变色栓菌(*Trametes versicolor*)NSJ105菌株,通过优化氮源、碳源、发酵液pH、发酵温度和发酵时间等发酵条件,使皂苷产量提高了2倍以上。杨国栋^[16]发现疯草(*Achnatherum inebrians*)*Undifilum*属内生真菌可合成苦马豆素,在疯草内生真菌培养基中添加苦马豆素合成前体物质L-组氨酸、脯氨酸、色氨酸、L-赖氨酸、哌可酸,可显著提高苦马豆素的产量。但关于使用优化生产工艺、添加前体物质、使用外源性诱导子等方法来提高苦豆子内生真菌次生代谢产物产量的研究鲜有报道。

本研究以前期从苦豆子健康种子中分离的50株内生真菌为材料,采用生物碱沉淀法和酸性染料比色法初筛,高效液相色谱法复筛得到一株高产槐定碱菌株,通过形态学和分子生物学确定其种的分类地位,采用高效液相色谱法明确其碱产率。通过单因素试验、Plackett-Burman(PB)试验、最陡爬坡试验、响应面试验(Box-Behnken试验)探究不同培养条件、添加不同前体物质、诱导子等因素对其碱产率的影响,筛选对其碱产率具有显著影响的因子。研究结果将为苦豆子内生真菌合成槐定碱的分子机制研究以及通过微生物发酵大规模生产槐定碱提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:2021年9月,在宁夏盐池县花马池镇天然草场(N 38°28′40″,E 106°38′11″,海拔1212.94 m)选择健康无病虫害的野生苦豆子群落。采样区按“Z”型方式设置采样点,每样点面积为25 m²,3个样点共60个豆荚,带回实验室进行脱粒和内生真菌分离纯化,共得到50株内生真菌并进行编号(HY1~HY50),上述菌株均由宁夏大学农学院植物病理实验室分离保存。

主要试剂:槐定碱(sophoridine, SIR)、氧化苦参碱(mxymatrine, OMA)、苦参碱(matrine, MA)、槐果碱(sophocarpine, SC)和氧化槐果碱(oxysophocarpine, OSC)标准品为色谱纯,甲醇、磷酸二氢钾、溴甲酚绿、二氯甲烷(天津市天力化学试剂有限公司)、引物和2×Taq PCR Master Mix(生工生物工程股份有限公司,上海),L-哌啶酸、L-赖氨酸、 α -酮戊二酸、苯丙氨酸、丙酮酸、水杨酸、茉莉酸甲酯(源叶生物科技有限公司,上海),以上试剂纯度规格均为分析纯。

供试培养基:马铃薯葡萄糖肉汤培养基(potato dextrose broth, PDB:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,蒸馏水1000 mL)、马铃薯蔗糖培养基(potato sucrose broth, PSB:马铃薯200 g,蔗糖20 g,蒸馏水1000 mL)、察氏培养基(Czapek-Dox medium, CDM:蔗糖30 g, KNO₃ 2 g, K₂HPO₃ 1 g, KCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄ 0.1 g, 蒸馏水1000 mL)参照庄敬华等^[17]的方法配制;燕麦片培养基(oatmeal agar, OMA:燕麦片30 g,蒸馏水1000 mL)、萨氏液体培养基(sabouraud dextrose medium with yeast extract, SDY:酵母浸出粉10 g,葡萄糖40 g,蛋白胨10 g, pH 5.9,蒸馏水1000 mL)参照李倩楠等^[18]的方法配制;苦豆子汁液培养基(*S. alopecuroides* broth, SAB)配制方法为苦豆子粉200 g,蒸馏水1000 mL,煮沸1 h过滤。上述培养基均在121 °C高温灭菌30 min后,备用。

1.2 产槐定碱菌株的筛选

参照金婧^[19]的生物碱提取方法并修改,提取菌株菌丝待测液,称取1 g菌丝体,置于50 mL离心管中,加入30 mL甲醇,混合均匀,45 °C下用CSF-1A型超声波发生器(超声波仪器厂,上海)超声处理60 min,9000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液,使用0.45 μ m 无菌滤膜过滤,于RE-52AA型旋转蒸发器(亚荣生化仪器厂,上海)上蒸发浓缩至2 mL,4 °C保存待检。

1)生物碱沉淀法和酸性染料比色法初筛:参照Henzelyová等^[20]的生物碱沉淀法,在样品中分别加入10 μ L生物碱测定试剂,静置5 min后,观察颜色变化,每个处理重复3次,若出现颜色反应或沉淀,则可初步判断其相应内生真菌待测液中含有喹诺里西啶类生物碱。

参照王文凯等^[21]的酸性染料比色法建立线性回归方程 $y=4.2761x-0.0146$ ($R^2=0.9990$),线性范围为0.0098~0.6250 mg·mL⁻¹。将菌株磷酸缓冲液样品与槐定碱标准品置于紫外可见分光光度计(L5S,仪电有限公司,上海)中,在波长300~800 nm范围内进行扫描。槐定碱标准品在615 nm处出现吸收峰。若内生真菌样品液在615 nm处也出现吸收峰,这表明样品溶液中含有槐定碱。

2)高效液相色谱分析复筛:精密吸取菌株菌丝待检液,用于高效液相色谱检测。参照Ju等^[22]的方法研究并修改,色谱条件:UltimateAQ-C18(4.6 μ m×250 mm×5 mm);流动相:磷酸缓冲液—甲醇(55:45);紫外检测波长:216 nm;柱温:30 °C;流速:1.0 mL·min⁻¹。将内生真菌待检样品与生物碱标准品高效液相色谱图进行比较,当样品出现与标准品色谱峰保留时间相同或相似的色谱峰时,即可确定待测样品中含有相应的生物碱。

将产碱菌株经过连续5次传代,每一代测定菌丝干重并计算碱产率。

$$\text{碱产率}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})=(\text{碱质量浓度}\times\text{体积})/\text{菌丝干重}$$

1.3 菌株HY17分类鉴定

形态学鉴定:将菌株置于PDA平板上培养5 d后,观察菌落和菌丝的形态学特征,包括菌落大小、颜色、边缘形态,挑取菌落边缘菌丝制片,观察菌丝体等结构特征。将菌株置于燕麦固体(OA)培养基上15 d后,观察子囊壳、子囊孢子等形态学特征,初步确定该菌株的分类地位。

分子生物学鉴定:用Biospin[®]真菌DNA提取试剂盒提取真菌DNA。分别选用ITS、LSU和TUB2基因片段进行PCR扩增,引物信息如表1所示^[23-25]。PCR反应体系:2×Eco Taq[®]PCR Super Mix 12.5 μL,正、反向引物(10 μmol·L⁻¹)各1 μL,DNA模板1 μL,ddH₂O补足至25 μL。PCR扩增程序:94℃预变性3 min;94℃变性1 min,退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min,4℃保存。最终的PCR扩增产物经1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测后,采用凝胶成像系统分析结果。所得PCR产物送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

表1 用于ITS、LSU和TUB2基因片段PCR扩增的引物信息

Table 1 Primers used for the amplification of ITS, LSU, and TUB2 genes

| 目标基因 Target gene | 引物名称 Primer | 引物序列 Primer sequences (5'-3') | 退火温度 Annealing temperature (°C) | 参考文献 Reference |
|------------------|-------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------|
| ITS | ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC | 55 | [23] |
| | ITS5 | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG | | |
| LSU | LSU1Fd | GRATCAGGTAGGRATACCCG | 55 | [24] |
| | LR5 | TCCTGAGGGAAACTTCG | | |
| TUB2 | Bt2a | GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC | 58 | [25] |
| | Bt2b | ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC | | |

将测序结果提交到NCBI采用BLAST进行同源性比较,下载同源性较高的菌株序列为代表菌株。按照ITS-LSU-TUB2的顺序进行基因序列的首尾相连,运用MEGA 7软件中的邻接法(neighbor joining)按1000次重复构建系统发育树。

1.4 菌株HY17产槐定碱发酵培养基及条件单因素优化

分别测定不同发酵液体培养基、碳源和氮源对菌株产槐定碱的影响。液体培养基设置为150 mL的CDM、PDB、SDY、PSB、SAB、OMA,共6个处理;培养碳源设置为玉米粉、葡萄糖、果糖、可溶性淀粉和麦芽糖共5个处理;培养氮源设置为干酪素、牛肉膏、蛋白胨、硝酸钠共4个处理。

测定培养条件天数和pH对菌株产槐定碱的影响。天数设置1、2、4、6、8、10、12和14 d共8个处理;pH值设置4、5、6、7、8、9、10和自然pH(6.6)共8个处理;所有处理3组重复,发酵培养后收集菌丝体,测定其菌丝干重(将发酵液用纱布过滤收集菌丝体,去离子水冲洗2~3次,去除菌丝体残留的培养基,60℃烘干至恒重,电子天平称重)及碱产率,碱产率测定同1.2。

1.5 菌株HY17产槐定碱发酵优化

1.5.1 PB试验 在1.4试验结果的基础上,通过Plackett-Burman设计,对可能影响菌株产碱的前体物质、诱导子进行筛选,从而选出影响菌株发酵产生槐定碱的主要因素,以最大限度地提高其槐定碱的产率。

表2 PB设计因素水平

Table 2 PB design factor levels

| 变量 Codes | 因素 Factors | 水平 Levels | |
|----------------|----------------------------|-----------|------|
| | | -1 | 1 |
| X ₁ | L-赖氨酸 L-lysine | 1.00 | 2.00 |
| X ₂ | L-哌啶酸 L-piperidinic acids | 0.08 | 0.16 |
| X ₃ | α-酮戊二酸 α-ketoglutaric acid | 0.01 | 0.02 |
| X ₄ | 苯丙氨酸 Phenylalanine | 2.00 | 5.00 |
| X ₅ | 丙酮酸 Pyruvate | 1.00 | 4.00 |
| X ₆ | 水杨酸 Salicylate | 1.00 | 2.00 |
| X ₇ | 茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate | 0.10 | 0.50 |
| X ₈ | 种子提取物 Seed extract | 2.00 | 5.00 |

共筛选8个因素,每个变量由高(+1)和低(-1)水平表示,每次试验进行3次重复,以平均槐定碱产率为主要响应值。其中各因素水平设计如表2所示。

1.5.2 最陡爬坡试验 最陡爬坡法根据PB试验值变化梯度的方向确定爬坡的方向,依据确定因素的效应值确定步长,快速且经济地逼近最佳值区域。将PB试验中筛选出的3个对菌株碱产率贡献最大的因素,分别以PB设计中的低水平为起始点,设计试验。

1.5.3 Box-Behnken 响应面分析 Box-Behnken 试验根据最陡爬坡试验的结果,设计三因素三水平的中心响应面试验,因子与水平见表3。

1.6 数据分析

采用Microsoft Excel 2019软件对数据进行整理,运用MEGA 7软件构建多基因序列系统发育树,应用SDT v. 1.2软件分析核酸的一致性。采用SPSS 21.0软件邓肯氏多重比较进行显著性分析,使用Design Expert 12.0软件进行响应面设计。

2 结果与分析

2.1 产槐定碱菌株的筛选

通过生物碱沉淀法和酸性染料比色法初筛发现,50株苦豆子内生真菌中仅有菌株HY17菌丝提取物出现了沉淀反应且与槐定碱标准品均在615 nm处出现了吸收峰,初步表明菌株HY17菌丝中含有槐定碱(图1A)。在

表3 Box-Behnken 因素及水平

Table 3 Box-Behnken factors and levels

| 项目 Item | 因子 Factors | 水平 Levels | | |
|----------------|---------------------------|-----------|------|------|
| | | -1 | 0 | 1 |
| X ₁ | L-赖氨酸 L-lysine | 0.50 | 1.00 | 1.50 |
| X ₂ | L-哌啶酸 L-piperidinic acids | 0.04 | 0.08 | 0.12 |
| X ₄ | 苯丙氨酸 Phenylalanine | 0.50 | 2.00 | 3.50 |

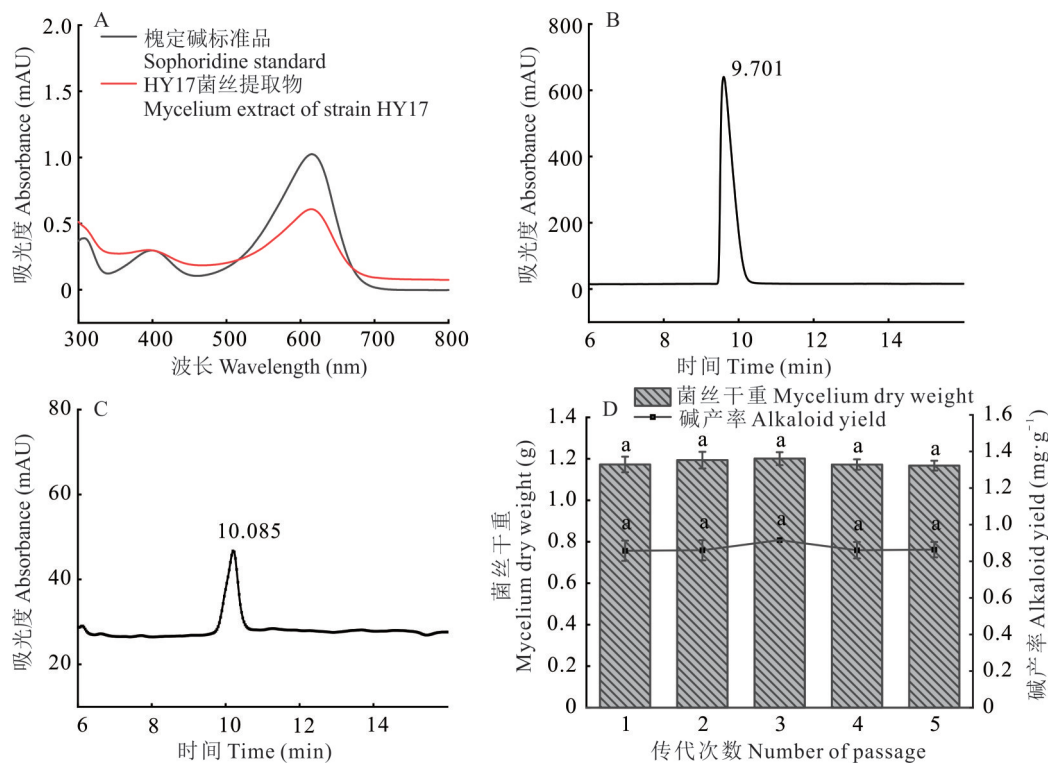


图1 苦豆子内生真菌产碱菌株的筛选

Fig. 1 Screening of alkali-producing strains of endophytic fungi from *S. alopecuroides*

A: 槐定碱标准品与菌株HY17菌丝提取物扫描光谱图;B:槐定碱标准样品的HPLC图;C:菌株HY17菌丝提取液HPLC图;D:菌株HY17传代5次菌丝干重及碱产率。不同小写字母表示 $P<0.05$ 水平差异显著,下同。A: Scanning spectra of sophoridine standard and mycelium extract of strain HY17; B: HPLC chromatogram of sophoridine standard sample; C: HPLC chromatogram of strain HY17 mycelium extract; D: Mycelium dry weight and alkaloid yield of strain HY17 in 5 passages. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

615 nm 波长处测量样品的吸光度值,代入线性回归方程,根据标准曲线方程得到菌株 HY17 菌丝中槐定碱的含量为 $0.431 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,碱产率为 $0.862 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

经过 HPLC 法分析,菌株 HY17 的菌丝提取物在 10.085 min 出现与槐定碱标准品色谱保留时间 9.701 min 相近的峰,且与周围其他杂质峰分离性良好(图 1B,C),但未出现与苦参碱、槐果碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱相匹配的色谱峰,因此确定菌株 HY17 菌丝中含有槐定碱。

将菌株 HY17 连续传代 5 次后,发现菌株 HY17 菌丝干重与碱产率无显著性变化(图 1D),进而确定菌株 HY17 为一株生长良好且碱产量稳定的菌株。

2.2 产槐定碱菌株 HY17 的分类鉴定

在 PDA 培养基上培养 5 d,菌株 HY17 正面菌落中心为粉红色绒毛,边缘白色、质地绒毡状,菌落形状为圆形,边缘整齐、形状扁平(图 2A),背面呈黄褐色,颜色中间深,边缘浅(图 2B)。在光学显微镜下观察,气生菌丝丰富、菌丝有隔膜(图 2C),生长后期还会产生无性型厚膜孢子(图 2E)。在 OA 培养基上子囊壳表生,呈球形,大小为 $(94 \sim 206) \mu\text{m} \times (114 \sim 210) \mu\text{m}$ (图 2D)。子囊孢子呈无色、柠檬形或椭圆形,大小为 $(1.2 \sim 3.8) \mu\text{m} \times (3.6 \sim 6.5) \mu\text{m}$ (图 2F)。根据形态学观察,初步鉴定该菌株为无毛毛壳菌(*Achaetomium* sp.)。

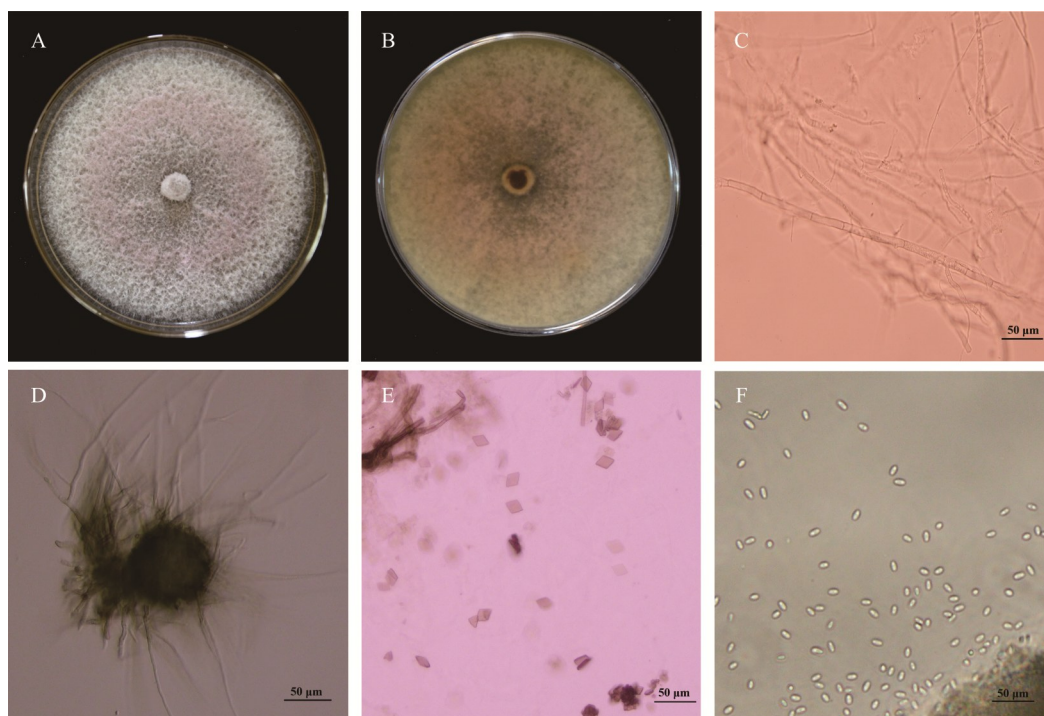


图 2 苦豆子内生真菌菌株 HY17 的形态学鉴定

Fig. 2 Morphological identification of the endophytic fungi strain HY17 from *S. alopecuroides*

A: 菌落形态正面 Colony morphology frontal; B: 菌落形态背面 Colony morphology dorsal; C: 菌丝形态 Mycelial morphology; D: 子囊壳形态 Mycelium morphology; E: 子囊孢子形态 Spore morphology; F: 厚膜孢子 Chlamydospore.

由图 3 可知,基于 *ITS-LSU-TUB2* 的 NJ 法构建多基因系统发育树,菌株 HY17 与无毛毛壳属(*Achaetomium* sp.)真菌聚在一起,并形成了一个独立的分支。与无毛毛壳属真菌相似性系数较高,与球毛毛壳属(*Chaetomium* sp.)真菌相似性较低,说明菌株 HY17 与无毛毛壳属亲缘关系最近。应用 SDT v. 1.2 软件分析了菌株 HY17 与参考菌株间的核酸序列一致性,菌株 HY17 与无毛毛壳属真菌的一致性为 85.4%~91.9%,与同属的其他种表现出一定的遗传距离,确定为新种。因菌株 HY17 首次分离于苦豆子健康种子内,将其命名为苦豆子无毛毛壳菌(*Achaetomium sophora*),菌株保藏号为 CGMCC No. 41060,菌种保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

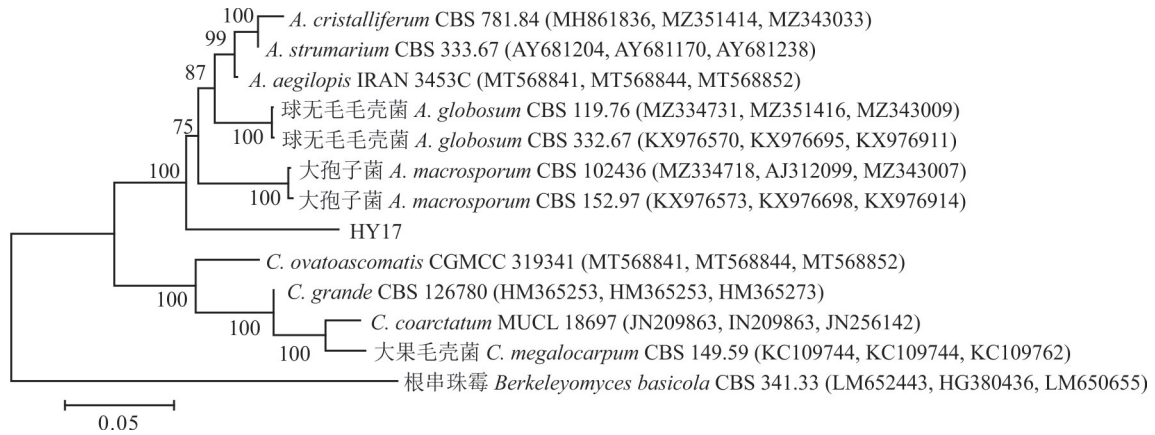


图 3 苦豆子内生真菌菌株 HY17 基于 ITS-LSU-TUB2 构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS-LSU-TUB2 gene of the endophytic fungi strain HY17 from *S. alopecuroides*

2.3 菌株 HY17 产槐定碱发酵培养基优化

菌株 HY17 分别在不同液体培养基培养 7 d 后, SDY 培养基中的菌丝生长速度最快, 菌丝产量最多, 菌丝呈团状红色菌丝, 平均干重为 0.970 g, SDY 与 SAB 中的菌丝碱产率较高, 分别为 0.948 与 0.932 mg·g⁻¹ (图 4A)。以 CDM 为基础培养基同时以干酪素作为氮源, 其平均菌丝干重达到最大, 为 0.435 g, 且与其他处理差异显著。蛋白胨作为氮源时的碱产率最高, 为 0.774 mg·g⁻¹, 干酪素次之, 为 0.672 mg·g⁻¹ (图 4B)。而将玉米粉作为碳源时, 其平均菌丝干重达到最大, 为 0.437 g, 果糖作为碳源时的碱产率最高, 为 0.879 mg·g⁻¹, 其次为玉米粉, 碱产率为 0.782 mg·g⁻¹ (图 4C)。

由图 4D 可知, 当培养基 pH=6 时, 菌丝干重较其他 pH 处理显著增加, 其他 pH 处理之间无显著差异。碱产率则在 pH=6 或 pH=7 时较大, 与自然 pH 下的碱产率无显著差异。在 pH=6 之后, 随着 pH 的增加, 其碱产率呈不断减少的趋势。由图 4E 可知, 2~8 d 是菌丝体迅速增加的时期, 8~12 d 菌丝体增加趋于平稳; 在 1~2 d 时菌丝中的碱产率处于快速提高时期, 2~8 d 碱产率平稳增加, 到 8 d 时碱产率达到最大, 之后逐渐趋于衰落。

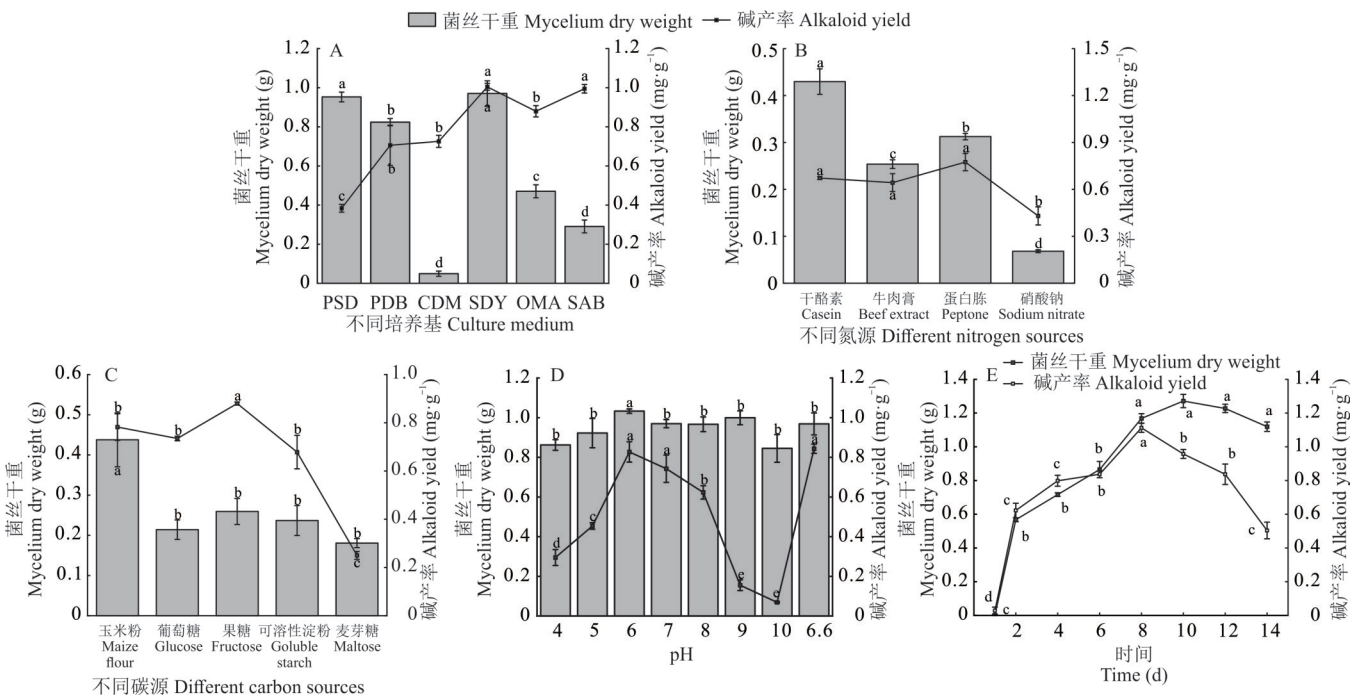


图 4 不同因素对苦豆子内生真菌菌株 HY17 菌丝干重及碱产率的影响

Fig. 4 Effect of different factors on the mycelium dry weight and alkaloid yield of the endophytic fungi strain HY17 of *S. alopecuroides*

因此综合考虑,确定在初始 pH=6,碳源和氮源分别为玉米粉和干酪素的 SDY 液体培养基上培养 8 d 为最优发酵培养基。

2.4 菌株 HY17 产槐定碱发酵条件优化

2.4.1 PB 试验 以前期产槐定碱发酵培养基优化试验为基础,选用试验次数 $N=12$ 的试验设计,以碱产率为响应值,试验设计及结果如表 4 所示。结果显示, X_1 (L-赖氨酸)、 X_2 (L-哌啶酸)、 X_4 (苯丙氨酸)为正效应,即增加这几种物质的量,产碱量会有提升,这是对提升生物碱最重要的 3 个因素,其贡献度分别为 18.03%、14.12%、12.69%。其次为丙酮酸与茉莉酸甲酯,其对碱产率的贡献值为 9.20%、7.79%。 α -酮戊二酸、水杨酸和种子提取物对菌株 HY17 碱产率的贡献较低。该模型的 P 值为 0.0056,表明所得的回归方程达到了极显著,即该模型在被研究的整合回归区域拟合很好。相关系数 $R^2=0.0946$,说明相关性很好,校正决定系数 $AdjR^2=0.9069$,表明 90.69% 的试验数据变异性可以用该回归模型来解释(表 5)。

表 4 Plackett-Burman 试验结果与分析

Table 4 Results and analysis of Plackett-Burman tests

| 序号 No. | 因素 Factors | | | | | | | | 菌丝干重 Mycelium dry weight (g) | 碱产率 Alkaloid yield ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) |
|-----------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------------------|---|
| | X_1 | X_2 | X_3 | X_4 | X_5 | X_6 | X_7 | X_8 | | |
| 1 | 1 | 0.16 | 0.02 | 5 | 1 | 1 | 0.1 | 5 | 0.81 | 1.94 |
| 2 | 1 | 0.80 | 0.01 | 2 | 1 | 1 | 0.1 | 2 | 1.04 | 1.34 |
| 3 | 2 | 0.08 | 0.02 | 5 | 1 | 2 | 0.5 | 5 | 1.65 | 1.18 |
| 4 | 1 | 0.16 | 0.01 | 5 | 4 | 1 | 0.5 | 5 | 1.03 | 1.27 |
| 5 | 2 | 0.08 | 0.02 | 5 | 4 | 1 | 0.1 | 2 | 1.06 | 1.23 |
| 6 | 2 | 0.08 | 0.01 | 2 | 4 | 1 | 0.5 | 5 | 2.51 | 1.67 |
| 7 | 2 | 0.16 | 0.01 | 5 | 4 | 2 | 0.1 | 2 | 0.96 | 1.30 |
| 8 | 1 | 0.08 | 0.02 | 2 | 4 | 2 | 0.1 | 5 | 1.33 | 2.05 |
| 9 | 2 | 0.16 | 0.01 | 2 | 1 | 2 | 0.1 | 5 | 1.33 | 2.05 |
| 10 | 1 | 0.16 | 0.02 | 2 | 4 | 2 | 0.5 | 2 | 0.49 | 2.82 |
| 11 | 1 | 0.08 | 0.01 | 5 | 1 | 2 | 0.5 | 2 | 0.64 | 1.98 |
| 12 | 2 | 0.16 | 0.02 | 2 | 1 | 1 | 0.5 | 2 | 0.89 | 1.51 |

2.4.2 爬坡试验 由表 6 可知,随着 L-赖氨酸、L-哌啶酸、苯丙氨酸的增加,碱产率无明显变化规律,最大产碱量出现在试验 2,因此以试验 2 的条件作为响应面设计的中心水平点,即 L-赖氨酸为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,L-哌啶酸为 $0.08\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,苯丙氨酸为 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4.3 Box-Behnken 响应面分析试验 为了进一步提高菌株 HY17 的碱产率,采用 Box-Behnken 设计试验,对上述最陡爬坡试验筛选出的 3 个适宜浓度进行复配添加,优化添加条件,试验设计及结果见表 7。

对各因素进行多元线性回归分析,得到回归方程:
 $Y=1.36+0.0507X_1+0.0164X_2-0.0128X_4-0.002X_1X_2+0.1236X_1X_4+0.0283X_2X_4-0.2869X_1^2-0.3156X_2^2-0.2104X_4^2$ 。对响应面试验进行方差分析及模型

表 5 各试验因素的效应分析

Table 5 Effect analysis of each experimental factor

| 因素 Factors | 贡献度 Contribution (%) | 自由度 df | 均方 Mean square | F 值 F-value | P 值 P-value |
|---------------|-------------------------|-----------|-------------------|----------------|----------------|
| X_1 | 18.03 | 1 | 0.50 | 21.60 | 0.0143 |
| X_2 | 14.12 | 1 | 0.25 | 15.14 | 0.0527 |
| X_4 | 12.69 | 1 | 0.23 | 8.67 | 0.0635 |
| X_5 | 9.20 | 1 | 0.31 | 6.47 | 0.1213 |
| X_7 | 7.79 | 1 | 1.38 | 15.41 | 0.1111 |
| X_1X_3 | 1.38 | 1.38 | 15.41 | 0.01 | 0.1196 |
| X_1X_4 | 0.32 | 0.3159 | 3.52 | 0.11 | |
| 残差 Residual | 0.45 | 0.0898 | | | |
| 综合 Cor total | 2.63 | | | | |

$R^2=0.0946$, $AdjR^2=0.9069$.

的可信度分析,回归方程模型 P 值为 0.0001,达到极显著水平。失拟项 P 值为 0.8580,差异不显著,表明回归方程模型与试验结果拟合较好。模型的决定系数 $R^2=0.9762$,校正后的 $R^2=0.9456$,方程回归性显著。预测 $R^2=0.9085$,与校正后的 R^2 这两个值高且接近,则回归模型能充分说明试验。相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 $6.48\% < 10\%$,表明试验的可信度和精确度高(表 8)。信噪比 14.1045 视为合理。综上所述,该回归模型对响应值的拟合程度较高,方程能够较好地反映响应值与自变量的关系。

由图 5 可知,通过试验优化得到碱产率最优制备条件为:L-赖氨酸浓度为 $1.044 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、L-哌啶酸浓度为 $0.081 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、苯丙氨酸浓度为 $1.995 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,预测得到的最高碱产率为 $1.362 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在该条件下进行 3 次平行试验,得到碱产率为 $1.396 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,比预测值高 2.49% ,证明该模型是可靠的。与原始发酵条件相比,优化后碱产率提高了 61.95% ,说明优化后的前体物质浓度组成更能促进菌株 HY17 产生槐定碱。

表 7 响应面设计方案及结果

Table 7 Experimental design scheme for response surface methodology and results

| 序号 No. | L-赖氨酸 L-lysine ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | L-哌啶酸 L-piperidinic acids ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | 苯丙氨酸 Phenylalanine ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | 碱产率 Alkaloid yield ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) | 序号 No. | L-赖氨酸 L-lysine ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | L-哌啶酸 L-piperidinic acids ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | 苯丙氨酸 Phenylalanine ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | 碱产率 Alkaloid yield ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) |
|-----------|---|--|---|--|-----------|---|--|---|--|
| 1 | 0.5 | 0.08 | 3.5 | 0.667 | 10 | 1.5 | 0.04 | 2.0 | 0.767 |
| 2 | 1.0 | 0.08 | 2.0 | 1.232 | 11 | 1.0 | 0.12 | 0.5 | 0.839 |
| 3 | 1.5 | 0.08 | 0.5 | 0.810 | 12 | 1.0 | 0.08 | 2.0 | 1.424 |
| 4 | 0.5 | 0.04 | 2.0 | 0.700 | 13 | 1.5 | 0.08 | 3.5 | 1.054 |
| 5 | 1.0 | 0.08 | 2.0 | 1.414 | 14 | 1.5 | 0.12 | 2.0 | 0.810 |
| 6 | 1.0 | 0.04 | 3.5 | 0.772 | 15 | 1.0 | 0.04 | 0.5 | 0.877 |
| 7 | 1.0 | 0.08 | 2.0 | 1.359 | 16 | 1.0 | 0.08 | 2.0 | 1.396 |
| 8 | 0.5 | 0.12 | 2.0 | 0.751 | 17 | 1.0 | 0.12 | 3.5 | 0.847 |
| 9 | 0.5 | 0.08 | 0.5 | 0.917 | | | | | |

3 讨论

毛壳菌的一些种类具有产生生物活性物质的能力,诸如球毛壳素、淄醇类物质、多酚类物质、抗生素、聚酮类化合物等多种化合物,这些物质在农业、食品和医疗等领域具有重要的应用价值^[26]。但到目前为止,关于毛壳菌产生物碱的报道较少,且无毛壳属真菌是多数药用植物中较为新颖的内生真菌属^[27]。本研究以从苦豆子种子中分离纯化出的 50 株内生真菌菌株为材料,通过初筛和复筛得到 1 株稳定产槐定碱的真菌菌株 HY17,结合形态特征和分子鉴定确定其为新种,命名为苦豆子无毛壳菌。

不同微生物需要适当的发酵条件才能产生符合自身菌种特性的代谢物,因此国内外对发酵工艺优化的研究多集中在对培养基种类和组分筛选,以及对培养天数、pH、温度等发酵条件的优化^[28-30]。本研究对菌株 HY17 的

表 6 最陡爬坡试验及结果

Table 6 Steepest climb tests and results

| 试验 号 No. | 因素 Factors ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | | | 菌丝干重 Mycelium dry weight (g) | 碱产率 Alkaloid yield ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) |
|----------------|---|---------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|---|
| | L-赖氨酸 L-lysine | L-哌啶酸 L-piperidinic acids | 苯丙氨酸 Phenylalanine | | |
| 1 | 0.75 | 0.06 | 1.25 | 1.21 | 0.35 |
| 2 | 1.00 | 0.08 | 2.00 | 1.24 | 0.49 |
| 3 | 1.25 | 0.10 | 2.75 | 1.20 | 0.14 |
| 4 | 1.50 | 0.12 | 3.50 | 0.98 | 0.21 |
| 5 | 1.75 | 0.14 | 4.25 | 1.05 | 0.21 |
| 6 | 2.00 | 0.16 | 5.00 | 0.70 | 0.38 |
| 7 | 2.25 | 0.18 | 5.75 | 0.85 | 0.23 |
| 8 | 2.50 | 0.20 | 6.50 | 0.55 | 0.14 |

液体培养基和成分及培养条件进行筛选,对HY17菌丝中的槐定碱进行综合分析,发现在初始pH=6、碳源和氮源分别为玉米粉和干酪素的SDY液体培养基上培养8 d,对菌株HY17的生长繁殖和槐定碱的产生更为有利。吴小伦^[31]从土壤中分离得到1株羽毛角蛋白降解菌,短黄杆菌(*Flavobacterium breve*)ZDM,发现有有机氮源为干酪素、最佳碳源为玉米粉时可以促进其产生角蛋白酶。槐定碱作为一种含氮生物碱^[32],菌丝的碱产率与发酵液中氮源的含量密切相关,干酪素的主要成分为酪蛋白,其蛋白质质量高,可显著提升菌丝的生长繁殖,而玉米粉作为一种天然的碳源,可以提供能量和碳元素,促进真菌的生长。此外,玉米粉中还含有少量的氮元素,也能为真菌生长提供一定的氮源,因此,干酪素与玉米粉作为菌株HY17发酵的最优碳氮源对菌株的生长繁殖和产碱能力有很好的促进作用。SDY液体培养基含有大量酵母浸出粉和蛋白胨,具有充分的氮源,作为最优液体培养基同样能够促进菌株HY17菌丝的生长与槐定碱的合成。本研究确定槐定碱产量最高的最佳发酵时间为8 d,超过8

表8 响应面二次模型方差分析

Table 8 Response surface quadratic model ANOVA

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F值 | P值 |
|-------------------------------|----------------|-----|-------------|---------|---------|
| Source | Sum of squares | df | Mean square | F-value | P-value |
| 模型 Model | 1.1500 | 9 | 0.1276 | 31.880 | <0.0001 |
| X ₁ | 0.0206 | 1 | 0.0206 | 5.1400 | 0.0578 |
| X ₂ | 0.0021 | 1 | 0.0021 | 0.5359 | 0.4879 |
| X ₃ | 0.0013 | 1 | 0.0013 | 0.3296 | 0.5839 |
| X ₁ X ₂ | 0.0000 | 1 | 0.0000 | 0.0041 | 0.9510 |
| X ₁ X ₃ | 0.0611 | 1 | 0.0611 | 15.270 | 0.0058 |
| X ₂ X ₃ | 0.0032 | 1 | 0.0032 | 0.8005 | 0.4007 |
| X ₁ ² | 0.3466 | 1 | 0.3466 | 86.550 | <0.0001 |
| X ₂ ² | 0.4195 | 1 | 0.4195 | 104.75 | <0.0001 |
| X ₃ ² | 0.1865 | 1 | 0.1865 | 46.570 | 0.0002 |
| 残差 Residual | 0.028 | 7 | 0.004 | | |
| 失拟项 Lack of fit | 0.0044 | 3 | 0.0015 | 0.2499 | 0.8580 |
| 纯误差 Pure error | 0.0236 | 4 | 0.0059 | | |
| 综合 Cor total | 1.1800 | 16 | | | |

$R^2=0.9762$, $AdjR^2=0.9456$, $Pred R^2=0.9085$.

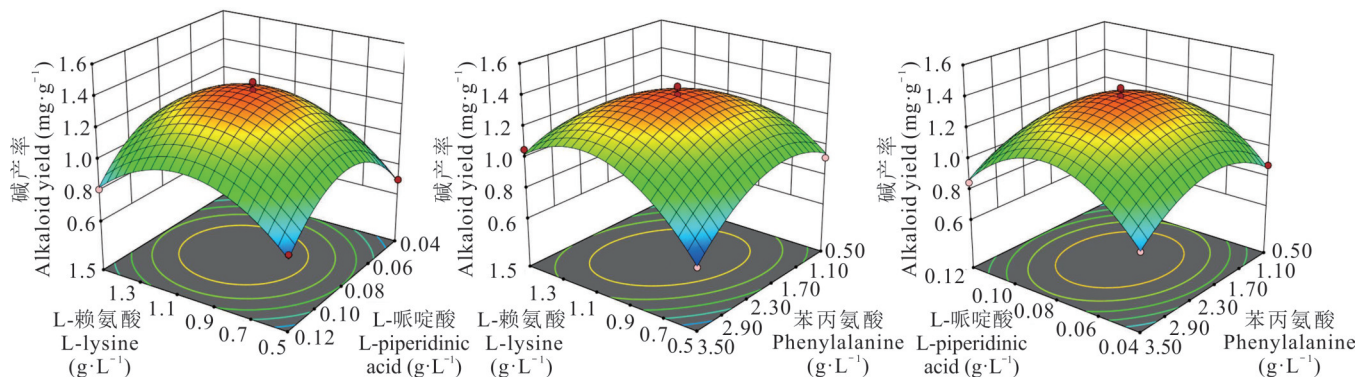


图5 各因素交互作用对菌株碱产率影响的响应面图

Fig. 5 Response surface plot of the effect of interaction of factors on alkaloid yield

d产率逐渐下降,可能是菌株HY17在生长过程中发生了生物转化,影响了菌株的生长和碱产率,此结果与前人报道一致^[33]。pH对菌株HY17的菌丝生长无显著的影响,可能是真菌自身通过某种方式调节其生长环境pH,使环境pH更利于其生长繁殖^[34]。

添加前体物质是指向培养基中加入外源供应生物合成前体或其他中间体的策略,以提高所需的产品产量。而诱导子是信号分子,通过诱导微生物启动某些反应或机制来触发培养物中次生代谢物的形成^[35]。Pu等^[36]发现色胺对真菌产喜树碱的作用为正效应。Zhao等^[37]使用乙醇和甲醇作为诱导子使得胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)ES026产石杉碱甲的产量提升了51.89%。槐定碱是苦豆子中的主要喹诺里西啶类生物碱之一,但目前关于槐定碱在苦豆子中的合成机制仍不清楚。已报道喹诺里西啶类生物碱的生物合成都是L-赖氨酸脱羧形成尸胺,尸胺铜氨基氧化酶氧化脱氨基产生5-氨基戊醛,其自发环化成 Δ^1 -哌啶碱席夫,随后形成含有4个杂环的二亚胺阳离子的中间体,然后再通过氧化、脱氢、羟基化、酰化和甲基化等一系列复杂的反应,最终形成喹诺

里西啶类生物碱^[38-39]。另据 Bunsupa 等^[40]报道 L-哌啶酸是一种广泛存在于生命体内的中间体, L-哌啶酸可以通过缩合、水解、甲基化等反应产生多种赖氨酸衍生的生物碱。以苯丙氨酸为前体进行生物合成, 在苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)的催化下, 苯丙氨酸被羟化成酪氨酸, 而酪氨酸是许多生物碱合成途径中的关键中间体。因此猜测 L-赖氨酸、L-哌啶酸、苯丙氨酸直接或间接的参与苦豆子内生真菌槐定碱的合成过程中, 是槐定碱的可能前体物质或中间物质。基于此, 本试验探究了 L-赖氨酸、 α -酮戊二酸、L-哌啶酸、苯丙氨酸、丙酮酸、茉莉酸甲酯、水杨酸和种子提取物 5 种前体物质和 3 种诱导子对菌株 HY17 生物碱合成的影响。研究发现 L-赖氨酸、L-哌啶酸、苯丙氨酸对菌株 HY17 的生物碱合成为正效应, 即增加这几种物质的量后, 碱产率会有提升。此结果与张蕾蕾等^[41]的试验结果存在差异, 其研究的苦马豆素为吡啶里西啶类生物碱, 该类生物碱与喹诺里西啶类生物碱生物合成路径虽同是 L-赖氨酸为初始底物的含氮杂环, 但前者是 L-赖氨酸氧化为 L-2-氨基己二酸半醛, 再经过一系列酶促反应依次生成 Δ 1, 6-哌啶羧酸、哌可酸, 而后者是 L-赖氨酸脱羧形成 5-氨基戊醛, 其自发环化成 Δ 1-哌啶碱席夫^[38], 两者所形成的醛和哌啶酸等中间产物并不完全相同。

4 结论

通过形态学和分子生物学鉴定菌株 HY17 为苦豆子无毛壳菌, 为新种, 具有产槐定碱能力。通过优化培养基和发酵条件后菌株 HY17 碱产率相较于野生型菌株提高了 61.95%, 表明其具有作为产槐定碱的资源菌而被开发和利用的潜在价值。这为通过微生物发酵生产槐定碱提供了一种新方法。

参考文献 References:

- [1] Ren G, Ding G T, Zhang H Y, *et al.* Antiviral activity of sophoridine against enterovirus 71 *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 236: 124–128.
- [2] Ma T, Yan H, Shi X L, *et al.* Comprehensive evaluation of effective constituents in total alkaloids from *Sophora alopecuroides* L. and their joint action against aphids by laboratory toxicity and field efficacy. *Industrial Crops and Products*, 2018, 111: 149–157.
- [3] Wang R, Deng X, Gao Q, *et al.* *Sophora alopecuroides* L.: An ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 248: 112172.
- [4] Song X H, Pan Y, Li L Y, *et al.* Composition and diversity of rhizosphere fungal community in *Coptis chinensis* Franch. continuous cropping fields. *Public Library of Science One*, 2018, 13(3): e0193811.
- [5] Zhang G. An endophytic fungus from *Gamptotheca acuminata* that produce GPT and research of biology of GPT. Guiyang: Guizhou University, 2007.
张根. 产喜树碱内生真菌的分离、鉴定及生物学活性研究. 贵阳: 贵州大学, 2007.
- [6] Gao L, Wang K X, Zhou Y Z, *et al.* Uncovering the anticancer mechanism of compound kushen injection against HCC by integrating quantitative analysis, network analysis and experimental validation. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 624.
- [7] Cao X, Xu L, Wang J, *et al.* Endophytic fungus *Pseudodidymocyrtis lobariellae* KL27 promotes taxol biosynthesis and accumulation in *Taxus chinensis*. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 1–18.
- [8] Toghueo R M K, Sahal D, Zabalgoeazcoa Í, *et al.* Conditioned media and organic elicitors underpin the production of potent antiplasmodial metabolites by endophytic fungi from Cameroonian medicinal plants. *Parasitology Research*, 2018, 117: 2473–2485.
- [9] Kusari S, Hertweck C, Spitellert M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(7): 792–798.
- [10] Luo D, Lin Q, Tan J L, *et al.* Water-soluble matrine-type alkaloids with potential anti-neuroinflammatory activities from the seeds of *Sophora alopecuroides*. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 116: 105337.
- [11] Ju M X, Zhang Q, Wang R, *et al.* Correlation in endophytic fungi community diversity and bioactive compounds of *Sophora alopecuroides*. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 955647.
- [12] Yu Y T, He S H, Zhao Q M. Isolation and identification of matrine-producing fungal endophytes from *Sophora alopecuroides* in Ningxia. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(13): 2643–2654.
余永涛, 何生虎, 赵清梅. 宁夏苦豆子中产苦参碱内生真菌的分离与鉴定. *中国农业科学*, 2013, 46(13): 2643–2654.

- [13] Cao K, Chen J, Lu X, *et al.* Matrine-producing endophytic fungus *Galactomyces candidum* TRP-7: Screening, identification, and fermentation conditions optimization for matrine production. *Biotechnology Letters*, 2023, 45(2): 209–223.
- [14] Cook D, Gardner D R, Grum D, *et al.* Swainsonine and endophyte relationships in *Astragalus mollissimus* and *Astragalus lentiginosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(4): 1281–1287.
- [15] Chen Q, Wang J, Gao Y, *et al.* Optimization of fermentation conditions and product identification of a saponin-producing endophytic fungus. *Microorganisms*, 2023, 11(9): 2331.
- [16] Yang G D. Study on biosynthesis of swainsonine by the locoweed's endophytic fungi. Yangling: Northwest A & F University, 2012.
杨国栋. 疯草内生真菌合成苦马豆素的研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [17] Zhuang J H, Gao Z G, Liu X, *et al.* Effect of fermentation factors on spore types of *Trichoderma* strain 23. *Chinese Journal of Biological Control*, 2005, 21(1): 37–40.
庄敬华, 高增贵, 刘限, 等. 不同发酵条件对木霉产孢类型的影响. *中国生物防治学报*, 2005, 21(1): 37–40.
- [18] Li Q N, Yin Y F, Ma Y, *et al.* Study on the optimum medium and concentration of fly maggot-killing conidia of *Metarhizium brunneum*. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2024(8): 60–67, 76.
李倩楠, 尹衍峰, 马园, 等. 棕色绿僵菌最适培养基和杀蝇蛆分生孢子浓度探究. *黑龙江畜牧兽医*, 2024(8): 60–67, 76.
- [19] Jin J. Screening and optimization of alkaloid-producing endophytic fungi of *Sophora alopecuroides* L. for quinolizidine alkaloids. Yinchuan: Ningxia University, 2022.
金婧. 产喹诺里西啶生物碱苦豆子内生真菌的筛选与产碱条件的优化. 银川: 宁夏大学, 2022.
- [20] Henzelyová J, Antalová M, Nigutová K, *et al.* Isolation, characterization and targeted metabolic evaluation of endophytic fungi harbored in 14 seed-derived *Hypericum* species. *Planta Medica*, 2020, 86(13/14): 997–1008.
- [21] Wang W K, Ju M X, Jin J, *et al.* Screening of alkaloid-producing endophytic fungi from *Sophora alopecuroides* and optimization of their fermentation conditions. *Acta Agrestia Sinica*, 2025, 33(1): 307–316.
王文凯, 鞠明岫, 金婧, 等. 产生物碱苦豆子内生真菌筛选及其发酵条件优化. *草地学报*, 2025, 33(1): 307–316.
- [22] Ju M X, Zhang Q Q, Wang R T, *et al.* Community ecological succession of endophytic fungi associates with medicinal compound accumulation in *Sophora alopecuroides*. *Microbiological Spectrum*, 2024, 12(2): e03076–23.
- [23] Wang Q, Li Y, Li K W, *et al.* Sophoridine: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and toxicity. *Phytomedicine*, 2022, 95: 153756.
- [24] Zhang X G, Guo S J, Wang W N, *et al.* Diversity and bioactivity of endophytes from *Angelica sinensis* in China. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1489.
- [25] Berbee M L, Pirseyedi M, Hubbard S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 1999, 91(6): 964–977.
- [26] Dwibedi V, Rath S K, Jain S, *et al.* Key insights into secondary metabolites from various *Chaetomium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(4): 1077–1093.
- [27] Anitha K P G U, Mythili S. Antioxidant and hepatoprotective potentials of novel endophytic fungus *Achaetomium* sp., from *Euphorbia hirta*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2017, 10(6): 588–593.
- [28] Zhou W, Cai M, Na K, *et al.* pH-dependent accumulation of anticancer compound on mycelia in fermentation of marine fungus. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41(7): 1169–1173.
- [29] Hu Z, Weng Q, Cai Z, *et al.* Optimization of fermentation conditions and medium components for chrysomycin a production by *Streptomyces* sp. 891-B6. *BMC Microbiology*, 2024, 24(1): 120.
- [30] Zhang Y H, Li H, Zhang M Q, *et al.* Identification of a cellulose-degrading bacteria from silkworm excrement and optimization of enzyme production and its bioaugmentation effect. *Acta Sericologica Sinica*, 2023, 49(6): 551–559.
张元昊, 李豪, 张敏琪, 等. 一株蚕沙纤维素降解菌的鉴定及产酶优化和生物强化效果. *蚕业科学*, 2023, 49(6): 551–559.
- [31] Wu X L. Studies on feather-degrading *Flavobacterium breve* ZDM, the fermentation conditions and characteristics of keratinase. Hangzhou: Zhejiang University, 2001.
吴小伦. 羽毛角蛋白降解菌(*Flavobacterium breve* ZDM)的分离、鉴定及其发酵产酶条件和酶学特性的研究. 杭州: 浙江大学, 2001.
- [32] Tang Q, Liu Y, Peng X, *et al.* Research progress in the pharmacological activities, toxicities, and pharmacokinetics of sophoridine and its derivatives. *Drug Design, Development and Therapy*, 2023, 16: 191–212.

- [33] Wei Z J, Zhou L C, Chen H, *et al.* Optimization of the fermentation conditions for 1-deoxynojirimycin production by *Streptomyces lawendulae* applying the response surface methodology. *International Journal of Food Engineering*, 2011, 7(3), 10.2202/1556-3758.2354.
- [34] Chen D, Sheng W, Wang D, *et al.* Effective purification of high concentration chromium-containing wastewater and preparation of chromium ferrite. *Environmental Engineering Research*, 2023, 28(6): 220706.
- [35] Venugopalan A, Srivastava S. Endophytes as *in vitro* production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(6): 873-887.
- [36] Pu X, Qu X, Chen F, *et al.* Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: Isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97: 9365-9375.
- [37] Zhao X M, Wang Z Q, Shu S H, *et al.* Ethanol and methanol can improve huperzine A production from endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* ES026. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61777.
- [38] Li Y, Wang G, Liu J, *et al.* Quinolizidine alkaloids derivatives from *Sophora alopecuroides* Linn: Bioactivities, structure-activity relationships and preliminary molecular mechanisms. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 188: 111972.
- [39] Ramírez-Betancourt A, Hernández-Sánchez A M, Salcedo-Morales G, *et al.* Unraveling the biosynthesis of quinolizidine alkaloids using the genetic and chemical diversity of mexican lupins. *Diversity*, 2021, 13(8): 375.
- [40] Bunsupa S, Yamazaki M, Saito K. Quinolizidine alkaloid biosynthesis: Recent advances and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 239.
- [41] Zhang L L, Yu Y T, He S H, *et al.* Influence of different factors on swainsonine production in fungal endophyte from locoweed. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 46(1): 163-173.
张蕾蕾, 余永涛, 何生虎, 等. 不同因素对疯草内生真菌合成苦马豆素的影响. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(1): 163-173.