

石斛内生菌产石斛碱类生物碱发酵培养条件优化及降血糖活性研究

鲁 为^{1,2}, 刘佳萌¹, 覃璐琪¹, 郑佳欢¹, 郭润芳^{2*}, 范 蓓^{1*}

(¹中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; ²河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000)

摘要: 目的: 优化石斛内生菌 (*Pseudomonas protegens*) CM-YJ 44 的培养条件, 提高其次级代谢产物石斛碱类生物碱的产量。方法: 利用单因素试验及正交试验对其发酵培养条件进行了优化, 借助高效液相色谱确定了石斛碱类生物碱产量最高的最佳培养条件。利用胰岛素抵抗 (IR) 细胞模型, 二甲双胍 (Met) 作为阳性对照, 测定 2-(N-7-硝基-2, 1, 3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖 (2-NBDG) 的摄取量, 比较菌株次级代谢产物的降血糖活性。结果: 优化实验发现, 菌株 CM-YJ 44 培养的最佳碳源、氮源、无机盐添加量、维生素和初始 pH 值分别为 5 g/L 果糖、3 g/L 酵母浸粉、5 g/L 麦芽浸粉、0.1% 无机盐。在 200 r/min、28 °C 下培养 48 h 石斛碱类生物碱产量最高可达到 39.56 mg/mL。结果: 50 ng/mL 和 100 ng/mL 的石斛碱与 CM-YJ 44 次级代谢产物作用下, 细胞活力分别为 101% 和 91.62%, 且均能显著提高细胞 2-NBDG 的摄取 ($P < 0.05$)。结论: 在最佳培养条件下石斛碱类生物碱产量最高; 菌株次级代谢产物降血糖活性优于石斛碱纯品, 且二者活性均优于 Met。

关键词: 石斛内生菌; 工艺优化; 石斛碱类生物碱; HepG2; 降血糖

研究表明, 石斛中发挥药用功效的活性成分主要为多糖类和生物碱类^[1], 其中, 石斛碱是石斛属植物所特有的一类生物碱, 属于倍半萜类生物碱^[2], 目前仅在 6 种石斛中发现该构型的生物碱^[3]。相关研究报道表明, 石斛碱的药用功效主要表现在调控脂代谢等方面。黄琦等^[4-5]发现, 石斛碱能有效降低糖尿病大鼠的空腹血糖, 其作用机制与改善胰岛素抵抗、上调肝脏相关蛋白表达相关。XU 等^[6]从玫瑰石斛中首次分离出吡啶类生物碱, 并验证了其具有降低 HepG2 细胞血糖的作用, 同时相关研究发现, 石斛碱能通过增加血清胰岛素水平改善小鼠的妊娠期糖尿病^[7]。除了直接的降血糖活性外, 石斛碱还可以缓解糖尿病小鼠的葡萄糖和脂质代谢紊乱^[8]。目前, 石斛碱的合成途径包括植物提取、化学合成和生物合成。其中植物提取主要是利用酸性乙醇提取、酸水溶液浸泡提取或超临界流体萃取等工艺从金钗石斛中提取生物总碱^[9], 但石斛属植物生长条件较苛刻^[10], 且该方法石斛碱的产量较低, 仅有 0.02%~0.06%^[11]。化学合成研究难度较大、步骤多, 且多属于实验室水平^[12-13]。因此, 植物提取法和化学合成法均

不适用于大规模生产石斛碱。生物合成具有得率高、提取周期短的优点, 且不受植物生长周期的限制。闫浩利等^[14]发现, 用菌根真菌 MF23 (*Mycena sp.*) 处理组育苗后其石斛碱含量较对照组高 15.69%。LI 等^[15]对相关机制进行了研究, 为利用植物内生菌生物合成石斛碱的奠定了基础。由此可见, 石斛碱的生物合成具有巨大的优势和广阔的市场前景, 并且已有相关研究证实植物内生菌可以产生与宿主结构相同或相似的活性化合物^[16-18]。

实验前期, 从霍山石斛鲜条中分离出的石斛内生菌 CM-YJ 44, 从其发酵上清液中鉴定出了石斛碱的前体物质: 6-羟基石斛碱和石斛次碱。本研究在前期研究基础上, 对石斛内生菌 CM-YJ 44 发酵培养条件进行优化, 旨在实现菌株次级代谢产物中石斛碱类生物碱的增产。在该基础上, 借助胰岛素抵抗模型对石斛碱及次级代谢产物的降血糖活性进行研究比较。

基金项目: 国家重点研发计划 (项目编号: 2022YFD1600303); 中国农业科学院农产品加工研究所创新工程院所重点任务 (项目编号: CAAS-ASTIP-G2022-IFST-06)。

作者简介: 鲁 为 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 活性天然产物富集及活性。

*共同通信作者: 郭润芳 (1969—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏及其副产物的高值化利用; 范 蓓 (1969—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食药同源产品营养品质评价、功效机制与综合利用关键技术。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

1.1.1 材料 实验菌株：课题组前期从石斛茎中分离得到的可产石斛碱类生物碱的内生菌 CM-YJ 44 (NCBI 登录号: MZ674076; CMCC 保藏编号: 23981); 细胞株：人肝癌 HepG2 细胞 (CL-0103)，购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 试剂 石斛碱 ($\geq 98\%$)，上海源叶生物；甲醇 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯)，美国 Fisher Chemical；葡萄糖、酵母浸粉、麦芽浸粉、氯化钠、氢氧化钠、果糖，上海沪试；维生素 B、二甲基亚砷、PBS 缓冲液、盐酸二甲双胍、CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；法尼基焦磷酸溶液、棕榈酸，美国 Sigma；乙酸乙酯，北京通广；HepG2 完全培养基，武汉普诺赛生命科技；重组人胰岛素、高糖 DMEM 培养基，北京酷莱博科技有限公司；2-NBDG 葡萄糖摄取检测试剂盒，美国 AAT Bioquest。

1.1.3 仪器 RE-52 旋转蒸发仪、Esci-1020 立式单开门震荡培养箱、H23A 高速离心机、Agilent 1260 超高效液相、LRH-250 生化培养箱、Eppendorf 5810R 低温高速离心机、Thermo fisher 细胞培养箱、Olympus IX71 荧光倒置显微镜、MolecuLar Devices spectra MAX190 酶标仪、GR60DR 自动压力蒸汽灭菌锅等。

1.2 方法

1.2.1 种子液的制备及菌株的培养 本研究在 YIM 38 培养基的基础上进行菌株 CM-YJ 44 产石斛碱类生物碱培养条件的优化，其配方为：双蒸水 (dd H₂O) 1 L、葡萄糖和酵母浸粉各 4 g、麦芽浸粉 5 g、维生素 B₁ 1 g、NaCl 1 g、1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0，混合均匀后于 121 °C 灭菌 15 min。将保藏的菌种在 YIM 38 平板上划线活化，放入 28 °C 的培养箱中培养 48 h，挑取活化后的菌株的单菌落接种于液体培养基中，28 °C 摇瓶培养过夜制备种子液。以 1% 的接种量将种子液接种至 600 mL 的液体培养基中，在 28 °C、200 r/min，摇瓶培养 48 h。

1.2.2 石斛碱标准曲线的绘制 精密称取 20 mg 石斛碱标准品粉末，加甲醇溶解并定容至 5 mL，用甲醇稀释至 0.5、1、1.5、2、2.5 mg/L。参考文献 [19] 使用高效液相色谱测定，根据高效液相色谱的谱图峰面积绘制石斛碱标准曲线。

1.2.3 菌株 CM-YJ 44 产石斛碱类生物碱培养的单因素优化 碳、氮源均为影响菌株生长的重要因素，目前常用的碳源包括葡萄糖、乳糖、果糖和可溶性淀

粉 [20] 等，常用的氮源包括酵母浸粉、麦芽浸粉、牛肉膏、胰蛋白胍和硫酸铵 [21] 等，因此本研究选择其进行实验。将 YIM 38 培养基中的碳源葡萄糖分别用 4 g/L 的乳糖，蔗糖，果糖和可溶性淀粉替换。将氮源酵母浸粉用 4 g/L 的硫酸铵、牛肉膏和胰蛋白胍替代，再将原有的氮源麦芽浸粉替换为以上氮源，添加量为 5 g/L，配制不同碳、氮源的培养基。

维生素作为微生物生长、代谢必不可少的物质，参与众多代谢反应，因此对原培养基中的维生素组分进行优化。参考文献 [22] 进行复合维生素 B 的配制：维生素 B₁ 6 mg、维生素 B₂ 3 mg、维生素 B₆ 0.4 mg、烟酰胺 20 mg、泛酸钙 2 mg。用配制好的复合维生素 B 替代基础培养基中的维生素 B₁，其它组分按照原配方添加，配制不同维生素 B 的培养基。

通过实验室前期对石斛碱类倍半萜生物碱 (DSAs) 化学合成途径的研究，发现倍半萜法尼基焦磷酸 (FPP) 可作为 DSAs 合成途径中上下游之间的重要调控因子 [23]，因此选择添加不同含量的 FPP 进行测定。因此设置 0%、0.1%、0.2% 3 个 FPP 浓度和 0.05%、0.10%、0.15% 3 个 NaCl 浓度 [21]，其他组分按照原配方添加，配制不同添加量药物的培养基。

以上培养基初始 pH 均调节至 7.0，种子液以 1% 的接种量接种至培养基中，28 °C、200 r/min，摇瓶发酵培养 48 h，进行最优单因素的筛选。

1.2.4 菌株 CM-YJ 44 产石斛碱类生物碱培养的正交优化 根据单因素试验的结果，选取最优碳源、氮源和维生素 B。pH 值是确保微生物正常繁殖、代谢的重要参数，最佳初始 pH 值对不同种类微生物发酵后目的产物的产量及质量影响较大，因此将初始 pH 值作为第四因素，设计 4 因素 3 水平 L₉ (3⁴) 的正交试验以确定最佳培养基组分。因素及水平量的设计见表 1，按照表中的含量进行不同培养基的配制，按 1.2.1 的方法进行发酵培养，进行最佳培养基筛选。

表 1 L₉ (3⁴) 正交试验设计

因素 水平	A 氮源(g/L)	B 碳源(g/L)	C 维生素 B ₁ (g/L)	D pH 值
1	3	3	0.5	6.5
2	4	4	1	7
3	5	5	1.5	7.5

1.2.5 菌株 CM-YJ 44 次级代谢产物的制备及石斛碱类生物碱含量的测定 发酵完成的菌悬液，均以 9 500 r/min 的转速离心 20 min，用等量的乙酸乙酯对上清液萃取两次，收集乙酸乙酯层，38 °C 旋转蒸发，待液体完全蒸发后加入 1 mL 甲醇，溶解获得石斛内生菌

的次级代谢产物溶液,过0.22 μm滤膜,获得待测样品。按照石斛碱标准品的液相条件进行样品测定,根据标准品的出峰时间,计算包含该时间点前后共五分钟的代谢产物样品的峰面积,再根据绘制的标准曲线,计算不同培养基的发酵液中该时间段的石斛碱类似物的含量。

1.2.6 HepG2细胞培养及胰岛素抵抗细胞模型的建立 将冻存的细胞于37℃水浴锅中融化,离心后弃去上清,加入1 mL高糖HepG2完全培养基中,加入6 mL的高糖完全培养基,在37℃、5% CO₂的培养箱中培养,至细胞达到90%汇合进行后续实验。

棕榈酸(PA)的配制参考文献[24]进行,采用PA联合胰岛素建立IR模型^[25-26]:取对数生长期的细胞,以10⁵个/mL的密度接种于96孔板。细胞贴壁后加入高糖完培稀释后的250 μmol/L的PA,培养箱中孵育36 h后,再加入100 μmol/L的胰岛素孵育30 min建立模型。测定2-NBDG摄取量判断模型建立结果,2-NBDG是一种荧光标记的2-脱氧葡萄糖类似物,可以竞争性地抑制D-葡萄糖,因此可以用作细胞中葡萄糖代谢的示踪剂^[27],2-NBDG的测定按照试剂盒说明书^[28]进行。

1.2.7 CCK-8法细胞毒性的测定 石斛碱及氮吹后的次级代谢产物均用含0.1%二甲基亚砜(DMSO)的高糖完全培养基溶解,不同药物均用高糖HepG2完全培养基稀释。对石斛碱和菌株CM-YJ 44次级代谢产物对HepG2细胞的毒性进行测定。将细胞分为空白组、阳性对照组、石斛碱组(50、100、200、400、800 ng/mL)和CM-YJ 44组(50、100、200、400、800 ng/mL),每组均为3个复孔。空白对照组无细胞,仅加入高糖完培。细胞以10⁵个/mL的密度接种于96孔板中,细胞贴壁后阳性对照组加入高糖完培,药物组加入药物干预24 h,按照CCK-8细胞增殖及毒性检测试剂盒说明书测定细胞增殖活力(%),计算公式如式(1)。

$$\text{HepG2细胞活力}(\%) = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中,A₀为具有培养基和CCK-8溶液而没有细胞的孔的吸光度;A₁为具有细胞、CCK-8溶液和药物溶液的孔的吸光度;A₂为具有细胞、CCK-8溶液而没有药物溶液的孔的吸光度。

1.2.8 石斛碱及菌株次级代谢产物降血活性的测定 按照1.2.6的方法建立IR-HepG2细胞模型。将细胞分为空白组、IR组、阳性对照Met组、石斛碱组和CM-YJ 44组,每组3个平行复孔,其中空白组不添加PA,其余组均为PA孵育的细胞。待细胞贴壁后,空白组和IR组弃掉原培养,加入高糖完培,石斛碱组和CM-YJ 44组分别加入筛选后适宜浓度的石斛碱和次级代谢产物。均孵育24 h后,测定2-NBDG含量。

1.2.9 数据分析 标准曲线绘制采用Origin 2021进行,SPSS 21统计软件进行极差分析,2-NBDG荧光强度采用Imagine J(Java 8)计算,所有的ANOVA单因素方差统计学分析及柱状图绘制均采用GraphPad Prism 8进行,P<0.05为显著。

2 结果与分析

2.1 石斛碱标准曲线

采用安捷伦1260超高效液相色谱仪进行标准曲线峰面积的测定,测定结果如表2,标准曲线见图1。

表2 不同浓度石斛碱标准品峰面积

浓度(mg/mL)	峰面积(mAU)
0.5	2 350.6
1	3 280.9
1.5	4 719.9
2	6 196.1
2.5	7 780.8

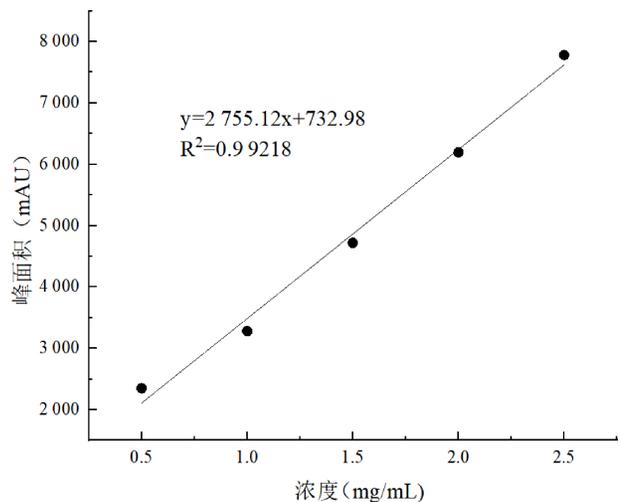


图1 石斛碱标准曲线

2.2 不同培养基对菌株CM-YJ 44产石斛碱类似物含量的影响

2.2.1 单因素试验优化结果 采用液相色谱对菌株次级代谢产物进行分析,标准品的紫外吸收峰的出峰时间为28 min,因此选取28~30 min的紫外吸收时间段的类似物进行含量的测定^[29-31]。对不同碳源培养基菌株CM-YJ 44发酵液中特定时间段(28~30 min)的石斛碱类似物的含量进行了测定。菌株CM-YJ 44在不同碳源的培养基中生长积累的代谢物含量有一定的差异,其中C3果糖组的石斛碱类似物积累量最多,显著高于其他碳源组(P<0.01),其次为C1葡萄糖组,C4组的积累量最少,因此最佳的碳源为果糖(图2)。

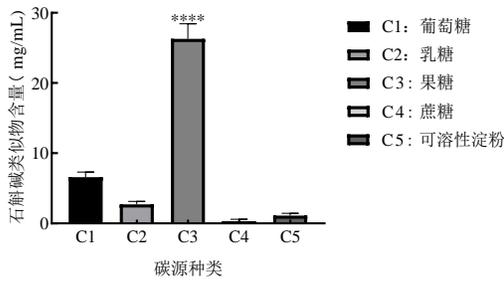


图2 碳源优化石斛碱类似物含量

注：*与C1组相比，**** $P < 0.01$

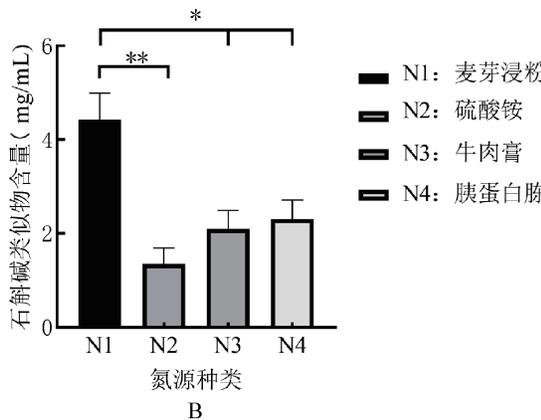
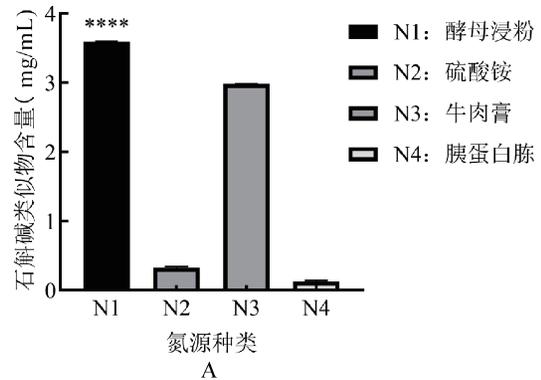
对不同氮源培养基中的代谢产物进行了测定发现，不同氮源的液体培养基中生长积累的代谢物含量有一定的差异。用不同氮源替换酵母浸粉后（图3A），原氮源酵母浸粉（N1）组的石斛碱类似物积累量最高，显著高于其他氮源组（ $P < 0.01$ ），其次为N3牛肉膏组，N4胰蛋白胍组含量最少。用不同氮源替换麦芽浸粉后（图3B），原氮源麦芽浸粉（N1）组石斛碱类似物积累量最高，与其它氮源组的积累量均存在显著性差异（ $P < 0.05$ ），其次为胰蛋白胍组，硫酸铵组积累量最少。因此菌株发酵的最佳氮源为酵母浸粉和麦芽浸粉。对不同维生素B添加的培养基中的代谢产物进行了测定发现，各组之间虽无显著差异（ $P > 0.05$ ），但单一维生素B₁组石斛碱类似物积累量高于复合维生素B组，因此最佳维生素B为单一维生素B₁（图4）。

无机盐及FPP的添加量对石斛碱类似物积累量的影响使用同样的方法进行了测定。如图5所示，不同无机盐添加量对石斛碱类似物的积累量无显著性差异（ $P > 0.05$ ），其中0.1%添加即1 g/L的添加量最利于产物的积累，0.15%添加量组的产物含量最低。由此可以得到菌株发酵的最佳无机盐添加量为0.1%。如图6所示，FPP 0添加组的石斛碱类似物含量最高，高于0.1%添加组，显著高于FPP 0.2%添加组（ $P < 0.01$ ）。因此最佳FPP添加量为0。

2.2.2 正交试验优化结果 根据单因素试验的结果选取的最优碳氮源和维生素B种类，按照表1建立正交试验，根据方案进行培养基配制（表3），测定各组的石斛碱类似物含量。如表4所示，1号实验组的石斛碱类似物含量高于其他实验组。极差分析结果显示，对产物积累影响最大的因素是碳源，其次是pH，维生素B₁对产物积累的影响最小。最优组合为A₁B₃C₁D₁，即氮源酵母浸粉3 g/L、碳源果糖5 g/L、维生素B₁0.5 g/L、初始pH值为6.5。

2.3 菌株次级代谢产物降糖活性测定

2.3.1 不同药物对细胞活力的影响 不同浓度石斛碱



A不同氮源替换酵母浸粉；B不同氮源替换麦芽浸粉

图3 氮源优化石斛碱类似物含量

注：*与N1组相比，* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、**** $P < 0.01$

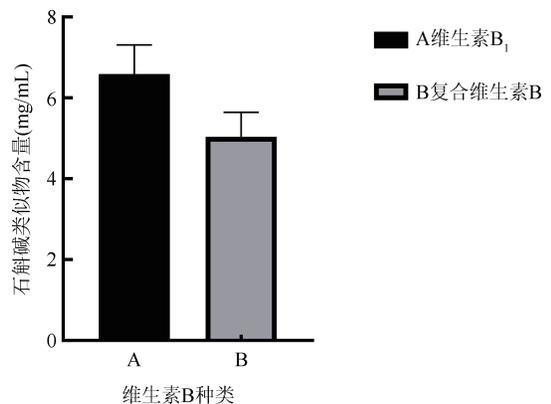


图4 维生素B优化石斛碱类似物含量

注：*与C1组相比，**** $P < 0.01$

及次级代谢产物作用于细胞，CCK-8法测定细胞活力。如图7A所示，在50、100 ng/mL浓度的石斛碱作用下，细胞活力较好，分别为94%和91%。如图7B所示，在50、100 ng/mL次级代谢产物作用下，细胞活力较好，分别为93%和91%。因此选取50和100 ng/mL药物进行后续试验。

2.3.2 石斛碱及菌株次级代谢产物降糖活性比较 测定同浓度菌株次级代谢产物和石斛碱对细胞2-NBDG摄取的影响。如图8，IR组的2-NBDG摄取量显著低于空白对照组（ $P < 0.01$ ），模型建立成功。除50 ng/mL的二

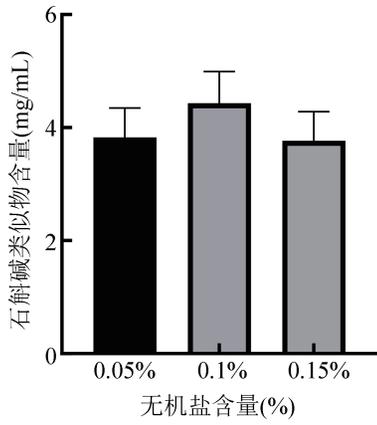


图5 无机盐优化石斛碱类似物含量

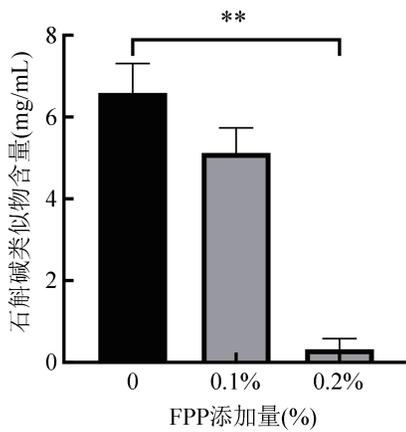


图6 FPP优化石斛碱类似物含量。

注：* 与0添加FPP组相比，* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

表3 菌株培养条件优化正交试验方案

因素	A 酵母浸粉	B 果糖	C 维生素B ₁ 含量	D pH值
1	2	3	3	1
2	1	1	1	1
3	3	1	3	2
4	1	2	3	3
5	2	2	1	2
6	3	3	1	3
7	3	2	2	1
8	2	1	2	3
9	1	3	2	2

甲双胍组未表现出显著的降血糖活性，其余浓度药物均表现出了降血糖活性。其中，50 ng/mL的菌株次级代谢产物的活性优于等浓度的石斛碱，100 ng/mL的石斛碱的活性优于等浓度的二甲双胍。其中菌株次级代谢产物的活性优于石斛碱纯品可能是产物中多种化合物共同作用的结果。

3 讨论

本研究通过单因素试验和正交试验对石斛内生菌

表4 菌株CM-YJ44极差分析

正交试验极差分析					
实验号	A 酵母浸粉(g/L)	B 果糖(g/L)	C 维生素B ₁ (g/L)	D pH值	Y 石斛碱类似物含量(mg/mL)
1	2	3	3	1	39.56
2	1	1	1	1	34.59
3	3	1	3	2	2.57
4	1	2	3	3	22.26
5	2	2	1	2	23.77
6	3	3	1	3	26.54
7	3	2	2	1	27.55
8	2	1	2	3	12.75
9	1	3	2	2	30.50
k ₁	87.35	49.90	84.90	101.69	
k ₂	76.07	73.57	70.80	56.84	
k ₃	56.66	96.60	64.39	61.55	
均值k ₁	29.12	16.63	28.30	33.90	
均值k ₂	25.36	24.52	23.60	18.95	
均值k ₃	18.89	32.20	21.46	20.52	
极差R	10.23	15.57	6.84	14.95	
主次因素	BDAC				
最优组合	A ₁ B ₃ C ₁ D ₁				

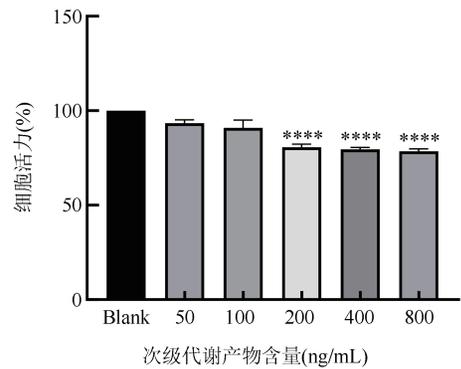
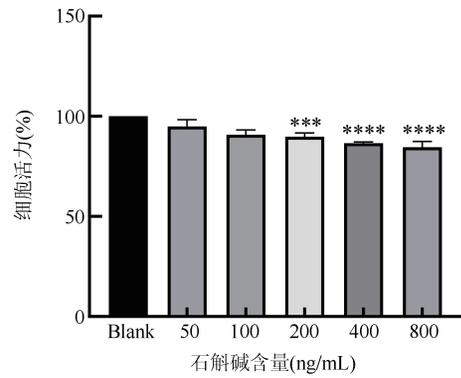


图7 不同浓度药物对细胞的毒性作用

注：* 与正常组相比，*** $P < 0.01$ 、**** $P < 0.001$

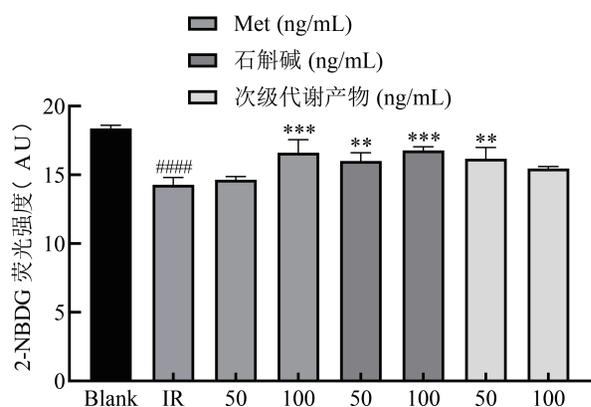


图8 石斛碱及菌株次级代谢产物IR-HepG2细胞2-NBDG摄取的影响

注: *与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;

#与正常组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

CM-YJ 44产石斛碱类生物碱培养条件进行了优化, 最终得到最佳条件: 酵母浸粉3 g/L、麦芽浸粉5 g/L、果糖5 g/L、NaCl 1 g/L、维生素B₁ 0.5 g/L、初始pH值为6.5、200 r/min、28 °C、摇瓶培养48 h。根据优化的结果可以发现, 有机氮源较无机氮源更适合菌株CM-YJ 44次级代谢产物的积累, 同时不额外添加无机盐和FPP更有利。前者可能是由于二者在微生物代谢过程中参与的代谢途径不同, 对代谢产物的积累存在影响^[32]。后者可能是由于低浓度条件下有益于微生物的生理活动, 而浓度过高时会表现为抑制作用^[33]。

同时, 通过利用PA诱导建立IR-HepG2细胞模型, 并进一步对石斛碱和菌株次级代谢产物的降血糖活性进行了探究和比较, 结果显示在一定浓度范围(50~100 ng/mL), 二甲双胍、石斛碱和次级代谢产物的降血糖活性为: 次级代谢产物>石斛碱>二甲双胍。可能是由于次级代谢产物中多种化合物协同作用使其降糖活性优于单一石斛碱, 具体作用机制仍需进一步探究。

参考文献

- [1] 郁美娟, 孟庆华, 黄德音, 等. 石斛属植物有效成分及药理作用研究[J]. 中成药, 2003, 25(1): 918-921.
- [2] 陈星月, 龚道勇, 郭顺星, 等. 石斛碱型生物碱及石斛碱合成生物学研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2021, 38(3): 8-18.
- [3] 金蓉鸾, 孙继军, 张远名. 11种石斛的总生物碱的测定[J]. 南京药学院学报, 1981(1): 9-13.
- [4] 黄琦, 廖鑫, 吴芹, 等. 金钗石斛生物总碱对糖尿病大鼠血糖及肝脏组织IRS-2 mRNA, IGF-1 mRNA表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 155-158.
- [5] 黄琦, 廖鑫, 吴芹, 等. 金钗石斛总生物碱对糖尿病大鼠骨骼肌组织GLUT4表达的影响[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(13): 1625-1628.
- [6] XU X, CHEN X, YANG R, et al. Crepiditumines A and B, Two Novel Indolizidine Alkaloids from *Dendrobium crepidatum*[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 9564.
- [7] FENG Y, JIA B, FENG Q, et al. Dendrobine attenuates gestational diabetes mellitus in mice by inhibiting Th17 cells [J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2021, 128(3): 379-385.
- [8] SHI Y S, CHEN J C, LIN L, et al. Dendrobine rescues cognitive dysfunction in diabetic encephalopathy by inhibiting ferroptosis via activating Nrf2/GPX4 axis [J]. Phytomedicine, 2023, 119: 154993.
- [9] 张成宸, 袁仁锋. 金钗石斛生物碱的提取技术及临床前药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(9): 46-52.
- [10] 蒋波, 詹源庆, 黄捷. 金钗石斛濒危原因及其野生资源保护[J]. 中国野生植物资源, 2024(5): 34-36.
- [11] WANG S S, LIU J M, SUN J, et al. Analysis of Endophytic Bacterial Diversity From Different *Dendrobium* Stems and Discovery of an Endophyte Produced Dendrobine-Type Sesquiterpenoid Alkaloids [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 775665.
- [12] Padwa A, Dimitroff M, Liu B. Formal synthesis of (+/-)-dendrobine: use of the amidofuran cycloaddition/rearrangement sequence [J]. Organic Letters, 2000, 2(20): 3233-3235.
- [13] Yamamoto K, Kawasaki I, Kaneko T. Synthetic studies of dendrobine I synthesis of the skeleton of dendrobine [J]. Tetrahedron Letters, 1970, 11(56): 4859-4861.
- [14] 闫浩利, 陈晓梅, 廖方华, 等. 菌根真菌对金钗石斛幼苗生长及石斛碱和多糖积累的影响[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(17): 1450-1454.
- [15] LI Q, DING G, LI B, et al. Transcriptome Analysis of Genes Involved in Dendrobine Biosynthesis in *Dendrobium nobile* Lindl. Infected with Mycorrhizal Fungus MF23 (*Mycena* sp.) [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 316.
- [16] 叶晶晶, 周晓玲, 张升祥, 等. 2株桑树内生菌发酵产物的降血糖作用[J]. 蚕业科学, 2011, 37(6): 1046-1052.
- [17] 吴昊. 微生物源1-脱氧野尻霉素生物合成调控及其抑制 α -葡萄糖苷酶机理研究[D]. 南宁: 广西大学, 2019.
- [18] Nimal Christudas I V S, Praveen Kumar P, Agastian P. In vitro α -glucosidase inhibition and antioxidative potential of an endophyte species (*Streptomyces* sp. *loyola* UGC) isolated from *Datura stramonium* L [J]. Current Microbiology, 2013, 67(1): 69-76.
- [19] 李墅, 王春兰, 郭顺星. 高效液相色谱法测定金钗石斛中石斛碱含量[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(4):

- 252-254.
- [20] 刘莹, 侯英敏, 孙业兵, 等. 三七内生菌的分离及其产皂苷发酵条件的优化[J]. 大连工业大学学报, 2016, 35(1): 15-18.
- [21] 方翔, 徐伟芳, 牛娜, 等. 一株桑树内生拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 2147-2160.
- [22] 丁舒, 宋兆伟, 陈颖, 等. 诱导富集胞外灵芝酸A的液态发酵培养基优化[J]. 保鲜与加工, 2022, 22(5): 43-48.
- [23] 陈星月, 龚道勇, 郭顺星, 等. 石斛碱型生物碱及石斛碱合成生物学研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2021, 38(3): 8-18.
- [24] SUN YP, WANG JF, GUO XJ, et al. Oleic Acid and Eicosapentaenoic Acid Reverse Palmitic Acid-induced Insulin Resistance in Human HepG2 Cells via the Reactive Oxygen Species/JUN Pathway [J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2021, 19(5): 754-771.
- [25] Tong T, Ren N, Soomi P, et al. Theaflavins Improve Insulin Sensitivity through Regulating Mitochondrial Biosynthesis in Palmitic Acid-Induced HepG2 Cells [J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2018, 23(12): 3382.
- [26] HUANG F, CHEN J, WANG J, et al. Palmitic Acid Induces MicroRNA-221 Expression to Decrease Glucose Uptake in HepG2 Cells via the PI3K/AKT/GLUT4 Pathway [J]. *BioMed Research International*, 2019, 2019: 8171989.
- [27] DING P F, ZHU Q, SHENG B, et al. Alpha-Ketoglutarate Alleviates Neuronal Apoptosis Induced by Central Insulin Resistance through Inhibiting S6K1 Phosphorylation after Subarachnoid Hemorrhage [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 9148257.
- [28] Cell Sample Preparation | AAT Bioquest [EB]. <https://www.aatbio.com/resources/guides/cell-sample-preparation.html>.
- [29] 梁雨彤, 戴临风, 郭瑞怡, 等. 高效液相色谱法在中药成分定量分析中的研究进展[J]. 化学与粘合, 2022, 44(4): 341-344.
- [30] 张晓丽, 迟名锋, 张宁, 等. 去甲乌药碱的药理作用和含量测定的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2022, 38(18): 3145-3148, 3153.
- [31] 罗鸣. 药物检验分析中应用超高效液相色谱法的研究[J]. 江西医药, 2022, 57(5): 450-453.
- [32] 杜丽红, 郝亚男, 陈宁, 等. 有机氮源及其在微生物发酵中的应用[J]. 发酵科技通讯, 2019, 48(1): 1-4.
- [33] 张文芝, 郭坚华. 微生物发酵工艺优化研究进展[J]. 广东农业科学, 2013, 40(6): 114-117.

Optimization of Fermentation Culture Conditions and Hypoglycemic Activity of Endophytic Actinomycetes Producing Dendrobium Alkaloids

LU Wei^{1,2}, LIU Jia-meng¹, QIN Lu-qi¹, ZHENG Jia-huan¹, GUO Run-fang^{2*}, FAN Bei^{1*}

¹ Institute of Agricultural Products Processing, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

² College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: 【Objective】To optimize the fermentation culture conditions of endophyte *Pseudomonas protegens* CM-YJ 44 to improve the production of the dendrobium alkaloids. 【Method】The single factor and orthogonal experiment were used to optimize the fermentation culture conditions, and HPLC was used to select the optimal culture conditions with the highest production. Insulin Resistant human hepatocellular carcinoma model induced by palmitic acid (PA) combined with hyper insulin were used investigate the hypoglycemic bioactivity of secondary metabolites of this strain. With the Metformin (Met) as a positive control and the intake of 2- (n-7-nitro-2, 1, 3-benzooxadiazol-4-amino) -2-deoxy-d-glucose (2-NBDG) was used as a reference point. 【Result】The optimal fermentation medium was as follows, yeast powder 3 g/L, malt powder 5 g/L, fructose 5 g/L, NaCl 1 g/L, vitamin B₁ 0.5 g/L, initial pH value 6.5. And the highest yield of dendrobium alkaloids from strain CM-YJ 44 reached at 39.86 mg/mL when cultured with 28 °C for 48 h at the speed of 200 rpm/min. It was also found that under the treatment of 50 and 100 ng/mL dendrobium and secondary metabolites, the cell viability were 101% and 91.62%, respectively, and the uptake of 2-NBDG was significantly increased. 【Conclusion】The yield of dendrobium alkaloids was the highest under the optimum culture conditions. The hypoglycemic activity of the secondary metabolites of the strain was better than that of Dendrobium at the concentration of 50 and 100 ng/mL, and both of them were better than Met.

Keywords: endophyte of dendrobium; process optimization; dendrobium alkaloids; human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells; hypoglycemic