

刘紫英,袁 斌,冷桂华. 1 株华木莲内生真菌的抗氧化活性分析和菌株鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):213-216.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.059

# 1 株华木莲内生真菌的抗氧化活性分析和菌株鉴定

刘紫英<sup>1</sup>,袁 斌<sup>2</sup>,冷桂华<sup>1</sup>

(1. 宜春学院化学与生物工程学院/江西省天然药物活性成分重点实验室,江西宜春 336000;

2. 宜春学院生命科学与资源环境学院,江西宜春 336000)

**摘要:**华木莲(*Sinomanglietia glauca* Z. X. Yu et Q. Y. Zheng)为木兰科中我国特有的单种属植物,全世界唯宜春特有的珍稀濒危新树种,对从华木莲叶片中分离的多株内生真菌进行抗氧化活性分析,筛选出抗氧化性较高的菌株并鉴定。筛选华木莲叶片的内生真菌,制备其发酵液提取物,采用 TBA 反应法、超氧阴离子自由基( $O_2^- \cdot$ )、羟基自由基( $\cdot OH$ )清除能力的分析测定其抗氧化活性,对抗氧化活性高的内生真菌菌株利用试剂盒提取内生真菌总 DNA,扩增其 rDNA 的 ITS 序列并测序。结果显示,菌株 SL-3 的总抗氧化活性很高,比对照、以维生素 C 为底物的高。通过对抗氧化活性成分的分析可知,该菌株含有黄酮类化合物。对菌株 SL-3 进行形态和分子鉴定,确定为产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)。说明内生真菌 SL-3 产黄青霉具有明显和稳定的抗氧化活性,可用于抗氧化活性成分发酵生产的微生物资源。

**关键词:**华木莲;内生真菌;抗氧化活性;ITS 序列;黄酮类化合物;菌株鉴定;产黄青霉;微生物资源

**中图分类号:** S567.23<sup>+</sup>9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0213-04

华木莲(*Sinomanglietia glauca* Z. X. Yu et Q. Y. Zheng)别称落叶木莲,为我国特有单种属植物,属于木兰科,已被列为国家 I 级重点保护植物,全球仅狭域分布于江西省宜春市,是特有的珍稀树种。目前,国内外仅施建敏等对华木莲叶黄酮类化合物和多糖的抗氧化作用进行了研究,结果显示,华木莲叶内黄酮类化合物和多糖的抗氧化性效果很好<sup>[1-2]</sup>,华木莲具有潜在的利用价值,可成为抗衰老保健品辅料或功能因子<sup>[3]</sup>。现有研究结果表明,植物内生真菌可能产生与其宿主

体内相同或相似的生理活性成分,植物内生菌是分离新的天然活性成分和开发新药的潜在资源,成为当今的研究热点<sup>[4-5]</sup>。笔者前期已研究过华木莲叶中内生真菌的群落结构<sup>[6]</sup>,分离并鉴定 74 株华木莲叶内生真菌。现以华木莲的内生真菌为研究对象,通过对多株内生真菌进行发酵振荡培养,利用硫巴比妥酸(TBA)反应法、超氧阴离子自由基( $O_2^- \cdot$ )、羟基自由基( $\cdot OH$ )清除能力研究其培养液提取物具有抗氧化活性,筛选出抗氧化活性成分的内生真菌并鉴定其种属。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

华木莲取材于江西省宜春市明月山风景区周边林木种植

收稿日期:2016-01-25

基金项目:江西省天然药物活性成分重点实验室开放基金。

作者简介:刘紫英(1979—),女,江西万年人,硕士,副教授,从事微生物工程技术研究。E-mail:yingziliu2008@163.com。

- [7] Kuddus M, Ramteke P W. Cold-active extracellular alkaline protease from an alkaliphilic *Stenotrophomonas maltophilia*: production of enzyme and its industrial applications [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(11): 1294-1301.
- [8] Wang Q F, Hou Y H, Xu Z, et al. Purification and properties of an extracellular cold-active protease from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ276 [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 38(3): 362-368.
- [9] Acevedo J P, Rodriguez V, Saavedra M, et al. Cloning, expression and decoding of the cold adaptation of a new widely represented thermolabile subtilisin-like protease [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(2): 352-363.
- [10] 陈吉刚, 李文晨, 罗 楠, 等. 产蛋白酶北极海洋耐冷菌 ArcB82306 的筛选及其蛋白酶性质 [J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(6): 858-862.
- [11] Margesin R, Palma N, Knauseder F. Protease of psychrotrophic bacteria isolated from glaciers [J]. Journal of Basic Microbiology, 1991, 31(5): 377-383.

- [12] Kasana R C. Proteases from psychrotrophs: an overview [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2010, 36(2): 134-145.
- [13] Huston A L, Methe B, Deming J W. Purification, characterization, and sequencing of an extracellular cold-active aminopeptidase produced by marine psychrophile *Colwellia psychrerythraea* strain 34H [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3321-3328.
- [14] Kim J I, Lee S M, Jung H J. Characterization of calcium-activated bifunctional peptidase of the psychrotrophic *Bacillus cereus* [J]. Journal of Microbiology, 2005, 43(3): 237-243.
- [15] Vazquez S, Ruberto L, Cormack W M. Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil [J]. Polar Biology, 2005, 28(4): 319-325.
- [16] 曾胤新, 陈 波. 极区低温海洋细菌及其产酶情况的初步研究 [J]. 生物技术, 2002, 12(1): 10-12.
- [17] Deechongkit S, Wen J, Narhi L O, et al. Physical and biophysical effects of polysorbate 20 and 80 on darbepoetin alfa [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 98(9): 3200-3217.

场所,分别取新鲜健康植株的叶片,组织分离法分离内生真菌,菌株存于宜春学院江西省天然药物活性成分研究重点实验室微生物药物实验室,分别编号为 SL-1、SL-2、SL-3、SL-22、SL-56、SL-68。

### 1.2 培养基

察氏培养基培养液成分包括  $\text{NaNO}_3$  2.0 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g、KCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4$  0.5 g、硫酸铁 0.01 g、蔗糖 30 g、水 1 000 mL, pH 值自然, 121 °C 灭菌 20 min。

### 1.3 仪器与设备

高速离心机 (TGL-16G 型)、紫外可见分光光度计 SFZ-UV-2000 型 (龙尼柯仪器有限公司)、数显恒温水浴锅 HH-6 (国华电器有限公司)、EHG-B 恒温摇床培养箱 (江苏亿通电子有限公司)、PHSJ-4A 精密酸度计 (上海雷磁分析仪器厂)、RE-2000A 旋转蒸发器 (上海嘉鹏科技有限公司)、大龙移液器手动单道可调移液枪 100~1 000  $\mu\text{L}$  (芬兰 Dragonmed 公司)、SHZ-III/SHZ-IIID 循环水真空泵 (上海京工实业有限公司)。

### 1.4 样品与试剂

芸香苷标准品 (10270-200901, 中国药品生物制品检定所)、硫巴比妥酸 (TBA)、三氯乙酸、正丁醇、抗坏血酸、葡萄糖、硝酸钠、磷酸氢二钾、氯化钾、七水硫酸镁、硫酸铁、精制花生油、邻苯三酚、水杨酸钠、过氧化氢、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醚等, 以上试剂均为分析纯。

### 1.5 试验方法

**1.5.1 菌株活化并扩大培养** 从实验室保存的菌种中挑取少量接种于察氏培养基上培养 6 d, 用打孔器在平板上取长势较好的培养菌丝并接种, 用于扩大培养。在 250 mL 三角瓶中装 100 mL 察氏液体培养基, 用 12 层纱布包好都放入灭菌锅中灭菌 20 min, 于 28 °C、160 r/min 下振荡培养 7 d。

**1.5.2 发酵液提取物的制备** 将培养液进行抽滤除去菌丝和菌丝球, 利用旋转蒸发器进行减压蒸发浓缩, 将 100 mL 的培养液浓缩至 3~4 mL, 加入足量无水乙醇振荡, 提取, 于 5 000 r/min 下离心 15 min, 弃沉淀, 留上清液。将上述提取液用无水乙醇定容至 25 mL。

**1.5.3 TBA 反应法测定培养液提取物抗氧化活性<sup>[7]</sup>** 采用的 TBA 反应法略有改动, 配制 2.5% 精制花生油乙醇溶液作为底物, 在各个比色管中分别加入 0.02% 芸香苷、抗坏血酸和菌株培养液提取物 (以上均采取底物 4 mL、反应 6 mL 进行反应), 混匀后于 37 °C 水浴中存放; 每 24 h 取出 1 mL 待测液样品, 加入 1 mL 25% 三氯乙酸, 混匀, 放置 5 min, 然后加入 1 mL 0.67% TBA, 于沸水中加热 20 min; 取出, 冷却, 再加入 4 mL 正丁醇, 剧烈振荡, 于 4 000 r/min 下离心 10 min, 取上层正丁醇液, 于 532 nm 波长处比色; 以蒸馏水代替抗氧化剂的空白样品作为对照, 存放 24、48、72、96、120、144 h 后测  $D_{532\text{ nm}}$  值。

**1.5.4 超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 清除能力的测定<sup>[8]</sup>** 采用邻苯三酚自氧化进行测定, 取 4.5 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 8.2), 4.2 mL 蒸馏水混匀后在 25 °C 水浴中保温 20 min, 取出后立即加入在 25 °C 水浴中预热过的 3 mmol/L 邻苯三酚 0.3 mL, 迅速摇匀, 倒入比色杯, 325 nm 下每隔 30 s 测定吸光度, 计算线性范围内 1 min 内吸光度的

增加量, 以 10 mmol/L HCl 溶液配制空白管作为对照。按照上述方法步骤加入邻苯三酚前先分别加入 0.1 mL 不同的样品液, 同样 10 mmol/L HCl 溶液配制空白管作为对照, 同样方法测定吸光度。前后 2 次的样品吸光度差 ( $\Delta D$ ) 与测定时间差 ( $\Delta T$ ) 的比值即为该时段的邻苯三酚自氧化速率。

清除能力率 =  $(\Delta D_1/\Delta T - \Delta D_2/\Delta T)/\Delta D_1/\Delta T \times 100\%$ 。

式中:  $\Delta D_1/\Delta T$  代表邻苯三酚自氧化时反应速率;  $\Delta D_2/\Delta T$  代表加入样品液后邻苯三酚自氧化反应速率。

**1.5.5 样品对羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 的清除率<sup>[9]</sup>** 采用水杨酸比色法进行测定, 在 4 mL 反应液 (含 0.15 mol/L 硫酸亚铁 1 mL、6 mmol/L 水杨酸钠 1 mL) 中加入不同浓度的样品 1 mL, 再加入双氧水启动反应; 37 °C 水浴中反应 1 h, 测定 510 nm 处的吸光度, 吸光度越大, 则清除羟基自由基效果越好。

$\cdot\text{OH}$  清除率 =  $[D_0 - (D_i - D_{0i})]/D_0 \times 100\%$ 。

式中:  $D_0$  代表用蒸馏水代替样品的对照值;  $D_i$  代表加样品后的吸光度;  $D_{0i}$  代表样品本底吸光度。

**1.5.6 芸香苷标准曲线的绘制和发酵液中黄酮类化合物浓度的测定<sup>[10]</sup>**

**1.5.6.1 标准曲线的绘制** 称取 0.001 5 g 芸香苷标样, 溶于 15 mL 的 30% 乙醇溶液中, 分别取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 此溶液于 10 mL 比色管中, 各补加 30% 乙醇溶液使成 5 mL 体积。加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min; 加 100 mg/L 硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min; 加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 4.0 mL, 再加蒸馏水稀释到刻度, 摇匀, 静置 15~20 min 后, 于 510 nm 处测定吸光度  $D$ 。

**1.5.6.2 样品浓度的测定** 分别取 6 个不同编号的 10 mL 比色管, 装入样品各 5 mL, 依次加入 50 mg/L 亚硝酸钠 0.3 mL, 静置 6 min; 加 100 mg/L 硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min; 加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 4.0 mL, 静置 15~20 min, 同时以 30% 乙醇溶液代替样品液配制空白试剂, 在 510 nm 处测定吸光度  $D$ 。

**1.5.7 抗氧化活性高的内生真菌菌株的分子鉴定** 用生工生物工程上海 (股份) 有限公司的真菌基因组 DNA 提取试剂盒和 PCR 试剂盒进行扩增、ITS (internal transcribed spacer) 序列分析, 即根据已知真菌的保守序列设计 1 对特异性引物 ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCCG - 3') 和 ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'), PCR 扩增采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系, 反应条件: 94 °C 1 min; 55 °C 30 s; 72 °C 1 min 30 个循环; 72 °C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收纯化目的片段, 纯化产物由生工生物工程上海 (股份) 有限公司测序。以 NCBI 数据库中 Blastn 程序比对分析, 使利用 MEGA 6.0 软件和邻接法 (neighbour-joining methods) 进行聚类分析鉴定种属。

## 2 结果与分析

### 2.1 TBA 反应法测华木莲内生真菌抗氧化活性

以 2.5% 精制花生油乙醇溶液作为底物进行反应, 其结果见表 1。清除率 = (对照的  $D_{532\text{ nm}}$  - 样品的  $D_{532\text{ nm}}$ ) / 对照的  $D_{532\text{ nm}} \times 100\%$ 。由表 1 可知,  $D_{532\text{ nm}}$  值越小, 抗氧化活性越高。随着时间的延长, 该 6 株内生真菌的发酵液提取物与各抗氧化

剂均不同程度抑制了花生油的脂质过氧化。培养 144 h 时停止该试验,数据显示抑制作用还很明显,其样品清除率从大到小依次为 SL-3>SL-68>SL-22>维生素 C>SL-1=芸

香苷>SL-2>SL-56,由此可见菌株 SL-3、SL-68、SL-22 可以较显著地延缓花生油的脂质过氧化过程,具有相对较强的抗氧化能力,值得进一步研究。

表 1 TBA 法测定的华木莲内生真菌发酵液抗氧化性

发酵液	$D_{532\text{ nm}}$						144 h 的清除率 (%)
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	
SL-1	0.111	0.204	0.284	0.382	0.412	0.429	15.38
SL-2	0.137	0.214	0.281	0.376	0.401	0.426	15.00
SL-3	0.068	0.114	0.216	0.307	0.328	0.354	29.30
SL-22	0.118	0.211	0.254	0.384	0.407	0.418	16.57
SL-56	0.134	0.217	0.275	0.389	0.415	0.438	12.57
SL-68	0.079	0.221	0.271	0.311	0.378	0.410	18.16
芸香苷	0.141	0.211	0.263	0.382	0.424	0.456	8.98
维生素 C	0.147	0.215	0.281	0.364	0.397	0.424	15.37
无菌水(CK)	0.154	0.277	0.333	0.471	0.498	0.501	0

2.2 华木莲内生真菌发酵液对超氧阴离子自由基清除率

从表 2 可以看出,样品中有效成分越多,清除率越高,其中最高效的是样品 SL-3,其清除率高达 21%,其次是

SL-68。由此可以看出,SL-3 和 SL-68 都是抗氧化性物质高产菌株,很有开发前景。

表 2 华木莲内生真菌发酵液对超氧阴离子自由基清除率

发酵液	$D_0$	$D_1$	$D_2$	$\Delta D_1 = (D_1 - D_0)$	自氧化速率	$\Delta D_2 = (D_2 - D_1)$	清除率 (%)
蒸馏水	1.742	1.765	1.787	0.023	0.000 8	0.022	4.35
SL-1	1.744	1.765	1.785	0.021	0.000 7	0.020	4.76
SL-2	1.745	1.766	1.786	0.021	0.000 7	0.020	4.76
SL-3	1.746	1.765	1.780	0.019	0.000 6	0.015	21.05
SL-22	1.752	1.772	1.791	0.020	0.000 7	0.019	5.00
SL-56	1.757	1.779	1.799	0.022	0.000 7	0.020	9.09
SL-68	1.747	1.771	1.792	0.024	0.000 8	0.021	12.50

2.3 华木莲内生真菌发酵液对羟基自由基的清除率

从表 3 可知,华木莲内生真菌发酵液对羟基自由基的清除率从大到小依次为 SL-3>SL-68>SL-22>SL-2>SL-56>SL-1,相对于超氧阴离子自由基的清除率普遍较高。内生真菌 SL-3、SL-68、SL-22 对羟基自由基的清除率都比较高,其中 SL-3 的清除率为 64.03%,远远高于其他菌株,显示出很高的抗氧化性。

表 3 华木莲内生真菌培养液对羟基自由基的清除率

发酵液	$D_{0i}$	$D_i$	$D_i - D_{0i}$	清除率 (%)
蒸馏水	0	1.126	1.126	0
SL-1	0.016	0.922	0.906	19.54
SL-2	0.118	0.909	0.791	29.75
SL-3	0.424	0.829	0.405	64.03
SL-22	1.197	1.822	0.625	44.49
SL-56	0.038	0.836	0.798	29.13
SL-68	0.815	1.313	0.498	55.77

2.4 内生真菌培养液的抗氧化物质中黄酮类化合物浓度

由不同浓度芸香苷绘制得到标准曲线(图 1),根据该曲线得到标准方程: $y = 0.018\ 9x - 0.046\ 2$ , $r^2 = 0.963\ 3$ 。式中, $x$  代表芸香苷浓度; $y$  代表吸光度。

同样有 6 种样品在 510 nm 处的吸光度以及代入式中得到的抗氧化物质的浓度见表 4。从表 4 可以看出,SL-3、

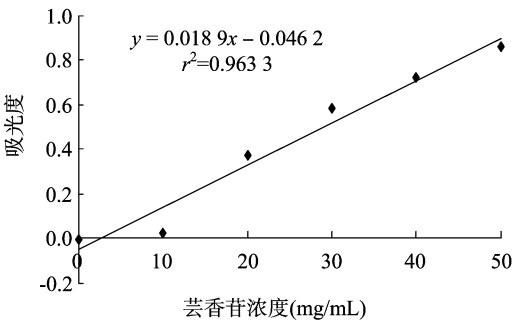


图 1 芸香苷标准曲线

SL-68 的抗氧化物质浓度较高,分别为 34.338、19.851  $\mu\text{g/mL}$ 。

表 4 华木莲内生真菌发酵液中黄酮类抗氧化物质浓度

发酵液	吸光度 $D$	抗氧化物的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
SL-1	0.026	3.820
SL-2	0.089	7.153
SL-3	0.603	34.338
SL-22	0.236	14.931
SL-56	0.069	6.095
SL-68	0.329	19.851

综上可知,内生真菌 SL-3 的 TBA 可以较显著地延缓脂

质过氧化过程,具有相对较强的抗氧化能力,对超氧阴离子自由基和羟基自由基的清除率效果很好;SL-3 含黄酮类抗氧化物质浓度较高,为 34.338  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,是抗氧化性物质高产菌株,因而对其进行种属鉴定。

## 2.5 华木莲内生真菌 SL-3 种属鉴定

华木莲内生真菌 SL-3 形态学鉴定的方法参见笔者前期的华木莲叶中内生真菌的群落结构研究<sup>[6]</sup>,其形态学特点为典型的青霉属真菌,现对其进行分子鉴定,经扩增 5.8S rDNA 序列,并测序内生真菌 SL-3 的 ITS 区含 548 bp,通过 Gen-

Bank 中进行 Blast 比对,应用 MEGA 6.0 软件中邻接法(neighbour-joining methods, NJ)构建聚类分析树状图,bootstrap 检验值 $\geq 50\%$ ,1 000 次重复。基于 10 个菌株 ITS 序列采用邻接法构建系统发育树,以确证 SL-3 菌株的分类归属(图 2),由此可以看出与内生真菌 SL-3 处于同一分支的 4 株菌株均为产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*),并且这个菌株与产黄青霉的 ITS 序列相似性达 99%。Renske 等认为,通过 ITS 区域比对,序列相似性 $\geq 99\%$ ,鉴别为相同种,即内生真菌 SL-3 鉴定为产黄青霉<sup>[11]</sup>。

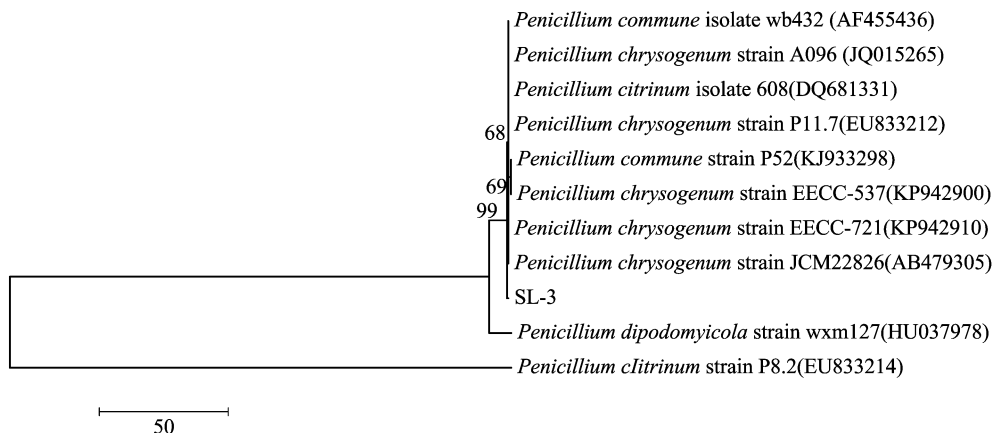


图2 采用邻接法构建的华木莲内生真菌SL-3菌株与相关种的系统发育树

## 3 结论

目前,寻找外源性自由基清除剂和抗氧化剂来延缓衰老,已经成了国内外研究热点,木兰科植物黄酮类化合物含量的测定已有不少研究,但是抗氧化性能方面的研究很少。因此,本试验采用华木莲的内生真菌作为对象研究其抗氧化性,结果显示华木莲叶内生真菌 SL-3 是可以产生较多抗氧化物质的菌株,符合相关文献描述的植物内生真菌可以产生与植物本身相似或相同的抗氧化物质<sup>[5]</sup>,而且提取物中的抗氧化物质还是比较多的,对于超氧阴离子自由基、羟基自由基有较强的抑制作用,它们的多种抗氧化活性预示着其产生相关抗氧化化合物的能力;有望成为较好的天然抗氧化性物质,为进一步对其发酵工艺研究成为抗衰老保健品的辅料或功能因子奠定理论基础。

## 参考文献:

- [1] 施建敏,俞志雄,庞会忠,等. 华木莲叶黄酮类化合物抗氧化作用[J]. 江西农业大学学报,2006,28(5):693-697.
- [2] 庞会忠,俞志雄,施建敏,等. 华木莲叶多糖的提取及其抗氧化作用[J]. 江西农业大学学报,2006,28(6):813-818.
- [3] 郑庆衍,郑峻嵘. 新发现的濒危树种——落叶木莲[J]. 植物杂

- 志,2000(1):1.
- [4] Phongpaichit S, Nikom J, Rungjindamai N A, et al. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2007, 51(3): 517-525.
- [5] 徐范范. 药用植物内生真菌产次生代谢产物的研究进展[J]. 医学综述,2010,16(17):2667-2669.
- [6] 刘紫英,冷桂华,周秀玲. 华木莲叶中内生真菌的群落结构[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):316-318.
- [7] 霍娟,陈双林. 杜仲内生真菌抗氧化活性[J]. 南昌大学学报,2004,28(3):270-275.
- [8] Strobel G A. Endophytes as sources of bioactive products [J]. Microbes and Infection( Institut Pasteur ),2003,5(6):535-544.
- [9] 王梦亮,郭婷婷,张娜莎,等. 2 株长白红景天内生真菌的鉴定及抗氧化活性条件的优化[J]. 天然产物研究与开发,2015(27):667-673,654.
- [10] 杜晓宁,代金霞. 宁夏枸杞内生菌抗氧化活性菌株的筛选与鉴定[J]. 中国中药杂志,2015,40(20):3941-3944.
- [11] Renske L, Paula L, Thom W K, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons [J]. Applied and Environmental Microbiology,2003,69(1):327-333.