

白及内生真菌的分离鉴定及其胞外多糖的抗氧化活性分析

董燕婧, 程访, 许小珍, 曾艺, 张寿文*

(江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004)

[摘要] 目的:缓解白及药用资源压力,分离鉴定白及内生真菌并进行内生真菌胞外多糖活性强弱研究。方法:分离鉴定白及内生真菌,进行液体发酵培养获得胞外多糖,通过建立铁氰化钾法,2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)法,水杨酸法,2-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)法4种体外模型研究白及内生真菌胞外多糖的抗氧化活性。结果:从白及新鲜根中分离得到10株内生真菌,鉴定合并菌株后得到6株不同的菌株,其中10号菌株胞外多糖($0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)总还原力最强,其维生素C(VC)当量高达 $12.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,其次为6号菌株;清除DPPH自由基活性最强的为1号和6号菌株为16.6%;6号菌株清除羟基自由基活性最强为21.6%,最弱的为10号菌株仅为11.0%;测定其清除ABTS自由基活性时则发现,10号菌株活性最强为13.6%,其次为6号菌株,最弱的为5号仅为1.8%。结论:白及内生真菌胞外多糖具有一定的抗氧化活性,其中6号菌株胞外多糖总还原力,清除DPPH自由基活性,清除羟基自由基活性、清除ABTS自由基均较好,可以加以开发和利用。

[关键词] 白及;胞外多糖;抗氧化;内生真菌;分离鉴定

[中图分类号] R282.2;R2-0;R284;R241 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0024-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181047

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1037.035.html>

[网络出版时间] 2018-03-09 11:50

Isolation and Identification of Endophytic Fungi of Bletillae Rhizoma and Investigation of Antioxidative Activity of Its Exopolysaccharides

DONG Yan-jing, CHENG Fang, XU Xiao-zhen, ZENG Yi, ZHANG Shou-wen*

(Research Center for Traditional Chinese Medicine (TCM) Resource and Ethnic Minority Medicine, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and identify Bletillae Rhizoma fungi and study on the exopolysaccharides activity of endophytic fungi, in order to alleviate the pressure of Bletillae Rhizoma medicinal resources. **Method:** Bletillae Rhizoma endophytic fungi were isolated and identified, and then exopolysaccharides were obtained through liquid fermentation. The antioxidant activity of exopolysaccharide in Bletillae Rhizoma roots endophytic fungi was studied by establishing 4 kinds of *in vitro* models, including iron potassium cyanide, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), salicylic acid and 2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) methods. **Result:** The 10 endophytic fungi were isolated from Bletillae Rhizoma fresh roots, and 6 strains were obtained after identification and combination. The exopolysaccharides of No. 10 strain ($0.1\text{ g}\text{ L}^{-1}$) had the strongest total reducing power, with VC equivalent up to $12.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, followed by No. 6 strain. No. 1 and No. 6 strains had the strongest DPPH free radical scavenging activities (16.6%). Strain 6 had the strongest hydroxyl radical scavenging activities (21.6%) and No. 10 strain had the weakest activity (11.0%) on scavenging hydroxyl radical. In the detection of ABTS free radical scavenging activity, it was found that No. 10 strain had the

[收稿日期] 20171109(013)

[基金项目] 江西省重点研发计划项目(20161BBF60072);江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC16S23)

[第一作者] 董燕婧, 硕士, 从事中药资源开发与利用研究工作, E-mail: 990464593@qq.com

[通信作者] *张寿文, 博士, 教授, 从事中药资源开发与利用工作, E-mail: 546572890@qq.com

strongest activity (13.6%), followed by No. 6 strain, and the weakest was only 1.8% for No. 5 strain.

Conclusion: The exopolysaccharides of *Bletillae Rhizoma* endophytic fungi has certain antioxidant activity, and the exopolysaccharides of No. 6 strain has better total reducing power, higher scavenging activities of DPPH free radicals, hydroxyl radicals, and ABTS free radicals, so it can be further developed and utilized.

[**Key words**] *Bletillae Rhizoma*; exopolysaccharides; antioxidant; endophytic fungi; isolation and identification

白及为兰科多年生草本植物,为我国紧缺濒危中药材,被列入濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES)的附录中,受到国际保护;其主要活性成分为白及多糖,具有收敛止血、延缓皮肤衰老、抗菌等多种生物活性,被广泛用于医药、化工、化妆品等领域^[1-4]。为了缓解其野生资源压力,实现白及资源的可持续性利用,目前众多学者开展了白及快速繁殖初步研究,其中王楷等^[5-7]从白及种子着手,研究了不同培养基、激素以及添加物等对其生长的影响,建立了白及无性繁殖体系;然而,组培苗出瓶移栽驯化过程中抗逆性差、移栽存活率低等问题突出,使得其在短期内难以快速大规模推广应用。究其原因可能是快繁过程中没有共生菌与其相互作用。近年来有关报道表明,在兰科植物的整个生命过程中都与共生真菌紧密联系,真菌直接或者间接影响着兰科植物种子萌发,植株营养生长,以及植株生理代谢活动等^[8-10]。然而,关于白及内生真菌的研究多集中在内生真菌的分离鉴定及多样性方面,未见有关白及内生真菌胞外多糖与白及药材多糖活性比较研究的报道^[11-13]。因此,本文从白及新鲜植株健康根系中分离白及内生真菌,对内生真菌鉴定培养后采用还原/抗氧化能力,清除 2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)自由基、羟基自由基活性和 2-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)自由基活性,研究其胞外多糖活性,旨在筛选出生产抗氧化活性较强的胞外多糖白及内生真菌,以便进一步利用真菌工业化生产活性较强的胞外多糖来替代白及多糖,为缓解白及药用资源压力和研制开发相关药物制剂方面提供参考。而且,与植物多糖相比,真菌胞外多糖成本低廉、无原料来源问题、产量可观并且易于分离、便于实现工业化大规模生产^[14-16]。

1 材料

2017 年 3 月至 2017 年 8 月从江西中医药大学神农园挖取白及新鲜植株,经江西中医药大学赖学文教授鉴定确定为兰科多年生草本植物白及 *Bletilla striata*。

DPPH(美国 Aladdin 公司,批号 G1712053,规格

250 mg,纯度 HPLC $\geq 97\%$); ABTS(上海蓝季科技发展有限公司,批号 170325,规格 1 g,纯度 HPLC $\geq 98\%$);水为超纯水,试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 菌种的分离鉴定 取白及新鲜植株生长健康的根系部分,洗净表面泥沙,在流水下冲洗 2 h 后放于紫外灯下灭菌 30 min。在无菌操作台上利用 75% 乙醇和 0.1% 升汞、不同浓度的次氯酸钠组合灭菌,灭菌后用清水清洗 3~5 次,洗去残留在根系表面的消毒剂,无菌滤纸吸干表面水分,将整条根系剪成 3~5 mm 的小段,接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板培养基上。不同的组合灭菌方式为① 75% 乙醇 + 体积分数分别为 0.1% 升汞分别消毒 1, 2, 3, 4, 5, 6 min; ② 75% 乙醇 + 体积分数分别为 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0% 的次氯酸钠消毒 1, 2, 3, 4, 5, 6 min。每个平板接种 3 个根段作为实验组,以不剪除与消毒液接触两端的根段作为对照组,实验组与对照组分别进行 3 次重复试验。

将组合灭菌后分离出的白及内生真菌液体发酵培养,提取菌丝 DNA 后利用分子生物学方法进行鉴定。

2.2 菌种的复苏和发酵 对菌株进行复苏和液体发酵。将菌种取出冷却至室温后接种于 PDA 平板培养基上,28 °C 活化培养 1 周左右,接种于马铃薯葡萄糖(PD)液体培养基(250 mL 锥形瓶装液量为 100 mL),每瓶接入 3 块直径大小一致的菌块。于 120 r·min⁻¹, 28 °C 条件下连续培养 2 周。

2.3 胞外粗多糖的提取 将发酵液减压抽滤,使菌丝和菌液完全分离。60 °C 减压浓缩菌液,最后定容于 25 mL 的量瓶中,冷却后加入 3 倍量 95% 乙醇,4 °C 冰箱中静置保存 24 h,使多糖充分沉淀析出。6 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃去上清液,所得固体依次用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗 3 次,60 °C 干燥至恒重,所得粉末即为白及内生真菌胞外粗多糖,将胞外粗多糖样品置于干燥器中保存备用。

2.4 Sevag 法除蛋白质 使用 Sevag 法除蛋白质,正丁醇与 4 倍体积的三氯甲烷混合后得 Sevag 试

剂。将粗多糖完全溶解于少量蒸馏水中,按 Sevag 试剂-样品(1:1)加入离心管中(总体积小于离心管的 80%),充分混匀振摇 25 min,在 1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下离心 5 min,取上清液,重复操作 3 次。加入 3 倍量 95% 乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置保存 24 h,使多糖充分沉淀析出,6 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃去上清液,所得的固体 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重后置于干燥器中保存备用。

2.5 粗多糖的抗氧化活性测定 提取分离得到白及内生真菌胞外多糖 6 个样品,将胞外多糖样品用水完全溶解[加入少量二甲基亚砷(DMSO)辅助溶解],配成 0.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样液备用。分别对这些样品进行总还原能力, DPPH 自由基,羟基自由基以及 ABTS 自由基清除活性的测定。

2.5.1 总还原能力的测定 采用石红霞测定真菌胞外多糖总还原力方法^[17]测定其抗氧化活性。在 700 nm 处测定吸光度 A ,实验平行 3 次,结果取平均值,并以维生素 C(VC)为阳性对照,绘制标准曲线。

2.5.2 清除 DPPH 自由基活性测定 采用石红霞^[17]测定真菌胞外多糖清除 DPPH 自由基方法测定其活性。用无水乙醇作参比液,在 517 nm 处测 $A_{\text{样品}}$ 。用 2 mL 的无水乙醇代替样品,测定空白 $A_{\text{空白}}$ 。用 2 mL 的无水乙醇代替 DPPH 储备液,测定 $A_{\text{对照}}$ 。实验平行 3 次,结果取平均值,按下列公式计算清除率。

$$\text{清除率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})] / A_{\text{空白}} \times 100\% \quad (\text{式} 1)$$

2.5.3 清除羟基自由基活性测定 采用石红霞^[17]测定真菌胞外多糖清除羟基自由基方法测定其活性。用水作参比液,在 510 nm 处测定 $A_{\text{样品}}$,用无水乙醇 1 mL 代替 0.1% H_2O_2 ,测定 $A_{\text{对照}}$,用蒸馏水代替样品,测定空白 $A_{\text{空白}}$,平行实验 3 次,结果取平均值,按式 1 计算清除率。

2.5.4 清除 ABTS 自由基活性测定 采用四乙基氧化铵(TEAC)法^[18]测定。配制 7.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABTS 和 2.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过硫酸钾,等比例混合后室温黑暗保存 12 ~ 16 h 后得 ABTS 母液,用无水乙醇稀释母液至在 734 nm 处 $A_{734 \text{ nm}}$ 为 0.70 ± 0.05 ,得 ABTS 反应液备用。吸取样品液 0.2 mL 和 ABTS 反应液 0.8 mL,充分混匀反应后,静置 6 min 后在 734 nm 处测定 $A_{\text{样品}}$;用无水乙醇 0.2 mL 代替样品测定其 $A_{\text{空白}}$,按下列公式计算清除率。

$$\text{清除率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\% \quad (\text{式} 2)$$

2.6 统计学方法 采用 Excel 2016, SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。

3 结果

3.1 菌株的分离鉴定 对白及新鲜植株健康根系进行消毒灭菌后,筛选出适合白及健康根段表面消毒的最佳组合为 75% 乙醇处理 30 s, 5.0% 次氯酸钠消毒 5 min,最终筛选出 10 株白及内生真菌。经江西中医药大学菌物药研究中心苏明生老师利用分子生物学方法提取真菌菌丝 DNA,分析得到 6 株菌株,见表 1。

表 1 白及内生真菌鉴定信息

Table 1 Identification of *Bletillae Rhizoma* endophytic fungi

菌种	编号
<i>Chaetomium aureum</i> (金毛壳菌)	1,2,3,8,9
<i>Acremonium</i> sp. (支顶孢属)	5
<i>Fusarium solani</i> (茄病镰刀菌)	6
<i>Phytophthora palmivora</i> (棕榈疫霉)	7
<i>Fusarium</i> sp. (镰刀菌属)	10
-	4

注:4 号菌株未能成功鉴定,须进一步研究。

3.2 总还原力活性 白及内生真菌胞外多糖把铁氰化钾中的三价铁离子还原成二价铁,进一步与三氯化铁反应生成在 700 nm 处具有最大 A 的普鲁士蓝($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$)^[19],其 A 可以间接反应胞外多糖还原能力的大小, A 越大,还原能力越强。以 VC 质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 16.508X + 0.0077 (R^2 = 0.998)$ 。

不同白及内生真菌菌株胞外多糖总还原能力不同,最强的为菌株 10 号,其 VC 当量高达 12.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其次为菌株 6 号(VC 当量为 11.83 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和 1 号菌株(VC 当量为 11.77 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),还原力最弱为菌株 4 号,VC 当量 11.47 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。白及内生真菌胞外多糖总还原力大小顺序为 10 > 6 > 1 > 7 > 5 > 4。见表 2。

3.3 清除 DPPH 自由基活性 DPPH 是一种很稳定的氮中心的自由基,其结构中含有 3 个苯环和 1 个 N 原子上有 1 对孤对电子,其乙醇溶液为紫红色,在 517 nm 处有最大吸收峰。向 DPPH-乙醇试剂中加入胞外多糖样品,其孤对电子被配对,深紫色的 DPPH 被还原成 DPPH-H 形式,颜色变淡,其褪色程度与所接受的电子数量成定量关系,通过测定其吸光度进行分析^[20]。

白及根部内生真菌胞外多糖对 DPPH 自由基清除活性明显,其中菌株 1 和菌株 6 对其清除率高达

表 2 白及内生真菌胞外多糖(0.1 g·L⁻¹)总还原力测定

Table 2 Total reduction force of *Bletillae Rhizoma endophytic extracellular polysaccharide*(0.1 g·L⁻¹)

菌株编号	A	VC 当量/mg·L ⁻¹
1	0.202	11.77
4	0.197	11.47
5	0.198	11.53
6	0.203	11.83
7	0.201	11.71
10	0.206	12.01

16.6%,最低的为菌株 5 号清除率为 13.2%。比较不同白及内生真菌胞外多糖清除 DPPH 自由基活性为 1 = 6 > 7 > 4 > 10 > 5。见表 3。

表 3 白及内生真菌胞外多糖(0.1 g·L⁻¹)对 DPPH 自由基的清除率测定

Table 3 Removal rate of DPPH free radical by *Bletillae Rhizoma endophytic extracellular polysaccharide* (0.1 g·L⁻¹)

菌株编号	A _{对照}	A _{样品}	清除率/%
1	0.037	0.284	16.6
4	0.039	0.293	14.2
5	0.036	0.293	13.2
6	0.035	0.282	16.6
7	0.036	0.286	15.5
10	0.037	0.293	13.5

注: A_{空白}为 0.296。

3.4 清除羟基自由基活性 利用水杨酸法测定白及根部内生真菌胞外多糖清除羟基自由基的活性。本实验中 H₂O₂ 与 Fe²⁺ 反应生成的羟基自由基与水杨酸反应,生成在 510 nm 处有特殊吸收的 2,3-二羟基苯甲酸^[17]。白及内生真菌胞外多糖能够清除羟基自由基,进而使得生成的有色化合物含量减少。在 510 nm 处测定反应液的 A,与空白液相比较,从而测定样品对羟基自由基的清除作用。

不同白及内生真菌胞外多糖对羟基自由基清除活性不同,6 号菌株对羟基自由基清除活性最大为 21.6%,10 号菌株的活性最弱为 11.0%。其活性大小顺序为 6 > 4 > 1 > 7 > 5 > 10。见表 4。

3.5 清除 ABTS 自由基活性 ABTS 经氧化后形成了相对稳定的蓝绿色自由基,在 734 nm 下有吸收峰。加入白及内生真菌胞外多糖后,溶液 A 降低,能够清除 ABTS 自由基。

白及内生真菌胞外多糖具备一定的清除 ABTS

表 4 白及内生真菌胞外多糖(0.1 g·L⁻¹)对羟基自由基清除率的测定

Table 4 Hydroxyl radical scavenging rate by *Bletillae Rhizoma endophytic extracellular polysaccharide*(0.1 g·L⁻¹)

菌株编号	A _{对照}	A _{样品}	清除率/%
1	0.081	0.914	11.9
4	0.080	0.910	12.3
5	0.078	0.918	11.2
6	0.164	0.906	21.6
7	0.077	0.916	11.3
10	0.077	0.919	11.0

注: A_{空白}为 0.946。

自由基的活性,从其清除结果中发现 10 号菌株的清除活性最强为 13.6%,远高于其他菌株;其中活性最弱的为 5 号菌株仅为 1.8%。清除 ABTS 自由基活性大小顺序为 10 > 6 > 5 > 1 > 7 > 5。见表 5。

表 5 白及内生真菌胞外多糖(0.1 g·L⁻¹)对 ABTS 自由基清除率的测定

Table 5 Removal rate of ABTS free radical by *Bletillae Rhizoma endophytic extracellular polysaccharide* (0.1 g·L⁻¹)

菌株编号	A _{样品}	清除率/%
1	0.544	4.1
4	0.536	5.5
5	0.557	1.8
6	0.527	7.1
7	0.548	3.3
10	0.490	13.6

注: A_{空白}为 0.567。

4 讨论

本文从白及根部分离出 10 株内生真菌,合并鉴定菌株得到 6 株^[21],对其进行液体发酵培养,通过建立铁氰化钾法测定其总还原能力,DPPH 法测定其清除 DPPH 自由基活性,水杨酸法测定清除羟基自由基活性,TEAC 法测定清除 ABTS 自由基的活性以研究其胞外多糖体外抗氧化活性。比较分析不同菌株的抗氧化活性发现 6 号菌株的总还原力,清除 DPPH 自由基活性,清除羟基自由基活性和清除 ABTS 自由基活性均较高,其胞外多糖(0.1 g·L⁻¹)清除羟基自由基的活性高达 21.6%,其余菌株清除羟基自由基的活性均为 11.0% ~ 12.3%,且远高于 10 号菌株(清除羟基自由基活性最弱)。这一结果表明白及内生真菌胞外多糖具有一定的抗氧化活性,与孔令嫻^[20]在白及多糖抗氧化活性方面的研究

具有一定的相似性,为缓解白及药用资源压力以及白及内生真菌胞外多糖的开发和应用提供了科学依据。

[参考文献]

[1] 孙爱静,庞素秋,王国权. 中药白及化学成分与药理活性研究进展[J]. 环球中医药,2016,9(4):507-511.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:146.

[3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第19卷(兰科)[M]. 北京:科学出版社,1999:117.

[4] 陆峻波,刘亚辉,杨永红,等. 从文献分析看我国白及研究进展[J]. 云南农业大学学报:自然科学版,2011,26(2):288-292.

[5] 王楷,李玥,张云峰,等. 白及种子的高效萌发及其无性繁殖体系的构建[J]. 云南师范大学学报:自然科学版,2014,34(4):71-78.

[6] 鲁光耀,杨仙,蒋瑞彬,等. 白及组培快速繁殖体系研究[J]. 浙江中医药大学学报,2015,39(5):383-390.

[7] 张燕,黎斌,李思锋. 不同培养基上白及的种子萌发与幼苗形态发生[J]. 西北植物学报,2009,29(8):1584-1589.

[8] 郑超文,肖娅萍. 兰科菌根真菌研究方法的概述[J]. 微生物学杂志,2014,34(4):85-89.

[9] 何炜,杨晓红,戴木兰,等. 兰科菌根共生效应研究进展[J]. 安徽农业科学,2008(17):7206-7207,7226.

[10] 周德平,吴淑杭,姜震方,等. 兰科植物内生真菌的功能及应用前景[J]. 上海农业学报,2005(3):110-113.

[11] 韦艳梅,周雅琴,李力,等. 白及内生真菌多样性研究[J]. 广西植物,2016,36(7):832-836,831.

[12] 苏子敬. 白及内生菌的分离与鉴定[D]. 重庆:重庆师范大学,2015.

[13] 陶刚. 中国贵州兰科植物白及内生真菌多样性及生态分布研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009.

[14] 李传民. 绞股蓝内生真菌高产胞外多糖发酵条件的优化及结构分析[D]. 郑州:河南工业大学,2016.

[15] 杨同香,吴孔阳,陈俊亮,等. 真菌发酵胞外多糖的研究进展[J]. 食品科学,2016,37(5):265-270.

[16] 王春宴. 海洋真菌胞外多糖的结构及抗氧化活性研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2013.

[17] 石红霞. 明月草内生真菌发酵产物活性及与植物生长关系的研究[D]. 兰州:兰州理工大学,2016.

[18] Deetae P, Parichanon P, Trakunleewathana P, et al. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas [J]. Food Chem,2012,133(3):953-959.

[19] 黄诚,尹红,李地才. 铁氰化钾-三氯化铁光度法测定蔬菜中还原糖含量[J]. 理化检验:化学分册,2011,47(10):1143-1145.

[20] 孔令姗. 白及多糖的提取与功效研究[D]. 上海:上海应用技术学院,2015.

[21] 陈美君,李峰庆,吕蒙,等. 白及与其混伪品 ITS2 序列二级结构比较与鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(15):46-52.

[责任编辑 仝燕]