

(微生物学杂志), 2005, 25(2): 27-30.

[2] Li C G, Li X M, Wang J G. Effect of soybean continuous cropping on bulk and rhizosphere soil microbial community function [J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2006, 26(4): 1145-1149.

[3] Pan Y Q. Simply discuss about the impediment factors of reducing production and the comprehensive treatment of soybean planted continuously [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2006, 22(1): 147-148.

[4] Hong C Q, Nie Y L. Effects of root exudates on plant nutrition [J]. *Ecol Environ* (生态环境), 2003, 12(4): 508-511.

[5] Microbiological Department, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. *Research Method of Soil Microorganism* (土壤微生物研究法) [M]. Beijing: Science Press, 1985.

[6] Xie W K, Wang X Q, Li B, et al. Study of plant root excreta [J]. *Shandong Forest Sci Technol* (山东林业科技), 2005 (5): 63-67.

[7] Nehl D B, Allen S J, Brown J F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective [J]. *Appl Soil Ecol*, 1996, 5: 1-20.

影响桦褐孔菌培养菌丝体水解鞣质积累的因素

杨士钊, 郑维发*

(徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要:目的 探索影响人工培养条件下桦褐孔菌菌丝体水解鞣质积累的因素。方法 以菌丝体干质量和水解鞣质的量为指标, 对不同碳源、氮源、pH 以及不同金属离子作用下的菌丝体干质量和水解鞣质的量进行测定。结果 最适合桦褐孔菌积累水解鞣质的碳、氮源是葡萄糖和蛋白胨, 最佳 pH 是 5.5。Cu²⁺ 在 0.8 mmol/L, Co²⁺ 在 1.6 mmol/L, Zn²⁺ 在 1.6 mmol/L, Mn²⁺ 在 1 mmol/L, NH₄⁺ 在 4 mmol/L 时都能明显地促进水解鞣质的合成。结论 以葡萄糖和蛋白胨为碳、氮源, pH 为 5.5 的培养基有利于桦褐孔菌水解鞣质的积累。Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ 添加到上述培养基中是进一步提高培养产物水解鞣质积累的有效手段。

关键词:桦褐孔菌; 水解鞣质; 深层发酵

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)12-1874-05

Factors affecting accumulation of hydrolysable tannins in cultured mycelia of *Inonotus obliquus*

YANG Shi-zhao, ZHENG Wei-fa

(Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: **Objective** To study the factors affecting the accumulation of hydrolysable tannins in cultured mycelia of *Inonotus obliquus*. **Methods** Taking dry weight of mycelia and hydrolysable tannin content as index, different carbon and nitrogen sources, pH levels, and metal ions were evaluated for the accumulation of hydrolysable tannins in the submerged culture of *I. obliquus*. **Results** The optimal carbon and nitrogen sources were glucose and peptone. Optimal initial pH value was 5.5. The accumulation of hydrolysable tannins was greatly enhanced in the medium with the presence of Cu²⁺ at 0.8 mmol/L, Co²⁺ and Zn²⁺ at 1.6 mmol/L, Mn²⁺ at 1 mmol/L, and NH₄⁺ at 4 mmol/L when compared to the control. **Conclusion** The accumulation of hydrolysable tannins is maximized in the medium containing glucose and peptone with pH value at 5.5. Supplementation of Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, and Mn²⁺ into the medium is an effective method for further increasing the accumulation of hydrolysable tannins in cultured mycelia of *I. obliquus*.

Key words: *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat; hydrolysable tannins; depth fermentation

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat 为多孔菌科褐卧孔菌属药用真菌。主要分布于俄罗斯北部、

北欧、中国长白山地区等北纬 40°~50°地区^[1]。长期以来桦褐孔菌在俄罗斯、北欧等国家被广泛用来治

收稿日期: 2007-02-10

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2006034); 江苏省高校自然科学基金研究计划重大项目 (05KJA36012)

作者简介: 杨士钊 (1976—), 男, 河南南阳人, 徐州师范大学天然产物化学硕士研究生。E-mail: ysz20045@126.com

* 通讯作者 郑维发 Tel/Fax: (0516) 83403179 E-mail: yyzw@xznu.edu.cn

疗各种癌症、心脑血管疾病、糖尿病、肝病、艾滋病^[2],具有显著药理活性,而对人体没有任何不良反应^[3]。研究表明,多酚类化合物是桦褐孔菌主要成分之一,具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、增强机体免疫^[4]、益肝护肾、抑菌、抗艾滋病^[5]等作用。其中,没食子鞣质和二聚鞣花鞣质具有显著的抗病毒活性,已被广泛用于抗 HIV 研究^[6]。天然的桦褐孔菌主要生长在活的桦树干上,对环境要求特殊,生长十分缓慢。由于桦褐孔菌多酚类化合物对多种疾病疗效显著和市场需求不断增加,现有资源已无法满足市场需求。有关桦褐孔菌的人工培养已有多糖、黑色素类化合物在发酵产物中积累的报道^[7,9],而多酚类化合物在桦褐孔菌发酵产物中的积累规律尚不清楚。本实验以多酚类化合物水解鞣质和菌丝体生物量为指标,不同碳、氮源和金属离子为影响因子,开展桦褐孔菌水解鞣质和生物量积累的研究,为提高桦褐孔菌深层发酵产物的多酚类化合物积累进而提高人工培养桦褐孔菌的药理学活性奠定实验基础。

1 实验器材

1.1 试剂与仪器:没食子酸、鞣花酸购自 Sigma 公司, Folin-Ciocalteu 显色剂按文献自制^[10],电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),722S 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);恒温振荡培养箱(上海申能博彩生物技术有限公司);Flexi-Dry. MP 冷冻干燥机(美国专利#4,823,478), Waters 600 高效液相色谱系统,2487 紫外检测器, Waters Empower 色谱工作站。

1.2 菌种及培养基:桦褐孔菌采自牡丹江镜泊湖火山口,标本由俄罗斯真菌专家 Margarita A. Bondartseva 教授鉴定,保存于江苏省药用植物生物技术重点实验室(编号:LBMP2004005)。菌种经 PDA 斜面纯化培养后接入液体培养基。发酵培养基与种子培养基均采用 2% 葡萄糖,0.35% 蛋白胨,0.1% 酵母膏,0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% CaCl_2 , pH 自然(5.5)。

2 方法与结果

2.1 菌丝体的发酵与鞣质的检测:将培养 7 d 的液体菌种按 1:20 (体积比) 无菌接入 500 mL 装有 100 mL 培养基的三角瓶中,在温度 26 °C 振荡频率为 140 r/min 的培养箱中培养 15 d。根据实验方案,改变培养基中的碳源、氮源与 pH 值以及添加金属离子。菌丝体生物量以菌丝体的干质量表示。每个处理设 3 个重复。培养结束后,发酵产物以 4 800 ×

g 离心 15 min,分离菌丝体。桦褐孔菌菌丝体匀浆后加入 70% 丙酮 20 mL^[11]超声提取 1 h,提取 3 次,合并提取液,35 °C 减压回收丙酮,离心除去残渣后定容至 50 mL,得胞内水解鞣质;向上清液中加入 3 倍的无水乙醇,静置过夜。醇沉液 4 800 × g 离心分离,上清 40 °C 减压回收乙醇,在残液中加入 10 mL 乙醚^[12]萃取 3 次,合并萃取后的溶液并定容至 50 mL,得胞外鞣质。冷冻干燥后分别用 FeCl_3 溶液检验,盐酸-正丁醇检测鞣质的类别^[11]。结果显示,加入 FeCl_3 溶液后显蓝色,盐酸-正丁醇处理后无红色,表明产物中只有水解鞣质而无缩合鞣质。

准确吸取水解鞣质溶液 1 mL,加入 2 mL Folin-Ciocalteu 显色剂,按文献处理并分别测定吸光值^[10]。同法以没食子酸为对照品,测定不同质量浓度的没食子酸的吸光值,绘制标准曲线。本实验条件下没食子酸的回归方程为 $Y = 0.02155 + 0.15322X$, $r = 0.99923$, $SD = 0.01476$, $n = 8$, $P < 0.0001$ 。根据回归方程计算出胞内水解鞣质和胞外水解鞣质的量,二者的和即为总水解鞣质的量。

2.2 碳源对水解鞣质和生物量积累的影响:分别以米粉、蔗糖、半乳糖、D-木糖、麦芽糖代替一级摇瓶中的葡萄糖,质量分数皆为 2%。结果显示,以 2% 葡萄糖作为碳源时总水解鞣质的量和菌丝体生物量为最高,分别达到了 8.74 g/L 和 131.28 mg/L。而其他几种碳源无论是菌丝体还是水解鞣质的量都相对较低(表 1)。

表 1 碳源对水解鞣质和菌丝体干质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of carbon sources on hydrolytic tannin contents and dry mycelium weight ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

碳源	总水解鞣质/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	胞外鞣质/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	胞内鞣质/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	菌丝体/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
葡萄糖	131.28±3.74	78.57±2.73	52.68±2.25	8.74±0.31
米粉	18.75±1.56	6.75±0.86	12.01±1.17	5.56±0.35
木糖	32.51±2.49	12.49±1.54	20.05±2.11	5.03±0.28
蔗糖	53.28±2.61	16.76±1.72	35.55±1.88	5.75±0.20
麦芽糖	40.08±2.26	20.36±1.87	19.67±1.68	3.26±0.14
半乳糖	61.90±2.45	37.42±1.09	24.36±1.87	2.57±0.18

2.3 氮源对水解鞣质的影响:分别以蛋白胨、酵母膏、黄豆粉、麦皮、蛋白胨和酵母膏混合物、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 为实验氮源,代替一级摇瓶中的蛋白胨,质量分数皆为 0.6%,其中混合氮源中,蛋白胨为 0.4%,酵母膏为 0.2%,从表 2 可见不同氮源对水解鞣质的积累有很大影响,其中以蛋白胨做碳源时总水解鞣质的量最高,达到 125.38 mg/L,但不利于菌丝体的生长,干质量仅为 2.91 g/L。无机氮源不利于菌丝体的生长和水解鞣质的积累。而

0.4% 蛋白胨和 0.2% 酵母膏为混合氮源时水解鞣质的量和菌丝体的产量都较高,分别达到 96.25 mg/L 和 6.53 g/L (表 2)。

2.4 pH 对水解鞣质的影响:用 1 mol/L 的 HCl 或 1 mol/L 的 NaOH 将培养起始 pH 分别调至 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5。结果显示,pH 为 5.5 时即自然条件下菌丝体和总水解鞣质的量最高,分别达到 7.84 g/L 和 131.48 mg/L (表 3)。

表 2 氮源对水解鞣质和菌丝体干质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of nitrogen sources on hydrolytic tannin contents and dry mycelium weight ($\bar{x} \pm s, n=3$)

氮源	总水解鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞外鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞内鞣质/ (mg · L ⁻¹)	菌丝体/ (g · L ⁻¹)
蛋白胨	125.38 ± 3.63	75.56 ± 2.84	50.21 ± 2.11	2.91 ± 0.27
酵母膏	44.38 ± 2.34	30.34 ± 2.15	14.01 ± 1.43	5.96 ± 0.49
混合	96.25 ± 3.77	57.84 ± 2.46	38.48 ± 2.39	6.53 ± 0.32
黄豆粉	50.74 ± 2.56	29.26 ± 1.87	21.56 ± 2.10	2.12 ± 0.16
麦皮	42.37 ± 2.64	35.18 ± 2.25	9.02 ± 1.07	1.57 ± 0.30
硫酸铵	13.54 ± 1.37	8.56 ± 0.93	5.09 ± 0.78	0.34 ± 0.07
硝酸钾	33.72 ± 1.45	28.47 ± 1.08	5.36 ± 0.89	0.26 ± 0.06

表 3 pH 对水解鞣质和菌丝体干质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of initial pH value on hydrolytic tannin contents and dry mycelium weight ($\bar{x} \pm s, n=3$)

pH	总水解鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞外鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞内鞣质/ (mg · L ⁻¹)	菌丝体/ (g · L ⁻¹)
4.5	27.61 ± 1.58	20.63 ± 1.42	7.04 ± 1.16	2.43 ± 0.07
5.5	131.48 ± 3.94	72.47 ± 2.53	59.12 ± 2.17	7.84 ± 0.29
6.5	44.35 ± 2.43	20.14 ± 2.03	24.24 ± 1.49	6.71 ± 0.18
7.5	62.73 ± 2.16	32.07 ± 1.57	30.71 ± 1.78	3.54 ± 0.27
8.5	115.19 ± 2.84	69.24 ± 2.24	46.01 ± 2.01	2.59 ± 0.21

2.5 金属离子对水解鞣质的影响:根据碳、氮源和 pH 单因子实验的结果,以最适合水解鞣质积累的培养基(葡萄糖 2%; 蛋白胨 0.035%; 酵母膏 0.1%; KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, (NH₄)₂SO₄ 0.01%, CaCl₂ 0.02%, pH 5.5) 开展金属离子对水解鞣质质量的影响。金属离子溶液滤膜除菌后与菌种一同接入事先灭菌的培养基中,以不加金属离子的培养基为对照。结果表明,几种金属离子对桦褐孔菌水解鞣质的积累有显著的促进作用。但随着金属离子浓度的增加菌丝体的生长受到抑制。铜离子在 0.4 mmol/L 时对水解鞣质的积累有促进作用,对菌丝体的生长没有抑制作用。0.8 mmol/L 时水解鞣质的积累达到极显著,总水解鞣质几乎是对照的 2 倍。但此时菌丝体的生长受到抑制,胞外水解鞣质达 150 mg/L (表 4)。钴离子和锌离子在 0.8、1.6 mmol/L 时对桦褐孔菌水解鞣质的积累有显著的促进作用。钴离子对菌丝体生长没有显著抑

制作用(表 5),在 1.6 mmol/L 时,锌离子对菌丝体的生长有一定的抑制作用(表 6)。锰离子在 0.05~1 mmol/L 时对桦褐孔菌水解鞣质的积累都有显著的促进作用,其中 1 mmol/L 锰离子使总水解鞣质积累达到最大值,但此时菌丝体生物量积累减少儿乎一半(表 7)。

2.6 桦褐孔菌培养菌丝体中水解鞣质的成分分析:

表 4 CuSO₄ · 5H₂O 对水解鞣质和菌丝体干质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of CuSO₄ · 5H₂O on hydrolytic tannin contents and dry mycelium weight ($\bar{x} \pm s, n=3$)

CuSO ₄ · 5H ₂ O/ (mmol · L ⁻¹)	总水解鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞外鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞内鞣质/ (mg · L ⁻¹)	菌丝体/ (g · L ⁻¹)
对照	122.5 ± 3.13	74.61 ± 3.22	47.42 ± 2.67	7.38 ± 0.29
0.04	135.18 ± 3.27	78.84 ± 3.83	56.57 ± 3.17	7.26 ± 0.36
0.4	186.41 ± 6.33	89.89 ± 4.54	97.75 ± 3.49	5.16 ± 0.25
0.8	219.26 ± 6.96	150.91 ± 5.57	62.54 ± 2.48	1.84 ± 0.14
2	112.19 ± 5.84	79.78 ± 2.99	31.41 ± 2.01	0.29 ± 0.06

表 5 CoCl₂ · 4H₂O 对水解鞣质和菌丝体干质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of CoCl₂ · 4H₂O on hydrolytic tannin contents and dry mycelium weight ($\bar{x} \pm s, n=3$)

CoCl ₂ · 4H ₂ O/ (mmol · L ⁻¹)	总水解鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞外鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞内鞣质/ (mg · L ⁻¹)	菌丝体/ (g · L ⁻¹)
对照	118.89 ± 3.29	57.13 ± 2.17	51.71 ± 2.12	7.24 ± 0.30
0.08	131.54 ± 3.82	71.19 ± 2.56	60.28 ± 2.88	7.17 ± 0.34
0.8	159.83 ± 4.95	81.36 ± 2.86	78.55 ± 2.04	7.01 ± 0.26
1.6	178.74 ± 4.23	99.63 ± 3.77	79.18 ± 1.57	6.80 ± 0.22
4	112.56 ± 3.33	56.54 ± 2.34	45.02 ± 2.15	6.22 ± 0.14

表 6 ZnCl₂ 对水解鞣质和菌丝体干质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of ZnCl₂ on hydrolytic tannin contents and dry mycelium weight ($\bar{x} \pm s, n=3$)

ZnCl ₂ / (mmol · L ⁻¹)	总水解鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞外鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞内鞣质/ (mg · L ⁻¹)	菌丝体/ (g · L ⁻¹)
对照	125.42 ± 3.07	74.47 ± 2.06	50.84 ± 2.59	7.65 ± 0.39
0.08	139.53 ± 3.32	78.46 ± 3.22	61.21 ± 2.46	7.51 ± 0.32
0.8	181.85 ± 5.09	83.38 ± 2.58	78.44 ± 2.06	7.07 ± 0.13
1.6	196.94 ± 4.60	105.56 ± 3.67	91.13 ± 3.17	5.98 ± 0.16
4	113.91 ± 5.67	55.41 ± 2.47	58.63 ± 2.13	4.43 ± 0.14

表 7 MnCl₂ · 4H₂O 水解鞣质和菌丝体干质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of MnCl₂ · 4H₂O on hydrolytic tannin contents and dry mycelium weight ($\bar{x} \pm s, n=3$)

MnCl ₂ · 4H ₂ O/ (mmol · L ⁻¹)	总水解鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞外鞣质/ (mg · L ⁻¹)	胞内鞣质/ (mg · L ⁻¹)	菌丝体/ (g · L ⁻¹)
对照	133.05 ± 4.22	73.91 ± 2.55	61.45 ± 1.87	7.94 ± 0.33
0.05	142.65 ± 5.68	80.52 ± 2.78	62.11 ± 2.31	7.86 ± 0.17
0.5	157.29 ± 6.87	93.13 ± 3.66	64.14 ± 2.29	7.37 ± 0.14
1	189.46 ± 7.32	83.34 ± 4.02	106.18 ± 6.12	4.02 ± 0.16
2.5	92.72 ± 4.64	40.33 ± 1.82	52.44 ± 1.98	1.89 ± 0.12

取最佳碳、氮源和 pH 的培养基发酵生产的水解鞣质 10 mg 用 2 mL 2 mol/L 的盐酸 80 °C 水解 7 h, 再加入 2 mL 2 mol/L 的 NaOH 中和, 0.45 μm 滤膜过滤后, 进样量 20 μL 用于 RP-HPLC 分析, 以没食子酸和鞣花酸为对照品。RP-HPLC 条件为色

谱柱: Hypersil ODS (250 mm × 4.6 mm, 大连依利特公司); 柱温: 30 °C; 流动相: 0.1 mol/L 的 H₃PO₄ 等度; 体积流量: 1 mL/min; UV 检测波长: 280 nm (没食子酸) 和 254 nm (鞣花酸)。色谱图见图 1。

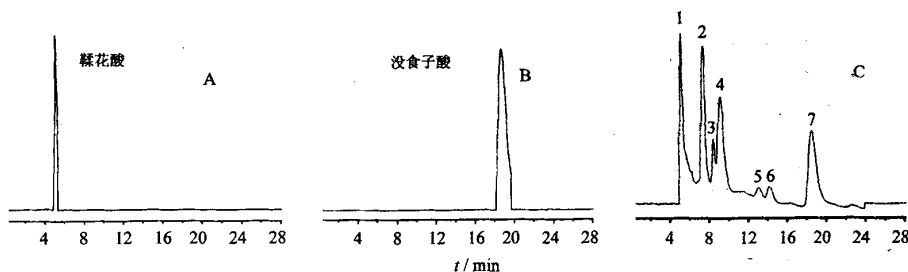


图 1 鞣花酸对照品 (A)、没食子酸对照品 (B) 和样品 (C) 的 RP-HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of ellagic acid (A), gallic acid reference substance (B), and sample (C)

结果表明, 桦褐孔菌发酵产物水解后的产物有 7 种, 其中以 1 (鞣花酸)、3、4、7 (没食子酸) 为主要成分。说明桦褐孔菌发酵产物中多酚类物质以鞣花酸鞣质和没食子酸鞣质为主。

3 讨论

本研究结果显示, 葡萄糖和蛋白胨是桦褐孔菌水解鞣质积累的最佳碳、氮源, Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ 等金属离子对水解鞣质的积累有显著的促进作用。有研究表明, 真菌中水解鞣质的生物合成途径来自于莽草酸途径, 其合成前体是没食子酸, 3-脱氢莽草酸脱氢酶是合成没食子酸的关键酶^[13]。Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ 对 3-脱氢莽草酸脱氢酶的活性有显著的促进作用^[14]。Mn²⁺, Co²⁺, Mg²⁺ 还能刺激莽草酸途径中的第 1 个酶 3-脱氧-D-阿拉伯-庚糖-7 磷酸合成酶的活性^[15]。Zn²⁺, Co²⁺ 也可被莽草酸途径的第 2 个酶脱氢奎尼酸合成酶利用^[16], 有利于提高脱氢奎尼酸合成酶的活性。野生环境中, 桦褐孔菌可能通过寄主的木质部获得无机离子包括金属离子。研究表明, 重金属离子是潜在的氧化剂, 它们的存在对菌丝体生长还有氧化胁迫作用^[17]。多酚类化合物具有显著的抗氧化和清除自由基活性^[18]。因此, Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ 等金属离子对水解鞣质积累的促进作用还可能是由于氧化胁迫诱导了水解鞣质生物合成的增加, 一部分保留在细胞内清除胞内自由基, 另一部分分泌到胞外, 平衡细胞外部的氧化胁迫。野生环境的温差起伏、紫外辐射以及病原微生物的感染都是氧化胁迫因子, 这些因子的长期存在可能是野生桦褐孔菌积累水解鞣质主要原因。本研究通过探索鞣质积累的碳、氮源和 pH 以及添加适当的金

属离子显著地提高了人工培养环境下桦褐孔菌的药用成分——水解鞣质的积累。对进一步开展桦褐孔菌在人工培养条件下多酚类化合物的积累研究奠定了一定的基础。

References:

- [1] Huang L N. Mysterious folk medical fungi in Russia- *Inonotus obliquus* [J]. *Edib Fungi Chin* (中国食用菌), 2002, 21: 7-8.
- [2] Shiin Y, Tamai Y, Terazawa M. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* I: a new triterpene, 1, 24-cyclopentalanosta-3, 21, 25-triol-8-ene from sclerotium [J]. *Japan Wood Res Soc*, 2001, 47: 313-316.
- [3] Lin B X. Medical fungi-*Inonotus obliquus* [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2004, 16: 74.
- [4] Cuia Y, Kim D S, Park K C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96: 79-85.
- [5] Chung K T, Wei C, Johnson M G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? [J]. *Trends Food Sci Tech*, 1998, 9: 168-175.
- [6] Yu D, Morris-Natschkesl, Lee K H. New development in natural product based anti-AIDS research [J]. *Med Res Rev*, 2007, 27: 108-132.
- [7] Kim Y O, Han S B, Lee H W, et al. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus* [J]. *Life Sci*, 2005, 77: 2438-2456.
- [8] Kukulyanskaia T A, Kurchenko N V, Kurchenko V P, et al. Physicochemical properties of melanins produced by the sterile form of *Inonotus obliquus* ("Chagi") in natural and cultivated fungus [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2002, 38: 68-72.
- [9] Babitskaia V G, Shcherba V V, Ikonnikova N V. Melanin complex from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilát (Chaga) (Aphyllphoromycrtaeae) [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2000, 36: 439-444.
- [10] Singleton V L, Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents [J]. *Am J Enol Vitic*, 1965, 16: 144-158.
- [11] Morais S, Nascimento E, Queiroz C, et al. Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuwa* wood [J]. *J Braz Chem So*, 1999, 10: 447-452.
- [12] Bi Shi, Jing D. *Plant Polyphenols* (植物多酚) [M]. Beijing: Sciences Press, 2004.
- [13] Ossipov V, Salminen J P, Ossipova S, et al. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway [J].

[14] Kambourakis S Frost J. Synthesis of gallic acid: Cu²⁺-mediated oxidation of 3-dehydroshikimic acid [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(37): 9042-9043.

[15] Forlani G, Lejczak B, Kafarski P. N-Pyridyl-amino methylene-bisphosphonic acids inhibit the first enzyme in the shikimate pathway, 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase pesticide [J]. *Biochem Physiol*, 1996, 55: 180-188.

[16] Chandran S, Frost J. Aromatic inhibitors of dehydroquinate synthase: Synthesis, evaluation and implications for gallic acid biosynthesis [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 1493-1496.

[17] Srichairatanakool S, Ounjaijean S, Thephinlap C, et al. Iron-chelating and free-radical scavenging activities of microwave-processed green tea in iron overload [J]. *Hemoglobin*, 2006, 30(2): 311-327.

[18] Azmi A S, Bhat S H, Hanif S, et al. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(2): 533-538.

细辛挥发油对植物病原真菌的抑制作用研究

刘海燕¹, 范 婧¹, 高微微^{1*}, 国 辉¹, 李荣英², 李学兰²

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所, 北京 100094; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所 云南分所, 云南 景洪 666100)

摘要:目的 测定细辛挥发油抗药用植物病原真菌的活性, 探讨其抗菌作用机制。方法 以“甲霜灵”和“农抗 120”为对照农药, 采用菌丝生长速率法测定细辛挥发油对 5 种植物病原真菌的毒力作用, 求得毒力方程和 EC₅₀, 比较细辛挥发油与两种常用农药的作用; 以枸杞炭疽病菌为作用对象, 采用电导率法测定细辛挥发油对菌丝细胞膜的损伤作用。结果 在 5 种供试菌中, 细辛挥发油对西洋参疫病菌的抑制作用最强, EC₅₀ 值为 59.70 μg/mL, 与“甲霜灵”相近; 对枸杞炭疽病菌抑制作用最弱, EC₅₀ 值为 410.20 μg/mL, 介于“甲霜灵”和“农抗 120”之间; 对砂仁叶枯病菌、烟草赤星病菌、土生链格孢菌的 EC₅₀ 在 296.48~334.13 μg/mL, 高于“甲霜灵”, 与“农抗 120”相近。供试菌在细辛挥发油作用 5.0、10.0 h 后, 菌丝细胞外渗液电导率值随着作用时间延长而增加, 分别为 7.900 1、9.476 0 μS/cm, 明显高于空白对照组 1.867 7、1.795 6 μS/cm (P<0.05), 与对照农药“农抗 120”作用相近, 略高于“甲霜灵”组。结论 细辛挥发油对 5 种植物病原真菌的抑制作用居于“甲霜灵”和“农抗 120”之间, 细辛挥发油可以造成枸杞炭疽病菌菌丝细胞膜损伤, 引起内容物外渗, 细胞膜是细辛挥发油对植物病原真菌的作用靶点之一。

关键词: 细辛; 挥发油; 植物病原真菌; 抗菌活性

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2007)12-1878-04

Inhibition of essential oil from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against plant pathogenic fungi

LIU Hai-yan¹, FAN Jing¹, GAO Wei-wei¹, GUO Hui¹, LI Rong-ying², LI Xue-lan²

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Yunnan Branch, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China)

Key words: *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag; essential oil; plant pathogenic fungi; antifungal activity

细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 为马兜铃科草本植物, 细辛全草干燥后, 在我国作为重要中药, 主要用于治疗感冒、鼻炎、喉炎、哮喘、胃炎、口腔糜烂、风湿性关节炎等症。有文献报道细辛提取物对人类致病菌白色念珠菌、伤寒杆菌以及引起食物腐败的黄曲霉、黑曲霉有抑菌作用^[1,2]; 另外对人参黑斑病菌

Alternaria panax、西洋参根疫病菌 *Phytophthora cactorum*、腐皮镰孢 *Fusarium solani*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 等植物病原菌也具有较好的抗菌效果^[3,4]。上述研究结果提示, 细辛对环境空气中气和土生的有害微生物均有一定的作用, 具有开发成为植物杀菌剂的潜力。在前期的研究中, 笔者通过对不同溶剂提取的细辛提取物的抑菌作用比较, 发现细辛

收稿日期: 2007-03-15

基金项目: 国家“十五”科技专项创新药物与中药现代化项目资助 (2001BA701A58)

作者简介: 刘海燕 (1979—), 女, 内蒙古人, 北京协和医科大学在读研究生, 主要从事药用植物抗菌活性研究。

* 通讯作者 高微微 Tel & Fax: (010) 62899737 E-mail: gaovv118@sina.com

影响桦褐孔菌培养菌丝体水解鞣质积累的因素

作者: 杨士钊, 郑维发, YANG Shi-zhao, ZHENG Wei-fa
作者单位: 徐州师范大学, 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏, 徐州, 221116
刊名: 中草药 **ISTIC PKU**
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2007, 38(12)
被引用次数: 1次

参考文献(18条)

1. Huang L N Mysterios folk medical fungi in Russia-Inonotus obliquus 2002
2. Shin Y; Tamai Y; Terazawa M Chemical constituents of Inonotus obliquus II: a new triterpene, 1,24-cyclopentalanosta-3,21,25-triol-8-ene from sclerotium 2001
3. Lin B X Medical fungi-Inonotus obliquus 2004
4. Cuia Y; Kim D S; Park K C Antioxidant effect of Inonotus obliquus[外文期刊] 2005(1/2)
5. Chung K T; Wei C; Johnson M G Are tannins a double edged sword in biology and health?[外文期刊] 1998(4)
6. Yu D; Morris-Natschkesl; Lee K H New development in natural product based anti-AIDS research[外文期刊] 2007(1)
7. Kim Y O; Han S B; Lee H W Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of Inonotus obliquus[外文期刊] 2005
8. Kukulyanskaia T A; Kurchenko N V; Kurchenko V P Physicochemical properties of melanins produced by the sterile form of Inonotus obliquus ("Chagi") in natural and cultivated fungus[外文期刊] 2002
9. Babitskaia V G; Shcherba V V; Ikonnikova N V Melanin complex from medicinal mushroom Inonotus obliquus (Pers.:Fr.) Pilót (Chaga) (Aphyllcphoromycrtidae)[外文期刊] 2000(4)
10. Singleton V L; Rossi J A Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents 1965
11. Morais S; Nascimento E; Queiroz C Studies on polyphenols and lignin of Astronium urundeuva wood 1999
12. Bi Shi; Jing D 植物多酚 2004
13. Ossipov V; Salminen J P; Ossipova S Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway[外文期刊] 2003(1)
14. Kambourakis S; Frost J Synthesis of gallic acid: Cu²⁺-mediated oxidation of 3-dehydroshikimic acid [外文期刊] 2000(37)
15. Forlani G; Lejczak B; Kafarski P N-Pyridyl-amino methylene-bisphosphonic acids inhibit the first enzyme in the shikimate pathway, 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase pesticide[外文期刊] 1996(3)
16. Chandran S; Frost J Aromatic inhibitors of dehydroquinase synthase: Synthesis, evaluation and implications for gallic acid biosynthesis[外文期刊] 2001(12)
17. Srichairatanakool S; Ounjaijean S; Thephinlap C Iron-chelating and free-radical scavenging activities of microwave-processed green tea in iron overload[外文期刊] 2006(02)

18. [Azmi A S;Bhat S H;Hanif S](#) [Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage:a putative mechanism for anticancer properties](#)[外文期刊] 2006(02)

引证文献(1条)

1. [赵艳霞](#). [缪康杰](#). [魏志文](#). [张梅梅](#). [郑维发](#) [真菌多糖激发子对桦褐孔菌多酚积累影响的研究](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2010(12)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200712039.aspx