

乌拉尔甘草内生真菌分离及活性初探

杨明俊*, 张琛#, 晏祖花, 路鑫龙, 王永刚

兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050

摘要:目的 分离纯化乌拉尔甘草内生真菌, 及筛选其次生代谢产物具有较好抑菌活性、抗氧化活性 (DPPH·自由基清除率、总还原力测定、羟基自由基清除率)、抗 α -葡萄糖苷酶活性的特异性菌株。方法 采用组织切块法对乌拉尔甘草分离纯化内生真菌; 以正丁醇、醋酸乙酯和乙醇为有机相萃取菌株发酵液及菌丝体; 采用滤纸片法进行抑菌活性检测; 3种检测方法表征抗氧化活性; PNPG 法检测抗 α -糖苷酶活性。结果 从乌拉尔甘草中分离得到 36 株内生真菌, 发酵液萃取浓缩得到 108 个样品。实验共分离得到 7 个属, 其中木霉属是优势种。实验结果显示, 43.52% 的样品具有不同程度的抑菌作用, 其中 8.33% 表现较好; 萃取物均具有不同程度的抗氧化活性, 其中 4.63%~10.12% 的样品分别在 3 种方法中表现较好; 99.07% 的样品具有不同程度的抗 α -葡萄糖苷酶活性, 其中 5.56% 的样品表现较好。结论 从乌拉尔甘草中分离出具备较好的抑菌活性、抗氧化活性、抗 α -葡萄糖苷酶活性代谢产物的菌株, 有待进一步研究深入。

关键词: 乌拉尔甘草; 内生真菌; 抑菌; 抗氧化; α -葡萄糖苷酶抑制活性

中图分类号: R282.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)17-4538-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.023

Isolation and activity evaluation of endophytic fungi from *Glycyrrhiza uralensis*

YANG Ming-jun, ZHANG Chen, YAN Zu-Hua, LU Xin-long, WANG Yong-gang

School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To isolate and purify endophytic fungus from *Glycyrrhiza uralensis*, and screen the specific strain with better antibacterial and antioxidant activity (DPPH· radical scavenging, total reducing power, determination of hydroxyl radical scavenging) and anti- α -glucosidase activity. **Methods** The endophytic fungi were isolated and purified from *G. uralensis* by tissue cutting. N-butanol, ethyl acetate and ethanol were used to extract the fermentation liquid and mycelium. Antibacterial activity was detected by filter paper. Three methods were used to characterize antioxidant activity. A total of 36 endophytic fungi were isolated from *G. uralensis* by PNPG method. **Results** A total of seven genera were isolated from 108 samples by concentrated fermentation liquid extraction. *Trichoderma*. sp was the dominant species. The experimental results showed that 43.52% of the samples had different degrees of antibacterial effect, of which 8.33% performed well; The extracts showed different levels of antioxidant activity, of which 4.63% to 10.12% showed better performance in the three methods. 99.07% of the samples had different levels of anti- α -glucosidase activity, of which 5.56% of the samples performed well. **Conclusion** The strains isolated from *G. uralensis* have good antibacterial activity, antioxidant activity, and anti- α -glucosidase activity, which further study is needed.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch; endophytic fungi; antibacterial activity; antioxidant activity; α -glucosidase inhibited activity

植物内生真菌 (plant endophytic fungi) 是指在一定的生长时期或全部生长时期寄生于植物体内, 但对寄主植物组织并不引起明显病害症状的真菌, 与寄生真菌、病原真菌和腐生真菌对植物组织

造成破坏不同, 内生真菌与植物是互惠共生的关系。近年来, 植物内生真菌作为一种新型活性化合物的物质资源无论在海洋^[1-2]还是内陆^[3]都受到人们广泛关注。研究者们已经在多种植物中分离到了具有

收稿日期: 2019-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660581); 国家自然科学基金资助项目 (31460032); 兰州理工大学红柳优秀青年人才支持计划 (2018)

*通信作者: 杨明俊 (1976—), 男, 山西临汾, 副教授, 博士, 从事微生物次生代谢活性产物研究。

Tel: 13919033744 Fax: (0931)2973362 E-mail: yangmj@lut.cn

#并列第一作者 张琛 (1994—), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物互作及次生代谢产物的研究。E-mail: zc11932@163.com

与宿主相同或相似的生理活性代谢产物的内生真菌^[4]。

甘草作为我国西北地区珍稀药用植物资源,并且由于其紧张的供求关系,为研究者们关注。甘草内活性化合物,如黄酮类,具有良好的抗炎、抗氧化、自由基清除作用,并且它们还是 α -糖苷酶抑制剂^[5-7]。最近研究发现,甘草植物活性成分具有较好的 α -糖苷酶抑制活性,并且可高于传统用药阿卡波糖的效果^[8-9]。

目前对具 α -糖苷酶抑制活性的内生真菌的筛选研究还很缺乏。另外,研究者从甘草中分离出了具备良好抑菌活性^[10]、抗炎^[11]、抗氧化^[12]内生真菌,但仍存在丰富的潜在资源。本实验以乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 为研究对象,对其植物内生真菌进行了分离并对其代谢产物的抑菌活性、抗氧化活性、抗 α -糖苷酶抑制剂活性进行了初步研究,期望分离出具备良好活性的菌株,为甘草资源的综合开发提供理论基础。

1 材料

1.1 药材

样品于2013年9月份采摘自甘肃省庆阳市正宁县,生长状况良好,由兰州理工大学生命科学与工程学院杨明俊副教授鉴定为乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.。

1.2 菌株

3种革兰阳性菌(G⁺)为地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* (B. lic)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (S. au) 和乳链球菌 *Streptococcus uberis* (S. u); 3种革兰阴性菌(G⁻)为大肠杆菌 *Escherichia coli* (E. coli)、肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae* (K. pn) 和绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* (P. a),均由兰州理工大学生命科学与工程学院教研室提供。

1.3 仪器与试剂

分离培养基PDA、牛肉膏蛋白胨培养基均由实验室配制,试剂均为分析纯;电泳系统(BIO-RAD公司,美国);DNA扩增仪Model MG96+ (杭州朗基科学仪器有限公司);凝胶成像系统(BIO-RAD公司,美国);旋转蒸发仪RE-5286 A (上海亚荣生化仪器厂);光学显微镜E220 (麦克奥迪仪器有限公司)。

2 方法

2.1 内生真菌的分离和纯化

取新鲜的甘草,用蒸馏水清洗干净,并切成0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm的小切块,用75%乙醇和0.1%

升汞消毒。用无菌滤纸片吸干切块上的水分,接种到PDA培养基(PDA、PDB培养基均在灭菌后待温度降至45℃左右时,在无菌条件下加入100 U/mL青霉素钠和硫酸链霉素,抑制细菌生长,下同)上,28℃,培养3~7 d;采取菌丝尖端挑取法,反复分离纯化至形成单菌落;采用组织印迹法,以消毒过的组织切块材料的表面与培养基接触5 min为无菌操作参照^[13]。

2.2 内生真菌的鉴定

2.2.1 形态学初步鉴定 将纯化的菌株划线接种到PDA培养基上,28℃恒温培养3~7 d,每天观察记录菌落颜色、菌丝长短、菌落大小、菌落边缘形态以及其基质颜色等。结合棉兰染色剂染色法,进行初步的形态学分类鉴定^[14]。

2.2.2 分子生物学鉴定 取0.1 g内生真菌菌丝体于液氮中研磨,用CTAB法提取内生真菌DNA,以真菌通用引物ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'和ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'扩增ITS rDNA基因序列,扩增产物纯化后送北京奥科鼎盛生物公司测序。所得序列通过NCBI/BLAST进行相似性分析,分析比对结果,确定分离菌株的种类归属。

2.3 菌株的发酵及产物的制备

无菌条件下,将生长良好的菌株,接种于200 mL PDB培养基中28℃、160 r/min培养2周。取发酵好的菌液,抽滤法分离得到菌丝和滤液。将滤液分别与醋酸乙酯和正丁醇按照滤液-有机溶剂(2:1)的比例混匀萃取3次,萃取液经减压浓缩,分别得到发酵液醋酸乙酯和正丁醇萃取物,萃取物分别用DMSO稀释至5 mg/mL,备用;将菌丝细胞超声破碎,于40℃烘箱中烘干,用无水乙醇回流提取2次,每次2 h。将提取液合并减压旋转浓缩得到菌丝提取物,用DMSO稀释至5 mg/mL,备用。

2.4 次生代谢产物的抑菌活性

将活化的6种指示菌液以二倍稀释法制成原浓度的 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 倍,在牛肉膏蛋白胨培养基上每种各加指示菌200 μ L,均匀涂布(不同浓度各3次重复,下同)。37℃培养24 h,观察并将长势良好且有单菌落形成的菌液浓度作为指示菌的最适接种浓度。在相同培养条件下,将样品制成5 mg/mL,通过滤纸片法对发酵产物进行抑菌活性实验,以最适浓度分别吸取各指示菌液200 μ L均匀涂布至牛肉膏蛋白胨培养基上。将无菌

的直径6 mm的滤纸片平铺在带菌平板上(2片/板)。用微量移液器吸取10 μ L待测样品滴加到纸片上。以DMSO作阴性对照,分别以25 U的青霉素和链霉素作为G⁺和G⁻的阳性对照^[15]。

2.5 抗氧化活性

2.5.1 总还原力测定 实验采用铁氰化钾还原法检测样品总还原力。反应器中分别加入0.2 mol/L pH 6.6的磷酸缓冲液2.5 mL和不同质量浓度(0.010、0.025、0.050、0.075 mg/mL)的样品溶液2.5 mL,加入2.5 mL 1%铁氰化钾,均匀混合后在50 $^{\circ}$ C条件下反应20 min。取出后加入2.5 mL 10%三氯乙酸,5 000 r/min离心10 min。取上清液2.5 mL,加入2.5 mL蒸馏水和0.5 mL FeCl₃,混匀后静置10 min,在700 nm处检测吸光度(A)值。以VC作为阳性对照^[16]。

2.5.2 羟基自由基($\cdot$ OH)清除率的测定 利用过氧化氢与Fe²⁺混合产生 $\cdot$ OH,在体系中加入水杨酸捕捉 $\cdot$ OH并产生有色物质,该物质在510 nm下有最大吸收。反应体系中含8.8 mmol/L双氧水1 mL、9 mmol/L FeSO₄ 1 mL、9 mmol/L水杨酸-乙醇溶液1 mL,不同浓度的样品溶液1 mL。最后加双氧水,37 $^{\circ}$ C反应30 min,以蒸馏水为参比,在510 nm检测吸光度^[8]。以VC作为阳性对照^[16]。按下式计算 $\cdot$ OH清除率:

$$\cdot\text{OH清除率} = 1 - (A_x - A_{x0})/A_0$$

A₀为空白对照液的A值,A_x为加入样品溶液后的A值;A_{x0}为不加显色剂双氧水样品溶液本底的A值

2.5.3 DPPH $\cdot$ 自由基清除率的测定 用无水乙醇配制0.04 mg/mL DPPH $\cdot$ 溶液。分别取2 mL不同浓度的样品溶液,加入2 mL DPPH $\cdot$ 溶液,混合均匀,室温放置30 min后,5 000 r/min离心10 min。取上清液于517 nm处测A值^[17]。用VC作为阳性对照^[16]。样品对DPPH $\cdot$ 自由基的清除率用以下公式计算。

$$\text{DPPH}\cdot\text{自由基的清除率} = 1 - (A_1 - A_2)/A_0$$

A₀为2 mL无水乙醇+2 mL DPPH $\cdot$ 溶液的A值,A₁为2 mL样品溶液+2 mL DPPH $\cdot$ 溶液的A值,A₂为2 mL样品溶液+2 mL无水乙醇的A值

2.6 α -葡萄糖苷酶抑制活性

实验采用PNPG法^[18]。用0.1 mol/L磷酸缓冲液配制0.1 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液,将待测样品质量浓度配制成1.0 mg/mL,取0.6 mL α -葡萄糖苷酶溶液,加入样品1 mL,37 $^{\circ}$ C孵育10 min,加入10 mmol/L PNPG 0.1 mL,37 $^{\circ}$ C孵育10 min,加入1 mol/L Na₂CO₃

终止液2 mL,于405 nm处测A值。

$$\text{抑制率} = [(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}) - (A_{\text{实验}} - A_{\text{实验空白}})] / (A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}})$$

对照组用1 mL蒸馏水代替抑制剂;对照空白组用0.1 mL蒸馏水代替PNPG,1 mL水代替抑制剂;实验空白组用0.1 mL蒸馏水代替PNPG

3 结果与分析

3.1 菌落

图1是部位菌株的显微照片。通过对分离菌株的菌落颜色、菌丝形态、菌落边缘以及基质颜色的观察,课题组从甘草内分离出36株甘草内生真菌,菌丝及菌落形态特征如表1所示。

如表1和表2所示,对36株内生真菌进行形态学和分子生物学初步鉴定,36株内生真菌分别为青霉属*Penicillium* sp. 4株,占11.11%;根霉属*Rhizopus* sp. 8株,占22.22%;木霉属*Trichoderma* sp. 11株,占30.56%;镰孢属*Fusarium* sp. 5株,占13.89%;曲霉属*Moniliales* sp. 6株,占16.67%;喙枝孢霉属*Rhinochadiella* sp. 1株,占2.78%;篮状菌属*Talaromyces* sp. 1株,占2.78%。木霉属是优势种,曲霉属次之。

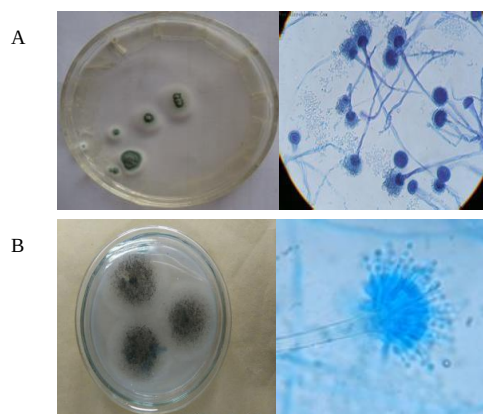


图1 G-203 (A) 和 G-207 (B) 的菌落形态及显微结构
Fig. 1 Colony morphology and microstructure of G-203 (A) and G-207 (B)

3.2 抑菌试验结果

经测试*K. pn*、*E. coli*、*P. a*和*S. au*的最适生长浓度为 1×10^{-5} CFU/mL,*B. lic*和*S. u*的最适生长浓度 1×10^{-6} CFU/mL。实验经分离萃取浓缩制得108个样品,在108个样品中有47个样品(如表3显示),(菌体部位11个、正丁醇部位15个、醋酸乙酯部位21个)至少对1种指示菌具有一定的抑制作用,占全部样品的43.52%;有9个样品(菌体部位4个、正丁醇部位1个、醋酸乙酯部位4个)至少对1种

指示菌有强抑制作用, 表现较好, 占全部样品的 8.33%。G-506 菌体部位、G-207 的正丁醇部位、G-402 的醋酸乙酯部位对 6 种指示菌均具有较好的抑菌活性。其中 G-506 菌体部位对 *B. lic* 和 *S. au* 的抑菌圈分别达到 24.5、22.0 mm; G-207 的正丁醇部位对 *E. coli*、*P. a*、*S. u* 的抑菌圈直径分别为 24、21、22 mm,

对 *S. au* 的抑菌圈直径达到 27 mm; G-402 的醋酸乙酯部位对 *E. coli*、*P. a*、*S. au* 的抑菌圈直径达到 21、23、21 mm; 另外, G-504 的醋酸乙酯部位对 *K. pn*、*E. coli* 和 *S. u* 的抑菌圈分别达到 20、24、24 mm; G-402 的醋酸乙酯部位对 *K. pn* 的抑菌圈直径达 29 mm, 显示出强抑菌活性。

表 1 形态学鉴定

Table 1 Morphological identification

编号	菌落形态			
	菌落颜色	菌丝	边缘	基质颜色
G-101	褐色	菌丝短、致密	轮纹状	褐色
G-102	白色	菌丝长、干燥	整齐	无色
G-103	墨绿色	菌丝短、干燥	整齐	黑绿色
G-104	浅绿色	菌丝短、较干燥	整齐	黄绿色
G-105	粉红色	菌丝长、湿润	有爬壁	粉色
G-106	深黄色	菌丝长、湿润	有爬壁	深黄色
G-201	黑色	菌丝短、致密	整齐	深黑色
G-202	白色转浅黄色	菌丝长、干燥	整齐	无色
G-203	浅绿色	菌丝短、湿润	整齐	浅绿色
G-204	浅粉红色	菌丝长、松散	有爬壁	浅红色
G-205	白色转浅绿色	菌丝短	绒状	无色
G-206	深褐色	菌丝长、绒毛状	放射状	黄色
G-207	黑色	菌丝长、湿润	绒状	黑色
G-208	黑色	菌丝长	整齐	黑灰色
G-301	灰白色	菌丝短	整齐	浅黄色
G-302	绿色	菌丝长、发达	有爬壁	浅绿色
G-303	黄色转浅黑色	菌丝长、湿润	整齐	黑黄色
G-304	黑色转棕色	菌丝短、干燥	整齐	棕黄色
G-401	白色转黑色	菌丝长、干燥	有爬壁	浅黑色
G-402	白色	菌丝长、松散	有爬壁	无色
G-403	黄绿色	菌丝长、松散	整齐	黄色
G-404	浅棕色	菌丝长、发达	有爬壁	浅棕色
G-405	深黄色	菌丝短、干燥	整齐	浅黄色
G-501	棕红色	菌丝短、湿润	整齐	暗红色
G-502	粉红转深红	菌丝长	整齐	深红色
G-503	墨绿色	菌丝长、湿润	有爬壁	浅绿色
G-504	暗绿色	菌丝短、致密	整齐	暗绿色
G-505	紫红色	菌丝短	整齐	暗红色
G-506	中间浅黄边缘白色	菌丝长、湿润	有爬壁	黄色
G-507	黑灰色	菌丝长、干燥	轮纹状	灰色
G-508	灰色	菌丝短、干燥	轮纹状	灰白色
G-601	暗红色	菌丝长、湿润	有爬壁	深红色
G-602	绿色	菌丝短、干燥	整齐	黄绿色
G-603	黑色	菌丝短、湿润	整齐	黑色
G-701	黄绿色	菌丝短致密干燥	轮纹状	无色
G-801	黄褐色	菌丝长、绒状	有爬壁	浅黄色

表 2 分子生物学鉴定

Table 2 Molecular biological identification

菌株名称	匹配菌株属名 (NCBI 编号)	相似度/%
G-101	<i>Rhizopus</i> sp. (MK139786.1)	99.216
G-102	<i>Rhizopus</i> sp. (MG669209.1)	97.619
G-103	<i>Penicillium</i> sp. (JQ011376.1)	92.347
G-104	<i>Penicillium</i> sp. (MK036020.1)	99.317
G-105	<i>Aspergillus</i> sp. (KU321566.1)	98.900
G-106	<i>Trichoderma</i> sp. (JX559856.1)	96.741
G-201	<i>Fusarium</i> sp. (KT269843.1)	99.617
G-202	<i>Rhizopus</i> sp. (MH854659.1)	98.578
G-203	<i>Trichoderma</i> sp. (JX559860.1)	95.690
G-204	<i>Aspergillus</i> sp. (MG551283.1)	83.383
G-205	<i>Trichoderma</i> sp. (KP340244.1)	98.807
G-206	<i>Rhizopus</i> sp. (MG669211.1)	99.057
G-207	<i>Rhinocladia</i> sp. (JX559857.1)	96.422
G-208	<i>Aspergillus</i> sp. (KT266801.1)	98.007
G-301	<i>Trichoderma</i> sp. (JX559860.1)	98.727
G-302	<i>Penicillium</i> sp. (JX559859.1)	96.937
G-303	<i>Aspergillus</i> sp. (KY523044.1)	94.713
G-304	<i>Fusarium</i> sp. (MH341180.1)	98.422
G-401	<i>Rhizopus</i> sp. (MH715977.1)	99.040
G-402	<i>Rhizopus</i> sp. (KM401403.1)	98.762
G-403	<i>Trichoderma</i> sp. (KP340244.1)	99.309
G-404	<i>Rhizopus</i> sp. (JQ775568.1)	98.605
G-405	<i>Trichoderma</i> sp. (MH021637.1)	99.503
G-501	<i>Fusarium</i> sp. (KF986683.1)	97.177
G-502	<i>Aspergillus</i> sp. (MK205155.1)	94.466
G-503	<i>Penicillium</i> sp. (AY373913.1)	99.330
G-504	<i>Trichoderma</i> sp. (KR868290.1)	99.470
G-505	<i>Aspergillus</i> sp. (MF346057.1)	96.350
G-506	<i>Trichoderma</i> sp. (MK547284.1)	98.361
G-507	<i>Rhizopus</i> sp. (MK139786.1)	98.718
G-508	<i>Trichoderma</i> sp. (MK691702.1)	97.910
G-601	<i>Talaromyces</i> sp. (MK547286.1)	96.590
G-602	<i>Trichoderma</i> sp. (KR868287.1)	98.594
G-603	<i>Fusarium</i> sp. (MK429839.1)	99.071
G-701	<i>Trichoderma</i> sp. (JN108925.1)	98.517
G-801	<i>Fusarium</i> sp. (MK212882.1)	96.150

表 3 菌株发酵液粗提物抑菌活性 (n = 3)

Table 3 Antibacterial activity of crude extracts from strain fermentation broth (n = 3)

提取部位	菌株	抑菌圈大小/mm					
		<i>K. pn</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. a</i>	<i>B. lic</i>	<i>S. au</i>	<i>S. u</i>
菌体	G-101	—	—	—	++	+	—
	G-105	++	—	—	+	—	—
	G-207	+	+++	—	+	++	++
	G-208	—	—	—	—	+	—
	G-303	—	+++	++	—	—	+
	G-402	++	—	—	—	+	++
	G-405	+++	+	++	—	—	—
	G-502	—	—	+	+	—	+
	G-506	++	++	++	+++	+++	+
	G-603	—	+	+	—	—	—
	G-801	+	++	—	—	+	+
	G-101	+	—	++	+	—	—
	G-102	—	+	—	—	—	—
	G-105	—	—	—	—	+	++
	G-202	—	+	++	++	+	—
正丁醇	G-207	++	+++	+++	++	++++	+++
	G-208	+	+	++	—	+	++
	G-302	—	—	++	—	—	—
	G-303	+	—	+	++	—	—
	G-402	+	—	—	++	+	+++
	G-405	—	+	+	+	++	++
	G-502	+	+	+	++	+	+
	G-504	+	++	++	+	++	—
	G-506	—	—	+	—	—	+
	G-603	+	+	—	+	+	+
	G-801	+	—	—	—	—	—
	G-101	+	—	++	++	+	+
	G-102	—	—	—	++	+	—
	G-105	+	+	+	+	—	++
	G-106	+	++	++	+++	—	—
醋酸乙酯	G-201	+	—	—	+	+	+
	G-202	—	—	++	+	—	—
	G-206	+	+	+	+	+	++
	G-207	+	—	+	—	++	—
	G-208	+	+	—	++	+	+
	G-302	+	+	+	+	+	+
	G-303	—	—	—	—	—	+
	G-402	++++	+++	+++	++	+++	++
	G-403	++	+	+	—	++	++
	G-405	+	+	+	+	—	—
	G-501	+	+	++	++	++	++
	G-502	—	+	++	—	—	+
	G-504	+++	+++	++	++	+	+++
	G-506	—	+	+	+	+	+
	G-602	+	+	+	—	—	++
对照	G-603	+++	+	++	—	—	—
	G-801	+	+	+	+	+	+
	链霉素	—	—	—	+++	++	+++
	青霉素	++	+++	+++	—	—	—
	DMSO	—	—	—	—	—	—

“—”表示无抑菌圈；“+”表示低抑菌活性，6 mm ≤ ϕ < 15 mm；
“++”表示中等抑菌活性，15 mm ≤ ϕ < 20 mm；“+++”以上表示
强抑菌活性，其中“+++”表示 20 mm ≤ ϕ < 25 mm，“++++”表
示 25 mm ≤ ϕ < 30 mm

“—” means no zone of inhibition; “+” means low antibacterial activity,
6 mm ≤ ϕ < 15 mm; “++” means medium antibacterial activity, 15
mm ≤ ϕ < 20 mm; “+++” above means strong antibacterial activity,
where “+++” means 20 mm ≤ ϕ < 25 mm, “++++” means 25 mm ≤
 ϕ < 30 mm

3.3 总还原力的测定结果

图 2 的实验数据表明, 共 108 个样品在质量浓度为 0.05 mg/mL 时均有一定的还原能力, 并且 4.63% 的样品具有较好的还原力, 其中 G-403、G-601 菌体部位, G-202、G-207 正丁醇部位, G-504 醋酸乙酯部位总 5 个样品的还原力达到 2.5 以上, G-207 正丁醇部位萃取物和 G-601 菌丝体部位提取物的还原力分别达到 2.607 和 2.656, 紧略低于阳性对照

VC 的还原力 (A 值) 为 2.693。

3.4 对 $\bullet$ OH 清除率的测定结果

图 3 的数据表明在 108 个样品 (质量浓度为 0.25 mg/mL) 中, 102 个样品对于 $\bullet$ OH 具有不同程度的清除作用, 占样品总数的 94.44%; 有 11 个样品对 $\bullet$ OH 的清除率在 75% 以上, 表现较好, 占总数的 10.12%。其中 G-504 的菌体部位和 G-603 的正丁醇部位萃取物对 $\bullet$ OH 的清除率分别达到 93.65% 和 94.76%,

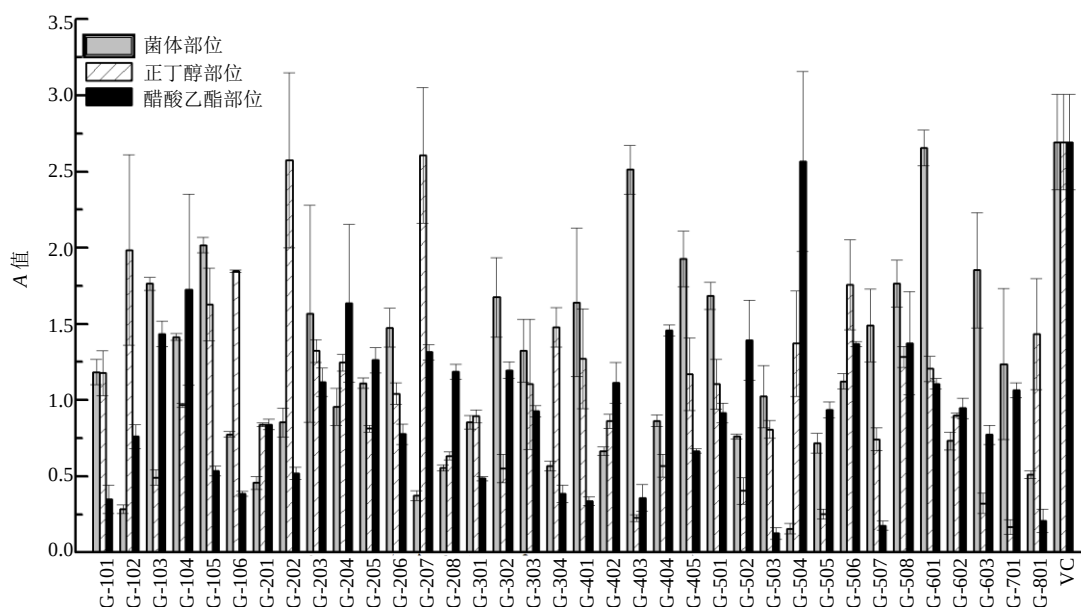


图 2 菌株发酵液提取物的总还原力

Fig. 2 Total reducing power of extracts from strain fermentation broth

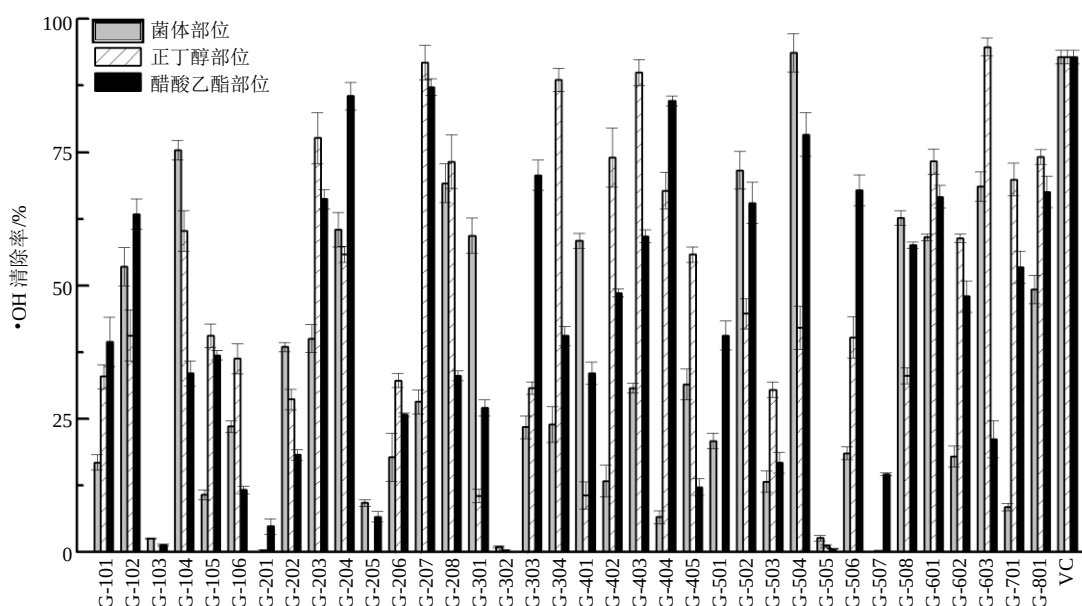


图 3 菌株发酵液提取物对 $\bullet$ OH 的清除率

Fig. 3 Scavenging rate of $\bullet$ OH by extracts from strain fermentation broth

都高于阳性对照 VC 的清除率为 92.86%，显示出极强的清除活性。

3.5 对 DPPH·清除率的测定结果

图 4 结果显示，108 个样品 (0.025 mg/mL) 中，101 个样品显示出对 DPPH·不同程度的清除作用，占总体的 93.52%。53 个样品对 DPPH·的清除率在达 50% 以上，占总体的 49.07%。其中，G-102、G-105、G-202、G-504 的正丁醇部位；G-207、G-402、G-601

的菌丝体部位；G-203、G-304 的醋酸乙酯部位对 DPPH·的清除率表现出较好水平，在 75% 以上，占总样品的 8.33%。G-601 菌丝体部位的清除率是 96.07%，高于阳性对照 VC 的 95.75%，显示出极强的清除活性。

3.6 抗 α -葡萄糖苷酶活性结果

图 5 所示，当样品质量浓度在 1 mg/mL 时，107 个样品对 α -葡萄糖苷酶的活性具有一定的抑

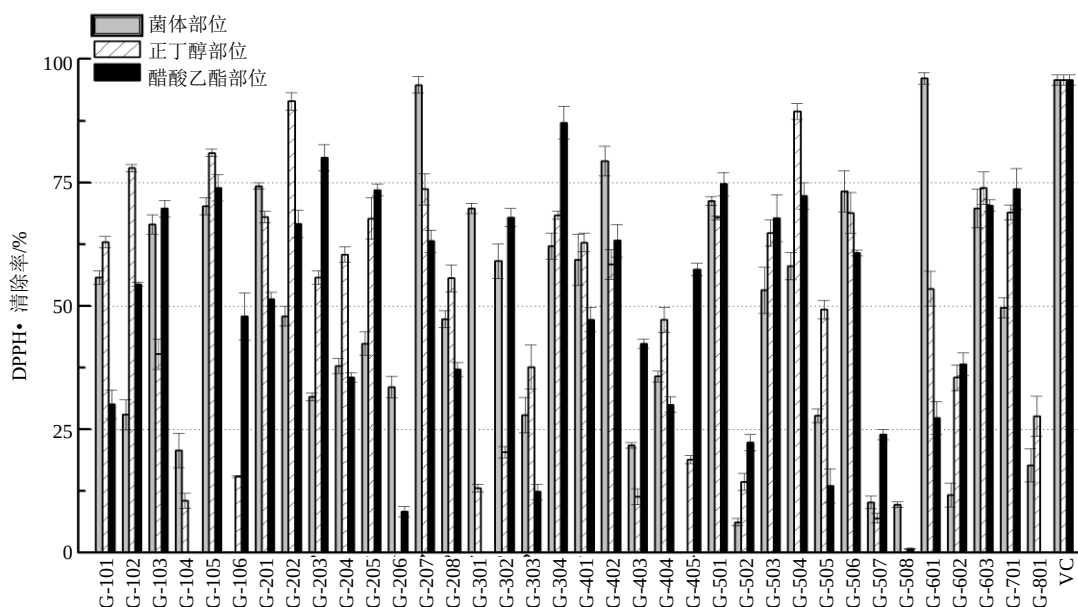


图 4 菌株发酵液提取物对 DPPH·的清除率

Fig. 4 Scavenging rate of DPPH· by extracts from strain fermentation broth

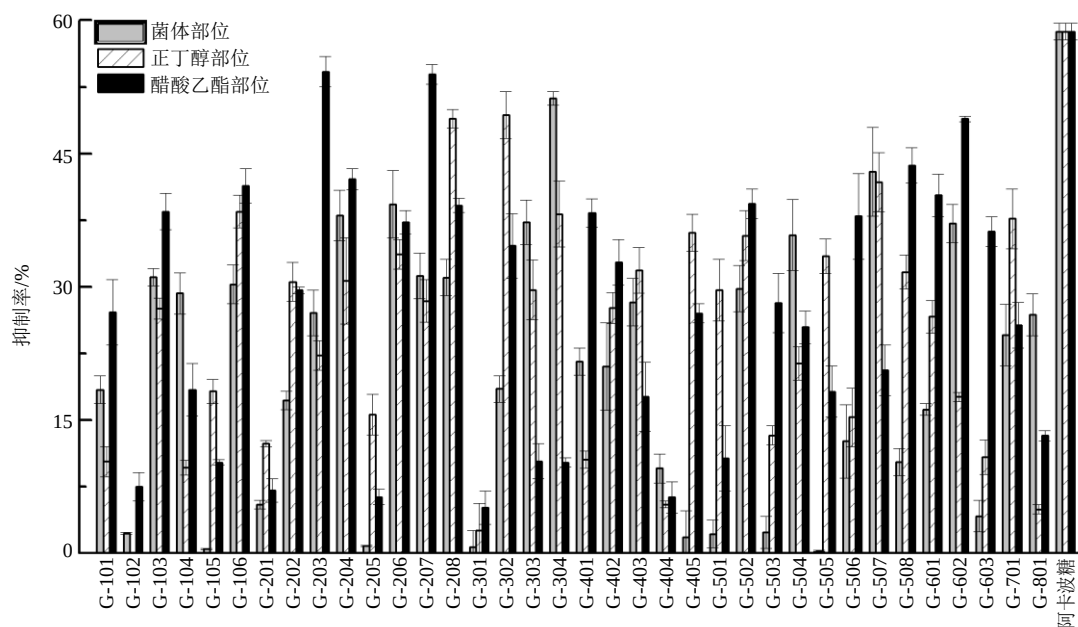


图 5 菌株发酵液提取物抗 α -葡萄糖苷酶活性结果

Fig. 5 Anti- α -glucosidase activity of extracts from strain fermentation broth

制作用。其中, G-203、G-207、G-602 的醋酸乙酯部位粗提物, G-208、G-302 的正丁醇粗提物, G-304 的菌丝粗提物总 6 个样品具有较强的抑制 α -葡萄糖苷酶的活性且其抑制率均在 45% 以上, 占总样品的 5.56%。

4 讨论

乌拉尔甘草在《中国药典》规定的 3 种不同品种甘草中品质最优^[19], 本研究从中分离得到 36 株内生真菌, 与其他研究所分离有相似之处, 如镰孢属、根霉属、青霉属、曲霉属。同时也有差异, 本次分离中, 优势菌株是木霉属, 而产自黑龙江大庆地区的乌拉尔甘草内生真菌的优势种是镰孢属^[20]。采自宁夏平罗的甘草内生真菌的优势种为梭孢霉属^[21], 而宁夏盐池的野生甘草则为镰孢属、青霉属、曲霉属^[22]。塔里木盆地采集的光果甘草和胀果甘草的优势种多为链格孢属、曲霉属、青霉属^[23]。这种差异的出现很可能是由于甘草道地性有密切联系^[24], 同时也表明甘草内潜在蕴含丰富的真菌资源。

吴桐等^[20]用菌饼法及纸片法从乌拉尔甘草分离 46 株内生真菌中, 检测到 34 株内生真菌对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金色葡萄球菌、铜绿假单胞菌等致病菌表现出不同程度的抑菌活性, 并筛选出较好抑菌活性的菌株。王丽等^[25]采用杯碟法从乌拉尔甘草的根、茎中共分离出 54 株内生真菌, 菌株发酵液抑菌试验得到 20 株活性菌株, 其抗菌活性主要表现为对枯草芽孢杆菌和酒精酵母的抗性, 高活性菌株对枯草芽孢杆菌具有较好的抑制活性。毕江涛等表明甘草内生真菌菌饼对革兰氏阳性球菌、革兰氏阳性芽孢杆菌拮抗活性较强, 对革兰氏阴性菌敏感性较差, 同时也表明甘草内生真菌能够产生抗菌活性物质, 这可能与甘草有效成分的药理作用有密切关系^[26]。杨志军等^[27]从甘草中分离得到 1 株内生真菌并测得发酵物粉末有体内及体外抗炎作用。鲜有采用萃取法, 本实验选用菌株发酵液醋酸乙酯部位、正丁醇部位和菌丝体乙醇部位研究抑菌活性对甘草内生真菌发酵液萃取物以及甘草内生真菌菌丝体提取物 108 个样品进行了研究。抑菌实验结果表明, 占中 43.52% 的 47 个样品对指示菌具有不同程度的抑制作用, 证明了甘草内生真菌次生代谢产物的粗提物具有良好的抑菌活性和开发潜力。但仅 G-506 菌体部位、G-207 的正丁醇部位、G-402 的醋酸乙酯部位表现出良好或较好的抑制作用, 预示着其开发和利用的可能性, 同时也表明了内生真菌活

性部位的不明确与复杂性^[28-29]。

吴玉玲^[30]采用 DPPH 抗氧化实验表明一些乌拉尔甘草内生真菌发酵物的醋酸乙酯层、发酵物的菌丝层及正丁醇层均有显著的抗氧化活性。高晓娟等^[12]从产甘草黄酮的耐盐植株内分离的内生真菌大多数有较强的抗氧化活性, 并且 DPPH 清除率高达 90% 以上。于海宁等^[31]采用了 2 种方法评估了 14 株甘草内生菌株发酵液的抗氧化活性, 部分菌株表明了较高的还原力 (FRAP 值高达 309) 和显著的 DPPH 清除率 (高达 95%)。本研究抗氧化实验中, 采用 3 种方法 (总还原力测定、对 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率和对 DPPH 自由基的清除率) 评估抗氧化性, 样品总体在不同程度上表现出一定的抗氧化活性, 表明甘草内生真菌是筛选天然抗氧化活性成分的潜在资源^[31]。另外, 4.63%~10.12% 的样品分别在 3 种实验中表现出较好的活性。表明醋酸乙酯、正丁醇、乙醇萃取部位可发掘出具备较好抗氧化活性的样品, 同时也暗示其他萃取部位可能存在良好抗氧化活性, 实验筛选出多个具备极强抗氧化活性的样品, 如 G-207 正丁醇部位萃取物和 G-601 菌丝体部位提取物的还原力; G-504 的菌体部位和 G-603 的正丁醇部萃取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率; G-601 菌丝体部位的 DPPH $\cdot$ 清除率, 有进一步研究深入。

目前, 对于甘草的 α -葡萄糖苷酶抑制剂多在甘草自身成分, 对甘草内生真菌的研究几乎没有。Gou 等^[32]在以前的研究中发现甘草醋酸乙酯部位比其他有机溶剂具有较好的 α -葡萄糖苷酶的抑制活性, 并在从乌拉尔甘草中分离并鉴定了 IC_{50} 显著低于高于阿卡波糖的化合物。冯长根等^[8]对甘草水提液进行石油醚、醋酸乙酯萃取, 分离得到异黄酮成分, 显著高于阿卡波糖的抑制活性。许有瑞^[33]将甘草水提取物依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 在甘草黄酮和甘草次酸中得到高活性成分。本研究过程中同样在醋酸乙酯部位筛选到较多的较高活性的粗提物, 表明内生真菌产生了与宿主相同或相似的活性组分^[4]。在本实验中, 菌株 G-203、G-207 和 G-602 的醋酸乙酯部位粗提物; G-208、G-302 的正丁醇粗提物; G-304 的菌丝粗提物具有较强的抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 其抑制率均在 45% 以上, 接近于阿卡波糖的 58.74%, 具备进一步开发的潜力。

此次研究从甘草中分离的部分菌株具有良好的抑菌、抗氧化、抗 α -葡萄糖苷酶活性开发潜力, 具有进一步开发药物的潜力, 有待进一步研究深入。

参考文献

- [1] Strobel G, Daisy B U, Harper J J J O N P. Natural products from endophytic microorganisms [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 257-268.
- [2] Kjer J, Debbab A, Aly A H, et al. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products [J]. *Nat Prot*, 2010, 5(3): 479-486.
- [3] Zheng Y K, Miao C P, Chen H H, et al. Endophytic fungi harbored in *Panax notoginseng*: diversity and potential as biological control agents against host plant pathogens of root-rot disease [J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(3): 353-360.
- [4] 郭顺星. 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势 [J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 1-13.
- [5] Ajish K R, Antu K A, Riya M P, et al. Studies on α -glucosidase, aldose reductase and glycation inhibitory properties of sesquiterpenes and flavonoids of *Zingiber zerumbet* Smith. [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(10): 947-952.
- [6] Maione F, Russo R, Khan H, et al. Medicinal plants with anti-inflammatory activities [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(12): 1343-1352.
- [7] 谢子任. 甘草药理活性的研究 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(7): 232-233.
- [8] 冯长根, 宇微微, 甘强, 等. 甘草中黄豆黄苷的分离鉴定及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性 [J]. 科技导报, 2014, 32(16): 29-33.
- [9] 蒲秀瑛, 任菁, 刘璐, 等. 甘草不同提取部位对 α -葡萄糖苷酶活性的影响 [J]. 中国食品工业, 2015, (5): 59.
- [10] 郑雪, 谭佳音, 孔德威, 等. 甘草内生真菌 HGC6 的鉴定及其抑菌活性代谢物研究 [J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2017, (3): 339-344.
- [11] 杨志军, 邓毅, 曼琼, 等. 甘草内生菌的鉴定及抗炎作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(7): 852-856.
- [12] 高晓娟, 吴秀丽, 吴玉玲, 等. 宁夏野生甘草中产甘草黄酮耐盐内生真菌分离及其 DPPH 自由基清除作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2016(10): 1549-1556.
- [13] 杨明俊, 路鑫龙, 王永刚, 等. 水仙内生真菌乙酰胆碱酯酶抑制活性菌株的筛选及鉴定 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(10): 1461-1464.
- [14] 吴雄宇, 李曼玲, 胡谷平, 等. 南海红树林内生真菌 2508 代谢物研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2002, 41(3): 34-36.
- [15] 邓祖军, 曹理想, 谭红铭, 等. 红树林内生真菌抗细菌和抗真菌活性的初步研究 [J]. 广东药学院学报, 2007, 23(5): 563-567.
- [16] 张改平, 杨建雄, 朱玉安. 紫草提取物的体外抗氧化活性研究 [J]. 植物科学学报, 2007, 25(5): 490-493.
- [17] Kumaran A, Karunakaran R J. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus* [J]. *Food Chem*, 2007, 99(1): 356-361.
- [18] Barros F A P, Rodrigues E. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae) [J]. *Biochemical System Ecol*, 2005, 33(3): 257-268.
- [19] 杨志军. 甘草内生菌代谢产物的药效学及相关物质研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2017.
- [20] 吴桐, 白长胜, 谭佳音, 等. 乌拉尔甘草内生真菌的分离及其抑菌活性研究 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(2): 154-160.
- [21] Jiang T B I, Wang X X, Chen W M, et al. Isolation of endophytic fungi from medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* and its microbial inhibition activity [J]. *Pratacult Sci*, 2013, 30(3): 357-364.
- [22] 刘建利, 曹君迈, 马文平. 宁夏乌拉尔甘草内生菌鉴定及甜瓜采后病害病原拮抗菌的筛选 [J]. 干旱地区农业研究, 2011, 29(1): 252-256.
- [23] 赵翀, 廖萍, 张瀚能, 等. 甘草内生真菌多样性及群落结构 [J]. 草业科学, 2016, 33(7): 1315-1323.
- [24] 陈静, 许贞, 张雪, 等. 不同产地甘草内生真菌多样性及分离条件研究 [J]. 药科学报, 2019, 54(2): 373-379.
- [25] 王丽, 刘磊, 韩素贞. 乌拉尔甘草内生真菌拮抗菌株的筛选和鉴定 [J]. 生物技术通报, 2009(6): 155-158.
- [26] 毕江涛, 王小霞, 陈卫民, 等. 甘草内生真菌分离及其抑菌活性初探 [J]. 草业科学, 2013, 30(3): 357-364.
- [27] 杨志军, 邓毅, 曼琼, 等. 甘草内生菌的鉴定及抗炎作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(7): 852-856.
- [28] 曼琼, 邓毅, 杨志军, 等. 甘草内生菌菌株对痰浊阻肺型大鼠干预作用的对比研究 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(2): 161-165.
- [29] 杨志军, 邓毅, 杨秀娟, 等. 甘草内生菌的鉴定及总黄酮总皂苷的含量测定 [J]. 解放军药科学报, 2018, 34(4): 337-340.
- [30] 吴玉玲. 甘草耐盐内生真菌分离、抗氧化活性及次生代谢物研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2014.
- [31] 于海宁, 姚振, 高源, 等. 抗氧化乌拉尔甘草内生菌株的筛选及鉴定 [J]. 浙江工业大学学报, 2014, 42(1): 63-66.
- [32] Gou S, Liu J, He M, et al. Quantification and bio-assay of α -glucosidase inhibitors from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 30(18): 2130.
- [33] 许有瑞. 甘草中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2006.