

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

高晓娟^{1,2,3}, 吴秀丽^{1,2}, 吴玉玲¹, 陈靖^{1,2,3*}

¹药学院 宁夏医科大学; ²宁夏回药现代化工程技术研究中心; ³宁夏医科大学回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 银川 750004

摘要:采用组织分离法,在不含盐及含盐 PDA 培养基上分离、纯化内生菌,以甘草苷等 8 种甘草黄酮为对照品,分析发酵产物;DPPH 自由基清除法测定清除率。共得到 108 株内生菌,TLC 发现 31 株可能产甘草黄酮;HPLC-UV 发现产甘草苷 7 株,产异甘草苷 3 株,产甘草素 3 株,产甘草查尔酮 A3 株,产刺甘草查尔酮 1 株,均为耐盐菌;产甘草苷、异甘草苷、甘草查尔酮 A、刺甘草查尔酮的部分菌株有较强 DPPH 清除率;产甘草苷和异甘草苷的菌株 8-5-Y-2 活性最强,与甘草总黄酮相当,强于甘草查尔酮 A。盐胁迫得到产甘草黄酮,且具较强 DPPH 自由基清除活性的耐盐内生真菌,为资源替代奠定基础。

关键词:甘草;耐盐内生真菌;甘草黄酮;HPLC-UV;DPPH

中图分类号:R932

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.009

Separation of Licorice Flavonoids-Producing Salt-resistant Endophytic Fungi from Wild *Glycyrrhiza uralensis* Fisch Living in Ningxia District

GAO Xiao-juan^{1,2,3}, WU Xiu-li^{1,2}, WU Yu-ling¹, CHEN Jing^{1,2,3*}

¹School of Pharmacy, Ningxia Medical University; ²Ningxia Research Center of Modern Hui Medicine Engineering and Technology; ³Key Laboratory of Hui Ethnic Medicine Modernization, Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: The PDA medium containing different concentrations of NaCl was used to isolate the salt-resistant endophytic fungi from wild *Glycyrrhiza uralensis*. The extracts were analyzed by TLC and HPLC-UV methods to screen the licorice flavonoids-producing fungi. Totally 108 fungi were obtained and 31 strains were proved to possibly produce licorice flavonoids by TLC. Analyzed by a HPLC-UV method, 7 strains of fungi were manifested to produce liquiritin and 3 strains produced isoliquiritin. 3 strains produced glycyrrhizin and 3 strains were observed to produce licochalcone A. Finally, the strain named 8-2-G-3 was found to produce echinatin. The DPPH free radical scavenging assay results showed that some flavonoids-producing strains, such as liquiritin, isoliquiritin, licochalcone A, and echinatin, had strong antioxidant activities. The strain 8-5-Y-2, which produced liquiritin and isoliquiritin, had a strong activity equal to total licorice flavonoids while stronger than licochalcone A. Salt-resistant culture was beneficial to obtain the licorice flavonoids-producing salt-resistant fungi which had strong DPPH free radical scavenging activity.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis*; salt-resistant endophytic fungi; licorice flavonoids; HPLC-UV; DPPH free radical scavenging

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 为豆科 (*Leguminosae*) 蝶形花亚科 (*Papilionatae* Taub) 甘草属多年生草本植物,具有抗炎、杀菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等活性^[1]。甘草黄酮是其主要活性成分,主要包括甘草苷、甘草素、甘草查尔酮等(结构如图 1 所示)。

甘草苷具有抗抑郁、神经保护、保肝等药理作用^[2-4];甘草素是一种存在于甘草中的二氢黄酮单体化合物,具有抗炎、保肝、激活雌激素受体等生理活性^[5-7];异甘草素有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用,并能扩张动脉,对心脏和脑有保护作用^[8];甘草查尔酮 A 在甘草总黄酮中含量最高,是近年来新发现的一种雌激素黄酮,具有广泛的药理作用,可以诱导肿瘤细胞凋亡,与化疗药物合用能减轻化疗药物的毒

性作用;通过抑制 NO 合成减轻多种炎症反应。甘草查尔酮 B 是一类查尔酮类化合物,研究表明^[9]甘草查尔酮 B 具有显著的抗菌作用,对革兰阳性菌具有较强的抑制活性,同时甘草查尔酮 B 能够抑制黑色素瘤细胞的恶性增殖并诱导其发生凋亡。

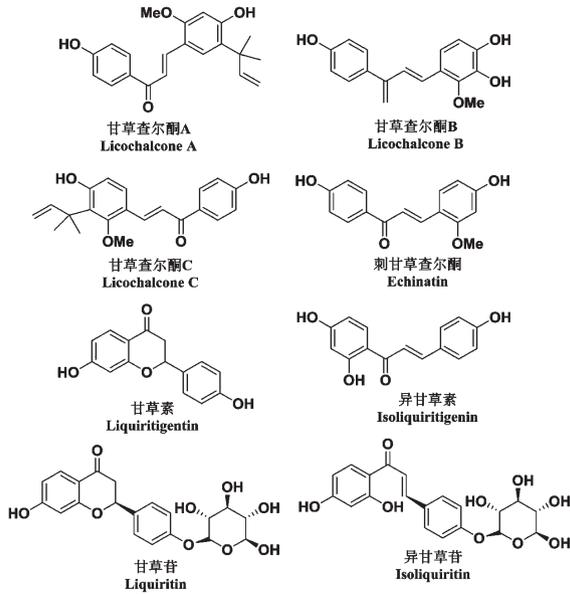


图1 甘草中常见的甘草黄酮化学结构

Fig. 1 Chemical structures of licorice flavonoids in *G. uralensis*

甘草中有着非常丰富的内生真菌资源,其中以从根中分离的菌株为主。李艳宾^[10,11]等对甘草根、茎、叶中的内生真菌进行分离,并采用黄酮物质显色反应法发现 10 株菌能够产生黄酮类物质,并筛选出高产 β -葡萄糖苷酶菌株,利用微生物转化法将甘草黄酮糖苷水解成苷元,提高其抗氧化活性。王红霞^[12,13]等发现 1 株产甘草酸内生真菌,鉴定该菌株为镰孢菌属;李文军^[14]等得到 1 株产甘草酸的内生真菌,产量可达 0.22 mg/L。

微生物在生长繁殖过程中受渗透压的影响较严重,大多数微生物在 0.5% ~ 3% NaCl 浓度条件下生长会受到抑制,但某些极端嗜盐菌可以在高浓度条件下生长。在自然界中微生物之间普遍存在拮抗现象,同一植物中不同内生真菌的生长繁殖能力有显著差异,对渗透压变化的适应能力具有差异,且内生真菌之间具有明显的拮抗现象。某些优势菌株生长速度快,繁殖能力强,在相同的培养条件下,优势菌株的快速生长繁殖往往会抑制或掩盖其余菌株的生长。因此,在常规培养基的中加入不同浓度的 NaCl,尽量使内生真菌的生长环境与宿主植物的生

长环境相同或相似,以诱导某些极端嗜盐菌的生长,而在这种条件下,不耐盐菌株的生长就会受到抑制,可能更有助于分离出与宿主植物所生长的极端环境类似的具有宿主专一性的菌株。管兰芳等^[15]发现盐胁迫能够诱导黄酮类物质的大量合成,黄酮类物质是细胞苯丙烷代谢通路上的一种重要代谢产物,而苯丙烷途径本身就是一条非常重要的防御性次级代谢途径,盐胁迫激活细胞内的防御性代谢途径,故黄酮类化合物的合成增多。

因此,本实验采用不同浓度的耐盐培养基,分离并使耐盐内生真菌在整个培养和发酵过程中保持耐盐培养,以刺激内生真菌细胞自身防卫反应,细胞响应胞外不良刺激,可能有利于促进细胞内黄酮类物质代谢及合成,从而得到比常规培养更多的、可能产甘草黄酮的内生真菌,为寻找甘草可能的替代资源奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 新鲜野生甘草采集

2012 年 7 月 20 日在宁夏回族自治区吴忠市同心县下马关镇采集新鲜的野生甘草,由宁夏医科大学药学院董琳老师鉴定为乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)。

1.2 实验仪器

立式压力蒸汽灭菌器 (YM75Z 型,上海三申医疗器械厂);洁净工作台 (SW-CJ-2FD 型,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);智能光照培养箱 (SPX-250-GB 型,上海龙跃仪器设备有限公司);冰箱 (BCD-215TD GA 型,青岛海尔股份有限公司);电子天平 (上海精密科学仪器有限公司);电热鼓风干燥箱 (GHG-9075A 型,上海一恒科学仪器有限公司);全温摇瓶柜 (HYG-A 型,太仓市豪诚实验仪器制造有限公司);超声波清洗器 (KQ-500E 型,昆山市超声仪器有限公司);循环水多用真空泵 (AKB-III 型,郑州长城科工贸有限公司);旋转蒸发器 (RE-52AA 型,上海亚荣生化仪器厂);三用紫外分析仪 (ZF7-C 型,上海康华生化仪器制造有限公司);高效液相色谱仪 (日立 2000 型,天美中国科学仪器有限公司);超纯水机 (64132 型,美国 Labcone corporation 公司)。

培养皿、锥形瓶、移液枪、有机系微孔过滤器 (0.45 μm)、漏斗、电磁炉、酒精计、滤纸、纱布、牛皮纸、接种环、镊子、酒精灯、打孔器等。

1.3 实验试剂

马铃薯(市场自购);葡萄糖(天津市大茂化学试剂厂,分析纯);琼脂(BIOSHARP, Japan);氯化钠(天津市大茂化学试剂厂,分析纯);无水乙醇(天津市大茂化学试剂厂,分析纯);青霉素(Sanland Chemical. Co. LTD);无水乙醇(天津市大茂化学试剂厂,分析纯);次氯酸钠溶液(安替福民,天津市凯通化学试剂有限公司,分析纯);乙酸乙酯(天津市大茂化学试剂厂,分析纯);甲醇(德国默克公司,色谱纯);乙腈(德国默克公司,色谱纯);超纯水(自制);甘草查尔酮 A 对照品(批号 130812)、甘草查尔酮 B 对照品(批号 131231)、甘草查尔酮 C 对照品(批号 131231)、刺甘草查尔酮对照品(批号 130813)、甘草苷对照品(批号 131127)、异甘草苷对照品(批号 131227)、甘草素对照品(批号 131227)、异甘草素对照品(批号 130222)均购于成都克洛玛生物科技有限公司(纯度均大于 98%)。

2 实验方法

2.1 培养基的配制

土豆葡萄糖琼脂培养基(PDA):将土豆去皮,取 200 g,切成小块放入加 1 L 水中,加热煮沸 30 min,用四层纱布过滤,溶液定容至 1 L,加入 20 g 葡萄糖,固体培养基则加入 20 g 的琼脂,溶液再加热煮至琼脂全部溶解,将溶液装入锥形瓶中,用四层纱布,两层牛皮纸包扎封口,含盐培养基分别用 3%、5%、8%、10%的 NaCl 溶液配制 PDA 培养基。将瓶装好的培养基于 121 °C 高压灭菌 28 min。

将洗净的培养皿用报纸包好,于 121 °C 高压灭菌 28 min;放入恒温电热鼓风干燥箱中烘干,将烘干后的培养皿平铺于洁净工作台中紫外照射 30 min。待培养基稍微冷却至 60 °C 左右时加入少量青霉素 G 摇匀,分别倒于已经紫外灭菌的培养皿中,每个培养皿约 15 mL,放置冷却凝固。

2.2 内生真菌的分离

2.2.1 药材处理

将采集到的新鲜野生甘草根、茎、叶表面清洗干净,用自来水冲洗 2 h,挑选出备用的植株在洁净台中进行如下处理:用 75% 乙醇漂洗 30 s,无菌水冲洗四次;2% 次氯酸钠浸泡 3 min,无菌水冲洗四次;75% 乙醇漂洗 30 s,无菌水冲洗四次;以无菌滤纸片吸干水分。

将上述植株用灭菌的手术刀分别切成 5 mm × 5

mm × 1 mm 的小块,切口尽量多,接种于已配好的 PDA 培养基上,每个培养皿中接 4 块,并标记好。

2.2.2 分组

实验共分五组,分别标注为 D、3、5、8、10,其中 D 为对照组,盐浓度为 0%;3 组:盐浓度为 3%;5 组:盐浓度为 5%;8 组:盐浓度为 8%;10 组:盐浓度为 10%。

2.3 菌株的培养

将接种植株组织的 PDA 培养基用封口膜封好,放置于智能光照培养箱培养,28 °C 恒温培养,培养 3 ~ 30 d。

分离过程中设置空白对照组,即将采用经表面消毒的甘草植株的组织块在空白的培养基上滚动,使组织块各表面尽量接触到 PDA 培养基,用封口膜封口,与接种好的培养皿一起于培养,若对照组培养皿上未长出菌落,说明植株的表面消毒彻底。

经预实验,选择用 75% 乙醇漂洗 30 s,无菌水冲洗四次,2% 次氯酸钠浸泡 3 min,无菌水冲洗 4 次,75% 乙醇漂洗 30 s,无菌水冲洗四次为最佳表面消毒实验,进行内生真菌的分离。

2.4 菌株的纯化

观察 PDA 培养基接种好的植物组织块,当各植物组织块内部向周围长出菌丝后,采用尖端菌丝挑取法使用已经灭菌的接种环挑取植株不同部位边缘切口处长出的菌丝,采用四分划线法划线接入新的 PDA 培养基中,于智能光照培养箱中 28 °C 恒温培养。待其长出新的菌落后,根据菌落的形态、颜色等差异再次挑取其尖端菌丝于新的 PDA 培养基中纯化,重复纯化至得到单一菌株为止。

2.5 菌株的保存

采用斜面培养基冷藏法保藏,筛选到的甘草内生真菌,用接种环挑取少量菌丝于新鲜 PDA 斜面试管培养基划线接种后,置智能光照培养箱中 28 °C 恒温培养 4 ~ 7 d,培养至菌体或孢子生长丰满后,放在 4 °C 冰箱短期保存,需要定时进行菌种活化。

PDA 斜面试管培养基的配制如 PDA 培养基的配制;将配好的 PDA 培养基约 10 mL 倒入试管中,于 121 °C 高压灭菌 28 min。待灭菌后将试管上端用玻璃棒垫起,使培养液顶端离试管口约三分之一处,冷却。

2.6 甘草内生真菌的活化

将保存菌株 28 °C 活化 24 h,从 PDA 斜面上挑取少量菌丝接种到 PDA 培养皿上(PDA 培养基配

制方法如同第一部分,但不加入青霉素 G),将接种好的 PDA 培养基放入 28 ℃ 恒温培养箱中培养 3~5 d,使菌种充分活化生长。

2.7 甘草内生真菌的发酵培养

2.7.1 培养液的配制

将 200 g 土豆切成小块放入加 1 L 水中,加热煮沸 30 min,用四层纱布过滤,溶液定容至 1 L,加入 20 g 葡萄糖,不同含盐菌株培养液需分别加入 3%、5%、8%、10% 的 NaCl 配制成不同盐浓度的培养液。将 150 mL 培养液装入 250 mL 的锥形瓶中,用四层纱布,两层牛皮纸包扎封口,将瓶装好的培养基于 121 ℃ 高压灭菌 28 min 后,放凉备用。

2.7.2 内生真菌的发酵

将已经长好的甘草内生真菌菌株,用已灭菌的菌用打孔器打孔,制成菌饼,接入到已经配好的培养液中,每个锥形瓶 10 个菌饼,每株菌 4 瓶,180 r/min 发酵 10 d。

2.7.3 发酵物产物的处理

发酵 10 d 结束后,将发酵液处理,四层纱布过滤,滤液分别用乙酸乙酯和正丁醇萃取 3 遍,旋转蒸发后得浸膏。菌丝体用 80% 乙醇超声、萃取后,旋转蒸发仪蒸发得浸膏。

2.8 内生真菌发酵物化学分析

2.8.1 TLC 定性分析

将萃取所得浸膏和甘草酸、甘草次酸、甘草总黄酮用甲醇溶解后点薄层板,以石油醚:乙酸乙酯=2:1 的比例展开,在 254 nm、365 nm 紫外下进行对比。

2.8.2 HPLC 定性分析

甘草对照品溶液的制备:精密称取甘草苷等 8 个对照品各 5.00 mg 于 5 mL 容量瓶中,加甲醇溶解制成 1 mg/mL 的溶液,有机系微孔过滤器 0.45 μm 过滤后备用。

甘草内生真菌发酵产物制备:将薄层分析较好的甘草内生真菌次生代谢产物进行 HPLC 分析。精密称取甘草内生真菌次生代谢产物 5.00 mg 于 1 mL 容量瓶中,加甲醇溶解制成 5.00 mg/mL 的溶液,有机系微孔过滤器 0.45 μm 过滤后备用。

色谱条件:色谱柱(Waters C₁₈, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5% 醋酸水溶液(B);梯度洗脱程序:时间梯度 0→5→10→15→20→25→30→35→40 min,乙腈(A)对应的浓度梯度 30%→40%→45%→45%→50%→60%→70%→

60%→30%。流速 1.0 mL/min;检测波长 372 nm;柱温 30 ℃;进样量 20 μL。

2.9 DPPH 自由基清除率测定

精密称取 3.94 mg DPPH,用甲醇定容于 100 mL 的容量瓶中,得到 0.1 mmol/L DPPH 甲醇溶液;精密称取 5 mg 菌株发酵物样品,定容至 1 mL,配制成 5 mg/mL 溶液。

设置 6 个样品浓度,分别为 1000、500、250、125、62.5、31.25 μg/mL,各样品取 200 μL,加入 0.1 mmol/L DPPH 溶液 800 μL,空白对照组加甲醇溶液,室温,避光放置 30 min 后,取 200 μL 于 96 孔酶标板中,振荡器混匀(10 s),在 517 nm 处测定吸光度,平行测定 3 次,计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

式中:A₀ 为 DPPH 溶液 + 无水乙醇的吸光度;A₁ 为 DPPH 溶液 + 样品溶液的吸光度;A₂ 为样品溶液 + 无水乙醇的吸光度。

3 实验结果

3.1 不同盐浓度组内生真菌数

通过对野生甘草内生真菌分离,经过 4~6 次纯化,共得到 25 株常规培养菌株,83 株耐盐甘草内生真菌菌株。

3.1.1 对照组

对照组分离得到内生真菌 25 株(占总菌数的 23.15%,以下同),其中从根中分离得到 13 株(12.04%);从茎中分离得到 3 株(2.78%);从叶中分离得到 9 株(8.33%)。

3.1.2 耐盐组

耐盐组得到 83 株内生真菌,根分离 31 株,茎分离 20 株,叶分离 32 株。

其中,3% 组分离得到内生真菌 24 株(22.22%),从根中分离得到 9 株(8.33%),从茎中分离得到 5 株(4.63%),从叶中分离得到 10 株(9.26%);5% 组分离得到内生真菌 16 株(14.81%)。从根中分离得到 8 株(7.41%),从茎中分离得到 4 株(3.70%),从叶中分离得到 4 株(3.70%);8% 组分离得到内生真菌 20 株(18.52%),从根中分离得到 9 株(8.33%),从茎中分离得到 4 株(3.70%),从叶中分离得到 7 株(6.48%);10% 组分离得到内生真菌 23 株(21.29%),从根中分离得到 5 株(4.63%),从茎中分离得到 7 株(6.48%),从叶中分离得到 11 株

(10.19%)。

薄层法初步分析得到 31 株可能产甘草黄酮的菌株,

3.2 TLC 分析结果

菌株代号及发酵物各萃取层产甘草黄酮情况见表

83 株耐盐内生真菌全部发酵,其发酵物经硅胶 1。

表 1 可能产甘草黄酮菌株

Table 1 Licorice flavonoid-producing strains

菌株代号 Strain name	菌丝层 Mycelium layer	乙酸乙酯层 Ethyl acetate layer	正丁醇层 N-butyl alcohol layer
3-6-G-3	+	+	-
3-2-Y-2	-	+	-
5-2-J-4	-	+	-
5-2-Y-3	-	-	+
5-5-J-4	+	+	+
8-2-G-3	+	+	+
8-4-Y-3	+	+	+
8-5-G-1	+	+	+
8-5-G-4	-	+	-
8-6-G-1	+	+	-
10-2-G-4	+	+	-
10-4-J-4	+	+	+
10-4-Y-1	+	+	-
10-5-G-2	+	+	-
10-5-Y-1	+	-	-
10-5-Y-3	+	-	-
10-6-J-1	+	+	-
10-6-J-2	+	+	-
3-5-Y-1	+	+	+
3-5-Y-2	-	+	+
8-2-G-4	-	+	+
8-4-G-1	-	+	+
8-4-Y-2	-	+	+
8-4-J-4	-	+	+
8-5-G-3	-	+	-
10-2-G-2	-	+	+
10-2-G-3	+	+	-
10-2-Y-1	+	+	-
10-4-Y-3	+	+	-
10-5-J-1	-	+	-
10-6-Y-1	+	-	+
8-5-Y-2	+	+	-
10-2-J-1	+	-	-

注:“+”表示该发酵物可能产甘草黄酮;“-”表示不产。

Note: ‘+’ indicated that the fermentation might produce licorice flavonoids; ‘-’ indicated no production.

从表中可以明确看出,甘草内生真菌发酵物乙酸乙酯层硅胶薄层初步分析的效果最好,菌丝层次

之,正丁醇层数量相对较少。

3.4 HPLC-UV 分析

8 种标准品 HPLC-UV 色谱图见图 4. A。甘草耐盐内生真菌发酵物经 HPLC-UV 分析后,其中含甘草苷的菌株为 3-6-G-3、8-5-G-4、8-5-Y-2 的乙酸乙酯层;含异甘草苷的菌株为 3-5-Y-1、8-4-G-1、8-4-Y-3、8-4-J-4、8-5-Y-2、10-2-G-3、10-6-J-2 的乙酸乙酯层;含甘草素的菌株为 10-4-Y-1、10-5-J-1 的乙酸乙

酯层和 10-4-Y-3 菌丝层;含有甘草查尔酮 A 的菌株为 10-2-G-4 乙酸乙酯层、10-6-J-1、10-6-J-2 的菌丝层和乙酸乙酯层,菌株 8-2-G-3 乙酸乙酯层中也有与刺甘草查尔酮相同保留时间的峰,而甘草查尔酮 B、甘草查尔酮 C 及异甘草素则在发酵的菌株的次生代谢产物中尚未发现。部分菌株发酵物 HPLC-UV 色谱图见图 4B ~ G。

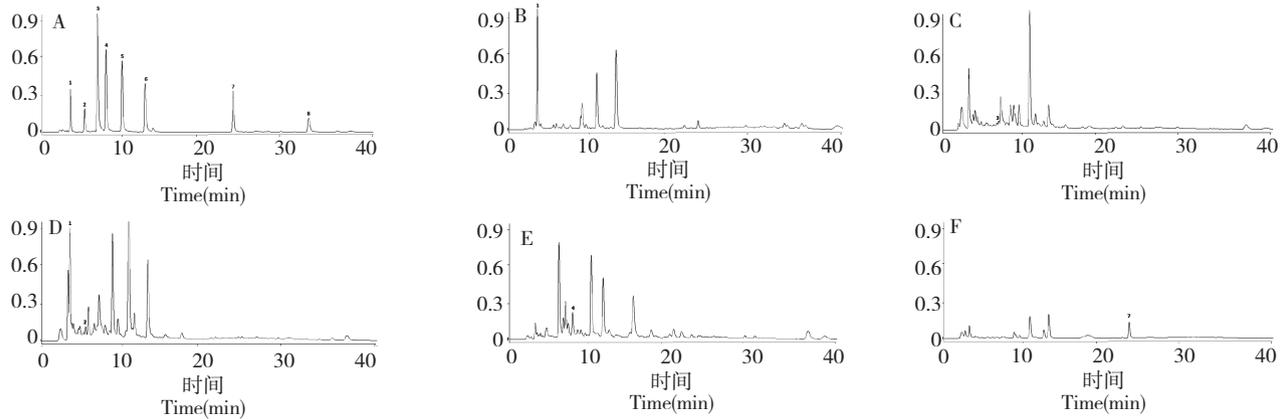


图 4 对照品(A)、菌株 3-6-G-3 乙酸乙酯层(B)、菌株 8-2-G-3 乙酯乙酯层(C)、菌株 8-5-Y-2 乙酸乙酯层(D)、菌株 10-4-Y-3 菌丝层(E)及菌株 10-6-J-1 乙酸乙酯层(F)的 HPLC-UV 色谱图

Fig. 4 HPLC-UV chromatograms of standards (A), ethyl acetate layer of strain 3-6-G-3 (B), ethyl acetate layer of strain 8-2-G-3 (C), ethyl acetate layer of strain 8-5-Y-2 (D), subiculum layer of strain 10-4-Y-3 (E) and ethyl acetate layer of strain 10-6-J-1 (F)

注:1-甘草苷,2-异甘草苷,3-刺甘草查尔酮,4-甘草素,5-甘草查尔酮 C,6-异甘草素,7-甘草查尔酮 A,8-甘草查尔酮 B

Note: 1-Liquiritin, 2-Isoliquiritin, 3-Echinatin, 4-Liquiritigenin, 5-Licochalcone C, 6-Isoliquiritigenin, 7-Licochalcone A, 8-Licochalcone B

3.5 抗 DPPH 自由基实验结果

抗 DPPH 自由基实验结果如表 3 所示。结果表明,产甘草苷的菌株 3-5-Y-1、8-4-G-1、8-4-J-4、8-5-Y-2、10-2-G-3,产异甘草苷的 3-6-G-3、8-5-Y-2,产甘草查尔酮 A 的 10-2-G-4,产刺甘草查尔酮 A 的 8-2-G-3 均有较强的抗氧化活性,当样品浓度为 1 mg/

mL 时,清除率达 90% 以上。产甘草苷和异甘草苷的菌株 8-5-Y-2 的活性最强(96.70%),与甘草总黄酮相当(97.63%),强于甘草查尔酮 A。产甘草苷的 7 株内生真菌中有 5 株具有显著的清除 DPPH 自由基活性。

表 2 菌株发酵物对 DPPH 自由基清除作用

Table 2 DPPH free radical scavenge effect of the fermentation of strains

菌株发酵物 Strain Fermentation	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	1000	500	250	125	62.5	31.25
3-6-G-3 菌丝层	77.32	52.89	41.18	34.02	33.55	31.05
3-6-G-3 乙酸乙酯层	90.89	84.11	77.01	70.93	68.80	67.51
3-2-Y-2 乙酸乙酯层	39.52	37.73	35.57	30.05	28.12	26.46
5-2-J-4 乙酸乙酯层	30.28	26.99	23.08	20.93	16.85	12.43
5-5-J-4 菌丝层	81.44	69.44	60.98	52.16	45.74	35.15
5-5-J-4 乙酸乙酯层	69.79	63.42	59.41	54.14	50.67	47.20
8-2-G-3 乙酸乙酯层	90.22	77.85	47.54	26.46	11.67	7.61

菌株发酵物 Strain Fermentation	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	1000	500	250	125	62.5	31.25
8-4-Y-3 乙酸乙酯层	91.56	71.77	66.02	54.09	49.34	44.64
8-5-G-1 菌丝层	55.27	48.40	39.38	35.19	31.53	30.05
8-5-G-4 乙酸乙酯层	63.80	55.79	50.41	49.85	48.49	47.68
8-6-G-1 菌丝层	69.02	60.44	58.66	57.06	53.62	49.71
8-6-G-1 乙酸乙酯层	74.06	62.96	60.16	52.22	50.22	45.04
10-2-G-4 菌丝层	33.11	21.96	13.71	9.14	7.14	5.92
10-2-G-4 乙酸乙酯层	94.94	79.46	60.95	33.59	16.63	9.43
10-4-J-4 菌丝层	70.63	61.24	57.38	47.51	41.73	32.74
10-4-J-4 乙酸乙酯层	74.99	65.43	63.31	48.56	39.45	31.35
10-4-Y-1 乙酸乙酯层	86.00	55.91	42.69	34.44	31.09	23.34
10-5-G-2 菌丝层	55.30	52.65	43.70	40.51	32.14	27.93
10-5-G-2 乙酸乙酯层	75.64	67.91	41.88	34.67	32.38	26.42
10-5-Y-1 菌丝层	66.24	51.27	43.08	33.41	27.33	26.61
10-5-Y-3 菌丝层	54.09	44.83	35.00	28.70	25.12	23.62
10-5-Y-3 乙酸乙酯层	84.51	63.55	46.70	40.21	35.48	32.03
10-6-J-1 菌丝层	57.12	48.22	44.41	40.27	36.94	21.71
10-6-J-1 乙酸乙酯层	69.74	55.37	41.63	33.03	24.89	18.87
10-6-J-2 菌丝层	79.20	66.37	54.76	40.79	30.82	20.78
10-6-J-2 乙酸乙酯层	90.29	75.08	69.25	61.27	41.74	35.07
3-5-Y-1 菌丝层	79.39	58.98	48.44	43.29	38.97	34.07
3-5-Y-1 乙酸乙酯层	98.34	71.58	54.35	52.71	42.13	30.68
3-5-Y-2 乙酸乙酯层	62.44	54.52	47.38	41.57	33.47	27.29
8-2-G-4 乙酸乙酯层	78.31	61.82	45.28	42.86	36.04	31.43
8-2-G-4 正丁醇层	87.44	78.46	64.09	52.55	41.90	34.80
8-4-G-1 乙酸乙酯层	96.06	87.35	78.69	66.76	56.66	38.75
8-4-J-4 乙酸乙酯层	91.28	69.77	53.98	43.75	35.28	31.57
8-5-G-3 乙酸乙酯层	85.40	78.38	56.37	43.92	40.12	29.39
10-2-G-2 乙酸乙酯层	91.90	88.03	77.91	63.67	53.72	46.29
10-2-G-3 菌丝层	90.59	82.68	70.30	61.84	58.38	64.98
10-2-G-3 乙酸乙酯层	90.90	85.85	77.39	72.07	67.46	65.98
10-2-Y-1 菌丝层	73.09	69.94	65.10	60.49	54.57	46.11
10-2-Y-1 乙酸乙酯层	74.30	59.99	48.56	38.11	39.77	27.63
10-4-Y-3 菌丝层	86.65	74.56	66.28	56.03	40.88	32.45
10-5-J-1 乙酸乙酯层	83.96	77.93	73.68	66.84	61.03	58.80
10-6-Y-1 菌丝层	55.61	45.39	39.37	28.87	22.49	18.01
8-5-Y-2 菌丝层	96.70	79.42	60.78	49.88	43.21	40.91
8-5-Y-2 乙酸乙酯层	75.39	71.25	64.27	58.22	52.65	51.94
10-2-J-1 菌丝层	53.82	47.64	44.88	34.38	21.55	27.35
甘草查尔酮 A	71.75	70.11	67.65	64.79	58.47	50.02
甘草总黄酮	97.63	93.77	88.71	76.04	63.60	46.22

4 讨论与结论

甘草是一种常用中草药,应用十分广泛,素有“十方九草”之说,故又把甘草称为“药中之国老”,野生甘草群落有极强的防风固沙功能,对保护生态环境有着重要作用。但近年来野生甘草资源由于毫无节制的采挖,资源总量和质量逐年下降,被称为“宁夏五宝”之一的野生甘草资源已接近枯竭。人工栽培甘草的周期一般在三年以上,种植有一定的难度。寻找替代资源成为保护野生甘草的重要措施。甘草根、茎、叶中有着极为丰富的内生真菌资源,产甘草黄酮内生真菌的筛选将为野生甘草的保护奠定重要基础。

甘草能耐受含盐量 0.3% ~ 0.6% 的盐化土壤条件,在这样的环境下,耐盐内生真菌比常规培养的内生真菌更具研究意义。研究发现耐盐培养条件下得到更多的内生真菌,且产甘草黄酮的菌株均为耐盐内生真菌,常规培养菌株中未找到目标化合物,表明在盐胁迫下内生真菌产生了更多的黄酮类化合物。不同盐浓度对耐盐内生真菌数的影响不大,但对成分积累有重要的影响,产甘草苷的菌株最多,产刺甘草查尔酮的菌株最少,产甘草素和甘草查尔酮 A 的内生真菌菌株均来自于 10% NaCl 组。结果表明不同盐浓度培养对不同成分的积累有显著影响,高盐的培养条件促进了甘草黄酮的生物合成。

抗氧化结果表明前期发现的产甘草黄酮的耐盐内生真菌大多数有较强的抗氧化活性,尤其是产甘草苷的 7 株内生真菌有 5 株可显著清除 DPPH 自由基,并筛选到既可产生甘草苷和异甘草苷,又有与甘草总黄酮抗氧化活性相当的菌株 8-5-Y-2,表明经过耐盐培养更有利于得到与甘草生物合成一致的活性内生真菌,可能成为寻找甘草替代资源的重要途径。

参考文献

- 1 Marjan NA, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytother Res*, 2008, 22:709-724.
- 2 Xiao Y (肖渊). Anti-depression effect of liquiritin and its mechanism. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine (北京中医药大学), MSc. 2009.
- 3 Yang Y (杨云), Bian GX (卞广兴), Lv QJ (吕秋军). Neuroprotection and neurotrophism effects of liquiritin on primary cultured hippocampal cells. *China J Chin Mater Med*

- (中国中药杂志), 2008, 8:931-935.
- 4 Ding XS (丁选胜), Dai DZ (戴德哉). Protective effect of liquiritin on liver toxicity induced by CCl₄. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 12:70-71.
- 5 Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, et al. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol*, 2008, 154:165-173.
- 6 Fu BQ (傅博强), Li H (李欢), Wang XR (王小如), et al. Inhibitory effects of several licorice flavonoids on the monophenolase activity of tyrosinase. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17:391-395.
- 7 Mersereau JE, Levy N, Staub RE, et al. Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor beta agonist. *Mol Cell Endocrinol*. 2008, 283:49-57.
- 8 Li DF (李德芳), Wang ZH (王振华), Luo F (罗锋), et al. Pharmacological activities of isoliquiritigenin. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 2:362-364.
- 9 Ran F (冉芳), Wang AH (王爱华), Yuan X (袁萱), et al. Apoptosis-inducing effect of licochalcone B on mouse melanoma and its mechanism. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2013, 9:220-224.
- 10 Li YB (李艳宾), Zhang Q (张琴). Isolation of licorice endophytic fungi and screening of flavones-producing strains. *Tianjin Agric Sci* (天津农业科学), 2012, 5:15-18.
- 11 Zhang Q (张琴), Li YB (李艳宾), Li H (李华). Screening of β -glucosidase producing licorice endophytic fungi and the bioconversion of licorice flavanoids. *Food Sci* (食品科学), 2013, 1:194-198.
- 12 Wang HX (王红霞), Li YL (李雅丽). Isolation of a glycyrrizic acid-producing endophytic fungus from licorice and analysis of metabolites. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2011, 14:28421-28423.
- 13 Wang HX (王红霞). Separation and fermentation cultivation of endophytic fungi production glycyrrhizic acid from ordos plateau licorice. Baotou: Inner Mongolia University Science and Technology (内蒙古科技大学), MSc. 2011.
- 14 Li WJ (李文军), Zheng SH (郑素慧), Mao PH (毛培宏), et al. Isolation of endophyte from glycyrrhiza inflata batalin of Xinjiang Uygur Autonomous Region and screening of glycyrrhizic acid-producing strain. *Biotechnology* (生物技术), 2008, 5:28-31.
- 15 Guan LF (管兰芳). Investigation of salt stress on growth and flavonoid biosynthesis in *Carduus crispus* L. cells and its mechanism. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University (浙江工商大学), 2009, 28:3597-3599.