

一株黑果枸杞内生真菌 RML6 的黄色素稳定性研究

裴泉鑫,李玉芳,蔡德育,袁彦彦,潘和平*

西北民族大学生命科学与工程学院,兰州 730110

摘要:植物内生真菌具有产天然活性物质的潜能,亦是天然色素的来源之一,本研究从黑枸杞叶部分离筛选得到产黄色素的内生真菌 RML6,经鉴定该菌为 *Coprinellus radians*,该菌株所产黄色素在 341 nm 波长处有最大吸收峰。从温度、pH、光照、金属离子、氧化剂与还原剂等方面探究黑枸杞内生真菌 RML6 所产黄色素的稳定性。结果表明该色素在自然光下放置 8 h 黄色素光吸收值无显著变化,但对紫外较为敏感应尽量避光存放;在 pH 6~10, 20~100 °C 下不受太大影响;金属离子中,Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺ 对该色素有护色或增色作用,Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺ 对色素有明显的影响;H₂O₂、NaHSO₃ 对该色素有较强的破坏力;常见几种添加剂对色素无太大影响,同时蔗糖对其还具有明显的增色效应。该色素可广泛用于多个用途。

关键词:内生真菌;黄色素;稳定性;黑果枸杞

中图分类号:TS202.3

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.1.002

Study on the Stability of Yellow Pigments Produced by Endophytic Fungus RML6 from *Lycium ruthenicum* Murr.

PEI Xiao-xin, LI Yu-fang, CAI De-yu, YUAN Yan-yan, PAN He-ping*

College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730110, China

Abstract: Endophytic fungi in plants have the potential of producing natural active substances and it is one of the sources of natural pigments. In this study, endophytic fungi RML6 is screened out from the leaves of *Lycium ruthenicum* Murr., and the strain is identified as *Coprinellus radians*. The yellow pigment which produced at this strain has the highest absorption peak at 341 nm. The stability of the yellow pigment which produced by the endophytic fungus RML6 of *Lycium ruthenicum* Murr was investigated from the aspects of temperature, pH, light, metal ion, oxidant and reducing agent. The results show that the pigment has no significant change in the light absorption value of yellow pigment for 8 hours under natural light, but it is less sensitive to UV storage. It is not affected much at pH 6-10 and 20-100 °C. In the metal ions, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ have color protection or burnish effect on the pigment, Zn²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ have a significant effect on the pigment. H₂O₂ and NaHSO₃ have strong destructive power to the pigment though several common additives have no effect on the pigment. Meanwhile, sucrose also has a significant hyperchromic effect on it. So the pigment can be used for a wide range of applications.

Key words: endophytic fungi; yellow pigment; stability; *Lycium ruthenicum* Murr.

内生真菌(endophytic fungus)指长期生活在植物的根、茎、叶等器官的组织内部,但一般不引发植物体病害的真菌^[1],在与植物长期协同进化的过程中,形成了一种互惠共生的复杂共生关系,可产生与寄主植物相似或相同的成分,或自有独特的产物^[2],在多个领域都具备重要的研究价值。黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)为茄科(*Solanaceae*)枸

杞属(*Lycium*)植物,在我国宁夏,甘肃,内蒙古,新疆,西藏等地皆有分布,为我国西部特有的沙漠植物^[3]。在藏医中黑枸杞主要作中药,藏医将其主要用于心热病、心脏病、月经不调、停经等病症且有显著药效。民间也有人用其作滋补强壮,降压药用。被广泛收载于《四部医典》,《晶珠本草》等藏药经典著作中^[4]。同时目前市面天然色素一般稳定性较差,对所处环境因素及其敏感,色价可能会随着条件的改变而发生变化^[5],色素的稳定性在一定程度决定了其使用空间和价值寻得一种稳定优质安全的色素也将极具意义。真菌 RML6 是黑果枸杞叶部分离

收稿日期:2017-10-16 接收日期:2017-12-04

基金项目:国家大学生创新创业训练计划(201710742095);甘肃省农业生物技术项目(GNSW-2015-28)

*通信作者 E-mail:panheping62@163.com

得到的一株 *Coprinellus radians* 真菌,在其代谢过程中可产生大量性质稳定的黄色素。目前有较多真菌色素被发现和开发使用^[6],但对黑果枸杞沙内生真菌色素的研究未见报道。本研究组从黑果枸杞叶部分离得一株产黄色素的真菌 RML6,并对菌株菌属进行了初步鉴定,对色素性质进行研究,为进一步开发利用该菌产生的黄色素奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

内生真菌菌株 RML6 从黑果枸杞植株中分离获得,自行保存。具有产胞外水溶性黄色素的性质。

1.1.2 培养基

PDA 培养基:马铃薯 200 g;葡萄糖 20 g;琼脂 15~20 g;蒸馏水 1000 mL;pH 自然。

发酵培养基:马铃薯 200 g;葡萄糖 20 g;蒸馏水 1000 mL;pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 真菌鉴定

真菌菌体用液氮研磨后提取总 DNA,然后用 ITS 扩增引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增并测序。将测序结果与 NCBI 数据库(NR)进行比对,并将序列进行 BLAST 比对,构建进化树。

1.2.2 色素提取

将保存的菌株于平板培养基活化,待菌丝体较为繁盛,接种于含 250 mL 发酵培养基的三角发酵瓶中,于 28 ℃、150 rpm 条件下震荡培养 15 d,将发酵液过滤除去菌丝体,蒸馏水冲洗菌丝体滞留色素,合并至色素滤液,然后按体积比 1:1 加入乙酸乙酯进行萃取去除脂溶性杂质,收集水层。将黄色素液体旋转浓缩至 30~50 mL,真空干燥得到色素粗提物^[7]。用去离子水稀释至 1 mg/mL 备用。

1.2.3 色素吸收光谱曲线的测定

取上述 1 mg/mL 的黄色素溶液,用 Nano-drop1000_UV 型分光光度计在 210~700 nm 范围内进行扫描,观察其光谱特征,确定最大吸收峰值。

1.2.4 光照对色素稳定性的影响

取三份适当浓度的色素溶液 5 mL 于平皿中,分别置于自然白光、暗室及 15 W 紫外光下 36 h,分别隔 4 小时测定其 341 nm 处的吸光度。

1.2.5 温度对色素稳定性的影响

取 6 组适当浓度的色素溶液 5 mL,分别置于 0、

20、40、60、80、100 ℃ 水浴 1、4、8 h 后,迅速冷却至室温,测定 341 nm 处吸光度^[8]。

1.2.6 pH 对色素稳定性的影响

取 6 组适当稀释后的色素溶液 5 mL,分别用 1 mol/mL NaOH 和 1 mol/mL HCl 调节 pH 为 2、4、6、8、10、12 室温静置 1 h,观察颜色变化,分别测定其在最大吸收波长处的吸光值。

1.2.7 金属离子对色素稳定性的影响

取 5 mL 适当浓度的色素溶液 8 组中分别加入 1 mL 浓度为 1 mol/L 的下列金属离子(Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+})溶液。并静置 1、4、8 h 后测定其在最大吸收波长处的吸光值。

1.2.8 氧化还原剂对色素稳定性的影响

取 5 mL 适当稀释的色素溶液 2 组,分别加入 1 mL 浓度 0.5%、1%、2% 的 H_2O_2 和浓度 mg/mL、1、0.5 mg/mL 的 Na_2HSO_3 。室温静置 1 h,分别测定其在最大吸收波长处的吸光值。

2 结果与分析

2.1 菌株 RML6 的形态特征

菌株 RML6 在 PDA 培养基上 28 ℃ 培养 3 d 后,菌落直径大约 1.5 cm,菌落质地绒毛状,菌丝白色,4~6 d 菌丝将变黄,菌落端生黄色分泌液滴,基底为棕黄色,菌丝光滑有隔。经过 PCR 扩增后获得的 ITS 序列长 448 bp (GenBank 中的登录号为 MG050698),该序列与 *Coprinellus radians* strain 00229-3 的 ITS 序列(序列号为 KT192203)同源性为 100%,综合形态学特征和 ITS 序列分析结果,将菌株 RML6 鉴定为 *Coprinellus radians*。

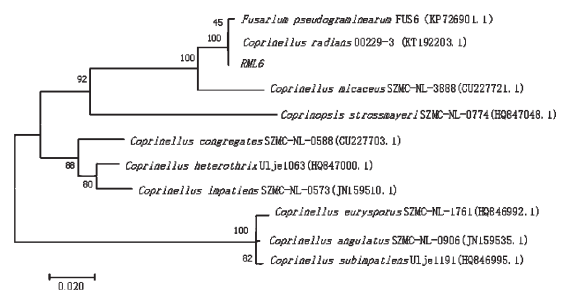


图 1 基于 rDNA ITS 序列同源性构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on rDNA ITS sequences homology

2.2 色素吸收光谱特征分析

对黄色素溶液进行全波长扫描,该黄色素在波长 341.25 nm 处吸收峰最强(图 2)。故本实验选

择 341 nm 作为最大吸收波长。

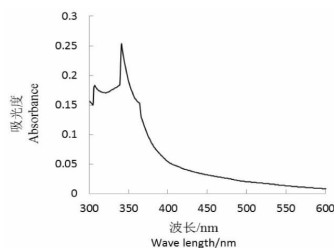


图 2 菌株 RML6 (*Coprinellus radians*) 黄色素的吸收光谱

Fig. 2 The absorption spectra of the yellow pigment from RML6

2.3 光照对色素稳定性的影响

由图 3 可知,紫外光对黄色素的稳定性破坏程度最明显。自然光光照 24 h,对黄色素有些许影响,但不明显,紫外光光照 24 h 后,色素稳定性破坏较为强烈,说明黄色素对紫外光非常敏感。因此,在加工和存储该色素时,要做的尽量避免光,尽量避免强光暴晒,且不接触紫外线。

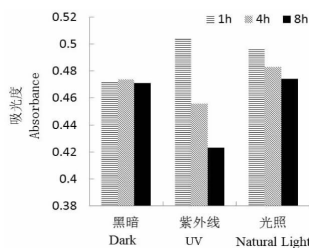


图 3 光照对色素稳定性的影响

Fig. 3 Effect of light on the yellow pigment stability

2.4 温度对色素稳定性的影响

该色素极具稳定性,在 0 ~ 100 °C 范围内温度的变化对色素的无太大影响,当温度达 40 °C 时吸光度最大,60 ~ 100 °C 范围内随温度上升吸光度略有影响,但与常温时无太大区别,且由下图可见随加热时间的增加,色素在 341 nm 处的吸光度除在 60 °C 有略微的下降外其他温度下皆有所上升。因此,本色素热稳定性极为可靠。

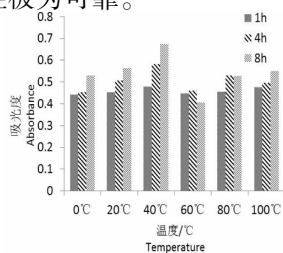


图 4 温度对色素稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the yellow pigment stability

2.5 pH 对色素稳定性的影响

由 5 图可见,在 pH 2 ~ 8 范围内色素保持较强的稳定性,且在 pH = 4 时吸光度最大,当 pH 高于 8 时酸碱度对色素出现较大影响,因此该色素适用于酸性和弱碱性环境的使用,在使用和存储运输时应当避免与强碱条件的接触。可适用于极酸性到弱酸性环境,满足生产需要。

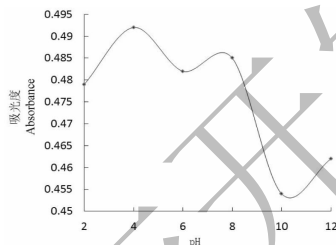


图 5 pH 对色素稳定性的影响

Fig. 5 Effect of pH on the yellow pigment stability

2.6 金属离子对色素稳定性的影响

由图 6 可看出在添加图中所述各种金属离子后几乎无明显变化,其中 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 对该色素有护色或增色作用, Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 对色素有明显的负面影响但随时间延长其影响并不会有过大的变化; Fe^{3+} 对色素增色效果极为强烈, Ca^{2+} 减色最为明显但几乎不会对生产使用造成太大影响,总体来说这些金属离子对该色素无明显影响,可广泛应用。但为了更好发挥出本色素的效果,应尽量减少其与各种离子的接触。

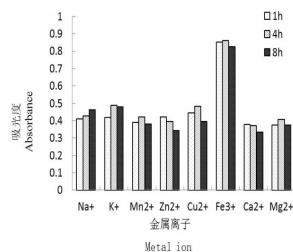


图 6 金属离子对色素的影响

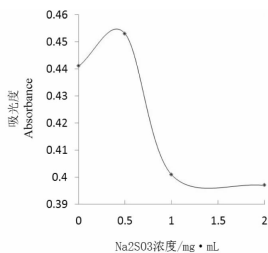
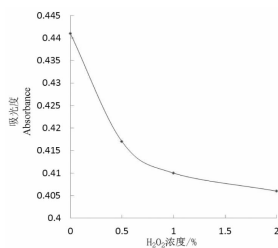
Fig. 6 Effect of metal ions on the yellow pigment stability

2.7 氧化还原剂对色素稳定性的影响

由下面 2 幅图可见 H_2O_2 和 Na_2SO_3 对色素稳定性都具有明显影响,且随着浓度增长,对色素的减色效果越强,该色素应避免其长期暴露在空气中或与氧化还原性物质接触,以保证色素质量。

2.8 常见添加剂对色素稳定性的影响

由图 9 可以看出,蔗糖对色素具增色效应,柠

图7 Na₂SO₃ 对色素稳定性的影响Fig. 7 Effect of Na₂SO₃ on the yellow pigment stability图8 H₂O₂ 对色素稳定性的影响Fig. 8 Effect H₂O₂ of on the yellow pigment stability

柠檬酸、罗氏盐对色素吸光度值无太大影响,乳糖会造成色素吸光度一定下降;但各添加剂对其吸光度影响很小,在大量使用时造成的影响可忽略不计。因此本色素稳定性较好,理论可与一般食品添加剂共用。

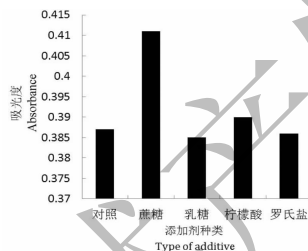


图9 常见添加剂对色素稳定性的影响

Fig. 9 Effect of common additive on the yellow pigment stability

3 结论

黑果枸杞内生真菌 RML6 经鉴定为 *Coprinellus radians*, 目前尚无相关报道指出黑枸杞内生真菌具有产色素的性能, 国内也暂无 *Coprinellus radians* 产色素及其色素性质的报道, 因此具有很大的研究价值和意义; 该菌所产色素为水溶性胞外黄色素, 色素的提取十分方便, 在 PDA 液体摇瓶培养过程中 6 天左右渐渐变黄色 12 天左右达到顶峰颜色几乎不在变化。色素性质极为稳定, 理论上可广泛应用于各个领域。因该黄色素对紫外光较为敏感, 色素在保

存过程中应尽量满足避光条件; 在 pH = 2 ~ 8 范围内, 色素稳定性表现较好且在 pH = 4 时吸光度值最大该性质与冠突散囊菌黄色素较为相似^[9]; 本色素热稳定性极强, 在 0 ~ 100 °C 范围内温度对色素不会有太明显影响且在 40 °C 时吸光度值最大可满足日常常见温度条件下的使用, 本色素热稳定性较海洋菌株 MP-16^[10] 和粒毛盘菌黄色素^[11] 要强; 但该色素在氧化或还原物存在条件下极为敏感, 色素吸光度下降明显, H₂O₂ 或 Na₂HSO₃ 会对色素造成较大影响, 在此特点上本色素不能与具抗氧化能力的茯砖茶金花菌黄色素^[12] 进行比较; 在金属离子作用下本色素稳定性表现极佳, 多种金属离子对其负面影响可做忽略, 更有一些离子对其具有增色护色效果, 尤其 Fe³⁺ 增色效果最好; 同时在试验所用的几种添加剂对其影响也微乎其微, 更突出了本色素优异的稳定性; 该色素在上诉多个条件下皆较为稳定, 可作为多个领域的色素添加剂使用; 但真菌产物具有极强的生物活性, 可能具有一定毒副产物, 因此对其成分需要进一步分析验证, 为其使用提供理论参考; 同时有相关报道指出 *Coprinellus radians* 可产生一定抗肿瘤的成份^[13,14], 后期可对本色素功能性进一步研究, 为 *Coprinellus radians* 产物的研究提供依据。

参考文献

- Zhou C (周成), Shao H (邵华), Zhang LQ (张玲琪), et al. Application potential of plant EndopHytic Fungi research [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002 (2): 69-73.
- Li H (李涵). Research on diversity and metabolite activity of plant endop Hytic Fungi [D]; Journal of Jilin University.
- Dong DH (董得红). Qaidam *Lycium ruthenicum* Murr [J]. *Chinese Turkish* (中国土族), 2014, (02): 25-26.
- Yang B (杨斌), Wang XD (王向未). Application and development of *Lycium ruthenicum* Murr and its functional components in food industry [J]. *Light Industry Science and Technology* (轻工科技), 2014, 30(10): 22-23.
- Xu YJ (许友姣), Lu LX (陆利霞), Xiong XH (熊晓辉). Technologies to improing The Stability of the natural food colorants [J]. *Food R D* (食品研究与开发), 2008, (02): 188-192.
- Wang J (王君), Zhang BS (张宝善). Research progress on natural pigments produced by microorganisms [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 2007, (3): 580-583.
- Liu W (刘维), Ruan LY (阮璐雅), Guan CL (管成林), et al. Study on stability of red pigments produced by an edno-

- pHyctic fungus H1B1 from *Dendrobium officinale* [J]. *China Food Addit* (中国食品添加剂), 2016, (01): 71-75.
- 8 Zhang LQ(张立强), Liang HB(梁华兵), Ai TS(艾桃山), *et al.* Characterization of a Red Pigments Producing Fungus and Study on the Stability of the Red Pigments [J]. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2015, 54: 2863-2865.
- 9 Li WJ(李文娟), Lv JL(吕嘉栎), Du B(杜冰), *et al.* Study on Properties of Pigment Produced during the Liquid Fermentation of *Eurotium cristatum* [J]. *Food Ind* (食品工业), 2016, 37(1): 27-31.
- 10 Zhou J(周静), Liu Z(刘妹), Hu CY(胡晟源), *et al.* Isolation and identification of yellow pigment producing marine fungi strain and characterization of the melanin pigment [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2017, 38: 217-220.
- 11 Yang L(杨柳), Wang QQ(王青青), Wu JX(吴俊贤), *et al.* Stability of yellow pigment from *Lachnum* sp. [J]. *Microbiology China* (微生物学通报), 2016, 43(5): 1042-1050.
- 12 Li YT(李玉婷), Lv JL(吕嘉栎). Study on stability and antioxidant activity of the yellow pigments from *Eurotium cristatum* [J]. *Microbiology China* (微生物学通报), 2013, 40: 2030-2036.
- 13 Lin GS(林观盛), Wang S(王松), Xia HG(夏华刚), *et al.* Studies on Resources of Macro-fungi in Southwest University [J]. *Indian J Agr Sci* (安徽农业科学), 2010, 38: 20875-20877.
- 14 Gao Y(高越), Xi YB(郗砚彬). A new Guanacastane type diterpenoid compound was isolated from the gibbon. *J Tradit Chin Med* (国际中医中药杂志), 2012, 34: 676-676.

(上接第 126 页)

- 31 Shao ZZ(邵正中), Wu D(吴冬), Li GX(李光宪), *et al.* Raman spectroscopic investigation the Relation between structure and function of silk *Fibroin* [J]. *Chin J Light Scatter* (光散射学报), 1995, 7(1): 3-6.
- 32 Idris A, Vijayaraghavan R, Rana UA, *et al.* Dissolution and regeneration of wool keratin in ionic liquids [J]. *Green Chem*, 2014, 16: 2857-2864.
- 33 Rao DR, Gupta VB. Crystallite orientation in wool fibers [J]. *J Appl Polym Sci*, 1992, 46: 1109-1112.
- 34 Li ZL(李志林), Wu RH(吴瑞红). Preparation and characterization of crystalline ultrafine silk powder for cosmetics [J]. *Chem Bioeng* (化学与生物工程), 2006, 23(11): 57-59.
- 35 Liu C(刘畅). Optimized preparation of the keratin sponge film and its application [D]. Wuxi: Donghua University (东华大学), Ph.D. 2014.
- 36 Chu YM(储咏梅), Lin H(林红), Chen YY(陈宇岳). Modification on UV-protective ability of oxidized raw bamboo fabric treated by wool keratin [J]. *Wool Textile J* (毛纺科技), 2010, 38(2): 8-11.
- 37 Wan Z(万震), Liu S(刘嵩). The latest research progress of anti-ultraviolet fabric [J]. *Dyeing Finishing* (印染), 2001, 27(1): 42-44.
- 38 Wang H(王浩), Zhao WT(赵为陶), Chen YY(陈宇岳), *et al.* Preparation of wool keratin anti-ultraviolet finish and its application [J]. *Dyeing Finishing* (印染), 2011, 37(15): 4-7.
- 39 Du XH(杜小豪), Xu W(徐卫). The method of sunscreen effect evaluation of cosmetics ultra-violet spectroscopy [J]. *China Surfactant Detergent Cosmet* (日用化学工业), 1998, 3: 43-46.