

## 2 株长白红景天内生真菌的鉴定及抗氧化活性条件的优化

王梦亮<sup>1</sup>, 郭婷婷<sup>1,2</sup>, 张娜莎<sup>1,2</sup>, 崔晋龙<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>山西大学应用化学研究所; <sup>2</sup>山西大学生物技术研究所, 太原 030006

**摘要:** 本实验通过形态学鉴定和 PCR 扩增 rDNA-ITS 序列分析, 确定两株长白内生真菌 Ra-R-32、ZPRa-S-2 的种属, 采用正交设计优化其 DPPH 抗氧化发酵条件, 并通过测定 DPPH·清除能力、·OH<sup>-</sup>清除能力、Fe<sup>2+</sup>螯合能力、O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力及亚硝酸盐清除能力等方法对其抗氧化活性综合评价。实验显示, Ra-R-32 和 ZPRa-S-2 分别隶属于 *Hypocrea longipilosa* 和 *Aspergillus sydowii*; Ra-R-32 培养的最佳条件为: 葡萄糖 35 g/L, 蛋白胨 3 g/L, pH 8, 35 °C, 装液量 100 mL/250 mL; ZPRa-S-2 培养的最佳条件为: 蔗糖 35 g/L, 牛肉膏 3 g/L, pH 6, 30 °C, 装液量 150 mL/250 mL。最佳发酵时间都为 10 d。它们的 DPPH·清除能力、·OH<sup>-</sup>清除能力、O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力较强, 其中, Ra-R-32 的 EC<sub>50</sub> 值分别为 4.72、7.50、1.60 mg/mL; ZPRa-S-2 的 EC<sub>50</sub> 值分别为 2.88、8.99、4.12 mg/mL。结果表明优化条件下二菌株均具有良好的抗氧化能力。

**关键词:** 长白红景天; 内生真菌; 抗氧化; 条件优化

中图分类号: Q939.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.022

### Identification and Fermentation Optimization of Two Endophytic Fungi from *Rhodiola angusta*

WANG Meng-liang<sup>1</sup>, GUO Ting-ting<sup>1,2</sup>, ZHANG Na-sha<sup>1,2</sup>, CUI Jin-long<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Applied Chemistry, Shanxi University; <sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** Two endophytic fungi, Ra-R-32 and ZPRa-S-2, from *Rhodiola angusta* were isolated and identified. Their fermentation conditions and antioxidant activity were optimized and evaluated, respectively. Fungal identification methods were based on morphological observation and their ITS ribosomal DNA sequences. Orthogonal test was applied to optimize the fermentation conditions based on scavenging DPPH· activity. In addition, the antioxidant activities were subjected to DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, Fe<sup>2+</sup> chelating, superoxide radical scavenging and nitrite clearing assays. The results showed that Ra-R-32 and ZPRa-S-2 belonged to *Hypocrea longipilosa* and *Aspergillus sydowii*, respectively. The optimal fermentation conditions for Ra-R-32 were as follows: glucose 35 g/L, peptone 3 g/L, initial pH at 8.0, the loading volume was 100 mL in 250 mL flask, and culture temperature was 35 °C. The optimal fermentation conditions for ZPRa-S-2 were as follows: sucrose 35 g/L, beef extract 3 g/L, initial pH at 6.0, the loading volume was 150 mL in 250 mL flask, and culture temperature was 30 °C, and the optimal fermentation time for both fungi were 10 d. Both fungi exhibited excellent scavenging capacities against DPPH, hydroxyl radical and superoxide anion. The EC<sub>50</sub> values of Ra-R-32 were 4.72, 7.50 and 1.60 mg/mL; and the EC<sub>50</sub> values of ZPRa-S-2 were 2.88, 8.99 and 4.12 mg/mL, respectively. The results showed that two endophytic fungi from *R. angusta* have remarkable antioxidant capacity.

**Key words:** *Rhodiola angusta*; endophytic fungi; antioxidant; fermentation optimization

长白红景天 (*Rhodiola angusta*) 主要分布在我国东北, 尤其是长白山地区<sup>[1]</sup>。红景天苷和黄酮类物质是其活性成分, 具有抗氧化、增强免疫力等

药理作用<sup>[2,3]</sup>, 在食品、保健品和化妆品等开发中主要作为抗氧化剂添加物使用。

从具有抗氧化功能的传统药用植物中筛选天然抗氧化剂是正确的研究方向, 但是, 它们在植物中含量往往很低, 加上植物资源本身紧缺等问题, 严重限制其开发。近年来, 研究者发现, 药用植物中蕴含着丰富的、与宿主功能类似的内生真菌, 并从真菌中分

收稿日期: 2014-04-22 接受日期: 2014-11-06

基金项目: 国家自然科学基金(31270383); 高等学校博士学科点专项科研基金(20121401120001); 山西省自然科学基金(2014011029-1)

\* 通讯作者 Tel: 86-351-7016101; E-mail: cjl717@163.com

离获得了体现宿主功能的天然产物,比如,从金鸡纳树内生真菌中分离出金鸡纳碱<sup>[4]</sup>。同时,从抗氧化植物内生真菌中分离鉴定出具有抗氧化功能的天然化合物,也为寻找抗氧化天然产物提供了思路。比如,银杏内生真菌 *Chaetomium globosum* CDW7 能够有效合成一种抗氧化物质 flavipin<sup>[5]</sup>,南方红豆杉内生真菌 *Xylariales* sp. 固体发酵产物中的化合物 10, 11-dihydroxynerolidol 具有一定的抗氧化作用<sup>[6]</sup>。植物的抗氧化主要是通过其本身富含的黄酮、香豆素、酚酸等天然物质,清除体内的·OH<sup>-</sup>和O<sub>2</sub><sup>-</sup>等自由基或激活体内抗氧化体系等维持细胞处于正常生理水平,达到抗氧化的目的<sup>[7]</sup>。

红景天属植物是最具抗氧化能力的药用植物之一,其中蕴藏的内生真菌及其抗氧化物质尚无报道。本实验室首次从长白红景天中分离了 50 株内生真菌,鉴定了二株真菌 Ra-R-32 和 ZPRa-S-2,对其 DP-PH 抗氧化发酵条件进行了优化,并采用 6 种方法对它们的抗氧化活性进行综合评价,为其深入研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

真菌 Ra-R-32 和 ZPRa-S-2 分离自长白红景天的健康组织,植物材料于 2012 年 5 月采集于吉林省延边州安图县的长白山(N 38°46′~47°30′,E 121°08′~134°),由崔晋龙鉴定为长白红景天 *Rhodiola angusta* Nakai。以上材料均保藏于山西大学应用化学研究所。

### 1.2 试剂与仪器

试剂:1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),梯希爱(上海)化工工业发展有限公司;Ferrozine(菲洛嗪),阿法埃莎(天津)化学有限公司;总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒,南京建成生物工程研究所;其它试剂均为分析纯。

仪器:生物摄影显微镜、电泳仪、凝胶成像系统、CR 型高速冷冻离心机、UV2450 紫外-可见分光光度计、旋转蒸发仪。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 真菌鉴定

将真菌接种在察氏培养基(CZ)平板上,28℃培养 7 d,记录菌落形态特征;挑取菌丝,在显微镜下观察菌丝、孢子、产孢结构等特征,结合文献,鉴定种属。采用 CTAB 法提取基因组 DNA,用引物 ITS1

(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和 ITS4(TCCTCGCTTATTGATATGC)对真菌 ITS-rDNA 进行 PCR 扩增,程序为 94℃ 3 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 延伸 5 min,4℃ 保藏。送上海生工生物工程公司测序,提交至 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),进行相似性比对。综合上述二种方法确定其种属。

#### 1.3.2 内生真菌发酵产物中黄酮化合物的提取与含量测定

将纯化好的内生真菌接种于装有 100 mL 液体 CZ 的三角瓶(250 mL)中,于 25℃,120 rpm 条件下培养 10 d 后,4 层纱布过滤。发酵液于 10000 rpm 条件下离心 10 min,取上清,加入 5 倍体积的 95% 乙醇,去沉淀。上清液于 45℃,8×10<sup>3</sup> Pa 条件下旋转蒸发,获得发酵液浓缩物。称取一定量浓缩物,按液料比 1:10 加入 75% 乙醇浸泡 30 min,超声提取 1 h,得到的滤渣再重复提取 2 次。合并滤液,于 45℃,8×10<sup>3</sup> Pa 条件下旋转蒸发,获得黄酮化合物粗提物,称重。加双蒸水定容为 10 mg/mL 的母液,放 4℃ 条件下备用。

以芦丁为标准品,建立标准曲线进行总黄酮含量定量分析。分别取 0.20 mg/mL 芦丁对照品溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;再加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;最后加入 10% 氢氧化钠溶液 4.0 mL,用蒸馏水定容至 10 mL,摇匀,放置 15 min;以不加对照品溶液为空白。在 510 nm 处测定其吸光值。校准曲线方程为  $Y = 8.23819X - 0.0095$ ,  $R^2 = 0.9993$ 。以 2 mL 黄酮化合物粗提物代替芦丁进行试验,测定其在 510 nm 处的吸光值,通过标准曲线计算二株真菌 Ra-R-32 和 ZPRa-S-2 发酵液粗提物中的总黄酮含量分别为 48.52 mg/g 和 90.18 mg/g。

#### 1.3.3 发酵条件的优化

选择 DPPH 自由基清除能力为评价指标,以液体 CZ 为基础培养基,分别以淀粉、葡萄糖、蔗糖、乳糖作为碳源,以酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、硝酸钠作为氮源,进行碳源、氮源单因子优化。以此为基础,利用 DPS 软件设计 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交实验(表 1),从而确定抗氧化能力最佳的碳源量、氮源量、pH 值、温度、装液量等条件。之后,分别测定发酵 4、6、8、10、12 d 时的抗氧化能力,确定最佳发酵时间。

在优化发酵条件下,通过 1.3.2 中的测定方法,

得 Ra-R-32 和 ZPRa-S-2 发酵液粗提物中的总黄酮含量分别为 69.14 mg/g 和 108.25 mg/g, 均高于优

化前的总黄酮含量, 表明优化试验结果良好。以此为基础进行下面的抗氧化能力评价。

表 1  $L_{16}(4^5)$  正交试验因子/水平表

Table 1 Factors and levels of  $L_{16}(4^5)$  test

因素 Factors	水平 Levels			
	1	2	3	4
(A)碳源 Carbon source(g)	20	25	30	35
(B)氮源 Nitrogen source(g)	1	2	3	4
(C)pH	5	6	7	8
(D)温度 Temperature(°C)	20	25	30	35
(E)装液量 Liquid medium(mL)	50	100	150	200

### 1.3.4 DPPH 自由基清除能力的测定<sup>[8]</sup>

将 2 mL 样液与 4 mL 50 mg/L 的 DPPH 混合, 充分振荡, 37 °C 恒温、避光反应 30 min, 在 517 nm 测定 OD 值。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以  $V_0$  作阳性对照, DPPH 甲醇溶液作空白对照。根据下面公式计算样品对 DPPH 自由基的清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

$A_0$  为空白对照 OD 值,  $A_i$  为样品或阳性对照 DPPH 溶液的 OD 值。

### 1.3.5 羟基( $\cdot\text{OH}^-$ )自由基清除能力测定

利用分光光度法测定 Fenton 反应产生的  $\cdot\text{OH}^-$ <sup>[9]</sup>。分别向不同编号试管加入 20 mmol/L 水杨酸钠溶液 0.6 mL、1.5 mmol/L 硫酸亚铁溶液 2 mL、样液 1 mL, 混匀后再加入 6 mmol/L 过氧化氢溶液 1.4 mL, 充分振荡。37 °C 恒温反应 1 h, 在 510 nm 测定 OD 值。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以  $V_0$  作阳性对照, 以蒸馏水代替样液作空白对照。根据下面公式计算样品对羟基自由基的清除率:

$$\text{OH}^- \text{基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

$A_0$  为空白对照的 OD 值,  $A_i$  为加有样品或阳性对照后的 OD 值。

### 1.3.6 亚铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )螯合能力测定

采用 Ferrozine 比色法<sup>[8]</sup>。分别移取 1 mL 样品溶液于不同试管, 依次加入 3.7 mL 55% 乙醇、0.1 mL 2 mmol/L  $\text{FeCl}_2$  和 0.2 mL 5 mmol/L Ferrozine, 振荡混匀, 室温下静置 20 min。于 562 nm 测定 OD 值。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以 EDTA 二钠盐作阳性对照, 以 55% 乙醇作空白对照。根据下面公式计算样品的  $\text{Fe}^{2+}$  螯合能力:

$$\text{Fe}^{2+} \text{螯合能力}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

$A_0$  为空白对照的 OD 值,  $A_i$  为加有样品或阳性对照后的 OD 值。

### 1.3.7 超氧阴离子( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )清除能力测定

参照邻苯三酚自氧化法<sup>[10]</sup>。向 10 mL 比色管依次加入 3 mL pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液、1 mL 0.2 mmol/L NBT(四氮唑蓝)溶液、1 mL 样品溶液、1 mL 10 mmol/L 邻苯三酚溶液, 摇匀后用蒸馏水稀释至刻度。37 °C 水浴反应 4 min 后, 立即滴加两滴 10 mol/L HCl 终止反应, 于 536 nm 处测定 OD 值。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以  $V_0$  作阳性对照, 以 80% 乙醇代替试样作空白, 同时测定不加 NBT 体系的 OD 值。根据公式计算样品的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  清除率:

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

$A_0$  为不加 NBT 的 OD 值;  $A_0$  为空白对照的 OD 值;  $A_i$  为样液的 OD 值。

### 1.3.8 亚硝酸盐清除能力测定

采用盐酸萘乙二胺法<sup>[11]</sup>。向反应管中依次加入 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的亚硝酸钠 3 mL, pH 3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 5 mL 和样液 2 mL, 振荡混匀。于 37 °C 水浴反应 15 min 后立即加入 2 mL 0.4% 对氨基苯磺酸, 摇匀, 室温静置 3-5 min 后, 加入 1 mL 0.2% 盐酸萘乙二胺, 振荡混匀, 静置 15 min, 于 538 nm 测定 OD 值。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以  $V_0$  作阳性对照, 以蒸馏水代替样液作空白对照。根据下面公式计算样品的亚硝酸盐清除率:

$$\text{亚硝酸盐清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

$A_0$  为空白对照 OD 值,  $A_i$  为样品或阳性对照后的 OD 值。

### 1.3.9 总抗氧化能力测定

采用南京建成生物工程研究所研制的总抗氧化能力测定试剂盒进行总抗氧化能力测定。根据实际情况, 本实验定义在 37 °C 时, 每分钟每毫升待测液使反应体系的 OD 值每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位 (U)。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。以  $V_0$  作阳性对照。根据下面公式计算样品的总抗氧化能力:

$$\text{总抗氧化能力/U/mL} = \frac{A_i - A_0}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总量}}{\text{取样量}} \div$$

黄酮粗提物浓度

$A_0$  为空白对照的 OD 值,  $A_i$  为加有样品或阳性对照后的 OD 值。

### 1.4 统计方法

试验中各  $EC_{50}$  表示各抗氧化能力清除率为 50% 时, 所对应的样品浓度。其值越小, 表明清除能力

越强。其值效应分析通过 SPSS Statistics 17.0 完成。

试验数据的差异显著性采用 DPS 数据处理软件, 通过最小显著差数法 (LSD) 进行分析。不同大写字母表示差异性显著 ( $P < 0.05$ ), 小写字母表示差异性极显著 ( $P < 0.01$ )。试验结果均通过 Origin-Pro 8.0 软件分析作图。

## 2 实验结果

### 2.1 鉴定结果

形态特征研究表明, Ra-R-32 菌落呈淡黄绿色, 平铺, 边缘呈啮蚀状, 气生菌丝较短, 呈白色, 背面为黄色 (图 1A); 菌丝有隔, 具分支, 分生孢子为菌丝断裂形成的节孢子, 淡色, 短柱形 (图 1B)。ZPRa-S-2 菌落分散分布, 孢子呈粉末状, 绿色, 菌落边缘呈白色 (图 1C); 菌丝有隔, 分生孢子发达, 分生孢子梗顶部膨大为球状, 产生数条放射状的分生孢子链 (图 1D)。结合鉴定文献<sup>[12]</sup>, 初步鉴定分别为肉座菌属 (*Hypocrea*)、曲霉属 (*Aspergillus*)。

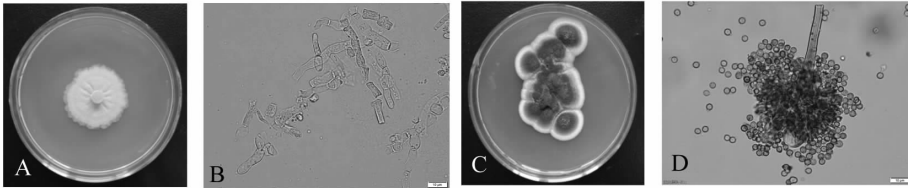


图 1 Ra-R-32 (A, B) 和 ZPRa-S-2 (C, D) 的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of Ra-R-32 (A, B) and ZPRa-S-2 (C, D)

Ra-R-32 和 ZPRa-S-2 的 ITS 序列提交至 Gen-Bank, 获得序列号 KJ542277 和 KJ542307。经 Blast 相似性比对, Ra-R-32 与 *Hypocrea longipilosa* 同源性和序列相似度均为 100%。ZPRa-S-2 与 *Aspergillus sydowii* 同源性和序列相似度均为 100%。综合形态和分子两种鉴定结果, 二株菌为 *Hypocrea longipilosa*

和 *Aspergillus sydowii*。

### 2.2 发酵条件的优化

#### 2.2.1 最佳碳源、氮源的确定

供试 4 种碳源中, 葡萄糖为 Ra-R-32 对 DPPH 自由基的清除效果的最佳碳源, 与其它碳源相比, 差异性极显著 ( $P < 0.01$ ); 葡萄糖和蔗糖为 ZPRa-S-2

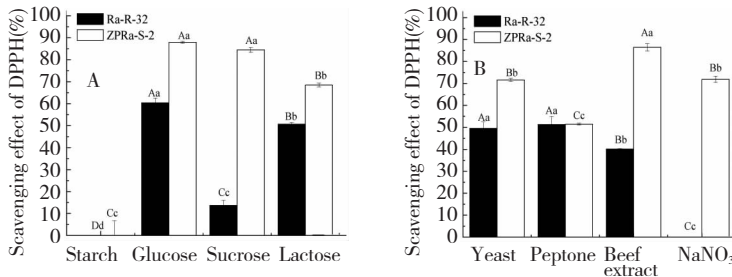


图 2 Ra-R-32、ZPRa-S-2 发酵条件中最佳碳源、氮源的确定

Fig. 2 Determination of optimal carbohydrate and nitrogen sources

注: A 和 B 分别为不同碳源和氮源对 Ra-R-32、ZPRa-S-2 发酵液抗氧化活性的影响。

Note: A and B refer to effects of C and N sources on antioxidant activities of Ra-R-32 and ZPRa-S-2.

的最佳碳源,两者差异性不显著。试验中分别选择葡萄糖、蔗糖作为 Ra-R-32 和 ZPRa-S-2 发酵培养基的碳源(图 2A)。

供试的 4 种氮源中,以蛋白胨、酵母膏为氮源时,Ra-R-32 对 DPPH 自由基的清除能力依次减弱,但差异不显著;以牛肉膏为氮源时,ZPRa-S-2 对 DP-

PH 自由基清除能力最强,与其它氮源相比,差异性极显著( $P < 0.01$ )。试验中分别选择蛋白胨、牛肉膏作为 Ra-R-32 和 ZPRa-S-2 发酵培养基的氮源(图 2B)。

2.2.2 发酵条件的优化

表 2 Ra-R-32、ZPRa-S-2 最佳发酵条件的正交实验直观及方差分析

Table 1 Results of orthogonal tests of optimal fermentation condition of Ra-R-32 and ZPRa-S-2

处理编号 Codes	因素 Factors					DPPH 清除能力(%) The DPPH scavenging effect (%)						
	A	B	C	D	E	Ra-R-32		ZPRa-S-2				
1	20	1	5	20	50	0.99		51.78				
2	20	2	6	25	100	12.68		83.16				
3	20	3	7	30	150	59.30		80.94				
4	20	4	8	35	200	54.04		54.26				
5	25	1	6	30	200	4.01		71.66				
6	25	2	5	35	150	19.82		23.34				
7	25	3	8	20	100	67.18		93.00				
8	25	4	7	25	50	13.69		54.29				
9	30	1	7	35	100	75.15		-1.78				
10	30	2	8	30	50	80.25		93.54				
11	30	3	5	25	200	0.50		77.51				
12	30	4	6	20	150	1.24		85.95				
13	35	1	8	25	150	78.30		80.70				
14	35	2	7	20	200	57.42		15.70				
15	35	3	6	35	50	62.74		93.83				
16	35	4	5	30	100	10.50		83.45				
	T <sub>1</sub>	380.99	451.26	95.42	380.47	473.02	变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
	T <sub>2</sub>	290.03	510.50	217.94	315.49	496.50	A	5155.31	3	1718.44	303.35	0.0001
	T <sub>3</sub>	471.43	569.16	616.66	438.13	475.97	B	5199.79	3	1733.26	305.97	0.0001
	T <sub>4</sub>	626.88	238.41	839.30	635.24	323.84	C	29889.09	3	9963.03	1758.76	0.0001
Ra-R-32	$\bar{x}_1$	31.75	37.61	7.95	31.71	39.42	D	4762.1	3	1587.37	280.22	0.0001
	$\bar{x}_2$	24.17	42.54	18.16	26.29	41.37	E	1587.257	3	529.09	93.40	
	$\bar{x}_3$	39.29	47.43	51.39	36.51	39.66	误差	181.2734	32	5.66		
	$\bar{x}_4$	52.24	19.87	69.94	52.94	26.99						
	R	28.07	27.56	61.99	26.65	14.39						
	T <sub>1</sub>	810.44	607.07	708.21	751.94	972.76	变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
	T <sub>2</sub>	819.30	647.22	1016.48	979.44	773.49	A	98.7107	3	32.9036	6.2371	0.0019
	T <sub>3</sub>	778.30	1035.84	539.93	988.78	825.45	B	11274.1	3	3758.034	712.3617	0.0001
	T <sub>4</sub>	821.07	938.98	964.50	508.96	657.41	C	12480.71	3	4160.236	788.602	0.0001
ZPRa-S-2	$\bar{x}_1$	67.54	50.59	59.02	62.66	81.06	D	12886.38	3	4295.459	814.2346	0.0001
	$\bar{x}_2$	68.28	53.93	84.71	81.62	64.46	E	4276.328	3	1425.443	270.2027	0.0001

$\bar{x}_3$	64.86	86.32	44.99	82.40	68.79	误差	168.8146	32	5.2755
$\bar{x}_4$	68.42	78.25	80.37	42.41	54.78				
R	3.56	35.73	39.71	39.98	26.28				

如表2方差分析知,各因素对试验结果影响极显著( $P < 0.01$ )。极差R值的大小表示该因素对试验结果的影响大小。对Ra-R-32抗氧化发酵体系影响大小为:pH值>碳源量>氮源量>温度>装液量;对ZPRa-S-2影响大小为:温度>pH值>氮源量>装液量>碳源量。T1、T2、T3、T4值分别表示各菌株在不同发酵条件下同一因素在各水平时清除率之和, ( $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$ 、 $x_4$ 为各发酵条件在各水平处清除率的算术平均数。取各试验因子的清除率总和(T值)或算术平均数( $\bar{x}$ 值)的最大值时的对应条件,即可得出最优处理组合。Ra-R-32最佳优化条件为 $A_4B_3C_4D_4E_2$ ,即葡萄糖35 g/L,蛋白胨3 g/L, pH 8,温度35℃,装液量100 mL/250 mL;ZPRa-S-2的最佳优化条件为 $A_4B_3C_2D_3E_1$ ,即蔗糖35 g/L,牛肉膏3 g/L, pH 6,温度30℃,装液量150 mL/250 mL。

### 2.2.3 最佳发酵时间的确定

Ra-R-32、ZPRa-S-2对DPPH自由基清除能力随时间延长逐渐增大,第10天时清除能力均达到最大,分别为88.27%、93.92%,随后清除能力均下降(图3)。

以最佳发酵条件为基础,在第10 d时Ra-R-32、ZPRa-S-2对DPPH自由基清除能力分别达到88.27%、93.92%,高于正交试验中的16组实验结果,因此,最佳发酵时间为10 d。

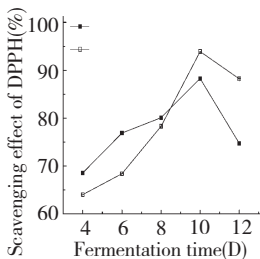


图3 最佳发酵时间的确定

Fig. 3 Optimization of fermentation time for antioxidant test

### 2.3 Ra-R-32 抗氧化活性评价

Ra-R-32的抗氧化能力如图4所示。其质量浓度与DPPH自由基清除能力、 $\cdot OH^-$ 清除能力呈量效关系,随质量浓度的增大清除能力逐渐增强,质量

浓度为10 mg/mL时,清除率均达到最大值,分别为84.03%、61.05%。其 $Fe^{2+}$ 螯合能力随浓度增大而降低,当质量浓度为2 mg/mL时清除率最大,为12.60%。其 $O_2^-$ 清除能力随着浓度的增大而逐渐升高,在4 mg/mL时增幅较大,质量浓度为7 mg/mL时,清除率达到83.29%。其亚硝酸盐清除能力较弱,且随浓度变化不大,在13.65%~21.00%范围内波动。其总抗氧化能力随浓度增大而逐渐增大,浓度为10 mg/mL时,总抗氧化能力为6.67 U/mL。结果表明,Ra-R-32的抗氧化能力与DPPH自由基、 $\cdot OH^-$ 和 $O_2^-$ 的清除能力有关,三者的 $EC_{50}$ 值分别为4.72、7.50、1.60 mg/mL。阳性对照 $V_0$ 对DPPH、 $\cdot OH^-$ 、 $O_2^-$ 、亚硝酸盐清除率的 $EC_{50}$ 值均小于0.10 mg/mL,其总抗氧化能力随浓度增大而增强,浓度为1 mg/mL时为28.78 U/mL;EDTA的 $Fe^{2+}$ 螯合能力 $EC_{50}$ 值为0.032 mg/mL(图6)。Ra-R-32的6种抗氧化能力均不及阳性对照。

### 2.4 ZPRa-S-2 抗氧化活性评价

ZPRa-S-2不同方法的抗氧化能力如图5所示。ZPRa-S-2对DPPH清除能力随着浓度增大而增大,在浓度达到6 mg/mL后趋于平稳,清除率最大值达87.00%;在浓度为1-6 mg/mL时,对 $\cdot OH^-$ 清除能力较低,且稳定,浓度超过7 mg/mL时,清除能力大幅增强,清除率最大达到69.82%;对 $Fe^{2+}$ 螯合能力和亚硝酸盐清除能力较差,随浓度变化不大,均小于10.00%;对 $O_2^-$ 清除能力随浓度增大而增大,浓度为10 mg/mL时,清除率达到97.08%。随浓度

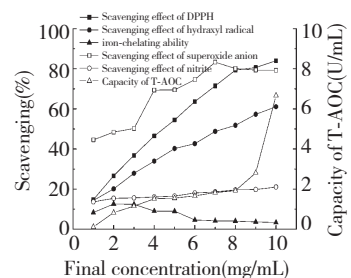


图4 不同浓度Ra-R-32菌株发酵液提取物的6种抗氧化活性

Fig. 4 Six antioxidant activities of fermentation extract of Ra-R-32 under different concentrations

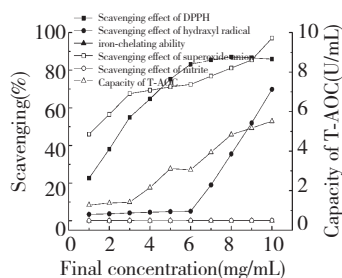


图5 不同浓度 ZPRa-S-2 菌株发酵液提取物的 6 种抗氧化活性

Fig. 5 Six antioxidant activities of fermentation extract of ZPRa-S-2 under different concentrations

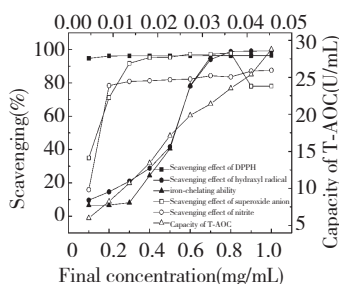


图6 不同浓度的阳性对照抗氧化实验清除能力

Fig. 6 The antioxidant activities of positive controls under different concentrations

增大,其总抗氧化能力逐渐增大,浓度为 10 mg/mL 时,总抗氧化能力为 5.52 U/mL。ZPRa-S-2 的 DPPH 清除率、 $\cdot\text{OH}^-$  清除率、 $\text{O}_2^-$  清除率的  $\text{EC}_{50}$  值分别为 2.88、8.99、4.12 mg/mL。与阳性对照抗氧化能力相比(图 6),ZPRa-S-2 相对较弱。

### 3 讨论

Strobel<sup>[13]</sup> 经过长期的研究和统计后提出,地球上几乎所有的植物都含有内生真菌,在长期进化过程中,内生真菌与宿主进行了基因、信息和物质的交换,这赋予了真菌可能具有宿主相似功能的活性,使得内生真菌成为目标功能化合物筛选的资源库。长白红景天作为我国红景天使用的主要品种之一,主要成分是红景天苷、黄酮等化合物,对 DPPH 自由基、 $\cdot\text{OH}^-$ 、 $\text{O}_2^-$  等具有较强的清除能力<sup>[2]</sup>。基于上述理论,本研究对二株红景天内生真菌抗氧化活性进行综合评价,具有客观、科学的特点。

实验中的二株真菌分布广泛,存在于土壤<sup>[14]</sup>、海洋<sup>[15]</sup>等环境中,同时也作为植物内生真菌被分离和使用<sup>[15,16]</sup>。文献表明,这两株菌具有生物转化和催化<sup>[15,18]</sup>、清除  $\text{O}_2^-$ <sup>[17]</sup> 和产生新天然产物的能

力<sup>[16]</sup> 等多样生物活性。比如,两株同种属真菌曾同时分离自南大西洋的海绵,它们都具有产生水解酶并分解苄基缩水甘油醚的生物活性<sup>[15]</sup>。*Hypocrea longipilosa* 的无性型为 *Trichoderma longipile* 真菌,曾被用于接种山茶花用于抑制山茶花枯萎病的研究<sup>[14]</sup>,其他研究相对较少。而有关 *Aspergillus sydowii* 的研究则很丰富,作为内生真菌,它能产生 Xanthone,具有免疫抑制活性等<sup>[16]</sup>; Chung 等<sup>[17]</sup> 从这种菌中分离出三种倍半萜类物质,验证了它能够通过抑制  $\text{O}_2^-$  的产生,达到抑制炎症的作用;另外,它具有促进葡萄糖的消耗达到抑制糖尿病发生的活性;同时,它还具有将多种的 methylphenylacetone nitrile (腈类)化合物在温和条件下生物催化为多种羧酸化合物的能力<sup>[18]</sup> 等等。本实验中的二株真菌是首次从红景天中分离获得,它们的多种抗氧化活性预示着其具有产生相关功能化合物的潜力,这将为后续的研究提供理论依据。

### 参考文献

- 1 Wang SH(王思宏), Yin QF(尹起范), Fan YL(范艳玲), et al. Identification studies of wild and cultivated *Rhodiola saccharinensis* A. Bor and *Rhodiola angusta* Nakai taken from Changbai Mountains by Fourier transform infrared spectrometry. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学与光谱分析), 2004, 24: 957-959.
- 2 Choe KI, Kwon JH, Park KH, et al. The antioxidant and anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the root of *Rhodiola sachalinensis* A. BOR. *Molecules*, 2012, 17: 11484-11494.
- 3 Shi LL, Wang CY, Zhou XJ. Production of salidroside and tyrosol in cell suspension cultures of *Rhodiola crenulata*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2013, 114: 295-303.
- 4 Maehara S, Simanjuntak P, Maetani Y, et al. Ability of endophytic filamentous fungi associated with *Cinchona ledgeriana* to produce *Cinchona* alkaloids. *J Nat Med*, 2013, 67: 421-423.
- 5 Ye YH, Xiao Y, Ma L, et al. Flavipin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity. *App Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 7131-7139.
- 6 Yu M(于淼), Yang M(杨梅), Zhang LR(张连茹). A preliminary study of endophytic from *Taxus chinensis*. *J Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), 2013, 41: 332-335.