研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.03.004

薰衣草产酚酸内生真菌的分离及产物初步鉴定

熊天真， 谢诗语， 薛亚娟， 白 蓉， 冯佳婷， 管政兵， 廖祥儒， 蔡宇杰*

（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：利用人工种植的薰衣草及无锡本地采集的相同品种薰衣草，对其各组织内生真菌进行分离、纯化。分别分离得到 18 和 23 株内生真菌。对所筛选出的菌株进行固态发酵，并对其发酵培养产物进行提取。通过化学反应的方法从野外采集薰衣草内生真菌中筛选出一株产酚酸的菌株，并通过分子生物学方法对其进行初步鉴定，并对其固态发酵提取物进行初步研究。研究结果表明了薰衣草内生真菌的多样性，为通过微生物固态发酵产酚酸类物质提供理论和实验基础。

关键词：薰衣草；内生真菌；固态发酵；酚酸

中图分类号：Q 93　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2018)03—0250—06

Isolation of Endophytic Fungi of Phenolic Acids in Lavender and the Identification of Its Products

XIONG Tianzhen， *XIE Shiyu*， *XUE Yajuan*， *BAI Rong*，
FENG Jiating， *GUAN Zhengbing*， *LIAO Xiangru*， *CAI Yujie**

（Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：In this study，the endophyte fungi of lawender was isolated and identified.18 and 23 endophytic fungi were isolated from planting lavender and wild lavender. The strains were cultured by solid-state fermentation and to extract the fermentation culture products. Wild lavender extracted a strain endophytic fungi of phenolic acids by using the method of chemical reaction. And the strains were identified by the method of molecular biology. Solid-state fermentation extract was identified primarily. The diversity of endophytic fungi of lavender is reflected by the results of the study and the solid fermentation by microorganisms to produce phenolic acid material provided theoretical and experimental basis.

Keywords：lavender，endophytic fungi，solid state fermentation，phenolic acid

收稿日期：2015–09–30

基金项目：国家自然科学基金项目(21275066)。

* **通信作者**：蔡宇杰(1973—)，男，江苏无锡人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事天然产物发酵与提取研究。
E–mail：yu_jie_cai@ yahoo. com. cn

引用本文：熊天真，谢诗语，薛亚娟，等. 薰衣草产酚酸内生真菌的分离及产物初步鉴定[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(03)：250–255.

植物内生真菌是指在生活史的某一段时期或全部阶段生活于健康植物各组织和器官内部,不引起被感染的宿主植物组织明显症状改变的真菌[1]。植物内生菌具有多种作用[2],内生真菌在植物体内具有较为稳定的生存空间,不易受到环境条件的影响,可以在植物体内独立的分裂繁殖和传递,使之成为生物防治中具有潜力的微生物农药、抗菌剂[3]、增产菌或作为潜在的生防载体菌而被加以利用[4]。内生菌能够与宿主相互作用,产生具有生物活性的次级代谢产物[5]。李昆太等人从南方红豆杉中分离出一株能够产生紫杉醇的内生真菌,为解决紫杉醇生产带来了新的思路[6]。因此对植物内生菌进行开发来生产一些天然产物具有重要的意义[7]。

酚酸类化合物是指苯环上有若干个酚羟基的一类化合物,在植物中分布广泛,具有调节生长代谢、抵御病害入侵等多方面的功效,并且大多具有确切的药理活性和药用价值。研究表明,酚酸类化合物不仅具有显著的抗氧化[8-9]、抗自由基、抗菌[10]消炎以及预防心血管疾病的作用,而且具有抗癌[11]、抗炎症[12]和血小板凝聚[13]等功能。目前对植物提取物中总酚酸测定的研究较多[14-17],但是对植物内生菌固态发酵产物总酚酸含量测定的研究还很欠缺。因此,作者对薰衣草内生真菌进行筛选分离,并对固态发酵产物进行初步分析,能够对植物内生真菌的进一步开发提供理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料 于春季在江苏省无锡市采集的薰衣草及本实验室种植的同品种薰衣草进行实验。

1.1.2 培养基 筛菌培养基:PDA 琼脂培养基,添加氨苄青霉素,终质量浓度为 0.1 mg/mL。种子培养基:PDA 液体培养基。固态培养基:大米渣 15 g(粒度 1~2 mm),5%葡萄糖 0.75 g, 水 15 mL,pH 值自然,121 ℃灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 薰衣草各组织的表面消毒 分别取野外采集和人工种植的薰衣草各组织, 用自来水冲洗干净,用滤纸吸干表面的水分,用无菌水冲洗 3 次,再用 75%乙醇浸泡 3 min, 无菌水冲洗 4 次, 然后用 3%的次氯酸钠浸泡 2 min,用无菌水冲洗 4 次,以最后一次冲洗液涂平板,在 30 ℃条件下置于培养箱,检查表面消毒是否彻底。

1.2.2 内生真菌的分离与纯化 取表面消毒过的薰衣草各组织,分别放入灭过菌的研钵中,加入少量的无菌水,对其各组织进行研磨。取上清液进行梯度稀释,涂布于加有氨苄青霉素的 PDA 琼脂平板上,放入培养箱中培养 2~7 d,待平板上长出菌落。用平板划线的方法反复接种平板,直到分离出单一的典型菌落。

1.2.3 内生真菌的固态发酵 于三角瓶中加入种子培养基,灭菌。无菌条件下将纯化的菌种转入种子培养基中,置于 30 ℃的摇床上,200 r/min 摇瓶培养 3~5 d。待形成一定浓度的菌体小球后,将菌体转入灭过菌的固态培养基中,搅拌均匀,然后置于 30 ℃培养箱中培养 10 d,获得各菌株的固态发酵物。

1.2.4 对照品溶液的制备 精密称取迷迭香酸标准品 25 mg 置于 25 mL 量瓶中,加入 50%甲醇溶解并定容到刻度,得到 1 mg/mL 的迷迭香酸对照品溶液。

1.2.5 样品溶液的制备 精密称取发酵后的固态培养基 5 g,加 70%乙醇 50 mL,于 50 ℃的水浴锅中振荡提取 12 h,抽滤定容提取液。取 5 g 灭过菌的固态培养基在相同条件下进行提取实验,作为对照。

1.2.6 化学反应溶液的制备 精密吸取待测溶液 0.5 mL,加无水乙醇至 2.5 mL。分别加入 0.3%十二烷基硫酸钠溶液 1 mL、0.6%三氯化铁 0.25 mL,0.9%铁氰化钾 0.22 mL,摇匀,暗处放置 5 min。再加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 6 mL,摇匀,暗处放置 20 min。

1.2.7 精密度实验 精密吸取样品溶液 0.5 mL,按照含量测定方法,连续测定 5 次,结果相对标准偏差为 0.85%,表明所采用测定方法的精密度良好。

1.2.8 稳定性实验 精密吸取样品溶液 0.5 mL,按照含量测定方法,分别在 0,20,40,60,80 min 测定,结果相对标准偏差为 2.05 %,表明所采用的方法在 80 min 内稳定性较好。

1.2.9 重复性实验 取同一批发酵的固态培养基,按照样品溶液的制备方法制成样品 5 份,按照含量测定方法进行测定,结果相对标准偏差为 1.62%,表明所采用测定方法的重复性较好。

1.2.10 液相检测方法 色谱柱:LaChrom C_{18} 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相 A 和 B:分别是乙腈和甲酸溶液(0.1%);流量:1 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:35 ℃;进样体积:10 μL。

1.2.11 *质谱检测方法* 电离方式:采用负离子;毛细管电压 3.5 kV,锥孔电压 30 V,离子源温度 100 ℃,脱溶剂气温度 300 ℃,脱溶剂气流速 300 L/h,碰撞能量 6 eV,检测电压 1 700 V。

2 结果与分析

2.1 薰衣草内生真菌分离结果

从人工种植和野生采集的薰衣草各组织中分别分离得到 18 和 23 株内生真菌。对所筛选的菌株在组织中的分布进行了统计。统计发现,从根部筛选出的菌株数相对较多,从茎和叶中筛出的菌株数比较接近,从花中筛选出的菌株数最少,内生菌群在各组织中的分布可能存在数量上的差异性,这种差异性可能与各组织所接触的环境有关[18]。对比人工种植的薰衣草与野生的薰衣草中筛选出的菌株数,可以发现野生薰衣草中的内生菌群较为丰富,可能与野外的环境较为复杂有关[19]。

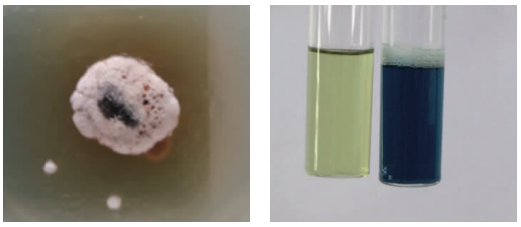
表 1 薰衣草内生真菌各组织分布

Table 1 Endophytic fungi of lavender distribution organizations

内生真菌来源	组织	数量/株	比例/%
人工种植薰衣草	根	7	38.8
	茎	3	16.6
	叶	5	28.0
	花	3	16.6
野生采集薰衣草	根	9	39.1
	茎	5	21.7
	叶	6	26.1
	花	3	13.1

2.2 产酚酸菌株的筛选及初步鉴定

为了探究菌株的产酚酸情况,对各菌株的固态发酵培养物提取后进行化学反应。结果显示,从野生薰衣草中筛选菌株 M1 的发酵提取物明显地显现蓝色,见图 1(b)。说明了 M1 为固态发酵产酚酸的菌株。对 M1 菌株形态进行观察,发现菌落长出白色的菌丝,并且菌丝表面有凝集的小液滴,见图 1(a)。通过 18S rRNA 测序和 BLAST 比对,发现与其高度同源的基本为曲霉属,见图 2。所以判断其为曲霉属。



(a) (b)

图 1 菌株 M1 形态及菌株 M1 化学反应溶液

Fig. 1 Morphology of M1 and chemical reaction solution of M1

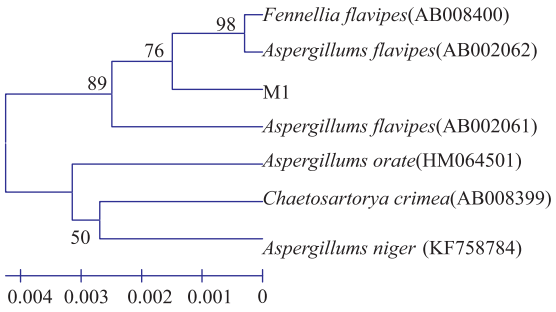


图 2 菌株 M1 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of M1

2.3 检测波长的选择

取对照品及 M1 固态发酵提取物,按照上述化学反应方法进行处理,然后在 200~900 nm 范围内测定吸光度,两种溶液的光谱吸收图谱基本一致,在 720 nm 处有最大吸收,因此选择 720 nm 为测量吸光度的检测波长。

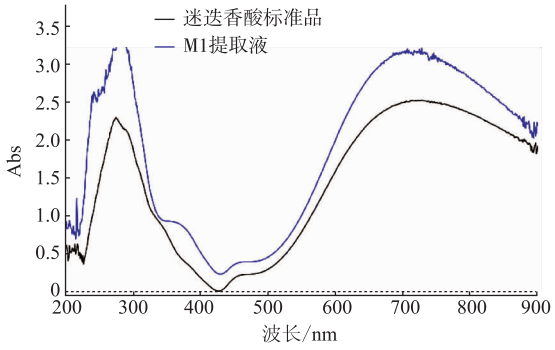


图 3 迷迭香酸标准品和 M1 发酵提取液波长扫描

Fig. 3 Rosemary acid standard and M1 fermentation extract wavelength scanning

2.4 线性关系考察

精密吸取迷迭香酸对照品溶液(质量浓度为 1 mg/mL)1、2、2.5、3、4 mL 定容到 5 mL,分别配置成 0.2,0.4,0.5,0.6,0.8 mg/mL 的迷迭香酸标准品溶

液,按照上述质量浓度测定方法,以显色剂为空白,720 nm 波长下测定吸光度，以吸光度为横坐标,迷迭香酸对照品的质量浓度为纵坐标绘制标准曲线。得线性回归方程为 y=0.241 2x−0.008 6,R^2=0.998 9,迷迭香酸质量浓度在 0.2~1 mg/mL 呈良好的线性关系。

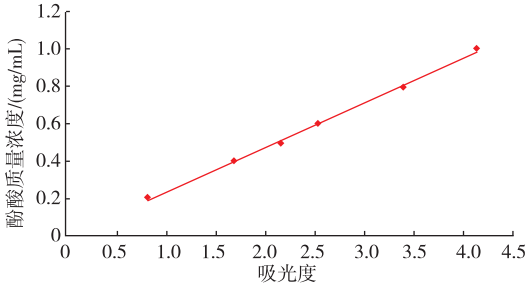


图 4　线性关系考察

Fig. 4　Linear relationship investigation

2.5　内生真菌 M1 固态发酵产物总酚酸质量分数的测定及加样回收实验

精密称取同一批样品 5 份,每份约 1 g,精密加入约5 mg 迷迭香酸对照品,按照 1.2.5 的方法制备样品,然后利用化学反应的方法进行显色反应,按照分光光度法,进行质量分数测定,计算回收率,见表2。

取 M1 菌株固态发酵后的培养基 5 g,按照含量测定方法制备提取液。分别吸取 0.5 mL 提取液,按照上述化学反应方法显色后测定吸光度,利用工作曲线计算出总酚酸的质量分数。可以看出 3 次测得的总酚酸平均质量分数为 7.938 mg/g,RSD 值为 0.615 %,在允许的误差范围内,见表 3。作者以迷迭香酸为对照品，对 M1 固态发酵产物总酚酸进行了质量分数测定,该方法灵敏、快速、简便、准确可靠。

表 2　加样回收实验结果

Table 2　Results of recoverie

编号	样品取样量/g	样品总酚酸量/mg	对照品量/mg	测定总酚酸量/mg	回收率/%	RSD/%
1	1.13	8.866	5.13	14.185	103.68	3.71
2	1.15	9.132	5.07	14.079	97.57	
3	1.01	8.112	5.02	12.928	95.94	
4	1.13	8.775	5.11	14.112	104.44	
5	1.08	8.521	5.05	13.558	99.74	

表 3　M1 固态发酵产物总酚酸质量分数测定

Table 3　M1 solid-state fermentation product total phenolic acid Determination

序号	提取物质量/g	吸光度(A_{720})	质量分数/(mg/g)	平均质量分数/(mg/g)	RSD/%
1	5.01	3.310	7.907	7.938	0.615
2	5.03	3.325	7.912		
3	5.01	3.346	7.994		

2.6　内生真菌 M1 固态发酵产物初步分析

按照上述高效液相色谱检测方法对固态发酵产物进行检测,结果见图 5。提取液在 280 nm 波长检测下的成分很可能是含有苯环的酚酸类物质[20]。图中有较强信号的两种成分的保留时间分别为 10.61、16.83 min,现对这两种物质进行分析。

200~600 nm 波长扫描见图 6，保留时间 10.61 min 出峰的物质在 310 nm 左右存在最大的吸收波长，且此物质在 280 nm 检测波长的液相中有比较强的信号,那么这种物质可能是含有共轭双键的多酚类物质，同时在 MS 图谱中还存在相对丰度较高的 325.0 的碎片峰。从图 7[M+H]⁻质谱图可知,相对分子质量为326。此外,存在 281.0 的碎片峰,推测为[M+H−COOH]⁺碎片,说明化合物具有一个羧基。那

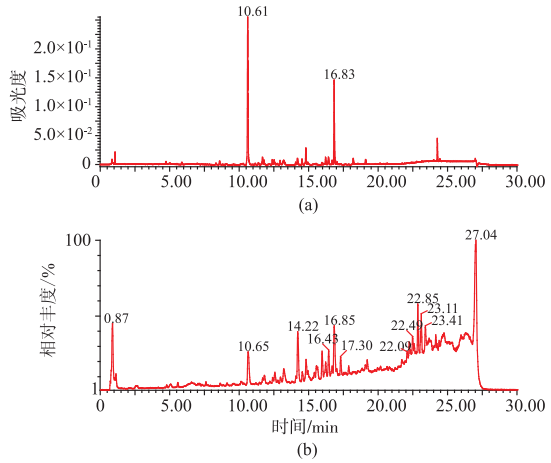


图 5　M1 固态发酵提取液高效液相色谱图及总离子流图

Fig. 5　HPLC figure of M1 solid-state fermentation extract and total ion flow diagram

么这种物质很可能是酚酸类的物质。

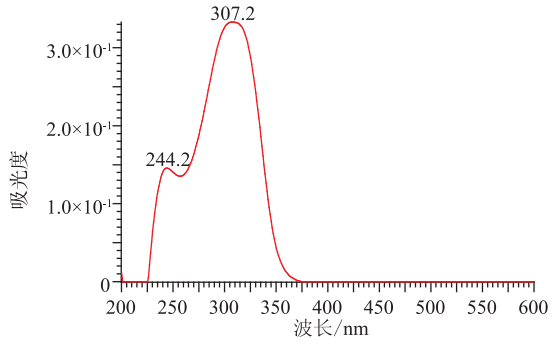


图 6　发酵提取物 10.61 min 处的波长扫描图谱

Fig. 6　Wavelength scanning of fermentation extracts at 10.61 min

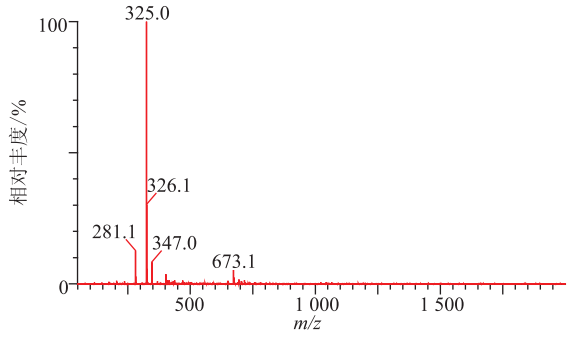


图 7　发酵提取物 10.61 min 处离子峰质谱检测结果

Fig. 7　MS results(right) of fermentation extracts at 10.61 min

200~600 nm 波长扫描见图 8，保留时间 16.83 min 出峰的物质在 243、286 nm 左右存在最大的吸收波长，此物质可能为含有苯环的物质[21]。从图 9[M+H]⁻质谱图可知，相对分子质量为 398。那么这种物质同样可能是酚酸类物质。

3 结　语

植物内生菌是生产天然产物的一个庞大的资源[22]，通过微生物发酵法生产天然产物较传统的植物提取有来源稳定以及产量大的优势[23]。对内生菌株进行合理地开发，利用有着巨大的价值[24-25]，然而

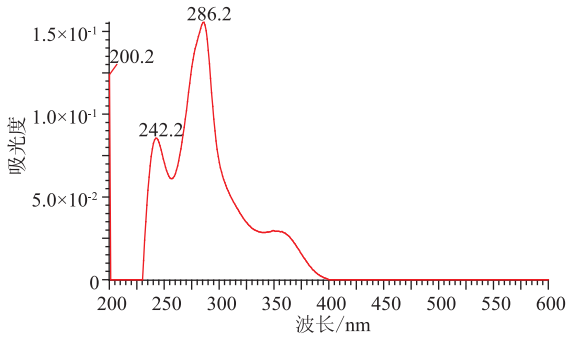


图 8　发酵提取物 16.83 min 处的波长扫描图谱

Fig. 8　Wavelength scanning of fermentation extracts at 16.83 min

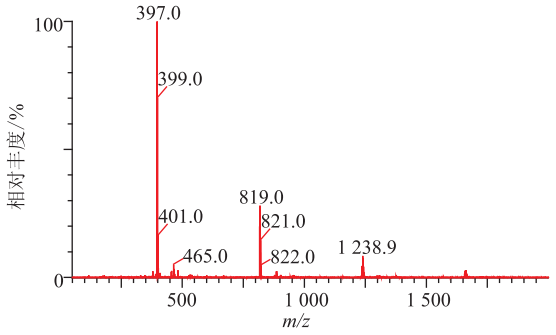


图 9　发酵提取物 16.83 min 处离子峰质谱检测结果

Fig. 9　MS results(right) of fermentation extracts at 16.83 min

寻找到合适的菌株生产出对人类有作用的天然产物还需要大量的研究工作。

本研究显示薰衣草各组织中存在着丰富的内生真菌。野外的环境复杂多变，而人工种植的薰衣草处在温度与湿度相对稳定的环境中。同一植株不同的组织中内生真菌的数量存在着一定的差别。对各菌株的固态发酵物进行提取，通过化学反应的方法筛选出一株产酚酸物质的菌株。然后对其发酵产物进行总酚酸质量分数的测定以及对所产酚酸物质进行初步的分析。然而对于酚酸物质的结构和作用还有待于进一步的研究。

参考文献：

[1] JIA Li,CHEN Shuying,ZHAI Yonggong,et al. Recent advances in studies on endophytes and their associated bioactive products [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**,2007,38(11):1750-1754.(in Chinese)

[2] HUA Yongli,OUYANG Shaoling,CHEN Meilan,et al. Advances of medical endophyte fungi studies[J]. **World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine Materia Medica**,2008,10(4):105-111.(in Chinese)

[3] LAURENT C,CARRIE WATERMAN,WAI S M,et al. Screening mangrove endophytic fungi for antimalarial natural products

[J]. **Marine Drugs**,2013,11(12):5036-5050.
[4] CHEN Yitao,WANG Weijian. Recent advances on the plant endophyte[J]. **Progress in Modern Biomedicine**,2009,9(16):3169-3172.(in Chinese)
[5] ZHANG Xiaorui. Research advances in endophytes and their developmental application[J]. **Progress in Modern Biomedicine**,2007,7(11):1747-1750.(in Chinese)
[6] LI Kuntai,PENG Weifu,ZHOU Jia,et al. Isolation and identification of a paclitaxel-producing endophyte from taxus chinensis var. mairei[J]. **Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis**,2013,35(1):184-188.(in Chinese)
[7] MONICA L,CHAVEZ G,SYLVAIN G,et al. Production profiles of phenolics from fungal tannic acid biodegradation in submerged and solid-state fermentation[J]. **Process Biochemistry**,2014,49(4):541-546.
[8] YOU Xin. Property of nature antioxidacts plants ferulic extracts and their bioactivities on human health[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(7):673-677.(in Chinese)
[9] RICEEVANS C,MILLER N,PAGANGA G,et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids[J]. **Free Radical Blology and Medicine**,1996,20(7):933-956.
[10] ALMUDENA G,CAROLINA C,EVA M,et al. Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation[J]. **Food Control**,2012,28(2):212-219.
[11] THANASET S,SOMPRASONG K,SUWATCHAI M,et al. Phenolic acid composition and anticancer activity against human cancer cell lines of the commercially available fermentation products of houttuynia cordata[J]. **Scienceasia**,2014,40(6):420-427.
[12] MUSTAFA K,MOUNA A,MOHD R,et al. Ellagic acid,phenolic acids,and flavonoids in malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity[J]. **Nutrition Research**,2010,30(9):650-659.
[13] TOMAS J,CHRISTOPHER D,KENNETH J,et al.Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and a lower rate of non-responders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease[J]. **European Heart Journal**,2006,27(10):1166-1173.
[14] YIN Hai,QIN Cuiling,DU Jiang. Content determination of tatal phenolic acid in soil notoginseng[J]. **Journal of Medicine and Pharmacy of Chinese Minorities**,2012,18(8):56-57.(in Chinese)
[15] WEI Xu,RAN Xiaoku,LI Weide,et al. Study on content determination of total phenolic Acids in extract of yacon leaves[J]. **Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine**,2015,42(4):811-814.(in Chinese)
[16] YANG Jie,QI Jin,YU Boyang. Determination of total triterpenoids and total phenolic acids in Prunellae spica collected from different places[J]. **Strait Pharmaceutical Journal**,2015,27(8):29-31. (in Chinese)
[17] HAN T,HU Y,ZHOU S Y,et al. Correlation between the genetic diversity and variation of total phenolic acids contents in fructus xanthii from different populations in China[J]. **Biomedical Chromatography**,2008,22(5):478-486.
[18] ZHOU Renchao,HUANG Juan,LI Zeen,et al. Diversity and tissue distribution of fungal endophytes in alpinia officinarum:an important south-China medicinal plant[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**,2014,39(16):3023-3029.(in Chinese)
[19] XU Yajun. Research progress on pesources diversity of plant endophytes[J]. **Guangdong Agricultural Sciences**,2011,24:149-152.(in Chinese)
[20] ZHANG Lianghua,DU Qizhen. Preparative purification of nobiletin by high-speed countercurrent chromatography[J]. **Food Science and Technology**,2009,34(1):156-158.(in Chinese)
[21] WANG Yogwei,SHEN Jiangzeng,CAI Yujie,et al. Research of the extraction and separation on the pigment of fusarium sp JN158[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(1):62-68.(in Chinese)
[22] Amal H. Aly,Abdes samad Debbab,Julia Kjer,et al. Fungal endophytes from higher plants:a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products[J]. **Fungal Diversity**,2010,41:1-16.
[23] TAN R X,ZOU W X. Endophytes:a rich source of functional metabolites[J]. **Natural Product Reports**,2001,18:448-459.
[24] YUE Cuicui,SHEN Jianzeng,CAI Yujie,et al. Optimization of fermentation conditions for cordycepin by cordyceps militaris JN168[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(2):135-141.(in Chinese)
[25] LI Y C,TAO W Y,CHENG L. Paclitaxel production using co-culture of taxus suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2009,83(2):233-239.