

甘草提取物对甘草内生真菌G11的生长及产甘草酸能力的影响

张敏敏, 张运晖, 赵 瑛

(甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 将产甘草酸的甘草内生真菌 G11 在甘草提取物中培养, 观察了其生长及次级代谢产物。结果表明, 在发酵培养基中加入 2.0%甘草提取液可提高菌株产甘草酸的能力; 在固体培养基中加入 3.0%甘草提取液时, 该菌株菌丝体长势最好, 生长速度最快。

关键词: 甘草; 内生真菌; 甘草酸; 能力

中图分类号: S565.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2018)11-0021-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2018.11.007

Influence of the Licorice Extracts on Growth and Ability to Produce Glycyrrhizic Acid of Acid-producing Endophytic Fungus G11

ZHANG Minmin, ZHANG Yunhui, ZHAO Ying

(Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In this experiment, the Glycyrrhizic Acid-producing Endophytic Fungus G11 was cultured in Glycyrrhiza extract and its growth and secondary metabolites were observed. The result showed that the yield of Glycyrrhizic acid were effectively improved by adding 2% licorice plant extract into the fermentation medium; The hypha grew best and had the fastest growth rate when 3.0% liquorice extract was added to the solid medium.

Key words: Licorice; Endophytic fungus; Glycyrrhizic acid; Ability

甘草酸(Glycyrrhizic Acid)是五环三萜皂甙化合物, 是甘草的主要药用有效成分之一, 具有抗炎^[1-2]、抗菌^[3]、抗氧化^[4]、抗肿瘤^[5-6]、抗病毒等活性^[7-8], 现已被广泛地应用于药品、食品等领域^[9]。目前甘草酸主要是从甘草的根部提取, 致使野生甘草成为渐危植物, 而人工种植甘草周期长, 组织培养技术也不成熟。1993年 Stierle A 等^[10]首次报道从紫杉树中分离出一种可产生紫杉醇的内生真菌, 之后又有众多研究者在多种植物中分离到能产生与宿主相同或相似生理活性代谢产物的内生菌, 于是筛选和利用内生菌生产药物有效成分成为一种药物开发的新途径。我们将分离出的 1 株产甘草酸的甘草内生真菌在甘草提取液中培养, 以探究菌株生长及产甘草酸能力。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 甘草样品 采集于甘肃省定西市渭源县会川镇半阴坡村, 为完整植株, 随机选取根部装入灭菌纸袋内编号备用。

1.1.2 供试菌株 产甘草酸内生真菌菌株 G11 由甘肃省农业科学院生物技术研究所分离并保藏。

1.1.3 试剂及仪器 主要有马铃薯固体培养基、马铃薯液体培养基、甘草酸标准品(购于北京索莱宝科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$)及 BS210S 分析天平(北京赛多利斯天平有限公司)、生化培养箱 LRH-250F(上海齐欣科学仪器有限公司)、双层恒温培养振荡器 ZHWY-2102C(上海智城分析仪器制造有限公司)、高速离心机 Centrifuge5810R(德国

收稿日期: 2018-05-21

基金项目: 甘肃省农业科学院中青年基金项目“甘肃野生甘草中产甘草酸内生真菌的分离与发酵培养”(2014GAAS30)。

作者简介: 张敏敏(1985—), 女, 甘肃武都人, 助理研究员, 硕士, 主要从事天然产物开发利用研究。联系电话: (0931)7612683。Email: 29730484@qq.com。

通信作者: 赵 瑛(1967—), 女, 湖南益阳人, 副研究员, 博士, 主要从事微生物菌肥应用研究。Email: zy8080@163.com。

ependorf 公司)、紫外分光光度计(北京莱伯科技有限公司)、旋转蒸发仪(上海沪西分析仪器厂)、超净工作台 SW-CJ(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 甘草根的处理 将新鲜甘草根用清水洗净, 无菌水冲洗 2~3 次, 75%酒精漂洗 5 min, 无菌水冲洗 4 次后用 0.1%升汞溶液消毒 8 min, 最后用无菌水冲洗 5 次。用无菌刀片将消过毒的根部切成 0.5~1.0 cm 的小段。

1.2.2 菌种的活化 将 G11 菌种在生化培养箱中 28 °C 下活化 24 h。

1.2.3 甘草提取物对内生真菌 G11 生长状态的影响 将处理过的甘草根部加到组织研磨器中, 加入少量 PDA 液体培养基研磨, 用针头过滤器过滤 2 次, 并将过滤液分别按照 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%的浓度添加到 50 mL 未凝固的 PDA 培养基中, 重复 3 次, 用接种铲在长有 G11 的培养基边缘刮下菌丝, 接种到含有植物提取液的培养基中, 在生化培养箱 28 °C 下倒置培养 4 d, 以不加甘草提取液的 PDA 培养基为对照。观察 G11 菌丝长势和生长速度。

1.2.4 种子液的制备 从活化后的斜面中挑取 G11 菌种接至 PDA 平板, 置于生化培养箱中 28 °C 下倒置培养 3 d, 然后用接种铲在菌落边缘生长旺盛处刮下菌丝接种至 50 mL PDA 液体培养基中, 置于转速为 120 r/min 摇床上 28 °C 下培养 2 d, 即得种子菌悬液。

1.2.5 甘草提取物对内生真菌 G11 产甘草酸能力的影响 将处理过的甘草根部按 1.2.1 及 1.2.3 的方法处理并加入 PDA 培养基, 分别形成含 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%植物提取液的发酵培养液, 然后将种子液以 10%的接种量接入发酵培养液, 3 次重复, 置于转速为 100 r/min 的摇床上 28 °C 下培养 6 d, 以不加植物提取液的发酵培养基为对照。发酵结束后将锥形瓶真空抽滤, 分别收集滤液和菌丝体。滤液用等体积的二氯甲烷萃取 3 次, 合并上层有机相; 菌丝体冻融后充分研磨, 加入 30 mL 乙酸乙酯, 超声萃取 15 min, 有机相与前述有机相合并, 于旋转蒸发仪上 35 °C 去除有机溶剂浓缩至干, 将得到的萃取物溶于 1 mL 甲醇中, 4 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 用于检测甘草酸的含量^[11-12]。

精密称取甘草酸标准品 1 mg, 甲醇定容至 10

mL, 得母液浓度为 0.1 mg/mL。将母液依次稀释成浓度梯度为 2.0、1.5、1.0、0.5、0.1 mg/L 的标准品, 在 252 nm 波长处分别测定吸光度, 以浓度为横坐标, 吸收度为纵坐标; 计算回归方程, 绘制标准曲线, 处理后的发酵液在紫外-可见分光光度计上测定其吸光度^[13]。

2 结果与分析

2.1 甘草提取物对内生真菌 G11 菌落生长状态的影响

由表 1 可知, 添加 3.0%、4.0%甘草提取物时, G11 菌丝长势最好, 培养过程中生长速度也很快, 可能是因为当提取物添加至 3.0%时即可以满足该菌株生长所需的条件。因此, 要促进菌株生长, 可添加 3.0%的甘草提取物。

表 1 G11 的长势和菌落直径

添加浓度 /%	菌落直径 /cm	菌落形态
0(CK)	5.5	菌落边缘不整齐, 气生菌丝白色稀疏, 菌落薄, 呈浅灰色
	4.5	
	5.5	
0.5	7.5	菌落较薄呈灰色, 菌落边缘整齐, 气生菌丝白色稀疏
	6.5	
	7.0	
1.0	6.5	菌落边缘整齐, 菌落薄, 气生菌丝白色稀疏, 菌落呈浅灰色
	6.5	
	7.0	
2.0	6.5	菌落呈灰色, 较薄, 平坦, 菌落边缘整齐, 气生菌丝白色稀疏
	7.2	
	7.5	
3.0	7.3	菌落近圆形, 菌丝细而密, 菌落较厚, 呈灰色, 菌落由中心向外围颜色逐渐变浅
	7.2	
	7.0	
4.0	8.0	菌落近圆形, 菌丝细而密, 菌落较厚, 呈灰色, 菌落由中心向外围颜色逐渐变浅
	7.5	
	7.0	

2.2 甘草提取物对内生真菌 G11 产甘草酸能力的影响

由图 1 可得回归方程为 $y=0.0878x+0.0321$, $R^2=0.9991$ 。式中 y 为甘草酸的吸光度, x 为溶液浓度。表明溶液浓度在 0.1~2.0 mg/L 内时, 吸光度与甘草酸标准品的浓度呈良好的线性关系。根

据发酵液提取物的吸光度，由所得回归方程可以计算出菌种 G11 产甘草酸的能力，结果如图 2 所示。

在培养基中添加不同浓度的甘草提取液，甘草酸的产量发生了不同变化，说明甘草提取液的添加对甘草酸内生菌 G11 产甘草酸的能力有一定的影响。通过图 2 可知，当甘草提取液添加至 2.0% 时，甘草酸含量最高；当添加至 3.0% 以上时，甘草酸的产量却随着浓度的增大而不断减小。这可能是由于宿主植物中的某些成分会影响其次级代谢过程，当添加量超过正增长的范围时，菌株的次级代谢系统反而会受到抑制，但此猜测还需要进一步验证。

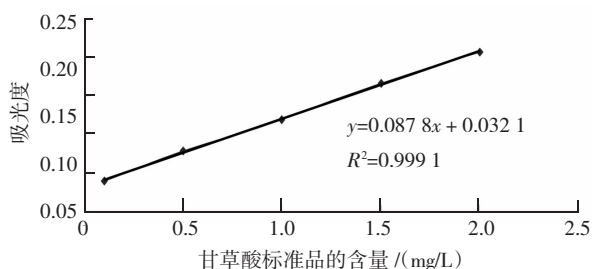


图 1 甘草酸标准品的标准曲线

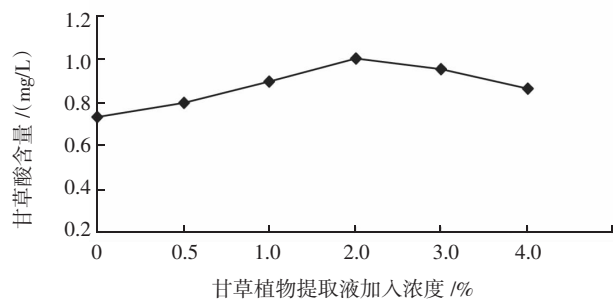


图 2 不同浓度甘草提取物对甘草酸产量的影响

3 小结与讨论

内生菌与植物经过共同的漫长进化过程，其基因中或含有与寄主植物相似的部分，使得内生菌具有可产生与植物相同活性物质的能力。本研究通过对甘草内生真菌 G11 产甘草酸能力的分析，发现当植物提取液添加至 3.0% 时，有利于 G11 的生长，此时菌丝长势最好；但当植物提取液添加至 2.0% 时，最有利于甘草酸的生产，提取液浓度继续提高时反而会抑制甘草酸的生产。在本研究最终优化的发酵条件下，甘草酸产量达到 1.005 mg/L，但相对于植物体所产甘草酸的含量仍然甚微。因此，要通过甘草内生菌生产甘草酸，还需要继续筛选优势菌种和优化发酵条件。

参考文献:

- [1] SUBBA RAO G S R, KONDAIAH P, SANJAY K S, *et al.* Chemical modifications of natural triterpenes -glycyrrhetic and boswellic acids: evaluation of their biological activity[J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(51): 11541-11548.
- [2] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(4): 261-267.
- [3] 朱雪峰, 谢鲲鹏, 霍洪楠, 等. 甘草提取物的抑菌作用及其对小鼠免疫功能的影响[J]. *中国微生物学杂志*, 2013, 25(3): 254-257.
- [4] 雍建平. 甘草酸、甘草次酸衍生物的合成及生物活性研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(6): 1495-1498.
- [5] CHADALAPAKA G, JUTOORU I, MCALEES A, *et al.* Structure-dependent inhibition of bladder and pancreatic cancer cell growth by 2-substituted glycyrrhetic and ursolic acid derivatives [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(8): 2633-2639.
- [6] SCHWARZ S, CSUK R. Synthesis and antitumour activity of glycyrrhetic acid derivatives[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 18(21): 7458-7474.
- [7] LI Z, ZHAO Y, LIN W, *et al.* Rapid screening and identification of active ingredients in licorice extract interacting with V3 loop region of HIV-1 gp120 using ACE and CE-MS [J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2015, 111: 28-35.
- [8] 李 阳, 高 欢, 朱庆均, 等. 甘草化学成分抗病毒活性研究进展[J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(2): 167-171.
- [9] 徐 谓, 李洪军, 贺雅非. 甘草提取物在食品中的应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(10): 274-281.
- [10] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreae* an endophyte fungus of pacific yew[J]. *Science*, 1993, 260: 214-216.
- [11] 王红霞, 李雅丽. 一株产甘草酸内生真菌的分离及代谢产物分析[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(14): 2841-2843.
- [12] 李 端. 渐危药用植物黄檗产活性成分内生真菌菌株的初步研究[D]. 西安: 西北大学, 2006.
- [13] 杨帅才, 庄书蓓, 肖凤华, 等. 甘草中甘草酸的含量测定[J]. *黑龙江医药*, 2004, 17(4): 251-252.

(本文责编: 陈 伟)