

一株桃树内生真菌 *Pestalotiopsis vismiae* N1 培养条件优化与抗氧化、抗菌活性分析*

侯若琳¹ 刘鑫¹ 王丹亭² 陈磊² 林文雄² 郑明锋^{**} 傅俊生^{2**}

¹福建农林大学食品科学学院 福州 350002

²福建农林大学生命科学学院 福州 350002

摘要 对一株内生真菌韦司梅拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis vismiae*) 的培养条件进行探究, 在此基础上进一步对其发酵提取物抗氧化、抗菌活性进行分析。通过测定菌丝的生长速度寻找菌丝培养适宜的温度、碳源、氮源和pH, 并采用正交试验优化培养条件; 通过测定菌株深层发酵液提取物对羟基和DPPH自由基的清除率以分析其抗氧化活性; 通过测定菌株深层发酵液提取物对多种病原细菌抑菌圈大小的影响来分析其抗菌活性。结果表明, 韦司梅拟盘多毛孢菌丝最适宜培养温度为25 ℃, 在该温度培养条件下菌丝生长最佳碳源为蔗糖, 最佳氮源为酵母提取粉, 最佳初始pH为6.5, 这3种因素的显著性差异大小顺序为碳源 > 氮源 > pH; 菌株深层发酵液提取物具有良好的抗氧化活性, 其对羟基自由基和DPPH自由基清除率的EC₅₀分别为1.19 mg/mL和0.56 mg/mL; 菌株发酵液提取物对铜绿假单胞杆菌、金黄色葡萄球菌均具有一定的抑制作用; 深层发酵液提取物抗氧化和抗菌活性具有一定的稳定性。本研究结果可为深入开发利用该真菌资源提供科学依据。(图12 表3 参26)

关键词 韦司梅拟盘多毛孢; 生长培养; 抗氧化活性; 抗菌活性

CLC Q939.9

Optimization of culture conditions, and analysis of the antioxidant and antibacterial activities of the endophyte *Pestalotiopsis vismiae* N1*

HOU Ruolin¹, LIU Xin¹, WANG Danting², CHEN Lei², LIN Wenxiong², ZHENG Mingfeng^{1**} & FU Junsheng^{2**}

¹ College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

² College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract In this study, the culture conditions of endophytic fungus *Pestalotiopsis vismiae* were investigated, and the antioxidant and antibacterial activities were analyzed to provide a basis for further development and utilization of *P. vismiae*. The mycelial growth rate was determined to explore the suitable temperature, carbon source, nitrogen source, and pH for mycelial growth, and the orthogonal test was performed to optimize the culture conditions. The antioxidant activity of the extract from the deep fermentation broth was analyzed by measuring the hydroxyl radical and DPPH radical scavenging rates. The antibacterial activity of the extract from the deep fermentation broth was studied by measuring the size of the inhibition zone for various pathogenic bacteria. The results showed that the optimum growth temperature for *P. vismiae* was 25 ℃, the best carbon source for mycelial growth at 25 ℃ was sucrose, the optimum nitrogen source was yeast extract, and the optimum initial pH was 6.5. The order of the significant differences among the three factors was carbon source > nitrogen source > pH. The submerged fermentation broth extract of *P. vismiae* had good antioxidant activity, and the EC₅₀ of the hydroxyl radical and DPPH radical scavenging rates was 1.19 mg/mL and 0.56 mg/mL, respectively. The strain fermentation broth extract had certain inhibitory effects on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The antioxidant and antibacterial activity of *P. vismiae* had a certain stability. The results of this study provided a scientific basis for the development and utilization of these fungal resources.

Keywords *Pestalotiopsis vismiae*; culture condition; antioxidant activity; antibacterial activity

收稿日期 Received: 2018-05-19 接受日期 Accepted: 2018-06-25

*国家自然科学基金项目(81503187)和福建农林大学现代种业工程研究院建设项目资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (81503187) and the Funding for the Construction of Modern Seed Industry Engineering Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: fujunsheng81@163.com; vanzheng@163.com)

植物内生真菌是指出现在植物某个生长阶段或整个生活史的植物组织内部真菌,它的涵盖面包括菌根真菌和植物病原菌以及存在于健康植物的茎叶中不形成明显病症的真菌^[1]。经过与植物长时间的相互影响和同工进化,植物内生真菌具有特殊的生理机制和代谢系统,同时还具有强大的生物酶系统和次级代谢产物合成能力^[2]。拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)真菌是植物内生真菌的重要类群之一,自Strobel等从植物内生拟盘多毛孢次生代谢产物中分离到抗癌物质紫杉醇后,该属真菌资源的研究得到了广泛的关注^[3]。

2014年,钱一鑫等人对尤韦拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis uvicola*)的代谢产物进行了研究,发现其发酵液能够对猕猴桃褐腐病菌和辣椒疫霉菌产生较强的抑制活性,这在农业上具有较好的应用前景^[4]。2016年,张旭等人对拟盘多毛孢属真菌(*Neopestalotiopsis zerumbet*)进行了研究,发现该菌株能用于艳山姜叶病害鉴定方面^[5]。2017年,王雅玲等人对韦司梅拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis vismiae*)研究发现其能产生含量较高的核苷,具有较好的生产应用价值^[6]。本实验室前期对一株分离自桃树的韦司梅拟盘多毛孢深层发酵液提取物的抗肿瘤活性进行了研究,发现其发酵液提取物具有良好的抗乳腺癌活性,这些良好生物活性使其在未来生产中具有巨大的应用前景和经济效益。目前,关于韦司梅拟盘多毛孢的研究主要集中于对其化学活性成分在农业上的应用报道,而对其生理生长、营养要素及与人类健康相关应用方面的研究却鲜见报道。探究合适的生长条件将有利于菌株在工业发酵生产应用中缩短生产周期和提高活性物质产量。因此,我们将系统深入地对其化学活性成分在农业上的应用研究,在此基础上进一步探究其发酵液提取物抗氧化、抗菌活性,为深入开发利用该菌资源奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料试剂和仪器

1.1.1 材料 韦司梅拟盘多毛孢(*P. vismiae*) N1分离自中国福建三明野生桃树枝(由本实验室鉴定并保藏,收藏编号: N1; ITS序列NCBI登录号: KY810494)。

1.1.2 试剂和仪器 二苯基苦味酰基苯肼(DPPH)(Sigma公司);双抗(Invitrogen公司);木糖、蔗糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、乙醇、硫酸亚铁、水杨酸等试剂均为国产分析纯。超净工作台(SW-CJ-2F型,苏州净化设备有限公司),高压蒸汽灭菌锅(MJ-54A型,上海施都凯仪器设备有限公司);恒温培养箱(HPS-400型,济南哈东联商贸电子有限公司),pH计(FE-20型,梅特勒托利多仪器有限公司),电子天平(CP-214型,奥豪斯仪器有限公司)。

1.2 韦司梅拟盘多毛孢培养条件分析

1.2.1 菌株活化 采用PDA加富培养基(马铃薯200 g/L,葡萄糖20 g/L,琼脂20 g/L,蛋白胨5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1.5 g/L,维生素B₁ 10 mg/L)^[7]活化培养韦司梅拟盘多毛孢菌株。

1.2.2 不同培养温度筛选 以GPY培养基(葡萄糖20 g/L,酵母粉20 g/L,琼脂25 g/L,蛋白胨10 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L, pH自然)作为基础培养基^[8],在超净工作台中

将直径为0.8 cm的菌饼接入灭菌后的GPY培养基,分别移入20、25、30、35和40℃的生化培养箱中进行培养,每个温度10次重复。接种1 d后采用划线法每天相同时间测量菌丝生长速度,待生长速度最快的菌丝长至直径6 cm左右停止记录。

1.2.3 不同pH培养基筛选 基础培养基同1.2.2,用1 mol/L氢氧化钠和1 mol/L盐酸调节培养基的pH并灭菌,在超净工作台中将直径为0.8 cm的菌饼接入初始pH分别为5、5.5、6、6.5、7、7.5和8的供试培养基中,25℃恒温培养,每个pH 10次重复。实验方法同1.2.2。

1.2.4 不同碳源培养基筛选试验 在无碳培养基(酵母粉20 g/L,琼脂20 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L,维生素B₁ 10 mg)^[7]的基础上分别加入等质量的木糖、可溶性淀粉、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和乳糖作为碳源筛选试验的6个不同水平,每个碳源10次重复,在超净工作台中将直径为0.8 cm的菌饼接入供试培养基,在25℃生化培养箱中进行恒温培养。实验方法同1.2.2。

1.2.5 不同氮源培养基筛选试验 在无氮培养基(葡萄糖20 g/L,琼脂20 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L,维生素B₁ 10 mg)^[7]的基础上分别加入等质量的酵母浸粉、蛋白胨、牛肉膏、脲、硝酸钾和硝酸铵作为氮源筛选试验的6个不同水平,每个氮源10次重复,在超净工作台中将直径为0.8 cm的菌饼接入供试培养基,在25℃生化培养箱中进行恒温培养。实验方法同1.2.2。

1.2.6 正交试验 从温度、pH、碳源和氮源4个因素中筛选出比较适合韦司梅拟盘多毛孢菌丝生长3个水平,进行正交试验。在正交基础培养基(琼脂20 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L,维生素B₁ 10 mg)^[9]的基础上根据正交表中的配方进行培养基制作,在超净工作台中将直径为0.8 cm的菌饼接入供试培养基,在25℃生化培养箱中进行恒温培养。实验方法同1.2.2。

1.3 韦司梅拟盘多毛孢深层发酵液抗氧化与抗菌活性研究

1.3.1 深层发酵液制备 将试管菌种接到平板培养基上进行活化,活化完后将平板打孔,将菌片接入PDB液体培养基,置于摇床160 r/min,25℃培养45 d。发酵完成后,收集发酵液,浓缩发酵液,用乙酸乙酯进行萃取,将萃取液减压蒸馏浓缩成干膏,用于抗氧化及抗菌实验。

1.3.2 羟基自由基清除率测定实验 羟基自由基清除能力测定参照文献[10]的方法,采用水杨酸-硫酸亚铁法测定。在试管中依次加入浓度为9 mmol/L的水杨酸-乙醇溶液、9 mmol/L的 FeSO_4 溶液、不同浓度的样品溶液(阳性对照:维生素C)和8.8 mmol/L的 H_2O_2 溶液各1 mL,最后加蒸馏水补齐到15 mL,摇匀,置于37℃水浴中反应15 min,在波长510 nm处测定吸光度 A_X ;以蒸馏水1 mL替代样品溶液测定吸光度 A_0 ;以蒸馏水1 mL替代 H_2O_2 测定吸光度 A_{X0} ,依据下列公式计算清除率。将实验重复3次,求得清除率的平均值。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_X - A_{X0})}{A_0} \times 100\%$$

1.3.3 DPPH自由基清除率测定实验 参照文献[11]方法进行DPPH自由基清除能力的测定。取不同浓度的样品溶液2 mL和浓度为 2×10^{-4} mol/L的DPPH无水乙醇溶液2 mL加入试

管中摇匀,在室温下密闭静置30 min,于波长517 nm处测得吸光度 A_i ;将2 mL DPPH和2 mL蒸馏水加入试管中摇匀并在波长517 nm处测吸光度 A_c ;将2 mL无水乙醇和2 mL样品加入试管中摇匀并在波长517 nm处测吸光度 A_j .根据下列公式计算DPPH自由基的清除率.将实验重复3次,求得清除率的平均值.

$$\text{清除率} = 1 - \frac{A_i - A_j}{A_c} \times 100\%$$

1.3.4 抗菌活性测定实验 参考文献[12-14]的研究方法.采用滤纸片法,将韦司梅拟盘多毛孢发酵液浸膏配制成浓度分别为20、10、5、2.5、1.25 mg/mL的抑菌液,备用;在超净工作台中,用一次性无菌注射器吸取浓度约 2.3×10^6 CFU/mL的指示菌(4种病原菌:肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)悬液加入培养基中,并用无菌三角涂布棒将菌液涂布均匀后备用;使用3点接种法用镊子分别将浸有不同浓度的韦司梅拟盘多毛孢抑菌液、双抗溶液(阳性对照,青霉素-链霉素混合溶液,工作浓度:青霉素浓度100 U/mL,链霉素浓度0.1 mg/mL)和二甲基亚砜溶液(阴性对照)的滤纸片(直径8 mm),放到均匀涂布菌液的测试菌平板上,将实验重复3次.将测试菌平板均倒置于37 °C生化培养中进行恒温培养24 h后,测量抑菌圈直径,取平均值作为实验结果.

1.3.5 抗氧化与抗菌活性稳定性探究 参考文献[15]的方法,取6份浓度为2 mg/mL的韦司梅拟盘多毛孢样品分别置于0、20、40、60、80、100 °C条件下处理30 min,以DPPH自由基的清除率来指示处理前后样品的抗氧化活性;取6份浓度为20 mg/mL的韦司梅拟盘多毛孢样品分别置于0、20、40、60、80、100 °C条件下处理30 min,以铜绿假单胞杆菌为指示菌,通过测定处理前后样品的抑菌圈直径确定其抑菌活性,每个温度重复3次实验.取6份浓度为2 mg/mL的韦司梅拟盘多毛孢样品分别置于紫外紫外光照0、1、2、3、4、5 h处理,以DPPH自由基的清除率来指示处理前后样品的抗氧化活性;取6份浓度为20 mg/mL的韦司梅拟盘多毛孢样品分别置于紫外紫外光照0、1、2、3、4、5 h处理,以铜绿假单胞杆菌为指示菌,用抑菌圈直径法测定处理前后样品的抑菌活性,设置3次重复.

1.4 统计学处理

数据用SPSS 13.0统计软件分析处理.统计描述:计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示.两组间的均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 培养条件单因素实验

2.1.1 温度实验 韦司梅拟盘多毛孢的菌丝在不同的温度下呈现出不同的生长趋势(图1,图2),在25 °C培养条件下的韦司梅拟盘多毛孢菌丝长速显著大于同期培养在其他温度下的菌丝长速.较高的温度会抑制菌丝的生长,当温度为30 °C时,菌丝几乎停止生长,因此选取25 °C为菌丝生长最佳温度.

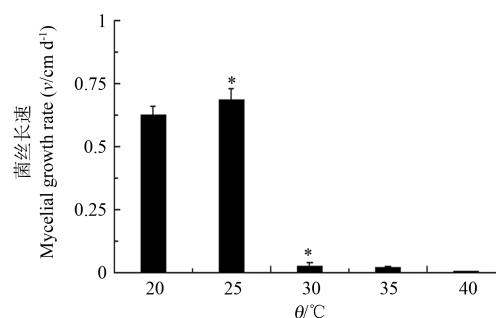


图1 不同温度下培养的韦司梅拟盘多毛孢的菌丝生长速度.与前一条件相比较, * $P < 0.05$.

Fig. 1 *Pestalotiopsis vismiai* mycelium growth rate under different temperatures. Compared with the previous condition, * $P < 0.05$.

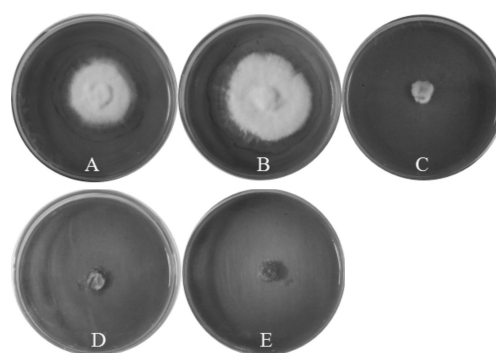


图2 不同温度下培养的韦司梅拟盘多毛孢的菌落生长情况.

Fig. 2 The colony growth of *Pestalotiopsis vismiai* cultured at different temperatures.

A: 20 °C; B: 25 °C; C: 30 °C; D: 35 °C; E: 40 °C.

2.1.2 pH实验 在不同pH条件下,韦司梅拟盘多毛孢的菌丝呈现出不同的生长趋势(图3、图4).pH在6.0-7.0时,菌丝生长速度较快,在pH为6.5时,菌丝长速达到最大,当pH过酸或过碱时,菌丝生长速度减慢.

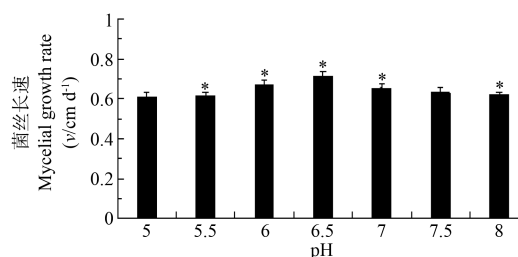


图3 不同初始pH下培养的韦司梅拟盘多毛孢的菌丝生长速度.与前一条件相比较, * $P < 0.05$.

Fig. 3 *Pestalotiopsis vismiai* mycelium growth rate line under different initial pH values. Compared with the previous condition, * $P < 0.05$.

2.1.3 碳源实验 韦司梅拟盘多毛孢在不同碳源条件下菌丝呈现出不同的生长趋势(图5、图6),碳源为蔗糖的菌丝长速大于相同条件下其他碳源的菌丝长速,碳源为麦芽糖和乳糖的菌丝长速仅次于蔗糖.

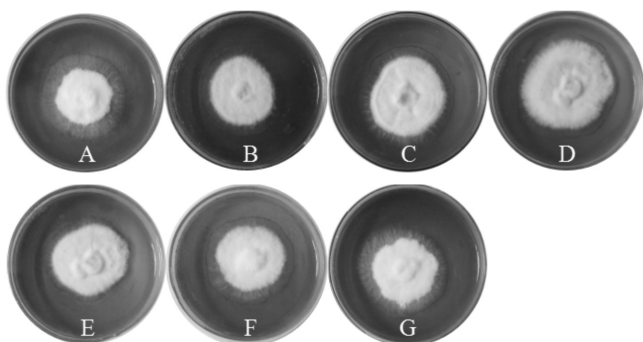


图4 不同初始pH下培养的韦司梅拟盘多毛孢的菌落生长情况。

Fig. 4 The colony growth of *Pestalotiopsis vismiai* cultured at different pH values.

A: pH = 5; B: pH = 5.5; C: pH = 6; D: pH = 6.5; E: pH = 7; F: pH = 7.5; G: pH = 8.

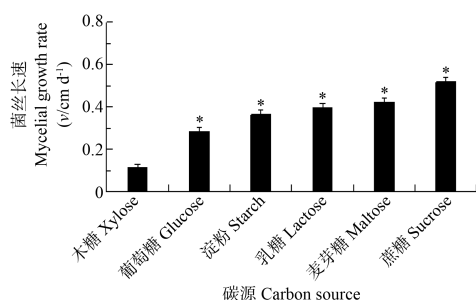


图5 不同碳源下培养的韦司梅拟盘多毛孢的菌丝生长速度. 与前一条件相比较, * $P < 0.05$.

Fig. 5 *Pestalotiopsis vismiai* mycelium growth rate under different carbon sources. Compared with the previous condition, * $P < 0.05$.

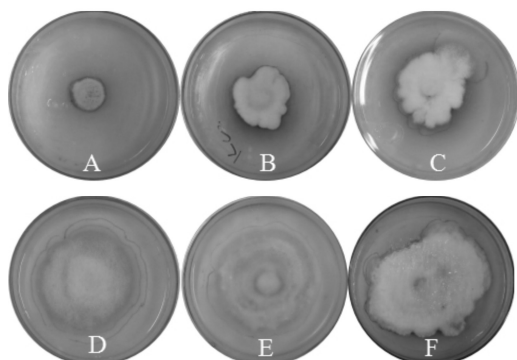


图6 不同碳源下培养的韦司梅拟盘多毛孢的菌落生长情况。A: 木糖; B: 葡萄糖; C: 淀粉; D: 乳糖; E: 麦芽糖; F: 蔗糖。

Fig. 6 The colony growth of *Pestalotiopsis vismiai* cultured at different carbon sources. A: Xylose; B: Glucose; C: Starch; D: Lactose; E: Maltose; F: Sucrose.

2.1.4 氮源实验 韦司梅拟盘多毛孢在不同氮源条件下菌丝呈现不同的生长趋势 (图7、图8), 其中氮源为酵母提取粉的菌丝长速大于相同条件下其他氮源的菌丝长速, 以蛋白胨和牛肉膏为氮源的菌丝长速次之, 其中以脲为氮源的菌丝近乎停止生长, 效果最差。

2.2 正交实验

由于单因素分析结果单一, 没有考虑到其交互影响作用, 所以本文进一步采用正交试验进行探究。根据单因素实

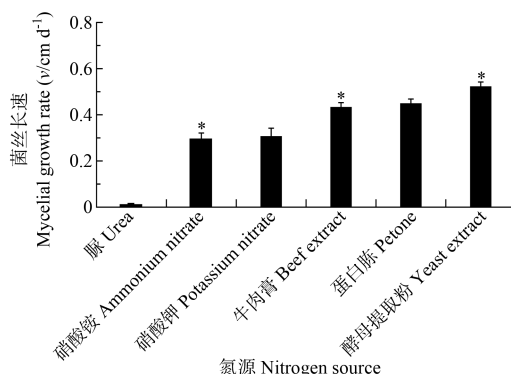


图7 不同氮源下培养的韦司梅拟盘多毛孢的菌丝生长速度. 与前一条件相比较, * $P < 0.05$.

Fig. 7 *Pestalotiopsis vismiai* mycelium growth rate under different nitrogen sources. Compared with the previous condition, * $P < 0.05$.

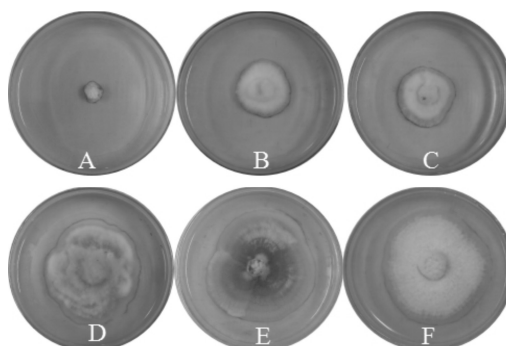


图8 不同氮源下培养的韦司梅拟盘多毛孢的菌落生长情况。A: 脲; B: 硝酸铵; C: 硝酸钾; D: 牛肉膏; E: 蛋白胨; F: 酵母提取粉。

Fig. 8 The colony growth of *Pestalotiopsis vismiai* cultured at different nitrogen sources. A: Urea; B: Ammonium nitrate; C: Nitrate of potash; D: Beef extract; E: Peptone; F: Yeast extract.

验结果, 温度为25 ℃时菌株菌丝生长最为适宜, 因此在选定培养温度为25 ℃的前提下, 选取pH、碳源和氮源中最优良的3个条件进行3因素3水平的正交试验 (表1)。

从表1中可以看出, 碳源中的k3最大, 氮源中的k1最大, pH中的k2最大, 所以可得出菌株最佳培养条件为温度25 ℃, 碳源为蔗糖, 氮源为酵母提取粉, pH为6.5。通过分析极差可以发现, 碳源的极差最大, 为0.17, 表明影响韦司梅拟盘多毛孢菌丝生长的最主要因素为碳源, 其次是氮源, 最后是pH。

方差分析 (表2) 中, 碳源的 F 值最大为230.333, 氮源其次, 为30.333, 然后是pH, 为5.333。所以3种因素的显著性差异大小顺序为碳源 > 氮源 > pH, 该结果与直观分析一致。

2.3 韦司梅拟盘多毛孢深层发酵液提取物抗氧化活性

在所选质量浓度范围内, 韦司梅拟盘多毛孢深层发酵液提取物对羟基自由基和DPPH自由基有一定的清除能力, 且清除自由基能力与质量浓度呈正相关, 其对羟基自由基和DPPH自由基清除率的 EC_{50} 分别为1.19 mg/mL和0.56 mg/mL (图9)。

在上述实验结果基础上, 对抗氧化活性的稳定性进行了探究, 结果表明韦司梅拟盘多毛孢深层发酵液提取物经过一定温度和紫外光照处理后, 抗氧化活性未表现出较大波动, 与原有的活性基本一致, 表明发酵液提取物的抗氧化活性对

表1 韦司梅拟盘多毛孢菌丝生长的正交试验结果直观分析
Table 1 Direct-viewing analysis of orthogonal test of mycelial growth of *Pestalotiopsis vismiae*

试验号 No.	初始 pH Initial pH	碳源 Carbon source	氮源 Nitrogen source	空白 Blank	菌丝长速 Mycelial growth rate (v/cm d ⁻¹)
1	1 (6.0)	1 (乳糖 Lactose)	1 (酵母提取粉 Yeast extract)	1	0.57
2	1 (6.0)	2 (麦芽糖 Maltose)	3 (牛肉膏 Beef extract)	2	0.49
3	1 (6.0)	3 (蔗糖 Sucrose)	2 (蛋白胨 Peptone)	3	0.67
4	2 (6.5)	1 (乳糖 Lactose)	3 (牛肉膏 Beef extract)	3	0.52
5	2 (6.5)	2 (麦芽糖 Maltose)	2 (蛋白胨 Peptone)	1	0.52
6	2 (6.5)	3 (蔗糖 Sucrose)	1 (酵母提取粉 Yeast extract)	2	0.73
7	3 (7.0)	1 (乳糖 Lactose)	2 (蛋白胨 Peptone)	2	0.53
8	3 (7.0)	2 (麦芽糖 Maltose)	1 (酵母提取粉 Yeast extract)	3	0.53
9	3 (7.0)	3 (蔗糖 Sucrose)	3 (牛肉膏 Beef extract)	1	0.63
K1	1.73	1.62	1.83	1.72	
K2	1.77	1.54	1.72	1.85	
K3	1.69	2.03	1.64	1.72	
k1	0.58	0.54	0.61	0.57	
k2	0.59	0.51	0.57	0.62	
k3	0.56	0.68	0.55	0.57	
R	0.03	0.17	0.06	0.05	

温度和紫外具有一定的稳定性 (图10).

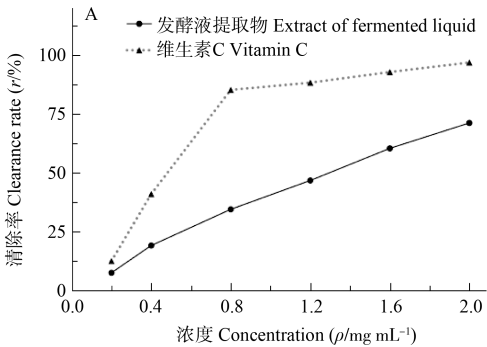


表2 韦司梅拟盘多毛孢菌丝生长的正交试验结果的方差分析
Table 2 Variance analysis of orthogonal test results of mycelial growth of *Pestalotiopsis vismiae*

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 d _f	均方 Mean square	F	显著性 Significance
pH	0.001	2	0.001	5.333	0.158
碳源 Carbon source	0.046	2	0.023	230.333	0.004
氮源 Nitrogen source	0.006	2	0.003	30.333	0.032
误差 Error	0.001	2	0.0001		
总和 Total	0.054				

2.4 韦司梅拟盘多毛孢深层发酵液提取物抗菌活性

试验进一步探究了菌株深层发酵液提取物的抗菌活性,结果显示对铜绿假单胞杆菌、金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用,并且抑菌圈直径大小与浓度呈正相关性,当发酵液提取物质量浓度达到10 mg/mL时,抑菌活性强于阳性药物双抗产品推荐的最高有效使用抑菌浓度.在所选的浓度范围内发酵液对肺炎克雷伯菌和大肠杆菌没有表现出抑制作用 (表3).

在上述实验基础上,进一步对其抗菌活性稳定性进行了探究,经过一定温度和紫外光照处理后,抗菌活性未表现出较大变化,与原有的活性基本一致,表明发酵液提取物抗菌活性对温度和紫外具有一定的稳定性 (图11).

3 讨论与结论

实验表明,韦司梅拟盘多毛孢对碳源利用的特点是优先利用双糖或单糖,其次再利用大分子量多糖.试验中韦司梅

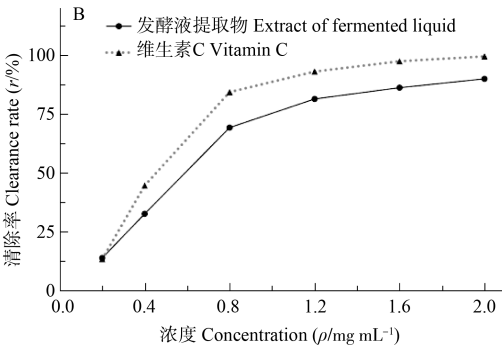


图9 韦司梅拟盘多毛孢深层发酵液提取物的抗氧化活性. A: 羟基自由基清除率; B: DPPH自由基清除率.
Fig. 9 Antioxidant activity of the extract from deep submerged fermentation broth of *Pestalotiopsis vismiae*. A: Hydroxyl radical scavenging rate; B: DPPH radical scavenging rate.

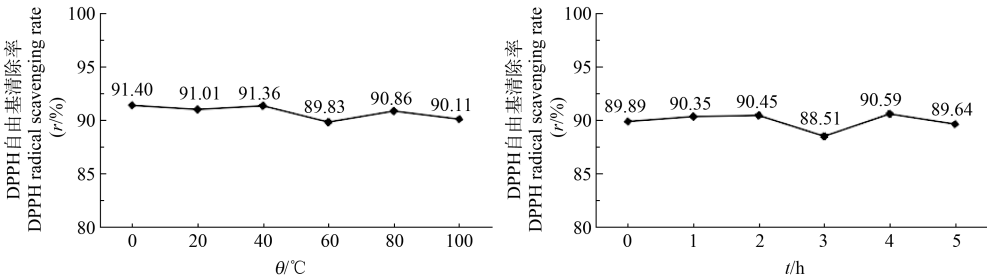


图10 温度和紫外线对发酵液抗氧化活性的影响.
Fig. 10 Effects of temperature and UV on antioxidant activity of submerged fermentation broth.

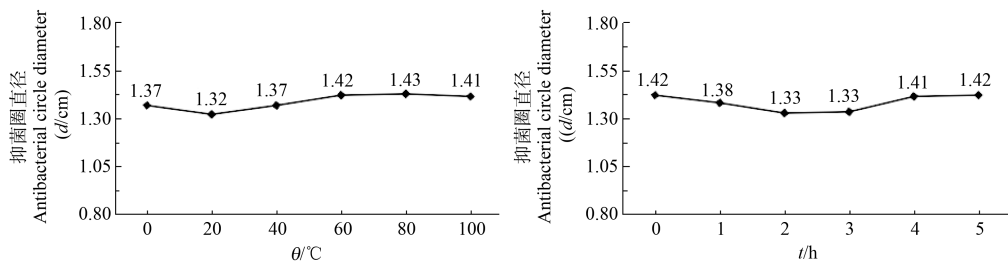


图11 温度和紫外线对发酵液抗菌活性的影响。
Fig. 11 Effects of temperature and UV on antibacterial activity of submerged fermentation broth.

拟盘多毛孢对蔗糖的利用效果最好,其次是麦芽糖和乳糖,推测韦司梅拟盘多毛孢可能进化出了一套以双糖或单糖为碳源的酶系和代谢机制,可以较好地利用双糖或单糖.对于氮源,韦司梅拟盘多毛孢在有机氮源的条件下菌丝长速和长势优于无机氮源,其中酵母提取粉为氮源时菌丝生长效果最佳,这可能是因为有机氮源中含有多种其他营养成分,如核苷酸和微量元素,因而促进了韦司梅拟盘多毛孢菌丝的生长.

从pH筛选试验中得出,固体培养条件下,韦司梅拟盘多毛孢最适的初始pH为6.5,可见微酸性条件更适合韦司梅拟盘多毛孢菌丝的生长.而pH过酸或过碱时,菌丝生长变慢,原因可能是由于该菌细胞内部与菌丝生长相关的酶活性被抑制^[16].根据菌丝和培养温度的关系,可将真菌菌株分为3种类型,即低温型、中温型和高温型,中温型的温度范围为20-28℃^[17].根据实验结果可认为该菌株属于中温型真菌,推测可能是在20-28℃条件下提高了该菌与生长相关酶的活性,从而促进了菌丝在生长方面的活性.正交试验中,在25℃条件下恒温培养下,以蔗糖为碳源、以酵母提取粉为氮源、初始pH为6.5时的条件为韦司梅拟盘多毛孢菌丝生长的最佳条件,该研究系统地探究了韦司梅拟盘多毛孢的生长条件,为该菌在生产中缩短生产周期奠定了理论基础.

随着现代生命科学的不断发展,越来越多的研究显示,人类心脑血管疾病、肿瘤、老年性痴呆等多种疾病几乎都与过氧自由基有关,因此寻找天然高效的抗氧化剂越来越引起人们的重视^[18-20].本实验结果表明韦司梅拟盘多毛孢菌株深层发酵液提取物具有良好的抗氧化活性,其对羟基自由基和DPPH自由基清除率的EC₅₀分别为1.19 mg/mL和0.56 mg/mL,并且研究结果还显示菌株发酵液提取物抗氧化活性还具有一定稳定性,表明该菌株发酵产物在抗氧化剂方面具有一定应用前景.铜绿假单胞杆菌是一种条件致病菌,能在一定条件下引起患者术后伤口的感染,还能引起人的关节炎和角膜炎等疾病^[21];铜绿假单胞杆菌也是囊性纤维化患者发病和死亡的主要原因之一,一旦发生感染最终会导致患者肺衰竭和死亡,其原因之一是由于细菌对抗生素产生了耐药性^[22].在对我国部分地区的调查表明,因滥用抗生素,一些病人体内耐药的铜绿假单胞杆菌占33%以上^[23],这导致了常用的抗菌药对该致病菌引起的感染疗效明显下降,因此研发能特异针对该病原菌的新型抗菌药物就迫在眉睫.本研究结果显示,韦司梅拟盘多毛孢深层发酵液提取物对铜绿假单胞杆菌有较好的抑制作用,当提取物质量浓度为10 mg/mL时,抑菌活

性强于阳性药物双抗产品推荐的最高有效使用抑菌浓度(表3,图12),表明提取物在该浓度时可以达到较好的抑菌效果,提示该菌发酵产物在抑制铜绿假单胞杆菌方面具有较好的应用潜力.

表3 韦司梅拟盘多毛孢深层发酵液提取物的抑菌圈直径
Table 3 Inhibition zone diameter of *Pestalotiopsis vismia* submerged fermentation broth

浓度 Concentration (ρ/mg mL ⁻¹)	抑菌圈直径 Antibacterial circle diameter (d/cm)			
	肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	铜绿假单胞杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
阳性对照 Positive control	2.42 ± 0.03	1.27 ± 0.03	3.83 ± 0.08	3.12 ± 0.02
阴性对照 Negative control	-	-	-	-
0.625	-	-	-	-
1.25	-	0.87 ± 0.03*	-	-
2.5	-	1.07 ± 0.01*	-	0.86 ± 0.02*
5	-	1.19 ± 0.02*	-	0.94 ± 0.03*
10	-	1.31 ± 0.02*	-	1.03 ± 0.05*
20	-	1.47 ± 0.05*	-	1.23 ± 0.02*

-: 无抑菌作用;与阳性对照相比, *P < 0.05.
-: No bacteriostatic action; Compared with positive, *P < 0.05.

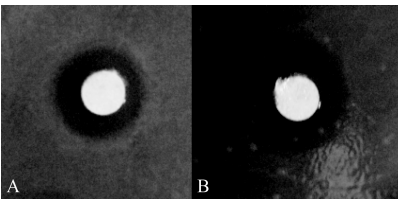


图12 拟盘多毛孢提取物对铜绿假单胞菌的抑制作用. A: 阳性对照(青霉素-链霉素混合溶液: 青霉素浓度100 U/mL, 链霉素浓度0.1 mg/mL); B: 拟盘多毛孢发酵液提取物(10 mg/mL).
Fig. 12 Inhibitory effect of *Pestalotiopsis vismia* submerged fermentation broth on *Pseudomonas aeruginosa*. A: Positive control (Penicillin-streptomycin solution: penicillin 100 U/mL, streptomycin 0.1 mg/mL); B: *Pestalotiopsis vismia* submerged fermentation broth extracts (10 mg/mL).

本实验室前期采用LC-MS/MS方法对韦司梅拟盘多毛孢发酵液乙酸乙酯提取物成分进行了初步分析^[24].分析结果显示在正离子模式中有13个离子强度较大的色谱峰下被检测到,使用Thermo Scientific™ Mass Frontier™7.0软件解析及检索相关数据库,初步鉴定了其中的6种成分,分别为胍乙酸、香兰素、表儿茶素、莫能菌素、青霉素V、青霉素,大部分可以作为抗菌剂.莫能菌素是聚醚类抗生素,青霉素是β-内

酰胺类抗生素; 香兰素和胍乙酸常用于食品添加剂, 同时其也是一种抗菌剂, 其中胍乙酸对金黄色葡萄球菌抑菌效果明显^[25]; 表儿茶素是一种酚类化合物, 不仅具有一定的抗菌活性, 有良好的抗氧化活性^[26]。以上多种物质在其抗菌与抗氧化活性方面可能发挥着重要作用, 但关于何种成分发挥主要的抗菌与抗氧化活性还有待进一步研究, 因此课题组后期还将对其抗菌与抗氧化活性成分进行深入研究。

参考文献 [References]

- 郭梦圆, 高艳华, 郑雨璋, 王萍, 夏飞, 周选围. 冬虫夏草内生菌NS2-B1发酵培养基筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2017, **23** (5): 939-944 [Guo MY, Gao YH, Zheng YZ, Wang P, Xia F, Zhou XW. Screening of liquid fermentation media of an endophytic fungus NS2-B1 isolated from *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23** (5): 939-944]
- Strobel G, Daisy B, Castillo U. Natural products from endophytic microorganisms [J]. *J Nat Prod*, 2004, **67** (2): 257-268
- Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *taxus wallachiana* [J]. *Microbiology*, 1996, **142** (2): 435-440
- 钱一鑫, 康冀川, 雷帮星. 一株牡蒿内生尤韦可拟盘多毛孢及其应用: 中国, CN 104212723 A [P]. 2014-12-17 [Qian YJ, Kang YC, Lei BX. An endophytes *Pestalotiopsis uvicola* from *Artemisia Artemisia* and its application: China, CN 104212723 A [P]. 2014-12-17]
- 张旭, 龙庆德, 李启瑞, 何明辉, 唐翠娥. 一株拟盘多毛孢属真菌及其用于艳山姜叶病害的鉴定方法: 中国, CN106434371A [P]. 2017-02-22 [Zhang X, Long QD, Li QR, He MH, Tang CE. A *Pestalotiopsis* fungus and its application in identification of leaf diseases of *Alpinia zerumbet*: China, CN106434371 A [P]. 2017-02-22]
- 王雅玲, 叶日英, 孙力军. 一种韦司梅拟盘多毛孢CAMT66351及其应用: 中国, CN107034145A [P]. 2017-08-11 [Wang YL, Ye RY, Sun LJ. A *Pestalotiopsis vismia* CAMT66351 and its application: China, CN107034145A [P]. 2017-08-11]
- 曹春蕾, 崔宝凯, 包海鹰. 桑木层孔菌固体培养条件的研究[J]. 菌物学报, 2011, **30** (3): 486-490 [Cao CL, Cui BK, Bao HY. Solid culture conditions of *Phellinus mori* [J]. *Mycosystema*, 2011, **30** (3): 486-490]
- 王建瑞, 图力古尔, 刘宇, 鲁铁. 簇生沿丝伞的生物学特性[J]. 菌物研究, 2014, **12** (1): 36-40 [Wang JR, Tolgor B, Liu Y, Ru L. Biological characteristics of wild medicinal mushroom *Naematoloma fasciculare* [J]. *J Fungal Res*, 2014, **12** (1): 36-40]
- 鲁铁, 图力古尔. 白蜡多年卧孔菌生物学特性及驯化栽培[J]. 生态学报, 2013, **33** (17): 5194-5200 [Lu T, Bau T. Biological characteristics and cultivation of fruit body of wild medicinal mushroom *Perenniporia fraxinea* [J]. *Acta Ecol Sin*, 2013, **33** (17): 5194-5200]
- Yin C, Fan X, Fan Z, Shi D, Gao H. Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes*, polysaccharides and determination of its antioxidant activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018 (111): 446-454
- Ai S, Tnabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, **51** (12): 3661
- 孟庆龙, 潘景芝, 陈丽, 王琦. 桑黄发酵产物的抑菌作用[J]. 食品科学, 2011, **32** (3): 56-59 [Meng QL, Pan JZ, Chen L, Wang Q. Antibacterial activity evaluation of fermentation supernatant and mycelia of *Phellinus igniarius* [J]. *Food Sci*, 2011, **32** (3): 56-59]
- Zhang Y, Liu X, Wang Y, Jiang P, Quek SY. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Control*, 2016, **59**: 282-289
- Hu D, Wang H, Wang L. Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2016, **65**: 398-405
- 郑艳, 戴婧婧, 管玉鑫, 姜莹莹, 邢晴晴. 凤丹内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 中国中药杂志, 2016, **41** (1): 45-50 [Zheng Y, Dai JJ, Guan YX, Jiang YY, Xing XX. Isolation, identification and inhibition activity of endophytes in Fengdan [J]. *Chin J Trad Chin Med*, 2016, **41** (1): 45-50]
- 陈燕飞. pH对微生物的影响[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2009, **8** (3): 121-124+131 [Chen YF. pH to uygur biology Influence [J]. *J Taiyuan Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 2009, **8** (3): 121-124+131]
- 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 农业出版社, 1997: 1-448 [Huang NL. Chinese Edible Fungus Encyclopedia [M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1997: 1-448]
- Miller AA, Silva TMD, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Reactive Oxygen Species and Cerebrovascular Diseases [M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2014: 1895-1924
- Zhou D, Shao L, Spitz DR. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells [J]. *Adv Can Res*, 2014, **122**: 1-67
- Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of alzheimer's disease, parkinson's disease, and huntington's disease: a mini review [J]. *Oxid Med Cell Long*, 2016, **2016** (4): 8590578
- 韩青松, 简永利, 涂宜强, 高永安, 宋显章, 涂国众, 段龙川. 绿脓杆菌研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2012, **33** (1): 122-124 [Han QS, Jian YL, Tu YQ, Gao YA, Song XZ, Tu GZ, Duan LC. Research advances on *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Animal Husbandry Feed Sci*, 2012, **33** (1): 122-124]
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI, an opportunistic pathogen [J]. *Nature*, 2000, **406** (6799): 959-64
- 徐海花, 牛钟相, 秦爱建. 细菌耐药性研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2010, **41** (1): 156-160 [Xu HH, Niu ZX, Qin AJ. New research progress of bacterial drug-resistance [J]. *J Shandong Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 2010, **41** (1): 156-160]
- 侯若琳, 刘鑫, 陈良韬, 李佳欢, 郑明峰, 傅俊生. 一株韦司梅拟盘多毛孢的鉴定及其发酵液抗乳腺癌活性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, **47** (3): 111-120 [Hou RY, Liu X, Chen LT, Li JH, Zheng MF, Fu JS. Identification of a *Pestalotiopsis vismia* and anti-breast cancer activity of its fermentation broth [J]. *J NW A&F Univ (Nat Sci Ed)*, 2019, **47** (3): 111-120]
- 王翔林, 陈晨, 王冠楠. HPLC法测定胍基乙酸含量[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, **2**: 254-257 [Wang XL, Chen C, Wang GN. Determination of Glycocyamine by HPLC [J]. *Heilongjiang Anim Husbandry*, 2016, **2**: 254-257]
- Aree T, Jongrungruangchok S. Enhancement of antioxidant activity of green tea epicatechins in β -cyclodextrin cavity: single-crystal X-ray analysis, DFT calculation and DPPH assay [J]. *Carb Polym*, 2016, **151** (20): 1139-1151