

光果甘草内生真菌的分离及其次级代谢产物活性研究^{*}

李 洋, 贾志鹏, 赵毓杰, 赵肖肖, 裴佳梅, 陈垚林, 冯再平, 张新国^{**}

(兰州理工大学生命科学与工程学院 兰州 730050)

摘 要:目的 从新鲜的光果甘草中分离、纯化内生真菌,并筛选出能够对腺苷脱氨酶、 β -内酰胺酶、黄嘌呤氧化酶和酪氨酸酶产生抑制效果的次级代谢产物的菌株。方法 采用4种培养基以组织匀浆法分离纯化内生真菌。然后用活性评价平台对其次级代谢产物进行评价。结果 分离得到植物内生真菌131株,其中34株形态各异且特殊。其中菌株G(1-5)(s)的菌丝体甲醇提取物有较好的腺苷脱氨酶抑制活性(抑制率:98.58%) and β -内酰胺酶抑制活性(抑制率:93.15%),菌株G6次级代谢产物的乙酸乙酯相有较好的黄嘌呤氧化酶抑制活性(抑制率:91.38%),分别鉴定为 *Penicillium* sp. 和 *Aspergillus* sp.。结论 光果甘草内生真菌种类丰富,具有良好的研究价值,后期值得深入研究,为光果甘草的保护和深层次应用提供重要的技术资料。

关键词:光果甘草 内生真菌 分离 鉴定 次级代谢产物 酶抑制活性

doi: 10.11842/wst.20240112008 中图分类号: R284.2 文献标识码: A

光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)为豆科甘草属植物,其药用部位为干燥根和根茎,主要分布于欧洲、中亚及我国的甘肃、青海、新疆等地,是2020年版《中国药典》甘草项下收录的品种之一^[1]。甘草在中医临床应用广泛,现代药理学研究显示,光果甘草中主要活性成分包括甘草酸、甘草次酸、甘草甜素等三萜皂苷类化合物,以及甘草素、异甘草素、光甘草定等黄酮类化合物,这些成分赋予促进机体免疫调节、抗氧化、抗病毒、抗炎和杀菌等多种药理学作用^[2]。

植物内生菌,是指生存在于健康植物各器官、组织内部和细胞间隙内,与植物和谐共生,在不同生长阶段与植物相关联的微生物^[3]。研究表明,内生菌不仅在宿主中分布广泛,而且种类丰富多样,其不仅能产生与宿主相近的活性物质,还能产生一些结构独特的与宿主植物不同的活性成分^[4]。例如有学者从人参

中成功分离出多种内生菌,其内生菌除了可以产生与宿主相同的稀有人参皂苷 Rg3 和 Rh2^[5],还可以产生抗炎活性类化合物大黄素甲醚^[6]。同样值得一提的是,Zhao等^[7]从浙江铁皮石斛中分离得到的75株内生菌,其内生链霉菌不仅能生成宿主内嘌呤类化合物,还能从其次级代谢产物中分离到新型抗菌肽 Peptidendrocin A。因此,内生菌不仅是重要的次生代谢产物储备库,也是发现新活性物质的有力资源^[8]。尽管甘草内生菌已有相关方面报道,但目前有关光果甘草内生真菌的研究还相对较少,主要集中在其抗性方面^[9]。尤其是关于该植物内生真菌次级代谢产物的其他活性方面的研究尚未见到相关报道。

人体内的许多疾病与各种酶的异常表达相关。通过抑制关键酶来干预治疗已成为现代医学的重要策略,也是目前药物研发的重要靶点^[10]。研究显示,已

收稿日期:2024-01-12

修回日期:2024-03-12

^{*} 国家自然科学基金委员会地区科学基金项目(32160021):西部生境中未培养微生物多样性及其重要类群创新抗耐药菌药物的筛选研究,负责人:张新国。

^{**} 通讯作者:张新国(ORCID:0000-0002-7266-2471),博士,教授,硕士研究生导师,主要研究方向:中药发酵及微生物新药的发现研究工作。

上市的创新药物中,以酶为靶点的药物约占22%,并在临床治疗中发挥着重要作用^[11]。基于此,本研究以光果甘草内生真菌为对象,以在体内与腺苷代谢有关,参与免疫细胞制造的腺苷酸脱氨酶(Adenosine deaminase, ADA)、能催化黄嘌呤生成尿酸造成痛风疾病的黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XOD)、耐药细菌针对内酰胺类抗生素分泌的使抗菌活性降低的 β -内酰胺酶以及可以调控黑色素生成在医药、美容和环保等领域的应用广泛的酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR)为靶点,进行次级代谢物的筛选和生物活性评价,以期增加光果甘草内生真菌的多样性并筛选出活性良好的菌株,为光果甘草深层次应用提供技术资料。

1 材料

1.1 植物材料

新鲜的光果甘草(*G. glabra* L.)采集于甘肃省定西市陇西县山区,后经我院杨林副教授鉴定,确系药用植物光果甘草(*G. glabra* L.)。

1.2 主要试剂

XOD(批号MB3079),腺苷(批号C1819162)和舒巴坦(批号G150104)购自阿拉丁试剂有限公司;ADA(批号ADA20180125)购自北京爱必信生物技术有限公司; β -内酰胺酶(批号11403105)购自上海晶纯实业有限公司;头孢硝噻吩(批号E2104156)购自长沙俄里翁生物科技有限公司;TYR(批号20210811)购自上海宝曼生物科技有限公司。

1.3 供试仪器

UV2102PC型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);FA2104型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);DSX-280B型灭菌锅(上海申安医疗器械厂);SW-CJ-IFD型洁净工作台(郑州长城科工贸有限公司);SPX-150B-Z生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.4 培养基的配制

内生真菌分离培养基:①PDA培养基:参考文献^[12]进行配制。②100倍稀释PDA培养基:将PDA培养基按比例稀释100倍处理后备用。③虎红琼脂培养基:参考文献^[13]配制。④甘草琼脂培养基:甘草粉20.0 g、硫酸铵2.0 g、琼脂18.0 g、氯化钠2.0 g,加蒸馏水定容至1000 mL,pH自然,高压蒸汽灭菌(121℃,20 min)处理后备用。⑤发酵培养基:上述相应培养基不加琼

脂,同法配制为对应液体培养基。

2 方法

2.1 光果甘草内生真菌的分离与纯化

将新鲜光果甘草的根、茎、叶按照参考文献^[14]进行表面消毒并组织匀浆后接种于“1.4”所述内生真菌分离培养基中,置于28℃恒温培养箱中培养2-10天,观察生长情况。待菌落生成后,根据菌落形态不同进行划线分离,直至得到单一菌落。纯化后的菌株采用斜面保藏法进行保藏。

2.2 光果甘草内生真菌的发酵及次级代谢产物样品的制备

将“2.1”所述分离保藏的内生真菌活化转接至“1.4”所述发酵培养基中,摇床震荡(28℃、200 r·min⁻¹)培养7-10天。发酵液抽滤后滤液用乙酸乙酯体积比为1:2进行萃取3次,两相进行减压浓缩和烘干后得到乙酸乙酯相和水相样品。菌丝体用甲醇热回流提取3 h后抽滤,同上干燥后得菌丝体甲醇提取物供试样品。

2.3 光果甘草内生真菌的次级代谢产物的活性评价

2.3.1 次级代谢产物ADA抑制活性的评价

根据实验室前期搭建的ADA抑制剂筛选平台^[15],以曲酸为阳性对照,通过紫外分光光度计连续测定体系中底物腺苷在265 nm的特征吸收峰吸光度值的变化,对各发酵菌株次级代谢产物的ADA抑制活性进行评价。

样品的酶抑制率计算公式为: $I=(K_0-K_1)/K_0 \times 100$;式中:I:抑制率(%); K_0 :酶速率线性回归方程斜率; K_1 :样品线性回归方程斜率。

2.3.2 次级代谢产物 β -内酰胺酶抑制活性的评价

根据实验室前期搭建的 β -内酰胺酶抑制剂筛选平台^[16],以舒巴坦为阳性对照,通过紫外分光光度计连续测定体系中底物头孢硝噻吩在485 nm下的特征吸收峰吸光度值变化。对各发酵菌株次级代谢产物的 β -内酰胺酶抑制活性进行评价,并依据“2.3.1”所注公式计算样品抑制率。

2.3.3 次级代谢产物XOD抑制活性的评价

根据实验室前期搭建的XOD抑制剂筛选平台^[17],以别嘌呤醇作为阳性对照,通过紫外分光光度计连续测定体系中底物黄嘌呤在290 nm的特征吸收峰吸光度值的变化,对各发酵菌株次级代谢产物的XOD抑制活性进行评价,并依据“2.3.1”所注公式计算样品抑制率。

2.3.4 次级代谢产物TYR抑制活性的评价

根据实验室前期搭建的TYR抑制剂筛选平台^[18],以曲酸为阳性对照,通过紫外分光光度计连续测定体系中底物L-多巴在波长475 nm处的特征吸收峰吸光度值的变化,对各发酵菌株次级代谢产物TYR抑制活性进行评价,并依据“2.3.1”所注公式计算样品抑制率。

2.4 光果甘草内生真菌的形态学鉴定及高活性菌株的分子生物学鉴定

将上述“2.1”分离纯化到的菌接种于相应培养基培养5-7天,适时观察并准确记录各菌株生长状况、菌落整体形态、颜色和有无线素类物质产生等变化。用光学显微镜进行显微观察将内生真菌参考《真菌鉴定手册》作初步分类鉴定^[19],并将筛选到的高活性菌株送至西安一棵树生物科技有限公司18S rRNA测序。

3 结果

3.1 光果甘草内生真菌的分离与筛选结果

本实验利用“1.4”所示的4种内生真菌分离培养基最终分离得到131株光果甘草内生真菌,分离情况如表1所示。其中PDA培养基的出菌率最高,为43.51%,其次为虎红培养基,出菌率为20.61%。将131株内生真菌接种于相应的培养基中培养,观察并

记录生长情况,部分菌株鉴定结果如表2所示。

通过初步鉴定,本研究从光果甘草植物中分离得到的内生真菌主要为曲霉属和青霉属等,如图1所示。

3.2 光果甘草内生真菌次级代谢产物样品活性评价结果

实验通过对“2.1”所述的131株植物内生真菌中形态各异且较为特殊的34株进行液态发酵,通过菌株发酵和次级代谢产物样品制备,共获得乙酸乙酯相、水相和菌丝体甲醇提取物样品共计102份,用于次级代谢产物活性评价。

3.2.1 次级代谢产物对ADA抑制活性评价结果

由表3可知,阳性对照曲酸浓度为0.1 mg·mL⁻¹时,对ADA的抑制率为42.34%。样品浓度为1 mg·mL⁻¹时,72.55%的样品显示出ADA抑制活性,且27.45%的样品对ADA的抑制率大于40%,11.76%的样品对ADA的抑制率大于60%,4.9%的样品对ADA的抑制率大

表1 各个培养基分离得到内生真菌结果

培养基	分离得到菌株数目(株)	出菌率(%)
PDA培养基	57	43.51
100倍稀释PDA培养基	22	16.79
虎红琼脂培养基	27	20.61
甘草琼脂培养基	25	19.09
总计	131	

表2 部分光果甘草内生真菌形态学鉴定结果

菌株	菌落及孢子结构	鉴定结果
G3-3	菌落呈棕黄色,菌丝体絮状湿润,菌落边缘不整齐,产生黄色代谢产物。分生孢子梗顶端膨大成球形顶囊,分生孢子呈球形	曲霉属
G3-4	菌落表面黑色,背面黄色,表面粗糙呈现颗粒状,分生孢子梗顶端膨大成球形顶囊般,分生孢子呈球形	曲霉属
G1-14	菌落表面中心白色,向外延伸逐渐变为墨绿色,背面整体红色。菌丝绒毛状,分生孢子梗顶端呈对称扫帚状,分生孢子呈球形	青霉属
GFT-6	菌落表面中心墨绿色,向外延伸呈白色,背面整体黄色。菌丝体绵绸湿润,分生孢子梗顶端膨大成球形顶囊,分生孢子呈球形且连成链状	曲霉属

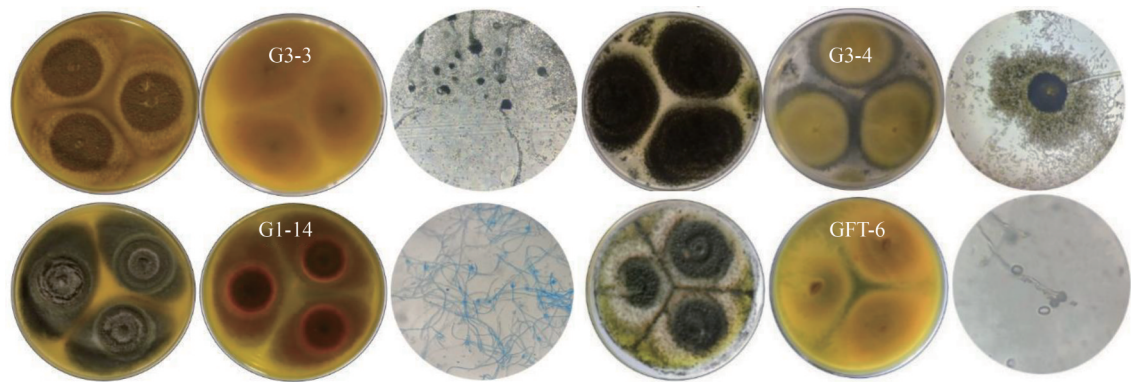


图1 部分内生真菌菌株正反照片

注:从左到右分别为该编号菌株的培养皿正面菌落形态、培养皿反面菌落形态和显微结构。

表3 待测样品 ADA 抑制活性测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品编号	乙酸乙酯相抑制率(%)	水相抑制率(%)	菌丝体甲醇提取物抑制率(%)
G1-1	81.67±0.83	/	18.33±1.26
G1-2	41.96±1.39	/	20.11±1.31
G1-5-2	40.39±1.42	18.26±0.68	/
G(1-5)(s)	26.89±1.69	/	98.58±0.45
G1-9	56.77±1.46	/	/
G1-12	72.40±1.26	/	56.01±1.39
G2(Y)	91.21±0.89	/	29.66±1.56
G2-3.1	68.00±1.25	16.17±1.79	56.22±1.41
G3-4	82.88±1.36	14.69±1.52	59.07±1.37
G6	30.46±1.67	/	77.52±1.19
GNS-6	71.93±1.59	/	51.98±1.37
GNS-10	55.30±1.27	/	29.98±1.56
GNS-12	/	/	21.98±1.48
GNS-14	50.17±1.28	/	/
GNT-2	13.27±0.77	/	16.26±1.43
GNT-5	/	15.31±1.26	33.19±1.62
GFT-2	58.69±1.25	18.02±1.53	33.44±1.59
GFT-3	59.07±1.31	11.03±0.99	32.79±1.57
GFT-4	56.88±1.33	20.39±1.76	18.28±1.42
GFT-5	69.86±1.29	/	/
GFT-6	69.39±1.26	14.17±0.59	27.10±1.38
GFT-7	42.98±1.08	13.46±0.89	22.28±1.34
GFT-8	52.59±1.42	/	/
GFT-9	62.60±1.15	11.04±0.79	25.04±1.36
GFT-10	92.33±0.55	17.82±1.21	56.70±1.29
HGGJSS5	18.89±1.84	16.09±1.45	13.15±1.27
HGGJSS6	34.48±1.54	/	13.94±1.32
HGGJSS 8	39.88±1.62	/	/
HGGJSS12	31.24±1.66	/	14.71±0.88
HGCMCSS4	4.73±1.12	/	/
HGCMC SS5	18.29±1.16	4.72±0.82	/
HGCMC SS6	22.17±0.87	17.11±1.48	12.73±1.09
HGCMC-SS8	14.28±1.15	22.06±1.25	11.52±1.14
G-B(YT)	42.09±1.28	11.17±1.17	35.12±0.98
阳性对照(曲酸 0.1 mg·mL ⁻¹)		42.34±0.76	

注：“/”表示样品抑制率为零。

于80%。而表现出ADA抑制活性的样品主要集中于乙酸乙酯相和菌丝体的甲醇提取物中,其中菌株G(1-5)(s)的菌丝体甲醇提取物的抑酶活性最高,1 mg·mL⁻¹时抑制率为98.58%,当浓度为0.5 mg·mL⁻¹时抑制率为81.28%,当浓度为0.1mg·mL⁻¹时抑制率为35.17%。

3.2.2 次级代谢产物对β-内酰胺酶抑制活性评价结果

由表4可知,阳性对照舒巴坦浓度为0.01 mg·mL⁻¹时,对β-内酰胺酶的抑制率为86.20%。样品浓度为1 mg·mL⁻¹时,73.53%的样品显示出β-内酰胺酶抑制

活性,且25.49%的样品对β-内酰胺酶的抑制率大于40%,7.84%的样品对β-内酰胺酶的抑制率大于60%,2.94%的样品对β-内酰胺酶的抑制率大于80%。而表现出β-内酰胺酶抑制活性的样品主要集中于乙酸乙酯相和菌丝体的甲醇提取物中,其中菌株G(1-5)(s)的菌丝体甲醇提取物的抑酶活性最高,1 mg·mL⁻¹时酶抑制率93.15%,当浓度为0.5 mg·mL⁻¹时酶抑制率为79.88%,当浓度为0.1mg·mL⁻¹时酶抑制率为56.13%。

3.2.3 次级代谢产物对XOD抑制活性评价结果

由表5可知,阳性对照别嘌呤醇浓度为0.02 mg·

表4 待测样品β-内酰胺酶抑制活性测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品编号	乙酸乙酯相抑制率(%)	水相抑制率(%)	菌丝体甲醇提取物抑制率(%)
G1-1	29.52±1.59	/	18.94±1.27
G1-2	/	/	/
G1-5-2	83.14±1.18	/	53.55±1.41
G(1-5)(s)	32.45±1.47	19.16±1.52	93.15±1.03
G1-9	59.32±1.32	16.17±1.63	/
G1-12	81.66±1.26	/	60.93±1.22
G2(Y)	58.44±1.36	/	47.85±1.49
G2-3.1	/	/	72.09±1.31
G3-4	66.81±1.19	12.39±1.49	25.12±1.55
G6	18.14±1.44	/	58.99±1.46
GNS-6	55.33±1.22	10.18±0.77	61.79±1.36
GNS-10	45.56±1.56	/	33.26±1.49
GNS-12	25.93±1.68	/	17.15±0.88
GNS-14	30.80±1.31	20.85±1.50	/
GNT-2	22.20±0.97	22.69±1.47	33.52±1.64
GNT-5	23.28±0.89	/	24.80±1.51
GFT-2	53.04±1.23	/	41.45±1.22
GFT-3	35.49±1.47	14.19±0.82	16.80±1.05
GFT-4	36.08±1.43	/	28.66±1.54
GFT-5	55.25±1.26	/	37.97±1.49
GFT-6	45.70±1.34	/	43.72±1.45
GFT-7	31.76±1.45	14.22±0.72	26.90±1.58
GFT-8	25.82±1.51	/	27.18±1.50
GFT-9	41.39±0.67	12.71±0.81	51.43±1.36
GFT-10	53.30±1.38	11.26±0.96	52.91±1.29
HGGJ SS5	28.19±1.59	/	16.01±0.79
HGGJ SS6	40.05±1.47	15.09±0.70	37.81±1.29
HGGJ SS8	26.89±1.62	11.36±0.84	28.98±1.69
HGGJ SS12	23.19±1.53	/	35.40±1.38
HGCMC SS4	14.85±1.48	10.66±1.12	/
HGCMC SS5	68.85±1.20	10.14±1.66	/
HGCMC SS6	26.67±1.56	/	27.98±1.47
HGCMC-SS8	11.37±0.81	/	/
G-B(YT)	25.45±1.13	12.31±0.76	41.32±1.29
阳性对照(舒巴坦0.01 mg·mL ⁻¹)		86.20±1.12	

注:“/”表示样品抑制率为零。

mL⁻¹时,对XOD的抑制率为67.09%。样品浓度为1 mg·mL⁻¹时,75.49%的样品显示出酶抑制活性,且10.78%的样品对XOD抑制率大于40%,3.92%的样品对XOD抑制率大于60%,0.98%的样品对XOD抑制率大于80%。其中菌株G6发酵液的乙酸乙酯提取物和菌丝体甲醇提取物表现出较强的XOD抑制活性,样品浓度为1 mg·mL⁻¹时,酶抑制率分别为91.38%和75.06%。当浓度为0.5 mg·mL⁻¹时酶抑制率分别为80.01%和57.69%,当浓

度为0.1 mg·mL⁻¹时酶抑制率分别为36.78%和27.14%。

3.2.4 次级代谢产物对TYR抑制活性评价结果

由表6可知,阳性对照曲酸浓度为0.4 mg·mL⁻¹时,对TYR的抑制率为84.39%。样品浓度为1 mg·mL⁻¹时,71.57%的样品显示出酶抑制活性,且2.94%的样品对TYR抑制率大于20.00%。其中菌株G1-5-2菌丝体甲醇提取物样品对TYR抑制率为26.54%,其他菌株样品对TYR无明显抑制作用,该实验结果表明已获得

表5 待测样品 XOD抑制活性测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品编号	乙酸乙酯相抑制(%)	水相抑制率(%)	菌丝体甲醇提取物抑制率(%)
G1-1	39.04±1.59	11.34±1.62	/
G1-2	/	10.24±1.59	/
G1-5-2	35.41±1.56	/	/
G(1-5)(s)	/	/	46.37±1.33
G1-9	62.97±1.48	30.34±1.24	14.79±1.47
G1-12	33.25±1.39	14.91±1.55	65.69±1.26
G2(Y)	38.52±1.34	/	10.02±0.95
G2-3.1	/	15.74±1.48	22.22±1.54
G3-4	50.88±1.42	15.39±1.51	31.17±1.26
G6	91.38±0.26	8.31±0.88	75.06±1.04
GNS-6	57.70±1.33	10.46±1.20	14.61±1.37
GNS-10	53.00±1.37	/	12.91±1.44
GNS-12	18.50±1.68	/	25.10±1.59
GNS-14	28.27±1.46	11.78±1.37	/
GNT-2	29.12±1.56	11.61±1.41	13.84±1.45
GNT-5	16.83±1.05	/	38.44±1.29
GFT-2	43.93±1.46	17.06±1.04	30.95±1.36
GFT-3	22.56±1.57	/	13.88±1.21
GFT-4	16.33±1.63	/	19.96±1.54
GFT-5	35.99±1.38	/	/
GFT-6	25.32±1.49	14.57±1.25	56.00±1.14
GFT-7	23.80±1.51	/	/
GFT-8	/	17.13±1.47	13.92±1.66
GFT-9	31.22±1.17	/	14.19±1.07
GFT-10	33.71±1.21	16.96±1.45	17.04±1.22
HGGJSS5	24.32±1.34	10.99±1.22	10.29±1.52
HGGJ SS6	11.49±1.59	17.84±1.56	11.62±1.23
HGGJ-SS8	21.07±1.43	15.17±1.42	14.00±1.49
HGGJSS12	12.64±1.61	15.62±1.53	11.30±1.32
HGCMC SS4	7.75±1.22	11.02±1.04	15.39±1.36
HGCMC SS5	/	/	33.49±1.28
HGCMC SS6	54.43±1.15	15.18±1.39	14.58±1.51
HGCMC-SS8	22.00±1.46	/	17.39±1.25
G-B(YT)	25.65±1.39	/	34.01±1.63
阳性对照(别嘌呤醇 0.02 mg·mL ⁻¹)		67.09±1.23	

注:“/”表示样品抑制率为零。

的菌株样品对TYR无明显抑制活性。

结果表明,光果甘草中的可培养内生真菌次级代谢产物对 ADA、β-内酰胺酶、XOD 等具有一定的抑制作用,而对TYR的抑制作用交叉。

3.3 高活性菌株的鉴定结果

3.3.1 高活性菌株的形态学鉴定

由上述活性测定结果可知,菌株 G(1-5)(s)的次级代谢产物样品有着较好的 ADA、β-内酰胺酶抑制活性。菌株 G6 的次级代谢产物样品有着较好的 XOD 抑制活性。两株菌的正反及显微照片如图 2 所示。

菌株 G(1-5)(s)和 G6 这两株高活性菌株进行形态

学鉴定。其中菌株 G(1-5)(s)的菌落形态和显微结构如图 2A 所示,菌丝呈白色短绒状。菌落中心呈皱缩堆积状,边缘处为均匀放射的绒状,菌落在平板上产生黄色次级代谢产物,显微观察下菌丝极细,孢子呈球状连接,菌丝有隔,产孢结构较小,初步鉴定为青霉菌属。而菌株 G6 的菌落形态和显微结构如图 2B 所示,菌丝呈黑色毛绒状。菌落中心呈平整分布,边缘处为绒状白色菌丝,菌落在平板上产生米白色的次级代谢产物,显微观察下菌丝粗壮,菌丝顶端形成孢子囊,孢子聚集于孢子囊,产孢结构较大,初步鉴定为曲霉属。

表6 待测样品TYR抑制活性测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品编号	乙酸乙酯相抑制率(%)	水相抑制率(%)	菌丝体甲醇提取物抑制率(%)
G1-1	14.47±1.38	6.41±0.77	12.95±1.07
G1-2	14.64±1.42	/	10.40±1.25
G1-5-2	/	9.68±1.02	9.49±1.43
G(1-5)(s)	11.17±1.26	5.85±1.14	26.54±1.53
G1-9	13.41±1.18	/	8.64±1.07
G1-12	15.89±1.65	/	19.90±1.25
G2(Y)	3.26±0.67	/	/
G2-3.1	/	/	16.82±1.36
G3-4	19.74±1.09	/	/
G6	13.85±1.34	/	13.27±1.54
GNS-6	10.31±1.20	/	/
GNS-10	12.01±1.41	/	6.21±0.80
GNS-12	/	8.02±0.49	12.07±1.43
GNS-14	4.73±0.87	/	/
GNT-2	7.87±0.45	10.69±1.11	6.78±0.99
GNT-5	7.28±0.66	10.37±1.26	18.37±0.79
GFT-2	/	18.13±0.83	8.13±0.47
GFT-3	17.00±0.52	14.52±1.39	13.18±1.47
GFT-4	10.67±0.59	13.76±1.42	9.13±1.36
GFT-5	/	14.88±1.15	/
GFT-6	16.72±0.49	6.85±0.57	12.70±1.68
GFT-7	20.12±1.24	10.37±1.15	9.53±0.66
GFT-8	17.06±0.63	14.15±1.34	11.40±1.25
GFT-9	/	12.29±1.27	/
GFT-10	/	13.17±1.46	5.94±0.79
HGGJSS5	6.88±1.38	14.29±1.36	10.19±1.54
HGGJ SS6	14.21±1.47	13.67±1.41	13.31±1.36
HGGJ SS8	13.48±1.33	14.51±0.99	/
HGGJ SS12	/	7.11±1.01	9.48±0.74
HGCMCSS4	13.06±1.37	6.01±1.34	6.71±1.04
HGCMCSS5	17.10±1.28	/	21.48±1.16
HGCMCSS6	5.44±0.69	10.19±1.63	12.25±0.95
HGCMC-SS8	/	/	4.38±0.88
G-B(YT)	6.87±1.03	/	5.49±1.37
阳性对照(曲酸 0.4 mg·mL ⁻¹)		84.39±1.43	

注：“/”表示样品抑制率为零。

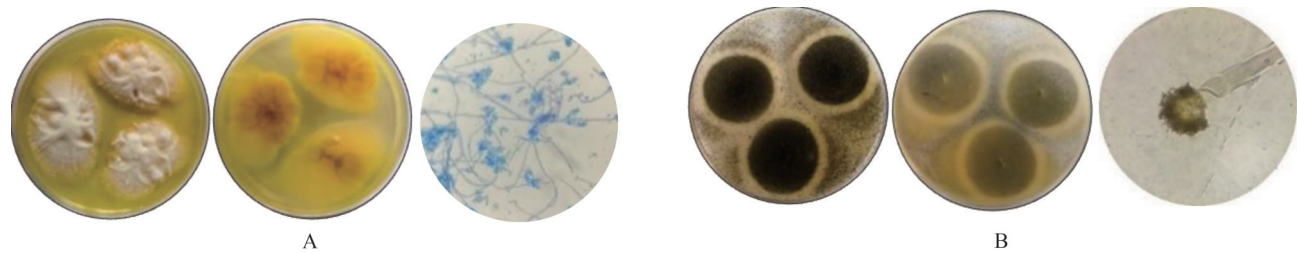


图2 菌株G(1-5)(s)(A)和G6(B)培养皿正面菌落形态、培养皿反面菌落形态和显微结构

3.3.2 高活性菌株的分子生物学鉴定

将菌株G(1-5)(s)和菌株G6的分子生物学测定序列登录NCBI与Genbank数据库进行Blast比对,显示菌株G(1-5)(s)与*Penicillium polonicum*的99.83%的最

高相似性,初步将其鉴定为*Penicillium* sp.。菌株G6与*Aspergillus niger*有99.66%的最高相似性,初步将其鉴定为*Aspergillus* sp.。进一步构建系统进化树所得结果如图3所示。

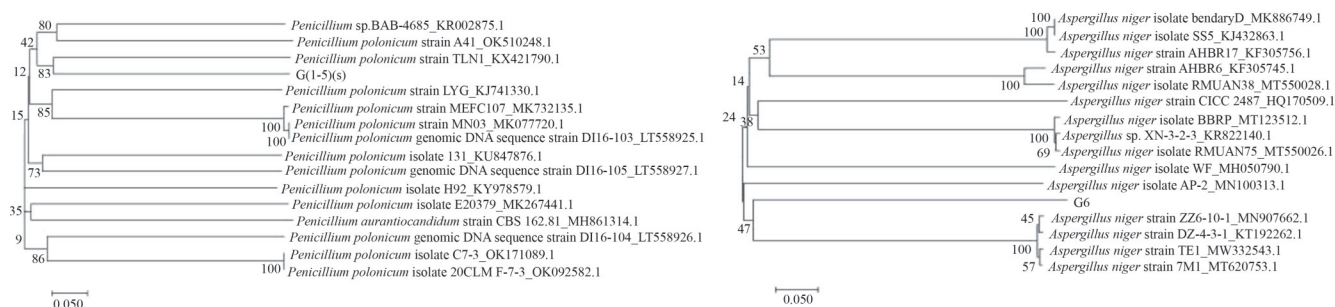


图3 菌株G(1-5)(s)(左)和菌株G6(右)系统进化树

4 讨论

1993年, Stierle等^[20]发现从太平洋紫杉中分离出的内生菌可产生与寄主植物相同的抗肿瘤物质紫杉醇,这启发了研究人员可以从植物内生菌中寻找生物活性物质。甘草作为我国传统的药食同源中药材,具有悠久的药用历史,从甘草内生菌中寻找活性物质不但能推动我国中药材的发展,还能为新药的发现和应用开辟途径^[21]。本研究的结果也证实,光果甘草中不仅含有丰富的内生真菌资源,而且其内生真菌次级代谢物具有丰富的生物活性。

培养基营养物质的组成对内生菌分离至关重要。研究显示,营养物质的不同可能导致某些微生物生长缓慢甚至不生长^[22]。本研究在选择分离光果甘草内生真菌时选用了4种分离培养基,以尽可能模拟内生真菌自然的生长环境。其中使用100倍稀释过的寡营养培养基^[23]进行内生真菌分离,可以避免优势菌在培养基中生长过快,从而抑制其他非优势菌的生长,以便分离到常规培养基难以获得的菌株。结果显示,原浓度PDA培养基分离效果显示出了较强的优势,该研究结果有望为光果甘草内生菌的分离培养基的选择提供一定指导。

随着全球癌症发病率逐年上升,抗癌药物一直是研发焦点。研究表明,ADA抑制剂可以调控肿瘤的免疫细胞应答反应^[24],从而增强某些化疗药物的抗肿瘤活性。其来源包括从天然产物中提取分离、化学结构修饰、化学合成等^[25],目前常用的ADA抑制剂如脱氧助间型霉素等存在毒副作用较大等问题,因此需要迫切开发安全、稳定、高效的ADA抑制剂。

随着抗生素的滥用,细菌耐 β -内酰胺类抗生素问题日益严重,而新型抗生素的研制已经无法满足耐药菌患者治疗的需要^[26]。研究显示,耐药菌主要是产生 β -内酰胺酶水解相关药物的 β -内酰胺环来形成耐药

性^[27]。针对此问题,除了积极研发新型抗生素,寻找 β -内酰胺酶抑制剂也很重要。

XOD能催化黄嘌呤和次黄嘌呤生成尿酸,进而引发痛风等症状^[28]。目前上市的XOD抑制剂如别嘌醇等存在着疗效差、副作用大的问题^[29],而来自食物或中药的XOD抑制剂通常副作用更少,因此具有更广泛的研究前景。

TYR是生物体合成黑色素、导致果蔬褐变的关键酶。曲酸等TYR抑制剂可以抑制TYR的活性,因此在美容保健、色素型皮肤病治疗以及食品保鲜等方面应用广泛^[30]。但由于稳定性差、易分解,且具有副作用等问题,其应用受到了限制^[31],因此亟待寻找开发新型抑制剂。

本研究以经典微生物分离方法得到34株形态各异的内生真菌,并作为初始菌株发酵制备102份次级代谢产物样品并进行活性测定,结果显示,对ADA有抑制作用的样品有74个,抑制效果强于对照的样品有25个,集中于乙酸乙酯相和甲醇提取物;对 β -内酰胺酶有抑制作用的样品有75个,抑制效果强于对照的样品有1个;对XOD有抑制作用的样品有77个,抑制效果强于对照的样品有2个;对TYR有抑制作用的样品有73个,抑制效果强于对照的样品有0个。其中菌株G(1-5)(s)次级代谢产物的菌丝体甲醇提取物有较好的ADA、 β -内酰胺酶抑制活性,样品浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑制率分别为98.58%和93.15%。菌株G6次级代谢产物的乙酸乙酯相有较好的XOD抑制活性,样品浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑制率为91.38%。分子生物学鉴定显示菌株G(1-5)(s)为*Penicillium* sp.,菌株G6为*Aspergillus* sp.,研究表明对于*Penicillium* sp.和*Aspergillus* sp.的次级代谢产物二者都存在一定的抗肿瘤、抗氧化、杀虫和免疫调节等活性^[32]。

尽管当前关于光果甘草内生菌的研究还鲜有报道,但其他两种甘草为材料的研究已充分揭示了其富含丰

富多样的内生菌及其次级代谢产物。如杨雅琳等^[33]从新疆胀果甘草中分离得到的内生菌SCAU7001展示了广泛的抗菌活性;姜硕等^[34]从黑龙江乌拉尔甘草中分离出一株烟曲霉菌株能产生酰胺类生物碱 pseurotin A, 具有诱导细胞分化、抗菌和免疫调节等功能;此外, Sun等^[35]从乌拉尔甘草中分离得到的尖孢镰刀菌次级代谢产物, 展现出良好的抗氧化和香豆素等化合物的生物合成能力。相较于此前的研究, 本研究通过对光果甘草内生真菌的次级代谢产物的研究, 特别关注了当前研究较少的靶点, 如XOD、TYR。这些研究成果更进一步凸

显了甘草在开发新药和探索天然药物资源方面的巨大潜力, 研究将为光果甘草内生菌及其次级代谢产物在未来的应用探索提供了宝贵的技术资料。

综上所述, 本文期望通过一系列研究为甘草内生菌的潜在应用及天然药物发现与开发提供新视角。实验表明, 光果甘草内生真菌是发现ADA、 β -内酰胺酶、XOD和TYR抑制剂的良好资源。后续应扩充培养方法、优化条件以获取更多特异性菌株, 发酵分离目标化合物, 实现菌株合理开发。同时, 还需深入探索其他活性, 全面揭示其生物活性和药用价值。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:88.
- 2 李伟, 钟鹏, 刘泽东, 等. 甘草的药理作用及其在畜牧业的应用. 中国饲料, 2023(17):49-55, 71.
- 3 Wilson D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 1995, 73(2):274.
- 4 张黎光, 魏希颖, 马彩霞. 药用植物内生真菌—生物活性物质的新来源. 药物生物技术, 2011, 18(5):453-456.
- 5 Yan H, Jin H, Fu Y, et al. Production of rare ginsenosides Rg3 and Rh2 by endophytic bacteria from *Panax ginseng*. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(31):8493-8499.
- 6 梁炜薇, 王大成, 程鸿, 等. 人参内生球毛壳菌株RSQMK-9的化学成分研究. 天然产物研究与开发, 2014, 26(8):1202-1206.
- 7 Zhao H, Chen X, Chen X, et al. New peptidodrocin and anticancer chartreusin from an endophytic bacterium of *Dendrobium officinale*. *Ann Transl Med*, 2020, 8(7):455.
- 8 Fíráková S, Šturdíková M, Máčková M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*, 2007, 62(3):251-257.
- 9 曼琼, 杨志军, 邓毅, 等. 甘草内生菌的鉴定与药理作用和活性成分研究进展. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(9):1125-1128.
- 10 王蓓, 孟瑛瑛, 罗满平, 等. 虚拟筛选技术在酶抑制剂类化合物研究中的进展. 中国中药杂志, 2023, 48(24):6533-6544.
- 11 唐章勇, 唐灿. 酶抑制剂筛选的研究进展. 上海医药, 2007, 28(3):117-119.
- 12 龙楚媚, 付强, 王琪, 等. 罗汉果内生菌的分离及 α -淀粉酶抑制剂产生菌的筛选. 中国酿造, 2019, 38(1):71-74.
- 13 常强, 吴再节, 孙伟, 等. 不同培养温度对大曲微生物种群变化影响的研究. 现代食品, 2019(12):63-65, 78.
- 14 李文军, 郑素慧, 毛培宏, 等. 新疆胀果甘草内生菌的分离及产甘草酸菌株的筛选. 生物技术, 2008, 18(5):28-31.
- 15 董佩杰, 张新国, 刘英娟, 等. 腺苷脱氨酶抑制剂快速筛选模型的建立. 中国现代应用药学, 2015, 32(11):1301-1305.
- 16 王斯文, 陈向东, 汪辉, 等. β -内酰胺酶抑制剂高通量筛选模型的建立. 中国抗生素杂志, 2013, 38(2):102-105.
- 17 朱深银, 周远大, 刘庆山, 等. 黄嘌呤氧化酶抑制剂高通量筛选模型的建立及应用. 中国药理学杂志, 2007, 42(3):187-190.
- 18 马小弟, 杜雅娟, 张新国, 等. 酪氨酸酶抑制剂快速筛选方法的建立. 中国食品工业, 2020(S2):69-71.
- 19 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979:129-134.
- 20 Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, 260(5105):214-216.
- 21 牟文荣, 张童童, 裴莉昕, 等. 药食同源类中药开发应用探讨. 中医学报, 2023, 38(3):673-678.
- 22 Muggia L, Kopun T, Grube M. Effects of growth media on the diversity of culturable fungi from lichens. *Molecules*, 2017, 22(5):824.
- 23 朱利平, 黄惠莉. 产壳聚糖酶海洋真菌鉴定、寡营养培养基优化及廉价培养基研究. 食品与发酵工业, 2011, 37(5):35-39.
- 24 方倩, 李兴武, 梅传忠. 腺苷脱氨酶的临床价值及其应用进展. 现代肿瘤医学, 2014, 22(2):476-478.
- 25 郭思佳, 张新国, 赵萍, 等. 腺苷脱氨酶抑制剂的研究进展. 中国食品工业, 2020, 6:72-75.
- 26 Fisher J F, Meroueh S O, Mobashery S. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev*, 2005, 105(2):395-424.
- 27 Wong D, van Duin D. Novel beta-lactamase inhibitors: unlocking their potential in therapy. *Drugs*, 2017, 77(6):615-628.
- 28 朱小霞, 曹灵, 邹和建. 痛风的诊断及进展. 内科理论与实践, 2020, 15(4):232-235.
- 29 高天舒, 胡伟凤, 肖榆箫, 等. 黄嘌呤氧化酶抑制剂的研究进展. 药学研究, 2022, 41(9):605-610.
- 30 胡泳华, 贾玉龙, 陈清西. 酪氨酸酶抑制剂的应用研究进展. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(5):760-768.
- 31 何敏, 凡美艳, 杨维, 等. 曲酸类酪氨酸酶抑制剂研究进展. 化学试剂, 2022, 44(7):1001-1011.
- 32 Wei C, Sun C, Feng Z, et al. Four new chromones from the endophytic

- fungus *Phomopsis asparagi* DHS-48 isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mangle*. *Mar Drugs*, 2021, 19(6):348.
- 33 杨雅琳, 赵翀, 廖萍, 等. 塔里木盆地胀果甘草内生放线菌多样性及抗菌活性分析. *微生物学通报*, 2016, 43(10):2138-2147.
- 34 姜硕, 许哲祥, 王宇晴, 等. 产 pseurotin A 内生真菌 GYP8 的鉴定. *安徽农业科学*, 2018, 46(32):85-87.
- 35 Sun Y, Ren G, Shi Q, *et al.* Identification of a novel coumarins biosynthetic pathway in the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* GU-7 with antioxidant activity. *Appl Environ Microbiol*, 2023, 89(1): e0160122.

Isolation of Endophytic Fungi from *Glycyrrhiza glabra* L. and Study of Their Secondary Metabolite Activity

LI Yang, JIA Zhipeng, ZHAO Yujie, ZHAO Xiaoxiao, PEI Jiamei, CHEN Kailin, FENG Zaiping, ZHANG Xinguo

(College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective Endophytic fungi were isolated and purified from fresh *Glycyrrhiza glabra* L. and strains capable of producing secondary metabolites with inhibitory effects on adenosine deaminase, β -lactamase, xanthine oxidase, and tyrosinase were screened. Methods Four types of culture media were used to isolate and purify endophytic fungi using tissue homogenization method. Subsequently, the secondary metabolites of endophytic fungi were evaluated using an activity assessment platform. Results A total of 131 strains of endophytic fungi were isolated from the plant, among which 34 strains exhibited distinct morphologies and special characteristics. The mycelial extract of hypha G(1-5)(s) showed good adenosine deaminase inhibitory activity (inhibition rate: 98.58%) and β -lactamase inhibitory activity (inhibition rate: 93.15%). and β -lactamase (inhibition rate: 93.15%). Strain G6 exhibited excellent xanthine oxidase inhibitory activity (inhibition rate: 91.38%) in the ethyl acetate phase. These strains were identified as *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. Conclusion *Glycyrrhiza glabra* L. harbors a diverse range of endophytic fungi with promising research potential. Further investigation is warranted to provide important technical data for the protection and in-depth applications of *Glycyrrhiza glabra* L..

Keywords: *Glycyrrhiza glabra* L., Endophytic fungi, Isolation, Identification, Secondary metabolites, Enzyme inhibition activity

(责任编辑: 李青)