

# Study on Antioxidant Activity of *Lilium davidii* var. *unicolor* Endophytes

Dan Li<sup>1</sup>, Hong Cao<sup>1\*</sup>, Chunmei Wang<sup>2</sup>, Tingxiu Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou Gansu

<sup>2</sup>The Experiment Center, Northwest University for Nationalities, Lanzhou Gansu

Email: \*caoh2008@163.com

Received: May 5<sup>th</sup>, 2017; accepted: May 18<sup>th</sup>, 2017; published: May 26<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

We Separated the endophytes from the bulbs and roots of *Lilium davidii* var. *unicolor* by tissue separation method, then the preliminary classification was made according to morphological character; 13 strains of endophytes were randomly selected, then the activity of hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ) radicals and superoxide anion ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) radicals was determined by Fenton reaction and the antioxidant activity of the strains was determined by the radical scavenging rate of hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ) radicals and superoxide anion ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) radicals. The results showed that 26 strains of endophytes were isolated from the stems, bulbs and roots of *Lilium davidii* var. *unicolor* and we found that AJ-2 strain had the highest scavenging rate of hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ) radicals, up to 85% and the scavenging rate of superoxide anion ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) radical is also the highest, up to 90% or more, so AJ-2 strain can be used as a further study of the object.

## Keywords

*Lilium davidii* var. *unicolor*, Endophytic Fungi, Hydroxyl Radical, Superoxide Anion Radica

# 兰州百合内生菌的抗氧化活性研究

李丹<sup>1</sup>, 曹竑<sup>1\*</sup>, 王春梅<sup>2</sup>, 王廷秀<sup>2</sup>

<sup>1</sup>西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州

<sup>2</sup>西北民族大学实验中心, 甘肃 兰州

Email: \*caoh2008@163.com

收稿日期: 2017年5月5日; 录用日期: 2017年5月18日; 发布日期: 2017年5月26日

\*通讯作者。

## 摘要

以兰州百合为试验材料, 采用组织分离法从其鳞茎及根中分离内生菌, 依据形态进行初步分类; 随机选取13株内生菌采用Fenton清除反应测定羟基( $\cdot\text{OH}$ )自由基活性和超氧阴离子( $\text{O}_2\cdot^-$ )自由基活性, 以羟基( $\cdot\text{OH}$ )自由基和超氧阴离子( $\text{O}_2\cdot^-$ )自由基清除率为指标, 测定菌株的抗氧化活性。结果表明: 从兰州百合表面消毒的鳞茎及根中共分离出内生菌26株, 发现AJ-2菌株对羟基( $\cdot\text{OH}$ )自由基的清除率最高, 可达85%以上; AJ-2菌株对超氧阴离子( $\text{O}_2\cdot^-$ )自由基的清除率也是最高, 可达90%以上, 所以可将AJ-2菌株作为进一步研究的对象。

## 关键词

兰州百合, 内生菌, 羟基自由基, 超氧阴离子自由基

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

兰州百合(*Lilium davidii* var. *unicolor*)为百合科百合属川百合的变种, 是一种多年生鳞茎类草本植物。分析研究表明, 兰州百合不但含有丰富的糖类、蛋白质和脂肪, 而且含有秋水仙碱, 随着人口老龄化的加剧以及人们对抗氧化衰老产品的日益需求, 成了全社会所共同关心的热点。现代生物关于活性氧和体内自由基增多是促进衰老进程的主要原因的研究越来越引人注目, 衰老的自由基学说被越来越多的实验证实。因此, 寻找能够高效清除自由基的天然抗氧化物[1] [2]的研究越来越引起人们的重视。

植物内生菌(Endophyte) [3] [4]是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的种组织和器官内部的一类微生物, 而宿主植物一般不表现出外在的症状。所有植物中几乎都存在内生菌, 可通过组织学方法或从严格表面消毒的植物组织中分离得到, 一直被人们认为是生物活性物质的主要来源。

许多研究结果证明百合多糖是百合的主要功效成分, 具有良好的抗氧化活性[5] [6], 但从兰州百合分离出内生菌及其抗氧化活性的研究尚未见报道。本研究利用组织分离法对兰州百合内生菌进行分离纯化, 并进一步对12株兰州百合内生菌的发酵产物进行抗氧化活性测定, 对兰州百合更好的开发利用提供参考, 并为开发新的抗氧化活性生物资源提供基础和依据。

## 2. 材料与试剂

### 2.1. 材料

兰州百合

### 2.2. 试剂

试剂名称: 公司名称

硫酸亚铁: 天津市化学试剂厂

水杨酸: 天津市化学试剂厂

95%乙醇：天津市化学试剂厂  
 30%过氧化氢溶液：天津市化学试剂厂  
 邻苯三酚：成都市科龙化工试剂厂  
 浓盐酸：新光化工试剂厂  
 试剂均为分析纯。

### 2.3. 培养基

- 1) 分离培养基：高氏 I 号培养基、营养琼脂培养基、高盐查氏培养基、PDA 培养基。
- 2) 液体摇瓶培养基：营养肉汤培养基。

### 2.4. 仪器及设备

名称	型号	生产厂家
超净工作台	1285 REL#6	OUTLETS
振荡培养箱	QHZ—98A	北京信达恒信科技有限公司
低速台式离心机	TDL—50B	上海安亭科学仪器厂
显微镜	CXZI	日本奥林巴斯
恒温培养箱	ZHP—250E	海佰好仪器有限公司
高压灭菌锅	MLS—3750	SANYO
恒温鼓风干燥箱	DHG—9246A	上海精宏实验设备有限公司
电冰箱	BCD—212KA	海尔
电子天平	BS2/OS	北京赛多利斯天平有限公司
电热恒温水浴锅	DK—S24 型	上海精宏实验设备有限公司

## 3. 方法

### 3.1. 百合内生菌的分离

将采集的百合样品用自来水冲洗去掉表面的泥沙，用无菌滤纸吸干百合表面的水分，对样品进行适当的修剪，使其鳞茎及根分开，然后在无菌超净台中进行处理。首先将百合组织鳞茎及根分别用浓度为 0.1% 的 Tween-20 浸泡 5 分钟，无菌水冲洗干净。75% 的酒精浸泡 5 分钟，无菌水冲洗 3 次将表面的酒精冲洗干净。用 2% 的次氯酸钠消毒 5 分钟，无菌水冲洗 3 次，但要留下最后一次冲洗百合鳞茎及根的无菌水，装于无菌小烧杯中，待用(作为对照)。再将百合进行研磨，在研钵中加入一定量的无菌蒸馏水，静置用微量移液器吸取 200  $\mu$ l，用涂布棒将菌液均匀的涂布在平板上，用封口膜封住放入 37℃ 恒温培养箱中培养。

### 3.2. 内生菌的分离纯化

挑取平板上长出的菌落进行划线分离，直至在平板上长出单菌落。

### 3.3. 内生菌的保藏

斜面低温保藏法[7]：将分离所得菌种在适宜的固体斜面培养基上，待菌充分生长后，塞子部分用牛皮纸包好，移至 4℃ 冰箱中保藏。

### 3.4. 兰州百合内生菌发酵产物的抗氧化活性测定

#### 3.4.1. 试样的准备

在 150 ml 的锥形瓶中加入 50 ml 营养肉汤培养基，灭菌后，将已培养好的内生菌接种于营养肉汤培养基中。在 37℃，180 r/min 条件下，摇床振荡培养 3 d。

#### 3.4.2. 清除羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )活性的测定

采用 Fenton 反应[8]-[13]其原理是  $\text{Fe}^{2+}$  催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )，加入水杨酸捕捉 $\cdot\text{OH}$ 产生有色物质在 510 nm 波长处有吸收峰，因此测吸光度  $A_{510}$  值表示样品清除羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )能力大小 A 值越高，说明样品清除羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )能力越弱。

在 10 ml 离心管中依次加入 6 mmol/L 硫酸亚铁溶液 1 ml，6 mmol/L 水杨酸—乙醇溶液 1 ml 后，把不同菌株的发酵提取液 1 ml 分别加入试管中，然后加入 0.1%的过氧化氢溶液 1 ml，总体积 5 ml，以双蒸水补足体积，摇匀后在 37℃水中温浴 30min，7000 r/min 离心 3 min，在 510 nm 处测定吸光度值  $A_i$ ，以相应溶剂代替样本作为空白对照，吸光度为  $A_{\text{max}}$ ，相应样品溶液的吸光度  $A_0$ ，3 次重复取平均值。

自由基清除率按下式计算： $\cdot\text{OH}$  清除率： $E(\%) = [1 - (A_i - A_0) / A_{\text{max}}] \times 100\%$ ；

公式中引入  $A_0$  是为了消除供试品本身颜色对测定的干扰，清除率越大，抗氧化活性越高。

#### 3.4.3. 对 $\text{O}_2^-$ 自由基清除能力的测定

超氧阴离子清除作用的测定采用邻苯三酚自氧化法，参照迟晓星报道的方法并略有改动[14]。在 10 ml 离心管中依次加入，4.5 ml PH = 8 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液放入 25℃水浴中加热 20 min，分别加入 1 ml 不同菌株的发酵提取液和 0.4 ml 25 mmol/l 邻苯三酚溶液，混匀后于 25℃水浴中反应 5 min，加入 80 mmol/L HCL 1 ml 终止反应，并摇匀，反应 3 min，7000 r/min 离心 3 min，在波长 420 nm 处测吸光度  $A_i$ ，以相应溶剂代替样品作为空白对照，测吸光度为  $A_{\text{max}}$ ，相应样品溶液的吸光度  $A_0$ ，3 次重复取平均值。 $\text{O}_2^-$  清除率： $E(\%) = [1 - (A_i - A_0) / A_{\text{max}}] \times 100\%$ 。

本实验数据分析是以菌株对羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )和超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )清除率的大小来分析的，具体试验结果如下：

## 4. 结果

### 4.1. 兰州百合内生菌分离结果

兰州百合表面消毒的最后一次浸泡的无菌水涂布在营养琼脂平板上，平板上未长菌，说明兰州百合表面的微生物已消毒干净，平板上长出的菌均为兰州百合的内生菌。

从兰州百合鳞茎及根分离出内生菌共 26 株，其中百合鳞茎 13 株内生菌、从百合根部分离出 13 株内生菌。

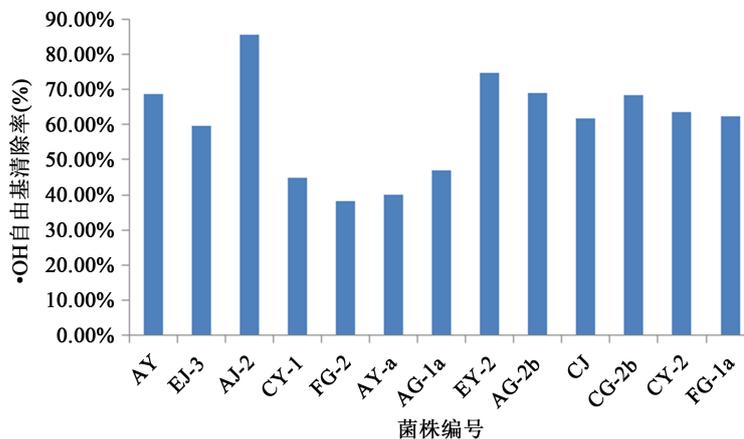
### 4.2. 13 株兰州百合内生菌对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

随机选取兰州百合内生菌 13 株，测定其对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用，结果见图 1。

由图 1 可知，13 株菌对 $\cdot\text{OH}$ 自由基都有一定的清除作用，其中 AJ-2 菌株对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率最高，可达 85%以上。其他多数菌株大部分也都高达 60%以上，说明百合的内生菌对 $\cdot\text{OH}$ 自由基有一定的清除作用。

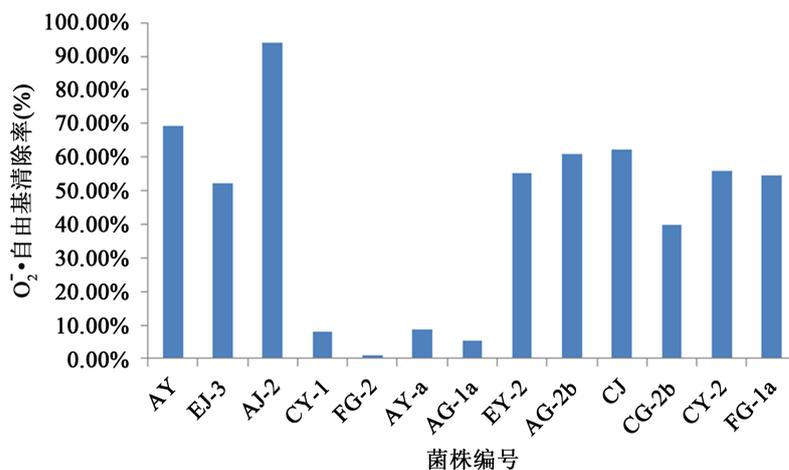
### 4.3. 13 株兰州百合内生菌对 $\text{O}_2^-$ 的清除作用

随机选取兰州百合内生菌 13 株，测定其对 $\text{O}_2^-$ 的清除作用，结果见图 2。



**Figure 1.** The scavenging rate of  $\cdot\text{OH}$  radicals in 13 strains. In the figure: A—Actinomycetes culture medium; C—Coates medium; F—Nutrient AGAR medium; E—PDA medium; G—Lily root; Y—Lily bulbs leaf; J—Lily bulbs stems; Numbers represent endophytic fungi from lily, lowercase letters represent endophytes isolated strains

**图 1.** 13 株菌对  $\cdot\text{OH}$  自由基的清除率。图中：A—高氏培养基；C—高盐察氏培养基；F—营养琼脂培养基；E—PDA 培养基；G—百合根；Y—百合鳞茎叶；J—百合鳞茎茎；数字代表从百合中分离出的第几株内生菌，小写字母代表亚株



**Figure 2.** The scavenging rate of  $\text{O}_2\cdot^-$  radicals in 13 strains

**图 2.** 13 株菌对  $\text{O}_2\cdot^-$  自由基的清除率

由图 2 可知, 13 株菌对  $\text{O}_2\cdot^-$  自由基都有一定的清除作用, 其中 AJ-2 菌株对  $\text{O}_2\cdot^-$  自由基的清除率最高, 可高达 90% 以上, 而且其对  $\cdot\text{OH}$  自由基的清除率也高达 85% 以上。从图中可以看出百合大部分内生菌对自由基的清除均有一定的作用。

## 5. 讨论

### 5.1. 自由基的清除

目前关于活性氧的研究越来越引起人们的关注, 国内外学者发现有机体的多种疾病都直接或间接的与自由基对机体的氧化损伤有关, 因此寻找高效天然抗氧化剂显得十分重要[15] [16]。关于内生菌的抗氧化活性已有报道, 如赵云涛等[17]在红树林内生真菌的抗氧化作用研究中, 利用 Fenton 反应、邻苯三酚自养化法测定浓度为 100 mg/ml 的红树林内生真菌发酵产物对羟自由基和超氧阴离子的清除作用, 结果

表明测定的 18 株内生真菌中, 具有清除羟自由基的菌株有 9 株, 抑制率最高达 85.49%; 具有清除超氧阴离子自由基的菌株有 10 株, 抑制率最高达 68.85% 能够同时对羟自由基和超氧阴离子自由基都具有清除能力的有 5 株。候奎等[18]在葛的根、茎、果实中分离出 128 株内生真菌, 并采用 DPPH 自由基酶标仪法对其清除自由基活性进行检测, 结果表明分离出的葛内生真菌普遍具有清除自由基的活性, 且分离部位不同产地不同所具有的活性也不同。同一部位分离出的不同菌株之间活性亦不同, 其中菌株在浓度 215 mg/ml 的清除自由基活性达到 92.3%。本研究随机挑选的 13 株菌均有一定清除自由基的能力, 大部分具有良好的抗氧化活性。

## 5.2. 抗氧化活性

自从 1993 年美国学者首次从短叶红豆杉的韧皮部分中分离到一株产紫杉醇的内生真菌以来, 关于植物内生菌的研究就一直为学者所关注, 但关于内生菌的大部分研究主要是集中在其抗肿瘤和抗菌方面, 相对于抗氧化活性的研究相对较少。本研究以甘肃本地特产兰州百合为实验材料, 采用组织分离法得到 26 株内生菌。随机选取的 13 株菌均有一定的清除自由基的能力, 具有潜在的开发利用价值, 尤其是 AJ-2 菌株表现出较强的清除自由基的能力, 加之较易培养, 因此被定为本实验的最优良菌株, 可作为进一步研究的对象。

## 5.3. 内生菌分离

在内生菌的分离过程中, 表面消毒是内生菌分离的关键步骤, 既要彻底杀死供试材料表面的菌, 又不伤及供试材料内部的内生菌, 过轻或过重都会影响植物内生菌的分离。在植物内生菌分离过程中用 PDA 培养基、高氏培养基、高盐察氏培养基、营养琼脂培养基可以最大限度分离出尽可能多的内生菌。在进行测定菌株清除羟基自由基和超氧阴离子自由基实验时, 两组实验是分开进行的, 由于菌株是在固体斜面培养基上保存的, 到后期菌株代谢活力减慢, 因此不能很好的在液体培养基内生长, 所以测定百合内生菌抗氧化活性实验选取的是生长状态较好的 13 株进行的。

## 6. 结论

从兰州百合分离出 26 株内生菌, 其中百合鳞茎叶分离出 5 株、百合鳞茎茎分离出 8 株、从百合根部分离出 13 株菌。随机挑选的 13 株百合内生菌均有一定清除自由基的能力, 都具有良好的抗氧化活性, 其中 AJ-2 菌株对·OH 自由基的清除率最高, 可达 85% 以上; 其他多数菌株对·OH 自由基的清除率都高达 60% 以上; AJ-2 菌株对  $O_2^-$  自由基的清除率达 93.88%, 而且其对·OH 自由基的清除率也高达 85.39%, 可作为进一步研究对象。

## 基金项目

西北民族大学国家级大学生创新创业训练计划资助项目(项目编号: 201610742072)。

## 参考文献 (References)

- [1] 贾粟, 陈疏影, 翟永功, 等. 近年国内外植物内生菌产生物活性物质的研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(11): 1570.
- [2] 杜晓宁, 徐慧娟, 代金霞, 等. 宁夏枸杞内生细菌多样性及抑菌活性的研究[J]. 微生物学通报, 42 (9): 1779-1787.
- [3] 李佳, 殷幼平, 郑莉萍, 等. 柑橘黄龙病寄主长春花内生细菌的分离及功能鉴定[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 862.
- [4] 王梅霞. 产黄酮类物质银杏内生真菌菌株的初步研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2003.
- [5] 周世文, 徐传福. 多糖的免疫药理作用[J]. 中国生化药物杂志, 1994(2): 143-147.

- [6] 张英, 石雪萍, 姜洪芳, 张卫明, 金敬宏. 葱白多糖的降血脂功能及对酒精肝预防作用的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(4): 521-525.
- [7] 周德庆. 微生物学实验教程(第2版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 372, 136, 207, 60, 128, 26, 32.
- [8] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(8): 213.
- [9] 周海华, 马海乐. 云芝多糖的体外抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 44.
- [10] 王德才, 高丽君, 高艳霞. 泰山四叶参多糖体外抗氧化活性的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(2): 104.
- [11] 李顺峰, 张丽华, 付娟妮, 等. 真姬菇子实体多糖体外抗氧化活性的研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(14): 302.
- [12] 杨江涛, 杨娟, 谢红, 等. 刺梨多糖粗品与纯品体外抗氧化作用[J]. 食品工业科技, 2008, 29(2): 94.
- [13] 朱良, 张杰平, 王一飞, 等. 繁枝蜈蚣藻多糖的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 453.
- [14] 迟晓星, 张涛, 赵静, 等. 叶酸的提取及抗氧化性研究. 现代食品科技[J]. 2011, 27(10): 1234-1237.
- [15] Sugiyama, H., Fung, K.P. and Wu, T.W. (1993) Purpurogallin as an Antioxidant Protector of Human Erythrocytes Against Lysis by Peroxyl Radicals. *Life Sciences*, **53**, 39.
- [16] Harper, J.K., Ford, E.J., Strobel, G.A., *et al.* (2003) Acin: A 1,3-dihydroisobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* Possessing Antioxidant and Antimycotic Activities. *Tetrahedron*, **59**, 2471.
- [17] 赵云涛, 李倩茹, 陈绍红, 等. 红树林内生真菌的抗氧化作用[J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 25(6): 93.
- [18] 侯奎, 刘玉军, 陆荣, 等. 葛内生真菌次生代谢产物清除自由基活性的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2008, 35(2): 26.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjfn@sanspub.org](mailto:hjfn@sanspub.org)