

文章编号:1673-1689(2010)06-0948-04

花脸香蘑 *Lepista sordida* LS7 的鉴定及其 发酵液抗菌活性分析

张京良, 李 蓉, 江晓路*

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘 要: 对采集自青岛崂山的一株真菌 LS7 进行鉴定, 通过对菌落形态和菌丝结构的形态学研究, 以及对 ITS 和 5.8s rDNA 分子系统学分析, 结果均说明此真菌为花脸香蘑(*Lepista sordida*)。采用不同有机溶剂对该菌株的发酵液萃取, 对不同的萃取部位进行抗菌活性分析。通过对其发酵液的抗菌活性实验, 发现该菌株的发酵液具有广泛的抗菌活性, 对 G^+ 、 G^- 细菌、酵母菌和霉菌都有很好的抑制作用, 其中对植物致病菌黄瓜枯萎菌和辣椒炭疽菌效果明显。

关键词: 花脸香蘑, 形态学, ITS, 抗菌活性

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Identification of *Lepista sordida* LS7 and Antibiotic Activity Analysis of its Fermentation Broth

Zhang Jing-liang, LI Rong, JIANG Xiao-lu*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A strain LS7 was isolated from the Laoshan mountain of Qingdao. According to the morphological, cultural characteristics, and ITS and 5.8s rDNA sequence analysis, the isolate was identified as *Lepista sordida*. The fermentation broth was extracted by different organic reagents, and their antibiotic activity was also evaluated in this study. This strain exhibited the inhibitory action on Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi, especially for *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum capsicibutl*. The results shown here provided the theoretical basis for the application of *Lepista sordida* in food and medicine industry.

Key words: *Lepista sordida*, morphology, ITS, antibiotic activity

花脸香蘑(*Lepista sordida*), 俗称紫晶香蘑, 紫晶口蘑, 丁香蘑, 花脸蘑, 紫花脸香蘑等, 隶属于真菌门(Enmycophyta)、担子菌亚门(Basidiomycotina)、层菌纲(Hymenomycetes)、伞菌目(Agari-

cales)、口蘑科(Tricholomataceae)、香蘑属(*Lepista*)^[1]。主要分布于中国的贵州、黑龙江、辽宁、河北、河南、甘肃、青海、四川、新疆、山西、内蒙古和福建等地。花脸香蘑在民间作为药用, 具有养血、益

收稿日期: 2009-12-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771646)。

* 通信作者: 江晓路(1959—), 女, 山东青岛人, 理学学士, 教授, 硕导, 主要从事应用微生物方面的研究。Email: jiangxl@ouc.edu.cn

神、补肝的功效^[2],而且色泽宜人,气味芳香,味道鲜美,是一种名贵的食用菌和药用菌。贵州省生物研究所罗心毅研究员从贵州野生花脸香蘑中分离纯化该菌株,经过多年探索,用人工代料栽培成功获得子实体,2003年对子实体蛋白质,氨基酸,微量元素进行分析^[3-4]。试验表明,花脸香蘑富含8种人体必需氨基酸和多种微量元素。1996年德国学者 Xenia Mazur^[5]等用 *Lepista sordida* 菌株发酵分离出抗癌、抗菌的两种二萜骨架化合物。然而,目前对花脸香蘑的研究主要集中在液体发酵和人工栽培条件的优化及其子实体成分分析方面,对其发酵的次级代谢产物的研究却很少。

作者主要研究采自青岛崂山的一株真菌,观察其菌落和菌丝等形态,以及对 ITS 和 5.8srDNA 区域的分子系统学分析,对其进行菌种鉴定,并且对该菌株发酵产物的抗菌活性进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 菌种

LS7 菌株:由中国海洋大学应用微生物研究室从青岛崂山分离;革兰氏阳性细菌:枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌 (*Salmonella*);革兰氏阴性细菌:克雷伯氏菌 K13 (*Klebsiella* K13)、梅氏弧菌 (*Vibriometschnikovi*)、大肠杆菌 (*E. coli*);真菌:黄瓜枯萎菌 (*Fusarium oxysporum*)、辣椒炭疽菌 (*Colletotrichum capsicibutl*)、黑根霉 (*Rhizopus nigricans*)、白假丝酵母 (*Candida albicans*);以上菌种均由中国海洋大学应用微生物实验室提供。

1.2 培养基

1.2.1 LS7 菌株种子培养基 PDA 培养基。

1.2.2 LS7 菌株发酵培养基 土豆 200 g,葡萄糖 3 g/dL,酵母膏 0.6 g/dL,磷酸二氢钾 0.05 g/dL,硫酸镁 0.1 g/dL, V_{B1} 0.01 g/dL, pH 6.5, 水 1 000 mL。

1.2.3 抗菌实验培养基 细菌:牛肉膏蛋白胨培养基;真菌:PDA 培养基;弧菌:2216E 培养基。

1.3 LS7 菌株发酵培养方法

从活化的斜面上挑取约 5 mm×5 mm 大小菌块接种于发酵培养基中,250 mL 三角瓶装液 100 mL, 25℃、160 r/min 摇床培养 10 d,挑选菌丝球均匀细密的作为种子。250 mL 三角瓶装液 100 mL,接种体积分数 7%, 25℃、160 r/min 摇床培养 5 d,收集菌丝体和发酵液,菌丝体用于菌种鉴定,发酵液用于抗菌活性测定。

1.4 LS7 菌株的鉴定

1.4.1 培养菌落及菌丝特征 从斜面上取约 5 mm×5 mm 的菌块接种到 PDA 培养基上, 25℃ 培养,观察菌落形态及颜色变化。培养 10 d 后,用 OLYMPUS BX41 生物荧光显微镜观察菌丝结构。

1.4.2 LS7 菌株的 ITS 和 5.8s rDNA 区域的扩增 用 CTAB^[6]法提取菌株的基因组 DNA。选用真菌通用引物:

ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

-3')。50 μ L PCR 反应体系:10×扩增缓冲液 5 μ L、引物 A (ITS4) 1 μ L、引物 B (ITS5) 1 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L、dNTP(2 mmol/L) 5 μ L、模板 DNA 2.5 μ L,加超纯水 35.25 μ L 补足至 50 μ L。反应条件:94℃ 3min, (94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 90s) 30 个循环, 72℃ 保温 10 min。PCR 反应结束后,取 3 μ L 产物加等量的 loading buffer 于 1.5 g/dL 琼脂糖凝胶电泳上电泳,在紫外凝胶成像仪上检测 PCR 产物大小。PCR 产物送交上海博尚生物技术有限公司测序。

1.4.3 ITS 区域序列比对及进化树的构建 将得到的序列采用 CLUSTAL X 软件进行对位排列。运用分子进化遗传分析软件 MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 中 Kimura 2-Parameter Distance 参数转换成遗传距离值后用 NJ (neighbor-joining method, 邻接法) 构建 original 树,自展数据集(Bootstrap)为 1 000 次,空位或缺失位点当作配对删除处理,其中替代包括转换和颠换,选择松口蘑为外类群。

1.5 发酵产物的提取及抗菌活性测定

1.5.1 发酵产物的提取 发酵液离心去菌体,浓缩至原体积的 1/5,浓缩液中加入等量乙酸乙酯萃取,分离水相和乙酸乙酯相,水相再加入等量乙酸乙酯,反复萃取 3 遍,合并乙酸乙酯相。乙酸乙酯萃取后的水相再用正丁醇采用相同的方法萃取。将收集的有机相分别减压浓缩并蒸干,收集得固体物质即为不同有机相组分。将固体溶于 DMSO 中,配制成质量浓度为 20 mg/mL 待测溶液,备用^[7]。

1.5.2 抗菌活性测定 在培养皿中分别移入菌浓度为 10^9 cfu/mL 的供试菌悬液 0.1 mL,取已融化冷却至 45℃ 的培养基 12 mL,加入平皿立即混匀。待培养基凝固后,将直径为 6 mm 的圆形无菌双层滤纸片蘸取 20 μ L 不同组分的待测样品,放于培养基上,细菌 32℃ 培养 18~24 h,测定抑菌圈直径;真菌 28℃ 培养 24~48 h,测定抑菌圈直径^[8]。

2 结果与分析

2.1 子实体、菌落形态及菌丝特征

LS7 菌株子实体菌盖中部稍上凸,湿润时水浸状,紫色,边缘内卷,具不明显的条纹,菌肉带淡紫色,薄而脆香。菌褶淡紫色,稍稀,直生,不等长。菌柄与菌盖同色,靠近基部弯曲,内实。在 PDA 培养基上生长旺盛,菌落饱满,菌丝粗壮,分支多且密,爬壁能力强,菌丝初期为白色,后转为粉色、紫色,见图 1。在生物荧光显微镜下观察菌丝结构,菌丝宽度为 3~4 μm ,有隔,明显的锁状联合,与胡先运^[9]等研究结果基本相同。

2.2 ITS 区域序列分析

以 LS7 菌株的基因组 DNA 为模板,以真菌通用引物 ITS4、ITS5 为引物扩增,得到约 670 bp 的

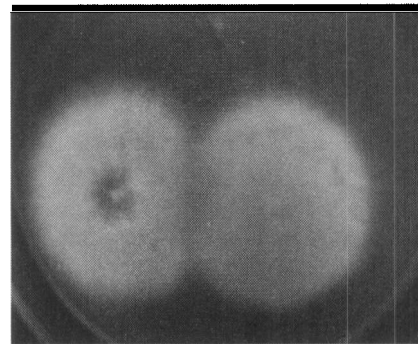


图 1 菌株 LS7 的菌落形态

Fig. 1 Colony of strain LS7

DNA 片段,在 GenBank 数据库中的登录号是 FJ428582。以松口蘑作为外类群,采用邻接法构建进化树,见图 2。从系统发育树上看,LS7 菌株与花脸香蘑构成姐妹群,处于最近的进化位置,支持率为 99%。根据子实体、菌落形态,菌丝的特征和 ITS 区域基因分析,推断 LS7 菌株为花脸香蘑 (*Lepista sordida*)。

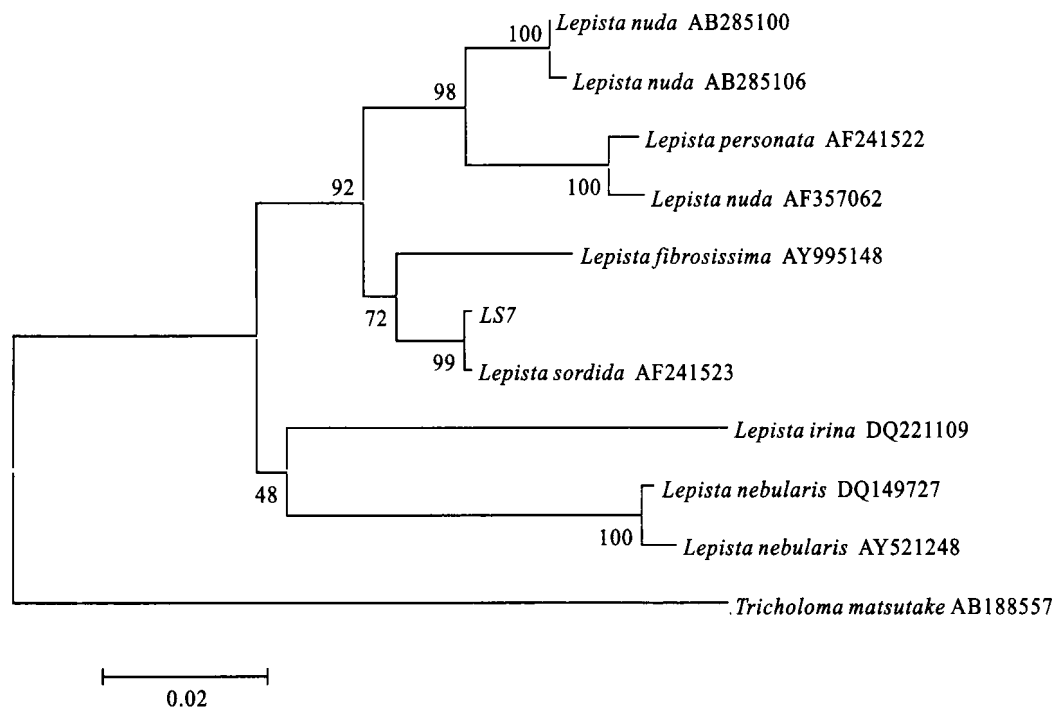


图 2 LS7 菌株与相近菌株的系统进化树图

Fig. 2 Phylogenetic relationships between strain LS7 and *Lepista*

2.3 抗菌实验结果与分析

将 LS7 菌株发酵产物,分别用有机溶剂乙酸乙酯和正丁醇萃取发酵液,得到乙酸乙酯相与正丁醇相产物。以枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、克雷伯氏菌 K13、大肠杆菌、黑根霉、白假丝酵母、黄瓜枯萎菌、辣椒炭疽菌、梅氏弧菌为供试菌,测定不同提取部分的抗菌活性,结果见表 1。

由表 1 可见,乙酸乙酯提取物对绝大多数供试菌有抑制作用,其中对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、黄瓜枯萎菌、辣椒炭疽菌和梅氏弧

菌的抑制作用非常强,抑菌圈直径均达到或高于 15 mm,其中对黄瓜枯萎菌的抑制能力最强,抑菌圈直径达到 30 mm,对白假丝酵母也有一定的抑制效果,抑菌圈直径达到 12 mm。正丁醇提取物对供试菌也有很好的抑制作用,其中对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、梅氏弧菌、黄瓜枯萎菌和辣椒炭疽菌有很好的抗菌活性,抑菌圈均达到或高于 15 mm,然而对克雷伯氏菌、白假丝酵母都没有抑制效果。无论是乙酸乙酯提取物还是正丁醇提取物对黑根霉都没有抗菌活性。由此结果分析,具有抗菌

活性的物质主要分布在乙酸乙酯部分,而正丁醇部分有少量的分布。通过对其发酵产物的抗菌活性实验,发现该菌株所产生的物质具有广泛的抗菌活性,对 G^+ 、 G^- 细菌、酵母菌和霉菌都有很好的抑制作用,尤其是对植物致病菌黄瓜枯萎菌和辣椒炭疽菌效果明显,在植物防病和抗病方面有很大的应用前景。白假丝酵母又称白色念珠菌,是一种条件致病性真菌,是艾滋病等免疫功能低下者最常见的并发症和主要死亡原因,目前治疗多采用唑类药物,耐药现象严重。作者发现花脸香蘑发酵液的乙酸乙酯提取物对白假丝酵母有很强的抑制作用,因此也为开发新型抗念珠菌药物的研究提供了一种新的资源。

表 1 不同有机溶剂萃取部位的抗菌活性		
Tab. 1 Antibiotic activity of different fractions		
菌种	抑菌圈直径/mm	
	乙酸乙酯	正丁醇
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	15	14
克雷伯氏菌 K13 <i>Klebsiella</i> K13	6	0
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	19	18
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	19	24
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	11	10
梅氏弧菌 <i>Vibriometschnikovi</i>	18	20
白假丝酵母 <i>Candida albicans</i>	12	0
黄瓜枯萎菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	30	24
辣椒炭疽菌 <i>Colletotrichum capsicibutl</i>	21	20
黑根霉 <i>Rhizopus nigricans</i>	0	0

参考文献(References):

[1] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993. 125.

[2] 谢福泉,胡七金. 野生优良食药菌花脸香蘑的研究进展[J]. 菌物研究, 2005,3(4):52—56.
XIE Fu-quan,HU Qi-jin. Advances of the study on valuable wild *Lepista sordida*[J]. **Journal of Fungal Research**, 2005,3 (4):52—56. (in Chinese)

[3]. 罗心毅,洪江,张勇民. 人工栽培花脸香蘑氨基酸研究[J]. 氨基酸与生物资源, 2003, 25(3): 14—15.
LUO Xin-yi,HONG Jiang,ZHANG Yong-min. Study on amino acids in *Lepista sordida* [J]. **Amino Acids&Biotic Resources**, 2003, 25(3): 14—15 (in Chinese)

[4] 罗心毅,洪江,张勇民. 花脸香蘑元素测定[J]. 中国食用菌, 2003, 22(4): 43—44.
LUO Xin-yi,HONG Jiang,ZHANG Yong-min. Study of trace elements in *Lepista sordida* [J]. **Edible Fungi of China**, 2003, 22(4): 43—44. (in Chinese)

[5] Mazur X, becker U , Anke T ,et al . Two new bioactive diterpenes from *Lepista sordida*[J]. **Phytochemistry**, 1996 , 43 (2) : 405—407.

[6] 吴忠兰,宋玉霞,马洪爱,等. 用改进的 CTAB 法提取肉苁蓉基因组 DNA[J]. 宁夏大学学报:自然科学版, 2008,29 (1): 78—80.
WU Zhong-lan,SONG Yu-xia, MA Hong-ai, et al. Genomic DNA isolation in cistanche deserticolaby modified CTAB method[J]. **Journal of Ningxia University:Natural Science Edition**, 2008, 29 (1): 78—80. (in Chinese)

[7] 方玉春,姜仁吉,朱天骄,等. 海绵来源真菌 *Aspergillussp* BH4 次级代谢产物的初步研究[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 627—630.
FANG Yu-chun, JIANG Ren-jie, ZHU Tian-jiao, et al. Study on the secondary metabolites of sponge-associated fungus, *Aspergillussp* BH4[J]. **Periodical of Ocean University of China**, 2006, 36(4): 627—630. (in Chinese)

[8] 李祝,朱秋劲,周礼红,等. 黑曲霉 xj 菌株发酵液的抗菌活性研究[J]. 食品与机械,2008,24(1) 100—101.
LI Zhu, ZHU Qiu-jin, ZHOU Li-hong,et al. Antibacterial activity of *Aspergillus niger* xj fermentation broth[J]. **Food & Machinery**, 2008,24(1):100—101. (in Chinese)

[9] 胡先运. 花脸香蘑田间栽培、营养评价及液体发酵特性研究[D]. 贵州:贵州师范大学,2007.

(责任编辑:李春丽)