

刺五加内生真菌CWJ01产抑菌物质发酵条件优化及成分分析

李玉国, 姜 坤, 张道志, 徐恒伟, 冯丹萍, 孟小茜, 郑春英

Fermentation Conditions Optimization and Components Analysis of Antimicrobial Substances-producing Endophytic Fungus CWJ01 from *Acanthopanax senticosus*

LI Yuguo, JIANG Kun, ZHANG Daozhi, XU Hengwei, FENG Danping, MENG Xiaoqian, and ZHENG Chunying

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110328>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

乳酸菌发酵对刺五加叶活性成分、体外抗氧化作用与降血糖相关酶的影响

Effects of Lactic Acid Bacteria Fermentation on the Active Components, Antioxidant Activity and Enzymes on Hypoglycemic Activity *in Vitro* of *Acanthopanax senticosus* Leaves

食品工业科技. 2022, 43(7): 155-162 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080265>

一株酸面团源乳酸菌的益生特性及其对刺五加叶总皂苷的影响

The Probiotic Properties of a Strain of Sourdough-derived Lactic Acid Bacteria and Its Effect on the Total Saponins of *Acanthopanax senticosus* Leaves

食品工业科技. 2021, 42(14): 121-126 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120035>

刺五加的化学成分及药理活性研究进展

Research Progress on Chemical Constituents and Pharmacological Activities of *Acanthopanax senticosus*

食品工业科技. 2019, 40(23): 353-360 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.058>

一株丹参种子内生真菌ZJZD-3的分离鉴定及其生物活性

Isolation, Identification and Biological Activity of an Endophytic Fungus Strain ZJZD-3 from *Salvia miltiorrhiza* Seed

食品工业科技. 2020, 41(4): 67-73 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.013>

刺五加化学成分药动学特性及其体内代谢过程研究进展

Research Progress on the Pharmacokinetics of *Acanthopanax senticosus* Harms Chemical Constituents and Its Metabolism *in Vivo*

食品工业科技. 2020, 41(16): 334-339, 345 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.053>

雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性及稳定性研究

Study on Antimicrobial Activity and Stability of Endophytic Fungus *Apiospora malaysiana* from *Thamnia subuliformis* *in Vitro*

食品工业科技. 2023, 44(21): 146-153 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023010047>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

李玉国, 姜坤, 张道志, 等. 刺五加内生真菌 CWJ01 产抑菌物质发酵条件优化及成分分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(17): 209–220. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110328

LI Yuguo, JIANG Kun, ZHANG Daozhi, et al. Fermentation Conditions Optimization and Components Analysis of Antimicrobial Substances-producing Endophytic Fungus CWJ01 from *Acanthopanax senticosus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(17): 209–220. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110328

· 工艺技术 ·

刺五加内生真菌 CWJ01 产抑菌物质发酵条件优化及成分分析

李玉国¹, 姜坤¹, 张道志¹, 徐恒伟¹, 冯丹萍¹, 孟小茜¹, 郑春英^{2,*}

(1. 黑龙江省方正林业局有限公司, 黑龙江哈尔滨 150822;

2. 黑龙江大学, 生命科学学院, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江省寒区植物基因与生物发酵重点实验室, 黑龙江省普通高校微生物重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080)

摘要: 从刺五加叶中分离得到一株具有较好抑菌活性的内生真菌 CWJ01, 为提高该菌株发酵液抑菌活性, 并探究其抑菌活性物质基础, 在单因素实验的基础上, 结合抑菌活性进行正交试验优化刺五加内生真菌 CWJ01 的发酵条件, 并采用柱色谱法对其含有的次生代谢产物进行分离, 结合形态学及 ITS 序列分析法, 对内生真菌 CWJ01 进行菌种鉴定。结果表明, CWJ01 的最适发酵工艺条件: 以 PDB 为基础培养基, 以 2% 葡萄糖为碳源, 以 1% 蛋白胨为氮源, 培养基初始 pH 为 7.0, 培养基装液量为 60%, 菌株接种量为 5%, 空气浴振荡器转速为 140 r/min, 温度为 28 °C, 连续培养 15 d; 在最适发酵条件下, CWJ01 发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径可达 27.48±0.17 mm; 从内生真菌 CWJ01 发酵液中分离得到反式肉桂酸及苯甲酸, 并且内生真菌 CWJ01 经鉴定为波兰青霉 (*Penicillium polonicum*)。本研究可为深入挖掘药用植物内生菌抗菌活性物质提供参考。

关键词: 刺五加, 内生真菌, 抑菌活性, 发酵条件, 菌种鉴定, 次生代谢产物

中图分类号: TS201.2; R932 文献标识码: B 文章编号: 1002-0306(2024)17-0209-12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110328



本文网刊:

Fermentation Conditions Optimization and Components Analysis of Antimicrobial Substances-producing Endophytic Fungus CWJ01 from *Acanthopanax senticosus*

LI Yuguo¹, JIANG Kun¹, ZHANG Daozhi¹, XU Hengwei¹, FENG Danping¹, MENG Xiaoqian¹, ZHENG Chunying^{2,*}

(1. Heilongjiang Fangzheng Forestry Bureau Co., Ltd., Harbin 150822, China;

2. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education & Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Plant Genetic Engineering and Biological Fermentation Engineering for Cold Region & Key Laboratory of Microbiology, College of Heilongjiang Province & School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: An endophytic fungus CWJ01 with good antibacterial activity was isolated from the leaves of *Acanthopanax senticosus*. In order to improve the antibacterial activity of the fermentation broth of this strain and explore the substance basis of its antibacterial activity, the fermentation conditions of the endophytic fungus CWJ01 were optimized by orthogonal experiment according the antibacterial activity on the basis of single factor experiments. The secondary metabolites contained in the endophytic fungus CWJ01 were separated by column chromatography. The strains of the

收稿日期: 2023-11-30

基金项目: 中国龙江森林工业集团补助科技项目“道地药食刺五加深加工技术研究”(2022001)。

作者简介: 李玉国 (1975-), 男, 硕士, 教授级高级政工师, 研究方向: 食品和药物生物活性挖掘与研发, E-mail: 1094907852@qq.com。

* 通信作者: 郑春英 (1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品和药物生物活性挖掘与研发, E-mail: zhengchunying68@163.com。

endophytic fungus CWJ01 were identified by morphology and ITS sequence analysis. The results showed that the optimum fermentation conditions of CWJ01 were as follows: PDB as the base medium, 2% glucose as the carbon source, 1% peptone as the nitrogen source. The initial pH of the medium was 7.0, the liquid content of the medium was 60%, the inoculated strain was 5%, the rotating speed was 140 r/min, the temperature was 28 °C, and the culture time was 15 days. Under the optimal process conditions, the diameter of inhibition zone of CWJ01 fermentation broth against *Staphylococcus aureus* was 27.48 ± 0.17 mm. Trans-cinnamic acid and benzoic acid were isolated from the fermentation broth of endogenous fungus CWJ01, and the endophytic fungus CWJ01 was identified as *Penicillium polonicum*. This study can provide reference for further exploration of antibacterial active substances of endophytes.

Key words: *Acanthopanax senticosus*; endophytic fungus; bacteriostatic activity; fermentation condition; strain identification; secondary metabolites

刺五加为五加科植物刺五加(*Acanthopanax senticosus*(Rupr. et Maxim.)Harms)的干燥根、根茎或茎^[1],含有多糖苷类成分^[2]、黄酮类成分^[3]、香豆素^[4]、多糖^[5]等,具有抗肿瘤^[6]、抗抑郁^[7]、镇静安神^[8]、抗辐射^[9]、调节免疫功能^[10]、降血糖^[11]等多种活性,现广泛应用于食品、药品等领域^[12-13]。刺五加需求量逐年上涨,由于森林面积逐渐减少以及盲目的采挖,导致刺五加成为国家二级濒危物种,三级重点保护品种^[14]。尽管栽培种植在某种程度上能缓解刺五加原料供应不足的问题,但刺五加的生长周期为3~4年,且栽培种植过程中还存在种质资源变异等问题^[15]。因此,采用各种生物技术生产刺五加次生代谢产物原料是目前研究的热点。

内生菌为生长于健康宿主植物组织内部,且不引起宿主植物病变的一类微生物菌群^[16]。内生菌与宿主植物之间协同进化,参与宿主植物体内次生代谢产物的生物转化并诱导次生代谢产物的产生^[17],因此,系统研究刺五加内生菌,从刺五加内生菌中筛选具有较好生物活性的目的菌株,并对目的菌株次生代谢产物进行系统性研究具有一定的必要性。尽管已有很多关于刺五加内生菌研究方面的相关报道,但这些研究大多仅限于对刺五加内生菌的分离鉴定工作,而关于刺五加内生菌次生代谢产物系统分离工作的研究却未见报道。本文以分离自健康刺五加叶片的内生真菌 CWJ01 为研究对象,对其发酵液进行抑菌活性分析,并在此基础上系统研究其抑菌活性物质基础,为刺五加内生菌资源开发及研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验菌株刺五加内生真菌 CWJ01 分离自健康刺五加叶,采集地点黑龙江省方正林业局(经度 129.533056,纬度 45.791111,海拔 280.5 m);PDB、NA 培养基 配制方法同文献[18-19];10 受试菌株见表 1 购于黑龙江省微生物研究所;引物设计 委托上海生工生物工程股份有限公司合成的 ITS 通用引物;甲醇、石油醚、乙酸乙酯 天津市富宇精细化工有限公司;氘代氯仿(CDCl_3)、氘代甲醇(MeOD) 济南迈纳科技有限公司;链霉素 河北远征药业有限公司;制霉素 佛山市海正药业有限公司;DNA

抽提试剂盒 生工生物工程(上海)有限公司。

FL2000 高效液相色谱仪(配紫外检测器) 浙江温岭福立分析仪器有限公司;色谱柱: Venusil XBP- C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) Agela Technologies Inc. USA; SZX 超净工作台 南通科学仪器有限公司;HZQ-C 空气浴振荡器 哈尔滨东联电子技术开发有限公司;KQ-100DE 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;Waters Xevo TQ-S micro 型三重四极杆串联质谱仪 沃特世科技(上海)有限公司(Waters);400MH 固体超导核磁共振波谱 AVANCE III 美国 Thermo Fisher 公司。

表 1 实验用受试菌

Table 1 Test strains required for the experiments

分类	名称
细菌	A金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)
	B鲍曼不动杆菌(<i>Acinetobacter baumannii</i>)
	C大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)
	D屎肠球菌(<i>Enterococcus faecium</i>)
	E短小芽孢杆菌(<i>Bacillus pumilus</i>)
	F枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)
	G铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	H肺炎克雷伯菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
	I单增李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)
	J白假丝酵母(<i>Candida albicans</i>)
真菌	

1.2 实验方法

1.2.1 刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液制备及抑菌活性分析 参阅文献[20],制备 1×10^7 CFU/mL 的刺五加内生真菌 CWJ01 种子液。以含 2% 葡萄糖及 2% 蛋白胨的 PDB 为培养基,培养基初始 pH 自然,按装液量为 50%(v/v)分装于锥形瓶中。从 50 mL 种子液中,精密吸取 5%(v/v)菌悬液,接种于上述液体培养基中,空气浴振荡器培养条件为 28 °C 120 r/min,连续培养 14 d,培养完成后进行抽滤,将菌丝体滤出,得发酵液,冷冻干燥。取适量冻干粉,加甲醇配制成 500 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液。取供试品溶液、阳性对照溶液(100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 制霉素),空白对照溶液(甲醇),参阅文献[21],采用琼脂扩散法检测刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液抗菌活性,采用游标卡尺测量其抑菌圈直径。

1.2.2 刺五加内生真菌 CWJ01 产抑菌物质发酵工艺的优化

1.2.2.1 单因素实验 在初始 pH 为 7.0 的 PDB 液体培养基中, 选取葡萄糖、麦芽糖、蔗糖作为碳源, 浓度分别为 0%、1%、2%、5%、10%(m/v), 取 1.2.1 中的种子液, 按 5% 的接种量, 转接于装液量 50% 的上述培养基中, 其他发酵操作同 1.2.1, 观察抑菌活性。比较不同浓度的碳源培养基对菌株发酵的影响。

在初始 pH 为 7.0 的 PDB 液体培养基中, 选取牛肉膏、蛋白胨、酵母膏作为氮源, 浓度分别为 0%、0.5%、1%、2%、5%(v/v), 接种量、装液量及发酵操作同 1.2.1, 观察抑菌活性。比较不同浓度的氮源培养基对菌株发酵的影响。

在 1.2.1 实验基础上, 分别探究接种量、装液量、初始 pH、转速、温度、发酵时间对抑菌活性的影响。其中接种量分别为: 3%、4%、5%、6%、7%、8%(v/v); 装液量为 20%、30%、40%、50%、60%、70%(v/v); 初始 pH 为 4、5、6、7、8、9; 空气浴振荡器转速分别为: 100、120、140、160、180、200 r/min; 设定发酵温度分别为: 22、24、26、28、30、32 ℃; 发酵时间分别为: 7、9、11、13、15、17 d, 检测发酵液的抑菌活性。

1.2.2.2 正交试验 在单因素实验的基础上, 得出最佳单因素实验条件, 在 4 个单因素变化的拐点附近, 选取 3 个水平进行实验, 分析碳源浓度(%)、接种量(v/v)、装液量(v/v)、发酵时间(d)四个因素在发酵过程中对刺五加内生真菌 CWJ01 抑菌活性的影响。以抑菌活性为指标, 设计正交试验, 优化发酵条件^[22-23]。正交试验设计见表 2。

表 2 正交试验因素水平
Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	A 碳源浓度(%)	B 接种量(%)	C 装液量(%)	D 发酵时间(d)
1	1	4	40	13
2	2	5	50	15
3	5	6	60	17

1.2.3 刺五加内生真菌 CWJ01 抑菌物质分离 取内生真菌 CWJ01 发酵液, 乙醚萃取 3 次(3×100 mL), 合并萃取液, 回收溶剂, 得乙醚萃取部位, 将乙醚萃取部位通过硅胶柱分离, 以石油醚: 乙酸乙酯(15:5)为洗脱液, 收集洗脱液(10 mL/组分), 以石油醚: 乙酸乙酯(15:5)为展开剂进行薄层层析(TLC)检识后, 合并 20~50 号组分, 回收溶剂后, 再次进行硅胶柱分离, 以石油醚: 乙酸乙酯(15:10)为洗脱液, 收集洗脱液(5 mL/组分), 以石油醚: 乙酸乙酯(15:10)为展开剂进行 TLC 检识后, 合并 78~85 号组分, 得到的粗结晶于 4 ℃ 冷藏 48 h 后, 得到晶体 A; 继续收集 120~130 号组分, 得到粗结晶混合物, 将此粗结晶混合物以石油醚: 乙酸乙酯(15:15)为洗脱液进行硅胶柱(柱内径 22 mm, 柱长 300 mm)纯化, 收集洗脱液

(5 mL/组分), 以石油醚: 乙酸乙酯(15:15)为展开剂进行 TLC 检识后, 合并 50~58 号组分, 回收溶剂后于 4 ℃ 冷藏 24 h, 析出晶体 B, 晶体 A 和 B 的抑菌活性分析同 1.2.1。

1.2.4 刺五加内生真菌 CWJ01 抑菌物质结构鉴定

采用 HPLC 法, 分别以 a. 甲醇: 水: 甲酸(60:40:0.5), 检测波长 254 nm; b. 乙腈: 水: 甲酸(65:34:1), 检测波长 260 nm 为流动相(流速: 1 mL·min⁻¹); 色谱柱: Global Chromatography-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 25 ℃; 进样量: 10 μL; 洗脱时间: 60 min, 对所分离得到的晶体 A 及 B(0.5 mg/mL)进行纯度测定并采用质联(MS)电喷雾电离(ESI)对晶体 A 和晶体 B 进行正、负离子扫描^[24]; 同时根据晶体 A 及 B 的理化性质分别采用 CDCl₃ 及 MeOD 溶解后(0.1 mg/mL)进行核磁共振(¹H-NMR 及 ¹³C-NMR)鉴定^[25]。

1.2.5 刺五加内生真菌 CWJ01 的鉴定 采用形态学观察及分子生物学鉴定(ITS 序列分析)法^[24-25], 对刺五加内生真菌 CWJ01 菌株进行鉴定。

1.2.5.1 刺五加内生真菌 CWJ01 菌株形态学初步鉴定 对刺五加内生真菌 CWJ01 进行菌株形态观察、光学显微镜和扫描电子显微镜观察, 观察菌株菌落在培养基的长势特征及正反面颜色, 在显微形态下观察菌株的孢子和孢子梗形态, 并且比照文献《真菌分类学》^[26]《真菌鉴定手册》^[27], 对该菌做形态学初步分类。

1.2.5.2 刺五加内生真菌 CWJ01 菌株分子生物学鉴定

a. 刺五加内生真菌 CWJ01 基因组 DNA 的提取: 用上海生物工程有限公司 Ezup 柱式真菌的基因组抽提试剂盒对 CWJ01 菌株的基因组 DNA 进行提取, 步骤为: 菌株活化: 将 CWJ01 菌株接种于 PDA 培养基上, 28 ℃, 培养 3 d, 备用。菌丝体的制备: 活化后的 CWJ01 菌种转接于马铃薯液体培养基, 于 28 ℃, 140 r/min 摇床培养 3 d, 取出, 抽滤, 所得的菌体分别用 25% 乙醇和灭菌 ddH₂O 先后处理 2 次, 离心, 弃上清, 冷冻干燥, 置于 4 ℃ 保藏。50 mg CWJ01 菌体, 与适量液氮混合, 并迅速研磨使其完全呈粉末, 将菌粉置于灭菌的 tube 管中, 依次添加 65 ℃ 的 FPCB Solution 700 μL 和 β-巯基乙醇 7 μL 充分振荡使其混合均匀, 60 ℃ 水浴 25 min。室温放置 10 min, 加入苯酚: 氯仿: 异丙醇(25:24:1)混合溶液 700 μL, 轻摇 10 次, 于 4 ℃ 12000 r/min 离心 5 min。将上清转移至 2 mL 事先灭菌的 tube 管中, 小心添加 700 μL 氯仿摇匀, 于 5 ℃ 12000 r/min 离心 4 min。上清液添加 40 μL RNase A(20 mg/mL), 充分混匀, 于室温放置 8 min 后, 分别依次加入一半体积 BD Buffer 试剂, 充分振荡使其混匀。将上一步中混合物移至吸附柱内, 静置 2 min, 10000 r/min 离心 1 min, 弃去管中液体。将吸附柱放回收集管中,

加入 500 μL PW Solution, 10000 r/min 离心 1 min, 弃去废液。再将吸附柱放回收集管中, 加入 500 μL Wash Solution, 10000 r/min 离心 1 min, 弃废液, 10000 r/min 再次离心 3 min。最后将吸附柱转移至无菌 tube 内, 添加 50 μL 60 $^{\circ}\text{C}$ 的 Elution Buffer 试剂, 室温下放置 3~5 min, 调节转速 10000 r/min 离心 2 min 后, 获得 CWJ01 菌株的 DNA 溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏。

b. 目的片段的 PCR 扩增: 采用真菌通用引物扩增 ITS rDNA 片段, 引物是由上海生物工程有限公司合成的真菌 ITS rDNA 序列通用引物 ITS1、ITS4, 其序列如下所示: 正向引物 ITS1: (5'-TCCG TAGG-TGAACCTGCGG-3'); 反向引物 ITS4: (5'-TCCT-CCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系见表 3, 反应程序见表 4。

表 3 PCR 反应体系
Table 3 Components of PCR reaction

试剂	体积(μL)
Template(基因组DNA 20~50 ng/ μL)	0.5
10 \times Buffer(with Mg^{2+})	2.5
dNTP(各 2.5 mmol/L)	1.0
酶	0.2
F(10 Um)	0.5
R(10 Um)	0.5
加dd H_2O 至	25

表 4 PCR 循环条件
Table 4 Amplification procedure of PCR

温度($^{\circ}\text{C}$)	时间	程序
94	4 min	预变性
94	45 s	30 cycle
55	45 s	
72	1 min	
72	10 min	修复延伸
4	∞	终止反应

PCR 产物检测: 扩增产物用凝胶电泳(含 1% 的琼脂糖)检测, 利用 UVP 凝胶成像系统采集, 并分析扩增图谱, 150 V、100 mA、20 min 电泳观察。

c. 纯化回收 PCR 产物: 回收电泳检测出的 CWJ01 菌株的 DNA 目的片段, 其反应程序如下: 切割目的产物, 称重后再加入 5 倍的 Buffer B2,

于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴 8 min。调节转速 8000 r/min 离心 40 s。倒掉收集管中液体。加入 500 μL Wash Solution, $9000\times g$ 离心 30 s, 倒掉收集管中液体。重复上述步骤一次。空吸附柱于 $9000\times g$ 离心 1 min。吸附柱置于无菌 tube 内, 小心添加 30 μL Elution Buffer, 放置 2 min, 再次离心 1 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存含有 DNA 的溶液。

d. 测序: 将获得的目的 DNA 片段送至上海生工生物工程有限公司进行 CWJ01 菌株的后续测序。

e. 系统进化分析: 将 CWJ01 菌种的 ITS rDNA 核苷酸序列上传至 NCBI 数据库, 在 GenBank 中与其他已知序列进行比对, 然后通过 MEGA5.0 软件构建刺五加内生真菌 CWJ01 菌株的系统发育树, 分析其亲缘关系和进化过程, 从而进一步确定菌株的科属。

1.3 数据处理

上述实验均重复 3 次, 使用 Origin Lab 进行数据分析, 采用 SPSS 25 进行单因素方差分析(ANOVA)及相关性性分析; 采用 IBM SPSS Statistics 26 对数据结果进行正交设计及分析。

2 结果与分析

2.1 刺五加内生真菌 CWJ01 抑菌活性分析

刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液对 10 种受试菌均表现出不同程度的抑制作用, 具体抑菌活性结果见表 5。

结果表明, 目的菌株发酵液对上述 10 种致病菌均有抑制作用, 但在此抑菌浓度下, 其抑菌活性弱于阳性对照品溶液(链霉素), 后续可通过提高抑菌浓度的方式增强其抑菌活性。此外, 通过抑菌活性分析可以看出, 刺五加内生真菌 CWJ01 对金黄色葡萄球菌抑制作用最为明显, 其抑菌活性与阳性对照品溶液相近, 抑菌圈直径达到了 $20.16\pm 0.07\text{ mm}$, 因此选取金黄色葡萄球菌作为指示菌筛选刺五加内生真菌 CWJ01 的发酵工艺条件。

2.2 发酵工艺的优化

2.2.1 单因素实验结果

2.2.1.1 培养基碳源及其含量对发酵工艺的影响
采用含有不同质量浓度碳源的培养基对刺五加内生真菌 CWJ01 进行培养, 随后进行抑菌活性测定, 结果见图 1。

表 5 内生真菌 CWJ01 发酵液的抑菌作用($n=3$)

Table 5 Antimicrobial activities of fermentation broth of endophytic fungi CWJ01 ($n=3$)

样品	抑菌圈直径(mm)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
CWJ01发酵液	20.16 \pm 0.07	17.28 \pm 0.25	19.70 \pm 0.33	12.93 \pm 0.63	16.00 \pm 0.15	15.83 \pm 0.59	13.74 \pm 0.47	15.66 \pm 0.76	12.63 \pm 0.05	10.21 \pm 0.55
空白对照(甲醇)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阳性对照(链霉素)	20.82 \pm 0.25	26.12 \pm 0.23	28.19 \pm 0.27	24.00 \pm 0.08	20.55 \pm 0.66	26.21 \pm 0.11	28.07 \pm 0.46	26.66 \pm 0.41	23.21 \pm 0.33	-
阳性对照(制霉素)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.00 \pm 0.39

注: 受试菌A~J名称见表1; -无抑菌活性; 表8同。

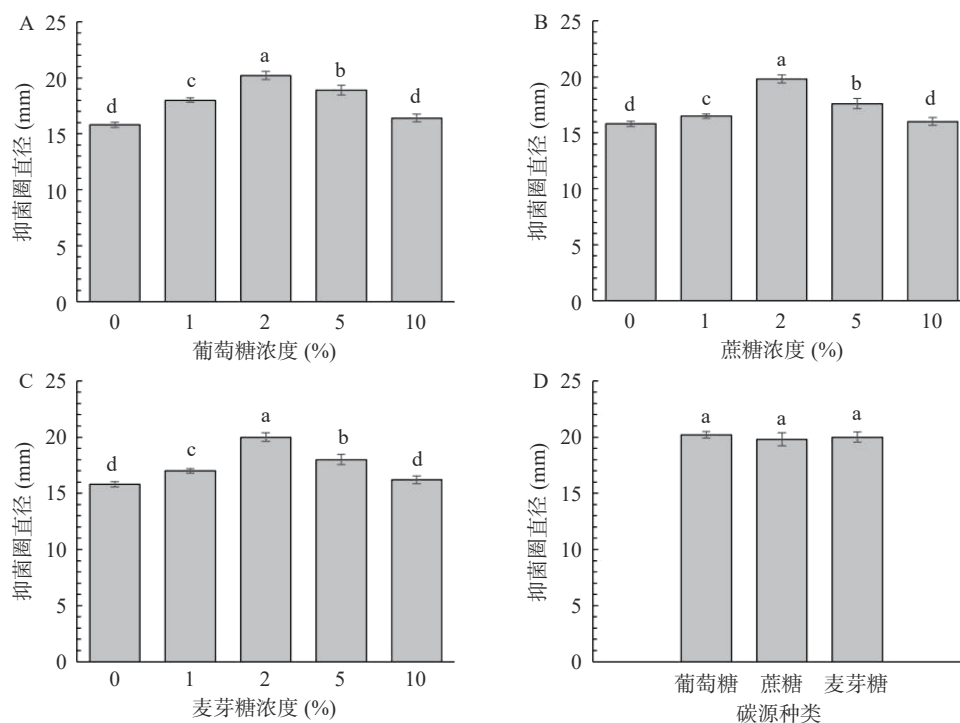


图 1 碳源及其含量对 CWJ01 发酵液抑菌活性的影响

Fig.1 Effect of carbon source and its content on antibacterial activity of CWJ01 fermentation broth

注: D: 当质量浓度为 2% 时, 3 种碳源对 CWJ01 发酵液抑菌活性的影响; 图中不同小写字母表示抑菌活性存在显著差异 ($P < 0.05$), 图 2 同。

由图 1 可知, 当培养基中含有不同质量浓度的碳源时, 对 CWJ01 发酵液的抑菌活性存在显著差异 ($P < 0.05$), 当 3 种培养基中碳源质量浓度低于 2% 时, 均不能满足菌株 CWJ01 的正常生长发育及代谢; 而当碳源浓度高于 2% 时, 高浓度的碳源可能使菌株 CWJ01 生长过快, 多种次生代谢产物快速积累, 以致使其抑菌活性次生代谢产物浓度被稀释, 从而使其抑菌活性出现降低的趋势^[18]。此外, 当 3 种培养基中碳源质量浓度为 2% 时, CWJ01 发酵液的抑菌活性较强, 尤其是当培养基中碳源为 2% 葡萄糖时, 其抑菌活性最强。因此选择葡萄糖为最优碳源。

2.2.1.2 培养基氮源及其含量对发酵工艺的影响

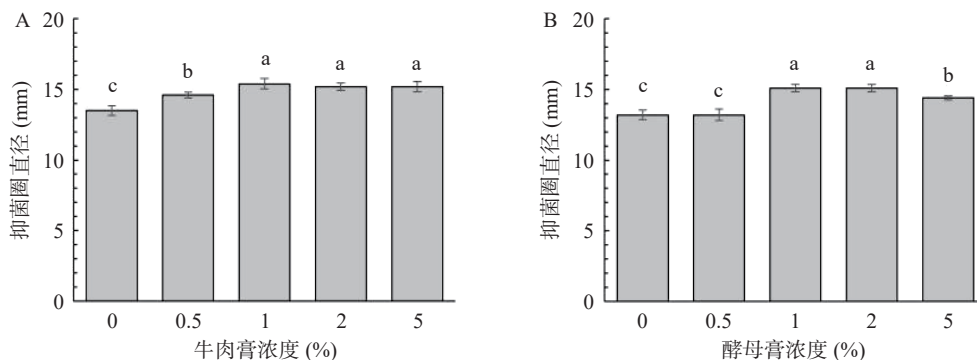
采用含有不同质量浓度氮源的培养基对刺五加内生真菌 CWJ01 进行培养, 随后进行抑菌活性测定, 结果见图 2。

由图 2 可以看出, 当培养基中不含氮源(氮源质量浓度 0%)及含有 0.5%、1% 的氮源时, 对 CWJ01

发酵液的抑菌活性存在一定影响, 这可能是由于当培养基中氮源质量浓度低于 1% 时, 菌株 CWJ01 生长发育会出现缓慢现象, 从而使其抑菌活性次生代谢产物合成减少; 而当培养基中含有 1%、2%、5% 的氮源时, 对 CWJ01 发酵液的抑菌活性基本无影响。此外, 当 3 种培养基中氮源质量浓度为 1% 时, CWJ01 发酵液的抑菌活性较强, 尤其是当培养基中氮源为 1% 蛋白胨时, 其抑菌活性最强。因为氮源影响较小, 根据上述实验结果确定选择 1% 蛋白胨为氮源。

2.2.1.3 菌株接种量对发酵工艺的影响 菌株接种量过大或者过小均会对刺五加内生真菌 CWJ01 的发酵产生影响, 不同菌株接种量下其抑菌活性结果如图 3 所示。

结果表明, 随着菌株接种量从 3% 增加到 8%, 刺五加内生真菌 CWJ01 的抑菌活性呈现先增强后减弱的趋势。上述结果说明, 接种量持续增加并不能使其抑菌活性持续增强, 反而因单位容积内菌种浓度



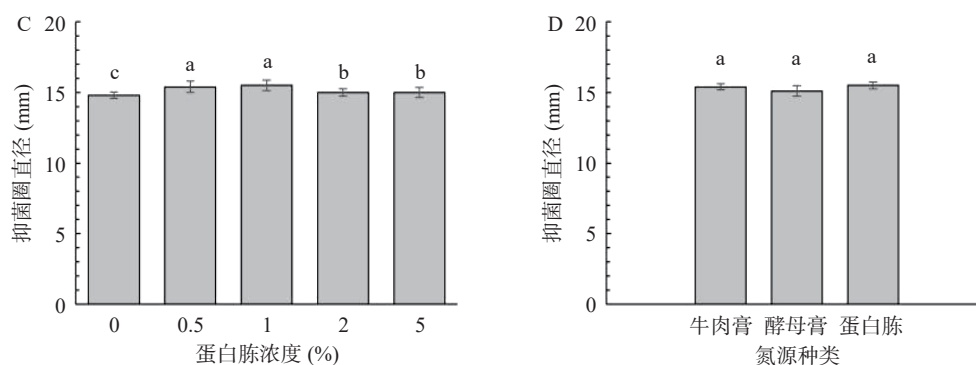


图2 氮源及其含量对 CWJ01 发酵液抑菌活性的影响

Fig.2 Effect of nitrogen source and its content on antibacterial activity of CWJ01 fermentation broth

注: D: 当质量浓度为 1% 时, 3 种氮源对 CWJ01 发酵液抑菌活性的影响。

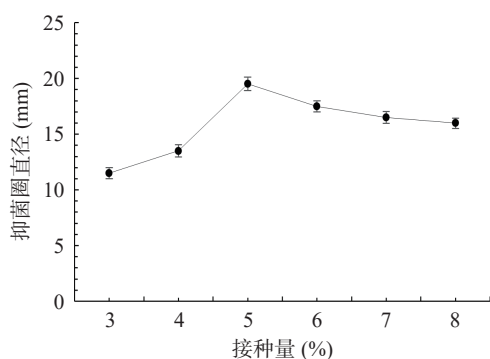


图3 不同菌株接种量对刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液抑菌活性影响

Fig.3 Antibacterial activities of CWJ01 fermentation broth at different inoculation quantities

过大使培养基中营养物质过度消耗而阻碍了其生长发育, 从而使其次生代谢产物合成缓慢, 进而影响了其抑菌活性^[28]。

2.2.1.4 培养基装液量对发酵工艺的影响 分别测定不同的装液量(v/v)对刺五加内生真菌 CWJ01 抑菌活性的影响, 结果如图 4。

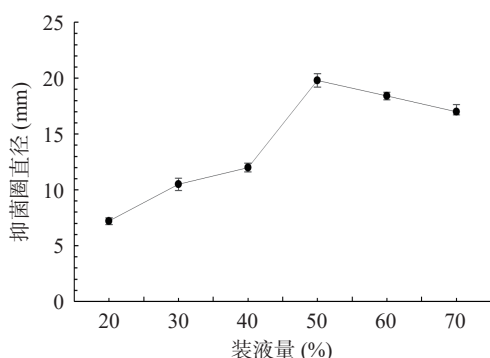


图4 培养基装液量对刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液抑菌活性的影响

Fig.4 Antibacterial activities of CWJ01 fermentation broth at different fermentation volumes

结果表明, 装液量会直接影响刺五加内生真菌 CWJ01 的生长发育, 培养基装液量既不可以过低, 也不可以过多, 装液量为 50% 时, CWJ01 抑菌活性最强。培养基装液量过低, 意味着其营养物质达不到菌

株正常生长发育的需求; 装液量过高, 则会稀释菌株的次生代谢产物浓度, 从而出现其抑菌活性减弱的现象^[29]。

2.2.1.5 培养基初始 pH 对发酵工艺的影响 分别采用不同初始 pH 的培养基对刺五加内生真菌 CWJ01 进行培养, 培养后测定其抑菌活性, 结果见图 5。

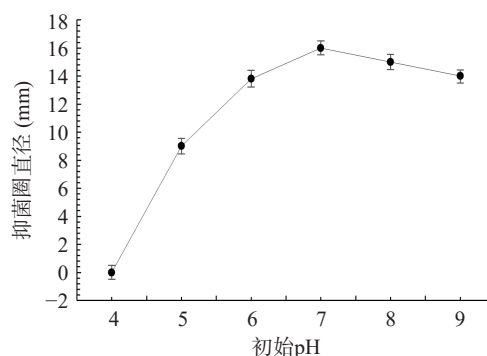


图5 培养基初始 pH 对刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液抑菌活性影响

Fig.5 Antibacterial activities of CWJ01 fermentation broth at different initial pH

结果表明, 初始 pH 能影响发酵液的黏度, 并对次生代谢产物的稳定性也产生影响, 当 pH 为 4.0 时, 抑菌活性较低, 可能是因为发酵液酸度过强, 影响了菌体生长, 导致抗菌活性物质产生较少, 当初始 pH 从 5.0 上升至 7.0 时, 其抑菌效果也随之增加, 并且当初始 pH 达到 7.0 时, 其活性最强, 随后, 随着初始 pH 的继续增大, 活性作用逐渐降低, 原因可能是发酵液碱性过大, 影响菌体生长导致抗菌物质产生受到抑制。因此, 确定最佳初始 pH 为 7.0。上述结果证明, 培养基的初始 pH 对目的菌株抑菌活性有显著影响。因菌株生长过程中能够分泌代谢产物主动调节 pH, 故以初始 pH 为 7 进行后续实验。

2.2.1.6 空气浴振荡器转速对发酵工艺的影响 分别设置空气浴振荡器不同的转速, 观察转速对刺五加内生真菌 CWJ01 抑菌活性的影响, 结果见图 6。

结果表明, 空气浴振荡器转速能够影响刺五加内生真菌 CWJ01 的抑菌活性。仪器转动过程中能

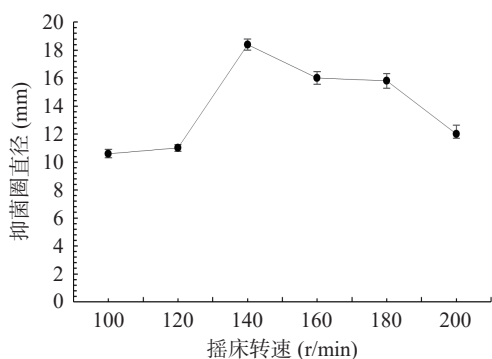


图 6 不同转速对刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液抑菌活性的影响

Fig.6 Antibacterial activities of CWJ01 fermentation broth at different speeds of shaking speed

够将刺五加内生真菌 CWJ01 与培养基充分接触,保证其在生长发育过程中接触到新鲜的营养物质。然而转速过高,将产生较大的摩擦力,容易导致菌株变形或死亡^[30]。上述结果表明,空气浴振荡器转速为 140 r/min 时,发酵液的抑菌活性最强。因空气浴振荡器的转速增加过程中会间接导致温度变化,故以 140 r/min 为最终条件进行后续实验研究。

2.2.1.7 空气浴振荡器振荡温度设置对发酵工艺的影响 分别设置不同的空气浴振荡器温度进行目的菌株发酵,筛选刺五加内生真菌 CWJ01 的最适生长温度,结果见图 7。

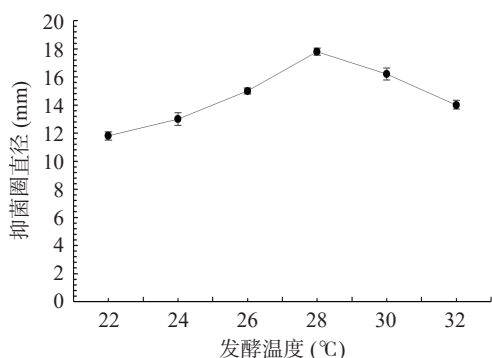


图 7 发酵温度对刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液抑菌活性影响

Fig.7 Antibacterial activities of CWJ01 fermentation broth at different fermentation temperatures

结果表明,温度对刺五加内生真菌 CWJ01 的生长发育有较明显的影响,刺五加内生真菌 CWJ01 的最适发酵温度为 28 °C。当温度低于 28 °C,其酶活性未被完全激活,从而使其次生代谢产物的合成缓慢;而当温度高于 28 °C,其酶的活性也可能被抑制,从而使其次生代谢产物合成较少,进而使抑菌活性降低^[31]。

2.2.1.8 发酵时间对发酵工艺的影响 分别对刺五加内生真菌 CWJ01 进行不同时间的发酵,不同发酵时间下目的菌株抑菌活性结果见图 8。

结果表明,在 7~15 d,刺五加内生真菌 CWJ01

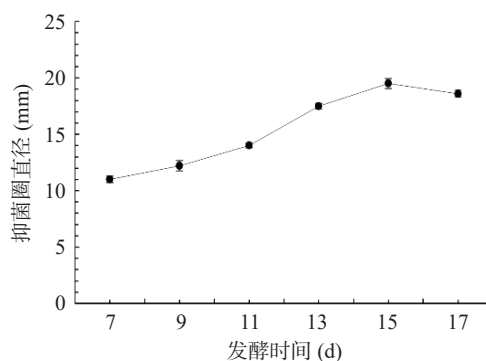


图 8 发酵时间对刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液抑菌活性影响

Fig.8 Antibacterial activities of CWJ01 fermentation broth at different fermentation time

的抑菌活性随着发酵时间的增长而增强,但随着发酵时间超过 15 d 后,菌株可能进入衰老期,其抑菌活性开始减弱,因此,发酵时间 15 d 是该单因素实验的拐点,此时抑菌效果最好,当不足或超过 15 d 后,抑菌效果均下降。

2.2.2 正交试验结果 正交试验及方差分析结果见表 6、表 7。通过极差分析及方差分析(见表 6 及表 7)可知,对刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液抑菌能力影响较大的四个因素顺序为 C>B>A>D,以抑菌活性为指标,刺五加内生真菌 CWJ01 最优发酵组合为: A₂B₂C₃D₂,即培养基中以 2% 葡萄糖为碳源,5% (v/v)菌种接种量,60%(v/v)的培养基装液量,发酵时间为 15 d。综合考虑发酵过程中各因素的影响,最终确定刺五加内生真菌 CWJ01 的最佳发酵工艺为:基础培养基为 PDB,其中碳源为 2% 葡萄糖;氮源为 1% 蛋白胨;培养基初始 pH 为 7.0;培养基装液量为 60%(v/v);菌株接种量为 5%(v/v);将已接种的刺五加内生真菌 CWJ01 置于空气浴振荡器,仪器参数设置为:振动频率(转速)140 r/min;温度设置 28 °C;连续培养 15 d。

表 6 正交试验结果

Table 6 Results of orthogonal experiment

试验号	因素				抑菌圈直径 (mm)
	A(碳源浓度)	B(接种量)	C(装液量)	D(发酵时间)	
1	1	1	1	1	19.20±0.21
2	1	2	2	2	27.31±0.35
3	1	3	3	3	25.72±0.30
4	2	1	2	3	22.40±0.72
5	2	2	3	1	26.60±0.01
6	2	3	1	2	24.00±0.21
7	3	1	3	2	23.31±0.22
8	3	2	1	3	20.32±0.46
9	3	3	2	1	23.00±0.35
K ₁	72.23	64.91	63.52	68.80	
K ₂	73.00	74.23	72.71	74.62	ΣY=211.86
K ₃	66.63	72.72	75.63	68.44	CT=4987.18
R	2.123	3.107	4.037	2.060	
S	8.063	16.69	26.63	8.026	

注:ΣY表示组别1~9抑菌圈直径之和;CT=(ΣY²)/9。

表 7 方差分析结果

Table 7 Results of variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	8.063	2	4.032	806.4	**
B	16.69	2	8.345	1669	**
C	26.63	2	13.315	2663	**
D	8.026	2	4.013	802.6	**
误差	0.01	2	0.005		

注: ** $P<0.01$, 表示差异极显著。

为了验证所筛选发酵工艺参数的合理性, 采用上述最佳发酵工艺制备刺五加内生真菌 CWJ01 的发酵液后对其进行抑菌实验, 结果表明, 经优化后的发酵条件制备的刺五加内生真菌 CWJ01 的发酵液抑菌活性可达 27.48 ± 0.17 mm, 而采用 1.2.1 方法制备的刺五加内生真菌 CWJ01 的发酵液抑菌活性为 20.16 ± 0.07 mm, 上述结果说明了工艺筛选的合理性。

表 8 晶体 A 和 B 抑菌活性结果(n=3)

Table 8 Antibacterial activity results of crystals A and B (n=3)

样品	抑菌圈直径(mm)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
结晶A(100 $\mu\text{g/mL}$)	17.28 ± 0.30	18.27 ± 0.37	8.56 ± 0.15	26.89 ± 0.33	18.37 ± 0.36	17.25 ± 0.32	—	8.36 ± 0.13	—	—
结晶B(100 $\mu\text{g/mL}$)	8.75 ± 0.66	—	—	28.00 ± 0.61	—	8.79 ± 0.39	18.2 ± 0.2	8.75 ± 0.36	17.32 ± 0.43	—
空白对照(甲醇)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
阳性对照(链霉素)	24.00 ± 0.11	26.80 ± 0.61	25.40 ± 0.37	28.11 ± 0.01	22.05 ± 0.09	23.30 ± 0.45	23.06 ± 0.29	27.88 ± 0.65	23.50 ± 0.45	—
阳性对照(制霉素)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	21.90 ± 0.59

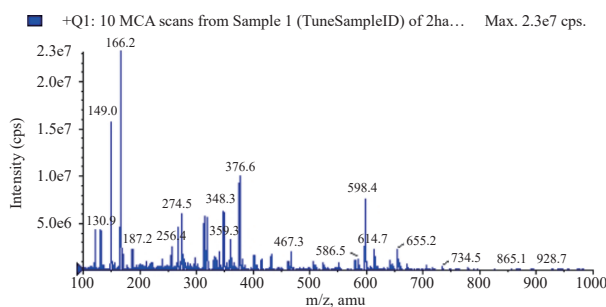
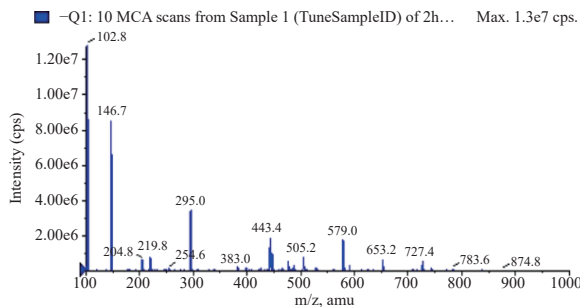


图 9 单体物质 A 的 MS 鉴定结果
Fig.9 MS identification result of crystal A

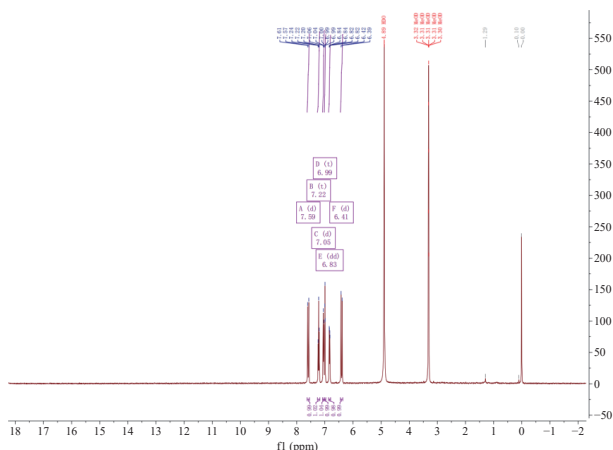


图 10 单体物质 A 的 ^1H -NMR 核磁共振谱
Fig.10 ^1H -NMR nuclear magnetic resonance spectrum of crystal A

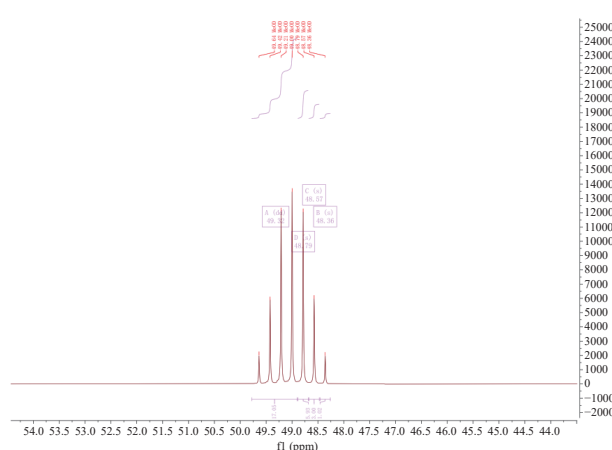


图 11 单体物质 A 的 ^{13}C -NMR 核磁共振谱
Fig.11 ^{13}C -NMR nuclear magnetic resonance spectrum of crystal A

2.3 刺五加内生真菌 CWJ01 抑菌物质的分离

为了阐明刺五加内生真菌 CWJ01 抑菌活性物质基础, 对刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液中次生代谢产物进行提取分离, 结果从刺五加内生真菌 CWJ01 的发酵液中分离得到 2 个单体化合物, 其抑菌作用结果见表 8。

由表 8 可知, 晶体 A 及晶体 B 均有较好的抑菌活性, 二者均为刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液中的抑菌活性物质。

单体物质 A: 白色针晶, mp.59~62 $^{\circ}\text{C}$ 。ESI-MS m/z : 146 $[\text{M}-2\text{H}]^{-}$, 295 $[\text{2M}-\text{H}]^{-}$, 443 $[\text{3M}-\text{H}]^{-}$, 579 $[\text{4M}-\text{H}]^{-}$, 结果如图 9 所示。 ^1H -NMR(400 MHz, MeOD) δ 7.59(d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.22(t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.05(d, $J=7.7$ Hz, 1H), 6.99(t, $J=2.1$ Hz, 1H), 6.83(dd, $J=8.1, 2.5$ Hz, 1H), 6.41(d, $J=16.0$ Hz, 1H),

结果如图 10 所示。 ^{13}C -NMR (101 MHz, MeOD) δ 49.32(dd, $J=42.8, 21.5$ Hz), 48.79, 48.57, 48.36, 结果如图 11 所示。

综合 HPLC、MS、 ^1H -NMR 以及 ^{13}C -NMR 鉴定可知, 单体物质 A 相对分子质量为 148.16, 分子式为 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$, 元素分析结果为 C: 88.47, H: 6.60, O: 26.27, 同时结合其理化性质, 以及参考文献 [32], 最终确定单体物质 A 为反式肉桂酸, 其结构如图 12 所示。

单体物质 B: 淡黄色针状结晶。MS 鉴定结果: Positive MS: 145.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 267.3 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 283.4 $[2\text{M}+\text{k}]^+$, Negative MS: 121.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 结果如图 13 所示。 ^1H -NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.06(2H, d, $J=7.8$ Hz, H-2, 6), 7.62(1H, dt, $J=7.4, 1.3$ Hz, H-4),

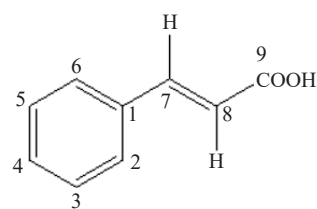


图 12 反式肉桂酸结构

Fig.12 Structure of trans-cinnamic acid

7.50(2H, t, $J=7.2$ Hz, H-3, 5), 为苯环上单取代, 1 个氢原子被羟基取代。结果如图 14 所示。 ^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD) δ 131.8(C-1), 130.7(C-2, 6), 129.5(C-3, 5) 134.0(C-4), 170.0(C-COOH) 结果如图 15 所示。

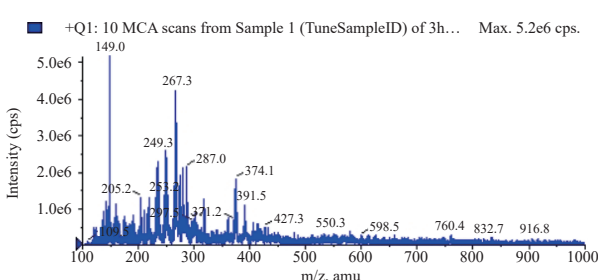
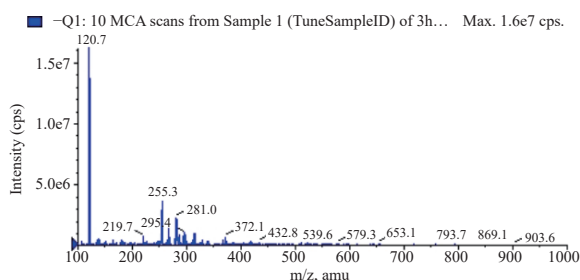
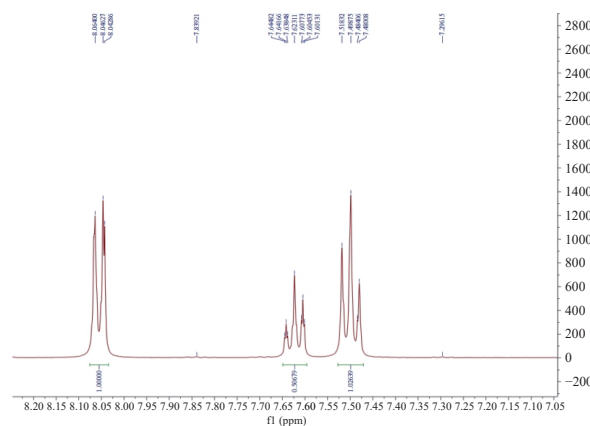
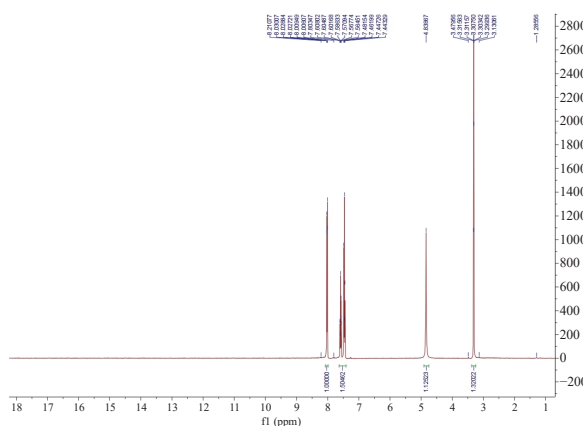
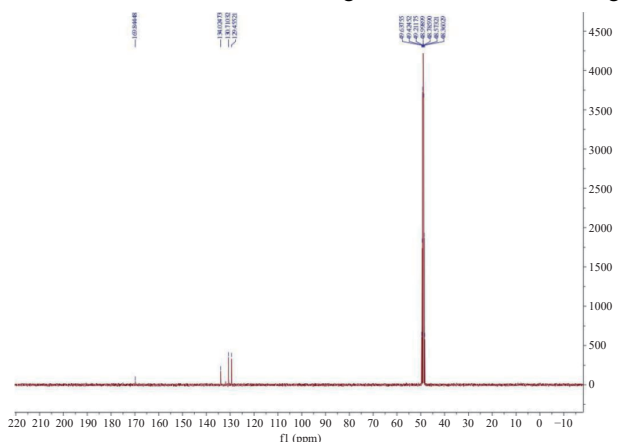


图 13 单体物质 B 的 MS 鉴定结果

Fig.13 MS identification result of crystal B

图 14 单体物质 B 的 ^1H -NMR 核磁共振谱Fig.14 ^1H -NMR nuclear magnetic resonance spectrum of crystal B图 15 单体物质 B 的 ^{13}C -NMR 核磁共振谱Fig.15 ^{13}C -NMR nuclear magnetic resonance spectrum of crystal B

根据 MS 以及 ^{13}C -NMR, ^1H -NMR 鉴定, 单体物质 B 相对分子质量为 122.12, 分子式为 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, 元素分析结果为 C: 68.81, H: 4.95, O: 26.27, 同时结合其理化性质, 以及参考文献 [33], 最终确定单体物质 B 为苯甲酸, 其结构如图 16 所示。

从刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液中分离得到反式肉桂酸及苯甲酸, 其中, 作为重要的有机酸, 反式肉桂酸具有抑菌、抗氧化等作用, 且安全、无毒, 即可做水果防腐剂, 也可做调味料[34]; 苯甲酸可以作为防腐剂广泛应用于食品中(GB2760-2014)。刺五加内生真菌 CWJ01 发酵液的抑菌作用可能为其所含上述 2 种次生代谢产物共同作用的结果, 后续将对其具有抑菌活性的次生代谢产物进行更为系统的分离。

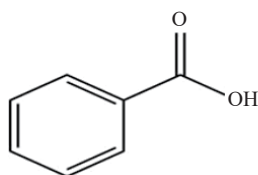


图 16 苯甲酸的结构

Fig.16 Structure of benzoic acid

2.4 刺五加内生真菌 CWJ01 的鉴定

刺五加内生真菌 CWJ01 菌落为青绿色, 菌丝密集, 背面基质为深黄色; 孢子大小相近, 单个孢子呈圆形、卵圆形和椭圆形, 光滑, 孢子大都聚集在孢子梗顶部呈伞形, 其菌落形态及显微形态见图 17。

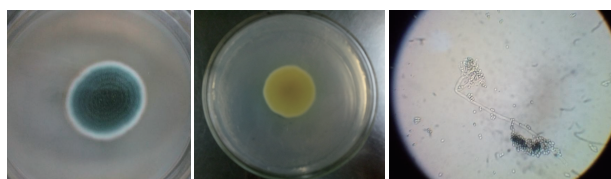


图 17 内生真菌 CWJ01 菌落形态及孢子显微形态结构

Fig.17 Colony morphology and the spore microstructure of endophytic fungi CWJ01

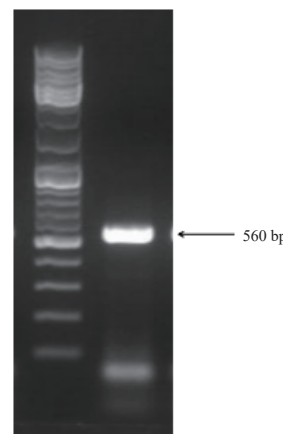


图 18 CWJ01 PCR 扩增产物

Fig.18 PCR products of CWJ01

从刺五加内生真菌 CWJ01 DNA 中获得 1 条长度为 560 bp 的特异性条带(见图 18), 根据其 ITS 序列建立刺五加内生真菌 CWJ01 的系统发育树(如图 19), 目的菌株序列与 *Penicillium polonicum* (LC092114.1) 的相似性达到了 99%, 结合形态学观察结果, 将刺五加内生真菌 CWJ01 菌株鉴定为波兰青霉(*Penicillium polonicum*)。

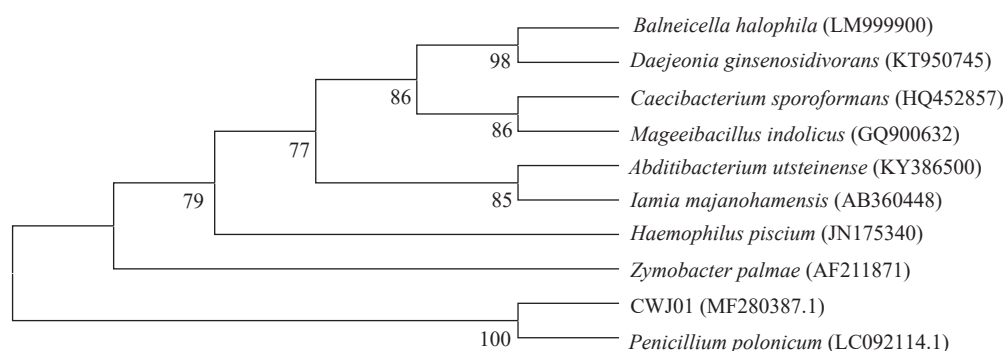


图 19 CWJ01 系统发育树

Fig.19 Phylogenetic tree of CWJ01

3 结论

从健康刺五加叶中分离得到一株可以产刺五加苷 E 的内生真菌 CWJ01, 该菌株发酵液同时也具有较好的抗菌活性, 为提高其抑菌活性, 对其发酵工艺参数进行优化后, 确定其最适发酵条件为: 基础培养基 PDB 中碳源是 2% 葡萄糖, 氮源是 1% 蛋白胨, 培养基初始 pH7.0, 培养基装液量 60%(v/v), 菌悬液接种量 5%(v/v), 摇床转速 140 r/min, 培养温度 28 ℃。连续培养时间 15 d。发酵条件优化后所制备的内生真菌 CWJ01 发酵液, 其抑菌活性较未经发酵条件筛选所制备的发酵液抑菌活性显著提高; 从内生真菌 CWJ01 发酵液中分离得到 2 种具有抑菌活性的物质反式肉桂酸及苯甲酸。经鉴定, 内生真菌 CWJ01 为波兰青霉(*Penicillium polonicum*)。上述结果可为构建工程菌株及开发应用刺五加内生真菌 CWJ01 提供参考。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 125. [National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: A [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 125.]
- [2] LIANG C, XIU L X, HUI F, et al. Isolation and identification of an-anthocyanin component in the fruits of *Acanthopanax sessiliflorus* (Rupr.&Maxim) Seem. By means of high speed counter current chromatography and evaluation of its antioxidant activity[J]. Molecules, 2020, 25(8): 20–34.
- [3] CHEN X H, ZHAO Y Y, WANG Q, et al. Chemical constituents from the stems of *Acanthopanax senticosus* with their cytotoxic activities[J]. Asian Natural Products Research, 2022, 24(7): 673–678.
- [4] LI J, LI N, LEE H S, et al. Four new sesqui-lignans isolated

- from *Acanthopanax senticosus* and their diacylglycerol acyltransferase (DGAT) inhibitory activity[J]. *Fitoterapia*, 2016, 109: 185–189.
- [5] XIA Y G, HUANG Y X, LIANG J, et al. Comparable studies of two polysaccharides from leaves of *Acanthopanax senticosus*: Structure and antioxidation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 350–362.
- [6] 李强, 张若冰, 杨玉赫, 等. 刺五加叶化学成分及药理作用研究进展[J]. *药学研究*, 2023, 42(7): 495–501. [LI Qiang, ZHANG Ruobing, YANG Yuhe, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Acanthopanax senticosus* leaves[J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2023, 42(7): 495–501.]
- [7] ZHANG Xiaoxu, ZHANG Qi, YU Menghan, et al. Integrating serum pharmacochimistry and network pharmacology to explore the molecular mechanisms of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxim.) Harms on attenuating doxorubicin-induced myocardial injury[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 319(3): 117349.
- [8] RUI S, ZHAO Y, WANG J Y, et al. Sedative and hypnotic effects of ethanol extracts of *Acanthopanax senticosus* root bark and *Acanthopanax sessiliflorus* Brak and their mechanisms[J]. *Journal of Jilin University(Medicine Edition)*, 2020, 46(5): 917–924.
- [9] JIN L, SCHMIECH M, GAAFARY M E, et al. A comparative study on root and bark extracts of *Eleutherococcus senticosus* and their effects on human macrophages[J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153181.
- [10] TETSUO S, MIYAKO N, MASAFUMI S, et al. The fruit of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) harms improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation by modulation of liver adenosine monophosphate activated protein kinase activity and lipogenic gene expression in high-fat diet fed obese mice[J]. *Nutrition Research*, 2016, 36(10): 98–102.
- [11] 崔立东. 刺五加何以成为“寒地龙药”之首[N]. *黑龙江日报*, 2023-07-31(006). [CUI Lidong. Why *Acanthopanax sessiliflorus* became the first of "Cold Earth Dragon Medicine"[N]. *Heilongjiang Daily*, 2023-07-31(006).]
- [12] 卓长清, 赵欣, 栗朝霞. 枸杞刺五加运动饮料研制及抗疲劳作用研究[J]. *中国食品添加剂*, 2019, 30(12): 131–136. [ZHUO C Q, ZHAO X, LUAN Z X. Study on preparation and anti-fatigue function of wolfberry and *Acanthopanax senticosus* sports beverage[J]. *China Food Additives*, 2019, 30(12): 131–136.]
- [13] CHEN X Q, JIA X D, YANG S, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoids, polysaccharides, and eleutherosides from *Acanthopanax senticosus* using response surface methodology in development of health wine[J]. *LWT*, 2022, 165: 113725.
- [14] 谭龙, 曹贵阳, 郭盛磊, 等. 2021 年黑龙江省中药材生产统计数据[J]. *中国现代中药*, 2023, 25(11): 2296–2300. [TAN Long, CAO Guiyang, GUO Shenglei, et al. Analysis of production statistics of Chinese medicinal materials in Heilongjiang Province in 2021[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2023, 25(11): 2296–2300.]
- [15] 谈文权. 不同设施栽培方式对刺五加采摘期及产量的影响[J]. *中国果菜*, 2020, 40(7): 72–75. [TAN W Q. Effects of different cultivation methods on picking time and yield of *Acanthopanax senticosus*[J]. *Chinese Fruit and Vegetable*, 2020, 40(7): 72–75.]
- [16] CAO J, LIU B, XU X, et al. Plant endophytic fungus extract ZNC improved potato immunity, yield, and quality[J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 707256.
- [17] SONIA W, ADIL A B, ABRAR A K, et al. Endophytic fungi: Unravelling plant-endophyte interaction and the multifaceted role of fungal endophytes in stress amelioration[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 108–174.
- [18] 闫佳佳, 万璐, 尤梦瑶, 等. 产香兰素内生真菌 GP20 的鉴定及发酵条件研究[J]. *中国调味品*, 2022, 47(11): 44–49. [YAN Jiajia, WAN Lu, YOU Mengyao, et al. Identification and fermentation conditions of vanillin-producing endophytic fungus GP20[J]. *Chinese Condiment*, 2022, 47(11): 44–49.]
- [19] 尤梦瑶, 闫佳佳, 万璐, 等. 黄芪内生枯草芽孢杆菌 HS8 次生代谢产物研究[J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2022, 39(6): 679–685. [YOU Mengyao, YAN Jiajia, WAN Lu, et al. Study on secondary metabolites of endophytic *Bacillus subtilis* HS8[J]. *Natural Science Journal of Heilongjiang University*, 2022, 39(6): 679–685.]
- [20] WANG Fuqi, HU Tianshuai, HAN Yangyang, et al. Biological control of gentian spot blight by the combination of endophytic fungi fermentation broth and traditional Chinese medicine extractions[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2023, 128: 102149.
- [21] PRINCE H E, ANDERSON W L, TOMASI T B. Inhibition of L-cell growth in agarose (ILGA): A simple inexpensive method for the detection and quantitation of factors inhibiting tumor cell growth[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1982, 48(3): 367–372.
- [22] 李俊秀, 廖夏云, 赵立春, 等. HPLC 测定青钱柳叶片中槲皮素、山奈酚的含量[J]. *湖北农业科学*, 2023, 62(10): 166–172.
- [23] LI Junxiu, LIAO Xiayun, ZHAO Lichun, et al. Determination of quercetin and kaempferol in leaves of *Salix cyclocarya* by HPLC[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2023, 62(10): 166–172.]
- [23] 魏宝红, 刘佳, 毕旺华, 等. 药用真菌桑黄的液态发酵工艺优化及体外抗肿瘤活性研究[J]. *生物化工*, 2023, 9(4): 19–25.
- [24] WEI Baohong, LIU Jia, BI Wanghua, et al. Optimization of liquid fermentation process and in vitro antitumor activity of the medicinal fungus *Sanghuangporus* spp.[J]. *Biochemistry*, 2023, 9(4): 19–25.]
- [24] 董玲, 张凤菊, 赵驰, 等. 基于 UPLC-QTOF-MS 解析苦荞黄酮组成及药理学网络分析[J]. *核农学报*, 2024, 05(38): 911–918.
- [25] DONG Ling, ZHANG Fengju, ZHAO Chi, et al. Composition and pharmacologic network analysis of flavonoids from Tartary buckwheat based on UPLC-QTOF-MS[J]. *Chinese Journal of Nuclear Agriculture*, 2024, 05(38): 911–918.]
- [25] 徐荧, 马成业, 张琛, 等. 液体核磁共振技术用于木质素结构表征的研究进展[J]. *中国造纸学报*, 2024, 39(2): 23–34. [XU Y, MA Y C, ZHANG C, et al. Research progress on solution-state nuclear magnetic resonance (NMR) technique for lignin structure characterization[J]. *Chinese Paper Journal*, 2024, 39(2): 23–34.]
- [26] 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩, 等. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984. [SHAO Liping, SHEN Ruixiang, ZHANG Suxuan, et al. *Taxonomy of fungi* [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1984.]
- [27] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. [WEI Jingchao. *Fungal identification manual* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1982.]
- [28] 万璐, 闫佳佳, 尤梦瑶, 等. 产甘草次酸内生真菌 GRE111 的鉴定及发酵条件研究[J]. *中国调味品*, 2022, 47(10): 41–46.
- [29] WAN Lu, YAN Jiajia, YOU Mengyao, et al. Identification and fermentation conditions of glycyrrhetic acid-producing endophytic fungus GRE111[J]. *Chinese Condiments*, 2022, 47(10): 41–46.]

- [29] 张赫, 尤梦瑶, 万璐, 等. 产紫丁香苷内生真菌 CJ7 的鉴定及发酵条件研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(25): 143–150. [ZHANG He, YOU Mengyao, WAN Lu, et al. Identification and fermentation conditions of endophytic fungus CJ7 producing syringin[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(25): 143–150.]
- [30] ABDEL-FATAH S, EL-BATAL A, EL-SHERBINY G, et al. Production, bioprocess optimization and γ -irradiation of *Penicillium polonicum*, as a new Taxol producing endophyte from *Ginkgo biloba* [J]. *Biotechnology Reports*, 2021, 30: e00623.
- [31] ZHANG Shuang, GUO Yu, ZHAO Qianhui, et al. Study on the bacteriostatic action of Chinese herbal medicine on avian *Trichosporon*[J]. *Poultry Science*, 2020, 99(9): 4530–4538.
- [32] 赵俊俊, 马瑞霞. 杏鲍菇液体菌种摇瓶发酵条件的研究[J]. *中国园艺文摘*, 2017, 33(8): 27–28, 83. [ZHAO Junjun, MA Ruixia. Study on fermentation conditions of liquid strains of *Pleurocenteryngii*[J]. *Chinese Horticultural Abstracting*, 2017, 33(8): 27–28, 83.]
- [33] 张赫, 关昕, 祁可香, 等. 产反式肉桂酸内生真菌 GRE4 的鉴定及发酵条件研究[J]. *中国调味品*, 2023, 48(7): 25–31. [ZHANG He, GUAN Xin, QI Kexiang, et al. Identification and fermentation conditions of trans-cinnamic acid-producing endophyte GRE4[J]. *Chinese Condiment*, 2023, 48(7): 25–31.]
- [34] WANG Dandan, SUN Li, YU Hong, et al. Whole-genome analysis of the benzoic acid-degrading bacterium *Bacillus halotolerans* B28 to reveal its phytoprobiotic effects[J]. *International Biodegradation & Biodegradation*, 2023, 185: 105668.