裙带菜内生菌的分离鉴定及其抑制 AChE 活性的研究

秦云，王凤舞

(青岛农业大学食品科学与工程学院，山东青岛 266109)

摘要：目前，国内外对于裙带菜的研究主要集中于其抗氧化、抗肿瘤等活性，而对其内生菌的研究未见报道。本文以青岛海域裙带菜为原材料，对其内生菌进行分离、纯化，共获得 7 株内生真菌和 5 株内生细菌，并采用 DTNB 显色法测定各菌株发酵液抑制乙酰胆碱酯酶活性，筛选出具有活性的菌株，并对活性最高的一株细菌 QD-4 进行生理生化鉴定和 16S rDNA 分子生物学鉴定，确定该菌株为芽孢杆菌，命名为 *Bacillus* sp. QD-4。以发酵液的 AChE 抑制率为活性指标，采用单因素和正交试验对发酵条件进行优化，确定了培养基最佳碳源为 5.0%淀粉、最佳氮源为 1.0%蛋白胨，最佳发酵条件：发酵时间 5 d、接种量 8%、培养基初始 pH 值 9.0、培养温度 30 ℃。发酵条件经优化后,当发酵液粗浸膏为 20 mg/mL 时，对 AChE 抑制率可达到 34.02%。

关键词：裙带菜；内生菌；乙酰胆碱酯酶；抑制剂

文章篇号：1673-9078(2015)1-53-58 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.011

Isolation, Identification and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Endophytes from *Undaria pinnatifida*

QIN Yun, WANG Feng-wu

(College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China**)**

Abstract: Studies on *Undaria pinnatifida* to date have mainly focused on its antioxidant, antitumor activities, while no reports are available on the endophytes from *Undaria pinnatifida*. In this study, fresh U. *pinnatifida* from Qingdao sea area was used to isolate and purify endophytes. A total of seven strains of endophytic fungi and five strains of endophytic bacteria were isolated, the acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity of each strain was evaluated by the 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) method, and active strains were identified. Strain QD-4 showed the highest AChE inhibitory activity and was identified, by physiological-biochemical characteristics and molecular biological techniques (using 16S rDNA sequencing), as *Bacillus* sp. and named as *Bacillus* sp. QD-4. The fermentation conditions were optimized using single-factor and orthogonal experiments with the inhibition rate on AChE in the fermentation broth as the activity indicator. The optimum carbon and nitrogen sources were identified as 5% starch and 1% peptone, respectively. The optimum fermentation conditions were as follows: fermentation time, 5 days; quantity of inoculum, 8%; initial substrate pH, 9.0; and culture temperature, 30 ℃. Under these conditions, the highest rate of AChE inhibition was 34.02% when the concentration of crude extract from fermentation broth was 20 mg/ml.

Key words: *Undaria pinnatifida*; endophyte; acetylcholinesterase; inhibitor

老年痴呆症，即阿尔茨海默病（Alzheimer's Disease, AD），是老年期痴呆最常见的一种类型。随着老年人口的增长，老年痴呆症发病人数逐年增多，并且随着年龄的增长，患病率也逐渐上升。老年痴呆症已成为继心脑血管疾病和恶性肿瘤之后，威胁人类健康的“第三大杀手”[1~2]。导致 AD 的因素很多，但是目前国际公认的 AD 病理为“胆碱能缺失学说”，造成乙酰胆碱缺失的因素可能是β -淀粉样斑块内及周围的 AChE 活性增加，激活了其细胞毒性，或者是 AChE 糖基化异常及其各分子型表达水平的变化[3]。因此，开发治疗 AD 的药物，尤其是乙酰胆碱酯酶抑制剂（acetyl cholinesterase inhibitors，AchEIs）类药物的研究倍受关注。AchEIs 可分为化学合成和天然产物两大类，目前国内外的研究主要集中在微生物源的 AChEIs，尤其是海洋微生物，具有潜在的价值[4]。

裙带菜（*Undaria pinnatifida*）为是大型海洋海藻，属褐藻门，褐子纲、海带目、翅藻科、裙带菜属[5]。目前，对于裙带菜的研究主要是生理活性物质的生理功能和分离纯化等方面，未见有从裙带菜内分离筛选

收稿日期：2014-06-07

基金项目：青岛市科技发展计划项目－应用基础研究（13-1-4-199-jch）

作者简介：秦云(1988-)，女，硕士研究生，研究方向为食品营养与功能性食品

通讯作者：王凤舞(1979-)，女，博士，副教授，研究方向为食品营养与功能性食品

具有产抗老年痴呆活性物质的菌株的报道[6~8]。裙带菜生长在高压、高盐、低温等极端的海洋环境，加之裙带菜所含有种类丰富的营养成分，其内生菌可能有其独特的代谢途径，次生代谢产物具有较好的生物活性，具有很大的开发潜力[9]。

本实验以青岛海域的裙带菜为材料，对其进行内生菌进行分离，并筛选出具有抑制抗老年痴呆活性物质 AChE 活性的菌株，然后，对其进行生理生化和分子生物学鉴定，优化液体发酵条件。在最优发酵条件下，大批量发酵，对发酵液的粗浸膏进行分离、纯化，以期获得更多结构新颖、生物活性多样高效的次生代谢产物，为天然药物的研究开发提供基础[10~11]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品

裙带菜采自青岛海域。

1.1.2 培养基

分离用培养基，WA-抗生素培养基：琼脂 20 g、氨苄青霉素 200 mg、链霉素 200 mg、海水 1000 mL；LB 琼脂培养基：蛋白胨 10 g、酵母浸粉 5 g、氯化钠 10 g、琼脂 15 g、海水 1000 mL；121 ℃灭菌 20 min。

液体发酵培养基，察氏培养基：硝酸钠 3 g、磷酸氢二钾 1 g、硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 g、氯化钾 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30 g、海水 1000 mL；LB 营养肉汤：蛋白胨 10 g、酵母浸粉 5 g、氯化钠 10 g、海水 1000 mL；121 ℃灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 裙带菜内生菌的分离和纯化

取裙带菜的根、茎，用无菌水冲洗干净，用剪刀剪成 1 cm×1 cm 的小块。在经过紫外消毒的无菌操作台内，把剪好的材料置于 75%乙醇消毒 1 min，而后用 2.5%次氯酸钠消毒 10 min，再用 75%乙醇消毒 1 min，无菌水冲洗 2~3 次，剪去边缘，把样品放入 WA-抗生素平板培养基和 LB 琼脂平板培养基上，分别置于 28 ℃和 37 ℃的培养箱中，倒置培养，进行内生菌的分离。

对照实验：冲洗干净的裙带菜的根、茎，用 75%酒精消毒后直接无菌水冲洗，不进行切割完整置于分离培养基上，倒置培养。对照应无菌体生长，证明表面消毒彻底。待实验组长出菌体时，采用菌丝尖端切割法对内生真菌进行分离纯化；挑取单菌落对内生细菌进行分离纯化。将分离纯化好的内生菌菌种于 4 ℃冰箱保存备用[12]。

1.2.2 发酵培养

将已纯化的内生菌分别转接于 PDA 和 LB 平板平板上进行活化，将活化好的真菌接种到装有 200 mL 察氏培养基（500 mL 三角瓶），置于恒温振荡培养箱中 120 r/min，28 ℃培养 14 d；将活化好的细菌接种到装有 200 mL LB 营养肉汤（500 mL 三角瓶），置于恒温振荡培养箱中 180 r/min，37 ℃培养 3 d。发酵结束后，真菌发酵液用四层纱布过滤，将菌丝体和发酵液分离。细菌发酵液，8000 r/min 离心 10 min，将菌体和发酵液分离。将所得的发酵液用乙酸乙酯萃取 3 次，合并乙酸乙酯相旋转蒸发、浓缩得粗浸膏。

1.2.3 发酵液粗提取物抑制 AChE 活性的测定

将浸提物用二甲基亚砜（DMSO）溶解，配制成适当浓度的溶液。抑制 AChE 活性测定参照改良 Ellman 法[13]。取 4 支 10 mL 的试管（1~4）分别标注为空白、对照、样品、本底放于 37 ℃的恒温水浴中，向这 4 支试管中分别添加 pH8.0 磷酸缓冲液（2950 μL、2880 μL、2880 μL、2950 μL）、乙酰胆碱碘代物 20 μL、显色剂 DTNB 100 μL；然后向 1、2 号试管中各加入 DMSO 100 μL，3、4 号试管中各加入待测样品溶液 100 μL，2、3 号试管中再各加入 70 μL 的乙酰胆碱酯酶后混匀、在水浴中反应 4 min 20 s 后再向各试管中分别添加 40%的 SDS 终止剂 100 μL 终止反应；最后在 412 nm 下测其 OD 值，通过计算公式计算出样品对乙酰胆碱酯酶的抑制率：

$$\text{AChE抑制率}/\% = \left[\frac{A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{本底}})}{A_{\text{对照}}}\right] \times 100\%$$

1.2.4 内生细菌 QD-4 的鉴定

1.2.4.1 生理生化鉴定

参照《伯杰氏细菌鉴定手册》（第八版）和《细菌系统鉴定手册》，依据其生理生化特征对 QD-4 菌株进行分类鉴定。

1.2.4.2 16S rDNA 序列分析

参照文献[14]提取细菌基因组 DNA。采用通用引物，正向引物(7F)5’-CAGAGTTTGATCC TGGCT-3’，反向引物(1540R) 5’-AGGAGGTGAT CCAGCCGCA-3’。PCR 条件：94 ℃ 4 mim 预变性；94 ℃ 45 s，55 ℃ 45 s，72 ℃ 1 min 共 30 个循环；最后 72 ℃ 8 min 修复延伸。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测确定为单一条带后，送上海生工生物工程技术服务有限公司，进行测序。

从 NCBI 的基因库中寻找与 QD-4 的 16S rDNA 相关的序列，将相关性最高的菌株同 QD-4 菌株一同构建系统进化树，并进行同源性比较，进而确定菌株

的分类。

1.2.5 QD-4 发酵条件的优化

1.2.5.1 QD-4 生长曲线

采用比浊度法，将 QD-4 菌株接入液体培养基中，37 ℃，180 r/min 条件下摇床振荡培养，每隔 12 h 在操作台中取样一次，将取出的样品在 600 nm 处测定菌液吸光光度值，绘制生长曲线。

1.2.5.2 碳源对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

以蛋白胨为氮源，含量为 1.0%，分别选用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、淀粉作为不同的碳源，含量皆为 5.0%，接种量为 10%，37 ℃，培养 3 d，测定抑制 AChE 活性，每种处理三个重复。

1.2.5.3 氮源对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

以淀粉作为碳源，含量为 5.0%，分别选用牛肉膏、蛋白胨、干酪素、硝酸钠、硝酸铵作为不同的氮源，含量皆为 1.0%，接种量为 10%，37 ℃，培养 3 d，测定抑制 AChE 活性，每种处理三个重复。

1.2.5.4 发酵时间对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

固定培养基碳源、氮源，接种量 10%，培养温度为 37 ℃，发酵时间分别为 3 d、4 d、5 d、6 d 和 7 d，测定抑制 AChE 活性，每种处理三个重复。

1.2.5.5 接种量对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

固定培养基碳源、氮源，接种量分别为 2%、4%、6%、8%和 10%，37 ℃，培养 5 d，测定抑制 AChE 活性，每种处理三个重复。

1.2.5.6 培养基初始 pH 值对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

固定培养基碳源、氮源，将培养基 pH 值分别调至 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0，接种量为 8%，37 ℃，培养 5 d，测定抑制 AChE 活性，每种处理三个重复。

1.2.5.7 培养温度对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

固定培养基碳源、氮源，接种量为 8%，培养温度分别为 20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃和 40 ℃，培养 5 d，测定抑制 AChE 活性，每种处理三个重复。

1.2.6 正交试验

在上述单因素实验基础上，采用 $L_9(3^4)$ 正交表，以 QD-4 菌发酵液提取物 AChE 活性抑制率为指标，以发酵时间（A）、接种量（B）、初始 pH 值（C）和培养温度（D）为试验因素进行正交试验。正交试验因素与水平设计见表 1。

表 1 QD-4 菌株液体发酵培养条件的正交试验因素和水平设计

Table 1 Factors and levels in the orthogonal experiment for liquid fermentation conditions of strain QD-4

水平	因素			
	A (发酵时间/d)	B (接种量/%)	C (初始 pH 值)	D (培养温度/℃)
1	4	7	8.0	25
2	5	8	9.0	30
3	6	9	10.0	35

2 结果与分析

2.1 裙带菜内生菌的筛选

裙带菜经分离、纯化，共分离得到 7 株内生真菌和 5 株内生细菌。将分离得到的内生菌进行液体发酵培养，并对发酵液萃取的乙酸乙酯相进行抑制 AChE 活性的测定，结果见表 2。

表 2 内生菌发酵液提取物 AChE 抑制率测定结果

Table 2 Rate of AChE inhibition by the extract from endophyte fermentation broth

真菌	AChE 抑制率/%	细菌	AChE 抑制率/%
Up-1	-	QD-1	28.24±1.37
Up-2	13.88±1.23	QD-2	-
Up-3	-	QD-3	11.13±1.08
Up-4	30.90±1.43	QD-4	31.18±1.89
Up-5	5.06±0.79	QD-5	-
Up-6	-		
Up-7	-		

注：样品浓度为 50 mg/mL。

表 2 中发酵液提取物活性测定结果显示：在 12 株发酵的内生菌中，细菌 QD-4 的抑制率最高，在浓度为 50 mg/mL 达到 31.18±1.89%。因此，选择细菌菌株 QD-4 对研究 AChE 天然抑制剂有潜在的研究价值。

2.2 QD-4 菌株鉴定

表 3 生理生化鉴定结果

Table 3 Identification of strain QD-4 using physiological and biochemical characteristics

试验名称	试验结果	试验名称	试验结果
接触酶试验	+	硝酸盐还原试验	-
吲哚试验	-	葡萄糖利用试验	+
M.R.试验	+	果糖利用试验	+
V.P.试验	-	甘露醇利用试验	-
硫化氢试验	-	酪蛋白水解试验	+
明胶液化试验	-	淀粉水解试验	+

注：表中“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应。

对 QD-4 菌株进行生理生化鉴定试验，结果如表 3 所示，参照《伯杰氏细菌鉴定手册》（第八版）和《细菌系统鉴定手册》，经鉴定该菌为革兰氏阳性菌，有芽孢。

登陆 www.NCBI.com 网站，获得登录号：KJ809566，在 GeneBank 中通过 Blast 得到与 QD-4 菌株序列相似度较大的菌株，通过 Clustul 软件同 GeneBank 中的相似序列进行比较，利用 MEGA5.0 软件绘制出 QD-4 菌株的系统发育树，如下图所示。

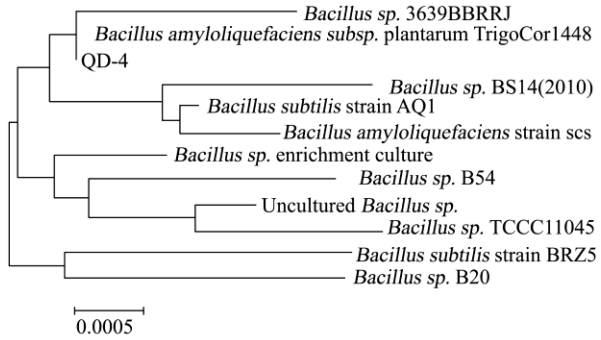


图 1 QD-4 菌株 16S rDNA 同源性构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of strain QD-4 on 16S rDNA gene sequences

鉴定 QD-4 菌株经分子生物学鉴定其属于细菌域，厚壁菌门，杆菌纲，芽孢杆菌目，芽孢杆菌科，芽孢杆菌属，与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 有 99%的同源性，并命名为 *Bacillus* sp. QD-4。

2.3 *Bacillus sp.*QD-4 发酵条件的优化

2.3.1 *Bacillus sp.* QD-4 生长曲线的绘制

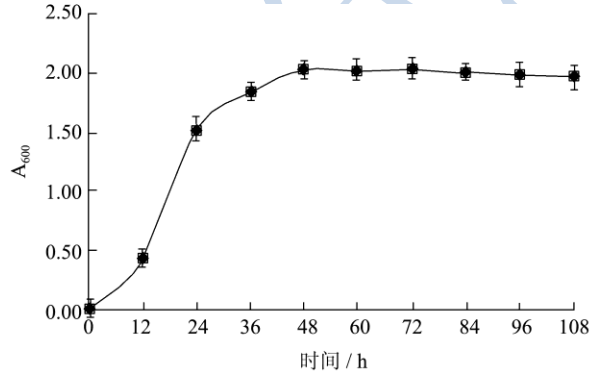


图 2. *Bacillus* sp. QD-4 菌株的生长曲线

Fig.2 Growth curve of strain *Bacillus* sp. QD-4

Bacillus sp. QD-4 菌株的生长曲线如图 2 所示，菌株在 0~12 h 时为生长延滞期，菌株对环境适应能力较弱，12~24 h 时菌株适应环境后利用培养基中提供的营养成分成指数关系快速生长，24~48 h 时达到稳定期，48 h 以后菌株生长进入衰亡期。

2.3.2 碳源对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

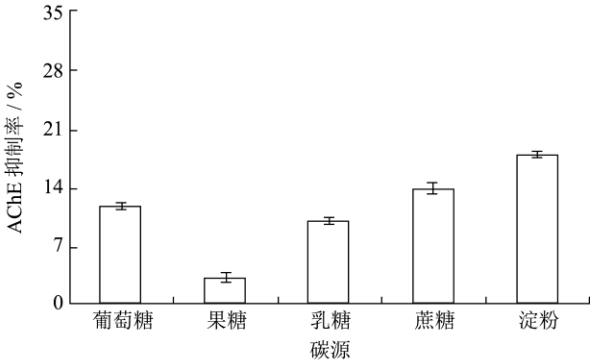


图 3 碳源对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

Fig.3 Effect of various carbon sources on AChE inhibition rate

碳源是微生物培养基主要组成成分之一，其主要功能有：为微生物细胞生长提供碳架和碳素，为微生物生命活动提供能源。由图 3 可以看出，*Bacillus* sp.QD-4 菌株可利用实验提供的各种碳源，当以淀粉为碳源时，发酵液提取物对 AChE 活性的抑制率达到最高，为 18.07%（浓度为 20 mg/mL），其次为蔗糖和葡萄糖。因此，选择淀粉为 QD-4 菌株液体发酵的最佳碳源。

2.3.3 氮源对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

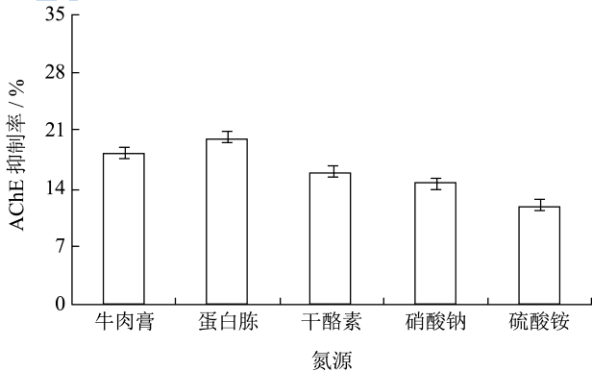


图 4 氮源对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

Fig.4 Effect of nitrogen sources on AChE inhibition rate

微生物的生长和产物的合成都需要氮源。氮源主要用于微生物菌体细胞中氨基酸、蛋白质、核酸等的合成及含氮代谢产物的合成，在液体发酵中起着重要的作用。由图 4 可以看出，*Bacillus* sp. QD-4 菌株在蛋白胨中能很好的生长，发酵液提取物对 AChE 的抑制率达到最高，为 20.16%（浓度为 20 mg/mL），因此，选择蛋白胨酵母膏为 *Bacillus* sp. QD-4 菌株液体发酵的最佳氮源。

2.3.4 发酵时间对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

液体发酵过程中微生物产生的次级活性代谢产物

的时间有所不同，由图 5 可以看出，随着发酵时间的延长，发酵液提取物对 AChE 活性抑制率逐渐升高，到第 5 d 时，抑制率达到最高，为 21.15%（浓度为 20 mg/mL），当发酵时间继续延长时，抑制率逐渐下降，因此，确定 *Bacillus* sp. QD-4 菌株最佳液体发酵时间为 5 d。

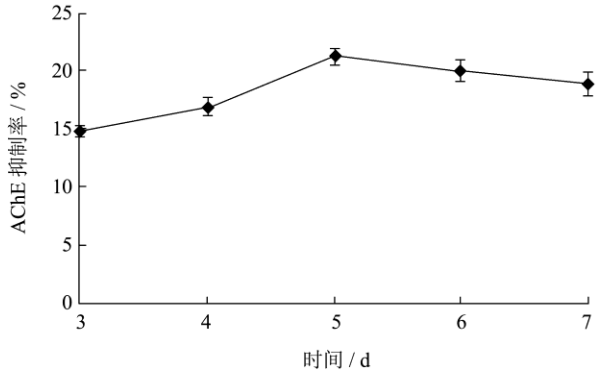


图 5 发酵时间对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

Fig.5 Effect of culture time on AChE inhibition rate

2.3.5 接种量对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

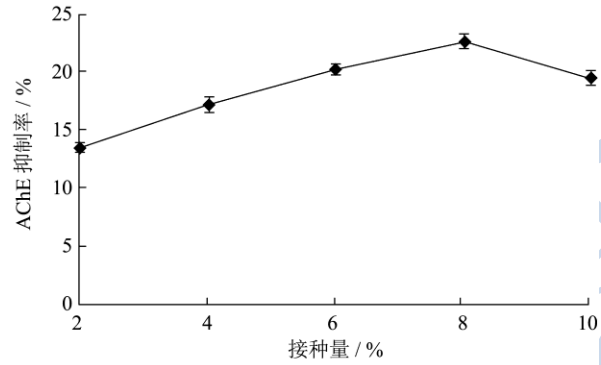


图 6 接种量对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

Fig.6 Effect of quantity of inoculum on AChE inhibition rate

接种量的多少可影响液体发酵过程中菌体的生长速度及代谢产物的产量。由图 6 可以看出，随着接种量的增加，*Bacillus* sp. QD-4 菌株发酵液提取物抑制 AChE 的活性也随之增强，当接种量达到 8%时，抑制率达到最大，为 22.73%（浓度为 20 mg/mL）。接种量继续增大时，发酵液提取物对 AChE 的抑制率反而降低。原因可能为接种量过大，引入的抑制次生代谢的有害物质相应增多，对产物的合成不利，或者菌体在发酵前期生长过于旺盛，空间和资源相对匮乏，培养基中的营养成分被大量消耗，进而影响发酵后期代谢产物的形成和分泌。因此，确定 *Bacillus* sp. QD-4 菌株液体发酵的最佳接种量为 8%。

2.3.6 培养基初始 pH 值对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

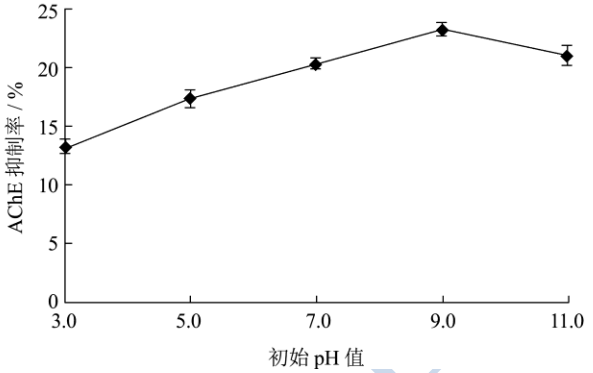


图 7 初始 pH 值对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

Fig.7 Effect of pH on AChE inhibition rate

培养基的初始 pH 值对菌株的生长和代谢有直接影响，初始 pH 值应使菌株快速生长并且有利于代谢产物的产生。由图 7 可以看出，发酵液的初始 pH 值对 *Bacillus* sp. QD-4 菌株产抑制 AChE 活性代谢物的影响显著。该菌在 pH9.0 时发酵液提取物 AChE 抑制率达到最大值，即 AChE 抑制率为 23.18%。原因可能是该菌的生长环境 pH 对该菌的次生代谢产物产生具有激发作用，该菌株产 AChE 抑制活性代谢产物产生最多。因此该菌的最适发酵培养基的初始pH值为9.0。

2.3.7 培养温度对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

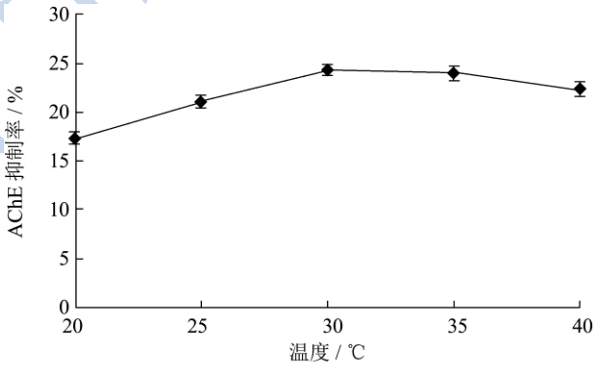


图 8 培养温度对发酵液提取物 AChE 抑制率的影响

Fig.8 Effect of culture temperature on AChE inhibition rate

由图 8 可以看出，当培养温度低于 30 ℃时，随着温度的升高，*Bacillus* sp. QD-4 菌株发酵液提取物对 AChE 的抑制率也随之增大，当达到 30 ℃左右时，抑制率达到最大，抑制率为 23.99%。当温度继续升高时，抑制率下降，说明高温会影响 *Bacillus* sp. QD-4 菌株抑制 AChE 活性代谢产物的合成和分泌。因此，确定 *Bacillus* sp. QD-4 菌株液体发酵的最佳培养温度为 30 ℃。

2.3.8 正交试验结果

由表 4 可知，D（培养温度）对 *Bacillus* sp. QD-4 菌株发酵液 AChE 抑制率影响较大，其次是 B（接种

量）、A（发酵时间）、C（初始 pH 值）由此得出最佳发酵条件为 $A_2B_3C_2D_2$，即发酵时间 5 d、接种量 9%、培养基初始 pH 值 9.0、培养温度 30 ℃。

据表 5 的方差分析结果，在 α=0.05 条件下的 F 临界值比较，可知，接种量和培养温度对 *Bacillus* sp. QD-4 菌株发酵液 AChE 抑制率的影响显著；发酵时间、培养基初始 pH 值对 *Bacillus* sp. QD-4 菌株发酵液 AChE 抑制率的影响不显著。

表 4 正交试验结果

Table 4 Result of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	AChE 抑制率/%
1	1	1	1	1	20.59
2	1	2	2	2	23.35
3	1	3	3	3	24.16
4	2	1	2	3	27.64
5	2	2	3	1	20.43
6	2	3	1	2	32.27
7	3	1	3	2	28.53
8	3	2	1	3	20.34
9	3	3	2	1	25.32
K_1	22.700	25.587	24.400	22.113	
K_2	26.780	21.373	25.437	28.050	
K_3	24.730	27.250	24.373	24.047	
R	4.080	5.877	1.064	5.937	

表 5 方差分析结果

Table 5 Result of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	24.970	2	11.319	19.000	
B	55.054	2	24.956	19.000	*
C	2.206	2	1.000	19.000	
D	55.008	2	24.936	19.000	*
误差	2.21	2			

注：$F_{0.05(2,2)}$=19.00; * 为具有显著性。

2.3.9 验证试验

采用最佳发酵条件和最佳碳源、氮源进行 *Bacillus* sp. QD-4 菌株液体发酵实验，测定发酵液提取物的 AChE 抑制率，为 34.02%（浓度为 20mg/mL）。此结果表明，应用上述实验确定的最佳发酵条件和碳源、氮源所得到的发酵液提取物的 AChE 抑制率较高，有利于发酵液中抗老年痴呆活性物质的提取分离。

3 结论

3.1 从青岛裙带菜中分离得到 12 株内生菌，筛选出 6 株具有抑制 AChE 活性的菌株，说明裙带菜内生菌对于对研究 AChE 天然抑制剂有潜在的价值。对活性最高的一株细菌 QD-4 进行生理生化和分子生物学鉴定，确定该菌株为芽孢杆菌，命名为 *Bacillus* sp. QD-4。

3.2 采用单因素和正交试验对发酵条件进行优化。确定了最佳发酵条件：碳源为淀粉、氮源为蛋白胨，发酵时间 5 d、接种量 8%、培养基初始 pH 值 9.0、培养温度 30 ℃。发酵液粗浸膏在 20 mg/mL 时，对 AChE 抑制率可达到 34.02%。

3.3 *Bacillus* sp. QD-4 具有一定的开发研究前景，在下一步的研究工作中，需要对更多的具有活性的内生菌进行研究，并通过优化发酵条件提高生物活性；还需对次生代谢物化学成分进行分析，获得更多结构新颖、生物活性多样高效的次生代谢产物，为进一步深入研究奠定坚实的基础。

参考文献

[1] Richards S S, Hendrie H C. Diagnosis, management, and treatment of A1zheimer's disease [J]. Archives of Internal Medicine, 1999, 159: 789-798

[2] 刘艳玲,李奴英.乙酰胆碱酯酶抑制剂治疗老年痴呆症的研究进展[J].山西医药杂志(下半月刊),2008,1:64-66
LIU Yan-lin, LI Nu-ying. Advances in the studies on the Acetyl cholinesterase inhibitor treating the alzheimer's disease [J]. Shanxi Medical Joumal, 2008, 1: 64-66

[3] 李前,朱振霞.乙酰胆碱酯酶与老年性痴呆关系的研究进展[J].中国老年学杂志,2002,4:325-326
LI Qian, ZHU Zhen-xia. Research progress of the relationship between acetylcholinesterase and senile dementia [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2002, 4: 325-326

[4] Ge HM, Peng H, Guo ZK, et al. Bioactive alkaloids from the plant endophytic fungus *Aspergillus* terreus [J]. Planta Medica, 2010, 76(8): 822-824

[5] 石颖,侯和胜.裙带菜的生理作用及药用价值研究进展[J].食品与药品,2013,15(3):213-215
SHI Ying, HOU He-sheng. Physiological effect and pharmacological importance of undaria pinnatifida: a literature review [J]. Food and Drug, 2013, 15(3): 213-215

[6] Park HJ, Lee MK, Park YB, et al. Beneficial effects of Undaria pinnatifida ethanol extract on diet-induced-insulin resistance in C57BL/6J mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(4): 727-733

[7] 张文竹,刘红兵,管华诗,等.裙带菜的化学成分及其生物活性研究进展[J].海洋科学,2009,33(4):72-75
ZHANG Wen-zhu, LIU Hong-bing, GUAN Hua-shi, et al. Advances in the studies on the chemical constituents and biological activity of marine seaweed undaria pinnatifida [J].

Marine Sciences, 2009, 33(4): 72-75

[8] Lee J B, Hayashi K, Hashimoto M, et a1. Novel anti-viral fucoidan from sporophyll undaria pinnatifida (mekabu) [J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52(9): 1091-1094

[9] Peng Y, Zhigang Y, Chunmei D. Pigment signatures of some diatoms isolated from China seas [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 25: 108-118

[10] Wiese J, Ohlendorf B, Blümel M, et al. Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge tethya aurantium and identification of their secondary metabolites [J]. Marine Drugs, 2011, 9(4): 561-585

[11] Wang Y, Xu L, Ren W, et al. Bioactive metabolites from Chaetomium globosum L18, an endophytic fungus in the medicinal plant curcuma wenyujin [J]. Phytomedicine, 2012, 19: 364-368

[12] 赵庆云,樊明涛,师俊玲,等.银杏植株中内生菌的分离及产黄酮菌株的筛选[J].农业机械学报,2007,38(9):199-201
ZHAO Qing-yun, FAN Ming-tao, SHI Jun-ling, et al. Isolation of endophytic fungi and screening of flavonoid producing strains from Ginkgo [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2007, 38(9): 199-201

[13] 柏志全,周丽丽,郑辉,等.电针穴位对脑缺血-再灌流大鼠海马和大脑皮层 AChE 活性的影响[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2002,23(5):101-104
BO Zhi-quan, ZHOU Li-li, ZHENG Hui, et al. Influence of electroacupuncture points on AChE activity of hippocampus and cortex caused by cerebral ischemia-reperfusion rats [J]. Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition), 2002, 23(5): 101-104

[14] 陈泽斌,夏振远,雷丽萍,等.烟草可培养内生细菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 和系统发育分析[J].中国烟草学报,2012, 18(1):92-100,105
CHEN Ze-bin, XIA Zhen-yuan, LEI Li-ping, et al. PCR-RFLP and phylogeny analysis of 16S rDNA of tobacco cultivable endophytic bacteria [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2012, 18(1): 92-100, 105

现代食品科技