

文章编号:1001-6880(2015)6-1028-05

排风藤内生真菌 PFT-2 发酵产物抗氧化活性研究

杨 扬¹, 苏香萍^{1*}, 李则君¹, 汪鋆植^{1,2}, 邹 坤^{1,2}¹三峡大学生物与制药学院; ²三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 宜昌 443002

摘要:采用 DPPH·法及 Fe^{3+} 还原力法对排风藤内生真菌 PFT-2 提取物的抗氧化活性进行研究,首先测定发酵液乙酸乙酯萃取物和菌丝体甲醇总提物的活性,然后测定菌丝体总提物各极性部位,即石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、丙酮、甲醇和水层剩余物部位的活性,同时以 V_c 作为阳性对照。结果表明:内生真菌 PFT-2 菌丝体甲醇总提取物各样品抗氧化活性较强,尤其是甲醇提取物部位、丙酮提取物部位和正丁醇部位;它们对 DPPH·的清除作用与 V_c 相当,其中甲醇提取物部位 IC_{50} 值为 0.023 mg/mL,活性略高于 V_c ,同时以上提取物对 Fe^{3+} 也具有很强的还原能力。

关键词:排风藤;内生真菌;发酵;抗氧化活性

中图分类号:R151.2; TS201.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.06.016

Antioxidant Activity of Fermentation Products of Entophytic Fungal PFT-2 in *Solanum cathayanum*

YANG Yang¹, SU Xiang-ping^{1*}, LI Ze-jun¹, WANG Jun-zhi^{1,2}, ZOU Kun^{1,2}¹College of biological and pharmaceutical science, Three Gorges University; ²Hubei Key

Laboratory of Natural Products Research and Development, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: DPPH· scavenging assay and ferric reducing power assay *in vitro* were used to evaluate the antioxidant activities of the extracts from entophytic fungal PFT-2 in *Solanum cathayanum*. Firstly, the antioxidant activities of ethyl acetate extract from fermentation liquid and the methanol extract of mycelium were determined. Secondly, the antioxidant activities of petroleum ether fraction, chloroform fraction, ethyl acetate fraction, *n*-butanol fraction, acetone fraction, methanol fraction, water surplus parts from the total methanol extract of mycelium were tested, respectively. Simultaneously V_c was used as positive control. The experimental results showed that all fractions of the methanol extraction of mycelium from entophytic fungal PFT-2 in *S. cathayanum* had strong scavenging capacity against DPPH·, in which ethanol fraction, acetone fraction and *n*-butanol fraction were almost equivalent to V_c for DPPH· scavenging activity. The IC_{50} value of ethanol fraction for the DPPH· assay was 0.023 mg/mL, which suggested that antioxidant activity of ethanol fraction was even stronger than that of V_c . Meanwhile, the above fractions all revealed strong Fe^{3+} reducing power.

Key words: *Solanum cathayanum*; entophytic fungal; fermentation; antioxidant activity

植物内生菌(entophytic fungal)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各种组织和器官内部或细胞间隙的真菌或细菌^[1]。许多研究^[2-4]表明,植物内生菌能产生多种全新的活性物质,作为生物防治资源、外源基因的载体和新药的来源,在农业、医药、食品卫生领域有着巨大的应用潜

力。

排风藤(*Solanum cathayanum*)为茄科植物千年不烂心的干燥全草,为植物白英的全草^[5]。夏秋采收,晒干,生用,亦用鲜品。生长于海拔 200~1400 m 处山坡阴湿处及灌木丛中,主产于三峡地区的巴东、长阳、秭归、兴山以及神农架,全国大部分地区均有分布^[6]。排风藤其性微寒,味苦,具有清热利湿、解毒消肿之功效,且富含生物碱、黄酮、萜类和甾体等化合物^[7],具有抗炎、保肝护肝和抗氧化活性^[8,9]。

文献^[10]从排风藤中分离得到 18 株菌株,其中两株菌株的代谢产物的抗菌活性较强。目前国内外

收稿日期:2014-11-27 接受日期:2015-04-28

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31370373,21272136);湖北省自然科学基金青年项目(2014CFB327);宜昌市自然基础科学研究与应用专项(A14302a07);三峡大学生物与制药学院 2014 年科技开发预研基金(Hy1403)

* 通讯作者 E-mail: xiangping@ctgu.edu.cn

对排风藤的研究主要集中在排风藤药材提取物的成分和活性^[8,9],而未见排风藤内生真菌代谢产物生物活性的研究报道。本文对排风藤内生真菌 PFT-2 进行发酵扩大培养,并对各提取物做抗氧化活性的研究,为排风藤内生真菌的这一微生物资源的研究开发提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 出发菌株

排风藤内生真菌 PFT-2 (*Rhizoctonia*. sp. PFT02),本实验室提供并培养。

1.2 实验试剂

二苯代苦味肼基自由基(DPPH·),Sigma 公司;石油醚、氯仿、正丁醇、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、Vc、无水乙醇、铁氰化钾、三氯化铁、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、三氯乙酸均为国产分析纯试剂。

1.3 实验仪器

UV-3100 型紫外可见分光光度计,上海美普达仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;GSP-9270MBE 隔水式恒温培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;EYELA 旋转蒸发仪旋转蒸发器;超净工作台,上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

2 实验方法

2.1 培养基

PDA 液体发酵培养基的制备:称取 2000 g 马铃薯,洗净去皮切碎,加水煮沸 0.5 h,纱布过滤,定容至 10 L,再加蔗糖 200 g,充分溶解,分装于三角瓶,200 mL/500 mL 瓶,121 °C,灭菌 30 min。

2.2 种子液制备

将本实验室分离保藏的菌株排风藤 PFT-2 菌株接种到 PDA 斜面培养基中活化,28 °C 恒温培养箱培养 7 d,观察菌株生长状态,是否和母斜面相同。将活化好的 PFT-2 菌株接种到 PDA 液体发酵培养基中,28 °C 恒温摇床培养 3 d 左右,记录观察发酵液特征,如正常可接入发酵培养基扩大培养。

2.3 发酵培养

将上述种子液按照 5% 的接种量接种到 8 L 的 PDA 液体发酵培养基中,即 40 瓶 200 mL /500 mL 装的锥形瓶,28 °C 恒温摇床培养 14 d,观察发酵液状态,菌丝体形态大小、颜色及密度不再变化为准。

2.4 代谢产物分离提取和样品制备

发酵液萃取:将发酵液用 4 层纱布过滤,发酵滤液用等体积的乙酸乙酯萃取,萃取发酵液三次,直至颜色为无色。合并萃取液,置于圆底烧瓶中,旋转蒸去溶剂,得发酵液乙酸乙酯萃取物。

菌丝体提取:发酵液过滤后菌丝体,先 60 °C 烘干,再研磨成粉,称取各菌株菌丝 100 mL,用 800 mL 甲醇超声萃取 3 次,每次 30 min 冷浸抽提,合并提取物旋蒸浓缩得到菌丝体甲醇总提物。取适量菌丝体甲醇总提物用蒸馏水混悬后,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇,丙酮、甲醇提取得到菌丝体甲醇总提物各部位,即石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、丙酮提取物、甲醇提取物、水层剩余物和水不溶物,将所有提取物冷藏于冰箱中,备抗氧化活性测定之用。

2.5 抗氧化活性测定

2.5.1 DPPH·清除能力^[11,12]

向试管中依次加入 1.0 mL 0.15 mmol/L DPPH·溶液和 1.0 mL 甲醇,总体积为 2.0 mL,混匀 20 min 后,测定吸光度(A 为 517 nm),记为 A₀;加入 1.0 mL DPPH·溶液和 1.0 mL 待测试样溶液,测定值记为 A_i;加入 1.0 mL 甲醇和 1.0 mL 待测试样溶液,测定值记为 A_j,按下式计算 DPPH·清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100$$

样品清除 DPPH·能力采用 IC₅₀ 值表示。并以维生素 C(Vc)作抗氧化活性对照实验。

2.5.2 Fe³⁺还原力的测定^[13]

准确称取样品 100 mg,溶剂溶解并定容至 10 mL,配制成质量浓度为 10 mg/mL 样品溶液,稀释成不同质量浓度,取 2.5 mL 各浓度的样品溶液,加入 2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液及 2.5 mL 1% 铁氰化钾,50 °C 水浴反应 20 min 后,急速冷却,加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液混匀,0.2 μm 水相滤膜过滤,取上清液 5 mL,加入 5 mL 0.02% 三氯化铁溶液混匀,10 min 后于 700 nm 波长处测定吸光度 A。吸光度越大则还原能力越大,以 Vc 作为阳性对照。

3 结果与讨论

3.1 发酵液的培养状态

PFT-2 内生真菌接种发酵培养到第 5 d 时,菌丝球的颜色由乳白色逐渐变为黄色,其大小均匀,发酵液无色澄清;PFT-2 内生真菌发酵培养到第 12 d 时,菌丝球变为墨绿色,并且大部分菌丝球变得松散呈

絮状,发酵液仍为澄清无色,此状态持续到第 14 d 发酵结束。

3.2 发酵液乙酸乙酯萃取物和菌丝体甲醇总提物抗氧化活性结果

DPPH[·]是一类较为稳定的芳香类自由基,天然抗氧化物质对 DPPH[·]的清除能力被认为是抗氧化物质清除自由基的总能力,因此 DPPH[·]法被广泛

用于各种物质体外抗氧化活性的研究中。另外 Fe³⁺还原能力的测定,可检验提取物是否为良好的电子供应体,提取物通过提供电子使 Fe³⁺还原为 Fe²⁺,根据体系吸光度的大小可以反应出提取物的还原力强弱,吸光度越大,还原力越强,说明其抗氧化活性就越强。

表 1 各样品对 DPPH[·]的清除率

Table 1 Scavenging rates of samples against DPPH[·] %

样品 Sample	样品质量浓度 Sample concentration (mg/mL)							
	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.50	5.00
1 号 Sample 1	0.26	7.87	18.11	17.85	39.90	49.34	57.48	86.35
2 号 Sample 2	10.59	22.22	23.46	23.70	50.86	56.79	74.07	97.78

注:1 号样品为发酵液乙酸乙酯萃取物;2 号样品为菌丝体甲醇总提物。

Note: Sample 1 was the fermentation liquid of ethyl acetate extract; Sample 2 was the total methanol extract of mycelium.

由表 1 可知,乙酸乙酯萃取 PFT-2 内生真菌的滤液,甲醇浸泡粗提的 PFT-2 内生真菌的菌丝体,两个样品都对 DPPH[·]均有一定的清除活性,并且在一定质量浓度范围内,清除 DPPH[·]的能力均随着样品物质量浓度的增大而增强,而在实验的质量浓度范围内,菌丝体甲醇总提物在各质量浓度条件下清除 DPPH[·]的能力明显强于发酵液乙酸乙酯萃取物,则选择菌丝体甲醇总提物做进一步的抗氧化活性研究。

3.3 菌丝体甲醇总提物的不同极性部位的抗氧化活性

由图 1 可知,在一定质量浓度范围内,菌丝体甲醇总提物的各极性部位对 DPPH[·]的清除作用呈随浓度增大而增加趋势,但当达到一定浓度后样品对 DPPH[·]的清除率随浓度增大,变化趋于平缓,同时各种提取物对 DPPH[·]的清除效果与提取剂的极性也有一定关系,清除效果较好的物质主要集中在甲醇、正丁醇、丙酮等极性较大的溶剂中。在实验的质量浓度范围内,不同有机溶剂的萃取物在各质量浓度条件下清除 DPPH[·]的能力为: V_c > 菌丝体甲醇提取物 > 菌丝体正丁醇部位 > 菌丝体甲醇总提物 > 菌丝体乙酸乙酯部位 > 菌丝体丙酮提取物 > 水层剩余物 > 菌丝体氯仿部位 > 菌丝体石油醚部位,故 PFT-2 内生真菌次级代谢产物中抗氧化活性成分主要分布在甲醇提取物,当质量浓度达到 5.000 mg/mL 时,其清除率达到 83.3%。活性最差的在石油醚部位,当质量浓度达到 5.000 mg/mL 时,其清除率仅为 38.1%。

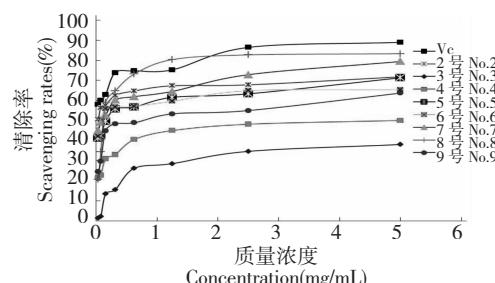


图 1 菌丝体甲醇总提物的不同极性部位对 DPPH[·]的清除率

Fig. 1 DPPH[·] scavenging rates of different polar fractions of the total methanol extract from mycelium

注:2 号样品为菌丝体甲醇总提物;3 号样品为石油醚部位;4 号样品为氯仿部位;5 号样品为乙酸乙酯部位;6 号样品为丙酮提取物;7 号样品为正丁醇部位;8 号样品为甲醇提取物;9 号样品为水层剩余物

Note: Sample 2 was the total methanol extract of mycelium; Sample 3 was the petroleum ether fraction; Sample 4 was n-butanol fraction; Sample 5 was ethyl acetate fraction; Sample 6 was acetone fraction; Sample 7 was chloroform fraction; Sample 8 was methanol fraction; Sample 9 was water residue

3.4 菌丝体甲醇总提物各部位样品对 DPPH[·]清除活性 IC₅₀ 值的影响

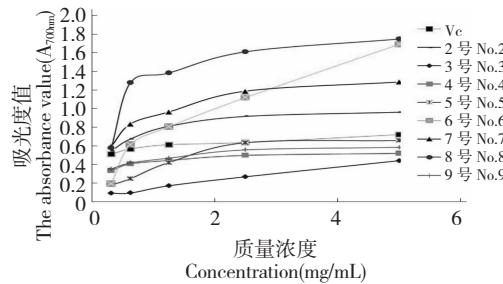
由表 2 可见,萃取物或提取物对 DPPH[·]清除活性 IC₅₀ 值顺序为: 甲醇提取物 < V_c < 丙酮提取物 < 正丁醇部位 < 甲醇总提物 < 乙酸乙酯部位 < 水层剩余物 < 氯仿部位 < 石油醚部位。IC₅₀ 越小说明对 DPPH[·]的清除效果越好,在各种提取物中,甲醇提取物的活性最强。IC₅₀ 值最大的为石油醚提取物 4.510 mg/mL。

表 2 菌丝体甲醇总提物的不同极性部位对 DPPH[·] 清除活性的 IC₅₀ 值Table 2 IC₅₀ values of different polar fractions of the total methanol extract from mycelium in DPPH[·] assay

样品 Sample	V _c	2号 No. 2	3号 No. 3	4号 No. 4	5号 No. 5	6号 No. 6	7号 No. 7	8号 No. 8	9号 No. 9
IC ₅₀ (mg/mL)	0.049	0.173	4.510	3.293	0.185	0.094	0.093	0.023	0.777

注:样品编号同图 1

Note: The numbering of samples were the same as Fig. 1

图 2 菌丝体甲醇总提物的不同极性部位对 Fe³⁺ 还原力曲线Fig. 2 Fe³⁺ reducing power curves of different polar fractions of the total methanol extract from mycelium

注:样品编号同图 1

Note: The numbering of samples were the same as Fig. 1

3.5 菌丝体甲醇总提物的不同极性部位对 Fe³⁺ 还原力测定

由图 2 可看出, PFT-2 内生真菌次级代谢产物的提取物对 Fe³⁺ 具有较强的还原能力, 其还原能力强弱为: 甲醇提取物 > 丙酮提取物 > 正丁醇部位 > 甲醇总提物 > V_c > 乙酸乙酯部位 > 水层剩余物 > 氯仿部位 > 石油醚部位。其中乙酸乙酯部位、水层剩余物、氯仿部位表现出与 V_c 相当的还原能力, 甲醇部位、丙酮提取物、正丁醇部位、甲醇总提物明显强于 V_c; 石油醚部位还原能力弱于 V_c。

4 结论

在 DPPH[·] 的清除实验中, 从清除率及 IC₅₀ 来看, 排风藤 PFT-2 内生真菌的次级代谢产物中抗氧化物质应该主要是一些强极性物质, 这些物质容易被甲醇、正丁醇、丙酮等极性溶剂提取获得, 而氯仿、石油醚等溶剂提取所得的弱极性物质活性很低或者不具活性。

在 Fe³⁺ 还原力的测定实验中, 排风藤 PFT-2 内生真菌的次级代谢产物的提取物的还原力强弱顺序为: 甲醇提取物 > 丙酮提取物 > 正丁醇部位 > 甲醇总提物 > V_c > 乙酸乙酯部位 > 水层剩余物 > 氯仿部位 > 石油醚部位, 与 DPPH[·] 的清除实验所得结

果基本一致。

DPPH[·] 法和 Fe³⁺ 还原力测定结果表明, 排风藤 PFT-2 内生真菌的次级代谢产物具有较强的清除 DPPH[·] 能力。排风藤 PFT-2 内生真菌可大规模固体培养, 且培养基价格低廉, 培养条件容易控制, 其次生代谢产物有望开发为天然抗氧化剂, 并有可能开发为活性抗氧化单体的天然来源。

参考文献

- Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial Ecology of Leaves (Eds Andrews JH, Hirano SS). New York:Spring-Verlag, 1991:179-197.
- Kulnar D, Siva S, Cheung H, et al. In vitro studies of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* with anti-proliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. *J Ethnopharmacol*, 2004, 94:295-300.
- Wagellaar MM, Clardy J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint. *Nat Prod Res*, 2001, 64: 1006-1009.
- Sessitsch A, Reiter B, Berg G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth promoting and antagonistic abilities. *Canadian J Microbiol*, 2004, 50:239-249.
- Zuo XM(左小明), Deng ZS(邓张双), Guo ZY(郭志勇), et al. Isolation and identification of chemical constituents of *Solanum cathayanum*. *J Huazhong Norm Univ, Nat Sci*(华中师范大学学报, 自科版), 2012, 3:322-323.
- Fu SX(傅书遐). *Flora of Hubei* (湖北植物志). Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2002. 517-518.
- Xie MX(谢明霞), Zhou Y(周媛), Zou K(邹坤). Chemical constituents of *Solanum cathayanum*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2008, 31:1332-1334.
- Xie MX(谢明霞), Wang JZ(汪鋆植), Zhou Y(周媛), et al. Protective effect of *Solanum cathayanum* extracts and compounds on acute liver injury. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2009, 25(3):51-53.