

· 制剂与质量 ·

内生镰刀菌漆酶辅助提取槐米中总黄酮的研究

许云峰¹, 张 臻², 周建芹¹, 陈晶磊¹, 王剑文^{1*}

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123; 2. 南京大学生命科学院, 江苏 南京 210093)

摘要:目的 研究内生真菌胞外漆酶在槐米总黄酮提取中的应用。方法 内生镰刀菌在起始pH 7.0的综合马铃薯培养基中, 20℃下摇瓶培养6 d, 具有较高的漆酶活力(36.1 U/mL)。槐米干粉投入真菌发酵液中进行酶解处理, 比较酶料比、酶解温度、酶解时间和酶解液pH值对槐米总黄酮提取率的影响。结果 槐米干粉以酶料比40:1加入粗酶液中, 在pH 7.0、20℃下酶解处理1 h后, 总黄酮提取率可达11.4%, 比常规提取法提高了28.7%。结论 内生真菌漆酶辅助提取法为槐米总黄酮提取的可行新方法。

关键词: 槐米; 内生镰刀菌; 漆酶; 总黄酮; 辅助提取

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)11-1637-04

Total flavonoid extracted from *Sophara japonica* buds with assistant of laccase from endophytic *Fusarium* sp. C-8

XU Yun-feng¹, ZHANG Zhen², ZHOU Jian-qin¹, CHEN Jing-lei¹, WANG Jian-wen¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: **Objective** To study the application of extracellular laccase from endophytic fungi to total flavonoid extraction. **Methods** The extracellular laccase vitality of an endophytic *Fusarium* sp. C-8 from *Artemisa annua* reached 36.1 U/mL when the fungus was cultivated in revised PDA medium with initial pH 7.0 at 20°C on a rotary shaker incubator for 6 d. The crude laccase from the cultural medium was applied for extraction of flavonoid from the buds of *Sophara japonica*. The optimization on the ratio of dry buds to crude enzyme liquid, temperature, time, and pH value was carried out during the process of laccase-assistant treatment. **Results** After incubation with 40:1 of crude enzyme (pH 7.0) at 20°C to dry buds for 1 h, the extraction rate of total flavonoids was 11.4%, a more increase of 28.7% than that in regular extraction process. **Conclusion** The results present a practical method of laccase-assistant extraction process on total flavones in *S. japonica* buds.

Key words: the buds of *Sophara japonica* L.; endophytic *Fusarium* sp. C-8; laccase; total flavonoids; enzyme-assistant extraction

槐米是豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的干燥花蕾, 在中医临床上作为止血药, 治疗痔疮、子宫出血, 并有清肝泻火、治疗肝热目赤的功效。槐米中含有以芦丁为代表的黄酮类化合物。但是槐米中黄酮类物质难溶于水。植物内生菌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, 它们在与植物长期共存和进化过程中建立了一种共生关系。生活在植物内部的内生真菌具有降解一部分植物木质素和纤维素的能力, 具有较高的果胶酶、木聚糖酶、纤

维素酶和多酚氧化酶活性^[1, 2], 单头孢霉属内生真菌具有较高的漆酶活性^[3]。漆酶是一种含铜的多酚氧化酶, 是最主要的3种木质素降解酶之一, 可以有效的降解木质素, 增进植物中有效成分的释放, 提高提取率。目前少见将漆酶等木质素降解酶应用于中药成分提取的报道。为进一步挖掘内生真菌的胞外酶活性以及在中药生物技术中的潜在应用, 本实验以槐米总黄酮为目标, 利用产漆酶的内生镰刀菌粗提液处理槐米, 并优化槐米总黄酮提取的酶法辅助提取工艺。

收稿日期: 2008-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772731); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2007051); 苏州大学青年教师研究基金资助项目(Q3132625)

作者简介: 许云峰(1983—), 男, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向为中药生物技术。Tel: 13646210745 E-mail: yfxu83@yahoo.com.cn

* 通讯作者 王剑文 Tel: (0512)65880025 E-mail: jwwang@suda.edu.cn

1 仪器及材料

22PC型可见分光光度计(上海棱光技术有限公司),电子分析天平(Starorious),PYX—DHS—40X50—S—II型隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),HZQ—X100型恒温振荡培养箱(江苏太仓市实验设备厂),高速冷冻离心机(Beckman Allegra 64R)。

槐米购自四川省中药材公司,经苏州大学药学院刘春宇教授鉴定为豆科植物槐 *S. japonica* L. 的干燥花蕾。芦丁(供定量测定用,批号0080-9705,中国药品生物制品检定所),邻联甲苯胺、NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 内生菌培养及漆酶活性筛选:在加入0.2%没食子酸的PDA培养基(马铃薯20%,葡萄糖2%,琼脂1%,pH值自然)上接种待测真菌^[4],28℃避光培养5d,平板上有脱色圈者表明有漆酶产生。将产酶菌株挑出,接种于马铃薯液体培养基(马铃薯20%,葡萄糖2%,KH₂PO₄0.3%,MgSO₄0.15%,维生素B₁10mg/L,酵母膏0.5%)^[5],振荡培养5d后,测定漆酶酶活力。酶活力以样品与邻联甲苯胺反应5min后吸光度的改变值表示,以每分钟吸光度增加0.01为一个酶活力单位(U/mL)^[6]。

通过没食子酸PDA平板初筛发现内生镰刀菌具有分解没食子酸的能力。该菌分离自黄花蒿 *Artemisia annua* L. 茎韧皮部,菌种保藏在苏州大学药学院真菌资源与菌种保藏室。将筛选出的产酶菌株接种于PDA平板上活化,25℃培养5d后接种于综合马铃薯培养基中,装液量为每个500mL摇瓶装液300mL,接种量为5%,摇床转速为150r/min。在不同温度(10~60℃)和pH值(pH4~9)条件下发酵培养0~12d,以筛选菌株的最佳产酶培养条件。内生镰刀菌的生长曲线见图1。可见发酵至第6天,真菌生长转入生长中后期,此时漆酶酶活力达到最高,为36.1U/mL。

经比较,培养基pH7.0,培养温度为20℃时,内生菌胞外漆酶活性较高,见图2。内生镰刀菌发酵液以5000r/min离心10min,上清液为漆酶粗提液,测定酶活后-80℃保存,使用前测定酶活力。

2.2 槐米总黄酮的测定

2.2.1 溶液的制备:精密称取120℃干燥恒重的芦丁对照品10.0mg,置于20mL量瓶中,加入70%乙醇使其溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为芦丁对照品

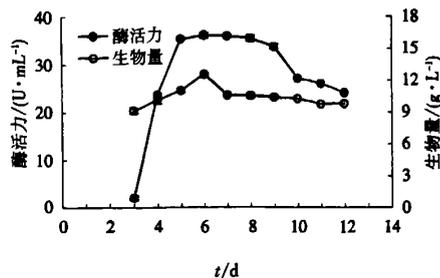


图1 内生镰刀菌的菌丝生物量和胞外漆酶活力
Fig. 1 Mycelia biomass and extracellular laccase vitality of endophytic *Fusarium* sp. C-8

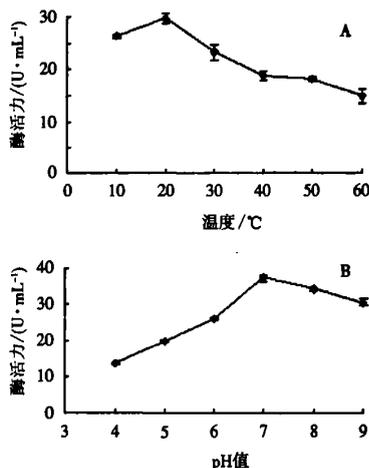


图2 培养温度(A)和培养基pH值(B)对内生镰刀菌胞外漆酶活力的影响
Fig. 2 Effect of culture temperature (A) and pH value of medium (B) on laccase vitality of endophytic *Fusarium* sp. C-8

溶液。槐米烘干磨碎,过60目筛,称取50g,以酶料比40:1加入粗酶液,摇匀后30℃水浴2h,再加入60倍量蒸馏水后室温放置24h,4500r/min离心并吸取上清液5mL,置于25mL量瓶中,加入70%乙醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.2 标准曲线的制备:分别精密吸取0.5mg/mL芦丁对照品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL于10mL量瓶中,用70%乙醇稀释至5.0mL。分别加入5%NaNO₂0.3mL,摇匀,静置6min。加10%Al(NO₃)₃0.3mL,摇匀,静置6min,再加4%NaOH4.0mL,用70%乙醇稀释至刻度,摇匀,静置12min,于510nm处测定吸光度(A)值^[7]。以A为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标进行回归,得方程A=0.8796C+0.0343(r=0.9995)。

2.2.3 样品的测定:取上述制备样品5mL,按标准

曲线的制备项下方法于510 nm处测定A值,根据方程得样品中总黄酮的量,计算槐米中总黄酮提取率(总黄酮提取率=提取液中总黄酮的质量/槐米的质量×100%)。

2.3 酶法辅助提取试验

2.3.1 单因素试验:使用内生镰刀菌漆酶粗提液(酶料比10:1~50:1)处理槐米,在pH值为7.0,酶解2 h后,总黄酮提取率提高了13.8%~65.4%,粗酶提取的最佳温度为20℃,最佳酶料比为40:1,见图3。漆酶处理时,处理液pH值和单一因素变化对总黄酮提取率影响不显著。

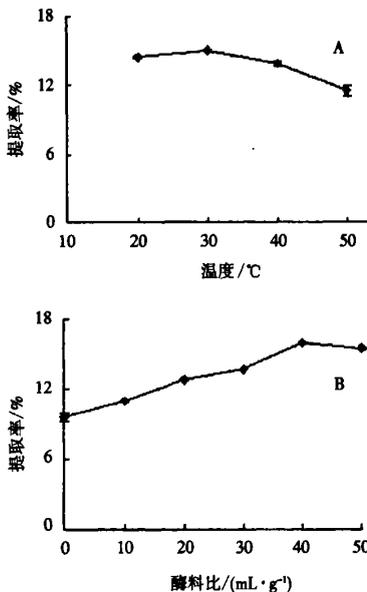


图3 内生菌漆酶处理温度(A)和酶料比(B)对总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effects of treatment temperature (A) and amount of crude laccase from endophytic *Fusarium* sp. C-8 (B) on total flavones extraction rate

2.3.2 正交试验:准确称取槐米干粉,每份50 g,在使用漆酶粗提液处理槐米时,选择不同的处理时间、温度、pH值和酶料比(发酵液量/投料量),分别研究各提取条件对总黄酮提取率的影响。根据单因素的试验结果,选取L₉(3⁴)正交表进行正交试验,结果见表1,并进行极差分析以确定最佳处理条件。方差分析见表2,当考虑因素间的相互作用时,酶解温度对总黄酮提取率的影响程度较显著,其他因素影响不显著。结合单因素试验结果,酶法提取槐米总黄酮的最佳工艺条件为A₁B₂C₃D₁:即酶解温度20℃、pH值7.0、酶料比40:1、酶解时间1 h。

表1 正交试验结果

Table 1 Result of orthogonal test

试验号	A 温度/℃	B pH值	C 酶料 比/(mL·g ⁻¹)	D 酶解 时间/h	提取率/%
1	1(20)	1(6)	1(20:1)	1(1)	11.399
2	2(30)	2(7)	3(40:1)	1	11.422
3	3(40)	3(8)	2(30:1)	1	10.717
4	1	2	2	2(2)	11.024
5	2	3	1	2	11.127
6	3	1	3	2	8.932
7	1	3	3	3(3)	10.786
8	2	1	2	3	10.240
9	3	2	1	3	9.114
K ₁	33.209	30.571	31.640	33.538	
K ₂	32.789	31.560	31.981	31.083	
K ₃	28.763	32.630	31.140	30.140	
R	1.482	0.686	0.280	1.133	

表2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

来源	离差平方和	自由度	方差	F值	显著性
A	4.017	2	2.008	33.676	P<0.05
B	0.707	2	0.353	5.925	
C(误差)	0.119	2	0.06		
D	2.052	2	1.026	17.2	

F_{0.05}(2,2)=19 F_{0.01}(2,2)=99

2.4 验证试验:以总黄酮提取率为指标,精确称取等量(50 g)的槐米干粉,采用试验确定的最佳工艺条件提取,即以酶料比40:1加入槐米干粉中,在pH 7.0、温度20℃下,酶解处理1 h,按该工艺优化条件进行重复试验3次,总黄酮平均提取率可达11.4%,与常规水提法相比提取率提高了28.7%。

3 讨论

能够分泌漆酶的真菌主要集中于担子菌亚门、子囊菌亚门及半知菌亚门等高等真菌,其中担子菌亚门的白腐真菌是产漆酶活性较高的生产菌^[8],镰刀菌属的一些类群产漆酶的能力也较强^[9]。笔者已从黄花蒿中分离到72株内生真菌,一些内生真菌具有较强的抗菌和青蒿素调节等生物活性^[10]。黄花蒿内生镰刀菌的漆酶活性部分反映了内生菌具有在宿主植物内部侵染和共生的能力。

应用活性酶协同常规法进行中药有效成分提取的相关报道目前已引起重视^[11,12],但此类研究中大多使用的是纯酶,成本较高,易受中药成分或其他环境因素的影响。应用内生菌发酵粗酶液提取中药材有效成分的方法还未见报道,本实验采用内生镰刀菌的漆酶发酵液作用于槐米总黄酮的提取,并优化

出酶法提取的最佳条件:以酶料比40:1加入槐米干粉中,在pH 7.0、温度20℃下,酶解处理1 h后,总黄酮提取率可达11.4%,比常规提取率增加了28.7%。使用微生物粗酶辅助法是中药材提取的新方法,值得进一步探讨和进行工艺优化。

参考文献:

- [1] Schulz B, Boyle C, Draeger S, et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites [J]. *Mycol Res*, 2002, 106: 996-1004.
- [2] 史央,戴传超,陆玲,等. 大戟科4种药用植物内生真菌3种胞外酶活性的比较[J]. *植物资源与环境学报*, 2002, 11: 17-20.
- [3] Wang J W, Wu J H, Huang W Y, et al. Laccase production by *Monotropa* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* [J]. *Biores Technol*, 2006, 97: 786-789.
- [4] 王宜磊. 高酶活菌株的筛选及漆酶特性[J]. *微生物学杂志*, 2004, 24: 11-13.
- [5] 朱明旗,曹文敏,李振枝. 栓菌属高产漆酶菌株的筛选及其发酵产酶条件研究初报[J]. *中国农学通报*, 2006, 22: 119-121.
- [6] 王宜磊,朱陶. 漆酶高产菌株的筛选及产酶条件研究[J]. *生态学杂志*, 2002, 21: 27-29.
- [7] 廖华卫,李瑞珍,黄敏仪. 槐花米中药用有效成分芦丁提取方法研究[J]. *现代食品与药品杂志*, 2006, 16: 73-75.
- [8] 王佳玲,余惠生,付时雨,等. 白腐菌漆酶的研究进展[J]. *微生物学通报*, 1998, 25: 233-236.
- [9] 蔡伟建,李峰,李济吾. 镰刀菌(*Fusarium* sp.) HJ01对中性艳蓝GL的脱色降解特性研究[J]. *环境科学学报*, 2007, 27: 213-220.
- [10] Wang J W, Zhang Z, Tan R X. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23: 857-860.
- [11] 陈学伟,马书林. 酶法提取黄芪多糖的研究[J]. *上海中医药杂志*, 2005, 39: 56-58.
- [12] 王邕,黎海彬,白先放,等. 酶解-溶剂法提取罗汉果中黄酮类物质的研究[J]. *食品科技*, 2006, 31: 125-127.

苦瓜籽MAP30的聚乙二醇化学修饰条件优化及纯化研究

张永明,刘盛邦,黄凯,聂宇,孟延发*

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室,四川成都 610064)

摘要:目的 探讨聚乙二醇修饰苦瓜籽核糖体失活蛋白(MAP30)的反应条件以及修饰产物的纯化方法。方法 在不同条件下,将聚乙二醇活性酯(mPEG)₂-NHS与MAP30反应,用SDS-PAGE分析不同反应条件对产物成分的影响;采用Sephacryl S-300 HR分子筛柱色谱法对修饰产物进行分离纯化,TNBS法测定目标产物PEG-MAP30的氨基修饰度。结果 聚乙二醇修饰MAP30的最优反应条件为4℃,pH 8.5硼酸硼砂缓冲液,MAP30质量浓度1 mg/mL,MAP30与(mPEG)₂-NHS质量比1:10为最佳修饰条件,5 min内反应完全;反应产物进一步纯化,经SDS-PAGE检测目标产物PEG-MAP30中不含未修饰的MAP30;TNBS法测定MAP30的氨基修饰度为44.9%。结论 初步确定了聚乙二醇修饰MAP30的反应条件和修饰产物的纯化方法。

关键词: 苦瓜籽;核糖体失活蛋白(MAP30);聚乙二醇;化学修饰

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1640-04

Modification conditions optimization and purification of PEGylated MAP30 from *Semen Momordicae Charantiae*

ZHANG Yong-ming, LIU Sheng-bang, HUANG Kai, NIE Yu, MENG Yan-fa

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Objective To explore conditions for the modification of MAP30 from *Semen Momordicae Charantiae* with polyethylene glycol (PEG) and the method for the purification of PEG-MAP30. **Methods** To analyze the influence of various conditions on the components of PEG-MAP30 by SDS-PAGE, purify PEG-MAP30 by Sephacryl S-300 HR molecular sieve column chromatography, and detect the modification rate of amino by TNBS under the optimal reaction condition with the reaction of (mPEG)₂-NHS and MAP30. **Results** Temperature 4℃, boric acid-borax buffer with pH 8.5, concentration of MAP30 1 mg/mL, the mass ratio of MAP30 to (mPEG)₂-NHS (1:10), and, 5 min for reaction time were selected as the optimal reaction condition. Molecular sieve column showed a good purification effect. The

收稿日期:2008-04-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(C01020404)

作者简介:张永明(1982-),男,河南新乡人,硕士研究生,2005年毕业于河南师范大学生命科学学院,研究方向为蛋白质工程与酶工程。E-mail: dongxiel10@tom.com

*通讯作者 孟延发 E-mail: yfmgeng@163.net