

槐树内生真菌抗氧化活性的初步研究

史佳琴, 周松林, 王梅霞, 陈双林*
(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘 要: 为了确定槐树内生真菌的抗氧化活性, 利用抗氧化能力(T-AOC)测试盒初步测定了分离自槐树的12个内生真菌菌株的总抗氧化活性, 进而采用碘量法比较了总抗氧化活性较高的菌株的抗氧化能力及其动态变化。结果表明, 供试的12株槐树内生真菌均有不同程度的抗氧化活性, 4个菌株的抗氧化活性较高, 7号菌株最高, 达12.54U/ml; 30号菌株经碘量法测定反应10d后的过氧化值仅为39.13meq/kg, 说明其抗氧化活性较高且较稳定。本研究的结果预示着槐树内生真菌在探寻天然抗氧化活性产物中具有重要价值。

关键词: 槐树; 内生真菌; 抗氧化活性

Preliminary Study on Antioxidant Activity of Endophytic Fungi Isolated from *Sophora japonica* L.

SHI Jia-qin, ZHOU Song-lin, WANG Mei-xia, CHEN Shuang-lin*
(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: To evaluate the antioxidant activity of endophytic fungi isolated from *Sophora japonica* L., the total antioxidative capability and stability were assayed by T-AOC reagent box. Those strains with higher total antioxidative capability were also studied and compared by iodometry. The results showed that 12 strains of endophytic fungi isolated from *Sophora japonica* L. have different antioxidant activities. Four strains show higher antioxidant activity, where strain No. 7 reaches 12.54U/ml as the best. Strain No. 30 shows better antioxidative stability, so the POV (peroxide value) of lard tested in the ten days is only 39.13meq/kg. It might be concluded that these endophytic fungi from *Sophora japonica* L. have a potential value as natural antioxidants.

Key words *Sophora japonica* L.; endophytic fungi; antioxidativity

中图分类号: S792.26 Q939.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0250-04

槐树(*Sophora japonica* L.)为豆科槐属中常见的木本药用植物, 其叶、花、果实以及根皮均可入药, 槐花和槐角还可食用。《本草纲目》记述:“槐实, 苦, 寒, 无毒。主治五内邪气热, 止涎唾, ……久服, 明目益气, 头不白, 延年。”从槐树的花蕾、果实中提取的原料药芦丁, 可直接作为药物, 是一种优良的抗氧化剂。槐花和槐角内还含有芸香甙、甾醇、刺槐素、槲皮素等多种抗氧化活性成分, 因此, 槐树是一种获取天然抗氧化剂的重要资源^[1], 在食品工业上有较多应用。

对植物内生真菌产物与活性的研究表明: 植物内生真菌一般能够产生与宿主植物相同或相似的生理活性物质^[2-4], 这为从槐树中分离具有较高抗氧化活性的内生真菌资源, 进而利用其进行天然抗氧化剂的生产和开发利用提供了理论基础。本研究从槐树叶片、叶柄、枝条及果实中分离其内生真菌, 为了探讨其抗氧化活性, 利用抗氧化能力(T-AOC)测试盒初步测定了槐树内生真菌不

同菌株的液体培养物的总抗氧化活性, 从中筛选出抗氧化活性较高的菌株, 再通过碘量法比较了这些总抗氧化活性较高的菌株的抗氧化能力及其动态变化。结果表明, 槐树内生真菌有不同程度的总抗氧化活性, 4个菌株的抗氧化活性则明显高于供试对照的芦丁, 7号菌株最高, 达12.54U/ml; 11个菌株表现出高于芦丁的对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)抑制能力, 7号和11号菌株还高于VC, 分别达到67.29%和65.57%; 碘量法测定30号菌株反应10d后的过氧化值(peroxide value, POV)仅为39.13meq/kg, 表现出了较高且较稳定的抗氧化活性。研究结果预示着槐树内生真菌在探寻天然抗氧化活性产物中具有重要价值, 为进一步研究和开发其活性产物作为天然抗氧化剂提供了基础和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2006-07-01

*通讯作者

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(02KJB180002)

作者简介: 史佳琴(1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事微生物学研究。

分离内生真菌的槐树组织分别采自江苏南京、浙江天目山和安徽滁州。

芦丁 中国药品生物制品检定所 VC 南京建成生物工程研究所。

总抗氧化能力(T-AOC)测试盒和抗超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)测试盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 槐树内生真菌的分离

槐树内生真菌通过常规的植物组织分离法获得^[5], 对分离获得的菌株按真菌形态分类鉴定方法进行鉴定^[6]。

表1 分离获得的供试槐树内生真菌及其来源
Table 1 Strains of endophytic fungi isolated from *Sophora japonica* L. and their sources

菌株编号	宿主槐树的采集地点	分离部位
No. 2	江苏南京	叶柄
No. 7	江苏南京	叶片
No. 11	江苏南京	叶片
No. 12	江苏南京	叶柄
No. 16	浙江天目山	叶片
No. 21	浙江天目山	叶片
No. 22	江苏南京	叶柄
No. 30	江苏南京	种子
No. 45	江苏南京	枝条
No. 53	江苏南京	叶片
No. 55	安徽滁州	叶片
No. 58	安徽滁州	叶片

1.2.2 槐树内生真菌培养液提取物的制备

槐树内生真菌菌株活化后, 取少量菌丝接种于马铃薯葡萄糖液体培养基中, 250ml 三角瓶, 100ml 装液量, 26℃、150r/min 培养7d。滤除菌丝, 滤液用旋转蒸发仪减压蒸发浓缩, 加入等量80%乙醇振荡提取, 5000r/min 离心10min, 弃去沉淀, 上清液再浓缩至黏稠后真空干燥得粗提物。

1.2.3 槐树内生真菌培养液提取物抗氧化活性的测定

取1.2.2所得粗提物以95%乙醇配制成0.15%(W/V)溶液, 芦丁和VC亦制成同浓度乙醇溶液, 用总抗氧化能力(T-AOC)测试盒和抑制超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)测试盒分别测定各菌株粗提物的总抗氧化活性和对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的抑制能力^[7-8], 测试方法参照测试盒说明书。

总抗氧化能力计算公式:

总抗氧化能力(U/ml)=($A_i - A_0$)/0.01÷30(反应液总体积/取样量)×测试前稀释倍数

式中, A_0 为对照管吸光值(OD); A_i 为样品管吸光值(OD)。

在37℃时, 每毫升样品使反应体系的吸光度(OD)值每增加0.01时定义为一个总抗氧化能力单位。

超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除率(%)=(1 - A_i/A_0) × 100
式中, A_0 为对照OD; A_i 为样品OD。

1.2.4 槐树内生真菌培养液提取物抗氧化活性的碘量法测定

取初测总抗氧化活性较高的6株内生真菌的培养液粗提物以95%乙醇配制成0.02%(W/V)溶液, 芦丁也制成同浓度乙醇溶液, 加入60g猪油中, 充分搅拌, 混合均匀, 另取猪油60g, 添加与处理相同量的无水乙醇作空白对照。将所有样品置于60℃下强化保存, 每24h搅拌一次, 用碘量法^[9]逐日测定其过氧化值。每处理均重复3次, 过氧化值取其平均值, 10d之后终止。

过氧化值的测定: 按GB5009.37—2003测定^[10]。

2 结果与分析

2.1 槐树内生真菌的菌株筛选和培养液提取物的总抗氧化能力测定

从采自三地槐树不同组织中共分离获得60株内生真菌, 采用总抗氧化能力(T-AOC)测试盒对它们的培养液粗提物的总抗氧化活性进行初测, 从中筛选出总抗氧化能力较高的12个菌株作为供试菌。其中, 第2、7、11、12、16、21和45号菌株经鉴定为镰刀菌 *Fusarium* spp.; 22号菌株经鉴定为拟茎点霉 *Phomopsis* spp.; 30号菌株经鉴定为壳多孢 *Stagonospora* spp.; 53号菌株经鉴定为刺孢壳 *Chaetomella* spp.; 55号菌株经鉴定为盘长孢 *Gloeosporium* spp.; 58号菌株经鉴定为刺盘孢 *Colletotrichum* spp.。12株内生真菌培养液粗提物的总抗氧化能力见表2。

表2 12株槐树内生真菌培养液提取物及芦丁、VC的总抗氧化能力测定结果

Table 2 Total antioxidativity of extraction of 12 endophytic fungal strains isolated from *Sophora japonica* L. and rutin, VC

菌株编号	对照(A_{520})	样品(A_{520})	总抗氧化能力(U/ml)
No. 2	0.312	0.605	9.76
No. 7	0.106	0.482	12.54
No. 11	0.320	0.694	12.48
No. 12	0.260	0.599	11.32
No. 16	0.104	0.361	8.56
No. 21	0.247	0.602	11.84
No. 22	0.567	0.705	4.60
No. 30	0.074	0.316	8.08
No. 45	0.072	0.353	9.38
No. 53	0.061	0.263	6.73
No. 55	0.014	0.136	4.06
No. 58	0.049	0.195	4.86
芦丁	0.012	0.222	7.00
VC	0.005	0.365	12.00

表2表明, 筛选供试的12株槐树内生真菌提取物均具有较明显的总抗氧化活性, 但有较大差异, 最高的

为7号菌株的12.54U/ml,最低的为55号菌株的4.06U/ml。22、53、55、58号4个菌株低于芦丁,2、12、16、21、30和45号6个菌株高于芦丁而低于VC,7和11号两个菌株高于同浓度的VC。

2.2 槐树内生真菌培养液提取物清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的能力

表3 12株槐树内生真菌培养液提取物与芦丁、VC对超氧阴离子自由基的清除能力测定结果

Table 3 Effects of the extraction of 12 endophytic fungal strains isolated from *Sophora japonica* L. and rutin VC on eliminating superoxide anion radicals

菌株编号	对照(A_{550})	样品(A_{550})	清除率(%)
No. 2	0.700	0.331	52.71
No. 7	0.700	0.229	67.29
No. 11	0.700	0.241	65.57
No. 12	0.700	0.345	51.71
No. 16	0.700	0.380	45.71
No. 21	0.700	0.397	43.29
No. 22	0.622	0.340	45.34
No. 30	0.700	0.289	58.71
No. 45	0.700	0.275	60.71
No. 53	0.622	0.407	34.57
No. 55	0.622	0.313	49.68
No. 58	0.622	0.282	54.66
芦丁	0.622	0.373	40.03
VC	0.622	0.273	61.00

表3表明,供试的12株槐树内生真菌提取物均具有一定的清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的活性,清除率最高的为7号菌株的67.29%,最低的为53号菌株的34.57%,其发酵液提取物的清除率低于芦丁。2、12、16、21、22、30、45、55和58号等9个菌株高于芦丁而低于VC,7和11号两个菌株高于同浓度的VC。0.15%芦丁对于超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除率为40.03%,未达到50%,VC的则为61.00%,二者也不同。在供试菌方面,2、7、11、12、30、45和58号7个菌株发酵液提取物对于超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除能力超过了50%。

2.3 槐树内生真菌培养液提取物的抗氧化活性的稳定性与变化

根据上述12株槐树内生真菌的类型和抗氧化活性差异的代表选择了6个菌株供试于其抗氧化能力变化及稳定性的研究,应用碘量法测定了6个槐树内生真菌菌株培养液提取物对猪油脂质过氧化的抑制能力在反应10d中的变化,结果见表4和图1。

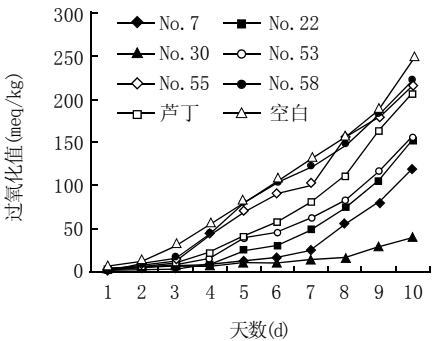


图1 6株槐树内生真菌发酵液提取物与芦丁处理猪油的过氧化值的动态变化

Fig.1 Changing trend of POV of lard coped with the extraction of 6 endophytic fungal strains isolated from *Sophora japonica* L. and rutin

表4和图1的结果表明:6株供试菌发酵液提取物最初的抗氧化能力差异并不大,这可由处理猪油的第一天反应的过氧化值体现,除7号和58号菌株低于芦丁呈现出高于后者的抗氧化性以外,另外4株则均高于芦丁而呈现出低于后者的抗氧化性。随着反应的继续,6株菌的抗氧化活性与芦丁一样均呈现相同的趋势,即过氧化值逐步变大,抗氧化活性逐步减弱。至反应终了的第10d,7、22、30和53号四个菌株仍保持了高于芦丁的抗氧化活性,而55和58号两株菌的抗氧化活性已低于芦丁,其中,30号菌株发酵液提取物对于猪油氧化的抑制能力最强,经碘量法测定,反应10d后的过氧化值仅为39.13meq/kg,而其第1d为3.17meq/kg,是除空白对照外所有处理中第三高的,说明其抗氧化活性比

表4 6株槐树内生真菌发酵液提取物与芦丁处理猪油的过氧化值(meq/kg)

Table 4 POV of lard coped with the extraction of 6 endophytic fungal strains isolated from *Sophora japonica* L. and rutin (meq/kg)

时间(d)	No. 7	No. 22	No. 30	No. 53	No. 55	No. 58	芦丁	空白
1	0.90	3.07	3.17	3.10	3.57	1.63	2.10	6.40
2	3.33	6.77	5.83	6.10	10.33	11.33	6.40	13.27
3	3.83	8.03	6.87	9.17	14.77	17.03	9.80	31.70
4	9.43	8.17	7.63	15.10	44.13	44.73	22.60	55.70
5	11.73	24.80	10.27	39.83	71.30	79.63	41.10	81.80
6	15.87	29.47	10.47	45.57	92.47	104.53	57.10	107.47
7	25.57	48.77	13.83	61.70	102.20	122.53	81.17	132.77
8	55.03	74.83	16.30	82.77	157.2	147.97	110.73	157.26
9	79.93	105.17	28.17	116.2	180.79	182.76	163.43	189.26
10	119.80	152.07	39.13	156.39	217.86	222.29	206.29	247.92

较稳定,可持续较长时间。反应10d后的过氧化值位于30号菌株之后的是7号菌株的119.8meq/kg,而该菌株处理的猪油第1d的过氧化值为0.9meq/kg,呈现出最强的抗氧化活性,这与利用T-AOC测试盒对槐树内生真菌培养液粗提物的总抗氧化活性初测的结果(表2)相吻合,当时,7号菌株表现出了最强的抗氧化活性,总抗氧化能力达12.54U/ml,因此,在供试菌株中7号菌株的综合抗氧化活性也较好。

3 讨 论

实验结果表明,7号菌株发酵液提取物的总抗氧化能力最强(表2)、其清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的能力也最强(表3),说明其抗氧化活性的机制可能在于清除超氧阴离子自由基,以它的发酵液提取物处理猪油的反应第1d的过氧化值为0.9meq/kg(表4),也是所有处理中最低的,说明7号菌株新鲜的发酵液提取物的抗氧化能力最强。相比之下,30号菌株的总抗氧化能力和清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的能力(表2~3)在12个菌株中均处于中间水平,但是,以其处理猪油反应第10d的过氧化值为39.13meq/kg,是所有处理中最低的,可见其抑制油脂氧化的能力更为稳定,同时也暗示着30号菌株和7号菌株可能具有不同的抗氧化机制。从表4和图1的结果来看,7号和30号菌株发酵液提取物处理猪油的反应第1d的过氧化值分别为0.9meq/kg和3.17meq/kg,这与表2中的总抗氧化能力结果是相符的,但是反应3d后30号处理的过氧化值开始低于7号的,以后一直到反应终了的第10d都保持了此趋势,而7号菌株处理的第10d的过氧化值为119.8meq/kg,仅次于30号菌株、远低于芦丁,因此从抗氧化能力及其稳定性上来看,7号和30号两个菌株是较有价值的抗氧化活性菌株。

本研究从槐树组织中初步分离了60株内生真菌,经

过抗氧化活性检测和筛选,表明它们都有不同能力的抗氧化作用,但是菌株间的抗氧化活性差异较大,抗氧化能力同时显著超过对照芦丁和VC的只有两株,这一方面说明抗氧化活性在槐树内生真菌中是一个普遍的生物活性,因此可以以其作为筛选用于天然抗氧化剂开发的重要生物资源,另一方面,鉴于槐树具有以芦丁为代表的多种抗氧化活性产物,其内生真菌也具有抗氧化活性,从而又一次佐证了“植物内生真菌一般能够产生与宿主植物相同或相似的生理活性物质^[3-4]”。不过,并非所有的槐树内生真菌都具有显著的抗氧化活性,而且其抗氧化产物以及抗氧化机理是否与其宿主——槐树相一致是值得深入研究的。

参考文献:

- [1] 王秀坤,李家实,魏璐雪,等.槐属植物化学成分研究概况[J].国外医学:中医中药分册,1996,18(4):7-11.
- [2] STERLE A. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew[J]. Science, 1993, 260: 214-216.
- [3] STROBEL G.A. Rainforest endophytes and bioactive products[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(2): 315-333.
- [4] 谷苏,邵华,蒋晓华,等.药用植物内生真菌多样性及其活性成分的潜在应用价值[J].中国药学杂志,2001,36(1):14-15.
- [5] LI Jia-yao, STROBLE G, SIDHU R, et al. Endophytic taxol-producing fungi bald cypress, *Taxodium distichum*[J]. Microbiology, 1996, 142: 2223-2226.
- [6] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [7] 张丽平,童华荣.抗氧化能力测定方法的研究进展[J].中国食品添加剂,2004(3):108-113.
- [8] ARUOMA O I, MURCIA A, BUTLER J, et al. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 1880-1885.
- [9] 孟洁,杭瑚.诃子抗氧化作用的研究[J].食品科学,2000,21(2):9-12.
- [10] 食品卫生检验方法:理化部分(一)[S].北京:中国标准出版社,2003:306-307.

信 息

日本开发出控制鸡蛋大小新技术

日本农林水产省畜产实验场最近开发出通过控制鸡饲料成分来控制鸡蛋大小的技术。

由于日本消费者采购食品喜欢大小均匀个体适中的产品,鸡蛋也不例外,过大过小都会影响其价格。畜产实验场开始研究控制鸡蛋大小的饲养方法。研究人员在刚进入产蛋期的鸡饲料中添加各种物质,观察鸡蛋大小的变化。结果,他们发现在饲料中掺入亚油酸可促进鸡蛋的生长,亚油酸在饲料中的比例为0.68%时,每个鸡蛋的重量基本上保持在58.8g。当亚油酸的比例提高到2.83%时,每个鸡蛋的重量可达到59.6g。向日葵油和玉米油中都含有亚油酸。研究人员还发现,若鸡所产的蛋过大,只要在饲料中添加牛黄酸就可以使鸡蛋变小。实验证明,在饲料中添加0.5%的牛黄酸,鸡蛋的重量就可以下降1g。