

超声波法提取凹叶厚朴内生真菌代谢产物

耿直 (陕西国际商贸学院, 陕西西安 712046)

摘要 [目的]优化超声波法提取凹叶厚朴内生真菌代谢产物的工艺。[方法]采用正交试验设计,以超声温度、超声时间、超声功率为考察因素,以厚朴酚的含量为指标,采用高效液相色谱法,确定发酵液的最佳超声提取条件。[结果]最佳超声提取条件为超声温度 50 ℃、超声时间 60 min、超声功率 100 kHz。[结论]该方法能够用于内生真菌发酵液中代谢产物提取。

关键词 凹叶厚朴;内生真菌;超声提取;正交试验

中图分类号 S567.1⁺1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)01-0122-02

Ultrasonic Extraction of *Magnolia officinalis* Endophytic Fungi Metabolites

GENG Zhi (Shaanxi Institute of International Trade Commerce, Xi'an, Shaanxi 712046)

Abstract [Objective] The aim was to optimize the technique for extracting endogenous fungal metabolites from *Magnolia officinalis* with ultrasonic method. [Method] Using orthogonal test design, with ultrasonic temperature, ultrasonic time, ultrasonic power as investigated factors, the content of magnolol as indicator, adopting HPLC method, the optimum ultrasonic extraction conditions of mycelia were obtained. [Result] The optimum ultrasonic extraction conditions were as following: ultrasonic temperature 50 ℃, ultrasonic time 60 min, ultrasonic power 100 kHz. [Conclusion] The method can be used to extract endogenous fungal metabolites in the fermented liquid.

Key words *Magnolia officinalis*; Endophytic fungi; Ultrasonic extraction; Orthogonal test

凹叶厚朴(*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils.)为木兰科木兰属厚朴植物(*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.)的变种,是我国特有的树种,具有很高的药用价值。凹叶厚朴在临床上多以复方入药,故用量很大,因厚朴药材的药用部位为干燥的根、皮,导致这一资源的破坏,这极度不符合资源合理利用和环境保护^[1]。

植物内生真菌是属于天然组成成分,在生物发展史上有极其丰富的代谢产物。研究表明,几乎所有的植物组织中都含有内生真菌。另有大量研究报告指出,在现有的植物体中,其内生真菌也能够产生与宿主相同或相似的次生代谢产物^[2]。厚朴内生真菌长期生活在厚朴植物体内,在漫长的进化过程中,可以产生与厚朴植物化学成分相似的代谢产物,即厚朴酚与和厚朴酚^[3]。由于内生真菌代谢产物成分复杂多样,而传统的提取方法严重不足,影响内生真菌的开发与利用,因此,必须开发新的技术提取。超声波提取技术发展日益成熟化,用该技术提取内生真菌发酵液中生理活性物质逐渐成为趋势^[4]。目前,有学者对厚朴内生真菌的分离鉴定进行了研究^[5-6],但对厚朴内生真菌代谢产物的报道较少。笔者利用超声提取技术对凹叶厚朴的内生真菌代谢产物进行研究,深入了解超声提取技术对内生真菌代谢产物的提取效率,为超声提取内生真菌代谢产物的合理性提供理论依据,以提高中药资源凹叶厚朴的利用率。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种来源。菌种于 4 ℃ 冰箱保存在陕西国际商贸学院微生物实验室,编号 YX-24(分离自凹叶厚朴)。

1.1.2 试剂。厚朴酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 140823);KH₂PO₄(天津市红岩化学试剂厂);MgSO₄·

7H₂O(天津市津北精细化工有限公司);葡萄糖(天津市河东区红岩试剂厂);其余试剂为分析纯;水为纯净水。

1.1.3 仪器。电子天平(YP-2102,上海光正医疗仪器有限公司);立式压力蒸汽灭菌器(LDZM-40KC,上海申安医疗器械厂);恒温恒湿培养箱(SPX-150-C,上海琅环实验设备有限公司);恒温振荡器(HZQ-R,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);旋转蒸发器(RE-52AA,上海亚荣生化仪器厂);Waters 高效液相色谱仪(e2695 型,上海冉超光电科技有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 培养基的配制。液体发酵培养基(PDA 培养基):马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、KH₂PO₄ 3 g、MgSO₄·7H₂O 0.75 g、水 1 000 mL,121 ℃ 灭菌 15 min。

1.2.2 液体发酵培养。配制好的液体培养基(按“1.2.1”培养基配方)灭菌后于超净工作台静置过夜,确认其没有污染后,将菌株接种于内装液体发酵培养基的三角瓶中,每菌株 3 瓶,于 28 ℃、140 r/min 摇床上培养 3~4 d。

1.2.3 色谱条件。Waters e2695 型高效液相色谱仪,流动相为甲醇-水(78:22),柱温 25 ℃,检测波长 294 nm。

1.2.4 对照品溶液制备。精密称定厚朴酚对照品适量,加甲醇定容至 25 mL,即得。

1.2.5 供试品溶液制备。待菌丝体布满培养基后,抽滤发酵液,菌液加等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,收集乙酸乙酯相。菌丝放入 -20 ℃ 冰箱冷冻,待菌丝冻融后,取出,放入研钵研磨至菌丝体完全破碎,呈糊状,同样加等体积乙酸乙酯,在超声条件下提取,收集乙酸乙酯相。合并上述两者乙酸乙酯相,于 55 ℃ 旋转蒸发至干,以甲醇定容至 25 mL 容量瓶中,作为供试品,待测。

1.2.6 正交试验设计。以超声温度(A)、超声时间(B)、超声功率(C)为考察因素,选取 3 因素 3 水平进行多因素的正交试验,按 L₉(3⁴)进行试验(表 1),以厚朴酚的含量为指标,采用高效液相色谱法,确定菌丝的最佳超声提取条件。

基金项目 陕西省教育厅 2014 年科学研究计划(专项项目,14JK2010)。

作者简介 耿直(1985—),男,陕西西安人,讲师,硕士,从事生物工程及植物生物技术研究。

收稿日期 2016-09-28

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平 Level	A(超声温度 Ultrasonic temperature) // °C	B(超声时间 Ultrasonic time) // min	C(超声功率 Ultrasonic power) // kHz
1	30	60	80
2	40	90	90
3	50	120	100

2 结果与分析

由表 2 可见,各因素对凹叶厚朴内生真菌代谢产物厚朴酚提取量的影响程度从大到小依次为 C、A、B,即超声功率是影响厚朴酚提取量的主要因素。凹叶厚朴内生真菌发酵液的最佳超声提取工艺条件为 A₃B₂C₂,即超声温度为 50 °C、超声时间为 90 min、超声功率为 90 kHz。然而由于因素 B 中各均值数值相差不大,且超声提取时间过长导致温度升高,影响厚朴酚含量;另外,超声波提取功率越高对细胞的破坏越彻底,内生真菌代谢产物提取量越多,综合分析考虑确定最佳超声提取功率为 100 kHz。最终确定最优提取工艺为超声温度 50 °C、超声时间 60 min、超声功率 100 kHz。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal test

试验号 Test No.	A	B	C	厚朴酚含量 The content of magnolol // mg/mL
1	1	1	1	0.002 845
2	1	2	2	0.004 818
3	1	3	3	0.002 412
4	2	1	2	0.003 551
5	2	2	3	0.003 920
6	2	3	1	0.003 363
7	3	1	3	0.005 007
8	3	2	1	0.002 959
9	3	3	2	0.004 405
k_1	0.034	0.038	0.031	
k_2	0.036	0.039	0.043	
k_3	0.041	0.034	0.038	
R	0.007	0.050	0.012	

(上接第 121 页)

3 结论

对萝卜叶中不同萃取组分及其 AChE 抑制活性进行研究,以石杉碱甲为对照品,对萝卜叶中 6 个不同萃取组分的乙酰胆碱酯酶抑制活性进行试验。结果表明,6 个组分样品均表现出一定的 AChE 抑制活性,其 AChE 抑制活性与其样品浓度均表现出一定的浓度依赖关系。由 6 个不同萃取组分样品的 IC₅₀ 值可知,其抑制 AChE 的活性从大到小为二氯甲烷组分、乙酸乙酯组分、石油醚组分、正丁醇组分、水相、萝卜叶水提原液。由此可见,萝卜叶具有较好的 AChE 抑制活性,同时为萝卜叶中 AChE 抑制活性成分的跟踪分离提供试验依据。

3 结论与讨论

试验结果表明,超声波法提取凹叶厚朴内生真菌代谢产物最佳超声提取工艺为超声温度 50 °C、超声时间 60 min、超声功率 100 kHz。在对菌丝体的提取时,采用了超声波萃取技术。超声功率是影响厚朴酚含量最大的因素,这是因为超声波在工作时,通过振动、空化效应加快相之间的传质速度,使有效成分和溶剂的交互作用增强,使有效成分更充分地溶入溶剂,提高有效成分的提取效果。

在对菌丝超声时,因实验室超声波清洗仪的规格原因,在仪器工作一段时间后,很明显出现温度上升的趋势,经过多次试验测量,结果表明在 60 min 之内,超声波清洗仪内水的温度均高出预设温度 5 ~ 7 °C,因此,在试验过程中设置温度时均比正常的试验温度低 5 ~ 7 °C,且使仪器每工作 20 min,间隔 10 min,更好地控制变量对试验结果的影响,控制试验结果的准确性。

在试验中,对菌液进行等量的乙酸乙酯萃取 3 次,使得菌液中含有的有效成分充分地融入乙酸乙酯相中。每次发酵液中菌丝体的量不是很多,相比菌液量明显很少,且在提取菌丝体时,仅以等量的乙酸乙酯超声萃取 1 次。可见,原本就不多的菌丝体含量相比菌液显得微不足道。因此,前人在研究各种内生真菌的发酵液时,有的直接就舍弃了菌丝体的提取。该试验不但研究菌丝体,且研究用超声萃取技术提取菌丝体的最佳提取工艺。

参考文献

- [1] 斯金平,童再康,曾燕如,等.厚朴种质资源评价与利用研究[J].中药材,2002,25(2):79-81.
- [2] 王兴红.内生真菌与天然产物研究进展[J].中草药,2007,38(1):140-143.
- [3] 马昭,唐承晨,张纯,等.内生菌与宿主植物关系对中药材道地性研究的启示[J].上海中医药大学学报,2015,29(6):4-11.
- [4] 杨海麟,吕霞付,杨胜利,等.超声波在生物发酵工程中的应用[C]//中国生物工程学会.中国生物工程学会第三次全国会员代表大会暨学术讨论会论文摘要集.北京:中国生物工程学会,2001:1.
- [5] 庞蕾,严铸云,郭晓恒,等.厚朴内生真菌的研究(I):菌种分离及其鉴定[J].时珍国医国药,2006,17(10):2013-2014.
- [6] 全保慧,关铭.厚朴内生真菌的分离鉴定及药理学活性的分析[J].湖南中医药大学学报,2009,29(7):36-40.

参考文献

- [1] 汪隆植,何启伟.中国萝卜[M].北京:科学技术文献出版社,2005:1-6.
- [2] 郑一美,周福富.莱菔叶的药效应用及有效成分的提取分离研究[J].亚太传统医药,2008,4(11):49-50.
- [3] 张明,李盾,陈仪本,等.乙酰胆碱酯酶分子生物学研究进展[J].农药,2006,45(1):8-11.
- [4] 杨建红,陶媛媛,张云梅,等.药用植物中乙酰胆碱酯酶抑制剂研究进展[J].云南化工,2006,33(6):78-82.
- [5] 张翼,冯妍,李晓明,等.海藻组分抑制乙酰胆碱酯酶活性研究[J].海洋与湖沼,2005,36(5):459-464.
- [6] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V, Jr, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7(2):88-95.
- [7] 殷帅文,刘丽萍,王安萍,等.17 种植物不同溶剂萃取物乙酰胆碱酯酶抑制活性研究[J].江苏农业科学,2012,40(10):293-296.