

# 蛹拟青霉代谢产物清除自由基和抑制单胺氧化酶活性的研究\*

陈安徽<sup>1</sup>, 邵颖<sup>1</sup>, 陈宏伟<sup>1</sup>, 吴海亮<sup>2</sup>, 樊美珍<sup>2</sup>

1(徐州工程学院食品生物学院, 江苏 徐州, 221008) 2(安徽省微生物防治重点实验室, 安徽 合肥, 230036)

**摘 要** 用二苯代苦味肼基自由基(DPPH)—TLC法和酶标仪法对1株蛹拟青霉 RCEF0892 摇瓶发酵菌丝体及发酵液甲醇-乙酸乙酯[V(甲醇):V(乙酸乙酯)=1:1]提取物清除自由基活性进行了定性和定量分析,发现该菌株发酵液提取物具有较强的清除自由基活性,在浓度为5.0 mg/mL,于37℃下保温10min时,它对0.4 mg/mL的DPPH自由基的清除率可达79.92%。同时,以大鼠肝脏线粒体单胺氧化酶为靶标的体外实验发现,RCEF0892菌株菌丝体提取物具有较强的抑制单胺氧化酶活性,且其活性和浓度呈量效关系,其对大鼠肝脏线粒体单胺氧化酶的半数抑制浓度IC<sub>50</sub>为81.39 μg/mL。

**关键词** 蛹拟青霉, 自由基, 单胺氧化酶

虫草是一类十分重要的药用真菌,是寄生于昆虫体上的真菌与其寄主昆虫形成的虫菌复合体,隶属于子囊菌门(Ascomycotina),核菌纲(Pyrenomycetes),麦角菌科(Clavicipitales),虫草属(Cordyceps)<sup>[1]</sup>。对蛹虫草及其无性型(蛹拟青霉)的研究已经引起国内外学者的高度重视。大量研究结果表明,蛹虫草生药及其无性型菌丝体含有丰富的虫草多糖、甾醇类物质和核苷等活性成分;蛹虫草生药及其无性型菌丝体具有广泛的药理活性,包括抗菌、抗炎、抗癌、雄性激素样作用等<sup>[2~4]</sup>。

虽然对蛹虫草及其无性型已有较多研究,但还未见其清除DPPH自由基及抑制单胺氧化酶活性的综合研究报告。研究表明,单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)是在机体内参与胺类物质代谢的主要酶类之一,具有十分重要的生理功能,当其活性过强时不仅会直接造成胺类神经递质不足,同时过多的氧化脱胺而产生自由基会进一步损伤神经组织,导致相关病症的出现,如目前发病率逐年升高的抑郁症和帕金森综合症等就与单胺氧化酶活性过强有关。另外,人体内很多疾病与机体内的自由基有着密切的关系,对自由基方面的研究已经引起医学学者的高度重视<sup>[5]</sup>。因此,对单胺氧化酶抑制剂和自由基清除剂的研究已成为寻找有关治疗药物的热点。本研究将对1株蛹拟青霉(*Paecilomyces militaris* (Kob.)

Brown & Smith ex Liang)菌丝体和发酵液的甲醇-乙酸乙酯提取物分别进行了清除DPPH自由基和抑制单胺氧化酶活性的研究,为进一步结构研究和相关的药物开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及其来源

蛹虫草无性型菌株:蛹拟青霉菌株 RCEF0892,由安徽农业大学微生物防治省重点实验室提供。

### 1.2 培养基

固体斜面培养基:葡萄糖 40 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母浸出粉 10 g/L,琼脂 20 g/L,蒸馏水 1 000 mL。

液体摇瓶培养基:葡萄糖 40 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母浸出粉 10 g/L,蒸馏水 1 000 mL。

### 1.3 主要试剂和仪器

试剂:二苯代苦味肼基自由基(DPPH)、kynuramine dihydrobromide 均为 Sigma 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)、无水乙醇、甲醇、三氯甲烷等均为国产分析纯试剂。

主要仪器:TUMEN TL-15 高速离心机,江苏图们离心机厂;FREEZONE 12 冻干机,美国LABCONCO公司;梅特勒 AE200 型电子天平,上海分析仪器厂;Spectra M2 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;高效硅胶板 GF254,青岛海洋化工。

### 1.4 研究方法

#### 1.4.1 菌株的培养及样品的准备

用1.2中液体培养基,灭菌后以5%的接种量接

第一作者:博士。

\* 国家自然科学基金资助项目(30570004;30570189)

收稿日期:2008-03-31

入一级液体种子,置于 160 r/min, 25℃ 摇床上培养 7 d 后抽滤,菌丝体冻干,发酵液减压浓缩至原体积的 1/4,然后加入 95% 乙醇沉淀,使其终浓度为 75%, 4℃ 冰箱放置过夜后离心,弃沉淀,将上清液在 40℃ 条件下进一步浓缩后冻干。分别称取 5g 发酵液和菌丝体冻干品,加入 50 mL 的甲醇和乙酸乙酯混合提取液 $[V(\text{甲醇}):V(\text{乙酸乙酯})=1:1]$ 于超声波振荡器中(功率 250W, 频率 33kHz)浸提 30 min, 然后 2 000r/min 离心 5min, 取上清液, 挥去溶剂后, 称重, 用甲醇将提取物分别配成 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL 和 10 mg/mL 的样品溶液, 作为供试样品 I。另外, 将上述 2 种提取物分别用 12.5% DMSO 配成浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DMSO 样品液, 作为供试样品 II。

参考 Andrew Holt 等(1997)方法, 制备大鼠肝脏线粒体单胺氧化酶精酶<sup>[6]</sup>。

#### 1.4.2 蛹拟青霉 RCEF0892 菌丝体和浸提物清除自由基活性定性分析

取浓度为 10 mg/mL 上述提取物的甲醇溶液进行 DPPH 薄层试验, 以 1.0 mg/mL 的抗坏血酸甲醇溶液为阳性对照。点样量为 4 $\mu\text{L}$ , 展开剂为  $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=65:35$ 。等流动相到达距薄层板上沿 1cm 的地方, 取出让展开剂自然挥去, 在 254nm 紫外灯下, 用铅笔标记荧光猝灭斑点, 然后喷浓度为 0.4 mg/mL 的 DPPH 95% 乙醇溶液进行显色。

#### 1.4.3 蛹拟青霉 RCEF0892 甲醇浸提物清除自由基活性的定量分析

参考胡丰林等的 DPPH 试剂酶标仪法<sup>[5]</sup>。用移液器准确量取各浓度样品 I 100 $\mu\text{L}$  放入 96 孔板中, 同时加入事先用 95% 乙醇配好的 0.4 mg/mL 的 DPPH 试剂 100 $\mu\text{L}$ 。上述每个测试做 3 个重复, 之后把 96 孔板置于酶标仪中振动 30 s, 在 517nm 下检测 1 次; 于 37℃ 保温 10 min 后再测定 1 次。

$$\text{相对清除率}/\%=[1-(A_p-A_c)/A_{\max}]\times 100$$

其中:  $A_p$ —样品加入 DPPH 试剂的吸光值;  $A_c$ —样品不加入 DPPH 试剂的吸光值;  $A_{\max}$ —DPPH 试剂不加样品(以甲醇代替样品)的吸光值。

#### 1.4.4 单胺氧化酶抑制剂活性的测定<sup>[7,8]</sup>

用上述制备的精酶液 75 $\mu\text{L}$  先和 5 $\mu\text{L}$  各浓度供试样品 II 于 96 孔板上于 37℃ 条件下保温 10 min, 然后向各孔中加入浓度为  $1.5\times 10^{-3}$  mol/mL 的底物 20  $\mu\text{L}$  混匀, 使 DMSO 溶剂的最终含量为 5%。空白对

照是以 5 $\mu\text{L}$  的 DMSO 溶剂代替待测样品, 在 360 nm 波长下, 测定开始时混合物的吸光值, 保温 15 min 再测其吸光值。根据前后吸光值的单位时间变化来确定样品的相对抑制率, 每个样品处理 3 个重复。

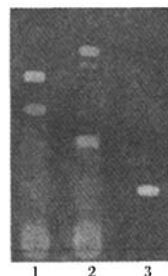
$$\text{相对抑制率}/\% = 1 - [(A_1 - A_2) / \Delta A_0] \times 100$$

其中,  $A_1$ —一起始时底物和酶样品混合液的吸光值;  $A_2$ —反应 40min 后的底物和酶样品混合液的吸光值;  $\Delta A_0$ —空白对照前后吸光值的差值。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛹拟青霉 RCEF0892 菌丝体和发酵液提取物清除自由基活性的定性测定

按 1.4.2 方法进行点样和展开, 划出 254 nm 下荧光猝灭斑点后喷 DPPH 试剂, 5 min 后的薄层扫描图谱见图 1。从图 1 可见, 样品点和阳性对照均有黄色斑点呈现, 说明它们都具有清除自由基的活性, 因为 DPPH 为一稳定的有机自由基, 它能够强烈地吸收 517nm 的光而呈紫色, 当它与自由基清除剂反应时, 其孤电子被配对, 此时其吸收光发生蓝移而呈现黄色。



1—RCEF0892 菌丝体提取物; 2—RCEF0892 发酵液的提取物; 3—抗坏血酸

图 1 提取物 DPPH 试验谱图

由图 1 可见, 样品点和阳性对照均有黄色斑点呈现(黑白图片中为白色), 说明供试样品均具有清除自由基的活性成分, 菌丝体提取物中有 2 个主要的活性成分, 发酵液提取物样品中有 3 个清除自由基的活性的成分, 且 2 种样品中清除自由基活性成分在薄层板上的  $R_f$  值均不相同, 说明 2 种样品中自由基清除剂为不同物质。

### 2.2 蛹拟青霉 RCEF0892 菌丝体和发酵液提取物清除自由基活性的定量测定

为了进一步确定样品 I 清除 DPPH 自由基的活性大小, 分别按上述配制的样品浓度进行定量测试。根据 DPPH 自由基的特性, 选择波长 517nm 作为测

试波长,根据吸光值变化大小来确定样品的清除自由基能力大小。实验结果如表 1 所示。

表 1 不同浓度样品对 DPPH 自由基的相对清除率

样品反应浓度 /mg · mL <sup>-1</sup>	自由基相对清除率/%			
	菌丝体提取物		发酵液提取物	
	0 min	10 min	0 min	10 min
0.5	10.24±0.57	17.65±0.41	18.13±0.58	30.32±0.15
1	14.32±0.78	23.48±0.59	24.78±0.61	37.54±0.38
2.0	19.34±0.43	32.17±0.65	35.46±0.73	48.79±0.72
4.0	24.19±0.85	43.26±0.77	43.97±0.85	68.45±0.80
5.0	31.23±0.66	58.44±0.34	56.36±0.72	79.92±0.53

从表 1 的结果可以得出,发酵液提取物甲醇液清除 DPPH 自由基的活性相对较强,当浓度相同时,无论是否保温,发酵液提取物清除 DPPH 自由基活性均显著高于菌丝体提取物 ( $P < 0.05$ )。当样品浓度为 5.0 mg/mL 时,37℃ 保温 10min 发酵液提取物对 0.4 mg/mL DPPH 自由基清除率达到 79.92%。另外,发现 2 种提取物均随着样品浓度的递增其自由基

清除活性增强,当样品的浓度一定时,随保温时间延长其自由基清除活性亦增强。

### 2.3 蛹拟青霉 RCEF0892 菌丝体和发酵液提取物对 MAO 活性的抑制效果

按照 1.4.4 的方法加入供试样品 II,并进行抑制单胺氧化酶活性进行测试,每个浓度样品设 3 个重复。实验结果见表 2。

表 2 不同浓度样品对单胺氧化酶的相对抑制率

原始样品浓度 /μg · mL <sup>-1</sup>	反应浓度 /μg · mL <sup>-1</sup>	样品 II 对单胺氧化酶的相对抑制率/%	
		菌丝体提取物	发酵液提取物
25	12.5	6.63±0.14	1.12±0.11
50	25	13.93±0.32	2.52±0.27
100	50	29.97±0.24	6.71±0.34
200	100	54.98±0.47	14.97±0.37
400	200	81.75±0.83	23.91±0.63

表 2 的结果表明,蛹拟青霉 RCEF0892 摇瓶发酵液和菌丝体甲醇提取物对大鼠肝脏线粒体单胺氧化酶相对抑制率呈明显的量效关系,随着样品浓度的增加,其抑制率增大。在供试的样品浓度范围内,供试样品浓度与其对酶的相对抑制率极显著相关,相关系数都在 0.96 以上。但是,菌丝体提取物的活性明显强于发酵液提取物 ( $P < 0.05$ ),经计算,该菌株菌丝体冻干品提取物对单胺氧化酶的半数抑制浓度  $IC_{50}$  为 81.39 μg/mL,而发酵液冻干品提取物对大鼠肝脏线粒体单胺氧化酶的半数抑制浓度  $IC_{50}$  为 456.49 μg/mL。

### 3 结论与讨论

上述研究结果表明,蛹拟青霉 RCEF0892 菌株的发酵液甲醇提取物具有较强的清除自由基活性,在浓度为 5.0 mg/mL,于 37℃ 下保温 10 min 时,它对 0.4 mg/mL 的 DPPH 自由基的清除率可达 79.92%,菌丝体提取物清除自由基活性相对较弱,在浓度为 5.0 mg/mL,于 37℃ 下保温 10 min 时,它对

0.4 mg/mL 的 DPPH 自由基的清除率仅为 58.44%,说明 RCEF0892 菌株清除 DPPH 自由基的活性成分主要存在于发酵液中。单胺氧化酶试验结果显示,RCEF0892 菌株抑制单胺氧化酶活性物质主要存在于菌丝体中,菌丝体提取物对单胺氧化酶的半数抑制浓度  $IC_{50}$  为 81.39 μg/mL,而 RCEF0892 菌株发酵液冻干品的提取物对大鼠肝脏线粒体单胺氧化酶的相对抑制率相对较低。由于目前被称为都市流行感冒的抑郁症的发病率逐年升高,而随着人口的老龄化的加剧以及帕金森综合症作为一种常见的老龄病其发病人数也越来越多,开发相关药物将具有较大的经济价值和社会价值。因此,值得对蛹拟青霉 RCEF0892 菌株发酵液中的自由基清除剂和单胺氧化酶抑制剂作深入研究。

### 参 考 文 献

- 傅岚,陈作红. 虫草属真菌化学成分及药理作用研究进展[J]. 生命科学研究, 2004, 8(1): 1~7
- Lin Yuwei, Chiang Been Huang. Anti-tumor activity of

- the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(3):244~250
- 3 So-Young Won, Eun-Hee Park. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 96(3):555~561
  - 4 Kyungah Jung, In-Ho Kim, Daeseok Han. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 93(1): 75~81
  - 5 Hu F L, Schmidt K, Stoyanova S, et al. Free radical scavengers from the entomogenous deuteromycete *Beauveria amorpha* [J]. *Planta Medica*, 2002, 68: 64~65
  - 6 Andrew Holt, Dennis F, Sharman, et al. A Continuous Spectrophotometric Assay for Monoamine Oxidase and Related Enzymes in Tissue Homogenates[J]. *Analytical Biochemistry*, 1997, 244: 384~392
  - 7 Schmidt K, Li Z, Schubert B, et al. Screening of entomopathogenic Deuteromycetes for activities on targets involved in degenerative diseases of the central nervous system[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 89: 251~260
  - 8 Weissbach H, Smith T, Daly J, et al. A rapid spectrophotometric assay of monoamine oxidase based on the rate of disappearance of kynuramine[J]. *Journal of Biochemistry*, 1960, 235 (4):1 160~1 163

## Study on Scavenging and Monoamine Oxidase Inhibitory Activities of the Metabolite of *Paecilomyces Militaries*

Chen Anhui<sup>1</sup>, Shao Ying<sup>1</sup>, Chen Hongwei<sup>1</sup>, Wu Hailiang<sup>2</sup>, Fan Menzhen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Food Engineering Department, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

<sup>2</sup>(Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control, Hefei 230036, China)

**ABSTRACT** DPPH-TLC and DPPH-Microplate assays were used to determine the free radical scavenging activities of the extracts from the fermentation broth and mycelia of *Paecilomyces militaries* RCEF0892. The results revealed that the extracts had strong free radical scavenging activities. At concentration of 5.0 mg/mL the extract from fermentation broth of RCEF0892 could decrease 79.92% of 0.4 mg/mL DPPH radicals after incubating at 37°C for 10 minutes. A rat liver monoamine oxidase assay showed that the extract from fermentation mycelia of RCEF0892 has strong MAO inhibitory activity. It has a dose-dependent manner with IC<sub>50</sub> of 81.39 µg/ml.

**Key words** *Paecilomyces militaris*, free radical, monoamine oxidase

### 2008年世界香料香精市场回顾

预计香料香精的世界需求量将以每年4.7%的速度增长,2008年将会增加至190亿美元。大多数发达国家的芳香工业的发展相对缓慢,发展中国家的市场潜力巨大,食品加工和消费品品制造工业持续发展,国民生产总值和个人收入水平不断提高,国际投资活跃,这些因素将丰富世界香料香精需求。

一直以来,香料香精的供给和需求被西欧,美国,日本等地区垄断,直到2003年,这些地区占世界总需求的65%,及世界总生产的75%。但是,国内市场已经成熟的美国、德国、法国和英国不得不依赖于发展中国家,扩大投资项目,保持竞争力。在过去10年,亚太、拉丁美洲和东欧见证了该产业的迅速成长,到2008年,这些地区的市场都将会充满机会。

2008年,香料仍然是香料香精行业比重最大的产品,得力于发展中国家香料香精市场的发展,发达国家的消费量不断增长,用于快餐、软饮料,点心和方便食品中。和基本食品相比,这些产品一般需要更高的化学香料存放条件。

随着人们对天然芳香疗法和异国芳香疗法越来越感兴趣,对香精和精油的需求量也随之增长。因为相对较高的价格,至2008年,它的增长也是较缓慢的。