内生草酸青霉 SY-15 中聚酮类物质 Popk-1 的抗氧化活性分析

刘　欢,刘呈雄,熊　泽,刘士平,薛艳红*

三峡大学生物与制药学院天然产物研究与利用湖北省重点实验室,宜昌 443002

摘　要:从 11 株内生草酸青霉中筛选到一株抗氧化活性较高的菌株 SY-15,利用活性追踪的方法,对其发酵液进行了抽滤、萃取、浓缩、柱层析和 HPLC 等分离得到一化合物,通过 NMR 分析和对比文献发现其为一种聚酮类物质,含有氧杂蒽酮的母核。该物质的总抗氧化活性为 70.66 U/mL,DPPH 自由基清除率达到 80.67%,铁氰化钾还原力测定其吸光值为 1.43,分别达到同等浓度维生素 C 的 72.99%、81.76%、58.85%。体内实验表明此化合物可有效提高氧化胁迫下酵母细胞的存活力,对酵母细胞有一定的抗氧化损伤保护作用。

关键词:内生菌;草酸青霉;SY-15;Popk-1;抗氧化

中图分类号:Q939.99　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2020)Suppl-0023-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.004

Antioxidant activity analysis of the polyketide Popk-1 in *Penicillium oxalicum* SY-15

LIU Huan, LIU Cheng-xiong, XIONG Ze, LIU Shi-ping, XUE Yan-hong*

Hubei Provincial Key Laboratory of Natural Product Research and Utilization, School of Biology and Pharmaceuticals, Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: A strain SY-15 with high antioxidant activity was screened from 11 strains of endophytic penicillium. The fermentation broth was subjected to suction filtration, extraction, concentration, column chromatography and HPLC using activity tracking method. After separation, a compound was obtained, and it was found to be a polyketone by NMR analysis and comparative literature, containing the mother core of xanthone. The total antioxidant activity of the substance is 70.66 U/mL, the DPPH free radical scavenging rate is 80.67%, and the absorbance value of potassium ferricyanide is 1.43, which reaches 72.99%, 81.76%, 58.85% of the same concentration of vitamin C. *In vivo* experiments have shown that this compound can effectively improve the viability of yeast cells under oxidative stress, and has a certain protective effect on yeast cells against oxidative damage.

Key words: endophytic fungi; *Penicillium oxalicum*; SY-15; Popk-1; antioxidant

近年来研究表明,抗氧化物质在协助生物体对抗逆境胁迫、预防氧化应激疾病和延缓衰老中发挥着巨大的作用[1]。随着这些物质在医药、食品、化妆品等领域的广泛应用,抗氧化剂的生产与研发成为该领域的一大研究热点[1]。但是许多合成的抗氧化剂由于存在潜在毒性,因而人们将眼光更多投向安全、高效抗氧化天然产物的发掘中[1]。目前大部分抗氧化剂来源于植物,如虾青素、生育酚乙酸酯、茶多酚等,其中虾青素是公认的抗氧化能力最高的物质,又叫虾红素和红酵母,是一种类胡萝卜素;在自然界中,其是由藻类、细菌和浮游植物产生的;研究表明,它的抗氧化能力是维生素 E 的 1 000 倍,天然 β-胡萝卜素的 10 倍,葡萄籽的 17 倍,辅酶 Q10 的 60 倍,茶多酚的两倍[2]。

由于植物生长周期长,离体培养相对繁琐,大规模的采伐对野生资源造成极大的挑战,因此许多学者期望在植物内生菌中找到与宿主相同、相似或结构新颖的抗氧化次级代谢产物[3]。近年来人们在真菌中寻找抗氧化物质烟曲霉取得了较大的进展,

收稿日期:2019-12-30　　接受日期:2020-04-01

基金项目:国家自然科学基金(31540065)

* 通信作者 Tel:86-717-6395580;E-mail:xyh1231977@163.com

如本实验室从烟曲霉 SG-17 的次级代谢产物分离得到一种(*Z*)-*N*-(4-羟基苯乙烯基)甲酰胺的物质,其总抗氧化活性(T-AOC)可达 131.94 U/mL,是 Vc 的 18 倍,同时可以有效地协助水稻抵抗干旱胁迫,且可能通过调节 POD、HSP70 和 NADPH 氧化酶的途径来协助水稻抵抗干旱胁迫[4]。从黄曲霉 MG-9 粗提物中重结晶得到一种主物质麦角甾醇,其可以将神经细胞 SH-SY5Y 在 H_2O_2(800 μmol/L)胁迫下的相对存活率提高了 74.5%,并且麦角甾醇可通过抑制凋亡蛋白 caspase 3 的活性来达到对神经细胞 SH-SY5Y 的抗氧化保护作用[4]。

草酸青霉(*P. oxalicum*)是一种分布在土壤、根际、食物及动植物体内的丝状真菌,蕴含着丰富的次生代谢产物,如海吲哚生物碱(oxaline)、色原酮类化合物(oxalicumones)、聚酮类物质 calbistrin A 和 B 等[5],但是迄今为止,对草酸青霉抗氧化物质的报道不多。本研究从高抗氧化活性的内生草酸青霉出发,应用活性追踪的方法,明确了 SY-15 起抗氧化活性的主要物质是一种聚酮类物质 Popk-1,它含有氧杂蒽酮的母核[3]。近年来研究表明,氧杂蒽酮及其衍生物结构多样,且具有广泛的生物活性,母体环上不取代基的不同造成了抗高血压、抗惊厥、抗血栓、抑制拓扑异构酶介导的抗肿瘤作用等[3],但是关于其抗氧化活性国内外还鲜有报道,本文明确了氧杂蒽酮类物质 Popk-1 在体内和体外的抗氧化活性,为新型抗氧化剂的开发与应用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

实验中使用的 11 株内生草酸青霉 SY-15、SG-4、SJ-3、SJ-7、SFS-1、SFS-8、SFS-10、SFR-3、SFR-7、SFR-13、FS-19 分别来自于三峡河岸带植物疏花水柏枝(*Myricaria laxiflora*)和秋华柳(*Salix variegata*),其中菌株 SY-15 目前保藏于武汉大学(CCTCCM2017025)。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, BY4742)购自 EUROSCARF。

丝状真菌的培养采用 PDA 培养基:新鲜土豆 200 g/L,蔗糖 20 g/L,pH 调至 7.2 ~ 7.5。酿酒酵母的培养采用 YPD 培养基:酵母膏 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,pH 调至 7.2 ~ 7.5。固体培养基加入琼脂 20 g/L。

1.2 菌株的培养及抗氧化活性测定

将保存于 4 ℃冰箱的 11 株草酸青霉菌接种于 PDA 固体平板 28 ℃培养 3 ~ 7 天,用接种环挑取少许菌丝接种到 200 mL PDA 液体培养基上,28 ℃,120 rpm 培养 7 天。将培养物真空抽滤,收集菌体和发酵液,菌体用 70% 丙酮常温浸提 24 h,超声 1.5 h,过滤菌丝收集浸提液,浸提液和发酵液 60 ℃条件下减压浓缩、冷冻干燥获得粗提取物,分别用 DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基清除法、T-AOC 试剂盒和铁氰还原力法(potassium ferricyamide, PF)分别测定其抗氧化能力[7],重复 3 次,以相同浓度的抗坏血酸(V_C)作为正对照。

1.3 SY-15 抗氧化活性物质的分离及鉴定

将培养物真空抽滤,收集菌体浸提液和上清液,等体积乙酸乙酯萃取浸提液和发酵液得菌酯相、菌水相、清酯相、清水相,60 ℃条件下减压浓缩、冷冻干燥获得粗提取物,用三种方法分别测定其抗氧化能力,确定活性部位[6]。用薄板色谱(TLC)(紫外 254 nm)及柱层析分析分离,在洗脱剂石油醚/丙酮体积比为 1∶3 的浓度梯度下得到代谢产物,活性追踪后高效液相色谱分析(HPLC),条件:C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),波长 210 nm,流动相:A:水(90% →0%),B:乙腈(10% →100% 梯度脱洗),柱温 35 ℃,总流速 1.0 mL/min,进样量 20 μL),选取出峰时间为 18.5 min 的峰富集,采用 NMR 鉴定其结构,并根据上文描述的方法并测定其抗氧化活性[7]。

1.4 酵母细胞的抗氧化损伤保护效果分析

将酿酒酵母菌株 BY4742 于 YPD 固体培养基 28 ℃活化 24 h 后,接种于 200 mL YPD 液体培养基中,28 ℃,120 rpm 培养 12 h。取 100 μL 酵母发酵液接种于 200 mL YPD 液体培养基,28 ℃,120 rpm 培养 12 h 后,分别添加 15 μL 浓度为 1 mg/mL 的甲萘醌(VK_3)、200 μL 浓度为 3 mg/mL 谷胱甘肽(GSH)和 200 μL 浓度为 3 mg/mL 氧杂蒽酮,28 ℃,120 rpm 培养 3 h 后涂布于 YPD 固体培养基[8,9],生长 24 h 后拍照观察。

为了初步确定不同浓度梯度杂氧蒽酮对 BY4742 的氧化损伤保护效果,分别向酵母培养物添加 15 μL 浓度为 1 mg/mL 的甲萘醌(VK_3)、200 μL 浓度分别为 1、3、6 mg/mL 的氧杂蒽酮,28 ℃,120 rpm 培养 3h 后取出,菌株发酵液稀释至 10^{-3} 倍,取 5 uL 接种于 YPD 平板[8,9],每组三个重复,生长 24 h 后拍照观察。

2　结果与分析

2.1　不同草酸青霉代谢产物抗氧化活性

选用 T-AOC 法测定 1 mg/mL 草酸青霉菌 SY-15、SG-4、SJ-3、SJ-7、SFS-1、SFS-8、SFS-10、SFR-3、SFR-7、SFR-13、FS-19 的发酵液粗提取物抗氧化活性,结果如表 1 所示。

表 1　不同草酸青霉发酵液总抗氧化活力

Table 1　Total antioxidant activity of different fermentation broths of *P. oxalicum*

菌株 Strain	采样生境 Sampling habitat	分离部位 Separation site	来源 Origin	登录号 Accession No. in GenBank	总抗氧化值 T-AOC (U/mL)
SY-15	淹水前 Before flooding	叶 Leaf	疏花水柏枝 *Myricaria laxiflora*	KX822145	25.99 ±0.47[a]
SG-4	淹水前 Before flooding	根 Root	疏花水柏枝 *Myricaria laxiflora*	MK450299	15.85 ±0.36[c]
SJ-3	淹水前 Before flooding	茎 Stem	疏花水柏枝 *Myricaria laxiflora*	MK881161	1.60 ±0.13[g]
SJ-7	淹水前 Before flooding	茎 Stem	疏花水柏枝 *Myricaria laxiflora*	MK881162	13.47 ±0.61[d]
SFS-1	淹水前 Before flooding	茎 Stem	秋华柳 *Salix variegata*	MK817603	13.90 ±0.15[d]
SFS-8	淹水前 Before flooding	茎 Stem	秋华柳 *Salix variegata*	MK817604	13.73 ±0.06[d]
SFS-10	淹水前 Before flooding	茎 Stem	秋华柳 *Salix variegata*	MK817605	14.21 ±0.34[d]
SFR3	淹水前 Before flooding	根 Root	秋华柳 *Salix variegata*	MK817608	6.122 ±0.47[f]
SFR7	淹水前 Before flooding	根 Root	秋华柳 *Salix variegata*	MK817609	25.04 ±0.09[a]
SFR13	淹水前 Before flooding	根 Root	秋华柳 *Salix variegata*	MK817606	18.35 ±0.39[b]
FS19	淹水后 After flooding	茎 Stem	秋华柳 *Salix variegata*	MK817607	12.20 ±0.31[e]

注:a ~ g 依次为菌株由大到小的抗氧化活性,相同字母相似程度较高,不同字母抗氧化活性差异显著。下同。

Note: a-g are the antioxidant activities of the strains from large to small in order. The same letter has a higher degree of similarity and different letters have significant differences in antioxidant activity. The same below.

结果显示菌株发酵液抗氧化活性相对较高的是 SY-15 和 SFR-7,抗氧化活性分别为 25.99 和 25.04 U/mL,和其它菌株相比有显著性差异,大部分菌体抗氧化活性较低。文献报导 SY-15 抗氧化活性比目前已知其它内生真菌高,易于培养分离且周期短[3],因此选用草酸青霉 SY-15 作为目的菌株进行深入研究。

2.2　SY-15 不同部位的抗氧化活性

SY-15 清酯、菌酯、清水、菌水相代谢产物抗氧化活性测定结果如表 2 所示。

表 2　清酯、菌酯、清水、菌水相抗氧化活性

Table 2　Antioxidant activity of sterilized ester, bactericidal ester, water, bacterial aqueous phase

待测物 Substance	DPPH 法 DPPH method(%)	总抗氧化活力 T-AOC(U/mL)	铁氰化钾法 PF method(OD)
SY-15 清酯 SY-15 clear esters	93.95 ±0.65[b]	139.61 ±0.65[a]	0.51 ±0.06[d]
SY-15 菌酯 SY-15 bacterial esters	27.34 ±0.09[e]	23.21 ±0.09[d]	0.12 ±0.07[e]
SY-15 清水 SY-15 clear water	71.47 ±0.74[c]	20.34 ±0.72[e]	1.23 ±0.33[b]
SY-15 菌水 SY-15 bacterial water	68.39 ±0.39[d]	69.59 ±0.41[c]	0.74 ±0.17[c]
V_C	94.67 ±0.57[a]	93.97 ±0.92[b]	2.11 ±0.12[a]

注:清酯:发酵液酯相萃取物;菌酯:菌饼酯相萃取物;清水:发酵液水相物质;菌水:菌饼水相物质,浓度均为 1 mg/mL。

Note: Clear esters: fermented liquid ester phase extracts; Bacterial esters: bacterial cake ester phase extracts; Clear water: fermented liquid water phase substances; Bacterial water: bacterial cake water phase substances, both at a concentration of 1 mg/mL.

天然产物研究与开发

综合三种方法结果显示 SY-15 清酯相,清水相,菌水相都有一定的抗氧化活性,多元统计学其有显著性差异,SY-15 清酯相抗氧化活性最高,DPPH 自由基清除率为 93.95%,T-AOC 法的抗氧化值为 139.61 U/mL,铁氰化钾还原力测定其吸光值为 0.51 分别达到 VC 的 75.49%、148.57%、24.17%。因此抗氧化活性部位确定为草酸青霉 SY-15 清酯相。

2.3 Popk-1 的分离及结构鉴定

T-AOC 法测定 SY-15 柱层析分析分离代谢产物的抗氧化活性为 94.23 U/mL,达到 V_C 的 99.54%。核磁共振得到 ^1H 和 ^{13}C NMR 两个图谱,根据 ^{13}C NMR 可知此物质一共有 16 个碳信号,是一种氧杂蒽酮衍生物,结合文献报[10,11]道确定此物质结构为 2,2′,6′-三羟基- 4-甲基-6-甲氧基-酰基-二苯基甲酮,化学式为 $C_{16}H_{14}O_6$,命名为 Popk-1,结构如图 1 所示所示,核磁数据如表 3。

表 3 核磁数据

Table 3 Nuclear magnetic data

Position	δ_C	Position	δ_C
1	130.3	8	20.19
2	153.4	9	51.9
3	120.4	1′	111.3
4	138.4	2′6′	161
5	120.3	3′5′	106.8
6	127.4	4′	136.3
7	166	7′	201

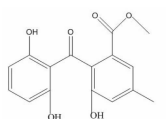

图 1 Popk-1 的结构

Fig. 1 Structure of Popk-1

根据上述结果,查阅文献确定化合物的结构为 2,2′,6′-三羟基-4-甲基-6-甲氧基-酰基-二苯基甲酮[10,11]。

2.4 Popk-1 体内外抗氧化活性及作用浓度测定

以相同浓度的谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(V_C)作为正对照测定 1 mg/mL Popk-1 抗氧化能力,结果如图 2(A、B、C)所示。

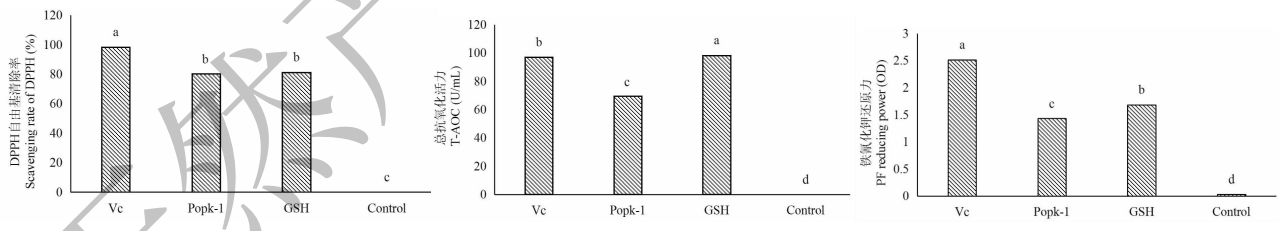

图 2 Popk-1 体外抗氧化活性

Fig. 2 Antioxidant activity of Popk-1 *in vitro*

结果显示 Popk-1 自由基清除率达到 80.67%,T-AOC 法测定其抗氧化活性为 70.66 U/mL,铁氰化钾还原力测定其吸光值为 1.43,与抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(V_C)相差很小,具有较强的抗氧化能力。

相同浓度 Popk-1 和谷胱甘肽对甲萘醌氧化胁迫下酵母细胞氧化损伤保护及作用浓度测定,结果如图 3 所示。

图 3A 和 3B 表明酵母细胞在受甲萘醌氧化胁迫后数量明显减少,B 与 C、D 相比酵母存活数量明显增加,说明酵母细胞在氧化胁迫后加入 Popk-1 和谷胱甘肽可有效提高其成活数量,图 E、F、G 表明酵母细胞经氧化胁迫后加入不同浓度 Popk-1 对其氧化损伤保护作用有明显差异,酵母生长状况与浓

天然产物研究与开发

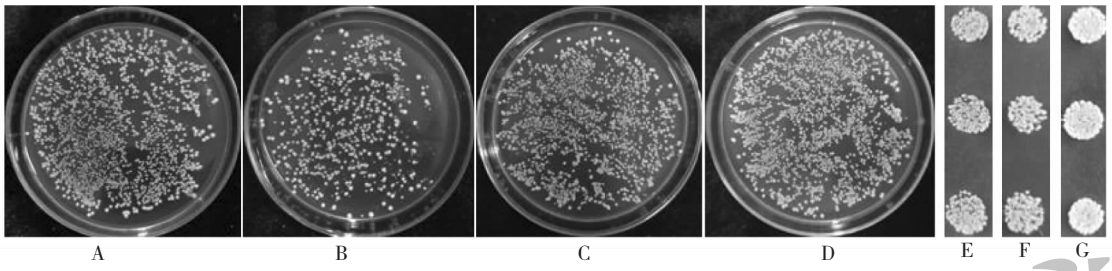

图 3　Popk-1 体内抗氧化活性及作用浓度

Fig. 3　Antioxidant activity and concentration of Popk-1 *in vivo*

注:A 为自然生长的酵母;B 为收到氧化剂 15 μL 1 mg/mL 甲萘醌氧化胁迫下的酵母;C 为 15 μL 1 mg/mL 甲萘醌氧化胁迫下加入抗氧化剂 200 μL 3 mg/mL 谷胱甘肽下的酵母;D 为 1 mg/mL 甲萘醌氧化胁迫下加入 200 μL 3mg/mL Popk-1 的酵母;E 为 1 mg/mL 200 μL Popk-1;F 为 3 mg/mL200 μL Popk-1。G 为 6 mg/mL 200 μL Popk-1。Note:A is a naturally growing yeast;B is a yeast receiving 15 μL of 1 mg/mL menaquinone under oxidative stress;C is 15 μL of 1 mg/mL menaquinone under oxidative stress. 200 μL of 3 mg/mL antioxidant is added Yeast under glutathione;D is the yeast added with 200 μL 3 mg/mL Popk-1 under oxidative stress of 1 mg/mL menadione;E is 1 mg/mL 200 μL Popk-1;F is 3 mg/mL of 200 μL Popk-1. 6 is G mg/ mL 200 ìL Popk-1.

Popk-1 度成正比,E 组与 G 组相比有较大差异,G 组酵母长势较好菌株个数相对较多。综上可得 Popk-1 有助于提高酵母细胞抵御氧化胁迫能力,伴随浓度增大,效果越明显。

3　讨论

本研究以能耐受低氧胁迫植物疏花水柏枝叶上的内生真菌 SY-15 为研究对象,分析了其代谢产物 Popk-1 对酿酒酵母细胞抗氧化保护的效果,尽管实验结果表明 Popk-1 具有一定的抗氧化能力,但由于其仅仅是 SY-15 代谢产物中的一种,因此并不能说明 SY-15 代谢产物中的抗氧化物质就是 Popk-1,也可能是其他化合物起作用,因此后续实验还需进一步分离纯化其他有抗氧化活性的化合物,为进一步研发新型抗氧化剂奠定基础。

参考文献

1　Ying JB, LI GR, Feng LH, et al. Research progress of reactive oxygen species and plant antioxidant system[J]. J Anhui Agr Sci(生物资源),2017,45(36):1-3.

2　Yin W, Shu JL, Su YC, et al. Study on the anti-fatigue and anti-oxidant effects of natural astaxanthin[J]. J Southwest Univ:Nat Sci(西南大学学报:自科版),2015,37(9):42-48.

3　Fan L, Zheng J, Yang X. Research advances in medicinal plant endophyte and its effects on geoherbs[J]. Med Plant(药用植物研究:英文版),2013,4(2):71-74.

4　Gao Y, Lei Q, Jiang W, et al. Molecular characterization and phenolic acids analysis of an endophytic fungus with high antioxidant activity[J]. Microbiol China(微生物学通报),2016,43:1235-1243.

5　Yuan XN, Chen G, Bai J, et al. Isolation and identification of the secondary metabolites from *Penicillium oxalicum* HSY-P-17[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报),2014,31:360-362.

6　Wang XY, Du GR, Li H. Research progress of *in vitro* determination of antioxidant capacity[J]. J Food Biotechnol(食品与生物技术学报),2012,31(3):247-252.

7　Qin-Wang GG, Kong YS, Jiang W, et al. Isolation and identification of main substance ergosterol from the endophytic fungus MG-9 and its antioxidant activity analysis[J]. J China Three Gorges Univ:Nat Sci)(三峡大学学报:自科版),2017,39(2):108-112..

8　Sun MD, Shi F, Wang XY. The role of *Saccharomyces cerevisiae* NAD(H) kinase Pos5p in the resistance of cells to oxidative stress[J]. Microbiol China(微生物学通报),2010,37:1740-1746.

9　Shi F. The influence of oxidative stress on the respiratory chain activity of *Saccharomyces cerevisiae* NAD(H) kinase mutant[J]. Microbiol China(中国微生物学),2012,39:1371-1378.

10　Liu B, Wang HF, Zhang LH, et al. New compound with DNA Topo I inhibitory activity purified from *Penicillium oxalicum* HSY05[J]. Nat Prod Res,2015;29:2197-2202.

11　Liu B, Wang HF, Zhang LH, et al. Isolation of a new compound from *Penicillium oxalicum*[J]. Chem Nat Comp,2016,52(5):821-823.