

以葛根为基质的灵芝发酵和体外清除自由基活性研究

张东升¹, 夏荣光², 张凌裳¹, 王红连¹, 杜郭君¹, 赵晓联^{1*}

(1. 江苏省苏微微生物研究有限公司, 江苏无锡 214063; 2. 句容茅宝山葛业有限公司, 江苏句容 212400)

摘要 [目的] 研制一种具有抗氧化作用的新型保健食品并研究其体外抗氧化活性。[方法] 以灵芝为发酵菌株, 葛根为发酵基质中的添加物, 研究了葛根对灵芝菌丝体生长和发酵产物体外清除自由基活性的影响。[结果] 葛根添加量为 60 g/L 时, 灵芝的生物量达最大值, 即 (9.76 ± 0.37) g/L, 比对照高 2.82 g/L。葛根具有清除羟自由基和超氧阴离子的能力, 添加葛根的灵芝发酵产物的对羟自由基和超氧阴离子的清除效果明显比单独灵芝发酵好。当葛根浓度为 20、40、60、80 和 100 g/L 时, 发酵产物对羟自由基的清除率分别为 67.2%、78.5%、84.9%、86.4% 和 87.3%, 对超氧阴离子的清除率分别为 35.42%、41.67%、46.88%、44.79% 和 45.88%。[结论] 该研究为开发具有抗氧化作用的新型灵芝发酵保健食品提供了理论基础。

关键词 葛根; 灵芝; 生物量; 羟自由基; 超氧阴离子

中图分类号 S567.3¹ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)31-15429-02

Study on the Lucidum Fermentation with Radix Puerariae as Matrix and the Activity of Scavenging Free Radicals in Vitro

ZHANG Dong-sheng et al (Jiangsu Su Wei Institute of Microbiology Co., Ltd., Wuxi, Jiangsu 214063)

Abstract [Objective] The purpose was to prepare a new type of health food with antioxidation effects and study its antioxidant activity in vitro. [Method] With lucidum as fermentation strain, radix puerariae as additive in fermentation matrix, the influences of radix puerariae on the growth of lucidum mycelia and the activity of scavenging free radicals in vitro of fermentation products were studied. [Result] When the addition amount of radix puerariae was 60 g/L, the biomass of lucidum reached its maximum (9.76 ± 0.37) g/L and it was increased 2.82 g/L than CK. The biomass of lucidum in CK was 2.82 g/L. The radix puerariae had ability of scavenging hydroxyl radical and superoxide anion and the scavenging effects on hydroxyl radical and superoxide anion of products from lucidum fermentation with radix puerariae were obviously better than that of products from lucidum fermentation without radix puerariae. When the concn. of radix puerariae were 20, 40, 60, 80 and 100 g/L, the scavenging rates of fermentation products on hydroxyl radical were 67.2%, 78.5%, 84.9%, 86.4% and 87.3% resp. and their scavenging rates on superoxide anion were 35.42%, 41.67%, 46.88%, 44.79% and 45.88% resp. [Conclusion] The study supplied theoretical basis for developing the new type of health food with antioxidation effects through lucidum fermentation.

Key words Radix puerariae; Lucidum; Biomass; Hydroxyl radical; Superoxide anion

自由基是人体生命活动过程中生物化学反应的中间产物。自由基产生过量或人体自身清除自由基能力下降会导致多种疾病的产生与恶化^[1]。损害人体健康的自由基几乎都与活性较强的含氧物质有关, 该类自由基叫作活性氧自由基(如 O_2^- 和 $\cdot OH$)。适当补充外源性抗氧化剂或给予能促使机体内源性抗氧化物质恢复到一定水平的药物, 可使各种损伤有所改善。采用发酵工程技术对中药进行发酵, 从发酵产物中提取活性成分, 可以快速、大规模生产目的产物, 从而缓解对野生中药资源需求的压力以及研制新型中药制剂, 是中药资源利用和开发的一条新途径^[2-3]。葛根及灵芝的体外清除氧自由基均有报道^[4-5]。笔者以自身发酵性能较好的灵芝作为出发菌株, 以药食兼用的中草药——葛根作为发酵基质中的添加物, 制备发酵产物并对其体外抗氧化活性进行了研究, 以开发具有抗氧化作用的新型保健食品。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种。灵芝(*Ganoderma lucidum*)由江苏省苏微微生物研究有限公司筛选保存。

1.1.2 培养基。菌种活化培养基: PDA 培养基。种子培养基: 葡萄糖 20 g/L, 玉米粉 20 g/L, 麸皮粉 10 g/L, 豆饼粉 5 g/L。发酵基础培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 4 g/L, $MgSO_4$ 0.75 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, 自然 pH 值。

1.1.3 葛根(*P. ohwi*)。由句容茅宝山葛业有限公司提供, 粉碎过 60 目筛备用。

1.1.4 化学试剂。葡萄糖、硫酸镁和蛋白胨等均为分析纯, 由中国医药集团上海化学试剂公司生产; 玉米粉、豆饼粉和麸皮为市售品(过 60 目筛)。

1.1.5 仪器。ZP-96 型回转式摇床(苏州威尔实验用品有限公司); 离心沉淀机(无锡市瑞江分析仪器有限公司); AB-L 型电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO); 高压蒸汽灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司); FRENCH Press 细胞破碎仪(Thermo Spectronic 制造); UV-2800 紫外分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 接种培养。

1.2.1.1 菌种活化。将保存的菌种接到 PDA 斜面培养基上, 25 °C 培养 7 d 活化菌种; 斜面种子每个月转接 1 次, 以保持菌种活力。

1.2.1.2 液体种子培养。250 ml 三角瓶装液量 80 ml。将斜面菌种分割成 5 mm 大的菌丝块, 转接到液体种子培养基中, 30 °C、150 r/min 摇瓶培养 7 d。

1.2.1.3 液体发酵。在 500 ml 三角瓶中加入灵芝发酵基础培养基 160 ml, 分别添加 20、40、60、80、100 g/L 葛根粉, 于 121 °C 灭菌 30 min, 冷却后接入灵芝液体菌种, 接种量 10%, 于 30 °C、150 r/min 摇瓶培养 5 d。每个样品设 3 个重复, 对照为不加葛根的灵芝单独发酵液。

1.2.2 发酵液处理。将 160 ml 发酵液在 3 000 r/min 下离心得菌丝体和上清液, 菌丝体经高压破碎仪破碎后, 加入 80 ml 超纯水, 煮沸 2 次, 每次 2 h, 离心过滤后合并 3 次的上清

基金项目 镇江市科技计划项目(NY2008009)。

作者简介 张东升(1975-), 男, 江苏盐城人, 助理研究员, 从事功能性食品的研究与开发。* 通讯作者, E-mail: zhaoXL118@263.net。

收稿日期 2009-07-06

液,用于测定灵芝发酵产物的抗氧化活性,以灵芝单独发酵液为对照。

1.2.3 葛根处理。葛根粉 3 g,加入 50 ml 超纯水,100 °C 下回馏提取 2 次,每次 2 h,离心后合并 2 次的上清液,用于测定中药的抗氧化活性。

1.2.4 生物量测定。取 80 ml 发酵液,经真空抽滤得菌丝体,经去离子水多次洗涤后,60 °C 烘干至恒重,称重。

1.2.5 羟自由基清除率测定。根据文献[6-7]的方法,利用 Fenton 反应检测添加葛根后的灵芝发酵产物对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用。10 ml 比色管中加入 0.75 mmol/L pH 值 7.4 的磷酸缓冲液 1.0 ml,番红(260 $\mu\text{g}/\text{ml}$)0.2 ml,EDTA(2 mmol/L)0.375 ml, FeSO_4 (2 mmol/L)2 ml,再加入“1.2.2”和“1.2.3”所得待测样品溶液 0.2 ml,最后加入 3% 的 H_2O_2 0.4 ml,混匀后于 40 °C 水浴保温 30 min,加入 0.5 ml 0.15 mol/L EDTA- Na_2 溶液终止反应,然后在波长 520 nm 处测吸光度 A 值。每个样品浓度作 3 个平行样,取其平均值。空白以等体积的超纯水代替样品溶液,对照以等体积的超纯水代替样品溶液和 FeSO_4 溶液。试验结果以清除率 E 表示。试验设 3 个重复。

$$\text{清除率 } E(\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100$$

1.2.6 超氧阴离子清除率测定。用改良的邻苯三酚(焦性没食子酸)自氧化法测定超氧阴离子清除率^[4,8]。邻苯三酚自氧化产物最大吸收波长为 325 nm,而超氧阴离子清除剂能使其产物在 325 nm 处吸收峰受到抑制。随着 A 值的变化来比较超氧阴离子清除剂的清除能力。反应温度为 25 °C,取 4.5 ml Tris-HCl(pH 值 8.2),待测样品溶液 0.5 ml,去离子水 3.8 ml,快速加入 10 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.2 ml,总体积 9.0 ml。空白管以去离子水代替,反应启动后,每隔 30 s 读取 1 次 A_{325} 值,计算各系统的自氧化速率为 S ,清除率为 E 。试验设 3 个重复。

$$\text{清除率 } E(\%) = \frac{S_{\text{空白}} - S_{\text{样品}}}{S_{\text{空白}}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 葛根添加量对灵芝菌丝体生长促进作用 由图 1 可知,灵芝深层发酵中添加葛根为底物时,一定添加浓度对灵芝菌丝体生长有促进作用。葛根添加浓度 60 g/L 时,灵芝生物量达最大值(9.76 \pm 0.37)g/L,比对照(不加葛根)高 2.82

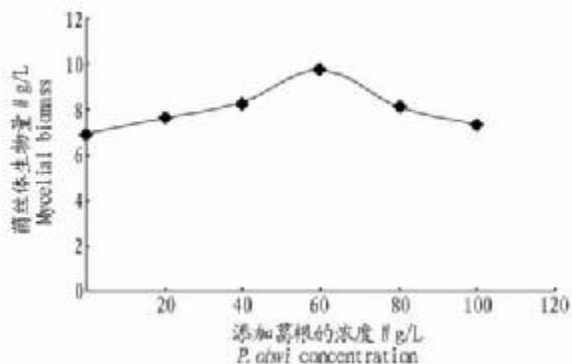


图 1 葛根不同添加量对灵芝菌丝体生物量的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of *P. ohwi* on the mycelial biomass of *G. lucidum*

g/L,增重 40.63%。灵芝菌丝有强大的酶系如纤维素酶、半纤维素酶等,这些酶可以将基质中的大分子物质分解成小分子等供其生长发育,之后随添加量的增加,利用率接近饱和,灵芝菌丝体生物量有所下降。

2.2 添加葛根后的灵芝发酵产物对羟自由基的清除作用

由表 1 可知,葛根本身具有较强的清除羟自由基的能力,经灵芝发酵后的效果明显比单独灵芝发酵的效果好。说明添加葛根后,强化了灵芝清除自由基的能力,并随添加量的增加自由基的清除能力逐步增强。但葛根添加浓度大于 60 g/L 时增强趋势放缓,对羟自由基的清除率最高达 87.3%。

表 1 葛根和添加葛根后的灵芝发酵产物对羟自由基的清除作用

Table 1 The scavenging activity of *P. ohwi* extracts and *G. lucidum* fermentation products after adding *P. ohwi* to hydroxyl radicals

样品	葛根浓度 // g/L	吸光度	清除率 // %
Samples	Concentration of <i>P. ohwi</i>	A_{520}	Scavenging rate
葛根水提物	30	0.289	36.1
对照	0	0.454	56.8
葛根发酵液 I	20	0.538	67.2
葛根发酵液 II	40	0.628	78.5
葛根发酵液 III	60	0.671	84.9
葛根发酵液 IV	80	0.691	86.4
葛根发酵液 V	100	0.706	87.3

2.3 添加葛根后的灵芝发酵产物对超氧阴离子的清除作用

由表 2 可知,葛根本身具有一定的超氧阴离子的清除能力,经灵芝发酵后的效果比单独灵芝发酵的效果好,表明添加葛根后,加强了灵芝清除自由基的能力,并随添加量的增加自由基的清除能力逐步增强。但浓度大于 60 g/L 时基本保持不变,结果与“2.2”测定结果基本一致。

表 2 葛根和添加葛根后的灵芝发酵产物对超氧阴离子的清除作用

Table 2 The scavenging activity of *P. ohwi* extracts and *G. lucidum* fermentation products after adding *P. ohwi* to superoxide anion

样品	葛根浓度 // g/L	自氧化速率	清除率 // %
Samples	Concentration of <i>P. ohwi</i>	$A_{325}/30\text{ s}$ Autoxidation rate	Scavenging rate
葛根水提物	30	0.082	14.58
对照	0	0.067	30.21
葛根发酵液 I	20	0.062	35.42
葛根发酵液 II	40	0.056	41.67
葛根发酵液 III	60	0.051	46.88
葛根发酵液 IV	80	0.053	44.79
葛根发酵液 V	100	0.052	45.88
空白	-	0.096	-

3 讨论

葛根和灵芝在体外对超氧阴离子和羟自由基均具有明显的清除作用。以葛根为液体深层发酵基质时,葛根对灵芝菌丝体的生长具有促进作用,经灵芝发酵后较单独灵芝发酵及葛根有更好的清除能力。为进一步揭示以葛根为基质的灵芝发酵产物主要抗氧化活性成分及其浓度的变化,以葛根为基质的灵芝液体发酵培养基的优化和灵芝主要抗氧化活

(下转第 15437 页)

摩擦引起发热,同时可以保证能量的快速传递和充分利用,因此热效率高,升温快速均匀,大大缩短了萃取时间,提高了萃取效率^[15]。超声波对媒质主要产生独特的机械振动和空化作用,当超声波振动时能产生并传递强大的能量,引起媒质质点以较大的速度和加速度进入振动状态,使媒质结构发生变化,促使有效成分进入溶剂中;同时在液体中还会产生空化作用,即在有相当大的破坏应力的作用下,液体内部形成空化泡的现象。空化泡在瞬间迅速涨大并破裂,破裂时把吸收的声场能量在极短的时间和极小的空间内释放出来,形成高压的环境,同时伴随有强大的冲击波和微声流,从而破坏细胞壁结构,使其在瞬间破裂,植物细胞内的有效成分得以释放,直接进入溶剂并充分混合,从而提高提出率^[16-18]。

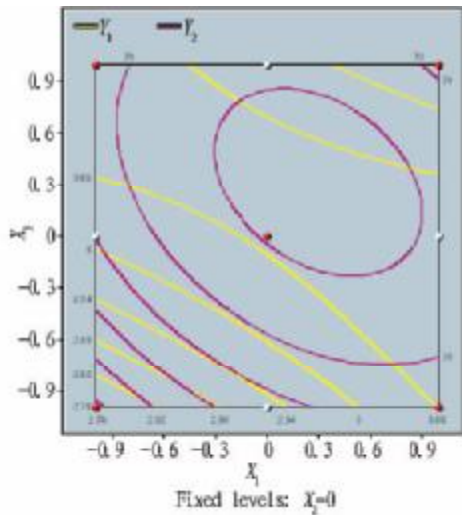


图1 提取时间、微波功率对多糖得率(Y_1 ,%)与纯度(Y_2 ,%)影响的等高线叠加(料液比 1:20)

Fig. 1 The contour overlapping for the effects of extraction time and microwave power on the yield (Y_1) and purity (Y_2) of polysaccharides (material-liquid ratio of 1:20)

表5 不同提取方法对桦褐孔菌多糖得率和纯度的影响

Table 5 Effects of different extraction methods on the yield and purity of polysaccharides from *I. obliquus*

方法 Methods	提取时间 Extraction time	桦褐孔菌多糖//%	
		Polysaccharides from <i>I. obliquus</i>	
		得率 Yield	纯度 Purity
超声-微波提取法	19	3.25	73.16
水浴浸提法	240	2.12	64.03

(上接第 15430 页)

性成分的分析是深入研究的主要内容,为开发具有抗氧化作用的新型灵芝发酵保健食品提供理论基础。

参考文献

[1] 莫简. 医用自由基生物学导论[M]. 北京:人民卫生出版社,1989:80-85.
 [2] 庄毅. 药用真菌新型(双向型)固体发酵工程[J]. 中国食用菌,2002,21(4):3-6.
 [3] 吴炳新,牛纪江,孙筱林,等. 中药发酵制药技术[J]. 山东中医杂志,2001,90(3):179-180.

3 结论

(1)超声-微波提取桦褐孔菌粗多糖的最佳工艺条件为:提取时间 18.45~24.50 min,料液比 1:20,微波功率 88.3~96.7 W。

(2)与传统水浴浸提法相比,超声-微波提取法不仅缩短了提取时间,而且提高了桦褐孔菌多糖的得率和纯度。

参考文献

[1] 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌——桦褐孔菌[J]. 中国食用菌,2002,21(4):7-8.
 [2] YONG OOK KIM, SANG BAE HAND, HONG WOEN LEE, et al. Immunostimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus* [J]. Life Sciences, 2005, 77: 2438-2456.
 [3] JAROSZ A, SKORSKA M, RZYMOWSKA J, et al. Effect of the extracts from fungus *Inonotus obliquus* on catalase level in HeLa and Nocardia cells [J]. Acta Biochem Polon, 1990, 37(1): 149-152.
 [4] YONG OOK KIM, HAE WOONG PARK, JONG HOON KIM, et al. Anticancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. Life Sciences, 2006, 79: 72-80.
 [5] MIZUNO T, ZHUANG C, ABE K, et al. Antitumor and hypo-glycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. Int J Med Mushrooms, 1999, 1(4): 301-316.
 [6] BABITSKAIA V G, SHCHERBA V V, IKONIKOVA N V. Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus* [J]. Prikl Biokhim Microbiol, 2000, 36(4): 439.
 [7] WASSER S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60: 258.
 [8] RZYMOWSKA J. The effect of aqueous extracts from *Inonotus obliquus* on the mitotic index and enzyme activities [J]. Boll Chim Garm, 1998, 137(1): 13.
 [9] SINISTERRA J V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview [J]. Ultrasonics, 1992, 30(3): 180-185.
 [10] VINATORU M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2001, 8: 303-313.
 [11] 张自萍. 微波辅助提取技术在多糖研究中的应用[J]. 中草药, 2006, 37(4): 630-632.
 [12] 赵兵, 王玉春, 欧阳藩, 等. 超声波在植物提取中的应用[J]. 中草药, 1999, 30(9): 1-3.
 [13] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003.
 [14] GIOVINNI M. Respinse surface methodology and product optimization [J]. Food Technology, 1999, 37: 41-45.
 [15] 刘川生, 王平, 王立飞, 等. 微波萃取技术在天然药物提取中的研究进展[J]. 中国天然药物, 2003, 1(3): 187-191.
 [16] 吕震付, 杨海麟, 王武. 超声波在生物发酵工程中的应用[J]. 生物技术通讯, 2001, 12(4): 310-313.
 [17] TOMA M, VINATORU M, PANIWNKYK L, et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2001, 8: 137-142.
 [18] VALACHOVIC P, PECHOVA A, MASON T J. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2001, 8: 111-117.

[4] 钟飞, 王晓春, 林丽. 葛根体外清除氧自由基作用的研究[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(2): 17-18.
 [5] 崔月花, 徐鹏, 章克昌. 灵芝液态发酵有效产物体外抗氧化活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(8): 32-34.
 [6] 沈齐美, 沈秋英. 北虫草抗自由基和羟自由基作用的研究[J]. 广西植物, 2001, 21(3): 252-254.
 [7] 韩强, 林慧芬, 朱玲莉. 一些天然提取物对超氧自由基和羟基自由基的清除作用[J]. 日用化学工业, 2000(6): 14-17.
 [8] 曾小玲. 马齿苋水提物对氧自由基清除作用的研究[J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(2): 133-135.