

文章编号:1673-1689(2006)06-0070-03

以几种药食植物为基质的灵芝发酵和 体外清除自由基活性的研究

崔月花^{1,2}, 章克昌¹

(1. 江南大学生工学院, 江苏 无锡 214036; 2. 扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:药用真菌灵芝对7种中药进行发酵,结果表明银杏叶、桑叶、竹叶在添加0.7 g/dL时对灵芝的生长有抑制作用,生物量分别为:0.6347、0.6903、0.7960 g/dL;干姜、薏苡仁、枸杞、苦荞对灵芝的生长有促进作用分别为:1.0509、1.0437、1.0708、1.0538 g/dL。在清除自由基的效果上,添加苦荞、桑叶、枸杞后灵芝对清除两种自由基的效果不如灵芝本身的效果,清除羟自由基的抑制率分别为:68.2%、66.6%、68.5%;清除超氧阴离子的抑制率分别为:26.9%、31.9%、35%;添加银杏叶、薏苡仁、生姜后灵芝对两种自由基的作用效果都有提高,清除羟自由基的抑制率分别为70.5%、75%、70.6%;清除超氧阴离子的抑制率为34.9%、38%、33%。

关键词:灵芝;生物量;自由基;抑制率

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

The Study on the Submerged Culture of *Ganoderma lucidum* with some Edible Herbs and Scavenging Free Radical in Vitro

CUI Yue-hua^{1,2}, ZHANG Ke-chang¹

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The effect of some edible herbs on the submerged culture *Ganoderma lucidum* was investigated. The results showed that the leaf powder of *Ginkgo biloba*, *Morus alba* L. *Pleioblastus Amarus* inhibited the growth of *G. lucidum* at the concentration of 0.7 g/dL. The biomass was 0.9637, 0.6903, 0.7960 respectively. But and the seed powder of *Zingiber officinale*, *Coix lachryma*, *Hycium*, *ruthenicum*, Tartary buckwheat improved enhanced the growth of *G. lucidum* at the same concentration. The biomass was 1.0509, 1.0437, 1.0703, 1.0538. The scavenging two free radical of *G. lucidum* with buckwheat, *M. alba* L, *H. ruthenicum*, *P. amarus* is lower than *G. lucidum* itself. The rate of scavenging $\text{OH}^{\cdot-}$ and $\text{O}^{\cdot-}$ was 68.2%, 66.6%, 68.5%, 67.5%, 269%, 31.9%, 355, 25.6% respectively. while *G. biloba* C. *Lachryma* and *Z. officinale* exhibited better effect on the scavenging two free radial than *G. lucidum*, the effect of scavenging $\text{OH}^{\cdot-}$ and $\text{O}^{\cdot-}$ was 70.5%, 75%, 70.6%, 34.9%, 38%, 33%, respectively.

收稿日期:2005-07-13; 修回日期:2005-10-26.

作者简介:崔月花(1971-),女,内蒙古赤峰人,发酵工程博士研究生。

Key words: *G. lucidum*; biomass; free radical; scavenging rate

自由基是人体生命活动过程中生物化学反应的中间产物。在正常的情况下,体内的自由基的产生和清除是平衡的,但若是体内自由基产生过多或清除过慢,则自由基会在分子水平、细胞水平以及器官水平上给机体造成损伤,加快机体的衰老过程,并诱发癌症、心血管疾病等诸多疾病^[1]。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。所以,近十几年来各种抗活性氧化化合物的研究受到了广泛的重视。目前,临床证实有效且应用较多的是BHT,BHA等人工合成的药物,这些药物往往会对人体有副作用,随着经济的发展和人们生活水平的提高,人们开始转向天然药物。但由于野生药用资源的日益减少,药材市场上供应的主要栽培品种面临品质退化等问题及我国对中药的加工技术陈旧,使我国的中药远不能满足人们需要和走向世界。采用发酵工程技术对中药进行发酵,然后从发酵产物中提取活性成分,可以达到快速、大规模生产目的产物,从而可以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的途径^[2-3]。江南大学生物资源实验室先后利用了灵芝、鸡腿蘑等对苦荞、石斛、苦瓜、苦参等几十种中药进行了发酵,筛选出了具有性味功能加强的新药组合^[4-6]。本实验是在作者所在实验室原有的工作基础上,利用灵芝对薏苡仁、枸杞、苦荞、竹叶、银杏叶、桑叶7种药食植物进行发酵,以开发具有抗氧化方面的药品和充分有效的利用这些资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 灵芝(*Ganoderma lucidum*),由江南大学生物工程学院生物资源研究室筛选保存。

1.1.2 培养基 斜面培养基:PDA培养基,斜面种子每个月转接一次,以保持菌种活力。

种子培养基:每升含葡萄糖20 g,玉米粉20 g,麸皮粉10 g,豆饼粉5 g。

发酵基础培养基:每升含葡萄糖20 g,玉米粉20 g,麸皮10 g, MgSO_4 0.75 g, KH_2PO_4 1.5 g, pH自然。

1.1.3 中药材 薏苡仁(*Coix lachryma-jobi*)、银杏叶(*Ginkgo biloba* L.)、枸杞(*Lycium chinense*

Mill)、苦荞(*Fagopyrum tataricum* Gaertn)、桑叶(*Morus folium*)、苦竹叶(*Pleioblastus amarus*)、姜(*Zingiber officinale* Rosc.),均购自江苏无锡山禾药业集团,用前60烘干粉碎,过60目筛。

1.2 接种培养

1.2.1 菌种活化 将保存的菌种在无菌条件下接到PDA斜面培养基上,25℃培养7 d。

1.2.2 液体种子培养方法 将斜面菌种分割成5 cm²大的小块转接到液体种子培养基中,培养条件:250 mL三角瓶装液量80 mL,30℃,150 r/min条件下培养7 d。

1.2.3 液体发酵 在500 mL三角瓶中加入灵芝发酵基础培养基,分别添加1 g薏苡仁粉、桑叶、竹叶、枸杞、苦荞、干姜粉、银杏叶粉,装液量为150 mL。在121℃,一个大气压下,灭菌30 min。冷却后接入灵芝液体菌种,接种量10%。摇瓶培养条件:30℃,150 r/min下培养5 d。每个样品设置3个重复。

1.3 发酵液的处理

将150毫升发酵液在3000 r/min下离心,菌丝经过组织捣碎机捣碎后,加入100 mL超纯水,煮沸2 h,2次,离心,合并上清液。上清液浓缩为50 mL。

1.4 中药的处理

将7种中药各1 g,加入20 mL超纯水,在100℃下回馏提取2 h,两次,离心过滤后合并上清液,定容到50 mL。

1.5 生物量的测定

取100 mL发酵液于8000 r/min下离心10 min,经自来水多次洗涤,然后将菌丝在60℃烘干至恒重,称重。

1.6 羟自由基的生成及清除率的测定

在10 mL的比色管中加入0.75 mmol/L的pH值为7.4的磷酸缓冲液1.0 mL,番红(260 μg/mL)0.2 mL, EDTA (2 mmol/L)0.375 mL, FeSO_4 (2 mmol/L)2 mL,再加入样品溶液0.2 mL,最后加入3%的 H_2O_2 420 μL,混匀后于40℃水浴保温30 min,加入0.5 mL 0.15 mol/L EDTA Na_2 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。空白组以等体积的超纯水代替样品溶液,对照组以等体积的超纯水代替样品溶液和 FeSO_4 溶液^[7-8]。实验结果

以清除率E表示:

$$E = (\text{样品组吸光度值} - \text{空白组吸光度值}) \times 100 / (\text{对照组吸光度值} - \text{空白组吸光度值})$$

1.7 超氧阴离子的生成和测定

按文献[9]的方法进行,同时参考文献[10-11]。

2 结果和讨论

2.1 7种药食植物对灵芝生长的影响

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。从表中可以看出,在添加相同剂量的情况下,添加桑叶、银杏叶后,两者抑制了灵芝的生长,而苦荞、薏苡、竹叶、干姜的生物量明显比灵芝单独发酵的要高,说明苦荞、薏苡、生姜适合灵芝的生长。

表1 7种药食植物对灵芝生长的影响

Tab.1 The effect seven edible-herbs on the growth of *G. Lucidum*

样品	生物量/(g/dL)
灵芝	0.889 9
苦荞	1.053 8
桑叶	0.690 3
银杏叶	0.634 7
枸杞	1.070 8
竹叶	0.796 0
干姜	1.050 9
薏苡仁	1.043 7

2.2 添加中药后灵芝清除羟自由基的效果

图1结果表明,在几种中药中,桑叶、苦荞的清除能力较强,虽然竹叶、枸杞、干姜、薏苡仁在此体系和浓度下清除的效果较低。但苦荞和桑叶经过灵芝发酵后的效果没有明显的比单独灵芝发酵的效果好,说明二者对灵芝没有强化作用。竹叶、枸杞本身的清除羟自由基的能力不高,经过灵芝发酵后的效果不如灵芝本身的,说明对灵芝没有强化效果。而干姜、银杏叶、枸杞、薏苡仁经过灵芝发酵后,清除羟自由基的能力都不同程度的有所增强,其中以薏苡仁提高的程度比较大。分别为70. %、70.5 %、75 %强化了灵芝的清除效果。

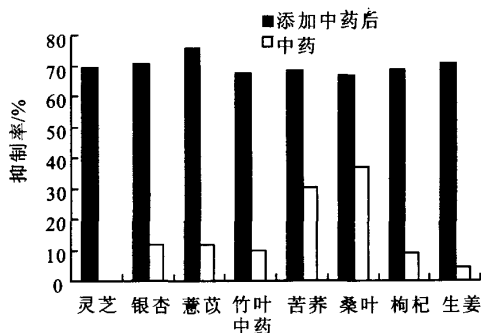


图1 中药,添加中药后灵芝的清除羟自由基的能力

Fig.1 The scavenging rate on the OH· by *G. lucidum* fermented with and without herbs

2.3 添加中药后清除超氧阴离子的效果

从图2中可以看出,银杏叶、桑叶、竹叶在所用浓度下没有清除超氧阴离子的活性而生姜、薏苡仁、枸杞、苦荞在所用的浓度下表现出明显的抑制活性,活性分别为25 %、27 %、9.7 %、23 %。7种中药经过灵芝发酵后,桑叶、银杏叶、干姜、枸杞、薏苡仁对灵芝抑制超氧阴离子的效果具有强化作用,其中以薏苡仁提高的效果最好。竹叶、苦荞对灵芝的强化作用效果没有明显的影响,不如灵芝单独发酵的效果好。

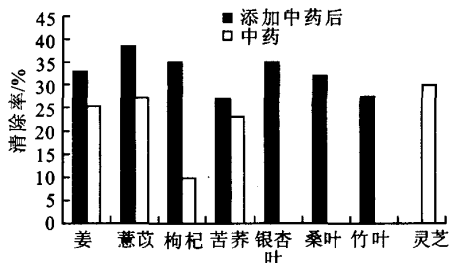


图2 中药,添加中药后灵芝清除超氧阴离子的能力比较

Fig.2 The scavenging rate on the O₂·⁻ by *G. lucidum* fermented with and without herbs

本实验在灵芝的培养基质中添加了7种药食植物,筛选出能强化灵芝清除自由基效果的中药,其中薏苡仁、银杏在清除两种自由基的能力上都比苦荞、桑叶、枸杞、干姜要好,对灵芝起到强化作用,达到中药的合理配伍,对探索抗氧化延缓衰老方面的新药的研制,发挥中药的保健功能具有一定的指导意义。

(下转第78页)

PVA 的分布实验及酶活测定结果看,认为该混合体系所产生的 PVA 降解酶系主要结合在细胞膜上; PVA 可能是先在细胞膜上 PVA 降解酶的作用下降解为小分子聚合物,然后进入细胞被进一步降解利用。

参考文献:

- [1] 王银善, 庞学军, 方慈祺. 共生细菌 SB1 降解聚乙烯醇的研究 I. 共生细菌 SB1 的分离及某些性质[J]. 环境科学学报, 1991, 11(2): 236—241.
- [2] Mori T, Sakimoto M, Kagi T, et al. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades poly(vinyl alcohol)[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(2): 330—332.
- [3] Suzuki T, Ichihara Y, Yamada M. Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol[J]. *Agric Biol Chem*, 1975, 37(4): 747—756.
- [4] Hashimoto S, Fujita M. Isolation of a bacterium requiring three amino acids for polyvinyl alcohol degradation[J]. *J Ferment Technol*, 1985, 63(5): 471—474.
- [5] Sakazawa C, Shimao M, Taniguchi Y. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed culture[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 41: 261—267.
- [6] Kim B C, Sohn C K, Lim S K. Degradation of polyvinyl alcohol by *Sphingomonas* sp. SA3 and its symbiote[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30: 70—74.
- [7] Finley J H. Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coating[J]. *Anal Chem*, 1961, 33(13): 1925—1927.
- [8] 肖长生, 张武, 谢壮奎. 聚乙烯醇降解酶产生菌的分离和发酵条件[J]. 微生物学报, 1989, 20(5): 343—347.
- [9] 钱鼎, 李寅, 堵国成. 培养条件对聚乙烯醇(PVA)降解酶合成的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(2): 226—230.

(责任编辑: 秦和平, 李春丽)

(上接第 72 页)

参考文献:

- [1] 信维平. 天然自由基清除剂的综述及开发[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(1): 80—812.
- [2] 庄毅. 应用药用真菌新型固体发酵工程技术研制中药一类新药的提议[J]. 中药新药与临床药理, 1995, 6(4): 41.
- [3] 吴炳新, 牛纪江, 孙技林, 等. 中药发酵制药技术[J]. 山东中医杂志, 2001, 90(3): 179—180.
- [4] 李雁群, 张莲芬, 张志斌, 等. 普参灵芝发酵液在 2.2.15 细胞中抗 HBV 作用[J]. 无锡轻工大学学报: 食品与生物技术, 2004, 2: 98—100.
- [5] 王锋. 添加中药的鸡腿蘑发酵[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [6] 杨海龙. 灵芝发酵新型抗肿瘤制剂的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [7] 沈齐英, 沈秋英. 北虫草抗氧自由基和羟自由基作用的研究[J]. 广西植物, 21(3): 252—254.
- [8] 熊辉岩, 张晓峰, 谭大风, 等. 大黄属三种植物不同部分提取物清除羟基自由基的体外实验研究[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 128—130.
- [9] 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.
- [10] 邹国林. 一种 SOD 测定方法邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 15(4): 71273.
- [11] Marklund S. Involvement of superoxide anion radicals in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *Eur J Biochem*, 1974, 47: 469.

(责任编辑: 杨萌)