

富锗树舌胞外多糖的体外抗氧化活性研究

李正鹏, 祝嫦巍, 吴萍, 王松华, 孙玉军

(安徽科技学院应用微生物研究所, 安徽凤阳 233100)

摘要: 利用树舌为材料通过液体深层富锗培养获得富锗胞外多糖, 测定了树舌富锗胞外多糖中锗含量及其抗氧化活性, 即清除氧自由基、羟自由基、DPPH自由基、亚硝酸盐的能力和总还原力, 并以维生素C (Vc) 作为阳性对照。实验结果表明: 树舌富锗培养基内锗质量浓度为150 $\mu\text{g/mL}$ 时, 可显著提高胞外多糖的产量, 使胞外多糖产量达到1.12 g/L, 比对照组提高36.62%。同时胞外多糖中的有机锗含量也得到显著提高达到0.26 mg/g, 比对照组提高116.67%。有机锗对提高胞外多糖清除氧自由基、羟自由基、DPPH、亚硝酸盐的能力及总还原力有显著的促进作用, 在多糖浓度为2.5 mg/mL时, 分别比对照提高25.52%、31.83%、26.95%、16.38%和10.36%。富锗树舌胞外多糖抗氧化活性与多糖浓度呈明显的剂量-效应关系。

关键词: 树舌; 富锗; 胞外多糖; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2013)8-1791-1795

In Vitro Antioxidative Activity of Germanium-rich Exopolysaccharides from *Ganoderma applanatum*

LI Zheng-peng, ZHU Chang-wei, WU Ping, WANG Song-hua, SUN Yu-jun

(Institute of Applied Microbiology, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: Germanium-rich exopolysaccharides (GEPS) was prepared via submerged fermentation of *Ganoderma applanatum*, and the antioxidative activity of GEPS in vitro was evaluated by determining its capability in eliminating superoxide anion free radical, hydroxyl radical, DPPH and sodium nitrite. Also, those various antioxidant activities were compared to Vc. Results showed that GEPS reached 1.12 g/L, being of 36.62% higher than those of the control. The organic Germanium reached 0.26 mg/g, being of 116.67% higher than those of the control when the concentration of GeO_2 in culture medium was 150 $\mu\text{g/mL}$. The organic Germanium could greatly enhance the free scavenging effective to superoxide anion free radical, hydroxyl radical, DPPH, sodium nitrite and deoxidization capacity of exopolysaccharides, being of 25.52%, 31.83%, 26.95% and 16.38%, respectively, higher than those of the control when GEPS was 2.5 mg/mL. The antioxidative activity of GEPS displayed a dose-response relationship with its concentrations.

Key words: *Ganoderma applanatum*; Germanium-rich; exopolysaccharide; antioxidative activity

树舌 (*Ganoderma applanatum*) 是隶属于灵芝属的一种大型药用真菌, 其子实体含有糖类、甾体化合物、三萜类、有机酸、生物碱类、多肽、氨基酸、酚类、香豆素类、苷类和挥发油以及微量元素等多种活性成分, 具有防止动脉硬化, 提高免疫力, 抗癌, 延年益寿等多种功效^[1-2], 深受众多消费者的青睐。已有报道表明, 树舌液体发酵产物菌丝体中和发酵液中的具有与子实体相同的成分, 尤其是胞内与胞外多糖都具有较强的生物活性。

锗按其性能分为有机锗和无机锗, 无机锗非人体

收稿日期: 2013-04-17

基金项目: 安徽高校省级科学研究重点项目 (KJ2012A063); 国家自然科学基金项目 (31100070); 安徽省自然科学基金项目 (11040606M96); 安徽科技学院生物学校级重点建设学科项目 (AKXK20102-1)

作者简介: 李正鹏 (1971-), 男, 副教授, 研究方向: 微生物生物技术

必需元素, 且对动物机体有害, 但近年来的研究表明, 有机锗是一种生物活性很高的物质, 具有诱发自身干扰素, 增加NK细胞活性, 活化巨噬细胞, 抗脂质过氧化, 抗衰老, 抗病毒, 降血脂, 清除自由基及抗肿瘤等多重医疗保健功能。同时对骨质疏松、高血压、糖尿病等也有一定疗效, 含锗食物和药物被认为是治疗癌症和艾滋病的主要药品之一^[3-5]。已有研究证实食药真菌菌丝体对锗有较强的富集能力, 可以使无机锗转化为有机锗, 降低或消除其对机体的毒害作用, 增加有机锗的利用率, 提高锗的生物效应, 同时增加菌丝体中有效活性成分的含量, 更好地改善食药真菌的品质与保健功效。由于液体深层发酵具有菌体生长迅速、生产周期短、不受时间和空间限制等优点, 因此, 有关真菌富锗液体深层发酵已有一些报道^[6], 但树舌对锗的富集的研究报道较少, 而关于树舌富锗多糖的抗

氧化性研究尚未见报道。

本研究对树舌进行富锗深层发酵,制备富锗胞外多糖,并对其抗氧化活性进行研究,为进步发挥有机锗和树舌的双重功效,开发具有多种功效的树舌功能性食品或药品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种

树舌 (*G. applanatum*), 由安徽科技学院微生物研究所提供。

1.1.2 主要试剂

DPPH、铁氰化钾、对氨基苯磺酸、邻苯三酚、硫代巴比妥酸、盐酸萘乙二胺、氧化锗、过氧化氢等。

1.1.3 主要仪器设备

FUS-D发酵罐, 上海国强生化工程装备公司; 752型紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; R206B旋转蒸发仪, 上海申顺生物科技有限公司; TAS-990原子吸收分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; FD-1真空冷冻干燥机, 南京科尔仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 富锗树舌深层培养及胞外多糖的提取与测定

在发酵培养基中加入锗质量浓度为150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化锗(根据摇瓶发酵试验结果, 确定氧化锗添加量), 利用50 L发酵罐进行富锗深层培养, 培养温度28 $^{\circ}\text{C}$ 、通气量(V/V)为1:0.5、搅拌速度为120 r/min、培养时间4 d。过滤除去菌丝体, 发酵液5000 r/min, 取上清液按李正鹏等^[7]方法进行胞外多糖的提取与测定。同时以不加氧化锗的培养基进行深层培养, 按相同的方法提取胞外多糖作为对照组样品。

1.2.2 胞外多糖有机锗含量的测定

原子吸收法^[8]。

1.2.3 氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除率测定

采用邻苯三酚自氧化法产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 进行试验^[9]。将多糖用双蒸水配制成不同质量浓度梯度的溶液。取0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液4.5 mL, 分别加入0.1 mL不同浓度的多糖溶液和0.4 mL 0.5 mmol/L的25 $^{\circ}\text{C}$ 预热的邻苯三酚溶液, 空白对照组以双蒸水代替多糖溶液, 迅速混匀后在25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应5 min, 加入1 mL 8 mol/L HCl终止反应, 于320 nm处测定吸光度。氧自由基清除率

的计算式:

$$\text{O}_2^{\cdot-}\text{清除率}/\%=[(A_0-A_1)/A_0]\times 100\%$$

注: A_0 为空白对照的平均吸光度值; A_1 为样品的平均吸光度值。

1.2.4 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率测定

由Fenton法产生 $\cdot\text{OH}$ ^[10]。将多糖用双蒸水配制成不同质量浓度梯度。取2 mL不同浓度的多糖溶液, 依次加入6 mmol/L的 FeSO_4 溶液2 mL, 混匀, 6 mmol/L的 H_2O_2 溶液2 mL, 混匀, 静置10 min, 再加入6 mmol/L的水杨酸溶液2 mL, 混匀, 静置30 min后于510 nm处测其吸光度值。空白对照组以双蒸水代替多糖溶液。羟自由基清除率的计算式:

$$\cdot\text{OH}\text{清除率}/\%=[(A_0-A_1)/A_0]\times 100\%$$

注: A_0 为空白对照的平均吸光度值; A_1 为样品的吸光值。

1.2.5 DPPH清除率测定

本实验方案参考Chen等的方法^[11]。准确称取DPPH标准品4 mg, 用无水乙醇定容至100 mL备用。取不同浓度的多糖溶液2 mL于试管中, 再加入2 mL 6.5×10^{-5} mol/L DPPH溶液, 混合均匀, 反应30 min后以3000 r/min的速度离心分离10 min, 取上清液在517 nm处测吸光值为 A_i , 清除率公式为:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}/\%=[1-(A_i-A_j)/A_0]\times 100$$

注: E(DPPH \cdot)为树舌多糖对DPPH \cdot 的清除率; A_0 为2 mL DPPH \cdot 溶液+2 mL双蒸水混匀测定的吸光值; A_i 为2 mL DPPH \cdot 溶液+2 mL多糖溶液混匀测定的吸光值; A_j 为2 mL无水乙醇+2 mL多糖溶液混匀测定的吸光值。

1.2.6 亚硝酸盐清除率测定

富锗树舌多糖清除 NaNO_2 的试验具体参照吴雪辉等的方法^[12]。

1.2.7 还原能力的测定

本试验参考Oyaizu方法^[13]并做略微改动。取不同浓度的多糖溶液1 mL于试管中, 分别加入pH 6.6的磷酸盐缓冲液0.2 mL、1%铁氰化钾0.5 mL, 混合均匀后置于50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应20 min后流水速冷, 再加10%三氯乙酸1.0 mL, 混匀, 以3000 r/min离心分离10 min, 移取上清液1.5 mL于试管中, 加蒸馏水3.0 mL和0.1% FeCl_3 0.2 mL, 常温反应5 min后于700 nm处测定吸光值, 还原能力计算式为:

$$E=(A_i-A_0)$$

注: E为待测液与空白对照组吸光值的差值; A_0 为空白吸光值; A_i 为多糖的吸光值。

1.3 数据统计

利用SPSS数据处理软件对实验结果进行显著性

分析。

2 结果与讨论

2.1 富锗树舌胞外多糖及锗含量的测定

树舌富锗深层发酵液和不加锗深层发酵液经离心、醇沉、脱蛋白、洗涤后,进行真空冷冻干燥后,分别得富锗胞外多糖(GEPS)和对照组胞外多糖样品。利用硫酸-苯酚法和原子吸收法测定胞外多糖及多糖中有机锗的含量,结果表明:胞外多糖产量达1.12 g/L,比对照组提高36.62%。有机锗的含量达0.26 mg/g,是对照组的116.67%。经方差分析对照组与富锗实验组存在显著差异。由此可见,培养基内添加GeO₂浓度为150 μg/mL时,可以显著提高胞外多糖的产量及胞外多糖中有机锗的含量。

2.2 富锗树舌胞外多糖对 O₂⁻ 的清除活性

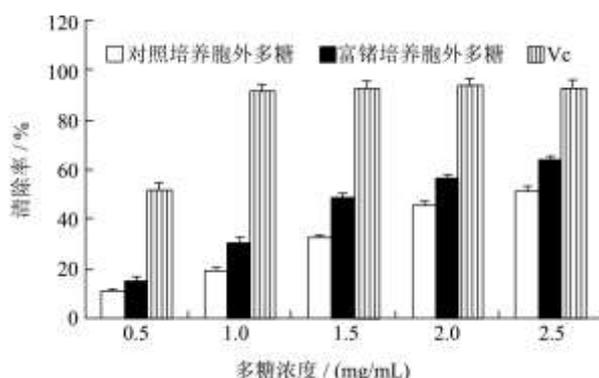


图1 富锗树舌胞外多糖对 O₂⁻ 的清除作用

Fig.1 Scavenging effects of GEPS on super oxide ion radicals

O₂⁻清除率是反映药物抗氧化作用的重要指标之一。由图1可知,树舌胞外多糖和富锗树舌胞外多糖对氧自由基有良好的清除能力,在实验浓度范围内与其浓度呈正相关性,但各样品的清除作用均低于Vc。当富锗树舌胞外多糖达2.5 mg/mL时,对氧自由基的清除率达到63.52%,比对照组提高了25.52%,而Vc在浓度为1 mg/mL即达到95%以上。2种培养方式的胞外多糖对氧自由基清除作用的半数抑制率分别为IC₅₀=1.79 mg/mL与IC₅₀=2.37 mg/mL。经方差分析2种培养方式的胞外多糖对氧自由基的清除作用存在极显著差异,可见有机锗具有明显的提高多糖对氧自由基的清除作用。

2.3 富锗树舌胞外多糖对·OH 的清除活性

羟自由基是目前所知活性氧中对生物体毒性最强,危害最大的一种自由基,它可以与生物体内的多种分子作用使细胞坏死或突变。羟自由基清除率是反

映药物抗氧化作用的重要指标。由图2可知,树舌胞外多糖和富锗胞外多糖对·OH有良好的清除能力,在设定浓度范围内,随着多糖浓度的增加,对·OH清除率不断增加,呈现出良好的量效关系,但各样品的清除作用均低于Vc。当富锗培养的胞外多糖浓度2.5 mg/mL时,清除羟自由基的能力达到63.72%,比对照组培养提高31.83%,而Vc在浓度为1 mg/mL即达到90%以上。2种培养方式的胞外多糖对羟自由基的清除作用的半数清除率分别为IC₅₀=1.75 mg/mL与IC₅₀=2.46 mg/mL。经方差分析2种培养方式的胞外多糖对羟自由基的清除作用存在极显著差异,可见有机锗具有明显的提高多糖对羟自由基的清除作用。

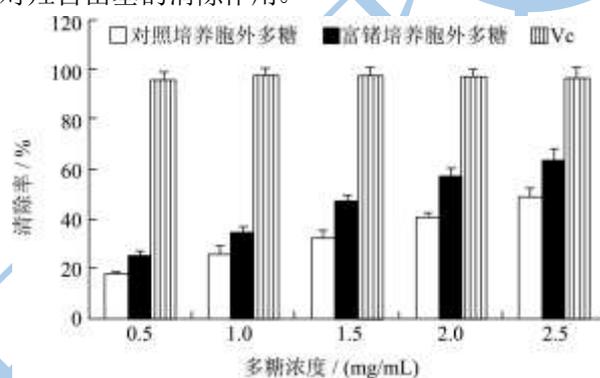


图2 富锗树舌胞外多糖对·OH 的清除作用

Fig.2 Scavenging effects of GEPS on hydroxyl free radicals

2.4 富锗树舌胞外多糖对 DPPH· 的清除活性

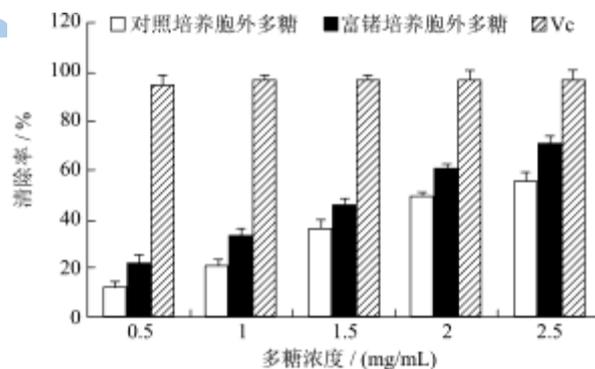


图3 富锗树舌胞外多糖对 DPPH· 的清除作用

Fig.3 Scavenging effects of GEPS on DPPH radicals

二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)是一种很稳定的以氮为中心的自由基,若受试物能清除它,则提示受试物具有降低羟自由基、烷自由基或过氧自由基的有效浓度和打断脂质过氧化链反应的作用。由图3可知,树舌胞外多糖和富锗胞外多糖随着浓度增加,清除DPPH·的作用逐渐增强,呈现一定的量效关系,但各样品的清除作用均弱于Vc。当富锗多糖浓度达2.5 mg/mL时,对DPPH·清除率达到70.28%,比对照组提高了26.95%,而Vc在浓度为0.5 mg/mL即达到95%以上。2

种培养方式的胞外多糖对羟自由基的清除作用的半数清除率分别为 $IC_{50}=1.66\text{ mg/mL}$ 与 $IC_{50}=2.16\text{ mg/mL}$ 。经方差分析2种培养方式的胞外多糖对DPPH·的清除作用存在极显著差异,可见锗具有明显的提高多糖对DPPH·的清除作用。

2.5 富锗树舌胞外多糖对亚硝酸盐的清除活性

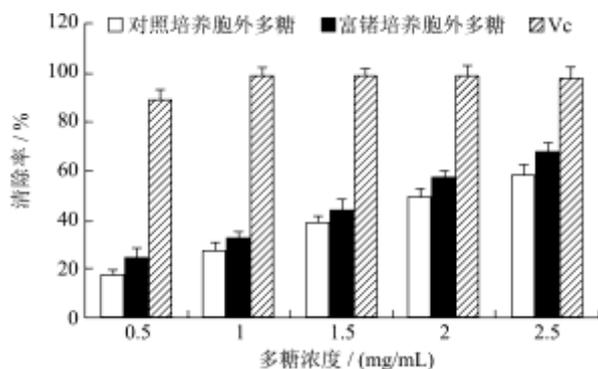


图4 富锗树舌胞外多糖对亚硝酸盐的清除作用

Fig.4 Scavenging effects of GEPS on nitrite

亚硝酸盐在弱酸性的条件下,能与氨基苯磺酸重氮化后,再与N-1-萘乙二胺盐酸盐偶合生成红色的化合物,测定红色化合物的变化可以反映出多糖清除 $NaNO_2$ 的能力的强弱。由图4可知,树舌胞外多糖与富锗胞外多糖对亚硝酸根离子具有一定的清除作用,在设定浓度范围内随着多糖浓度的增加而逐渐增大,呈现一定的量效关系,但各样品的清除活性均低于Vc。当浓度达到 2.5 mg/mL 时,清除率高达 67.83% ,比对照组提高了 16.38% ,而Vc在浓度为 1.0 mg/mL 即达到 98% 以上。2种培养方式的胞外多糖对亚硝酸盐清除作用的半数清除率分别为 $IC_{50}=1.73\text{ mg/mL}$ 与 $IC_{50}=1.99\text{ mg/mL}$ 。经方差分析2种培养方式的胞外多糖对亚硝酸盐的清除作用存在极显著差异,可见锗具有明显的提高多糖对亚硝酸盐的清除作用。

2.6 富锗树舌胞外多糖的还原能力

抗氧化剂是通过自身的还原作用给出电子而清除自由基的,还原力越强,抗氧化性越强。药物还原力的大小在一定程度上反映了其预防性抗氧化功能的强弱。由图5可知,树舌胞外多糖与富锗胞外多糖具有还较强原能力,且还原能力随着多糖浓度的增加而增大,呈现出良好的量效关系。当浓度达到 2.5 mg/mL 时,其吸光值为 0.75 ,比对照组提高了 10.3% ,可见锗具有明显的提高多糖对亚硝酸盐的还原能力。当Vc浓度为 0.5 mg/mL 时,吸光值即达到 2.06 ,说明树舌胞外多糖与富

锗胞外多糖的还原能力远低于Vc。

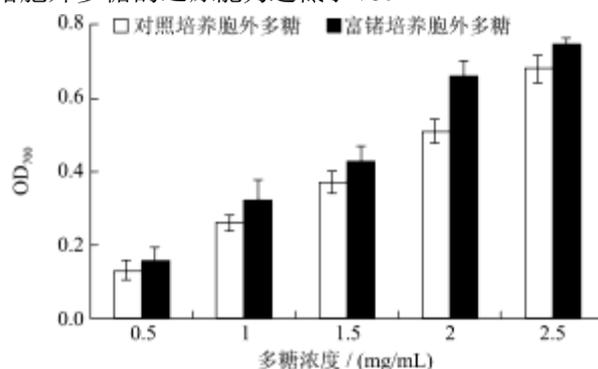


图5 富锗树舌胞外多糖的还原能力

Fig.5 Reducing power of GEPS concentrations

3 结论

3.1 多糖同蛋白质、核酸等生物大分子一样具有复杂的空间结构,空间结构与它的生物活性密切相关。决定空间结构的主要因素是多糖分子链内和链间的氢键,这些氢键是受外界条件影响的。由于多糖结构的复杂性,其构效关系的研究一直是多糖研究的热点与难点。本研究利用富锗深层发酵法,将树舌多糖生物抗氧化活性与锗的生物活性进行复配,得到了一种生物活性更好的复合多糖,具有高效的自由基清除能力,为进一步筛选高效的自由基清除剂,保证人类的健康奠定了基础。但富锗多糖的化学组成与结构、锗与多糖的结合方式、锗在多糖中的存在形式以及锗提高自由基清除率的机理还值得进行深入的研究。

3.2 本研究结果表明:利用发酵技术通过树舌深层富锗发酵,可以有效的将无机锗转化为有机锗,获得一种富锗胞外多糖,其产量达 1.12 g/L ,有机锗的含量达 0.26 mg/g 。制备得到的富锗树舌胞外多糖具有较强的还原能力,并在体外对氧自由基、羟自由基、DPPH·及亚硝酸盐均有较强的清除作用,该富锗多糖具备开发为天然抗氧化剂、功能性食品或药品的潜力。

参考文献

[1] Maja K, Anita K, Mimir N, et al. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor* [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, 26(1-2): 144-153

[2] 周忠波,马红霞,图力古尔.树舌化学成分及药理学研究进展[J].菌物研究,2005,3(1):35-42

Zhou Z B, Ma H X, Bau T. A Review of researches on chemical composition and pharmacology of *Ganoderma*

- lipsiense [J]. Journal of Fungal Research, 2005, 3(1): 35-42
- [3] Krystek P, Ritsema R. Analytical product study of germanium-containing medicine by different ICP-MS applications [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2004, 18(1): 9-16
- [4] Nakamura T, Saito M, Aso H. Effects of a lactobacilli, oligosaccharide and organic germanium intake on the immune responses of mice [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(2): 375-377
- [5] Nakamura T, Saito M, Shimada Y, et al. Induction of aminolevulinic acid synthase gene expression and enhancement of metabolite, protoporphyrin IX, excretion by organic germanium [J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 653(1-3): 75-81
- [6] 朱蕴兰.富锗木耳菌丝体主要化学成分分析[J].食品工业科技,2012,33(22):234-237
- Zhu Y L. Main chemical compositions analysis of *Auricularia auricula* germanium riched [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(22): 234-237
- [7] 李正鹏,吴萍,孙玉军,等.树舌胞外富锌多糖体外抗氧化活性研究[J].热带作物学报,2012,33(5):890-893
- Li Z P, Wu P, Sun Y J, et al. Studies on the antioxidant activity in Vitro of Zinc rich exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(5): 890-893
- [8] 陈宏伟,侯进慧,陈安徽,等.富锗蛹虫草菌丝体主要活性成分分析[J].食品科学,2010,31(24):329-333
- Cheng H W, Hou J H, Cheng A H, et al. Effect of Germanium in culture medium on main active component of *Cordyceps militaris* [J]. Food Science, 2010, 31(24): 329-333
- [9] Cheung Y C, Siu K C, Liu Y S, et al. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide-protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(5): 892-895
- [10] 黄生权,敖宏,曾凡逵,等.灵芝蛋白酶解产物分析及其抗氧化活性的研究[J].现代食品科技,2013,29(1):24-28
- Huang S Q, Ao H, Zeng F K, et al. Analysis of enzymatic hydrolysis of *Ganoderma lucidum* protein and antioxidation of its hydrolysates [J]. Modern Food Science and Technology 2013, 29(1): 24-28
- [11] Chen X L, Wu G H, Huang Z L. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58(1):18-22
- [12] 吴雪辉,张喜梅,李廷群,等.板栗花粗提物的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2008,24(1):14-16
- Wu X H, Zhang X M, Li T Q, et al. Study on antioxidant activity of crude extract from chestnut flower [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(1): 14-16
- [13] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucose amine [J]. J PJ Nutr, 1986, 44: 307-315