

不同破壁方法对灵芝孢子粗多糖 抗氧化活性的影响

董 扬^{1,2}, 郝利民^{1,2,*}, 刘宇琪^{1,2}, 张黎明¹, 鲁吉珂^{2,3}, 江庆伍⁴, 贾士儒^{1,*}

(1.天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457; 2.军需装备研究所, 北京 100010;

3.郑州大学生命科学学院, 河南 郑州 450001; 4.安徽金寨乔康药业有限公司, 安徽 六安 237300)

摘 要: 采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除法、羟自由基清除法、2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐自由基(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS⁺·)清除法和铁氰化钾法以及酵母细胞氧化损伤保护模型, 分别对未破壁灵芝孢子(unbroken *Ganoderma lucidum* spore, UGS)、机械法破壁灵芝孢子(mechanically broken *Ganoderma lucidum* spore, MGS)、生物法与机械法复合破壁的灵芝孢子(biologically and mechanically broken *Ganoderma lucidum* spore, BGS)提取粗多糖进行体外抗氧化活性评价。结果表明, 3种处理方法的灵芝孢子粗多糖表现出不同的抗氧化活性, 且抗氧化活性与多糖质量浓度呈一定数量关系, 多糖质量浓度越高, 抗氧化活性越强。BGS所得粗多糖对DPPH自由基、羟自由基、ABTS⁺·的清除能力以及还原力在3种处理方法中均为最强。多糖质量浓度为5.0 mg/mL时, 对3种自由基的清除率分别为84.6%、91.0%、99.9%, 还原力为1.09; BGS所得粗多糖对紫外损伤酵母细胞保护能力也相对较强。表明BGS粗多糖具有较高的抗氧化活性。

关键词: 灵芝孢子; 生物破壁; 机械破壁; 粗多糖; 抗氧化

Effect of Different Cell Wall Disruption Methods on *in Vitro* Antioxidant Activity of Crude Polysaccharides *Ganoderma lucidum* Spores

DONG Yang^{1,2}, HAO Limin^{1,2,*}, LIU Yuqi^{1,2}, ZHANG Liming¹, LU Jike^{2,3}, JIANG Qingwu⁴, JIA Shiru^{1,*}

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. The Quartermaster Equipment Institute of People's Liberation Army, Beijing 100010, China; 3. School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

4. Anhui Jinzhai Qiaokang Pharmaceutical Co. Ltd., Lu'an 237300, China)

Abstract: The present work was undertaken to investigate the *in vitro* antioxidant activity of crude polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* spores with unbroken (UGS) cell wall, and those with cell wall broken mechanically (MGS) and biologically-mechanically (BGS) in terms of their scavenging activities against DPPH, hydroxyl and ABTS radicals and K₃Fe(CN)₆ reducing power and their ability to protect yeast cells from oxidative damage. The results showed that the three crude polysaccharides had different antioxidant activities in a dose-dependent manner. The scavenging capacities against DPPH, hydroxyl and ABTS radicals, and the reducing power of BGS polysaccharides were the highest among the three polysaccharides. At 5.0 mg/mL, the scavenging rates of DPPH, hydroxyl and ABTS radicals were 84.6%, 91.0%, and 99.9%, respectively, and the reducing power was 1.09. The protective effect of BGS polysaccharides on UV-induced oxidative damage was relatively strong. Therefore, the crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* spores with biologically and mechanically broken sporoderm has high antioxidant activity.

Key words: *Ganoderma lucidum* spore; biological sporoderm disruption; mechanical sporoderm disruption; crude polysaccharide; antioxidant activity

收稿日期: 2017-04-26

基金项目: 全军重点科研项目(BX115C007; AX110C002); 军需所科研项目(HX-04-14-025)

作者简介: 董扬(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。E-mail: whydongyang@163.com

*通信作者: 郝利民(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为军用功能食品。E-mail: hlm2005@163.com

贾士儒(1954—), 男, 教授, 博士, 研究方向为发酵工程原理。E-mail: jiashiru@tust.edu.cn

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201717017

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 17-0101-06

引文格式:

董扬, 郝利民, 刘宇琪, 等. 不同破壁方法对灵芝孢子粗多糖抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 101-106.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201717017. <http://www.spkx.net.cn>

DONG Yang, HAO Limin, LIU Yuqi, et al. Effect of different cell wall disruption methods on *in vitro* antioxidant activity of crude polysaccharides *Ganoderma lucidum* spores[J]. Food Science, 2017, 38(17): 101-106. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201717017. <http://www.spkx.net.cn>

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 作为药物首载于《神农本草经》, 能够润补强壮, 扶正固本、延年益寿, 具有极高的药用价值和保健功效^[1]。灵芝孢子是在灵芝生长成熟期弹射出来的生殖细胞, 也称担孢子^[2]。灵芝孢子多糖是灵芝孢子的主要生理活性成分, 属灵芝多糖的一种。现代研究表明, 灵芝多糖是一种的天然抗氧化剂, 其清除自由基作用可用来防治慢性支气管炎、高血压、高血脂、糖尿病、肝炎、肿瘤以及延缓衰老等^[3]。

灵芝孢子质地坚硬、耐酸碱、极难氧化分解^[4], 为了提高人体对灵芝孢子活性成分的吸收、利用, 通常要对灵芝孢子进行破壁处理。目前, 生产中使用最广泛的破壁方法是机械法, 主要采用碾压、挤压、撞击等机械力进行破壁, 郭秀良^[5]发明了一种高精度灵芝孢子破壁机, 通过磨料筒和磨料棒的相互挤压转动进行破壁。机械法操作简单易行, 破壁率高, 但运行本较高, 且破壁过程大量产热, 容易导致孢子中的热敏成分失活。生物法包括酶解、菌溶、激活孢子萌发等, 蒋家新等^[6]采用纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等对孢子进行破壁, 破壁率达19%; 吴学谦等^[7]以蛹虫草为溶壁菌对灵芝孢子进行固态发酵, 获得免疫活性更高的破壁灵芝孢子粉; 吴小平等^[8]以灵芝子实体与麦芽汁对孢子进行萌发, 孢子萌发率大于1%。与机械法相比, 生物法能耗小, 可有效保留灵芝孢子活性成分, 但破壁率较低。

灵芝发酵液成分复杂, 含有一些有助于溶壁的纤维素酶、蛋白酶、几丁质酶等。本研究将灵芝发酵液接种在灵芝孢子粉中进行固体发酵培养, 发酵液中的酶系作用于灵芝孢子壁, 使孢子壁出现裂隙, 随后再进行机械破壁, 不仅可以提高破壁率, 还可有效保留灵芝孢子粉中的热敏活性成分。旨在以未破壁灵芝孢子 (unbroken *Ganoderma lucidum* spore, UGS) 为对照, 探讨机械破壁法、生物与机械复合破壁法对灵芝孢子粗多糖抗氧化活性的影响, 为灵芝孢子资源的应用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 菌株 (金芝1号)、孢

子粉 安徽金寨乔康药业有限公司; 酿酒酵母A.S.2399 (*Saccharomyces cerevisiae*) 天津科技大学微生物重点实验室。

1.1.2 试剂及培养基

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氨基双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS)、考马斯亮蓝G-250染液、牛血清白蛋白 美国Sigma公司; 其他试剂为国产分析纯。

酵母浸出粉胨葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YEPD) 培养基 (g/L): 葡萄糖30.0、酵母粉15.0、KH₂PO₄ 2.0、MgSO₄ · 7H₂O 1.0, pH 6.0。

1.2 仪器与设备

JA12002型电子天平 上海精科天平仪器厂; TDA-8002型恒温水浴锅 天津市中环试验电炉有限公司; RE-3000型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; QL-902型漩涡振荡器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; UVmini-1240型紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; TF-J型冷冻干燥机 北京诺比邻信息技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 灵芝孢子破壁处理

1.3.1.1 机械法破壁

采用灵芝孢子粉破壁设备^[9]进行低温剪切式物理破壁, 破壁时间1 h, 破壁温度10 ℃。

1.3.1.2 生物法与机械法复合破壁

生物法与机械法复合破壁是先对灵芝孢子进行生物法处理再采用机械法破壁。

生物法处理过程: 向经过湿热灭菌的灵芝孢子粉接种灵芝菌, 于20~25 ℃固体培养30~45 d; 机械法破壁过程: 将生物法处理后的孢子粉进行机械法破壁, 破壁方法同1.3.1.1节, 即得复合法破壁孢子粉。

1.3.2 灵芝孢子粗多糖的制备

分别称取UGS粉、机械法破壁灵芝孢子 (mechanical broken *Ganoderma lucidum* spore, MGS) 粉、生物法与机械法复合法破壁灵芝孢子 (biological and mechanical

broken *Ganoderma lucidum* spore, BGS) 粉各15 g, 加水360 mL, 回流提取12 h, 过滤, 取滤液, 减压浓缩至一定体积, 加入3 倍体积95%乙醇, 4 ℃沉淀12 h, 离心收集沉淀后冷冻干燥, 即得到UGS粗多糖、MGS粗多糖、BGS粗多糖^[10]。

1.3.3 体外抗氧化活性的测定

1.3.3.1 DPPH自由基清除能力

取不同质量浓度(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL)的3种多糖样品溶液以及VC各1.0 mL与0.5 mmol/L DPPH溶液1.0 mL、60%乙醇10.0 mL, 混合均匀, 室温下静置30 min, 测定波长517 nm处的吸光度, 以VC为阳性对照^[11]。以等体积无水乙醇代替DPPH溶液测定样品本底吸光度, 以等体积蒸馏水代替多糖样品溶液测定空白对照吸光度。按公式(1)计算DPPH自由基清除率。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_i 为样品组吸光度; A_j 为样品本底吸光度; A_0 为空白对照组吸光度。

1.3.3.2 $\cdot\text{OH}$ 清除能力

取不同质量浓度(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL)的3种多糖样品溶液以及VC各1.0 mL、5.0 mmol/L FeSO_4 溶液2.0 mL、5.0 mmol/L H_2O_2 溶液2.0 mL、蒸馏水2.0 mL, 最后加入5.0 mmol/L水杨酸-乙醇溶液2.0 mL, 混合均匀, 室温下静置30 min, 测定波长510 nm处的吸光度, 以VC为阳性对照^[12]。以等体积蒸馏水代替 H_2O_2 溶液测定样品本底吸光度, 以等体积蒸馏水代替多糖样品溶液测定空白对照吸光度。按公式(1)计算 $\cdot\text{OH}$ 清除率。

1.3.3.3 ABTS⁺清除能力

将等体积7.4 mmol/L ABTS和2.6 mmol/L过硫酸钾溶液混合, 避光反应12~16 h, 用pH 7.4的磷酸缓冲液稀释该溶液, 使其734 nm波长处的吸光度在(0.70±0.02), 制成ABTS工作液。取不同质量浓度(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL)的3种多糖样品溶液以及VC各1.0 mL与ABTS工作液6.0 mL, 混合均匀, 室温下静置6 min, 测定734 nm波长处的吸光度, 以VC为阳性对照^[13]。以等体积蒸馏水代替ABTS工作液测定样品本底吸光度, 以等体积蒸馏水代替多糖样品溶液测定空白对照吸光度。按公式(1)计算ABTS⁺清除率。

1.3.3.4 还原力

通过铁氰化钾法对还原力进行测定^[14]。取不同质量浓度(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL)的3种多糖样品溶液以及VC各1 mL与1%铁氰化钾溶液1.0 mL、pH 6.6的磷酸缓冲液1.0 mL, 混合均匀, 50 ℃水浴反应20 min, 加入10%三氯乙酸2.0 mL, 3 000 r/min离心10 min, 取上清液2.0 mL加入蒸馏水2.0 mL、0.3%三氯化铁0.4 mL, 混合均匀, 50 ℃水浴反应10 min, 测定700 nm波长处的吸光度, 以VC为阳性对照。按公式(2)计算还原力。

$$\text{还原力} = A_i - A_j \quad (2)$$

式中: A_i 为样品组吸光度; A_j 为样品本底吸光度(以等体积蒸馏水代替三氯化铁溶液)。

1.3.3.5 紫外损伤酵母细胞保护能力

将酵母菌在YEPD液体培养基中培养至对数期, 取20 mL发酵液离心收集菌体。将菌体用pH 6.9磷酸缓冲液清洗2次, 最后悬浮于20 mL磷酸缓冲液中制得酵母菌悬浮液。取菌悬液1.0 mL与不同质量浓度(4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 mg/mL)的3种多糖样品溶液以及VC各4.0 mL, 混合均匀, 在致死条件(20 W, 距离30 cm, 60 s)下照射。避光条件下, 在YEPD固体培养基上稀释涂布, 28 ℃培养48 h后进行菌落计数, 以VC为阳性对照^[15]。按公式(3)计算酵母细胞存活率。

$$\text{存活率}/\% = \frac{A_i - A_j}{A_0 - A_j} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_i 为样品组酵母单菌落数; A_j 为对照组单菌落数(以等体积磷酸缓冲液代替多糖样品溶液); A_0 为未经紫外照射的酵母单菌落数。

1.3.4 总糖质量分数的测定

采用苯酚-硫酸法测定多糖质量浓度, 以葡萄糖为标准品, 绘制苯酚-硫酸法标准曲线, 得线性回归方程: $Y = 0.6647X + 0.0110$, $R = 0.9970$ 。式中, Y 为 $A_{490\text{ nm}}$; X 为葡萄糖标准溶液质量浓度/(mg/mL)。

分别称取3种粗多糖样品0.01 g, 溶解并定容到100 mL, 得到供试样品溶液。取样品溶液1.0 mL于试管中, 加1.0 mL蒸馏水, 以2.0 mL蒸馏水为空白对照。分别向每支试管中加1.0 mL苯酚试剂, 混匀, 立即加5.0 mL浓硫酸, 混匀, 室温静置20 min, 测定490 nm波长处的吸光度, 按公式(4)计算样品溶液多糖的质量浓度^[16]。

$$\text{多糖质量浓度}/(\text{mg/mL}) = \frac{0.9\rho_1 \times V_1}{V_2} \quad (4)$$

式中: ρ_1 为标准葡萄糖溶液质量浓度/(mg/mL); V_1 为测得样品溶液吸光度所对应的葡萄糖标准溶液体积/mL; V_2 为样品溶液体积/mL; 0.9为校正系数。

得到多糖质量浓度后, 按公式(5)计算粗多糖的总糖质量分数。

$$\text{总糖质量分数}/\% = \frac{\rho_2 \times V_2 \times n}{m} \times 100 \quad (5)$$

式中: ρ_2 为多糖质量浓度/(mg/mL); V_2 为样品溶液体积/mL; n 为稀释倍数; m 为粗多糖样品的质量/mg。

1.3.5 蛋白质量浓度的测定

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质量浓度, 以牛血清白蛋白为标准品, 绘制考马斯亮蓝法标准曲线, 得线性回归方程: $Y = 2.47790X + 0.00925$, $R = 0.9941$ 。式中, Y 为 $A_{595\text{ nm}}$; X 为蛋白质量浓度/(mg/mL)^[17]。

分别将3种粗多糖样品配制成质量浓度为20 mg/mL的溶液,取500 μ L于试管中,加5.0 mL的考马斯亮蓝G-250染液,混匀。室温放置3 min后测定595 nm波长处的吸光度。按式(6)计算蛋白质质量分数。

$$\text{蛋白质质量分数}/\% = \frac{\rho_1}{\rho_2} \times 100 \quad (6)$$

式中: ρ_1 为测得样品吸光度所对应的标准牛血清白蛋白溶液质量浓度/(mg/mL); ρ_2 为粗多糖样品的质量浓度/(mg/mL)。

2 结果与分析

2.1 灵芝粗多糖的DPPH自由基清除能力

DPPH自由基是一种以氮为中心的质子自由基,在517 nm波长处有特征吸收峰,自由基清除剂可以与其电子配对使其褪色,且褪色程度与接受电子量呈定量关系,可根据吸光度变化进行快速定量分析^[18]。

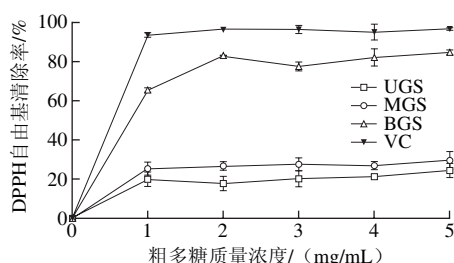


图1 UGS、MGS、BGS处理对灵芝粗多糖的DPPH自由基清除率

Fig. 1 DPPH radical scavenging rates of crude polysaccharides of UGS, MGS and BGS

由图1可知,UGS、MGS、BGS处理所得粗多糖及阳性对照VC对DPPH自由基均具有一定清除能力,在实验质量浓度范围内,DPPH自由基清除率呈现一定的剂量依赖性,粗多糖质量浓度越高,DPPH自由基清除率越强。相同质量浓度时,3种处理方法所得粗多糖及VC的DPPH自由基的清除率由大到小依次为:VC>BGS>MGS>UGS。粗多糖质量浓度为1.0 mg/mL时,UGS、MGS、BGS对粗多糖的DPPH自由基清除率分别为19.8%、25.2%、65.2%;质量浓度为1.0~5.0 mg/mL时,3种处理方法对粗多糖的DPPH自由基清除率略有增加;质量浓度为5.0 mg/mL时,UGS、MGS、BGS对粗多糖的DPPH自由基清除率分别为24.4%、29.4%、84.6%。因此,复合破壁的灵芝孢子粗多糖对DPPH自由基具有较强的清除能力。

2.2 灵芝粗多糖的•OH清除能力

•OH是一种毒性很强的活性氧自由基,对机体破坏作用极大,是造成生物体过氧化损伤的主要因素^[19]。 Fe^{2+} 与 H_2O_2 反应后会生成•OH,水杨酸能够与•OH发生

显色反应,自由基清除剂能够螯合金属离子,抑制自由基的产生^[20-21]。

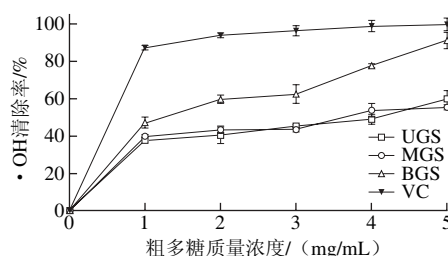


图2 UGS、MGS、BGS处理对灵芝粗多糖的•OH清除率

Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging rates of crude polysaccharides of UGS, MGS and BGS

由图2可知,UGS、MGS、BGS所得粗多糖及阳性对照VC对•OH均具有一定清除能力,在实验质量浓度范围内,•OH清除率呈现一定的剂量依赖性,粗多糖质量浓度越高,•OH清除率越强。相同质量浓度时,3种处理方法中粗多糖的•OH清除率最强的是BGS。粗多糖质量浓度为5.0 mg/mL时,UGS、MGS、BGS对粗多糖的•OH清除率分别为59.8%、55.2%、91.0%。因此,复合破壁的灵芝孢子粗多糖对•OH具有较强的清除能力。

2.3 灵芝粗多糖的ABTS⁺清除能力

ABTS经过硫酸钾氧化后会形成稳定的蓝绿色水溶性ABTS⁺,自由基清除剂与ABTS⁺反应后可使其褪色,可根据褪色情况判断样品抗氧化能力^[22]。

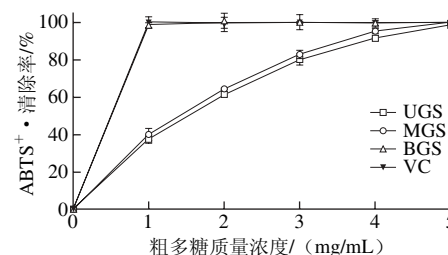


图3 UGS、MGS、BGS处理对灵芝粗多糖的ABTS⁺清除率

Fig. 3 ABTS radical scavenging rates of crude polysaccharides of UGS, MGS and BGS

由图3可知,UGS、MGS、BGS所得粗多糖及阳性对照VC对ABTS⁺均具有一定清除能力,在实验质量浓度范围内,ABTS⁺清除率呈现一定的剂量依赖性,粗多糖质量浓度越高,ABTS⁺清除率越强。相同浓度时,3种处理方法中粗多糖的ABTS⁺清除率最强的是BGS,远高于MGS和UGS;MGS对粗多糖的ABTS⁺清除率略高于UGS。粗多糖质量浓度为5.0 mg/mL,3种处理方法对粗多糖的ABTS⁺清除率均达99.0%以上;质量浓度大于1.0 mg/L时,BGS所得粗多糖的ABTS⁺清除率与VC接近。因此,复合破壁的灵芝孢子粗多糖对ABTS⁺具有较强的清除能力。

2.4 灵芝粗多糖的还原能力

化合物的还原能力是验证其潜在抗氧化活性的一个重要指标^[23], 本实验以 Fe^{3+} 为电子受体, 抗氧化剂提供电子, 将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 并生成普鲁士蓝, 在700 nm波长处有特征吸收峰^[24]。

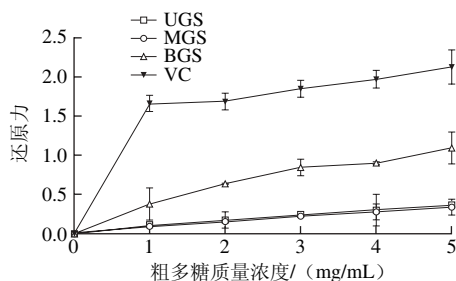


图4 UGS、MGS、BGS处理对灵芝粗多糖的还原力

Fig. 4 Reducing power of crude polysaccharides of UGS, MGS and BGS

由图4可知, UGS、MGS、BGS所得粗多糖及阳性对照VC均具有一定的还原能力, 在实验质量浓度范围内, 还原能力呈现一定的剂量依赖性, 粗多糖质量浓度越高, 还原力越强。相同质量浓度时, 3种处理方法中粗多糖的还原力最强的是BGS, UGS与MGS还原力接近。粗多糖质量浓度为5.0 mg/mL时, UGS、MGS、BGS对粗多糖的还原力分别为0.37、0.33、1.09。因此, 复合法破壁的灵芝孢子粗多糖具有较强的还原力。

2.5 灵芝粗多糖的紫外损伤酵母细胞保护能力

研究表明, 体内自由基产生过多时会引起有机生物大分子如DNA、蛋白质、脂类等受到攻击, 导致机体组织的氧化损伤, 进而引发衰老以及多种疾病^[25-26]。抗氧化剂具有消除自由基的作用, 能够有效减弱紫外照射对DNA的损伤^[27]。酵母细胞是与人体细胞接近的真核单细胞生物, 以其为对象进行氧化损伤保护作用研究, 有助于为灵芝类抗氧化产品的开发提供理论支持。

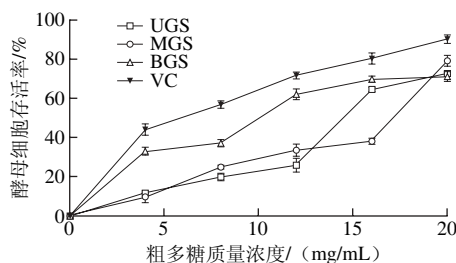


图5 UGS、MGS、BGS处理对灵芝粗多糖的紫外损伤酵母细胞保护能力

Fig. 5 Protective effects of crude polysaccharides of UGS, MGS and BGS on UV-induced oxidative damage in yeast cells

由图5可知, UGS、MGS、BGS所得粗多糖及阳性对照VC对紫外损伤酵母细胞均具有一定的保护能力, 在实验质量浓度范围内, 紫外损伤酵母细胞保护能力呈现

一定的剂量依赖性, 粗多糖质量浓度越高, 酵母细胞存活率越高, 粗多糖质量浓度为20.0 mg/mL时酵母细胞的存活率最高。粗多糖质量浓度为20.0 mg/mL时, UGS、MGS、BGS对粗多糖的酵母细胞存活率分别为72.6%、79.1%、71.1%, 酵母细胞存活率最高的是MGS; 粗多糖质量浓度为4.0、8.0、12.0、16.0 mg/mL时, 酵母细胞存活率最高的是BGS。因此, 复合法破壁的灵芝孢子粗多糖对紫外损伤酵母细胞具有较强的保护能力。

2.6 多糖和蛋白质质量分数

表1 不同破壁方法所得粗多糖中多糖和蛋白质的质量分数

Table 1 Contents of polysaccharides and protein in crude polysaccharides of UGS, MGS and BGS

指标	UGS	MGS	BGS
多糖质量分数	73.1	79.1	72.8
蛋白质量分数	3.8	3.9	7.3

由表1可知, UGS、MGS、BGS所得粗多糖中多糖质量分数分别为73.1%、79.1%、72.8%。3种粗多糖中多糖质量分数较为接近, 均在70%~80%之间, 说明3种粗多糖的主要成分均为多糖。3种处理方法所得粗多糖的蛋白质量分数均小于10%, UGS和MGS的蛋白质量分数接近, 分别为3.8%、3.9%; BGS的蛋白质量分数最高, 为7.3%, 可能其糖蛋白质量分数较高。有研究表明, 粗多糖中的蛋白质量分数与对自由基的清除能力有显著的相关性^[28-29], 故推测BGS较高的自由基清除能力可能与其较高的蛋白质量分数有关。此外, 影响多糖抗氧化活性的因素比较复杂, 包括分子构象、蛋白质量分数、糖醛酸质量分数、分子质量等^[30], 今后, 应对灵芝孢子多糖构象及其抗氧化活性作用机理作进一步的研究。

综上所述, 复合法破壁灵芝孢子粗多糖的抗氧化活性显著高于未破壁及机械法破壁灵芝孢子粗多糖, 其原因可能是: 1) 与机械法相比, 复合法缩短了灵芝孢子的机械破壁时间, 降低了机械破壁强度, 减少了多糖在破壁过程中的热损伤; 2) 复合法有利于保留多糖与蛋白之间的键合, 有助于保持多糖和蛋白的原有结构和活性; 3) 灵芝发酵液中的活性成分可能在一定程度上强化了灵芝孢子粉的抗氧化活性。

3 结论

采用5种体外抗氧化实验, 对UGS、MGS、BGS所得粗多糖的抗氧化活性进行了对比研究, 结论如下: 1) UGS、MGS、BGS所得粗多糖均具有一定的体外抗氧化活性, 且抗氧化活性与粗多糖浓度呈一定的剂量关系, 粗多糖质量浓度越高, 抗氧化活性越强; 2) BGS所得粗多糖对DPPH自由基、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{ABTS}^+\cdot$ 的清除能力均

高于UGS、MGS, 其还原能力及对紫外损伤酵母细胞的保护能力也均高于UGS、MGS。这表明BGS粗多糖具有较高的抗氧化活性, 该实验结果对灵芝孢子作为抗氧化剂的开发具有参考价值。

参考文献:

- [1] 卯晓岚. 药用菌分类概述[J]. 食用菌, 1983(3): 47-48.
- [2] 唐柳, 张志军, 魏雪生, 等. 灵芝孢子粉药理作用研究进展[J]. 天津农业科学, 2011, 17(3): 25-28. DOI:10.3969/j.issn.1006-6500.2011.03.008.
- [3] 林志彬. 灵芝抗氧化清除自由基作用的研究[J]. 菌物研究, 2014, 12(2): 63-70. DOI:10.3321/j.issn:1671-167X.2006.05.024.
- [4] 林志彬, 王鹏云. 灵芝孢子及其活性成分的药理研究[J]. 北京大学学报(医学版), 2006, 38(5): 541-547. DOI:10.3321/j.issn:1671-167X.2006.05.024.
- [5] 郭秀良. 一种高精度灵芝孢子破壁机: CN204170763U[P]. 2015-02-25.
- [6] 蒋家新, 赵澎涛, 王新辉. 灵芝孢子酶法破壁的研究[J]. 食品科学, 1996, 17(4): 19-22. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.1996.04.005.
- [7] 吴学谦, 徐娟, 吴学良, 等. 一种灵芝孢子粉的生物破壁方法: CN103340909A[P]. 2013-10-09.
- [8] 吴小平, 柯斌榕, 刘芳, 等. 一种赤芝担孢子萌发的方法: CN103026901A[P]. 2013-04-10.
- [9] 江庆伍. 一种灵芝孢子粉破壁机: CN202137002U[P]. 2012-02-08.
- [10] 黄晓兰, 吴惠勤, 黄芳, 等. 破壁与不破壁灵芝孢子粉多糖的分析[J]. 中草药, 2006, 37(6): 813-816. DOI:10.3321/j.issn:0253-2670.2006.06.004.
- [11] SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARA K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6): 945-948. DOI:10.1021/jf00018a005.
- [12] DIEZ L, LIVERTOUX M H, STARK A A, et al. High-performance liquid chromatographic assay of hydroxyl free radical using salicylic acid hydroxylation during *in vitro* experiments involving thiols[J]. Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications, 2001, 763(1): 185-193. DOI:10.1016/S0378-4347(01)00396-6.
- [13] 胥莉, 李阳, 刘学波. 车前子总黄酮和总多糖粗提物的体外抗氧化性能及其对脑神经细胞的保护作用[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 142-146. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201311032.
- [14] FAN L P, LI J W, DENG K Q, et al. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1849-1854. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.10.018.
- [15] 圣志存, 郝利民, 陶如玉, 等. 红缘拟层孔菌发酵物体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(13): 129-133. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.13.019.
- [16] 黎晶晶, 徐格非. 苯酚-硫酸法测定灵芝多糖含量的研究[J]. 杭州化工, 2008, 38(1): 23-26. DOI:10.3969/j.issn.1007-2217.2008.01.007.
- [17] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-256. DOI:10.1006/abio.1976.9999.
- [18] 郝志鹏, 马丽杰, 吴敬, 等. 海红果多糖提取工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(18): 88-92.
- [19] 柳红, 张静. 不同南瓜多糖体外清除羟基自由基作用的研究[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(4): 356-359. DOI:10.3969/j.issn.2095-0837.2007.04.007.
- [20] YUAN H M, ZHANG W W, LI X G, et al. Preparation and *in vitro* antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives[J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(4): 685-692. DOI:10.1016/j.carres.2004.12.026.
- [21] 曾军, 石国荣. 天然产物抗氧化活性的测定方法和原理[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(22): 35-36. DOI:10.3969/j.issn.1007-7731.2008.22.018.
- [22] 张逸波, 郑文杰, 黄峙, 等. 硒杂环化合物SPO清除DPPH和ABTS自由基的光谱学研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(7): 1866-1871. DOI:10.3964/j.issn.1000-0593(2010)07-1866-06.
- [23] 马虎飞, 王思敏, 杨章民. 陕北野生枸杞多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 60-63.
- [24] YEN G C, DUH P D, TSAI H L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid[J]. Food Chemistry, 2002, 79(3): 307-313.
- [25] 陈瑗, 周玫, 刘尚喜, 等. 营养、衰老与自由基理论[J]. 营养学报, 2005, 27(3): 177-180.
- [26] 才真, 王春革. 天然药物抗氧化、抗衰老的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(16): 2994-2995. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2014.16.043.
- [27] 汪曙晖, 朱俊向, 张莉, 等. 天然抗氧化剂的抗氧化与促氧化作用[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(8): 68-71.
- [28] LIU F, OOI V E, CHANG S T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts[J]. Life Sciences, 1997, 60(10): 763-771.
- [29] LIN C L, WANG C C, CHANG S C, et al. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 45(2): 146-151.
- [30] 李正一, 连成杰, 孙杰, 等. 莲藕不同部位多糖的理化特征与抗氧化活性研究[J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(4): 18-25. DOI:10.3969/j.issn.2095-6002.2016.04.004.