

中药天麻成分对灰树花胞外多糖合成及相关关键酶的影响

贺宗毅^{1,2}, 吴天祥^{2,3,*}, 徐晓宝³

(1.重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2.贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025;

3.贵州大学化学与化工学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 采用液体深层发酵方式研究中药天麻对灰树花胞外多糖合成的影响, 并用苯酚-硫酸法测定总糖含量。结果表明: 天麻添加量为7g/L时能显著促进灰树花胞外多糖产量的增加。此时灰树花产胞外多糖产量平均为3.91g/L, 与对照组的3.72g/L相比提高了5.1%。同时, 对灰树花多糖合成代谢途径中的两个重要酶的酶活力进行测定。说明添加天麻成分发酵后, 磷酸葡萄糖异构酶活力有所降低, 磷酸葡萄糖变位酶活力则无明显变化。

关键词: 灰树花; 天麻; 胞外多糖; 磷酸葡萄糖异构酶; 磷酸葡萄糖变位酶

Effect of *Rhizoma Gastrodiae* on Key Enzyme Activities Involved in the Biosynthesis of Exopolysaccharides from *Grifola frondosa* in Submerged Culture

HE Zong-yi^{1,2}, WU Tian-xiang^{2,3,*}, XU Xiao-bao³

(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 2. School of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The effect of *Rhizoma Gastrodiae* on the biosynthesis of exopolysaccharide (EPS) from *Grifola frondosa* in submerged culture was studied. Total polysaccharide content was determined by phenol-sulphuric acid method. The results showed that *Rhizoma Gastrodiae* at 7 g/L significantly promoted the biosynthesis of EPS in *Grifola frondosa* when compared with blank control, increasing EPS yield from 3.72 g/L to 3.91 g/L. The measured activities of two key enzymes involved in the synthesis of EPS indicated that after fermentation in the presence of *Rhizoma Gastrodiae*, PGI activity was decreased, although α -PGM activity showed no obvious change.

Key words: *Grifola frondosa*; *Rhizoma Gastrodiae*; exopolysaccharide; PGI; α -PGM

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)11-0199-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201311043

灰树花(*Grifola frondosa*), 又名栗子蘑、栗蘑、千佛菌、贝叶多孔菌、甜瓜板、舞茸等。它属于真菌门(Eumycota)、担子菌亚门(Basidiomycotina)、层菌纲(Hymenomycetes)、非褶菌目(Aphyllorphales)、多孔菌科(Polyporaceae)、多孔菌属(*Polyporus*)的一种大型真菌。灰树花是一种富含多糖、维生素、氨基酸、蛋白质、无机盐等有效成分的药、食两用菌。灰树花性平味甘在药用价值方面可用来治疗小便不利、水肿、脚气、肝硬化、腹水、糖尿病及高血压、肥胖等疾病。近年来的研究表明, 灰树花中富含的多糖物质具有明显的抗诱变、抗衰老、调节免疫、抑制肿瘤、抗HIV、保肝护肝等生理活性作用^[1-5]。

天麻(*Gastrodia tuber*)为兰科多年生寄生菌植物, 以蜜环菌的菌丝或菌丝分泌物为营养来源。天麻主要产于四川、云南、贵州, 其干燥块茎富含天麻素, 可以入药, 具有平肝、息风、止痉作用, 主治头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐等症。天麻的主要成分包括天麻素(*p*-hydroxymethylphenyl- β -D-glucopyranoside)、对羟基苯甲醇(*p*-hydroxybenzyl alcohol)、香草醇(vanillyl alcohol)、香兰素(vanillin)等。其中, 天麻素是其主要活性成分^[6]。许多中草药需要与真菌共生才能生长, 如天麻就必须与真菌蜜环菌共生, 在传统中药炮制过程中早已有用真菌发酵中药的方法。而近年来, 在中药炮制新技术发展中已有许多学者提出了中药发酵制药技术的新思

收稿日期: 2012-03-19

基金项目: 贵州省优秀科技教育人才省长基金项目(黔省专合字(2009)106号); 国家自然科学基金地区基金项目(31060272)

作者简介: 贺宗毅(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为应用微生物。E-mail: cqhcmtzhy2004@163.com

*通信作者: 吴天祥(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为发酵工程。E-mail: wutianxiang0808@aliyun.com

路,他们认为以药用真菌发酵中草药可以显著增强其免疫活性,并命名为:“双向发酵”。刘高强等^[7]在2007年报道了,中药中华地鳖虫和蛭螫虫的提取物能刺激灵芝菌体生长和增加灵芝多糖的产量,同时他们还说明了并不清楚是中药中的何种成分刺激了灵芝多糖的生产。Liu Gaoqiang等^[8]又在2011年报道蛭螫虫的提取物在一定浓度下能够刺激灵芝的生长和灵芝三萜类化合物的生产,不过他们同样还是没有说明中药成分和灵芝在深层发酵过程中是如何相互作用的。虽然目前对于微生物发酵中药后,明显提高其药用价值已有诸多报道,但是对中药成分与药用真菌生长代谢间相互作用过程,缺乏深入、系统的研究。

近几年研究表明向真菌培养基中添加适量的中药可以促进真菌的生长或提高活性产物的产量^[9-10]。Kim等^[11]在2010年报道了中药成分添加进真菌培养基的研究中,以中药牛蒡子提取物和灰树花作为研究对象,发现灰树花分泌的酶能够将牛蒡子苷转化为牛蒡子苷元,并且加入了牛蒡子提取物的灰树花发酵液成分(包括灰树花胞外多糖)有抗氧化活性。这些研究都是真菌对于中药成分的利用情况,但是加入的中药成分对真菌代谢产物的合成途径是否有无影响,针对这个问题,本研究从灰树花代谢途径入手分析了天麻对灰树花胞外多糖合成的影响。

Looijesteijn等^[12]在1999年报道了, α -葡萄糖磷酸变位酶(α -PGM)参与了胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)的合成,而葡萄糖磷酸异构酶(PGI)则与乳酸的代谢有关,这两种酶是糖酵解途径(EMP)与EPS合成途径的重要分支点。而葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)是这两种酶的共同前体。 α -PGM的活力决定了G-6-P是更多的走向多糖合成路径还是糖酵解途径。而在糖酵解途径中,PGI的活力决定了G-6-P能否更多的转化为果糖-6-磷酸(F-6-P)。据此,在灰树花发酵培养液中加入天麻,通过检测灰树花代谢过程中关键酶活力的变化,初步研究了天麻与灰树花代谢的相互影响。由于灰树花多糖具有明显的抗诱变、抗衰老、调节免疫、保肝护肝等生理活性作用,了解天麻成分对灰树花多糖产量提高的机理对指导灰树花多糖类新药制剂的研发具有重要的意义,并且药食两用真菌灰树花通过转化天麻中的有效成分,有可能获得药用活性更强、更稳定的活性产物,活性产物的筛选工作正在进行当中。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

天麻(*Gastrodia tuber*) 贵州省德江县天麻基地。

灰树花菌株(51616) 中国农业微生物菌种保藏管理中心;天麻素标品 贵州迪大科技生物有限公司;葡

萄糖 天津市大茂化学试剂厂;蛋白胨 上海盛思生化科技有限公司; KH_2PO_4 天津市福晨化学试剂厂; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 天津市瑞金特化学品有限公司;无水乙醇 成都金山化学试剂有限公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(β -NADP)、磷酸盐缓冲液(TEA-HCl)、乙二胺四乙酸(EDTA)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose 6-phosphate dehydrogenase) 美国Sigma公司;Bradford蛋白质浓度定量试剂盒、PGI、 α -PGM活力定量试剂盒 贵州生物有限公司;其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器与设备

CP114电子天平 奥豪斯仪器(上海)有限公司;TS-2102C恒温振荡器 上海天呈仪器有限公司;SPX-150B-Z恒温培养箱、GZX-9070 MBE数显鼓风干燥箱、BXM-30R立式灭菌锅 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;RE52AA旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;TG2-16G低速离心机 上海安亭科学仪器厂;UV-7502PC紫外-可见分光光度计 上海欣茂仪器有限公司;SW-CJ-1D净化工作台 苏州净化设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 斜面种子培养

从母种试管中切取出黄豆粒大小的菌丝块,接种于斜面中部。于25℃恒温培养9d。

1.3.2 液体种子培养

将培养好的斜面菌种切取蚕豆大小,接于液体培养基中,250mL三角瓶装液量100mL,25℃、150r/min,摇床培养9~11d。

1.3.3 摇瓶发酵培养

按15%的接种量取液体种子进行接种,250mL三角瓶装液量100mL,25℃、150r/min摇床培养6~7d。

1.3.4 天麻醇提液的制备

称取一定量的天麻,加10倍量95%乙醇浸提48h,过滤后减压蒸馏除去乙醇。用蒸馏水定容至适当体积(天麻质量浓度以生药量计)。静置24h后过滤,滤液用于添加在灰树花发酵培养基中。

1.3.5 生物量测定

将发酵液离心(4000r/min, 20min),用蒸馏水冲洗菌丝滤饼两次,再离心,菌丝在90℃电热恒温干燥箱中烘干至质量恒定,称质量得菌丝生物量。

1.3.6 胞外多糖产量测定

将100mL发酵液经4000r/min离心20min,得到的滤液用3,5-二硝基水杨酸比色法测还原糖含量、苯酚-硫酸法测总糖含量。胞外多糖产量等于总糖含量与还原糖含量之差。

1.3.7 测定样品的制备

分别取不同发酵时间的灰树花发酵液于4000r/min离心15min,得到的菌丝体置于冷冻后的研磨中(研磨置于

冰槽内),加入裂解液,混匀,研磨充分后转入5mL离心管中,加入强化液,涡旋振荡15s,反复振荡5次后,再加入适量裂解液于离心管中,于4℃、15000r/min离心15min。离心完成后取上清液至预冷的新的5mL离心管中。制得的上清液样品用于后续测定。

1.3.8 α -PGM和PGI酶活力的检测

蛋白含量的测定方法为Bradford法^[13],以牛血清白蛋白制标准蛋白曲线。

α -PGM反应液中含有0.1mol/L TEA-HCl(pH7.6)、1.98mmol EDTA、0.127mmol β -NADP、5mmol $MgCl_2$ 、1U葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和一定量的细胞提取物。添加1.06mmol α -葡萄糖-1-磷酸后反应开始。葡萄糖磷酸异构酶(PGI)反应液中含有0.1mol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.2)、5mmol $MgCl_2$ 、0.127mmol β -NADP、1U葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和一定量的细胞提取物。添加1.06mmol果糖-6-磷酸后反应开始。

α -PGM、PGI酶活力定义为每分钟每毫克蛋白中酶转化1 μ mol NADPH为一个单位,故将酶活力单位定为 μ mol NADPH/(min·mg)。而NADPH的变化可在340nm波长处测定其吸光度的改变来反映^[14]。

两种酶酶活力的计算公式为:

$$\text{酶活力}/(\mu\text{mol NADPH}/(\text{min} \cdot \text{mg})) = \frac{(A_1 - A_2) \times V_1 \times m}{V_2 \times 6.22 \times t \times \rho}$$

式中: A_1 为吸光度起始读数; A_2 为吸光度终读数; V_1 为反应液总体积/mL; m 为样品稀释倍数; V_2 为加入样品体积/mL; 6.22为NADPH毫摩尔吸光系数; t 为反应时间/min; ρ 为样品蛋白质量浓度/(mg/mL)。

2 结果与分析

2.1 天麻添加量对灰树花发酵产EPS和生物量的影响

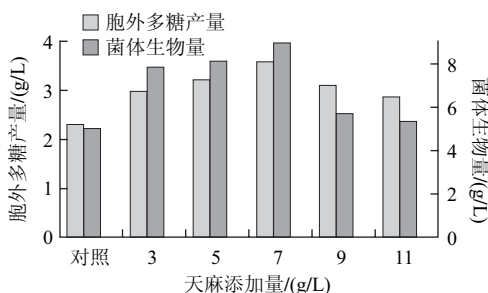


图1 天麻添加量对灰树花胞外多糖和菌体生物量的影响

Fig.1 Effect of the amount of *Rhizoma gastrodiae* on EPS production and dry cell biomass

在摇瓶培养基中加入适量的天麻,利用灰树花强大的分解转化能力,对天麻中的纤维、糖类、蛋白质等物质加以利用。灰树花在生长代谢过程中可能对天麻中的主要成分天麻素进行转化利用,从而提高胞外多糖的产

量。其他条件为葡萄糖30g/L、蛋白胨5.5g/L、 KH_2PO_4 1.5g/L、 $MgSO_4$ 0.75g/L。不同天麻添加量对灰树花发酵的影响结果见图1。天麻的添加量对灰树花胞外多糖的产生具有一定的促进作用。当天麻质量浓度为7g/L时胞外多糖产量及菌体生物量均达到最大值,分别为3.91g/L和8.90g/L。与对照相比,胞外多糖产量增加了5.1%,通过方差分析显著性 $P=0.0262$,说明了灰树花胞外多糖产量的显著增加。而天麻经过醇提,可以排除天麻中多糖对本实验带来的干扰。随着天麻质量浓度的升高,灰树花菌体生物量随之降低。可能是天麻中的某些成分对灰树花菌丝的生长产生了抑制作用。因此确定选择添加天麻质量浓度为7g/L为最佳。

2.2 天麻对灰树花胞外多糖合成的影响

采用真菌-酵母磷酸葡萄糖异构酶、真菌-酵母磷酸葡萄糖变位酶活性光谱法定量检测试剂盒分别测定磷酸葡萄糖异构酶、磷酸葡萄糖变位酶的酶活性,结果见图2。

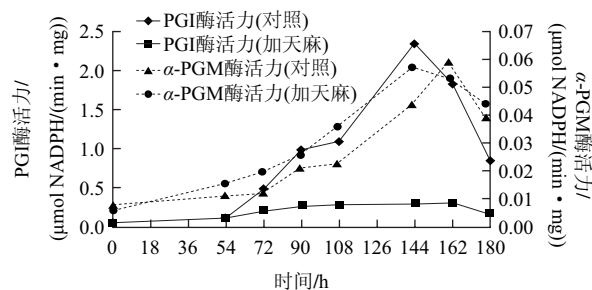


图2 PGI与 α -PGM酶活力的动力学曲线

Fig.2 Time course of α -phosphoglucosylase (α -PGM) and phosphoglucose isomerase (PGI) activities during fermentation in the presence of *Rhizoma Gastrodiae*

由图2可知,未添加天麻的灰树花发酵组(对照组)的异构酶活力随发酵时间的延长其活力逐渐上升,在发酵144h时其活力达到最大值,之后随着时间的延长其活力逐渐下降。添加天麻的灰树花发酵组(天麻组)的异构酶活力在144h处达到最大值,90~162h范围内变化不大,说明异构酶活力在90h后与对照组相比受到一定的抑制。

总体上考察,天麻组异构酶活力比对照组的低,天麻对异构酶活力影响显著($P<0.05$),这可能是加入天麻醇提液后,醇提液中的天麻素主要成分或复合成分对灰树花多糖合成代谢途径中的糖酵解重要酶——PGI起抑制作用。对照组与天麻组的变位酶酶活力先均呈上升趋势,随后逐渐下降。两者相比并无显著差异($P>0.05$),加入的天麻醇提液对变位酶并无显著影响。这与Tang Yajie等^[15]在灵芝胞外多糖合成相关酶活力研究中的结果相似。

3 讨论

目前提高灰树花多糖产量的研究主要集中在灰树花发酵培养基优化及向培养基中添加适量的中药。这些传统的方法对提高灰树花菌丝量和代谢产物是可行的,但本研究从另外的角度研究了中药天麻对灰树花胞外多糖合成的影响。

PGI是糖酵解途径中的重要酶,其最终引导乳酸的生成; α -PGM是EPS合成相关的重要酶,它引导葡萄糖-6-磷酸向多糖合成代谢途径方向进行。Degeest等^[16]的研究表明在嗜热链球菌中PGM的活力与EPS的合成紧密相关。本研究在添加天麻的基础上(与对照组相比)对PGM的酶活力分析可知灰树花EPS的合成与PGM的酶活力可能存在一种正相关的关系。天麻组的GPI活力受到显著抑制,即糖酵解途径受到显著抑制,这对于葡萄糖-6-磷酸向多糖合成途径行进是有利的。Tang Yajie等^[15]在灵芝胞外多糖合成相关酶活力研究中表明采用乳糖流加法可以促进灵芝EPS的产生,其代谢途径中 α -PGM活力提高(与对照组相比),PGI活力下降(与对照组相比),其研究还表明 α -PGM活力与EPS的合成正相关。正如先前的报道^[17],并联系前面提到的 α -PGM酶活力的变化情况,PGI活力的提高能减少糖异生途径(EPS合成途径)的碳通量,不利于EPS合成。

综合上述表明加入适量的天麻对灰树花胞外多糖产量的提高具有促进作用,天麻对PGI和PGM的影响机理如何,有待进一步研究。对于高等真菌灰树花在EPS合成与酶的关系上并没有相关文献报道,希望本研究对进一步研究EPS合成的规则及产量的提高有所帮助。

参考文献:

- [1] 邓超, 郭敏辰. 食用菌深层发酵及其多糖活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4622-4625.
- [2] 周鹏, 谢明勇. 多糖的生物活性[J]. 食品研究与开发, 2001, 22(2): 6-8.
- [3] 陈士良. 药用真菌灰树花深层发酵技术及其抗肿瘤多糖的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2000.
- [4] NANBA H. Antitumor activity of oral administered "D-Fraction" from maitake mushroom(*Grifola frondosa*)[J]. J Nat Med, 1993, 1(4): 10-15.
- [5] ADACHI Y, OHNO N, YADOMAE T. Activation of kupffer cells by administration with gel-forming(1,3)- β -D-glucan from *Grifola frondosa*[J]. Bio & Pharm Bull, 1998, 21(3): 278-283.
- [6] LIU C L, LIU M C, ZHU P L. Determination of gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, vanillyl alcohol, *p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin in tall gastrodia tuber by high-performance liquid chromatography[J]. Chromatographia, 2002, 55: 317-320.
- [7] LIU Gaoqiang, ZHANG Kechang. Enhancement of polysaccharides production in *Ganoderma lucidum* by the addition of ethyl acetate extracts from *Eupolyphaga fineness* and *Catharsius molossus*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74: 572-577.
- [8] LIU Gaoqiang, XIAO Huaxi, WANG Xiaoling, et al. Stimulated production of triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by an ether extract from the medicinal insect, *Catharsius molossus*, and identification of the key stimulating active components[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 165: 87-97.
- [9] 杨海龙, 吴天祥, 章克昌. 中药提取液对灵芝深层发酵的影响[J]. 微生物学报, 2003, 21(4): 519-522.
- [10] 王兴红, 李旗德, 曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容[J]. 中草药, 2001, 32(3): 267-268.
- [11] KIM J H, BAE J T, SONG M H, et al. Biological activities of fructus arctii fermented with the basidiomycete *Grifola frondosa*[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(12): 1943-1951.
- [12] LOOIJESTEIJN P J, BOELS I C, KLEEREBEZEM M, et al. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 5003-5008.
- [13] 王福荣. 生物工程分析与检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006.
- [14] QIAN N Y, STANLEY G A. Purification and characterization of two phosphoglucomutases from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and their regulation in maltose- and glucose-utilizing cells[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(17): 5304-5311.
- [15] TANG Yajie, ZHONG Jiangjiang. Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24: 1023-1026.
- [16] DEGEEST B, de VUYST L. Correlation of activities of the enzymes α -phosphogluco-mutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 3519-3527.
- [17] RUNGRASSAMEE W, LIU X. Activation of glucose transport under oxidative stress in *Escherichia coli*[J]. Arch Microbiol, 2008, 190: 41-49.