

四种香蘑属真菌子实体抗氧化活性比较分析

李凡¹, 薛春梅¹, 赵晔², 张跃华¹, 李佳琳¹, 杜春梅¹, 赵永勋^{1*}

(1. 佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2. 北京碧水源膜科技股份有限公司, 北京 101407)

摘要 [目的] 为了评价4种香蘑属真菌的抗氧化活性。[方法] 对4种香蘑属真菌子实体微波水提物进行抗氧化活性比较分析。[结果] 灰褐香蘑(*Lepista luscina*)、白香蘑(*Lepista caespitosa*)、紫丁香蘑(*Lepista nuda*)、花脸香蘑(*Lepista sordida*)4种香蘑子实体提取物对二苯基苦味酰基苯肼自由基(\cdot DPPH)和羟自由基(\cdot OH)的清除作用较显著, 对 \cdot DPPH的清除率依次达到73.9%、59.2%、80.7%和82.8%; 对 \cdot OH的清除率分别达到92.5%、95.7%、83.6%和94.4%。这4种真菌子实体提取物对超氧阴离子亦有一定的清除作用。[结论] 4种香蘑真菌子实体中可能存在着活性较强的天然抗氧化活性物质。

关键词 香蘑属真菌; 抗氧化活性; DPPH; 羟自由基; 超氧阴离子

中图分类号 S646 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)04-015-03

A Comparative Analysis on Antioxidant Activity for Four Kinds of *Lepista epiphyte*

LI Fan¹, XUE Chun-mei¹, ZHAO Ye², ZHAO Yong-xun^{1*} et al (1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. Beijing Origin Water Membrane Technology Co. Ltd, Beijing 101407)

Abstract [Objective] The research aimed to evaluate the antioxidant activity of four kinds of *Lepista epiphyte*. [Method] The comparative analysis for anti-oxidant activity of fungi microwave water extracts of the four fragrant mushroom fruiting bodies was carried out. [Result] Fungi microwave water extracts of *Lepista epiphyte*, *Lepista luscina*, *Lepista caespitosa*, *Lepista nuda* and *Lepista sordida* showed significant clearance, which was 73.0%, 73.0%, 58.6% and 73.0% respectively to \cdot DPPH and 91.0%, 94.8%, 82.3% and 91.0% respectively to \cdot OH in the microwave processed water extract of their fruiting body. Moreover, the fruiting body extracts of the four kinds of fungus showed a clear effect on superoxide anion. [Conclusion] Fruiting body of four kinds of *Lepista epiphyte* might contain natural antioxidant substances.

Key words *Lepista epiphyte*; Antioxidant activity; DPPH; Hydroxyl free radicals; Superoxide anion

现代研究表明,许多疾病如心脑血管疾病、癌症以及人体衰老等过程都与自由基过剩有关^[1]。自由基是生物体内生物化学反应的普遍介质,是带有不配对电子的原子、原子团或分子如羟自由基、超氧阴离子自由基等,可直接损伤各种生物膜,导致多种疾病的发生^[2]。因而,如何开发利用抗氧化活性物质调节体内代谢、延缓衰老、预防疾病等问题已引起人们的广泛关注。国内外的许多研究证明,很多大型真菌子实体和发酵产物中多含有抗氧化活性物质^[3-6]。这表明大型真菌可能是提取天然、安全的抗氧化活性物质的理想原料。

香蘑属(*Lepista*)真菌隶属于真菌门(Eumycota)担子菌纲(Basidiomycetes)伞菌目(Agaricales)口蘑科(Tricholomataceae)。我国已发现有12种^[7]。到目前为止,关于香蘑属真菌子实体提取物抗氧化活性的比较研究未见报道。笔者主要通过制备灰褐香蘑[*Lepista luscina* (Fr.) Sing.]、白香蘑[*Lepista caespitosa* (Bres.) Sing.]、紫丁香蘑[*Lepista nuda* (Bull.; Fr.) Cooke]、花脸香蘑[*Lepista sordida* (Fr.) Sing.]等4种常见香蘑子实体提取物,测定其清除 \cdot DPPH、 \cdot OH以及超氧阴离子的能力,评价这4种香蘑属真菌的抗氧化活性,并且进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试灰褐香蘑、白香蘑、紫丁香蘑、花脸香蘑均为野生香蘑,采集于黑龙江省佳木斯市周边林场。

1.2 提取液的制备^[8] 将采集的白香蘑、灰褐香蘑、紫丁香蘑、花脸香蘑放入干燥箱中烘干,准确称取烘干后这4种香蘑各5.0 g,放入烧杯中,按料液比1:20加双蒸水至10.00 ml,用玻棒搅拌均匀,同时放入微波炉中,调至300 W输出档,定时1 min,取出,8 000 r/min离心4 min,取上清液,即为这4种香蘑的提取液。将这4种香蘑的提取液分别稀释至0.5、1、2、4、6、8、10 mg/ml的浓度梯度,4℃冰箱保存,备用(保存时间最好不超过72 h)。

1.3 指标测定与方法

1.3.1 清除 \cdot DPPH能力的测定^[9]。精确称取DPPH试剂0.0158 g,用无水乙醇溶解,并定容至200.0 ml,使其浓度为200 μ mol/L,避光保存(该溶液最好现配现用)。准确吸取各浓度样品溶液2.0 ml与2.0 ml DPPH溶液,加入同一具塞试管中,充分混匀,37℃恒温水浴暗反应30 min后,于波长517 nm处测定吸光度(A_i),以无水乙醇调零。每个样品平行测定3次,取平均值。按以下公式,计算各待测样品对DPPH自由基的清除率。

$$\cdot \text{DPPH 清除率}(\%) = \frac{1 - (A_i - A_0)}{A_0} \times 100\%$$

式中, A_i 为2.0 ml样品溶液与2.0 ml DPPH试剂混合液的吸光度; A_0 为2.0 ml样品溶液与2.0 ml空白溶剂(无水乙醇)混合液的吸光度; A_0 为2.0 ml DPPH溶液与2.0 ml溶剂混合液的吸光度。

1.3.2 清除 \cdot OH能力的测定^[10-12]。采取邻二氮菲- Fe^{2+} 法测定羟基自由基的清除率。吸取1.5 ml 5 mmol/L邻二氮菲用液,加入4 ml pH 7.4磷酸钠缓冲液,再加入1.0 ml 7.5 mmol/L FeSO_4 溶液,立即混匀。加入1 ml某一浓度的样品溶液,立即混匀。加入1.5 ml双蒸水以补充体积,最后加入1.0

基金项目 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(12531696)。
作者简介 李凡(1989-),女,山东阳谷人,硕士研究生,研究方向:微生物学。*通讯作者,教授,硕士生导师,从事真菌生物学方面的研究。
收稿日期 2014-12-15

ml 浓度 1% H_2O_2 溶液,以双蒸水代替 H_2O_2 溶液作为空白对照,轻轻混匀。37 °C 保温 90 min,于 536 nm 测定吸光度。

·OH 清除率计算公式为:

$$\cdot OH \text{ 清除率}(\%) = \frac{A_i - A_j}{A_s - A_o} \times 100\%$$

式中, A_i 为加入样品(子实体提取液)及 H_2O_2 ; A_j 为加 H_2O_2 而不加样品; A_s 为两者都不加; A_o 为空白对照。

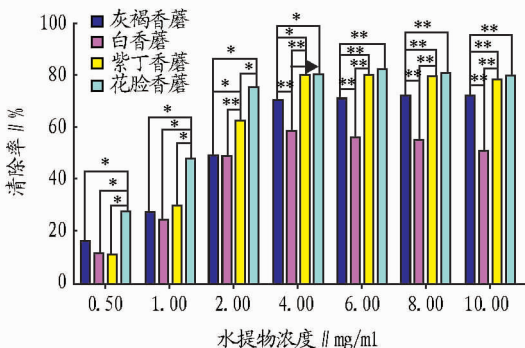
1.3.3 清除超氧阴离子($\cdot O_2^-$)能力的测定^[10-12]。取 pH 为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 6.0 ml,加入不同浓度的样品 0.5 ml,37 °C 水浴 10 min,最后加入 37 °C 预热过的 7 mmol/L PR (邻苯三酚盐酸溶液) 1.0 ml,混匀后反应 4 min,用 0.5 ml 浓盐酸终止反应,测定 325 nm 处吸光度(A)以等体积 pH 为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液为空白吸光度(A_0)。蒸馏水调零。

$$\cdot O_2^- \text{ 清除率}(\%) = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100\%$$

式中, A (试样)为试样组在波长 325 nm 的吸光度; A_0 为空白组在波长 325 nm 的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 ·DPPH 清除率的比较 对这 4 种香蘑属真菌子实体的水提物清除 ·DPPH 的能力进行双因素方差分析。从图 1 可以看出,这 4 种香蘑属真菌子实体的水提物都有一定清除 ·DPPH 的能力。在一定程度上,随着子实体提取物浓度的增加,清除 ·DPPH 的能力也在升高。当质量浓度为 4.00 mg/ml 时,灰褐香蘑、白香蘑、紫丁香蘑和花脸香蘑的 ·DPPH 清除率均达到较大值,分别为 70.5%、58.6%、80.4% 和 80.5%。·DPPH 去除能力强弱顺序为花脸香蘑 > 紫丁香蘑 > 灰褐香蘑 > 白香蘑。在 0.50~4.00 mg/ml 浓度梯度范围内,·DPPH 清除率随着浓度的升高而增加。当质量浓度为 6.00 mg/ml 时,花脸香蘑的清除率最大,达到 82.7%。在 6.00~10.00 mg/ml 浓度梯度范围内,随着浓度的增加,4 种香蘑的 ·DPPH 清除率均有些许的降低。在 0.50~10.00 mg/ml 浓度梯度范围内,同种香蘑不同浓度梯度 ·DPPH 清除率均有显著差异。在提取物浓度相同的情况下,不同香蘑清除 ·DPPH 能力之间存在差异,但白香蘑均与其他 3 种香蘑之间有显著性差异。

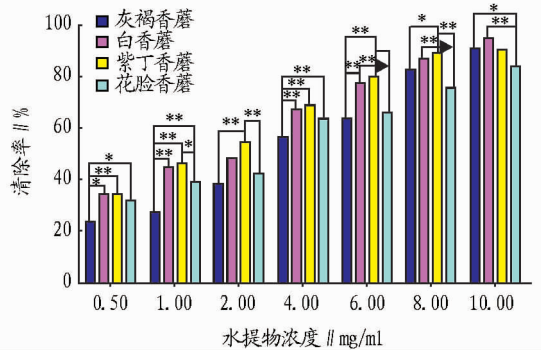


注: *、* * 分别表示差异在 0.05、0.01 水平显著。

图 1 清除 ·DPPH 的能力

2.2 清除 ·OH 能力的比较 从图 2 可以看出,4 种香蘑属真菌子实体均有很强的清除 ·OH 能力,在 0.50~10.00

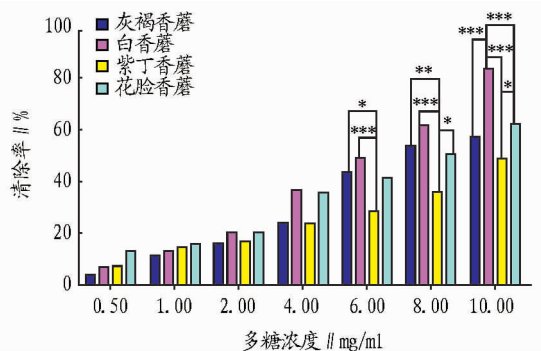
mg/ml 浓度梯度范围内对 ·OH 的清除能力均随提取物质量浓度的增加而升高。当质量浓度为 4.00 mg/ml 时,去除能力强弱顺序为花脸香蘑 > 白香蘑 > 灰褐香蘑 > 紫丁香蘑。当质量浓度为 10 mg/ml 时,白香蘑的清除率最大,达到 94.9%。在提取物浓度相同的情况下,不同香蘑 ·OH 的能力均存在差异,但白香蘑均与其他 3 种香蘑之间的清除率均有显著差异。



注: *、* * 分别表示差异在 0.05、0.01 水平显著。

图 2 清除 ·OH 的能力

2.3 清除超氧阴离子能力的比较 由图 3 可知,4 种香蘑属真菌子实体对邻苯三酚自氧化均有抑制作用,在一定质量浓度范围内对超氧阴离子的清除能力均随提取物质量浓度的增加而升高。在所测样品中,白香蘑具有较强的清除超氧阴离子的能力,并且随着浓度的升高而增加。当质量浓度为 4.00 mg/ml 时,清除超氧阴离子能力的强弱顺序为花脸香蘑 > 白香蘑 > 灰褐香蘑 > 紫丁香蘑。而当质量浓度为 10.00 mg/ml 时,白香蘑的清除率最高,达到 25.4%。在 0.50~4.00 mg/ml 浓度梯度范围内,各香蘑属真菌间的清除率无显著差异,但随着质量浓度的升高,紫丁香蘑与其他 3 种香蘑的清除率均有显著性差异。这可能与紫丁香蘑的药用成分有关。



注: *、* * 分别表示差异在 0.05、0.01 水平显著。

图 3 清除超氧阴离子的能力

3 讨论

目前,食品安全成为全世界关注的话题。人工合成抗氧化剂存在潜在的致癌作用,以天然抗氧化剂取代合成抗氧化剂是食品行业的发展趋势^[13]。传统食用菌因含有多种抗氧化成分,受到人们的青睐,而对于那些珍惜的野生食用菌,科学家对其进行系统性抗氧化活性比较分析的研究较少。

研究表明,灰褐香蘑、白香蘑、紫丁香蘑、花脸香蘑 4 种

香蘑属真菌子实体微波处理水提取物对·DPPH和·OH的清除作用比较显著,其中对·DPPH的清除率分别达到73.0%、58.6%、80.0%和82.7%,花脸香蘑的清除能力最强;对·OH的清除率分别达到91.0%、94.8%、82.3和90.3%,白香蘑的清除能力最强。4种香蘑属真菌子实体的水提取物对超氧阴离子均有一定的清除作用,分别达到17.3%、25.4%、14.8和17.5%,白香蘑的清除能力最强。这4种香蘑真菌子实体中可能存在着活性较强的天然抗氧化活性物质,推测其水提取物中含有较多亲水性抗氧化活性物质。该研究没有对这4种香蘑属真菌子实体中的抗氧化活性物质进行进一步的分离纯化,所以不能确定抗氧化活性物质的具体成分,有待于今后进行深入研究。

参考文献

- [1] 张成,康蔓妮,叶慧颖,等. 蕺菜浸提液的抗氧化能力研究[J]. 湖北农业科学, 2014,53(4):877-880.
- [2] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [3] 王宏雨. 食用菌抗氧化活性研究及竹荪抗氧化活性物质提取工艺优化[D]. 福州:福建农林大学,2010.
- [4] MAHFUZ ELMASTAS,OMER ISILDAK,IBRAHIM TURKEKUL. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushroom[J]. Journal of Food Composition and Analysis,2007,12:223-227.

- [5] LILLIAN BARROS,MARIA-JOAO FERREIRA,BRUNO QUEIROS. Total phenols,ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities[J]. Food Chemistry,2007,103:413-419.
- [6] 马晓华,连宾. 几种常见食用菌清除羟基自由基能力的研究[J]. 食品发酵工业,2005,214(10):25-28.
- [7] 李挺,宋斌,林群英,等. 我国香蘑属真菌研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(13):7579-7581.
- [8] 黄琼,丁玲. 微波协同酶法提取金针菇多糖工艺的优化[J]. 食品与机械,2013,29(1):128-130,166.
- [9] 王振江,唐翠明,刘学铭,等. 桑椹高花色苷及抗氧化能力种质资源的筛选与评价[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(3):197-202.
- [10] 赵艳红,李建科,李国秀. 天然抗氧化物体外活性评价方法的优选与优化[J]. 食品科学,2008,29(6):64-69.
- [11] 陈湘莲,曾宏彬,李泰辉. 花脸香蘑菌丝体提取物的体外抗氧化活性[J]. 微生物学通报,2011,38(6):958-963.
- [12] 陈湘莲,李泰辉,沈亚恒. 花脸香蘑发酵物的体外抗氧化及抗肿瘤活性研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(14):8276-8278.
- [13] 刘树兴,赵芳. 从天然植物中开发抗氧化剂研究进展[J]. 食品研究与开发,2007,28(7):179-182.

(上接第9页)

3 讨论

全世界每年约有140万人死于结核病,尤其是耐药结核杆菌感染,对人类健康构成重大威胁。因此,研发新的抗结核药物任务艰巨。G2菌株属白浅灰链霉菌。许多白浅灰链霉菌能产生一种或多种抗细菌、抗真菌、抗藻类、抗病毒、抗原生动物或抗肿瘤的抗菌素。有报道指出,白浅灰链霉菌发酵物乙酸乙酯提取物具有较强的抗肿瘤活性^[13]。李晓玲^[14]研究表明,红树植物来源的白浅灰链霉菌MGR072蕴藏着丰富的生物碱类次生代谢产物,是寻找药物先导化合物的重要资源。但迄今为止,有关浅灰白链霉菌次生代谢产物抗结核杆菌方面的研究不多。结果表明,G2培养液的乙酸乙酯萃取物具有抗结核杆菌活性,G2菌株分离自淡水底层土壤。这一发现提示具特殊地貌的土壤放线菌具有进一步挖掘新型抗结核药物的潜力。G2菌株发酵液的乙酸乙酯萃取物成分极其复杂,其抗结核杆菌的活性弱可能与有效成分含量不高有关。虽然萃取后剩余物也显示出抗结核杆菌活性,很有可能是萃取不彻底造成的,当然并不排除剩余物存在不同于乙酸乙酯萃取物的活性成分。笔者拟对G2菌株的乙酸乙酯萃取物进行活性跟踪分离,得到活性单体,并且进行结构鉴定和作用机制探讨,相关工作正在进行中。

参考文献

- [1] MARÍA DEL RAYO CAMACHO-CORONA,MÓNICA A. RAMÍREZ-CABRERA,OMAR GONZÁLEZ-SANTIAGO,et al. Activity against drug re-

- sistant-tuberculosis strains of plants used in mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases[J]. Phytother Res,2008,22:82-85.
- [2] ELOUARTI A,HAOUAT A C,SQALLI H,et al. Extra- and intracellular antimycobacterial activity of *Arbutus unedo* L[J]. Afr J Microbiol Res,2012,6:1283-1290.
- [3] DYE C. Global epidemiology of tuberculosis[J]. Lancet,2006,367:938-940.
- [4] WHO: Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy and Financing. Geneva,Switzerland: WHO/HTM/TB/2009.411[R].2009.
- [5] WHO: Global Tuberculosis Control-Surveillance, Planning and Financing. Geneva,Switzerland: WHO/HTM/TB/2007.376[R].2007.
- [6] WHO. 耐药结核病临床医生使用指南[S]. 2版. 北京:中国疾病预防控制中心结核病防治中心,2010.
- [7] 姜成林,徐丽华. 放线菌资源的开发利用[J]. 工业微生物,1989,19(6):31-35.
- [8] 张纪忠,黄静娟,盛宗斗,等. 微生物分类学[M]. 上海:复旦大学出版社,1985:214-218.
- [9] 程丽娟,薛泉宏,来航线,等. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,1988.
- [10] 杨宇容,徐丽华,李启任,等. 低温环境中放线菌的研究[J]. 云南大学学报:自然科学版,1997(4):397-402.
- [11] 阮继生,黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京:科学出版社,2011:116-152.
- [12] ZUO Y X,LI L,ZHANG T,et al. Contribution of *Streptomyces* in sediment to earthy odor in the overlying water in Xionghu reservoir, China[J]. Water Research,2010,44(20):6085-6094.
- [13] 古静燕. 海洋白浅灰链霉菌 *Streptomyces Albogriseolus* A2002 抗肿瘤活性成分的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2004.
- [14] 李晓玲. 红树林来源白浅灰链霉菌 MGR072 次级代谢产物的研究和核糖体工程优化[D]. 北京:国家海洋局第三海洋研究所,2011.