

紫丁香蘑粗多糖的体外抗氧化活性研究

李男男¹, 李环明¹, 薛春梅^{1,2*}, 赵永勋¹, 李佳琳¹, 杜春梅^{1,2}, 李丽¹, 靖桂云¹

(1. 佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学应用微生物研究所, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要 [目的]研究紫丁香蘑菌丝体粗多糖的抗氧化活性。[方法]采用微波辅助法提取紫丁香蘑菌丝体粗多糖,采用固液分离及离心法提取发酵液粗多糖,采用 DPPH 法、水杨酸比色法和邻苯三酚自氧化法等研究粗多糖清除自由基能力的变化。[结果]菌丝体粗多糖和发酵液粗多糖均具有较强的抗氧化能力,但 2 种粗多糖的抗氧化能力有差异;菌丝体粗多糖清除自由基的能力高于发酵液粗多糖,在特定浓度范围内,随着多糖浓度的增加,其抗氧化能力也随之增强,且呈量效依赖关系。[结论]菌丝体粗多糖和发酵液粗多糖均具有抗氧化能力,但菌丝体粗多糖抗氧化能力强于发酵液粗多糖。

关键词 紫丁香蘑;粗多糖;抗氧化活性;自由基

中图分类号 S646.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)14-0063-03

The Antioxidant Activity of Crude Polysaccharide in *Lepista nuda*

LI Nan-nan¹, LI Huan-ming¹, XUE Chun-mei^{1,2*} et al (1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. Institute of Applied Microbiology, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract [Objective] To study the antioxidant activity of crude polysaccharide in *Lepista nuda* mycelium. [Method] The mycelium polysaccharide of *Lepista nuda* was extracted by microwave-assisted method. The crude polysaccharide of fermentation broth was extracted by solid-liquid separation and centrifugation. The change in the capacity of crude polysaccharide scavenges free radical with the methods of DPPH, salicylic acid colorimetry and three phenol autoxidation was determined. [Result] The crude polysaccharide of mycelium and fermentation broth both had stronger antioxidant ability. However, the antioxidant capacity of two kinds of crude polysaccharide was different; The ability of scavenging free radical of polysaccharide from mycelium was stronger than that of polysaccharide in fermentation broth. In a certain range of concentration, if the concentration of polysaccharide increased its antioxidant capacity also increased, which was dose-dependent. [Conclusion] The crude polysaccharide of mycelium and fermentation broth both had stronger antioxidant ability, and the former was stronger than the latter.

Key words *Lepista nuda*; Crude polysaccharide; Antioxidant activity; Free radical

自由基生物学研究与肿瘤发生、心脑血管疾病、药物中毒、人类机体衰老等过程均具有密切的关系,自由基包括超氧阴离子、有机氧自由基、轻自由基、单线态氧、无机和有机过氧化物等类型。正常情况下,生物机体在体内有氧化代谢过程中会不断地产生自由基,如果超出机体防御系统所具有的清除能力时,这些自由基会直接地或间接地损伤机体组织,诱发某些疾病的发生^[1-2],因此自由基是机体细胞损伤及其癌变的原始诱发机制之一。部分天然抗氧化剂具有抗氧化物质,能减少对机体的损伤和危害。研究表明,食用菌多糖有效、无毒,具有清除自由基、提高抗氧化酶活性等作用,食用菌多糖将成为新型药物、保健品和抗氧化剂开发和研究的理想来源^[3]。

紫丁香蘑(*Lepista nuda*)属于担子菌亚门(Basidiomycota)层菌纲(Hymenomyetes)伞菌目(Agaricales)口蘑科(Tricholomataceae)香蘑属(*Lepista*),主要分布于我国,欧洲地区也有分布,是一种药食皆用的名贵野生真菌。目前紫丁香蘑菌丝体多糖抗氧化活性的相关研究鲜见报道。笔者以紫丁香蘑液体发酵菌丝体作为材料,研究其清除自由基的能力和活性,以期为其开发和利用此种真菌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌丝体。紫丁香蘑菌丝体由佳木斯大学微生物实验

室提供。

1.1.2 培养基。斜面培养基:马铃薯 200 g/L,蔗糖 20 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L,琼脂 20 g/L, MgSO₄ 1 g/L, VB₁ 0.01 g/L, pH 自然。种子培养基:马铃薯 200 g/L,蔗糖 20 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄ 1 g/L, VB₁ 0.01 g/L, pH 自然。液体培养基:马铃薯 200 g/L,可溶性淀粉 20 g/L,酵母浸粉 5 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, CaCl₂ 0.01 g/L, VB₁ 0.01 g/L, pH 7。

1.2 方法

1.2.1 培养方法。

1.2.1.1 菌种活化。将菌种在 28 ℃ 下培养 1 d, 无菌条件截取约 0.5 cm² 接种于试管中,于 25 ℃ 培养,待菌丝长满试管后备用。

1.2.1.2 种子培养。选择 250 mL 三角瓶加入 100 mL 种子培养基,121 ℃ 高压灭菌 30 min,冷却后,在无菌条件下接种约 0.5 cm² 的 4 块至液体培养基中,在 25 ℃、110 r/min 条件下摇床培养 13 d。

1.2.1.3 摇瓶培养。将种子悬液接入到指定的液体培养基中,接种量约为 5%,并在 25 ℃、110 r/min 条件下摇床恒温培养 13 d。

1.2.2 粗多糖样品的制备。发酵产物经固液分离得到菌丝体沉淀和发酵液,菌丝体用蒸馏水洗涤,重复 3 次,再用滤纸吸至不滴水。所得菌丝体放于 50 ℃ 恒温干燥箱内烘干至恒重,并用天平称重,记录。

称取定量菌丝体按 1:50 的比例溶入蒸馏水中,并放入微波炉中,在中火条件下提取 15 min,取出后在 55 ℃ 水浴中保温 1 h,之后放入低速离心机 4 000 r/min 离心 10 min,沉淀中再加入 20 mL 蒸馏水,重复上述操作,合并滤液,按 1:5 的

基金项目 黑龙江省教育厅科学技术面上项目(12531696);佳木斯大学科技青年基金项目(Sq2013-029)。

作者简介 李男男(1990—),女,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,研究方向:微生物学。*通讯作者,副教授,硕士,硕士生导师,从事应用微生物学研究。

收稿日期 2017-03-31

比例加入 95% 乙醇,放入 4 °C 冰箱醇沉 24 h,4 000 r/min 离心 10 min,沉淀物用无水乙醇、丙酮反复洗涤并干燥,即得到菌丝体粗多糖样品^[4-5]。

将发酵液置于离心机中,4 000 r/min 离心 10 min,沉淀物用无水乙醇、丙酮反复洗涤并干燥,即得到发酵液粗多糖样品。

精确称取菌丝体粗多糖和发酵液粗多糖样品,溶于蒸馏水中,分别配制成 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 的样品溶液。

1.2.3 抗氧化活性测定。

1.2.3.1 二苯基苦味酰基苯胍(DPPH)法。DPPH 清除率测定:精确称取 0.015 8 g DPPH 试剂,用无水乙醇定容至 200.0 mL,使其浓度为 200 μmol/L,避光保存。在试管中依次加入原液和 8 次脱蛋白后多糖水溶液 2.5 mL,200 μmol/L DPPH 溶液 2.5 mL,混匀,25 °C 放置 30 min,测定 517 nm 处的吸光度。以蒸馏水作为空白体系,测定其吸光度,以无水乙醇代替 DPPH 为对照体系,测其吸光度。每个样品设置 3 次重复,取其平均值^[6]。

$$\text{清除率} = [1 - (A_s - A_T) / A_0] \times 100\%$$

式中, A_s 为 2.5 mL 样品液与 2.5 mL DPPH 试剂混合液的吸光度; A_T 为无水乙醇代替 DPPH 作为对照的吸光度; A_0 为蒸馏水代替样品作为空白的吸光度。

1.2.3.2 普鲁士蓝法。还原能力测定:取磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L,pH 6.8)和 $K_3Fe(CN)_6$ (1% W/V) 各 2.5 mL,加入待测液 2 mL 摇匀后,于 50 °C 水浴 30 min,然后加入三氯乙酸(10% W/V) 2.5 mL,取混合液 2.5 mL,与蒸馏水 2.5 mL 和 $K_3Fe(CN)_6$ (1% W/V) 0.5 mL 混合后,以磷酸缓冲溶液作为参比,于 700 nm 处测定吸光度,以蒸馏水作为空白对照。共设置 3 次重复,取其平均值^[7]。

1.2.3.3 水杨酸比色法。羟自由基清除率的测定:加入 9 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液、水杨酸-乙醇溶液和待测液各 1 mL,然后加入 9 mmol/L H_2O_2 溶液 1 mL,于 37 °C 反应 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,采用蒸馏水作为对照,在 510 nm 处测定其吸光度。以 $FeSO_4$ 溶液、水杨酸-乙醇溶液、待测液和蒸馏水各 1 mL,测其吸收度。每个样品均设 3 次重复,取其平均值^[8-9]。

$$\text{清除率} = [A_0 - (A_x - A_{w_0})] / A_0 \times 100$$

式中, A_0 为空白对照液的吸光度; A_x 为加入待测液后的吸光度; A_{w_0} 为待测液的吸光度。

1.2.3.4 邻苯三酚氧化法。超氧阴离子自由基抑制率测定:取 Tris-HCl(0.1 mol/L,pH 8.2)缓冲液 6 mL 于试管中,分别加入各级多糖样品 0.5 mL,37 °C 条件下水浴 10 min,加入 7 mmol/L 比邻苯三酚盐酸溶液 1 mL,充分混匀,反应 4 min,立即用 0.5 mL 浓盐酸终止反应,测其 320 nm 处吸光度 A_x 。对照组以 Tris-HCl 缓冲液代替糖液作为对照组,测其 320 nm 处吸光度 A_0 ,设 3 次重复,取其平均值。

$$\text{抑制率} = (\Delta A_0 - \Delta A_x) / \Delta A_0 \times 100\%$$

式中, A_0 为对照液的吸光度在 4 min 的变化量; A_x 为加入提

取液后的吸光度在 4 min 的变化量。

1.3 数据处理 采用 Excel 和 SPSS 18.0 软件对试验数据进行处理,结果取平均数,并进行检验分析。

2 结果与分析

2.1 DPPH 清除率 DPPH 是一种较为稳定的自由基,易溶于无水乙醇并呈深紫色,当有抗氧化剂存在时,其孤对电子会被配对,表现为紫色减弱,在 517 nm 处吸收度随之减弱或消失。DPPH 法可总体评价天然抗氧化剂消除自由基的能力。由图 1 可知,2 种粗多糖均具有 DPPH 自由基清除能力,在一定范围内,随着多糖浓度的增加,DPPH 自由基清除率也随之增加。菌丝体粗多糖的 DPPH 自由基清除能力略高于发酵液粗多糖 DPPH 自由基清除能力,但小于 Vc 的 DPPH 自由基清除能力,当浓度为 10 mg/mL 时,清除率达到最大值,分别为 71.44% 和 52.61%。

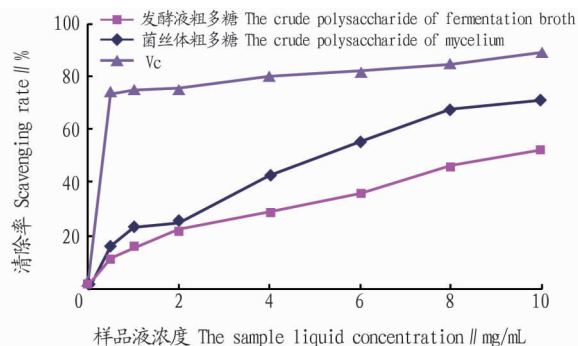


图 1 紫丁香菌丝体粗多糖和发酵液粗多糖 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 1 The scavenging capacity of the crude polysaccharide DPPH free radicals of mycelium and fermentation broth

2.2 还原能力 抗氧化剂通过还原作用给出电子来清除自由基,还原力越大抗氧化性越强,可根据还原力的大小来判断其抗氧化活性,其反应生成物在 700 nm 处的吸光度大小即反映其抗氧化能力的大小,值越大则样品还原能力越强。由图 2 可知,2 种粗多糖均具还原能力,在一定范围内,随着糖浓度的增加,还原能力逐渐加强,菌丝体粗多糖还原能力略高于发酵液粗多糖的还原能力,但与 Vc 比较,2 种糖的还原能力均较弱。当样品液浓度达 10 mg/mL 时,其吸光度达最大值,分别为 0.966 和 0.493。

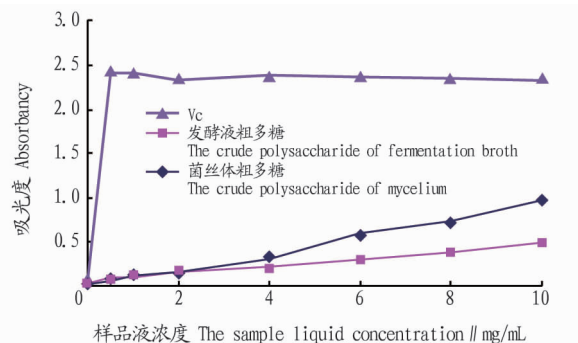


图 2 紫丁香菌丝体粗多糖和发酵液粗多糖的还原能力

Fig. 2 The reducing capacity of the crude polysaccharide of mycelium and fermentation broth

2.3 羟自由基清除率 羟自由基是已知活性最强的自由基,可损伤蛋白质、核酸、脂质等大分子物质,引起细胞损伤,从而导致机体衰老和癌变等。因此,清除羟自由基是预防机体疾病的有效方式之一。由图 3 可知,2 种粗多糖均具有羟自由基清除能力,在一定范围内,随着糖浓度的增加,羟自由基清除率也随之增加,菌丝体粗多糖的羟自由基清除率略高于发酵液粗多糖羟自由基清除率,但低于 Vc 的羟自由基清除率。当浓度为 10 mg/mL 时,其清除率达到最大值,分别为 81.63% 和 65.97%。

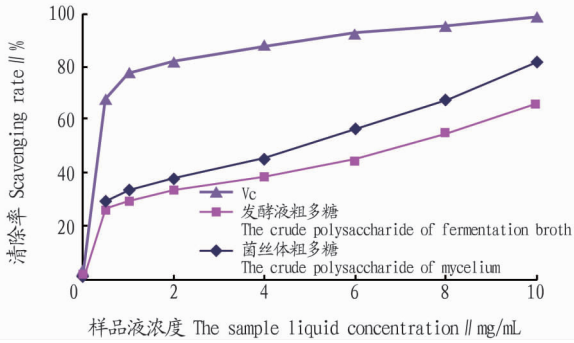


图 3 紫丁香蘑菇菌丝体粗多糖和发酵液粗多糖羟自由基的清除能力

Fig. 3 The scavenging capacity of the crude polysaccharide Hydroxyl free radicals of mycelium and fermentation broth

2.4 超氧阴离子清除率 超氧阴离子自由基是机体内存在的主要活性氧自由基,对人体的作用具有双重性,其总量较少时,可杀死部分进入机体内的病菌,促进人体机体的健康;当其在机体内大量聚集时,会发生反应并生成氧自由基,引起脂质过氧化,从而导致细胞膜的结构和功能改变,可以通过清除超氧阴离子自由基的能力,来评价其抗氧化能力。由图 4 可知,2 种粗多糖均具有超氧阴离子自由基清除能力,在一定范围内,随着糖浓度的增加,超氧阴离子自由基清除率也随之增加,菌丝体粗多糖超氧阴离子自由基清除率略高于发酵液粗多糖超氧阴离子自由基清除率,但低于 Vc 的超氧阴离子羟自由基清除率。当糖浓度为 10 mg/mL 时,清除率均达最大值,分别为 44.83% 和 31.77%。

3 结论与讨论

食用菌多糖具有清除自由基、提高抗氧化酶活性和抑制脂质过氧化等抗氧化活性,可起到保护生物膜和延缓衰老的

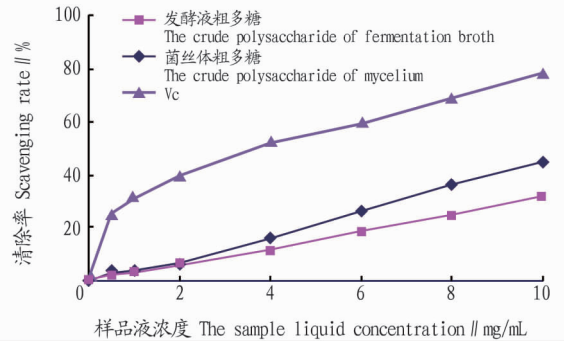


图 4 紫丁香蘑菇菌丝体粗多糖和发酵液粗多糖超氧阴离子的清除能力

Fig. 4 The scavenging capacity of the crude polysaccharide superoxide anion of mycelium and fermentation broth

作用,食用菌多糖可加工成为保健食品和药品,是抗氧化剂开发的重要来源。该试验结果表明,紫丁香蘑菇菌丝体粗多糖和发酵液粗多糖均具有清除自由基能力,但发酵液粗多糖清除自由基的能力略弱于菌丝体粗多糖。清除率与多糖浓度具有相关性,即多糖浓度增加,清除率也随之增加,菌丝体粗多糖清除超氧阴离子自由基的能力大于发酵液粗多糖。胞内粗多糖的抗氧化能力强于胞外粗多糖,2 类多糖在结构上是否存在差异有待于进一步研究,该试验未对粗多糖成分分离纯化,不能确定哪些成分起到抗氧化活性,这也有待于深入研究。

参考文献

- [1] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,1999:7.
- [2] 金杰,李志西,张锋,等. 桑椹醋提取物对二苯代苦味酰基自由基(DP-PH·)的清除作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(3):135-137.
- [3] 林烽. 橄榄叶总黄酮代谢和提取工艺优化及其抗氧化作用[D]. 福州:福建农林大学,2008.
- [4] 陈留勇,孟宪军,贾薇,等. 黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基、提高免疫活性研究[J]. 食品科学,2004,25(2):167-170.
- [5] 丁利军,周国栋. 莲子水溶性糖的提取及其对自由基清除能力的研究[J]. 食品科学,2002,23(8):252-254.
- [6] 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.
- [7] 陈湘蓬,曾宏彬,李泰辉. 花脸香蘑菇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.
- [8] 李小雨,王振宇,王璐. 食用菌多糖的分离、结构及其生物活性的研究进展[J]. 中国农学通报,2012,28(12):236-240.
- [9] 张珏,张志才,王玉红,等. 灵芝菌丝体碱提水溶性多糖工艺条件及对羟自由基的清除作用[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(3):98-100.

(上接第 62 页)

- [10] 杨宝珍,董学军,高琼,等. 油蒿(*Artemisia ordosica*)的蒸腾作用及其群落的水分状况[J]. 植物生态学报,1994,18(2):161-170.
- [11] LAN S B, WU L, ZHANG D L, et al. Desiccation provides photosynthetic

protection for crust cyanobacteria *Microcoleus vaginatus* from high temperature[J]. *Physiol Plant*, 2014, 152(2):345-354.

- [12] 程晓莉,安树青,钦佩,等. 鄂尔多斯草地退化过程中植被地上生物量空间分布的异质性[J]. 生态学报,2003,23(8):1526-1532.