

花脸香蘑菌丝体提取物的体外抗氧化活性

陈湘莲^{1,2,3} 曾宏彬² 李泰辉^{2*}

(1. 中国科学院华南植物园 广东 广州 510650)

(2. 广东省微生物研究所 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东省菌种保藏及应用新技术重点实验室 广东 广州 510070)

(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: 分别测定花脸香蘑 *Lepista sordida* 发酵菌丝体不同浓度乙醇溶剂提取物在 4 种抗氧化模型中的抗氧化作用。结果表明, 各种菌丝体提取液对二苯基苦味酰基苯肼自由基(\cdot DPPH)和羟自由基(\cdot OH)均有显著的清除作用, 其清除作用随着乙醇溶剂浓度的提高而降低: 在 3 g/L 菌丝生药浓度时, 去离子水提取物对 DPPH 自由基和羟自由基的清除率分别为 90.55%和 81.90%; 在 6 g/L 菌丝生药浓度时, 50%乙醇和 70%乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除率分别为 53.7%和 45.2%, 对羟自由基的清除率分别为 79.4%和 78.4%。各菌丝提取物也具有极强的抗脂质过氧化能力, 在 5 g/L 菌丝生药浓度 64 h 内, 水提取物、50%乙醇和 70%乙醇提取物对亚油酸过氧化物的抑制率分别为 100%、96.0%和 89.2%。在一定浓度下, 各提取液对邻苯三酚自氧化也均有抑制作用。

关键词: 发酵, 乙醇提取物, DPPH, 亚甲基蓝, 超氧阴离子, 脂质过氧化

The antioxidant activities of mycelial extracts of *Lepista sordida* in vitro

CHEN Xiang-Lian^{1,2,3} ZENG Hong-Bin² LI Tai-Hui^{2*}

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China)

(2. Guangdong Provincial Public Laboratory of New Microbial Application Technology, Guangdong Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The antioxidant activities of fermented mycelial extracts with different concentrations of ethanol of *Lepista sordida* were individually determined in four test systems. The results showed that all the mycelial extracts had obvious effects on scavenging 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (\cdot DPPH) and hydroxyl radical; and with the concentration of ethanol increasing, the antioxidant activities declined: the extract with deionized water at the concentration of 3 g/L mycelium, DPPH radical scavenging

activity and hydroxyl radical scavenging activities were 90.55% and 81.90% respectively. At a concentration of 6 g/L mycelium in 50% and 70% ethanol extracts, the DPPH radical scavenging activities were 53.7% and 45.2%, and the hydroxyl radical scavenging activities were 79.4% and 78.4%. The extracts could also significantly inhibited the peroxidation of linoleic acid, within 64 hours at the concentration of 5 g/L, the inhibition ratios of the extracts with water, 50% and 70% ethanol were 100%, 96.0% and 89.2% respectively. The extracts possessed slightly restraining effects on pyrogallol autooxidation.

Keywords: Fermentation, Ethanol extracts, DPPH, Methylene blue, Autooxidation, Peroxidation of linoleic acid

人体在新陈代谢过程中会产生大量的自由基,而这些自由基是引起癌症、动脉硬化症、帕金森症等多种疾病的重要因素^[1-2]。人体适当补充一些抗氧化剂可以有效地清除体内过多的自由基,从而减小其造成的危害。在抗氧化剂的使用上,一些合成抗氧化剂如对丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)等经动物实验发现有毒,而天然的抗氧化剂通常更符合绿色环保的要求。因此,开发安全高效的天然抗氧化剂来代替合成抗氧化剂已成为今后的发展趋势^[3]。

研究证实,一些高等真菌具有较好的抗氧化活性,如灵芝 *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.、银耳 *Tremella fuciformis* Berk.、金针菇 *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer 等,并且从中分离获得了一些活性化合物^[4]。花脸香蘑 *Lepista sordida* (Schumach.) Singer 属于担子菌门 Basidiomycota 口蘑科 Tricholomataceae 香蘑属 *Lepista*, 又名紫晶香蘑、紫晶口蘑、丁香蘑、花脸蘑或紫花脸香蘑,是一种有名的食药两用菌,具有相当高的开发价值,一直以来倍受食用菌爱好者和科研工作者的关注。我国民间认为花脸香蘑具有养血、益神、补五脏之功效^[5]。然而,目前对花脸香蘑的活性研究报道较少,具体的药效机制还不清楚,还需要进一步试验论证。本研究首次对花脸香蘑的抗氧化活性进行探讨,为进一步开发该珍稀食用菌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 菌种由广东省微生物研究所提供,菌株编号为 GIM5.315, 标本号为 GDGM21933。

1.1.2 培养基: 综合 PDA 液体培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, KH_2PO_4 3, MgSO_4 1.5。

1.1.3 试剂: DPPH (1,1-二苯基-2-苦肼基)购自 Alfa Aesar 公司; 亚油酸购自 ICN 公司; 维生素 C、甘露醇、硫酸亚铁、亚甲基蓝、过氧化氢、无水乙醇、氯化亚铁、盐酸、硫氰酸铵、邻苯三酚等试剂均为国产分析纯; 水为超纯水。

1.1.4 仪器: VC505 超声波细胞破碎仪(Sonics 公司), R-200 旋转蒸发仪(Buchi 公司), CW20 恒温水浴(Topper 公司), WGP-400 隔水式电热恒温培养箱(重庆万达仪器有限公司), DU640 可见紫外分光光度计(Beckman 公司), Milli-Q 超纯水制备系统(Millipore 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的培养: 在 500 mL 的三角瓶中装入 200 mL 液体 PDA 培养基, 接种 1 mm^3 大小的接种块于三角瓶中, 于摇床上 25°C 、120 r/min 条件下培养 10 d, 离心收集菌丝体和发酵液。菌丝体于 60°C 烘干至恒重。

1.2.2 样品的制备: 将烘干的菌丝粉碎, 准确称取菌丝粉末 4 份, 每份 5 g, 分别加入去离子水、50%乙醇、70%乙醇及 95%乙醇各 25 mL, 浸泡 24 h 后, 超声破碎 30 min, 离心, 取上清。由于预实验发现乙醇对实验结果有影响, 因此将含乙醇的提取物减压蒸馏(60°C , 50 mbar)浓缩除去乙醇, 加去离子水定容至 25 mL, 即得到浓度为 200 g/L 菌丝生药浓度的菌丝体提取液, 置于 4°C 冰箱备用。使用时再根据需要稀释成不同浓度。

维生素 C 用去离子水配成 1 g/L 的溶液, 甘露醇用去离子水配成 10 g/L 的溶液, 作为阳性对照。

1.2.3 清除·DPPH 自由基的测定(DPPH 法): 参考金杰等^[6]的方法: 在试管中加 2.5 mL DPPH 溶液 (1.3×10^{-4} mol/L), 依次加入不同量的提取物, 用去离子水定容至 5 mL, 混匀, 室温放置 30 min 后, 于 1 cm 比色皿中在 517 nm 波长下测定吸光度 A_s ; 以蒸馏水代替样品作为空白对照, 其吸光度为 A_0 ; 以无水乙醇代替 DPPH 作为对照体系, 其吸光度为 A_T 。按以下公式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_T}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

1.2.4 清除·OH⁻自由基的测定(Fenton 法): 参考李铭芳^[7]的方法。在 10 mL 的具塞刻度比色管中, 空白对照管加入亚甲基蓝(0.005%)溶液 300 μ L、PBS (磷酸盐缓冲溶液, pH 6.0) 500 μ L, 加去离子水定容至 5 mL, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 以 1 cm 比色皿, 在 664 nm 波长处测定其吸光度 A_0 ; 损伤管依次加入亚甲基蓝溶液 300 μ L、PBS (pH 6.0) 500 μ L、5 mmol/L FeSO₄ 溶液 250 μ L、20 mmol/L H₂O₂ 溶液 250 μ L, 加去离子水定容至 5 mL, 摇匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 以 1 cm 比色皿, 在 664 nm 波长处测定其吸光度 A ; 样品管是在上述损伤管的反应体系中加入一定量样品, 使之终浓度分别达到图示中的菌丝生药浓度, 处理过程同损伤管, 在 664 nm 波长处测定其吸光度 A_s 。

各样品管中加入一定量样品于上述损伤管的反应体系中, 使之终浓度为分别达到图示中的菌丝生药浓度, 在 664 nm 波长处测定其吸光度 A_s 。羟自由基清除率可按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_s - A}{A_0 - A} \times 100 \quad (2)$$

1.2.5 清除·O₂⁻自由基的测定(邻苯三酚自氧化法): 参考钟飞等^[8]的方法。取 Tris-HCl-EDTA (pH 8.2) 缓冲液 2.7 mL 于 1 cm 比色杯中, 再加入 50 μ L 水, 于 25 $^{\circ}$ C 恒温 10 min, 再加入 25 $^{\circ}$ C 恒温的 45 mmol/L 邻苯三酚溶液 6 μ L 启动反应, 于 325 nm 波长测定反应启动后第 30 秒的光密度值, 然后每隔 30 s 测一次光密度值, 共测 4 min, 记录每次测量的光吸收值 A_0 。

按上述方法, 以不同的花脸香蘑提取物及发酵液代替水, 于 325 nm 波长测定反应启动后第 30 秒的光密度值, 然后每隔 30 s 测一次光密度值, 共测

4 min, 记录每次测量的光吸收值 A_s 。根据数据绘制邻苯三酚自氧化速率曲线。计算自氧化平均速率 $\overline{\Delta A}$, 通过以下公式计算抑制率(I):

$$I(\%) = 1 - \frac{\overline{\Delta A_s}}{\Delta A_0} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.6 抗脂质过氧化能力的测定(FTC 法): 参考吕晓玲等^[9]的方法。在 10 mL 具塞试管中加入样品 1 mL, 0.1 mol/L 的 PBS (pH 7.0) 2 mL, 50 mmol/L 亚油酸溶液 1 mL, 混匀后, 置于 40 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中。取 100 μ L 反应液, 分别加入 9.7 mL 75%乙醇溶液, 100 μ L 30%硫氰酸铵溶液, 100 μ L 20 mmol/L 氯化亚铁溶液, 混匀, 准确反应 3 min 后, 于 1 cm 比色杯中测定 500 nm 波长下的吸光值, 以 A_{500} 表示。零时刻测定 $A_{500(t_0)}$, 以后每隔 24 h 测定一次 $A_{500(t)}$, 绘制氧化速率曲线。由于在 64 h 时, 空白样品的吸光值达到最大, 其后吸光值逐渐降低, 按以下公式计算各样品反应 64 h 后的抑制率(I):

$$I(\%) = 1 - \frac{A_{500(64)}^{\text{样品}} - A_{500(t_0)}^{\text{样品}}}{A_{500(64)}^{\text{空白}} - A_{500(t_0)}^{\text{空白}}} \times 100\% \quad (4)$$

2 结果与分析

2.1 清除·DPPH 自由基的能力

二苯基苦味酰基苯肼(DPPH)是一种稳定的自由基, 溶于乙醇后为深紫色, 在 517 nm 下有最大吸收值。当有抗氧化剂存在情况下, 其孤对电子被配对, 紫色减弱, 光吸收值随之减弱或消失。DPPH 法可总体评价天然抗氧化剂清除自由基的能力。不同浓度的花脸香蘑提取物对 DPPH 自由基的清除效果如图 1 所示。

检测结果表明, 各发酵菌丝体提取物都具有一定的清除 DPPH 自由基活性的能力, 随着样品浓度的增加, 清除率逐渐增高, 表现出明显的量效关系。其中水提物的抗氧化能力最强, 在 3 g/L 菌丝生药浓度时达到 90.55%, 随着样品浓度的增高, 其抗氧化能力变化不显著。随着提取液乙醇浓度的提高, 其提取物的抗氧化能力逐渐下降, 这说明花脸香蘑发酵菌丝体中具有抗氧化活性的物质多为水溶性物质。维生素 C 是一种极强的还原剂, 在本实验中浓度为 0.6 g/L 时, 其清除率达到 85.0%以上。

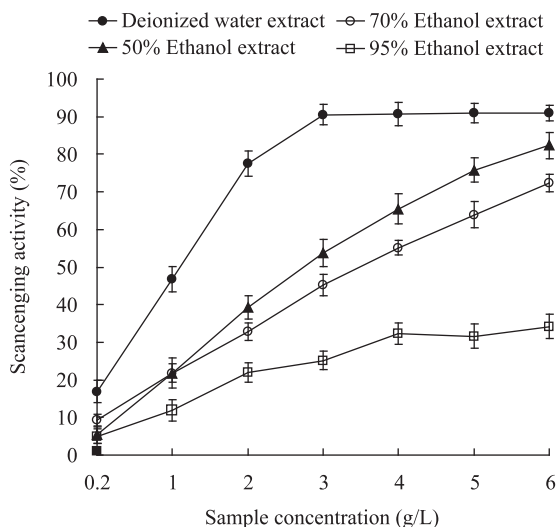
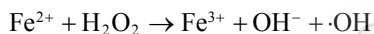


图1 花脸香蘑菇菌丝提取物清除 DPPH 自由基的能力
Fig. 1 DPPH radical scavenging activities of mycelia extracts of *Lepista sordida*

2.2 清除羟自由基的能力

羟自由基($\cdot\text{OH}$)非常活泼, 在含氧自由基中氧化性最强。由于其存在时间短, 难于直接测定, 因此一般采用间接法。最常用的就是利用 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$, 其反应机理如下所示。



产生的 $\cdot\text{OH}$ 与亚甲基蓝反应生成无色加合物, 使吸光度降低。因此, 可通过测定吸光度的变化, 从而间接测得所产生 $\cdot\text{OH}$ 的浓度变化。花脸香蘑菇菌丝提取物及发酵液清除羟自由基的实验结果如图2所示。

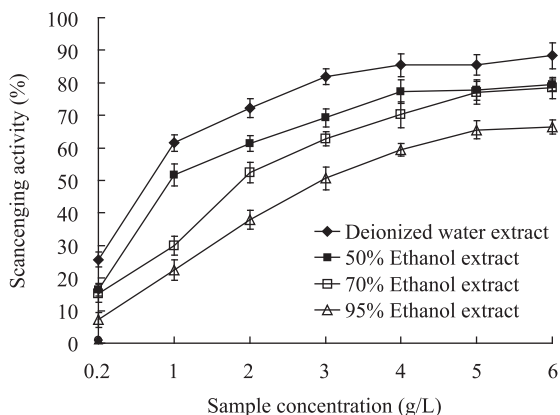


图2 花脸香蘑菇菌丝提取物及发酵液清除羟自由基的能力
Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging activities of mycelia extracts of *Lepista sordida*

在本实验中, 水提物清除羟自由基的能力最强, 3 g/L 时, 其清除率为 81.9%。随着乙醇浓度的增加, 提取液清除羟自由基能力逐渐减弱, 但是减弱的速率不如对 DPPH 自由基的作用明显。说明能够清除羟自由基的物质绝大部分还是水溶性物质, 但是有一部分在乙醇中的溶解度随乙醇浓度的增加而增加, 这也与 DPPH 自由基清除实验的结果相符。甘露醇又称虫草酸, 被认为是虫草类真菌的主要药效成分之一, 具有止咳平喘、清除羟自由基等作用, 对多种疾病具有一定的疗效^[10]。在本研究中, 甘露醇溶液也显示出较强的清除羟自由基的能力, 在终浓度为 0.15 g/L 时, 其清除率达到 80.0%; 而维生素 C 对羟自由基的清除能力远不如对 DPPH 自由基的清除能力, 在终浓度为 0.6 g/L 时, 清除率仅为 25.0%。

2.3 清除超氧阴离子的能力

邻苯三酚在弱碱性条件下会发生自氧化产生超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)。 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除剂能抑制邻苯三酚的自氧化过程, 使体系的 A_{325} 的特征吸收峰减弱。实验中发现, 低浓度的提取物对邻苯三酚自氧化的速率抑制不明显; 高浓度的提取物由于本身颜色较深, 加入到反应系统对吸光度测定产生干扰, 测定不准确。实验中加入 50 μL (终浓度为 0.33 g/L) 各提取液测定其抗氧化能力。各样品加入后对邻苯三酚自氧化的抑制作用如图3所示。

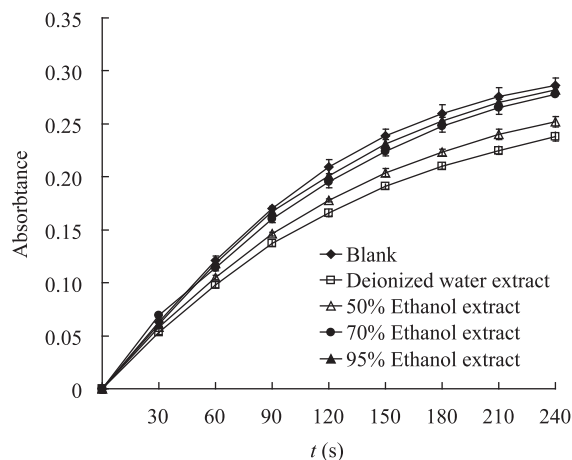


图3 0.33 g/L 各提取液的邻苯三酚自氧化速率曲线
Fig. 3 The autoxidation rate curve of pyrogallol at the concentration of 0.33 g/L mycelia extracts

表 1 花脸香蘑各提取物及发酵液对邻苯三酚自氧化和亚油酸过氧化的抑制率
Table 1 Inhibition rates of pyrogallol autoxidation and peroxidation of linoleic acid by mycelial extracts and fermentation broth of *Lepista sordida*

样品 Sample	水提取物 Extract with water	50%乙醇提取物 Extract with 50% ethanol	70%乙醇提取物 Extract with 70% ethanol	95%乙醇提取物 Extract with 95% ethanol
邻苯三酚自氧化抑制率(<i>I</i>) Inhibition rate of pyrogallol autoxidation (%)	13.76±1.31	10.07±0.97	1.01±0.21	0.67±0.48
亚油酸过氧化抑制率(<i>I</i>) Inhibition rate of peroxidation of linoleic acid (%)	100.00±5.56	96.05±6.20	89.15±5.23	23.90±4.63

实验结果表明, 提取物能一定程度上降低邻苯三酚自氧化的速率, 其平均抑制率见表 1。其中水提取物的抑制率最强, 其次是 50%乙醇提取物, 随着乙醇浓度的增加, 提取物对邻苯三酚自氧化的抑制率逐渐减弱。加入 50 μ L 10 g/L 的甘露醇溶液, 在该反应体系中不具有抑制作用。维生素 C 具有较强的抑制邻苯三酚自氧化的作用, 但是随着时间的增加, 其抑制能力也逐渐减弱。为避免样品本身颜色的干扰, 本实验中加入的样品量太少, 使得各提取物的作用不明显。

2.4 抗脂质过氧化的能力

亚油酸在 40 $^{\circ}$ C 保温过程中发生自氧化产生过氧化物, 加入各样品后(样品终浓度为 5 g/L), 其过氧化反应的速率曲线如图 4 所示。空白对照组的自

氧化速率非常大, 在第 4 天达到最大, 随后产生的过氧化物逐渐减少。水提取物和 50%乙醇提取物都具有较强的抗脂质过氧化作用。

水提取物能够抑制亚油酸的过氧化作用, 在测试的时间内, 其吸光度只在零时刻的数值作用波动, 说明其在反应时间内, 未产生或只产生了很少的过氧化物。95%乙醇提取物可以微弱地抑制脂质过氧化物的产生, 其吸光值上升迅速, 但是达到最高值的时间比空白对照晚, 随后由于亚油酸的消耗, 其吸光值也逐渐下降。

3 讨论

近年来, 食用菌的开发越来越受到人们的关注。已有的研究表明, 传统食用菌中含有多种活性成分, 除了能提高人体免疫力、增强肝功能外, 还具有抗氧化、抗肿瘤、降血脂等多种功效。食用菌体内的抗氧化活性物质主要为多酚类、萜类及多糖类等化合物。宾夕法尼亚州立大学 Beelman 教授的实验室研究发现, 在所有抗氧化食物中, 蘑菇 *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach 的抗氧化作用最强, 其体内的一种高效抗氧化物——麦角硫因 (Ergothioneine) 的含量比小麦胚芽多出 12 倍, 比鸡的肝脏多出 4 倍^[12]。然而, 关于食用菌的抗氧化活性, 科学家们研究最多的还只是一些常见的食用菌种类; 受材料的限制, 对那些珍稀野生食用菌品种的活性研究较少。本研究发现, 花脸香蘑菌丝生药浓度在 3 g/L 时其总体抗氧化能力就能达到 90% 以上, 表明花脸香蘑是一种具有极强抗氧化活性的食用菌品种。

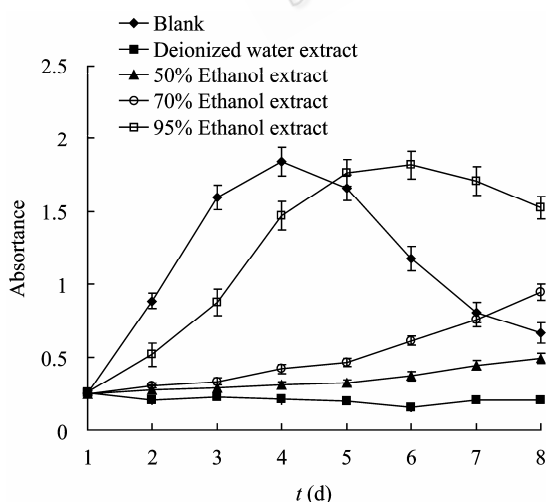


图 4 5 g/L 各提取物的亚油酸过氧化反应速率曲线
Fig. 4 The peroxidation rate curve of linoleic acid at the concentration of 5 g/L of mycelia extracts

迄今为止, 科学家对花脸香蘑活性物质的研究较少, 仅在 1996 年德国学者报道了 2 种二萜类化合物, 并发现它们具有较强的促进白细胞分化为单核细胞的作用和抗菌活性^[13], 但未对它们的抗氧化活性进行检测。本实验的数据明确表明, 花脸香蘑发酵菌丝体的各提取物均具有一定的抗氧化活性。在提取物浓度较低时(<10 g/L 菌丝体生药浓度), 即能达到 90% 以上的抗氧化活性, 这说明花脸香蘑发酵物中可能存在着大量、高效的天然抗氧化剂。同时, 本研究结果也显示, 水提物的抗氧化能力最强, 随着乙醇浓度的提高即溶剂的极性减小, 提取物的抗氧化能力减弱, 说明花脸香蘑中具有抗氧化作用的物质多为大极性的或者水溶性的化合物。多糖是一类重要的天然抗氧化剂, 也是真菌化合物中被研究得最多的具有抗氧化活性的水溶性物质。然而真菌体内的有效成分不止多糖, 其他物质也具有抗氧化活性。本研究没有对花脸香蘑抗氧化作用的物质进行进一步的纯化, 暂不能确定抗氧化活性物质的具体成分, 有待今后进行深入的研究。

真菌的发酵培养具有可连续生产、规模大、产量高、周期短等优点。在本实验中, 花脸香蘑的菌丝体提取物显示出了较强的抗氧化作用, 胡先运等研究比较了花脸香蘑的发酵菌丝和人工栽培子实体的氨基酸、蛋白质等营养成分, 发现发酵菌丝体的各营养成分略高于子实体^[14-16]。迄今花脸香蘑人工栽培子实体产量较低, 未能进行规模化生产, 但菌丝发酵培养则相对比较容易。今后通过进一步的研究, 将花脸香蘑进行发酵培养, 收集其菌丝体和具有活性的次生代谢物质, 作为一种新的食品或食品添加剂来增加膳食中的抗氧化剂含量, 将有可能成为开发这一珍稀资源的有效途径。

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] Praticò D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2002, 63(4): 563-567.
- [3] 宋怀恩, 闻韧. 抗氧化剂筛选方法的研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2003, 13(2): 119-124.
- [4] Zhong JJ, Xiao JH. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2009, 113: 79-150.
- [5] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993: 125.
- [6] 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(DPPH·)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.
- [7] 李铭芳, 王慧琴, 李淑芳. 亚甲基蓝光度法检测 Fenton 试剂所生成的羟自由基[J]. *江西农业大学学报*, 2003, 25(5): 794-796.
- [8] 钟飞, 王晓春, 林丽. 葛根体外清除氧自由基作用的研究[J]. *湖南中医学院学报*, 2004, 24(2): 17-18.
- [9] 吕晓玲, 曹东旭, 张泽生, 等. 天然萝卜红色素的抗脂质过氧化功能[J]. *食品科学*, 2001, 22(5): 19-21.
- [10] 桂琳, 葛飞, 黄寅. 比色法测定细脚拟青霉胞内甘露醇及羟自由基清除率[J]. *安徽农业科学*, 2009, 35(19): 8818-8819, 8824.
- [11] 胡先运, 李香莉, 张勇民, 等. 花脸香蘑 *Lepista sordida* (Fr) Sing 的研究进展[J]. *中国食用菌*, 2006, 25(5): 20-22.
- [12] New method shows mushrooms a top source for one antioxidant. *ScienceDaily*, Sep. 12, 2005. <http://www.sciencedaily.com/releases/2005/09/050912080429.htm>.
- [13] 谢福泉, 胡七金. 野生优良食药菌花脸香蘑的研究进展[J]. *菌物研究*, 2007, 3(4): 52-56.
- [14] Mazur X, Becker U, Anke T, et al. Two new bioactive diterpenes from *Lepista sordida*[J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(2): 405-407.
- [15] 胡先运. 花脸香蘑田间栽培、营养评价及液体发酵特性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学硕士学位论文, 2007.
- [16] 罗心毅, 洪江, 张勇民. 人工栽培花脸香蘑氨基酸研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 2003, 25(3): 14-15.