

杏鲍菇发酵产物冻干粉功能成分分析及抗氧化活性

侯金鑫¹, 江一帆², 赵晓静¹, 段硕楠¹, 王立安^{1,*}

(1.河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050024; 2.华北制药新药研究开发有限公司, 河北 石家庄 050015)

摘 要: 通过低温冷冻干燥处理将杏鲍菇液体发酵产物制成冻干粉, 对冻干粉中的粗纤维、粗多糖、总黄酮和粗三萜功能性成分及其抗氧化活性进行分析。结果表明, 冻干粉中粗纤维的含量为52.67mg/g, 粗多糖的含量为31.79mg/g, 总黄酮的含量为9.19mg/g, 粗三萜的含量为8.87mg/g。杏鲍菇发酵产物冻干粉对DPPH自由基的半数有效质量浓度 EC_{50} (7.60mg/mL), 其质量浓度为16mg/mL时与质量浓度为0.02mg/mL的VC对自由基的清除率相当。抗衰老小鼠实验显示, 冻干粉可有效提高小鼠血清、肝脏中的总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平, 降低丙二醛(MDA)含量($P<0.05$)。杏鲍菇液体发酵产物含有丰富的抗氧化功能性物质, 且有较好的开发利用价值。

关键词: 杏鲍菇; 发酵产物; 冻干粉; 总黄酮; 粗三萜; 抗氧化; 衰老小鼠模型

Analysis of Functional Components and Antioxidant Activity of Lyophilized Powder of Cultured Mycelia of *Pleurotus eryngii*

HOU Jin-xin¹, JIANG Yi-fan², ZHAO Xiao-jing¹, DUAN Shuo-nan¹, WANG Li-an^{1,*}

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China;

2. NCPC New Drug Research and Development Co. Ltd., Shijiazhuang 050015, China)

Abstract: The cultured mycelia of *Pleurotus eryngii* were lyophilized into powder and the contents of crude fiber, crude polysaccharide, flavonoids and crude triterpenoid in the lyophilized powder were analyzed. The antioxidant activity was assessed by using DPPH free radical scavenging assay and *D*-galactose induced aging mice model. Results showed that 1 g of this powder contained 52.67 mg of crude fiber, 31.79 mg of crude polysaccharides, 9.19 mg of flavonoids and 8.87 mg of crude triterpenoids. Its EC_{50} value in quenching DPPH free radical was 7.60 mg/mL. The DPPH radical scavenging activity of the lyophilized powder at 16 mg/mL was equivalent to that of VC at 0.02 mg/mL. The lyophilized powder was capable of improving the activities of superoxide dismutase (T-SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), reducing the malondialdehyde (MDA) content in serum and liver of aging mice. The cultured mycelia of *Pleurotus eryngii* could be a potential source for development and utilization of natural antioxidants.

Key words: *Pleurotus eryngii*; cultured mycelia; lyophilized powder; total flavonoids; crude triterpenes; antioxidant; aging mice model

中图分类号: TS201.1; Q411

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0329-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321066

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)是一种优良的食用菌, 不仅含有丰富的蛋白质、人体必需氨基酸、膳食纤维以及多种微量元素等营养元素^[1], 还含有杏鲍菇多糖^[2]、萜类^[3]等生物活性物质。杏鲍菇是一种具有抗氧化^[4-5]、降血脂^[6]、抗疲劳^[7]、调节免疫力^[8]、抗肿瘤^[9]等保健作用的食药两用真菌。液体发酵具有生产成本低, 生产周期短, 占地面积

小等优点^[10], 随着液体发酵技术的发展, 通过液体发酵法可以获得大量的杏鲍菇发酵产物^[11], 研究发现, 液体深层发酵培养的杏鲍菇菌丝体中的营养成分与杏鲍菇子实体中的营养成分几乎相同, 甚至液体深层发酵所得的粗多糖含量要高于子实体^[12]。但杏鲍菇发酵产物中功能性成分种类、含量的分析及杏鲍菇发酵产物抗氧化活性

收稿日期: 2013-04-26

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目(11230908D); 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZH2011231)

作者简介: 侯金鑫(1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事真菌生化研究。E-mail: houjx2008@qq.com

*通信作者: 王立安(1965—), 男, 教授, 博士, 主要从事大型真菌资源研究。E-mail: wlian1965@126.com

分析尚未见报道。本研究通过真空冷冻干燥的方法将发酵产物制成干粉后,测定粗纤维、粗多糖、总黄酮和粗三萜的含量;通过体外、体内实验检测杏鲍菇液体发酵产物的抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*) 菌种由河北师范大学真菌生化与分子生物学实验室保藏。

大豆蛋白粉(食品级) 镇江市尚谷食品有限公司;葡萄糖、浓硫酸、氢氧化钠、浓盐酸、硼酸、氨水、冰醋酸、乙酰氯、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、无水乙醇,以上皆为国产分析纯;芦丁、齐墩果酸为国产色谱纯;总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、考马斯亮蓝试剂盒 南京建成生物工程研究所。

FA1104型电子天平 上海精密科学仪器有限公司; ZHQ-100型100L气升式发酵罐 镇江中恒生物工程设备有限公司; JM-L50型胶体磨 浙江惠合机械设备有限公司; GJJ型均质机 浙江惠合机械设备有限公司; B-260型恒温水浴锅 上海亚荣生化仪器厂; QL-901型漩涡混合器 江苏海门市麒麟医用仪器厂; ALPHA I-6型真空冷冻干燥机 西德Christ公司; GRX12型干热消毒箱 上海精宏实验设备有限公司; 756MC紫外-可见分光光度计 上海菁华科技有限公司。

1.2 动物

清洁级昆明小鼠(*Mus musculus*)购自河北医科大学动物中心,体质量18~20g,健康、雄性。

1.3 方法

1.3.1 杏鲍菇发酵产物冻干粉的制备

杏鲍菇液体发酵产物制备:按常规方法获得摇瓶菌种后,以3.5%接种量接种至100L发酵罐中。发酵培养基为:葡萄糖20g/L、大豆蛋白粉8g/L。发酵参数为:装料系数0.7,温度25℃,通气比(每分钟内通过单位体积发酵液的空气体积比)1:0.4,发酵7d。

发酵产物破碎条件:获得的含杏鲍菇菌丝体的发酵产物经胶体磨处理(2900r/min, 0.3L/min)→高压均质机处理(40MPa, 流量0.5L/min)→发酵产物匀浆。

冻干粉的制备:将发酵产物匀浆离心(5000r/min, 10min)处理后,上清液经减压蒸馏浓缩获得蒸馏产物;与离心获取的沉淀混合后,于真空冷冻干燥机中处理72h,冻干物经研磨处理即获得冻干粉。计算冻干粉的产率。

$$\text{冻干粉产率}/(\text{g/L}) = \frac{\text{冻干粉质量}/\text{g}}{\text{发酵液体积}/\text{L}} \quad (1)$$

1.3.2 杏鲍菇液体发酵产物功能性成分分析

冻干粉粗纤维含量的测定参照国标GB/T 5009.10—2003《植物类食品中粗纤维的测定》^[13]进行。

冻干粉中粗多糖含量的测定:精确称取冻干粉2.0g,加入50mL蒸馏水,常温超声水浴20min,然后80℃水浴浸提4h,抽滤,Sevag法除蛋白(3次),滤液定容至100mL,准确吸取10mL去蛋白后的溶液,加入4倍体积的80%乙醇,4℃过夜,4000r/min离心,将沉淀溶解后定容至100mL。以葡萄糖溶液制作标准曲线,采用苯酚-硫酸法测定^[14]。

冻干粉中总黄酮的测定:精确称取发酵液冻干粉2.0g于三角瓶中,加75%乙醇200mL,70℃水浴3.5h。抽滤,将滤液浓缩定容至50mL。冻干粉中总黄酮定量测定按照参考文献^[15]的方法进行。以芦丁为标准品,采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色体系进行定量测定。

冻干粉中粗三萜的测定:精确称取2.0g发酵液冻干粉,加适量的脱脂棉于烘箱中60℃烘干(用于索氏提取)。然后用氯仿索氏提取5h。减压浓缩,定容至50mL。冻干粉中粗三萜定量测定按照参考文献^[16]的方法,以齐墩果酸为标准,采用香草醛-冰醋酸显色体系进行测定。

1.3.3 杏鲍菇液体发酵产物冻干粉的抗氧化能力测定

1.3.3.1 冻干粉清除DPPH自由基能力实验^[17]

用ddH₂O把冻干粉配制成16mg/mL的母液,超声20min后离心(10000r/min, 10min),取上清液进行检测。

在96孔板内分为:样品空白组(A_j)加100μL不同质量浓度的样品液和100μL无水乙醇;药品空白组(A_0)加100μL纯水和100μL DPPH溶液。实验组(A_i)每组设置5个梯度(1、2、4、8、16mg/mL)分别加入100μL不同质量浓度的样品溶液和100μL浓度为 2×10^{-4} mol/L的DPPH溶液,混合均匀,室温暗反应30min,于波长517nm处测定各组吸光度。每组做6个重复。同时以VC(0.01、0.02、0.04、0.08、0.16mg/mL)做阳性对照。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

1.3.3.2 冻干粉抗衰老实验^[18]

选用18~22g雄性昆明小鼠36只,适应性饲养一周后随机分为空白对照组(C)、模型组(M)、阳性对照组(VC)、低剂量给药组(L)、中剂量给药组(M)和高剂量给药组(H),每组6只。空白对照组每日皮下注射等量生理盐水;模型组和给药组皮下注射D-半乳糖300mg/(kg·d)。

高剂量组、中剂量组和低剂量组灌胃杏鲍菇发酵产物冻干粉剂量分别为400、200、100mg/(kg·d),VC组给予100mg/(kg·d),每天灌胃1次。空白对照组和模型组每日灌胃等量生理盐水,连续4周。摘眼球取血,生理盐水灌流后取肝脏。按照试剂盒的使用方法检测小鼠血清和肝脏组织中的T-SOD、GSH-Px和MDA的含量。

1.4 数据统计

数据采用SPSS17.0软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 杏鲍菇发酵产物冻干粉产率及功能性成分

杏鲍菇发酵产物冻干粉的产率为 (15.743 ± 0.671) g/L。杏鲍菇液体发酵产物冻干粉功能性组分含量见表1。

表1 杏鲍菇发酵产物冻干粉中功能性成分含量分析
Table 1 Functional components in cultured mycelia of *Pleurotus eryngii*

功能性成分	粗纤维	粗多糖	总黄酮	粗三萜
冻干粉含量/(mg/g)	52.67 ± 1.70	31.97 ± 5.83	9.19 ± 1.77	8.87 ± 1.01

由表1可知, 杏鲍菇发酵产物冻干粉中粗纤维含量最多, 为52.67mg/g, 其次为粗多糖, 并且含少量总黄酮和粗三萜组分。

2.2 杏鲍菇发酵产物冻干粉清除DPPH自由基能力

表2 杏鲍菇发酵产物冻干粉对DPPH自由基的清除作用($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 DPPH radical scavenging activity of cultured mycelia of *Pleurotus eryngii* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	冻干粉质量浓度/(mg/mL)					EC_{50} /(mg/mL)
	1	2	4	8	16	
清除率/%	15.46	22.11	34.01	48.23	69.31	7.60

项目	VC质量浓度/(mg/mL)					EC_{50} /(mg/mL)
	0.01	0.02	0.04	0.08	0.16	
清除率/%	49.79 ± 1.46	73.52 ± 1.94	82.63 ± 1.20	86.33 ± 0.32	88.67 ± 1.20	0.007

表2显示了杏鲍菇发酵产物冻干粉对DPPH自由基清除能力。随着冻干粉的质量浓度增大, 清除自由基能力越来越强, 并呈现一定的量效关系。说明冻干粉在较高质量浓度条件下具有较强的清除自由基能力。在实验质量浓度范围内, 冻干粉在质量浓度为16mg/mL时, 自由基清除率高达69.31%, 相当于阳性对照VC剂量0.02mg/mL的清除作用。冻干粉清除DPPH自由基的半数有效质量浓度(EC_{50})为7.60mg/mL。

2.3 杏鲍菇发酵产物冻干粉的抗衰老作用

表3和表4显示了不同剂量杏鲍菇液体发酵产物冻干粉灌胃衰老小鼠后, 小鼠血清、肝脏中T-SOD、GSH-Px和MDA变化情况。表3、4均显示, 模型组与空白对照组相比, 小鼠血清、肝脏中的T-SOD、GSH-Px的酶活力均显著下降, MDA含量显著上升, 且差异十分显著($P < 0.05$), 说明衰老小鼠模型造模成功。模型组与VC组相比, 差异显著($P < 0.05$), 说明VC能抵抗由D-半乳糖引起的衰老现象。

由表3可知, 与模型组相比, 冻干粉中高剂量组均能使血液中T-SOD的酶活力显著提高; 冻干粉3个剂量组均能使血清中GSH-Px酶活力明显提高, 使MDA含量明显降低。3个剂量组相比, 高剂量组在提升小鼠血清中T-SOD方面显著高于低剂量组($P < 0.05$), GSH-Px酶活力显著高于中、低剂量组($P < 0.05$); 对于降低MDA水平, 高、中、低剂量组之间无显著差异。

表3 各处理组小鼠血清中T-SOD、GSH-Px的活力及MDA含量($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 T-SOD and GSH-Px activities and MDA content in serum from the mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	T-SOD活力/(U/L)	GSH-Px活力/(U/L)	MDA含量/(nmol/mL)
空白对照组	104.31 ± 5.06	360.70 ± 34.32^b	2.68 ± 0.51
模型组	49.45 ± 16.09^a	204.11 ± 27.78	4.49 ± 0.61^a
阳性对照组(VC)	108.92 ± 12.99^b	438.56 ± 64.60^b	2.81 ± 0.70^b
杏鲍菇	高剂量组 122.03 ± 18.74^{abc}	410.10 ± 42.30^{byz}	2.84 ± 0.80^b
发酵产物	中剂量组 100.53 ± 17.44^b	333.40 ± 61.41^{bcx}	3.62 ± 0.69^{ab}
冻干粉	低剂量组 57.87 ± 18.10^{axy}	259.86 ± 57.51^{abcy}	3.94 ± 1.24^{abc}

注: a. 与空白对照组比较有显著性差异($P < 0.05$); b. 与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$); c. 与阳性对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)。x. 与高剂量组比较有显著性差异($P < 0.05$); y. 与中剂量组比较有显著性差异($P < 0.05$); z. 与低剂量组比较有显著性差异($P < 0.05$)。下同。

表4 各处理组小鼠肝脏中T-SOD、GSH-Px的活力及MDA含量($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 T-SOD and GSH-Px activities and MDA content in liver from the mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	T-SOD活力/(U/mg pro)	GSH-Px活力/(U/mg pro)	MDA含量/(nmol/mg pro)
空白对照组	402.80 ± 38.36	263.84 ± 15.79	2.75 ± 0.74
模型组	238.83 ± 25.46^a	206.31 ± 8.03^a	4.88 ± 1.04^a
阳性对照组(VC)	389.68 ± 37.18^b	323.56 ± 58.11^{ab}	3.83 ± 0.66^b
杏鲍菇	高剂量组 425.32 ± 35.39^{bz}	335.74 ± 36.49^{abz}	3.29 ± 0.89^{bz}
发酵产物	中剂量组 383.48 ± 39.75^b	283.84 ± 26.47^b	3.83 ± 0.40^{ab}
冻干粉	低剂量组 348.29 ± 38.55^{abs}	268.50 ± 70.55^{bcx}	4.37 ± 1.05^{abcx}

由表4可知, 冻干粉高、中、低3个剂量组均能使肝脏中的T-SOD、GSH-Px的酶活力显著提高, 使MDA含量明显降低($P < 0.05$)。3个剂量组相比, 高剂量小鼠肝脏中T-SOD、GSH-Px酶活力显著高于低剂量组; MDA含量高剂量组显著低于低剂量组($P < 0.05$)。

高剂量组与VC组比较, 小鼠血清中T-SOD, 肝脏中T-SOD、GSH-Px酶活力水平高于VC组, 肝脏中MDA含量低于VC组, 说明杏鲍菇高剂量组在提高体内抗氧化活力方面优于VC组。

3 结论与讨论

本研究证实了杏鲍菇液体发酵产物含丰富的功能性成分。其中, 在杏鲍菇发酵产物中检测的黄酮类化合物含量为9.19mg/g; 三萜类化合物含量为8.87mg/g, 低于李嗣乾等^[19]报道的杏鲍菇子实体中的三萜类含量16.832%, 说明杏鲍菇子实体与杏鲍菇发酵产物中三萜类化合物含量存在一定差异; 粗纤维含量为52.67mg/g, 略低于杏鲍菇子实体中粗纤维的含量^[20]; 粗多糖含量为503.02mg/L, 要高于Chen Huabing等^[21]测得的杏鲍菇深层发酵液中的胞外粗多糖312mg/L, 说明杏鲍菇发酵菌丝体中也含有大量的多糖成分, 菌丝体经过胶体磨和高压均质机处理后能有效的使胞内多糖释放出来。

本研究还证实了杏鲍菇液体发酵产物具较强的抗氧

化能力。冻干粉在16mg/mL时对DPPH自由基的清除率达到了69.31%，相当于VC 0.02mg/mL的清除作用。给衰老小鼠模型灌胃冻干粉后，能显著提高小鼠血清、肝脏中T-SOD和GSH-Px酶活力水平，降低MDA含量，从而达到抗衰老的作用；冻干粉剂量在400mg/(kg·d)时的抗氧化能力要优于阳性VC组。杏鲍菇液体发酵产物可作为抗氧化保健产品的原料，在功能型饮料或保健胶囊开发方面具较好的应用前景。

参考文献：

- [1] 况丹. 七种食用菌营养成分分析比较[J]. 食用菌, 2011(4): 57-59.
- [2] 侯军, 林晓民, 李瑛, 等. 响应面法优化杏鲍菇菌糠多糖提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 155-158.
- [3] LIU Liangyan, LI Zhenghui, LIU Jikai. A new menthane-type monoterpene from *Pleurotus eryngii*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(1): 71-73.
- [4] 史亚力, 杨立红, 蔡德华, 等. 杏鲍菇多糖对力竭小鼠抗氧化、抗损伤的作用[J]. 体育学刊, 2005, 12(1): 56-57.
- [5] MISHRA K K, PAL R S, ARUNKUMAR R, et al. Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2/3): 1557-1563.
- [6] CHEN Jingjing, MAO Dong, YONG Yangyang, et al. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharide extract of *Pleurotus eryngii*[J]. Food Chemistry, 2012, 130(1): 687-694.
- [7] 郑素玲, 郭立英, 范永山. 杏鲍菇多糖对老龄小鼠抗疲劳能力影响[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 269-271.
- [8] 迟桂荣. 杏鲍菇多糖对鸡群免疫力调节的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4536-4566.
- [9] YANG Zengyue, XU Jian, FU Qiang, et al. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 95(2): 615-620.
- [10] 朱华玲, 班立桐, 徐晓萍, 等. 食用菌发酵的应用研究进展[J]. 江西农业学报, 2012, 24(4): 80-83.
- [11] 毛栋, 陆玲. 杏鲍菇液体发酵条件筛选研究[J]. 食品科技, 2010, 35(5): 19-23.
- [12] 常青, 阮新, 冯培勇, 等. 杏鲍菇子实体与深层发酵菌丝体营养成分分析[J]. 烟台教育学院学报, 2005, 11(4): 90-92.
- [13] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.10—2003 植物类食品中粗纤维的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [14] 丁钢强, 于村, 张双凤, 等. 食用菌多糖含量不同测定方法的研究[J]. 实用预防医学, 2000(5): 325-327.
- [15] 严力群, 丁万隆, 朱殿龙, 等. 坝上地区金莲花及其茎叶总黄酮的测定[J]. 中医药现代化中药研究, 2009, 11(3): 407-409.
- [16] 王伟, 尚德静, 温磊. 灵芝发酵菌丝三萜类化合物含量的测定[J]. 中国食用菌, 2006, 25(1): 30-32.
- [17] CHEUNG L M, CHEUNG P C K. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation[J]. Food Chemistry, 2005, 89: 403-409.
- [18] 熊艺花, 谢庆凤, 陈志维, 等. 珍珠养颜液对小鼠抗衰老及免疫调节的研究[J]. 中国当代医药, 2011, 18(28): 11-12.
- [19] 李嗣乾, 迟洪影, 李艺, 等. 超声波提取杏鲍菇三萜类化合物工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(12): 81-85.
- [20] 谷延泽. 白灵菇与杏鲍菇的营养分析与比较[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(21): 9931-9932.
- [21] CHEN Huabing, CHEN Chihi, CHEN Meijheng, et al. The use of mushroom hydrolysate from waste bag-log as the nitrogen source to mycelium biomass and exopolysaccharide production in *Pleurotus eryngii* cultivation[J]. Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2013, 44(2): 163-168.