

以香菇柄为主料固态发酵血芝提取液的 抗氧化活性研究

王 谦*, 齐悦歌

(河北大学生命科学学院, 保定 071002)

摘要: **目的** 探讨血芝-香菇柄固态发酵复合物提取液的抗氧化作用。**方法** 体内抗氧化试验, 将50只昆明种小鼠随机分为5个组, 分别为空白对照组、阳性对照组、低剂量组(2.5 g/kg)、中剂量组(5 g/kg)和高剂量组(10 g/kg)。灌胃30 d后, 采样, 测定小鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量。

结果 小鼠血清中SOD和GSH-Px的活力随剂量的增加而增大, 且5 g/(kg·d)和10 g/(kg·d)剂量组与阳性对照组相比较, 差异性显著($P < 0.05$)。**结论** 血芝-香菇柄固态发酵提取液具有抗氧化作用。

关键词: 血芝; 香菇柄; 固态发酵; 抗氧化

Antioxidant activity of *Amauroderma rudis*-roots of *Lentinus solid* fermentation compounds

WANG Qian*, QI Yue-Ge

(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the antioxidant activity of the extract of *Amauroderma rudis*-roots of *Lentinus solid* fermentation compounds. **Methods** A total of 50 healthy mice were randomly divided into blank control group, positive control group, low dose group (2.5 g/kg), middle dose group (5 g/kg) and high dose group (10 g/kg). After 30 d, the content of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum were determined. **Results** The activities of SOD and GSH-Px in serum were increased with the dose increased, and the differences were significant in middle dose group and high dose group compared to positive control group ($P < 0.05$). **Conclusion** It was indicated the extract of *Amauroderma rudis*-roots of *Lentinus solid* fermentation compounds had antioxidant activity.

KEY WORDS: *Amauroderma rudis*; roots of *Lentinus*; solid fermentation; antioxidant

1 引言

固态发酵是指培养基呈固态, 在没有或几乎没有自由流动水的状态下进行的一种或者多种微生物发酵, 部分基质是不溶于水的聚合物, 它不仅可以提供

供微生物所需的碳源、氮源、无机盐、水以及其他营养物质, 还是微生物生长的场所^[1]。

香菇是世界第二大食用菌, 也是中国特产之一。香菇柄是香菇商品化处理中的废弃物, 约占香菇干质量的15%~25%, 由于菇柄呈纤维化, 口感差, 绝

基金项目: 河北省现代农业产业技术体系食用菌创新团队项目

Fund: Supported by Innovation Team Project of Edible Fungus in Modern Agricultural Industry Technology System of Hebei Province

*通讯作者: 王谦, 研究员, 主要研究方向为食药真菌研究与开发。E-mail: wq6203_cn@126.com

*Corresponding author: WANG Qian, Researcher, College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China. E-mail: wq6203_cn@126.com

大部分都被废弃, 少量用作饲料, 全国每年废弃的香菇柄有数万吨, 造成资源的浪费。目前人们对香菇多糖的利用较高^[2], 由于其含有香菇多糖、嘌呤等因子, 具有抗氧化、提高免疫力的作用^[3,4], 因此, 香菇柄的资源化开发利用是一个热点问题。血芝(*Amauroderma rudis*(Ber k.)Cunn.), 即皱盖假芝, 别名皱盖乌芝, 灵芝科假芝属真菌。幼嫩子实体白色, 被损伤时由伤口处分泌血样液体, 故又名血芝, 自古以来就作为玄芝入药, 被认为具有延年益寿的功能^[5,6]。本试验研究在香菇柄这种特殊基质下培养血芝, 利用食用菌对香菇柄基质进行发酵处理, 获得发酵提取液后, 通过小鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量的变化, 探讨血芝—香菇柄固态发酵提取液的抗氧化作用。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

血芝: 河北大学食药用真菌研究所提供; 土豆(市售); 香菇菌柄、麸皮(易县天顺林木有限公司); 琼脂(河南柯原有限公司); 蔗糖(天津市科密欧化学试剂有限公司); 葡萄糖(天津市凯通化学试剂有限公司); 维生素 E(天津光复试剂厂); 雌性昆明种小鼠(河北医科大学实验动物部提供); 苯酚、浓硫酸(分析纯, 国药集团); SOD 试剂盒、GSH-Px 试剂盒(南京建成生物公司)。

2.2 仪器与设备

电子分析天平(FA2104, 北京市民桥科学仪器有限公司); 数显恒温水浴锅(HH-4, 西安市长安科学仪器厂); 超净工作台(北京市尘埃净化设备厂); 722 型分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 电热恒温培养箱(DNP-9052BS-III, 天津市新苗医疗器械公司)。

2.3 培养基

香菇菌柄固态发酵培养基: 香菇菌柄 84%、无霉变麸皮 14%、蔗糖 2%, 料水比 1:1.2(m:V)。

蔗渣培养基: 蔗渣 80%、玉米粉 18%、蔗糖 2%。

2.4 固态发酵物体系对比

将接入血芝的香菇柄固态发酵体系, 未接入血芝的香菇柄复合体系和普通培养血芝复合物中多糖含量进行对比研究。

2.4.1 3 种培养物的制备

(1) 普通培养物的制备

在无菌条件下挑取 0.5 cm×0.5 cm 大小的菌块转接到蔗渣培养基中(250 mL 三角瓶), 28 °C 恒温培养, 待菌丝长满为宜, 4 °C 冷藏, 备用。

(2) 发酵基质的制备

将香菇柄、麸皮和蔗糖按比例混合后, 装入 250 mL 三角瓶中, 121 °C 高压灭菌 2.5 h 后, 4 °C 冷藏, 备用。

(3) 固态发酵物的制备

按照(2)中方法制备固态发酵培养基后, 挑取 0.5 cm×0.5 cm 大小的菌块转接到此基质中, 28 °C 恒温培养, 待菌丝长满为宜, 4 °C 冷藏, 备用。

2.4.2 提取液的制备

采用热水浸提法^[7]: 分别称取 10 g 样品, 向其加入 4 倍体积的 85%乙醇, 在 60 °C 下浸提 30 min, 重复 2 次(以去除单糖、双糖、低聚糖的干扰)^[8]。去除滤液, 然后向样品中加 100 mL 蒸馏水, 85 °C 下水浴 30 min, 过滤得滤液。再向滤渣中加入 100 mL 蒸馏水, 重复上述操作。将 2 次滤液合并定容至 200 mL, 5000 r/min 离心得上清液, 备用。

2.4.3 提取液中粗多糖含量的测定

将样品上清液稀释 10 倍后, 分别吸取 2 mL 于 10 mL 具塞试管, 采用苯酚-硫酸法^[8,9], 计算多糖含量。

2.5 体内抗氧化试验

试验采用清洁级雌性昆明种成年小鼠, 体重 18~22 g, 由河北医科大学实验动物部提供。小鼠随机分成 5 组, 每组 10 只。1 个空白对照组、1 个阳性对照组和 3 个受试样品剂量组, 3 个剂量组分别为 2.5、5、10 g(提取液)/kg 体重, 空白对照组给予生理盐水, 阳性对照组给予维生素 E, 灌胃量按 2 mL/100 g 体重计算, 每日 1 次, 连续 30 d, 最后 1 次给药后禁食 8 h。实验结束后处死小鼠, 腹腔动脉取血, 制备血液匀浆标本^[10-15]。按照试剂盒的方法测定血清的超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力。

超氧化物歧化酶(SOD)活力测定采用黄嘌呤氧化酶法, 按照试剂盒的说明书进行, 并且定义每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U); 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力按试剂盒说明书在 450 nm 处进行测定, 每 0.1 mL 血清在 37 °C 反应 5 min, 扣除非酶促反应作用, 使反应体系中 GSH 浓度下降 1 μmol/L 为一个酶活性单位(U)。

3 结果与分析

3.1 固态发酵物体系对比

将3种培养复合物经热水浸提法获得提取液后,通过苯酚-硫酸法^[9]测定提取液中多糖含量,实验结果见表1。

表1 3种复合物中的多糖含量比较($n=3$)
Table 1 Comparison of polysaccharide content of three kinds of compounds ($n=3$)

三种培养复合物	多糖浓度(mg/mL)
普通培养复合物	0.32±0.01 ^a
固态发酵前复合物	0.91±0.01 ^b
固态发酵后复合物	1.41±0.01 ^c

注:小写不同字母代表显著性差异($P<0.05$)。

由表1可知,固态发酵后培养物中多糖含量最高,达1.41 mg/mL,与其他2种复合物相比,具有显著性差异($P<0.05$)。且固态发酵后复合物多糖含量大于普通培养复合物和固态发酵前复合物多糖含量之和,表明血芝在以香菇柄为特殊基质下经过固态发酵可以产生更多的多糖。

3.2 体内抗氧化试验

3.2.1 对小鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响

超氧化物歧化酶(SOD)能把超氧阴离子转换为过氧化氢,具有清除超氧阴离子自由基、保护细胞作用,其活力可以间接反映机体清除氧自由基和保护器官免受氧化应激损伤的能力。由表2可知,不同剂量的提取液能不同程度地提高小鼠血清中SOD的活力,随剂量的增加活力增大,且5 g/kg和10 g/kg剂量组与阳性对照组相比较,差异性显著($P<0.05$)。说明固态发酵提取液具有抗氧化作用。

表2 提取液对小鼠血清中SOD的影响($n=3$)
Table 2 Effects of crude extract on SOD activities in mice serum ($n=3$)

剂量(g/kg)	样本数(只)	超氧化物歧化酶 SOD(U/mL)
空白对照	10	80.65±4.15
阳性对照	10	103.15±3.35
2.5	10	115.32±3.02
5	10	146.51±2.12*
10	10	161.21±1.36*

注:与阳性对照组比较* $P<0.05$ 。

3.2.2 对小鼠血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力的影响

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)能将 H_2O_2 转换为水,使有毒性的 H_2O_2 转化为无害的水分子,同时还还原谷胱甘肽(GSH)在GSH-Px的催化下,实现还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSH)的转变,使氧化型物质还原,解除其氧化应激损伤。由表3可知,不同剂量的提取液能不同程度地提高小鼠血清中GSH-Px的活力,且5 g/kg和10 g/kg剂量组与阳性对照组相比较,差异性显著($P<0.05$)。同样说明固态发酵提取液具有抗氧化作用。

表3 提取液对小鼠血清中GSH-Px的影响($n=3$)
Table 3 Effects of crude extract on GSH-Px activities in mice serum ($n=3$)

剂量(g/kg)	样本数(只)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px(U/mL)
空白对照	10	155.11±3.14
阳性对照	10	162.51±2.36
2.5	10	180.33±4.22
5	10	211.16±1.17*
10	10	243.21±2.03*

注:与阳性对照组比较* $P<0.05$ 。

4 结论

香菇柄是香菇商品化处理中的废弃物,以香菇柄为主料固态发酵血芝,为血芝的生长提供所需的碳源、氮源等条件,更重要的是在香菇柄这种特殊基质下培养血芝,不仅有利于香菇柄中多糖等功能因子的释放,还有利于血芝自身代谢产物的合成,丰富自身的营养价值,并且在此特殊基质下,其提取液的抗氧化活性大大提高,为新型功能食品的开发提供了技术基础。

参考文献

- [1] 徐福建, 陈洪章, 李佐虎. 固态发酵工程研究进展[J]. 生物工程进展, 2002, 22(1): 44-47.
Xu FJ, Chen HZ, Li ZH. Research progress on solid fermentation [J]. Prog Biol Eng, 2002, 22(1): 44-47.
- [2] Comi G, Urso R, Iacumin L, et al. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy [J]. Meat Sci, 2005, 69(3): 381-3921.
- [3] 高虹, 史德芳, 何建军, 等. 超微粉碎对香菇柄功能成分和特

- 性的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 40-43.
- Gao H, Shi DF, He JJ, *et al.* Effect of superfine grinding on functional components and properties of *Lentinus edodes* stems [J]. Food Sci, 2010, 31(5): 40-43.
- [4] 刘存芳, 田光辉, 聂峰, 等. 香菇柄提取物的生物活性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 1(55): 124-128.
- Liu CF, Tian GH, Nie F, *et al.* Study on biologic activities of active components obtained from the root of *Lentinus edodes* [J]. Sci Tech Food Indu, 2008, 1(55): 124-128.
- [5] 马海昇, 李海珍, 姚志伟. 灵芝液体培养及条件优化的初步研究[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(3): 70-72.
- Ma HS, Li HZ, Yao ZW. The preliminary research of liquid culture of *Xuezi* and optimization of culture conditions [J]. Chem Bioeng, 2010, 27(3): 70-72.
- [6] 张晓, 董娜, 田彦辉, 等. 原生质体紫外诱变选育富硒血芝优良菌株[J]. 食品科技, 2012, 37(5): 2-5.
- Zhang X, Dong N, Tian YH, *et al.* Breeding superior selenium-enriched *Amauroderma rudis* strain by protoplast UV mutagenesis [J]. Food Sci Tech, 2012, 37(5): 2-5.
- [7] 李志. 真菌多糖复合制剂制备及抗衰老作用研究[D]. 保定: 河北大学, 2007.
- Li Z. Study on multi preparation of fungus polysaccharides and antisenile function [D]. Baoding: Hebei University, 2007.
- [8] 张志军, 刘建华, 李淑芳, 等. 灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 193-195.
- Zhang ZJ, Liu JH, Li SF, *et al.* Studies on *Ganoderma Lucidum* polysaccharides by phenol-sulfuric acid method [J]. Sci Tech Food Ind, 2006, 27(2): 193-195.
- [9] 黎晶晶, 徐格非. 苯酚-硫酸法测定灵芝多糖含量的研究[J]. 杭州化工, 2008, 38(1): 23-26.
- Li JJ, Xu GF. Studies on *Ganoderma Lucidum* polysaccharides by phenol-sulfuric acid method [J]. Hangzhou Chem Ind, 2008, 38(1): 23-26.
- [10] 张宁. 黑木耳分级多糖制备及抗氧化性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- Zhang N. Studies on preparation and antioxidant activities of fractionation polysaccharide by *Auricularia auricular* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2011.
- [11] 盖玉红. 灵芝多糖抗氧化性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007.
- Gai YH. Studies on antioxygen activity of *Ganoderma Lucidum* polysaccharides [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2007.
- [12] 王君巧, 聂少平, 余强, 等. 黑灵芝多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 274-277.
- Wang JQ, Nie SP, Xu Q, *et al.* Immune modulation and antioxidation activity of polysaccharides from *Ganoderma atrum* in immunosuppressed mice [J]. Food Sci, 2012, 33(23): 274-277.
- [13] 王家鹏. 灵芝多糖抗自由基与延缓衰老的实验研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2005.
- Wang JP. Experimental study of the anti-free radical and anti-senile effect of GLP [D]. Jinan: Shandong Traditional Chinese Medicine University, 2005.
- [14] 许倩兮. 雪灵芝皂甙的提取纯化及抗氧化活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- Xu QX. Study on extraction, purification and antioxidant activity of saponins in *Areneria Kensusensis* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.
- [15] 田敏, 王荣, 冯翠萍. 珊瑚状猴头菌多糖抗氧化作用研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(1): 25-33.
- Tian M, Wang R, Feng CP. Studies on polysaccharides from *Hericium coralloids* on the antioxidant activity in mice [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2015, 15(1): 25-33.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



王 谦, 研究员, 主要研究方向为食药真菌研究与开发。

E-mail: wq6203_cn@126.com