

几种常见食用菌清除羟基自由基能力的研究*

马晓华 连 宾

(南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 南京, 210097)

摘 要 文中测定了几种常见食用菌的清除羟基自由基能力, 并初步分析了食用菌抗羟基自由基物质的主要来源。结果表明, 7 种食用菌对羟基自由基均有显著的清除作用, 但不同食用菌所具有的清除羟基自由基能力各不相同, 它们清除羟基自由基能力的强弱顺序为: 真姬菇 > 茶树菇 > 双孢蘑菇 > 秀珍菇 > 香菇 > 平菇 > 黄金针菇。此外, 不同食用菌清除羟基自由基的物质也各不相同。

关键词 羟基自由基, 食用菌, 抗氧化

食用菌不仅味道鲜美, 营养丰富, 而且含有一些对人体非常有益的活性物质, 被人体吸收后可产生多种生理功能, 例如抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降血糖和降血脂等。食用菌所具有食疗的作用正逐渐得到人们的广泛关注。

人体内的自由基被认为会引起生物细胞氧化性损伤, 进而引起癌症、衰老、心血管疾病等慢性病^[1,2], 天然食品清除羟基自由基能力和抗氧化能力的研究由此而受到人们的重视。一些研究表明, 食用菌含有抗氧化成分, 浓香乳菇、香菇多糖、双孢蘑菇、药膳泽泻香菇等均具有较强的抗氧化作用^[3~6]。在人体内的自由基中以氧形成的自由基最为重要, 包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$), 羟基自由基($\cdot OH$)等^[7]。超氧自由基 $O_2^{\cdot-}$ 是在生命活动的代谢过程中产生的一种重要的自由基, 具有很强的氧化能力^[8], 因此研究抗氧化物质活性的实验中检测其清除超氧阴离子自由基能力的实验较多, 研究表明, 平菇多糖、黑木耳多糖等具有清除超氧自由基的作用^[9~11]。羟基自由基($\cdot OH$)是最活泼的自由基, 也是毒性最大的自由基。它可以与活细胞中任何分子发生反应造成损害, 且反应速度极快, 被破坏的分子遍及糖类、氨基酸、磷脂、核苷和有机酸等^[7]。但几乎未见有人对食用菌清除羟基自由基能力进行研究。本文利用水杨酸法检测并比较研究了几种常见食用菌鲜品及干品的热水浸提液、干菌粉、粗多糖、冷水浸提液、75%乙醇浸提液、无水乙醇浸提液及乙酸乙酯浸提液的清除羟基自由基能力, 初步分析了几种食用菌清除羟基自由基物质的来源。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*), 香菇 (*Lentinus edodes*), 平菇 (*Pleurotus ostreatus*), 秀珍菇 (*Pleurotus geesteyanus*), 茶树菇 (*Agrocybe aegerita*), 真姬菇 (*Hypsizygus marmoreus*), 金针菇 (*Flammulina velutipes*) 子实体新鲜样品均购自南京市上海路菜场。

1.1.2 试剂药品

无水乙醇, 95% 乙醇, 乙酸乙酯, H_2O_2 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, HCl , 水杨酸均为国产分析纯。所用水均为双蒸水。

1.1.3 主要仪器

恒温水浴锅, Sigma 1-15 离心机, Sigma 3K30 离心机, Bio-RAD Smartspec3000 分光光度仪。

1.2 方 法

1.2.1 七种食用菌鲜品热水浸提液的制备及其清除羟基自由基能力的测定

1.2.1.1 七种食用菌鲜品热水浸提液的制备

新鲜食用菌子实体, 取一部分于 60℃ 烘箱完全烘干后计算各种食用菌的含水量, 据此各称取 5 g 干重食用菌所需的鲜品 (双孢蘑菇 57.45 g, 香菇 38.13 g, 平菇 70.63 g, 秀珍菇 58.87 g, 茶树菇 54.43 g, 真姬菇 59.49 g, 黄金针菇 41.30 g), 用搅拌机搅拌成泥状后各加 100 mL 双蒸水, 95℃ 水浴浸提 2 h 后, 过滤, 取滤液, 即得食用菌鲜品热水浸提液。各取 2 mL 稀释 10 倍, 分别在 pH 5.4 和 pH 1.7 反应体系中用 1.2.1.2 方法测其羟基自由基清除率。

1.2.1.2 测定溶液对羟基自由基清除能力的方法

参照陈留勇等改动的 Smirnov (1989) 的水杨酸法^[12,13], 并略作改动。利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合产生

* 第一作者: 学士 (连宾教授为通讯作者)。

* 中国博士后基金 (2003033496) 和南京师范大学科研基金 (184070HZB39) 资助项目

收稿日期: 2005-04-16, 改回日期: 2005-08-29

羟自由基,即: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{Fe}^{3+}$ 。再在体系内加入水杨酸捕捉羟自由基并产生有色物质,该物质在 510 nm 处有最大吸收。用该吸光值来表示羟自由基的含量。反应体系中含 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL, 9 mmol/L FeSO_4 1 mL, 9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL, 待测溶液 1 mL, 其中 H_2O_2 是最后加入并启动整个反应。37℃ 反应 0.5 h 后, 12 000 r/min 离心 6 min, 然后以双蒸水作参比, 在 510 nm 下测定吸光度。考虑待测溶液本身的吸光值不同, 以 9 mmol/L FeSO_4 1 mL, 9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL, 待测溶液 1 mL 和双蒸水 1 mL 作为待测溶液的本底吸收值。清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = (A_0 - (A_X - A_{X_0})) / A_0 \times 100\%$$

其中 A_0 为空白对照液的吸光度, A_X 为加入待测溶液后的吸光度, A_{X_0} 为待测溶液的本底吸收值^[12~15]。

每一吸光值平行测 3 次, 取其平均值, 结果用 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 并采用 t 检验法。

1.2.2 三种食用菌干菌粉、干菌粉热水浸提液的制备及其清除羟自由基能力的比较测定

取双孢蘑菇、香菇和平菇新鲜子实体 60℃ 烘箱烘干, 粉碎机粉碎成干菌粉。测定干菌粉对羟自由基清除能力的方法参照 1.2.1.2, 为弥补用待测粉末代替待测液导致测定体系总体积减少, 以 1 mL 双蒸水代替待测液, 保持测定体系总体积均为 4 mL, 以便与 1.2.1.2 测定结果进行比较。即: A_X 反应体系中加入 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL, 9 mmol/L FeSO_4 1 mL, 9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL, 双蒸水 1 mL 和待测物 5 mg。 A_0 空白对照反应体系中加入 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL, 9 mmol/L FeSO_4 1 mL, 9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL, 双蒸水 1 mL。 A_{X_0} 反应体系中加入 9 mmol/L FeSO_4 1 mL, 9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL, 双蒸水 2 mL 和待测物 5 mg。其他同 1.2.1.2 中测定溶液对羟自由基的清除能力方法。

各取 5 g 双孢蘑菇、香菇和平菇干菌粉, 分别加 100 mL 双蒸水, 95℃ 水浴浸提 2 h 后, 过滤, 取滤液, 即得食用菌干菌粉热水浸提液。各取 1 mL 稀释 10 倍, 测定其清除羟自由基能力, 方法同 1.2.1.2。

1.2.3 食用菌干菌粉热水浸提液、粗多糖的制备及其清除羟自由基能力的比较测定

取 1.2.2 制备的香菇、平菇干菌粉各 2 g, 各加 50 mL 双蒸水, 95℃ 水浴浸提 2 h 后, 过滤, 取滤液, 即得食用菌干菌粉热水浸提液。各取 1 mL 稀释 10

倍, 测定干菌粉热水浸提液清除羟自由基能力, 方法同 1.2.1.2。余下的未经稀释的干菌粉热水浸提液各加 100 mL 95% 乙醇沉淀, 4℃ 冰箱过夜后, 8 000 r/min 离心 10 min 所得沉淀为粗多糖。各加 100 mL 双蒸水溶解得粗多糖溶液。各取 2 mL 稀释 5 倍, 测定其清除羟自由基能力, 方法同 1.2.1.2。

1.2.4 食用菌的 4 种提取物的制备及其清除羟自由基能力的测定

各取 8 g 由 1.2.2 制备的双孢蘑菇、香菇和平菇干菌粉, 再将每种食用菌的 8 g 干菌粉等分为 4 份, 2 g/份, 各自分别加 20 mL 的双蒸水、75% 乙醇、无水乙醇、乙酸乙酯, 充分搅拌, 通风橱中各自密闭放置浸提 14 h 后, 过滤, 各自取滤液即为不同提取溶剂的浸提液。将浸提液放真空干燥箱中用真空泵抽取 12 h 后, 在通风橱中自然挥发 5 d 至完全干燥得浸膏。分别测定浸膏对羟自由基的清除能力, 方法同 1.2.2 中测定干菌粉对羟自由基清除能力的方法。

2 结果及讨论

2.1 七种食用菌鲜品热水浸提液的清除羟自由基能力的比较 (图 1)

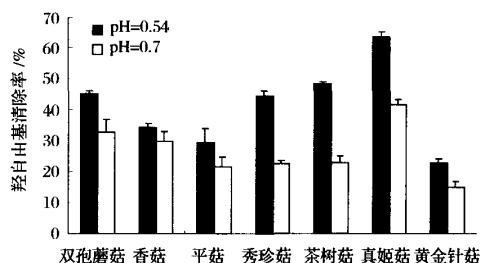


图 1 七种食用菌鲜品清除羟自由基能力比较

由图 1 可以看出无论是 pH 5.4 或是 pH 1.7 时, 各种食用菌均能有效地清除羟自由基, 它们与对照之间的差异均达到显著水平 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)。被认为具有预防衰老, 延长寿命功效的真姬菇在反应体系 pH 5.4 和 pH 1.7 时, 其对羟自由基清除率分别达到 63.61% 和 41.56%, 均为同时检测的 7 种食用菌中最高。所有 7 种食用菌清除羟基自由基能力的强弱顺序为: 真姬菇 > 茶树菇 > 双孢蘑菇 > 秀珍菇 > 香菇 > 平菇 > 黄金针菇。而 pH 1.7 反应体系清除羟自由基能力普遍低于 pH 5.4 的反应体系, 说明过酸会降低食用菌对羟自由基的清除能力。这可能是因为酸性条件下, 一些抗氧化物质会变得不稳定。现在已有人证实了酸碱度对物质的抗氧化

性确有影响,张政等研究表明^[16],天然抗氧化物质类黄酮的超氧化物歧化酶的最适 pH 为 8.0 左右,pH 稳定范围在 6.0~10.6。此结果说明菌汤不仅营养丰富,而且具有一定的抗氧化作用,同时也提示我们在烧菌类食品时不要放食醋等酸性调料,以免影响其抗氧化性能。

2.2 三种食用菌干菌粉及其热水浸提液的清除羟自由基能力比较(图 2)

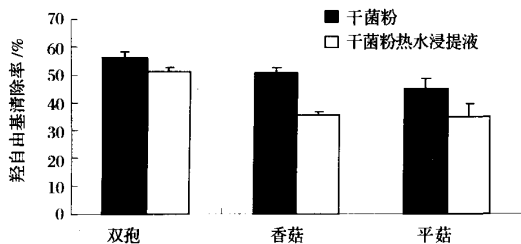


图2 食用菌干菌粉及其浸提液清除羟自由基能力比较

由图2可以看出,双孢蘑菇,香菇,平菇3者中干菌粉及其浸提液都有比较高的清除羟自由基能力,而其中又以双孢蘑菇最高。这说明市场上所售的一些食用菌干品同样具有很好的抗氧化作用。国内目前未见关于这3种食用菌热水浸提液清除羟自由基能力的报道,但有研究表明,香菇水提液具有抗氧化性,其抗 H_2O_2 作用和清除超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 作用均较强^[17]。实验结果还表明,3种食用菌干菌粉浸提液的清除羟自由基能力比各自干菌粉的清除羟自由基能力有不同程度的下降,双孢蘑菇差别最小,只下降了5.45%,香菇下降得最多,达到15.04%。这暗示了不同种类的食用菌清除羟自由基的物质并不相同,各物质的清除能力大小也不同,有些不溶于水的物质也有较强的抗氧化作用。另外,加热处理会破坏部分抗氧化物质,造成它们的活性降低^[16],这也可能是干菌粉热水浸提液清除羟自由基能力下降的原因之一。由此推测加热时间越长,抗氧化物质被破坏的越多,因此食用菌的烧煮的时间不宜过长。

2.3 食用菌子实体干品热水浸提液和粗多糖的清除羟自由基能力比较(表1)

表1 食用菌干品浸提液和粗多糖清除羟自由基能力比较

组别	浓度 /g·L ⁻¹	羟自由基清除率/%	
		干菌浸提液	粗多糖溶液
对照	10.0	—	—
香菇	4.0	28.80 ± 3.68 ^a	15.55 ± 1.16 ^b
平菇	4.0	27.07 ± 2.83 ^a	14.63 ± 5.30 ^b

注:实验组与对照组相比, a: $P < 0.01$ b: $P < 0.05$ 。

表1结果表明,食用菌粗多糖有显著的清除羟自由基的能力,相当于每100 mL含0.4 g干品所得粗多糖的清除羟自由基能力分别为15.55%和14.63%。但未经提取粗多糖的干菌浸提液本身的羟自由基清除率远大于粗多糖溶液。说明在热水浸提液中多糖具有一定的清除羟自由基能力,但由于粗多糖溶液组成的复杂性,许多被沉淀下来的诸如蛋白质等物质可能同样具有清除羟自由基能力。

2.4 不同提取物清除羟基自由基能力的比较(图3)

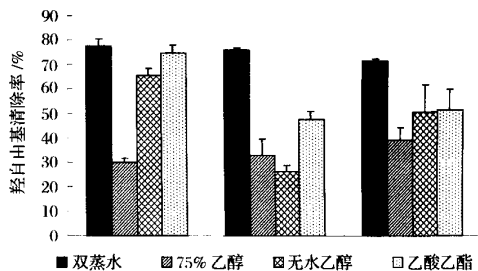


图3 不同提取溶剂清除羟基自由基能力的比较

图3结果说明,所测样品都具有非常明显的清除羟自由基的能力($p < 0.001$)。但不同食用菌其清除羟自由基作用的主要抗氧化剂来源并不完全相同。双孢蘑菇的双蒸水和乙酸乙酯浸提物的羟自由基清除率最高,分别达到77.65%和74.56%,而75%乙醇浸提物的羟自由基清除率则明显低于其他3种提取溶剂($p < 0.05$),只有29.86%。香菇的双蒸水浸提物的羟自由基清除能力显著高于其他3种提取溶剂($p < 0.01$),达76.02%。平菇为双蒸水浸提物的清除羟自由基能力最强,达到71.35%;而无水乙醇和乙酸乙酯的差不多,分别是50.32%和51.29%;只有75%乙醇的较低,清除率为39.01%。由此可见,各类食用菌的抗氧化、清除羟自由基的物质很多,有效成分也并不相同。而双孢蘑菇、香菇和平菇均为水提物的羟自由基清除率最高,说明这3种食用菌中清除羟自由基的物质大多能溶于水中,并发挥很好的清除羟自由基作用。

3 结 语

研究主要得出如下结论:(1)食用菌的热水提取液具有明显的清除羟自由基能力;(2)试验表明,过酸会抑制食用菌清除羟自由基能力,降低抗氧化物质的活性;(3)干菌粉同样具有较强的抗氧化能力;(4)不同种类的食用菌清除羟自由基的有效成分不相同。

据报道,糖类、活性肽、活性蛋白质、维生素E、维

生素 C、黄酮类化合物等等都是优良的活性氧清除剂^[7,18],这些物质在不同极性的溶剂中的溶解性不同,从而造成了不同浸提液清除羟自由基能力的差别。食用菌中究竟是哪种成分起到清除羟自由基的作用,它们对人体内其他自由基(如超氧自由基,过氧化氢,单线态氧等)是否也有明显的清除作用,这需要从浸提液中将这些抗氧化物质提取、分离并纯化以及进一步的分析研究。

参 考 文 献

- 崔 剑,李兆陇,洪啸吟. 自由基生物抗氧化与疾病[J]. 清华大学学报(自然科学版),2000,40(6):9~12
- 张连琴. 自由基与疾病[J]. 天津医科大学学报,1997,3(2):85~88
- 凌建亚,刘 涛,程健峰,等. 浓香乳菇菌丝体抗脂过氧化活性的研究[J]. 食品科学,2001,22(7):77~81
- 杨旭辉,朱敏恒,吴 越. 植物源性天然抗氧化成分研究发展[J]. 农垦医学,2004,26(4):298~300
- 常海兰,殷 凤. 双孢蘑菇的抗氧化作用及对免疫功能影响的研究[J]. 山西医科大学学报,2003,34(2):122~123
- 施洪飞,项 平,杨力坤,等. 泽泻香菇调节血脂和抗氧化作用实验研究[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版),2000,16(2):93~95
- 郑建仙. 功能性食品[M]. 北京:中国轻工业出版社,1995
- 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
- 杨海龙,林燕文. 平菇多糖的分离纯化及其对超氧自由基的效应[J]. 食品科学,1999(10):16~18
- 沈 侃,邵海玲. 平菇多糖清除 O_2^- 及对红细胞膜自由基氧化的影响[J]. 氨基酸和生物资源,2002,24(2):19~21
- 李兴泰,高明波. 黑木耳多糖清除活性氧及保护线粒体[J]. 食品科学,2004,25(1):171~174
- 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[J]. 食品科学,2004,25(2):167~170
- Nicholas Smironff, Quinton J Cumbes. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry,1989,28(4):1057~1060
- 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,2003,23(8):252~254
- 王建华. 枸杞多糖-2 的抗羟基自由基氧化作用[J]. 食品科学,2001,22(1):11~13
- 张政,周源,王转花,等. 苦荞麦麸皮中类黄酮的抗氧化活性研究[J]. 药物生物技术,2001,8(4):217~220
- 覃爱娟,龙盛京,李毅. 几种食用菌水提物抗氧化的研究[J]. 中国食用菌,1994,13(3):24~25
- 候至孝. 自由基相关疾病及抗氧化中药研究[J]. 天津药学,1996,8(1):18~21

Hydroxyl Radical Scavenging Activities of Several Kinds of Edible Fungi

Ma Xiaohua Lian Bin

(Key Laboratory of Microbial Engineering, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, 210097)

ABSTRACT The hydroxyl radical scavenging activities of several kinds of edible fungi were determined. The results showed that edible fungi studied in this paper have clearing effects on scavenging hydroxyl radical. Their scavenging activities followed in the order: *Hypsizygus marmoreus* > *Agrocybe aegerita* > *Agaricus bisporus* > *Pleurotus geesteyanus* > *Lentinus edodes* > *Pleurotus ostreatus* > *Flammulina velutipes*. Furthermore, the experiment showed that the capacity of scavenging hydroxyl radical is different in various kinds of edible fungi.

Key words hydroxyl radical, edible fungi, antioxidation

政策
法规
标准

我国将建立食品安全监察专员制度

国家食品药品监督管理局局长在全国人大教科文卫委员会全体会议上介绍,我国将逐步建立健全国家食品安全监察专员制度,并在汇报食品安全重点建议办理情况时指出,通过重点建议的办理,进一步理顺了工作思路,落实了工作措施,促进了食品安全监管体系的完善和食品安全执法力度的不断加大。为适应食品安全形势的需要,食品药品监管局调整了食品安全协调司和食品安全监察司的主要职能、内设机构和人员编制,逐步建立健全国家食品安全监察专员制度,强化综合监督和组织协调的权威,强化查处食品安全重大事故的职能。

据悉,食品药品安全是近年来全国人民代表大会上代表们关注的热点之一。今年,全国人大常委会办公厅确定将十届全国人大三次会议期间代表们提出的关于“完善食品安全监管体系,加大执法力度”的建议,作为重点建议办理。全国人大教科文卫委员会还组成了3个调研组,分赴山东、广东、浙江对食品卫生法实施情况进行了执法调研。下一步,全国人大常委会还要对食品卫生法进行修订,全国人大常委会已列入立法规划,预计不久修订草案将提交常委会审议。