

真姬菇 JB06 发酵海带废渣所得产物的 抗自由基和总抗氧化能力

解秋菊¹, 闫培生¹, 池振明²

(1. 哈尔滨工业大学(威海)海洋学院, 山东 威海 264209; 2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了探索海带废渣高附加值利用的方法,用真姬菇 JB06 菌株液态发酵海带废渣,乙醇沉淀法制备发酵液上清液中多糖,用试剂盒测定了所得多糖的抗自由基和总抗氧化能力。结果表明:在多糖质量浓度为 0.5 mg/mL 时,真姬菇 JB06 菌株发酵上清液中的多糖(简称 JB06 菌株多糖)对羟自由基的抑制率比海带废渣水溶液上清中的多糖(简称对照多糖)高了 11.34%;多糖质量浓度为 8 mg/mL 时,JB06 菌株多糖对超氧阴离子自由基的抑制率比对照多糖高了 9.52%;JB06 菌株多糖的总抗氧化能力比对照多糖高出了 13.20%。通过实验可以得出:真姬菇发酵海带废渣后获得的多糖的总抗氧化能力比对照多糖总抗氧化能力显著提高。

关键词: 真姬菇;液态发酵;海带废渣;多糖;抗自由基;总抗氧化能力

中图分类号: TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)04-0429-04

Anti-Free Radical and Antioxidant Activity of Exopolysaccharide from Fermented Kelp Waste by *Hypsizigus marmoreus* JB06

XIE Qiu-ju¹, YAN Pei-sheng¹, CHI Zhen-ming²

(1. School of the Ocean, Harbin Institute of Technology at Weihai, Weihai 264209, China; 2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The aim of this study is to find a way to reuse of kelp waste with higher value. For this, kelp waste was fermented in liquid by *Hypsizigus marmoreus* JB06, and the polysaccharides were got through sedimentation by ethanol. The activity of anti-free radical and total antioxidant of polysaccharides was detected by using the Kit. The results showed that at the 0.5 mg/mL, the inhibition rate of hydroxyl radical of the polysaccharide was higher by 11.34% than that from the solution of pure kelp waste. At the content of 8mg/mL, the inhibition of superoxide anion was higher by 9.52 % than that from the solution of pure kelp waste; the total antioxidant activity was increased by 13.20%. Based on the above results, it can concluded that the antioxidant capacity was significantly increased by fermentation.

Key words: *Hypsizigus marmoreus*, liquid fermentation, kelp wast, polysaccharide, anti-free radical, antioxidant activity

收稿日期: 2011-02-25

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2010DQ010)。

作者简介: 解秋菊(1972-),女,山东菏泽人,工学硕士,高级工程师,主要从事生物技术方面的研究。E-mail:whxqj@yahoo.com

*通信作者: 闫培生(1964-),男,山东栖霞人,农学博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物方面的研究。E-mail:psyan6@hotmail.com

海带作为海藻的一种,是海藻工业的主要原料之一,目前我国已形成了一个以褐藻胶、甘露醇、碘为主要产品的海藻化工业,产业规模居世界首位。按干物质计,海带的工业利用率仅为30%,还有约2/3的海带成分尚未得到利用,而是作为废弃物扔掉,不仅浪费了大量的自然资源,还带来一系列环境污染问题^[1]。

真姬菇(*Hypsizigus marmoreus*),俗称玉蕈、斑玉蕈、蟹味菇等,它隶属担子菌亚门,层菌纲,伞菌目,白蘑科,玉蕈属,是一种较为珍稀的药食两用菌^[2]。其多糖具有防癌抗癌、抵抗HIV病毒、降血压、清除体内自由基、提高免疫力等功效^[3]。随着人们对液体培养技术研究的不断深入,液体培养已被成功地用于多种大型真菌的大规模生产^[4]。研究发现,真姬菇在液体培养过程中能够在细胞内、外同时积累多糖^[5]。现代研究表明:许多食用真菌所含成分(如多糖等)具有免疫调节活性^[6]。作者以真姬菇做菌种,液体发酵海带废渣,研究了所得多糖的抗自由基和总抗氧化能力,为真姬菇的液体发酵和海带废渣的再利用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

羟自由基测定试剂盒、抗超氧阴离子自由基测定试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒:均购自南京建成生物工程研究所;海带废渣:荣成市寻山渔业公司;真姬菇JB06菌株:作者所在实验室筛选保存。

4K-15高速冷冻离心机:德国Sigma公司制造;Alpha1-2/LD-plus冷冻干燥机:德国Christ公司制造;MK3酶联免疫分析仪:美国热电Thermo。

1.2 方法

1.2.1 培养基的制备

1) 菌种斜面和平板培养基(g/dL):PDA培养基,含马铃薯20,葡萄糖2,琼脂粉1.8,pH自然。121℃灭菌30min。

2) 5%海带废渣液体培养基:将海带废渣磨成干粉,配制成5%的水溶液,同时添加0.025 g/dL的蛋白胨和0.005 g/dL的硫酸镁,pH自然,各做3个平行,121℃灭菌30min。

1.2.2 接种、培养与处理

将实验菌株从斜面上

挑取一小块接种到平板中央,25℃恒温培养。待菌丝体长到一定程度,用直径为10mm无菌打孔器从平板上打孔取块,分别接种于海带废渣液体培养基,放入摇床,25℃、110 r/min恒温振荡培养,以无菌的、不接种的海带废渣液体培养基作为空白对照。10d后,将发酵产物于4000 r/min离心10min,收集上清液,然后加入3倍体积的无水乙醇,混匀,4℃静置过夜后,5000 r/min离心20min,沉淀用95%乙醇洗2次后,-20℃冷冻,冷冻干燥机中冻干,得到粗多糖。

1.2.3 苯酚硫酸法测多糖质量浓度 标准曲线的绘制:取11支带塞的玻璃试管,依次加入0.100 mg/mL的葡萄糖标准液0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL,然后加入蒸馏水补足到1 mL,加入5%的苯酚1.0 mL,竖直加入浓硫酸5 mL,振荡混匀,然后100℃水浴中反应10min,冷却至室温,在490 nm波长下测定吸光值。

将粗多糖水溶液稀释到合适的浓度,加入1.0 mL,其它操作同标准曲线绘制方法,将吸光度值利用标准曲线算出溶液中多糖的质量浓度,此数值乘0.9,即为纯多糖量。

1.2.4 多糖清除羟自由基能力测定 将对照多糖、JB06菌株多糖分别用蒸馏水配制成0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL系列浓度,按试剂盒说明书提供的方法进行测定,每个质量浓度做3个平行,用酶标仪550 nm处测吸光度。

1.2.5 多糖清除超氧阴离子自由基能力测定 将对照多糖、JB06菌株多糖分别用蒸馏水配制成2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0、16.0 mg/mL系列质量浓度,按试剂盒说明书提供的方法进行测定,每个质量浓度做3个平行,用酶标仪550 nm处测吸光度。

1.2.6 多糖总抗氧化能力测定 将对照多糖、JB06菌株多糖分别用蒸馏水配制成0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、4.0、6.0 mg/mL系列质量浓度,每个质量浓度做3个平行,用酶标仪520 nm处测吸光度。按试剂盒说明书提供的方法进行测定。

2 结果与分析

2.1 多糖质量浓度

葡萄糖标准曲线为 $Y = 10.342X - 0.0002$,

$R^2=0.9995$,其中, Y 为490 nm处的吸光光度值, X 为葡萄糖质量浓度。对照粗多糖和JB06菌株粗多糖的质量浓度测定结果见表1。

表1 多糖质量浓度测定结果

Tab.1 Content of polysaccharides in fermented broth

粗多糖	OD ₄₉₀ 均值	质量浓度/(g/dL)
对照粗多糖	0.191±0.003	16.64
JB06 菌株粗多糖	0.326±0.006	28.39

从表1的实验结果可以看出,JB06菌株多糖质量浓度明显高于对照多糖。

2.2 多糖清除羟自由基能力的比较

JB06菌株多糖清除羟基自由基的能力高于对照多糖,且抑制率随着多糖质量浓度的增大而增加。JB06菌株多糖在质量浓度为0.1~0.5 mg/mL时其抑制率增加较慢,当大于0.5 mg/mL时,抑制率从40.78%很快升至60.31%;对照多糖的抑制率随着多糖质量浓度的升高逐渐增加。李正鹏、吴萍^[7]研究了白灵菇胞外多糖抗氧化活性,对羟自由基的抑制率也是随着多糖质量浓度的增加而增高,在4 mg/mL时抑制率为39.56%,低于本实验的结果,JB06菌株多糖此质量浓度的抑制率为70.56%,见图1。

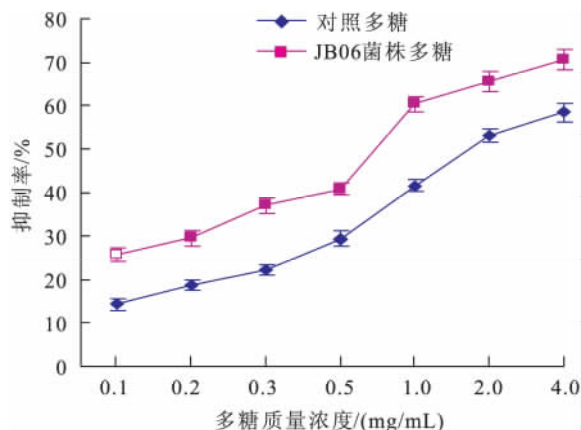


图1 对照多糖、JB06菌株多糖的清除羟自由基测定结果
Fig.1 Clean free radical activity of polysaccharides from strain JB06 broth

从图1的实验结果得知,在0.5 mg/mL时,JB06菌株多糖与对照多糖的抑制率差别最小,因此,在该多糖质量浓度下,对JB06菌株多糖和对照多糖的抑制率做 t 检验($p>0.05$ 差异不显著; $0.05<p<0.01$ 差异显著; $p<0.01$ 差异极其显著

), $p=0.002$,差异极其显著,从而得知,在其它多糖质量浓度下JB06菌株多糖与对照多糖的抑制率差异都极其显著。

2.3 多糖清除超氧阴离子自由基能力的比较

JB06菌株多糖清除超氧阴离子自由基的能力明显高于对照多糖。JB06菌株多糖在低质量浓度范围内,抑制率随质量浓度的升高而增强,多糖质量浓度从2 mg/mL升至8 mg/mL时,抑制率增加较快,从8.83%升至25.71%,多糖质量浓度大于8 mg/mL时,抑制率增加很慢,在16 mg/mL时,抑制率仅为32.14%。对照多糖对超氧阴离子自由基的抑制率随质量浓度的变化与JB06菌株多糖相似。李顺峰等^[8]报道真姬菇子实体多糖体外抗氧化特性研究表明,真姬菇子实体多糖粗品对超氧阴离子自由基有一定清除效果,在质量浓度为10 mg/mL时抑制率达到最高,约30%左右,本实验结果与其一致,见图2。

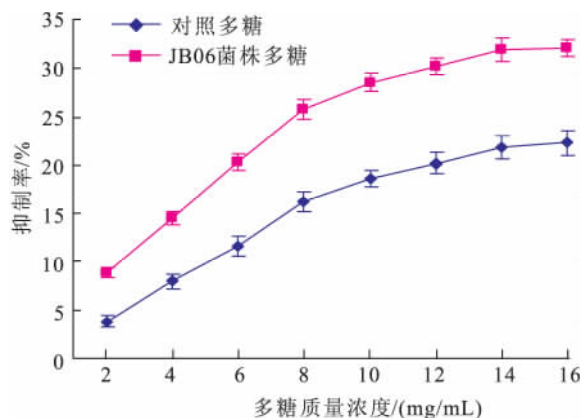


图2 对照多糖、JB06菌株多糖的抗超氧阴离子自由基测定结果

Fig.2 Anti-free radical activity of polysaccharides from strain JB06 broth

从实验结果得知,多糖质量浓度为2 mg/mL时,JB06菌株多糖与对照多糖的抑制率差别最小,因此,在该多糖质量浓度下,对JB06菌株多糖和对照多糖的抑制率做 t 检验, $p=0.004$,差异极其显著,从而得知,在其它多糖质量浓度下JB06菌株多糖与对照多糖的抑制率差异都极其显著。

2.4 多糖总抗氧化能力的比较

从图3可以看出,JB06菌株多糖的总抗氧化能力随多糖质量浓度的增加有一定的变化。在1 mg/mL和2 mg/mL时,总抗氧化能力达到最高,为2.050 U/mg,当多糖质量浓度继续增加时,其总抗

氧化能力则减少。多糖质量浓度为 6 mg/mL 时,总抗氧化能力减少为 1.401 U/mg,因此,JB06 菌株多糖的总抗氧化能力为 2.050 U/mg;对照多糖的总抗氧化能力也表现出与 JB06 菌株多糖相似的趋势,在多糖质量浓度为 0.4~2 mg/mL 范围内,总抗氧化能力逐渐增加,当多糖质量浓度为 2 mg/mL 时,总抗氧化能力达最高,为 1.811 U/mg,多糖质量浓度继续增加时,总抗氧化能力则逐渐降低。因此,对照多糖的总抗氧化能力为 1.811 U/mg。JB06 菌株多糖的总抗氧化能力比对照多糖高了 13.2%。

对 JB06 菌株多糖和对照多糖的抗氧化能力单位做 t 检验, $p=0.030$, 差异显著。

3 结语

作者测定了真姬菇液态发酵海带废渣所得多糖清除羟自由基、清除超氧阴离子自由基和总抗氧化能力,通过实验得出:真姬菇 JB06 菌株多糖清除

羟自由基、清除超氧阴离子自由基和总抗氧化能力都比对照多糖的高,真姬菇对海带废渣的发酵有明显的效果。

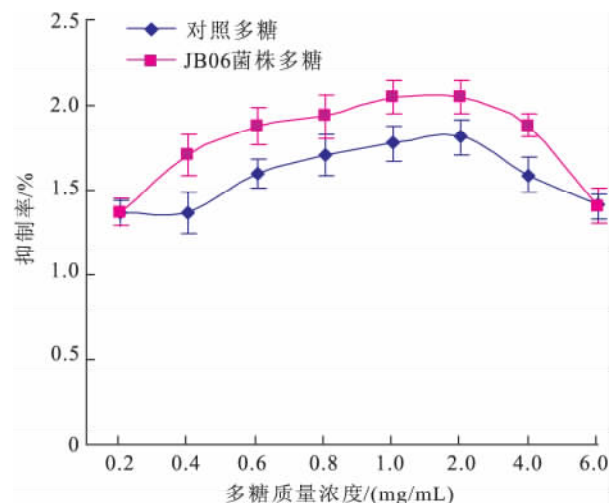


图3 对照多糖、JB06 菌株多糖的总抗氧化能力测定结果
Fig. 3 Total antioxidant activity of polysaccharides from strain JB06 broth

参考文献(References):

- [1] 孟秀梅,刘昌衡,王希敏,等. 海带下脚料的食用菌深加工初探[J]. 食品科技,2007,1:196-198.
MENG Xiu-mei, LIU Chang-heng, WANG Xi-min, et al. Initial exploration on deep processing utilizing domestic fungus of kelp off-cuts[J]. *Food Science and Technology*, 2007, 1:196-198. (in Chinese)
- [2] 陶明煌,王玮,王晓炜,等. 真姬菇营养成分生物活性物质分析及其多糖清除自由基活性研究[J]. 食品科学,2007,28(8):404-407.
TAO Ming-xuan, WANG Wei, WANG Xiao-wei, et al. Analysis of nutrient components and bioactive substance of *Hypsizygus marmoreus* and study on activity of polysaccharides scavenging free radicals[J]. *Food Science*, 2007, 28(8):404-407. (in Chinese)
- [3] 王萍,师俊玲. 真姬菇液体培养用菌种及其营养因子筛选[J]. 食品与发酵工业,2008,34(3):70-73.
WANG Ping, SHI Jun-ling. Optimization of nutrients for the grows and polysacchride production of *Hypsizygus marmoreus* in iquid cutivation[J]. *Food and Fermentating Industries*, 2008, 34(3):70-73. (in Chinese)
- [4] 贺红. 灵芝液体深层发酵技术研究进展及展望[J]. 基层中药杂志,2000,14(2):48-49.
HE Hong. Present status and future prospects of liquid submerged fermentation by canoderma [J]. *Primary Journal of Chinese Materia Medica*, 2000, 14(2):48-49. (in Chinese)
- [5] 刘少琴,赵紫华,马彩霞,等. 药用真菌液体发酵培养的研究进展[J]. 中国现代中药,2006,8(7):28-32.
LIU Shao-qin, ZHAO Zi-hua, MA Cai-xia, et al. Research development of liquid fermentatation on medicinal fungi[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2006, 8(7):28-32. (in Chinese)
- [6] 徐静娟,鄢敏辰,朱劼,等. 茶树菇多糖免疫调节作用的研究[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(6):36-39.
XU Jing-juan, WU Min-chen, ZHU Jie, et al. Study on immunoregulatory function of *Agrocybe cylindracea* polysaccharide(ACP) [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(6):36-39. (in Chinese)
- [7] 李正鹏,吴萍. 白灵菇胞外多糖抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业,2009,35(10):85-88.
LI Zheng-peng, WU Ping. Studies on the antioxidative effects of *pleurotus nebrodensis* exopolysaccharide[J]. *Food and Fermentating Industries*, 2009, 35(10):85-88. (in Chinese)
- [8] 李顺峰,张丽华,付娟妮,等. 真姬菇子实体多糖体外抗氧化特性研究[J]. 西北农业学报,2008,17(4):302-305.
LI Shun-feng, ZHANG Li-hua, FU Juan-ni, et al. Antioxidant properties of polysaccharide extracts from fruitbodies of *Hypsizygus marmoreus* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2008, 17(4):302-305. (in Chinese)