

评价方法对层孔菌抗氧化能力的影响

谢丽源, 甘炳成, 彭卫红, 黄忠乾, 谭伟

(四川省农业科学院 土壤肥料研究所, 四川 成都 610066)

摘要: 评价层孔菌体外抗氧化能力和分析对抗氧化能力起重要贡献的活性物质。采用多种抗氧化测定方法测定不同层孔菌抗氧化活性,测定多糖、黄酮、总酚等抗氧化活性物质质量浓度,比较抗氧化活性物质质量浓度间、抗氧化测定方法间以及抗氧化测定方法与活性物质质量浓度间的相关性。结果表明,ws2和ws7具有较高的多糖、黄酮及总酚质量浓度,且不同基因型及相同基因型菌株活性物质质量浓度间相关系数差异较大;ws2和ws7有较强的羟自由基、DPPH、超氧阴离子自由基清除能力及较高铁离子螯合能力和还原力,不同抗氧化能力检测方法所得的结果具有不同的统计学相关性;总酚与不同抗氧化检测方法间均有较强的相关性,黄酮相关性次之,粗多糖与其相关性较低,因此,酚类物质对抗氧化能力贡献最大。

关键词: 层孔菌;测定方法;抗氧化能力;活性物质;相关系数

中图分类号: R 284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)02—0143—08

Effect of Evaluation Method on Antioxidant Capacity of *Phellinus*

XIE Liyuan, GAN Bingcheng, PENG Weihong, HUANG Zhongqian, TAN Wei

(Institute of Soil and Fertilizer, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: The aim of this manuscript was to evaluate antioxidant capacity and analyze the active substance of playing an important contribution to antioxidant capacity of *Phellinus*. Antioxidant activities and the contents of antioxidant substances of *Phellinus* were determined by various of antioxidant assay methods, and the correlative relationships between contents of different active components, between results from different antioxidant assay methods and between contents of different active components and results from different antioxidant assay were further investigated. The results showed that ws2 and ws7 had the highest contents of polysaccharide, flavonoid and phenol, and the correlative relationships between contents of different active substances had a large difference whether different genotypes or the same genotypes. Strains of ws2 and ws7 had the strongest scavenging capacity of hydroxyl radical, DPPH, superoxide anion radical, chelating ability and reducing power, and the results from different antioxidant assay methods had differently statistical correlation. The correlative relationship between content of total phenolic and results from different antioxidant assay methods was the strongest than those of polysaccharide and flavonoid,

收稿日期: 2012-01-09

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAD16B00);四川省应用基础项目(2012JY0064);省财政基因工程专项资金项目(2012LWJJ-002)。

作者简介: 谢丽源(1977—),女,四川成都人,工学博士,副研究员,主要从事农产品贮藏及加工方面的研究。

E-mail: xieliyuan77@163.com

flavonoid's taking second place, polysaccharide's low correlation, which described that phenolic played a major contribution to the antioxidant capacity.

Keywords: *Phellinus*, assay method, antioxidant capacity, active substance, correlation coefficient

层孔菌 (*Phellinus*) 在分类学上属担子菌亚门 (Basidiomycota)、层菌纲 (Hymenomycetes)、非褶菌目 (Aphyllphorates)、锈革孔菌科 (Hymenochaetaceae), 具有增强免疫、抗氧化、抗菌、消炎等药理活性^[1-5]。研究发现, 层孔菌属真菌具有较高的抗氧化活性, 近年来日益受到关注, 但大多数研究集中在粗多糖、纯化多糖或粗提物的抗氧化活性^[6-8], 而对不同活性成分的抗氧化性能研究较少, 尤其是对其中发挥抗氧化性能起主要贡献的功能成分缺乏定论。

物质抗氧化活性的评价方法包括很多种, 目前还没有标准方法。由于生物体内自由基的种类、产生机理、产生部位及它所作用的靶点的不同, 相对应的抗氧化剂的抗氧化机理和能力就不同。因此, 通过体外抗氧化实验筛选抗氧化剂需要采用多种自由基, 选择多种抗氧化评价方法, 尤其是基于不同抗氧化机制的评价方法, 利用多系统、多方面来全面、客观的评价待测物的总抗氧化能力。

作者以层孔菌如苹果木层孔菌 (*Phellinus pomaceus*)、松木层孔菌 (*Phellinus pim*)、稀硬木层孔菌 (*Phellinus robustus*)、鲍氏层孔菌 (*Phellinus baumii*)、裂蹄针层孔菌 (*Phellinus linteus*) 作为研究材料, 采用多种抗氧化测定方法评价层孔菌抗氧化能力, 测定抗氧化活性物质质量浓度, 利用统计分析明确对层孔菌抗氧化起主要贡献的活性物质, 为其抗氧化机理研究以及进一步的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

ws1、ws5、ws7、ws10、ws11、ws12 (*P. linteus*)、ws2、ws3、ws6、ws8、ws9 (*P. baumii*)、ws-x (*P. robustus*)、ws-s (*P. pim*)、ws-l (*P. ignarius*)、ws-p (*P. pomaceus*): 均由四川省农业科学院微生物研究开发中心提供。

1.2 试剂

DPPH: Sigma 公司; 葡萄糖、无水乙醇、冰乙酸、乙酸乙酯、苯酚、过氧化氢、硫酸亚铁、水杨酸、邻苯

三酚、盐酸、磷酸盐缓冲液、铁氢化钾、三氯乙酸、三氯化铁、甲醇等: 均为分析纯, 上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.3 仪器

紫外分光光度计 UV1240: 日本岛津仪器公司; GLI66-II 高速离心机: 上海安亭科学仪器厂; HH-S11-Ni6-列六孔恒温水浴锅: 北京长安科学仪器厂; ALC-Z10.3 电子天平: 北京赛多利斯天平有限公司; R-201 旋转蒸发器: 上海申胜生物技术有限公司; SHB-III 循环水多用真空泵: 郑州长城科工贸有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 液体发酵培养基 葡萄糖 30 g/L, 蛋白胨 20 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L; pH 自然。

1.4.2 发酵液制备 接种体积分数 10% 液体种子培养基于装液量为 120 mL 发酵培养基 (500 mL 三角瓶) 中, 培养温度 26 °C, 转速 120 r/min, 培养 7 d, 过滤, 收集发酵液, 备用。

1.4.3 多糖质量浓度测定 参考张惟杰方法^[3], 绘制标准曲线, 求出回归方程 ($y=0.0147x+0.0081$, $R^2=0.9968$)。样品溶液适当稀释后, 取 2 mL 进行测定, 将所得的光吸收值代入回归方程, 得到多糖质量浓度^[9]。

1.4.4 总酚质量浓度测定 按照福林-肖卡法^[4-5], 绘制标准曲线, 得回归方程 ($y=0.1359x+0.0141$, $R^2=0.9983$)。样品溶液 0.2 mL 于 10 mL 容量瓶, 再加入 1 mL 福林酚显色剂, 摇匀后静置 5 min, 再加入 2 mL 15% Na_2CO_3 溶液, 定容至 10 mL, 室温下反应 2 h 后测定 A_{760} 。将所得的光吸收值代入回归方程, 得到总酚质量浓度^[10]。

1.4.5 黄酮质量浓度测定 按照芦丁- AlNO_3 法^[6-7], 绘制标准曲线, 得回归方程为 ($y=0.009x-0.0006$, $R^2=0.9994$)。精密量取 1 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至 25 mL 刻度, 摇匀, 放置 15 min, 在 510 nm 的波长处测定吸收度。将所得的光吸收值代入回归方

程,得到总黄酮质量浓度。

1.4.6 还原力测定 取 1 mL 不同浓度的待测液与 2.5 mL 0.2 mol/L pH 6.6 的磷酸盐缓冲液及 2.5 mL 1% 铁氰化钾混合,混合物混匀后 50 ℃ 水浴保温 20 min,然后加入 2.5 mL 10 g/dL 三氯乙酸,4 000 r/min 离心 10 min。取上清液 2.5 mL,分别加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% FeCl₃ 混匀,静置 10 min,以蒸馏水代替 FeCl₃ 溶液作为空白调零,于 700 nm 处测定吸光度^[12-13]。

1.4.7 对超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 清除作用研究 采用邻苯三酚自氧化法。取 4.5 mL 50 mmol/L pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液,4.2 mL 蒸馏水,混匀后在 25 ℃ 水浴中保温 20 min,取出后立即加入 25 ℃ 预热过的 3 mmol/L 邻苯三酚(由 10 mmol/L HCl 配制) 0.3 mL,迅速摇匀后倒入比色杯,空白管用 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚,325 nm 下每隔 30 s 测定吸光度,计算线性范围内每分钟吸光度的增加^[14-15]。多糖清除作用是在加入邻苯三酚之前,加入不同质量浓度的多糖溶液,在相同波长处测定吸光度,计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (\Delta A_0 / \Delta t - \Delta A_i / \Delta t) / (\Delta A_0 / \Delta t)$$

式中,ΔA₀/Δt 表示邻苯三酚自氧化反应速率;ΔA_i/Δt 表示加入多糖样品液后邻苯三酚自氧化反应速率。

1.4.8 对羟自由基 (·OH) 的清除作用研究 9 mmol/L FeSO₄ 1 mL,9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL,不同质量浓度的待测溶液 1 mL,8.8 mmol/L H₂O₂ 1 mL 最后加入混匀并启动整个反应。37 ℃ 反应 0.5 h 后,4 000 r/min 离心 10 min,然后以蒸馏水作为空白,在 510 nm 下测定吸光度。以上混合溶液中以蒸馏水代替 H₂O₂ 作为待测溶液的本底吸收值^[14-16]。

$$\text{清除率} = [A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0$$

式中,A₀ 为空白对照液的吸光值;A_x 为加入待测溶液后的吸光度;A_{x0} 为不加显色剂 H₂O₂ 待测溶液的本底吸收值。

1.4.9 对 DPPH· 自由基清除作用研究 95% 的甲醇溶解 4 mg DPPH 并定容到 100 mL。将 1 mL 不同质量浓度的待测液与 3 mL DPPH 溶液分别加入试管中,摇匀,室温静置 20 min,以 1 mL 不同质量浓度的待测液与 3 mL 95% 甲醇溶液作为空白,于 517 nm 处测定吸光度 A_i。以 1 mL 95% 甲醇与 3 mL DPPH 溶液混合后溶液的吸光度 A_j 为对照^[17-19]。

$$\text{清除率} = 1 - A_i / A_j$$

1.4.10 铁离子螯合能力测定 分别取 1 mL 各种样品溶液,加入 0.1 mL 2 mmol/L 氯化亚铁中,混匀后,加入 0.2 mL 5 mmol/L ferrozine,混匀,然后室温下静置 20 min,最后加入 3.7 mL 55% 乙醇、于 562 nm 处测定吸光度 A₁,不加样品,以蒸馏水补足,同上操作处理,测定其对比吸光度 A₀^[20];以 55% 乙醇作为空白对照,根据下面公式计算块菌提取物的铁离子螯合能力:

$$\text{铁离子螯合能力} = (A_0 - A_1) / A_0$$

2 结果与分析

2.1 不同基因型层孔菌总酚、多糖、黄酮质量浓度比较

由表 1 可知,不同基因型层孔菌具有不同的活性物质质量浓度,ws2 粗多糖质量浓度显著高于其他菌株,ws-x、ws-l、ws-p 质量浓度仅次于 ws2,且菌株间没有达到显著性差异(P>0.05),ws-s 和 ws1 粗多糖质量浓度最低;ws-1 和 ws2 黄酮质量浓度最高,ws-x、ws-p 的黄酮质量浓度次之,ws1 黄酮质量浓度最低;ws2、ws-1、ws-p 总酚质量浓度最高,ws-x 次之,ws-s 和 ws1 总酚质量浓度最低。

表 1 不同基因型层孔菌活性物质比较

Table 1 Comparison of active substances from *Phellinus* of different genotypes

菌株	活性物质质量浓度/(g/L)		
	粗多糖	黄酮	总酚
ws1	0.539±0.157 ^c	0.210±0.087 ^d	0.408±0.082 ^c
ws2	1.414±0.129 ^a	0.944±0.129 ^a	2.324±0.217 ^a
ws-x	1.016±0.114 ^b	0.746±0.077 ^b	1.176±0.382 ^b
ws-s	0.696±0.028 ^c	0.497±0.044 ^c	0.631±0.121 ^c
ws-1	0.998±0.106 ^b	1.186±0.095 ^a	2.025±0.285 ^a
ws-p	0.889±0.085 ^b	0.644±0.033 ^b	2.006±0.237 ^a

注:每一列不同的字母表示相互间存在显著差异(P<0.05)。

2.2 相同基因型不同菌株总酚、多糖、黄酮质量浓度比较

针对 *P. linteus* 活性物质质量浓度进行分析,见表 2。ws7 粗多糖质量浓度显著高于其他菌株,ws1、ws5、ws10、ws11、ws12 质量浓度较低,且相差不大;ws5、ws7、ws10、ws11、ws12 黄酮质量浓度相差不大,ws1 质量浓度最低;ws7、ws10 总酚质量浓度最高,ws5 和 ws11 质量浓度次之,ws1 和 ws12 质量浓度

最低。针对 *P. baumii*, ws2 粗多糖质量浓度显著高于其他菌株; ws2 总黄酮质量浓度最高, ws8、ws9、ws6 次之, ws3 质量浓度最低; ws2 总酚质量浓度最高, ws9、ws8、ws6 依次递减, ws3 质量浓度最低。

表 2 相同基因型不同菌株活性物质质量浓度比较

Table 2 Correlation among active compositions for strains of the same genotypes

菌株		活性物质质量浓度/(g/L)		
		粗多糖	总黄酮	总酚
<i>P. linteus</i>	ws1	0.539±0.157 ^b	0.210±0.087 ^b	0.408±0.082 ^c
	ws5	0.500±0.092 ^b	0.647±0.089 ^a	1.004±0.067 ^b
	ws7	1.037±0.114 ^a	0.565±0.151 ^a	1.576±0.074 ^a
	ws10	0.534±0.095 ^b	0.576±0.043 ^a	1.316±0.152 ^a
	ws11	0.425±0.084 ^b	0.469±0.045 ^a	1.002±0.118 ^b
	ws12	0.403±0.093 ^b	0.533±0.066 ^a	0.528±0.182 ^c
<i>P. baumii</i>	ws2	1.414±0.129 ^a	0.944±0.129 ^a	2.324±0.117 ^a
	ws3	0.686±0.135 ^{cd}	0.363±0.093 ^d	0.545±0.109 ^c
	ws6	0.910±0.024 ^{bc}	0.578±0.068 ^{bc}	1.047±0.101 ^d
	ws8	1.190±0.105 ^b	0.767±0.097 ^b	1.217±0.114 ^c
	ws9	0.624±0.107 ^{cd}	0.597±0.176 ^{bc}	1.719±0.170 ^b

注: 每一列不同的字母表示相互间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

2.3 不同基因型层孔菌抗氧化能力比较

由图 1 可知, ws2 羟自由基清除能力显著高于其余菌株 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ws-1、ws-x、ws-p 次之, ws1 和 ws-s 羟自由基清除能力最弱 ($P < 0.01$); DPPH 清除能力研究发现, ws2、ws-1 和 ws-p ($P > 0.05$) 的清除能力显著高于其余菌株 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ws-x 和 ws-s 清除作用依次递减, ws1 清除作用最低, 显著低于其他菌株 ($P < 0.01$); 对超氧阴离子自由基清除作用表明, ws2 清除作用显著高于其余菌株 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ws-p、ws-1 和 ws1 次之, ws-x 和 ws-s 清除作用最低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 对铁离子螯合能力研究发现, ws2 螯合能力最强 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ws-p、ws-1、ws-x 次之, ws-s 和 ws1 对铁离子螯合能力最弱 ($P < 0.01$); ws2 还原力最强 ($P < 0.01$), ws-1、ws-p、ws-x、ws-s 依次递减, 而 ws1 还原力最弱 ($P < 0.01$)。

2.4 相同基因型层孔菌抗氧化能力比较

针对 *P. linteus* 6 个不同菌株, 分别对其抗氧化能力进行研究, 结果见图 2。ws10 和 ws7 具有较高的羟自由基清除能力 ($P < 0.05$), ws11、ws5、ws1 和

ws12 的羟自由基清除能力较低, 且显著性不明显; ws7、ws10 具有较高的 DPPH 清除能力 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ws5、ws11、ws12 清除能力其次, ws1 具有最低的 DPPH 清除能力 ($P < 0.01$); ws5 的超氧阴离子清除能力显著高于其余菌株 ($P < 0.01$), ws10 和 ws1 清除作用相当, 且仅次于 ws5、ws7、ws11 和 ws12 清除能力较弱, 且依次递减; ws7、ws10、ws11 铁离子螯合能力较高 ($P < 0.01$), ws5、ws12、ws1 铁离子螯合能力较低; ws7、ws10 具有较高的还原力 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ws11、ws12、ws5 还原力依次递减, ws1 的还原力显著低于其余菌株 ($P < 0.01$)。

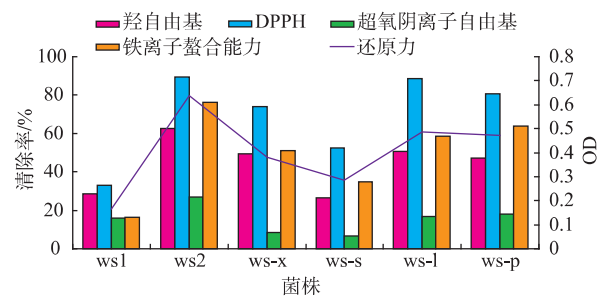


图 1 不同基因型菌株抗氧化能力比较

Fig. 1 Comparison of antioxidant capacity on strains of 6 genotypes

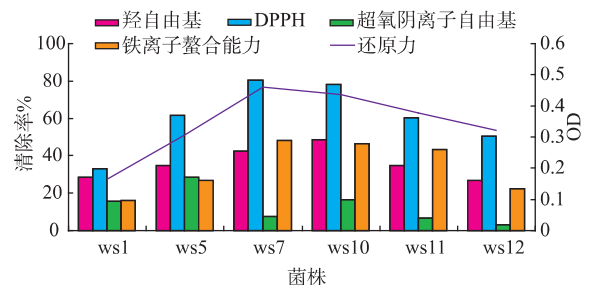


图 2 相同基因型菌株抗氧化能力比较

Fig. 2 Comparison of antioxidant capacity on strains of *P. linteus*

针对 *P. baumii* 5 个不同菌株, 分别对其抗氧化能力进行研究, 结果见图 3。ws9 和 ws2 具有较高的羟自由基清除能力 ($P < 0.01$), ws8、ws6、ws3 羟自由基清除能力依次递减; ws2 和 ws9 DPPH 清除能力较高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ws8 和 ws6 清除能力次之, ws3 清除能力显著低于其余菌株 ($P < 0.01$); ws8、ws9、ws2 超氧阴离子自由基清除作用显著高于 ws6 和 ws3 ($P < 0.01$); ws2 铁离子螯合能力显著高于其余菌株 ($P < 0.01$), ws9 和 ws8 高于 ws6、ws3 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ws3 的铁离子螯合能力最低 ($P < 0.01$); ws2

还原力显著高于 ws9、ws8、ws3、ws6 ($P<0.01$)。

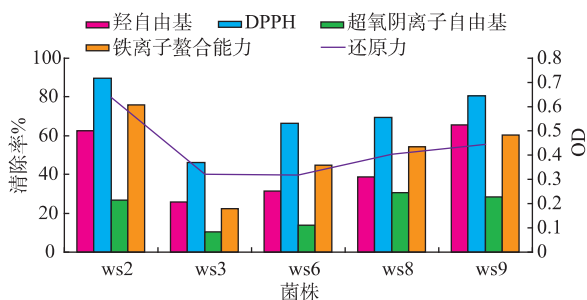


图3 相同基因型菌株抗氧化能力比较

Fig. 3 Comparison of antioxidant capacity on strains of *P. baumii*

2.5 相关性分析

2.5.1 活性物质质量浓度间相关性分析 由表3可知,不同基因型和相同基因型层孔菌粗多糖、总黄酮以及总酚质量浓度间相关系数差异较大,如粗多糖与总黄酮相关系数为0.770(不同基因型) ($P<0.05$),0.139(*P.linteus*)和0.890(*P.baumii*) ($P<0.01$);粗多糖与总酚相关系数为0.836(不同基因型) ($P<0.01$),0.673(*P.linteus*) ($P<0.05$)和0.575(*P.baumii*);总黄酮与总酚相关系数为0.821(不同基因型) ($P<0.01$),0.636(*P.linteus*)和0.851(*P.baumii*) ($P<0.01$)。由此可见,层孔菌活性物质间相关系数具有明显差异,这有可能与样品数量不足有关。因此,在分析不同菌株活性物质质量浓度时,不能凭借一种活性物质质量浓度来评价其他活性物质质量浓度,需要根据实际测量结果来得出结论。

表3 不同基因型及相同基因型菌株活性物质质量浓度间相关性

Table 3 Correlation among active compositions for strains of the same genotypes and different genotypes

相关系数		粗多糖	总黄酮	总酚
不同基因型	粗多糖	1		
	总黄酮	0.770*	1	
	总酚	0.836**	0.821**	1
<i>P.linteus</i>	粗多糖	1		
	总黄酮	0.139	1	
	总酚	0.673*	0.636	1
<i>P.baumii</i>	粗多糖	1		
	总黄酮	0.890**	1	
	总酚	0.575	0.851**	1

注: * $P<0.05$; ** $P<0.01$

2.5.2 抗氧化方法间相关性分析 对抗氧化方法间相关性分析见表4。针对不同基因型菌株,羟自由基与DPPH ($R=0.903$)、铁离子螯合能力 ($R=0.916$)及还原力 ($R=0.926$)方法间达到了极显著相关 ($P<0.01$),而与超氧阴离子自由基方法 ($R=0.674$)达到了显著相关 ($P<0.05$);DPPH与铁离子螯合能力 ($R=0.965$)和还原力 ($R=0.944$)方法间达到了极显著相关 ($P<0.01$);铁离子螯合能力与还原力 ($R=0.983$)达到了极显著相关 ($P<0.01$);超氧阴离子自由基与还原力间的相关系数为0.680 ($P<0.05$),而超氧阴离子自由基与DPPH及铁离子螯合能力间没有显著的相关性。针对*P.linteus*,羟自由基与DPPH ($R=0.872$)、铁离子螯合能力 ($R=0.846$)方法间达到了极显著相关 ($R<0.01$),和还原力 ($R=0.772$)达到显著相关 ($P<0.05$);DPPH与铁离子螯合能力 ($R=0.902$)和还原力 ($R=0.957$)方法间达到了极显著相关 ($P<0.01$);铁离子螯合能力与还原力方法间达到了极显著相关,相关系数为0.929 ($P<0.01$);超氧阴离子自由基与DPPH、铁离子螯合能力及还原力间没有显著的相关性。针对*P.baumii*,羟自由基与DPPH ($R=0.890$)、铁离子螯合能力 ($R=0.861$)及还原力 ($R=0.813$)方法间达到了极显著相关 ($P<0.01$),与超氧阴离子自由基 ($R=0.737$)达到显著相关 ($P<0.05$);DPPH与铁离子螯合能力 ($R=0.990$)和还原力 ($R=0.849$)方法间达到了极显著相关 ($P<0.01$),与超氧阴离子 ($R=0.762$)达到显著相关 ($P<0.05$);铁离子螯合能力与超氧阴离子自由基 ($R=0.802$)、还原力 ($R=0.873$)方法间达到了极显著相关 ($P<0.01$)。以上结果说明,不论针对不同基因型菌株还是相同基因型菌株,不同的体外评价抗氧化能力方法所得结果间,具有不同的统计学相关性,不能用一种评价方法所得的结果概况其他评价方法的结果,而应尽量选择多种抗氧化评价方法,较全面、客观的评价被评价化合物的抗氧化能力。

2.5.3 抗氧化能力与抗氧化物质间相关性分析 由表5可知,不同层孔菌的总酚、总黄酮及粗多糖质量浓度与不同方法测得的抗氧化能力大多呈显著相关,但有明显差异。针对不同基因型层孔菌,总酚与羟自由基、DPPH、铁离子螯合能力、还原力及超氧阴离子自由基方法间的相关系数分别为0.905、0.946、0.955、0.961 ($P<0.01$)0.718 ($P<0.05$);总黄酮与羟自由基、DPPH、铁离子螯合能力及还原

力方法相关系数分别为 0.791 ($P<0.05$)、0.913、0.801、0.824 ($P<0.01$);粗多糖与羟自由基、DPPH、铁离子螯合能力、还原力及超氧阴离子自由基相关系数分别为 0.945、0.858、0.908、0.940 ($P<0.01$)。针对 *P.linteus*,总酚与羟自由基、DPPH、铁离子螯合能力、还原力的相关系数分别为 0.882、0.963、0.915、0.892 ($P<0.01$);黄酮与 DPPH、还原力相关系数分别为 0.772、0.722 ($P<0.05$);多糖与各种测定方法间均没有达到显著相关性。针对 *P.baumii*,总酚与羟自由基、DPPH、铁离子螯合能力、还原力、超氧阴离子自由基的相关系数分别为 0.914、0.974、0.969、0.941

($P<0.01$)、0.706 ($P<0.05$);黄酮与超氧阴离子自由基、DPPH、铁离子螯合能力、还原力相关系数分别为 0.749 ($P<0.05$)、0.855、0.917、0.845 ($P<0.01$);多糖与还原力相关系数为 0.677 ($P<0.05$)。以上结果表明,不管是不同基因型还是同种基因型,总酚与抗氧化能力均有最高的相关性,充分证明多酚类物质是层孔菌抗氧化作用的重要因子,对抗氧化能力具有重要贡献,而黄酮类物质和多糖与其各抗氧化方法间的相关系数差异较大,且多糖与各抗氧化方法间的相关系数最低。因此,层孔菌抗氧化能力贡献主要来自多酚类物质,其次为黄酮类物质。

表 4 抗氧化方法间相关性

Table 4 Lineal correlation coefficients among the different methods

相关系数		羟自由基	DPPH 自由基	超氧阴离子自由基	铁离子螯合能力	还原力
不同基因型	羟自由基	1				
	DPPH	0.903**	1			
	超氧阴离子自由基	0.674*	0.480	1		
	铁离子螯合能力	0.916**	0.965**	0.588	1	
	还原力	0.926**	0.944**	0.680*	0.983**	1
<i>P.linteus</i>	羟自由基	1				
	DPPH	0.872**	1			
	超氧阴离子自由基	0.187	0.0001	1		
	铁离子螯合能力	0.846**	0.902**	-0.217	1	
	还原力	0.772*	0.957**	-0.271	0.929**	1
<i>P.baumii</i>	羟自由基	1				
	DPPH	0.890**	1			
	超氧阴离子自由基	0.737*	0.762*	1		
	铁离子螯合能力	0.861**	0.990**	0.802**	1	
	还原力	0.813**	0.849**	0.632	0.873**	1

注:* $P<0.05$; ** $P<0.01$

表 5 抗氧化能力与抗氧化物质质量浓度的相关性

Table 5 Lineal correlation coefficients between antioxidant composition and antioxidant capacity

相关系数		羟自由基	DPPH 自由基	超氧阴离子自由基	铁离子螯合能力	还原力
不同基因型	总酚	0.905**	0.946**	0.718*	0.955**	0.961**
	黄酮	0.791*	0.913**	0.369	0.801**	0.824**
	多糖	0.945**	0.858**	0.626	0.908**	0.940**
<i>P.linteus</i>	总酚	0.882**	0.963**	0.057	0.915**	0.892**
	黄酮	0.476	0.772*	0.185	0.501	0.722*
	多糖	0.466	0.536	-0.114	0.490	0.467
<i>P.baumii</i>	总酚	0.914**	0.974**	0.706*	0.969**	0.941**
	黄酮	0.620	0.855**	0.749*	0.917**	0.845**
	多糖	0.229	0.543	0.459	0.643	0.677*

注:* $P<0.05$; ** $P<0.01$

3 结 语

作者采用了不同的抗氧化方法综合评价了相同发酵条件下的不同基因型和相同基因型层孔菌属真菌的抗氧化能力,测定了粗多糖、总酚、黄酮等活性物质质量浓度,并分析了不同抗氧化能力测定方法间、抗氧化能力与活性物质质量浓度间的相关性。主要结果如下:

1) 不同基因型层孔菌属真菌主要活性物质检测结果表明,ws2 的粗多糖质量浓度显著高于其他菌株,ws-1 和 ws2 黄酮质量浓度最高,ws2、ws-1、ws-p 总酚质量浓度最高,差异不显著,由此可见,ws2 具有较高的活性物质质量浓度。针对 *P. linteus*,ws7 粗多糖质量浓度显著高于其他菌株,ws5、ws7、ws10、ws11、ws12 黄酮质量浓度相差不大,没有达到显著性差异,ws7、ws10 总酚质量浓度最高,由此可见,ws7 具有较高的活性物质质量浓度;针对 *P. baumii*,ws2 在粗多糖质量浓度、总黄酮质量浓度、总酚质量浓度显著高于其他菌株。对以上结果进行相关性分析,表明不同基因型以及相同基因型层孔菌属真菌粗多糖、总黄酮以及总酚质量浓度间相关系数差异较大,因此,无论是针对不同基因型还是相同基因型层孔菌属真菌,都不能凭借一种活性物质质量浓度来评价其他活性物质质量浓度,需要根据实际测量结果来得出结论。

2) 对不同基因型层孔菌的抗氧化能力分析结果表明,ws2 羟自由基清除能力显著高于其余菌株 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),ws2、ws-1 和 ws-p ($P>0.05$) 的 DPPH 清除能力较高 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),ws2 超氧阴离子自由基清除作用较高 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),ws2 螯合能力最强 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),ws2 还原力

最强 ($P<0.01$)。针对 *P. linteus* 抗氧化能力分析表明,ws10 和 ws7 具有较高的羟自由基清除能力 ($P<0.05$),ws7、ws10 具有较高的 DPPH 清除能力 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),ws5 的超氧阴离子清除能力显著高于其余菌株 ($P<0.01$),ws7、ws10、ws11 铁离子螯合能力较高 ($P<0.01$),ws7、ws10 具有较高的还原力 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。针对 *P. baumii* 抗氧化能力分析表明,ws9 和 ws2 具有较高的羟自由基清除能力 ($P<0.01$),ws2 和 ws9 DPPH 清除能力较高 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),ws8、ws9、ws2 超氧阴离子自由基清除作用显著高于 ws6 和 ws3 ($P<0.01$),ws2 铁离子螯合能力显著高于其余菌株 ($P<0.01$),ws2 还原力较高 ($P<0.01$)。以上结果说明,ws2 和 ws7 具有较高的抗氧化活性。

3) 不同基因型和相同基因型的层孔菌抗氧化方法间相关性存在差异,不同的体外评价抗氧化能力方法所得结果间具有不同的统计学相关性,不能用一种评价方法所得的结果概况其他评价方法的结果,而应尽量选择多种抗氧化评价方法,较全面、客观的评价被评价化合物的抗氧化能力。

4) 不同层孔菌属真菌的总酚、总黄酮及粗多糖质量浓度与不同方法测得的抗氧化能力大多呈显著相关,但差异较大。总酚与抗氧化能力均有最高的相关性,充分证明多酚类物质是抗氧化作用的重要因子,对抗氧化能力具有重要贡献,而黄酮类物质、粗多糖与其相关系数差异较大,且多糖与抗氧化方法间的相关系数最低。由此说明,层孔菌属真菌抗氧化能力贡献主要来自总酚类,其次是黄酮类化合物,而粗多糖对层孔菌属真菌抗氧化能力的影响最低。

参考文献:

- [1] 张小青,戴玉成. 中国真菌志:第二十九卷:锈革孔菌科[M]. 北京:科学出版社,2005:117-119.
- [2] Xia L, Jiao L L, Zhang X, et al. Anti-tumor and immunomodulating activities of proteoglycans from mycelium of *Phellinus nigricans* and culture medium[J]. *International Immunopharmacology*, 2008, 8(6): 909-915.
- [3] Zhu T, Kim S H, Chen C Y. A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*[J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(13): 1330-1335.
- [4] Kim H M, Kang J S, Kim J Y, et al. Evaluation of antidiabetic activity of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* in non-obese diabetic mouse[J]. *International Immunopharmacology*, 2010, 10(1): 72-78.
- [5] Luo J G, Liu J, Ke C L, et al. Optimization of medium composition for the production of exopolysaccharides from *Phellinus baumii* in submerged culture and the immunostimulating activity of exopolysaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78(3): 409-415.
- [6] Liang C H, Syu J L, Jeng L. Antioxidant properties of solid-state fermented adlay and rice by *Phellinus linteus* [J]. *Food*

Chemistry, 2009, 116(4):841–845.

- [7] Jung J Y, Lee I K, Seok S J, et al. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2008, 104(6):1824–1832.
- [8] 盛伟, 方晓阳, 吴萍. 白灵菇、杏鲍菇、阿魏菇多糖体外抗氧化活性研究[J]. **食品工业科技**, 2008, 29(5):103–109.
SHENG Wei, FANG Xiaoyang, WU Ping. Study on antioxidant activity of polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ferulae*[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, 29(5):103–109. (in Chinese)
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999:309–320.
- [10] 何照范, 张迪清. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998:107–122.
- [11] 张静, 余加进, 戴建辉, 等. 中药提取物中总黄酮的分析研究[J]. **云南民族大学学报**, 2010, 19(6):414–416.
ZHANG Jing, YU Jiajing, DAI Jianhui, et al. The determination of total flavonoids from Chinese herbal extracts [J]. **Journal of Yunan University of Nationalities**, 2010, 19(6):414–416. (in Chinese)
- [12] Kumaran A, Karunakaran R J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*[J]. **Food Chem**, 2006, 97(1):109–114
- [13] 吕丽爽. 何首乌中二苯乙烯苷的体外抗氧化研究[J]. **食品科学**, 2007, 28(1):313–317.
LU Lishuang. Study on stilbene from roots of polygonum multiglorum thumb antioxidant activities in vitro [J]. **Food Science**, 2007, 28(1):313–317. (in Chinese)
- [14] 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、提高免疫活性研究[J]. **食品科学**, 2004, 25(2):167–170.
CHEN Liuyong, MENG Xianjun, JIA Wei, et al. The study on the antitumor activity and scavenging free radical and immune effect of the water-soluble polysaccharides from *A Persica. Var. seleropersica* [J]. **Food Science**, 2004, 25 (2):167–170. (in Chinese)
- [15] 申明月, 聂少平, 谢明勇, 等. 茶叶多糖的糖醛酸含量测定及抗氧化活性研究[J]. **天然产物研究与开发**, 2007, 19(5):830–833.
SHEN Mingyue, NIE Shaoping, XIE Mingyong, et al. Studies on the content of uronic acid in tea polysaccharide and its antioxidative activity[J]. **Nat Prod Res Dev**, 2007, 19(5):830–833. (in Chinese)
- [16] Smironff N, Cumbers Q J. Hytoxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. **Phytochemistry**, 1989, 28(4):1051–1560.
- [17] Kumaran A, Karunakaran R J. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*[J]. **Food Chem**, 2007, 100(1):356–361.
- [18] 师梅梅, 杨建雄, 张改平, 等. 3'-大豆苷元磺酸钠的体外抗氧化研究[J]. **天然产物研究与开发**, 2008, 20(4):698–700;680.
SHI Meimei, YANG Jianxiong, ZHANG Gaiping, et al. In vitro antioxidant properties of 3'-daidzein sulfonate sodium [J]. **Nat Prod Res Dev**, 2008, 20(4):698–700;680. (in Chinese)
- [19] 李春阳, 许时婴, 王璋. DPPH 法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力[J]. **食品与生物技术学报**, 2006, 25(2):102–106.
LI Chunyang, XU Shiyong, WANG Zhang. Measuring the antiradical efficiency of proanthocyanidin from grape seed by the DPPH assay[J]. **Journal of Science and Biotechnology**, 2006, 25(2):102–106. (in Chinese)
- [20] Dinis T C P, Madeira V M C, Almeida L M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid-peroxidation and as peroxyl radical scavengers [J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1994, 315(1):161–169.