

层孔菌属真菌抗氧化活性物质测定及抗氧化能力分析

谢丽源*, 彭卫红, 黄忠乾, 谭伟, 甘炳成

四川省农业科学院土壤肥料研究所, 成都 610066

摘要: 本文以层孔菌属真菌液体发酵产物作为研究材料, 测定抗氧化活性物质含量, 并利用多种抗氧化测定方法, 分析不同菌株的体外抗氧化能力, 评价活性物质含量间、抗氧化方法间及抗氧化方法与含量间的相关性。研究表明, 供试菌株活性物质含量间的差异较大, 其中菌株 H2 粗多糖和总酚含量较高, 菌株 S 黄酮含量较高, 且活性物质含量间相关性不大; 针对供试菌株抗氧化能力测定结果表明, 菌株 H2 具有较高的还原力、铁离子螯合能力, 菌株 H2 和 H9 的羟自由基清除作用最强, 菌株 H2 和 L 的 DPPH 自由基清除作用最强, 菌株 H2、H5、H8、H9 具有较高的超氧自由基清除作用, 且不同方法间存在较大差异, 羟自由基与 DPPH 自由基、铁离子螯合能力及还原力, DPPH 自由基与铁离子螯合能力和还原力, 以及铁离子螯合能力与还原力这几种方法的相关性较高 ($P < 0.01$); 总酚含量与羟自由基、DPPH 自由基、铁离子螯合能力及还原力方法具有较高相关性 ($P < 0.01$); 总黄酮含量与 DPPH 自由基、铁离子螯合能力及还原力方法间相关系数分别为 0.810 ($P < 0.01$)、0.725、0.738 ($P < 0.05$); 粗多糖含量与各测定方法间的相关系数较低, 以上结果说明多酚类物质和黄酮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。

关键词: 层孔菌属; 活性物质; 抗氧化; 相关性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Analysis of the Active Antioxidant Substances and Antioxidant Capacity of *Phellinus*

XIE Li-yuan*, PENG Wei-hong, HUANG Zhong-qian, TAN Wei, GAN Bing-cheng

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

Abstract: The objectives of this study were to analyze the active antioxidant substances, to determine the antioxidant activity of liquid fermentation products from *Phellinus* and to further investigate the correlative relationships between contents of active antioxidant components, between results from different antioxidant assays and between contents of different active antioxidant components and results from different antioxidant assays. The results showed that the contents of active antioxidant substances of different strains were obviously different, where the contents of polysaccharide and total phenol of strain H2 were the highest, and the contents of flavonoids of strain S was the highest. The correlative relationship between active substances was low. The antioxidant capacity assay showed that strain H2 had a high reducing power and Fe ion chelating ability, strain H2 and H9 had the strongest effect on hydroxyl radical scavenging, strain H2 and L had the strongest DPPH scavenging effect, and strain H2, H5, H8, H9 had the highest superoxide radical scavenging effect. In addition, there were significant differences between results from different antioxidant assay methods, in which hydroxyl radicals and DPPH free radical scavenging assays, hydroxyl radicals and Fe chelating ability assays, hydroxyl radicals and reducing power assays, DPPH and Fe chelating ability assays, DPPH and reducing power assays as well as Fe chelating ability and reducing power assays had the highest correlative relationships. There was the highest correlation between the contents of total phenolics and results from different antioxidant assays and the correlative relationships between the contents of flavonoids and results from different antioxidant assay was the second, but the correlative relationships between the contents of polysaccharide and the results from antioxidant assays were low. The above results suggested that polyphenols and flavonoids were important antioxidant factors, and had an important contribution to the antioxidant capacity.

Key words: *Phellinus*; active substance; antioxidant capacity; correlation

收稿日期: 2013-07-29

接受日期: 2013-11-18

基金项目: 四川省应用基础项目(2012JY0064); 优秀论文基金

项目(2012LWJJ-002)

* 通讯作者 E-mail: xieliyuan77@163.com

鲍氏层孔菌 (*Phellinus baumii*)、裂蹄针层孔菌

(*Phellinus linteus*)、松木层孔菌(*Phellinus pim*)是属于锈革孔菌科(Hymenochaetae)、针层孔菌属(*Phellinus*)的药用真菌,均属于是中药桑黄的来源菌,是珍稀的药用真菌^[1]。研究表明,这三种层孔菌具有抗肿瘤、增强免疫、抗氧化、降血糖等功效,是目前国际公认的生物抗癌领域中药效非常好的药用真菌^[2,3]。研究发现,大型真菌具有较高的抗氧化活性,是开发天然、安全、高效的天然抗氧化剂的理想材料。

目前体外抗氧化能力的测定方法比较多,这些方法与操作难易程度、生物相关性、反应机理、反应发生环境等相关。但是不论是哪种方法都各有利弊,目前为止,没有一种方法可以代替全部的方法而作为标准方法用于所有复杂抗氧化剂的评价,更没有一种方法可以模拟生物体内的复杂环境。大多数的学者,在研究抗氧化能力时,使用一种或同时使用不同机理的两种或三种方法来共同评价物质的抗氧化能力。然而,不同方法得出的结论并不一定都是一致的,有的甚至会得出相反的结论。由于方法的不统一使得目前有关抗氧化作用的研究十分混乱。因此,必须同时使用多种方法进行测定,评价不同方法间的相关性,建立多种方法的数据库,为抗氧化活性研究提供参考标准,并为栽培、育种以及产品开发提供理论依据。

本研究以层孔菌属真菌中鲍氏层孔菌、裂蹄针层孔菌、松木层孔菌作为研究材料,利用多种抗氧化测定方法,对三种真菌不同菌株的抗氧化成分进行系统评价和比较,揭示三种层孔菌在抗氧化方面的药用价值,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

鲍氏层孔菌:H2、H3、H6、H8、H9;裂蹄针层孔菌:H1、H5、H7、H10、H11、H12;松木层孔菌:H4、X、L、S、P。以上菌株均由四川省微生物研究开发中心提供,并经过分子鉴定。

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,成都长征生物试剂公司提供。

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 10% 液体种子培养基(PDA)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 rpm,培养 7 d,过滤,收集发酵液,备用。

1.4.2 多糖含量测定

参考张惟杰方法^[4],以葡萄糖作为标准品,绘制标准曲线,求出回归方程($Y=0.0147X + 0.0081, R^2=0.9968$)。发酵液适当稀释后,取 2 mL 加入 5% 苯酚 1 mL, 5 mL 浓硫酸,反应 20 min 后,在 490 nm 波长测定吸光度,将所得的光吸收值代入回归方程,得到多糖含量。

1.4.3 总酚含量测定

以没食子酸作为标准品,按照福林-肖卡法^[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,在 760 nm 波长测定吸光度。将所得的光吸收值代入回归方程,得到总酚含量。

1.4.4 黄酮含量测定

以芦丁作为标准品,按照芦丁- AlNO_3 法^[6]绘制标准曲线,得回归方程为($Y=0.009X-0.0006, R^2=0.9994$)。精密量取样品液 1 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,使混匀,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,得到黄酮含量。

1.4.5 还原力测定^[7]

取 1 mL 不同浓度的待测液与 2.5 mL 0.2 mol/

L pH6.6 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 °C 水浴保温 20 min, 然后加入 2.5 mL 10% (W/V) 三氯乙酸, 4000 rpm 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。

1.4.6 对超氧阴离子自由基(O₂⁻)清除作用研究^[8]

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 °C 水浴中保温 20 min, 取出后立即加入 25 °C 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 测定吸光值, 计算线性范围内每分钟吸光度的增加。多糖清除作用是在加入邻苯三酚之前, 加入不同浓度的多糖溶液, 在相同波长处测定吸光度, 计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\Delta A_0/\Delta t - \Delta A_i/\Delta t}{\Delta A_0/\Delta t} \times 100$$

式中: $\Delta A_0/\Delta t$ 表示邻苯三酚自氧化反应速率, $\Delta A_i/\Delta t$ 表示加入多糖样品液后邻苯三酚自氧化反应速率。

1.4.7 对羟自由基(·OH)的清除作用研究^[9]

9 mmol/L FeSO₄ 1 mL, 9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL, 不同浓度的待测溶液 1 mL, 8.8 mmol/L H₂O₂ 1 mL 最后加入混匀并启动整个反应。37 °C 反应 0.5 h 后, 4000 rpm 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。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100$$

式中: 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_{x0} 为不加显色剂 H₂O₂ 待测溶液的本底吸收值。

1.4.8 对 DPPH 自由基清除作用研究^[10]

95% 的甲醇溶解 4 mg DPPH 并定容到 100 mL。将 1 mL 不同浓度的待测液与 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。

$$\text{清除率}(\%) = \left(\frac{A_j - A_i}{A_j} \right) \times 100$$

1.4.9 铁离子螯合能力测定^[11]

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 A_1 , 不加样品, 以蒸馏水补足, 同上操作处理, 测定其对比吸光度 A_0 ; 以 55% 乙醇作为空白对照, 根据下面公式计算铁离子螯合能力:

$$\text{铁离子螯合能力}(\%) = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100$$

2 结果与分析

2.1 活性物质含量分析

2.1.1 粗多糖含量分析

对不同层孔菌属真菌粗多糖含量进行分析, 结果表明(图 1), H2 菌株粗多糖含量显著高于其他菌株($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而 H8、H6、H7、X、L、P 菌株的粗多糖含量次之($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); H1、H4、H5、H3、H9、H10、H11、H12、S 菌株粗多糖含量较低($P < 0.01$), 且各菌株间没达到显著差异。

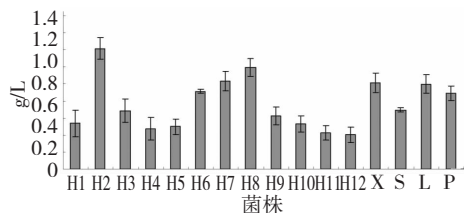


图 1 不同菌株粗多糖含量比较

Fig. 1 Comparison of polysaccharide content of different strains

2.1.2 黄酮含量分析

对不同菌株黄酮含量进行分析, 其结果如图 2 所示, 菌株 S 的黄酮含量显著高于其余菌株($P < 0.01$); 菌株 H2、H4、H8、P 黄酮含量次之; 菌株 H5、H6、H7、H9、H10、H11、H12、L、X 黄酮含量较低; 而菌株 H1、H3 的黄酮含量显著低于其他菌株($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

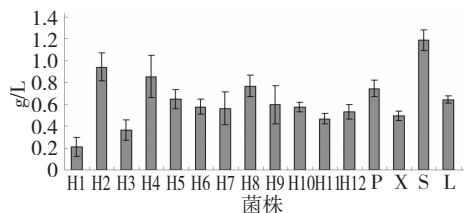


图 2 不同菌株黄酮含量比较

Fig. 2 Comparison of flavonoids content of different strains

2.1.3 总酚含量分析

对不同菌株总酚含量进行比较,研究结果表明(图3),菌株 H2 的总酚含量显著高于其他菌株($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),菌株 H4、H7、H9、S、L 总酚含量次之,菌株 H5、H6、H8、H10、H11、P 的总酚含量相当,而菌株 H1、H3、H12、X 的总酚含量较低,显著低于其他菌株($P < 0.01$),且之间未达到显著差异。

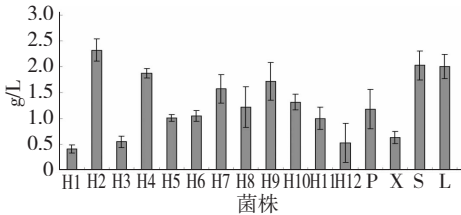


图3 不同菌株总酚含量比较

Fig. 3 Comparison of phenolic content of different strains

2.2 抗氧化能力测定

2.2.1 还原力研究

抗氧化剂是通过自身的还原作用给出电子而清除自由基,抗氧化剂的还原力与其抗氧化活性之间存在关系,还原力越强,抗氧化活性越强。具有还原能力的物质作为电子供体,能够还原脂质过氧化过程中的中间氧化产物,从而具备抗氧化性能,因此物质的还原能力可以看作其潜在的抗氧化性能的重要体现。由图4可知,不同菌株具有不同程度的还原能力,但其还原力高低有显著差异。菌株 H2 还原能力最强($P < 0.01$);菌株 H4、H7、H9、H10、L、P 的还原能力相当,未达到显著差异($P > 0.05$),还原能力仅次于 H2;菌株 H8、H11、X 还原能力再次之;菌株 H3、H5、H6、H12、S 还原能力较低,仅高于 H1 ($P < 0.01$);而菌株 H1 还原能力显著低于其余菌株($P < 0.01$)。

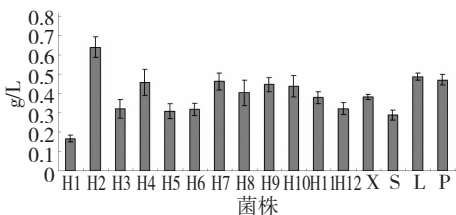


图4 不同菌株间还原力比较

Fig. 4 Comparison of reducing power of different strains

2.2.2 羟自由基清除作用研究

羟自由基是对机体危害最大的自由基,会造成组织脂质过氧化,蛋白质解聚与聚合,核酸断裂、多

糖解聚,其反应速度快,是已知化学性质最活泼的活性氧自由基,羟自由基清除率是反应药物抗氧化作用的重要指标^[12]。从图5可知,各菌株对羟自由基具有一定程度的抑制作用,其中菌株 H2 和 H9 对羟自由基清除作用最强($P < 0.01$),两者之间没有显著差异;菌株 H10、H11、X、L、P 对羟自由基的清除作用次之;而菌株 H1、H3、H6、H12、S 的清除作用低于其余菌株($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

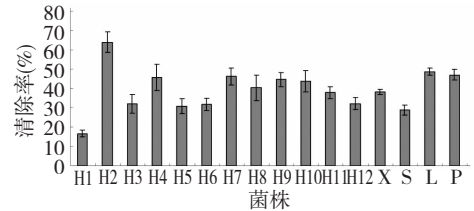


图5 不同菌株间羟自由基清除能力比较

Fig. 5 Comparison of hydroxyl radical scavenging capacity of different strains

2.2.3 超氧自由基清除作用研究

由图6可知,供试菌株对超氧自由基均有不同程度的清除作用,菌株 H2、H5、H8、H9 对超氧自由基清除作用最强($P < 0.01$),且菌株间显著性不明显;接下来清除作用从高到低依次是菌株 H4、P、L、H10、H1、H6、H3;菌株 X、H7、S、H11 清除作用显著低于以上菌株($P < 0.01$),且菌株间没有达到显著差异;而菌株 H12 的清除作用最低($P < 0.01$)。

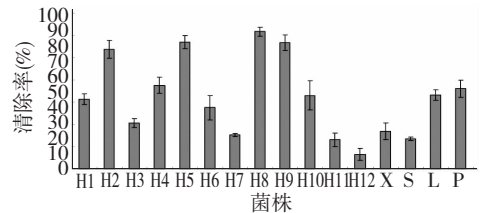


图6 不同菌株超氧自由基清除率比较

Fig. 6 Comparison of superoxide radical scavenging capacity of different strains

2.2.4 铁离子螯合能力研究

对层孔菌属真菌铁离子螯合能力研究发现,不同菌株具有不同的铁离子螯合能力(图7),菌株 H2 具有最高的铁离子螯合能力($P < 0.01$),随后铁离子螯合能力按照菌株 L、H9、S、H8、H4、P、H7、H10、H6、H11、X、H5 依次递减,而菌株 H1、H3、H12 的螯合能力较低,在 5% 和 1% 水平均未达到显著水平。

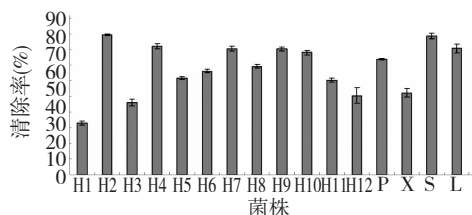


图7 不同菌株铁离子螯合能力比较

Fig. 7 Comparison of Fe chelating ability of different strains

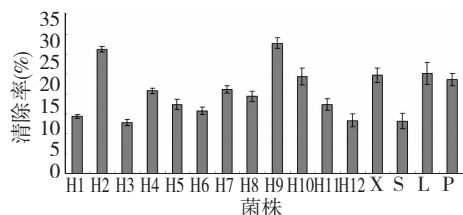


图8 不同菌株 DPPH 自由基清除能力比较

Fig. 8 Comparison of DPPH radical scavenging capacity of different strains

2.2.5 DPPH 自由基清除作用研究

对层孔菌属真菌 DPPH 自由基清除能力进行研究,研究结果表明(图 8),H2、L 菌株的 DPPH 自由基清除能力高于其余菌株($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);菌株 H4、P、H7、H9、H10 次之,但清除能力相差不大;随后依次为菌株 X、H8、H6、H5、H11;菌株 S、H12、H3 清除作用较低,仅高于 H1;而 H1 清除能力显著低于其余菌株($P < 0.01$)。

2.3 相关性分析

2.3.1 不同测定方法间的相关性

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。从表 1 中可以看出,羟自由基与 DPPH 自由基($R = 0.831$)、铁离子螯合能力($R = 0.845$)及还原力($R = 0.801$)方法间达到了

极显著相关($P < 0.01$);DPPH 自由基与铁离子螯合能力($R = 0.913$)和还原力($R = 0.910$)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 0.898($P < 0.01$)。而超氧阴离子自由基与 DPPH、羟自由基、铁离子螯合能力及还原力方法间没有显著的相关性,相关系数分别为 0.389、0.531、0.436、0.354($P > 0.05$)。由此说明,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。现有的数据统计结果表明,不能用一种评价方法所得的结果来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。

表 1 不同抗氧化方法间的相关性

Table 1 Linear correlation coefficients among different methods for testing antioxidant capacity

相关系数 Correlation coefficient	羟自由基 Hydroxyl radical	DPPH 自由基 DPPH radical	超氧阴离子自由基 Superoxide anion radical	铁离子螯合能力 Ferric iron chelating ability	还原力 Reducing power
羟自由基 Hydroxyl radical	1				
DPPH 自由基 DPPH radical	0.831 **	1			
超氧阴离子自由基 Superoxide anion radical	0.531	0.389	1		
铁离子螯合能力 Ferric iron chelating ability	0.845 **	0.913 **	0.436	1	
还原力 Reducing power	0.801 **	0.910 **	0.354	0.898 **	1

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

2.3.2 样品活性组分含量相关性研究

对活性物质含量间相关性进行分析,由表 2 可知,粗多糖含量与总黄酮和总酚含量相关系数分别为 0.533 和 0.531($P > 0.05$);而总黄酮含量与总酚含量达到了显著相关,相关系数为 0.777 ($P <$

0.05)。说明层孔菌属真菌这三种主要活性物质含量间相关性不大,可以借鉴和参考,但是不同活性物质含量还应通过实际测量值为准,不能由一种活性物质含量来评价其他活性物质含量。

表 2 活性物质含量间相关性

Table 2 Correlation among active composition

相关系数 Correlation coefficient	粗多糖 Crude polysaccharide	黄酮 Flavonoids	总酚 Total phenols
粗多糖 Crude polysaccharide	1		

黄酮 Flavonoids	0.533	1	
总酚 Total phenols	0.531	0.777 *	1

注: * $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ 。

2.3.3 抗氧化能力与抗氧化物质含量的相关性

为了弄清层孔菌属真菌的抗氧化能力与酚类物质含量、黄酮类物质含量及粗多糖含量的关系,根据前面对不同菌株的总酚、总黄酮、粗多糖的含量测定结果及不同方法测得的抗氧化能力结果作了相关性分析(表3)。由此可知,层孔菌属真菌的总酚、总黄酮及粗多糖含量与不同方法测得的抗氧化能力大多呈显著相关。总酚含量与对羟自由基、DPPH 自由基、铁离子螯合能力及还原力方法测得的抗氧化能力间的相关系数分别达到了 0.840、0.943、0.924、0.917($P < 0.01$);总黄酮含量与 DPPH 自由基、铁

离子螯合能力及还原力方法测得的抗氧化能力间的相关系数分别达到了 0.810($P < 0.01$)、0.725、0.738($P < 0.05$);粗多糖含量与铁离子螯合能抗氧化能力间的相关系数为 0.653($P < 0.05$),由此说明总酚与抗氧化能力有最高的相关性,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,除此之外,黄酮类物质与各抗氧化测定方法间的相关系数次之,说明也对抗氧化作用作出一定贡献,而粗多糖与其相关系数较低,因此说明,层孔菌属的抗氧化能力贡献主要来自总酚类和黄酮类物质。

表3 抗氧化能力与抗氧化物质含量的相关性

Table 3 Linear correlation coefficients between antioxidant composition and antioxidant capacity

相关系数 Correlation coefficient	羟自由基 Hydroxyl radical	DPPH 自由基 DPPH radical	超氧阴离子自由基 Superoxide anion radical	铁离子螯合能力 Ferric chelating ability	还原力 Reducing power
总酚 Total phenols	0.840 * *	0.943 * *	0.480	0.924 * *	0.917 * *
黄酮 Flavonoids	0.595	0.810 * *	0.383	0.725 *	0.738 *
粗多糖 Crude polysaccharide	0.457	0.518	0.309	0.653 *	0.576

注: * $P < 0.05$; * * $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$; * * $P < 0.01$ 。

3 结论与讨论

物质抗氧化活性的评价方法包括很多种,目前还没有统一的标准方法。抗氧化能力测定方法之所以仍没有一个标准方法,主要原因在于:(1)生物体中存在多个抗氧化系统,他们的工作原理及相互间的关系尚未搞清楚,所以单一的测定方法很难对抗氧化物质进行综合评价;(2)生物体中存在多种自由基和抗氧化剂,他们各自都有不同的化学和物理特征。某一抗氧化剂在单一系统中可能会同时具有多重机制,或者在不同系统中表现出不同的机制。此外对于不同的自由基,抗氧化剂的清除机制也不相同;(3)现在采用的抗氧化方法大多为体外抗氧化测定,无法真实模拟生理环境,且各方法都仅仅测定了抗氧化能力中的某一方面,故无法模拟生理条件下的多条抗氧化途径;(4)测定的样品大多为混合物,其成分十分复杂,各抗氧化物质的抗氧化作用无法用单一的机制来解释。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^[13]。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。针对对不同层孔菌属真菌不同抗氧化能力测定,研究表明,菌株 H2 还原力、铁离子螯合能力最强,菌株 H2 和 H9 的对羟自由基清除作用最强,菌株 H2 和 L DPPH 自由基清除作用最强,菌株 H2、H5、H8、H9 对超氧自由基清除作用最强,综合分析发现,菌株 H2 具有较高的抗氧化能力,但其他菌株间在不同方法间存在较大差异。不同层孔菌属真菌的抗氧化能力比较,不同方法间存在差异,各种方法测定的结果数值不一,表述方式不同,羟自由基与 DPPH 自由基($R = 0.831$)、铁离子螯合能力($R = 0.845$)及还原力($R = 0.801$),DPPH 自由基与铁离子螯合能力($R = 0.913$)和还原力($R = 0.910$),以及铁离子螯合能力与还原力($R = 0.898$)这几种方法的相关性较高,测定结果较为一致。由此可见,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

来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。

对供试菌株的主要活性物质多糖、总酚、总黄酮含量测定结果表明,层孔菌属真菌含量较为丰富的多糖、总酚和黄酮类物质,其中菌株 H2 粗多糖和总酚含量最高,菌株 S 黄酮含量最高。对活性物质含量间相关性进行分析发现,总黄酮和总酚含量间有显著相关性,相关系数为 0.777 ($P < 0.05$),粗多糖含量与总黄酮及总酚含量间相关性稍低,相关系数分别为 0.533 和 0.531 ($P > 0.05$);说明层孔菌属真菌这三种主要活性物质含量间相关性不大,可以借鉴和参考,因此不同活性物质含量还应通过实际测量值为准。

食用菌一直以其特有的食药兼用性受到人们的青睐。近年来,食用菌的抗氧化作用开始日益受到关注,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,而对食用菌中不同活性成分的抗氧化性能研究较少,尤其是对食用菌中发挥抗氧化性能起主要贡献的功能成分缺乏定论^[8]。本研究针对抗氧化能力与抗氧化物质含量的相关性进行分析,层孔菌属真菌的总酚、总黄酮及粗多糖含量与不同方法测得的抗氧化能力大多呈显著相关。总酚含量与羟自由基、DPPH 自由基、铁离子螯合能力及还原力方法测得的抗氧化能力间的相关系数分别达到了 0.840、0.943、0.924、0.917 ($P < 0.01$);总黄酮含量与 DPPH 自由基、铁离子螯合能力及还原力方法测得的抗氧化能力间的相关系数分别达到了 0.810 ($P < 0.01$)、0.725、0.738 ($P < 0.05$);粗多糖含量与铁离子螯合能力间的相关系数为 0.653 ($P < 0.05$),说明总酚与抗氧化能力有最高的相关性,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,总黄酮类物质与抗氧化能力相关性次之,说明对抗氧化能力贡献弱于总酚类物质,而相比之下,粗多糖含量与抗氧化能力间相关系数较低,说明粗多糖对抗氧化能力的影响较低。

参考文献

1 Zhang XQ(张小青), Dai YC(戴玉成). *Flora Fungorum*

- Sinicorum (Vol 29, Hymenochaetaceae) (中国真菌志). Beijing: Science Press, 2005. 117-191.
- 2 Cho EJ, Hwang HJ, Kim SW, *et al.* Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in ob/ob mice. *App Microbiol Biotechnol*, 2007, 75: 1257-1265.
- 3 Song AR(宋爱荣), Wang GY(王光远), He ZC(何忠诚), *et al.* Immunological regulation of *Phellinus igniarius* crude polysaccharides to tumor bearing mice. *Mycosystema* (菌物学报), 2009, 28: 295-298.
- 4 Zhang WJ(张惟杰). *Glycoconjugate Biochemical Research Techniques* (糖复合物生化研究技术). Zhejiang: Zhejiang University Press, 1999. 309-320.
- 5 Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem*, 2001, 73: 285-290.
- 6 Zhang J(张静), Yu JJ(余加进), Dai JH(戴建辉), *et al.* The determination of total flavonoids from Chinese herbal extracts. *J Yunan Univ National* (云南民族大学学报), 2010, 19: 414-416.
- 7 Kumaran A, Karunakaran RJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem*, 2006, 97: 109-114.
- 8 Xie LY(谢丽源), Zhang Y(张勇), Peng WH(彭卫红), *et al.* Immune function and antioxidant activity of intracellular polysaccharides from *Phellinus baumii*. *Food Sci* (食品科学), 2011, 32: 276-281.
- 9 Smironoff N, Cumbers QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 1989, 28: 1057-1560.
- 10 Kumaran A, Karunakaran RJ. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem*, 2007, 100: 356-361.
- 11 Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane liquid-peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 315: 161-169.
- 12 Du GR(杜国荣). Study on the total antioxidant capacity and bioactive compounds of kiwi, persimmon and apple fruits. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University (西北农林科技大学), PhD. 2009.