

香菇多酚含量的测定及抗氧化活性研究

马洪娟

(广东美味鲜调味食品有限公司, 广东 中山 528437)

摘要:为开发天然抗氧化剂和拓展香菇深加工途径,以香菇为原料,用乙醇通过水浴法提取其多酚类物质,并对其多酚含量进行测定。经测定香菇中多酚含量结果约为 $49.13(\pm 3.52)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;通过体外清除自由基方法(DPPH法、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力和 $\cdot\text{OH}$ 清除能力),对香菇多酚类物质的抗氧化能力进行初步研究。结果表明:香菇酚类提取液对3种自由基都有明显的清除能力,其中对DPPH·清除能力较强,对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 清除能力较弱。

关键词:香菇;多酚;提取;抗氧化

中图分类号:S646.1⁺2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)07-0116-04

植物多酚(plant polyphenol)是一类广泛存在于植物体内的多酚类物质,在植物中的含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素,主要存在于植物的皮、根、木、叶和果中^[1]。食用菌是可供食用的大型真菌,蛋白质含量丰富,氨基酸种类齐全,并且富含多种维生素和矿物质等,具有较高的食用价值和药用保健价值^[2]。而素有“山珍之王”的香菇,更是高蛋白、低脂肪的营养保健食品。

香菇[*Lentinula edodes* (Berk) Pegler],又称香蕈、香覃、平菇、锥茸等,属于担子菌纲、伞菌目、蘑菇科、香菇属。它具有独特的香味,优良的质地,高营养价值和药用价值。在美国被誉为“上帝食品”,中国目前已是世界上香菇生产的第一大国。香菇在我国培育面积广,是近年来我国发展

最快的食用兼药用菌类农产品。目前对香菇活性物质的研究主要集中在香菇多糖,并已应用于医药中,而对于具有抗氧化、抑菌等生理活性多酚的研究少有报道^[3]。然而食用菌子实体的酚类成分含量与其抗氧化能力明显相关^[4]。该试验以香菇为材料,采用水浴法及微波辅助提取香菇中的多酚并比较两工艺多酚含量,同时对香菇多酚进行抗氧化活性研究,以期开发天然抗氧化剂提供理论基础,并对拓展香菇深加工途径及提升香菇产业价值具有一定的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料香菇采购于阜新市农贸市场 去除菌体表面残留的培养基等杂质,洗净,于50℃烘箱中干燥,粉碎过0.2 mm筛,密封于自封袋中备用。

1.1.2 试剂 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、Folin-Ciocalteu试剂、没食子酸、AB-8大孔

收稿日期:2013-03-11

作者简介:马文娟(1977-),女,吉林省永吉县人,学士,工程师,从事食品安全研究。E-mail:ma7051@126.com。

Study on the Inhibitory Effect of Garlic on Bacteria of Familiar Food Pollutant

JIANG Cheng¹, SHEN Xiao-hui², LI Chun-feng¹, WU Heng-mei¹, XUE Chun-mei¹, ZHOU Qing-bo¹

(1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: To discuss the antibacterial effect of raw and cooked garlic solution in different concentrations to food pollution bacteria, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* were treated by raw and cooked garlic with different concentrations. The antibacterial circle and bacteriostatic rate were determined. The results showed that: the inhibition enhanced with the increase of concentration under different concentration of raw and cooked garlic solution. The inhibition rate to *Escherichia coli* was the strongest, the inhibition rate to *Staphylococcus aureus* was stronger, and the inhibition rate to *Bacillus subtilis* was the weakest. The inhibition rate of raw garlic was obviously higher than that of cooked garlic.

Key words: raw garlic; cooked garlic; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus subtilis*; antibacterial rate

树脂等购自 Sigma 公司;乙醇、碳酸钠、盐酸、VC、 H_2O_2 、茛三酮及三氯化铁、溴水、邻苯三酚、 $FeSO_4$ 、水杨酸、三羟甲基氨基甲烷等均为分析纯。

1.1.3 仪器设备 TU-1810752 紫外分光光度计(上海欣技仪器有限公司)、KDC-160HR 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司)、S10 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、JYL-350A 粉碎机(山东九阳有限公司)、分析天平、鼓风干燥箱、微波炉等。

1.2 方法

1.2.1 香菇多酚提取液制备 水浴法:称取香菇干粉 5.00 g 置于 250 mL 三角瓶中,加入 100 mL 70%乙醇,置于水浴锅中 50℃处理 1.5 h,即得香菇总多酚提取液,避光保存待用。3 次重复^[5]。微波辅助:称取香菇干粉 5.00 g 置于 250 mL 三角瓶中,加入 50 mL 70%乙醇。置于微波炉中以 160 W 的功率加热提取液 120 s,将提取液抽滤,滤液置于 50 mL 离心管中,用同样方法将滤渣再处理 1 次,滤液以 5 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min。合并上清液于 100 mL 容量瓶内,再以 70%乙醇定容,即得总多酚提取液,避光保存待用^[6]。

1.2.2 没食子酸标准曲线的制备 采取 Folin-Ciocalteu 比色法^[7]:称取 25 mg 没食子酸,加入到 25 mL 去离子水中,得到 1 $mg \cdot mL^{-1}$ 的没食子酸溶液。吸取 5 mL 1 $mg \cdot mL^{-1}$ 的没食子酸溶液,定容至 500 mL 容量瓶中,即得浓度为 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的没食子酸标准溶液,然后准确吸取 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2 mL 上述没食子酸标准溶液于比色管中,分别加入蒸馏水 3.2, 2.8, 2.4, 2.0, 1.6, 1.2, 0.8, 0.4, 0 mL,再各加入 Folin-Ciocalteu 试剂 0.6 mL,充分振荡后静置 3~4 min,分别加入 10% Na_2CO_3 1.2 mL,摇匀,置于 25℃恒温水浴中反应 30 min。以空白管为参比,于 765 nm 下测定吸光度,以没食子酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线(见图 1)。

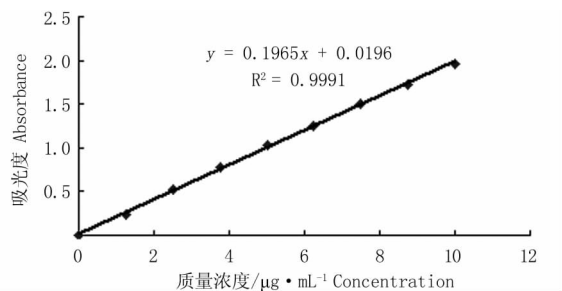


图 1 没食子酸标准曲线

Fig. 1 Standard curve of gallic acid

1.2.3 多酚含量测定 香菇多酚提取液用 70%乙醇水溶液适当稀释,准确吸取 2.0 mL 于比色管中,加入蒸馏水 1.2 mL,按上述方法测定其吸光度,并根据标准曲线计算出提取液中的总酚浓度及样品干粉中总酚含量,其结果表示为没食子酸的当量毫克数(gallic acid equivalent, GAE),即 mg GAE。

$$C = \frac{c \times V \times D}{m \times 10^3}$$

式中,C 为样品干粉中总酚含量($mg \cdot g^{-1}$),c 为标准曲线计算得到的总酚含量($mg \cdot mL^{-1}$),V 为提取液总体积(mL),D 为稀释倍数,m 为样品干粉质量(g)。

1.2.4 清除超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 能力测定 在 50 mL 容量瓶中依次加入 25 mL pH8.34 的磷酸缓冲液($0.1 mol \cdot L^{-1}$)、5 mL 不同浓度(0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 $mg \cdot mL^{-1}$)香菇提取液,最后加入 5 mL 邻苯三酚溶液($2.5 mol \cdot L^{-1}$),用蒸馏水迅速定容至刻度,并从加入邻苯三酚溶液时开始准确计时,测定反应启动后第 60 s 时的 $\lambda = 320$ nm 的吸光值 $A_{\text{样}}$ (以同浓度香菇提取液作参比)。另取试剂同上,不加香菇提取液作对照,测定反应启动后第 60 s 时的 $\lambda = 320$ nm 的吸光值 $A_{\text{空}}$ (以 pH 8.34 的磷酸缓冲液作参比)。以同样的方法测定 VC 清除超氧阴离子自由基的能力,作为对照。香菇提取液对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率计算公式:

$$O_2^{\cdot-} \text{清除率}(\%) = (A_{\text{空}} - A_{\text{样}}) / A_{\text{空}} \times 100^{[8]}$$

1.2.5 清除羟基自由基 $\cdot OH$ 能力测定 Fronton 反应法^[9]:在比色管中依次加入 6 $mmol \cdot mL^{-1}$ 的 $FeSO_4$ 2 mL、6 $mmol \cdot L^{-1}$ 水杨酸 2 mL、6 $mmol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 2 mL,摇匀后在 510 nm 波长处测定其吸光度 A_0 。在此反应体系中分别加入 1 mL 不同浓度(0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 $mg \cdot mL^{-1}$)的样品溶液,加蒸馏水 6 mL,摇匀,放置 6 min。以 6 $mmol \cdot L^{-1}$ $FeSO_4$ 2 mL 和 6 $mmol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 2 mL 和蒸馏水 2 mL 配成溶液作参比,在 510 nm 波长处测定其吸光度 A_1 ,计算 $\cdot OH$ 清除率。以同样的方法测定 VC 的 $\cdot OH$ 清除能力,作为对照。

$$\cdot OH \text{清除率}(\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

1.2.6 清除 DPPH 自由基能力测定 DPPH 法于 1958 年被提出,广泛用于定量测定生物试样、分类物质好和食品的抗氧化能力。此法是根据 DPPH 自由基有单电子,在 517 nm 处有一强吸收,其醇溶液呈紫色的特性。当有自由基清除剂

存在时,由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,其褪色程度与其接受的电子数量成定量关系,因而可用分光光度计进行快速的定量分析^[10]。DPPH 是一种很稳定的氮中心的自由基,它的稳定性主要来自共振稳定作用的 3 个苯环的空间障碍,使夹在中间的氮原子上不成对的电子不能发挥其应有的电子成对作用。

按文献[11]方法稍加修改,取不同浓度(0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)香菇提取液 2 mL 及 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPPH 溶液 2 mL,加入同一具塞试管中,摇匀在室温下密闭静置 30 min,用纯溶剂作参比于 517 nm 波长下测定吸光度,根据公式计算每种提取液对 DPPH 自由基的清除率。以同样的方法测定 VC DPPH·清除能力,作为对照。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

其中, A_{sample} 为加提取液后 DPPH 溶液的吸光度 $A_{\text{sample blank}}$ 为提取液的吸光度 A_{control} 为未加提取液时 DPPH 溶液的吸光度。

2 结果与分析

2.1 多酚含量

根据线性回归方程计算香菇提取液中总多酚的含量,可得香菇中多酚含量水浴法结果约为 $49.13(\pm 3.52)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;微波辅助为 $50.59(\pm 4.61)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。比茶树菇 $72.2(\pm 0.54)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、草菇 $59.2(\pm 1.10)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、金针菇 $34.1(\pm 0.23)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、平菇 $33.3(\pm 0.91)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、杏鲍菇 $27.7(\pm 0.82)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 等的多酚含量相对较多^[6]。

2.2 抗氧化活性

2.2.1 清除超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力 由图2可知,当样品浓度低于 2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率随浓度变化很大,清除率随体积增大而增大,当样品浓度超过 2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,香菇提取液对超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率达 50%(VC 为 90%)附近时,曲线斜率变得平缓,表明加大样液的量对超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率影响很小;当样液浓度增大至 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上时,样品对超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率基本不变,说明对 DPPH 自由基已清除完全。与对照组相比,其超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力较 VC 弱。经计算得出,VC 半抑制率 EC_{50} 为 2.27%;香菇半抑制率 EC_{50} 为 4.60%,明显大于 VC。

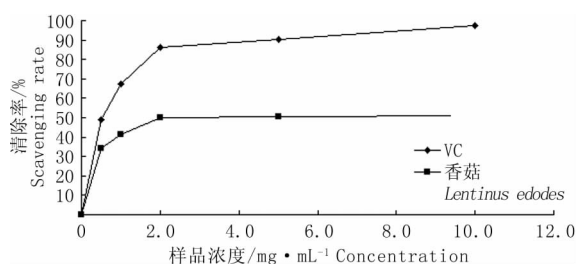


图2 香菇多酚对超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力
Fig. 2 Scavenging ability of *Lentinus edodes* polyphenol on superoxide anion $\text{O}_2^{\cdot-}$

2.2.2 清除羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 能力 由图3可以看出,当样品浓度低于 2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除率随浓度变化很大,清除率随体积增大而增大,当样品浓度超过 2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,香菇提取液对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除率达 69%(VC 为 99%)附近时,曲线斜率变得平缓,表明加大样液的量对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除率影响很小;当样液浓度增大至 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上时,样品对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除率基本不变,说明对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 已清除完全。与对照组相比,其羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力较 VC 弱。经计算得,VC 半抑制率 EC_{50} 为 3.35%;香菇半抑制率 EC_{50} 为 4.71%,明显大于 VC。

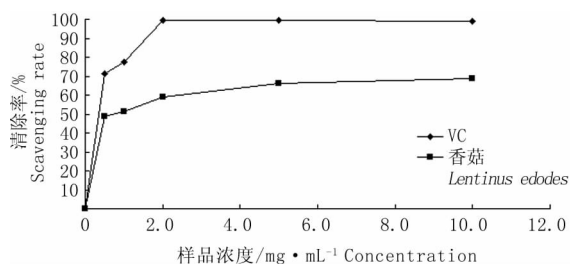


图3 香菇多酚对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力
Fig. 3 Scavenging ability of *Lentinus edodes* polyphenol on superoxide anion $\cdot\text{OH}$

2.2.3 清除 DPPH 自由基能力 由图4可以看出,当样品浓度低于 5.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对 DPPH 自由基的清除率随浓度变化很大,清除率随体积增大而增大,当样品浓度超过 5.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,香菇提取液对 DPPH 自由基的清除率达 60%(VC 为 70%)附近时,曲线斜率变得平缓,表明加大样液的量对 DPPH 自由基的清除率影响很小,样品对 DPPH 自由基的清除率基本不变,说明对 DPPH 自由基已清除完全。与对照组相比,其 DPPH 自由基的清除能力较 VC 弱。经计算得,VC 半抑制率 EC_{50} 为 1.92%;香菇半抑制率 EC_{50} 为 3.08%,明显大于 VC。

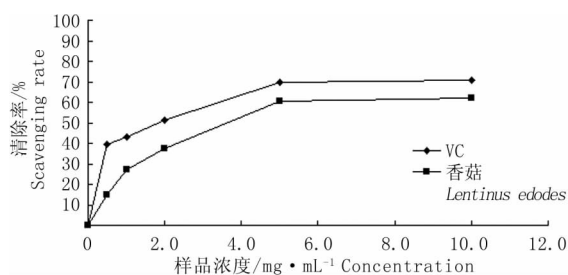


图4 香菇多酚对DPPH的清除能力

Fig. 4 Scavenging ability of *Lentinus edodes* polyphenol on superoxide anion DPPH

3 结论与讨论

通过对香菇酚类化合物的提取工艺及抗氧化性两方面的研究表明:

香菇采用水浴法在70%乙醇浓度、1:20料液比条件下水浴1.5 h测得的多酚含量结果约为49.13(±3.52) mg·g⁻¹。

对香菇酚类化合物进行抗氧化性研究,结果表明香菇酚类化合物对清除超氧阴离子O²⁻·、清除羟基自由基·OH和DPPH自由基都有明显的效果。尤其其酚类化合物对清除DPPH自由基的作用效果明显高于超氧阴离子O²⁻·和羟基自由基·OH。且随着香菇酚类化合物浓度的升高其抗氧化性作用逐渐增强,最后趋于稳定。

近年来,随着人们生活水平的提高,人类对保健越来越重视,香菇既是一种美味食品,又是较好的保健食品。干香菇食用部分占72%,每100 g食用部分中含水13 g、脂肪1.8 g、碳水化合物54 g。大量实践证明,香菇中含有丰富的抗氧化

物质,其提取物不仅可作为一种高效价廉的天然抗氧化剂用于食品工业,而且防治癌症的范围广泛,已用于临床治疗,是良好的保健功能性食品,具有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] 宋立江,狄莹,石碧.植物多酚研究与利用的意义及发展趋势[J].化学进展,2000,12(2):161-170.
- [2] 吴进菊,陈红兵,高金燕,等.多种食用菌中多酚氧化酶活性的初步比较[J].食品与机械,2010,26(2):79-81.
- [3] 刁小琴,关海宁,马松艳.中心组合设计优化酶法辅助提取香菇多酚及其抑菌活性研究[J].食品工业科技,2012,33(21):269-272.
- [4] 沈恒胜,陈君琛,汤葆莎,等.栽培料纤维转化与食用菌酚类抗氧化营养的关系[J].福建农业学报,2007,22(4):337-340.
- [5] 魏倩婷.香菇酚类物质的提取及功能学特性的研究[D].福州:福建农林大学,2011:1-62.
- [6] 孙延芳,刘艳凯,梁宗锁,等.六种食用菌多酚及其抗氧化活性研究[J].广东农业科学,2011(16):76-78.
- [7] 刘清,杨赞,姚惠源.大麦多酚类活性物质的提取工艺研究[J].粮食与饲料工业,2006(1):24-26.
- [8] 许中鸿,杭瑚,李运平.超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究进展及改进[J].化学通报,2001(8):516-519.
- [9] 贝玉祥,郭英,何超,等.诃子多酚的提取分离、结构鉴定及抗氧化活性的研究[J].食品研究与开发,2009,30(11):6-9.
- [10] Ferreira Isabel C F R, Baptista Paula, Boas Miguel Vilas. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity[J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1511-1516.
- [11] 张尊听,杨伯伦,刘谦光,等.野葛根异黄酮成分的超声萃取及抗氧化作用[J].食品科学,2002,23(5):31-33.

Determination of Polyphenol Content and Research on Antioxidant Activity in *Lentinula edodes* (Berk) Pegler

MA Hong-juan

(Guangdong Meiweixian Flavoring Foods Company Limited, Zhongshan, Guangdong 528437)

Abstract: In order to develop natural antioxidants and expand deep processing way of mushroom, taking *Lentinula edodes* (Berk) Pegler as raw material, the polyphenol material was extracted using alcohol by water bath, and polyphenol content was determined. The determining polyphenol content of *Lentinula edodes* (Berk) Pegler was about 49.13(±3.52) mg·g⁻¹. Through scavenging free radicals *in vitro* method (DPPH method, O²⁻· purge and ·OH scavenging), antioxidant capacity of polyphenols in mushrooms was preliminary studied. The results showed that polyphenol extracts of *Lentinus edodes* on three free radicals had obvious scavenging ability, which had higher scavenging ability to DPPH, scavenging ability to O²⁻· and ·OH.

Key words: *Lentinula edodes* (Berk) Pegler; polyphenols; extract; antioxidant