

4株姬松茸胞外多糖含量和生物活性的对比分析

解修超, 刘军生, 罗阳兰, 邓百万*, 柏秋月, 张毓文

(陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001)

摘要:对4株姬松茸菌株进行胞外多糖含量及生物活性对比研究。通过液体深层发酵后提取胞外多糖, 采用苯酚-浓硫酸法和3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定其含量, 通过滤纸片扩散法和分光光度法分别对其进行抑菌和 α -淀粉酶抑制作用研究, 利用DPPH法、ABTS法和羟自由基法考察其体外抗氧化活性。结果表明菌株JS06胞外多糖成分的抑菌活性高于其他3株姬松茸菌株, 对金黄色葡萄球菌效果最好。菌株JS01对 α -淀粉酶的 IC_{50} 为2.425 mg/mL, 优于其他3株姬松茸菌株;4株姬松茸菌株DPPH自由基、ABTS⁺自由基和羟自由基的清除率均随质量浓度的增大而增大, 当质量浓度达到1.0 mg/mL时, 菌株JS01对ABTS⁺自由基的清除率为83.06%, 高于其他3株姬松茸菌株;JS06对DPPH自由基和羟自由基的清除率分别为96.47%和99.71%, 均高于其他3株姬松茸菌株, 且对于羟自由基的清除率高于 V_C 。该研究表明4株姬松茸胞外多糖成分均具有一定的生物活性。

关键词:姬松茸;胞外多糖;抑菌活性;抗氧化活性;抑制 α -淀粉酶活性

Comparative Analysis of Extracellular Polysaccharide Content and Bioactivity Associated with 4 Strains of *Agaricus blazei*

XIE Xiu-chao, LIU Jun-sheng, LUO Yang-lan, DENG Bai-wan*, BAI Qiu-yue, ZHANG Yu-wen
(Shaanxi Provincial Engineering Research Center of Edible & Medicinal Fungi, School of Biological Science & Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China)

Abstract: The content and bioactivity of extracellular polysaccharides from 4 strains of *Agaricus blazei* were studied. Extracellular polysaccharides were extracted by submerged liquid fermentation. The content of polysaccharides was determined by phenol-concentrated sulfuric acid method and 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. The inhibition of bacteria and α -amylase were studied by filter paper diffusion method and spectrophotometry respectively. The antioxidant activity of polysaccharides *in vitro* was investigated by detecting the scavenging rate of DPPH free radical, ABTS⁺ free radical and $\cdot OH$ free radical. The antimicrobial activity of exopolysaccharides from strain JS06 was higher than that of the other three strains of *Agaricus blazei*, and the effect on *Staphylococcus aureus* was the best. The IC_{50} of strain JS01 to α -amylase was 2.425 mg/mL, which was superior to other three strains of *Agaricus blazei*. The scavenging rates of DPPH, ABTS⁺ and hydroxyl radicals of four *Agaricus blazei* strains increased with the increase of mass concentration. When the mass concentration reached 1.0 mg/mL, the scavenging rate of strain JS01 to ABTS⁺ radicals was 83.06%, higher than that of the other three strains. The scavenging rates of DPPH free radical and hydroxyl free radical by JS06 were 96.47% and 99.71% respectively, which were higher than the others, and the scavenging rate of hydroxyl free radical was higher than that of V_C . The results showed that the extracellular polysaccharides of the four

基金项目:秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心自然科学研究项目(QBXT-17-12);陕西省教育厅科研专项项目(16JK1158)

作者简介:解修超(1979—),男(汉),副教授,博士,研究方向:微生物资源保护与开发利用。

*通信作者:邓百万(1963—),男(汉),教授,硕士,研究方向:微生物资源保护与开发利用。

Agaricus blazei strains had bioactivity and potential medicinal value.

Key words: *Agaricus blazei*; extracellular polysaccharide; inhibition activity of bacteria; antioxidant activity; inhibition activity of α -amylase

引文格式:

解修超,刘军生,罗阳兰,等.4株姬松茸胞外多糖含量和生物活性的对比分析[J].食品研究与开发,2019,40(12):68-75

XIE Xiuchao, LIU Junsheng, LUO Yanglan, et al. Comparative Analysis of Extracellular Polysaccharide Content and Bioactivity Associated with 4 Strains of *Agaricus blazei*[J]. Food Research and Development, 2019, 40(12):68-75

姬松茸(*Agaricus blazei*)又名巴西蘑菇,属担子菌亚门(Basidiomycotina)、层菌纲(Hymenomycetes)、伞菌目(Agaricales)、蘑菇科(Agaricaceae)、蘑菇属(*Agaricus*),原产于巴西、秘鲁和美国等地,后被引进日本和中国等国家,并对其进行了深入研究。研究发现,姬松茸具有较高的食药价值,富含多种活性成分,与白蘑菇的亲缘关系较近,其多糖含量更是食用蕈菌之首^[1]。近年来相关学者对姬松茸多糖在抗氧化^[2],抗疲劳^[3],抗炎^[4],抗肿瘤^[5-6],抗衰老^[7],降血糖^[8]等方面的作用进行了深入研究,表明姬松茸多糖在糖尿病^[9]、肥胖症等疾病的治疗方面具有一定的潜在价值。

然而目前,一方面对姬松茸多糖的研究主要集中在胞内多糖,对胞外多糖研究较少,仅有关于姬松茸胞外多糖抗氧化活性的初步报道^[10],尚无系统性的研究,相对于胞内多糖而言,胞外多糖提取加工方便,成本较低^[11];另一方面,国内目前用于生产或研究的姬松茸种大部分来源于巴西和日本等地,我国品质优良的姬松茸菌株稀缺,种质资源严重不足^[12-13],优良菌株亟待筛选补充。本研究利用4株姬松茸菌株采用液体深层发酵法生产胞外多糖,测定其胞外多糖产量并考察其抑菌、抗氧化、抑制 α -淀粉酶活性,筛选产胞外多糖的优势菌株,以期对姬松茸的进一步综合开发和利用提供參考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试的4株姬松茸由陕西省食药菌工程技术研究中心保藏。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*,批号CMCC63501)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,批号ATCC-25925)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*,批号ATCC-25922)、白色念珠菌(*Candida albicans*,批号CMCC85021),以上4种菌株由陕西理工大学陕西省资源生物重点实验室菌种保藏中心提供,试验前复苏传代

使用。

维生素C(V_c ,分析纯,批号:20160105):天津市天新精细化工开发中心;DPPH:Sigma公司;ABTS:上海生工生物工程有限公司;其余试剂均为分析纯:天津市盛奥化学试剂有限公司。

马铃薯琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200.0 g/L、葡萄糖20.0 g/L、蛋白胨5.0 g/L、磷酸二氢钾5.0 g/L、硫酸镁3.0 g/L、琼脂15.0 g/L、水1 000 mL、pH值自然。

察氏培养基:硝酸钠3.0 g、磷酸氢二钾1.0 g、七水合硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)0.5 g、氯化钾0.5 g、硫酸亚铁0.01 g、蔗糖30.0 g、琼脂15.0 g、蒸馏水1 000 mL。

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉浸粉3.0 g/L,蛋白胨10.0 g/L,氯化钠5.0 g/L,琼脂15 g/L,水1 000 mL。

1.2 仪器与设备

EYELA N1000型旋转蒸发器:上海爱郎仪器有限公司;SW-CJ-1D型单人超净工作台:上海苏净实业有限公司;YXQ-LS-50S型高压灭菌锅:上海博讯实业有限公司医疗设备厂;KQ5200DE型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;UV2550型紫外分光光度计:日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株菌落及细胞形态

分别将4株姬松茸菌株接种于察氏培养基上,28℃暗培养5 d,观察其菌落形态,采用棉蓝染色法^[14]在光学显微镜下观察菌丝体的形态和大小^[15]。

1.3.2 菌株ITS分子鉴定

对4株姬松茸菌株进行ITS分子鉴定,利用CTAB法提取4株姬松茸菌株的DNA,采用真菌通用引物ITS-1(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS-4(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对ITS序列进行扩增。PCR反应体系50 μ L:2 $\times$ Taq Master Mix 25 μ L, 10 μ mol/L引物各2 μ L,模板DNA1 μ L(浓度10 ng/ μ L),双蒸水补齐至50 μ L。反应条件:94℃预变性2 min;

94 ℃ 30 s, 59 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 60 s, 33 个循环; 72 ℃ 延伸 2 min, 4 ℃ 保存。将试验阳性 PCR 产物送上海生工生物工程有限公司测序, 测序结果整理后提交 National Center for Biotechnology Information 数据库, 申请并获得登录号, 并利用 blast 进行序列比对, 下载相似序列后利用 Mega7.0 构建系统发育树。

1.3.3 胞外多糖提取及含量测定

将 4 株姬松茸菌株接入 150 mL PDA 液体培养基中, 120 r/min 振荡发酵 7 d, 抽滤, 收集滤液旋转蒸发浓缩至 60 mL, 采用 Sevag 法去除蛋白质, 滤液与 Sevag 试剂按 3:1 (体积比) 置于 250 mL 三角瓶中 120 r/min 振荡 30 min, 分液漏斗静置 20 min, 重复 3 次, 取上层清液。真空浓缩至 50 mL, 转入三角瓶中加入 3 倍体积的无水乙醇, 4 ℃ 静置过夜, 5 000 r/min 离心 10 min, 45 ℃ 干燥至恒重, 即得姬松茸胞外多糖^[16]。首先取除蛋白质后上层清液采用苯酚-浓硫酸法^[17]测定总糖含量, 并作葡萄糖标准曲线, 其回归方程为 $y=28.529x-0.0019$, $R^2=0.9939$ 。然后取加入乙醇沉降并离心后的上清液利用 DNS 法测定还原糖含量, 两者之差即为胞外多糖的含量^[18], 计算公式如下:

姬松茸胞外多糖含量=总糖含量-还原糖含量

1.3.4 抑菌活性分析

采用滤纸片扩散法^[19]研究 4 株姬松茸胞外多糖 (各取 50 μL) 对指示菌-枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、白色念珠菌 *Candida albicans* 菌株的抑菌效果, 以含无菌 PDA 培养基 50 μL 的纸片作为溶剂阴性对照, 以含 25 μg/mL 青霉素 50 μL 的纸片作为阳性对照, 以 0.96 % 生理盐水 100 μL 的纸片为空白对照。利用十字交叉法测量抑菌圈直径 D , 抑菌效果 (E) 按下列公式计算:

$$E = (D_{\text{样品组}} - D_{\text{阴性对照组}}) / (D_{\text{阳性对照组}} - D_{\text{空白对照组}})$$

采用二倍连续梯度稀释法测定最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC), 以 0.5 mL 的生理盐水为空白对照, 同时采用平板转种法^[20]测定最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC)。

1.3.5 α -淀粉酶抑制作用的测定

参考文献[21-22], 稍作修改, 用无菌水将 4 种胞外多糖样品配制成 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 溶液, 取 0.5 mL 样品溶液, 加入 0.5 mL 1 U/mL 的 α -淀粉酶溶液与 1 mL 0.25 % 的淀粉溶液, 混匀后于 50 ℃ 恒温水浴反应 10 min。然后立即加入 1 mL DNS 溶液, 沸水浴加热 5 min, 冷却后用 pH 6.6 磷酸缓冲液定容至 10 mL, 测定 575 nm 处吸光值。每样重复 3 次, 取平均值, 按下列公式计算 α -淀粉酶活性的抑制率:

$$\text{抑制率}/\% = 1 - \frac{A_s - A_{sb}}{A_c} \times 100$$

式中: A_s 为 0.5 mL 样品液 + 0.5 mL α -淀粉酶溶液的样品吸光值; A_{sb} 为 0.5 mL 样品 + 0.5 mL 磷酸缓冲液的样品对照组吸光值; A_c 为 0.5 mL 二甲基亚砷 + 1 mL 磷酸缓冲液的空白对照组吸光值。

1.3.6 体外抗氧化活性

1.3.6.1 还原能力测定

参考文献[23], 稍作修改, 用无菌水将 4 种胞外多糖样品及 V_c 配成 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 不同浓度的样品溶液, 取 1 mL 样品, 加入 1 mL pH 6.6 磷酸缓冲液, 1 mL 1 % 铁氰化钾溶液, 混匀后于 50 ℃ 水浴中反应 20 min, 加入 1 mL 10 % 三氯乙酸, 混匀后取 2 mL, 加超纯水 2 mL 与 200 μL 0.1 % 三氯化铁, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液测定 OD_{700} , 同时将铁氰化钾溶液替换成 1 mL 去离子水作为对照组。以 V_c 作为阳性对照, 重复 3 次, 取平均值。

1.3.6.2 DPPH 自由基清除能力的测定

参考文献[24], 稍作修改, 用无菌水将 4 种胞外多糖样品及 V_c 配制成 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 不同浓度的样品溶液, 取 2 mL 样品溶液加入 1 mL 0.2 mmol/L DPPH-99.9 % 乙醇溶液, 混匀, 放置在室温 (25 ℃) 暗处 10 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液测定 517 nm 处吸光值, 以 V_c 为阳性对照, 每样重复 3 次, 取平均值, 并按下列公式计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{清除率}/\% = 1 - \frac{A_s - A_{sb}}{A_c} \times 100$$

式中: A_s 为 2 mL 样品液 + 1 mL DPPH-乙醇溶液的样品吸光值; A_{sb} 为 2 mL 样品液 + 1 mL 99.9 % 乙醇溶液的样品对照组吸光值; A_c 为 2 mL 二甲基亚砷 + 1 mL 99.9 % 乙醇溶液的空白对照组吸光值。

1.3.6.3 ABTS⁺自由基清除能力的测定

参考文献[25-26], 稍作修改, 将 7 mmol/L 的 ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液等体积混合, 在室温 (25 ℃)、避光条件下静置过夜, 形成 ABTS⁺储备液。使用前将 ABTS⁺储备液用 99.9 % 乙醇稀释 (约稀释 60 倍), 即 OD_{734} 为 0.7 ± 0.02 。用无菌水将 4 种胞外多糖样品和 V_c 配制成 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 不同浓度的样品溶液, 取 1 mL 样品溶入 2 mL ABTS⁺工作液, 振荡混合, 放置于暗处 5 min 后 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液测定 OD_{734} , V_c 为阳性对照。每样重复 3 次, 取平均值, 并按下列公式计算 ABTS⁺自由基清除率:

$$\text{清除率}/\% = 1 - \frac{A_s - A_{sb}}{A_c} \times 100$$

式中: A_s 为 1 mL 样品液+2 mL ABTS⁺工作液的样品吸光值; A_{sb} 为 1 mL 样品+2 mL 99.9 %乙醇溶液的样品对照组吸收值; A_c 为 1 mL 二甲基亚砷+2 mL 99.9 %乙醇溶液的空白对照组吸光值。

1.3.6.4 羟自由基清除能力的测定

参考文献[27],稍作修改,用无菌水将 4 种胞外多糖样品及 V_c 配制成 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 溶液,在 1 mL 样品中分别加入 9 mmol/L $FeSO_4$ 和 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液各 2 mL 最后加 2 mL 1.2 mmol/L H_2O_2 启动反应,于 37 ℃反应 30 min,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液以去离子水调零在波长 510 nm 测定样品浓度吸光度 A_1 ;另外,去离子水代替 H_2O_2 重复上述操作,

测定两样品本身的吸光值 A_2 ,同时以水代替两样品溶液,测定吸光度 A_0 。 V_c 为阳性对照。每样重复 3 次,取平均值,并按下列公式计算羟自由基清除率:

$$\text{清除率}/\% = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3} \times 100$$

1.4 数据分析

试验采用 SPSS22.0, Origin8.5 软件进行数据分析、图表制作等,结果取 3 次平行试验的平均值。

2 结果与分析

2.1 菌株菌落形态

菌株外观形态与显微特征图见图 1。

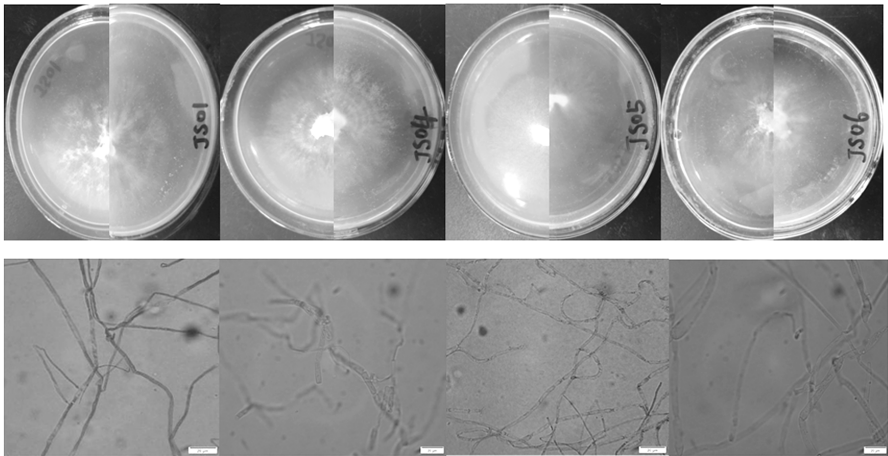


图 1 菌株外观形态与显微特征图
Fig.1 Colony morphology and microscopic characteristic of strains

4 株姬松茸菌丝有隔膜,具锁状分枝弯曲,与次顶端细胞融合,形成一桥状结构。菌丝呈白色,呈扇面状,背面呈淡黄色。4 株姬松茸菌株呈现不同的菌落形态,JS01 和 JS06 气生菌丝较为发达,生长速度快,生长后期能够拧结成束,而 JS04 和 JS05 以基生菌丝为主,生长速度较慢。

2.2 菌株 ITS 分子鉴定

JS01、JS04、JS05 和 JS06 菌株 ITS 的扩增结果显示其序列大小在 800 bp 左右。

将菌株 ITS 序列测序后,提交至 GenBank 数据库中,进行序列分析和相似性比较,并建立系统发育树以证实该菌的系统发育地位,结果如图 2 所示。菌株与 *Agaricus blazei* 中的 ITS 序列具有 99 % 的高度相似性,同时结合菌株菌落形态及显微特征结果认为,菌株 JS01、JS04、JS05 和 JS06 为姬松茸菌株。

2.3 胞外多糖含量测定

采用苯酚-浓硫酸法和 DNS 法测定 4 株姬松茸胞外多糖含量见表 1。

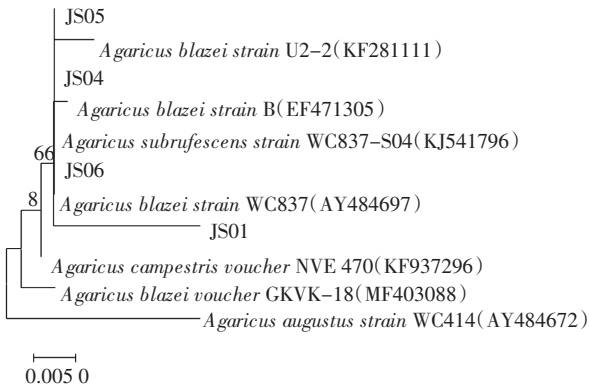


图 2 4 株姬松茸菌株系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree of 4 *Agaricus blazei* strains

表 1 胞外多糖含量

菌株	多糖含量/(mg/mL)
JS01	8.50±0.06
JS04	3.34±0.05
JS05	8.81±0.10
JS06	7.70±0.03

如表1所示,各姬松茸菌株的胞外多糖含量有所差异,其中JS01胞外多糖含量为8.50 mg/mL,JS04为3.34 mg/mL,JS05为8.81 mg/mL,JS06为7.70 mg/mL。

表2 胞外多糖抗菌活性分析

Table 2 Antibacterial activity analysis of extracellular polysaccharide

菌株 Strain	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>
JS01	-	+	+	+
JS04	-	+	+	+
JS05	-	-	+	-
JS06	+	+++	+++	-

注:-表示抗菌效果 $E < 0.2$, +表示抗菌效果 $0.2 < E < 0.6$, ++表示抗菌效果 $0.6 < E < 1.0$, +++表示抗菌效果 $E > 1.0$ 。

菌株JS01、JS04的胞外多糖对 *Escherichia coli* 这种革兰氏阴性菌有微弱的抑制作用,抑菌圈的大小为8 mm~12 mm,但JS06的胞外多糖对 *Staphylococcus aureus* 和 *Escherichia coli* 均有很强的抑制作用,抑菌圈大小为21 mm~28 mm。4株姬松茸胞外多糖对病原菌

2.4 抗菌活性分析结果

本试验利用滤纸片扩散法对4株姬松茸胞外多糖的抗菌活性进行对比分析,结果见表2。

Staphylococcus aureus 均具有一定的抑制作用。上述研究表明,JS06胞外多糖在抑制病原菌方面效果更好。

2.5 抑菌活性对比

胞外多糖的MIC和MBC结果见表3。

试验对照组无菌水纸片周围无抑菌环,阳性对照

表3 胞外多糖的MIC和MBC

Table 3 MIC and MBC of extracellular polysaccharide

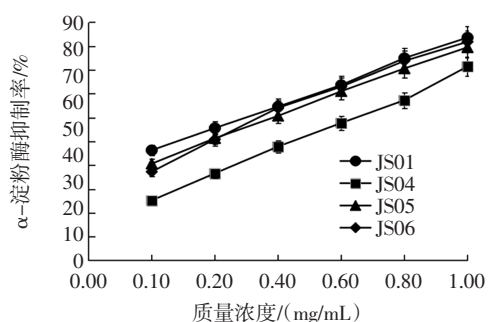
菌株	JS01		JS04		JS05		JS06	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
枯草芽孢杆菌	3.41	3.51	3.53	4.66	3.25	3.38	1.12	1.04
金黄色葡萄球菌	0.41	0.51	0.88	0.98	0.53	0.66	0.31	0.39
大肠埃希菌	2.24	2.36	2.25	2.38	2.14	2.46	0.77	0.94
白色念珠菌	2.47	2.59	3.03	3.01	2.35	2.48	2.34	2.46

组0.5%碘伏溶液周围抑菌环均 >1.5 cm,表明试验方法可行且无误。结果表明,4株姬松茸的胞外多糖对 *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli* 和 *Candida albicans* 均有一定的抑制作用,4种姬松茸菌株对金黄色葡萄球菌的抑制效果较好,对枯草芽孢杆菌的抑制效果差距不大;试验表明菌株JS06有更好抑菌活性,而对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑菌效果明显优于其他两株致病菌,其最小抑菌浓度分别为0.31 g/L和0.77 g/L,最小杀菌浓度为0.39 g/L和0.94 g/L。

2.6 α -淀粉酶抑制能力测定

胞外多糖对 α -淀粉酶的抑制作用见图3。

由图3可以看出,4株姬松茸胞外多糖成分对 α -淀粉酶均有一定的抑制作用。浓度在0.1 mg/mL~1.0 mg/mL内,随着质量浓度的增加, α -淀粉酶抑制率不断增加时,当浓度达到1.0 mg/mL时,对 α -淀粉酶的抑制率分别为93.55%、81.44%、89.46%和91.79%。经回归分析得JS01胞外多糖成分回归方程为: $y=9.5398x+$

图3 胞外多糖对 α -淀粉酶的抑制作用Fig.3 Inhibitory effect of extracellular polysaccharide on α -Amylase

26.862($R^2=0.9988$),计算得 IC_{50} 为2.425 mg/mL;JS04胞外多糖成分回归方程为: $y=10.95x+3.3885$ ($R^2=0.9972$),计算得 IC_{50} 为4.257 mg/mL;JS05胞外多糖成分回归方程为: $y=9.7562x+21.572$ ($R^2=0.9993$),计算得 IC_{50} 为2.905 mg/mL;JS06胞外多糖成分回归方程为: $y=10.869x+17.854$ ($R^2=0.9910$),计算得 IC_{50} 为2.958 mg/mL,表明4株姬松茸胞外多糖成分对 α -淀粉酶抑制作用

存在较大差异,JS01 对 α -淀粉酶抑制效果明显优于其他 3 株姬松茸菌株。

2.7 体外抗氧化活性对比

2.7.1 还原能力测定

胞外多糖的还原能力见图 4。

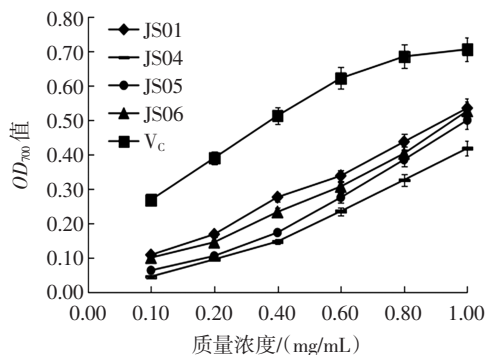


图 4 胞外多糖的还原能力

Fig.4 Reducing activity of extracellular polysaccharide

由图 4 可知,4 株姬松茸胞外多糖成分均表现出不同程度的还原能力,与阳性对照 V_c 相比,还原力从大到小排序为 $V_c > JS01 > JS06 > JS05 > JS04$ 。还原能力随浓度的增加而逐渐增加,当浓度为 0.1 mg/mL 时,4 株姬松茸胞外多糖的还原能力大小无显著差异,但当大于 0.1 mg/mL 时,四者的还原能力差距逐渐变大。当浓度为 1.0 mg/mL 时, V_c 和菌株 JS01、JS06、JS05、JS04 的还原力分别为 0.70 ± 0.05 和 0.53 ± 0.04 、 0.52 ± 0.02 、 0.50 ± 0.04 、 0.41 ± 0.03 ,表明 JS04 胞外多糖成分还原能力明显小于其他 3 株姬松茸菌株,4 株姬松茸胞外多糖都小于 V_c 的还原能力。

2.7.2 DPPH 自由基清除能力的测定

胞外多糖对 DPPH 自由基的清除作用见图 5。

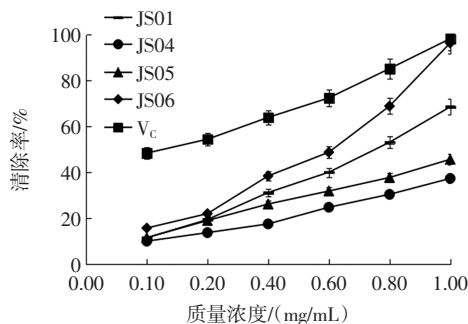


图 5 胞外多糖对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.5 DPPH free radicals scavenging activity of extracellular polysaccharide

由图 5 可知,4 株姬松茸胞外多糖成分对 DPPH 自由基均有一定的清除能力,0.1 mg/mL~1.0 mg/mL 内,随着质量浓度的增加,DPPH 自由基清除能力不断增强,呈现良好的剂量效应关系。DPPH 自由基清除能力从大到小排序为 $V_c > JS06 > JS01 > JS05 > JS04$,浓度为

1.0 mg/mL 时,对 DPPH 自由基清除率分别为 98.33 %、96.47 %、68.62 %、45.75 %和 37.42 %,经回归分析得 V_c 回归方程为: $y=10.007x+25.484$ ($R^2=0.9838$),计算得 EC_{50} 为 2.449 mg/mL;JS06 多糖成分回归方程为: $y=17.928x-33.145$ ($R^2=0.9850$),计算得 EC_{50} 为 4.638 mg/mL;JS01 多糖成分回归方程为: $y=11.292x-13.442$ ($R^2=0.9886$),计算得 EC_{50} 为 5.618 mg/mL;JS05 多糖成分回归方程为: $y=6.6525x-1.2043$ ($R^2=0.9973$),计算得 EC_{50} 为 7.697 mg/mL;JS04 多糖成分回归方程为: $y=5.5434x-2.5793$ ($R^2=0.9852$),计算得 EC_{50} 为 9.486 mg/mL。半数有效浓度(median effective concentration, EC_{50})是指清除率为 50 %时的样品质量浓度,一般认为某种物质的 EC_{50} 值低于 10 mg/mL,表明其具有较好的抗氧化性^[28],因此 4 株姬松茸胞外多糖成分均有较好的 DPPH 自由基清除能力且存在显著差异,JS06 胞外多糖的清除能力显著优于其他 3 株姬松茸的胞外多糖,表明 JS06 的胞外多糖成分具有较强的 DPPH 自由基清除能力。任朝辉等研究发现,姬松茸菌丝体多糖对 DPPH 自由基的 EC_{50} 为 0.184 mg/mL,清除 DPPH 自由基能力显著大于胞外多糖,这可能与多糖本身活性和浓度有关,这有待于后续试验的验证。

2.7.3 ABTS⁺自由基清除能力的测定

胞外多糖对 ABTS⁺自由基的清除作用见图 6。

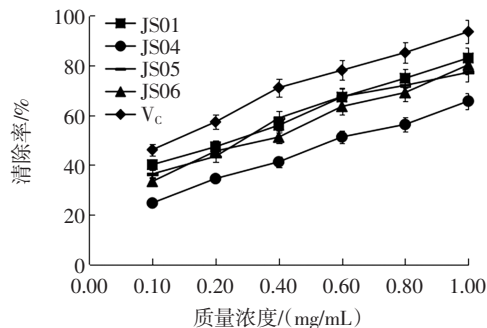


图 6 胞外多糖对 ABTS⁺自由基的清除作用

Fig.6 ABTS⁺ free radicals scavenging activity of extracellular polysaccharide

由图 6 可知,4 株姬松茸胞外多糖成分均具有较强的 ABTS⁺自由基清除能力,随着其质量浓度的增加,清除作用也随之增强。ABTS⁺自由基清除能力从大到小排序为 $V_c > JS01 > JS05 > JS06 > JS04$,浓度为 1.0 mg/mL 时,对 ABTS⁺自由基清除率分别为 93.65 %、83.06 %、80.30 %、77.27 %和 65.71 %,经回归分析 V_c 和 4 株姬松茸菌株的 EC_{50} 值依次为 2.163、3.203、3.647、3.708 mg/mL 和 5.046 mg/mL,表明 4 株姬松茸菌株胞外多糖成分对 ABTS⁺自由基清除能力存在较大差异,JS01 的清除能力明显优于其他 3 株姬松茸菌株。说明 JS01 的胞外多糖成分具有更强的 ABTS⁺自由基清除能力。

2.7.4 羟自由基清除能力的测定

胞外多糖对羟自由基的清除作用见图7。

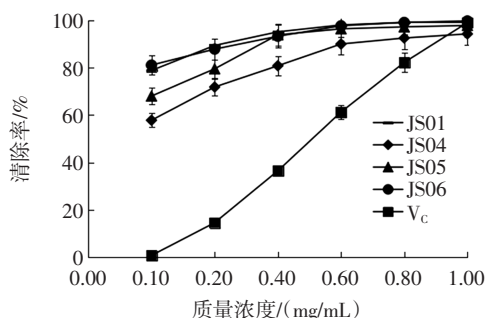


图7 胞外多糖对羟自由基的清除作用

Fig.7 Hydroxyl free radical scavenging activity of extracellular polysaccharide

由图7可知,4株姬松茸胞外多糖成分和V_c均具有明显的清除羟自由基作用且随着质量浓度的不断增加,对羟自由基的清除能力也逐渐增强。羟自由基清除能力从大到小排序为JS06>JS01>V_c>JS05>JS04,浓度为1.0 mg/mL时,对羟自由基清除率分别为99.71%、99.48%、99.03%、97.80%和94.25%。表明4株姬松茸菌株胞外多糖成分对羟自由基清除能力存在较大差异,JS06和JS01的清除能力优于V_c,且明显优于其他2株姬松茸菌株。说明JS06和JS01的胞外多糖成分具有较强的羟自由基清除能力,张卉等^[20]研究发现姬松茸胞外多糖AbEXP-la在30 mg/L的浓度条件下对羟基自由基的清除率达32.74%,这与本试验的结果类似。

3 结论

4株姬松茸菌株对4种致病菌的均有一定抑制效果,对金黄色葡萄球菌抑制效果最好,表明菌株JS06有更好抑菌活性,可为天然抗菌药物的开发提供新材料。

抗氧化结果显示4株姬松茸胞外多糖均具有一定的抗氧化活性,当浓度为1.0 mg/mL时,JS01的还原能力为0.53±0.04,相当于0.76 mg/mL V_c当量。JS06对于DPPH自由基和羟自由基的清除率分别为96.47%和99.71%,均高于其他3株姬松茸菌株,且对于羟自由基的清除率高于V_c;菌株JS01对α-淀粉酶的IC₅₀为2.425 mg/mL,明显优于其他3株姬松茸菌株的抑制作用。由此可见,4株姬松茸胞外多糖均具有抑菌、抗氧化活性和α-淀粉酶抑制作用,表明其胞外多糖具有潜在的药用价值,有利于加大对姬松茸的研究力度,对姬松茸种质资源的开发利用具有重要意义。4株姬松茸菌株中JS01和JS06的综合表现较好,值得进一步

研究。本试验未对提取得到的胞外多糖进行脱色和进一步的纯化处理,这可能会对其生物活性有一定影响,需要后续试验进一步验证,并提出有效解决方案,以便在不破坏胞外多糖活性的前提下,对其进行进一步的脱色和纯化。

参考文献:

- [1] 杨淑云.姬松茸栽培研究进展[J].北方园艺,2017(2): 191-195
- [2] 刘晓庆,秦春青,孙培龙,等.姬松茸子实体多糖高速剪切提取及其抗氧化活性[J].食药用菌,2017,25(2): 113-119
- [3] 李晶,魏健.姬松茸多糖增强免疫功能及抗疲劳作用的研究[J].食品研究与开发,2017,38(5): 201-204
- [4] 刘玮,杨继国,任杰,等.姬松茸多糖ABD的结构表征及抗炎活性研究[J].现代食品科技,2017,33(5):27-32,26
- [5] 黄清松,李红枝,郑敏.姬松茸多糖对糖尿病模型大鼠免疫功能的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(3): 724-725
- [6] 林祥伟,张苏伟.姬松茸粗多糖对K562细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制探讨[J].中国医药科学,2015,5(11): 25-28
- [7] 朱燕,黄真,钟晓明.姬松茸不同提取物对UVB致HaCaT细胞光损伤的保护作用研究[J].浙江中医药大学学报,2017,41(6): 458-463
- [8] 吕娟,白甫,魏鹏飞.姬松茸多糖对糖尿病大鼠氧自由基及炎症相关因子的影响[J].贵州医药,2017,41(2): 139-140
- [9] 魏占英,葛声.姬松茸在糖尿病防治中作用的研究进展[J].中国食物与营养,2014,20(11): 63-66
- [10] 王宏雨,张迪,肖冬来,等.姬松茸胞内多糖和胞外多糖的抗氧化活性研究[J].福建轻纺,2017(12): 30-32
- [11] 赵永勋.食药用菌液体发酵的现状和展望[J].农业与技术,2004(3): 111-114
- [12] 贺建超,贺聪莹,卢美欢,等.双孢蘑菇和姬松茸灭活原生质体融合育种研究[J].中国食用菌,2014,33(1): 9-10
- [13] 刘朋虎,江枝和,雷锦桂,等.(60)Co与紫外复合诱变选育姬松茸新品种—福姬77[J].核农学报,2014,28(3): 365-370
- [14] 王文丽.15种中药材表面污染真菌的分离鉴定及产毒性能分析[D].广州:广州中医药大学,2013: 12-13
- [15] 王祥红,汤志宏,李静.曲霉菌的分离及其形态观察[J].生物学通报,2013,48(7): 54-55, 63
- [16] 任朝辉,冯国辉,张传博.姬松茸深层发酵多糖提取工艺优化及抗氧化活性[J].食品工业科技,2017,38(14): 216-222
- [17] Kushwaha S C, Kates M. Modification of phenol-sulfuric acid method for the estimation of sugars in lipids[J].Lipids, 1981, 16 (5): 372-373
- [18] 李福后,王伟霞,刘伟.影响金针菇菌丝体及胞外多糖产量的因子研究[J].食品研究与开发,2018,39(11): 135-138
- [19] 刘军生,解修超,罗阳兰,等. Aspergillus sp. EA-LJS80的分离及其发酵液提取物七叶皂苷C的生物活性[J].菌物学报,2018,37(1): 79-87
- [20] 段红波,宦臣臣,梁引库,等.蒲公英叶脂溶性成分的GC-MS分析及其活性探讨[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(1): 60-66
- [21] 胡长玉,吴永祥,吴丽萍,等.白及活性成分的抗氧化和对α-淀粉

黄骅虾酱的微生物学和理化性质研究

吴小禾¹, 耿晓杰², 张建旭², 桑亚新², 孙纪录^{2*}

(1. 中山火炬职业技术学院 生物医药系, 广东 中山 528436; 2. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001)

摘要:为了评估黄骅虾酱的安全性以改进其传统生产工艺, 对其微生物学和理化性质进行系统研究。使用选择性/鉴别性培养基, 考察黄骅虾酱的菌落总数以及嗜盐性细菌、真菌、致病性肠杆菌、分解蛋白质细菌和乳酸菌的数量; 使用分光光度法、高效液相色谱法等方法, 测定黄骅虾酱的一般理化指标以及丙二醛、亚硝酸盐、挥发性盐基氮和生物胺含量。结果显示: 大多数样品菌落总数(<3 lgCFU/g)合格; 所有样品中均存在嗜盐性细菌; 多数样品中未检出真菌, 其余样品中真菌数量也较低(<2 lgCFU/g); 大多数样品中检出致病性肠杆菌(<3.16 lgCFU/g); 所有样品中未检测到乳酸菌和分解蛋白质的细菌。所有样品的食盐含量(<25%)合格; pH值在7.0~8.0之间; 水分活度在0.70~0.90之间; 大多数样品的水分含量(65%~80%)超标; 所有样品中均检出了丙二醛(<5 mg/kg)、亚硝酸盐(<0.50 mg/kg)、挥发性盐基氮(<450 mg/100 g)和生物胺(<550 mg/kg)。总之, 家庭自制和工厂生产的黄骅虾酱都存在一定的安全性问题; 比较而言, 工厂生产的虾酱的安全性优于家庭自制的虾酱。

关键词:黄骅虾酱; 微生物学安全性; 生物胺; 丙二醛; 挥发性盐基氮

Study on Microbiological and Physicochemical Properties of Huanghua Shrimp Paste

WU Xiao-he¹, GENG Xiao-jie², ZHANG Jian-xu², SANG Ya-xin², SUN Ji-lu^{2,*}

(1. Department of Biomedicine, Zhongshan Torch Polytechnics, Zhongshan 528436, Guangdong, China;

2. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China)

Abstract: For evaluating the safety of Huanghua shrimp paste and improving its traditional process, the microbiological and physicochemical properties of Huanghua shrimp paste were systematically studied. The aerobic bacterial count, halophilic bacteria count, fungal count, pathogenic enterobacteriaceae count, lactic acid bacteria count and proteolytic bacteria count were investigated by the selection/differentiation media. The general physicochemical indicators and the contents of malondialdehyde, nitrate, volatile base nitrogen and

基金项目: 河北省现代农业产业技术体系淡水养殖创新团队建设项目(HBCT2018180206)

作者简介: 吴小禾(1977—), 男(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 食品生物技术。

* 通信作者: 孙纪录(1972—), 男(汉), 教授, 博士。

- 酶的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 915-922
- [22] 柳梅, 任璇, 姚玉军, 等. 沙棘叶多酚提取物抗氧化及体外降血糖活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(6): 1013-1019
- [23] Zhang Y B, Zhang M, Cheng Q B, et al. Relationship between HPLC fingerprint chromatogram and antioxidant activity of Forsythia suspense leaves[J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29: 629-634
- [24] Wu Y X, Wang X, Jiang H T, et al. Study on total polyphenol content and antioxidant, antimicrobial activities of different polarity fractions of Chimonanthus salicifolius Hu leaves[J]. Food & Machinery, 2017, 33: 150-154
- [25] 杨少辉, 宋英公, 王洁华, 等. 雪莲果体外抗氧化和自由基清除能力[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 166-169
- [26] 赵秀玲, 刘永杰. 地皮菜挥发油的化学成分及抗氧化性研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2017, 39(3): 454-462
- [27] 熊利芝, 付柏婷, 吴玉发, 等. 牯岭籽多糖提取工艺优化及抗氧化性[J]. 应用化工, 2015, 4(6): 1008-1011
- [28] 郑义, 邵颖, 陈安徽, 等. 益智仁总黄酮超声辅助提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2014, 35(6): 44-49
- [29] 张卉, 李长彪, 刘长江. 姬松茸胞外多糖体外抗氧化活性的研究[J]. 中国食用菌, 2005, 24(3): 48-49

收稿日期: 2018-10-11