

富硒木耳水提物体外抗氧化作用研究

王晶晶, 仇建飞, 蔡玉红, 张之鑫, 马虹, 魏春雁*

(吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(长春), 长春 130033)

摘要:通过测定富硒木耳水提物(AESAA)对DPPH自由基、羟自由基、超氧自由基的清除能力及还原能力,以普通木耳水提物(AEAA)作为阴性对照,维生素C(V_c)作为阳性对照,评价了AESAA的体外抗氧化能力。结果表明: AESAA对DPPH自由基、羟自由基、超氧自由基的清除能力和还原能力显著强于AEAA,但弱于 V_c ;且富硒木耳抗氧化活性与含量呈正相关。

关键词:富硒木耳;水提物;体外抗氧化

中图分类号: S646.4

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)06-0134-05

Antioxidant Effects of Aqueous Extract of Se-Enriched *A. Auricula*

WANG Jingjing, QIU Jianfei, CAI Yuhong, ZHANG Zhixin, MA Hong, WEI Chunyan*

(*Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences/Risk Assessment Lab of Agri-products Quality and Safety (Changchun), Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the P.R. C, Changchun 130033, China*)

Abstract: The antioxidant capacity of aqueous extract of Se-enriched *A. auricula* (AESAA) in vitro was evaluated in this paper by measuring AESAA on DPPH free radicals, hydroxyl radicals, superoxide free radicals' scavenging ability and reducing ability with the aqueous extract of *A. auricula* (AEAA) as a negative control and vitamin C (V_c) as a positive control. The results showed that: AESAA had stronger scavenging ability of DPPH free radicals, hydroxyl free radicals and superoxide free radicals and reducing ability than AEAA, but weaker than V_c . The antioxidant activity of AESAA was positively correlated with selenium content.

Key words: Se-enriched *A. auricularia*; Aqueous extract; Antioxidant effects in vitro

硒(Selenium, Se)是人体必需微量元素,是内源性抗氧化酶的重要组成成分,具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫和预防心血管疾病等多种生物学功能^[1-2]。人体主要通过摄入食物补充硒元素,植物能将土壤中存在或肥料中添加的无机硒转化为更易被人体所吸收的有机硒。我国土壤缺硒情况导致我国居民日常通过食物摄取的硒量不能满足机体的正常需求^[3]。由此,国内外兴起一股补硒热,特别在国内,近几年来,如富硒茶、富硒米、富硒食用菌、富硒麦芽等各种各样的富硒食品和保健品被开发。开发高效安全的补硒食品、探究硒的生物学活性已成为食品和药品领域的热点之一。

木耳(*Auricularia auricula*)是我国传统的药食

两用食用菌,属担子菌门,伞菌纲,木耳目,木耳科,是高等担子菌的一个重要类群。它不仅富含人体需要的多种营养成分,而且含有大量人体所必需的氨基酸和微量元素^[4]。研究发现黑木耳对硒具有良好的富集和转化能力,基质中适宜浓度的硒可提高木耳产量并降低子实体粗纤维含量,改善子实体品质^[5]。目前,对富硒木耳的研究主要集中在富硒培育和营养成分富集上,对其活性功能研究与评价较少,现有本团队关于富硒木耳减轻糖尿病肝肾损伤、减轻神经系统认知缺陷,氧化应激和神经炎症等作用的报道^[6-9]。本研究继续以富硒木耳水提物为对象,研究其体外抗氧化能力,为富硒木耳的开发提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

富硒木耳、普通木耳,当年收获干品,由沈阳

收稿日期: 2020-03-29

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2017ZY038)

作者简介: 王晶晶(1994-),女,在读硕士,从事中药药理学研究。

通讯作者: 魏春雁,女,博士,研究员, E-mail: weichy@yeah.net

春源康诚富硒技术开发有限公司提供。

1.2 试剂

1,1-二苯基苦酰基苯肼(DPPH):购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;抗坏血酸(Vc)、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)和三氯化铁:购于天津市光复精细化工研究所;过氧化氢、硫酸亚铁、三氯乙酸、铁氰化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、浓盐酸和浓硝酸:购于北京化工厂;以上试剂均为分析纯。硒标准溶液(1 000 ppm),国家标准物质中心。实验用水:(1)超纯水,电阻率为18.2 M Ω/cm;(2)蒸馏水。

1.3 实验仪器

Agilent 7500a电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS):美国Agilent公司;酶标仪:VersaMax™1510,美国美谷分子;电子天平:感量0.000 1 g,德国梅特勒托利多公司;真空冷冻干燥机:北京松源华兴科技发展有限公司;电热消解仪:DigiBlock,北京Lab Tech公司;台式高速离心机:美国SCILOGEX公司;超纯水机:Milli-Q,美国Millipore公司;数显恒温水浴锅:HH-4,国华电器;数显鼓风干燥箱:上海博迅实业有限公司;粉碎机:天津市泰斯特仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 样品的制备

准确称取干燥样品,粉碎过0.425 mm孔径样品筛,按料液比1:50加水浸泡1 h,60 °C加热2 h,板框压滤机压滤,收集滤液,残渣重复上述操作2次,合并3次滤液,减压蒸发至浸膏状,冷冻干燥,得富硒木耳水提物(AESAA)冻干粉。对照用普通木耳水提物(AEAA)冻干粉的制备过程同上。

1.4.2 硒含量检测

1.4.2.1 硒标准系列溶液的配制

将硒标准溶液(1 000 ppm)用5% HNO₃溶液稀释成浓度梯度分别为0、0.2、0.5、1、2 ppb的硒标准系列溶液,上机测定。以硒浓度(ppb)为横坐标(x),离子计数(CPS)为纵坐标(y),绘制硒浓度标准曲线。

1.4.2.2 样品前处理

准确称取0.3 g AESAA和AEAA粉末,分别置于50 mL带盖消解瓶中,加入8 mL浓硝酸,盖上盖子放置过夜。次日,电热消解仪加热至110 °C进行预消解0.5 h,之后升温至160 °C继续消解直至消解瓶中的溶液澄清透明。开盖赶酸至消解瓶中剩余0.5 mL左右,恢复室温,加超纯水定容至

25 mL,摇匀,上机测定。每个样品重复3次。

1.4.2.3 ICP-MS工作条件

ICP-MS仪器工作条件见表1。

表1 ICP-MS仪器工作条件

工作参数	设定条件	工作参数	设定条件
功率	1 500 W	数据采集次数	3次
载气流量	0.9 L/min	进样深度	8 mm
补偿气流量	0.25 L/min	蠕动泵速	0.1 rps
辅助气流量	0.8 L/min	S/C温度	2 °C

1.4.3 DPPH自由基清除能力测定

采用Mao等^[10]的方法。精确称取30 mg的AE-SAA、AEAA和Vc,分别用蒸馏水配制成3 mg/mL的储备液。临用前分别稀释成浓度为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL的系列溶液。分别取0.5 mL上述不同浓度的样品溶液于5 mL离心管中,加入1.5 mL 0.2 mmol/L的DPPH自由基无水乙醇溶液,混匀,0.22 μm滤膜过滤。本底值测定用样品,则取同体积的蒸馏水代替DPPH自由基无水乙醇溶液,平行操作。避光37 °C孵育30 min后,上酶标仪于517 nm处测定各样品的吸收值A_i和本底吸收值A_j。以相同浓度的AEAA和Vc作为对照组,各样品溶液平行3个复孔。同时以纯净水代替待测样品溶液作为空白对照,并按式(1)计算样品溶液对DPPH自由基的清除率。

$$DPPH\text{自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_0} \right] \times 100\% \quad (1)$$

式中:A_i为样品溶液的吸收值,A_j为样品溶液的本底吸收值,A₀为空白对照。

1.4.4 羟自由基清除能力测定

采用Chen等^[11]的方法。分别取1.0 mL不同浓度的待测样品溶液置于5 mL离心管中,依次加入1 mL FeSO₄(9 mmol/L)和1 mL H₂O₂(8.8 mmol/L),混匀,室温静置反应10 min。各管分别加入1 mL水杨酸-乙醇溶液(9 mmol/L),37 °C孵育15 min。本底值测定用样品,则取同体积的蒸馏水代替反应试剂,平行操作。上酶标仪于510 nm波长处测待测样品吸收值A_i和本底吸收值A_j。以相同浓度的AEAA和Vc作为对照组,各样品溶液平行3个复孔。按式(2)计算样品对羟自由基的清除率。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_0} \right] \times 100\% \quad (2)$$

1.4.5 超氧自由基清除能力测定

采用Zhu等^[12]的方法。4 mL 50 mM Tris-HCl

(pH值8.2)与1 mL 25 mM的邻苯三酚溶液混合, 25 °C 孵育 10 min 后, 加入 1.0 mL 样品溶液, 25 °C 孵育 5 min, 1.0 mL 10 mM HCl 溶液终止反应。本底值测定用样品, 则取同体积的蒸馏水代替反应试剂, 平行操作。上酶标仪于 320 nm 处测样品吸收值 A_i 和本底吸收值 A_j 。以相同浓度的 AEAA 和 V_c 作为对照组, 各样品溶液平行 3 个复孔。按式 (3) 计算样品对超氧自由基的清除率。

$$\text{超氧自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_0} \right] \times 100\% \quad (3)$$

1.4.6 还原能力测定

采用庞中好^[13]的方法。分别将 0.5 mL 不同浓度样品溶液与 1.25 mL PBS (pH 值 6.6, 0.2 M) 缓冲液置于 5 mL 离心管中混匀后, 加入 1.25 mL 1% 铁氰化钾, 50 °C 培养箱孵育 20 min。冷却至室温后, 每管加入 1.25 mL 10% 三氯乙酸终止反应, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1.25 mL 于 5 mL 离心管中, 依次加入 1.25 mL 纯净水和 0.25 mL 0.1% $FeCl_3$, 混匀后室温静置孵育 10 min。在 710 nm 处测定待测样品的吸收值 A_i , 蒸馏水做空白对照 (A_0)。以相同浓度的 AEAA 和 V_c 作为对照组, 各样品溶液平行 3 个复孔。按式 (4) 计算样品的还原能力。

$$\text{还原能力} = A_i - A_0 \quad (4)$$

1.4.7 统计分析

所有试验均至少 3 次重复, 用 Graphpad 7.0 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 硒含量测定结果

硒标准曲线见图 1, 其回归方程为: $Y=1.370E-0.004X+3.805E-0.05$ 。

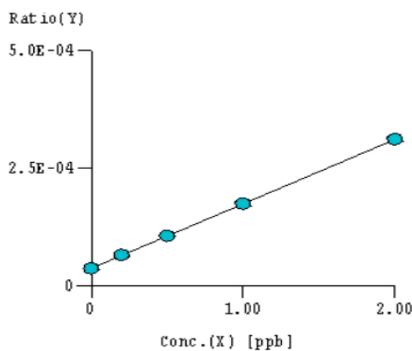


图 1 硒标准曲线

计算可知, AESAA 总硒含量 31.79 mg/kg, AEAA 总硒含量 4.4 mg/kg。

2.2 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基是一种合成的且以氮原子为中心的自由基。DPPH 自由基可被抗氧化剂还原, 乙醇溶液中的 DPPH 自由基下降, 溶液在 517 nm 处的吸收值降低, 且吸收值降低情况与抗氧化剂清除自由基能力呈线性关系^[14], 因而可以通过吸收值的变化来判定抗氧化剂清除自由基的能力。由图 2 可知, AESAA 及 AEAA 均对 DPPH 自由基具有一定的清除能力, 且随着浓度的升高清除能力增强。浓度为 3 mg/mL 时, AESAA 及 AEAA 的 DPPH 自由基清除率分别为 66.85% 和 52.88%。AESAA 及 AEAA 对 DPPH 自由基清除的 IC_{50} 分别为 1.916、2.865 mg/mL。 IC_{50} 为自由基清除率在 50% 时相应的样品溶液浓度。 IC_{50} 值越小, 表明清除能力越强, 说明在相同浓度下, AESAA 较 AEAA 具有更强的 DPPH 自由基清除能力。

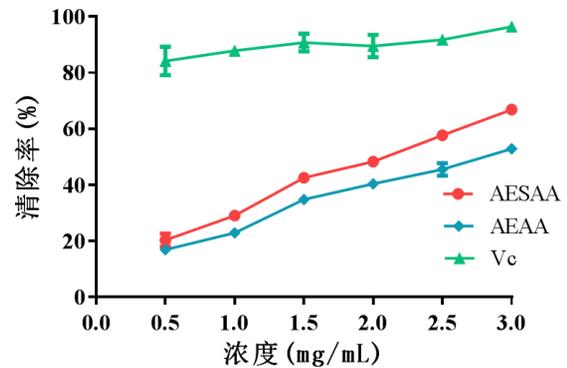


图 2 AESAA、AEAA 及 V_c 对 DPPH 自由基的清除能力

2.3 羟自由基清除能力

利用芬顿 (Fenton) 反应在体系中产生游离的羟自由基: $H_2O_2 + Fe^{2+} = \cdot OH + Fe^{3+} + H_2O$ 。游离羟自由基能与水杨酸发生反应生成 2,3-二羟基苯甲酸, 在 510 nm 波长处检测到最大吸收峰^[15]。当在 Fenton 体系加入抗氧化剂后, 体系中的羟自由基被抗氧化剂清除, 其与水杨酸反应生成的 2,3-二羟基苯甲酸随之减少, 在 510 nm 处吸收值下降。由图 3 可知, 清除率随浓度增加明显上升。AESAA 对羟自由基清除能力高于 AEAA, 浓度为 3 mg/mL

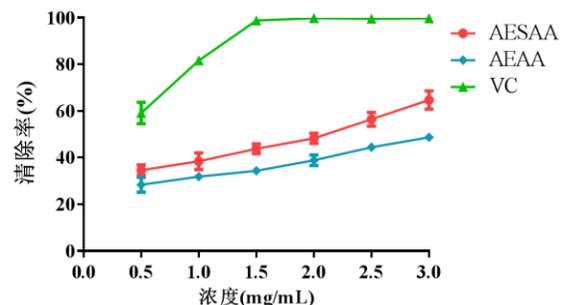


图 3 AESAA、AEAA 及 V_c 对羟自由基的清除能力

时, AESAA 及 AEAA 的羟自由基清除率分别为 64.69%、47.97%。IC₅₀ 分别为 1.751、3.534 mg/mL。

2.4 超氧自由基清除能力

在 pH 值 8.2~8.4 条件下, 邻苯三酚发生自氧化反应, 生成超氧自由基和有色中间产物, 在 320 nm 波长处检测到最大吸收峰。在体系中加入抗氧化剂能抑制邻苯三酚发生自氧化反应, 使超氧自由基的产生受阻, 在 320 nm 波长处检测到吸收值降低^[16]。由图 4 可知, 在试验浓度范围内 AESAA 及 AEAA 虽然具有一定清除超氧自由基的能力, 但清除率很低。浓度在 3.0 mg/mL 时, AESAA 对超氧自由基的清除率只有 48.3%, 尚未达到理想水平。

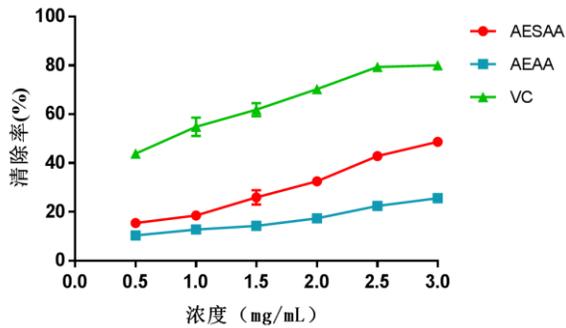


图 4 AESAA、AEAA 及 V_c 对超氧自由基的清除能力

2.5 还原能力

抗氧化剂可通过将 Fe³⁺ 还原生成 Fe²⁺, Fe²⁺ 与三氯化铁反应生成的普鲁士蓝, 在 710 nm 波长处有特殊吸收峰。吸收值越大, 还原能力越强, 表示样品抗氧化能力越强^[17]。由图 5 可知, 在 0.5~3 mg/mL 浓度范围内, 随着样品浓度增加, 其吸收值也不断增加。当水提物的浓度为 1.5 mg/mL 时, AESAA 在 710 nm 处的吸收值为 0.239, 略高于 AEAA 的吸收值 0.176; 当水提物的浓度为 3 mg/mL 时, AESAA 在 710 nm 处的吸收值为 0.554, 高于 AEAA 的吸收值 0.375, 显示出了较强的还原能力。

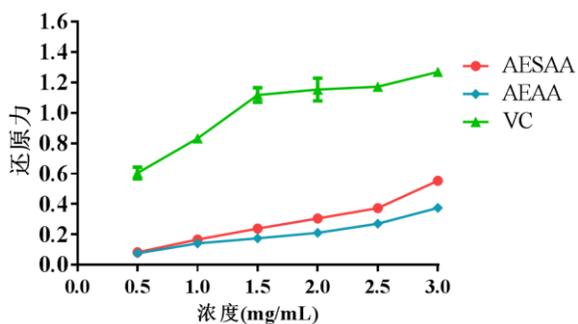


图 5 AESAA、AEAA 及 V_c 的还原能力

3 讨论

研究表明, 食用菌细胞壁上存在大量巯基、氨

基等离子基团, 使其对硒元素有很强的富集能力^[18]。生产上在培养基中添加适量硒肥, 食用菌通过代谢转化将基质中的无机硒转化为有机硒, 从而获得富硒食用菌。黑木耳是一种大众化食用菌, 作为富硒载体, 在转化硒的同时不仅改善自身实体的营养成分, 并在适宜的硒浓度下提高产量。本研究通过水浸提法获得富硒木耳和普通木耳提取物, 并检测出本研究所采用的试验材料水提物的含硒量是普通木耳水提物的 7 倍以上。

活性氧自由基是人体通过有氧代谢过程产生的中间产物。人体正常的生命活动需要适量的自由基存在和参与, 但是当机体内产生过量的自由基, 体内抗氧化系统不能完全清除多余的自由基, 会导致氧化/抗氧化防御能力失衡, 引起氧化损伤^[19]。孔沛筠等^[20]研究发现, 木耳多糖具有良好的天然抗氧化活性。也有研究发现, 硒具有显著的抗氧化能力, 其抗氧化能力与谷胱甘肽过氧化物酶的活性中心有关^[21]。植物中的硒可以通过 Se-H 和 Se=O 两种键合形式与多糖结合形成硒多糖, 是植物转化有机硒的主要形式之一^[22]。

本研究中, 与阳性对照品相比, 在相同浓度范围内, 富硒木耳水提物 AESAA 对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧自由基的清除率均低于 VC 的清除率, 是因为 VC 是最强天然抗氧化剂之一, 而且试验所用为纯品, 而 AESAA 仅仅是粗提物。与阴性对照品相比, 富硒木耳水提物 AESAA 对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧自由基的清除率均显著高于相同浓度的普通木耳水提物 AEAA。推断原因: (1) 硒直接参与构成的硒酶活性中心增多, 抗氧化活性增强; (2) 硒与木耳多糖形成的硒多糖也同时发挥着清除自由基作用。

东北黑木耳产量占全国黑木耳总产量的 75% 以上, 黑木耳生产是东北地区农民增收的最重要产业之一, 提升品质, 从而增加产品附加值是黑木耳产业发展必由之路^[23-25], 本研究所得出结论富硒木耳抗氧化能力显著增加, 为黑木耳产业更多生产富硒木耳、继续扩大优质黑木耳资源及开发利用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] M Roman, P Jitaru, C Barbante. Selenium biochemistry and its role for human health [J]. *Metallomics* 2014, 6(1): 25-54.
- [2] K Fink, M Moebes, C Vetter, et al. Selenium prevents microparticle-induced endothelial inflammation in patients after cardiopulmonary resuscitation [J]. *Crit Care*, 2015, 19(1): 58-69.
- [3] 中国科学院地理研究所化学地理研究室环境与地方病组.

- 我国克山病病带与非病带发硒分布的地理规律[J]. 地理学报, 1982(2): 136-143.
- [4] 万水霞, 蒋光月. 富硒栽培对黑木耳菌丝生长及产量的影响[J]. 中国食用菌, 2016, 35(6): 28-30.
- [5] 梁英, 杨宏志. 黑木耳富硒栽培研究[J]. 食用菌学报, 2000, 7(4): 34-37.
- [6] 王晶晶, 宋志峰, 丁荣春, 等. 富硒木耳水提物对链脉佐菌素诱导的糖尿病肾损伤的保护作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(5): 410-414.
- [7] Chunyan Wei, Jingjing Wang, Cuicui Duan, et al. Aqueous extracts of Se-enriched *Auricularia auricula* exhibits antioxidant capacity and attenuates liver damage in high-fat diet/ streptozotocin-induced diabetic mice[J]. J Med Food, 2020, 23(2): 153-160.
- [8] Wang J J, Zhang T Z, Liu X X, et al. Aqueous extracts of Se-enriched *Auricularia auricula* attenuates D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress and neuro-inflammation via suppressing RAGE/MAPK/NF- κ B pathway [J]. Neuroscience Letters, 2019: 106-111.
- [9] 王晶晶. 富硒木耳水提物对糖尿病小鼠肾损伤的保护作用及机制研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [10] Mao G, Zou Y, Feng W, et al. Extraction, preliminary characterization and antioxidant activity of Se-enriched Maitake polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 213-219.
- [11] Chen R, Liu Z, Zhao J, et al. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*[J]. Food chemistry, 2011, 127(2): 434-440.
- [12] Zhu Z Y, Liu F, Gao H, et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity of selenium polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 1090-1099.
- [13] 庞中好. 四角菱角茎多酚的提取及体外抗氧化、抗肿瘤活性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
- [14] 王晓宇, 杜国荣, 李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(3): 247-252.
- [15] 郭雪峰, 岳永德, 孟志芬, 等. 用清除羟自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(2): 508-511.
- [16] 程德竹, 杜爱玲, 李成帅, 等. 生姜提取物对邻苯三酚自氧化生成超氧自由基的清除[J]. 中国调味品, 2014, 39(11): 35-39.
- [17] 刘慧. 桃果实酚类物质及其抗氧化功能研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [18] Muñoz A H S, Wrobel K, Corona J F G, et al. The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*[J]. Mycol Res, 2007, 111(5): 626-632.
- [19] Ray P D, BoWen H, Yoshiaki T. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. Cell Signal, 2012, 24(5): 981-990.
- [20] 孔沛筠, 常雅宁, 聂嘉睿, 等. 木耳多糖提取工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J]. 食品与药品, 2018, 20(3): 187-193.
- [21] Rotruck J, Pope A, Ganther H, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase [J]. Science, 1973, 179(4073): 588-590.
- [22] 刘春延. 富硒黑木耳硒多糖提取、纯化及抗氧化活性的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.
- [23] 李桂珠, 许运新. 黑木耳产业发展前景分析[J]. 吉林农业科学, 2007, 32(1): 63-65.
- [24] 王广慧, 王佩华, 王鹏. 黑木耳多糖提取条件的研究[J]. 吉林农业科学, 2010, 35(5): 54-57.
- [25] 唐顺英. 浅析食用菌业发展状况与对策[J]. 吉林农业科学, 2005, 30(4): 64-65.

(责任编辑: 王丝语)