

## 红曲金钗石斛双向发酵产品抗氧化活性的研究

侯素媛<sup>1</sup>, 周礼红<sup>2</sup>, 刘磊<sup>2</sup>

(1. 贵州大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学生命科学院, 贵阳 550025)

**摘要:** 为筛选适合与金钗石斛双向发酵的红曲霉菌株, 研究双向发酵的药性菌质是否具有高抗氧化活性, 采用 ABTS 法、DPPH 法和抗脂质过氧化法 3 种体外抗氧化模型比较 2 株具有抗氧化活性的红曲霉菌株与金钗石斛双向发酵药性菌质抗氧化活性。结果表明, Vc 对照组的 ABTS 清除率和 DPPH 清除率明显高于各发酵组及金钗石斛组, 而抗脂质过氧化抑制率却低于 2 株不同红曲霉菌株与金钗石斛双向发酵药性菌质, 具有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 2 株不同红曲霉菌株与金钗石斛双向发酵药性菌质的 3 种体外抗氧化活性均高于红曲霉单独发酵产品和金钗石斛, 尤其菌株 GZUM-123 双向发酵药性菌质的抗脂质过氧化抑制率提高最多为 30.09%, 具有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。此研究可为新型双向发酵的抗氧化产品的开发提供一定的依据。

**关键词:** 红曲霉; 金钗石斛; 抗氧化活性

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)04-0600-04

### Antioxidant activity of mycoplasm from bidirectional fermentation of *Monascus* and *Dendrobium nobile* Lindl.

HOU Suyuan<sup>1</sup>, ZHOU Lihong<sup>2</sup>, LIU Lei<sup>2</sup>

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025;

2. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025)

**Abstract:** In order to screen strains from a bidirectional fermentation of *Monascus* and *Dendrobium nobile* and study the antioxidant activity of mycoplasm from a bidirectional fermentation medicine, three antioxidative modes *in vitro*, ABTS free radical scavenging, DPPH free radical scavenging, and inhibiting lipid peroxidation, were compared. Results showed that Vc group had higher ABTS and DPPH scavenging ratios compared to bidirectional ferment products, *Monascus* ferment products and *Dendrobium nobile*, while its anti-lipoperoxidation inhibition ratio was lower than those from the bidirectional fermentation medicinal mycoplasm of the two strains ( $P < 0.01$ ). The bidirectional fermentation medicinal mycoplasm from two *Monascus* strains and *Dendrobium nobile* had a higher antioxidant activity compared to individual *Monascus* ferment products and *Dendrobium nobile*. In three modes *in vitro*, the two-way fermentation medicinal mycoplasm of strain GZUM-123 had the highest inhibiting lipid peroxidation with an increase of 30.09% ( $P < 0.01$ ). The study can provide a foundation for the development of a new bidirectional fermentation.

**Key words:** *Monascus*; *Dendrobium nobile* Lindl; antioxidant activity

双向发酵是指用真菌为发酵菌种, 利用药材或药渣作为药性基质共同构成发酵组合进行的发酵的方式。双向发酵后菌质相比于原药材主要有几个方面的效果: 增强药效, 扩大用途, 减轻毒性。庄毅等<sup>[1]</sup>将黄芪药材添加到营养基质中, 试验证实发酵产物“槐芪菌质”提取清膏具有良好的保肝作用, 如

对四氯化碳肝损伤、免疫性肝损伤等都有良好作用; 谢小梅等<sup>[2]</sup>对灵雷菌质进行急性毒性试验发现, 相对于雷公藤生药, 灵雷菌质的 LD<sub>50</sub> 显著提高, 说明其毒性降低, 且在众多处理雷公藤方法中灵雷菌质的毒性最低; 现已有诸多学者利用双向发酵来研究如何提高真菌的抗氧化能力, 如 Pyo 和 Lee<sup>[3]</sup>, 在红曲

收稿日期: 2015-03-04

作者简介: 侯素媛, 硕士研究生。E-mail: sophie\_113@126.com

\* 通信作者: 周礼红, 副教授。E-mail: lhzhou33@126.com

霉发酵时添加了大豆提取物, 比未添加大豆的组分 DPPH 的清除率提高了 5.2~7.4 倍; Kuo 等<sup>[4-5]</sup>将大蒜汁和姜汁分别添加到红曲的液态发酵培养基中, 都能极大地提高红曲发酵液的抗氧化能力。

红曲(*Monascus-fermented rice or red yeast rice*) 是一种以大米为原料, 经红曲霉(*Monascus*)发酵制成的紫红色米曲。其在我国已有一千多年的历史。自从 20 世纪 70 年代日本 Endo 教授<sup>[6]</sup>首次在红色红曲霉(*Monascus ruber*)中分离出著名的降脂活性物质莫纳克林 K (*Monacolin K*) 以来, 红曲霉代谢产物中的生理活性物质不断被众多国内外学者挖掘出来。有研究报道在红曲众多次级代谢产物中的 dimerumic acid、酚类、黄酮类、色素类、dihydromonacolin-MV 和类黄酮等都具有较好的抗氧化活性作用, 特别是 dimerumic acid, 其在较低的浓度就能表现出很强的抗氧化活性。金钗石斛作为中药石斛的基源植物之一被收入《中国药典》(2005 年版); 其入药始载于《神农本草经》, 被列为上品, 性微寒、味甘; 具有清热养阴、生津益胃、润肺止咳等功效。目前有研究表明石斛中的酚酸类联苜类和多糖成分具有抗氧化活性<sup>[7-9]</sup>。为此, 作者采用红曲霉与金钗石斛进行双向发酵以期两者在相互作用中产生的活性物质具有更强的抗氧化能力, 为新型双向发酵的抗氧化产品的开发提供一定的依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** 红曲霉菌株 GZUM-123 和 GZUM-25 均由贵州大学真菌实验室选育与保藏。

**1.1.2 药材及试剂** (1) 药材。金钗石斛茎 *Dendrobium nobile* Lindl (购自贵州赤水金钗石斛种植基地)。

(2) 试剂。DPPH (Sigma 公司), ABTS (Sigma 公司)。

**1.1.3 仪器** DK-98-1 电热恒温水浴锅 (天津泰斯特仪器有限公司), YX280B 灭菌锅 (上海三申公司), SW-CJ-IF 净化工作台 (苏净集团苏州安泰空气技术有限公司), 摇床 (金坛市杰瑞尔仪器仪表有限公司), UV9100 紫外可见分光光度计 (莱伯泰科有限公司), DH-360A 电热恒温培养箱 (北京科伟兴仪器有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 金钗石斛中药煎汁的制备** 称取 50 g 金钗石斛, 煮沸 30 min, 倒出药汁用 8 层纱布过滤, 加水定容至 1000 mL, 得到金钗石斛水煎汁。

**1.2.2 培养基的制备** (1) 斜面培养基。沙氏琼脂改良培养基: 麦芽糖 5 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 琼脂 20 g, 葡萄糖 20 g, 水 1000 mL, pH 自然。用于红曲霉菌株的斜面培养及形态观察。

(2) 种子液培养基的制备。沙氏琼脂改良培养基: 麦芽糖 5 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 琼脂 20 g, 葡萄糖 20 g, 水 1000 mL, pH 自然。

(3) 发酵培养基的制备。①双向发酵组: 将 20 g 米粉加入 25 mL 金钗石斛水煎汁至于 150 mL 三角瓶中, 121℃ 灭菌 20 min, 用于红曲霉固体培养。

②红曲米对照组: 将 20 g 米粉加入 25 ml 蒸馏水至于 150 mL 三角瓶中, 121℃ 灭菌 20 min, 用于红曲霉固体培养。

**1.2.3 发酵培养方法** 分别将红曲霉菌株 GZUM-25、红曲霉菌株 GZUM-123, 斜面 28℃ 培养 7~11 d; 用无菌吐温生理盐水洗下孢子, 转入带有玻璃珠的无菌三角瓶中, 振荡, 充分打散孢子, 用 4 层无菌镜头纸过滤除去菌丝, 制成终浓度为  $10^6$  个·mL<sup>-1</sup> 的均一孢子悬液, 吸取 5 mL 孢子悬液接种到种子液培养基上。在 30℃、200 r·min<sup>-1</sup> 的旋转式摇床上培养 48 h 得到种子液。将 2 种菌株培养好的种子液按 10% (v/v) 分别接种到双向发酵组培养基和红曲米对照组培养基上, 在 30℃ 恒温培养箱中培养 6 d。

**1.2.4 抗氧化活性检测样品的制备** (1) 双向发酵组与红曲米组检测样品的制备。以 30% 乙醇为提取溶剂, 取定量药性菌质样品和红曲米样品, 料液比 1:30, 提取温度 60℃, 提取时间 12 h。取一定量提取液 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液, 将上清液经微孔滤膜过滤, 进行抗氧化活性的检测。

(2) 金钗石斛组检测样品的制备。取一定量金钗石斛水煎汁 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液, 将上清液经微孔滤膜过滤, 进行抗氧化活性的检测。

(3) V<sub>C</sub> 组检测样品的制备。精密称取 50.00 mg V<sub>C</sub> 置于 25 mL 容量瓶内, 用蒸馏水准确定溶至刻度线, 充分混匀得到浓度为 2.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的 V<sub>C</sub> 对照组。

**1.2.5 抗氧化能力的测定** 采用 ABTS 自由基清除实验、DPPH 自由基清除实验、抗脂质过氧化抑制实验 3 种体外抗氧化试验, 对双向发酵组、红曲米组、金钗石斛和 V<sub>C</sub> 组的体外抗氧化活性进行分析。

(1) ABTS+自由基清除实验<sup>[10]</sup>。将 2.5 mL 的 ABTS (7 mmol·L<sup>-1</sup>) 和 44 μL 的 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (140 mmol·L<sup>-1</sup>) 溶液充分混合, 在室温、避光条件下静置过夜 (12~16 h), 得到 ABTS+储备液。将 ABTS+储备液用 PBS 缓冲液 (20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 值为 7.4) 稀释, 用紫外分光光度计测量, 使其在波长 734 nm 处的吸光度值为

0.700±0.002, 得到 ABTS+工作液。取 30 μL 样品与 3.0 mL ABTS+工作液混合, 充分反应 6 min, 常温条件下在波长 734 nm 处测定吸光度值。

$$\text{清除率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

式中:  $A_{\text{空白组}}$  指以 30 μL 甲醇代替样品测得的吸光度值。

(2) DPPH 自由基清除实验<sup>[10]</sup>。取 1 mL DPPH (0.1 mmol·L<sup>-1</sup>, 乙醇为溶剂), 0.95 mL Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol·L<sup>-1</sup>, pH 值为 7.4), 1 mL 乙醇和 50 μL 试验品混合 30 min 后在波长 517 nm 处常温条件下测定吸光度值, 吸光度值越小, 其对自由基的清除能力越强。计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

式中:  $A_{\text{空白组}}$  指以 50 μL 甲醇代替样品测得的吸光度值。

(3) 脂质过氧化抑制实验<sup>[11]</sup>。使用 10% 鸡蛋黄匀浆液(体积分数)作为反应的脂质媒介。取 0.1 mL 样品溶液同 0.5 mL 鸡蛋黄匀浆液、0.4 mL 纯水及 50 μL 硫酸亚铁溶液(FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 70 mmol·L<sup>-1</sup>)混合, 于 37℃ 下孵育 30 min, 迅速加入 1.5 mL 乙酸溶液(20%, 体积分数, pH 为 3.5)及 1.5 mL 硫代巴比妥酸溶液(0.8%, 质量浓度, 用 1.1% 十二烷基硫酸钠溶液配制), 高速混匀后于 95℃ 下水浴 60 min。待反应物冷却至室温后, 再加入 5 mL 正丁醇, 充分摇匀, 混合物在 5000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 15 min, 取上清液测定其在 532 nm 处的吸光度。

$$\text{脂质过氧化抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

式中:  $A_{\text{空白组}}$  指以 0.1 mL 纯水代替样品测得的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 ABTS+自由基的清除

图 1 表明, V<sub>C</sub> 对 ABTS+自由基清除率几乎能达到 100%。菌株 GZUM-25 和菌株 GZUM-123 与金钗石斛双向发酵药性基质对 ABTS+自由基清除率分别为 74.05% 和 50.47%, 都显著低于 V<sub>C</sub>, 但是显著高于金钗石斛( $P < 0.01$ )。2 种菌株菌株与金钗石斛双向发酵药性基质对 ABTS+自由基清除率较红曲霉菌株发酵产物均有提高, 尤其菌株 GZUM-123 与金钗石斛双向发酵药性基质对 ABTS+自由基清除率较红曲霉菌株发酵产物提高了 9.96% ( $P < 0.05$  具有显著差异), 菌株 GZUM-25 与金钗石斛双向发酵药性基质对 ABTS+自由基清除率较红曲霉菌株发酵产物提高了 6.71% ( $P < 0.05$ )。

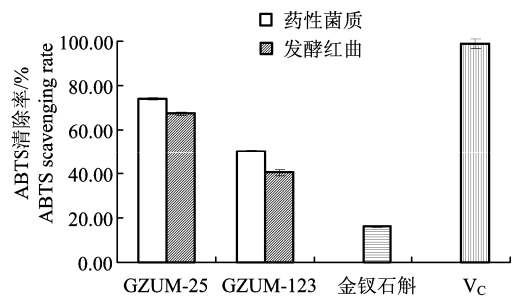


图 1 不同提取物对 ABTS 自由基清除活性  
Figure 1 Scavenging ABTS radical activities of different extracts

### 2.2 DPPH 自由基的清除

V<sub>C</sub> 对 DPPH 自由基清除率几乎能达到 100%。菌株 GZUM-25 和菌株 GZUM-123 与金钗石斛双向发酵药性基质对 DPPH 自由基清除率分别为 32.14% 和 21.43%, 都显著低于 V<sub>C</sub>, 但是显著高于金钗石斛( $P < 0.01$ ) (见图 2)。2 种菌株与金钗石斛双向发酵药性基质对 DPPH 自由基清除率较红曲霉菌株发酵产物均有提高, 尤其菌株 GZUM-25 与金钗石斛双向发酵药性基质对 DPPH 自由基清除率较红曲霉菌株发酵产物提高了 10.71% ( $P < 0.01$ ), 菌株 GZUM-123 与金钗石斛双向发酵药性基质对 DPPH 自由基清除率较红曲霉菌株发酵产物提高了 4.16% ( $P > 0.05$ )。

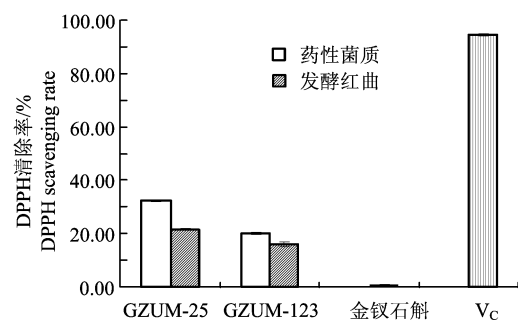


图 2 不同提取物对 DPPH 自由基清除活性  
Figure 2 Scavenging DPPH radical activities of different extracts

### 2.3 脂质过氧化抑制实验

菌株 GZUM-25 和菌株 GZUM-123 与金钗石斛双向发酵药性基质对脂质过氧化抑制率分别为 61.69% 和 59.31%, 都显著高于 V<sub>C</sub> 和金钗石斛( $P < 0.01$ ) (见图 3)。2 种菌株与金钗石斛双向发酵药性基质对脂质过氧化抑制率较红曲霉菌株发酵产物均有很大的提高, 菌株 GZUM-25 与金钗石斛双向发酵药性基质对脂质过氧化抑制率较红曲霉菌株发酵产物提高了 26.2% ( $P < 0.01$ )。菌株 GZUM-123 与金钗石斛双向发酵药性基质对脂质过氧化抑制率

较红曲霉菌株发酵产物提高了 30.09% ( $P < 0.01$ )。

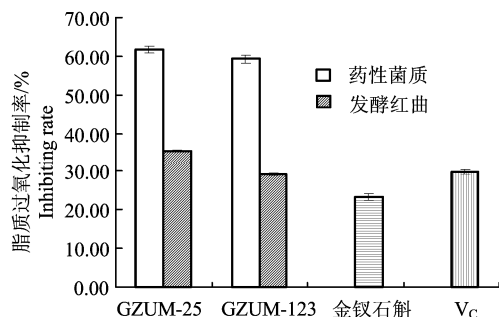


图 3 不同提取物对脂质过氧化抑制活性

Figure 3 Inhibiting lipid peroxidation of different extracts

### 3 讨论

将 2 种不同菌株的双向发酵药性菌质和红曲米组相比较, ABTS+清除率、DPPH 清除率和脂质过氧化抑制率都有所提高, 尤其菌株 GZUM-123 双向发酵药性菌质的抗脂质过氧化抑制率提高最多为 30.09%。药性菌质与一般发酵的药用菌质和药性菌质(药材)相比抗氧化活性增强。

同时可以看出, 除了 ABTS+自由基清除实验外, DPPH 自由基清除实验和脂质过氧化抑制实验结果均显示, 2 种菌株的发酵红曲与金钗石斛的清除率之和均小于药性菌质的清除率。3 种体外测定方法的原理各不相同, ABTS 法能准确测定多成分混合物的抗氧化能力, 但时间对该方法的测定结果有影响, 具有不同抗氧化反应速度的物质在不同时间测出抗氧化活性不同; DPPH 法自由基稳定, 灵敏度高, 无需其他复杂反应, 对路易斯碱或溶剂敏感, 在光照的富氧环境中易分解, 易与烷基类自由基发生反应; 脂质过氧化反应是一类自由基链式反应, 既产生自由基, 又需要自由基进一步推动, 因此, 脂质过氧化实验可综合评价活性物质对自由基的清除与脂类的保护作用, 但亚铁离子的浓度对测定结果有一定影响。因此, 3 种实验方法各有优缺点, 而 DPPH 自由基清除实验和脂质过氧化抑制实验均说明药性菌质抗氧化活性的提高, 不单单是药用菌质与金钗石斛活性物质的简单相加, 有可能在双向发酵的过程中代谢流的变化造成抗氧化活性成分含量增加或是产生了新的抗氧化活性物质。这需

要我们对双向发酵的机理作进一步的深入研究, 为今后系统研究双向发酵产生抗氧化活性物质奠定基础, 这对食品、医药、化妆品工业新产品的开发均有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 庄毅, 洪净. 药用真菌双向性固体发酵工程与中成药渣再开发[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(22): 1918-1919.
- [2] 谢小梅, 贺婧, 罗闯丹, 等. 灵芝双向发酵雷公藤的解毒持效作用[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1925-1929.
- [3] Pyo Y H, Lee T C. The potential antioxidant capacity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Monascus* fermented soybean extracts: evaluation of *Monascus*-fermented soybean extracts as multifunctional food additives[J]. Journal of Food Science, 2007, 72: s218-s223.
- [4] Chia K F, Wang T S, Yang P L, et al. Antioxidant activity of liquid-state fermentation products of *Monascus pilosus* grown in garlic-containing medium[J]. Journal of Food Science, 2006, 71: s456-s460.
- [5] Kou C F, Hou M F, Wang T S, et al. Enhanced antioxidant activity of *Monascus pilosus* fermented products by addition of ginger to the medium[J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 1-8.
- [6] Endo A, Monacolin K. A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. The Journal of Antibiotics, 1979, 32: 852-854.
- [7] Guan Z B, Li Z L, Li E R. A rare and endangered medicinal plant: *Dendrobium nobile*[J]. Chin Wild Plant Resour, 2002, 21(4): 36-37.
- [8] Zhang G N, Bi Z M, Wang Z T, et al. Advances in studies on chemical constituents from plants of *Dendrobium Sw.*[J]. Chin Tradit herb Drugs, 2003, 34(6): 5-8.
- [9] 张雪, 续洁琨, 王乃利, 等. 金钗石斛中联苜类和酚酸类成分的抗氧化活性研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(11): 829-832.
- [10] 肖翔, 周立平, 马新. 红曲菌发酵中添加紫苏叶提取物对其抗氧化活性的影响[J]. 中国酿造, 2011, 232(7): 50-53.
- [11] 曾维才, 石碧. 天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J]. 化工进展, 2013, 32(6): 1205-1212.
- [12] 王身艳, 余黎, 蒋亚平, 等. 双向发酵对草乌中乌头碱类成分含量影响及菌质抗炎镇痛作用的初步研究[J]. 中医药生物技术, 2011, 6(4): 246-249.
- [13] 许晓燕, 郑林用, 李艳, 等. 灵丹菌双向发酵工艺及药效品质研究[J]. 中国食用菌, 2010, 29(2): 28-31.