微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn
Nov. 20, 2013, 40(11): 2030−2036
© 2013 by Institute of Microbiology, CAS

研究报告

金花菌黄色素的稳定性及其抗氧化活性研究

李玉婷　吕嘉枥*

(陕西科技大学 生命科学与工程学院　陕西 西安　710021)

摘　要：【目的】评价茯砖茶金花菌黄色素的稳定性和抗氧化性能。【方法】以色素保存率为指标，研究温度、光照和 pH 对黄色素稳定性的影响。并对还原能力、DPPH·清除能力和 H_2O_2 诱导的红细胞溶血抑制能力进行测定，考察黄色素的抗氧化性能。【结果】该色素在低温下保存 7 d 保存率高于 98.88%，温度升高，保存率降低；光照尤其是太阳光对其稳定性影响较大；黄色素在 pH 2−10 较稳定，pH 12 时色素保存率仅为 46.22%。低浓度黄色素具有明显高于维生素 E (V_E)的还原能力、DPPH·清除率和溶血抑制率，其中 DPPH·的 EC_{50} 低于 50 mg/L。【结论】金花菌黄色素对热、酸和弱碱较稳定，对强碱和太阳光极不稳定，并有优良的抗氧化能力，研究和开发前景良好。

关键词：冠突散囊菌，色素，稳定性，抗氧化性

Study on stability and antioxidant activity of the yellow pigments from *Eurotium cristatum*

LI Yu-Ting　LÜ Jia-Li*

(*College of Life Science & Engineering*, *Shaanxi University of Science & Technology*, *Xi'an*, *Shaanxi* 710021, *China*)

Abstract: [Objective] Stability and antioxidant activity of the yellow pigments from *Eurotium cristatum* were evaluated. **[Methods]** Taking preservation rate of the pigments as an indicator, the effect of different temperature, light and pH on the stability were assessed. Antioxidant activity of the yellow pigments was investigated by three methods: reducibility, DPPH· scavenging activity and inhibition of erythrocyte hemolysis induced by H_2O_2. **[Results]** The results

基金项目：陕西省科技厅统筹项目(No. 2011KTCQ03-08)
*通讯作者：Tel: 86-29-86168583; ✉: lujl@sust.edu.cn
收稿日期：2012-12-03；接受日期：2013-04-02

of stability test showed that preservation rate of the pigments was more than 98.88% after low-temperature treatment for 7 days and declined as the temperature increasing. Light, especially sunlight, resulted in an obvious loss of stability of the pigments. Better stability of the pigments was observed in the range of pH 2−10. However, preservation rate was lower than 46.22% at pH 12. At low concentration the pigments had higher reducibility, DPPH· scavenging activity and inhibition rate of erythrocyte hemolysis than V_E, and the hemi-inhibitable concentration (EC_{50}) to DPPH· was lower than 50 mg/L. **[Conclusion]** The yellow pigments from *Eurotium cristatum* had better stability in the condition of heat and acid but alkali and sunlight were not. What's more, the pigments had higher antioxidant activity.

Keywords: *Eurotium cristatum*, Pigments, Stability, Antioxidant activity

金花菌是茯砖茶经发花工序自然形成的一种益生菌，经菌种鉴定为冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)[1−3]。研究表明[4−6]，茯砖茶具有显著的促消化、降血脂、调节糖代谢和抑制肿瘤细胞等功效，而其作用机理研究尚不成熟。但在茯砖茶发酵过程中发现[7−9]，其多种功效成分均随着金花菌的产生而有不同程度的变化，而相关药理试验[10−12]也证实了金花菌提取物具有良好的减肥降脂、抑菌和抗氧化等益生功能。因此，金花菌的生长及代谢对茯砖茶品质的形成起到了至关重要的作用。

金花菌经培养可形成金黄色的闭囊壳，其含有大量黄色物质。王波等[13]从金花菌中提取获得了黄色素的提取液，宋鲁彬[14]发现茯砖茶的石油醚洗脱组分中含有大量的色素物质，但有关金花菌黄色素组成和功能性的研究还鲜有报道。本试验采用麸皮固体培养基培养获取大量金黄色的金花菌闭囊壳，从中提取得到金花菌黄色素，并初步研究了黄色素的稳定性和抗氧化能力，以揭示金花菌黄色素与茯砖茶保健功效的关系。从而，为探究茯砖茶和金花菌的保健机理提供了一条新思路，并为金花菌黄色素的深入研究和开发奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种: 由陕西科技大学微生物研究室从陕西苍山茶叶有限责任公司所产茯砖茶中分离纯化得到。经 DNA 序列分析，其 ITS 片段为 532 bp，与 NCBI 数据库中的冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*, Accession No.: GU784865)进行比对，相似度为 100%。

1.1.2 培养基: 麸皮和水以一定配比混合均匀，于 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 试剂: 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·)标准品来自 Sigma 公司；肝素钠、V_E 为生化试剂；其他化学试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 黄色素的含量测定方法: 取恒重的黄色素精制品 0.025 1 g，用 95%乙醇溶解并定容至 50 mL，配制 500 mg/L 黄色素母液。母液稀释至合适浓度，于 300−600 nm 扫描，确定黄色素的最佳检测波长 λ_{max}。将上述黄色素母液稀释至 10、20、30、40、50、60 和 70 mg/L 梯度液，以 95%乙醇为空白对照，分别于 λ_{max} 处测定其吸光值。以黄色素浓度为横坐标(X, mg/L)、吸光值(A)

为纵坐标作直线，计算黄色素的标准曲线回归方程。由待测样品在 λ_{max} 处的吸光值 A 代入回归方程，即得黄色素的含量。

1.2.2 黄色素保存率的计算：以色素保存率为指标进行金花菌黄色素稳定性的研究。色素保存率根据下面公式计算：

$$色素保存率(\%)=\frac{C_t}{C_0}\times 100$$

式中：C_t 为某时刻样品溶液中黄色素的含量(g/L)；C_0 为样品溶液中黄色素的初始浓度(g/L)。

1.2.3 黄色素的提取、精制及组分分析：(1) 黄色素的提取和精制：金花菌接种至 1.1.2 培养基，于 28 °C 恒温培养 5 d，即得其固体培养物。将金花菌培养物研细，以 15 倍石油醚索氏提取 1 h，得金花菌黄色素提取液。该提取液在 40 °C、0.8×10^5 Pa 真空度下浓缩后，与适量硅胶拌样，采用湿法硅胶柱层析进行分离纯化，洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯:甲醇:冰乙酸(40:10:5:1, *V/V/V/V*)，收集黄色素组分，浓缩、冷却结晶，即得黄色素精制品。

(2) 黄色素的组成分析：配制 0.5 g/L 的黄色素精制品溶液，采用高效液相色谱(HPLC)法，分析色素精制品的组成。色谱条件为，色谱柱：Diamonsil C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；检测波长：λ_{max}；流速：1 mL/min；进样量：20 μL；柱温：室温；流动相：甲醇:乙腈:水饱和二氯甲烷(5:80:15, *V/V/V*)。

1.2.4 金花菌黄色素的稳定性研究：(1) 温度处理：将一定浓度的黄色素溶液分别于 4 °C、20 °C、40 °C、60 °C 和 80 °C 恒温避光保存，每 24 h 取样一次，冷却至室温，测定 λ_{max} 处的吸光值(n=3)，并计算其色素保存率，比较不同温度下黄色素的稳定性。

(2) 光照处理：将一定浓度的黄色素溶液于 30 °C 分别经紫外灯、日光灯、太阳光照射，以避光处理为对照，每 24 h 测定一次吸光值(n=3)，并计算其色素保存率，比较不同光照条件下黄色素的稳定性。

(3) pH 处理：分别将黄色素溶液的 pH 调至 2、4、6、8、10 和 12，于 30 °C 避光条件下保存，每 24 h 测定一次吸光值(n=3)，并计算其色素保存率，比较不同 pH 条件下黄色素的稳定性。

1.2.5 金花菌黄色素的抗氧化性能研究：(1) 还原能力的测定：采用铁氰化钾还原法[15]。分别取浓度为 0.01、0.04、0.07、0.10、0.13、0.16 和 0.19 g/L 的黄色素溶液 2.5 mL，依次加入 0.2 mol/mL 磷酸缓冲溶液 2.5 mL、1%铁氰化钾溶液 2.5 mL，混匀，于 50 °C 恒温 20 min，冷却，添加 10%三氯乙酸溶液 2.5 mL 反应，取混合液 5 mL，并加入蒸馏水 5 mL 和 0.1%三氯化铁溶液 1 mL，充分振荡均匀，避光静置 10 min，以蒸馏水为空白对照，分别测定 700 nm 波长处的吸光值 A。以 V_E 作为阳性对照，分析比较金花菌色素的还原能力。

(2) 清除 DPPH·能力的测定[16]：分别取 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 和 0.8 g/L 的黄色素溶液 1 mL，加入 50 mg/L 的 DPPH·标准溶液 3 mL，混匀，室温静置 30 min，以 95%乙醇为空白对照，测定 517 nm 下的吸光值 A_1；以乙醇代替样品液进行反应，其 517 nm 处的吸光值记作 A_0；以乙醇代替 DPPH·标准液进行反应，其 517 nm 处的吸光值记作 A_2。以 V_E 作阳性对照，分析比较该色素的 DPPH·清除能力。色素对 DPPH·的清除能力根据下面公式计算：

$$\text{DPPH}\cdot 清除率(\%)=(1-\frac{A_1-A_2}{A_0})\times 100 。$$

(3) H_2O_2 诱导的红细胞溶血试验：参照文献[17]方法并稍作改进：分别取 0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 和 20.000 mg/L 的黄色素溶液 0.1 mL，加入 2%家兔红细胞悬液 1 mL，混

匀, 加 2 mol/L 过氧化氢(H_2O_2)溶液 0.1 mL, 37 °C 保温 1 h, 用 4 mL 生理盐水稀释, 2 000 r/min 离心 5 min, 以生理盐水为空白对照, 测定上清液 415 nm 处的吸光值 A_1。以 0.1 mL 的生理盐水代替样品溶液进行反应, 测定吸光值为 A_0。以 V_E作为阳性对照, 分析比较该色素对红细胞的保护作用。色素的溶血抑制率根据下面公式计算:

$$溶血抑制率(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$ 。

2 结果与分析

2.1 金花菌黄色素的含量测定

由图 1 可知, 金花菌黄色素精制品溶液经紫外扫描后, 在 300−600 nm 波长范围内有明显吸收, 其最佳检测波长 λ_{max} 为 405 nm。标准曲线见图 2, 其回归方程为: Y=0.012 5X−0.024 3, r=0.999 7, 说明金花菌黄色素在浓度为 10−70 mg/L 的范围内线性关系良好。

2.2 金花菌黄色素的组成分析

由金花菌黄色素精制品的 HPLC 图谱(图 3)可知, 该色素主要由 4 种成分组成, 其中保留时间为 7.172 min 的组分所占含量最高。

2.3 金花菌黄色素的稳定性分析

2.3.1 温度对金花菌黄色素稳定性的影响: 由图 4 可知, 金花菌黄色素在 4 °C 和 20 °C 保存

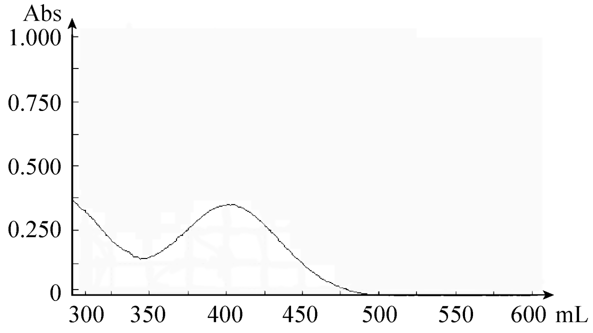

图 1 黄色素的紫外扫描图
Fig. 1 UV scanning of the yellow pigments

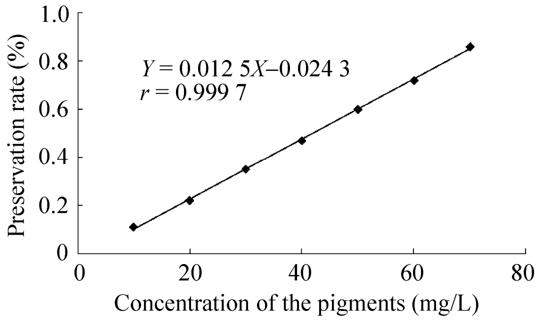

图 2 黄色素的标准曲线
Fig. 2 Standard curve of the yellow pigments

7 d 后, 其色素保存率高达 98.99%和 98.88%。随着温度的升高, 黄色素的稳定性略有下降, 但在 80 °C 条件下保存 7 d, 其色素保存率仍在 82%以上, 说明金花菌黄色素对热较稳定。

2.3.2 光对金花菌黄色素稳定性的影响: 不同光照条件对黄色素稳定性的影响差别较大, 结果如图 5 所示: 该色素溶液放置 7 d 后, 避光保存的色素保存率为 95.41%, 紫外光、日光灯下的色素保存率则下降为 69.95%和 63.76%。而在阳光直射 1 d 后黄色素溶液由黄色变为橙色, 3 d 后色素保存率降至 10%以下。这说明黄色素对光不稳定, 宜避光保存, 使用时应避免太阳光直射。

2.3.3 pH 对金花菌黄色素稳定性的影响: 色素溶液 pH 调至 12 时, 溶液由黄色变为橙红色, 且紫外扫描可见最大吸收峰向短波方向移动, 而 pH 调至 2−10 时, 其最大吸收峰不变、颜色稍变浅。由图 6 可知, 黄色素溶液避光放置 7 d, pH 2−8 条件下的色素保存率均在 90%以上, pH 为 10 和 12 时则分别降至 84.29%和 46.22%。说明金花菌黄色素在酸性、中性和弱碱性条件下较稳定, 在碱性条件下不稳定。

2.4 金花菌黄色素的抗氧化活性分析

2.4.1 还原能力: 由图 7 可知, 金花菌黄色素浓度为 0.01 g/L 时的还原能力与 V_E 相当, 随着色素浓度的增加而还原力明显增强, 且均明显强于同浓度下 V_E 的还原力。

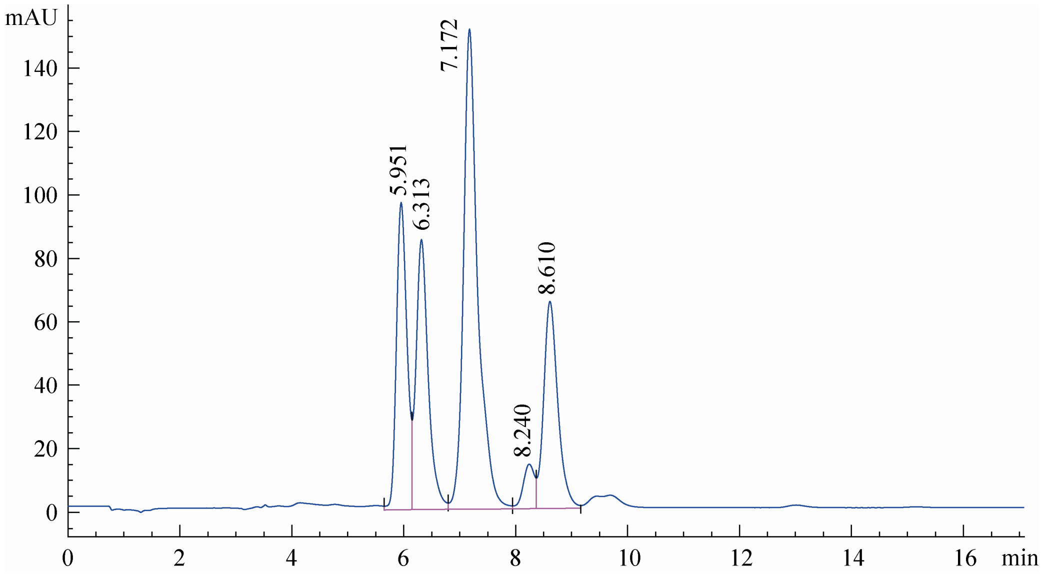

图 3　黄色素精制品的 HPLC 图谱

Fig. 3　HPLC map of the yellow pigments product

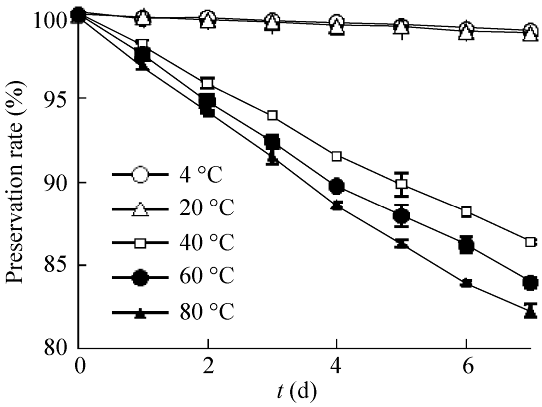

图 4　温度对黄色素稳定性的影响

Fig. 4　Effect of temperature on stability of the pigments

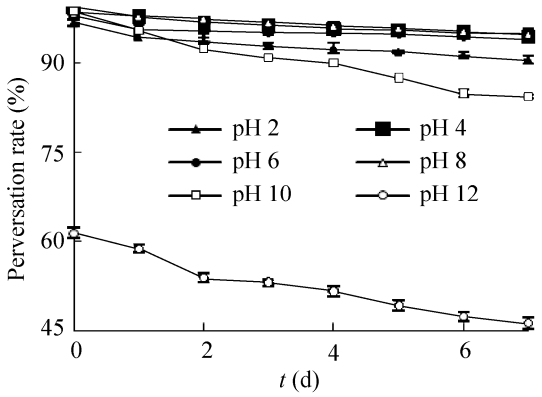

图 6　pH 对黄色素稳定性的影响

Fig. 6　Effect of pH on stability of the pigments

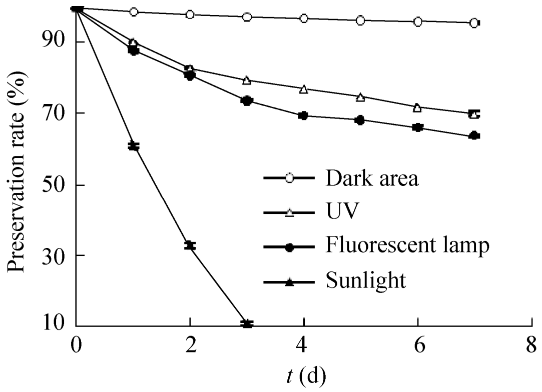

图 5　光照对色素稳定性的影响

Fig. 5　Effect of light on stability of the pigments

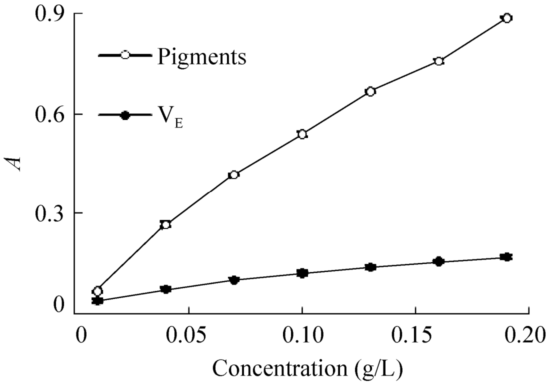

图 7　不同浓度黄色素的还原能力

Fig. 7　Reducibility of the pigments

2.4.2 DPPH·清除能力: 如图8所示, 金花菌黄色素浓度低于 0.1 g/L 时, 其 DPPH·清除能力随着浓度的增加而快速增强, 而当色素浓度高于 0.1 g/L 时, 其 DPPH·清除率稳定在 93%左右, 黄色素的 EC_{50} 低于 50 mg/L。由此可见, 金花菌黄色素对 DPPH·的清除能力明显优于 V_E。

2.4.3 H_2O_2 诱导红细胞溶血抑制能力: 由图 9 可知, 在低浓度范围内, 金花菌色素和 V_E 呈现较强的溶血抑制能力, 且金花菌黄色素的溶血抑制率明显高于 V_E, 但随着样品浓度的升高, 两者的溶血抑制率均降低。黄色素浓度为 1.25−2.50 mg/L 时对红细胞保护作用最强, 溶血抑制率为 21.23%。

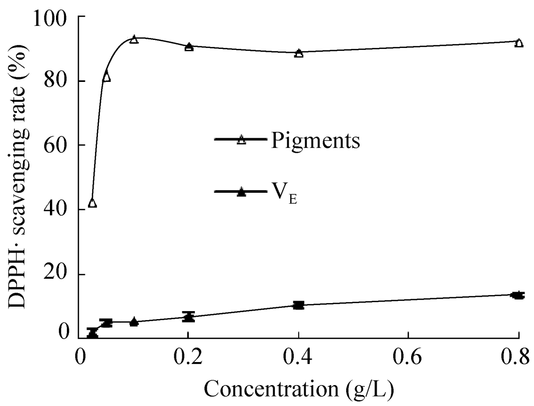

图 8 黄色素对 DPPH 的清除能力

Fig. 8 Scavenging activity to DPPH· of the pigments

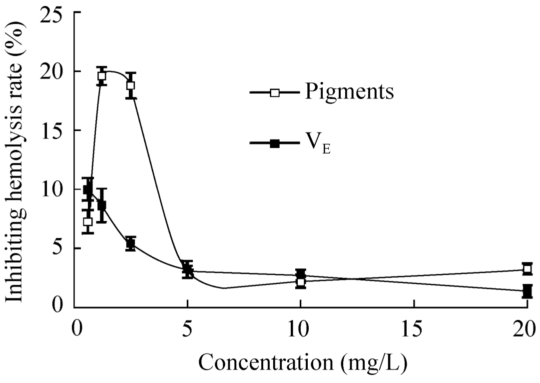

图 9 黄色素对 H_2O_2 诱导红细胞溶血的抑制效果

Fig. 9 Inhibitory effect of the pigments on H_2O_2-induced erythrocyte hemolysis

3 结论

金花菌培养物经索氏提取和硅胶柱层析纯化获得的黄色素精制品为混合色素, 主要含4种组分。试验结果表明, 金花菌黄色素在热、酸和弱碱性条件下较稳定, 在强碱条件下极易被破坏; 其对光较敏感, 在太阳直射下极不稳定, 色素保存率快速下降, 应避光保存。抗氧化性能研究显示, 金花菌黄色素具有良好的抗氧化能力, 其总还原能力、DPPH·清除能力和对 H_2O_2 诱导的红细胞溶血抑制能力均优于 V_E。综上所述, 金花菌黄色素稳定性较好, 且抗氧化性能良好, 具有较高的研究和应用价值。

参 考 文 献

[1] 齐祖同, 孙曾美. 茯砖茶中优势菌种的鉴定[J]. 真菌学报, 1990, 9(3): 176−179.

[2] Xu AQ, Wang YL, Wen JY, et al. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 14−22.

[3] 丁婷, 吕嘉枥. 陕西茯砖茶中"金花"菌的生物学特性分析[J]. 食品工业, 2012(1): 104−106.

[4] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 等. 高通量筛选研究茯砖茶对 FXR 模型的作用[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 331−334.

[5] 余智勇. 茯砖茶抗腹泻作用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2010.

[6] 宋鲁彬, 黄建安, 刘仲华, 等. 中国黑茶对消化道肿瘤的作用[J]. 茶叶科学, 2009, 29(3): 191−195.

[7] 刘作易. 一种决定茯砖茶品质的重要真菌——"金花"菌的研究进展[J]. 贵州茶叶, 1993, 74(2): 33−35.

[8] 黄浩, 黄建安, 李适, 等. 茯茶"散茶发花"加工过程中茶多酚和碳水化合物及冠突散囊菌数量的变化研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(15): 227−232.

[9] 欧阳梅, 熊昌云, 屠幼英, 等. 冠突散囊菌对茶叶品质成分及其抗氧化活性影响[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 343−348.

[10] 李佳莲, 胡博涵, 赵勇彪, 等. 冠突散囊菌发酵液的抑菌作用[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 157−160.

[11] 杨抚林. 冠突散囊菌液体发酵工艺及其发酵液对消化酶活性影响的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2005.
[12] 袁勇, 黄建安, 徐小江, 等. 茯茶中"金花"孢子粉提取物对体外诱导的非酒精性脂肪肝细胞内甘油三酯代谢的影响[J]. 茶叶科学, 2011, 31(2): 129−135.
[13] 王波, 于汉寿, 刘雪慧, 等. 散囊菌黄色素的提取及稳定性研究[J]. 生物学杂志, 2009, 26(3): 63−65, 71.
[14] 宋鲁彬. 中国黑茶药理功能评价及活性物质研究[D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2008.
[15] 赵艳红, 李建科, 李国秀. 天然抗氧化物体外活性评价方法的优选与优化[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 64−69.
[16] 胡喜兰, 韩照祥, 陶莹, 等. DPPH·法测定17种植物的抗氧化活性[J]. 食品科技, 2006(10): 264−268.
[17] 王关林, 田兵, 方宏筠, 等. 芦荟抗氧化物质活性及对红细胞的保护作用[J]. 营养学报, 2002, 24(4): 380−384.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

"高校教改纵横"栏目, 是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目, 也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟, 一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台, 同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表, 是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告, 特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线, 撰写的稿件内容必须要有新意、要实用, 不是泛泛地叙述教学设计与过程, 而是确实有感而发, 是教学工作中的创新体会, 或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 促进高校生物学教学的发展, 更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时, 为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台, 本栏目还开辟了"名课讲堂"版块, 邀约相关生命科学领域, 如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点, 推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文, 为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台, 促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！