

几种食用菌多糖的提取与抗氧化性研究

魏 华, 张 娣, 陆 玲, 陈福程

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物与功能基因组学重点实验室,
江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210023)

[摘要] 采用热水浸提法分别提取香菇(*Lentinus edodes*)、木耳(*Auricularia polytricha*)、银耳(*Tremella*)、猴头菇(*Hericium erinaceus*)、茶树菇(*Agrocybe chaxinggu*) 5 种食药两用菌子实体中的水溶性多糖, 子实体粉末在一定的料水比下热水浸提, 胰蛋白酶法脱杂蛋白, 乙醇沉淀得到精多糖。并采用苯酚-硫酸法测其糖含量, DPPH(1, 1-二苯基-2-三硝基苯胍)法检测其抗氧化性。结果显示, 茶树菇的精多糖得率最高, 为 4.81%, 香菇其次, 木耳最低; 含糖量猴头菇最高, 为 53.9%, 木耳最低; 5 种食药两用菌子实体多糖均具抗氧化性、DPPH 清除作用, 茶树菇最强, 浓度为 1.13 mg/mL 时清除率为 50%, 香菇次之, 银耳最弱。

[关键词] 多糖, 食用菌, 分离纯化, 总糖含量, 抗氧化性

[中图分类号] Q539 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2017)02-0072-04

Extraction, Purification and Antioxidant Activities of Several Polysaccharides from Edible and Medicinal Fungi

Wei Hua, Zhang Di, Lu Ling, Chen Fucheng

(School of Life Sciences, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Microbiology, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Water soluble polysaccharide were extracted by hot water from five kinds of edible and medicinal fungus—*Lentinus edodes*, *Auricularia polytricha*, *Tremella*, *Hericium erinaceus*, *Agrocybe chaxinggu*. First, sporophore powder were extracted by hot water in certain ratio of material to water. And, hybrid protein were removed by trypsin. Then, refined polysaccharide were obtained by ethanol precipitation. The sugar content was tested by phenol sulfuric acid method. The antioxidant activity was detected by the DPPH(1, 1-two-2-three dinitrophenylhydrazine) method.

Key words: polysaccharide, edible mushroom, isolation and purification, total sugar content, antioxidation

科学研究表明, 衰老、癌症、动脉粥样硬化、糖尿病和关节炎诸多疾病都与过量自由基的产生相关, 并且环境污染、生活压力大等外界因素更会导致体内自由基浓度大大增加。而抗氧化活性物质以其能够直接或间接清除自由基的能力而越来越受到各界重视。目前常用的抗氧化剂以化学合成抗氧化剂为多, 如二丁基羟基甲苯(BHT)、丁基羟基茴香醚(BHA)、没食子酸内酯(PG)等, 副作用大。因此开发天然高效安全的抗氧化物质具有重要的意义和前景。食用菌富含多种天然活性物质, 其药效和安全性历经多年验证, 是开发新型高效活性化合物的理想来源。

食药两用菌多糖是由食药两用菌中分离得出的由 10 个以上的单糖以糖苷键连接而成的高分子聚合物, 是从食药两用菌子实体、菌丝体、发酵液中分离出的, 在细胞的新陈代谢中起作用的一类活性物质。大量的实验表明, 食药两用菌多糖具有抗氧化^[1]、抗肿瘤^[2]、降血糖^[3]、降血脂^[4]、免疫调节^[5]等作用。有些已经在临床上广泛应用^[6-7]。随着科研对食药两用菌多糖功效的深入探究, 食药两用菌多糖势必会被应用于更多领域, 尤其是制药行业。深入研究食药两用菌多糖的活性成分及其理化性质对于食药两用菌多糖的应用有着非常积极的意义。

本文对香菇、木耳、银耳、猴头菇、茶树菇子实体多糖进行了初步分离纯化, 糖含量的测定和初步的抗

收稿日期: 2015-09-29.

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”第八批高层次人才项目和国家自然科学基金(J1103507)、江苏省高校自然科学基金(16KJB180016)。

通讯联系人: 陆玲, 博士, 教授, 研究方向: 真菌遗传学. E-mail: linglu@njnu.edu.cn

氧化性的检测,旨在为进一步研究这几种食药用菌的提取纯化和药用价值提供理论依据,实验结果表明,几种食用菌多糖均具有较强的抗氧化性,其中茶树菇多糖最强,香菇多糖次之。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 子实体

子实体干品(大山合集团有限公司),粉碎后备用。

1.1.2 试剂

胰蛋白酶、无水乙醇、5%苯酚、浓硫酸、DPPH,实验过程中所用标准葡萄糖均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器

电子天平;722 光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);HH-S4 数显恒温水浴锅(金坛市晶波实验仪器厂);2-16P 离心机(Sartorius)。

1.2 方法

1.2.1 子实体多糖的提取、分离和纯化

1.2.1.1 子实体粗多糖的提取

分别将子实体置于烘箱中烘干,使用粉碎仪粉碎,过 40 目筛,将菇粉按比例加入双蒸水,猴头菇、香菇、茶树菇料水比为 1:20,银耳、木耳料水比为 1:60。90 ℃ 恒温浸提 3 h,抽滤除渣得到浸提液,浸提液浓缩至原来体积的 1/4 至 1/5,加入 4 倍体积的无水乙醇,充分混合,置 4 ℃ 冰箱中醇析过夜,5 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,冷冻干燥至恒重,即得粗多糖。

1.2.1.2 子实体粗多糖的纯化

将子实体粗多糖配制浓度为 10 g/L 的溶液,与 0.01 g/mL 的胰蛋白酶溶液混合,用 NaHCO_3 调节 pH 至 8.1。混合液在 37 ℃ 水浴保温 3 h,然后溶液中加入 4 倍体积的无水乙醇,充分混合,置 4 ℃ 醇析过夜,5 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,冷冻干燥至恒重即得精多糖。

1.2.2 总糖含量的测定^[8]

总糖含量采用苯酚-硫酸法测定:以葡萄糖作为标准品,制作标准曲线并分别计算样品中的含糖量。配制 100 $\mu\text{g/mL}$ 的糖溶液,分别稀释成(0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100) $\mu\text{g/mL}$ 梯度浓度的糖液。取 1 mL 不同浓度的葡萄糖溶液,分别加入 0.5 mL 的 5% 苯酚溶液和 2.5 mL 99.9% 的浓硫酸,静置 20 min 后,在 490 nm 处测定吸光值。以糖质量(μg)为横坐标,490 nm 处吸光值 A 为纵坐标,所得回归方程为 $y=91.198x-2.4369$,相关系数 $R^2=0.9919$ 。

将样品配置成合适的浓度,按上述步骤操作,根据吸光值计算样品中多糖的含量。

1.2.3 多糖 DPPH 清除率的测定^[9]

DPPH 是一种稳定的可长时间存在的自由基,其结构中含有 3 个苯环,其中 1 个 N 原子中有 1 个孤对电子,其乙醇溶液且在 517 nm 附近有强烈的吸光反应,呈现为紫色。当 DPPH 溶液中加入自由基消除剂时,N 原子中的孤对电子会被配对,形成稳定的分子,溶液的染色将由紫色向淡黄色变化,导致其在 517 nm 处的吸光值减小,减小的程度与自由基被清除的程度表现出一定的定量关系。

称取 9.858 mg DPPH,加 95%乙醇溶解,然后定容至 250 mL,制备浓度为 0.1 mmol/L DPPH 溶液。反应体系中加入 2 mL DPPH,再加入 2 mL 不同浓度(0.1,0.2,0.4,0.8,1.6,3.2,6.4) mg/mL 的多糖样品溶液,在暗处混合、室温下反应 30 min,测定在 517 nm 处的吸光值。每个浓度梯度做 3 个平行样,取平均值。按下式计算 DPPH·清除率:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = [1 - (A_x - A_{x_0}) / A_0] \times 100\%.$$

式中, A_x 为加入样品溶液后的吸光度; A_{x_0} 为样品溶液本底的吸光度; A_0 为空白对照液的吸光度。

2 结果与分析

2.1 子实体粗多糖提取

通过热水浸提法得到几种食用菌子实体粗多糖,进而除蛋白得到精多糖,并分别计算其质量得率

(表 1),测定其总糖含量(表 2).

表 1 不同子实体中多糖得率

| Table 1 Polysaccharide yield from fruiting body of several edible and medicinal fungi | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|--------|
| 得率 | 猴头菇 | 香菇 | 银耳 | 木耳 | 茶树菇 |
| 粗多糖(%) | 7.013 | 8.625 | 4.711 | 3.610 | 14.250 |
| 精多糖(%) | 3.940 | 4.250 | 3.185 | 3.100 | 4.810 |

表 2 不同子实体提取多糖的总糖含量

| Table 2 Contents of polysaccharide from fruiting body of several edible and medicinal fungi | | | | | |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| 总糖含量 | 猴头菇 | 香菇 | 银耳 | 木耳 | 茶树菇 |
| 粗多糖(μg/mL) | 31.814 | 32.224 | 42.630 | 25.960 | 18.280 |
| 精多糖(μg/mL) | 53.910 | 44.652 | 36.535 | 12.629 | 39.390 |

因为真菌本身的成分和性质的不同,同样采用热水浸提,其多糖的得率相差较大. 由表 1 可知,粗多糖的得率大小为:茶树菇>香菇>猴头菇>银耳>木耳,精多糖得率排序相同. 茶树菇为低糖高蛋白的真菌,故热水浸提后,所得粗多糖的糖含量最少(18.28%). 木耳和银耳多糖浸提过程中料液粘度较高,使得木耳和银耳多糖的得率较低,推测是因为其中含有果胶等粘度较高的物质,从而影响了多糖得率. 针对此类粘度较高的多糖需要考虑改进浸提工艺以提高得率.

苯酚硫酸法测得猴头菇中的精多糖的糖含量比较高,香菇次之,茶树菇和银耳相近,木耳最低.

由表 2 可知,猴头菇、香菇和茶树菇中,粗多糖的糖含量明显低于精多糖的糖含量,表明胰蛋白酶去除的效果比较好,纯化的比较成功;而银耳和木耳则是精多糖的糖含量低于粗多糖,可能是因为在用胰蛋白酶去除杂蛋白的过程中,随着蛋白的洗脱,其中的多糖也有所流失,导致了糖成分的减少、糖含量的降低.

同样的在去除杂蛋白之后,茶树菇精多糖的糖含量低于猴头菇和香菇,但是高于银耳和木耳.

2.2 多糖对 DPPH 的清除率

利用物质对自由基的清除率来表征其抗氧化作用是目前普遍采用的方法.

由图 1 可知,木耳子实体多糖对 DPPH 的清除率随着糖质量浓度的升高而升高,但是在糖质量浓度为 6.4 mg/mL 时,明显可观察到反应体系有沉淀出现,故吸光值明显偏大,不再准确地描述 DPPH 的清除作用. 木耳子实体精多糖在浓度为 3.2 mg/mL 时,对 DPPH 的清除率接近 80%,可见作用比较明显. 木耳子实体粗多糖在浓度为 2.34 mg/mL 时,对 DPPH 的清除率为 50%.

由图 2 可知,银耳粗多糖的清除作用总体随着糖质量浓度的升高而升高,精多糖的清除作用总体随着糖质量浓度的升高而降低,但是在 0.2 mg/mL~0.8 mg/mL 的浓度范围内,随着糖质量浓度的升高,粗多糖的清除作用逐渐减小,精多糖的清除作用逐渐增大. 银耳多糖的两条清除曲线呈轴对称. 银耳子实体粗多糖在浓度为 6.4 mg/mL 时,对 DPPH 的清除率接近 42%.

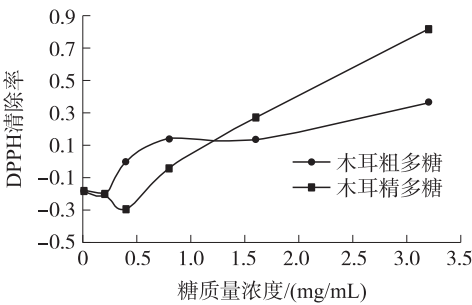


图 1 木耳子实体中多糖对 DPPH 的清除率
Fig. 1 DPPH scavenging percentage of *Auricularia polytricha*

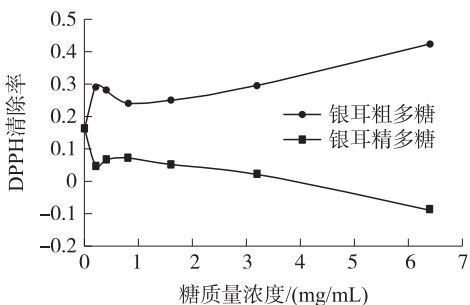


图 2 银耳子实体中多糖对 DPPH 的清除率
Fig. 2 DPPH scavenging percentage of *Tremella*

由图 3 可知,茶树菇多糖的清除作用与糖质量浓度呈正相关,在 0.4 mg/mL~1.6 mg/mL 的高浓度范围内表现的最为明显,茶树菇子实体精多糖在浓度为 1.6 mg/mL 时,对 DPPH 的清除率为 64.6%. 当精多糖质量浓度为 1.13 mg/mL 时,茶树菇子实体精多糖对 DPPH 的清除率为 50%.

由图 4 可知,香菇多糖的清除作用与糖质量浓度呈正相关,且在糖质量浓度为 0.8 mg/mL 之后,两条清除曲线基本平行. 由图中也可以看出,香菇子实体的粗多糖的清除作用明显强于精多糖,可能是因为粗

多糖中的一些杂质也具有抗氧化性,也可能是在胰蛋白酶去除杂蛋白的过程中,一些有效成分损失,使得清除率下降.当精多糖质量浓度为 1.6 mg/mL 时,香菇子实体精多糖对 DPPH 的清除率为 50%.

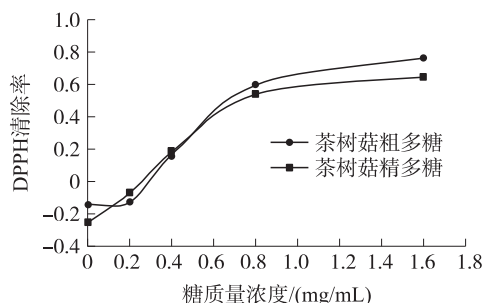


图 3 茶树菇子实体中多糖对 DPPH 的清除率

Fig. 3 DPPH scavenging percentage of *Agrocybe chaxinggu*

由图 5 可知,猴头菇的精多糖对 DPPH 的清除率在 0.8 mg/mL~6.4 mg/mL 的浓度范围内,与糖质量浓度呈正相关,猴头菇子实体精多糖在浓度为 6.4 mg/mL 时,对 DPPH 的清除率为 86.7%,清除作用明显.当精多糖质量浓度为 4.1 mg/mL 时,猴头菇子实体精多糖对 DPPH 的清除率为 50%.

依据子实体精多糖对 DPPH 的清除率为 50%时的多糖质量浓度,得到精多糖的清除作用的大小比较:茶树菇>香菇>木耳>猴头菇>银耳.

3 结论

真菌多糖不仅具有很好的营养价值,还有重要的医药价值和经济价值,作为一类来源广、无副作用而效率高的保健食品功能因子日益受到人们的青睐,其研究越来越受到科研的重视.本实验采用水提醇沉的方法从猴头菇、香菇、银耳、木耳、茶树菇 5 种食药菌的子实体中提取、纯化分别得到粗多糖和精多糖.真菌本身的性质和含量的差异,使得各自的分离纯化方法不一,且多糖得率相差较大.茶树菇子实体的精多糖得率最高,为 4.81%;香菇其次;木耳最低,只有 3.1%.

目前提取食药菌子实体多糖的方法很多,不同的提取方法各有利弊,应根据提取目的进行适当选择,要根据材料的性质、提取成本、工艺设备等选择合适的提取方法.本文采用的传统的热热水浸提法是提取多糖的最常用方法,操作简单,但耗时长、效率低,而利用复合酶解法、微波辅助法、超声波辅助法等可以显著提高提取率、缩短提取时间.

苯酚硫酸法测多糖的总糖含量,除了木耳精多糖的糖含量为 12.629%之外,其他 4 种材料的精多糖的糖含量均在 40%~54%,其中以猴头菇多糖的糖含量较高,为 53.9%.采用 DPPH 法定性地检测所得的几种多糖是否具有抗氧化性.实验数据及分析初步表明,猴头菇、香菇、银耳、木耳、茶树菇 5 种食药菌的子实体多糖均具有抗氧化性,其中,以茶树菇精多糖的清除作用最强,当精多糖的糖质量浓度为 1.13 mg/mL 时,茶树菇子实体精多糖对 DPPH 的清除率为 50%;香菇次之;银耳精多糖的清除作用最弱.

由于食药菌多糖的特殊的、天然的、高效的活性作用^[10],建立高效的、经济的多糖提取方法具有重要的现实意义;同样的,提高子实体多糖的纯度,以得到均一性多糖并清楚其理化性质才更加有利于食药菌多糖的深度开发利用.

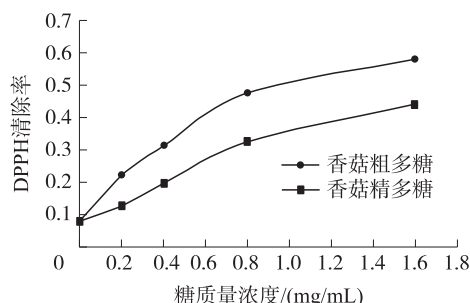


图 4 香菇子实体中多糖对 DPPH 的清除率

Fig. 4 DPPH scavenging percentage of *Lentinus edodes*

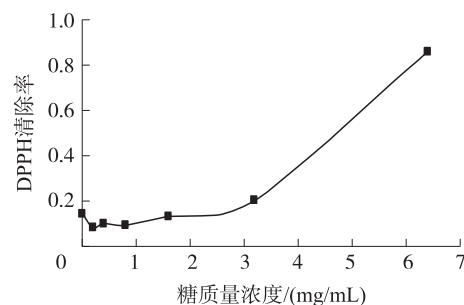


图 5 猴头菇子实体中精多糖对 DPPH 的清除率

Fig. 5 DPPH scavenging percentage of *Hericium erinaceus*

[参考文献]

- [1] 路新彦,吴学谦. DPPH 检测碱提香菇子实体多糖的抗氧化性能研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(18):9 519-9 520.
- [2] 曾小龙,廖新梅. 姬松茸多糖化学组分及药理作用的研究进展[J]. 中国食用菌,2007(1):3-6.

(下转第 88 页)

- [21] ZHONG W, CUI Y, YU Q, et al. Modulation of LPS-stimulated pulmonary inflammation by borneol in murine acute lung injury model[J]. *Inflammation*, 2014, 37(4): 148–157.
- [22] JIANG L, XU F, HE W, et al. CD200Fc reduces TLR4-mediated inflammatory responses in LPS-induced rat primary microglial cells via inhibition of the NF- κ B pathway[J]. *Inflammation research*, 2016, 65(7): 1–12.
- [23] CH O M K, PARK J W, JANG Y P, et al. Lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by dibenzylbutyrolactone lignans through inhibition of I- κ B phosphorylation and of p65 nuclear translocation in macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 67(6): 1738–1745.
- [24] CH O M K, JIANG Y P, KIM Y C, et al. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition; the role in TNF- α inhibition[J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(10/11): 1419–1429.
- [25] KANG H S, JI Y L, CHANG J K. Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Fructus*[J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2008, 116(2): 305–312.
- [26] 陈世宣, 冯伟, 周一心, 等. 牛蒡子苷元对关节软骨细胞增殖及 II 型胶原表达的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2015(7): 69–71.
- [27] JI Y L, CHANG J K. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits type I–IV allergic inflammation and pro-inflammatory enzymes[J]. *Archives of pharmacological research*, 2010, 33(6): 947–957.
- [28] SIAMAK M K M D, WERTH V P. Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects[J]. *International journal of dermatology*, 2010, 49(3): 239–248.
- [29] ISHIZAKI M, MUROMOTO R, AKIMOTO T, et al. Tyk2 is a therapeutic target for psoriasis-like skin inflammation[J]. *International immunology*, 2014, 26(5): 257–267.

[责任编辑: 黄 敏]

(上接第75页)

- [3] HIKINO H, ISHIYAMA M, SUZUKI Y, et al. Methanolic extract of hypoglycemic activity of ganoderma B: aglycan of ganoderma lucidum fruit bodies[J]. *Planta Medica*, 1989(55): 423.
- [4] 周国华, 于国萍. 黑木耳多糖降血脂作用的研究[J]. *现代食品科技*, 2005, 21(1): 46–48.
- [5] LEI L S, LIN Z B. Effect of ganoderma polysaccharides on T cell subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocyte[J]. *Acta Pharm Sin*, 1992, 27(5): 331–334.
- [6] 王斌, 连宾. 食药用真菌多糖的研究与应[J]. *食品与机械*, 2005: 96–99.
- [7] 周国英, 兰国红, 何小燕. 食用菌多糖研究开发进展[J]. *实用预防医学*, 2001, 11(1): 203–204.
- [8] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Anal Chem*, 1956(28): 350–356.
- [9] YAMAGUCHI T, TAKAMURA H. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62: 1201–1204.
- [10] 张树庭, 赵铭. 药用菌——一种丰富的天然营养保健品资源[J]. *中国食用菌*, 2002, 21(1): 5.

[责任编辑: 黄 敏]