

沙日娜. 香菇菌糠多糖的提取、组成及抗氧化活性分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 325–328.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.101

# 香菇菌糠多糖的提取、组成及抗氧化活性分析

沙日娜

(包头轻工职业技术学院, 内蒙古包头 014035)

**摘要:**利用响应面法,对香菇菌糠多糖(*Lentinus edodes* residues polysaccharides, LRPS)的提取条件进行优化,利用高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)等对其 2 种组分 LRPS-1、LRPS-2 进行化学结构特征分析,测定其抗氧化活性。结果表明,LRPS 的最佳提取条件为:加水稀释 35 倍、醇沉时间 20 h、pH 值为 8,此时多糖的得率为 3.69%;LRPS-1 由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖组成,物质量之比为 1.7:1.0:3.0,LRPS-2 由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖组成,物质量之比为 7.2:2.3:1.0:8.4;LRPS-1、LRPS-2 均有较强的抗氧化活性,LRPS-2 更为显著。

**关键词:**香菇;菌糠;响应面;提取优化;多糖;抗氧化

**中图分类号:**TS201.2      **文献标志码:**A      **文章编号:**1002-1302(2016)12-0325-04

香菇(*Lentinus edodes*)别称花菇,为真菌门侧耳科香菇属世界第二大食用菌<sup>[1]</sup>。香菇口味鲜美,富含多糖、维生素、蛋白质、多元酚、朴菇素、膳食纤维等多种生物活性物质,其中,菌丝体多糖是香菇菌丝体中最重要的生物活性物质,具有抗氧化、抗衰老、抗炎、保肝护肝和降血糖等作用<sup>[2-4]</sup>。菌糠是真菌收获后的培养基剩余物,含有丰富的菌丝体,我国年产各类菌糠总量约为 900 万 t,大部分被作为废物遗弃,在浪费资源的同时造成环境污染。响应面法(RSM)是以最经济的方式、较少的试验次数及较短的时间对参数进行全面研究,越来越多地被应用于各种生物化工处理过程<sup>[5]</sup>。本研究对香菇菌糠多糖的提取条件进行优化,利用 DEAE-52 纤维素柱和葡聚糖 G-100 对香菇菌糠多糖(LRPS)进行分离纯化,研究多糖组分 LRPS-1、LRPS-2 的分子量、单糖组成和抗氧化活性,从而为香菇菌糠的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

香菇菌糠,由内蒙古农业科学院真菌研究所提供。

### 1.2 仪器与试剂

1.2.1 试验仪器 752-N 紫外可见分光光度计、DK-S24 型恒温水浴锅、DZF-6021 型真空干燥箱,均由上海精宏实验设备有限公司生产;GC2010 气相色谱仪,日本岛津公司生产;TDL-5-A 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂生产;

收稿日期:2016-03-02

作者简介:沙日娜(1982—),女,内蒙古通辽人,硕士,讲师,主要从事农产品检验研究。E-mail:15588894651@163.com。

步研究,以有利于更好地为消费者酿出质优价廉的美味红葡萄酒提供科学依据。

## 参考文献:

[1]贾春风,刘凯,贾志军.河北省保定市家庭自酿葡萄酒现状调查研究[J].食品安全导刊,2013(6):78-79.

Nicolet380 傅立叶变换红外光谱仪,美国热电集团生产;LXJ-68-02 型离心机,北京医疗仪器修理厂生产。

1.2.2 试剂 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,天津市凯通化学试剂有限公司生产;95%乙醇,天津市百世化工有限公司生产;DPPH、DEAE-52 纤维素、葡聚糖 G-100, Sigma 公司生产;苯酚,天津市天大化学试剂厂生产;浓硫酸、浓盐酸,淄博化学试剂厂有限公司生产;三氯乙酸,天津大茂化学试剂厂生产。

### 1.3 多糖的提取与测定

使用多功能粉碎机粉碎香菇菌糠,采用水提醇沉法<sup>[6-7]</sup>提取香菇菌糠多糖,采用苯酚-硫酸法<sup>[8]</sup>测定多糖含量。

### 1.4 香菇菌糠多糖的提取优化

1.4.1 Plackett-Burman (PB) 试验设计 采取 9 因素 3 水平 PB 试验(表 1)考察各提取条件对 LRPS 提取率的影响;采用 Design-Expert 7.0 软件对数据进行分析。

表 1 LRPS 提取条件的优化 PB 试验变量水平及编码值

变量	代码	编码水平		
		-1	0	1
加水倍数(倍)	A1	20	30	40
pH 值	A2	5	7	9
提取温度(℃)	A3	75	85	95
提取时间(h)	A4	1	2	3
提取次数(次)	A5	1	2	3
乙醇浓度(%)	A6	75	85	95
乙醇倍数(倍)	A7	2	3	4
醇沉时间(h)	A8	12	24	36
醇沉温度(℃)	A9	-4	4	12

1.4.2 响应面(RSM)试验设计 根据 PB 试验结果,选取 pH 值、加水倍数、醇沉时间这 3 个对多糖得率影响最大的因

[2]缪粉英.自制葡萄酒的酿造技术及其保健功效[J].江苏农业科学,2012,40(10):249-250.

[3]黄胜君.影响家庭自酿红葡萄酒四个理化因素控制研究[J].辽东学院学报:自然科学版,2010,17(3):232-234,238.

[4]朱宝镛,戴仁泽,赵光鳌.葡萄酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1995:585-594.

素进行响应面法优化条件的筛选试验,以 1、0、-1 编码自变量的高、中、低 3 个水平,通过最小二乘法拟合二次多项方程,模型表达式为: $y=A_0+\sum A_ix_i+\sum A_{ii}x_i^2+\sum A_{ij}x_ix_j$ 。式中, $y$  为响应值,即 LRPS 得率, $A_0$ 、 $A_i$ 、 $A_{ii}$ 、 $A_{ij}$  为方程系数, $x_i$ 、 $x_j$  ( $i\neq j$ ) 为自变量编码值。采用 Design-Expert 7.0 软件对数据进行回归分析。

1.5 多糖的凝胶柱层析

采用 DEAE-纤维素离子交换柱对多糖进行分离纯化,采用葡聚糖 G-100 凝胶柱对多糖进行进一步分离纯化和纯度鉴定<sup>[9]</sup>,采用硫酸-苯酚法测定收集到的多糖溶液浓度,绘制洗脱曲线。

1.6 多糖的化学结构分析

1.6.1 单糖组成测定 糖样品经过 0.25 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 ℃ 加热 16 h 完全水解,或者不经过水解处理,按照 Blakeney 等的方法<sup>[10]</sup>将各单糖制备成全乙酰化糖醇衍生物;采用气相色谱分析糖的构成,分离柱为岛津公司生产的 0.25 mm×30 m 毛细管柱 DB-1,柱温为 210 ℃,N<sub>2</sub> 流速为 30 mL/min。

1.6.2 多糖分子量的测定 多糖样品溶于 50 mmol/L 的硝酸钠溶液或 0.05% 叠氮化钠中,获得浓度为 2.0 mg/mL 的糖溶液;使用 0.45 μm 滤膜过滤,直接进样<sup>[11]</sup>进行高效液相色谱测定,测定条件为:30 cm×4.6 mm TSKG3000PWxl 色谱柱,3.5 cm×4.6 mm TSK 保护柱,流动相为 50 mmol/L 硝酸钠溶液或 0.05% 的叠氮化钠,流速为 0.4 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μL。

1.7 多糖抗氧化分析

多糖清除 DPPH 自由基的测定方法为:2 mL 95% 乙醇或 0.1 μmol/L DPPH,与 2 mL 浓度在 100~1 000 mg/L 之间的 EPS 溶液进行混合,25 ℃ 水浴 15 min,517 nm 处测定吸光度<sup>[12]</sup>。EPS 清除羟基自由基的测定采用 Smironff 等的方法<sup>[13]</sup>,多糖还原力的测定采用 Oyaizu 的方法<sup>[14]</sup>。

2 结果与分析

2.1 PB 试验

由表 2 可见,当香菇菌糠加水稀释 20 倍、pH 值为 5、提取温度为 95 ℃、提取时间为 3 h、提取 1 次、乙醇浓度为 95%、乙醇稀释 2 倍、醇沉时间 36 h、醇沉温度 12 ℃ 时(编号 5),LRPS 的得率相对最高,为 3.34%。由表 3 可知,试验模型的  $P$  值小于 0.01,模型回归性较好,能够很好地反映变量和自变量之间的变化规律;pH 值、加水倍数和醇沉时间的  $P$  值均小于 0.01,这 3 个因素对 LRPS 的得率影响显著,其他因素影响相对较小或不显著。因此,选取提取 pH 值、加水倍数和醇沉时间这 3 个因素进行响应面分析试验。

2.2 RSM 试验

2.2.1 选取优化因素 pH 值、加水倍数、醇沉时间分别以变量  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$  表示,经多重回归分析,LRPS 得率的预测值  $y$  和变量之间的多项式模型为:

$$y=2.11+0.30x_1+0.14x_2+0.31x_3-0.12x_1x_2-0.067x_1x_3+0.10x_2x_3-0.42x_1^2-0.30x_2^2-0.27x_3^2。$$

2.2.2 响应面数据分析 由表 4 可知,线性回归系数  $x_1$ 、 $x_3$  和二次项系数  $x_1^2$ 、 $x_2^2$ 、 $x_3^2$  均极显著 ( $P<0.01$ ),线性回归系

表 2 LRPS 提取条件的优化

编号	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	LRPS 得率 (%)
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1.56 ±0.17
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	2.67 ±0.09
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	0.89 ±0.08
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	2.78 ±0.14
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	3.34 ±0.07
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1.34 ±0.06
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	2.78 ±0.05
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1.01 ±0.11
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0.77 ±0.13
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.91 ±0.16
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1.45 ±0.18
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.00 ±0.04
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.36 ±0.12
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.13 ±0.18
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.12 ±0.15
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.21 ±0.11
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.11 ±0.17
	**		**		*		**		*	

注:表中标注“\*”表示该模型或因素对 LRPS 的得率作用显著 ( $P<0.05$ ),标注“\*\*”表示该因素或模型对 LRPS 的得率作用极显著 ( $P<0.01$ )。表 3、表 4 同。

表 3 LRPS 提取条件优化试验数据方差分析

因素	平方和	自由度	平均方差	$F$ 值	$P$ 值	显著性
模型	9.25	9	1.03	57.53	<0.000 1	
A <sub>1</sub>	1.06	1	1.06	59.20	0.000 3	**
A <sub>2</sub>	0.10	1	0.10	5.75	0.001 2	**
A <sub>3</sub>	0.016	1	0.016	0.91	0.376 2	
A <sub>4</sub>	0.60	1	0.60	33.32	0.053 5	
A <sub>5</sub>	6.28	1	6.28	351.44	0.045 8	*
A <sub>6</sub>	0.10	1	0.10	5.80	0.052 7	
A <sub>7</sub>	0.33	1	0.33	18.75	0.004 9	**
A <sub>8</sub>	0.70	1	0.70	38.96	<0.000 1	**
A <sub>9</sub>	0.066	1	0.066	3.67	0.103 7	

数  $x_2$  显著 ( $P<0.05$ ),这表明 pH 值、加水倍数和醇沉时间对 LRPS 得率的影响都比较显著;模型的  $P$  值 <0.000 1,具有极显著性,而  $F$  值为 13.40,这说明香菇菌糠多糖的预测值和试验值一致;失拟项的  $F$  值为 0.29,  $P$  值为 0.128 9,这说明试验结果并非由纯误差引起,模型方程适合对 LRPS 提取试验的理论预测。另外,试验结果表明,模型的  $R^2$  值为 0.999 6,这说明试验值和预测值高度吻合,99.96% 的响应值具有可变性;调整行列式系数的  $R^2$  值为 0.999 0,这说明 99.90% 的 LRPS 总变差归因于独立变量,仅约 0.10% 的总变量不能用模型解释。

经响应面(图 1)分析,提取条件为 pH 值 7.88、加水 34.5 倍、醇沉时间 19.82 h,LRPS 的得率相对最高,为 3.85%,而验证试验 LRPS 的得率为 3.84%,这表明该模型适用于 LRPS 提取。考虑到操作方便,将最优提取条件调整为 pH 值 8、加水 35 倍、醇沉时间 20 h,此时,LRPS 的得率为 3.69%。

2.3 香菇菌糠多糖的组分分离纯化

采用 DEAE-纤维素柱对 LRPS 进行组分分离,分别利用

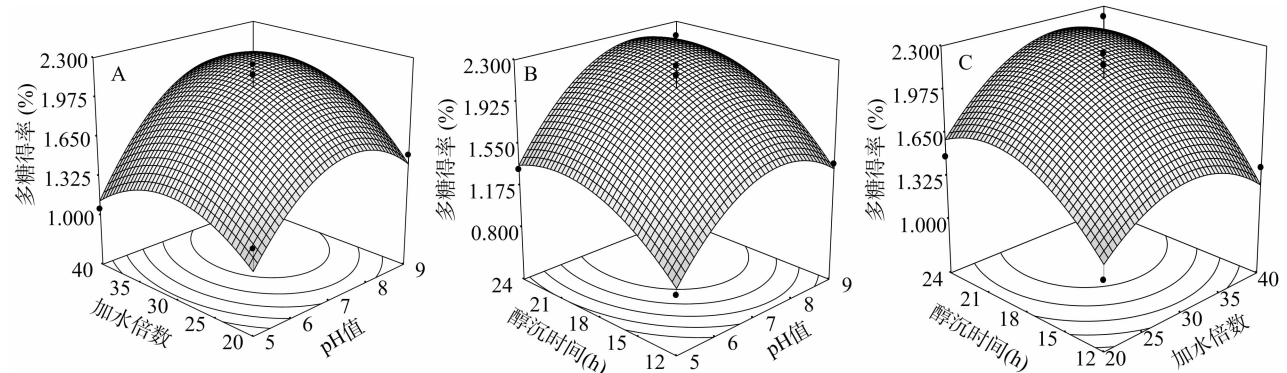
蒸馏水和 0.2、0.5、1.0 mol/L NaCl 溶液作为流动相对 LRPS 进行洗脱,得到 2 个组分 LRPS-1、LRPS-2;对分离得到的 2 个组分用葡聚糖 G-100 凝胶作进一步分离发现,LRPS-1、LRPS-2 均分离得到 1 个单一的洗脱峰,这表明 LRPS-1、LRPS-2 均为纯多糖(图 2)。

2.4 多糖组分化学结构分析

2.4.1 单糖组成分析 由表 5 可知,LRPS-1 的单糖组成主要包括鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖,其物质质量之比为 1.7:1.0:3.0;LRPS-2 的单糖组成主要包括鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖,其物质质量之比为 7.2:2.3:1.0:8.4。

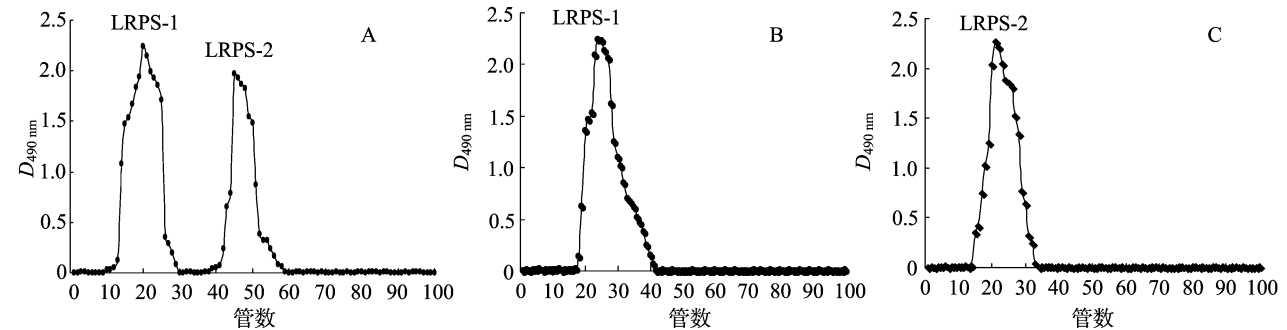
表 4 LRPS 二次模型回归系数显著性检验

项目	系数	标准误	平方和	均方离差	F 值	P 值	显著性
模型			3.33	0.37	13.40	0.000 9	**
截距	2.11	0.017					
x <sub>1</sub>	0.30	0.014	0.71	0.71	25.62	0.000 5	**
x <sub>2</sub>	0.14	0.014	0.16	0.16	5.71	0.048 2	*
x <sub>3</sub>	0.31	0.014	0.79	0.79	28.45	0.000 3	**
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	0.12	0.019	0.056	0.056	2.02	0.001 2	*
x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	0.067	0.019	0.018	0.018	0.64	0.008 2	*
x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	0.10	0.019	0.044	0.044	1.58	0.012 2	*
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0.42	0.019	0.73	0.73	26.35	<0.000 1	**
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0.30	0.019	0.37	0.37	13.33	<0.000 1	**
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-0.27	0.019	0.31	0.31	11.23	0.000 7	**
失拟检验		0.019	0.14	0.047	0.29	0.128 9	



A—pH 值为 7.88 时,醇沉时间和加水倍数对 LRPS 得率的影响;B—加水稀释倍数为 34.5 时,pH 值和醇沉时间对 LRPS 得率的影响;C—醇沉时间为 19.82 h 时,pH 值和加水倍数对 LRPS 得率的影响

图1 pH 值、加水倍数、醇沉时间 3 因素之间交互项对 LRPS 得率的影响



A—DEAE-纤维素交换柱;B、C—葡聚糖G-100凝胶柱

图2 多糖的分离纯化曲线

2.4.2 分子量 由表 6 可知,LRPS-1 的数均分子量  $M_n$  为  $4.36 \times 10^2$ ,重均分子量  $M_w$  为  $2.97 \times 10^4$ ,多分散系数  $M_w/M_n$  为 68.11;LRPS-2 的数均分子量  $M_n$  为  $6.93 \times 10^2$ ,重均分子量  $M_w$  为  $1.18 \times 10^5$ ,多分散系数  $M_w/M_n$  为 170.27。

2.4.3 多糖的抗氧化活性 由图 3 可知,LRPS、LPS(香菇多糖)、LRPS-1、LRPS-2 在波长 700 nm 处测得的吸光度分别为  $0.204 \pm 0.03$ 、 $0.264 \pm 0.001$ 、 $0.773 \pm 0.05$ 、 $0.986 \pm 0.03$ ;浓度为 1 000 mg/L 时,LRPS、LPS、LRPS-1、LRPS-2 对

DPPH 的清除率分别为  $(19.92 \pm 0.02)\%$ 、 $(39.88 \pm 0.01)\%$ 、 $(53.56 \pm 0.03)\%$ 、 $(55.61 \pm 0.01)\%$ ;对羟基自由基的清除率分别为  $(58.99 \pm 1.03)\%$ 、 $(66.20 \pm 1.34)\%$ 、 $(78.58 \pm 2.33)\%$ 、 $(92.10 \pm 2.57)\%$ 。由此可见,同等浓度下,LRPS 的抗氧化活性略低于 LPS,但是 LRPS-1、LRPS-2 的抗氧化活性明显高于 LPS,浓度为 1 000 mg/L 时,LRPS-2 的还原力是 LPS 的 3.73 倍,对 DPPH 和羟基自由基的清除率均为 LPS 的 1.39 倍。

表 5 香菇菌糠多糖组分的单糖种类

序号	单糖名称	LRPS		LRPS - 1		LRPS - 2	
		保留时间(min)	响应值(μV)	保留时间(min)	响应值(μV)	保留时间(min)	响应值(μV)
1	鼠李糖	14.36	9 861.6	14.35	6 459.2	14.35	11 995.0
2	D-核糖	—	—	—	—	—	—
3	阿拉伯糖	16.54	3 681.0	16.53	3 693.6	16.53	3 776.1
4	木糖	—	—	—	—	—	—
5	肌醇	—	—	—	—	—	—
6	甘露糖	34.84	10 525.8	34.84	11 171.6	34.81	16 68.7
7	葡萄糖	35.65	6 458.3	—	—	5.67	14 004.6
8	半乳糖	—	—	—	—	—	—

表 6 LRPS-1、LRPS-2 的分子量测定结果

多糖组分	$M_w$	$M_n$	$M_z$	$M_w/M_n$	$M_z/M_w$
LRPS-1	$2.97 \times 10^4$	$4.36 \times 10^2$	$5.19 \times 10^5$	68.11	17.47
LRPS-2	$1.18 \times 10^5$	$6.93 \times 10^2$	$7.51 \times 10^5$	170.27	6.36

注： $M_w$  为重均分子量； $M_n$  为数均分子量； $M_z$  为 Z 平均分子量； $M_w/M_n$  为多分散系数； $M_z/M_w$  为多分散指数。

3 结论

香菇菌糠多糖的最佳提取条件：pH 值为 8、加水 35 倍、

醇沉时间为 20 h，此时多糖的提取率为 3.69%。对 LRPS 进行分离纯化，得到 LRPS-1、LRPS-2 这 2 种组分，LRPS-1 由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖组成，物质量之比为 1.7：1.0：3.0；LRPS-2 由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖组成，物质量之比为 7.2：2.3：1.0：8.4。本试验选取多糖对羟基自由基清除率、DPPH 清除率及还原力 3 个指标考察多糖体外的抗氧化活性，结果显示，LRPS-1、LRPS-2 对 DPPH、羟基自由基均有较强的清除能力及较强的还原力，LRPS-2 的体外抗氧化活性相对更强。

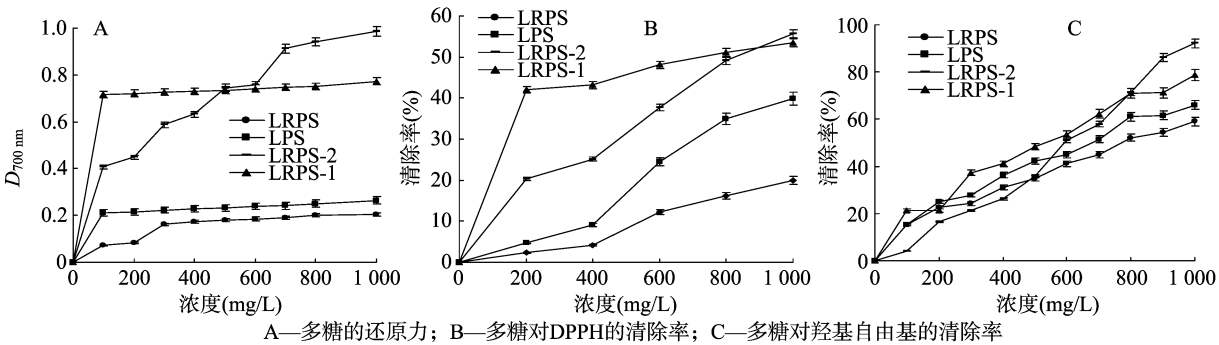


图 3 多糖的抗氧化活性

参考文献：

[1] 刘春如, 易 诚. 香菇的营养价值和药用价值[J]. 中国林副特产, 2002(1): 52-53.

[2] 吕国英, 范雷法, 张作法, 等. 香菇多糖研究进展[J]. 浙江农业学报, 2009, 21(2): 183-188.

[3] 张 昕, 张 强, 梁彦龙. 香菇多糖的抗肿瘤和降糖作用机制的研究进展[J]. 中国药事, 2008, 22(2): 149-154.

[4] 申进文, 冯雅岚, 庄庆利, 等. 香菇子实体多糖提取工艺优化研究[J]. 河南农业科学, 2010(3): 90-92.

[5] Kalil S J, Maugeri F, Rodrigues M I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization[J]. Process Biochemistry, 2000, 35(6): 539-550.

[6] 胡成旭, 侯欣彤, 冯永宁, 等. 响应面法优化云芝多糖提取条件的研究[J]. 食品工业科技, 2007(7): 124-126, 130.

[7] 张迅捷, 王 捷, 谢宝贵, 等. 响应面法优化樟芝多糖提取工艺的研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(1): 49-54.

[8] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical

Chemistry, 2002, 28(3): 350-356.

[9] 王 博, 徐 莎, 黄琳娟, 等. 白菱多糖 BSPI-A 的分离纯化及结构研究[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 120-123.

[10] Blakeney A B, Harris P T, Henry R J, et al. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis[J]. Carbohydrate Res, 1983, 113(83): 219-299.

[11] Lin H J, Qin X M, Aizawa I, et al. Chemical properties of water-soluble pectins in hot- and cold-break tomato pastes[J]. Food Chemistry, 2005, 93(3): 409-415.

[12] Liu X H, Feng P Y, Shi Y L. Study of isolation and purification of polysaccharides from fresh mycelia of *Agaricus blazei* Mussill and its anti-fatigue effect[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2006, 28(2): 190-194.

[13] Smimoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.

[14] Oyaizu M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin layer chromatography[J]. Journal of the Japanese Society for Food Science & Technology, 1988, 35(11): 771-775.