

李珊珊,王珊丹,燕洪涛,等. 不同提取工艺对猴头菇多糖产率、单糖组成及 DPPH 清除活性的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):154-156. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.040

不同提取工艺对猴头菇多糖产率、单糖组成及 DPPH 清除活性的影响

李珊珊¹,王珊丹²,燕洪涛³,陈建波¹,孙印石¹

(1. 中国农业科学院特产研究所,吉林长春 130112; 2. 吉林省人民医院,吉林长春 130021; 3. 吉林大学第二医院,吉林长春 130041)

摘要:采用热水提取、淀粉酶解、果胶酶解和超声 4 种方式对猴头菇多糖进行了提取,分别比较了不同提取方式所得到多糖的产率、总多糖含量、单糖组成及清除 DPPH 自由基活性方面的差异。结果发现,不同提取方式对多糖的产率、溶解性、葡萄糖和半乳糖的含量、DPPH 清除活性均有影响,其中超声提取和酶解提取得到的多糖 DPPH 自由基清除活性优于热水煮提得到的猴头菇多糖。

关键词:猴头菇多糖;提取工艺;单糖组成;自由基

中图分类号: TS241;R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2018)11-0154-02

猴头菇(*Hericium erinaceus*)别称猴头菌、刺猬菌,属担子菌纲多孔菌目齿菌科猴头属^[1]。在我国多地均有分布,尤其在长白山脉资源丰富,是一种非常具有特色的食用菌类。猴头菇含有多种营养成分,如蛋白质、多糖、脂肪、氨基酸等^[2]。多糖是猴头菇的重要活性成分,已被证实具有保护胃黏膜^[3]、增强免疫力^[4-6]、抗肿瘤^[7-9]、抗疲劳^[10]等多种功效。关于猴头菇多糖的研究已经越来越受重视,但多以活性研究为主,提取方法和单糖组成研究较少,一定程度上限制了猴头菇多糖的应用。针对上述现状,以猴头菇为原料,分别比较了热水煮提、超声提取、果胶酶提取、淀粉酶提取 5 种提取方式对猴头菇多糖的产率、总多糖含量和单糖组成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猴头菇采购于吉林省长春市立新参茸特产超市;果胶酶、淀粉酶采购于河南正兴食品添加剂有限公司;单糖标准品采购于 Sigma-Aldrich 公司;DPPH 采购于 Coolaber 公司(Cat# CD4891-500MG);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

TGL-16A 高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;FD-1A-50 低温冷冻干燥机,北京博医康技术有限公司;超声波清洗机 JP-100ST,深圳市洁盟清洗设备有限公司;电热恒温水浴锅 HHS 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

高效液相色谱仪及色谱柱:紫外检测器,SPD-M20A,日本岛津仪器有限公司;溶剂输送泵,LC-16,岛津仪器(苏州)

有限公司;柱温箱,CTO-16,岛津仪器(苏州)有限公司;色谱柱,ODS Hypersil 250 mm×4.6 mm,5 μm,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 实验方法

分别采用热水煮提、超声提取、果胶酶解和淀粉酶解法对猴头菇多糖进行提取。

1.3.1 热水煮提法 50 g 干燥的猴头菇切成小块后加入 1 L 蒸馏水,浸泡 4 h,100 ℃煮提 2 h 后过滤,滤渣重复提取 2 次。合并 3 次提取所得滤液,60 ℃水浴浓缩至 200 mL,离心(4 500 r/min,10 min),弃去沉淀。向上清液加入 4 倍量无水乙醇,沉淀过夜。离心(4 500 r/min,10 min),收集沉淀。向沉淀中加入 150 mL 蒸馏水,充分溶解,重复醇沉 1 次。沉淀冷冻干燥,得猴头菇多糖 WHP。

1.3.2 淀粉酶提取法 50 g 干燥的猴头菇切成小块后加入 1 L 蒸馏水,浸泡 4 h,加入 1 g 淀粉酶 60 ℃提取 1 h 后,煮沸 10 min 对酶进行灭活,过滤,滤渣重复提取 2 次。合并 3 次提取所得滤液后,处理方式同热水煮提法,最终得到多糖 WHP-D。

1.3.3 果胶酶提取法 50 g 干燥的猴头菇切成小块后加入 1 L 蒸馏水,浸泡 4 h,加入 1 g 果胶酶 55 ℃提取 1 h 后,煮沸 10 min 对酶进行灭活,过滤,滤渣重复提取 2 次。合并 3 次提取所得滤液后,处理方式同热水煮提法,最终得到多糖 WHP-G。

1.3.4 超声提取法 50 g 干燥的猴头菇切成小块后加入 1 L 蒸馏水,浸泡 4 h,超声(300 W,40 ℃)提取 0.5 h 后过滤,滤渣重复提取 2 次。合并 3 次提取所得滤液后处理方式同热水煮提法,最终得到多糖 WHP-C。

1.3.5 理化性质测定 采用苯酚-硫酸法测定总糖含量。

单糖组成分析^[11-13]:称取多糖样品 2 mg,依次用 1 mol/L 盐酸-甲醇溶液和 2 M 三氟乙酸溶液水解,PMP 衍生化后 HPLC 检测。采用 Shimadzu HPLC 系统,Hypersil ODS 色谱柱,流动相为 82.0% PBS(0.1 mol/L,pH 值 7.0)和 18.0% (体积分数)乙腈,流速为 1.0 mL/min,进样量为 20 μL,检测

收稿日期:2016-12-07

基金项目:吉林省科技发展计划医药产业发展引导资金(编号:20150311055YY)。

作者简介:李珊珊(1984—),女,吉林四平人,博士,助理研究员,从事特种动植物功能成分的结构、活性及产品开发。E-mail:lishanshan@caas.cn。

通信作者:孙印石,博士,研究员,从事特种动植物加工研究。E-mail:sunyingshi2002@163.com。

波长为 245 nm。

1.3.6 多糖的 DPPH 清除率检测 DPPH 溶液的配制:5 mg DPPH,加入无水乙醇定容至 100 mL,充分溶解,避光保存。

取 0.5 mL 样品溶液(空白对照为水),加入 0.5 mL DPPH 溶液,避光反应 1 h,517 nm 处测吸光值^[14]。

DPPH 清除率 = $(D_{\text{对照}} - D_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

$D_{\text{对照}}$:空白对照管反应后的吸光值; $D_{\text{样品}}$:样品溶液反应后的吸光值。

2 结果与分析

2.1 不同方式提取得到的猴头菇多糖产率及单糖组成比较

通过对不同提取方式得到的多糖产率及单糖组成进行对比(表 1),可以发现,超声法产率最低,果胶酶解和淀粉酶解次之,煮提法产率最高。总糖含量相差不大。

猴头菇多糖主要由葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、岩藻糖(Fuc)和甘露糖(Man)组成。煮提得到的多糖含有 88.6% 的 Glc,超声后得到的多糖中 Glc 含量为 43.2%,果胶酶解和淀粉酶解提取得到的多糖 Glc 含量分别为 86.8% 和 64.3%。超声提取过程中,一些糖苷键被破坏,而使长链多糖成为短链寡聚片段,造成多糖提取效率较低,因此超声法提取效率较低。并且与煮提相比,超声提取法得到的多糖中 Gal 和 Fuc 的比例几乎没有变化,说明 Gal 和 Fuc 可能通过某些连接方式结合在一起,Glc 含量的降低表明一些淀粉样的葡聚糖链被打断,成为寡聚片段在醇沉时被除去。

相比之下,果胶酶解法得到的多糖不论从产率上还是单糖组成上,都与煮提法得到的多糖差异不大。这是因为猴头菇多糖本身含有的半乳糖醛酸(GalA)量很低,几乎检测不出来,果胶酶失去了作用点,因此果胶酶提取法与煮提法相比没有太大的差异。

淀粉酶能够水解 α -1,4-Glc 和 α -1,4-Glc 之间的连接键,因此淀粉酶解后得到的多糖中 Glc 含量明显降低,Gal 含量升高。虽然一些淀粉样多糖被水解掉,但由于淀粉酶能够打断多糖通过 Glc 与细胞壁之间的连接,提高提取效率,所以整体产率并无太大变化。在试验中如果想要获得猴头菇多糖中的富含 Gal 的级分,可以考虑用淀粉酶解法。

表 1 不同提取方式得到的多糖产率和单糖组成

样品名称	提取方式	产率 (%)	总糖含量 (%)	单糖组成 (%)			
				Glc	Gal	Fuc	Man
WHD	煮提	11.9	71.4	88.6	9.1	2.2	0
WHD-D	淀粉酶解	9.4	68.4	64.3	29.8	5.9	0
WHD-G	果胶酶解	9.5	69.2	86.8	9.2	2.3	1.7
WHD-C	超声	4.4	72.7	43.2	45.7	9.3	1.8

2.2 猴头菇多糖的抗氧化能力检测

DPPH 自由基是一种物理性质稳定的有机自由基,溶于乙醇后呈紫红色,在 517 nm 处有最大吸收峰^[15]。当存在自由基清除剂时,紫红色随反应逐渐变弱,褪色程度与接受的单电子数呈正相关。反应过程中 DPPH 的清除率可反映样品清除自由基 DPPH 的能力。清除率越高,则样品的抗氧化活性越强。

不同提取方式得到的猴头菇多糖对 DPPH 的清除能力具有明显差异(图 1)。不同提取方式得到的猴头菇多糖都能一

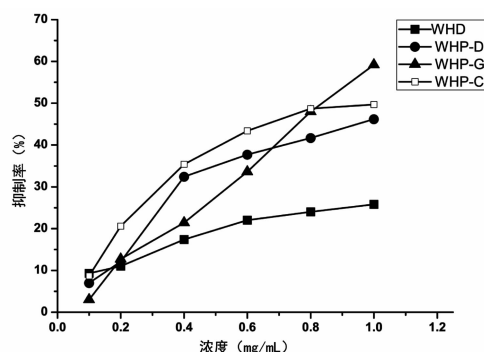


图 1 不同提取方式得到的猴头菇多糖对 DPPH 的清除率

定程度上清除 DPPH 自由基,并具有一定的浓度依赖性。水提多糖 WHP 对 DPPH 的清除率较低。WHD-D 和 WHD-P 差异不大,在浓度为 1 mg/mL 时,清除率均能达到 40% 以上。WHP-C 的浓度为 1 mg/mL 时,清除率接近 60%。当多糖浓度小于等于 0.8 mg/mL 时,WHP-D 对 DPPH 清除的效果最好;当多糖浓度大于 0.8 mg/mL 时,WHP-C 对 DPPH 清除的效果最好。因此,如果想得到抗氧化活性好的猴头菇多糖,可以根据实际情况考虑利用淀粉酶解法或超声提取法。

3 讨论与结论

本研究对猴头菇的提取工艺进行了比较,并通过 DPPH 自由基清除试验验证了其抗氧化活性。煮提和果胶酶解法提取得到的多糖单糖组成相似,但果胶酶解后得到的多糖水溶性更好。淀粉酶解得到的多糖中 Gal 含量明显高于其他几组。而超声提取得到的多糖 Glc 和 Gal 比例约为 1:1。通过热水煮提得到的多糖产率最高,但抗氧化活性不明显。淀粉酶解与果胶酶解得到的多糖产率相近,活性略有不同,低浓度时淀粉酶解多糖活性较好,高浓度时果胶酶解多糖活性更强。超声提取得到的多糖产率最低,当多糖浓度小于 1 mg/mL 时抗氧化效果最好。这可能是与多糖的溶解度相关,不同提取方式得到的多糖溶解度排序为超声提取 > 淀粉酶提取 > 果胶酶提取 > 水提多糖。当多糖浓度较低时,溶解性越好的多糖抗氧化活性越明显。本研究结果可以为猴头菇多糖的提取及活性评价提供一定的指导,也为猴头菇多糖的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王振丽,田辉,席会平,等. 猴头多糖的研究进展[J]. 中国食物与营养,2010(3):21-23.
- [2] 樊伟伟,黄惠华. 猴头菇多糖研究进展[J]. 食品科学,2008,29(1):355-358.
- [3] 黄萍,罗珍,郭重仪,等. 猴头菇多糖胃黏膜保护作用研究[J]. 中药材,2011,34(10):1588-1590.
- [4] 罗珍,黄萍,郭重仪,等. 猴头菇多糖增强免疫功能得实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):182-183.
- [5] 郭焱,崔健丽,朱娜. 猴头菇多糖对 TGF- β 1 抑制的 T 淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国实验诊断学,2012,16(1):48-49.
- [6] 唐川,杨焱,吴迪,等. 可溶性固形物含量对制备猴头菇子实体多糖得理化性质及免疫活性的影响[J]. 食用菌学报,2014,21(4):61-66.
- [7] 聂继盛,祝寿芬. 猴头多糖抗肿瘤及对免疫功能的影响[J]. 山

陈琛,李鑫鑫,付昀东,等. 汉中天麻多糖抗菌活性研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):156-159.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.041

汉中天麻多糖抗菌活性研究

陈琛¹,李鑫鑫¹,付昀东¹,刘祥¹,郑红星¹,吴三桥¹,李晓东²

(1. 陕西理工大学中德天然产物研究所/陕西理工大学生物科学与工程学院/陕西省天麻山茱萸工程技术研究中心/陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心,陕西汉中 723000; 2. 陕西省略阳县中药材技术推广服务中心,陕西略阳 724300)

摘要:采集湿天麻,通过常压蒸煮、切片、烘干、粉碎、超声辅助水提醇沉、脱色等工艺处理,得到天麻粗多糖。利用薄层平板琼脂糖孔穴扩散法定性测定天麻粗多糖抗菌活性,进而采用微量肉汤稀释法测定 40 株菌株(包括标准株和临床分离株)的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,简称 MIC)。天麻多糖具有广谱抗菌活性,对 G⁻ 的 MIC 范围为 0.468 75 ~ 15 mg/mL,对 G⁺ 的 MIC 范围 0.937 5 ~ 120 mg/mL,对真菌的 MIC 范围 0.937 5 ~ 30 mg/mL,其中对嗜麦芽假单胞菌 090223、黏质沙雷氏菌 1379、产酸克伯杆菌 3 株菌的抑菌活性最好, MIC 为 0.468 75 mg/mL。汉中天麻多糖粗提物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌具有一定的抗菌活性。

关键词:天麻多糖;提取;抗菌活性;最小抑菌浓度

中图分类号: Q949.95; R285

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2018)11-0156-04

天麻(*Gastrodia elata* Bl.) 别称赤箭、定风草、水洋芋等,为兰科天麻属与密环菌特殊共生的多年生草本植物,属国家三级保护物种,是一种名贵的中药材,药用部位为其块茎^[1],其味甘、性平,具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功能,用于治疗头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫、抽搐、破伤风等病症^[2],同时具有镇静、催眠、镇痛、增强免疫等作用^[3-9]。天麻中主要含有天麻素、天麻苷元、天麻多糖等多种成分^[10-11],其中天麻多糖含量高达 25%^[12]。

多糖是由 10 个以上的单糖通过糖苷键连接而成的一种

天然大分子化合物,其种类繁多,广泛存在于动物、植物、微生物中,目前对植物多糖和微生物多糖的研究较多。大量研究表明,多糖具有多种药理活性,如增强机体免疫力、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、降血糖、抗辐射和抗衰老等作用^[13-14]。通过中国知网(China National Knowledge Infrastructure,简称 CNKI)和美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称 NCBI)检索发现,目前关于天麻多糖的研究主要集中在天麻多糖的提取工艺优化、天麻多糖的分离纯化、分子组成分析及结构表征、天麻多糖的增强免疫作用、改善睡眠等方面,未见有关天麻多糖的抗菌活性的研究报道。因此,本试验以汉中天麻为研究对象,从天麻块茎中提取多糖并研究抗菌活性,为其进一步开发研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试药材

鲜天麻,2016 年 11 月采集于陕西省汉中市略阳县。

1.2 供试菌株

选取的 40 株菌株中革兰氏阴性菌(G⁻)20 株、革兰氏阳性菌(G⁺)12 株、真菌 8 株。40 株菌株中标准菌株库菌株 2 株,临床分离致病菌 38 株。菌株由大连理工大学生命科学院于海宁教授、苏州大学药学院王义鹏副教授提供,具体见表 1。

西医药杂志,2003,32(2):107-109.

[8] Wang J C. Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericum* spp. [J]. Medical Sciences, 2001, 17(9): 4612-4671.

[9] 孙力,于子雯. 猴头多糖对 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. 中国医药指南, 2013, 11(23): 64-64.

[10] 杨雪,张海悦,张鑫,等. 猴头菇多糖对小鼠抗疲劳作用研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 368-370, 375.

[11] 王博,张梦珊,张中玉,等. 菊花蜂花粉多糖的分离纯化及抗肿瘤活性研究[J]. 食品工业科技, 2016(5): 358-360.

[12] Zhang X, Li S S, Sun L, et al. Further analysis of the structure and immunological activity of an RG-I type pectin from *Panax ginseng* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(2): 519-525.

[13] Wang B, Diao Q Y, Zhang Z Y, et al. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa* [J]. Molecular Medicine Reports, 2013, 7(5): 1555-1558.

[14] 葛霞,陈婷婷,蔡教英,等. 青钱柳多糖抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(5): 59-64.

[15] 杜志强,王建英. 猴头菇多糖抗氧化活性及耐缺氧功能的研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 398-399.