

香菇菌柄基部多糖的提取及其清除 DPPH 自由基作用的研究

赵 昕, 吴子龙, 陈立凤, 赵九娥

(邯郸学院 生物科学系, 邯郸市资源植物重点实验室, 河北 邯郸 056005)

摘 要:以香菇菌柄基部和纤维素酶为试材,研究了纤维素酶解法提取香菇菌柄基部多糖的最佳工艺。结果表明:粉碎粒度 200 目,酶解温度 35℃,酶解时间 3 h,香菇菌柄基部多糖的提取率可达到 5.124%;初步纯化后的多糖对 DPPH 自由基有较强的清除活性,当清除率为 50%时,香菇多糖的 IC_{50} 为 0.13 mg/mL。

关键词:香菇菌柄基部;多糖;纤维素酶;DPPH 自由基

中图分类号:S 646.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0165-04

香菇(*Lentinus edode*)为侧耳科的担子菌^[1],味道鲜美、营养丰富,是我国著名的食用菌。香菇中含有多种有效药用组分,其中的香菇多糖(Lentinan,简称 LNT)是一种宿主免疫增强剂,具有抗肿瘤、抗病毒、调节免疫功能等作用^[2]。由于香菇菌柄基部(俗称香菇根)中纤维素等成分较多,口感差,以致售卖前人们就将香菇根剪下丢弃,造成极大浪费。然而作为一种可再利用资源如何提高其生产附加值,且对其中的多糖类化合物进行相关研究具有重要意义。因此,从有效利用香菇原材料和生产的角度出发,以纤维素酶为试材,采用酶解法研究了从废弃的香菇菌柄基部提取多糖的最佳工艺;同时进行香菇多糖抗氧化清除 DPPH 自由基作用的研究,为合理开发利用香菇资源提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

香菇菌柄基部由临漳县华森食用菌专业合作社提供,经 80℃烘干至恒重,研磨成粉末状,分别过 200、160、120、60 和 24 目筛,备用。纤维素酶(酶活性 15 U/mg)购于上海耕奔生物技术有限公司。纯度 99%的 DPPH 购于西安沃尔森公司,用无水乙醇配制成 0.01 mmol/L 的 DPPH 溶液,于 0~4℃储存备用。标准葡萄糖(分析纯)、苯酚、浓硫酸等均购于国内试剂公司。

1.2 试验方法

1.2.1 香菇多糖的提取 依据单因素和正交实验条件,准确称取 2 g 过一定目筛的香菇粉末置于烧杯中,加入 50 mL 蒸馏水,摇匀,90℃水浴浸泡 1.5 h。取出,冷却至相应的酶解温度,加入 0.02 g 纤维素酶,摇匀,放入恒温振荡器,进行酶解反应。酶解提取相应时间后沸水浴 10 min,进行灭酶活性处理。将灭酶活性后的溶液 3 000 r/min 室温离心 10 min,取上清,用三氯甲烷:正丁醇(体积比)=4:1 的 Sevage 试剂除蛋白,重复 4 次,其中样品液:Sevage 液(体积比)=5:1。取上清液,用 4 倍体积的乙醇沉淀出多糖,60℃烘干备用。

1.2.2 香菇多糖提取的单因素试验 香菇粉粒度:在酶解温度为 40℃,酶解时间为 1 h 的条件下,对比分析香菇粉粒度为 200、160、120、60、24 目 5 种试验条件下香菇菌柄基部多糖的提取率,以确定适宜的粉粒度。酶解温度:选用适宜粉粒度的样品酶解 1 h,对比分析酶解温度为 35、40、45、50、55℃条件下香菇菌柄基部多糖的提取率,以确定适宜的酶解温度。酶解时间:选用适宜粉粒度的样品,在适宜的酶解温度下,对比分析酶解时间为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 条件下香菇菌柄基部多糖的提取率,以确定适宜的酶解时间范围。

1.2.3 香菇多糖提取的正交实验 根据提取香菇菌柄基部多糖的单因素试验结果,利用 3 因素 4 水平正交实验设计^[3]方案(表 1)研究香菇粉粒度为 200、120、60、24 目,酶解温度为 35、40、45、50℃,酶解时间为 0.5、1.0、2.0、3.0 h 的多糖提取结果。

第一作者简介:赵昕(1977-),女,博士,副教授,现主要从事植物次生代谢等研究工作。E-mail:zhaoxinmdj@126.com。

基金项目:邯郸学院综合实验课改资助项目;邯郸学院博士科研启动基金资助项目(2008006)。

收稿日期:2012-08-27

表 1 $L_{16}(4^3)$ 正交实验设计因素水平Table 1 Factors and levels of $L_{16}(4^3)$ orthogonal test

水平	A 目筛/目	因素 B 温度/℃	C 时间/h
1	200	35	0.5
2	120	40	1
3	60	45	2
4	24	50	3

1.2.4 多糖含量测定 多糖含量采用苯酚-硫酸法测定^[4-5]。标准曲线的绘制:以葡萄糖作为标准品,于 490 nm 波长处测吸光度,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。多糖提取率的计算:在 490 nm 波长处测定 0.1 mL 10 倍体积蒸馏水稀释后样品液的吸光度,根据所得标准曲线的回归方程计算多糖的含量,根据公式计算多糖提取率。香菇菌柄基部多糖提取率=多糖含量/样品干重 $\times 100\%$ 。

1.2.5 多糖溶液对 DPPH 清除反应最佳时间的确定 准确称取 0.5 mg 上述最优提取条件制备的多糖粉末样品,加入 10 mL 蒸馏水,制成 0.05 mg/mL 的样品液。取 2 mL 样品液加入 2 mL DPPH 溶液混匀;2 mL 样品液加入 2 mL 无水乙醇混匀;2 mL DPPH 溶液加入 2 mL 无水乙醇混匀,以蒸馏水作为空白对照,每隔 2 min 测定 3 种混合液 517 nm 处的吸光度,连续测定直到观察到吸光度值没有明显变化为止,并以下式计算清除率^[6]。清除率 $\% = [1 - (A_t - A_1)/A_0] \times 100\%$, A_t : 2 mL 的样品液加 2 mL 的 DPPH 溶液的吸光度, A_1 : 2 mL 的样品液加 2 mL 的乙醇的吸光度, A_0 : 2 mL 乙醇加 2 mL DPPH 溶液的吸光度。

1.2.6 多糖溶液对 DPPH 的清除率 按照 1.2.5 的方法分别配制 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 和 0.35 mg/mL 的多糖样品液,并在 1.2.5 确定的反应时间下测定 517 nm 处的吸光度,计算其对 DPPH 的清除率。以清除 50% DPPH(即 IC_{50})所需的粗多糖浓度为抗氧化性指标^[7]。

1.3 数据分析

试验处理及数据测定均重复 3 次,采用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 多糖含量测定的标准曲线

多糖含量的标准曲线如图 1 所示,回归方程为 $y = 0.0172x - 0.012$, $R^2 = 0.994$,标准曲线的线性关系良好。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 香菇粉粒度 在酶解温度为 40℃,酶解时间为 1 h 的条件下,不同香菇粉粒度对多糖提取率有一定影响(表 2)。香菇粉粒度在 24~120 目和大于 200 目时,多糖提取率有较大差异,因此,选择 200、120、60、24 目为进行

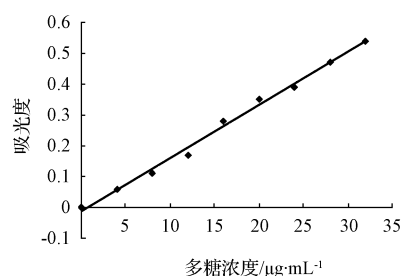


图 1 多糖标准曲线

Fig. 1 The standard curve of polysaccharides

表 2 香菇粉粒度对提取的影响

Table 2 Effects of powder size of *Lentinus edode* on extraction

样品粒度/目	24	60	120	160	200
多糖提取率/%	3.618	3.732	3.896	3.898	4.112

正交实验的粉粒度条件。

2.2.2 酶解温度 选用 200 目的样品酶解 1 h,分析酶解温度为 35、40、45、50、55℃对香菇菌柄基部多糖提取率的影响(图 2)。酶解温度 35~45℃时对多糖提取率的影响较大,变化较快,在 50℃后,多糖提取率减少,因此,酶解温度选为 35、40、45、50℃。

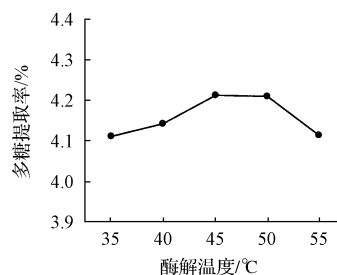


图 2 酶解温度对多糖提取率影响的单因素试验

2.2.3 酶解时间 选用 200 目的样品,在 45℃的酶解温度下,对比分析酶解时间为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 6 种试验条件下香菇菌柄基部多糖的提取率。由图 3 可知,酶解时间对多糖提取率的影响较大,随着酶解时间的增加,多糖提取率也增加,但是 1.5 和 2.0 h 的提取率接近,2.5 和 3.0 h 的提取率也较为接近,因此,选择 0.5、1.0、2.0、3.0 h 为适宜酶解时间。

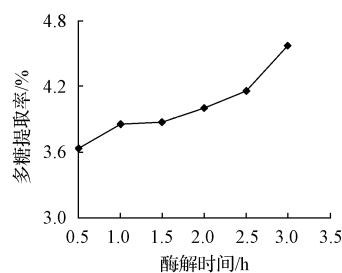


图 3 酶解时间对多糖提取率影响的单因素试验

2.3 正交实验结果

根据表 3 和表 4 的正交实验结果分析可以看出,温度对试验结果有显著影响。各因素对多糖提取的影响程度依次是:温度>时间>粒度;较优的提取条件是 $A_1B_1C_4$,即粉碎粒度 200 目,酶解温度 35℃,酶解时间 3 h。此组合未出现在正交表中,经 3 次试验验证后多糖提取率平均为 5.124%。

表 3 $L_{16}(4^3)$ 正交实验结果Table 3 Results of $L_{16}(4^3)$ orthogonal test

试验号	因素 A 目筛/目	B 温度/℃	C 时间/h	多糖提取率/%
1	1	1	1	4.868
2	1	2	2	4.112
3	1	3	3	4.001
4	1	4	4	4.845
5	2	1	2	4.960
6	2	2	1	3.482
7	2	3	4	4.115
8	2	4	3	4.039
9	3	1	3	4.173
10	3	2	4	4.884
11	3	3	1	3.578
12	3	4	2	3.981
13	4	1	4	4.980
14	4	2	3	4.538
15	4	3	2	3.655
16	4	4	1	3.904
k_1	4.457	4.745	3.958	
k_2	4.149	4.254	4.177	
k_3	4.154	3.837	4.188	
k_4	4.269	4.192	4.706	
R	0.308	0.908	0.748	
优水平	A_1	B_1	C_4	
主次因素			$B>C>A$	
最优组合			$A_1B_1C_4$	

表 4 方差分析结果

Table 4 Analysis of variance(ANOVA) of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
目筛	0.096	3	0.131	3.287	
温度	2.610	3	3.542	3.287	*
时间	1.230	3	1.669	3.287	
误差	1.474	6			
总和	5.410	15			

注: * 表示 $\alpha=0.05$ 。

2.4 多糖溶液对 DPPH 清除反应的最佳时间

由图 4 可知,在 0~20 min 之间,香菇菌柄基部多糖对 DPPH 的清除率随反应时间的增加而增大,清除率从 16.12% 增加到 24.10%。但随着时间的延长,清除率逐步趋于稳定,所以确定最佳反应时间为 20 min。

2.5 不同浓度的多糖溶液对 DPPH 清除作用的影响

不同浓度的香菇多糖对 DPPH 自由基的清除作用不同,多糖浓度为 0.35 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的

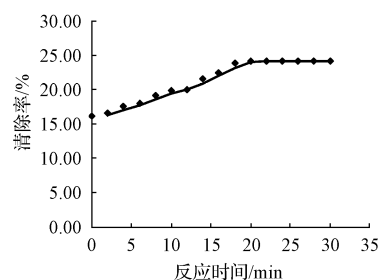


图 4 香菇多糖清除 DPPH 作用的时间响应曲线

清除作用最明显,清除率为 91%。多糖浓度为 0.05 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除作用最不明显,清除率为 24.10%。当多糖浓度在 0.1~0.15 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率为 50%。

将多糖浓度和清除率进行线性分析(图 5),得到回归方程, $y=2.3256x+0.2001$, $R^2=0.9285$,所以当清除率为 50%时, IC_{50} 为 0.13 mg/mL。

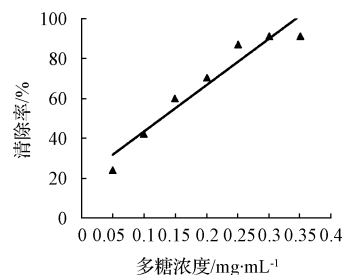


图 5 多糖对 DPPH 自由基清除率曲线

3 结论

香菇菌柄基部多糖提取的最优条件为:粉碎粒度 200 目,酶解温度 35℃,酶解时间 3 h。在此条件下,香菇多糖的提取率达到 5.124%。该试验以对 DPPH 自由基的清除能力来衡量供试材料的抗氧化性能,以清除自由基 50%所需样品浓度为指标,发现初步纯化后的多糖对 0.01 mmol/L 的 DPPH 自由基有明显的抑制作用,当清除率为 50%时,香菇多糖的 IC_{50} 为 0.13 mg/mL。

参考文献

- [1] 田光辉. 香菇多糖提取工艺的优化[J]. 延安大学学报, 2002(4): 46-48.
- [2] 张润光. 香菇的营养保健功能及其产品开发[J]. 食品研究与开发, 2004(4): 125-128.
- [3] 杜荣骞. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 307-314.
- [4] 周斌, 林松毅, 李超, 等. 超声波法提取香菇培养基废弃物中活性多糖的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 237-240.
- [5] 张桂, 赵国群. 超声波萃取植物多糖的研究[J]. 食品科技, 2005, 26(9): 302-304.
- [6] 李娟娟, 周尽花, 戴瑜, 等. 川桂叶总黄酮清除 DPPH· 自由基作用的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(10): 125-128, 132.
- [7] 张志国, 陈锦屏, 邵秀芝, 等. 红枣核类黄酮清除 DPPH 自由基活性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 67-70.

以柠条为主要基质栽培食用菌的配方筛选研究

刘秉儒¹, 宋乃平¹, 苏建宇², 贺永喜³, 牛瑛萍³

(1. 宁夏大学 西北退化生态系统恢复与重建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021;

3. 银川市农业技术推广服务中心, 宁夏 银川 750001)

摘要:以宁夏荒漠草原的柠条粉碎料为试材,以柠条粉占 78%(A)、68%(B)和 58%(C)的 3 种不同培养基为主料,以不添加和添加 10%、20% 玉米芯配栽培培料,研究了不同培养料配方对平菇、金针菇、黑木耳生物学转化率的影响,以期筛选柠条作为主要基质的适宜比例。结果表明:3 种蘑菇都能够在以柠条粉为主料的培养基中正常生长并形成子实体,平菇、金针菇、黑木耳的生物学转化率分别达 64.9%、62.5%和 42.9%,但同种类蘑菇不同配方的生物学转化率有差别,在栽培的 3 种蘑菇中,生物学转化率由大到小的配方顺序均为 C>B>A,而且差异显著;同时,在生物学转化率最高的 C 配方中,产量高低顺序是:平菇>金针菇>黑木耳。这说明在以柠条为主要基质的栽培料中添加一定比例的玉米芯,可以提高菌种的生长速度,缩短生产周期,提高生物学转化率与产量;在相同的配方中,平菇的生物学转化率显著高于其它蘑菇,因此柠条占 58%、玉米芯占 20%的 C 配方可作为最优栽培方案。

关键词:柠条粉;食用菌;基质;筛选;生物学转化率

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0168-03

我国是食用菌生产大国,食用菌总产值仅次于粮、棉、油、果类、蔬菜,在全国居第 6 位。生产上大面积栽培

的食用菌品种主要有平菇、香菇、双孢蘑菇、金针菇、黑木耳、银耳及药用菌灵芝等。食用菌可以将富含纤维素和木质素的农林副产品及农作物秸秆、木材废料、废棉、废纸、酿酒废渣等工农业废物再次利用,生产出大量优质食用菌,其废渣还可进行 3 次利用,开发成为有机肥和反刍饲料,从而达到资源的全部利用、零排放和可持续发展的目标。

柠条是宁夏治沙造林的首选灌木物种,也是人工造林的主要植物,每隔 2~3 a 需要平茬 1 次,但平茬时多年生枝条木质部特别发达,纤维素含量高,牲畜消化吸收的难度大,加之适口性差,作为成型饲料需要添加大

第一作者简介:刘秉儒(1971-),男,博士,副研究员,硕士生导师,现主要从事生态恢复技术与生物资源开发等研究工作。E-mail: bingru.liu@163.com.

责任作者:宋乃平(1963-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事生态恢复技术与生物资源开发等研究工作。E-mail: songnp@163.com.

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2010BAE00743-03);国家重点基础研究和规划发展项目(2012CB723206)。

收稿日期:2012-09-03

Research on the Extraction of Polysaccharides from Stipe Base of *Lentinus edode* and Function of Scavenging of DPPH Radical by the Polysaccharides

ZHAO Xin, WU Zi-long, CHEN Li-feng, ZHAO Ji-ue

(Department of Biology, Handan College, Handan Key Laboratory of Resource Plant, Handan, Hebei 056005)

Abstract: Taking the stipe base of *Lentinus edode* and cellulose as materials, the optimum extraction process of polysaccharides from stipe base of *Lentinus edode* were studied using cellulose method. The results showed that the optimum conditions for extraction process were as follows, the powder size of *L. edode* 200 mesh, extracting temperature 35°C, extracting time 3 h, and the extraction rate of polysaccharides could reach 5.124%. The preliminarily purified polysaccharides had powerful scavenging efficiency to DPPH radical. Its IC₅₀ was 0.13 mg/mL.

Key words: stipe base of *Lentinus edode*; polysaccharides; cellulose; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical