

# 盐渍对双孢菇多糖的影响

杨立红, 刘林德, 王晓洁, 屈慧鸽, 马秋慧, 蔡德华

(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

**摘 要:** 将盐渍和未盐渍的双孢菇分别经热水提取、乙醇沉淀得粗多糖, 结果表明未盐渍双孢菇粗多糖的得率比盐渍双孢菇粗多糖高 2 倍。两份粗多糖经 Sevag 法除去蛋白质后上 DEAE-纤维素柱层析, 分别用蒸馏水和 0.05mol/L NaCl 溶液洗脱, 得到多糖纯品组分 Ab-I、Ab-I' 和 Ab-II、Ab-II'。SephacroseCL-4B 测得盐渍与未盐渍双孢菇多糖的 Ab-I 和 Ab-I' 分子量均为  $7.79 \times 10^4$ 。红外光谱分析表明盐渍处理对双孢菇多糖结构未产生显著影响。多糖抗氧化能力测定的结果表明未盐渍双孢菇多糖的粗品和纯品的抗氧化能力均比盐渍双孢菇多糖的高。

**关键词:** 双孢菇; 盐渍蘑菇; 多糖; 分离鉴定; 抗氧化

## Effects of Salting on Extraction of *Agaricus bisporus* Polysaccharides

YANG Li-hong, LIU Lin-de, WANG Xiao-jie, QU Hui-ge, MA Qiu-hui, CAI De-hua

(College of Biological Science and Technology, Ludong University, Yantai 264025, China)

**Abstract:** The salted and the not-salted *Agaricus bisporus* were extracted by hot water and then deposited by ethanol. Determination results displayed that the extraction rate of crude polysaccharides of the not-salted *Agaricus bisporus* was 2 times higher than that of the salted. The DEAE cellulose column chromatography was used on polysaccharides purification after the protein was extracted with Sevag method. Pure polysaccharides namely Ab-I, Ab-I' and Ab-II, Ab-II' were isolated by distilled water and 0.05 mol/L solution of NaCl eluent respectively. The Sepharose CL-4B method showed that molecular weight of Ab-I and Ab-I' were both  $7.79 \times 10^4$ . Infrared ray (IR) assays showed that the process of salting didn't change the structure of *Agaricus bisporus* polysaccharides obviously. The determination results of anti-oxidant capacity of polysaccharides indicated that the anti-oxidant capacity of the crude and pure polysaccharides of not-salted *Agaricus bisporus* were both higher than that of the salted.

**Key words** *Agaricus bisporus*; salted mushroom; polysaccharides; isolation and identification; anti-oxidation

中图分类号: TS205.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0151-04

收稿日期: 2007-07-11

基金项目: 山东省教育厅科技计划项目(J06N02)

作者简介: 杨立红(1959-), 女, 教授, 主要从事生物化学及生物活性物质开发应用研究。

绿素自然析出, 这是由于叶绿素溶于有机溶剂, 不宜溶于水中。叶绿素可以作为另一个副产物进行开发利用。

### 参考文献:

- [1] 张英. 天然功能性竹叶提取物——竹叶黄酮[J]. 中国食品添加剂, 2002(3): 54-58.
- [2] 陆志科, 谢碧霞. 竹叶活性成分分析及其提取物抗菌效果[J]. 中南林学院学报, 2004(4): 70-74.
- [3] 陆柏益, 张英, 吴晓琴. 竹叶黄酮的抗氧化性及其心脑血管药理活性研究进展[J]. 林产化学与工业, 2005(3): 120-124.
- [4] 李瑶, 齐晓丽, 孟祥颖, 等. 竹叶中黄酮提取纯化工艺研究[J]. 东北

师大学报: 自然科学版, 2006, 38(1): 91-94.

- [5] 许刚, 张虹. 竹叶中黄酮提取方法的研究[J]. 分析化学, 2000, 28(7): 857-859.
- [6] 梁惠花, 刘晓河, 王志宝. 坝上油菜蜂花粉中总黄酮的超声提取及含量测定[J]. 张家口医学院学报, 2003, 20(4): 8-9.
- [7] 兰昌云, 周崇松, 范必威, 等. 超声波法提取槐花中黄酮的最佳工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(1): 55-58.
- [8] 冯涛, 曹东旭, 吕晓玲. 竹叶总黄酮的测定[J]. 中国食品添加剂, 2002(6): 85-88.
- [9] 陆志科, 谢碧霞. 竹叶活性成分分析及其提取物抗菌效果[J]. 中南林学院学报, 2004, 24(4): 70-73.
- [10] 唐传核. 植物生物活性物质[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 171-176.

双孢蘑菇因其担子上通常着生两个担孢子而得名,在分类上隶属真菌门,担子菌纲,无隔担子菌亚纲,伞菌目,蘑菇科,蘑菇属,学名为 *Agaricus bisporus* (Lange) Sing<sup>[1]</sup>。双孢蘑菇肉质肥厚,味道鲜美,营养丰富,是我国目前出口量最大、创汇最高的一种食用真菌,产地主要在福建、四川、山东、浙江等省,近几年在中国西部各省迅速发展,成为西部贫困地区脱贫致富的新途径<sup>[2]</sup>。由于在双孢菇采收时数量较多,不能及时销售,多采用盐渍的方法进行储藏和保鲜,但在盐渍过程中,由于需经杀青、脱盐等处理将不可避免的造成营养物质的丢失,尤其是对水溶性多糖的影响更为显著<sup>[3]</sup>。真菌多糖作为一种免疫功能调节剂,具有抗癌、抗衰老、抗突变、抗氧化等作用<sup>[4-7]</sup>,盐渍工艺对其多糖的影响将会不同程度的降低双孢菇的营养价值和药用价值,因此,此研究对盐渍工艺的改进具有一定的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

双孢菇子实体市售。

### 1.2 仪器

UV9100 紫外分光光度计 日本岛津公司; 红外光谱仪[IR550 (Series II) Spectrometer Nicolet MAGNA] 美国。

### 1.3 试剂

Sephadex G-200 法国 Sigma; SephARose CL-4B、蓝色葡聚糖-2000、标准聚糖(Dextran T-5、T-10、T-20、T-41、T-70) 瑞典 Amersham Biosciences 公司; DEAE-纤维素 进口分装; 总抗氧化能力测定试剂盒购 南京建成生物工程研究所。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 双孢菇的盐渍与脱盐处理

按参考文献[3]和[8]的方法进行盐渍处理,按参考文献[9]进行脱盐处理。

#### 1.4.2 粗多糖的提取

将经盐渍处理的双孢菇和未盐渍的新鲜双孢菇子实体风干后置于烘箱中,60℃烘干至恒重。粉碎过筛(40目)得子实体粉末,称重,按参考文献[10]的方法分别提取盐渍双孢菇与未盐渍双孢菇粗多糖,称重,计算得率。

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{\text{粗多糖重量}}{\text{子实体重量}(\text{mg})} \times 100$$

#### 1.4.3 粗品多糖的含量的测定

分别取盐渍处理和未盐渍的双孢菇多糖粗品100mg,定容至500ml,得0.2mg/ml的粗多糖溶液,稀

释得0.002mg/ml的粗多糖溶液,苯酚-硫酸法<sup>[11]</sup>测定粗多糖的含量。

#### 1.4.4 盐渍处理液中多糖的检测

分别取盐渍工程中的不同处理液,苯酚-硫酸法进行多糖的测定。

#### 1.4.5 粗多糖的分离纯化

分别取盐渍与未盐渍双孢菇粗多糖6g,加入1050ml蒸馏水,加热搅拌使其溶解,Sevag法<sup>[12]</sup>脱蛋白,反复萃取11次。将脱蛋白后的糖溶液定容至200ml置于透析袋中,自来水透析12h,蒸馏水透析12h,每隔3h换一次蒸馏水。称取DEAE-纤维素,按参考文献[13]方法处理,装柱(300×45mm),将透析后的多糖溶液上柱。分别用蒸馏水和0.05mol/L NaCl溶液洗脱,流速2ml/min,按6ml/管自动收集,苯酚-硫酸法显色,分别收集盐渍纯多糖组分及未盐渍纯多糖组分。

#### 1.4.6 多糖纯度鉴定

分别对盐渍纯多糖组分及未盐渍纯多糖组分洗脱液在200~370nm波段进行光谱扫描。

#### 1.4.7 多糖分子量的测定

按参考文献[10]的方法分别测定盐渍纯多糖组分及未盐渍纯多糖的分子量。

#### 1.4.8 红外光谱测定

分别取盐渍和未盐渍蒸馏水洗脱组分粉末5.0mg,加入适量KBr压片,在红外光谱仪中测定红外光谱。

#### 1.4.9 多糖抗氧化能力的测定

采用总抗氧化能力测定试剂盒,按参考文献[14]的测定方法,分别测定盐渍和未盐渍多糖粗品及纯品的总抗氧化能力。

## 2 结果与分析

### 2.1 双孢菇粗多糖的提取

按1.4.2方法分别计算盐渍与未盐渍双孢菇粗多糖的得率,结果如表1所示。

表1 多糖粗品得率  
Table 1 Extraction rate of crude polysaccharides

	子实体粉末(mg)	多糖粗品(mg)	多糖粗品得率(%)
盐渍	104	7.8	7.50
未盐渍	137	20.9	15.2

由表1可见,未盐渍双孢菇多糖得率远高于盐渍双孢菇多糖。可能因为是盐渍处理中水溶性多糖部分丢失。

### 2.2 粗品多糖的含量的测定结果

按1.4.3方法分别测定盐渍与未盐渍粗多糖含量,结

表3 盐渍处理液中多糖含量的检测结果

Table 3 Determination results of polysaccharides content of salted liquids

	煮沸杀青液	盐渍结束后浸泡液	第一次脱盐浸出液	第二次脱盐浸出液	第三次脱盐浸出液
OD 值	0.959	2.646	0.515	0.197	0.475
多糖含量(mg/ml)	0.052	0.141	0.028	0.012	0.026

表2 多糖粗品含量测定结果

Table 2 Determination results of crude polysaccharides content

	粗多糖溶液 浓度(μg/ml)	490nm 处的 OD 值	多糖粗品浓度 (μg/ml)	多糖粗品含量 (%)
盐渍	2	0.015	1.63	81.6
未盐渍	2	0.018	1.79	89.6

果如表2所示。

由表2可见，未盐渍双孢菇多糖粗品的含量比盐渍的高。

2.3 盐渍处理液中多糖含量的检测结果

盐渍处理液中多糖含量的检测结果见表3。

由此可见，在不同的盐渍处理过程中，均有不同程度的多糖被浸出。

2.4 粗多糖的分离纯化结果

盐渍与未盐渍双孢菇粗多糖经DEAE-纤维素柱的洗脱曲线如图1所示。

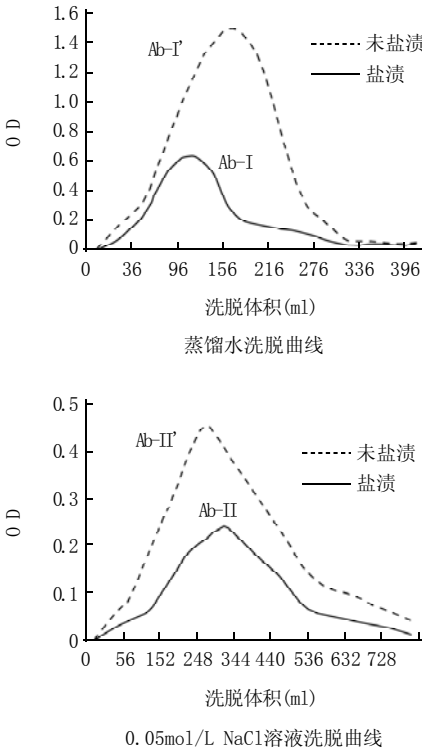


图1 盐渍与未盐渍双孢菇粗多糖 DEAE-纤维素洗脱曲线  
Fig.1 DEAE-cellulose elution profile of crude polysaccharides of salted and not-salted *Agaricus bisporus*

由盐渍的蒸馏水洗脱组分 Ab-I 和 0.05mol/L NaCl

Ab-II 及未盐渍的蒸馏水洗脱组分 Ab-I' 和 0.05mol/L NaCl Ab-II' 的峰面积可以看出，纯化的未盐渍双孢菇多糖的含量高于盐渍双孢菇多糖含量。

2.5 多糖纯度鉴定结果

紫外扫描结果表明，Ab-I 和 Ab-II 及 Ab-I' 和 Ab-II' 均仅在 200nm 处显示多糖吸收峰，均无 260nm 处的核酸吸收峰和 280nm 处的蛋白质吸收峰，说明 Ab-I 和 Ab-II 及 Ab-I' 和 Ab-II' 均不含核酸和蛋白质。

2.6 分子量测定结果

各种不同分子量的多糖标准品分别相继上样于 SepharoseCL-4B 装填的层析柱中，求得的洗脱体积见表4。分子量为 200 万的蓝色葡聚糖测得外水体积( $V_0$ )为 12ml，以  $V_e/V_0$  为纵坐标，分子量的对数( $\lg M$ )为横坐标绘制标准曲线，得到标准方程为： $y=4.9842-0.8315x$ ， $r=0.9990$ 。分别将 Ab-I 和 Ab-I' 上样得洗脱体积均为 11ml，代入方程得多糖 Ab-I 和 Ab-I' 的分子量均为  $7.79 \times 10^4$ 。

表4 标准多糖的洗脱体积  
Table 4 Elution volume of dextran

Dextran	分子量	$V_e$ (ml)	$V_e/V_0$	$\lg M$
T-10	10000	20	1.667	4
T-20	25000	16	1.333	4.398
T-40	40000	14	1.167	4.602
T-70	70000	11	0.917	4.845
T-41	410000	4	0.333	5.613

2.7 红外光谱测定结果

盐渍和未盐渍的双孢菇 Ab-II 和 Ab-II' 的红外光谱(IR)测定结果见图2。

盐渍与未盐渍双孢菇的红外光谱基本一致，因此，

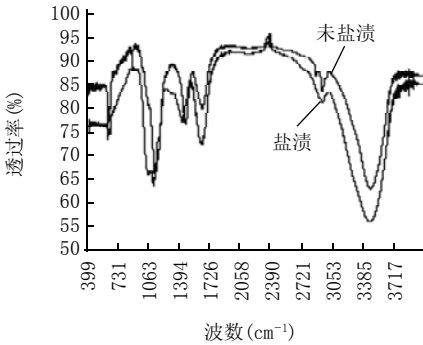


图2 Ab-II' 和 Ab-II 的红外光谱  
Fig.2 IR of Ab-II' and Ab-II

表5 多糖总抗氧化能力  
Table 5 Anti-oxidant capacity of polysaccharides

		浓度(mg/ml)	加入待测样本的量(μl)	对照管 OD <sub>520</sub>	测定管 OD <sub>520</sub>	总抗氧化能力(单位/ml)
纯品	盐渍(Ab-I)	4	200	0.016	0.106	5.7
	未盐渍(Ab-I')	4	200		0.227	13.4
粗品	盐渍	1	100	0.015	0.016	0.123
	未盐渍	1	100		0.019	0.253

盐渍工艺对多糖结构未见明显改变。Ab-II' 和 Ab-II 均在 3400~2800nm 处均具有糖的特征吸收峰<sup>[11]</sup>, 1647.10cm<sup>-1</sup> 吸收峰为 C=O 非对称伸缩振动所致, 1460.01cm<sup>-1</sup> 吸收峰为 C=O 的对称伸缩振动所致, 说明都有羧酸的存在, 1132.14cm<sup>-1</sup> D-吡喃葡萄糖苷吸收峰, 877.55cm<sup>-1</sup> 处为 β-D-吡喃葡萄糖苷吸收峰。因而, Ab-II 和 Ab-II' 均为 β-D-吡喃酸性葡聚糖。

### 2.8 多糖总抗氧化能力的测定及比较结果

由表5可以看出, 未盐渍双孢菇多糖粗品与纯品的总抗氧化能力均比盐渍双孢菇多糖粗品与纯品的总抗氧化能力高, 盐渍与未盐渍的双孢菇多糖, 其纯品糖含量比粗品糖含量的总抗氧化能力强。由此说明, 糖的含量对其总抗氧化能力有一定影响, 糖含量高, 总抗氧化能力强。

## 3 讨论

实验结果表明, 盐渍工艺对双孢菇多糖的影响主要表现在含量上, 由于盐渍过程水溶性多糖的丢失, 其有效成分含量减少, 总抗氧化能力随之下降。分子量和红外光谱测定结果表明, 盐渍工艺对双孢菇多糖的分子量和结构没有明显改变, 盐渍与未盐渍的双孢菇多糖均为 β-D-吡喃酸性葡聚糖。有研究表明<sup>[15-16]</sup>, 具有抗肿瘤活性的多糖都具有 β-型糖苷键, 因此, 盐渍与未盐渍双孢菇多糖应均有抗肿瘤活性, 但还有待于进一步研究。

盐渍对双孢菇多糖含量的影响, 主要是由于在盐渍中需经杀青处理, 通常盐渍工艺杀青时间为 5~8min<sup>[8]</sup>, 杀青处理的主要目的是钝化菇中的多酚氧化酶和过氧化物酶等使菇体变质的多种酶类, 由于过氧化物酶的耐热性比其它酶类强, 因此一般以过氧化物酶被破坏的程度作为杀青所需时间的依据。有研究表明, 采用 95~96℃烫漂温度效果最好, 在 3min 内过氧化物酶活性降低了 95.5%<sup>[17]</sup>。因此, 为减少水溶性多糖的损失, 杀青处理时间不宜过长, 此外, 食用菌中氨基酸、矿质

营养元素、维生素等在杀青处理中也都有不同程度的损失。所以, 提示在储藏和保鲜过程中, 盐渍工艺仍需进一步改善, 以提高双孢菇的营养价值和保健作用。

### 参考文献:

- [1] 吴素玲, 孙晓明, 王波, 等. 双孢蘑菇子实体营养成分分析[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(2): 47-48.
- [2] 武金霞, 张贺迎, 杨睿, 等. 双孢蘑菇子实体多糖的提取及单糖组成[J]. 中国食用菌, 2003, 22(1): 31-32.
- [3] 曲美玲, 李梅. 双孢蘑菇罐头加工工艺[J]. 中国农业, 2000(1): 23-24.
- [4] 耿越, 赵相轩, 花义山, 等. 高效毛细管电泳法测定蜂蜜中单糖的含量[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 114-116.
- [5] 石若夫, 李建国, 李洪艳, 等. 从椴子细胞培养物中分离多糖最佳工艺条件的研究[J]. 生物技术, 2000, 10(5): 23-24.
- [6] 马迪根 M T, 马丁克 J M, 帕克著 J. 微生物生物学[M]. 杨文博, 等译. 8版. 北京: 科学出版社, 2001: 45-47, 974-978.
- [7] 阿历索保罗 C J, 明期 C W. 真菌学概论[M]. 余永年, 宋大康, 等译. 北京: 中国农业出版社, 1983: 396.
- [8] 陈天仁, 魏生龙. 双孢菇采收与盐渍加工技术[J]. 西北园艺, 2003(3): 47-48.
- [9] 何弥尔. 盐渍蘑菇脱盐技术的研究[J]. 昆明师范高等专科学校学报, 2000, 22(4): 23-25.
- [10] 杨立红, 黄清荣, 冯培勇, 等. 榛蘑多糖的分离鉴定及其清除氧自由基作用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 309-312.
- [11] 张惟杰. 复合物生化技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 11-12.
- [12] 吴梧桐. 生物化学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 13-14.
- [13] 孙智达, 张声华. 枸杞多糖的提取、分离及理化特性研究[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(6): 603-604.
- [14] 杨立红, 王晓洁, 钟旭升, 等. 鱼腥藻藻蓝蛋白的抗氧化作用[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 208-212.
- [15] TAKUMA S, NORIKO A, KAZUO N, et al. Antitumor activity of carboxymethylglucans obtained by carboxymethylation of (1→3)-β-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IF013140[J]. Eur J Cancer, 1979, 115: 211-215.
- [16] YOSHIYUKI A, NAOHITO O, TOSHIRO Y Y S, et al. Degradation with formic acid of conformationally different (1→3)-β-glucans isolated from liquid-cultured mycelium of *Grifola frondosa*[J]. Carbohydr, 1988, 177: 91-100.
- [17] 樊建, 赵天瑞, 曹建新. 冻结条件对黑牛肝菌营养价值影响的研究[J]. 中国食用菌, 2006, 25(2): 47-49.