

平菇水溶性多糖结构表征与体外抗氧化作用

程超¹, 李伟², 汪兴平¹

(1. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000;

2. 西南农业大学园林学院, 重庆 400716)

摘要: 本文主要采用酶法辅助热水提取平菇多糖, 乙醇沉淀, 并用正交实验确定最佳条件, Sevage 法脱蛋白, 乙醇分级沉淀后, 得到 A、B、C、D 四个组分, 其中 C 用紫外和红外扫描证明其与蛋白质以复合物形式存在。同时在体外设计超氧自由基、羟基自由基等体系, 测定平菇粗多糖对他们的清除作用, 实验结果表明, 酶法处理水溶性多糖的提取率达到 15.7%, 平菇粗多糖对超氧阴离子自由基、羟基自由基具有清除作用。

关键词: 平菇; 水溶性多糖; 结构; 抗氧化

Study on the Structure Analysis and Antioxidation Effect in vitro of Water Soluble Polysaccharide of *Pleurotus ostreatus*

CHENG Chao¹, LI Wei², WANG Xing-ping¹

(1. Bioscience and Technology College, Hubei Nationalities Institute, Enshi 445000, China

2. Horticulture and Forest School, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China)

Abstract: In this paper, the polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* were extracted by enzymy and hot-water, and precipitated with perpendicular experiments. The protein in polysaccharides was removed by seavage way. The polysaccharides were graded to A、B、C、D by ethanol. The results showed that the extracting rate of water soluble polysaccharides by enzyme was 15.7%, and the polysaccharides had antioxidation effect on the $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$.

Key words: *Pleurotus ostreatus*; water soluble polysaccharides; structure; antioxidation

中图分类号: S646.14

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)08-0055-03

平菇(*Pleurotus ostreatus*)又称白平菇, 侧耳, 是广泛栽培的食用菌之一。平菇营养丰富, 味道鲜美, 每 100g 干品中含有蛋白质 7.8~17.7g, 脂肪 1.0~2.3g, 多糖类 57.6~81.8g, 粗纤维 5.6g, 还原糖 0.87~1.8g, 此外平菇中含有抗肿瘤的多糖蛋白, 以及抗生素和降血压, 防止脑血管疾病的牛磺酸等, 长期食用平菇, 可以降低血压, 降低胆固醇含量, 防止血管硬化, 另外平菇还能调节植物神经功能, 特别是对更年期综合症有明显调节作用^[2]。本文主要采用乙醇分级沉淀, 紫外光谱(UV)和红外光谱(IR)等方法对其结构进行初步研究, 同时对平菇多糖在体外对自由基的作用进行了试验。

1 材料与方法

1.1 材料

平菇: 购于市场, 60℃干制粉碎过筛备用。

1.2 试剂

95% 乙醇、98% 硫酸、蒽酮、三氯甲烷、正丁醇、葡萄糖等均为分析纯。

1.3 实验仪器

XA-1 型高速万能粉碎机; WB800S 型微波炉; R-201 型旋转蒸发器; 756MC 紫外分光光度计; FT-IR 红外光谱仪。

1.4 水溶性多糖的提取工艺^{[1][6]}

新鲜平菇→清洗→干燥→机械粉碎→酶处理→浸提→离心→上清液浓缩→醇析→离心→收集沉淀物→水洗→脱蛋白→醇析→干燥粗多糖

1.5 多糖的测定^[3]

总糖的测定: 蒽酮硫酸法; 还原糖测定: 菲林试剂法; 多糖 = 总糖 - 还原糖

1.6 平菇多糖的紫外可见光谱测定

配制一定浓度的平菇多糖溶液, 使用紫外可见分光光度计在波长 200~400nm 范围内扫描。

收稿日期: 2005-05-25

作者简介: 程超(1976-), 女, 讲师, 硕士研究生, 主要从事于食品化学研究。

1.7 红外扫描

干燥的平菇多糖 10mg, 与 100~200mgKBr 研磨后压片, 于 FT-IR 红外光谱仪在 4000~500cm⁻¹ 波段扫描。

1.8 多糖的自由基清除作用

1.8.1 平菇多糖对羟基自由基·OH 的清除率的测定^[7]

利用 H₂O₂ 与 Fe²⁺ 混合产生·OH, 在体系内加入水杨酸捕捉·OH 并产生有色物质, 该物质在 510nm 下有最大吸收。反应体系中含 8.8mmol/L H₂O₂ 1ml、9mmol/L FeSO₄ 1ml、9mmol/L 水杨酸-乙醇 1ml、不同浓度的多糖溶液 1ml。最后加 H₂O₂ 启动反应, 37℃ 反应 0.5h, 以蒸馏水为参比, 在 510nm 下测量各浓度的吸光度。考虑到多糖本身的吸光值, 以 9mmol/L FeSO₄ 1ml、9mmol/L 水杨酸-乙醇 1ml、不同浓度的多糖溶液 1ml 和 1ml 蒸馏水为多糖的本底吸收, 清除率计算公式:

$$\bullet\text{OH 清除率} = (A_0 - A_x - A_{x0}) / A_0 \times 100\%$$

其中 A₀ 为空白对照液的吸光度, A_x 为加入多糖溶液后的吸光度, A_{x0} 为不加显色剂 H₂O₂ 多糖溶液本底的吸光度。

1.8.2 平菇多糖对超氧阴离子自由基清除率的测定^{[6][8]}

采用邻苯三酚自氧化法测定, 取 4.5ml pH8.2 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 4.2ml 蒸馏水, 混匀后在 25℃ 水浴中保温 20min, 取出后立即加入在 25℃ 预热过的 3mmol/L 邻苯三酚 0.3ml (以 10mmol/L HCl 配制, 空白管用 10mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液), 迅速摇匀后倒入比色杯, 325nm 下每隔 30s 测定吸光度, 计算线性范围内每分钟吸光度的增加。在加入邻苯三酚前, 先加入一定体积的多糖溶液, 蒸馏水减少, 然后按上述方法计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = (\Delta A_0 - \Delta A) / (\Delta A_0) \times 100$$

其中: ΔA_0 为邻苯三酚的自氧化速率

ΔA 为加入多糖溶液后邻苯三酚的自氧化速率, 单位均为吸光度每分钟的增值。

2 结果与分析

2.1 酶法预处理条件的研究

本实验主要采用纤维素酶、木瓜蛋白酶降解细胞壁及糖与蛋白质之间的键, 采用 6 因素 3 水平的正交实验, 选用 L₁₈(3⁶) 的正交表, 实验结果见表 1 和表 2。

通过极差分析可以看出, 酶法预处理的最佳处理条

表 1 酶法提取的正交实验因素水平表

Table 1 The factors and levels of orthogonal experiment with enzyme extraction

因素	A 纤维素酶	B 木瓜蛋白酶	C 料液比	D 时间	E pH	F 温度
1	0.01%	0.01%	1:20	1h	5.0	30℃
2	0.02%	0.02%	1:25	2h	6.0	40℃
3	0.03%	0.03%	1:30	3h	7.0	50℃

表 2 酶法处理正交实验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	E	F	G	多糖得率 (%)
1	1	1	1	1	1	1	1	7.49
2	1	2	2	2	2	2	2	8.77
3	1	3	3	3	3	3	3	11.13
4	2	1	1	2	2	3	3	9.05
5	2	2	2	3	3	1	1	15.7
6	2	3	3	1	1	2	2	9.15
7	3	1	2	1	3	2	3	9.57
8	3	2	3	2	1	3	1	8.89
9	3	3	1	3	2	1	2	8.50
10	1	1	3	3	2	2	1	8.72
11	1	2	1	1	3	3	2	8.70
12	1	3	2	2	1	1	3	9.36
13	2	1	2	3	1	3	2	9.87
14	2	2	3	1	2	1	3	10.7
15	2	3	1	2	3	2	1	7.51
16	3	1	3	2	3	1	2	9.15
17	3	2	1	3	1	2	3	10.61
18	3	3	2	1	2	3	1	9.78
K ₁	9.028	8.975	8.643	9.232	9.228	10.15		
K ₂	10.33	10.652	10.508	8.788	9.253	9.053		
K ₃	9.417	9.253	9.623	10.753	10.293	9.57		
R	1.302	1.587	1.805	1.965	1.065	1.097		

件为 A₂B₂C₃D₃E₃F₁, 既是纤维素酶和木瓜蛋白酶的用量分别为 0.02%, 料液比为 1:30, 处理时间为 3h, pH 为 7.0, 处理温度为 30℃。其中酶处理时间对预处理的影响最显著, 其影响顺序为 D > C > B > A > F > E, 即处理时间 > 料液比 > 木瓜蛋白酶 > 纤维素酶 > 处理温度 > pH。

2.2 平菇多糖的分级

配制一定浓度的平菇粗多糖溶液, 分别用不同的浓度的乙醇进行沉淀, 实验采用粗多糖溶液与乙醇的体积比分别为 1:1、1:2、1:3、1:4 进行, 分别得到 A、B、C、D 四种不同的平菇多糖组分, 根据沉淀量的多少对 C 多糖组分进行紫外和红外扫描。

2.3 平菇多糖的紫外扫描

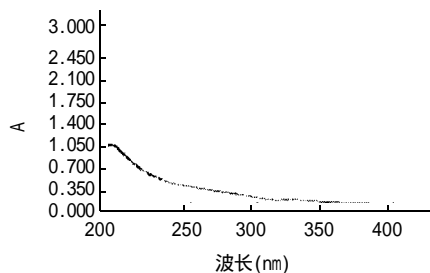


图 1 平菇多糖的紫外扫描图谱

Fig. 1 The UV spectrum of polysaccharides of Pleurotus ostreatus

紫外扫描图谱的结果 (见图 1) 显示, 在波长 260nm 和 280nm 虽然没有明显的吸收峰, 但是有一定的吸光值,

表明此多糖中可能含有蛋白质等物质。

2.4 平菇多糖的红外扫描图谱

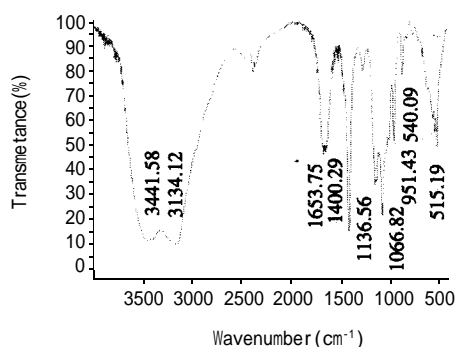


图2 平菇多糖的红外扫描图谱

Fig.2 The IR spectrum of polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*

红外图谱见图2, 在 3000cm^{-1} 附近有 -O-H 伸缩振动的强吸收峰, 在 1600cm^{-1} 附近可能为酰胺吸收峰, 1400cm^{-1} 附近为 C-H 弯曲振动吸收峰, $1200\sim 1010\text{cm}^{-1}$ 附近均有 C=O 的伸缩振动峰, 1066cm^{-1} 附近的吸收峰说明平菇多糖为吡喃多糖, 同时 899cm^{-1} 附近的吸收峰表明多糖中含有 β -糖苷键, 以上均为多糖的特征吸收峰。

2.5 平菇多糖对羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除率的测定

采用不同浓度的平菇多糖, 按照实验方法的步骤进行羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定, 具体结果见表3。

表3 平菇多糖对羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除率

Table 3 The elimination effect of different content polysaccharide on the $\cdot\text{OH}$

反应液体中多糖浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	清除率 (%)
25	3.344
50	3.560
75	3.614
100	5.017
125	9.440
150	10.41

由表3可以看出, 平菇多糖对羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用较明显, 并且随着多糖浓度的增加, 清除效果愈强。通过对以上数据进行统计分析, 可以得出多糖浓度($x, \%$)与清除率($y, \%$)的回归方程为 $y=0.2465+0.0641x$, 其相关系数 $r=0.944$, 对回归方程进行 t 检验得 $t=4.538$, 查表得 $t > t_{0.025, 4}=3.495$, 所以此回归方程在 0.025 水平上显著。其 EC_{50} 为 $776\mu\text{g/ml}$ 。

2.6 平菇多糖对超氧自由基清除率的测定

采用不同浓度的平菇多糖, 按照实验方法的步骤进行超氧自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率的测定, 具体结果见表4。

由表4可以看出, 平菇多糖对超氧自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的

表4 平菇多糖对超氧自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率

Table 4 The relationship between the polysaccharide content and the eliminating of $\text{O}_2^{\cdot-}$

反应液体中多糖浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	清除率 (%)
100	10
200	20
300	40
400	70
500	55
600	35

清除作用较明显, 随着多糖浓度的增加, 清除效果先上升后下降。通过对以上数据进行的统计分析, 可以得出多糖浓度($x, \%$)与清除率($y, \%$)的回归方程为多项式回归 $y=-36+0.437x-0.0005x^2$, 通过方差分析得出此回归方程在 0.05 水平上显著。当平菇多糖的浓度超过 $400\mu\text{g/ml}$ 时其清除超氧自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力下降, 这与文献[2]的结果一致。

3 结 论

总之本文主要采用酶法辅助热水提取平菇多糖, 乙醇沉淀, 并用正交实验确定最佳条件, Seavage法脱蛋白, 乙醇分级沉淀后, 得到A、B、C、D四个组分, 其中C用紫外和红外扫描证明其与蛋白质以复合物形式存在。同时在体外设计超氧阴离子自由基、羟基自由基等体系, 平菇粗多糖对超氧阴离子自由基、羟基自由基具有清除作用。

参考文献:

- [1] 孙培龙, 等. 姬松茸子实体多糖提取方法的研究[J]. 食品科学, 2003, (6).
- [2] 杨海龙, 林燕文. 平菇多糖的分离纯化及其对超氧自由基的效应[J]. 食品科学, 1999, 10.
- [3] 杨光成, 等. 灵芝菌丝体多糖含量的准确测定[J]. 食品工业科技, 2001, (5).
- [4] 杨文杰, 等. 螺旋藻多糖的水提与微波辅助提取的比较[J]. 食品工业科技, 2003, (8).
- [5] 复合酶解法提取裙带菜硫酸多糖的研究[J]. 食品科学, 1999, (11).
- [6] 唐莉莉, 丁霄霖. 竹叶多糖的分离提取及其生物活性研究[J]. 食品研究与开发, 2000, (1).
- [7] 陈留勇, 孟宪军, 贾薇, 等. 黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基提高免疫活性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 167-170.
- [8] 聂凌鸿, 宁正祥. 广州淮山水溶多糖的分离纯化及体外抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 129-133.