

两种羊肚菌胞内多糖体外抗氧化性

杨芳^{1,2}, 王新风^{1,2,*}, 翁良¹, 戈群妹¹, 陈珊珊¹

(1.淮阴师范学院生命科学院 资源微生物研究所, 江苏 淮安 223300;

2.江苏省生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300)

摘要: 用水提醇沉法提取北京羊肚菌(*M_B*)和淮阴羊肚菌(*M_H*)菌丝体胞内多糖(IPS1), 经脱色及脱蛋白得纯化多糖(IPS2)。采用水杨酸法测定 IPS1 和 IPS2 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用; 邻苯三酚自氧化法测定 IPS1 和 IPS2 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抑制作用。结果表明: IPS1 和 IPS2 均能明显地清除 $\cdot\text{OH}$ 和抑制 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力, 在 1~5mg/mL 质量浓度范围, 抗氧化活性随质量浓度的增加而增加。*M_B* 和 *M_H* 提取的 IPS1 和 IPS2 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力差异不显著, *M_B* 和 *M_H* 提取的 IPS1 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的差异也不显著, *M_H* 提取的 IPS1 和 IPS2 之间清除 $\cdot\text{OH}$ 能力差异显著, 质量浓度为 5mg/mL 时, IPS1 清除能力只有 22.57%, 而 IPS2 清除能力高达 46.27%, 表明 *M_H* 的胞内多糖的清除 $\cdot\text{OH}$ 能力明显高于 *M_B* 胞内多糖。

关键词: 羊肚菌; 胞内多糖; 抗氧化性

Antioxidant Activity of Intracellular Polysaccharides (IPS) from *Morchella esculenta* L.

YANG Fang^{1,2}, WANG Xin-feng^{1,2,*}, WENG Liang¹, GE Qun-mei¹, CHEN Shan-shan¹

(1.Institute of Resource Microorganism, College of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake, Huai'an 223300, China)

Abstract: The crude intracellular polysaccharides (CIPS_{M_B} and CIPS_{M_H}) extracted from the mycelia of *Morchella esculenta* L. from Beijing (*M_B*) and Huaiyin (*M_H*) areas by water extraction and alcohol precipitation were subjected to decolorization and deproteinization to obtain purified CIPS_{M_B} and CIPS_{M_H}, denoted as PIPS_{M_B} and PIPS_{M_H}, respectively. The scavenging effects of the four samples on hydroxyl and superoxide anion free radicals were tested by salicylic acid method and pyrogallol autoxidation method, respectively. It was observed that all the four samples were able to obviously scavenge both free radicals, displaying a positive concentration-dependent response in a concentration range between 1 mg/mL and 5 mg/mL. No statistical significance in the ability to scavenge superoxide anion free radicals was found between CIPS_{M_B} and PIPS_{M_B} and between CIPS_{M_H} and PIPS_{M_H}. CIPS_{M_B} and CIPS_{M_H} had no significant difference in the ability to scavenge hydroxyl free radicals. However, there was a significant difference in the ability to scavenge hydroxyl free radicals observed between CIPS_{M_H} and PIPS_{M_H}; the scavenging rate of CIPS_{M_H} at a concentration of 5 mg/mL was only 22.57%, whereas that of PIPS_{M_H} was as high as 46.27%, indicating that purification greatly enhances the hydroxyl free radical scavenging capacity of intracellular polysaccharides from the mycelia of *Morchella esculenta* L. from Huaiyin area.

Key words: *Morchella esculenta* L.; intracellular polysaccharide; antioxidant activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0076-03

羊肚菌(*Morchella esculenta* L.)隶属于囊菌亚门(Ascomycotina)、盘菌纲(Discomycetes)、盘菌目(Pezizales)、羊肚菌科(Morchellaceae)、羊肚菌属(*Morchella*), 因其菌盖表面呈许多小凹坑, 外观极似羊肚而得名。羊肚菌又名羊肚菜, 是一种野生名贵食药真菌, 最早收录于李时珍的《本草纲目》^[1]。羊

肚菌性平、味甘。能益肠胃、化痰理气, 是一种良好的中药。近来研究发现羊肚菌富含多糖。真菌多糖具有免疫调节功能和抗肿瘤功能。免疫调节作用是大多数活性多糖的共同特性^[2-3], 也是它们发挥其他生理和药理作用(如抗肿瘤)的基础。许多多糖都是哺乳动物的免疫调节剂^[4]。真菌多糖并不能直接杀死肿瘤细胞, 但却

收稿日期: 2010-09-13

基金项目: 江苏省教育厅高新产业项目(JHSD04-006); 江苏省大学生实践创新训练项目(JSDXS20090212);

淮阴师范学院教授基金项目(08HSJSK05)

作者简介: 杨芳(1983—), 女, 硕士, 主要从事真菌生理生化研究。E-mail: yangfang072@126.com

* 通信作者: 王新风(1964—), 男, 教授, 学士, 主要从事食品微生物研究。E-mail: wangxf@hytc.edu.cn

可以刺激机体免疫能力,从而达到抑制肿瘤细胞增生的目的^[5]。因此真菌多糖具有极其重要的利用与开发价值。羊肚菌胞内多糖(IPS)是羊肚菌的重要活性成分,本实验室以羊肚菌胞内多糖为研究对象,对两种不同来源羊肚菌进行胞内多糖(IPS1和IPS2)抗氧化性进行研究,为今后更好的利用与开发羊肚菌多糖抗氧化功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

羊肚菌(*Morchella esculenta* L.)母种分别购自中国农业大学食用菌研究室(M_B)和采集分离自江苏盱眙的母种(M_H)。

1.2 试剂

蒽酮、95%乙醇、水杨酸、过氧化氢、FeSO₄·7H₂O、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris),以上试剂均为分析纯 淮安国药化学试剂有限公司。

1.3 仪器与设备

T6新世纪紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; TDL-5000B离心机 上海安亭科学医学仪器厂; BS210S电子天平 北京赛多利斯天平有限公司; HD-930型组合式全温摇床 江苏太仓市实验仪器厂; 水浴锅 金坛市正基仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 羊肚菌胞内多糖浸提和纯化^[6]

精确称取已研磨好的干菌丝,按加水比50:1(V/m)加入蒸馏水,摇匀后,85℃恒温水浴浸提2h后取出,用滤纸过滤,残渣再重新提取一次,合并提取液。提取液分两步制备羊肚菌多糖:直接经醇沉法制得羊肚菌胞内粗多糖(IPS1);经5% H₂O₂脱色和Sevag法脱蛋白后,再醇沉、真空干燥得羊肚菌精多糖(IPS2)。

1.4.2 羊肚菌多糖测定

采用蒽酮比色法,参考文献[7]。

1.4.3 羊肚菌中各种提取液对·OH的清除率的测定^[8-10]

将IPS1和IPS2配制成一系列梯度浓度的液体,采用水杨酸法测定IPS1和IPS2对·OH清除率。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A₀为空白对照液的吸光度; A_x为加入待测溶液后的吸光度; A_{x0}为待测溶液的本底吸光度。

1.4.4 羊肚菌中各种提取液对O₂⁻清除率的测定^[11-12]

采用邻苯三酚自氧化法,取0.05mol/L pH8.2的Tris-HCl缓冲液4.5mL于试管中,置25℃水浴中预热20min,加入0.1mL各供试液,2.5mmol/L邻苯三酚0.4mL,混匀后在25℃水浴中准确反应4min,立即用8mol/L 0.1mL HCl

终止反应,并在299nm波长处测定吸光度(以蒸馏水调零),对照组用0.1mL蒸馏水代替供试液,同时设立试剂空白管。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (2)$$

1.4.5 数据处理

实验设3次平行,数值采用($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 羊肚菌胞内多糖IPS1和IPS2的含量

表1 两种羊肚菌中IPS1和IPS2的含量
Table 1 Contents of IPS1 and IPS2 in the mycelia of *Morchella esculenta* L. from Beijing and Huaiyin

胞内多糖	多糖含量/(mg/g)	
	M _B	M _H
IPS1	107.300 ± 8.343	114.850 ± 3.606
IPS2	90.800 ± 0.212	103.050 ± 0.777

由表1可知,比较两种羊肚菌中胞内多糖IPS1和IPS2的含量, M_H大于M_B。经脱色与脱蛋白纯化后得到的IPS2与未经纯化的IPS1之间差距不是很大,后者分别是前者的89.73%和84.62%,说明在粗多糖中蛋白的含量并不多。

2.2 MB中胞内多糖对O₂⁻和·OH的清除率

表2 MB中IPS1和IPS2对O₂⁻和·OH的清除率
Table 2 Scavenging rates of CIPS_{MB} and PIPS_{MB} on hydroxyl and superoxide anion free radicals

多糖质量 浓度/(mg/mL)	自由基清除能力/%			
	O ₂ ⁻		·OH	
	IPS1	IPS2	IPS1	IPS2
1	56.75 ± 0.437	70.41 ± 0.218	13.99 ± 1.475	9.57 ± 1.422
2	58.03 ± 0.156	71.17 ± 0.095	15.57 ± 1.006	13.11 ± 1.113
3	59.09 ± 0.031	71.71 ± 0.095	16.91 ± 0.738	16.59 ± 0.675
4	60.54 ± 0.996	72.58 ± 0.180	19.65 ± 2.178	18.51 ± 1.021
5	61.00 ± 0.625	73.08 ± 0.095	24.46 ± 4.566	22.57 ± 0.442

由表2得知,随着M_B中胞内多糖质量浓度的增加,抑制O₂⁻和清除·OH的能力也都是逐渐增加。清除自由基能力最强是多糖含量为5mg/mL,此时IPS1和IPS2抑制O₂⁻能力分别是61%和73.083%,清除·OH能力分别是24.46%和22.57%。运用DPS软件,采用定量数据机率分析方法,得IPS1对O₂⁻的EC₅₀质量浓度是0.0963mg/mL,IPS2对O₂⁻的EC₅₀质量浓度是0.0002mg/mL,且二者清除率回归方程的方差分析F值的显著水平P值分别为0.0029和0.0051。IPS1对·OH的EC₅₀质量浓度是123.9529mg/mL,IPS2对·OH的EC₅₀质量浓度是48.3226mg/mL,且二者质量浓度对数与清除率回归方程的方差分析表明,F值的显著水平P < 0.05(分别为0.00292和0.0051)。说明纯化

后的多糖清除自由基的能力要强于粗多糖。

2.3 M_H 中胞内多糖对 O₂⁻ 和 •OH 的清除率

表3 M_H 中 IPS1 和 IPS2 对 O₂⁻ 和 •OH 的清除率

Table 3 Scavenging rates of CIPSM_H and PIPSM_H on hydroxyl and superoxide anion free radicals

多糖质量 浓度/(mg/mL)	自由基清除能力/%			
	O ₂ ⁻		•OH	
	IPS1	IPS2	IPS1	IPS2
1	58.75 ± 0.375	70.40 ± 0.130	13.25 ± 2.869	25.37 ± 1.553
2	60.44 ± 0.625	71.02 ± 0.260	14.91 ± 1.247	29.59 ± 1.842
3	61.53 ± 0.656	72.48 ± 0.355	15.38 ± 1.247	36.95 ± 2.227
4	62.47 ± 0.781	73.00 ± 0.165	19.15 ± 0.471	38.30 ± 1.422
5	63.06 ± 0.634	73.17 ± 0.281	21.05 ± 1.187	46.27 ± 2.414

由表3可知,随着M_H胞内多糖质量浓度的增加,抑制O₂⁻和清除•OH的能力也都是逐渐增加。清除自由基能力最强是多糖质量浓度为5mg/mL,此时IPS1和IPS2抑制O₂⁻能力分别是63.063%和73.167%,清除•OH能力分别是21.05%和46.27%。运用DPS软件,采用定量数据机率分析方法,得IPS1对O₂⁻的EC₅₀质量浓度是0.0440mg/mL,IPS2对O₂⁻的EC₅₀质量浓度是0.0007mg/mL,且二者清除率回归方程的方差分析F值的显著水平P值分别为0.0008和0.0064。IPS1对•OH的EC₅₀质量浓度是346.5629mg/mL,IPS2对•OH的EC₅₀质量浓度是7.9611mg/mL,且二者质量浓度对数与清除率回归方程的方差分析表明,F值的显著水平P<0.05(分别为0.0239和0.0088)。说明纯化后的多糖清除自由基的能力要强于粗多糖。

2.4 VC 标准品对自由基的清除作用

表4 VC 标准品对 O₂⁻ 和 •OH 的清除率

Table 4 Scavenging rates of vitamin C standard on hydroxyl and superoxide anion free radicals

VC 质量浓度/(mg/mL)	自由基清除能力/%	
	O ₂ ⁻	•OH
0.1	38.65 ± 0.901	28.47 ± 0.987
1	97.41 ± 0.670	99.88 ± 0.033

3 讨 论

多糖分子上均具有还原性的半缩醛羟基,可与氧化剂活性氧发生氧化还原反应^[13]。羊肚菌胞内多糖(IPS1和IPS2)具有很强的抗氧化能力,在一定质量浓度范围内,对O₂⁻的清除中其清除能力与多糖的纯度和质量浓度呈正相关,多糖的纯度越高,质量浓度越大其抗氧化能力越强。经纯化后的北京羊肚菌多糖溶液在质量浓度达1mg/mL时,其清除能力为70.406%,在质量浓度从1mg/mL增加到5mg/mL过程中其清除能力只增加不到3%,因而认为当多糖溶液的质量浓度达到一定的范围时,羊肚菌多糖对O₂⁻的清除能力增效不明显,它们之间不存在

完全的剂量效应。淮阴羊肚菌的粗多糖和纯化后多糖溶液对O₂⁻的清除能力与北京羊肚菌非常相似,两者间的差异不显著(P=0.08391, 0.76838)。

•OH被认为是毒性最强的活性氧自由基,它比高锰酸钾和重铬酸钾的氧化性还强;它的反应性极强,寿命极短,对机体的破坏作用最大,是造成生物有机体过氧化损伤的主要因素。它可以引发组织细胞病变,从而导致各种疾病的发生和加速机体的衰老^[14-15]。羊肚菌多糖对•OH有明显的清除作用,淮阴羊肚菌和北京羊肚菌的粗多糖和经脱蛋白纯化后的多糖对•OH的清除率在同样质量浓度下,都较O₂⁻的清除能力低,粗多糖在1~5mg/mL质量浓度范围内的清除能力,两种羊肚菌都在13%~24%之间;而经脱蛋白后得到的纯化多糖的清除率淮阴羊肚菌的纯多糖明显高于粗多糖,但北京羊肚菌的纯化后的多糖对•OH的清除能力却不随着纯度的提高而提高,分析其原因可能因为种间的差异导致的多糖结构表征不同的影响或北京羊肚菌粗多糖中存在与多糖有协同清除•OH作用的蛋白。

由两种来源的羊肚菌粗多糖经脱蛋白纯化后得到纯化多糖的得率分别是84.62%(M_B)和89.73%(M_H),淮阴羊肚菌的多糖抗氧化能力优于北京羊肚菌,经脱蛋白纯化的多糖抗氧化能力优于粗蛋白。以VC的抗氧化性为参照,无论是淮阴羊肚菌还是北京羊肚菌,其5mg/mL的粗多糖溶液的抗氧化性都低于1mg/mL的VC标准对照组,只有淮阴羊肚菌纯化后的多糖在清除•OH时2mg/mL多糖溶液相当于0.1mg/mL的VC标准对照组。因此淮阴羊肚菌纯化后的多糖抗氧化能力更强、更经济、更具开发价值。

参考文献:

- [1] 李娟,王臻,姚良同,等.羊肚菌多糖研究进展[J].微生物学杂志,2005,25(4):89-91.
- [2] NEYTS J, SNOECK R, SCHOLS D, et al. Selective inhibition of human cytomegalovirus DNA synthesis by (S)-1-(3-Hydroxy-2-phosphorylmethoxypropyl)cytosine [(S)-HPMPC] and 9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine (DHPG)[J]. Virology, 1990, 179(1): 41-50.
- [3] SCHOLS D, PAUWELS R, WITVROUW M, et al. Differential activity of polyanionic compounds and castanospermine against HIV replication and HIV-induced syncytium formation depending on virus strain and cell type[J]. Chemistry & Chemotherapy, 1992, 3(1): 23-29.
- [4] 周靛,蒙义文.多糖及其衍生物抗病毒作用研究进展[J].应用与环境生物学报,1997,3(1):82-90.
- [5] 周国英,兰贵红,何小燕.食用菌多糖研究开发进展[J].实用预防医学,2004,11(1):203-204.
- [6] 武秋立,安家彦.羊肚菌多糖提取、分离条件的选择[J].食品科学,2005,26(1):116-120.
- [7] 李群.萘酚比色法测定羊肚菌多糖及实验评价[J].中国卫生检验杂志,2000,10(1):31-32.
- [8] 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.
- [9] SMIRONFF N, CUMBESQ J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [10] 马晓华,连宾.几种常见食用菌清除羟自由基能力的研究[J].食品与发酵工业,2005,31(10):25-29.
- [11] 刘刚,王辉,张先洲,等.青藤碱清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J].中草药,2006,37(1):85-89.
- [12] 王巨存,邢国胜,胡文锋,等.有机锆Ge-132对氧自由基和由羟自由基诱导的脂质过氧化的影响[J].中国药理学杂志,1994,29(1):23-25.
- [13] 郭华,侯冬岩,回瑞华,等.环棱孔菌多糖的提取、含量测定及抗氧化性分析[J].时珍国医国药,2006,17(5):729-730.
- [14] 芮海云,吴国荣,陈景耀,等.白芨中性多糖抗氧化作用的实验研究[J].南京师范大学学报,2003,6(4):94-98.
- [15] 郑琳,蒲洲,毕玉蓉.白阿魏侧耳子实体抗氧化活性的研究[J].中国食用菌,2002,22(1):23-26.