

安络小皮伞菌丝体多糖的提取及其抗脂质过氧化作用的研究

梁启明, 徐扬, 王艳珍, 赵兴红, 张益波, 滕利荣, 孟庆繁*

(吉林大学生命科学学院, 吉林长春 130012)

安络小皮伞, 系担子菌纲、伞菌目、白蘑科小皮伞属真菌^[1]。近年来研究表明, 安络小皮伞药用和保健价值都很高, 是对人体安全, 无毒副作用的镇痛和抗风湿药物^[23]。安络小皮伞多糖是安络小皮伞菌的重要活性物质之一, 具有提高免疫力, 抗肿瘤等多种活性。本文以液体深层发酵的菌丝体为研究对象, 通过单因素和正交实验对多糖的浸提条件进行优化, 得到最佳的提取条件。同时进行大鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用的研究, 为安络小皮伞多糖在抗脂质过氧化方面的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

安络小皮伞菌粉(过 60 目筛)由本项目组发酵、收集菌体、冻干制备; 蒽酮、浓硫酸、葡萄糖、95% 乙醇、无水乙醇、氯仿、正丁醇、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na)、硫酸亚铁、双氧水、三氯乙酸、硫代巴比妥酸 (TBA)、3, 5-二硝基水杨酸所有试剂均为分析纯。

德国 Eppendorf 5810R 型高速冷冻离心机, 752 紫外分光光度计, 恒温水浴锅, 冻干机, 透析袋 (截留分子量 1×10^4 Da) 电子天平等。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖的测定

1.2.1.1 总糖的测定 蒽酮-硫酸法^[4]。

1.2.1.2 还原糖含量的测定 采用 DNS 法^[5]。

1.2.1.3 多糖含量的计算 多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量

1.2.2 安络小皮伞粗多糖提取率的计算

粗多糖提取率 (W/W%) = [粗多糖含量

(g)/原料重量 (g)]x 100%

1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 料水比对粗多糖提取率的影响 分别称取 1g 菌丝体干粉置于 5 个 50mL 锥形瓶中, 按料水质量体积比 1: 10, 1: 20, 1:30, 1:40, 1:50 加入蒸馏水, 70°C 水浴浸提 2 h 4000 r/min 4°C 离心 20min 取上清测定总糖和还原糖。

1.2.3.2 温度对粗多糖提取率的影响 分别称取 1g 菌丝干粉置于 5 个 50mL 锥形瓶中, 料水比为 1: 30, 分别置于 50, 60, 70, 80, 90°C 恒温水浴锅中, 浸提 2h 离心后测定上清中总糖和还原糖。

1.2.3.3 提取时间对粗多糖提取率的影响 分别称取 1g 菌丝干粉置于 6 个 50 mL 锥形瓶中, 料水比为 1:30 在 70°C 水浴中分别浸提 0.5、1、2、3、4、5h 离心后测定上清中总糖和还原糖。

1.2.4 正交设计优化粗多糖提取条件 由单因素实验结果, 确定一个三因素三水平的正交实验 ($I_9(3^3)$), 见表 1。

表 1 正交实验因素水平表

水平	因素		
	A 温度 (°C)	B 时间 (h)	C 料水比 (w/v)
1	60	1	1:20
2	70	2	1:30
3	80	3	1:40

1.2.5 提取次数对粗多糖提取率的影响 根据正交实验确定的最佳提取条件进行粗多糖的提取, 按照上述步骤浸提 3 次, 测定每次提取液

中粗多糖含量。

1.2.6 多糖抗脂质过氧化作用的研究

1.2.6.1 安络小皮伞多糖的纯化 称取粉碎过60目筛的安络小皮伞菌粉,按正交设计确定的条件提取粗多糖,4000r/min 4℃离心20min除去沉淀。将上清液用三氯甲烷正丁烷(体积比)=4:1的Sevage试剂除蛋白,其中糖液(体积比)=5:1取上清液,分别用0.4、1、2、4倍体积的乙醇沉淀出多糖^[6],将各级多糖稀释成合适浓度进行抗氧化实验。

1.2.6.2 多糖对大鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用^[7] 羟自由基由EDTA-2Na-Fe-H₂O₂体系产生。OH使肝匀浆中不饱和脂肪酸发生LPO反应,其终产物为MDA TBA可使MDA显色,根据显色程度衡量MDA的相对含量。

健康大鼠,颈椎脱臼致死。迅速分离肝组织,用预冷的生理盐水清洗数次,除尽多余的血和膜至上清无色。匀浆,制成20%的匀浆,4500r/min离心10min取上清2.5mL生理盐水定容至100mL制成匀浆液。反应体系为肝匀浆10mL 6mmol/L EDTA-2Na-Fe²⁺ 0.1mL, 12mmol/L H₂O₂ 0.2mL 不同浓度多糖样品液1.0mL,对照组以1.0mL生理盐水代替样品液。空白组以生理盐水代替样品液。各组反应液混匀后于37℃温浴1h保温结束后加入15%三氯乙酸(TCA) 1.0mL终止反应。混匀,4500r/min离心10min取上清,再加入1.2%硫代巴比妥酸(TBA)沸水浴显色15min以空白管调零,于532nm测定吸光度值。

$$I\% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

式中 A_{样品}—安络小皮伞多糖液吸光度值;
A_{对照}—对照组吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 蒽酮硫酸法标准曲线的制作

取0.5g蒽酮用浓硫酸定容至250mL量

瓶中,配成酮溶液。分别取0.1mg/mL的标准葡萄糖溶液0, 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0mL加入2g/L的蒽酮试剂4mL迅速置于冰浴中冷却,摇匀,管口加盖玻璃纸,煮沸10min取出,用自来水冷却至室温,放置10min右,于620nm波长处测定吸光度值。以吸光度值为纵坐标,糖的含量Pg/mL为横坐标,绘制标准曲线。如图1所示,得回归方程:

$$y = 0.0068x - 0.0072, r = 0.99982$$

式中: x—多糖含量 μg/mL

y—吸光度 A_{20nm}

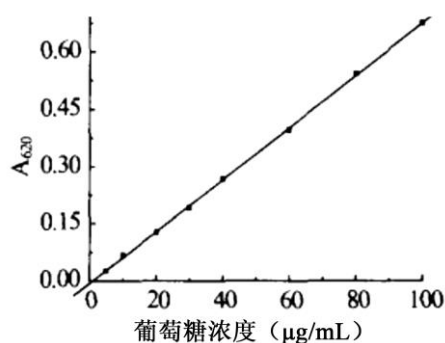


图1 葡萄糖标准曲线

2.2 单因素实验各个因素对提取率的影响

2.2.1 料水比对粗多糖提取率的影响

由图2可知,料水的质量体积比从1:10、1:20、1:30递变时,粗多糖提取率显著增加,加水量增加到1:40;1:50时,粗多糖提取率增加不太明显,趋于平缓。由于浸提液在后续工序中需经浓缩,若初期加水量过大会使后续工序能耗增加、效率降低,因此宜选择料水的质量体积比为1:30为宜。

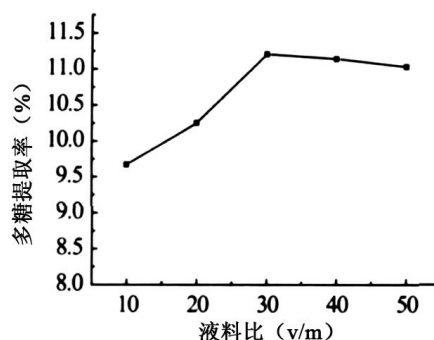


图 2 料水比对粗多糖提取率的影响

2.2.2 提取温度对粗多糖提取率的影响

由图 3 可知, 在 70°C 之前, 随温度的升高, 粗多糖得率不断增加, 在 70°C 时提取率最大, 从 70~90°C 提取率逐渐下降, 可能是由于提取温度过高, 菌丝体中多糖降解, 降低了提取率, 因此最佳提取温度为 70°C。

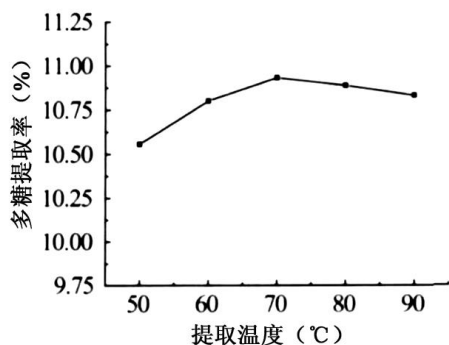


图 3 提取温度对粗多糖提取率的影响

2.2.3 提取时间对粗多糖提取率的影响

由图 4 可知, 随着提取时间的延长, 在 2h 前增加较为明显, 2h 后多糖的得率趋于平缓, 为减少能耗, 缩短工时, 宜选择浸提时间为 2h。

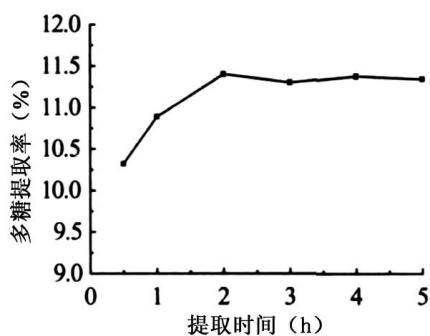


图 4 浸提时间对粗多糖提取率的影响

2.3 正交实验

2.3.1 正交实验结果

根据表 2 正交实验的分析可以看出, 安络小皮伞提取率的各影响因素的顺序为: C (料水比) > A (提取温度) > B (提取时间), 说明在各因素中, 料水比对粗多糖提取率的影响最大, 温度次之, 然后是提取时间。

因素 A B C 均以第二水平为最好。因此, 安络小皮伞粗多糖的提取优化条件为: A₂B₂C₂ 即最佳提取温度为 70°C, 最佳提取时间为 2h 最佳料水比为 1:30。

表 2 正交实验结果

实验号	因素			提取率 (%)
	A	B	C	
1	1	1	1	10.83
2	1	2	2	11.36
3	1	3	3	11.06
4	2	1	2	11.14
5	2	2	3	11.33
6	2	3	1	10.88
7	3	1	3	10.81
8	3	2	1	10.56
9	3	3	2	11.19
K ₁	11.083	10.927	10.759	
K ₂	11.117	11.083	11.230	
K ₃	10.853	11.043	11.067	
R	0.264	0.156	0.473	C>A>B

2.4 提取次数对粗多糖提取率的影响

从表 3 中可以看出, 提取一次时粗多糖得率达 11.45%, 滤渣复提后 2 次累计粗多糖得率达 11.56%, 二者之间并无显著差异。从节约能源和试剂的角度考虑, 提取次数应确定为提取 1 次。

表 3 提取次数对粗多糖得率的影响

提取次数	1	2	3
多糖得率 (%)	11.45	0.11	0.075

2.5 安络小皮伞多糖对大鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用

从图 5 可以看出, 安络小皮伞胞内多糖对于 EDTA-2Na-Fe²⁺-H₂O₂ 体系造成的大鼠肝匀浆脂质过氧化具有良好的抑制作用, 抑制率均能达到 50% 以上, 且具有浓度依赖性, 其中 0.4 倍醇沉多糖浓度在 0.16mg/mL 时, 抑制率

能达到 94%，当浓度为 0.20mg/mL 时，抑制率达到 98%。

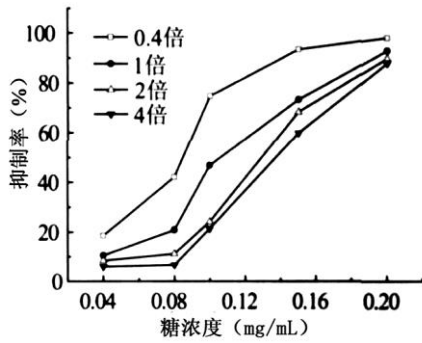


图 5 各级多糖对大鼠肝匀浆脂质过氧化抑制的抑制曲线

3 讨论

3.1 通过正交实验，确定料水比对粗多糖提取率影响最大，温度次之，然后是提取时间。安络小皮伞粗多糖的提取最佳条件为提取温度 70℃、浸提时间 2h 料水质量体积比 1:30 提取次数为 1 次，所得多糖效率最高，且经济效益也最好，在此条件下，粗多糖提取率可达 11.45%。

3.2 各级醇沉多糖对脂质过氧化均具有较好的抑制作用，0.4 倍醇沉的多糖在糖浓度为 0.2mg/mL 时，抑制率达到 98%，表明安络

小皮伞多糖在体外可很好地抑制脂质过氧化作用。

参考文献

- [1] 戴芳澜·中国真菌总汇[M].北京:科学出版社, 1979. 532-534.
- [2] 陈英红, 姜瑞芝, 高其品.安络小皮伞醇提物中镇痛成分 麦角甾醇和肉桂酸的含量测定.中成药, 2005 27(5): 583-585.
- [3] 叶文博, 杨晓彤, 陈莹.安络小皮伞对大鼠的长效镇痛作用. 中药药理与临床, 2002 18(4): 19-21.
- [4] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].浙江大学出版 2003. 12-13.
- [5] 滕利荣.生物学基础实验教程[.吉林科学技术出版社, 1999. 474-476.
- [6] 谭仁祥.植物成分分析[M].北京科学出版社, 2002. 559-560.
- [7] 靳菊情, 边晓丽, 葛萍, 等.黑石耳多糖对氧自由基及脂质过氧化的影响.中药材, 2001, 24(9): 660-661.
- [8] 潘晓鸥, 李健, 宋毅, 等.超滤法在中药分离、纯化工艺中的应用进展.华西医学, 2004 19(2): 351-352.
- [9] 王湛.膜分离技术基础[M].北京:化学工业出版社, 2001.208-210.
- [10] 韩雅珊主编.食品化学实验指导.北京:北京农业大学出版社, 1992. 47-48.

