

文章编号 :1009-038X(2000)04-0336-04

# 灰树花深层发酵菌丝体多糖的酶法 提取及其抗肿瘤作用

陈石良, 孙震, 谷文英, 陶文沂  
(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

**摘要** 对灰树花深层发酵菌丝体多糖的酶法提取工艺及其抗肿瘤作用进行了研究. 结果表明, 利用复合酶法处理并结合热水浸提, 缩短了提取时间, 且能显著提高多糖的提取率, 多糖提取率达 7.4%, 效果优于其他浸提方法. 动物体内实验证明, 腹腔注射菌丝体多糖对小鼠移植性肿瘤 S180 有明显的抑制作用, 抑制率达 57.6%~66.7%.

**关键词** : 灰树花 ; 深层培养 ; 菌丝体多糖 ; 复合酶 ; 抗肿瘤活性

中图分类号 : O636.1

文献标识码 : A

## Enzymatic Extraction Technique and Antitumor Activity of the Submerged Mycelium Polysaccharide of *Grifola frondosa*

CHEN Shi-liang, SUN Zhen, GU Wen-ying, TAO Wen-yi

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** : The method for enzymatic extraction of the submerged mycelium polysaccharide of *Grifola frondosa* and its antitumor activity have been studied in this paper. The experimental results showed that the method of enzymatic treatment combined with hot water extraction made yield of polysaccharide increasing and extraction time short. The yield of polysaccharide reached 6.5%. The in vivo inhibition rate of mycelium polysaccharide against Sarcoma-180 in mice is 57.6%~66.7%.

**Key words** : *grifola frondosa* ; submerged culture ; mycelium polysaccharide ; complex enzyme ; antitumor activity

灰树花是一种珍奇的食药两用菌,不仅可以栽培生产子实体,也可以利用深层发酵技术培养菌丝体.多糖是存在于灰树花菌丝体中的主要有效组分之一<sup>[1,2]</sup>,近年来多采用热水、酸、碱浸提法提取灰树花子实体和菌丝体多糖<sup>[3,4]</sup>.这些方法虽然是提取多糖的经典方法,但水提法时间长且效率低,而酸碱法又极易导致多糖的立体结构破坏及生物活性改变.因此,建立一种高效、经济的灰树花多糖提

取方法具有现实意义.

灰树花菌丝体中除多糖外,还含有一定量的蛋白质、胶质和粗纤维等成分,如能采用有关酶类对菌丝体进行预处理,将会有利于糖类物质的溶出和分离,从而提高多糖的提取率.为此,对灰树花深层发酵菌丝体多糖的酶法提取工艺进行了研究,并探讨其抗肿瘤作用.

收稿日期 :1999-11-23 ;修订日期 :2000-04-13.

作者简介 :陈石良(1969-)男,湖南邵阳人,粮油及植物蛋白工程博士研究生.

万方数据

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 灰树花菌丝体干粉 作者所在实验室发酵的菌丝体经过滤、洗涤、烘干,粉碎后过60目筛,获得干菌粉。

1.1.2 复合酶系 由纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、酶D等按一定比例组成的混合酶系。

### 1.2 实验方法

1.2.1 热水浸提 菌丝体干粉与蒸馏水按质量比为1:40混和,置80℃水浴中恒温浸提6h,4000 r/min离心,取上清液,浓缩5倍,用Sevag法<sup>[5]</sup>去蛋白质3次,得脱蛋白水提浓缩液。待测多糖提取率。

1.2.2 稀碱浸提 菌丝体干粉与0.5 mol/L NaOH溶液按质量比为1:40混和,置80℃水浴中恒温浸提2h,4000 r/min离心,取上清液,中和,浓缩5倍,用Sevag法去蛋白质3次,得脱蛋白碱提浓缩液。待测多糖提取率。

1.2.3 稀酸浸提 菌丝体干粉与0.5 mol/L HCl溶液按质量比为1:40混合,置80℃水浴中恒温浸提2h,经4000 r/min离心,取上清液,中和,浓缩5倍,用Sevag法去蛋白质3次,得脱蛋白酸提浓缩液。待测多糖提取率。

1.2.4 复合酶浸提 菌丝体干粉与蒸馏水按质量比为1:40混和,浸泡30 min后,调至pH 6.5,加菌粉质量2%的复合酶,置50℃保温反应90 min后,立即升温至80℃灭酶,并继续于80℃水浴中浸提1h,4000 r/min离心,取上清液,浓缩5倍,用Sevag法去蛋白质3次,得脱蛋白酶解浓缩液。待测多糖提取率。

### 1.3 多糖提取率的测定

被测液中加入3倍体积质量分数为95%的乙醇,3000 r/min离心10 min,收集醇沉物,再依次用质量分数75%乙醇、无水乙醇和丙酮滤洗,常温真空干燥,称重,按下式计算多糖提取率。

$$\text{多糖提取率} = \frac{\text{多糖质量}}{\text{菌粉干重}}$$

### 1.4 抗肿瘤实验

取接种7 d的小白鼠S180腹水癌细胞,用生理盐水稀释成 $10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的癌细胞悬液,以每鼠0.2 mL接种于小鼠右腋下,24 h后随机分组,每组12只,雌雄各半,同时开始每日腹腔注射多糖溶液,给药体积为0.5 mL,对照组给予等量生理盐水,连续10 d,停药后次日处死动物,剥离瘤块,称重。肿瘤抑制率按下式计算。

$$\text{肿瘤抑制率} = \frac{W_C - W_T}{W_C}$$

式中:  $W_C$  为对照组平均瘤重,  $W_T$  为给药组平均瘤重。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶解工艺条件的确定

2.1.1 复合酶最适作用pH值 将菌粉溶液的pH分别调至4.0、4.5、5.0、6.0、6.5、7.0,然后加入干菌粉质量2%的复合酶,50℃保温90 min后进行多糖提取,测定不同pH值下多糖提取率,结果见图1。可以看出,在pH 5.0~7.0范围内,复合酶均具有较高的酶活力,但pH 6.5时酶活力最高,因此实际操作时应选取pH 6.5。

2.1.2 复合酶最适作用温度 调节菌粉液的pH值为6.5,分别加入菌粉质量2%的复合酶,在不同温度下保温水解90 min后进行多糖提取,测定不同酶解温度下的多糖得率,结果见图2。可知,在上述给定条件下,复合酶的最适作用温度为50℃,此时多糖的提取效果最好。

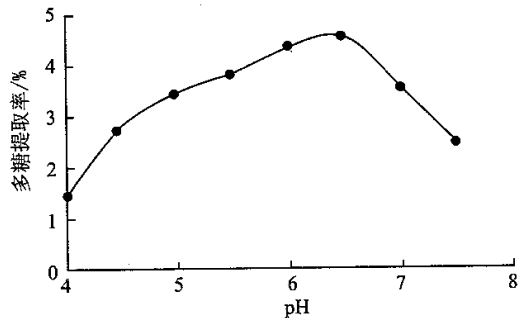


图1 pH对多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of enzymolysis pH on polysaccharide extraction

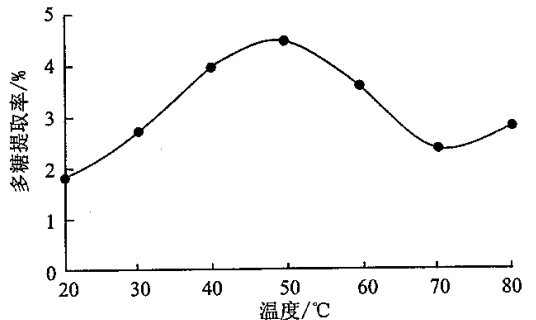


图2 温度对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of enzymolysis temperature on polysaccharide extraction

2.1.3 复合酶最佳酶解时间 调节菌粉液pH为6.5,分别加入菌粉质量2%的复合酶,在50℃下作

用不同时间后进行多糖提取,测定不同酶解时间下多糖提取率,结果见图3.可见,复合酶作用90 min后,多糖提取率不再增加,因此酶解时间以90 min为宜.

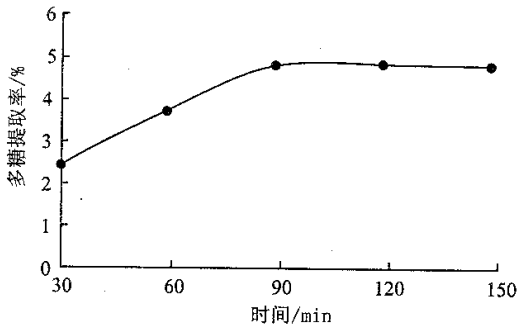


图3 酶作用时间对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis time on polysaccharide extraction

2.1.4 复合酶最适用量 调节菌粉液 pH 值为 6.5,分别加入菌粉质量 0.5%~3.0%的复合酶,在 50℃下保温 90 min 后进行多糖提取,测定不同酶用量下的多糖得率,结果见图4.可以看出,多糖得率随酶用量的增加而增加.但当酶用量超过菌粉质量的 2%后,多糖提取率不再明显增加.为节省复合酶用量,降低生产成本,复合酶的用量以菌粉质量的 2%为宜.

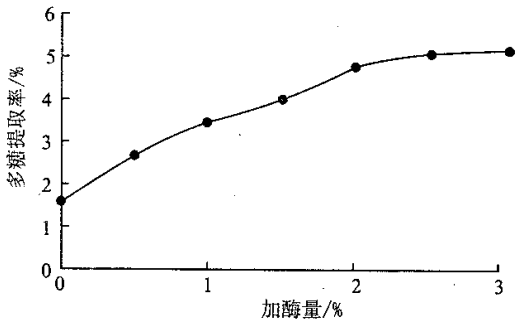


图4 酶用量对多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of amount of adding enzyme on polysaccharide extraction

## 2.2 酶解后水提工艺条件的确定

2.2.1 最适热水浸提温度 选用上述最佳酶解工艺条件进行酶处理后,分别在不同温度下保温浸提 1 h,测多糖提取率,结果见图5.可见,热水浸提温度对多糖提取效果有很大影响.50℃浸提时多糖得率仅为80℃浸提时的50%左右.当温度升至80℃以上时,多糖得率增加幅度趋于平缓.而且温度过高,有可能破坏多糖的结构,因此采用80℃热水浸提是较理想的选择.

2.2.2 最适浸提加水比 当加水比分别为10:1,

20:1,30:1,40:1,50:1时酶解90 min,再置于80℃下保温浸提1 h,测多糖得率,结果见图6.当加水比从10:1增加到40:1时,菌丝体胞内多糖几乎完全被浸出.再增大加水比,多糖的浸提率无明显提高,而且会增加下一步浓缩工艺的负担.因此,以40:1的加水比为宜.

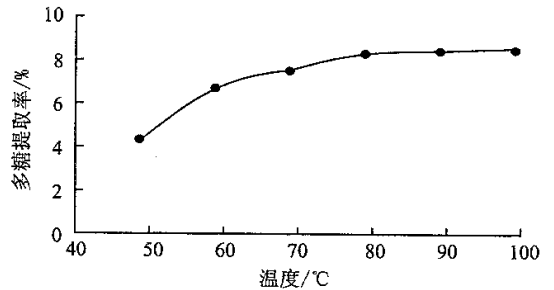


图5 温度对多糖提取率的影响

Fig.5 Effect of temperature on polysaccharide extraction

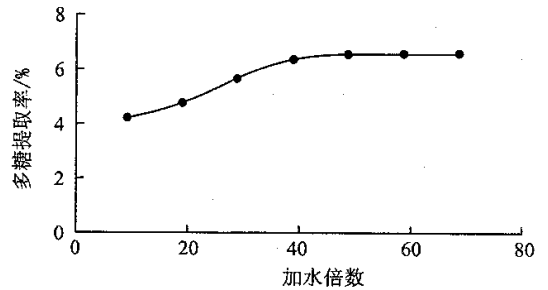


图6 加水倍数对多糖提取率的影响

Fig.6 Effect of volume of adding water on polysaccharide extraction

2.2.3 最适浸提时间 酶处理后的提取液分别在80℃保温浸提0,0.5,1,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4 h后,测多糖得率,结果见图7.表明酶解后水提1 h即可将菌丝体中的多糖提取完全.热水浸提时间太长,易引起多糖裂解,导致多糖提取率下降.因此,水提时间以1 h为宜.

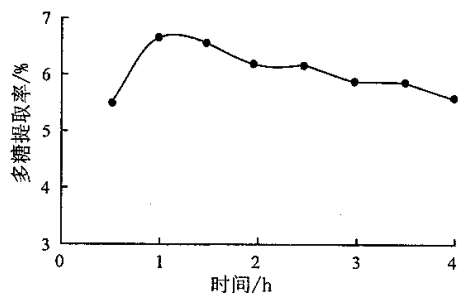


图7 热水浸提时间对多糖提取率的影响

Fig.7 Effect of extraction time on polysaccharide extraction

综合上述研究结果可知,利用复合酶处理并结合热水浸提提取灰树花菌丝体胞内多糖的最佳工艺条件为:菌丝体干粉与蒸馏水按质量比为1:40

混和, 浸泡 30 min 后调 pH 至 6.5, 添加菌粉质量 2% 的复合酶, 在 50 °C 下保温酶解 90 min, 升温至 80 °C 继续恒温浸提 1 h.

### 2.3 酶法浸提与其它浸提工艺的比较

分别用常规的热热水浸提、酸浸提、碱浸提及优化后的复合酶浸提工艺提取菌丝体多糖, 结果见图 8.

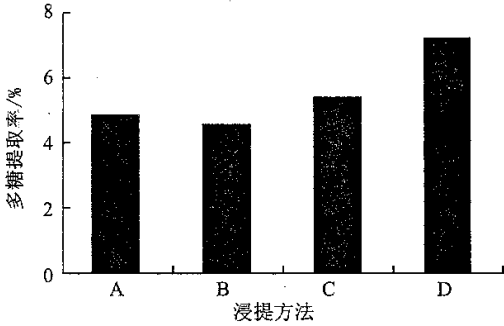


图 8 不同提取方法对多糖提取的影响

Fig.8 Effects of extraction methods on polysaccharide extraction

从图 8 可看出, 在 4 种提取方法中, 用酸碱溶液提取时, 所用时间虽较短, 但多糖提取率较低. 这是因为稀酸、稀碱在浓度因子难以控制的情况下易使

多糖中的糖苷键断裂, 形成较多的单糖, 从而减少了多糖得率. 而且提取液需中和, 程序繁琐; 水提法虽易操作, 但时间长, 提取效率低; 相比之下, 复合酶法浸提可大大提高可溶性多糖的提取率, 在 2 h 内, 其多糖得率可达 7.4%, 分别是热水浸提和酸、碱浸提法的 1.5, 1.6 和 1.3 倍, 而且反应条件温和, 杂质易除, 能保持多糖的立体结构和生物活性.

### 2.4 多糖对 S180 的抑制作用

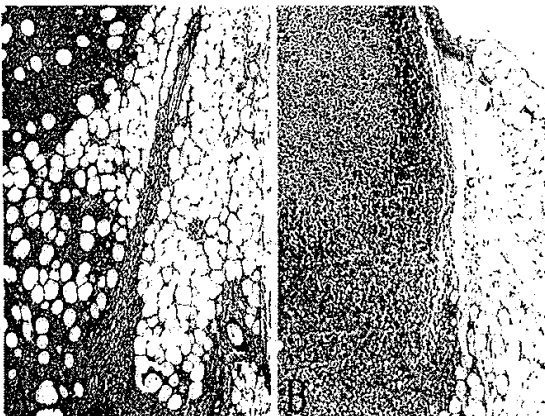
体内抑瘤实验结果见表 1. 灰树花菌丝体粗多糖对 S180 的抑制率达 57.6%~66.7%, 多糖与对照(生理盐水)之间的差异达到极显著水平( $P < 0.01$ ). 肿瘤组织病理学观察结果表明, 对照组瘤体在脂肪组织中呈浸润性生长, 扩散快(图 9a), 而给药组瘤体与脂肪组织的界限清楚, 扩散缓慢(图 9b). 此外, 对照组出现多灶性坏死(图 10a), 而给药组坏死仅见于中心区域(图 10b). 由此进一步证实, 灰树花菌丝体多糖有治疗或控制肿瘤生长之功效. 因此, 灰树花菌丝体多糖不仅是一种理想的保健食品, 而且是一种较好的抗癌药物, 如能将其与放疗或化疗药物合用, 势必在肿瘤治疗中起重大作用.

表 1 灰树花菌丝体粗多糖对 S-180 的抑制作用

Tab.1 Inhibition effect of crude polysaccharides from the mycelia of *Gifola frondosa* on Sarcama 180

给药	剂量	给药途径	鼠数/只		动物增重/g	平均瘤重( $\bar{X} \pm S_d$ )/g	抑瘤率/%
			始	末			
菌丝体多糖	50 mg/kg	腹腔注射	12	12	7.7	0.11 ± 0.04	66.7 <sup>1)</sup>
	100 mg/kg	腹腔注射	12	11	6.8	0.12 ± 0.07	63.6 <sup>1)</sup>
	200 mg/kg	腹腔注射	12	12	7.2	0.14 ± 0.03	57.6 <sup>1)</sup>
生理盐水	0.5 mL	腹腔注射	12	12	5.6	0.33 ± 0.12	

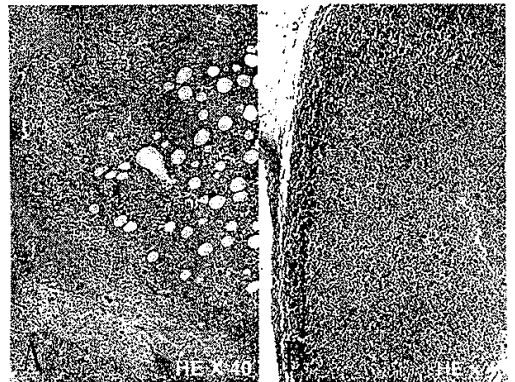
注: 1)  $P < 0.01$



a 对照组 b 多糖组

图 9 多糖对肿瘤组织 S-180 影响的光镜观察(40 ×) (示肿瘤与脂肪组织界限)

Fig.9 Photomicrograph of transplant tumor S-180 showing the border between tumor and fat tissue  
万方数据



a 对照组 b 多糖组

图 10 多糖对肿瘤组织 S-180 影响的光镜观察(40 ×) (示肿瘤组织坏死情况)

Fig.10 Photomicrograph of transplant tumor S-180 showing necrotic tissue of tumor

(下转第 353 页)

### 3 结 论

1) 酶法提取灰树花菌丝体多糖最佳工艺为: 菌丝干粉与蒸馏水按质量比为 1:40 混合, 浸泡 30 min 后, 调 pH 至 6.5, 添加菌粉质量 2% 的复合酶,

在 50 °C 下保温酶解 90 min 后升温至 80 °C, 继续恒温浸提 1 h, 多糖得率为 7.4%.

2) 从多糖得率和提取效率看, 酶法浸提优于常规的热水浸提法以及酸碱浸提法.

3) 灰树花菌丝体多糖具有明显的抗肿瘤活性, 动物体内对 S180 的抑制率为 57.6%~66.7%.

### 参考文献

- [1] ZHUANG C, MIZUNO T, ITO H, et al. Fractionation and antitumor activity of polysaccharides from *Grifola frondosa* mycelium[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 1994, 58(1):185~188.
- [2] 陈石良, 谷文英, 许正宏等. 灰树花液态发酵多糖及其氨基酸分析[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 6:148~150.
- [3] MIZUNO T, OHSAWA K, HAGIWARA N, et al. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from *Maitake*, *Grifola frondosa*[J]. **Agric Biochem**, 1986, 50(7):1679~1688.
- [4] 吴浩洁, 李艳霞, 贾身茂. 灰树花总糖提取和成分分析[J]. 食用菌学报, 1995, 2(4):52~54.
- [5] STAUB A M. Removal of protein by Sevag's method[J]. **Methods in Carbohydr Chem**, 1965, 5:5~6.
- [6] 周淑英, 卢振初, 王俏先等. 黄芪多糖(APS)抗肿瘤作用的实验研究[J]. 药物生物技术, 1995, 2(2):22~25.

(责任编辑:李春丽)