

文章编号: 1673-1689(2006)05-0111-04

黑木耳多糖的提取及降血糖作用

韩春然, 马永强, 唐娟

(哈尔滨商业大学 食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:利用纤维素酶(EC 3. 2. 1. 4)和蛋白酶(EC 3. 4. 14. 9)从黑木耳当中提取出了2种多糖, 相对分子质量分别为 3.17×10^5 和 1.83×10^5 。以正常小鼠和糖尿病小鼠为对象, 对黑木耳多糖的降血糖功能进行了研究, 使用剂量为 100, 200, 400 mg/kg(以体重计)。结果表明, 当质量分数在 200 mg/kg 以上, 黑木耳多糖能够显著降低糖尿病小鼠的血糖值, 但对正常小鼠的血糖值没有影响。黑木耳多糖能够增加糖尿病小鼠的糖耐量。

关键词:黑木耳; 多糖; 降血糖

中图分类号: R 949. 329

文献标识码: A

Extraction of Polysaccharide from *Auricularia auricular* and its Hypoglycemia Activity

HAN Chun-ran, MA Yong-qiang, TANG Juan

(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Two novel polysaccharides (APE I and APE II) were extracted and purified from *Auricularia auricular*, by cellulose (E. C. 3. 2. 1. 4) and protease (E. C. 3. 4. 14. 9). The average molecular weights was 3.17×10^5 and 1.83×10^5 , respectively. Furthermore, the hyperglycemia mice were used as a model to investigate the hypoglycemia activity of APE I, and the normal mice was as control. The results indicated that when more than 200 mg/kg body weight APE I was feed to the mice, the blood glucose of hyperglycemia mice were decreased significantly. However, no effect was observed for the control mice. On the other hand, APE I also could enhance blood glucose tolerance and decrease area under glucose curve of the hyperglycemia mice.

Key words: *Auricularia auricular*; polysaccharide; hypoglycemia activity

黑木耳 (*Auricularia auricula*) 在我国已有 1 000 多年的栽培史, 是我国最常见的食用菌之一。自古以来, 就有用黑木耳治疗多种疾病的记录^[1]。研究表明, 黑木耳的重要生理功能都与其多糖组分密切相关^[2], 如食用黑木耳可以降低空腹和 postprandial 血糖的水平, 增加胰岛素的分泌, 并能增加糖尿病小鼠对口服葡萄糖的耐受能力, 如水提法提取出的

3 种多糖, 粗多糖 (FA), 酸性多糖 (FA - A), 和中性多糖 (FA - N), 其中粗多糖能够显著降低空腹和非空腹血糖值, 提高对腹腔注射葡萄糖的耐受能力, 中性多糖能够降低空腹和非空腹血糖, 但是对葡萄糖耐受力没有作用, 而酸性多糖则没有表现出什么作用^[3]; 吴和孔^[4]发现黑木耳多糖能够降低四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠的血糖, 并增加胰岛素的

收稿日期: 2005-11-23; 修回日期: 2006-01-11.

基金项目: 黑龙江省教育厅重大项目 (105112006).

作者简介: 韩春然 (1970-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 工学硕士。

分泌,以上黑木耳多糖都是粗多糖,没有经过纯化,多糖的相对分子质量不清楚。

在过去的20年当中,人们从黑木耳提取出了相对分子质量各异的各种多糖,如日本研究人员^[5]从黑木耳中分离出了两种多糖,MEA和MHA,相对分子质量分别为 3.7×10^5 和 3.0×10^5 ,中国研究人员^[6]分离出了3种D-葡萄糖苷和两种酸性多糖,相对分子质量分别为 3.0×10^5 , and 5.0×10^5 。对于这些分子量明确的多糖,只由人曾经研究过其对肿瘤的抑制作用。

目前,木耳多糖的提取方法有热水浸提、盐水浸提、碱提取和乙醇提取法,酶法提取目前还没有报道。与目前的方法比较,酶法提取有许多优点,如产率高,杂质去除容易,提取条件可控等^[7]。以不同的提取方法得到的多糖的结构和分子量都不相同,这些性质反过来也会影响其生理功能。

作者的目的是以纤维素酶(EC 3. 2. 1. 4)和蛋白酶(EC 3. 4. 14. 9)从黑木耳中提取多糖,确定其相对分子质量,并以动物试验考察了其降血糖的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

黑木耳(市售),DEAE-Cellulose 52 (Whatman Inc 产品);DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia Corp 产品);Sepharose CL-4B 北京鼎国生物技术有限公司产品;722 光栅分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品。昆明种雄性小鼠(26 ± 2)g:黑龙江肿瘤医院动物实验室提供;自动血糖仪(ACCU-CHEK Advantage II, Roche Diagnostics Ltd. Hongkong 产品)。

1.2 试验方法

1.2.1 黑木耳多糖的提取 以图1所示程序对黑木耳多糖进行提取。

1.2.2 黑木耳多糖的纯化 在黑木耳粗多糖进行Sevage法脱蛋白^[8]、 H_2O_2 法脱色处理后,上样于DEAE-Cellulose 52 (Cl-) ($D 1 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$)层析柱,分别用pH 7.5 Tris-HCl、Tris-HCl + 0.2mol/L NaCl、Tris-HCl + 0.5mol/L NaCl阶段洗脱,体积流量10 mL/h,分部收集洗脱液(5 mL/管),以蒽酮-硫酸法检测多糖含量。

经阴离子交换柱层析分离得到的多糖级分再以Sepharose CL-4B ($D 1 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$)柱层析进行纯化,以0.1 mol/L的NaCl溶液进行洗脱,体积流量20 mL/h,流出液分管收集(5 mL/管),以蒽酮比色法检测多糖含量。依据测定结果,分段合并各多糖峰部分,冷冻干燥。

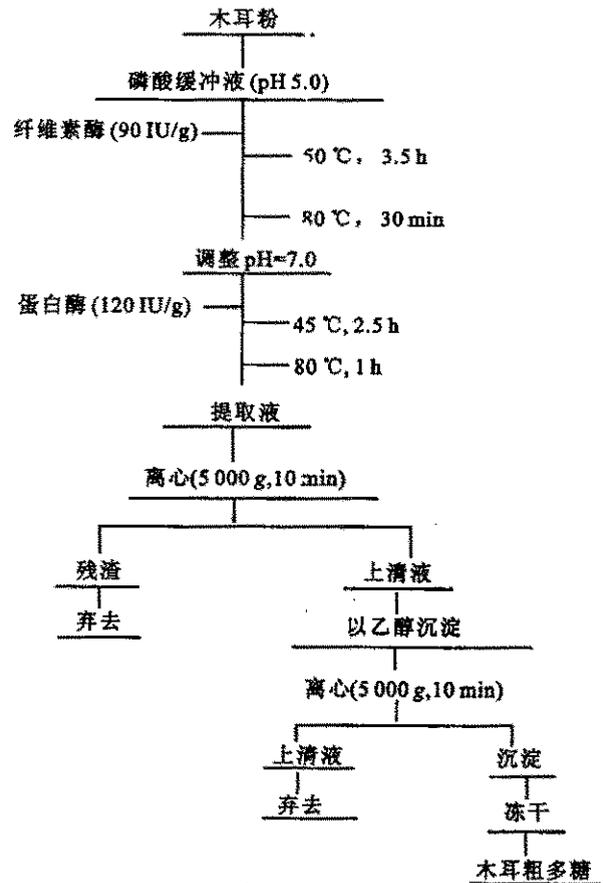


图1 纤维素酶和蛋白酶复合提取黑木耳多糖的流程图

Fig. 1 Scheme for the extraction of polysaccharide from *Auricularia auricular* by the combination of cellulase and protease

1.2.3 黑木耳多糖相对分子质量的测定 采用凝胶柱层析法。Sephadex G - 100 ($D 1 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$) 湿法装柱,将T系列(T-10, T-40, T-70, T-110, T-500)葡聚糖标准品及样品分别上样于以0.1 mol/L的NaCl溶液充分平衡的层析柱,以0.1 mol/L的NaCl溶液进行洗脱,蒽酮-硫酸法检测,以标准葡聚糖分子量的对数 $\lg M_w$ 对分配系数 K_{av} 作标准曲线,通过标准曲线计算样品的分子量。

1.2.4 动物试验 将昆明小鼠在不锈钢笼子中单独饲养,条件:温度(22 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,湿度(55 ± 5)%,12 h光照,12 h黑暗,饲料为黑龙江肿瘤医院动物实验室提供的标准饲料。

1) 高血糖模型动物 昆明种雄性小鼠禁食24 h后,腹腔注射四氧嘧啶(180 mg/kg,以体重计)。连续注射7 d后,尾尖取血测定空腹血糖,血糖值10~25 mmol/L为高血糖模型成功动物。

2) 降低空腹血糖实验

(a) 高血糖模型动物 选高血糖模型动物按空腹血糖随机分为模型对照组及3个剂量组,每组10只,分别设为低、中、高3个剂量组,低剂量组给予

100 mg/kg 黑木耳多糖,中剂量组给予 200 mg/kg 黑木耳多糖,高剂量组给予 400 mg/kg 黑木耳多糖,以每天灌胃量为小鼠体重的 2% 将木耳多糖配制成相应浓度的溶液,模型对照组给予相应体积蒸馏水。连续灌胃 30 d,测空腹血糖值,比较各组动物血糖值。

(b)正常动物 昆明种雄性小鼠按空腹血糖随机分组,随机选 1 个对照组和 1 个高剂量木耳多糖受试组,其余操作同高血糖模型动物。

3)糖耐量实验 高血糖模型动物按空腹血糖随机分为模型对照组及 3 个剂量组,每组 10 只,按人体推荐量的 5、10、20 倍分别设为低、中、高 3 个剂量组,低剂量组给予 100 mg/kg 黑木耳多糖,中剂量组给予 200 mg/kg 黑木耳多糖,高剂量组给予 400 mg/kg 黑木耳多糖,模型对照组给予相应体积的蒸馏水,15~20 min 后经口给予葡萄糖 2.0 g/kg,测定小鼠摄入葡萄糖后 0、30、120 min 的血糖值,观察模型对照组与受试样品组摄入葡萄糖后各时间点血糖曲线下面积的变化^[5]。

4)血糖的测定 实验动物空腹 24 h,尾尖取血,以毛细管收集,-70℃ 存放。以自动血糖仪测定血糖值。

1.2.5 统计方法 实验结果采用单向方差分析(ANOVA,Analysis of variance),使用软件为 SPSS 10.0(SPSS Inc.,Chicago,IL,USA)。数据之间的差别使用 Tukey's HSD(Honest Significant Difference)进行多重比较,显著水平设为 0.05。

2 结果与讨论

2.1 黑木耳多糖的提取和纯化

经脱蛋白与脱色处理之后,可得到乳白色的黑木耳多糖。上 DEAE-纤维素层析柱后,得到的洗脱曲线见图 2。

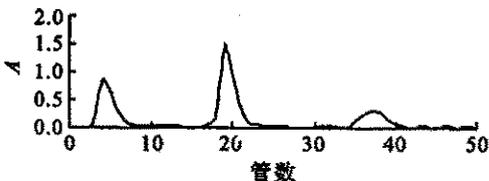


图 2 黑木耳多糖的 DEAE-Cellulose 52 柱层析图
Fig. 2 Elution profile of *Auricularia auricula* polysaccharides on DEAE-Cellulose 52 ion exchange column

可以看出,黑木耳多糖经阶段洗脱可以得到 3 种组分,其中以 pH 7.5 Tris-HCl 洗脱所得组分和以 Tris-HCl + 0.2 mol/L NaCl 洗脱所得组分为主,分别命名为 APE I 和 APE II,收集这两个组分,透析,冻干,得到 APE I 和 APE II。

APE I 和 APE II 经 Sepharose CL-4B 层析柱进一步纯化的洗脱曲线见图 3。两组分的洗脱峰均为单一对称峰,均为单一组分,收集主峰部分,经透析、冻干得黑木耳多糖 APE I 和 APE II。

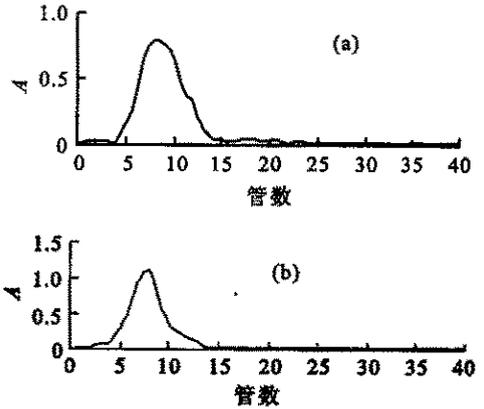


图 3 APE I (a)和 APE II (b)的 Sepharose CL-4B 柱层析图
Fig. 3 Elution profile of APE I (a) and APE II (b) on Sepharose CL-4B column

2.2 黑木耳多糖相对分子质量的测定

标准葡聚糖相对分子质量的对数 $\lg M_w$ 对分配系数 K_{av} ($\lg M_w - K_{av}$) 所作标准曲线如图 4。测得 APE I 的洗脱体积为 13 mL, APE II 的洗脱体积为 15 mL,根据标准曲线,其相对分子质量分别为 3.17×10^5 和 1.83×10^5 。

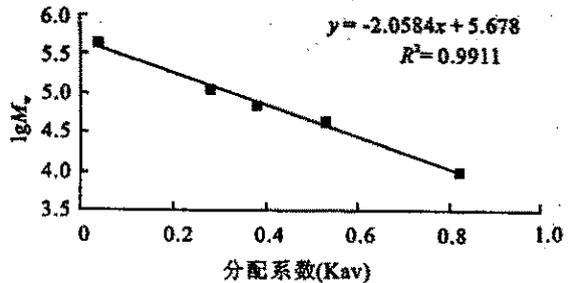


图 4 Sephadex G-100 柱层析测定葡聚糖相对分子质量的标准曲线
Fig. 4 Standard curve of molecular weights of dextran by Sephadex G-100 column chromatography

2.3 降低空腹血糖实验结果

表 1 是高血糖模型动物在试验开始和试验结束之后,模型对照组与 3 个剂量组小鼠的空腹血糖结果。可以看出,实验开始时,模型对照组与各剂量组间的血糖值均没有显著差异 ($p > 0.05$),实验 30 d 后,模型对照组与低剂量组小鼠的血糖值与本组实验开始时相比显著升高 ($p < 0.01$),中剂量组和高剂量组血糖比本组实验开始时下降,中剂量组血糖下降百分率为 1.0%,高剂量组血糖下降百分率为 44.1%,低剂量组与模型对照组相比较无显著

性差异,中剂量组和高剂量组均明显低于模型对照组($p < 0.01$)。试验重复3次进行,表中数据为(3次试验的)平均值 \pm 标准偏差。

表1 黑木耳多糖对糖尿病小鼠空腹血糖的影响

Tab.1 Effect of APE I on the blood glucose (mmol/L) of fasting (24 h) hyperglycemia mice

组别	实验开始	实验结束
对照	15.32 \pm 1.87	28.88 \pm 1.89
低剂量组	15.46 \pm 1.35	26.54 \pm 2.31
中剂量组	15.09 \pm 1.45	14.94 \pm 1.87*
高剂量组	15.19 \pm 1.47	8.49 \pm 1.38**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表2是正常动物模型在实验前和实验后的空腹血糖结果。可知,正常动物高剂量组在实验结束时的血糖值与本组动物实验开始时及正常动物对照组相比均无显著性差异($p > 0.05$),可见黑木耳多糖高剂量组对正常动物空腹血糖并无明显影响。因此,可判定黑木耳多糖具有降低糖尿病小鼠空腹血糖的作用。试验重复3次进行,表中数据为(3

表3 黑木耳多糖对糖尿病小鼠糖耐量和血糖曲线下面积的影响

Tab.3 Effect of APEI on the glucose tolerance (mmol/L) and AUC of hyperglycemia mice

组别	时间/min			AUC
	0	30	120	
对照	19.26 \pm 4.20	29.42 \pm 5.39	20.61 \pm 6.95	49.69 \pm 10.78
低剂量组	16.39 \pm 4.48	25.62 \pm 5.90	12.78 \pm 4.88*	39.30 \pm 9.67*
中剂量组	12.91 \pm 5.23*	21.58 \pm 5.57*	10.59 \pm 5.14**	32.75 \pm 9.95**
高剂量组	7.82 \pm 5.18**	15.35 \pm 5.73**	7.22 \pm 4.14**	22.71 \pm 9.22***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

众所周知,四氧嘧啶对 pancreatic β cells 具有 cytotoxic,减少胰岛素的分泌,导致糖尿病。黑木耳多糖能够降低血糖、提高糖尿病小鼠的血糖耐量的原因可能是黑木耳多糖能够减少四氧嘧啶对 pancreatic β cells 的损害,或者能够增强受伤的 pancreatic β cells 的功能。确切的机理还有待进一步考证。

参考文献:

- [1] 朱宝兰. 中国黑木耳生产[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [2] 周鹏, 谢明勇. 多糖的生物活性[J]. 食品研究与开发, 2001, 22(2): 6-8.
- [3] Yuan Z, He P, Takeuchi H. Ameliorating effects of *Auricularia auricula-judae* quel. on blood glucose level and insulin secretion in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Jpn Soc Nutr Food Sci*, 1998, 51: 129-133.
- [4] 吴宪瑞, 孔令员. 黑木耳多糖的医疗保健价值[J]. 林业科技, 1996, 21(3): 32-33.
- [5] Ukai S, Morisaki S, Masako G, et al. Polysaccharides in fungi. VII acidic heteroglycans from the fruit bodies of *Auricularia auricula-judae* quel[J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(2): 635-643.
- [6] Zhang L, Yang L, Ding Q, et al. Studies on molecular weights of polysaccharides of *Auricularia auricula-judae*[J]. *Carbohydr Res*, 1995, 270: 1-10.
- [7] 沈爱英, 谷文英. 复合酶法提取姬松茸子实体多糖的研究[J]. 食用菌, 2001(3): 7-9.
- [8] 齐慧玲, 魏绍云, 王继伦, 等. Sevag法去除白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工, 2000(3): 20-21.

万方数据

次试验的)平均值 \pm 标准偏差。

表2 黑木耳多糖对正常小鼠空腹血糖的影响

Tab.2 Effect of APE I on the blood glucose (mmol/L) of fasting (24 h) normal mice

组别	实验开始	实验结束
对照组	5.31 \pm 0.50	4.55 \pm 0.43
高剂量组	5.13 \pm 0.61	4.35 \pm 0.56

2.4 糖耐量实验结果

表3是4组糖尿病小鼠在不同时间的血糖值。试验重复3次进行,表中数据为3次试验的平均值 \pm 标准偏差。在灌胃后,所有黑木耳多糖组小鼠的血糖值都低于对照组,在低剂量组,120 min后与对照组出现显著差别,在中剂量和高剂量组,所有时间内的血糖值都显著($p < 0.05$)低于对照组。所有黑木耳多糖组小鼠的血糖曲线下面积与对照组都显著($p < 0.05$)降低。这些结果表明,黑木耳多糖能够提高糖耐量。

3 结论

利用纤维素酶(E. C. 3. 2. 1. 4)和蛋白酶(EC 3. 4. 14. 9)可以从黑木耳中提取到两种多糖,它们的相对分子质量分别为 3.17×10^5 和 1.83×10^5 。黑木耳多糖能够显著降低糖尿病小鼠的血糖值,增强其糖耐量并降低血糖曲线下面积。

(责任编辑 朱明)