

杏鲍菇多糖的超滤分离及其理化特性和生物活性分析

薛令坤^{1,2}, 张劲松¹, 唐庆九¹, 刘艳芳^{*1},
周 帅¹, 杨 焱¹, 张 忠¹, 吴 迪¹

(1. 国家食用菌工程技术研究中心/农业部南方食用菌资源利用重点实验室/上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403; 2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 采用超滤法将杏鲍菇下脚料水提物分为不同相对分子质量范围3个部分,并对各部分样品的得率、总糖和 β -葡聚糖质量分数、相对分子质量分布、单糖组成及其对巨噬细胞释放NO的影响进行了考察。结果表明,PU1得率远高于PU10和PU100,为14.6%,其总糖质量分数最高,达到62.75%。PU10和PU100中的 β -葡聚糖质量分数较高,分别为18.38%和19.91%,在总糖中所占比例超过50%。相对分子质量分析结果表明,粗多糖可以按照超滤膜的截留范围实现较好的分离,且PU100和PU10均含有多个组分,其中PU100中重均相对分子质量 $>100\ 000$ 组分约占73%,PU10中两个组分的相对分子质量均超过10 000;而PU1主要含有一个组分,其重均相对分子质量为 $1\ 110\times 10^3$ 。超滤各部分样品中的多糖分别由4~7种单糖组成,但种类及摩尔分数具有较大差异。活性测试结果显示,超滤所得各样品均具有体外刺激巨噬细胞释放NO的活性,在低质量浓度(50 $\mu\text{g/mL}$)时PU100活性最高。

关键词: 杏鲍菇下脚料;超滤;相对分子质量分布;单糖组成;巨噬细胞

中图分类号:Q 539 文献标志码:A 文章编号:1673-1689(2017)01-0074-06

Physicochemical Analysis and Bioactivity Investigation of Polysaccharides Separated from *Pleurotus eryngii* by Ultrafiltration

XUE Lingkun^{1,2}, ZHANG Jingsong¹, TANG Qingjiu¹, LIU Yanfang^{*1},
ZHOU Shuai¹, YANG Yan¹, ZHANG Zhong¹, WU Di¹

(1. National Engineering Research Center of Edible Fungi / Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture / Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Three different molecular weight fractions, i.e., 100 kD (PU100), 10 kD-100 kD (PU10) and 1~10 kD (PU1), were separated from the extracts of *Pleurotus eryngii* leftover in hot water (100 $^{\circ}\text{C}$) by membrane ultrafiltration. The physicochemical characteristics of fractions in the extracts were characterized including the product yield, the content of total sugar and β -glucan, the distribution of

收稿日期: 2015-03-27

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201303080)。

* 通信作者: 刘艳芳(1980—),女,山东曲阜人,副研究员,主要从事食药菌深加工研究。E-mail: aliu-1980@163.com

引用本文: 薛令坤,张劲松,唐庆九,等. 杏鲍菇多糖的超滤分离及其理化特性和生物活性分析[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(01): 74-79.

molecular weight, the composition of monosaccharide and its effects on the NO release from macrophages. PU1 showed the highest yield of 14.6%, which was much higher than that of either PU10 or PU100. The β -glucan (over 50% of β -glucan) contents of PU10 and PU100 were 18.38% and 19.91%, respectively. The crude polysaccharide could be efficiently separated by ultrafiltration membrane within the range of molecular weight as HPSEC analysis suggested. There were several fractions in both PU100 and PU10. Around 73% of PU100 was the polysaccharides with molecular weight >100 kD, while the molecular weights of two components in PU10 were larger than 10 kD and the main component in PU1 was 1.11 kD. Monosaccharide composition analysis indicated 4 and 7 monosaccharides composed the polysaccharides in different fractions with significant differences in types and molar ratios of monosaccharide. The activity of stimulating RAW264.7 macrophages to release nitric oxide (NO) was observed for all of the ultrafiltration fractions, among which PU100 represented the highest activity at low concentration (50 μ g/mL).

Keywords: *Pleurotus eryngii* leftover, ultrafiltration, the molecular weight distribution, monosaccharide composition analysis, macrophages-activation activity

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*), 俗称刺芹侧耳等, 具有菌肉肥厚、质地脆嫩、口感极佳的特点, 同时, 杏鲍菇还具有多种药用功效, 是一种集食用和食疗于一体的大型食用真菌^[1]。现有研究表明杏鲍菇多糖是其活性成分之一, 在抗血栓、调血脂、调节免疫、抗肿瘤和抗辐射方面都具有显著的效果^[2-4]。杏鲍菇下脚料是菇脚、菇片、菌柄基部等加工副产物, 主要做为饲料或肥料使用, 利用率不高。经研究表明, 杏鲍菇下脚料营养成分与其子实体类似^[5], 含有丰富的多糖, 因此利用下脚料来提取多糖, 不仅可以降低成本, 提高产品附加值, 还可以节约资源, 促进杏鲍菇产业多元化良性发展。

据报道, 多糖的生物活性与多种因素有关, 包括多糖的结构、相对分子质量、溶解度等, 因此, 提取纯化技术的不同, 会对多糖组分的生物活性产生影响^[6]。目前, 对杏鲍菇多糖的提取多采用传统水提醇沉工艺, 该工序繁杂、能耗高且多糖得率低, 不太利于工业化应用。而超滤是一种新型膜分离技术, 利用不同的孔径截留不同分子量物质, 具有常温操作、无相态变化, 可以防止杂菌污染和热敏性物质失活等特点^[7], 近年来越来越多地被用于真菌多糖的提取、分离和纯化^[8-9]。作者采用3种不同截留相对分子质量的超滤膜对杏鲍菇下脚料粗多糖提取液进行分离, 并对各部分样品进行分析, 比较其生物活性, 为杏鲍菇多糖的进一步研究和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杏鲍菇下脚料: 上海国森生物科技有限公司提供, 经低温烘干后置于干燥器中保存备用。

DMEM 高糖培养基、RPMI-1640、胎牛血清(FBS)、胰酶: Gibco 公司产品; 细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS): Sigma 公司产品; 三氟乙酸(TFA): Merck 公司产品; RAW 264.7 细胞株: 购自中科院细胞所。

1.2 仪器

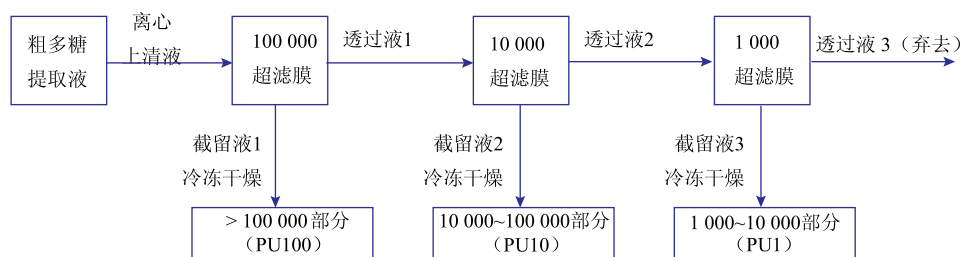
超滤设备为纳滤超滤反渗透一体机(BH-UF-NF-RO-3-2012): 上海贝鸿生物科技有限公司产品, 截留相对分子质量 100 000、10 000 和 1 000 的卷式超滤膜(型号 PSI1): 安得膜分离技术工程有限公司产品; 冷冻干燥机: Thermo Savant 公司产品; Synergy HT 多功能酶标仪: Bio-Tek 公司产品; CyberScan CON500 台式电导仪: Eutech 公司产品; ICS-2500 型高效离子色谱仪: Dionex 公司产品; 二氧化碳培养箱: Thermo Forma 公司产品; 细胞计数仪: Beckman Coulter 公司产品。

高效凝胶尺寸排阻色谱-多角度激光散色仪-示差折光检测仪联用分析法(HPSEC-MALLS-RI System): 由 Waters2695 型高效液相色谱仪, 氦-氖激光光源的八角度激光光散射检测器(MALLS, Wyatt 公司)和 Waters 2414 示差检测器(RI)组成。

1.3 方法

1.3.1 多糖提取 取杏鲍菇下脚料碎块 1 000 g 于蒸馏水 (料液质量体积比为 1 g:12 mL) 中浸泡 40

min, 沸水提取 2 h, 提取液过滤, 滤液 10 000 r/min 离心 15 min, 残渣重复上述操作再提取一次, 合并两次上清液, 得杏鲍菇下脚料水溶性粗多糖提取液。



1.3.2 超滤工艺流程

串联使用截留相对分子质量分别为 100 000、10 000 和 1 000 的 3 个超滤膜组件, 将杏鲍菇粗多糖提取液在室温、压力 0.2~0.3 MPa 条件下依次同时进行连续超滤处理, 超滤时间 3.5 h, 期间加约 3 倍体积蒸馏水稀释>100 000 截留液 (截留液 1), 直到透过液 3 电导值小于 80 μ S, 超滤结束, 得到相对分子质量段分别为>100 000 (命名为 PU100, 下同)、10 000~100 000 (PU10)、1 000~10 000 (PU1) 3 部分截留液, 经浓缩、冷冻干燥得粗多糖干品。

1.3.3 超滤各部分粗多糖得率及粗多糖中总糖和 β -葡聚糖含量测定 称取粗多糖干品, 加蒸馏水充分溶解, 离心, 采用苯酚-硫酸法测定总糖质量分数^[10]。

粗多糖得率(%)=粗多糖质量(g)/称取样品质量(g) $\times$ 100%

多糖中 β -葡聚糖含量测定, 参照 Megazyme 公司的酵母和蘑菇 β -葡聚糖检测试剂盒中的方法对粗多糖中 β -葡聚糖含量进行测定。

1.3.4 粗多糖分子量分布比较分析 采用高效凝胶尺寸排阻色谱-多角度激光光散射-示差折光检测仪联用分析技术 (HPSEC-MALLS-RI) 对杏鲍菇粗多糖的相对分子质量分布进行分析。称取 5 mg 粗多糖样品, 加入 1 mL 流动相充分溶解, 离心, 上清液用 0.25 μ m 的水相微孔膜过滤后取 100 μ L 进样分析。具体色谱条件为: 以 TSK-GEL 系列 G6000PWXL 和 G4000PWXL 色谱柱 (7.8 mm $\times$ 300 mm, TOSOH 公司产品) 为分析柱, 以 0.15 mol/L NaNO₃ 和 0.05 mol/L NaH₂PO₄ (pH=7, 质量分数 0.02%叠氮钠) 为流动相, 在 35 $^{\circ}$ C 条件下, 以 0.5 mL/min 流量进行洗脱分析。其中 8 角度激光光散射仪的光源波长选用 623.8 nm, 多糖在溶液中的折光指数增

量按照 0.146 mL/g 计算。使用 Astra(version 6.1.1) 数据分析软件对光散射数据进行采集和分析, 计算相对分子质量。

1.3.5 粗多糖的单糖组成分析 分别称取 2 mg 粗多糖加入带盖玻璃瓶, 加入 3 mL 2 mol/L 的三氟乙酸 (TFA), 110 $^{\circ}$ C 油浴 2 h, 冷却至室温, 50 $^{\circ}$ C 氮吹仪吹干, 再加 3 mL 甲醇并吹干, 重复加甲醇 2~3 次至 TFA 完全除去, 用超纯水冲洗玻璃瓶并将酸解液转移至 50 mL 容量瓶中, 定容。

色谱条件: 参考文献[11]测定超滤各部分多糖 PU100、PU10、PU1 的单糖组成。

1.3.6 粗多糖对 RAW264.7 细胞释放 NO 量的影响 称取粗多糖 5 mg 加入灭菌的离心管中, 用无菌的 PBS 配制成 5 mg/mL 的溶液, 充分溶解, 15 000 r/min 离心 30 min, 无菌条件下将上清液转移至新的无菌 eppendorf 管中, 然后取一定量稀释成 2 mg/mL, 0.5 mg/mL 的质量浓度, 并以 10 μ g/mL LPS 为阳性对照, 以 PBS 为阴性对照, 按文献[12]的方法测定巨噬细胞释放 NO 的产量。

2 结果与分析

2.1 超滤各部分得率及其总糖和 β -葡聚糖质量分数比较

由表 1 可知, 杏鲍菇下脚料水提物经超滤分离后, 粗多糖的总得率 (PU100、PU10、PU1 得率之和) 为 20.29%, 其中 PU1 得率最高, 为 14.6%, 占总得率的 71.96%, PU10 得率次之, PU100 最低, 仅为 2.7%, 说明杏鲍菇下脚料中相对分子质量小于 10 000 部分占较大比重, 而相对分子质量大于 100 000 部分所占比重最小。糖质量分数测定结果表明, PU1 总糖质量分数最高, 为 62.75%, 而 PU100 和 PU10 中 β -

葡聚糖质量分数较高,分别为 19.91%和 18.38%,在总糖中所占的比例均超过 50%,说明杏鲍菇下脚料中的 β -葡聚糖主要富集在相对分子质量较大的粗多糖部分。

表 1 超滤所得粗多糖得率及总糖和 β -葡聚糖质量分数分析
Table 1 Yield, total sugar and β -glucan content of crude polysaccharides obtained by ultrafiltration

样品编号	得率/%	总糖质量分数/%	β -葡聚糖质量分数/%
PU100	2.7	38.79 $\pm$ 0.22	19.91 $\pm$ 1.93
PU10	2.99	32.96 $\pm$ 0.40	18.38 $\pm$ 1.30
PU1	14.6	62.75 $\pm$ 0.24	15.22 $\pm$ 2.12

2.2 粗多糖的相对分子质量分布特征分析

超滤所得杏鲍菇各部分粗多糖的相对分子质量分布如图 1 和表 2 所示。PU100 主要包含 3 个组分,其中组分 1(Peak1)和组分 2(Peak2)重均相对分子质量分别为 7.188×10^6 和 1.565×10^5 ,均超过 1×10^5 ,两者质量分数占总组分的 73%,但两组分的多分散系数较大,表明组分 1 和组分 2 的相对分子质量分布较宽;PU10 含有两个组分,其中组分 2

(Peak2)重均相对分子质量为 1.807×10^4 ,在 10 000~100 000 范围内,约占总组分的 81.6%;而 PU1 只有一个组分,其重均相对分子质量为 1.414×10^3 ,属于 1 000~10 000 的范围。此结果表明,超滤法可以按照超滤膜的截留相对分子质量范围对粗多糖进行有效分离。

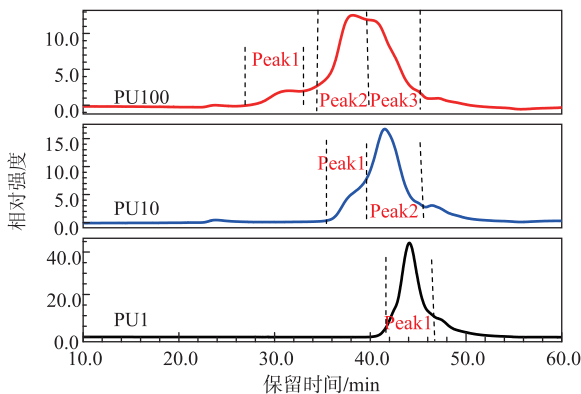


图 1 超滤各部分粗多糖的高效液相色谱图

Fig. 1 HPSEC chromatograms of crude polysaccharides obtained by ultrafiltration

表 2 超滤各部分粗多糖的相对分子质量分布范围

Table 2 Molecular weight distributions of crude polysaccharides obtained by ultrafiltration

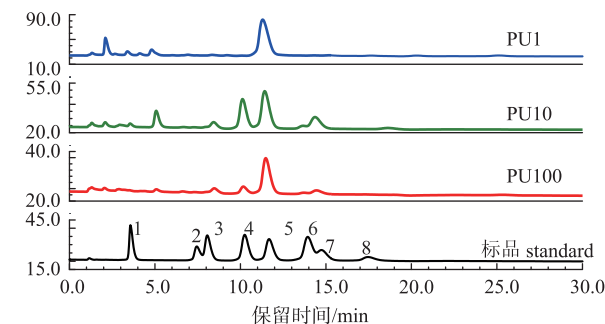
样品编号	组分	重均相对分子质量 M_w	数均相对分子质量 M_n	多分散指数(M_w/M_n)	质量分数/%
PU100	peak1	7.188×10^6	4.324×10^6	1.663	18
	peak2	1.565×10^5	9.555×10^4	1.637	55
	peak3	4.589×10^4	4.332×10^4	1.059	27
PU10	peak1	2.280×10^6	2.241×10^6	1.018	18.4
	peak2	1.807×10^4	1.273×10^4	1.420	81.6
PU1	peak1	1.414×10^3	1.110×10^3	1.274	100

2.3 超滤各部分粗多糖的单糖组成

超滤不同部分杏鲍菇下脚料粗多糖经高效阴离子色谱(HPAEC)检测后所得单糖组成及摩尔百分比结果如图 2 和表 3 所示。不同相对分子质量段多糖的单糖组成种类及组成摩尔百分比差异性较大。PU100 主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和甘露糖 4 种单糖组成,且葡萄糖所占摩尔分数最高,为 71.12%。PU10 包含的单糖种类最多,其中半乳糖和甘露糖摩尔分数较高。而 PU1 所含单糖种类最少,基本由葡萄糖组成,仅含少量岩藻糖、阿拉伯糖和半乳糖。

2.4 超滤各部分对体外刺激巨噬细胞释放 NO 产量的影响

真菌多糖的活性依赖于一定的相对分子质量,一般认为多糖相对分子质量大于一定的范围才表



1. 岩藻糖;2. 鼠李糖;3. 阿拉伯糖;4. 半乳糖;5. 葡萄糖;6. 木糖;7. 甘露糖;8. 果糖。

图 2 超滤各部分粗多糖的单糖组成

Fig. 2 Monosaccharide compositions of crude polysaccharides obtained by ultrafiltration

现出较好的生物学活性^[13]。由图 3 可以看出超滤所得 3 部分粗多糖均具有体外刺激巨噬细胞释放 NO

表 3 超滤各部分粗多糖的单糖组成摩尔分数

Table 3 Molar ratio of monosaccharide in crude polysaccharides obtained by ultrafiltration

样品编号	岩藻糖	阿拉伯糖	半乳糖	葡萄糖	木糖	甘露糖	果糖
PU100	—	9.73	11.22	71.12	0.65	7.28	—
PU10	1.47	5.64	27.29	39.06	0.64	19.58	6.32
PU1	2.20	1.40	0.65	95.75	—	—	—

注:—表示未检出

的活性。低质量浓度时(50 $\mu\text{g/mL}$)3者活性具有较大差异,PU100活性最高,PU10和PU1活性较弱;而在中等质量浓度(200 $\mu\text{g/mL}$)和高质量浓度(500 $\mu\text{g/mL}$)时,3种粗多糖活性均较好。

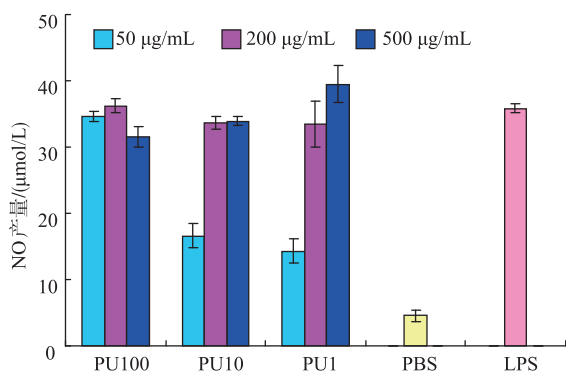


图 3 超滤各部分多糖对体外刺激巨噬细胞释放 NO 产量的影响

Fig. 3 Effect of crude polysaccharides obtained by ultrafiltration on NO release from RAW264.7 cells

3 结 语

真菌多糖的生物活性与其一结结构和高级构象密切相关,多糖分子在溶液中的链构象又受其分子质量的影响,一般具有 100 000~200 000 的高分子组分呈现较强的活性^[14-15],如杨阳等^[6]测得灰树花子实体多糖的活性部位主要位于 100 000~1 000 000 范围之间。因此将多糖按相对分子质量分段并研究

各个相对分子质量段多糖的特性及药理活性是非常有意义的。杏鲍菇下脚料多糖提取液经过超滤后,可以将粗多糖按照超滤膜的截留相对分子质量范围实现较好的分离,表现为相对分子质量大于 100 000 组分主要位于 PU100 部分,相对分子质量为 10 000~100 000 组分主要位于 PU10 部分,PU1 部分粗多糖相对分子质量均小于 10 000。同时 HPSEC 测定结果也显示 3 部分粗多糖不能完全按照截留相对分子质量范围分离,存在部分重合,尤其是 PU100 和 PU10 部分,可能原因是多糖分子链间的相互作用或者超滤不彻底,因而其超滤工艺需要进一步研究。

超滤所得 3 部分粗多糖在得率、糖含量、多糖相对分子质量、单糖组成及其刺激巨噬细胞活性方面存在差异。其中 PU100(>100 000)部分得率最低,但粗多糖的 β -葡聚糖质量分数最高,为 19.91%,且 PU100 在低质量浓度(50 $\mu\text{g/mL}$)时刺激巨噬细胞活性明显高于 PU10 和 PU1,这也说明杏鲍菇多糖中大相对分子质量的部分活性较好。PU1 部分得率最高,是 PU100 和 PU10 得率之和的 2.56 倍,说明杏鲍菇下脚料中小相对分子质量组分占较大比重。PU1 单糖组成主要由葡萄糖组成,其摩尔分数为 95.75%,进一步对 PU1 进行了分析,发现其中富含海藻糖,可能是导致其单糖组成葡萄糖摩尔分数高的原因,因而可以考虑将超滤技术作为海藻糖提取工艺的手段。

参考文献:

- [1] YAO Z Q, LAN J. Advances in the research of *Pleurotus eryngii*[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2004, 11(1): 52-58.
- [2] CHI G R, XU L, WU J W, et al. Studies on anti-virus and anti-tumors exocellular poly-saccharides of *Pleurotus eryngii* [J]. *Journal of Laiyang Agricultural College (Natural Science)*, 2006, 23(3): 174-176.
- [3] JUNG H Y, BAE I Y, LEE S Y, et al. Effect of the degree of sulfation on the physicochemical and biological properties of *Pleurotus eryngii* polysaccharides[J]. *Food Hydrocolloid*, 2011(25): 1291-1295.
- [4] CHEN J J, MAO D, YONG Y Y, et al. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of

- Pleurotus eryngii*[J]. **Food Chem**,2012(130):687-694
- [5] ZHANG Q,LIN K,XIANG W L,et al. Optimization of polysaccharide from the residue of *Pleurotus eryngii* using response surface methodology[J]. **Journal of Xihua University:Natural Science**,2014,33(2):88-92.
- [6] YANG Y,LIU C C,ZHOU C Y,et al. Study on ultrafiltration separation and immunocompetence of polysaccharides from *Grifola frondosa*[J]. **Food Science**,2008,29(9):277-280.
- [7] YUAN X Q,GU X H,YE J,et al. Separation of aqueous extract of *Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* Ser. with hypoglycemic effect by ultrafiltration[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(3):342-346.
- [8] YAN J Z,LIAO Q,LI X N. Purification of polysaccharide from *Poria Cocos* by ultrafiltration membrane technology [J]. **Journal of Zhejiang University Technology**,2013,41(2):122-125.
- [9] JI L J,CHEN S C,TIAN Z B,et al. Study on microfiltration-ultrafiltration preparation technology of *Coriolus versicolor* polysaccharides[J]. **Food and Fermentation Technology**,2014,50(2):27-30.
- [10] ZHANG W J. Sugar complex biochemical research technology[M]. Zhejiang:Zhejiang University Press,1994.
- [11] YANG Y,ZHANG J S,LIU Y F,et al. Structural elucidation of a 3-O-methyl-galactose-containing neutral polysaccharide from fruiting bodies of *Phellinus igniarius*[J]. **Carbohydrate Research**,2007,342:1063-1070.
- [12] KIM G Y,CHOS G S,LEE S H,et al. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages[J]. **Ethnopharmacol**,2004,95:69-76.
- [13] SUN P L,HU J R,ZHANG A Q,et al. Research advancement of β -glucan in edible and medicinal mushroom[J]. **Edible Fungi of China**,2008,27(1):9-13.
- [14] CHEN C F,YANG X T. Progresses in the studies of structure-activity correlation and detection methods of medicinal fungal β -(1,3)-D-glucans[J]. **Microbiology China**,2006,33(5):150-153.
- [15] CALAZANS G M T,LIMA R C,FRANCA F P,et al. Molecular weight and antitumor activity of *Zymonaonas mobilis* levans[J]. **Intern J of Bio Macrom**,2000,27(1):245-247.

会 议 消 息

会议名称(中文):第七届工业生物过程国际论坛

会议名称(英文):The 7th International Forum on Industrial Bioprocesses (IFIBiop 2016)

所属学科:生物物理学、生物化学及分子生物学,生物技术与生物工程

开始日期:2017-05-07

结束日期:2017-05-10

所在城市:江苏省 无锡市

具体地点:江南大学

主办单位:江南大学

联系电话:+86-510-85918516 +86-510-85197012

E-MAIL:ifibiop2016@jiangnan.edu.cn

会议网站:<http://www.ifibiop2016.org/>

会议背景介绍:The 7th International Forum on Industrial Bioprocesses (IFIBiop 2016) will be held at Wuxi in China. This event aims at promoting an efficient communication and collaboration in the field of industrial biotechnology.

It covers the following topics: Biocatalysis and Biotransformation; Biofuels and Biorefineries; Bioprocess Integration and Intensification; Bioreactors Engineering; Bioresources and Biomaterials; Biosensors; Carbohydrate Chemistry and Biotechnology; Food Biotechnology and Engineering; Microbial and Enzyme Technology; Molecular Bioengineering, Systems Biology and Metabolic Engineering; Purification of Biomolecules