

Extraction and Antioxidation of Polysaccharide from *Tremella fuciformis*

Ying Li, Min Lv, Shilong Cang, Dongyu Hou, Shaoyi Yu, Xinjun Zhu

College of Life Science, Dezhou University, Dezhou Shandong
Email: liying97ke@163.com

Received: May 10th, 2018; accepted: May 24th, 2018; published: May 31st, 2018

Abstract

Tremella polysaccharides were extracted from Tremella dry sample using ultrasonic extraction method. The effect of material to liquid ratio, temperature and time on the extraction efficiency was investigated, and the results showed that the optimum ratio was 1:40, the temperature was 60°C and the extraction time was 30 min. The antioxidant activity of Tremella polysaccharides was investigated using 2,2'-Azino-bis(3-ethyl benzothiazole-6-sulfonic acid)(ABTS) as radical model. The results showed that Tremella polysaccharides extracted via ultrasonic extraction method had obvious antioxidant activity.

Keywords

Temella Polysaccharides, Ultrasonic Extraction, Antioxidant

银耳多糖的提取及抗氧化的探究

李颖, 吕敏, 仓世龙, 侯冬玉, 于少艺, 朱新军

德州学院生命科学学院, 山东 德州
Email: liying97ke@163.com

收稿日期: 2018年5月10日; 录用日期: 2018年5月24日; 发布日期: 2018年5月31日

摘要

以银耳干品为实验材料, 研究了超声提取法对银耳多糖提取效率的影响。通过考察料液比、温度及提取时间对银耳多糖提取率的影响, 发现在料液比为1:40, 温度为60°C, 提取时间为30 min为最佳提取条件。以2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)为自由基模型, 考察了银耳多糖的抗氧化性能。结果表明, 该法提取的银耳多糖具有明显的抗氧化能力。

关键词

银耳多糖, 超声提取, 抗氧化

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

银耳, 是一种胶质真菌, 素以肉质厚、胶质重、口感好、营养丰富、药用价值高而闻名于世[1]。银耳的药用记录始见于陶弘景所著《名医别录》, 后来的《神农本草经》、《本草纲目》及《中国药学大辞典》均记载了银耳的功效[2]。银耳多糖占银耳干重的 60%以上。银耳多糖的药用功效主要在于加强机体免疫力, 抑制肿瘤, 降血压降血脂。

曲萌等人研究发现, 银耳多糖能激活和提高细胞因子和淋巴细胞的抗肿瘤作用, 并且在用药期间对身体内的主要内脏器官无明显的形态学的变化[3]。韩英等人研究证实了银耳多糖能较好的抑制肿瘤细胞的增殖[4]。过量的自由基可以诱导细胞走向衰老和凋亡。抗氧化就是抑制自由基活动, 银耳多糖就有良好的抗氧化作用, 周萍等通过比对多种多糖, 在体外进行自由基清除的实验发现银耳多糖有较强的抗氧化能力[5]。早在之前薛惟建等人研究了银耳多糖调节血糖的作用, 结果表明了银耳多糖能调节血糖的含量[6]。田春雨等人通过对用链脲佐菌素和高能量饲料喂养的大鼠进行研究, 得出结论: 模型大鼠的血糖、血脂有效地降低了[7]。此外韩英等人通过给小鼠的腹腔内注射银耳多糖, 观察银耳多糖是否会使辐射小鼠损伤减少, 结果表明银耳多糖对有辐射损伤的小鼠有保护作用[8]。

崔蕊静等人通过对比热水浸提、酶法浸提和碱浸提, 发现提取效果最好的是酶法浸提, 其次是碱浸提; 提得银耳多糖最少的是水浸提法[9]。黄秀锦对比了酶法浸提和碱浸提, 得出结论酶法浸提的效果是最好的, 用果胶酶酶解制得银耳多糖效果较好[10]。用水提取银耳中多糖的方法操作简单, 但是在提取过程中一些非糖物质被提出, 后续粗多糖的分离纯化会变得不容易; 利用酸碱浸提银耳中多糖的方法, 可以提到的多糖中含有水法无法提到的多糖。要注意用酸法提取时多糖易酸解, 用碱法时碱的用量可能会破坏多糖结构, 会影响多糖的进一步研究; 利用酶浸提银耳中多糖的方法, 多糖提取量是最大的, 杂质也是最少的, 但是成本太高, 只适用于实验室提取多糖、研究多糖结构[11]。提取出来的多糖要在工厂中大量生产, 所以不能只考虑提取量, 要综合比较多糖的提取方法, 选出最适的方法, 并不断地探究寻找更好的提取方案。

银耳多糖非常容易溶于水, 采用水提法就能提取到银耳中所含的大多数的多糖, 热水浸提法操作简单, 容易实行并且成本低。但是水提法的缺点就是提取率低, 何伟珍等人利用水煮法来提取银耳多糖, 银耳粗多糖的提取率只有 2.75% [12]。为了得到更多的银耳多糖, 可以在水浸提的基础上加上微波、超声等物理方法来辅助提取。微波是一种超高频电磁波, 利用其在 300 MHz~300 GHz 之间的频率, 吴琼等用微波辅助提取银耳中多糖的方法, 提取率大都高于 10%。微波加热, 细胞内水分子吸收微波能, 产生热量, 终导致细胞破裂, 减少了多糖类的残留, 提高了提取率[13]。超声波的声波频率比 20,000 赫兹还高, 超声波有着定向性、穿透性。银耳多糖的提取是利用超声波的空化效应, 造成细胞瞬间破裂, 有利于物质溶出, 提高银耳多糖的提取率。周雅琳等人通过超声波辅助提取, 观察银耳多糖的制得量, 比较不同处理方式的影响, 结果得出没有进行处理的银耳, 粗多糖提取量低了 22.48% [14]。

本研究的对象是银耳子实体, 根据超声波辅助水提的方法提取银耳多糖, 通过单因素实验优化提取工艺, 并且测量不同浓度的银耳多糖抗氧化能力。以希望优化银耳多糖的提取方法并为银耳多糖的开发利用提供参考。

2. 实验材料与方法

2.1. 实验材料与试剂

实验材料: 银耳干样;

实验试剂: 95%乙醇; 1%葡萄糖: 准确称取 1 g 葡萄糖, 定容至 100 mL, 配制成 10 mg/mL 的葡萄糖溶液, 备用; 浓硫酸; 5%苯酚溶液: 准确称取 5 g 苯酚放入 100 mL 容量瓶定容, 配制成 5%苯酚溶液, 避光低温保存待用; ABTS; 过硫酸钾; PBS 缓冲液(PH = 7.4)。

2.2. 实验主要仪器

万能粉碎机; 60 目筛; 电热恒温鼓风干燥箱; 电子天平; 高速离心机; 超声清洗仪; 紫外分光光度计; 旋转蒸发仪; 循环水式多用真空泵。

2.3. 实验方法及步骤

2.3.1. 银耳多糖的提取

(一) 原料的预处理

银耳用自来水清洗干净, 放入烘箱中, 在 50°C 下烘干至恒重, 用粉碎机粉碎并且过 60 目筛, 得到银耳粉末备用。

(二) 超声波提取银耳多糖预实验

按一定的料液比混匀, 放入超声清洗仪, 在温度为 60°C 超声强度为 40 kHz 条件下立即超声 20 min, 4°C, 8000 rpm/min 离心 5 min, 将上清液收集起来, 加入 4 倍体积的 95%乙醇, 摇匀, 放入 4°C 冰箱, 沉淀过夜(12~24 h), 然后于 4°C, 10,000 rpm/min 离心机中离心 5 min, 倒掉上清液, 置于烘箱中, 调节温度(50°C~60°C), 烘干, 加 1 mL 蒸馏水, 得多糖原液。

(三) 标准曲线的绘制

将配制好浓度为 10 mg/mL 的葡萄糖溶液, 分别取 0 μ l、50 μ l、100 μ l、150 μ l、200 μ l、250 μ l、300 μ l, 加水补充至 1 mL。浓度分别为 0.0 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、2.0 mg/mL、2.5 mg/mL、3.0 mg/mL, 分别取 100 μ l 于离心管中, 加入 5%的苯酚溶液 100 μ l, 混匀, 然后再加入 0.5 mL 浓硫酸, 混匀, 室温避光放置 20 min 后, 在 490 nm 处测其吸光度。以加入葡萄糖浓度为横坐标, 490 nm 下吸光度为纵坐标绘制葡萄糖标准曲线。

2.3.2. 超声提取的单因素试验

1) 提取时间的确定: 向各个蒸馏瓶中加 2 g 样品粉末 80 mL 蒸馏水(料液比 1:40), 混合均匀, 放于 60°C 超声清洗仪中, 立即超声提取, 分别提取 5 min、10 min、20 min、30 min、40 min、60 min 后, 4°C, 8000 rpm/min 离心 5 min, 将上清液收集起来, 加入 4 倍体积的 95%乙醇, 摇匀, 放入 4°C 冰箱, 沉淀过夜(12~24 h), 然后于 4°C, 10000 rpm/min 离心机离心 5 min, 倒掉上清液, 置于烘箱中, 调节温度(50°C~60°C), 烘干, 加 1 mL 蒸馏水, 测其多糖得率。

2) 提取温度的确定: 向各个蒸馏瓶中加 2 g 样品粉末和 80 ml 蒸馏水(料液比 1:40), 混合均匀, 分别置于 40°C、50°C、60°C、70°C 的超声清洗仪中, 立即超声提取 20 min 后, 4°C, 8000 rpm/min 离心 5 min,

将上清液收集起来,加入4倍体积的95%乙醇,摇匀,放入4℃冰箱,沉淀过夜(12~24 h),然后于4℃,10,000 rpm/min离心机离心5 min,倒掉上清液,置于烘箱中,调节温度(50℃~60℃),烘干,加1 mL蒸馏水,测其多糖得率。

3) 料液比的确定:分别向各组锥形瓶中加入一定量的蒸馏水,使其料液比分别为1:20、1:30、1:40、1:50、1:60,放入超声清洗仪,在温度为60℃超声强度为40 kHz条件下立即超声20 min后,4℃,8000 rpm/min离心5 min,将上清液收集起来,加入4倍体积95%乙醇,摇匀,放入4℃冰箱,沉淀过夜(12~24 h),然后于4℃,10,000 rpm/min离心机离心5 min,倒掉上清液,置于烘箱中,调节温度(50℃~60℃),烘干,加1 mL蒸馏水,测其多糖得率。

2.3.3. 银耳多糖抗氧化的实验

(一) 配制 ABTS 母液

试剂一:准确称取0.0384 g ABTS,定容至10 mL;

试剂二:准确称取0.0134 g 过硫酸钾,定容至10 mL;

试剂一与试剂二等比例混合,避光16 h。

(二) 抗氧化的测定

使用PBS稀释母液至734 nm吸光度值为0.7左右,作为工作液,将制得的多糖储备液取200 μl,加800 μl的蒸馏水,配制成银耳多糖原液,分别稀释1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256、0倍,取20 μl各样品加入工作液,用PBS缓冲液调零,在734 nm处测其吸光度,并且测量出各个浓度的多糖溶液的吸光度,观察银耳多糖的抗氧化性。

3. 结果与分析

3.1. 葡萄糖的标准曲线

图1以葡萄糖溶液为标准品,绘制的标准曲线,回归方程为 $y = 0.8271x + 0.0421$, $R^2 = 0.9913$ 。根据样品测定的吸光度值对照标准曲线回归方程计算银耳多糖浓度,算出多糖提取率。

3.2. 超声波提取的单因素试验结果

3.2.1. 提取时间

由图2可知,通过观察不同时间银耳多糖提取率,呈现了先增大后减小的趋势,当提取时间为40 min时,有最大的银耳多糖得率4.6%,由此可知银耳多糖的多糖得率并不是随着时间的增加而一直增加,当到40 min时达到最大值后,多糖得率开始下降,所以并不是提取时间越长,提取的多糖越多,由图可知超声提取最佳的提取时间在30~50 min之间。

3.2.2. 提取温度

由图3可知,银耳多糖的多糖得率随着温度的增加而增加,当到60℃时多糖得率达到最大值4.0%,再随温度升高银耳多糖的得率开始小幅度的下降,所以当温度达到60℃时,超声波破坏样品细胞最好,使用超声提取70℃以上的温度不好控制,因此,银耳多糖超声提取的最佳温度控制在60℃~70℃之间。

3.2.3. 料液比

由图4可知,银耳多糖的得率随着料液比的增大呈现先增大后减少的趋势,当料液比为1:40时达到最大的多糖得率3.8%,之后料液比继续增大,多糖得率呈下降趋势。当料液比为1:40时,银耳中多糖的提取已经基本完全,再增大水量只会增加多糖的损失,减少多糖的得率,因此,超声提取银耳多糖的最佳料液比是1:40。

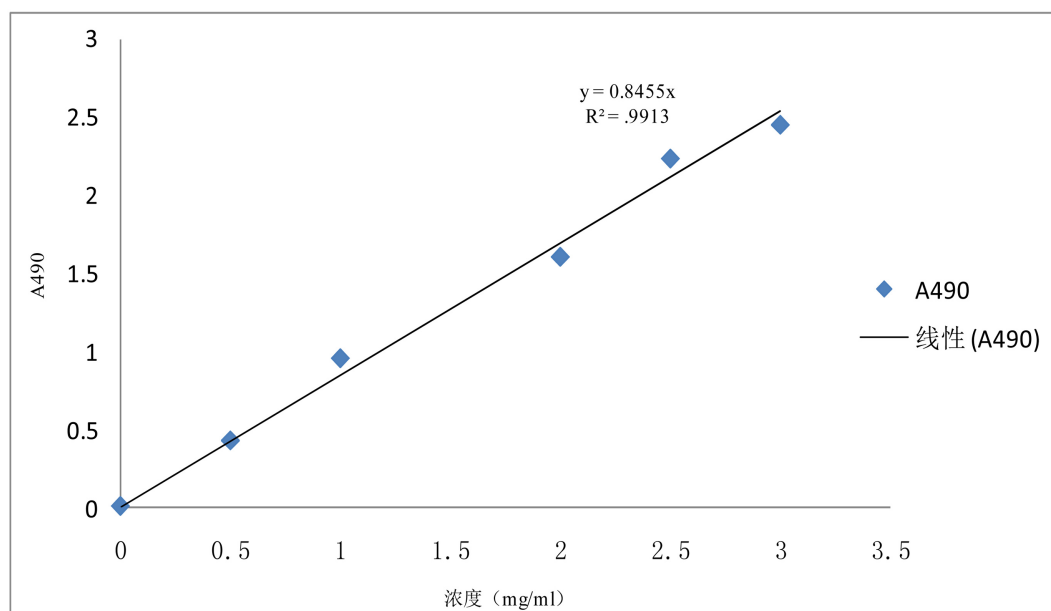


Figure 1. The standard curve of the determination of glucose content

图 1. 葡萄糖标准曲线

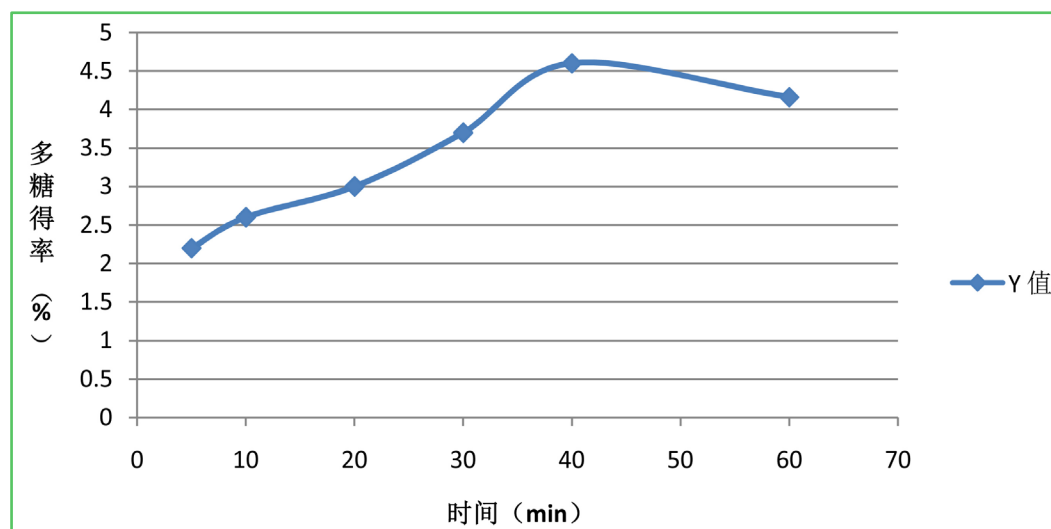


Figure 2. Effects of extraction time on *Tremella fuciformis* productivity

图 2. 提取时间对多糖得率的影响

3.3. 银耳多糖的抗氧化性

由图 5 可知, 银耳多糖具有抗氧化性, 随着稀释倍数的减小银耳多糖抗氧化能力增强。银耳多糖原液浓度为 44.4 mg/mL, 原液是具有最佳抗氧化性的。

4. 讨论与结论

4.1. 讨论

具有高生物活性的银耳多糖, 在医药和保健品领域中得到越来越多的重视, 其中, 提取技术是大规模应用银耳多糖的关键。银耳多糖主要是酸性和中性多糖, 用热水提取, 可以得到大部分的多糖成分,

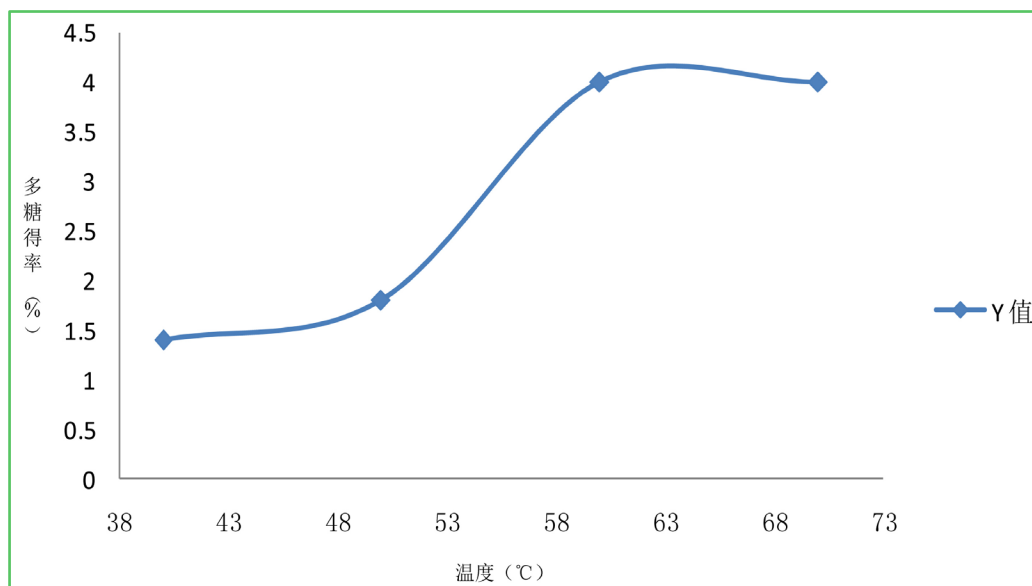


Figure 3. Effects of extraction temperature on *Tremella fuciformis* productivity

图 3. 提取温度对多糖得率的影响

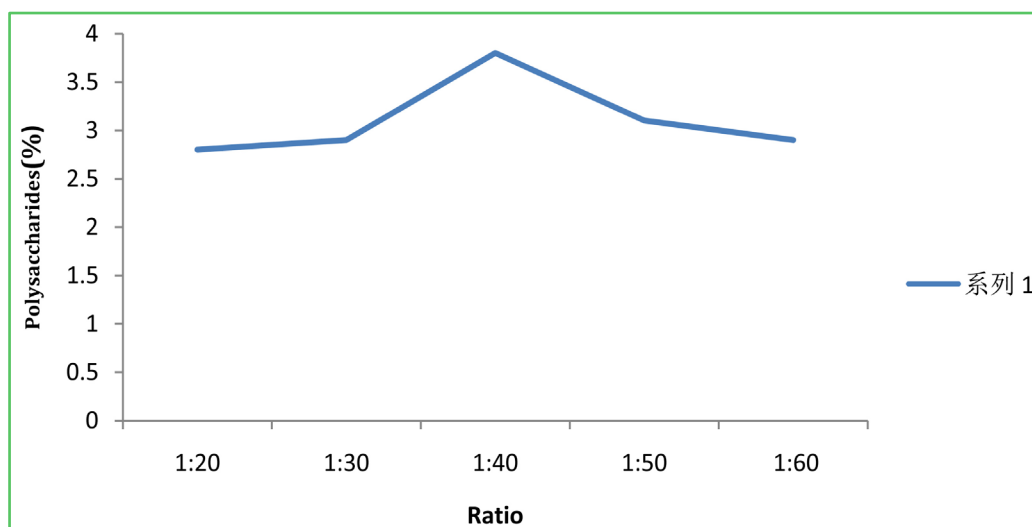


Figure 4. Effects of solid liquid ratio on *Tremella fuciformis* productivity

图 4. 料液比对多糖得率的影响

超声处理可以在同一时间使细胞空泡化，增加细胞膜和细胞壁的通透性，从而多糖溶出，提高多糖率。

一般认为，水提取法温和、提取率较低，本实验采用了单因素分析法优化银耳多糖的提取条件，并辅以超声波处理，提取效果好。优化方法后，提取率相对较高，但相比于与碱提取法和酶水解法，还存在一定的差距，要根据多糖的保留和成本预算情况的实际应用需要，择优选择。

4.2. 结论

通过单因素试验，研究了银耳多糖提取时间、提取温度和料液比对提取效果的影响，在此基础上，确定了超声提取方法优化的提取条件：提取时间 40 min，提取温度 65°C，料液比 1:40，在此条件下得到的银耳多糖的多糖得率为 5.1%。通过用过硫酸钾作为氧化剂、ABTS 作显色剂，得到银耳多糖具有抗氧化性。

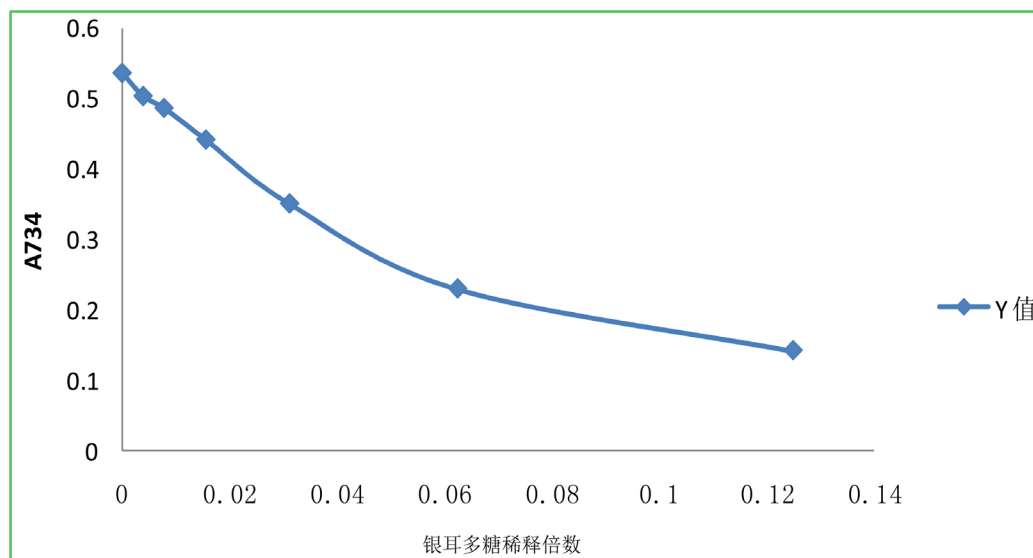


Figure 5. The influence of tremella polysaccharide concentrations against oxidation
图 5. 银耳多糖浓度对抗氧化的影响

致 谢

感谢国家星火科技计划(2014GA740050)对本研究的支持。

基金项目

国家星火科技计划(2014GA740050)。

参考文献

- [1] 彭卫红, 王勇, 黄忠乾, 等. 银耳研究现状与存在问题[J]. 食用菌学报, 2005, 12(1): 51-56.
- [2] 罗信昌. 中国银耳研究之历史回顾[A]. 中国菌物学会、湖北省科学技术厅、湖北省科学技术协会. 中国菌物学会第四届会员代表大会暨全国第七届菌物学学术讨论会论文集[C]. 中国菌物学会、湖北省科学技术厅、湖北省科学技术协会, 2008: 4.
- [3] 曲萌, 董志恒, 盖晓东. 银耳多糖在肝癌治疗中的作用及相关机制的实验研究[J]. 北华大学学报, 2007, 8(1): 51-57.
- [4] 韩英, 徐又清, 杨福军, 等. 银耳多糖的抗肿瘤作用及其机制[J]. 医药导报, 2011(30): 849-852.
- [5] 周萍, 安东, 王朝川, 等. 食用菌复合多糖的抗氧化活性研究[J]. 中国食用菌, 2011, 30(6): 42-44.
- [6] 薛惟建, 鞠彪, 王淑茹, 等. 银耳多糖和木耳多糖对四氧嘧啶糖尿病小鼠高血糖的防治作用[J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(3): 181-183.
- [7] 田春雨, 薄海美, 李继安. 银耳多糖对实验性 2 型糖尿病大鼠血糖及血脂的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(5): 986-987.
- [8] 韩英, 徐文清. 银耳多糖辐射防护作用的研究[J]. 中国辐射卫生, 2012, 21(2): 132-133.
- [9] 崔蕊静, 李凤英. 银耳多糖的提取及其在饮料中的应用[J]. 中国食用菌, 2004(23): 39-41.
- [10] 黄秀锦. 银耳多糖的提取、分离、纯化及其功能性质研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 134-136.
- [11] 苏红. 真菌多糖水提及化学辅助提取方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, 37(3): 426-432.
- [12] 何伟珍, 吴丽仙. 银耳多糖的提取分离与纯化[J]. 海峡药学, 2008, 20(7): 33-35.
- [13] 吴琼, 郑成, 宁正祥, 等. 辅助萃取银耳多糖的研究[J]. 食品科技, 2006, 31(9): 109-111.
- [14] 周雅琳, 谭红军, 杨勇. 不同处理方式对银耳粗多糖提取效果和化学成分的影响[J]. 食品科技, 2015, 40(5): 216-220.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2330-1724，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：ojs@hanspub.org