

# 提取温度对香菇多糖理化性质和免疫活性的影响

罗其昌<sup>1</sup>, 崔春<sup>2</sup>, 李文治<sup>1</sup>

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510000) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 研究提取温度对香菇多糖结构的影响, 以期对香菇多糖在保健品、药品等开发提供一定的理论依据。本文拟以香菇子实体为原料, 采用热水浸提法, 料液比 1:20, 两次提取, 设定提取温度为 100 °C、119 °C 和 140 °C 从而获得三种香菇多糖样品 LEP-A、LEP-B 和 LEP-C, 多糖含量随着水提温度的升高而增大。液相色谱分析显示, LEP-A、LEP-B 和 LEP-C 样品均为葡萄糖单一组分组成。红外光谱分析显示三种香菇多糖均含有 3600~3000 cm<sup>-1</sup> 处 -OH 伸缩振动、3000~2800 cm<sup>-1</sup> 处糖类 -CH 伸缩振动、在 1450~1200 cm<sup>-1</sup> 之间出现的羧基伸缩振动, 表明这三种物质均具有多糖的特征吸收, 结合其他特征峰确定多糖是吡喃型多糖。LEP-A、LEP-B 和 LEP-C 免疫活性进行分析可知, 三种香菇多糖样品均具有增强巨噬细胞吞噬能力、刺激 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖的作用, 且低温提取的多糖促进作用优于高温。

**关键词:** 香菇; 多糖; 结构; 免疫活性

文章编号: 1673-9078(2017)11-23-30

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.004

## Effects of Extraction Temperature on Physicochemical Properties and Immune Activity of Polysaccharide from *Lentinula*

LUO Qi-chang<sup>1</sup>, CUI Chun<sup>2</sup>, LI Wen-Zhi<sup>1</sup>

(1. Infinitus (China) Company Ltd, Guangzhou 510000, China)

(2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The effect of extraction temperature on the structure of *Lentinan* polysaccharide was investigated three kinds of *Lentinan* polysaccharide samples, including LEP-A, LEP-B and LEP-C, were obtained from *Lentinus edodes* by hot water extraction method. The extraction conditions were as follows: the ratio of material to liquid was 1:20 and extraction times for 2 with different extraction temperature changing from 100°C to 140°C. The content of polysaccharide significantly increased with the increase of extraction temperature. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that the monosaccharide composition of three crude polysaccharides contained only glucose. Analysis of IR spectrum proved that three kinds of polysaccharides contained the stretching vibration of -OH at 3600-3000 cm<sup>-1</sup>, the stretching vibration of -CH at 3000-2800 cm<sup>-1</sup>, and the stretching vibration of carboxyl at 1430-1200 cm<sup>-1</sup>. All of them were the characteristic IR absorption peaks of polysaccharides. In combination with other characteristic absorption peaks, the polysaccharide was confirmed as a pyran polysaccharide. LEP-A, LEP-B and LEP-C immunoreactivity analysis showed that the three kinds of *Lentinan* polysaccharide samples could improve the phagocytosis of macrophages and stimulate the proliferation rate of T lymphocytes and B lymphocytes. Also, the activities of polysaccharide obtained at low extraction temperature such as 100°C and 119°C were higher than that at 140°C.

**Key words:** *Lentinus edodes*; polysaccharide; structure; immune activity

近年来, 国内外关于香菇多糖的研究已经取得了很大的进步, 主要集中在香菇多糖的提取纯化、结构鉴定以及免疫活性评价等几个方面。其中, 香菇多糖的提取直接影响到其理化性质、化学结构、免疫活性

收稿日期: 2017-05-04

基金项目: 广东省科技计划项目(2017A010105002); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2017ZD093)

作者简介: 罗其昌(1981-), 男, 工程师, 硕士, 研究方向: 食品保健品

通讯作者: 崔春(1978-), 男, 教授, 博士生导师, 食品生物技术

和临床应用等后续一系列研究过程, 因此提取工艺是研究香菇多糖中非常重要的环节。目前食品企业工业化香菇多糖提取大多采用传统的热水浸提法, 该法通过持续的加热迫使香菇细胞壁破裂, 使得细胞内多糖溶出, 具有对多糖结构破坏程度小、设备简单、易于工业化操作和生产成本低等优势。然而, 提取工艺的最终目的是获得高免疫活性的多糖成分, 因此在优化多糖提取条件的同时, 需要综合考虑多糖提取率和多糖活性两个方面。孙世利<sup>[13]</sup>和于斐<sup>[14]</sup>分别对比了不同

温度条件下提取的金萱绿茶多糖和南瓜多糖的抗氧化性,发现高温组和低温组多糖抗氧化性存在显著差异。由此可见,多糖的提取温度显著影响其活性,而多糖的活性主要是由其化学结构决定的,因此本文是在前期研究获得的最佳提取工艺(热水浸提法,料液比1:20,两次提取)的基础上,进一步探究热水浸提法中不同提取温度对香菇多糖总含量、香菇多糖的还原糖和糖醛酸含量的影响;探究不同提取温度的分子量分布、香菇多糖单糖组成分析和香菇多糖的红外光谱扫描化学结构的影响;并探讨不同水提温度提取的香菇多糖在体外试验中分别对增强巨噬细胞吞噬能力、刺激T淋巴细胞和B淋巴细胞增殖的作用的影响,为工业化生产香菇多糖提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

香菇子实体,购于广州清平市场。

### 1.2 主要试剂

氢氧化钠、盐酸、葡萄糖、硫酸、三氟乙酸、半乳糖醛酸和乙腈均为分析纯。

### 1.3 主要仪器

THZ-82A 水浴恒温振荡器,金坛市华城开元实验仪器厂;GT7C2A 立式杀菌锅,温州市安福防腐机械厂;RE-52AA 旋转蒸发仪,上海生物有限公司;UV-2100 紫外可见分光光度计,上海优尼柯仪器有限公司;Waters510 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;IRAffinity-1 傅里叶红外光谱仪,日本岛津;FORMA-1 二氧化碳培养箱,美国 Thermo 公司;5810R 高速离心机德国 Eppendorf。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 香菇多糖的提取

取香菇(不粉碎)适量,与纯水按料液比1:20混合,在100℃水浴条件下搅拌浸提2.5h,过滤之后收集滤液备用,滤渣在相同条件下浸提2h。提取完后合并提取液、浓缩,浓缩至固形物为20%左右。119℃和140℃提取时在灭菌锅中设置119℃、140℃提取温度,其它条件与100℃提取方法相同。

将分别于100℃、119℃及140℃条件下提出的香菇多糖 *Lentinula edodes polysaccharides* 样品(分别命名 LEP-A、LEP-B 和 LEP-C),通过截留分子量为200 ku 和 300 ku 的透析袋,透析48h后,将上述各样

品分为低分子量和高分子量2个组(分别命名 LEP-A1 和 LEP-A2、LEP-B1 和 LEP-B2、LEP-C1 和 LEP-C2)。

#### 1.4.2 香菇多糖含量测定

分别取10g 100℃、119℃、140℃香菇多糖提取液加25% HCl 沸水浴水解2.5h后,利用高锰酸钾滴定法分别测定两种温度香菇多糖提取物的总糖含量。

#### 1.4.3 还原糖测定

标准曲线绘制:葡萄糖标准液(1mg/mL)0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6mL于20mL具塞试管中,用蒸馏水补足至1.0mL,分别准确加入DNS试剂1.5mL,沸水浴加热5min,流水冷却,用水补足到10mL刻度。在540nm波长下测定吸光度。

样品测定:取LEP-A1、LEP-B1、LEP-C1、LEP-A2、LEP-B2 和 LEP-C2 多糖样品各100mg,分别溶解于10mL蒸馏水中,取多糖溶液1.0mL于20mL具塞试管中,加DNS试剂1.5mL,沸水煮沸5min,冷却后用水补足到10mL刻度,在540nm波长下测定吸光度。从标准曲线查出葡萄糖mg/mL数。求出样品中糖含量。

#### 1.4.4 糖醛酸测定<sup>[16]</sup>

标准曲线绘制:取1mg/mL半乳糖醛酸标准溶液0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0mL置于10mL容量瓶中,加蒸馏水定容,再分别取上述各配制溶液1mL置于20mL具塞试管中,再置于冰水浴中,加入四硼酸钠/硫酸溶液5mL,混匀,于沸水浴中加热5min,冰水浴中冷却后加入1.5mg/mL间羟基联苯溶液100μL,混匀后,超声除去气泡。以1mL水同上操作制得空白液调零,在534nm处测定吸光度值。以标准品质量浓度mg/mL为横坐标,吸光度值A为纵坐标,绘制标准曲线。

样品测定:分别取1mg/mL LEP-A1、LEP-B1、LEP-C1、LEP-A2、LEP-B2 和 LEP-C2 多糖样品溶液1mL置于20mL具塞试管中,再置于冰水浴中,加入四硼酸钠/硫酸溶液5mL混匀,于沸水浴中加热5min,冰水浴中冷却后加入1.5mg/mL间羟基联苯溶液100μL,混匀后,超声除去气泡。以1mL水同上操作制得空白液调零,在534nm处测定吸光度值。按标准曲线绘制方法测定样品中糖醛酸含量。

#### 1.4.5 分子量分布

将透析所得样品LEP-A1和LEP-A2、LEP-B1和LEP-B2、LEP-C1和LEP-C2,分别取适量溶解于1mL dH<sub>2</sub>O中,超声5min,进行HPGPC分析。

HPLC 色谱条件如下:色谱柱,Agilent PL aquagel-OH Aqueous SEC 凝胶柱;流动相,水;流速,0.5mL/min;进样量,20μL;检测器,示差折光检测

器。数据用 GPC 软件分析后与标准曲线对照测得分子量 (标准品 T-10, 20, 50, 80, 130)。通过计算, 得出不同温度条件下提取出的多糖分子量大小。

#### 1.4.6 香菇多糖的单糖组成分析

将香菇多糖 LEP-A、LEP-B、LEP-C 样品 20 mg, 用 2 M 的三氟乙酸 100 °C 水解 6 h, 冷却后减压抽去 TFA, 再加入少量甲醇溶解后减压蒸干, 重复 3 次。然后将样品溶于 200  $\mu\text{L}$  75% 的乙腈中, 待用。(以葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、果糖为对照品。)

HPLC 色谱条件如下: 色谱柱, Agilent PL aquagel-OH Aqueous SEC 凝胶柱; 流动相, 75% 乙腈; 流速, 0.5 mL/min; 进样量, 5  $\mu\text{L}$ ; 检测器, 示差折光检测器。

通过结果分析不同温度条件下提取的香菇多糖的单糖组成。

#### 1.4.7 香菇多糖的红外光谱扫描

采用傅里叶红外光谱仪测定, 取香菇多糖 LEP-A、LEP-B、LEP-C 样品 2 mg 左右, KBr 压片, 红外分光光度计 4000  $\text{cm}^{-1}$ ~400  $\text{cm}^{-1}$ 。

#### 1.4.8 香菇多糖对巨噬细胞吞噬能力的影响

将对数生长期的 RAW264.7 巨噬细胞按  $1 \times 10^5$  个/孔加入 96 孔板中。贴壁后, 将 LEP-A、LEP-B 和 LEP-C 多糖样品按实验设计, 加入 96 孔培养板, 并以含 10% 胎牛血清的无酚红 RPMI-1640 培养液补足至终体积为 200  $\mu\text{L}$ ; 每种浓度设 5 个平行孔。同时, 做阳性对照孔(加入终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS)。细胞在 37 °C 5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度空气条件下培养 24 h。培养结束后, 轻轻吸去上清液, 加入 0.7% 中性红溶液 100  $\mu\text{L}$ 。30 min 后, 吸去中性红染液, 并以 37 °C 的 PBS 洗板数次, 直至细胞外染料全部洗净。离心并小心吸去 PBS 后, 加入细胞裂解液(乙醇:乙酸=1:1) 100  $\mu\text{L}$ , 4 °C 放置 1 h, 至细胞全部裂解。震荡混匀后, 在酶标仪上测定波长 540 nm 处 OD 值。

#### 1.4.9 香菇多糖对淋巴细胞 T 细胞增殖的影响

96 孔板每孔加入  $1 \times 10^6$  个 T 细胞, 并加入设定浓度的 LEP-A、LEP-B 和 LEP-C 多糖样品, 每孔总体积为 200  $\mu\text{L}$ 。每个剂量各设 5 个复孔, 细胞培养板置 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度空气条件下培养 24 h, 加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 继续培养 4 h。在 450 nm 波长处用酶标仪测定每孔 OD 值。

#### 1.4.10 香菇多糖对淋巴细胞 B 细胞增殖的影响

96 孔板每孔加入  $1 \times 10^6$  个 B 细胞, 并加入设定浓度的 LEP-A、LEP-B 和 LEP-C 多糖样品, 每孔总体积

为 200  $\mu\text{L}$ 。每个剂量各设 5 个复孔, 细胞培养板置 37 °C 5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度空气条件下培养 24 h, 加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 继续培养 4 h。在 450 nm 波长处用酶标仪测定每孔 OD 值。

#### 1.4.11 数据统计分析

本试验采 SPSS、GPC 和 Origin 8.5 软件进行数据分析、结构分析、绘图, 所有结果的测定均重复三次, 计算平均值与标准差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取温度对香菇多糖含量的影响

香菇多糖含量的测定结果(以固形物浓度 20% 为基数) 如图 1。不同提取温度下香菇多糖提取液多糖含量分别为 1.25%、1.64% 和 4.64% (以固形物浓度 20% 为基数)。随着提取温度的升高, 多糖含量逐渐上升, 尤其是 140 °C 条件下, 香菇多糖含量为 100 °C 的 3.7 倍。这是因为热水温度的升高, 不仅促进香菇细胞“崩解”, 还使得分子热运动增强, 提高了多糖的溶解度, 使得部分多糖链降解, 从而使得多糖更容易溶出 [14]。

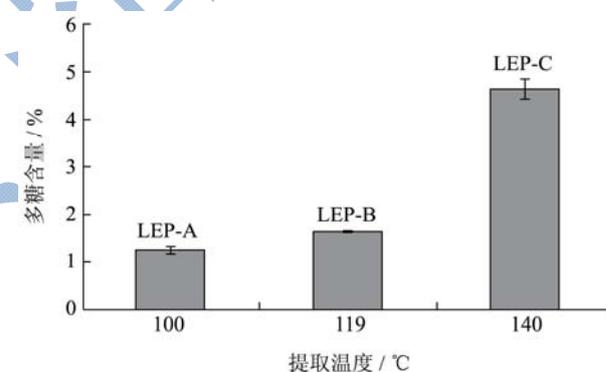


图 1 提取温度对香菇多糖含量的影响

Fig.1 Effects of extraction temperature on the content of Lentinan

### 2.2 香菇多糖的还原糖和糖醛酸含量

将分别于 100 °C、119 °C 及 140 °C 条件下提取的香菇多糖样品(分别命名 LEP-A、LEP-B 和 LEP-C), 通过截留分子量为 200 ku 和 300 ku 的透析袋, 将上述各样品分为低分子量和高分子量 2 个组(分别命名 LEP-A1 和 LEP-A2、LEP-B1 和 LEP-B2、LEP-C1 和 LEP-C2)。对各组分进行还原糖和糖醛酸的测定, 不同温度下提取的还原糖和糖醛酸含量结果如表 1 所示。

结果表明, 各组分均含有一定量的还原糖和糖醛酸, 且高温组还原糖含量显著高于低温组。

表 1 香菇多糖中还原糖和糖醛酸的含量

Table 1 The contents of reducing sugar and uronic acid in lentinan

多糖样品	LEP-A1	LEP-B1	LEP-C1	LEP-A2	LEP-B2	LEP-C2
还原糖含量/(mg/g)	17.80	18.50±0.07	26.30±0.71	11.40±0.28	13.20±0.14	36.20±3.25
糖醛酸含量/(mg/g)	47.00±4.18	43.00±8.90	38.33±13.00	46.90±8.60	43.60±3.60	51.00±10.80

### 2.3 分子量分布

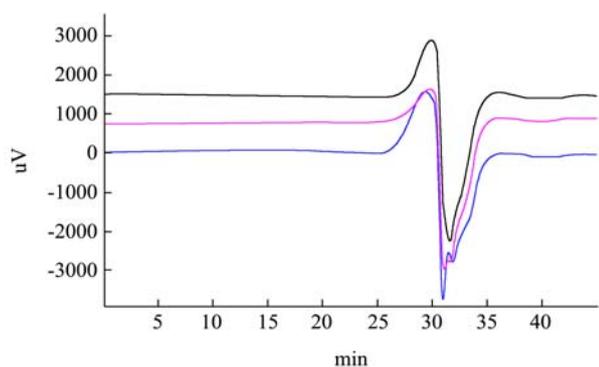


图 2 LEP-A1、LEP-B1、LEP-C1 低分子量样品高效液相色谱图

Fig.2 HPLC profiles of LEP-A1, LEP-B1 and LEP-C1 low molecular weight samples

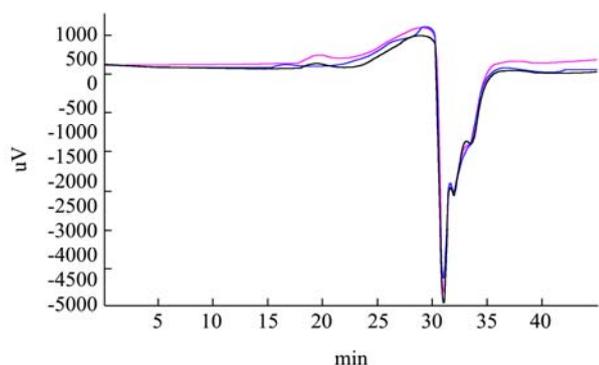


图 3 LEP-A2、LEP-B2、LEP-C2 高分子量样品高效液相色谱图

Fig.3 HPLC profiles of LEP-A2, LEP-B2 and LEP-C2 high molecular weight samples

图 2 和 3 为低分子量和高分子量香菇多糖样品色谱图，不同温度提取的香菇多糖低分子量均只出现了一个单一峰，LEP-A1、LEP-B1 和 LEP-C1 分子量分别为 6575 u、6676 u 和 6994 u。而高分子量样品出现两个峰值，LEP-A2、LEP-B2 和 LEP-C2 分子量分别为  $13 \times 10^5$  u 和 7782 u、 $9.9 \times 10^5$  u 和 7782 u、 $14.4 \times 10^5$  u 和 7064 u。由此可见，提取温度对多糖的低分子量影响并不显著，对高分子量多糖有些许影响。此外，实验发现高分子量段依然有低分子量分子存在，表明现有的透析方法不可能完全透析除去小分子量段多糖。

### 2.4 香菇多糖单糖组成分析

研究表明，构成香菇多糖的单糖有多种，如葡萄

糖、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖和甘露糖等<sup>[16-18]</sup>，香菇的产地、品种以及多糖的提取、分离方法的差异都会对香菇多糖的单糖组成造成很大的影响。一般而言，根据构成多糖的单糖种类可以将多糖分为均聚多糖和杂聚多糖，前者由一种单糖组成，后者由两种或者两种以上的单糖构成<sup>[19]</sup>。

将 100 °C、119 °C 及 140 °C 条件下提取的香菇多糖样品 LEP-A、LEP-B 和 LEP-C 通过三氟乙酸完全酸水解后，运用高效液相 (HPLC) 分析，以标准单糖为对照品。图 4 为六种标准单糖 a-阿拉伯糖；b-半乳糖；c-甘露糖；d-果糖；e-木糖；f-葡萄糖的液相色谱图，其保留时间分别为 5.198、6.442、5.912、5.517、4.758 和 6.118。

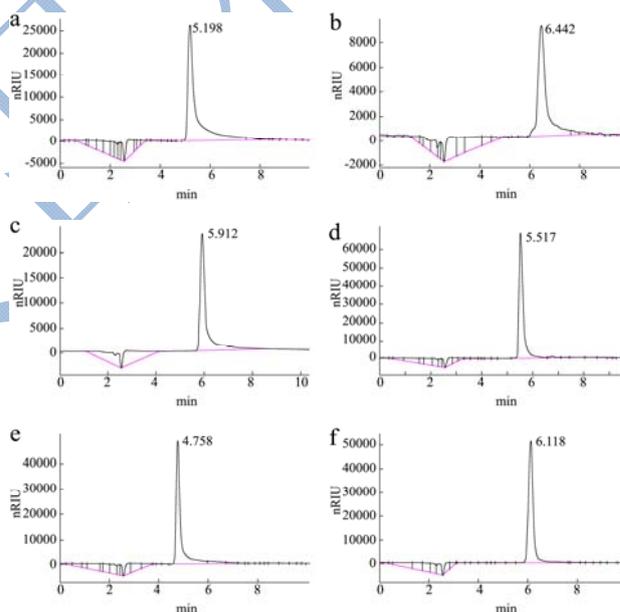


图 4 标准单糖的 HPLC 谱图

Fig.4 HPLC spectra of standard monosaccharides

注：a-阿拉伯糖；b-半乳糖；c-甘露糖；d-果糖；e-木糖；f-葡萄糖。

从图 5 可以看出香菇多糖样品 LEP-A、LEP-B、LEP-C 保留时间分别为 6.102、6.102 和 6.100，对照各单糖的保留时间，发现与标准单糖葡萄糖保留时间 6.118 一致，结果表明香菇多糖 LEP-A、LEP-B 和 LEP-C 样品单糖均为葡萄糖单一组分组成，由此推测通过本实验方法提取的香菇多糖为由葡萄糖单一组分组成的单一多糖。闫慧丹<sup>[19]</sup>利用水提醇沉法提取香菇

多糖，并通过气象色谱测定其单糖组成，发现葡萄糖为该多糖的主要单糖组成成分。

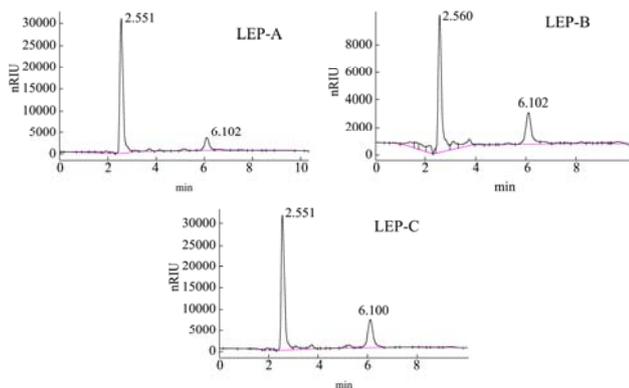


图5 香菇多糖 LEP-A、LEP-B、LEP-C 单糖的 HPLC 谱图  
Fig.5 HPLC spectra of LEP-A, LEP-B and LEP-C monosaccharides in *Lentinan*

2.5 香菇多糖的红外光谱扫描

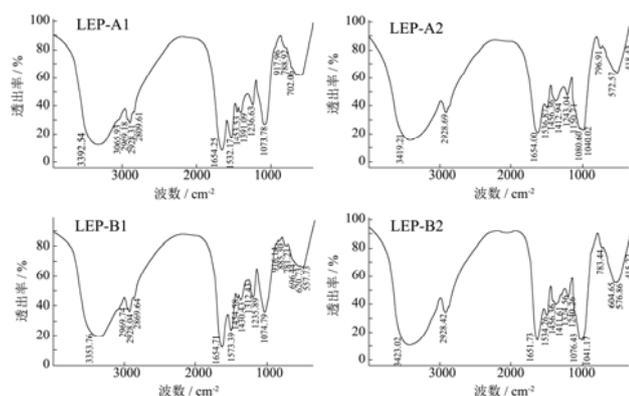


图6 香菇多糖 LEP-A1、LEP-A2、LEP-B1 和 LEP-B2 红外光谱图  
Fig.6 The FT-IR spectra of LEP-A1, LEP-A2, LEP-B1 and LEP-B2 in *Lentinan*

提取温度为 100 °C(A)和 119 °C(B)的粗多糖，经透析袋透析得到低分子量组和高分子量组，LEP-A1 和 LEP-B1、LEP-A2 和 LEP-B2，四个样品的红外光谱图如 6 所示，红外光谱分析见表 2。IR 图谱显示，四种香菇多糖均呈现典型的多糖特征峰，且各红外光谱很相似，说明四种组分的碳链骨架基本一致。其中，在 3600~3000  $\text{cm}^{-1}$  处均出现。

一吸收强度大的宽峰，LEP-A1 出现在 3392.54  $\text{cm}^{-1}$  处，LEP-A2 出现在 3419.21  $\text{cm}^{-1}$  处，LEP-B1 出现在 3353.76  $\text{cm}^{-1}$  处，LEP-B2 出现在 3423.02  $\text{cm}^{-1}$  处，这是糖分子内或分子间氢键-OH 伸缩振动的特征吸收峰，表明在多糖中存在氢键；在 3000~2800  $\text{cm}^{-1}$  处存在弱的吸收峰，是糖类-CH 伸缩振动的信号，且低分子量组为三个弱峰，高分子量组为一个；在 1654  $\text{cm}^{-1}$  附近处出现吸收峰是多糖中乙酰氨基 (-NHCOCH<sub>3</sub>) 的 C=O 伸缩振动引起的，也可能是蛋白质的吸收峰；1530  $\text{cm}^{-1}$  附近处出现的峰是 N-H 变角振动的信号，表明这四种多糖的红外光谱图还具有酰胺结构的特征吸收峰，由此推断透析得到的四种多糖很可能为氨基多糖；四种糖在 1450~1200  $\text{cm}^{-1}$  之间出现的一些不太尖的峰是羧基伸缩振动引起的，是糖类化合物的特征峰；1073  $\text{cm}^{-1}$  附近处出现的强吸收峰是由 C-O 形成的伸缩振动区，该吸收峰是 C-OH 和吡喃环上的醚键 C-O-C 特征吸收峰，说明四种组分中都存在吡喃糖苷键；在 917  $\text{cm}^{-1}$  和 770±14  $\text{cm}^{-1}$  处出现的微弱吸收峰表明  $\beta$ -型糖苷键的存在，表明多糖是吡喃型多糖；而四种多糖在 1750~1700  $\text{cm}^{-1}$  无吸收峰，表明多糖不含糖醛酸，由此可见经过透析处理除去糖醛酸成分。

表 2 香菇多糖 LEP-A1、LEP-A2、LEP-B1、LEP-B2 红外光谱分析

Table 2 The FT-IR spectrum analysis of LEP-A1, LEP-A2, LEP-B1 and LEP-B2 in *Lentinan*

低分子量吸收峰波数/ $\text{cm}^{-1}$		高分子量吸收峰波数/ $\text{cm}^{-1}$		振动方式或官能团
LEP-A1	LEP-B1	LEP-A2	LEP-B2	
3392	3353	3419	3423	-OH 伸缩振动
3000~2800	3000~2800	2928	2928	-CH 伸缩振动
1654	1654	1654	1651	酰氨基 C=O 伸缩振动
1532	1533	1536	1534	N-H 变角振动
1450~1200	1450~1200	1450~1200	1450~1200	糖类 C-H 变角振动
1073.78	1074.79	1200~1000	1200~1000	C-O 伸缩振动
917	916	-	-	吡喃环的非对称环伸缩振动峰
788	781	796	783	吡喃环的对称环伸缩振动峰

## 2.6 香菇多糖对巨噬细胞吞噬能力的影响

巨噬细胞吞噬中性红的能力可反映细胞免疫功能,通过测定实验组在 540 nm 处吸光值反映吞噬能力,吸光值越大表示巨噬细胞吞噬能力越强。对 100 °C、119 °C 和 140 °C 条件下提取的香菇多糖 LEP-A、LEP-B、LEP-C 进行吞噬中性红实验,实验分别选 5 μg/mL、10 μg/mL 和 15 μg/mL 三个多糖浓度梯度,10 μg/mL LPS 为阳性对照。

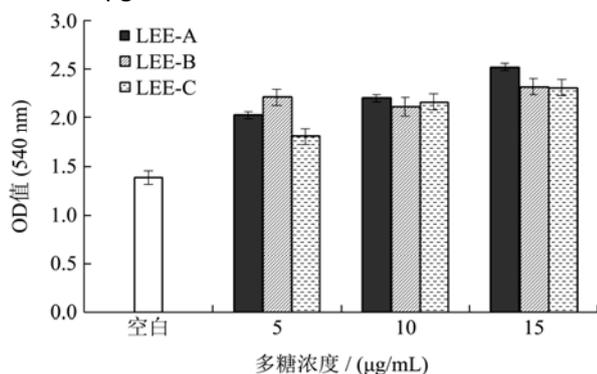


图 7 LEP-A、LEP-B、LEP-C 对 RAW264.7 巨噬细胞吞噬中性红的影响

Fig.7 Effects of LEP-A, LEP-B and LEP-C on the phagocytosis of neutral red in RAW264.7 macrophages

结果如图 7 所示。结果表明,各浓度下 LEP-A、LEP-B 和 LEP-C 多糖样品均具有增强巨噬细胞吞噬能力的作用,且随着多糖浓度的升高,吞噬能力逐渐增强。此外,综合比较,低温样品组作用效果有优于高温样品组作用效果。吞噬能力的增强是巨噬细胞活化的重要表现<sup>[20]</sup>,由此看来,三种温度下提取的香菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 均具有一定程度的活化作用,且低温提取的多糖活化效果优于高温。

## 2.7 香菇多糖对淋巴细胞增殖能力的影响

脾脏是人体非常重要的免疫器官,含有丰富的 T、B 淋巴细胞,这两种淋巴细胞的增殖和分化是机体进行免疫反应非常重要的阶段。有资料表明,T、B 淋巴细胞可分别被有丝分裂原刀豆蛋白 ConA 和脂多糖 LPS 刺激而发生增殖和分化<sup>[21]</sup>。CCK 法是检测细胞增殖的常用方法之一,与 MTT 法和 XTT 法等其他方法相比,具有细胞毒性小、检测时间短、试剂稳定性高等优势。其基本原理为:CCK8 试剂中含有的 WST-8 在电子载体 1-甲氧基-5 甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯的作用下被活细胞特别是增殖细胞中的琥珀酸脱氢酶还原为黄色的甲瓚产物,而生成的黄色甲瓚产物与活细胞的数量呈正比关系,因此可以通过测定反应产物在 450 nm 处的吸光值来反映活细胞数量<sup>[22]</sup>。琥珀酸脱氢酶

是细胞中线粒体能量代谢过程中的重要物质,非增殖期的细胞能量代谢弱,产生的琥珀酸脱氢酶也少,进而产生的甲瓚产物的量也少,吸光值较低,而增殖的细胞能量代谢非常旺盛,琥珀酸脱氢酶含量较多,产生的甲瓚产物量也多,相对应的吸光值也大。

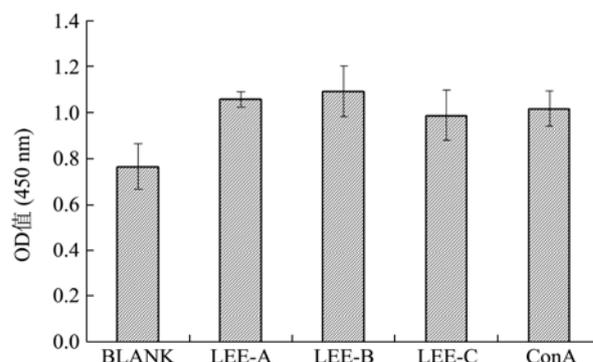


图 8 LEP-A、LEP-B、LEP-C 对 T 淋巴细胞增殖的影响

Fig.8 Effects of LEP-A, LEP-B and LEP-C on the proliferation of T lymphocytes

图 8 为浓度为 10 μg/mL 的香菇多糖对 T 淋巴细胞增殖的影响,ConA 为阳性对照,由图可知,与空白相比,不同温度下提取的香菇粗多糖均具有刺激 T 淋巴细胞增殖的作用,且这种促进作用于 ConA 相当甚至优于 ConA。此外,低温样品组对 T 淋巴细胞增殖作用效果优于高温样品组。

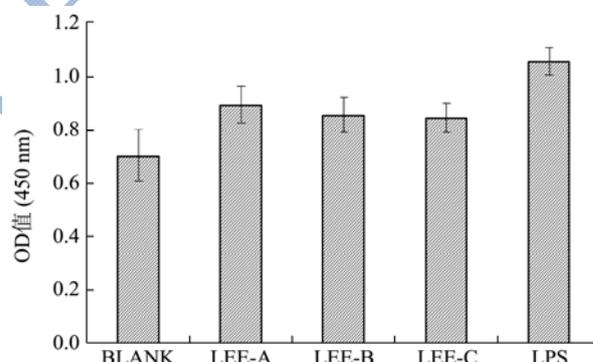


图 9 LEP-A、LEP-B、LEP-C 对 B 淋巴细胞增殖的影响

Fig.9 Effects of LEP-A, LEP-B and LEP-C on the proliferation of B lymphocytes

图 9 为浓度为 10 μg/mL 的香菇多糖对 B 淋巴细胞增殖的影响,LPS 为阳性对照,由图可知,与空白相比,不同温度下提取的香菇粗多糖均具有刺激 B 淋巴细胞增殖的作用,但这种促进作用于低于阳性对照 LPS。此外,低温样品组对 B 淋巴细胞增殖作用效果优于高温样品组。

## 3 小结

3.1 首次探讨了水提温度 100 °C、119 °C 和 140 °C 对获取的香菇粗多糖理化性质和结构的影响,发现高温

有利于大分子多糖的溶出,且获得的三种物质的单糖组分为葡萄糖单一组分。119℃提取的香菇多糖 LEP-B 具有最佳的增强巨噬细胞吞噬能力、刺激 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖的作用。此外,119℃高温不仅有利于提高多糖提取率,而且该温度为工业化杀菌温度,为工业化香菇多糖保健品开发提供了思路。

3.2 探究多糖的免疫活性需结合体内和体外实验共同分析,由于实验室条件有限,时间比较紧张,本文只对多糖的体外免疫活性进行了测定,需在后续研究中对提取多糖进行体内实验验证,以确认提取多糖的免疫活性。

### 参考文献

- [1] 张佳.香菇多糖提取与纯化新工艺[D].北京:北京化工大学,2007  
ZHANG Jia. A new technics about extraction and purification of polysaccharide from *Lentinusedodes* [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2007
- [2] Bisen P S, Baghel R K, Sanodiya B S, et al. *Lentimus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities [J]. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17(22): 2419-30
- [3] Chan C F, Chan W K, Sze M Y. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells [J]. Journal of Hematology & Oncology, 2009, 2(1): 1-11
- [4] 游丽君,邹林武,梁彦豪,等.超声-高温热水提取香菇多糖及其产物特性研究[J].现代食品科技,2013,9:2167-2172  
YOU Li-jun, ZOU Lin-wu, LIANG Yan-hao, et al. Characteristics of lentinan polysaccharide extracted by ultrasonic wave and hot water [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 9: 2167-2172
- [5] 史德芳,高虹,谭洪卓,等.香菇柄多糖的微波辅助提取及其活性研究[J].食品研究与开发,2010,31(2):10-14  
SHI De-fang, GAO Hong, TAN Hong-zhuo, et al. Study on microwave-assisted extraction and biological activity of polysaccharide from *Lentinus edodes* stem [J]. Food Research and Development, 2010, 31(2): 10-14
- [6] 黄桂萍,肖红,张敏生,等.微波技术提取香菇多糖的研究[J].食品科学,2006,27(11):267-269  
HUANG Gui-ping, XIAO Hong, ZHANG Min-sheng, et al. Study on extraction of lentinan with microwave technique [J]. Food Science, 2006, 27(11): 267-269
- [7] 杨娟,吴谋成,张声华.香菇子实体蛋白多糖的分离纯化及组成结构分析[J].植物资源与环境学报,2001,10(2):4-1018  
YANG Juan, WU Mou-cheng, ZHANG Sheng-hua. Isolation purification and characterization of polysaccharides from the fruitbody of *Lentinus edodes*(Berk.) Sing [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2001, 10(2): 4-1018
- [8] 于海宁,朱惊,刘研,等.大孔树脂法用于江篱多糖脱色的工艺研究与优化[J].浙江工业大学学报,2014,42(4):418-421  
YU Hai-ning, ZHU Jing, LIU Yan, et al. Optimization technology on decolorization of *Gracilaria* polysaccharide by macroporous resin method [J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2014, 42(4): 418-421
- [9] 张红旭,郭辉.特定分子量范围内香菇多糖的分离研究[J].中国药房,2006,17(8):575-576  
ZHANG Hong-xu, GUO Hui. Study on the isolation of lentinan within definite molecular weights [J]. China Pharmacy, 2006, 17(8): 575-576
- [10] 张红静.超滤法提取与纯化香菇多糖[D].天津:天津大学,2006  
ZHANG Hong-jing. Polysaccharide fractionation by ultrafiltration-a novel method for isolation and purification of lentinan from *Lentinus edodes* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2006
- [11] 燕航,钟耀广.影响香菇多糖提取的因素研究[J].现代食品科技,2006,22(2):179-180  
YAN Hang, ZHONG Yao-guang. The study on extraction of polysaccharides from *Lentinus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(2): 179-180
- [12] 王超,蒋璇,彭杰,等.香菇粗多糖提取工艺的研究[J].江苏科技大学学报:自然科学版,2013,27(1):85-88  
WANG Chao, JIANG Xuan, PENG Jie, et al. Study on the extraction of crude polysaccharides from *Lentinus edodes* [J]. Journal of Jiangsu University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2013, 27(1): 85-88
- [13] 孙世利,赖兆祥,庞式,等.提取温度对金萱绿茶多糖体外抗氧化活性的影响[J].广东农业科学,2011,38(1):123-125  
SUN Shi-li, LAI Zhao-xiang, PANG Shi, et al. Effect of extraction temperature on antioxidant activity of Jinxuan green tea polysaccharide *in vitro* [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(1): 123-125
- [14] 于斐,李全宏.低温提取南瓜多糖的理化性质及清除 DPPH 自由基作用[J].食品研究与开发,2011,32(4):28-31  
YU Fei, LI Quan-hong. The physicochemical properties and radical scavenging activity of pumpkin polysaccharides extracted at low temperature [J]. Food Research and Development, 2011, 32(4): 28-31
- [15] 陈永,李强,谭晓晶,等.红毛玉加多糖的基本性质研究[J].天然产物研究与开发,2004,16(6):507-510  
CHEN Yong, LI Qiang, TAN Xiao-jing, et al. Study on

- characterization of polysaccharides from a *Canthopanax giraldii* hams [J]. Natural Product Research and Development, 2004, 16(6): 507-510
- [16] 阮征,胡筱波,陈浩,等.香菇多糖 L-2A 的结构表征[J].光谱实验室,2007,24(3):496-500  
RUAN Zheng, HU Xiao-bo, CHEN Hao, et al. The structural representations of lentinan polysaccharide L-2A [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2007, 24(3): 496-500
- [17] 李健,刘宁,陈平,等.香菇多糖单糖组成及含量的测定方法研究[J].化学与粘合,2005,27(2):71-74  
LI Jian, LIU Ning, CHEN Ping, et al. Determination method of composition and content of monosaccharide in the mushroom polysaccharide [J]. Chemistry and Adhesion, 2005, 27(2): 71-74
- [18] 赵谋明,邹林武,游丽君.提取方法对香菇多糖性质的影响[J].华南理工大学学报:自然科学版,2013,41(10):26-33  
ZHAO Mou-ming, ZOU Lin-wu, YOU Li-jun. Effects of extraction methods on property of lentinan polysaccharide [J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 2013, 41(10): 26-33
- [19] 闫慧丹.新型香菇多糖的纯化、鉴定与免疫活性研究[D].广州:华南理工大学,2013  
YAN Hui-dan. Purification, identification and immune activity of a new polysaccharide from *Lentinula* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [20] 李龙.坛紫菜和龙须菜多糖对巨噬细胞免疫调节作用的研究[D].厦门:集美大学,2015  
LI Long. Effect of polysaccharides on macrophage immune from *Porphyra haitanensis* and *Asparagus* [D]. Xiamen: Jimei University, 2015
- [21] 王冰清.人参花多糖的分离纯化、结构分析以及对淋巴细胞增殖的作用[D].长春:东北师范大学,2008  
WANG Bing-qing. Isolation, purification and structure analysis of ginseng flower polysaccharides and their effects on lymphocyte proliferation [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2008
- [22] 程安玮.甘草多糖的提取及对小鼠腹腔巨噬细胞的免疫调节[D].无锡:江南大学,2008  
CHENG An-wei. Extraction of glycyrrhiza polysaccharides and immune regulation of peritoneal macrophages in mice [D]. Wuxi: University of the South, 2008