

酶法水解金针菇多糖及其产物特性分析

游丽君, 刘钧发, 冯梦莹, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 采用纤维素酶、果胶酶、内切木聚糖酶、木瓜蛋白酶、胰酶五种酶分别对热水提取后的金针菇多糖进行降解, 并研究其产物特性。结果发现, 酶法降解后多糖的抗氧化活性得到不同程度的提高, 其中胰酶降解的金针菇多糖的抗氧化活性最高, 其 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 值为 1.71 ± 0.03 mg/mL, 是空白样的 1.5 倍; 在 4.0 mg/mL 的多糖浓度下, 还原力达到 1.15, 是空白样的 1.77 倍; 还有氧自由基清除能力(ORAC)值达到 923.90 ± 22.32 μ mol Trolox/g, 是空白样的 2.24 倍。其次木瓜蛋白酶和果胶酶降解的金针菇多糖的抗氧化活性也比较高。此外, 酶法降解能使金针菇多糖的分子量有不同程度的减小。单糖组成测定结果表明金针菇多糖主要由葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖和岩藻糖五种单糖组成, 通过不同酶降解后金针菇多糖的单糖组成也不同。

关键词: 金针菇; 多糖; 酶解; 抗氧化; 自由基

文章编号: 1673-9078(2013)7-1486-1490

Characteristics of *Flammulina velutipes* Polysaccharides Degraded by Different Proteases

YOU Li-jun, LIU Jun-fa, FENG Meng-ying, ZHAO Mou-ming

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Flammulina velutipes* polysaccharides extracted from hot water were degraded by five enzymes (cellulase, pectinase, endo-xylanase, papain and trypsin). It was found that antioxidant properties of *Flammulina velutipes* polysaccharide degraded by different enzymes were improved. Among them, the *Flammulina velutipes* polysaccharides degraded by trypsin showed the best activities in DPPH radical scavenging activity (IC_{50} value 1.71 ± 0.03 mg/mL), reducing power (1.15 at 4.0 mg/mL) and ORAC value (923.90 ± 22.32 μ mol Trolox/g), being of 1.5, 1.77 and 2.24 folds, respectively, of those of the control, followed by the polysaccharides prepared by papain and pectinase. Moreover, the molecular weights of the polysaccharides were decreased after different enzymes degradation. The monosaccharide compositions of the polysaccharides were mainly glucose, galactose, xylose, mannose and algae. They were also changed after different enzymatic hydrolysis.

Key words: *Flammulina velutipes*; polysaccharides; enzymatic hydrolysis; antioxidant activities; free radicals

金针菇 (*Flammulina velutipes*) 又名毛柄金钱菌、冬菇, 属担子菌亚门, 层菌纲, 伞菌目, 口蘑科, 金钱菌属。金针菇在大自然中分布广泛, 是一种比较普遍的食用菌, 具有较高的药理价值。其中多糖是金针菇的子实体提取物的主要活性成分之一。相关研究表明, 金针菇多糖是一类主要以 β -(1,3)糖苷键连接的葡聚糖, 根据目前的研究, 金针菇多糖的主要活性有抗炎、抗衰老、抗氧化、调节免疫、抗癌、抗肿瘤、保

收稿日期: 2013-03-26

基金项目: 国家自然科学基金 (31101222)、广东省产学研项目 (2010A090200041)、广东省科技计划项目 (2011B030500004)、SRP 项目《生物活性多糖的分离纯化及功效研究》

作者简介: 游丽君 (1982-), 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向为食品生物技术

通讯作者: 赵谋明 (1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品生物技术

护肝脏和辅助改善记忆等功效^[1-2]。近年来, 金针菇多糖的提取方法主要是以热水提取法、超声提取法、微波提取法和酶提取法为主^[3]。其中热水提取法作为一种传统的提取方法, 其应用比较广泛, 但提取率较低, 所得多糖主要为胞外多糖, 分子量较大、溶解度较低、活性较低, 而且得到的多糖主要为杂多糖, 即多糖与蛋白质或者其他物质结合在一起, 纯度不高。本研究采用食品级酶制剂对热水提取后的金针菇多糖进行进一步降解, 旨在降低水提多糖的分子量, 促进小分子量多糖的进一步溶出, 达到提高其多糖抗氧化活性的目的。本法与目前文献报道的酶提取多糖不同。文献报道的酶制备多糖法, 主要是通过酶直接水解原料的细胞壁和细胞膜, 使胞内多糖容易溶出, 从而提高其提取率; 而本研究所研究的酶法降解法, 是采用酶来水解水提后的多糖, 从而提高其活性。因此, 两种方法中酶所作用的对象不同, 产物的特性也不同。本研

究采用酶法降解水提多糖,并研究其产物特性,目前尚未见此方面报道,具有一定的创新性。本研究结果将为生物活性多糖的进一步开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

金针菇干,产地福建龙岩;DPPH、Trolox、FL及APPH购于Sigma公司;纤维素酶、果胶酶、内切木聚糖酶,购于诺维信公司;木瓜蛋白酶、胰酶购于拜奥生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器与设备

高速冷冻离心机 GL-21M,长沙湘仪离心机有限公司;荧光酶标仪 Varioskan Flash,美国 Thermo 公司;紫外可见分光光度计 UV-2100,广州市广一科学仪器有限公司;THZ-82A 水浴恒温振荡器,常州澳华仪器有限公司;Breeze 高效凝胶渗透色谱仪,美国 waters 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理

先将购买的金针菇干粉碎,得到的金针菇粉末再按料液比 1:6 (*m/V*) 的比例加入 95% 乙醇,保持微沸状态回流 3 h。然后用滤布过滤,除去色素及其他一些醇溶性杂质,挥发干乙醇,得到的金针菇粉备用。

1.3.2 金针菇水提多糖的制备

经预处理的金针菇粉按料液比 1:25 (*m/V*) 的比例加入蒸馏水于圆底烧瓶中,置于电热套加热使之微沸,回流 2 h 后,用滤布过滤,将滤渣加入 25 倍水,继续微沸回流 1 h,用滤布过滤,将两次滤液合并,再进行抽滤,得到的滤液进行膜浓缩。

根据 Sevag 等^[4]的方法除蛋白,浓缩液按物料比 5:1 的比例加入 Sevag 试剂(氯仿:乙醇=5:1),剧烈振荡 30 min,然后静置 10 min,离心 4800 r/min,20 min,取上层清液,重复多次,直至除去蛋白质。

除去蛋白后的多糖溶液再加入 4 倍体积的无水乙醇,使乙醇终浓度为 80%,置于 4 °C 冰箱下 12 h,使多糖沉降,弃去上清液,所得沉淀用水复溶,即为金针菇水提多糖溶液。

1.3.3 金针菇水提多糖的酶法降解

将金针菇水提多糖配置成 5 mg/mL 的浓度,分装于 6 个锥形瓶中,调节溶液至各种酶最适 pH 值,再分别加入纤维素酶(a)、果胶酶(b)、内切木聚糖酶(c)、木瓜蛋白酶(d)、胰酶(e)五种酶和不加酶(f,水提金针菇多糖,作为空白对照),加酶量为 2%,在 50 °C 水浴加热,水解 4 h,然后在沸水浴中灭酶 10 min,冷却,离心(4800 r/min,20 min),过滤,上清

液即为酶解后多糖溶液。

1.3.4 多糖抗氧化活性的测定

1.3.4.1 DPPH 自由基的清除能力测定

多糖的 DPPH 自由基清除能力的测定主要参考 You 等人^[5],并略作修改。取 2 mL 的多糖样品(1~5 mg/mL)与 2 mL 的 DPPH 乙醇溶液(0.2 mmol/L)混合,振荡,避光静置 15 min,由于混合物有沉淀,因此离心(4800 r/min,15 min),在 517 nm 下测吸光值 A_i ,以等体积的蒸馏水和无水乙醇溶液调零,2 mL 的无水乙醇与 2 mL 多糖样品混合在同样条件下测得的吸光值为 A_j ,以及 2 mL 的 DPPH 乙醇溶液和 2 mL 的无水乙醇混合物测得的吸光值为 A_c 。多糖 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 值表示当 DPPH 的清除率为 50% 时多糖的浓度,单位 mg/mL。 IC_{50} 值越小,表明多糖的 DPPH 清除能力越强。

$$\text{DPPH 清除率}/\% = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

1.3.4.2 还原力

多糖还原力的测定主要参考 You 等人^[6],并略作修改。取 2 mL 的多糖样品(1~5 mg/mL),2 mL 的磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH 6.6)和 2 mL 的铁氰化钾(1%,*m/V*)混合,于 50 °C 水浴加热 20 min,再加入 2 mL 的三氯乙酸(10%,*m/V*)振荡,终止反应。取上清液 2 mL,并与 2 mL 的蒸馏水,0.4 mL 的氯化铁混合,振荡,反应 10 min,在 700 nm 下测吸光值,用蒸馏水调零。

1.3.4.3 氧自由基清除能力(ORAC)

ORAC 的方法主要参考 Aguirre 等人^[7],并略作修改。在 96 孔板中加入 40 μ L 荧光素(FL,3.5 nmol/L)和 20 μ L 的多糖样品(0.1~0.2 mg/mL),在 37 °C 下预热 15 min。然后快速加入 140 μ L 的 AAPH 自由基(12.8 mmol/L),振荡后运行程序。在 37 °C 下以激发波长 485 nm,发射波长 538 nm 进行测定,每 2 min 测定一次荧光值 f_i ,初始读数记为 f_0 ,而样品的荧光值曲线的面积(AUC)= $1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_n/f_0$,净面积(Net AUC)=AUC-AUC_{空白},Net AUC 值与 Trolox 浓度 Trolox(0~100 μ mol/L)作标准曲线。根据标准曲线计算得的金针菇 ORAC 值用 μ mol Trolox/g 表示。

1.3.5 分子量的测定

采用凝胶渗透色谱(GPC)测定分子量,参考金鑫等^[8]的色谱条件进行分析。进样量 20 μ L,流动相为 0.02 mol/L 的磷酸二氢钾溶液,流速为 0.6 mL/min,柱温 35 °C,检测器为 2414 型示差折光检测器。相对分子质量分别为 5200、11600、23800、48600、148000、273000、410000、668000、1400000 Da 的葡聚糖标准品作标准曲线。

1.3.6 单糖组成的测定

通过 GC-MS 进行金针菇多糖单糖组成的分析,参考 Kambiz 等^[9]的文献并略作修改。20 mg 的多糖样品与 5 mL 的三氟乙酸(TFA)在 100 °C 中水解 1 h。然后通过减压旋干,再加入适量的甲醇继续旋干,重复 3~5 次。再加入 40 mg 的盐酸羟胺、15 mg 肌醇和 2 mL 的吡啶于 90 °C 水浴振荡 1 h 后,加入 2 mL 醋酸酐 90 °C 水浴 30 min。反应后的溶液静置,取上清液,再加入 2 mL 水终止反应后,加入 4 mL 的二氯甲烷,吸取上层的水,然后再加入 2 mL 水,振荡,吸取上层水,重复 2~3 次,最后加入无水硫酸钠吸去剩余水分,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后即可上样。另外以 D-葡萄糖、鼠李糖、木糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖等作为内标。

2 结果与讨论

2.1 不同酶降解金针菇多糖后产物 DPPH 自由基清除能力

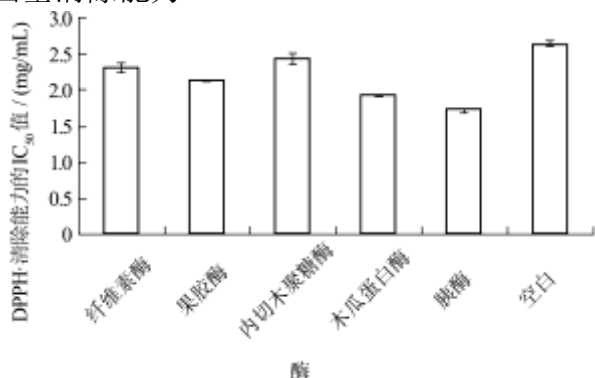


图 1 不同酶降解金针菇多糖后产物的 DPPH 自由基清除能力

Fig.1 DPPH radical scavenging activities of *Flammulina velutipes* polysaccharides degraded by different enzymes

图 1 为不同酶降解金针菇多糖后产物的 DPPH 自由基清除能力。DPPH 自由基清除能力的方法被广泛应用于评价多糖等天然化合物清除自由基的能力^[10]。在本研究中,金针菇多糖的 DPPH 清除能力随着多糖浓度的增加而升高。根据图 1 的 DPPH 自由基清除能力的 IC₅₀ 值,不同酶降解金针菇多糖后产物的清除能力从高到低为:胰酶>木瓜蛋白酶>果胶酶>纤维素酶>内切木聚糖酶>空白,其 IC₅₀ 值依次为:1.71±0.03 mg/mL、1.92±0.02 mg/mL、2.13±0.01 mg/mL、2.31±0.06 mg/mL、2.43±0.08 mg/mL、2.64±0.04 mg/mL。由此可知,通过酶降解后产物多糖的清除 DPPH 自由基能力有所提高,其中胰酶降解产物清除能力提高最明显,为空白样的 1.5 倍。根据 Jing 等^[11]的文献报道,DPPH 自由基的清除能力跟抗氧化剂的提供氢的能力有关,抗氧化剂通过提供氢与 DPPH 自由基形成稳定的

DPPH-H。本研究结果表明,通过酶降解后的多糖由于分子量降低,更多活性基团暴露,更易捕获 DPPH 自由基,从而使金针菇多糖的 DPPH 自由基清除能力有所提高。

2.2 不同酶降解金针菇多糖后产物的还原力

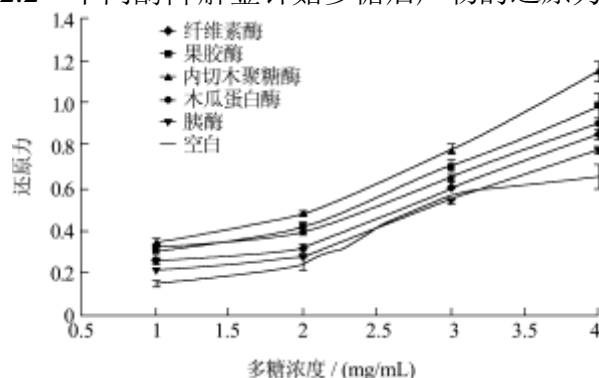


图 2 不同酶降解金针菇多糖后产物的还原力

Fig.2 The reducing power of *Flammulina velutipes* polysaccharides degraded by different enzymes

不同酶降解金针菇多糖后产物的还原力如图 2 所示,还原力法的原理是抗氧化剂与铁氰化钾在 50 °C 下被还原成亚铁氰化钾,再与 FeCl₃ 反应生成绿色的普鲁士蓝,在 700 nm 下有强吸收峰,其吸光度越高,说明其还原力越高^[12]。从图中可以看出,不同酶降解金针菇多糖后产物的还原力随着多糖浓度的增加而升高。胰酶降解金针菇多糖后产物的还原力最高,在 4.0 mg/mL 的多糖浓度下达到 1.15,是空白样品的 1.77 倍。不同酶降解金针菇多糖后产物的还原力从高到低依次为:胰酶>果胶酶>木瓜蛋白酶>纤维素酶>内切木聚糖酶>空白。可见,通过添加酶对金针菇水提多糖进行进一步降解,可提高多糖的还原力。这可能是因为由于酶的降解,使多糖结构中提供电子或者氢原子的基团更多地暴露,更易与铁氰化钾反应,因此产物的还原力提高。

2.3 不同酶降解金针菇多糖后产物 ORAC 值

目前,测量抗氧化值得方法基本上分成两种,一种是基于氢原子的转移,另一种是基于电子的转移^[13]。而 ORAC 法是基于氢原子转移的方法,广泛应用于蔬菜、饮料,也被逐渐应用于测定多糖抗氧化活性。如图 3 所示为不同酶降解金针菇多糖后产物的 ORAC 值。其中,胰酶降解金针菇多糖后产物的 ORAC 值最高,达到 923.90±22.32 μmol Trolox/g,是空白样品 ORAC 值的 2.24 倍。其次是酶降解金针菇多糖后产物,其 ORAC 值为 770.61±10.76 μmol Trolox/g。而内切木聚糖酶降解金针菇多糖后产物的 ORAC 值最低,仅有 429.7±10.75 μmol Trolox/g,与空白样品无显著性差异。

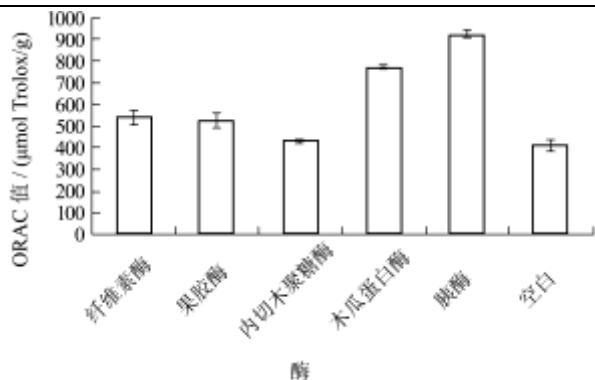


图3 不同酶降解金针菇多糖后产物的ORAC值

Fig.3 The ORAC values of *Flammulina velutipes* polysaccharides degraded by different enzymes

综上不同酶降解金针菇多糖后产物的 DPPH 自由基清除能力、还原力、ORAC 值, 可以得出, 胰酶降解金针菇水提多糖后, 产物的抗氧化活性得到显著提高, 其次为木瓜蛋白酶和果胶酶。这可能是因为以上几种酶可把金针菇水提多糖降解到适当的分子量范围, 使活性基团更多地暴露, 有利于捕获自由基, 从而使多糖的抗氧化活性提高。

2.4 不同酶的降解对金针菇水提多糖分子量的影响

表1 不同酶降解后金针菇多糖的分子量组成

Table 1 The molecular weights of *Flammulina velutipes* polysaccharides degraded by different enzymes

酶	峰 1(比例)	峰 2(比例)
纤维素酶	208.1 kDa (1.81%)	20.0 kDa (98.19%)
果胶酶	226.24 kDa (2.81%)	19.76 kDa (97.19%)
内切木聚糖酶	19.55 kDa (100%)	-
木瓜蛋白酶	262.64 kDa (8.09%)	19.66 kDa (91.91%)
胰酶	220.63 kDa (22.28%)	21.23 kDa (77.72%)
空白	272.94 kDa (2.43%)	19.66 kDa (97.57%)

不同酶降解后金针菇多糖后产物的分子量如表 1 所示。从表中可知, 除添加内切木聚糖酶的样品外, 其他金针菇多糖样品的分子量主要由两部分组成。空白样的分子量为 272.94 kDa 占 2.43% 和 19.66 kDa 占 97.57%。通过胰酶降解后, 金针菇多糖的分子量有所降低, 其分子量组成为 220.63 kDa 占 22.28% 和 21.23 kDa 占 77.72%。木瓜蛋白酶、果胶酶、纤维素酶作用于金针菇多糖后, 产物的分子量也都有不同程度的降低。此外, 内切木聚糖酶能大大降低金针菇多糖的分子量, 其分子量组成为 19.55 kDa(100%)。多糖的抗氧化活性与其分子量的大小和组成有密切关系。由表 1 可知, 多糖的分子量只有在一定的范围内, 其抗氧化活性才能得到发挥。

2.5 不同酶解后的金针菇多糖单糖组成的比

较

表2 不同酶降解后金针菇多糖的单糖组成

Table 2 The monosaccharide compositions of *Flammulina velutipes* polysaccharides degraded by different enzymes

单糖组成/%	纤维素酶	果胶酶	内切木聚糖酶	木瓜蛋白酶	胰酶	空白
岩藻糖	1.64	1.80	1.77	0.83	1.24	1.31
木糖	11.27	11.69	11.54	7.06	9.24	12.40
甘露糖	8.82	9.01	8.54	6.24	9.12	7.88
半乳糖	16.22	18.62	17.65	24.22	18.72	19.08
葡萄糖	62.05	58.25	60.14	61.65	61.68	58.49
半乳糖醛酸	-	0.62	0.36	-	1.22	0.83

从表 2 可知, 金针菇多糖主要由葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖和岩藻糖组成, 其中葡萄糖为主要成分, 约占 58~62%, 其次为半乳糖, 约占 16~24%。这与金鑫^[9]等测量四川、浙江和福建 3 个地方的金针菇多糖的单糖组成都是葡萄糖含量最高, 其次是半乳糖的结果相符合。因此可以推断, 金针菇多糖是以葡萄糖为主链的一类多糖。多糖的抗氧化活性与多糖的单糖组成密切相关^[14], 如 Ren 等人^[15]发现, 糖醛酸的含量越高, 多糖的抗氧化活性越好。因此不同酶降解金针菇多糖后产物的单糖组成不同, 其抗氧化活性也不同。这也解释了为什么不同酶降解金针菇多糖后产物的抗氧化活性不同。

3 结论

本文通过添加纤维素酶、果胶酶、内切木聚糖酶、木瓜蛋白酶和胰酶 5 种酶对水提后的金针菇多糖进行进一步的降解。研究发现: 酶法降解金针菇多糖的抗氧化活性有所增强, 胰酶降解金针菇多糖后产物的 DPPH 自由基清除能力、还原力、ORAC 值比空白样大大提高, 其次为木瓜蛋白酶和果胶酶。通过不同酶降解后的金针菇多糖的分子量有不同程度的下降、单糖组成也发生了变化, 但其具体的机理还有待进一步的研究。

参考文献

[1] 梁敏, 邹东恢, 郭宏文, 等. 复合酶法提取金针菇多糖及光谱分析[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(6): 1210-1213
Liang M, Zhou D H, Guo H W, et al. The extraction of *Flammulina velutipes* polysaccharides by complex enzymes and their spectral analysis [J]. Journal of Agricultural Science of Hubei, 2012, 51(6): 1210-1213

[2] 邹宇晓, 廖森泰, 吴娱明, 等. 金针菇多糖提取物对记忆障碍模型大鼠、小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国食品学

- 报,2010,1:26-30
- Zhou Y X, Liao S T, Wu Y M, et al. The effects of *Flammulina velutipes* polysaccharides on the memory ability of dysmnesia mice [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010, 1: 26-30
- [3] 刘孝永,陈蕾蕾,裘纪莹,等. 金针菇多糖研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2012, 18(5): 63-67
- Liu X Y, Chen L L, Qiu J Y, et al. Research Progress of *Flammulina velutipes* polysaccharides [J]. *Food and Nutrition in China*, 2012, 18(5): 63-67
- [4] Sevag M, Lackman D, Smolens J. The isolation of components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1938, 124, 425-528
- [5] You L, Zhao M, Regenstein J, et al. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124: 188-194
- [6] You L, Zhao M, Cui C, et al. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2009, 10: 235-240.
- [7] Aguirre M, Isaacs M, Matsuhiro B, et al. Characterization of a neutral polysaccharide with antioxidant capacity from red wine [J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(9): 1095-1101
- [8] 金鑫,向莹,陈健. 不同产地金针菇多糖的分子量和单糖组成比较研究[J]. *食品科技*, 2012, 37(5): 175-179
- Jin X, Xiang Y, Chen J. The molecular weight and monosaccharide compositions of *Flammulina velutipes* polysaccharides from different areas [J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(5): 175-179
- [9] Kambiz J, Ahmad R, Sohrab M, et al. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from *Acanthophyllum bracteatum* roots [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 49: 567-572
- [10] Yi C, Ming Y, Shao P, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107: 231-241
- [11] Wang J, Zhang Q, Zhang Z, et al. Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoidan and their potential antioxidant activity in vitro [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 44: 170-174
- [12] Isabel C, Paula B, Miguel V, et al. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100: 1511-1516.
- [13] Zulueta A, Esteve M, Frigola A, et al. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114: 310-316
- [14] Xu J, Liu W, Yao W, et al. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78: 227-234
- [15] Ren J, Sun R, Peng F. Carboxymethylation of hemicelluloses isolated from sugarcane bagasse [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2008, 93: 786-793