

Antioxidant Activity *in Vitro* of Polysaccharides from *Auricularia auricula* and *Auricularia polytricha*

Zhiqing Gong^{1,2,3}, Mingming Li¹, Jian Zhang¹, Wenliang Wang^{1,2,3}

¹Key Laboratory of Agro-Products Processing Technology of Shandong Province, Jinan Shandong

²Institute of Agro-Products Processing Science and Technology, SAAS, Jinan Shandong

³Key Laboratory of Novel Food Resources Processing, Ministry of Agriculture, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan Shandong

Email: 147372843@qq.com

Received: Oct. 28th, 2017; accepted: Nov. 10th, 2017; published: Nov. 17th, 2017

Abstract

To investigate the effects of crude polysaccharides of *Auricularia polytricha* and *Auricularia auricula*, protein removal on antioxidant activity *in vitro*, the crude polysaccharides were obtained through water bath and alcohol precipitation, then protein was removed by chloroform-butanol. We compared DPPH· scavenging capacity and total antioxidant capacity (FRAP) of four samples. The experiments showed that both the scavenging ability of DPPH· and the total antioxidant capacity showed that NO deproteinization *Auricularia polytricha* > deproteinization *Auricularia polytricha* > NO deproteinization *Auricularia auricular* > deproteinization *Auricularia auricula*. The antioxidant activity of *Auricularia polytricha* is higher than that of *Auricularia auricula*. The antioxidant capacity of polysaccharides had a dose effect relationship with its concentration.

Keywords

Auricularia polytricha, *Auricularia auricula*, Polysaccharide, Deproteinization, Antioxidant

毛木耳和黑木耳多糖体外抗氧化研究

弓志青^{1,2,3}, 李明明¹, 张 剑¹, 王文亮^{1,2,3}

¹山东省农产品精深加工技术重点实验室, 山东 济南

²山东省农业科学院农产品研究所, 山东 济南

³农业部新食品资源加工重点实验室, 山东 济南

Email: 147372843@qq.com

收稿日期: 2017年10月28日; 录用日期: 2017年11月10日; 发布日期: 2017年11月17日

文章引用: 弓志青, 李明明, 张剑, 王文亮. 毛木耳和黑木耳多糖体外抗氧化研究[J]. 食品与营养科学, 2017, 6(4): 223-228. DOI: 10.12677/hjfn.2017.64028

摘要

为比较毛木耳和黑木耳粗多糖、脱蛋白对多糖体外抗氧化作用的影响,将毛木耳和黑木耳水提醇沉得到粗多糖,采用氯仿-正丁醇脱蛋白,比较脱蛋白、未脱蛋白后毛木耳及黑木耳粗多糖对DPPH的清除能力以及总抗氧化能力(FRAP)。结果表明:四种样品的抗氧化能力为:未脱蛋白毛木耳多糖 > 脱蛋白毛木耳多糖 > 未脱蛋白黑木耳多糖 > 脱蛋白黑木耳多糖,毛木耳多糖的抗氧化能力高于黑木耳多糖,脱蛋白降低多糖的抗氧化能力,木耳多糖的抗氧化能力与浓度具有一定的量效关系。

关键词

黑木耳, 毛木耳, 多糖, 脱蛋白, 抗氧化性

Copyright © 2017 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

毛木耳(*Auricularia polytricha*)和黑木耳(*Auricularia auricula*)都属于胶质菌,真菌学分类属担子菌纲,木耳目,木耳科,木耳属,都属于食药两用菌,具有丰富的营养和保健价值。但二者也有一定的区别,包括口感方面:毛木耳质地硬而脆,较耐嚼,有“树上海蜃皮”之称,而黑木耳嫩、滑、口感好,被誉为“素中之荤”;外形和价格方面:毛木耳体型大、耳片厚、耳背毛较粗而长,价格低,而黑木耳体型小、耳片较薄、耳背毛较细而短,价格高。营养方面:毛木耳镁含量较高,而黑木耳钙、铁含量较高[1],每100克黑木耳中含铁185毫克,它比绿叶蔬菜中含铁量最高的菠菜高出20倍,比动物性食品中含铁量最高的猪肝还高出约7倍,是各种荤素食品中含铁量最多的。

木耳多糖具有增强免疫系统,提高免疫力,抑制癌细胞生长的作用。张丹凤[2]通过研究发现毛木耳多糖能够明显延长肿瘤小鼠的寿命。尹红力[3]将木耳多糖注入糖尿病小鼠体内,发现黑木耳多糖具有明显的降血糖作用。于美汇[4]通过向高血脂模型小鼠饲喂黑木耳多糖,证明黑木耳多糖拥有降血脂的功能。蛋白质是粗多糖的主要杂质,它的存在增加了多糖的吸湿性,多糖纯化的第一步就是去蛋白。单独研究毛木耳和黑木耳多糖功效及抗氧化能力较多,但二者多糖抗氧化能力相比较究竟如何,研究很少,本研究通过对照毛木耳和黑木耳多糖得率,以及脱蛋白对多糖DPPH的清除能力以及总抗氧化能力的影响,为开发毛木耳和黑木耳多糖的研究提供理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

毛木耳购自福建漳平新桥,黑木耳购自当地华联超市,产地黑龙江。

原料预处理:将木耳杂质冲洗干净,放入烘箱中60℃烘干至恒重,用粉碎机将木耳粉碎,过40目筛,保存备用。

2.2. 仪器

ZL-10L小型粉碎机:北京兴时利和科技发展有限公司;高速冷冻离心机CR22DIII:日立公司(日本);

冷冻干燥机 FD-1: 北京博医康实验仪器有限公司。

2.3. 实验方法

2.3.1. 木耳粗多糖的提取

分别称取毛木耳和黑木耳粉 50 g, 按照料液比 1:40 加蒸馏水, 在 100℃ 恒温水浴锅中水浴 4 h, 然后在 10℃ 下 3000 r/min 离心 15 min 取上清。沉淀按上述步骤重新提取后取上清液。合并两次上清液, 旋转蒸发至大约 100 mL。缓慢加入 90% 的酒精醇沉 24 h, 沉淀用冷冻干燥机冻干至恒重, 得到木耳粗多糖。

2.3.2. 木耳多糖脱蛋白

称取木耳多糖 1 g, 按 1:10 用蒸馏水溶解, 将氯仿 - 正丁醇溶液(4:1)与多糖溶液按照 1:4 置于离心管中, 震荡混匀 30 min, 3500 r/min 离心 1 min, 取上层多糖溶液(注意不要取出中间白色蛋白质)。将取出的多糖液用氯仿 - 正丁醇溶液再次脱蛋白, 重复以上过程三次。

2.3.3. 木耳多糖含量测定

毛木耳和黑木耳水溶性多糖含量测定采用 NY-T 1676-2008 [5], 以葡萄糖为标准样品制作标准曲线, 采用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 其标准曲线 $y = 12.199x - 0.0019$, $R^2 = 0.9967$ 。其计算公式如下:

$$X = \frac{c_1 \times 100}{m_1} \quad (1)$$

X : 样品中粗多糖的含量; c_1 : 溶液浓度; m_1 : 样品质量。

2.3.4. 蛋白含量的测定

蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法, 牛血清蛋白的标准曲线为 $y = 4.0211x + 0.0143$, $R^2 = 0.9959$ 。

2.3.5. 木耳多糖清除二苯代苦味肼基自由基(DPPH)的测定

分别取适量脱蛋白前后的毛木耳及黑木耳多糖配制成 10 mg/mL 的多糖母液, 分别稀释成 9 mg/mL、7 mg/mL、5 mg/mL、3 mg/mL 和 1 mg/mL 的粗多糖溶液。按表 1 加样, 反应 30 min 后测定 A_{517nm} 。按下式计算清除率:

$$\text{清除率 } I(\%) = \left[1 - \frac{A_i - A_j}{A_c} \right] \times 100\% \quad (2)$$

2.3.6. 铁离子还原/抗氧化力测定法(FRAP 法)

根据 Benzie 与 Strain 的方法[6], 其原理为 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪(tripyridyl-triazine, TPTZ)可被样品中还原物质还原为二价铁形式, 呈现出明显的蓝色, 在 593 nm 处有最大光吸收。将 NaAc-HAc 缓冲液(0.3 mol/L 醋酸钠缓冲溶液)、三氯化铁(20 mmol/L)溶液以及 TPTZ (10 mmol/L)溶液按照体积比 10:1:1 配制成 FRAP 工作液, 取不同浓度的硫酸亚铁标准溶液 4 mL 于试管中, 加入 4 mL FRAP 工作液于试管中加热至 37℃,

Table 1. DPPH· scavenging test of *Auricularia auricula* and *Auricularia polytricha*

表 1. 木耳清除 DPPH 自由基试验

吸光值	反应条件
A_c (不加样 DPPH 吸光度)	2 mL 0.2 mmol/L DPPH· 无水乙醇溶液与 2 mL 无水乙醇
A_i (样品后吸光度)	2 mL 0.2 mmol/L DPPH· 无水乙醇溶液与 2 mL 试样
A_j (空白组吸光度)	2 mL 无水乙醇与 2 mL 试样

反应 10 min, 在 593 nm 处测吸光值, 根据硫酸亚铁曲线计算出 FRAP 值, 其标准方程为 $y = 0.0007x + 0.0004$, $R^2 = 0.9982$ 。测定脱蛋白前后的毛木耳及黑木耳不同浓度的多糖溶液的 FRAP 值。

3. 结果和讨论

3.1. 粗多糖中多糖和蛋白质含量

毛木耳和黑木耳子实体粗多糖含量分别为 $9.39 \text{ g}/100\text{g}^{-1}$ 和 $4.42 \text{ g}/100\text{g}^{-1}$, 毛木耳多糖含量为黑木耳的二倍多。多糖含量与菌株、栽培条件的较大的影响, 陈雪凤等[1]报道了同一栽培条件下 5 个黑木耳菌株粗多糖含量范围在 $5.59\sim 9.52 \text{ g}/100\text{g}^{-1}$, 袁斌等[7]采用巨尾桉木屑栽培 7 个毛木耳菌株, 其粗多糖含量范围在 $9.6\sim 14.85 \text{ g}/100\text{g}^{-1}$, 从以上两则报道也可以看出, 毛木耳粗多糖的含量高于黑木耳粗多糖含量。

图 1 为毛木耳和黑木耳粗多糖中多糖和蛋白的含量, 脱蛋白采用 Sevage 法, 它是多糖脱蛋白较常用的方法之一。粗多糖脱蛋白后, 毛木耳粗多糖中蛋白含量从 4.93% 减少到 1.37%, 多糖含量从 83.31% 减少到 60.02%, 蛋白质脱除率 72%, 黑木耳粗多糖中蛋白含量从 5.48% 减少到 1.47%, 多糖含量从 71.15% 减少到 61.66%, 蛋白质脱除率 75%。可以看出, 脱蛋白的同时, 毛木耳和黑木耳多糖都有一定损失, 而且 Sevage 脱蛋白法对毛木耳多糖含量的影响要大于对黑木耳多糖的影响。

3.2. 木耳多糖的 DPPH 清除率

DPPH 自由基有单电子, 在 517 nm 处有一强吸收, 其醇溶液呈紫色。当有自由基清除剂存在时, 由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失, 其褪色程度与其接受的电子数量成定量关系。毛木耳粗多糖、黑木耳粗多糖及二者脱蛋白后的多糖清除 DPPH 自由基见图 2, 毛木耳粗多糖对 DPPH 的清除率要高于黑木耳粗多糖对 DPPH 的清除率, 而且脱蛋白后的多糖对 DPPH 清除率低于未脱蛋白的多糖, 即毛木耳未脱蛋白 > 毛木耳脱蛋白 > 黑木耳未脱蛋白 > 黑木耳脱蛋白, 且随着多糖浓度增加, 抗氧化能力增加, 多糖浓度在 $1\sim 9 \text{ mg}/\text{mL}$ 范围内, 与 DPPH 清除率呈直线关系, R^2 都大于 0.93。魏华等[8]采用胰蛋白酶去除毛木耳粗多糖中杂蛋白, 并研究了粗多糖与精多糖对 DPPH 清除率时发现, 在浓度 $0.2\sim 1.2 \text{ mg}/\text{mL}$ 时粗多糖的清除率大于精多糖, 而浓度 $1.2\sim 3.2 \text{ mg}/\text{mL}$ 时精多糖的清除率大于粗多糖。跟本实验结果不大一致, 可能跟脱蛋白的方式有关。

多糖浓度为 $9 \text{ mg}/\text{mL}$ 时, 毛木耳粗多糖与脱蛋白后的粗多糖 DPPH 清除率约为 90%, 但与 V_c 清除 DPPH 自由基相比较, 毛木耳和黑木耳的体外抗氧化性是非常低的, 比如郑大贵[9]用 DPPH 法测定 V_c 的抗氧化性, V_c 在浓度为 $0.02 \text{ mg}/\text{mL}$ 时, 对 DPPH 的清除率就已经达到 90% 以上, 两者相差将近 500 倍。

3.3. 木耳多糖总抗氧化能力(FRAP)

毛木耳粗多糖、黑木耳粗多糖及二者脱蛋白后的多糖 FRAP 见图 3, 与多糖清除 DPPH 自由基一致, 毛木耳多糖的总抗氧化性要高于黑木耳多糖, 脱蛋白影响多糖的总抗氧化能力, 刘超等[10]采用膜分离工艺制备党参复方总多糖, 并对得到的总多糖进行脱蛋白、脱色等不同方法的纯化, 测定各多糖产物的还原能力、清除羟基自由基、DPPH 自由基及超氧阴离子自由基的能力, 发现总多糖经脱蛋白、脱色等纯化步骤后体外抗氧化活性减弱。与本实验的结果一致, 说明多糖脱蛋白影响其抗氧化性。

随着多糖浓度增加, 抗氧化能力也逐步增加, 多糖浓度在 $1\sim 9 \text{ mg}/\text{mL}$ 范围内, 与 DPPH 清除率呈直线关系, R^2 都大于 0.92, 清除效果与多糖浓度均呈现一定的量效关系。

4. 结论

本实验对毛木耳和黑木耳粗多糖及 sevage 法脱蛋白后的多糖抗氧化能力, 包括清除 DPPH 自由基及总抗氧化能力进行了比较, 发现毛木耳多糖的抗氧化能力高于黑木耳多糖, 脱蛋白降低了二者的抗氧化

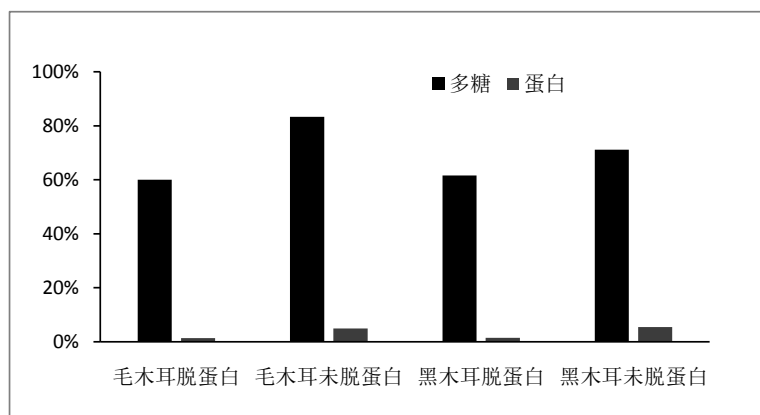


Figure 1. Polysaccharide and protein content of crude polysaccharide in *Auricularia auricula* and *Auricularia polytricha*

图 1. 毛木耳和黑木耳粗多糖中多糖和蛋白的含量

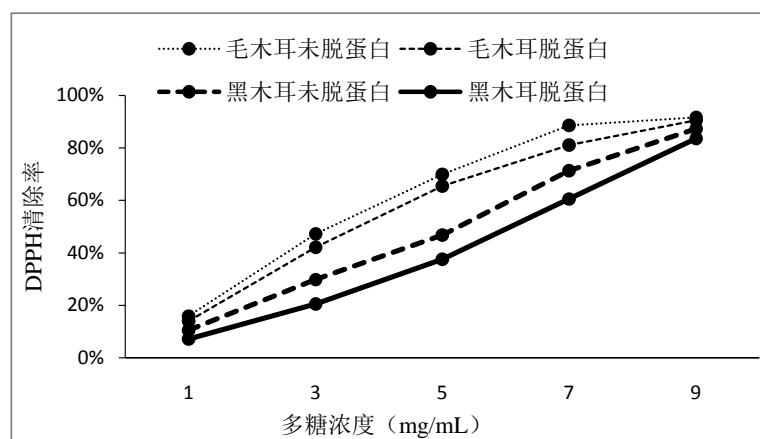


Figure 2. DPPH scavenging rate of polysaccharide in *Auricularia auricula* and *Auricularia polytricha*

图 2. 木耳多糖对 DPPH 的清除率

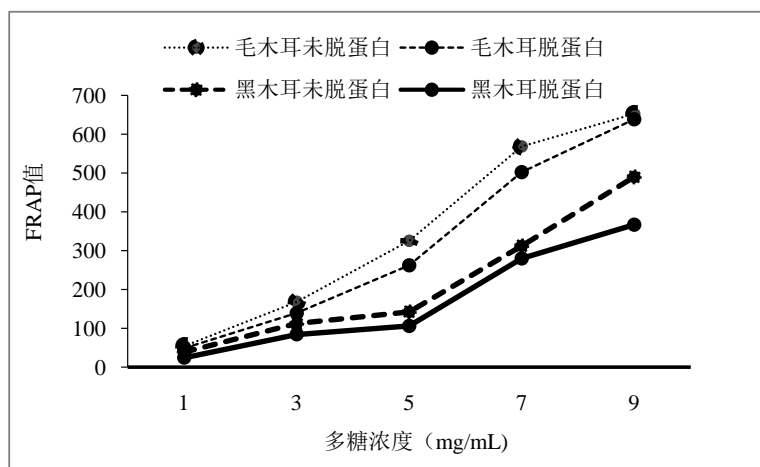


Figure 3. FRAP value of polysaccharide in *Auricularia auricula* and *Auricularia polytricha*

图 3. 木耳多糖的 FRAP 值

能力, 木耳多糖的抗氧化能力与浓度具有一定的量效关系。

脱蛋白的方法采用化学方法, 易破坏多糖结构, 降低多糖活性。而且脱蛋白的同时, 多糖浓度也降低很多, 因此脱蛋白方法要慎重使用。

实验发现毛木耳多糖的含量约为黑木耳的二倍, 而且抗氧化能力也较高, 但二者功效方面的作用究竟如何, 还需要进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] 陈雪凤, 韦仕岩, 吴圣进, 等. 不同黑木耳菌株的营养成分分析比较[J]. 食用菌, 2016, 38(2): 72-73.
- [2] 张丹凤, 陈国平, 潘裕添, 等. 白背毛木耳胞内多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 食用菌, 2014(3): 75-77.
- [3] 尹红力, 赵鑫, 佟丽丽, 等. 黑木耳多糖体外和体内降血糖功能[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 221-226.
- [4] 于美汇, 赵鑫, 尹红力, 等. 碱提醇沉黑木耳多糖体外和体内降血脂功能[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 232-237.
- [5] 农业部食用菌产品质量监督检验测试中心(上海)、上海市农业科学院食用菌研究所. 食用菌中粗多糖含量的测定[S]. 中华人民共和国农业行业标准 NY/T 1676-2008.
- [6] Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- [7] 袁斌, 柯丽娜, 吴尚钦, 等. 巨尾桉木屑配方对 7 种毛木耳产质量的影响[J]. 热带农业科学, 2017, 37(2): 62-66.
- [8] 魏华, 张娣, 陆玲, 等. 几种食用菌多糖的提取与抗氧化性研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2017, 40(2): 72-75, 88.
- [9] 郑大贵, 叶青, 叶红德, 等. DPPH·法评价 V_c 、异 V_c 及其衍生物的抗氧化性能[J]. 食品工业科技, 2008(4): 113-116.
- [10] 刘超, 张曜武. 不同方法制备的党参复方多糖的抗氧化活性研究[J]. 天津化工, 2015, 29(5): 19-22.

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: 2166-613X, 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: hjfn@sanspub.org