

文章编号: 1674-2869(2013)06-0030-05

香菇多糖和金针菇多糖的提取及其抑菌活性

胡国元, 李超影, 陈 默, 张 芊, 张 哲

(武汉工程大学化工与制药学院, 绿色化工过程教育部重点实验室,
湖北省新型反应器与绿色化学工艺重点实验室, 湖北 武汉 430074)

摘 要:为了探索食用菌多糖在抗菌方面的开发和应用, 采用菌丝体发酵法, 制得金针菇和香菇胞外多糖, 采用热水浸提结合微波预处理法, 提取香菇菌柄多糖, 并采用正交试验方法对提取工艺进行优化, 然后采用滤纸片法测试金针菇胞外多糖、香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑制活性。结果表明: 香菇菌柄多糖提取的最佳工艺为微波预处理 3 min(处理过程中微波炉的功率为 480 W)、料液比为 1:30(g:mL)、浸提时间为 1.5 h 和浸提温度为 96 °C。在 8.5 mg/mL 的浓度下, 金针菇胞外多糖, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均无抑制作用; 在 4.8 mg/mL 的浓度下, 香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均有抑制活性。香菇胞外多糖, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的最小抑菌浓度分别为 0.15、4.8、4.8 mg/mL; 香菇菌柄多糖, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的最小抑菌浓度分别为 2.4、4.8、4.8 mg/mL。不同浓度的香菇多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白球念珠菌的抑制活性不同; 香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白球念珠菌的抑制活性存在差异。

关键词:香菇; 金针菇; 多糖; 发酵; 提取

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2013.06.006

0 引 言

近年来, 关于香菇多糖抑菌活性的报道较多, 香菇多糖对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌都有一定的抑制作用, 对鸡白痢沙门氏杆菌和禽多杀性巴氏杆菌也有抑制作用^[1-2]; 金针菇多糖具有提高免疫力、保肝和抗氧化等功能^[3], 但关于其抑菌活性的报道较少; 另外, 有关香菇菌柄多糖抑菌活性的报道较少。本实验测定了金针菇胞外多糖、香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑制作用, 同时对香菇菌柄多糖的提取工艺进行了优化, 为食用菌多糖作为杀菌剂的开发和应用提供了依据。

1 实验部分

1.1 材 料

1.1.1 菌株 金针菇(*Flammulina velutipes*) 12、香菇(*Lentinus edodes*) 39、大肠杆菌(*Escherichia coli*) 8099、金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538 和白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC10231, 均由本实验室保藏。

1.1.2 香菇菌柄 市售鲜香菇, 取菌柄置于 60 °C 烘箱内烘干, 粉碎过孔径为 0.15 mm 筛子, 密封, 置于干燥器中保藏, 备用。

1.1.3 仪器与试剂 主要仪器: 恒温培养箱(DNP-9162, 上海精宏实验设备有限公司)、恒温摇床(SKY-200B, 上海苏坤实业有限公司)、超净工作台(CJ-2D, 天津市泰斯特仪器有限公司)、游标卡尺(申工 0~150 mm, 上海申韩量具有限公司)、电子天平(BL-220L, 岛津国际贸易上海有限公司)、振荡器(VTX3500, LMS CO., LTD.)、离心机(TG16-WS, 长沙湘智离心机仪器有限公司)、电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9053A, 上海精宏实验设备有限公司)、旋转蒸发器(R-201, 郑州长城科工贸有限公司)、循环水式多用真空泵(SHB-III A, 郑州长城科工贸有限公司)、数显恒温水槽(DK-S24, 上海精宏实验设备有限公司)、高压灭菌锅(LDZM-60KCS, 上海申安医疗器械厂)、细

收稿日期: 2013-04-26

基金资助: 湖北省教育厅科学技术研究计划 2012 年重点项目(D20121509); 武汉工程大学第四届研究生教育创新基金项目(CX201208)

作者简介: 胡国元(1965-), 男, 湖北红安人, 教授, 博士, 硕士研究生导师。研究方向: 生物源杀菌剂。

菌过滤器(E-100,北京众益中和生物技术有限公司)和分光光度计(722E,天津市普斯特仪器有限公司)等。主要试剂:乙醇(分析纯)、浓硫酸(分析纯)、苯酚(分析纯)、葡萄糖(化学纯)、磷酸二氢钾(化学纯)、磷酸氢二钾(化学纯)和硫酸镁(化学纯)等,均为市售。

1.1.4 培养基 完全培养基(Complete Yeast Extract Medium)^[4-5],牛肉膏蛋白胨培养基(Beef extract Prptone Medium)^[2],马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar Medium,PDA);马铃薯 20 g,葡萄糖 2 g,琼脂 18 g,加入蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2~7.4。

1.2 方法

1.2.1 金针菇和香菇的液体培养 按文献[4-5]的方法进行金针菇和香菇的液体培养。

1.2.2 发酵液中胞外多糖的提取 金针菇和香菇终止发酵后,按文献[4-5]的方法进行发酵液中胞外多糖的提取,得多糖粗制品,60℃烘干,置于干燥器中保藏,备用。

1.2.3 香菇菌柄多糖的热水浸提 影响多糖提取得率的主要因素有浸提温度、浸提时间和料液比等^[6-7]。根据预实验结果,选择料液比、浸提温度、浸提时间3项为考察因素,各取3个水平,即料液比(g:mL):1:20,1:30,1:40,浸提时间:0.5,1.0,1.5 h,浸提温度:96,98,100℃,进行 $L_9(3^3)$ 正交试验设计(见表1)。取27个250 mL三角瓶,分为9组,编号1~9组,每组重复3次,在每个三角瓶中加入1.0 g香菇菌柄粉末,按料液比加入蒸馏水,封口,恒温浸提一段时间,浸提两次,合并两次浸提液,多糖分离工艺同1.2.2。采用苯酚-硫酸法^[8]测定浸提液中多糖的含量,通过比较9个处理组浸提液中多糖的含量确定最优热水浸提方案。

表1 热水浸提法正交试验 $L_9(3^3)$ 因素及水平

Table 1 Factors and Levels of orthogonal tests of hot water extraction method

水平	因素		
	A 料液比/ (g:mL)	B 浸提 时间/h	C 浸提 温度/℃
1	1:20	0.5	96
2	1:30	1.0	98
3	1:40	1.5	100

1.2.4 微波法与热水浸提法复合提取香菇柄多糖 采用1.2.3的最优热水浸提料液比,选定微波炉的功率为480 W,微波处理时间设计4个水平,即为1、2、3、4 min,微波处理后按1.2.3的最优热水浸提方案进行,通过比较4个处理组浸提液中多糖的含量确定最优微波处理时间。

1.2.5 多糖母液的配制 将发酵法制备的金针菇、香菇胞外多糖和采用优化的微波法与热水浸提法复合提取香菇菌柄多糖粗制品溶于蒸馏水中,配制成 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的粗多糖溶液。采用苯酚-硫酸法^[8]测定粗多糖溶液中多糖的含量,经孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,得到无菌滤液,置于冰箱(4℃)中保藏,备用。

1.2.6 供试菌悬液的制备 将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌分别接种到牛肉膏蛋白胨培养基、牛肉膏蛋白胨培养基和PDA培养基制成的斜面上,分别置于恒温培养箱中37、37、28℃培养24 h,进行菌株活化,活化好后,分别挑取一环各菌菌苔,用无菌生理盐水进行稀释,制成含菌量为 $10^6 \sim 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[2,9],置于冰箱(4℃)中保藏,备用。

1.2.7 滤纸片的制备 用打孔器将定性滤纸加工成直径为6.0 mm的圆形滤纸片,灭菌备用。

1.2.8 抑菌实验及抑菌圈直径测定 在固体培养基平板上加入200 μL 菌悬浮液并涂布均匀,做成含菌平板,将已灭菌的滤纸片放入一定浓度的多糖无菌溶液中浸泡30 min,对照同步处理;用灭菌镊子夹出各滤纸片贴于各菌营养平板上,并加对照处理,重复三次,置于恒温培养箱中倒置培养24 h,取出,用十字交叉法,测量抑菌圈直径大小,取平均值^[2]。

1.2.9 最小抑菌浓度(MIC)的测定 将待测多糖水溶液用2倍稀释法^[10]稀释成一系列溶液,每个浓度多糖溶液的抑菌实验方法同1.2.9,以有抑菌圈的最低浓度为最小抑制浓度。

1.2.10 数据分析方法 采用Microsoft Excel 2003软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 香菇菌柄多糖热水浸提法的正交试验

香菇菌柄多糖热水浸提法的正交试验结果与分析见表2。

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal design tests

试验编号	因素			多糖含量/%
	A	B	C	
1	1	1	1	4.40
2	1	2	2	3.83
3	1	3	3	3.75
4	2	1	2	4.56
5	2	2	3	4.60
6	2	3	1	5.19
7	3	1	3	3.77
8	3	2	1	4.16
9	3	3	2	4.95
K_1	3.99	4.25	4.59	
K_2	4.78	4.20	4.45	
K_3	4.29	4.63	4.04	
R	0.79	0.38	0.55	

注:表中数据均为 3 次重复试验的平均值,以下同。

由表 2 可知,根据统计学原理,极差 R 的值越大,说明此因素对实验的影响越大。由于 $R_A > R_C > R_B$,所以,3 个影响因素中 A(料液比)对香菇菌柄多糖的提取效率影响最大,其次为 C(浸提温度),影响程度最小的是 B(浸提时间),影响多糖浸提效率的主次顺序是 $A > C > B$ 。从表 2 还可知,A 因素中 K_2 值最大,B 因素中 K_3 值最大,C 因素中 K_1 值最大,即 $A_2B_3C_1$ 为香菇菌柄多糖的提取的最佳处理组,提取香菇菌柄多糖的最佳条件为:料液比为 1:30(g:mL),浸提时间为 1.5 h,浸提温度为 96 °C,浸提 2 次,香菇菌柄浸提液中多糖的含量达 5.19%。

2.2 微波处理对香菇菌柄多糖热水浸提法影响的单因素试验

由表 3 可知,在最优热水浸提条件下,最佳的

微波处理时间为 3 min,经微波预处理后,热水浸提法提取多糖的含量为 5.68%,比最优热水浸提法提取多糖的含量高出 0.48%。

表 3 微波处理时间对多糖提取的影响

Table 3 Effects of microwave time on extracting of polysaccharide

时间/min	1	2	3	4
多糖含量/%	4.60	4.91	5.68	4.48

注:微波炉的功率为 480 W。

2.3 各多糖母液中多糖的含量测定

50 mg · mL⁻¹金针菇胞外粗多糖溶液中胞外多糖的含量为 8.5 mg · mL⁻¹,50 mg · mL⁻¹香菇胞外粗多糖溶液中胞外多糖的含量为 4.8 mg · mL⁻¹,50 mg · mL⁻¹香菇菌柄多糖溶液中多糖的含量为 9.3 mg · mL⁻¹;抑菌实验时,将香菇菌柄多糖母液中多糖的质量浓度稀释为 4.8 mg · mL⁻¹(与香菇胞外多糖母液的多糖含量一致,便于评价同一浓度下两种香菇多糖的抑菌活性的差异)。

2.4 金针菇胞外多糖、香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖的抑菌活性

由表 4 可知,金针菇胞外多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌均无抑制作用;香菇胞外多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌均有抑制作用,其中对大肠杆菌的抑制作用效果最好,结果与张嫚^[2]等的研究结论相似,香菇多糖对革兰氏阴性菌的抑制作用强于革兰氏阳性菌;香菇菌柄水溶性多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌亦均有抑制作用,但抑菌效果均较差;香菇胞外多糖与香菇菌柄水溶性多糖之间的抑菌活性存在差异,可能与它们的多糖结构不同有关,金针菇胞外多糖对供试 3 株菌株无抑制作用,有待进一步探讨。

表 4 金针菇胞外多糖、香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖的抑菌活性

Table 4 Antimicrobial activities of *F. velutipes* polysaccharide and *L. edodes* polysaccharide

实验组别	抑菌圈直径/mm		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念球菌
对照	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
金针菇胞外多糖	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
香菇胞外多糖	10.76±0.28	7.85±0.12	8.37±0.11
香菇菌柄多糖	6.98±0.03	6.36±0.33	6.75±0.25

注:滤纸片直径 6.00 mm,实验组金针菇胞外多糖的质量浓度为 8.5 mg · mL⁻¹,香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖的质量浓度均为 4.8 mg · mL⁻¹。

2.5 香菇多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌的最小抑菌浓度(MIC)

由表 5 可知,香菇胞外多糖的抑菌效果随浓度呈上升趋势,结果与张嫚^[2]等的研究结论相似;香菇胞外多糖对大肠杆菌的最小抑菌质量浓度为 0.15 mg · mL⁻¹,对金黄色葡萄球菌、白色念球菌的最小抑菌质量浓度均为 4.8 mg · mL⁻¹;由表 6 可知,香菇菌柄多糖对大肠杆菌的最小抑菌质量浓度为 2.4 mg · mL⁻¹,对金黄色葡萄球菌和白色念球菌的最小抑菌质量浓度亦均为 4.8 mg · mL⁻¹;香菇胞外多糖对大肠杆菌的最小抑菌质量浓度明显低于香菇菌柄多糖对大肠杆菌的最小抑菌质量浓度。

表 5 香菇胞外多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌的最小抑菌浓度

Table 5 The MIC of *L. edodes* exopolysaccharide against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*

香菇胞外多糖的质量浓度/(mg · mL ⁻¹)	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念球菌
4.8	+++	+	++
2.4	++	-	-
1.2	++	-	-
0.6	+	-	-
0.3	+	-	-
0.15	+	-	-
0.075	-	-	-

注:“-”表示无抑菌圈;“+”表示抑菌圈在 6~8 mm;“++”表示抑菌圈在 8~10 mm;“+++”表示抑菌圈在 10 mm 以上。

表 6 香菇菌柄多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念球菌的最小抑菌浓度

Table 5 The MIC of *L. edodes* polysaccharide against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*

香菇菌柄多糖的质量浓度/(mg · mL ⁻¹)	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念球菌
4.8	+	+	+
2.4	+	-	-
1.2	+	-	-

注:“-”表示无抑菌圈;“+”表示抑菌圈在 6~8 mm;“++”表示抑菌圈在 8~10 mm;“+++”表示抑菌圈在 10 mm 以上。

3 结 语

在最佳工艺条件下,香菇菌柄浸提液中多糖的含量为 5.68%。金针菇胞外多糖、香菇胞外多糖

和香菇菌柄多糖的抑菌活性测定结果:金针菇胞外多糖对 3 种供试菌株均无抑制活性,香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖对 3 种供试菌株均有不同程度抑制活性。具体小结如下:

a. 香菇菌柄多糖提取的最佳工艺为:料液比为 1 : 30(g : mL),微波处理 3 min(微波炉的功率为 480 W),然后采用 96 ℃热水浸提 1.5 h,热水浸提 2 次。

b. 香菇胞外多糖对 3 种供试菌株的抑制作用由强到弱依次为大肠杆菌、白色念球菌和金黄色葡萄球菌。香菇胞外多糖对大肠杆菌具有较好的抑制作用。

c. 香菇菌柄多糖对 3 种供试菌株的抑制作用由强到弱依次为白色念球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。香菇菌柄多糖对 3 种供试菌株的抑制作用相近。

d. 不同浓度的香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖对 3 种供试菌株的抑制作用不同,随着浓度的增加而增加。

e. 香菇胞外多糖和香菇菌柄多糖对 3 种供试菌株的抑制活性存在差异,香菇胞外多糖的抑菌效果更好些。

致谢

感谢湖北省教育厅、武汉工程大学研究生处的资助。

参考文献:

[1] 孟俊龙,冯翠萍,常明昌,等. 香菇多糖抑菌作用的研究[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2012,32(3): 261-264.
MENG Jun-long, FENG Cui-ping, CHANG Ming-chang, et al. Antimicrobial Characteristics of Polysaccharide from *Ganoderma Lentinan* [J]. J SHANXI AGRIC UNIV: Natural Science Edition, 2012,32(3): 261-264. (in chinese)

[2] 张嫚,胡大坤. 香菇多糖对鸡常见病原菌的体外抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2009(5): 219-220.
ZHANG Man, HU Da-kun. Antimicrobial Activity of Polysaccharide from *Ganoderma Lentinan* against Chicken common pathogens[J]. JIANGSHU AGRIC SCI, 2009(5): 219-220. (in chinese)

[3] 刘孝元,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 Xiao-yong, CHEN Lei-lei, QIU Ji-ying, et al. Research Advance of Polysaccharides from *Flammulina velutipes* [J]. Food and Nutrition in China, 2012,18(5): 63-67. (in chinese)

- [4] 李伟伟,胡国元,秦恩华. 富硒金针菇发酵液中胞外多糖的分离和分析[J]. 湖北民族学院学报:自然科学版,1998,16(6): 40-41.
LI Wei-wei, HU Guo-yuan, QIN En-hua. On Isolation and Analysis of Exocellular Polysaccharide from The Fermented Liquid of *Sc-Accumulation Flammulina velutipes*[J]. Journal of Hubei Institute for Nationalities, 1998,16(6): 40-41. (in chinese)
- [5] 胡国元,李伟伟,吴元欣,等. 金针菇液体培养生产多糖的研究[J]. 华中农业大学学报,2004,23(1): 26-29.
HU Guo-yuan, LI Wei-wei, WU Yuan-xin, et al. The Polysaccharide Produced from Liquid Culture of *Flammulina velutipes* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2004, 23(1): 26-29. (in chinese)
- [6] 何兵存,王义娜. 微波辅助提取香菇多糖的工艺研究[J]. 中国农学通报,2007,23(11): 162-165.
HE Bing-cun, WANG Yi-na. Study on the Extraction of Lentinan Polysaccharide by Microwave Treatment [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007,23(11): 162-165. (in chinese)
- [7] 张凯,李茂凡,胡国元,等. 茯苓菌核多糖分离技术研究[J]. 武汉工程大学学报,2011,33(1): 25-27,31.
ZHANG Kai, LI Mao-fan, HU Guo-yuan, et al. Study on Isolation Technology of Polysaccharide of *Poria cocos Sclerotium* [J]. J Wuhan Inst Tech, 2011,33(1): 25-27,31. (in chinese)
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州:浙江大学出版社,1999:11-12.
ZHANG Wei-jie. Biochemical Research Technology of Complex Carbohydrate[M]. 2nd ed. Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1999:11-12. (in chinese)
- [9] 肖创清,胡捷,陈敏. 一种中药复方洗液抑菌效果及毒性试验观察[J]. 中国消毒学杂志,2005,22(3): 303-305.
XIAO Chuang-qing, HU Jie, CHEN Min. Experimental Observation on Bacteriostatic Efficacy and Toxicity of Compound Lotion of Chinese Drugs [J]. Chinese Journal of Disinfection, 2005,22(3): 303-305. (in chinese)
- [10] 纪莉莲,范怡梅. 土茯苓体外抗菌活性实验[J]. 中国生化药物杂志,2002,23(5): 239-240.
JI Li-lian, FAN Yi-mei. Antibacterial activity of *Smilax glabra* decoction [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2002,23(5): 239-240. (in chinese)

Extraction and antimicrobial activities of polysaccharide from *Lentinus edodes* and *Flammulina velutipes*

HU Guo-yuan, LI Chao-ying, CHEN Mo, ZHANG Qian, ZHANG Zhe

(Hubei Key Lab of Novel Reactor & Green Chemical Technology, Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: To develop and apply the polysaccharide of anti-bacterial and anti-fungi from edible fungi, *Flammulina velutipes* exopolysaccharide and *Lentinus edodes* exopolysaccharide were extracted from the fermentation broth of *F. velutipes* and *L. edodes* by mycelia liquid fermentation. *L. edodes* polysaccharide was extracted by hot water extraction with microwave, and the optimum extraction factors were determined by orthogonal experiment. Agar diffusion method was used to measure the activities of exopolysaccharide and polysaccharide against *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Candida albicans* (*C. albicans*). The optimal conditions of hot water extraction method is that the microwave time is 3 minutes at 480 W, the ratio of material to water is 1 : 30 (g/mL), the extraction time is 1.5 h, and the extraction temperature is 96 °C. Under the dosage of 8.5 mg/mL, *F. velutipes* exopolysaccharide have no inhibition activities against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*. Under the dosage of 4.8 mg/mL, *L. edodes* exopolysaccharide and *L. edodes* polysaccharide all have inhibition activities against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of *L. edodes* exopolysaccharide is 0.15 mg/mL, 4.8 mg/mL and 4.8 mg/mL, and the MIC of *L. edodes* polysaccharide is 2.4 mg/mL, 4.8 mg/mL and 4.8 mg/mL against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*, respectively. The *L. edodes* polysaccharide of different concentrations have different inhibition activities against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*. *L. edodes* exopolysaccharide and *L. edodes* polysaccharide have different inhibition activities against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*, and the inhibition activities of *L. edodes* exopolysaccharide is better than that of *L. edodes* polysaccharide.

Key words: *Lentinus edodes*; *Flammulina velutipes*; polysaccharide; fermentation; extraction

本文编辑:张 瑞