

文章编号:1001-6880(2016)5-0761-06

# 裂蹄木层孔菌多糖的提取工艺及抗氧化活性研究

朱欣婷<sup>1,2</sup>,侯玉群<sup>1,3</sup>,念秘密<sup>4</sup>,杨文峰<sup>4</sup>,刘云<sup>2,3\*</sup><sup>1</sup>遵义医学院基础医学院;<sup>2</sup>贵州省普通高等学校特色药物肿瘤防治特色重点实验室;<sup>3</sup>遵义医学院医学与生物学研究中心;<sup>4</sup>遵义医学院药学院,遵义 563003

**摘要:**以多糖提取率为检测指标,采用水提醇沉法提取裂蹄木层孔菌多糖。正交实验考察提取温度、提取时间和料液比对多糖提取率的影响。结果显示,提取温度和料液比对多糖提取率有显著性影响,提取时间对多糖提取率无显著性影响。最佳提取工艺为提取温度80℃、提取时间2 h、料液比1:40(g/mL)。在此条件下,多糖平均提取率为3.20%。选用终体积分数70%的乙醇沉淀多糖12 h时,多糖得率最高。体外抗氧化活性实验结果显示,裂蹄木层孔菌多糖的总抗氧化能力、清除羟自由基和超氧阴离子自由基的能力在实验范围内随着多糖质量浓度的增加而增强。裂蹄木层孔菌多糖是一种具有抗氧化功能的药用真菌多糖。

**关键词:**裂蹄木层孔菌;多糖;提取;抗氧化活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.022

## Extraction and Antioxidant Activities of Polysaccharides from *Phellinus linteus*

ZHU Xin-ting<sup>1,2</sup>, HOU Yu-qun<sup>1,3</sup>, NIAN Mi-mi<sup>4</sup>, YANG Wen-feng<sup>4</sup>, LIU Yun<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Zunyi Medical University; <sup>2</sup>Guizhou Provincial College-based Key Lab for Tumor Prevention and Treatment with Distinctive Medicines; <sup>3</sup>Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical University; <sup>4</sup>Pharmacy School of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563003, China

**Abstract:** Taking extraction yield of polysaccharides as evaluation indexes, water-extraction and alcohol- precipitation method was applied for the extraction of polysaccharides from *Phellinus linteus*. Orthogonal experiment was used to investigate the effect of extraction temperature, extraction time and solid to liquid ratio on the extraction yield of the polysaccharides. The results showed that extraction temperature and solid-liquid ratio had a significant impact on the extraction yield of polysaccharides, but extraction time was not significant. The optimal extraction conditions were extracting at 80℃ for 2 h with solid to liquid ratio of 1:40 g/mL. Under the above conditions, the average extraction yield of polysaccharides was 3.20%. The highest polysaccharides yields was achieved by precipitation with 70% ethanol for 12 h. The results of antioxidant activity experiments *in vitro* displayed that the total antioxidant capacity, the hydroxyl radical and superoxide anion free radical scavenging activity increased with the increasing of polysaccharides concentration within the experimental range.

**Key words:** *Phellinus linteus*; polysaccharides; extraction; antioxidant activity

裂蹄木层孔菌 [*Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng.] ,又名裂蹄针层孔菌,属担子菌亚门(Basidiomycotina)、层菌纲(Hymenomycetes)、多孔菌目(Polyporales)、锈革孔菌科(Hymenochaetaceae)、针层孔菌属(*Phellinus*)药用真菌<sup>[1]</sup>。1968年,日本学者初次报道了裂蹄木层孔菌野生子实体提取物对小白鼠移植性肿瘤S180的抑制率高达

96.7%<sup>[2]</sup>。此外,裂蹄木层孔菌的醇提物<sup>[3]</sup>、乙酸乙酯萃取物<sup>[4,5]</sup>等物质也具有较强的抗肿瘤活性。除脂溶性成分以外,多糖是裂蹄木层孔菌的一个重要活性成分。预防和抑制肿瘤的生长是裂蹄木层孔菌多糖重要的特性之一<sup>[6-8]</sup>。另有文献显示,裂蹄木层孔菌多糖还具有抗炎、增强免疫调节<sup>[9-11]</sup>、抗肝纤维化<sup>[12]</sup>、降血糖<sup>[13]</sup>的作用。要研究裂蹄木层孔菌多糖的活性,前提是能有效提取和分离多糖。因此,本课题拟建立裂蹄木层孔菌多糖的提取工艺,并对裂蹄木层孔菌多糖进行体外抗氧化活性实验。此工作能为裂蹄木层孔菌多糖的活性研究提供实验数

收稿日期:2015-07-03 接受日期:2015-10-21

基金项目:贵州省科技厅社会发展攻关项目(黔科合SY[2013]3008);贵州省教育厅特色重点实验室建设项目(黔教合KY字[2014]212)

\*通讯作者 Tel:86-852-085128609511;E-mail:liyunzy@126.com

据,为该药用真菌的进一步开发和利用提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

裂蹄木层孔菌子实体购自吉林敦化市,经遵义师范学院生物系何林副教授鉴定为锈革孔菌科裂蹄木层孔菌;无水乙醇、浓硫酸、蒽酮、葡萄糖等试剂均为国产分析纯;抗坏血酸(Vc)购自Sigma公司;总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒、羟自由基测定试剂盒、抗超氧阴离子自由基测试盒均购自南京建成生物工程研究所。旋转蒸发仪购自瑞士BUCHI;FD-1型冷冻干燥机购自北京博医康技术有限公司;高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司;UV-2650紫外可见分光光度计购自日本岛津苏州仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 葡萄糖标准曲线的制备

参考文献<sup>[14]</sup>(略作修改),精确称取葡萄糖(105℃干燥至恒重),加纯水溶解定容,配制质量浓度为0.2 mg/mL的葡萄糖标准液。精密量取0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL葡萄糖标准液置于10 mL试管并补足体积至1 mL,置冰水浴,再加入0.2%硫酸-蒽酮溶液4.0 mL于此系列试管中,摇匀,同时置沸水浴反应10 min,流水冷却至室温,625 nm测定吸光度,以葡萄糖质量浓度x为横坐标,吸光度y为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $y = 7.0537x + 0.0246$  ( $R^2 = 0.9979$ )。

#### 1.2.2 裂蹄木层孔菌多糖的测定

裂蹄木层孔菌子实体粉碎过筛,精确称取1 g,一定条件下恒温水浴提取,趁热抽滤得上清液,取1.0 mL上清液按“1.2.1”方法操作,测定吸光度值。根据葡萄糖标准曲线计算出粗多糖样品中多糖的质量浓度。

$$\text{多糖提取率} = \frac{\text{多糖质量浓度} \times \text{提取液体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{裂蹄木层孔菌质量}} \times 100\%$$

#### 1.2.3 提取工艺单因素试验

##### 1.2.3.1 提取温度

按照料液比1:30(g/mL,下同),分别在50、60、70、80、90℃水浴提取3 h考察提取温度对裂蹄木层孔菌多糖提取率的影响。三次重复试验,取平均值。

##### 1.2.3.2 提取时间

按照料液比为1:30 g/mL,在80℃水浴分别提取1、2、3、4、5 h,考察提取时间对裂蹄木层孔菌多糖提取率的影响。三次重复试验,取平均值。

##### 1.2.3.3 料液比

在水浴80℃,分别选取料液比1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL提取3 h,考察料液比对裂蹄木层孔菌多糖提取率的影响。三次重复试验,取平均值。

##### 1.2.4 提取工艺正交试验

在单因素实验的基础上,按L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)进行正交实验,确定裂蹄木层孔菌多糖的最佳提取工艺参数。采用正交设计助手II V3.1处理正交试验数据。

#### 1.2.5 裂蹄木层孔菌多糖醇沉工艺

##### 1.2.5.1 醇沉时间对裂蹄木层孔菌多糖提取率的影响

按最佳提取工艺条件提取裂蹄木层孔菌多糖溶液并浓缩至50 mL,均分5份,分别加入4℃预冷无水乙醇,醇沉4、6、12、16、24 h,离心得沉淀物,冻干并称重。三次重复试验取平均值,并计算多糖沉淀速度。

$$\text{多糖醇沉速度} (\text{mg}/\text{h}) = \frac{\text{醇沉多糖质量} (\text{mg})}{\text{醇沉时间} (\text{h})}$$

##### 1.2.5.2 裂蹄木层孔菌多糖分级沉淀

按最佳提取工艺条件提取裂蹄木层孔菌多糖溶液并浓缩至140 mL,均分7份,加入无水乙醇至乙醇终体积分数分别为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%,4℃醇沉12 h,离心得沉淀物,冻干并称重。三次重复试验取平均值。

##### 1.2.6 裂蹄木层孔菌多糖抗氧化活性的测定

总抗氧化能力(T-AOC)、羟自由基清除能力及超氧阴离子自由基清除能力的测定均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定。

$$\text{总抗氧化能力} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对 OD 值}}{0.01} \div 30 \times$$

$$\frac{\text{反应液总量}}{\text{取样量}} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

$$\text{抑制羟自由基能力} (\text{U}/\text{mL}) = \frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度}$$

$$(8.824 \text{ mmol/L}) \times \frac{1 \text{ mL}}{\text{取样量}} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

$$\text{抗超氧阴离子活力} (\text{U}/\text{L}) = \frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}}{\text{对照 OD 值} - \text{标准 OD 值}} \times \text{标准品浓度} \times$$

(0.15 mg/mL) × 1000 mL × 样品测试前稀释倍数

## 2 实验结果

### 2.1 单因素实验

单因素实验结果如图 1(A~C)所示。图 1(A)显示,裂蹄木层孔菌多糖提取率随提取温度的升高

而增加,提取温度高于80℃后,多糖提取率增加趋势平缓;图 1(B)所示,当提取时间为1~3 h时,裂蹄木层孔菌多糖提取率呈上升趋势,超过3 h后提取率降低;从图 1(C)结果可知,裂蹄木层孔菌多糖提取率随料液比的增加而增加,料液比超过1:40 g/mL以后,提取率增加较平缓。

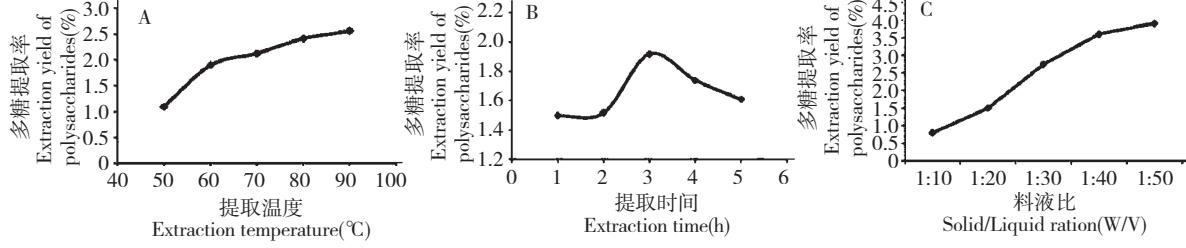


图 1 提取温度(A)、提取时间(B)及料液比(C)对多糖提取率的影响

Fig. 1 Effects of extraction temperature (A), extraction time (B), solid to liquid ratio (C) on the extraction yield of polysaccharides

### 2.2 正交实验

正交实验结果见表 1。由表中极差值大小可知,各因素对裂蹄木层孔菌多糖提取效果的影响程度依次为提取温度(A)>料液比(C)>提取时间(B)。由均值大小可得提取条件最佳组合为A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>。正交实验结果方差分析见表 2,提取温度和料液比对多糖提取率的影响显著,提取时间对多糖提取率无显著性影响。所以,确定裂蹄木层孔菌多糖提取条件最优组合为A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>,即提取温度80

℃、提取时间2 h、料液比1:40 g/mL。取3份裂蹄木层孔菌样品,以最佳条件组合进行验证实验,多糖提取率平均为3.20%。

### 2.3 裂蹄木层孔菌多糖醇沉工艺

#### 2.3.1 醇沉时间的选择

图 2 显示,醇沉时间在4~24 h时,沉淀多糖质量变化不大;当醇沉时间为12 h时,沉淀多糖质量达最大值1.712 mg。醇沉时间增加,多糖量有所减少。图 3 所示,醇沉初期醇沉速度急剧降低,随醇沉

表 1 裂蹄木层孔菌多糖提取正交实验

Table 1 Orthogonal experimental results of polysaccharides extraction from *P. linteus*

试验号 No.	A 提取温度 Extraction temperature ( °C )	B 提取时间 Extraction time ( h )	C 料液比 Solid to liquid ratio ( g/mL )	空列 Vacant column	多糖提取率 Extraction yield of polysaccharides ( % )
1	1(60)	1(2)	1(1:20)	1	0.93
2	1(60)	2(3)	2(1:30)	2	1.03
3	1(60)	3(4)	3(1:40)	3	1.48
4	2(70)	1(2)	2(1:30)	3	1.26
5	2(70)	2(3)	3(1:40)	1	2.13
6	2(70)	3(4)	1(1:20)	2	1.03
7	3(80)	1(2)	3(1:40)	2	3.34
8	3(80)	2(3)	1(1:20)	3	2.34
9	3(80)	3(4)	2(1:30)	1	2.45
K <sub>1</sub>	1.147	1.843	1.433	1.837	
K <sub>2</sub>	1.473	1.833	1.580	1.800	
K <sub>3</sub>	2.710	1.653	2.317	1.693	
R	1.563	0.190	0.884	0.144	

表 2 裂蹄木层孔菌多糖提取正交实验方差分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal experiment results of polysaccharides extraction from *P. linteus*

因素 Factors	偏差平方和 Sum of deviation square	自由度 Degree of Freedom	F 比 F-value	F 临界值 F critical-value	P 显著性 P significance
提取温度 Extraction temperature	4.862	2	147.333	19	*
提取时间 Extraction time	0.051	2	1.545	19	
料液比 Solid to liquid ratio	1.137	2	34.455	19	*
误差 Error	0.03	2			

<sup>\*</sup> P < 0.05

时间延长,即 12 h 以后,醇沉速度缓慢减小。综合以上两个指标确定醇沉时间为 12 h。

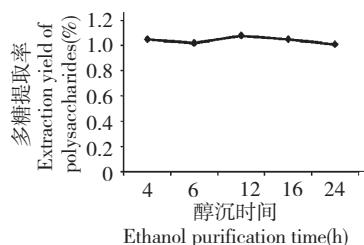


图 2 醇沉时间对多糖沉淀质量的影响

Fig. 2 Effect of ethanol precipitation time on precipitation amount of polysaccharides

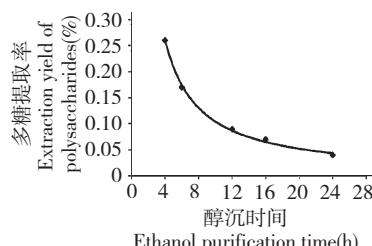


图 3 醇沉时间对多糖沉淀速度的影响

Fig. 3 Effect of ethanol precipitation time on precipitation rate of polysaccharides

### 2.3.2 分级沉淀试验结果

图 4 显示,随着乙醇体积分数的增加,沉淀的裂蹄木层孔菌多糖质量增加。当乙醇浓度为 70% ~

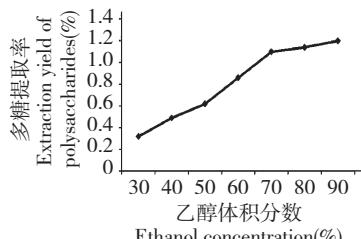


图 4 乙醇体积分数对多糖沉淀质量的影响

Fig. 4 Effect of ethanol concentration on precipitation amount of polysaccharides

90% 时,多糖质量增加趋势减缓。考虑乙醇用量成本,可选择乙醇终体积分数 70% 沉淀多糖。

### 2.4 裂蹄木层孔菌多糖抗氧化能力测定

#### 2.4.1 总抗氧化能力(T-AOC)的测定

从图 5 可以看出,裂蹄木层孔菌多糖的总抗氧化能力与多糖浓度有明显的量效关系。当裂蹄木层孔菌多糖质量浓度低于 1.0 mg/mL 时,总抗氧化活性略高于 Vc;而随着浓度增加,裂蹄木层孔菌多糖总抗氧化活性低于 Vc。

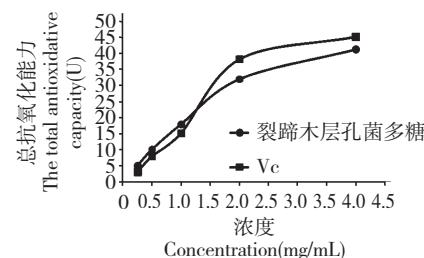


图 5 裂蹄木层孔菌多糖总抗氧化能力

Fig. 5 The total antioxidant capacity of polysaccharides from *P. linteus*

#### 2.4.2 羟自由基清除能力的测定

如图 6 所示,裂蹄木层孔菌多糖在 0 ~ 1 mg/mL 浓度范围内对羟自由基的抑制能力随浓度的增加而增强。当多糖浓度超过 0.5 mg/mL 时,抑制羟自由基的能力增加趋势趋于平缓,其抑制能力仍低于同

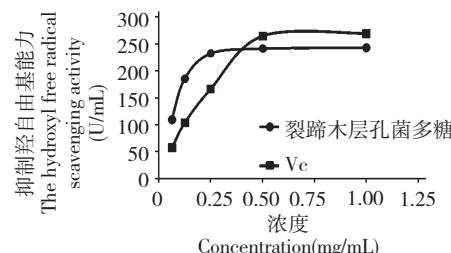


图 6 裂蹄木层孔菌多糖抑制羟自由基能力

Fig. 6 The hydroxyl free radical scavenging activity of polysaccharides from *P. linteus*

浓度的 Vc;但在低于 0.5 mg/mL 浓度时,裂蹄木层孔菌多糖抑制羟自由基的能力要高于 Vc。

#### 2.4.3 超氧阴离子自由基清除能力的测定

图 7 显示,裂蹄木层孔菌多糖抗超氧阴离子活力与浓度呈剂量依赖关系。当浓度低于 0.25 mg/mL 时,裂蹄木层孔菌多糖抗超氧阴离子活力小于同浓度的 Vc;但随着浓度的增加,裂蹄木层孔菌多糖抗超氧阴离子活力略高于 Vc。

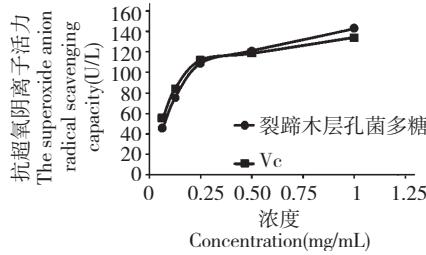


图 7 裂蹄木层孔菌多糖抗超氧阴离子活力

Fig. 7 The superoxide anion radical scavenging activity of polysaccharides from *P. linteus*

### 3 结论与讨论

本文采用水提纯沉法研究了裂蹄木层孔菌多糖的提取工艺,利用正交实验考察了提取温度、提取时间和料液比对多糖提取率的影响。实验结果显示,三个因素对裂蹄木层孔菌多糖提取率的影响程度依次为提取温度(A)>料液比(C)>提取时间(B)。正交实验结果方差分析显示,提取温度和料液比对多糖提取率的影响均显著。裂蹄木层孔菌多糖提取条件最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>,即提取温度 80 ℃、提取时间 2 h、料液比 1:40 g/mL。在此条件下,经三次验证实验可知多糖提取率平均为 3.20%。醇沉时间实验表明,当醇沉时间为 12 h 时,沉淀多糖质量达最大值,当醇沉时间超过 12 h 后,醇沉速度缓慢减小。分级醇沉实验结果提示,随着乙醇体积分数增加,沉淀的多糖质量增加。当乙醇浓度为 70%~90% 时,多糖质量增加趋势减缓。考虑乙醇用量和时间成本,可选择终体积分数 70% 的乙醇,醇沉 12 h 进行多糖沉淀。

本研究利用总抗氧化能力测定法、羟自由基清除法、超氧阴离子自由基清除法对提取的裂蹄木层孔菌多糖进行了体外抗氧化活性评价。结果显示,裂蹄木层孔菌多糖的总抗氧化能力、清除羟自由基和超氧阴离子自由基的能力随着多糖质量浓度的增加而增强。其中,裂蹄木层孔菌多糖对羟自由基的

清除能力最强,当多糖质量浓度在 0.5~1 mg/mL 范围内,清除羟自由基能力变化不大,其活性最大值为 242.66 U/mL。裂蹄木层孔菌多糖在低浓度(≤ 0.25 mg/mL)时,抗超氧阴离子活力小于同浓度的 Vc;但随着多糖质量浓度的增加,裂蹄木层孔菌多糖抗超氧阴离子活力略高于 Vc。

自由基是机体的正常代谢产物,在正常生理情况下体内自由基水平保持动态平衡。当某些因素导致平衡失调时,会造成肿瘤、高脂血症、心脑血管等疾病。为了防止或减轻自由基造成的危害,寻找合适的清除自由基的纯天然抗氧化剂成为科研工作者研究的热点。为了更好地挖掘裂蹄木层孔菌多糖的生物学活性,本课题通过测定总抗氧化能力、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力,以此检测裂蹄木层孔菌多糖的体外抗氧化活性。实验结果提示该真菌多糖具有一定的消除自由基、抗氧化作用,有可能成为潜在的抗氧化剂来源。体外抗氧化活性实验结果虽不能完全代表体内清除自由基的作用,但对抗氧化功效的初筛仍具重要参考价值。为了进一步明确裂蹄木层孔菌多糖的抗氧化性,本课题将在后续工作中进行体内抗氧化活性实验,为裂蹄木层孔菌多糖抗氧化性的研究提供更为全面的数据支持。

### 参考文献

- Zhang XQ (张小青), Dai YC (戴玉成). *Flora Fungorum Sinicorum* (中国真菌志). Beijing: Science Press, 2005, 29: 11.
- Ikeda T, Nakanishi M, Uehara N, et al. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Jpn J Cancer Res*, 1968, 59: 155-157.
- Lee WY, Hsu KF, Chiang TA, et al. *Phellinus linteus* extract induces autophagy and synergizes with 5-fluorouracil to inhibit breast cancer cell growth. *Nutr Cancer*, 2015, 67: 275-284.
- Liu Y (刘云), Hu SS (胡珊珊), Zhu XT (朱欣婷), et al. Preliminary study of ethyl acetate extract from *Phellinus rimosus* on anticancer. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2012, 23: 2234-2236.
- Liu Y (刘云), Hu SS (胡珊珊), Zhu XT (朱欣婷). Inhibition effect of ethyl acetate extract from *Phellinus rimosus* on human hepatoma cell lines SMMC-7721 proliferation *in vitro*. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2012, 21(9): 59-60.

(下转第 744 页)