

香菇、平菇酶解液成分及其免疫功能研究

艾有伟, 刘超群, 陈艳丽, 王宏勋*

(武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘要: 在食用菌饮品制备研究基础上, 研究香菇、平菇酶解液中成分组成及其免疫功能。结果表明: 原料中蛋白质、多糖、氨基酸在其酶解液中得率都在 74% 以上, 其中多糖含量最高。在吞噬指数 α 、胸腺指数、脾脏指数的免疫功能实验中, 酶解液与空白对照组相比均有显著增强或增大作用, 一定程度上反映出酶解液具有食用菌多糖的免疫功能, 初步说明以香菇、平菇酶解液为主要原料制备的食用菌饮品可部分替代香菇、平菇的摄入。

关键词: 香菇和平菇酶解液; 成分; 免疫功能; 碳廓清实验

Composition Analysis and Immunological Functions of Enzymatic Hydrolysates of *Lentinus edodes* and Oyster Mushroom Prepared with Papain

AI You-wei, LIU Chao-qun, CHEN Yan-li, WANG Hong-xun*

(College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: On the basis of our previous work concerning the preparation of edible fungi beverage, the composition and immunological functions of *Lentinus edodes* hydrolysate and oyster mushroom hydrolysate prepared by papain hydrolysis were investigated. The results showed that after the hydrolysis, the yields of proteins, polysaccharides and amino acids in hydrolysates from both mushroom species were all over 74%, especially polysaccharides with the highest yield. The immunological function experiments showed that both hydrolysates could notably increase phagocytic index, thymus index and spleen index when compared with the blank control group. This suggests that they have immunological functions due to the presence of polysaccharides. This study preliminarily indicates that edible fungi beverage can partially replace edible fungi intake.

Key words: enzymatic hydrolysates of *Lentinus edodes* and oyster mushroom; composition; immunological functions; carbon clearance

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)19-0258-04

国内众多研究表明, 食用菌含有丰富的多糖、蛋白质等营养成分^[1], 是营养丰富并兼有食疗价值的食品^[2-3], 其含有的微生物多糖功效成分具有明显的提高免疫力的功能^[4-5]。目前食用菌多糖免疫活性的研究是食用菌研究的热点。本实验酶解液中免疫活性物质为食用菌多糖, 在开展白灵菇菇脚、香菇、平菇等食用菌饮品研究基础上^[6-7], 本实验测定香菇、平菇酶解液中主要营养物质多糖、蛋白质成分及其氨基酸组成, 并对平菇、香菇的酶解液对小白鼠免疫器官脏器指数、巨噬细胞吞噬功能的影响进行研究, 以了解酶解液化过程对食用菌功效与营养成分保留情况及其对免疫功能的影响。为采用液化方式进行食用菌的加工提供实验数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

香菇、平菇酶解液由本实验室自制。

中华墨汁 北京一得阁墨汁有限责任公司; 木瓜蛋白酶 上海悠祥生化有限公司。

1.2 仪器与设备

Waters 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; Varin 210 泵、7725I 手动进样器、Varian335 PTA 检测器 美国 Varian 公司; Starter 2C pH 计 奥豪斯仪器(上海)有限公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 巩义予华仪器有限公司; XXJ- II 离心沉淀机 上海医用分析仪器公司; Fw80 型万能粉碎机 上海洪纪仪器设备有限公司。

收稿日期: 2011-06-26

作者简介: 艾有伟(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学、农产品加工与综合利用。E-mail: aywlingyun@126.com

* 通信作者: 王宏勋(1977—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为微生物食品开发、食品微生物预测。

E-mail: wanghongxunhust@163.com

1.3 动物

昆明种小鼠(雄性), 清洁级, 购自华中科技大学同济医学院, 许可证号: SCXK(鄂)2010-0007。

1.4 方法

1.4.1 香菇、平菇酶解液制备方法

制备过程: 干香菇清洗→烘干→粉碎→酶解→抽滤→滤液浓缩→香菇酶解液; 新鲜平菇清洗→烘干→粉碎→酶解→抽滤→滤液浓缩→平菇酶解液^[6-7]

香菇酶解液制备: 准确称取香菇干粉 5g 加入 100mL 蒸馏水, 加入木瓜蛋白酶 3%, 在 45℃ 条件下反应 4h, 酶解结束, 沸水浴灭酶 10min。待冷却至室温过滤, 酶解液定容至 100mL。

平菇酶解液制备: 准确称取香菇干粉 5g 加入 100mL 蒸馏水, 加入木瓜蛋白酶 2.5%, 在 55℃ 条件下反应 5h, 酶解结束, 沸水浴 10min 灭酶。待冷却至室温过滤, 酶解液定容至 100mL。

1.4.2 香菇、平菇酶解液基本成分含量测定

氨基酸种类及含量测定方法: 液相色谱柱后衍生法^[8-9]; 蛋白质含量测定方法: 凯氏定氮法^[10]; 游离氨基酸总量测定: 甲醛值法^[11]; 总糖含量测定方法: 苯酚-硫酸法^[12]; 多糖含量测定: 取香菇、平菇酶解液各 25mL, 分别加入 4 倍体积的无水乙醇醇沉 24h, 离心, 取沉淀用无水乙醇洗涤离心数次, 60℃ 烘干后加水溶解, 苯酚-硫酸法测定多糖含量^[13-14]。

1.4.3 动物分组

将实验动物适应性饲养 4d 后(小鼠体质量 18~22g)随机分为 7 组, 每组 10 只。即空白对照组, 香菇高、中、低剂量组, 平菇高、中、低剂量组。

1.4.4 剂量设计

以 70kg 体质量人每日服用 10g 干香菇、干平菇计算, 香菇多糖提取率为 8.6%, 平菇多糖提取率为 4.3%。参照“保健食品功能学评价程序和检验方法”, 剂量设计以人体每日食用量的 10、20、30 倍作为低、中、高 3 个剂量组^[15], 以此为依据将 5g 香菇、平菇干粉分别酶解抽滤后所得溶液 100mL 酶解液分别浓缩至 70、35、23mL, 另设蒸馏水做空白对照组。各组小鼠灌胃量为 0.2mL/10g, 每日一次。

各组多糖剂量为: 香菇低、中、高剂量组多糖质量浓度分别为 6.17、12.34、18.78mg/mL; 平菇低、中、高剂量组多糖质量浓度分别为 3.05、6.09、9.27mg/mL。

1.4.5 脏器指数测定^[16]

连续灌胃 28d, 各组小白鼠最后一次灌胃后 24h 颈椎脱臼处死, 取出胸腺、脾脏, 用滤纸吸干其表面血液, 称质量, 分别计算出胸腺指数、脾脏指数。

$$\text{脏器指数} / (\text{g}/10\text{g}) = \frac{\text{脏器质量}/\text{g}}{\text{体质量}/10\text{g}} \times 10 \quad (1)$$

式中: 脏器质量和体质量的单位均为 g; 脏器指数 g/10g。

1.4.6 单核-巨噬细胞吞噬功能测定(小白鼠碳廓清实验)^[17]

小白鼠连续灌胃 28d 后, 将稀释 5 倍的中华墨汁, 按小白鼠每 10g 体质量 0.1mL 计算, 经尾静脉注入体内。注入墨汁后于 2min 和 10min 分别从眼眶后静脉丛取血 20μL, 稀释于 2mL Na₂CO₃ 溶液(0.1%)中摇匀。用分光光度计于 600nm 波长处测光密度值(OD), 以 Na₂CO₃ 溶液为空白。然后将小鼠颈椎脱臼处死, 取肝脏、脾脏, 用滤纸吸干表面血液, 称质量。计算吞噬指数 α。

$$\alpha = \frac{m}{m_1 + m_2} \times \sqrt[3]{K} \quad (2)$$

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1} \quad (3)$$

式中: t_1 、 t_2 分别为两次取血时间/min; K 为未经校准的吞噬指数; OD_1 、 OD_2 分别为 t_1 、 t_2 时血标本的 OD 值; m 、 m_1 、 m_2 分别为小鼠体质量、肝脏质量、脾脏质量/g。

1.5 统计分析

差异统计分析采用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析, 比较空白对照组与各实验组之间的差异。

2 结果与分析

2.1 香菇、平菇酶解液多糖、蛋白质成分测定

表 1 香菇、平菇酶解液中基本成分含量

Table 1 Basic composition of *Lentinus edodes* hydrolysate and oyster mushroom hydrolysate

酶解液	蛋白质含量 / (g/100mL)	游离氨基酸 含量/(mg/100mL)	总糖含量 / (mg/100mL)	多糖含量 / (mg/100mL)
香菇	0.77	32.70	785.92	351.33
平菇	1.01	55.99	836.43	145.59

注: 以 5g 原料酶解后酶解液定容至 100mL 计算。

表 2 香菇、平菇原料中基本成分含量

Table 2 Basic composition of *Lentinus edodes* and oyster mushroom

原料	蛋白质 含量/(g/5g)	游离 氨基酸	总糖含量 / (mg/5g)	多糖含量 / (mg/5g)
干香菇	1.03	—	2746.28	430.05
干平菇	1.36	—	2355.65	156.64

注: 一, 因香菇和平菇均为干制品而无法测定游离态氨基酸。

表3 原料及酶解液中氨基酸含量
Table 3 Amino acid composition of *Lentinus edodes* and oyster mushroom as well as their hydrolysates

氨基酸种类	原料氨基酸含量/(mg/5g)		酶解液氨基酸含量/(mg/100mL)	
	干香菇	干平菇	香菇酶解液	平菇酶解液
Asp	84.83	101.93	61.83	77.57
Thr	65.45	46.67	31.49	38.03
Ser	37.88	51.37	29.84	41.81
Glu	206.55	236.92	141.88	202.46
Pro	28.13	34.91	23.71	26.99
Gly	40.46	44.61	32.04	41.62
Ala	53.76	53.59	36.83	51.62
Cys	3.94	1.07	0.27	3.58
Val	30.28	35.95	26.77	37.13
Met	7.87	8.24	5.26	5.93
Ile	24.59	26.42	21.36	28.65
Leu	56.24	56.68	37.85	40.64
Tyr	19.40	24.60	11.74	23.14
Phe	31.27	36.33	22.09	28.45
His	19.14	40.93	18.34	21.96
Lys	26.98	45.11	29.85	32.21
Arg	31.00	51.18	27.18	37.66
总量	767.77	896.52	607.71	805.95

表4 原料中蛋白质、氨基酸、多糖在其酶解液中的得率
Table 4 Ratios between contents of proteins, polysaccharides and amino acids in *Lentinus edodes* hydrolysate and oyster mushroom hydrolysate and those in *Lentinus edodes* and oyster mushroom

酶解液	蛋白质含量/%	氨基酸含量/%	多糖含量/%
香菇	74.75	79.14	81.69
平菇	74.26	89.89	92.95

由表1~4可知,香菇、平菇经酶解后所得酶解液中蛋白质、氨基酸、多糖含量与原料中含量相比均在74%以上,其中多糖含量的比值尤为突出。说明该两种食用菌经酶解液化后所得溶液在很大程度上保留了原料中的多糖、蛋白质和氨基酸。即很大程度上保留了原料所具备的营养与功能价值。由表3可知,香菇、平菇原料和酶解液中氨基酸不仅含量较高而且种类丰富,含有7种人体必需氨基酸。香菇原料、酶解液中必需氨基酸含量分别达到氨基酸总量的31.6%、28.5%,平菇原料、酶解液必需氨基酸占氨基酸总量的31.3%、28.5%。一般来说,若食物所含必需氨基酸种类齐全,含量高,则其蛋白质的营养价值也高^[18],一定程度上说明香菇、平菇酶解液和香菇、平菇一样具有丰富的营养价值。

2.2 香菇、平菇不同质量浓度酶解液对小鼠脏器指数的影响

由表5可知,各实验组与空白对照组相比胸腺指数均增大,其中香菇酶解液(中剂量、高剂量)、平菇酶

解液(中剂量、高剂量组)与空白对照组相比差异非常显著($P < 0.01$)。说明香菇与平菇的中、高剂量酶解液对增强小白鼠胸腺指数具有非常显著的增强作用。

表5 香菇、平菇酶解液对小白鼠胸腺指数的影响($n = 10$)
Table 5 Effects of *Lentinus edodes* hydrolysate and oyster mushroom hydrolysate on thymus index of mice ($n = 10$)

组别		胸腺指数/(g/10g)	显著性
空白对照组		$0.0201 \pm 16.9 \times 10^{-5}$	
香菇酶解液组	低剂量	$0.0254 \pm 2.93 \times 10^{-5}$	
	中剂量	$0.0262 \pm 9.07 \times 10^{-6}$	**
	高剂量	$0.0264 \pm 4.23 \times 10^{-6}$	**
平菇酶解液组	低剂量	$0.0239 \pm 4.08 \times 10^{-5}$	
	中剂量	$0.0291 \pm 3.55 \times 10^{-5}$	**
	高剂量	$0.0295 \pm 3.96 \times 10^{-5}$	**

注: **.与空白对照组比较,有极显著差异($P < 0.01$)。下同。

表6 酶解液对小白鼠脾脏指数的影响($n = 10$)
Table 6 Effects of *Lentinus edodes* hydrolysate and oyster mushroom hydrolysate on spleen index of mice ($n = 10$)

组别		脾脏指数/(g/10g)	显著性
空白对照组		$0.0254 \pm 4.92 \times 10^{-6}$	
香菇酶解液组	低剂量	$0.0317 \pm 4.39 \times 10^{-5}$	
	中剂量	$0.0323 \pm 5.96 \times 10^{-4}$	*
	高剂量	$0.0348 \pm 5.24 \times 10^{-5}$	*
平菇酶解液组	低剂量	$0.0253 \pm 1.30 \times 10^{-5}$	
	中剂量	$0.0258 \pm 1.63 \times 10^{-5}$	
	高剂量	$0.0263 \pm 1.68 \times 10^{-5}$	

注: *.与空白对照组比较,有极显著差异($P < 0.05$)。下同。

由表6可知,与空白对照组相比各组指数均增大,其中香菇酶解液中剂量组和高剂量组与空白对照组相比差异显著($P < 0.05$)。说明香菇中、高剂量对小鼠脾脏指数的增加具有显著作用。

表7 酶解液对小白鼠吞噬指数 α 的影响($n = 10$)
Table 7 Effects of *Lentinus edodes* hydrolysate and oyster mushroom hydrolysate on phagocytic index of mice ($n = 10$)

组别		吞噬指数 α	显著性
空白对照组		4.410 ± 0.093	
香菇酶解液组	低剂量	5.424 ± 0.399	**
	中剂量	5.538 ± 1.641	*
	高剂量	5.212 ± 0.149	**
平菇酶解液组	低剂量	4.625 ± 0.374	
	中剂量	4.892 ± 0.463	
	高剂量	5.399 ± 0.878	*

由表7可知,各实验组与空白对照组相比吞噬指数均增大,其中香菇酶解液中剂量组和平菇酶解液高剂

量组显著增大($P < 0.05$), 香菇酶解液低剂量和高剂量组吞噬指数增大非常显著($P < 0.01$)。说明香菇酶解液中剂量组和平菇酶解液高剂量组对提高小鼠的碳廓清速率, 提高机体巨噬细胞的吞噬功能具有显著作用, 香菇酶解液低剂量组和平菇酶解液高剂量组对提高碳廓清速率、提高机体巨噬细胞吞噬能力具有非常显著的作用。

3 讨 论

免疫是机体对感染有抵抗能力而不患疫病和传染病, 即人体对各种疾病的抵抗能力^[19]。很多研究表明食用菌多糖具有提高免疫功效的作用。日前食用菌多糖免疫力功效的研究多通过对免疫器官脏器指数、细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能、NK 细胞活性 4 个方面测定从而进行判定是否具有提高机体免疫功能的作用。本实验中通过小白鼠免疫器官脏器指数、小鼠碳廓清实验吞噬指数的测定进行酶解液对小鼠免疫功能影响的研究^[20]。其中小鼠碳廓清实验是测定单核-巨噬细胞功能中最为常用的一种方法。从实验结果可以看出, 各实验组与空白对照组相比胸腺指数、脾脏指数、吞噬指数均有所增加, 而且随着酶解液质量浓度的增大, 效果越明显。由此可以说明香菇、平菇酶解液可能与食用菌多糖同样具有增强机体免疫功能的作用。

食用菌中丰富的营养成分决定其具备很好的营养价值, 如提高机体免疫力、抗衰老、抗肿瘤^[21]等作用。食用菌酶解是将其蛋白质、氨基酸、多糖等成分由固态转化为液态的过程, 通过对香菇、平菇两种食用菌及其酶解液中蛋白质、氨基酸、多糖含量和氨基酸组成的测定可以得出两种酶解液在很大程度上保留了香菇、平菇中原有的营养成分, 即很大程度上保留了它的营养价值。初步表明以食用菌酶解液为主要成分制备的食用菌饮品可部分替代食用菌的食用, 提供食用菌的营养与功效物质。

参考文献:

- [1] CHU O K. Nutrition and dietary carcinogens[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 387-395.
- [2] 徐慧君, 边才苗, 王锦文. 三种食用菌营养成分的测定[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(14): 7544-7546.
- [3] 胡淑琴, 刘学铭. 我国主要和珍稀食用菌化学成分研究进展[J]. 食用菌, 2009(6): 1-5.
- [4] 张峰源, 张松. 食药真菌多糖及复合多糖生物活性研究[J]. 生命科学研究, 2006, 10(2): 85-90.
- [5] CHANG R. Functional properties of edible mushroom[J]. Nutr Rev, 1996, 54(11): 91-94.
- [6] 艾有伟, 王宏勋, 侯温甫. 白灵菇菌脚饮品的酶法制备工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 464-466.
- [7] 艾有伟, 王宏勋, 侯温甫. 食用菌液化工艺与质量标准研究[J]. 食品科技, 2010, 35(7): 33-37.
- [8] 朱曙东, 赵异皓. 氨基酸的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 1994, 12(1): 20-24.
- [9] RFEIFER R, KAROL R, BURGOYNE R, et al. Application of HPLC to amino acid analysis[J]. American Laboratory, 1983, 15(3): 77-78.
- [10] 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 67-73.
- [11] 轻工业部食品发酵工业科学研究所. GB 12143.2—89 果蔬汁饮料中氨基态氮的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1990.
- [12] 中国国家标准委员会. GB/T 15672—2009 食用菌总糖含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [13] 宁慧青. 不同食用菌多糖含量的比较研究[J]. 山西化工, 2007, 27(3): 44-46.
- [14] 丁钢强, 于村, 张双凤, 等. 食品多糖含量不同测定方法比较[J]. 实用预防医学, 2000, 7(5): 325-327.
- [15] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验和评价技术规范[S]. 2003.
- [16] 钟海雁, 敖常伟, 李忠海. 松乳菇多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中南林学院学报, 2006, 26(4): 52-55.
- [17] 林清华. 免疫学实验[M]. 3 版. 武汉: 武汉大学出版社, 2004: 61-63.
- [18] 陆宁, 檀华蓉, 杨勇胜. 香菇中蛋白氨基酸成分分析[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(6): 94-95.
- [19] 李立, 王宁, 张桂霞. 蛋白粉对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(3): 54-60.
- [20] 秦俊哲, 陈明, 陈合, 等. 食药真菌多糖的研究现状与展望[J]. 中国食用菌, 2004, 23(2): 6-7.
- [21] KIDD P M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment[J]. Altern Med Rev, 2005, 5(1): 4-27.