



研究报告

不同基质栽培的猴头菌子实体多糖理化性质和体外免疫活性

朱伶俐^{1,2} 李巧珍¹ 吴迪^{*1} 郝海波³ 张赫男¹ 许占武³ 李正鹏¹ 杨焱^{*1}

1 国家食用菌工程技术研究中心 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201403

2 上海海洋大学食品学院 上海 201306

3 江苏东越生物技术发展股份有限公司 江苏 大丰 224133

摘 要:【背景】猴头菌多糖是猴头菌(*Hericium erinaceus*)中主要的活性成分,具有提高免疫力、抗肿瘤、降血糖、抗突变、抗衰老等多种功效。目前对于猴头菌多糖的研究主要集中在结构分析上,有关不同基质栽培对于猴头菌子实体多糖理化性质的影响鲜见报道。【目的】研究不同基质栽培的猴头菌子实体多糖的理化性质和体外免疫活性,筛选出高产优质猴头菌的栽培配方。【方法】采用 7 种不同配方的基质经工厂化栽培获得不同的猴头菌子实体,对其子实体产量和粗多糖含量进行统计和分析测定,并对 7 种不同基质栽培获得的猴头菌子实体多糖的分子量分布及单糖组成等理化特征进行分析,比较其对刺激 RAW264.7 巨噬细胞株释放 NO 的差异。【结果】综合各项指标表明,配方 2 (木屑 30%,玉米芯 40%,棉籽壳 15%,玉米粉 2%,麸皮 6%,米糠 5%,石膏 1%,石灰 1%)和配方 7 (玉米芯 39%,棉籽壳 10%,麸皮 10%,米糠 30%,大豆皮 5%,甜菜渣 4%,碳酸钙 2%)栽培获得的猴头菌子实体具有较高的多糖含量和活性。【结论】所选配方适合作为栽培猴头菌深加工原料的培养基质。

关键词: 猴头菌, 基质配方, 多糖理化性质, 免疫活性

Foundation item: Shanghai Seed Industry Development Project (2016-1-12)

***Corresponding authors:** Tel: 86-21-62209765

E-mail: WU Di: wudi@saas.sh.cn; YANGYan: YangYan@saas.sh.cn

Received: 19-03-2018; **Accepted:** 23-05-2018; **Published online:** 12-06-2018

基金项目: 上海种业发展项目(沪农科种字 2016 第 1-12 号)

***通信作者:** Tel: 021-62209765

E-mail: 吴迪: wudi@saas.sh.cn; 杨焱: YangYan@saas.sh.cn

收稿日期: 2018-03-19; 接受日期: 2018-05-23; 网络首发日期: 2018-06-12

Physicochemical properties and *in vitro* immunological activities of polysaccharides from different matrix formula of *Hericium erinaceus* fruiting bodies

ZHU Ling-Li^{1,2} LI Qiao-Zhen¹ WU Di^{*1} HAO Hai-Bo³ ZHANG He-Nan¹
XU Zhan-Wu³ LI Zheng-Peng¹ YANG Yan^{*1}

1 National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

2 College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Jiangsu Dongyue Biotechnology Development Co. Ltd., Dafeng, Jiangsu 224133, China

Abstract: [Background] Polysaccharide is one of the main substances in *Hericium erinaceus* and is commonly used in the treatment of neurasthenia, tumors, and digestive diseases like gastritis and ulcers. At present, studies on polysaccharides from *H. erinaceus* mainly focus on the structural analysis, but few on the effects of different substrates on the physicochemical properties of polysaccharides from the fruit bodies. [Objective] The physicochemical properties and *in vitro* immune activity of polysaccharides from fruit bodies of *H. erinaceus* cultivated on different substrates were studied to select the better cultivation formula of *H. erinaceus* with high yield and good quality. [Methods] Different fruiting bodies of *H. erinaceus* were obtained by industrial cultivation with seven different formulations of substrates. The yield of fruit bodies and the content of crude polysaccharides were analyzed and determined. The physicochemical characteristics such as molecular weight distribution and monosaccharide composition of the polysaccharides of *H. erinaceus* fruiting bodies obtained from seven different substrate cultures were analyzed, and the differences in NO release from RAW264.7 macrophage cell strains were compared. [Results] All indicators showed that the formula 2 (sawdust 30%, corncob 40%, cottonseed shell 15%, corn flour 2%, wheat bran 6%, rice bran 5%, gypsum 1%, lime 1%) and formula 7 (corn cob 39%, cottonseed shells 10%, wheat bran 10%, rice bran 30%, soybean bran 5%, beet residue 4%, calcium carbonate 2%) can be considered as excellent, efficient and high quality cultivation compared with other formulations of culture substrates. [Conclusion] The selected culture formulas are suitable for the cultivation fruiting body of the deep processed raw materials for *H. erinaceus*.

Keywords: *Hericium erinaceus*, Matrix formula, Polysaccharides properties, Immunological activity

猴头菌(*Hericium erinaceus*)隶属齿菌科真菌,整个子实体形状像猴子的脑袋,因此取名“猴头”,又称为对脸蘑、山伏茸、刺猎菌等^[1]。猴头菌性平、味甘,能利五脏、助消化、滋补、抗癌、降血糖、增强免疫力,自古就有“山珍猴头,海味燕窝”之说^[2]。猴头菌多糖对多种肿瘤有明显抑制作用,同时还具有降血糖、降低胆固醇等作用^[3]。因此,猴头菌多糖的研究价值很高,在医药保健方面具有广阔前景。

我国野生猴头菌的数量较少,产量也较低,远远不能满足日益增长的市场需求。近年来,随着猴

头菌人工栽培技术的发展,栽培方法也由原来的椴木栽培改为袋料栽培^[4],并已实现工厂化。栽培子实体已成为目前猴头菌开发利用的主要原料来源,猴头菌的人工栽培原料以锯木屑或棉籽壳为主,生产中需大量木屑或棉籽壳^[5]。不同配方基质栽培获得的猴头菌子实体产量有较大的差异,如杨勇杰等^[6]研究了猴头菌用木屑代料栽培的最佳配比,结果表明代料木屑与麦麸比较适合的配比为木屑 77%–79%和麦麸 11%–23%。然而,不同栽培基质对猴头菌多糖的含量、理化性质和免疫活性影响的研究却鲜见报道。

本研究采用 7 种不同的栽培基质对猴头菌进行工厂化栽培,分析不同栽培基质对猴头菌子实体粗多糖含量、多糖分子量分布及单糖组成的影响,比较不同的栽培基质刺激巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的活性差异,分析其对多糖合成的影响,为猴头菌加工利用的高品质原料栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

猴头菌 0605 由上海市农业科学院食用菌研究所提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

单糖标准品(D-Gal、D-Glc、D-Ara、L-Fuc、L-Rha、D-Man、D-Xyl、D-Fru、D-GluA 和 D-GalA), Sigma-Aldrich 公司; DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胎牛血清, Gibco 公司; 青霉素、链霉素, Amersco 公司; RAW264.7 细胞株(小鼠巨噬细胞株), ATCC (American type culture collection); 其他试剂均为国产分析纯。

酶标仪, Bio-Tek 公司; 高效液相系统, Waters

公司; ICS2500 离子色谱仪, Dionex 公司; Flash smart 元素分析仪, ThermoFisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 供试配方

如表 1 所示, 试验共设 7 个配方, 选用目前江苏东越生物技术发展股份有限公司的栽培料配方为对照配方 5 (木屑 78%, 麸皮 20%, 石膏粉 1%, 过磷酸钙 1%); 选用目前栽培上常用的配方为基础配方 1; 调整主料配比及保持辅料配比不变(白糖 1%, 石膏 1%)来设计试验配方 3 (玉米芯 78%, 麸皮 20%, 白糖 1%, 石膏 1%)、配方 4 (棉籽壳 43%, 杂木屑 45%, 麸皮 10%, 白糖 1%, 石膏 1%)和配方 6 (棉籽壳 88%, 麸皮 10%, 白糖 1%, 石膏 1%); 以米糠、大豆皮、甜菜渣和碳酸钙部分替代配方 1, 根据不同的碳氮比设计试验配方 2 (木屑 30%, 玉米芯 40%, 棉籽壳 15%, 玉米粉 2%, 麸皮 6%, 米糠 5%, 石膏 1%, 石灰 1%)和配方 7 (玉米芯 39%, 棉籽壳 10%, 麸皮 10%, 米糠 30%, 大豆皮 5%, 甜菜渣 4%, 碳酸钙 2%)。适宜的碳氮比不仅会影响猴头菌菌丝生长速度及质量, 而且与子实体原基形成早晚、数量和子实体的品质有较大的关系。

表 1 猴头菌子实体栽培基质配方组成

Table 1 The substrate formula of *Hericium erinaceus* fruiting bodies

配方编号 Recipe No.	栽培基质配方组成 Substrate formula	碳氮比 C/N
1	木屑 9%, 玉米芯 34%, 棉籽壳 21%, 玉米粉 8%, 麸皮 26%, 白糖 1%, 石膏 1% Sawdust 9%, corncob 34%, cottonseed shell 21%, corn flour 8%, bran 26%, sugar 1%, gypsum 1%	19.24
2	木屑 30%, 玉米芯 40%, 棉籽壳 15%, 玉米粉 2%, 麸皮 6%, 米糠 5%, 石膏 1%, 石灰 1% Sawdust 30%, corncob 40%, cottonseed shell 15%, corn flour 2%, bran 6%, rice bran 5%, gypsum 1%	27.68
3	玉米芯 78%, 麸皮 20%, 白糖 1%, 石膏 1% Corncob 78%, bran 20%, sugar 1%, gypsum 1%	29.63
4	棉籽壳 43%, 杂木屑 45%, 麸皮 10%, 白糖 1%, 石膏 1% Cotton seed hulls 43%, miscellaneous sawdust 45%, bran 10%, sugar 1%, gypsum 1%	23.65
5	木屑 78%, 麸皮 20%, 石膏粉 1%, 过磷酸钙 1% Sawdust 78%, bran 20%, gypsum powder 1%, calcium superphosphate 1%	29.93
6	棉籽壳 88%, 麸皮 10%, 白糖 1%, 石膏 1% Cotton seed shell 88%, wheat bran 10%, sugar 1%, gypsum 1%	20.19
7	玉米芯 39%, 棉籽壳 10%, 麸皮 10%, 米糠 30%, 大豆皮 5%, 甜菜渣 4%, 碳酸钙 2% Corn cob 39%, cotton seed shell 10%, bran 10%, rice bran 30%, soybean husk 5%, sugar beet residue 4%, calcium carbonate 2%	19.77

1.2.2 栽培条件

栽培袋:聚乙烯塑料袋 15 cm×30 cm×0.045 cm; 盖子直径: 2.5 cm; 袋装含水量: 68% 左右; pH 6.1–7.2; 袋装湿重: 600 g; 原材料(产地): 杂木屑(盐城大丰), 玉米芯(山东枣庄), 棉籽壳(山东夏津), 米糠(上海市上海农场), 麸皮(江苏张家港), 玉米粉(江苏大丰), 大豆皮(山东临清)。

1.2.3 栽培方法

按照栽培配方中原材料的比例精准称取各种原料, 在搅拌锅中搅拌均匀, 控制含水量在 60%–66%。利用装机器装袋, 栽培料中间打孔至底部, 套上颈圈盖, 1×10^5 Pa 高压灭菌 2 h。冷却至 25 °C 左右后人工接种, 在完全黑暗的培养房中培养, 控制培养温度为 23–25 °C, 相对湿度为 70% 左右^[7]。待菌丝长满后取下栽培袋的颈圈盖, 移出菇房出菇。出菇温度为 16 °C 左右, 相对湿度在 90% 以上, CO₂ 浓度控制在 1 500 mg/L 以下, 待猴头菌子实体长至成熟期进行采收, 每个配方做 100 包重复。

1.3 多糖含量的测定

1.3.1 待测液的制备

多糖的提取参照农业行业标准 NY/T1676-2008 进行。将来自 7 个不同配方基质栽培的猴头菌子实体样品粉碎后过 20 mm 孔径筛, 分别称取 0.5 g 放入 50 mL 具塞离心管。用 5 mL 超纯水浸润样品, 缓慢加入 20 mL 无水乙醇。使用漩涡振荡器振荡使样品混合均匀, 置于 600 W 超声提取器中常温超声提取 30 min。提取结束之后, 于 13 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。不溶物用 10 mL 80% 乙醇溶液洗涤, 再以 13 000 r/min 离心 10 min 弃上清。用水将不溶物转入离心管, 加入 50 mL 超纯水, 利用恒温振荡仪进行加热提取, 100 °C 提取 2 h, 冷却至室温, 于 13 000 r/min 离心 10 min, 将上清液加水定容到 100 mL, 此溶液即为多糖测定液。

1.3.2 含量测定

利用 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液母液分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 6 个试管中, 加蒸馏水补充至 1 mL, 同时取 1 mL 测定液于试管中。上

述试管分别加入 0.5 mL 5% 苯酚溶液, 再加入 2.5 mL 98% 的浓硫酸, 使用漩涡振荡器充分混合, 将试管置于 100 °C 水浴 20 min, 冷却至室温后, 使用酶标仪在 490 nm 下测定吸光度。以葡萄糖质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。结合标准曲线计算多糖含量:

$$\omega = \frac{m_1 \times 100}{m_2 \times 0.2} \times 10^{-4}$$

式中, m_1 为从标准曲线上查得的样品测定液中含糖量, 单位为毫克(mg); m_2 为样品质量, 单位为克(g); ω 为多糖含量, 单位为克每百克(g/100 g)。

1.4 多糖的分子量分布测定

1.4.1 样品的制备和处理

取多糖测定液 2 mL, 于 12 000 r/min 离心 25 min 后取上清, 过 0.22 μ m 的水相微孔膜过滤后进行 HPSEC-MALLS-RI 分析。

1.4.2 流动相配制条件

流动相为含 0.05 mol/L 的 NaH₂PO₄ 和 0.15 mol/L 的 NaNO₃ 溶液(pH 7.0, 0.02% 叠氮钠)^[8]。

1.4.3 色谱分析条件

采用 Waters e2695 高效液相系统配以凝胶色谱柱 TSK PWXL6000 和 TSK PWXL4000 串联, 2414 示差折光检测器、DAWN8⁺激光检测器分析多糖的分子量分布, 并用 ASTRA 6.1 数据分析软件对光散射数据进行采集和分析, 计算其分子量。流速 0.5 mL/min, 色谱柱柱温恒定在 35 °C; 激光检测器光源波长选用 623.8 nm。多糖在溶液中的折光指数增量(dn/dc)按照 0.146 mL/g 计算, 普鲁兰 Shodex standard p-82 为标准品。

1.5 单糖组成分析

1.5.1 样品处理

将上述多糖测定液冷冻干燥后称取 2 mg 放入水解瓶中, 加入 2 mol/L 三氟乙酸(TFA) 3 mL, 在 110 °C 下水解 4 h。水解后用氮吹仪吹干, 再加入 3 mL 甲醇吹干, 反复 3–4 次, 直至完全除去三氟乙酸。用超纯水溶解定容至 100 mL 容量瓶, 用高效阴离子色谱(HPAEC)测定水解产物中的单糖组成。

1.5.2 色谱条件

CarboPacTMPA20 阴离子交换柱(3 mm×150 mm), 柱温 30 °C, 进样量 25 μL, 流动相为超纯水、0.25 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的 NaAc^[9]。

1.6 体外刺激巨噬细胞的活性试验

将上述多糖测定液流水透析(分子量 3.0 kD) 48 h 后, 冷冻干燥得到的样品用 PBS 溶液配制成 5 g/L 的母液, 12 000×g 离心 30 min, 将上清依次稀释成 0.5、2.0、5.0 g/L 待用(作用终浓度为 50、200 和 500 mg/L)。参照文献[10]方法测定巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 产量。

1.7 统计学分析

采用 Origin 2017 整理及绘图, 用 SPSS 22.0 软件多重比较 Bonferroni 法进行统计学分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同基质配方生长情况比较分析

不同配方基质栽培出的子实体菇体形状无较大差异, 菇型圆整且紧实(图 1, 表 2)。不同配方栽培的猴头菇生物学效率结果见表 2, 生物学效率也称转化率, 以百分数表示单位质量培养料的风干物质所产出的子实体鲜重。生物学效率的高低往往成为决定栽培配方、菌种优选的依据, 因此生产上在描述栽培配方和品种产菇能力时, 常用其作为产量

指标。SPSS 单因素方差分析结果表明, 组间平方和的 F 值为 16.927, 相应的概率值是 0.00, 小于显著水平 0.05, 因此不同配方对于出菇产量有显著的影响。配方 2 栽培子实体菌刺适中, 子实体产量最高, 达到 140 g, 生物学效率为 56%。配方 3 次之, 出菇产量为 118 g, 生物学效率为 47.2%; 配方 1 子实体产量为 113 g, 生物学效率达 47.2%, 这两个配方产量和生物学效率差异并不显著($P>0.05$)。配方 4 菌刺较短, 肉质较为紧实, 出菇产量为 108 g, 生物学效率达 43.2%; 配方 6 和配方 7 菌刺较长且较为紧实, 出菇产量分别为 96 g 和 98 g, 生物学效率分别为 38.4% 和 39.2%。配方 5 菌刺较短, 子实体产量最低, 为 89 g, 生物学效率较低, 为 35.6%, 与配方 2 差异极显著($P<0.01$)。

2.2 粗多糖含量

试验参照农业行业标准 NY/T1676-2008 对不同配方中的猴头菌子实体多糖含量进行了测定。从图 2 可以看出, 配方 2 和配方 7 的多糖含量较高, 分别达到 7.06% 和 7.78%, 而配方 3 的多糖含量最低, 仅 3.07%。SPSS 单因素方差分析结果表明, 组间平方和的 F 值为 653.142, 小于显著水平 0.05, 因此不同配方对于子实体粗多糖含量有显著的影响; 配方 2 和配方 7 与其他配方对比有显著差异($P<0.05$)。

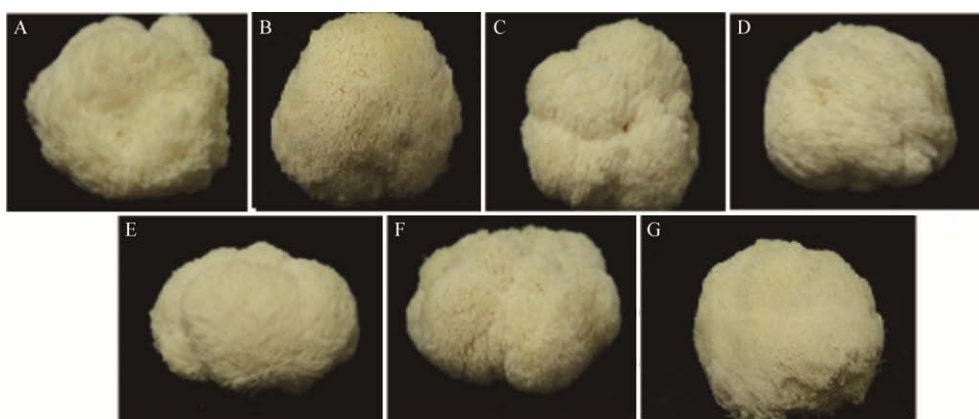


图 1 不同配方猴头菌子实体形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of *Hericium erinaceus* fruiting bodies at different substrate formula

注: A: 配方 1; B: 配方 2; C: 配方 3; D: 配方 4; E: 配方 5; F: 配方 6; G: 配方 7.

Note: A: Formula 1; B: Formula 2; C: Formula 3; D: Formula 4; E: Formula 5; F: Formula 6; G: Formula 7.

表 2 主要农艺生长性状
Table 2 Important horticultural traits

配方编号 Recipe No.	子实体形状 Shape	菌刺分化 Bacterial spiny differentiation	肉质松紧度 Meat quality	出菇产量 Yield (g)	生物学效率 Biological efficiency (%)
1	菇体大圆整 Large and round	菌刺适中 Moderate spines	紧实 Tight	113±11.16a	45.2
2	菇体大圆整 Large and round	菌刺适中 Moderate spines	紧实 Tight	140±9.31b	56.0
3	菇体大圆整 Large and round	菌刺适中 Moderate spines	紧实 Tight	96±10.59c	38.4
4	菇体大圆整 Large and round	菌刺短 Short bacterial	紧实 Tight	98±13.78d	39.2
5	菇体圆整 Round	菌刺短 Short bacteria	较紧实 Tight relatively	89±11.12e	35.6
6	菇体圆整 Round	菌刺长 Long bacteria	较紧实 Tight relatively	118±12.82f	47.2
7	菇体圆整 Round	菌刺长 Long bacteria	较紧实 Tight relatively	108±9.01g	43.2

注:数据以 30 个样本平均值±SD 表示;a 与 b 相比没有显著性差异($P>0.05$),b 与 c、d、e、f 和 g 之外的数据组均有显著性差异($P<0.05$).
Note: Values shown the samples (n=30); a had no significantly different compared with b ($P>0.05$), b had significantly different compared with c, d, e, f and g ($P<0.05$).

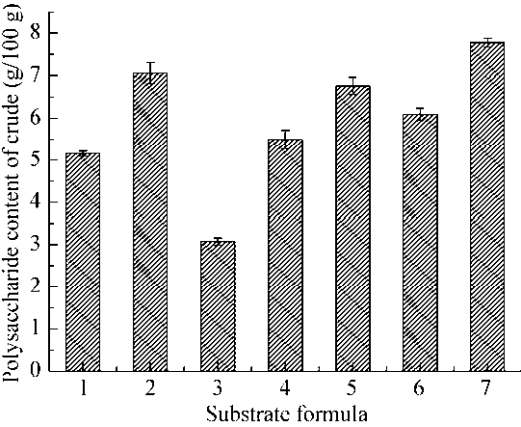


图 2 猴头菌子实体的粗多糖含量
Figure 2 Polysaccharide content of crude extract from *Hericium erinaceus* fruit bodies

2.3 多糖的分子量分布

使用 HPSEC-MALLS-RI 联用分析 7 种不同配方猴头菌子实体多糖组分的分子量,并利用 Astra 数据分析软件进行计算(表 3)。7 种不同配方基质栽培的猴头菌子实体多糖的分子量及其分布趋势相近,但各组分所占比例差异明显。7 种不同

配方猴头菌子实体多糖的 HPSEC 图谱均有 3 个峰(图 3),峰 1 的重均分子量在 $1.0\times10^6\text{--}9.0\times10^6$ 之间,峰 2 的重均分子量在 $1.0\times10^5\text{--}7.0\times10^5$ 之间,峰 3 的重均分子量在 $1.0\times10^4\text{--}9.0\times10^4$ 之间,表明猴头菌子实体粗多糖在万级、十万级和百万级均有分布。由表 3 可知,配方 3 猴头菌子实体多糖在 Peak 1 中重均分子量最大,为 8.779×10^6 ,所占比例最高,达到 23.7%;而配方 2 猴头菌子实体多糖在 Peak 2 中所占比例最高达 69.9%,重均分子量为 2.877×10^5 ;配方 7 在 Peak 3 小分子多糖中所占比例最高达 50.4%,重均分子量为 8.949×10^4 。该结果表明,猴头菌子实体多糖分子量的分布因栽培基质的不同而有较大差异,基质中玉米芯占比较大时,栽培获得的百万级以上的猴头菌大分子多糖较多;木屑与玉米芯所占比例接近时,栽培子实体多糖中分子量十万级的组分较多;添加米糠且占比较多的基质,栽培子实体多糖以万级左右的组分为主。结果表明基质组成对多糖的合成代谢产生了一定的影响。

表 3 不同配方基质猴头菌子实体多糖的分子量分布范围

Table 3 Molecular weight distribution of different substrate formula polysaccharides from *Hericium erinaceus* fruit bodies

Recipe No.	Peak1				Peak2				Peak3			
	M_w (Da, $\times 10^6$)	M_n (Da, $\times 10^6$)	M_w/M_n	Ratio (%)	M_w (Da, $\times 10^5$)	M_n (Da, $\times 10^5$)	M_w/M_n	Ratio (%)	M_w (Da, $\times 10^4$)	M_n (Da, $\times 10^4$)	M_w/M_n	Ratio (%)
1	1.55	1.35	1.14	9.30	1.26	0.77	1.64	51.90	3.62	3.18	1.14	39.30
2	5.50	5.01	1.10	11.90	2.88	1.65	1.75	69.90	1.63	1.50	1.08	18.20
3	8.78	5.66	1.55	23.70	1.76	1.23	1.43	51.70	6.63	6.20	1.07	24.60
4	2.07	1.44	1.44	10.70	1.17	0.70	1.68	43.60	3.25	2.81	1.16	46.20
5	3.58	3.10	1.15	9.50	6.24	5.44	1.15	56.00	4.95	3.31	1.50	34.50
6	2.53	2.06	1.23	7.10	2.34	1.31	1.70	48.10	8.00	7.12	1.12	44.90
7	2.15	1.59	1.35	5.90	2.02	1.44	1.40	43.70	8.95	7.77	1.15	50.40

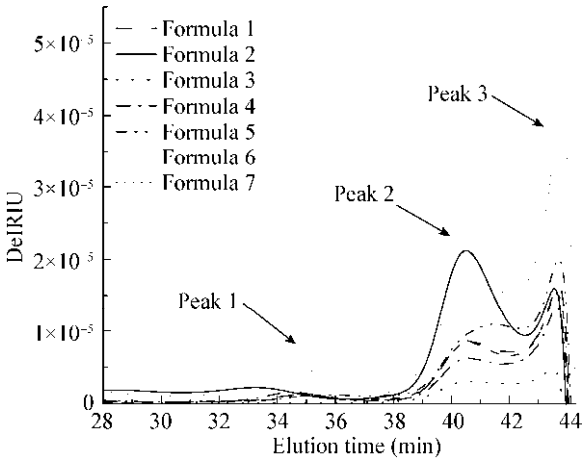


图 3 不同基质栽培猴头菌多糖的液相图谱
Figure 3 HPLC chromatograms of different matrix formula polysaccharides from *Hericium erinaceus* fruit bodies

2.4 单糖组分分析

7 种不同基质配方中猴头菌子实体多糖经高效阴离子色谱(HPAEC)检测后所得单糖组成及摩尔数的结果见表 4。由表 4 可知,猴头菌子实体多糖主要由半乳糖、葡萄糖、甘露糖和岩藻糖组成,并且含有少量阿拉伯糖、氨基葡萄糖和果糖。不同配方基质的单糖组成差异显著,其中配方 7 栽培得到的子实体多糖的单糖组成种类最多,与其他配方相比岩藻糖所占摩尔数比例较大。结果也表明,不同基质栽培得到的猴头菌多糖在结构特征上存在一定的差异,需要结合活性差异探讨最佳活性的结构特征,为栽培获得高活性猴头菌多糖的基质配方提供依据。

表 4 不同配方基质猴头菌子实体多糖的单糖组成及摩尔比

Table 4 Mole ratio of monosaccharide of different substrate formula polysaccharides from *Hericium erinaceus* fruit bodies

配方编号 Recipe No.	岩藻糖 Fucose	阿拉伯糖 Arabinose	氨基葡萄糖 Glucosamine	半乳糖 Galactose	葡萄糖 Glucose	甘露糖 Mannose	果糖 Fructose
1	0.833 4	—	0.347 4	3.309 4	3.321 5	1.000 0	0.433 7
2	5.584 1	—	0.445 1	2.634 6	6.577 0	1.000 0	—
3	7.670 3	—	—	4.964 1	10.568 2	1.000 0	2.323 0
4	3.164 0	—	—	6.015 5	4.697 3	1.000 0	—
5	11.157 6	—	0.586 6	3.753 0	4.291 9	1.000 0	—
6	13.850 7	—	0.400 6	3.709 2	4.335 6	1.000 0	—
7	15.918 3	1.675 7	0.910 7	2.694 8	6.915 8	1.000 0	2.153 9

注: —: 未检测到。
Note: —: Not detected.

2.5 不同基质栽培的猴头菌粗多糖刺激巨噬细胞 RAW264.7 产生 NO 的产量

RAW264.7 巨噬细胞是由 Abelson 鼠白血病病毒诱导小鼠产生肿瘤后, 收集小鼠腹水单核样巨噬细胞得到的细胞株^[11]。该细胞具有很强的黏附和吞噬抗原的能力, 是微生物学、免疫学研究中的常用细胞株。由图 4 可知, 7 种不同配方的猴头菌子实体多糖刺激巨噬细胞产生 NO 的活性有较大差异, 其中配方 4 和配方 7 栽培的猴头菌子实体多糖活性较高, 其余配方在试验浓度范围内刺激巨噬细胞释放 NO 的活性均具有浓度依赖性, 表现出一定的激活巨噬细胞的活性。配方 7 栽培得到的猴头菌子实体多糖中分子量万级的组分占比较大, 说明这部分组分具有相对更好的活性; 配方 4 栽培得到的猴头菌子实体多糖中半乳糖的比例较大, 杂多糖中半乳糖比例高于葡萄糖的表现出的活性较高, 配方 4 的子实体多糖表现出的较好活性与这一结构特征可能有一定的相关性^[12]。

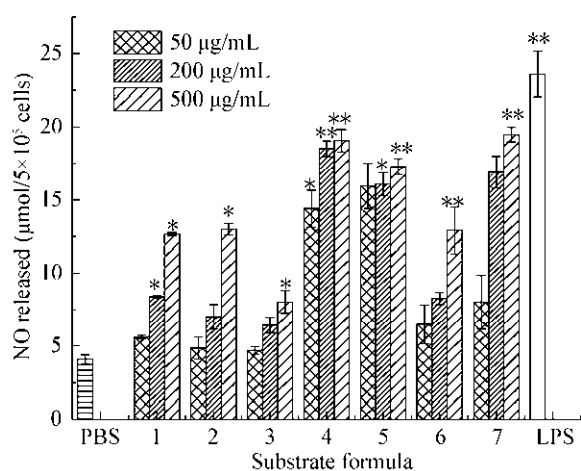


图 4 不同基质配方猴头菌子实体多糖对 RAW264.7 巨噬细胞释放 NO 的影响

Figure 4 Effect of different substrate formula polysaccharides from *Hericium erinaceus* fruit bodies on NO production by RAW264.7 macrophages

注: PBS: 磷酸盐缓冲液; LPS: 细菌脂多糖. *: 与对照相比差异显著; **: 与对照组相比差异极显著。

Note: PBS: Phosphate buffer (negative control); LPS: Lipopolysaccharide (positive control). *: Significant difference at $P < 0.05$ compared with the negative control; **: Extremely significant difference at $P < 0.01$ compared with the negative control.

3 讨论与结论

迄今为止, 许多猴头菌中的生物活性化合物已经被分离和鉴定, 如草根类、麦角甾类、糖蛋白类、多糖类、甾体类、生物碱类和海草素类等^[13]。在这些活性物质中, 猴头菌多糖被认为是主要的活性物质之一, 具有多种药理活性如抗肿瘤作用、保护胃粘膜、提高免疫、抗衰老等^[14]。目前有关食用菌多糖的大量研究集中在多糖的提取、分离纯化、结构、药理及其生产技术方面, 在不同配方基质中对于猴头菌子实体的影响研究局限于其生物学特性和产量方面, 而有关基质对猴头菌子实体多糖的理化性质及其活性产生的影响尚未有研究报道。本研究表明, 不同基质配方栽培的猴头菌子实体多糖的理化性质及其活性有较大的差异。试验表明, 配方 2 栽培的猴头菌子实体紧实、生物学性状好、产量差异达显著水平, 而且其多糖的含量也相对较高, 是适宜进行猴头菌栽培的优良配方; 配方 1、3 和 7 的生物学效率虽不及配方 2, 但综合性状表现良好, 配方 7 得到的子实体多糖含量最高, 其活性也相对较高, 是获得高品质猴头菌子实体的最佳配方。黄勇等研究不同配方培养基对小刺猴头菌子实体多糖含量的影响发现, 以玉米芯为主料的培养基, 小刺猴头菌发菌快, 菌丝洁白、粗壮、浓密, 生长迅速, 子实体形状优良, 生物转化率高, 更重要的是其有效成分多糖含量高, 这与本文的结论相一致^[15]。

本研究对 7 种不同基质栽培的猴头菌子实体多糖的结构特征进行了分析, 发现不同配方栽培的猴头菌多糖的分子量及其分布趋势相近, 但各组分所占比例差异明显, 栽培基质组成对猴头菌多糖的合成代谢产生了一定的影响。7 种不同配方的猴头菌子实体多糖经 HPLC 分析呈现 3 个峰, 表明其主要有 3 种分子量分布的组分, 峰 1 的重均分子量在 $1.0 \times 10^6 - 9.0 \times 10^6$ 之间, 峰 2 的重均分子量在 $1.0 \times 10^5 - 7.0 \times 10^5$, 峰 3 的重均分子量在 $1.0 \times 10^4 - 9.0 \times 10^4$ 。玉米芯的存在对栽培获得大分子

量的多糖贡献较大,米糠的大比例添加对栽培获得万级左右的小分子量多糖有较大的贡献。不同配方基质栽培的子实体多糖的单糖组成分析结果显示,猴头菌子实体多糖主要由半乳糖、葡萄糖、甘露糖和岩藻糖组成,并且含有少量阿拉伯糖、氨基葡萄糖和果糖,不同配方基质的单糖组成差异显著,其中配方7栽培子实体多糖的单糖组成种类最多,岩藻糖所占摩尔数比例最大;配方4栽培子实体多糖的单糖组成中半乳糖的比例较大。配方4和配方7得到的子实体多糖体外刺激巨噬细胞RAW264.7释放NO的活性相对较高,而NO是一种重要的信息传递物质,广泛参与免疫反应在内的机体多系统的生理过程,巨噬细胞受到刺激活化时,释放大量的NO,可杀伤外源微生物、寄生虫和肿瘤细胞等,诱发炎症反应保护机体抵御外界不利因素的侵害,从巨噬细胞RAW264.7释放NO的活性可间接反映机体的体外免疫活性。从不同配方栽培子实体多糖的活性结果分析发现,其活性与多糖结构特征具有一定的相关性。

本研究通过对不同基质栽培的猴头菌子实体生物学效率、多糖含量及活性的系统研究,可为猴头菌栽培的优良配方提供一定的理论参考。研究表明配方2(木屑30%,玉米芯40%,棉籽壳15%,玉米粉2%,麸皮6%,米糠5%,石膏1%,石灰1%)适宜于猴头菇的栽培,不仅生物学性状好、出菇产量差异与其他配方相比达到显著水平,而且多糖含量较高;配方7(玉米芯39%,棉籽壳10%,麸皮10%,米糠30%,大豆皮5%,甜菜渣4%,碳酸钙2%)的生物学性状和产量虽然不及配方2,但是激活巨噬细胞产生NO的体外免疫活性均优于其他配方。综上所述,这两种配方都可以考虑作为工厂化高效栽培优质猴头菌的配方。

REFERENCES

- [1] Xu J, Li SL, Liu J, et al. Comparative test on different matrix formula of *Hericium erinaceus*[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2017, 45(8): 1288-1290 (in Chinese)
许晶, 李素玲, 刘晶, 等. 猴头菇不同基质配方的比较试验[J]. 山西农业科学, 2017, 45(8): 1288-1290
- [2] Cai YX, Cao XM, Xue ZX, et al. Medium formula screening for *Hericium erinaceus* cultivated with JUNCAO[J]. Northern Horticulture, 2017, 41(11): 148-152 (in Chinese)
蔡杨星, 曹秀明, 薛志香, 等. 菌草栽培猴头菌配方筛选[J]. 北方园艺, 2017, 41(11): 148-152
- [3] Li YF, Wei YD, Li H, et al. Formula screening of *Hericium erinaceus* cultivated by corn-cob[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2017, 45(1): 41-43, 145 (in Chinese)
李艳芳, 魏雅冬, 李贺, 等. 玉米芯栽培猴头配方筛选[J]. 山西农业科学, 2017, 45(1): 41-43, 145
- [4] Wu TJ, Zhao M, Zhang XZ, et al. Comparison of cultivated *Hericium erinaceus* with different formula culture materials[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2015(2): 170-171 (in Chinese)
吴团结, 赵蒙, 张绪璋, 等. 不同配方培养料栽培猴头菇比较试验[J]. 黑龙江农业科学, 2015(2): 170-171
- [5] Gao ZY. Study on antitumor activities and mechanism of inducing apoptosis polysaccharides from the liquid submerged fermentation of *Hericium caput-medusae*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2013 (in Chinese)
高梓越. 小刺猴头菌液体深层发酵浸膏多糖的抗肿瘤作用及诱导肿瘤细胞凋亡机制的初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2013
- [6] Yang YJ. Study on chemical composition of *Hericium erinaceus* polysaccharide[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2004 (in Chinese)
杨勇杰. 猴头多糖化学成分研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2004
- [7] Yu HL, Yan Y, Lü BB, et al. Comparison of biological characteristics of different *Hericium erinaceus* strains within a commercial cultivation facility[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(12): 145-149 (in Chinese)
于海龙, 杨焱, 吕贝贝, 等. 工厂化生产条件下猴头菌株品比试验[J]. 中国农学通报, 2013, 29(12): 145-149
- [8] Yu HZ, Liu YF, Zhou S, et al. Comparison of the polysaccharides from fruiting bodies, mycelia and spore powder of *Ganoderma lingzhi*[J]. Mycosystema, 2016, 35(2): 170-177 (in Chinese)
于华峥, 刘艳芳, 周帅, 等. 灵芝子实体、菌丝体及孢子粉中多糖成分差异比较研究[J]. 菌物学报, 2016, 35(2): 170-177
- [9] Qiao YR, Luo YH, Zhou S, et al. Isolation and purification of GFP75-2-2B, a polysaccharide from *Grifola frondosa* fruit bodies, and its effect on nitric oxide release from macrophages[J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(4): 48-51 (in Chinese)
乔艳茹, 罗永煌, 周帅, 等. 灰树花多糖 GFP75-2-2B 的分离

- 及其对刺激巨噬细胞释放 NO 的影响[J]. 食用菌学报, 2010, 17(4): 48-51
- [10] Lee SJ, Lim KT. Phyto glycoprotein inhibits interleukin-1 β and interleukin-6 via p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2008, 377(1): 45-54
- [11] Li J. The effect of three monosaccharide carbon sources on polysaccharides synthesis of *Ganoderma lucidum*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)
李洁. 三种单糖碳源对灵芝多糖合成影响的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015
- [12] Friedman M. Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(32): 7108-7123
- [13] Guo QB, Cui SW, Kang J, et al. Non-starch polysaccharides from American ginseng: physicochemical investigation and structural characterization[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 44: 320-327
- [14] Lee JS, Min KM, Cho JY, et al. Study of macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(9): 951-959
- [15] Huang Y, Zhang JT, Li JH, et al. Effect of different-dispensing culture medium upon polysaccharide content in spinule hedgehog hydnum entity[J]. Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2007(6): 20-21 (in Chinese)
黄勇, 张金亭, 李金花, 等. 不同配方培养基对小刺猴头子实体多糖含量的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2007(6): 20-21

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊, 中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今, 本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.138)