

香菇菌丝体多糖的化学结构与抗氧化活性分析

元向东*

(包头轻工职业技术学院,内蒙古 包头,014035)

摘 要 对香菇菌丝体多糖(*Lentinus edodes mycelium polysaccharides*, LMPS)的2种组分(LMPS-1和LMPS-2)进行化学结构特征分析,旨在为香菇菌丝体多糖的构效关系研究提供依据。文中利用高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱(GC)、红外光谱(IR)分析等对其化学结构特征进行解析,并测定其抗氧化活性。构成糖分析结果显示:LMPS-1单糖组成为阿拉伯糖、木糖、甘露糖和葡萄糖,其摩尔比为2.5:0.8:1:1.8;LMPS-2的单糖组成为鼠李糖、木糖和葡萄糖,其摩尔比为4.2:1:2.7。LMPS-1和LMPS-2均有较强的抗氧化活性,LMPS-2更为显著。香菇菌丝体多糖主要由阿拉伯糖和鼠李糖组成的吡喃型多糖,有较强的抗氧化活性。

关键词 香菇;菌丝体;多糖;化学结构;抗氧化

香菇(*Lentinus edodes*)又称为花菇,属真菌门(Eumycophyta),侧耳科(Pleurotaceae),香菇属(*Lentinus*),是世界第二大食用菌。香菇口味鲜美,营养丰富,富含多糖、维生素、蛋白质、多元酚、朴菇素、膳食纤维等多种生物活性物质。菌丝体多糖是香菇菌丝体中最重要的生物活性物质,作为一种免疫促进剂,已引起人们广泛的兴趣。菌丝体多糖的生物学功能主要有以下几方面:抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、免疫调节、抗炎、保肝护肝和降血糖等作用^[1-2]。有关香菇菌丝体多糖的药理研究,特别是结构方面的研究已引起国内外学者的高度关注,并成为多糖领域的研究热点。本研究对香菇菌丝体多糖(*Lentinus edodes mycelium Polysaccharides*, LMPS)通过DEAE-52纤维素柱和G-100葡聚糖多糖进行分离纯化。分别研究了LMPS-1和LMPS-2分子质量、单糖组成、键型和抗氧化活性,为香菇菌丝体多糖的研究开发及利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

供试菌种:香菇(*Lentinus edodes*),内蒙古农科院保存。

深层液体种子培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, V_{B_1} 0.1 g,水1 L, pH自然。

液体种子培养条件:25℃恒温摇床160 r/min振

荡培养10 d。

深层液体发酵培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, V_{B_1} 0.1 g,蛋白胨3 g,酵母粉3 g,水1 L, pH自然。

深层液体发酵培养条件:100 L气升式液体深层发酵罐中培养14 d,发酵温度25℃,连续通入无菌空气。

实验试剂:30% H_2O_2 ,天津市凯通化学试剂有限公司;体积分数95%乙醇,天津市百世化工有限公司;DPPH, Sigma公司;DEAE-52纤维素, Sigma公司;葡聚糖G-100, Sigma公司;苯酚,天津市天大化学试剂厂;浓 H_2SO_4 , 淄博化学试剂厂有限公司;浓 HCl, 淄博化学试剂厂有限公司;三氯乙酸,天津大茂化学试剂厂。

实验仪器:752-N紫外可见分光光度计,上海精宏实验设备有限公司;GC2010气相色谱仪,日本津岛公司;TDL-5-A型台式离心机上海安亭科学仪器厂;Nicolet380傅立叶变换红外光谱仪,美国热电集团;Nicolet380傅立叶变换红外光谱仪,美国热电集团;DK-S24型恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;LXJ-68-02型离心机,北京医疗仪器修理厂;DZF-6021型真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司。

1.2 多糖的提取

利用水提醇沉法提取香菇菌丝体多糖。

1.3 成分含量测定

总糖含量采用苯酚-硫酸法^[3]测定。

1.4 多糖的凝胶柱层析

首先采用DEAE-纤维素离子交换柱对多糖进行

第一作者:硕士,讲师(本文通讯作者, E-mail:18865489890@163.com)。

收稿日期:2015-09-01,改回日期:2016-01-24

分离纯化,用浓度梯度为 0.2、0.5、1.0 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,洗脱速度控制在 1 mL/min,每个洗脱梯度收集 25 管,每管收集 2 mL,利用苯酚-硫酸法测定收集到的多糖溶液浓度,绘制洗脱曲线。然后用葡聚糖 G-100 凝胶柱对多糖进行进一步分离纯化和纯度鉴定^[4]。用 0.1 mol/L NaCl 溶液充分平衡层析柱后,用蒸馏水作为洗脱剂,洗脱速度控制在 0.1 mL/min,每管收集 2 mL,同样利用硫酸-苯酚法对收集到的多糖溶液浓度测定,绘制洗脱曲线。

1.5 多糖的分子质量测定

采用高效凝胶渗透色谱法(HPLC)对多糖的分子质量进行测定^[5]。用高效液相色谱仪(1260, Agilent Technologies, USA), SHODEX SB-806HQ 色谱柱 column(8.0 mm × 300 mm)及示差折光检测器测定。流动相为 0.2 mol/L NaCl 溶液,进样量为 100 μL,流速为 0.5 mL/min,柱温保持在 5 ℃。标准品及样品质量浓度均为 2 mg/mL。用葡聚糖系列样品作为标准品,以 lgMw(分子质量对数)对 ET(保留时间)绘制标准曲线,得线性回归方程:lgMw = 1 - 0.342 9ET + 11.975, $R^2 = 0.999 1$ 。用 0.2 mol/L NaCl 水溶液将样品配成浓度为 2 mg/mL 的溶液,上柱测定其保留时间,根据回归方程计算分子质量。

1.6 构成糖分析

糖样品经过酸加热完全水解(0.25 mol/L H₂SO₄, 100 ℃, 16 h),或者不经过水解处理,按照 BLAKENEY^[6]等制备成各单糖的全乙酰化糖醇衍生物,然后进行气相色谱(GC)分析(岛津 GC-14C,柱温 210 ℃,N₂流速 30 mL/min),分离柱为岛津公司的毛细管柱 DB-1(0.25 mm × 30 m)。

1.7 多糖的红外光谱(IR)分析

多糖的 IR 分析仪采用 Perkin Elmer 公司的 Spectrun GXFT-IR 红外光谱分析系统。样品采用 KBr 压片法进行测定。

1.8 多糖的体外抗氧化分析

多糖对 DPPH 自由基的清除率测定反应体系如下:2 mL 体积分数为 95% 的乙醇或 DPPH 溶液(0.1 μmol/L), 2 mL 不同浓度的多糖溶液(100 ~ 1 000 mg/L)。反应混合物在 25 ℃水浴 15 min,在 517 nm 处测定吸光度^[7]。清除羟基自由基的测定方法是采用 SMIRONFF 的方法^[8]。多糖还原力的测定方法根据 OYAIU 的方法^[9]。

2 结果与分析

2.1 香菇菌丝体多糖的组分分离纯化

采用 DEAE-纤维素柱对 LMPS 进行组分分离,分别利用蒸馏水和 0.2、0.5、1.0 mol/L 的 NaCl 溶液作为流动相对 LMPS 洗脱,得到 2 个组分(LMPS-1 和 LMPS-2),如图 1 所示。对经过 DEAE-纤维素分离得到的 2 个组分用葡聚糖 G-100 凝胶做进一步分离。如图 2 所示,LMPS-1 和 LMPS-2 均分离得到一个单一的洗脱峰,表明 LMPS-1 和 LMPS-2 均为纯多糖。对 LMPS-1 和 LMPS-2 进行紫外光谱扫描(ultraviolet spectrum, UV),试验结果显示 LMPS-1 和 LMPS-2 在 280 nm 处有特征吸收峰,表明 2 种组分可能是以糖蛋白的形式存在。

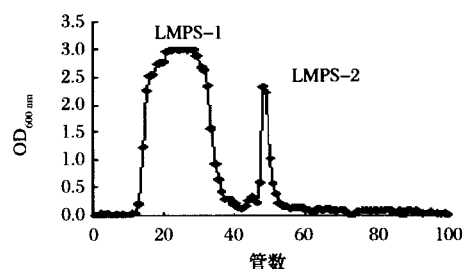


图1 LMPS 的 DEAE-纤维素离子交换柱层析洗脱曲线
Fig. 1 The profile of DEAE-cellulose ion exchange column chromatography by LMPS

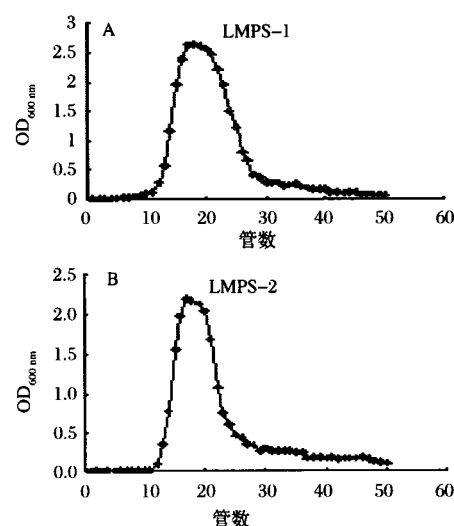


图2 两种多糖组分的葡聚糖 G-100 凝胶层析洗脱曲线
(A) LMPS-1 和 (B) LMPS-2

Fig. 2 The profile of G-100 gel filtration chromatography by two polysaccharides (A) LMPS-1 and (B) LMPS-2

2.2 化学结构分析

用高效液相色谱分析多糖分子质量如图 3 所示。LMPS-1 色谱图出现了 2 个洗脱峰,说明 LMPS-1 含有分子质量相对集中的 2 个组分,因此,LMPS-1 为不均

一多糖。用 GPC 分析软件计算后可知, LMPS-1 的 M_w 为 5.49×10^4 Da, M_n 为 2.40×10^4 Da, M_v 为 5.01×10^4 Da, M_z 为 1.07×10^5 Da, M_p 为 1.24×10^4 Da, LMPS-1 的 M_w/M_n 值为 2.29。LMPS-2 为单一对称峰,说明 LMPS-2 为均一多糖。其 M_w 为 1.35×10^4 Da, M_n 为 1.05×10^4 Da, M_v 为 3.55×10^4 Da, M_z 为 1.20×10^5 Da, M_p 为 1.14×10^4 Da。LMPS-2 的 M_w/M_n 值为 1.29。

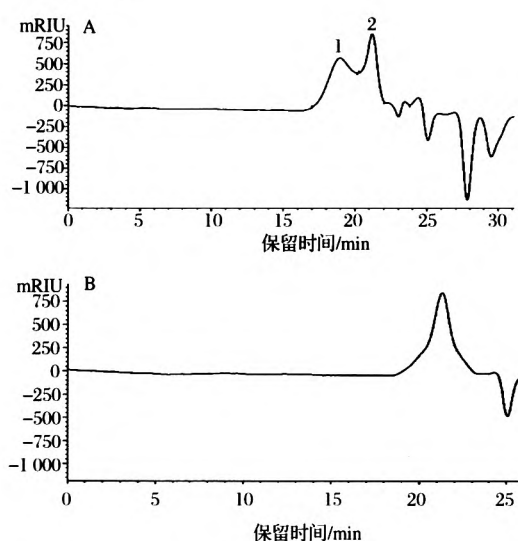


图3 两种多糖高效液相色谱图分析(A)LMPS-1 和 (B)LMPS-2

Fig. 3 Analysis of HPGPC chromatogram by LMPS-1 and LMPS-2

根据标样的保留时间来测定单糖的含量,由图4和表1可知,LMPS-1 含有37%的阿拉伯糖、11.4%的木糖、18.2%的甘露糖和33.4%的葡萄糖,它们的摩尔比为2.5:0.8:1:1.8,从这些数据可以看出,LMPS-1 含量最多的单糖是阿拉伯糖和葡萄糖。

表1 气相色谱结果

Table 1 Results of gas chromatography

序号	单糖名称	LMPS-1 单糖含量/%	LMPS-2 单糖含量/%
1	鼠李糖	-	54.7
2	D-核糖	-	-
3	阿拉伯糖	37	-
4	木糖	11.4	10.8
5	肌醇	-	-
6	甘露糖	18.2	-
7	葡萄糖	33.4	34.5
8	半乳糖	-	-

注:-:表明多糖组分中不含有该单糖。

LMPS-2 含有54.7%的鼠李糖、10.8%的木糖和34.5%的葡萄糖,它们的摩尔比为4.2:1:2.7,可以

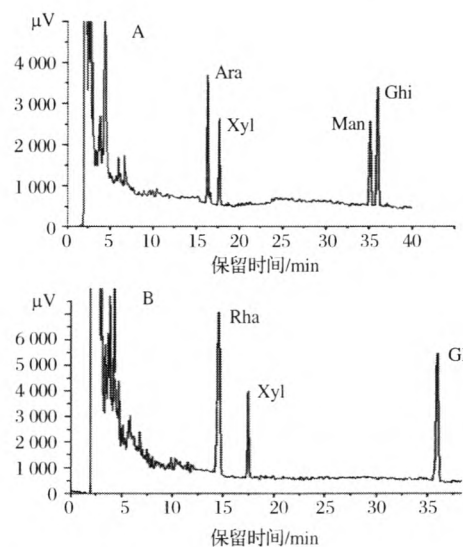


图4 两种多糖气相色谱图分析(A)LMPS-1 和 (B)LMPS-2

Fig. 4 Analysis of GC chromatogram by LMPS-1 and LMPS-2

看出 LMPS-2 含量最多的单糖是鼠李糖和葡萄糖。

如图5所示,LMPS-1 在2 927.76和3 418.64 cm^{-1} 附近有明显的吸收峰,其主要由—OH 和 C—H 的伸缩振动引起^[10]。而1 642.63 cm^{-1} 处的吸收峰说明 LMPS-1 中含有酰胺羰基。1 371.95 cm^{-1} 处吸收峰为 C=O 对称伸缩振动引起,1 415 cm^{-1} 处吸收峰为 C—H 变角振动引起,在1 023.73、1 082.21、1 156.03 cm^{-1} 处的吸收峰是糖环上的 C—O 和 O—H 伸缩振动引起的,这表明 LMPS-1 中存在 D-吡喃环^[11]。760.15 cm^{-1} 处的吸收峰主要由 D-葡萄糖吡喃环对称环伸缩振动引起,930.25 cm^{-1} 处的吸收峰主要由 D-葡萄糖吡喃环不对称环伸缩振动引起的。

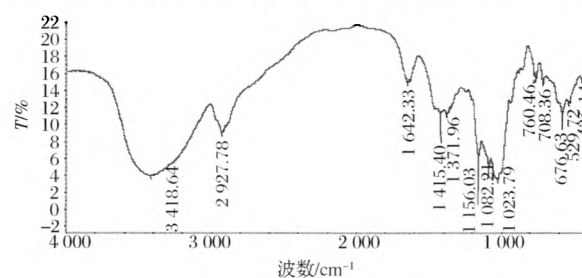


图5 LMPS-1 的红外光谱

Fig. 5 FT-IR spectra of LMPS-1

由图6可知,在3 417.98和3 441.87 cm^{-1} 附近有较强的吸收峰,2个峰分别由—OH 和 C—H 的伸缩振动引起^[10]。在2 366.27 cm^{-1} 处吸收峰为脂肪族 C—H 伸缩振动特征,1 615.74 cm^{-1} 处的吸收峰说

明 LMPS-2 中含有酰胺羰基, $1\,238.04\text{ cm}^{-1}$ 为非对称的硫酸酯($\text{S}=\text{O}$)伸缩振动特征,常被用于计算多糖中硫酸酯的含量^[12]。在 $1\,147.85$ 、 $1\,023.13\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是由 $\text{C}-\text{O}$ 和 $\text{O}-\text{H}$ 伸缩振动引起的,这表明多糖中存在 *D*-吡喃环^[11]。

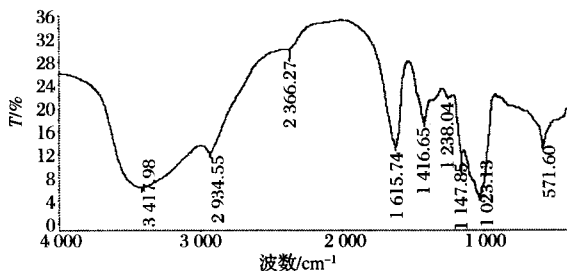


图6 LMPS-2 的红外光谱

Fig. 6 FT-IR spectra of LMPS-2

2.3 两种组分的体外抗氧化活性

2.3.1 LMPS-1 和 LMPS-2 对 DPPH 自由基的清除作用

图7为 LMPS-1 和 LMPS-2 对 DPPH 自由基的清除作用。在浓度为 200 mg/L 时, LMPS-1 和 LMPS-2 对 DPPH 的清除率分别为 $(13.85 \pm 0.69)\%$ 和 $(32.96 \pm 1.65)\%$ 。据报道,当浓度为 200 mg/L 时,桑黄菌丝体多糖对 DPPH 自由基的清除率为 8% ^[13]。结果表明, LMPS-2 对 DPPH 具有较高的清除率,是桑黄的 412% 。

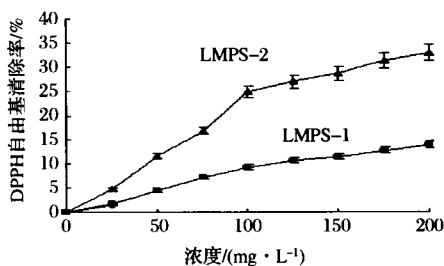


图7 LMPS-1 和 LMPS-2 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 7 Scavenging effects of LMPS-1 and LMPS-2 on DPPH radicals

2.3.2 LMPS-1 和 LMPS-2 对羟基自由基的清除作用

LMPS-1 和 LMPS-2 对羟基自由基的清除作用见图8,在 $1\,000\text{ mg/L}$ 时 LMPS-1 和 LMPS-2 对羟基自由基的清除率分别为 $(8.50 \pm 0.43)\%$ 和 $(41.2 \pm 2.06)\%$ 。据相关报道,当浓度为 $1\,000\text{ mg/L}$ 时,虫草的清除率为 20% ^[14],桦褐孔菌的清除率为 10% ^[15]。即 LMPS-2 对羟基自由基的清除作用是虫草的 206.0% ,桦褐孔菌的 412.0% 。

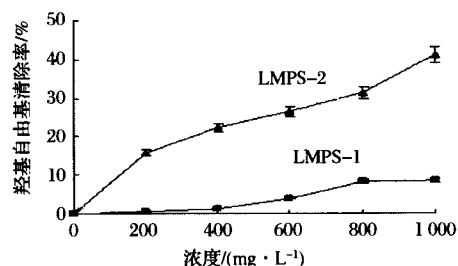


图8 LMPS-1 和 LMPS-2 对羟基自由基的清除作用

Fig. 8 Scavenging effects of LMPS-1 and LMPS-2 on hydroxyl radicals

2.3.3 LMPS-1 和 LMPS-2 的还原力测定

如图9所示,在 100 mg/L 时, LMPS-1 和 LMPS-2 在 700 nm 处测得的还原力分别为 (0.19 ± 0.01) 和 (0.53 ± 0.03) ,据报道,桑黄的为 0.10 ^[16],树舌灵芝的为 0.40 ^[17],即 LMPS-2 的还原力是桑黄的 530.0% ,树舌灵芝的 132.5% 。LMPS-2 的 EC_{50} 为 893.2 mg/L 。

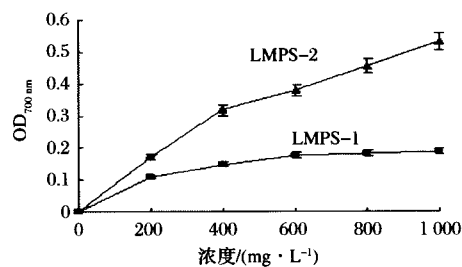


图9 LMPS-1 和 LMPS-2 还原力测定

Fig. 9 Reducing power of LMPS-1 and LMPS-2

3 结论

在本试验中,经过 DEAE-纤维素离子交换柱和葡聚糖 G-100 凝胶柱的分离, LMPS 分离得到多糖组分分别为 LMPS-1 和 LMPS-2。利用气相色谱法测定了 LMPS-1 和 LMPS-2 单糖的组成。发现 LMPS-1 中主要含有阿拉伯糖和木糖, LMPS-2 中主要含有鼠李糖和阿拉伯糖, LMPS-1 和 LMPS-2 中阿拉伯糖的含量都比较高。但是在结构分析中,通过红外光谱法对 LMPS-1、LMPS-2 在 $4\,000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 区段进行扫描,结果显示,2 种多糖均为 *D*-吡喃型。其中, LMPS-2 中检测到脂肪族 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动特征峰和非对称的 $\text{S}=\text{O}$ 伸缩振动特征峰,说明多糖可能是以含有硫酸酯的脂多糖形式存在。由于抗氧化剂对不同的氧化剂或自由基的作用原理各有不同,所以目前没有单一的方法可以一次性准确的反映出所有抗氧化剂或自

由基的作用机制。因此,在本试验中选取了羟基自由基、还原力和 DPPH 自由基 3 个指标对香菇菌丝体多糖组分的体外抗氧化活性进行测定。结果显示, LMPS-1 和 LMPS-2 对 DPPH 自由基、羟基自由基均有较强的清除能力;两者均有较强的还原力,并且 LMPS-2 的体外抗氧化活性更强。

参 考 文 献

- [1] 吕国英,范雷法,张作法,等.香菇多糖研究进展[J].浙江农业学报,2009,21(2):183-188.
- [2] 张昕,张强,梁彦龙.香菇多糖的抗肿瘤和降糖作用机制的研究进展[J].中国药事,2008,22(2):149-151.
- [3] GILLES D M, HAMILTON K A, REBERS J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Anal Chem, 2002, 28(3):350-356.
- [4] 王博,徐莎,黄琳娟,等.白芨多糖 BSPI-A 的分离纯化及结构研究[J].食品科学,2010,31(7):120-123.
- [5] LIN H J, QIN X M, AIZAWA I, et al. Chemical properties of water-soluble pectins in hot-and cold-break tomato pastes [J]. Food Chemistry, 2005, 93(3):409-415.
- [6] BLAKENEY A B, HARRIS P T, HENRY R J, et al. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis [J]. Carbohydrate Res, 1983, 113(83):219-299.
- [7] LIU X H, FENG P Y, SHI Y L. Study of isolation and purification of polysaccharides from fresh mycelia of *Agaricus blazei* Mussill and its anti-fatigue effect[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2006, 28(2):190-194.
- [8] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4):1 057-1 060.
- [9] OYAIZU. M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin layer chromatography [J]. J Jpn Soc Food Sci, 1986, 35(11):771-775.
- [10] ZOU X. Quick isolation and purification of extracellular polysaccharides from *agaricus blazei* murill and elementary property analysis [J]. Food Science, 2005, 17(4):14.
- [11] LIU X, ZHAO M. Antioxidant activities and functional composition content of selected *Phyllanthus emblica* fruits juice [J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(5):151-154.
- [12] MELO M R S, FEITOSA J P A, FREITAS A L P, et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea* [J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(4):491-498.
- [13] ZHU Z P, LI N. Antioxidant properties of polysaccharides from *Phellinus igniarius* in vitro [J]. Food Science, 2011, 32(19):92-95.
- [14] 李晓磊,赵珺,李丹,等.冬虫夏草深层发酵菌丝体和蛹虫草子实体抗氧化活性的对比研究[J].食品科技,2009,34(9):75-79.
- [15] SHEN J W, YU H Y, HUO Y F, et al. Purification of polysaccharide of *Phaeoportunus obliquus* and the bioactivity of purified fractions [J]. Mycosystema, 2009, 28(3):564-570.
- [16] XIE L Y, ZHANG Y, PENG W H. Immune function and antioxidant activity of intracellular polysaccharides from *Phellinus baumii* [J]. Food Science, 2011, 32(9):276-281.
- [17] LI Z P, WU P, WU S Q. Study on antioxidant activity of *Ganoderma applanatum* intracellular polysaccharides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(6):108-110.

Characteristic and antioxidant activities of polysaccharides by *Lentinus edodes* mycelium

YUAN Xiang-dong *

(Baotou Light Industry Vocational Technical College, Inner Mongolia, Baotou 014035, China)

ABSTRACT To isolate and purify *Lentinus edodes* mycelium polysaccharides (LMPS) through ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography, and to provide a theoretical reference for relationship between structure and activity of LMPS. The structural characteristics of polysaccharide were elucidated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), and infrared spectrum (IR). Results: The result showed that LMPS-1 was composed of rhamnose (Rha), arabinose (Ara), xylose (Xyl), mannose (Man), glucose (Glu) and galactose (Gal) with a molar ratio of 1.52:2.96:2.91:0.78:1:1.35; LMPS-2 contained Rha, Ara and Xyl with a molar ratio of 2.91:1:1.1:0.2:0.5. The results showed that LMPS-1 and LMPS-2 had very strong reducing power and scavenging effects on DPPH and hydroxyl radicals. LMPS furanoids were mainly composed of Rha and Glu with strong antioxidant activities.

Key words *Lentinus edodes*; mycelium; polysaccharide; chemical structure; antioxidant activities