香菇多糖纯化前后结构和生物活性的比较

王嘉铭[1]， 雷于国[2]， 胡国元[*1]， 但冬梅[2]

（1. 武汉工程大学 绿色化工过程教育部重点实验室/环境生态与生物工程学院，湖北 武汉 430205；2. 湖北裕国菇业股份有限公司，湖北 随州 441300）

摘要： 为了比较香菇多糖纯化前后的结构特性和生物活性。分别对香菇粗多糖样品（命名为 L0）及其纯化后的 3 个多糖组分（依次命名 L1、L2 和 L3）进行结构特性（紫外光谱，红外光谱，扫描电镜，粘均相对分子质量，刚果红络合物）和生物活性（抗氧化活性和抑菌活性）的测定。紫外光谱结果显示纯化后多糖组分基本不含有核酸和蛋白质；红外光谱结果表明多糖纯化前后均有显著的多糖特征吸收峰和 β-糖苷键，其中 L1 与 L0 的结构更相似，吸收峰更明显；扫描电镜结果显示，纯化前后组分有一定的差异，其中 L2 和 L3 表面结构呈现出碎屑状堆积，而 L1 呈现出有一定凸起和褶皱的块状；刚果红络合物结果表明，L0 和 L1 中含有三螺旋结构；L0、L1、L2 和 L3 的粘均相对分子质量分别为 2.19×10^5、8.34×10^4、4.40×10^4、3.66×10^4。抗氧化实验表明，L0 具有更好的抗氧化效果；对金黄色葡萄球菌抑菌圈的测定发现 L1 具有更好的抑菌效果。实验结果表明，纯化前后香菇多糖在结构和活性上均有一定的差异，为活性多糖组分的制备和利用提供了一定的依据。

关键词： 香菇多糖；纯化；结构特性；抗氧化；抑菌活性

中图分类号：TS 201.1　**文章编号：**1673-1689(2020)01-0099-08　DOI：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.01.014

Comparison of the Structural Characteristics and Biological Activity of before and after Purification Polysaccharides of *Lentinula edodes*

WANG Jiaming[1]， *LEI Yuguo*[2]， *HU Guoyuan*[*1]， *DAN Dongmei*[2]

（1. Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education/School of Environmental Ecology and Biological Engineering Pharmacy，Wuhan Institute of Technology，Wuhan 430205，China；2. Hubei Yuguo Guye Co.，Ltd.，Suizhou 441300，China）

Abstract： The effect of purification on the structure and biological activity of polysaccharide in *Lentinula edodes* were investigated. The structural characteristics (UV，FT-IR，SEM，Viscosity-average molecular weight，Congo red complex) and biological activity (Antioxidant and Antibacterial activity) of crude polysaccharide samples (named L0) and their purified three polysaccharides (named L1，L2，and L3) were measured respectively. The UV results showed that nucleic acids and proteins were not found in the purified polysaccharides. The FT-IR results showd that all components have absorption peak of sugar and β-glucosidic bond，but the FT-IR structural of L1 were similar to L0. The SEM pictures showd that the surface structures of L2 and L3 were similar，presents the

收稿日期： 2018-01-02

基金项目： 湖北省科技攻关项目（CXZD2017000310）。

* **通信作者：** 胡国元（1965—），男，博士，教授，主要从事微生物发酵研究。E-mail：hgy701@163.com

fragmental accumulation,and the structure of L1 present a bump and fold block. With Congo red complex of the study,L0 and L1 contained three spiral structure,the L2 and L3 did not contain three spiral structure. The antioxidation experiment showed that the L0 components had better anti-oxidation activity. The determination of staphylococcus aureus was found that L1 have better antibacterial activity. The work found that after purification,the structure and biological activity of polysaccharide were different. These provided some basis for the selection of active components.

Keywords: letinan,purification,structural property,antioxidant,bacteriostatic activity

香菇(*Lentinula edodes*)又名香菌、香蕈、花菇,是一种重要的食用菌[1],具有良好的食用和药用功能。香菇多糖作为香菇中一种重要的活性组分,在食品,医药等方面有广泛的应用。研究发现,香菇多糖具有抗氧化[2],抗病毒[3]以及抗肿瘤[4]等功效,并且因为它丰富的来源和极低的毒副作用,其逐渐成为当前的研究热点。研究发现香菇具有降脂[5]和降血糖[6]的作用,香菇多糖对溃疡性结肠炎小鼠也有一定改善作用[7]。

目前关于香菇提取物分离纯化,结构特性和活性的报道已经很多,如:单联刚[8]通过无机陶瓷膜超滤法使回收率达到了 95.4%;唐庆九等[9]通过对香菇提取物分析,首次分离到了腺嘌呤;陈万超等[10]对香菇特征指纹图谱进行了构建;汲晨锋等[11]研究表明香菇多糖结构与抗肿瘤间的关系,其结构主要体现为同多糖和杂多糖两种形式;魏元[12]研究表明香菇多糖主要是阿拉伯糖和鼠李糖组成的吡喃型多糖;张超等[6]通过对香菇等食用菌提取物的研究发现了他们胰岛素代谢的影响;CHEN Y 等[2]通过研究发现香菇多糖具有抗氧化活性;胡国元等[20]研究发现香菇多糖对金黄色葡萄球菌具有较好的抑制作用。但是系统性对纯化前后香菇多糖结构和生物活性进行比较的报道还较少,前期研究结果显示从香菇未成熟期子实体提取的粗多糖醇沉组分的抗氧化等生物活性优于其他生育期。

作者通过对香菇未成熟期子实体粗多糖组分进行分离纯化,然后通过紫外光谱,红外光谱,刚果红络合物分析,电子显微镜扫描,粘均相对分子质量测定,抗氧化活性以及抑菌活性的测定,比较了纯化前后的香菇多糖在结构和生物活性上的差异,为活性香菇多糖的制备和利用提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

香菇未成熟期子实体(菌幕形成,菌盖直径约为 1.5~2.0 cm):湖北随州裕国菇业有限公司提供。供试样品 60℃烘干后,粉碎过 60 目筛(0.25 mm)备用。

考马斯亮蓝、纤维素 DEAE-52,源叶生物、核黄素、甲硫氨酸、氮蓝四唑、1,1-二苯基-2-硝基苯肼(DPPH)、阿拉丁公司产品;牛肉浸膏:北京双旋微生物培养基制品厂产品;蛋白胨:安琪酵母股份有限公司产品;琼脂:北京生东科技有限公司产品;金黄色葡萄球菌:作者所在实验室保藏。

1.2 仪器与设备

Genesys 10s 紫外可见分光光度计:美国 Thermo Scientific 公司产品;JSM-5510LV 型扫描电镜;Nicolet 380 红外光谱仪:美国赛默飞公司产品;AL 104 电子分析天平:梅特勒-托利多上海有限公司产品;FW-100 高速万能粉碎机:北京市永光明医疗仪器厂产品;SHD-DIII 循环水式多用真空泵:巩义市予华仪器有限责任公司产品;GZX-9030 MBE 数显鼓风干燥箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂产品;DK-S28 电热恒温水浴锅:上海精宏实验设备有限公司产品;LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅;上海申安医疗器械厂产品。

1.3 实验条件

1.3.1 粗多糖的制备 称取香菇样品 10 g,按照料液质量体积比 1 g:20 mL 加入蒸馏水,100℃提取 2 h,抽滤,得到浸提液后按照浓缩比 1:4 进行旋转蒸发浓缩,加入无水乙醇至终体积分数 20%,4℃静置 12 h,离心收集沉淀,烘干后得香菇粗多糖样品(命名为 L0),避光保存备用。

1.3.2 粗多糖的脱色和脱蛋白 称取 5 g 香菇粗多糖样品,溶于 250 mL 蒸馏水后,充分溶解过滤备

用。根据蛋白质与氯仿溶液混合会变性沉降的特点,配置氯仿-正丁醇混合溶液,氯仿和正丁醇体积比为 4:1,向样液中加入配置好的氯仿-正丁醇混合液(样液的 1/3),在 25℃摇床中以 150 r/min 振摇 30 min 后，放入离心机中在 4 000 r/min 条件下离心 15 min,用移液枪吸出水层,再加入氯仿-正丁醇混合液重复 2 次。

取脱蛋白的多糖溶液，加入质量分数 1%活性炭，调节 pH 至 3.5，置于 20 ℃摇床中以 190 r/min 振摇 100 min 后过滤。

1.3.3 粗多糖柱层析 将 Cellulose DEAE-52 填料在 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液中浸泡 12 h,用蒸馏水充分洗涤至中性后抽滤；然后转入 0.5 mol/L 的 HCl 溶液中浸泡 12 h，用蒸馏水洗涤至中性后抽滤;最后再用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 12 h,洗涤至中性。湿法装柱,用蒸馏水平衡 24 h 后备用。

将脱蛋白质和脱色后的多糖溶液加入到处理过的 Cellulose DEAE-52 纤维素柱中，依次用蒸馏水、0.2 mol/L、0.4 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱,控制流速在 15 滴/min。每只试管收集 10 mL,采用苯酚-硫酸法在 490 nm 处检测 OD 值,以吸光度为纵坐标,管数为横坐标制作洗脱曲线[13],合并含多糖的各管样品,透析脱盐,冷冻干燥,收集纯化后多糖样品 得到 3 个多糖组分,依次命名 L1,L2,L3。

1.3.4 紫外光谱扫描分析 分别将各多糖样品溶于蒸馏水中,在 200~400 nm 范围内进行紫外扫描,根据 260 nm 和 280 nm 等处是否有吸收峰,判断样品中是否含有核酸和蛋白质。

1.3.5 红外光谱扫描分析 取适量的各多糖样品,和溴化钾充分碾磨混合后压片,用红外色谱仪在红外光 4 000~450 cm^{-1} 区间下扫描。

1.3.6 粘均相对分子质量的测定 准确称取 0.5 g 各组分多糖样品，溶解于 2 mol/L 的 NaCl 溶液中,用 3# 砂芯漏斗抽滤,弃去初滤液,精密量取续滤液 10 mL 自管沿管壁加入乌氏粘度计。乌氏粘度计垂直固定于水浴槽中 10 min 以上,使管内温度和水浴温度平衡,然后按照文献[15]对各组分特性粘度进行测定,其中 a 值由张翼伸(1983)确定为 1[14],再由标准葡聚糖样品测得 K 值,最后根据$[\eta]=KM^{a}$ 计算各组分粘均相对分子质量[15]。

1.3.7 电子显微镜扫描 取少量的各多糖样品粉末,减压条件下喷镀一层金原子,用扫描电子显微镜在 15 kV 的加速电压下放大 1 000 倍成像。

1.3.8 刚果红分析 分别取 40 mg 多糖样品溶于 20 mL 蒸馏水，加入 2 mL 刚果红溶液，分别加入 NaOH 溶液至浓度为(0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5 mol/L),在 200~800 nm 进行紫外扫描,测定最大吸收峰,观察最大吸收峰的变化,以 NaOH 浓度为横坐标,最大吸收峰为纵坐标制作曲线[16]。

1.3.9 抗氧化活性测定

1）对 DPPH 自由基的清除测定 参照 LIU Yong 方法进行修改 [17]，取各多糖样品溶于蒸馏水中,配成 0.5 mg/L 的溶液。取 5mL 的 6.4×10^{-4}mol/L DHHP，定容于 50 mL 容量瓶中摇匀待测。利用 DPPH 溶液的特征紫红色吸收峰，按照 A_0:2.0mL DPPH+2.0 mL 溶剂;A_1:2.0 mL DPPH 溶液+2.0 mL 样品溶液;A_j:2.0 mL 样品溶液+2.0 mL 溶剂；在波长 517 nm 处用分光光度计测定各个溶液吸光度,吸收峰的下降表示对有机自由基的清除能力。清除率计算公式为:清除率(%)=$(1-(A_1-A_j)/A)\times100\%$。

2）对羟自由基的清除测定 参照 ZHU Liancai 方法进行修改[18]取各多糖样品溶于蒸馏水中,配成 0.5 mg/L 的溶液。采用邻二氮菲-Fe^{2+}氧化法,吸取 4.0 mL pH 7.4 磷酸钠缓冲液,加入 1.5 mL 5.0 mmol/L 邻二氮菲，充分混匀。然后再加入 1 mL 7.5 mmol/L $FeSO_4$ 溶液,立即混匀。加入 1.0 mL 各组分多糖溶液,再加入 1.5 mL 蒸馏水补充体积,最后加入 1.0 mL 1%H_2O_2 溶液,混匀,于 37℃水浴中反应 60 min,在 536 nm 测定吸光度。按照公式进行计算：清除率(%)=$(A_{加药}-A_{损伤})/(A_{未损}-A_{损伤})$。式中:$A_{加药}$为加入样品实验组测得的吸光度,$A_{损伤}$为加入 H_2O_2 而不加入抗氧剂所测得吸光度,$A_{未损}$为不加 H_2O_2 和抗氧化剂所测得吸光度。

3）对超氧阴离子的清除测定 取各多糖样品溶于蒸馏水中,配成 0.5 mg/L 的溶液。采用光照核黄素-氮蓝四唑(NBT)法[19],取 1 mL pH 7.8 磷酸缓冲液,加入 0.5 mL 3.3×10^{-5} mol/L 核黄素、0.5 mL 0.02 mol/L 甲硫氨酸、5.1×10^{-4} mol/L NBT 和 1 mL 样品溶液。光照 20 min 后与 560 nm 测定样品吸光度。以溶剂代替样品测定空白吸光度 A_0。按照公式进行计算:清除率(%)=$(1-(A/A_0))\times100\%$。式中 A_0 为溶剂替代样品测定的空白吸光度;A 为样品吸光度。

1.3.10 抑菌活性的测定

1)多糖溶液的配置 将各多糖样品溶于蒸馏水

中,配制成 10 mg/mL 的多糖溶液,通过孔径为 0.45 μm 的滤器过滤后放置于 4℃冰箱保存,备用。

2）菌悬液的制备　将金黄色葡萄球菌接种到牛肉膏蛋白胨培养基制成的平板上,置于 37℃培养 24 h 进行活化,然后挑取一块菌苔,用无菌生理盐水进行稀释,制成含菌量为 10^6~10^8 CFU/mL 的菌悬液,置于 4℃冰箱中保存,备用。

3）最小抑制浓度的测定　在装有固体培养基的平板上加入 50 μm 菌悬液,并用涂布棒涂布均匀,将滤纸片放入经两倍稀释法稀释后的不同浓度的多糖溶液中浸泡 20 min,用蒸馏水做对照。用灭菌后的镊子将直径 6 mm 滤纸片夹出放置于含菌平板上,重复 3 次,37 ℃倒置培养 24 h,然后用十字交叉法,测量抑菌圈直径大小,计算平均值,以有抑菌圈的最低浓度为最小抑制浓度 (minimum inhibitory concentration) [20-21]。

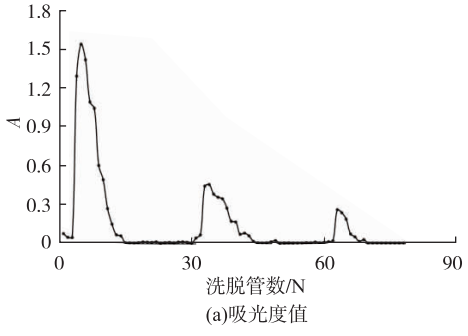
2 结果与分析

2.1 粗多糖的纯化

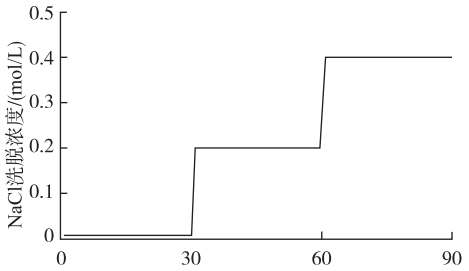
香菇粗多糖样品(L0)为黑褐色,呈块状,经过脱蛋白、脱色和纤维素柱层析纯化后,为淡黄色,表明粗多糖中部分杂质已经被脱除。洗脱曲线如图 1 所示,L0 经水洗脱(1~30 管)后,得到多糖组分 L1 (4~14 管);经 0.2 mol/L NaCl 线性梯度洗脱(31~60 管) 后得到多糖组分 L2 (31~44 管); 经 0.4 mol/L NaCl 线性梯度洗脱(61~90 管)后得到多糖组分 L3 (61~69 管)。其中 L1 为淡黄色块状,L2 和 L3 均为淡黄色粉末。根据峰面积和含量大小成正比的关系,可知 L1 组分最多,为多糖主要成分。

2.2 紫外光谱扫描分析

对纯化前后各组分多糖在 200~400 nm 进行紫外扫描,结果如图 2 所示,纯化后组分在 260 nm 和 280 nm 波长范围内仅有一个微弱的吸收峰,而未纯化样品在 260 nm 和 280 nm 波长范围内有较强的



(a)吸光度值



(b)洗脱浓度

图 1　香菇粗多糖经 DEAE–纤维素–52 柱层析梯度洗脱曲线

Fig 1　Elution curve of crude polysaccharide by DEAE–cellulose–52 chromatography.

吸收峰,说明经过纯化后,多糖样品中基本不含核酸和蛋白质杂质。

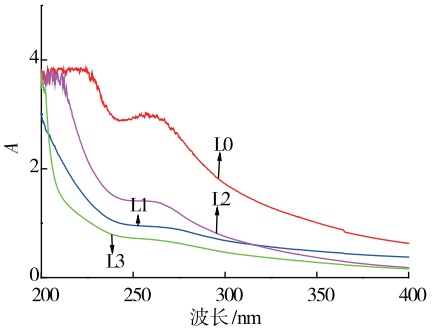


图 2　不同香菇多糖组分紫外光图谱

Fig 2　UV spectra of different polysaccharides fractions

2.3 红外光谱扫描分析

当一束红外光透过物质,和红外光震动频率一样的基团会吸收能量跃迁。如图 3 所示,3 420.14 cm^{-1} (L0)、3 387.06 cm^{-1}(L1)、3 450.59 cm^{-1}(L2)、3 445.11 cm^{-1}(L3)吸收峰由于糖链上的伸缩振动引起[22]。2 932.26 cm^{-1}(L0)、2 936.14 cm^{-1}(L1)吸收峰由于 C–H 的伸缩振动引起。1 700~1 750 cm^{-1} 内4个组分多糖均没有很强的吸收峰,表明 4 个多糖组分中均不含糖醛成分[23]。1 641.08 cm^{-1}(L0)、1 647.57 cm^{-1}(L1)、1 634.97 cm^{-1}(L2)、1 635.56 cm^{-1}(L3)出现C=O特征吸收峰 [24]。1 406.68 cm^{-1} (L0)、1 410.79 cm^{-1}(L1)、1 414.74 cm^{-1}(L3)由于 C–H 弯曲引起,为多糖类化合物的特征吸收峰,进一步的验证了样品为多糖类物质。同时,L1 多糖组分在1 078.96 cm^{-1} 和 1 052.24 cm^{-1} 存在较强的吸收峰,是糖苷键 C–O–C 的非对称振动峰, 并且在1 100~1 000 cm^{-1} 只存在两个吸收峰,表明 L1 多糖组分中存在呋喃糖环;4 个多糖组分在890 cm^{-1} 附近均有较强的吸收峰,表明存在β–糖苷键;纯化前多糖组分 L0 与 L1 表现出相似的结

构,但是吸收峰强度较 L1 弱,进一步验证 L1 为多糖中的主要成分。而 L2 和 L3 多糖组分在 1 075.24 cm^{-1} 和 1 078.98 cm^{-1} 处的吸收峰归于吡喃糖环上 C-O 的伸缩振动。与 L1 多糖组分相比,L2 和 L3 虽然与 L1 吸收峰较为相似,但是在指纹区却没有出现密集的高强度吸收峰,根据红外光谱分析所能获得的信息较少。

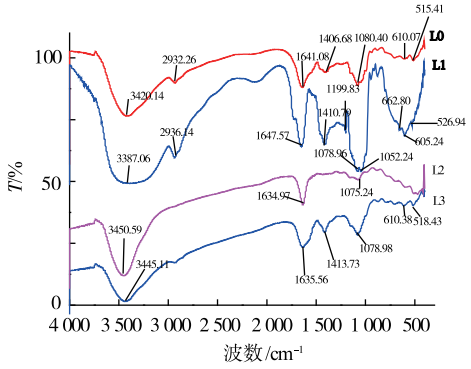


图 3　不同香菇多糖组分红外光图谱

Fig 3　FI-IR spectra of different polysaccharides fractions

2.4　粘均相对分子质量的测定

纯化前后香菇多糖样品粘均相对分子质量如图 4 所示,纯化前粗多糖粘均相对分子质量为 2.19×10^5,纯化后的多糖组分粘均相对分子质量分别为 8.34×10^4、4.40×10^4、3.66×10^4,纯化后相对分子质量明显低于纯化前,进一步说明经过脱蛋白,脱色和纤维素柱层析后,许多大分子杂质被去除。同时,洗脱时盐浓度对相对分子质量也有一定的影响,即盐浓度越高,洗脱所得组分相对分子质量越小。

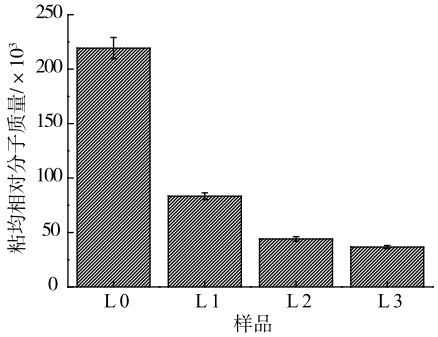


图 4　不同香菇多糖组分粘均相对分子质量

Fig 4　Viscosity-average molecular weight of different polysaccharides fractions

2.5　电子显微镜扫描

4 个不同多糖组分扫描电镜如图 5.所示,L0 呈现纤维状,可能由于不同的分子或者分子基团聚集成不同形态的聚集体所造成;L1 呈现不规则的块状,中间有一定的缝隙,有突出的褶皱结构,说明多糖分子间有一定的排斥力,吸引力较弱;L2 和 L3 形态较为相似,都表现为碎屑状堆积,分子间存在孔洞间隙,使得多糖并未完全集合。通过电镜扫描图片,进一步证实了分离出的组分中所含物质和多糖种类都有一定的差异,其中 L1 与 L2,L3 组分差异较大。

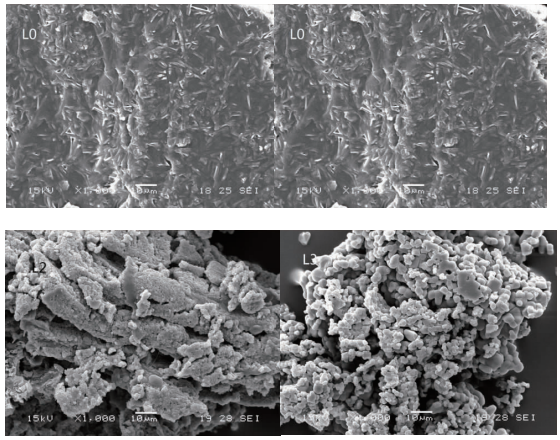


图 5　不同香菇多糖组分电镜照片

Fig5　Electron microscopy images of different polysaccharide fractions

2.6　刚果红分析

刚果红与具有三螺旋结构的多糖能够形成络合物,在一定 NaOH 浓度内,最大吸收波长与为结合的刚果红相比会发生红移(向波长增大的方向移动)。4 个不同多糖组分与刚果红络合物最大吸收波长与 NaOH 浓度关系如图 6 所示。L0 和 L1 在 NaOH 浓度小于 0.3 mol/L 时,最大吸收峰与对照组相比发生红移,说明 L0 和 L1 中存在三螺旋结构,与刚果红络合后在 NaOH 作用下发生一定的红移,当 NaOH 浓度大于 0.3 mol/L 时,最大吸收波长开始表现出下降趋势,表明三螺旋结构解体,变成没有规则的自由卷曲状态;而 L2 和 L3 最大吸收波长随着 NaOH 浓度增加一直下降,与对照组趋势相似,没有发生红移,表明 L2 和 L3 中不含有三螺旋结构。

2.7　对 DPPH 自由基清除能力

纯化前后不同多糖组分对 DPPH 自由基清除效果如图 7 所示,在 DPPH 自由基清除实验中,4 个组分与标准抗氧化剂 VC 相比,对 DPPH 自由基均有一定的清除作用,并且随着浓度升高,对 DPPH 清除作用逐渐增大,4 个多糖组分均在 8 mg/mL 时,清除率达到最大,分别为 L0 (66.06±1.16)%、L1

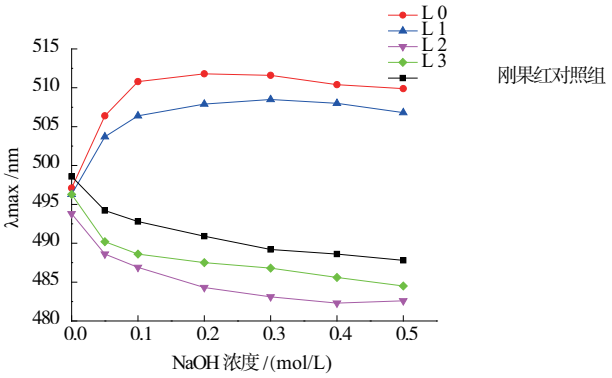


图 6　刚果红络合物随 NaOH 浓度改变其最大吸收波长的变化

Fig 6　Maximum absorption of Congo red complex in solution with various concentrations of NaOH

(64.22±1.10)%、L2(56.53±0.91)%、L3(33.61±0.55)%；VC 活性明显高于各个组分，在 2 mg/mL 时就达到 92.50%。同时纯化前后多糖组分对 DPPH 清除能力有一定的差异，L0 对 DPPH 清除能力最强，可能是因为未纯化的 L0 中含有蛋白质以及其他的活性物质，使其在和多糖的共同作用下对 DPPH 有更好的清除作用。而纯化后的 3 个组份中，L1 清除效果明显高于 L2 和 L3。

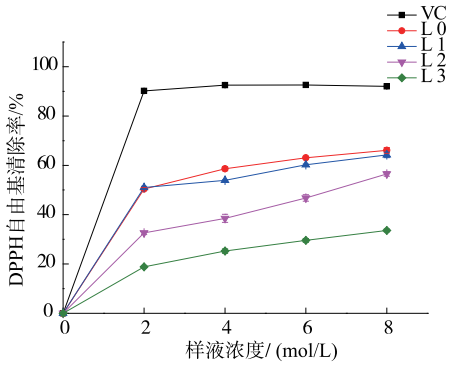


图 7　香菇多糖对 DPPH 自由基的清除能力

Fig 7　DPPH free radical scavenging capacities of different polysaccharides fractions

2.8　对羟自由基的清除能力

纯化前后不同组分对羟自由基清除能力如图 8 所示，在羟自由基清除实验中，虽然四个多糖组分与标准抗氧化剂(VC)相比，VC 在 2 mol/L 时对羟自由基清除率已经达到(97.11±0.483)%，但是 4 个多糖组分对羟自由基扔有一定的清除能力，并且随着样液浓度提高，清除作用逐渐升高，均在 8 mg/mL 时达到最大，分别为 L0(29.31±1.03)%、L1(25.55±0.48)%、L2(21.41±0.50)%、L3(18.50±0.44)%。未纯化多糖组分 L0 对羟自由基清除能力高于纯化后的样品，纯化后的样品 L1 清除能力与 L0 接近，明显高于 L2 和 L3 组分，而 L2 和 L3 对羟自由基的清除活性较为相似。

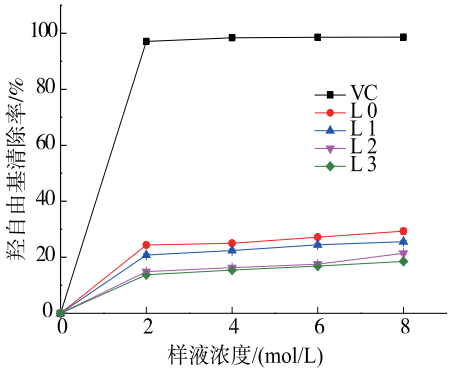


图 8　香菇多糖对羟自由基的清除能力

Fig 8　Hydroxyl radical scavenging capacities of different polysaccharides fractions

2.9　对超氧离子清除能力

纯化前后不同组分对超氧阴离子清除能力如图 9 所示，在超氧阴离子清除实验中，VC 对超氧阴离子的清除作用明显高于 4 个多糖组分，在 2 mg/L 时即达到(97.47±0.54)%，而 4 个多糖组分对超氧阴离子清除能力较为接近，其中 L0 清除能力最强，在 8 mg/mL 时最大，可以达到(19.90±0.46)%，L1 清除能力高于 L2 和 L3 组分，而当质量浓度大于 7 mg/mL 时，L3 的清除能力超过 L2。

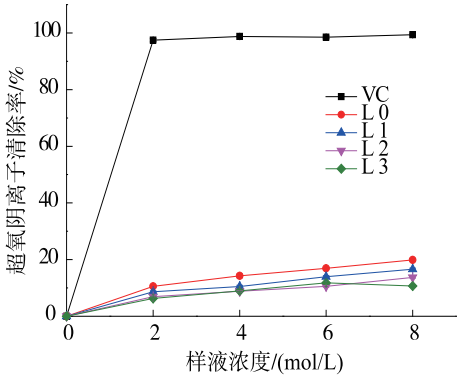


图 9　香菇多糖对超氧离子的清除能力

Fig 9　Superoxide anion radical scavenging capacities of

2.10　抑菌活性的测定

2.10.1　*不同多糖组分的抑菌活性*　不同多糖组分对金黄色葡萄球菌的抑制作用如表 1 所示，L2 和 L3 多糖组分对金黄色葡萄球菌均无抑制作用；L0 和 L1 多糖组分对金黄色葡萄球菌均有一定的抑制作用，其中 L1 对金黄色葡萄球菌的抑制作用比 L0 好，说明纯化后的多糖具有更好的抑菌作用，可能

由于 L1 经纯化后其中活性多糖成分含量更高,使其对金黄色葡萄球菌有更好的抑菌作用。

表 1　香菇不同多糖组分的抑菌活性

Table 1　Antimicrobial activities of different polysaccharides fractions

样品	对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径/mm
L0	15.7±0.65
L1	22.1±0.83
L2	6.0±0.92
L3	6.0±0.96
对照组	6.0±0.00

注:滤纸片直径为 6 mm,实验组香菇多糖溶液浓度为 10 mg/mL,对照组为蒸馏水,“-”表示没有抑制作用。

2.10.2　*香菇不同多糖组分的最小抑制浓度*　以金黄色葡萄球菌为供试菌株,研究不同组分多糖的最小抑菌浓度(MIC),结果如表 2.所示,L0 和 L1 对金黄色葡萄球菌的最小抑制质量浓度分别为 5 mg/mL 和 2.5 mg/mL,纯化后的多糖组分 L1 对金黄色葡萄球菌的最小抑制浓度明显低于未纯化组分 L0。

表 2　香菇不同多糖组分的最小抑菌浓度

Table 2　The MIC of different polysaccharides fractions

多糖样液质量浓度/(mg/mL)	L0	L1
10	+++	+++
5.0	++	++
2.5	-	+
1.25	-	-
0.625	-	-

注:“-”表示无抑菌圈;“+”表示抑菌圈在 5-8mm;“++”表示抑菌圈在 8-11mm;“+++”表示抑菌圈在 11mm 以上。

3 结　语

作者前期对不同生长发育期香菇子实体不同醇沉组分粗多糖结构和生物活性进行了研究,发现香菇未成熟期子实体粗多糖体积分数 20%醇沉组分具有最优的生物活性,由于粗多糖中含有的也会对活性有一定的影响,为了进一步探究香菇粗多糖中的色素和蛋白质等物质对其生物活性的影响,作者通过对香菇未成熟期子实体粗多糖体积分数 20%醇沉组分进行纯化，比较纯化前后香菇多糖的结构及其生物活性差异。

供试样品的结构分析结构显示:紫外光谱扫描图谱表明 L1、L2 和 L3 不含有核酸和蛋白质,而 L0 出现较强的核酸和蛋白质吸收峰;根据红外光谱扫描和 SEM 分析,发现纯化前后香菇多糖均含有显著的多糖特征吸收峰,并且都能观察到其中起活性作用的主要部位 β-糖苷键,L0 可能由于不同的分子或者分子基团聚集成不同形态的聚集体而呈现纤维状，但是 L1 呈现出有褶皱的块状,L2 和 L3 呈现碎屑状堆积,进一步证明了纯化后多糖中物质或者种类发生了变化；刚果红结果表明,L1 中仍保留了 L0 中存在的三螺旋结构,而 L2 和 L3 中三螺旋结构已经消失;粘均相对分子质量的测定结果,发现纯化后的香菇多糖粘均相对分子质量明显降低,并且随着洗脱浓度的增大,相对分子质量越来越小。

供试样品的生物活性测定结果显示:尽管各多糖组分与阳性对照 VC 相比,其抗氧化活性都较低,但是由于多糖是一种大分子化合物,在相同浓度下低于 VC 属于正常情况，因此这 4 个多糖组分均具有一定的抗氧化活性，但其中 L0 表现出更好的抗氧化活性,说明可能是其中蛋白质或者其他的活性物质与多糖的共同作用,使其具有更好的抗氧化能力,抗氧化活性和结构之间的联系还需要进一步的研究。香菇多糖组分对金黄色葡萄球菌的抑菌试验结果表明 L0 和 L1 对金黄色葡萄球菌具有明显的抑制作用,而 L2 和 L3 对金黄色葡萄球菌均无抑制作用,可能是因为 L0 和 L1 中含有更多的活性成分 β-葡聚糖,同时三螺旋结构的存在也可能增加其对金黄色葡萄球菌的抑制作用。

致谢:感谢湖北裕国菇业股份有限公司提供支持。

参考文献:

[1] DAI Yu-cheng, ZHOU Li-wei, YANG Zhu-liang. A revised checklist of edible fungi in China [J]. **Mycosystema**, 2010, 1: 1-21. (in Chinese)

[2] CHEN Y, MAO W J, YANG Y P, et al. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2012, 87(1): 218 - 226.

[3] 郭振环. 硫酸化香菇多糖的抗病毒和增强免疫活性及其与其他几种硫酸化多糖的比较[D]. 南京:南京农业大学,2010.[4]

LI Shi-jun,WANG Kai-ping,WANG Liu,GU Ming,ZENG Fang,ZHANG Yu. Isolation,purification,structural elucidanton,and antitumor activity in vitro of lentinan LNT2[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**,2014,45(09):1232-1237. (in Chinese)

[5] 曾琳娜. 香菇多糖降脂作用的评估及分子机制的研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2016.

[6] ZHANG Chao,WANG Han-wen,YANG Yan,et.al. Effect of Different Edible Fungi on the Bioactivity of Anti-Insulin Resistance in Insulin Resistant Cells[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2017,36 (01): 22-26. (in Chinese)

[7] ZHOU Leng,TANG Wen-tai,WANG Gang. Regulatory Effect of lentinan on immune function of ulcerative colitis rats and its mechanism study[J]. **China Pharmacy**,2016,27(22):3044-3047. (in Chinese)

[8] 单联刚.香菇多糖无机陶瓷膜超滤法提纯工艺优化研究[J]. 吉林农业,2016(03):85.

[9] TANG Qing-jiu,WANG Shu-lei,WANG Chen-guang,LIU Yan-fang,ZHANG Zhong,ZHOU Shuai,LIANG Jing-yu. Studies on Mononucleoside Components of Lentinula edodes Fruiting Bodies[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2017,36(03): 283-286. (in Chinese)

[10] CHEN Wan-chao,YANG Yan,LI Wen,et al. Analysis of volatile components in Lentinula edodes by SPME-GC-MS and establishment of fingerprint[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,35(10):1074-1080. (in Chinese)

[11] JI Chen-feng,YUE Lei. Study on the chemical structure and anti-tumor effect of mushroom polysaccharide[J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**,2016,34(10):1074-1080. (in Chinese)

[12] WEI Yuan. Analysis of the chemical structure and antioxidant activity of lentinus polysaccharide[J]. **Jiangsu agricultural science**, 2016,34(10):1074-1080. (in Chinese)

[13] 耿安静.香菇多糖的制备、结构特性和生物活性的研究[D].广州:华南理工大学,2010.

[14] LIANG Zhong-yan,ZHANG Yi-shen. An Investigation of water soluble polysas-charide from clitoplus caespitosus pk. (I) -solution,purification and identification of its structure [J]. **Chemical Research In Chinese Universtties**,1983(03):364-370. (in Chinese)

[15] ZHNG Wei-jie.Biochemical research techniques of sugar complex[M]. **Zhejiang University Press**,1999. (in Chinese)

[16] MEI Guang-ming,HAO Qiang,ZHANG Xiao-jun,Guo Yuan-ming,CHEN Xue-chang. Purification and Structural Analysis of a Polysaccharide from Lentinusedodes Extracted using an Acid Solution[J]. **Modern Food Science and Technology**,2014,30 (09):79-84. (in Chinese)

[17] LIU Yong,DU Yi-qun,WANG Jun-hui,ZHANG Xue-qiang,ZHANG Jian-bo.Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2014,?64:63-68.

[18] ZHU Lian-cai,TAN Jun,WANG Bo-chu,HE Rui.,LIU Yuping,ZHENG Chao. Antioxidant activities of aqueous extract from Agrimonia pilosaLedeb and its fractions[J]. **Chemistry & Biodiversity**,2009,6(10):1716-1726.

[19] ZHAO Yan-hong,LI Jian-ke,ZHAO Wei,WU Xiao-xia. Evaluation on Antioxidant Activities of Extracts from Common Edible and Medicinal Plants in vitro[J]. **Food Science**,2009,30(3):104-108. (in Chinese)

[20] HU Guo-yuan,LI Chao-ying,CHEN M,ZHANG Q,ZHANG Z. Extraction and antimicrobial acvitivies of polysaccharide from Lentinus edodes and Flammulina velutipes[J]. **Journal of Wuhan Institute of Technology**,2013,35(06):30-34. (in Chinese)

[21] ZHANG Tang-wei,YANG Le,LIU Qing-hai,et al. Antioxidant and antimicrobial activities of nostoc commune polysaccharide[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(6):868-873. (in Chinese)

[22] PAN Feng,YAO Yu-xin,TANG Xin,WU Wei. Physicochemical property and antioxidant activity of exopolysaccharide produced by endophytic fungal *Fusarium redolens* 6WBY3 isolated from Fritillaria unibracteata var. Wabuensis[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,2017,57(02): 240-253. (in Chinese)

[23] Zheng YF,Zhang Q,Liu XM,Ma L,Lai F. Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on Magnolia kwangsiensis Figlar & Noot[J]. **Carbohydrate Polymers**,2016,142: 98-104.

[24] Ge Y,Duan YF,Fang GZ,Zhang Y,Wang S. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. francheti: isolation, purification,structural features and antioxidant activities[J]. **Carbohydrate Polymers**,2009,77(2): 188-193.