

魏元. 香菇多糖的化学结构与抗氧化活性分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(11): 305–308.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.091

香菇多糖的化学结构与抗氧化活性分析

魏元

(包头轻工职业技术学院, 内蒙古包头 014035)

摘要:对香菇多糖(*Lentinus edodes* polysaccharides, LPS)经过离子交换柱层析和凝胶柱层析法得到的 2 种组分(LPS-1 和 LPS-2)的化学结构特征进行分析,旨在为香菇多糖的构效关系研究提供依据。采用高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱(GC)、红外光谱(IR)分析等手段对其化学结构特征进行解析,并对其抗氧化活性进行分析。构成糖分析结果显示, LPS-1 单糖组成为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖,其物质质量之比为 1.52 : 2.96 : 2.91 : 0.78 : 1.00 : 1.35; LPS-2 的单糖组成为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖和半乳糖,其物质质量之比为 2.91 : 1.00 : 1.10 : 0.20 : 0.50。LPS-1 和 LPS-2 均有较强的抗氧化活性, LPS-2 更为显著。结果表明,香菇多糖主要是阿拉伯糖和鼠李糖组成的吡喃型多糖,有较强的抗氧化活性。

关键词:香菇;多糖;化学结构;抗氧化

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0305-04

香菇(*Lentinus edodes*)别称花菇、香菌、香蕈、冬菇、香菇,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、富含多种生物活性物质,如多糖、维生素、蛋白质、多元酚、朴菇素、膳食纤维等。香菇多糖是香菇中最重要的一种生物活性物质,作为一种免疫促进剂,已引起人们广泛的兴趣。香菇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^[1-2]。有关香菇多糖的药理研究,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。本研究对香菇多糖(*Lentinus edodes* polysaccharides, LPS)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 LPS-1 和 LPS-2 的分子量、单糖组成、键型和抗氧化活性,为香菇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

1.1.1 试验材料 本研究所用的香菇多糖是以山东荣丰食用菌有限公司生产的香菇为材料,经过热水浸提、乙醇沉淀、透析等方法分离而成。

1.1.2 试验试剂 30% H₂O₂ (天津市凯通化学试剂有限公

司);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);浓硫酸(淄博化学试剂厂有限公司);浓盐酸(淄博化学试剂厂有限公司);三氯乙酸(天津大茂化学试剂厂)。

1.1.3 试验仪器 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(日本岛津公司);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);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的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进行测定,绘制洗脱曲线。

收稿日期:2015-08-27

基金项目:现代农业产业技术体系食用菌产业创新团队(编号:SDAIT-11-011-07)。

作者简介:魏元(1980—),男,山东青岛人,硕士,讲师,主要从事农产品检验研究。E-mail:15588894651@163.com。

[4]史先敏,严泽民,谢静红,等.白藜芦醇的光稳定性和热稳定性研究[J].日用化学工业,2011,41(3):204-207.

[5]叶秋雄,黄苇.白藜芦醇苷的稳定性研究[J].食品工业科技,2011,32(4):155-156.

[6]韩晶晶,刘炜,毕玉平.白藜芦醇的研究进展[J].生物工程学

报,2008,24(11):1851-1859.

[7]张煜梅,黄健花,金青哲,等.反式及顺式白藜芦醇光稳定性分析[J].食品与发酵工业,2013,39(11):250-252.

[8]范金波,蔡茜彤,冯叙桥,等.5种天然多酚类化合物抗氧化活性的比较[J].食品与发酵工业,2014,40(7):77-83.

1.5 多糖的分子量测定

采用高效液相色谱法 (HPLC) 对多糖的分子量进行测定^[5]。用高效液相色谱仪 (1260 型, 美国安捷伦科技有限公司), SHODEX SB-806 HQ 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 μ L, 流速为 0.5 mL/min, 柱温保持 5 $^{\circ}$ C。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 $\lg Mw$ (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: $\lg Mw = 1 - 0.3429ET + 11.975$, $r^2 = 0.9991$ 。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量。

1.6 构成糖分析

糖样品经过酸加热完全水解 (0.25 mol/L H_2SO_4 、100 $^{\circ}$ C、16 h), 或者不经过水解处理, 按照 Blakeney 等的方法^[6]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 (日本岛津公司的岛津 GC-14C、柱温 210 $^{\circ}$ C、 N_2 流速 30 mL/min), 分离柱为日本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 分析仪采用铂金埃尔默仪器有限公司的 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 乙醇 (质量浓度 95%) 或 DPPH (0.1 μ mol/L), 2 mL 不同浓度的多糖溶液 (100 ~ 1000 mg/L)。反应混合物在 25 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 在 517 nm 处测定吸光度^[7]。羟基自由基清除能力测定采用 Smironff 等的方法^[8]。多糖还原力的测定采用 Oyaizu 等的方法^[9]。

2 结果与分析

2.1 香菇多糖的组分离纯化

采用 DEAE-纤维素柱对 LPS 进行组分离, 分别利用蒸馏水和 0.2、0.5、1.0 mol/L NaCl 溶液作为流动相对 LPS 洗脱, 如图 1 所示, 得到 2 个组分 (LPS-1 和 LPS-2)。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, LPS-1 和 LPS-2 均分离得到 1 个单一的洗脱峰, 表明 LPS-1 和 LPS-2 均为纯多糖。对 LPS-1 和 LPS-2 进行紫外光谱扫描 (ultraviolet spectrum, UV), 试验结果显示 LPS-1 和 LPS-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。

2.2 化学结构分析

用高效液相色谱分析多糖分子量, 可知 LPS-1 的数均分子量为 5.77×10^4 u, 重均分子量为 5.47×10^4 u, Z 均分子量为 7.16×10^5 u, Z+1 均分子量为 8.97×10^5 u; LPS-2 的数均分子量为 4.58×10^3 u, 重均分子量为 1.77×10^3 u, Z 均分子量为 1.55×10^4 u, Z+1 均分子量为 4.49×10^4 u (图 3)。

根据标样的保留时间来测定单糖的含量, 由表 1 可知, LPS-1 主要含有鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖, 它们的含量分别为 11.4%、30.0%、27.1%、8.0%、9.1%、

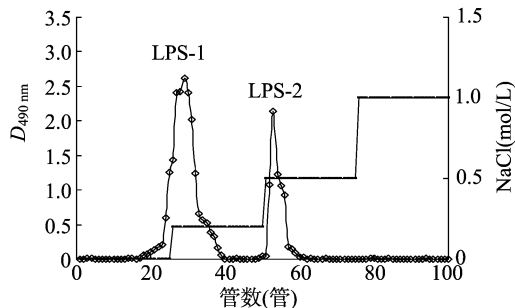


图1 香菇多糖的 DEAE-纤维素离子交换柱层析洗脱曲线

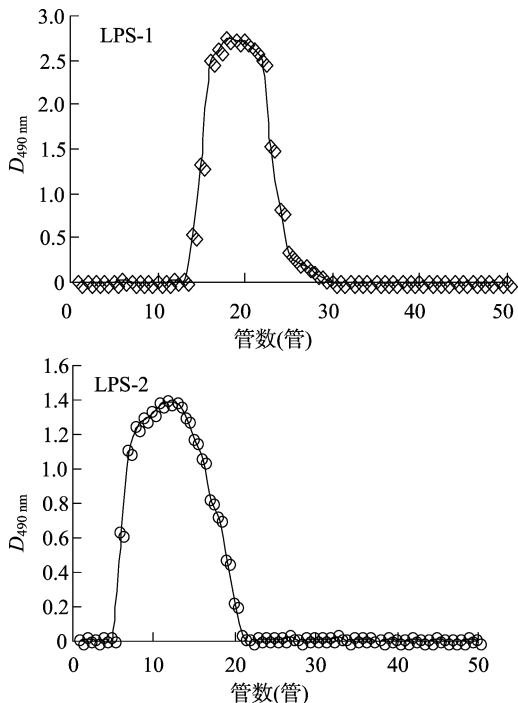


图2 2 种多糖组分的葡聚糖 G-100 凝胶层析洗脱曲线

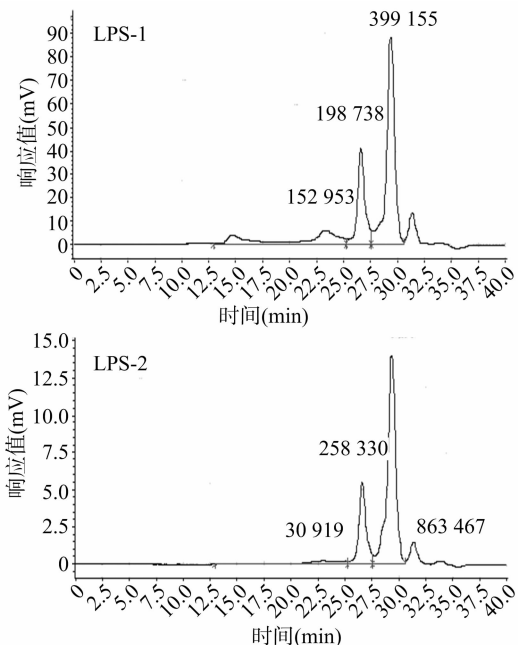


图3 2 种多糖高效液相色谱图分析

表 1 气相色谱结果

序号	单糖名称	含量(%)	
		LPS-1	LPS-2
1	鼠李糖	11.4	44.7
2	D-核糖	—	—
3	阿拉伯糖	30.0	20.9
4	木糖	27.1	19.9
5	肌醇	—	—
6	甘露糖	8.0	—
7	葡萄糖	9.1	3.6
8	半乳糖	14.3	10.8

注:—表明多糖组分中不含有该单糖。

14.3%,其物质质量之比为 1.52 : 2.96 : 2.91 : 0.78 : 1.00 : 1.35,从这些数据可以看出,LPS-1 含量最多的单糖是阿拉伯糖和木糖。LPS-2 主要含有鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖,它们的含量分别为 44.7%、20.9%、19.9%、3.6%、10.8%,其物质质量之比为 2.91 : 1.00 : 1.10 : 0.20 : 0.50,可

以看出 LPS-2 含量最多的单糖是鼠李糖和阿拉伯糖。

由图 4 可知,LPS-1 在 $2\,927.76\text{ cm}^{-1}$ 和 $3\,418.64\text{ cm}^{-1}$ 附近有明显的吸收峰,主要由—OH 和 C—H 的伸缩振动引起^[10]。而 $1\,642.63\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰说明 LPS-1 中含有酰胺羰基。 $1\,371.95\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰为 C=O 对称伸缩振动引起, $1\,415.40\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰为 C—H 变角振动引起,在 $1\,023.73$ 、 $1\,082.21$ 、 $1\,156.03\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是糖环上的 C—O 和 O—H 伸缩振动引起,这表明 LPS-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-葡萄糖吡喃环非对称环伸缩振动引起。

由图 5 可知,在 $2\,923.65\text{ cm}^{-1}$ 和 $3\,441.87\text{ cm}^{-1}$ 附近有有较强的吸收峰,2 个峰分别由—OH 和 C—H 的伸缩振动引起^[10]。在 $1\,416.11\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰为 C—H 变角振动引起, $1\,623.67\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰说明 LPS-2 中含有酰胺羰基。在 $1\,156.11$ 、 $1\,079.99$ 、 $1\,024.15\text{ cm}^{-1}$ 处的为 C—O 和 O—H 伸缩振动引起的,这表明多糖中含有 D-吡喃环^[11]。

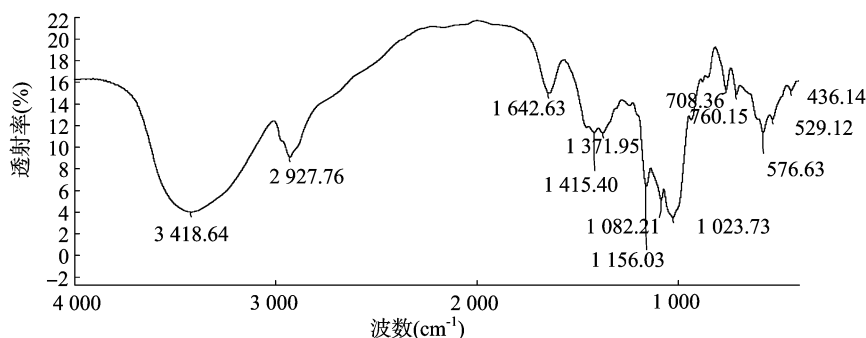


图 4 LPS-1 的红外光谱

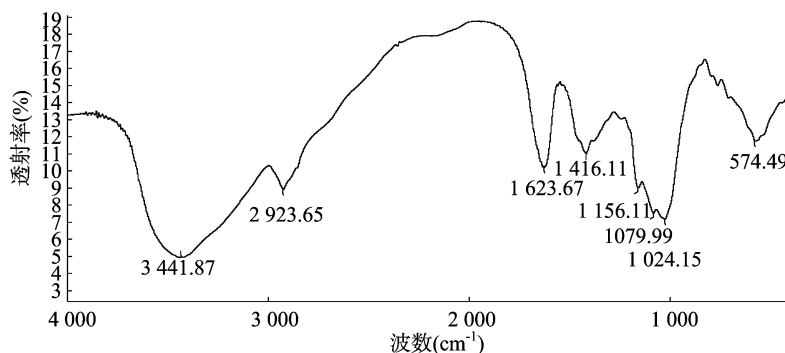


图 5 LPS-2 的红外光谱

2.3 2 种组分的体外抗氧化活性

2.3.1 LPS-1 和 LPS-2 对 DPPH· 的清除作用 图 6 为 LPS-1 和 LPS-2 对 DPPH· 的清除作用,在浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,LPS-1 和 LPS-2 对 DPPH· 的清除率分别为 $(29.35 \pm 0.69)\%$ 和 $(74.21 \pm 1.65)\%$ 。据报道,当浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,灵芝多糖对 DPPH· 的清除率为 15.00% ^[12]。LPS-2 的 EC_{50} 为 $(48 \pm 0.05)\text{ }\mu\text{g/mL}$ 远远高于灵芝多糖 ($1\,000.00\text{ }\mu\text{g/mL}$)^[12]。结果表明,LPS-2 对 DPPH· 具有较高的清除率。

2.3.2 LPS-1 和 LPS-2 对羟基自由基的清除作用 LPS-1 和 LPS-2 对羟基自由基的清除作用见图 7。在 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时 LPS-1 和 LPS-2 对羟基自由基的清除率分别为 $(12.51 \pm$

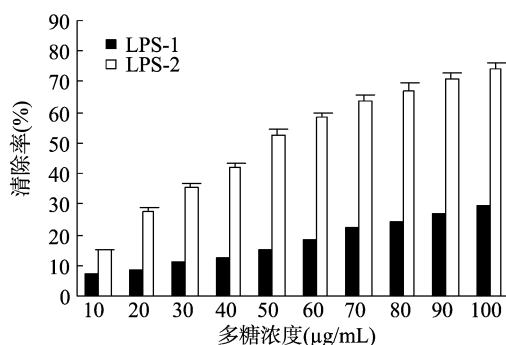


图 6 LPS-1 和 LPS-2 对 DPPH· 的清除作用

$1.02)\%$ 和 $(69.94 \pm 4.81)\%$ 。据相关报道,当浓度为

100 $\mu\text{g/mL}$ 时,灵芝多糖对羟基自由基的清除率为 29.00%^[13],白灵菇多糖对羟基自由基的清除率为 39.50%^[14]。即 LPS-2 对羟基自由基的清除作用是灵芝多糖的 2.41 倍,白灵菇多糖的 1.77 倍。

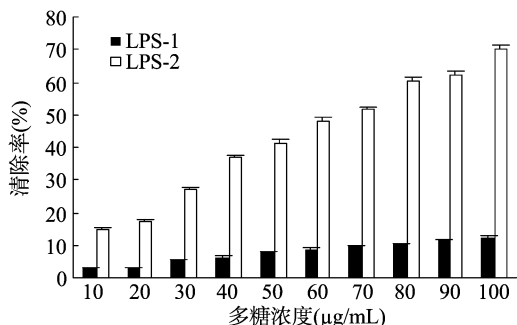


图7 LPS-1 和 LPS-2 对羟基自由基的清除作用

LPS-2 的 EC_{50} 为 $(69.00 \pm 0.05) \mu\text{g/mL}$ ($P < 0.01$),比灵芝菌丝体多糖低 240.00 $\mu\text{g/mL}$ ^[13],比白灵菇低 640.00 $\mu\text{g/mL}$ ^[14],结果表明 LPS-2 对羟基自由基有较强的清除能力。

2.3.3 LPS-1 和 LPS-2 的还原力测定 由图 8 可见,在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,LPS-1 和 LPS-2 在 700 nm 处测得的还原力分别为 0.22 ± 0.003 和 0.42 ± 0.05 ,LPS-2 的还原力比白灵菇、金针菇、美味牛肝菌分别高 0.37、0.25、0.24^[15]。说明 2 种组分都具有非常强的还原力,LPS-2 的还原力更为显著。

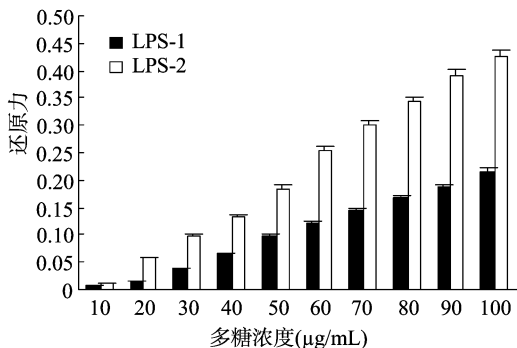


图8 LPS-1 和 LPS-2 的还原力测定

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,LPS 分离得到多糖组分分别为 LPS-1 和 LPS-2。利用气相色谱法测定了 LPS-1 和 LPS-2 单糖的组成。发现 LPS-1 中主要含有阿拉伯糖和木糖,LPS-2 中主要含有鼠李糖和阿拉伯糖,LPS-1 和 LPS-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 LPS-1、LPS-2 在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 区段进行扫描,结果显示,2 种多糖均为 D-吡喃型。其中,在 LPS-2 中检测到脂肪族 C-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不同,所以目

前没有单一的方法可以一次性准确地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清除能力、还原力和 DPPH·清除能力 3 个指标对香菇多糖组分的体外抗氧化活性进行测定。结果显示,LPS-1 和 LPS-2 对 DPPH·、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 LPS-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, 1956,28(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(2):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):1057-1060.
- [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] Xiang Z. Quick isolation and purification of extracellular polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill and elementary property analysis [J]. Food Science, 2005,26(4):014.
- [11] Liu X L, Zhao M M. Antioxidant activities and functional composition content of selected *Phyllanthus emblica* fruits juice [J]. Food and Fermentation Industries, 2006,32(5):151-154.
- [12] 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.
- [13] Zhang J, Zhang Z C, Wang Y H. Studies on water soluble polysaccharides from the mycelia of *Ganoderma lucidum* by alkaline extraction[J]. Food Sci Biotechnol, 2005,24(3):98-100.
- [14] Ma S F, Chen L M, Xu H N, et al. Isolation, purification, and anti-oxidative activity of exopolysaccharide from *Pleurotus nebrodensis*[J]. Jiangsu J Agr Sci, 2010,26(1):157-162.
- [15] Chen X, Gong L, Liu G H. Extraction and reducing antioxidant power of polysaccharides from edible fungi[J]. Food Science, 2010,31(14):140-144.