

新型铜绿菇多糖的制取、结构性质 及其抗氧化活性的研究

贾金霞,任晓婕,李宝花,王昱沅*

(南京农业大学食品科技学院,江苏南京 210095)

摘要:以铜绿菇子实体为原料,结合单因素实验和响应面法首次建立其多糖的水提醇沉工艺,对于所获得粗提物再利用 DEAE-纤维素-52 和 Sephadex G-150 分离纯化得到两种铜绿菇多糖,并采用高效凝胶过滤色谱法和单糖柱前衍生法对其进行相对分子量和单糖组成的测定,通过红外扫描和刚果红实验研究其结构性质,利用扫描电镜和原子力显微镜观察其形貌,最后对其抗氧化活性进行初探。研究结果表明,铜绿菇多糖在提取温度为 84 ℃,提取时间 2.6 h,料液比 1:23 g/mL 的最佳提取条件下,得率达 4.30%;纯化后所获得两种新型多糖的相对分子量分别为 18.05 kDa 和 2398.83 kDa,具有典型的多糖特征吸收峰,其中一种多糖具有三股螺旋结构。Crude RLP、RLP-1-1 和 RLP-2-1 的 DPPH 自由基清除率分别为 41.19%、38.97% 和 39.27%,而它们的金属离子螯合率分别为 29.83%、27.81% 和 51.96%,铜绿菇多糖表现出一定的抗氧化活性。

关键词:铜绿菇,多糖,结构,抗氧化活性

Study on the Preparation, Structure, Properties and Antioxidant Activity of New Polysaccharides from *Russula aeruginea* Lindb.: Fr

JIA Jin-xia, REN Xiao-jie, LI Bao-hua, WANG Yu-feng*

(School of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Using the fruiting bodies of *Russula aeruginea* Lindb.: Fr as raw materials, the water extraction and alcohol precipitation process of its polysaccharides were established by single factor experiments and response surface method. Two kinds of polysaccharides were obtained from the crude extracts by DEAE-cellulose-52 and Sephadex G-150. The relative molecular weight and monosaccharide composition were determined by high performance gel filtration chromatography and monosaccharide precolumn derivatization. And their structure and properties were studied by infrared scanning and Congo red experiment. The morphology was observed by scanning electron microscope and atomic force microscope, and their antioxidant activities were preliminarily studied. The results showed that the yield of polysaccharides from *Russula aeruginea* Lindb.: Fr reached 4.30% under the optimum conditions of extraction temperature 84 ℃, extraction time 2.6 h and solid-liquid ratio 1:23 g/mL. The relative molecular weight of the two new polysaccharides after purification was 18.05 kDa and 2398.83 kDa, respectively; They had typical characteristic absorption peaks of polysaccharides, one of which has three helix structures. The scavenging rates of DPPH free radicals by Crude RLP, RLP-1-1 and RLP-2-1 were 41.19%, 38.97% and 39.27%, while their metal ions chelating rates were 29.83%, 27.81% and 51.96%, respectively. The polysaccharides from *Russula aeruginea* Lindb.: Fr showed certain antioxidant activity.

Key words: *Russula aeruginea* Lindb.: Fr; polysaccharide; structure; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)05-0188-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.031

引文格式: 贾金霞,任晓婕,李宝花,等. 新型铜绿菇多糖的制取、结构性质及其抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 188-194, 200.

铜绿菇又名铜绿红菇、青脸菌、紫菌,是红菇科、红菇属的一种^[1],在我国多地均有分布,其子实体一般呈暗铜绿色,形态表现为中部稍下凹的扁半球形。

因其色味鲜美,粗纤维、多糖、蛋白质和氨基酸等含量丰富被人们所喜爱^[2-4]。

多糖是组成食用菌的一种大分子碳水化合物,

收稿日期: 2019-05-06

作者简介: 贾金霞(1990-),女,硕士研究生,研究方向:天然化学产物, E-mail: 2016108053@njau.edu.cn。

* 通讯作者: 王昱沅(1976-),男,博士,副教授,研究方向:生物分离和食品功能因子, E-mail: joywangyu@sina.com。

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK20171379)。

在生命过程起着能量和结构物质的作用,同时具有多种生物活性,如抗氧化、抗肿瘤、促进伤口的愈合作用和免疫刺激活性^[5-9]。食用菌多糖具有生物相容性、可生物降解性、无毒和无免疫原性等特点,被广泛应用于在食品、医疗保健和化妆品行业^[10]。铜绿菇作为一种在我国广泛分布的药食同源大型食用菌,具有安全低毒性的特点,研究其富含的菌多糖有利于其药用价值的推广^[11]。国内外研究者对铜绿菇的研究仅集中于探究纯培养条件、野生菌种分离以及子实体核糖核酸酶的提取及活性研究^[12-14],而在子实体多糖的提取、分离纯化、结构性质和体外抗氧化活性等方面研究尚未见任何报道。

本研究首次建立新型铜绿菇多糖的制备工艺,初步探索其两种纯化多糖的结构性质和抗氧化活性,为铜绿菇及其多糖的进一步在食品、药品及功能性食品中的研究和利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

铜绿菇 云南楚雄哀山; DEAE-纤维素-52、Sephadex G-150 索莱宝公司;单糖标准品、菲咯啉、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) Sigma 公司;1-苯基-3 甲基-5-吡唑啉酮(PMP) 阿拉丁公司;其他试剂 均为国产分析纯。

RE52-99 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; S-4800 酶标仪 Thermo 公司; HL-2S 恒流泵 上海沪西分析仪器有限公司; LC-20AD 岛津高效色谱仪 岛津公司; Nicolet IR200 红外光谱仪 Nicolet 公司; SU8010 扫描电镜 日立公司; Dimension Icon 原子力显微镜 布鲁克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程及铜绿菇多糖得率的测定 根据文献^[15]并进行了适当修改,采用水提醇沉法提取粗多糖。将铜绿菇子实体烘干制粉过 50 目筛后备用。首先取 5.0 g 菇粉,按料液比 1:20 (g/mL)与蒸馏水混合,在 80 ℃的水浴锅中浸提 2 h,浸提结束后将浸提液以 5000 r/min 离心 10 min,将离心后的上清液浓缩至 20.0 mL。加入 80.0 mL 的 95% (v/v)乙醇醇沉 10 h,真空抽滤醇液,后依次用无水乙醇、丙酮和无水乙醚洗涤各 3 次,得到铜绿菇粗多糖(Crude RLP)。铜绿菇多糖的含量测定参考文献^[16],绘制葡萄糖标准曲线为 $y = 17.96786x - 0.01432$ ($R^2 = 0.99396$),线性范围为 0~60 μg/mL,并计算铜绿菇多糖得率:

多糖得率(%) = 提取的多糖质量/铜绿菇菇粉质量 × 100

1.2.2 多糖提取条件的优化

1.2.2.1 单因素实验 按照 1.2.1 提取多糖,分别研究提取温度、提取时间和料液比对多糖得率的影响。首先在提取时间和料液比分别为 2.0 h 和 1:20 g/mL 时,研究提取温度 50、60、70、80 和 90 ℃对多糖得率的影响;然后在料液比和提取温度分别为 1:20 g/mL 和 80 ℃时,研究提取时间 1.0、2.0、3.0 和 4.0 h 对多糖得率的影响;最后在提取温度和提取时间分别为

80 ℃和 2.0 h 时,研究料液比 1:10、1:20、1:30、1:40 和 1:50 g/mL 对多糖的得率的影响。

1.2.2.2 响应面试验设计 根据 1.2.2.1 的单因素的结果,应用 Box-Behnken 中心组合设计,以铜绿菇多糖得率为响应值,以提取温度、提取时间和料液比为自变量,设计如表 1 的三因素三水平表并进行响应面试验设计。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels table for Box-Behnken design(BBD)

因素	编码水平		
	-1	0	1
A 提取温度(℃)	70	80	90
B 提取时间(h)	1.0	2.0	3.0
C 料液比(g/mL)	1:10	1:20	1:30

1.2.3 多糖的分离纯化 参考文献^[17]并进行适当修改,取 100 mg 的粗多糖(Crude RLP)溶于 10.0 mL 的去离子水中,糖液离心后取上清液,上样于装柱体积为 1 BV 的 DEAE-纤维素-52 层析柱(26.0 mm × 300.0 mm),依次用去离子水和 0.10 mol/L 的 NaCl 洗脱,以 1.15 BV/h 流速,10 min/管收集。取奇数管用苯酚硫酸法检测每管的吸光值 A_{490} ,绘制 A_{490} 随管数变化洗脱曲线。将不同洗脱液下的收集物分别浓缩、透析除杂和冻干,得到 RLP-1 和 RLP-2 两种初级纯化多糖。

参考文献^[18]并作适当修改,称取 RLP-1 和 RLP-2 各 30.0 mg 溶于 3.0 mL 去离子水中,离心后取上清液,上样于装柱体积 1 BV 的 Sephadex G-150 层析柱(16.0 mm × 300.0 mm);以 0.35 BV/h 的流速,10 min/管收集。同理绘制洗脱曲线和收集纯化组分,得到两种最终纯化产物即 RLP-1-1 和 RLP-2-1。(1 BV = 52.0 mL)

1.2.4 相对分子质量测定 采用高效凝胶过滤色谱法^[19],将葡聚糖标准品和铜绿菇纯化多糖样品分别配制成 5.0 mg/mL,过 0.45 μm 的滤膜,上样于配备 ELSD 检测器和 TSK G4000PW_{XL}(7.8 mm × 300 mm)柱的 LC-20AD 高效液相色谱仪,在柱温为 35 ℃条件下,进样 20 μL,用流速 0.5 mL/min 的去离子水洗脱,以保留时间为横坐标,葡聚糖相对分子质量的对数值为纵坐标做标准曲线,将样品保留时间带入计算其相对分子质量。

1.2.5 单糖组成测定 HPLC 检测条件:使用的 LC-20AD 高效液相色谱仪,检测器为 SPD-20A,检测柱为 RP-C₁₈(4.6 mm × 250 mm),柱温条件 30 ℃,进样量 20 μL,流速 1.0 mL/min,流动相为用 PBS (0.1 mol/L, pH6.7)和乙腈按 83:17 的比例混合的混合液。

参考文献^[18]进行 PMP 衍生,取 10 种单糖标准品各 5.0 mg,将其混合并溶解到 1.0 mL 去离子水中。取 0、12.5、25、50、100 μL 的单糖标准品混合液并补水至 100 μL,分别加入 100 μL NaOH 溶液(0.6 mol/L)均匀混合,取 100 μL 混合液与 100 μL PMP-甲醇溶液(0.5 mol/L)混合,接着在 70 ℃的水浴锅中反应

100 min。反应结束后冷却至常温,加入 100 μL HCl (0.3 mol/L) 将其中和,并在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的旋转蒸发器中蒸干,蒸干后依次加入 1.0 mL 的去离子水和氯仿,充分混匀以除去 PMP,保留水相。水相经 0.45 μm 滤膜过滤后,上样于 HPLC 进样检测。

参考文献[18]进行多糖的酸水解,将纯化多糖配制成 5.0 mg/mL,取 100 μL 糖液加入 100 μL TFA (4.0 mol/L),在 120 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h,冷却后用甲醇蒸干,并用 100 μL 去离子水复溶并按上述步骤进行 PMP 衍生和上样。

1.2.6 红外光谱 参考文献[20],将 1.0 mg 的多糖和 100.0 mg 溴化钾研磨充分并压成薄片,用红外光谱仪进行检测。

1.2.7 刚果红实验 参考文献[18],将铜绿菇多糖配制成 2.0 mg/mL,加入 2.0 mL 刚果红试剂 (80 $\mu\text{mol/L}$),将糖液中氢氧化钠浓度从低到高等梯度增加 (0.05~0.50 mol/L),并记录 200~800 nm 内的最大吸收波长。以刚果红做空白对照。

1.2.8 扫描电镜 (SEM) 和原子力显微镜 (AFM) 形貌观察实验 参考文献[21],铜绿菇多糖配制成 4.0 $\mu\text{g/mL}$,滴在云母片上并晾干,用于 SEM (测前需喷金) 和 AFM 观察。

1.2.9 抗氧化活性实验

1.2.9.1 DPPH 自由基清除活性的测定 参考文献[22],取 0~4.0 mg/mL 间相同浓度梯度的 Crude RLP、RLP-1-1、RLP-2-1 和 V_c (阳性对照) 各 50 μL 于 96 孔板,依次加入 25 μL DPPH 乙醇溶液 (0.4 mmol/L) 和 100 μL 超纯水,混匀,室温避光反应 20 min,在 517 nm 测 OD 值为 A_1 ,以超纯水代替样品为空白组,其 OD 值记为 A_0 ;无水乙醇代替 DPPH 为干扰组,其 OD 值记为 A_2 ;清除率计算公式:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0]$$

1.2.9.2 金属离子螯合能力的测定 参考文献[23],取 0~4.0 mg/mL 间相同浓度梯度的 Crude RLP、RLP-1-1、RLP-2-1 和 EDTA-2Na (阳性对照) 各 50 μL 于 96 孔板,依次加入 2.5 μL FeCl_2 (2.0 mmol/L)、10 μL 菲咯啉溶液 (5.0 mmol/L) 和 137 μL 蒸馏水,混匀,室温反应 10 min 于 562 nm 测 OD 值为 A_1 ;以蒸馏水代替样品为对照组,其 OD 值记为 A_0 ;以蒸馏水代替 FeCl_2 溶液为干扰组,其 OD 值为 A_2 ;螯合率计算公式:

$$\text{金属离子螯合率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

1.3 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm sd$ 表示,使用 Origin 8.5 作图,显著性和方差分析采用 SAS 软件 (8.0 版)。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

提取温度对多糖得率的影响如图 1a,多糖得率随提取温度的升高而升高后趋于平缓。提取温度为 80 和 90 $^{\circ}\text{C}$ 的得率无显著性差异 ($P > 0.05$),但 50、60 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 的存在显著性差异 ($P < 0.05$),从能耗考虑^[24],选取 80 $^{\circ}\text{C}$ 为较适提取温度。

提取时间对多糖得率的影响如图 1b,随着提取

时间的增加,铜绿菇多糖得率呈现先增加后减小,提取时间对得率影响显著 ($P < 0.05$)。其中提取时间为 2 h 时,多糖的得率高达 3.85%,而 2.0 h 后得率反而下降。随着提取时间的延长,多糖扩散到溶剂中并溶解的量虽有所增加,然而多糖降解导致的损失更明显,表现为得率的下降^[25]。因此选取 2.0 h 为较适提取时间。

料液比对多糖得率的影响,由图 1c 可知,随着料液比的增加,多糖得率呈现先增加后减小,而后趋于稳定的趋势。水料比为 1:10 和 1:20 g/mL 时,两者的得率存在显著性差异 ($P < 0.05$),而 1:20 ~ 1:50 g/mL 时得率无显著性差异 ($P > 0.05$)。原料与水的比例增加,可使细胞中的多糖释放增加,但也会造成多糖因吸热的不均匀致使其溶解性下降^[26],因此选取 1:20 g/mL 为较适提取料液比。

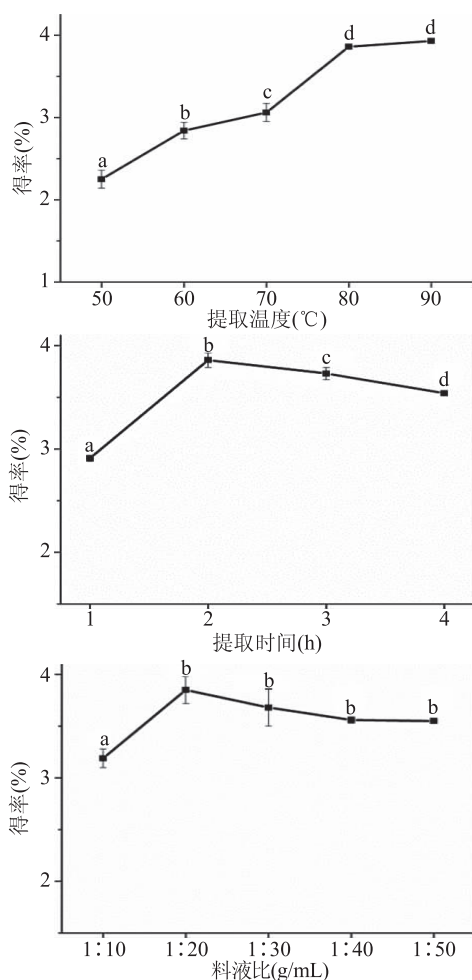


图1 不同提取因素对铜绿菇多糖得率的影响

Fig.1 Effects of different extraction factors on the yield of polysaccharides from *Russula aeruginea* Lindb. Fr

2.2 响应面实验结果与分析

响应面实验的结果如表 2 所示,所得铜绿菇多糖得率的回归方程:

$$Y = 3.98 + 0.21A + 0.20B + 0.016C + 0.047AB - 0.090AC + 0.017BC - 0.18A^2 - 0.28B^2 - 0.19C^2$$

方差分析表如表 3,该模型 P 值 < 0.0001 , R^2 和 R^2_{adj} 分别为 0.9947 和 0.9879 均接近于 1,失拟项 $P =$

表2 响应面实验设计与结果

试验号	A	B	C	多糖得率(%)
1	0	0	0	3.96
2	0	0	0	3.98
3	0	-1	1	3.34
4	-1	-1	0	3.17
5	0	0	0	3.97
6	0	-1	-1	3.30
7	0	1	1	3.76
8	-1	0	-1	3.31
9	-1	1	0	3.50
10	1	1	0	3.98
11	0	0	0	3.99
12	1	0	-1	3.93
13	-1	0	1	3.48
14	0	1	-1	3.65
15	1	-1	0	3.46
16	0	0	0	4.01
17	1	0	1	3.74

0.0697 > 0.05, 相对于误差项不显著, 说明该模拟公式可用于铜绿菇多糖得率的预测。根据各因素及交互作用的 P 值可以判定每个系数的显著性, P 值越小, 系数的显著性越高。线性项 A (提取温度)、B (提取时间) 和 C (料液比) 影响极其显著 ($P < 0.0001$)。此外, 互作效应结果表明, A 与 B 的互作效应显著 ($P = 0.0223 < 0.05$), A 与 C 的互作效应极显著 ($P < 0.001$), 但 B 与 C 的互作效应不显著 ($P > 0.05$)。说明提取温度和提取时间的相互作用以及提取温度和料液比的相互作用对铜绿菇多糖得率的影响都是显著的。

铜绿菇多糖最佳提取工艺条件是 83.78 ℃, 2.62 h, 1: 22.67 g/mL, 得率为 4.04%。为提高实验的操作性, 选取温度、时间和液料比分别为 84 ℃、2.6 h

和 1: 23 g/mL 进行验证实验, 得率为 4.30% 与理论值仅相差 0.26%, 进一步验证了该模型的可预测性。

2.3 铜绿菇多糖的分离纯化

由图 2 可知, 铜绿菇粗多糖经 DEAE-纤维素-52 纯化获得两个独立的洗脱峰, 收集组分分别命名为 RLP-1 和 RLP-2, 进一步经 Sephadex G-150 层析柱纯化后 (图 3 所示), 分别收集得到峰形更加对称的 RLP-1-1、RLP-2-1 组分, 表明两组分的纯度较高。

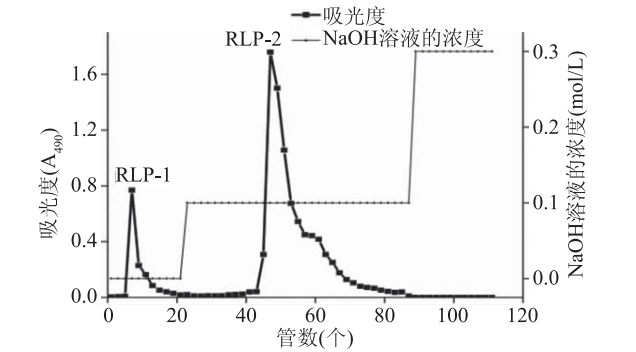


图2 铜绿菇多糖 DEAE-纤维素-52 梯度洗脱曲线
Fig.2 DEAE-cellulose-52 gradient elution curve of polysaccharides from *Russula aeruginea* Lindb.; Fr

2.4 铜绿菇多糖的结构性质

上述两种铜绿菇多糖的相对分子量测定结果 (如图 4 所示), RLP-1-1 和 RLP-2-1 均呈现单一对称峰, 进而验证其纯度较高。RLP-1-1 和 RLP-2-1 保留时间分别为 17.85 和 9.95 min, 计算可得两种纯化多糖的分子量分别 18.05、2398.83 kDa。

上述两种铜绿菇多糖的单糖组成测定结果 (如图 5 所示), 图 a、b 和 c 分别表示单糖标准品、纯化多糖 RLP-1-1 和 RLP-2-1 的 HPLC 图。a 图中峰 1~10 依次为甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖。图 b 为纯化多糖 RLP-1-1 的 HPLC 图, 由图可知该多糖由三种多糖组成, 即葡萄糖、半乳糖和岩藻糖组

表3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	0.34	1	0.34	321.70	<0.0001 ****
B	0.33	1	0.34	310.11	<0.0001 ****
C	0.002113	1	0.002113	2.00	<0.0001 ****
AB	0.009025	1	0.009025	8.53	0.0223 *
BC	0.001.225	1	0.001.225	1.16	0.3176
AC	0.032	1	0.032	30.63	0.0009 ***
A ²	0.13	1	0.13	123.29	<0.0001 ****
B ²	0.33	1	0.33	308.72	<0.0001 ****
C ²	0.15	1	0.15	145.20	<0.0001 ****
残差	0.007405	7	0.001058		
失拟项	0.0529	3	0.001975	5.34	0.0697
误差	0.006	4			
总变异	1.4	16			

注: $R^2 = 0.9947$, $R^2_{adj} = 0.9879$; * 表示差异显著 $P < 0.05$, ** 表示差异高度显著 $P < 0.01$, *** 表示差异极显著 $P < 0.001$, **** 表示差异极其显著 $P < 0.0001$ 。

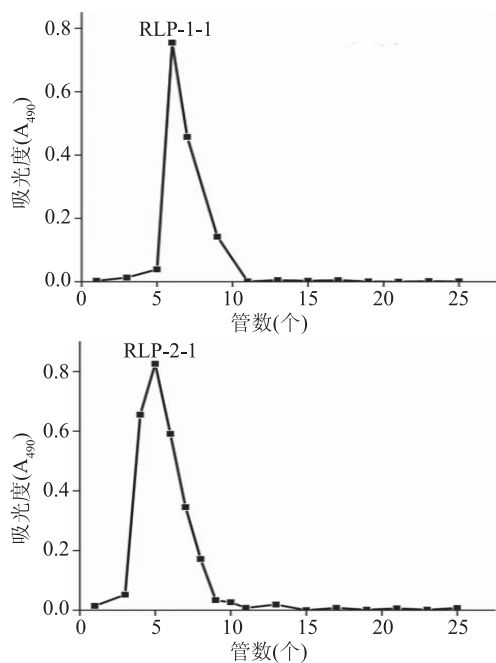


图3 铜绿菇多糖的 Sephadex G-150 的洗脱曲线
Fig.3 Sephadex G-150 elution curve of polysaccharides from *Russula aeruginea* Lindb. Fr
注:a:RLP-1-1 的洗脱曲线,b:RLP-2-1 的洗脱曲线。

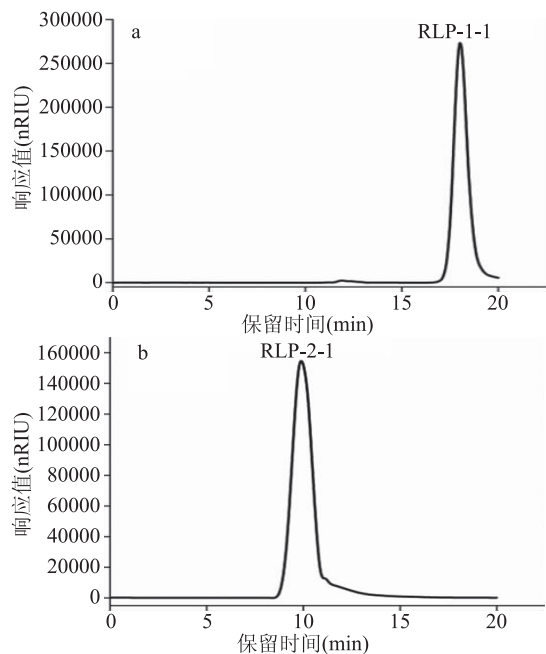


图4 高效液相色谱图

Fig.4 High performance liquid chromatography
注:a:RLP-1-1 的高效液相色谱图,
b:RLP-2-1 的高效液相色谱图。

成,各单糖物质的量百分比分别为:为 5.35%, 67.02%和 27.63%。图 c 为纯化多糖 RLP-2-1 的 HPLC 图,由图可知 RLP-2-1 只由葡萄糖组成。

铜绿菇多糖的红外光谱图如图 6 所示,RLP-1-1 和 RLP-2-1 具有 3400 和 2926 cm^{-1} 多糖特征吸收峰^[27];此外二者在 1643 cm^{-1} 处具有 C=O 非对称性伸缩振动所引起的特征峰,表明它们均含有酰胺键^[28];1355 和 1250 cm^{-1} 处的吸收峰代表两者含有硫

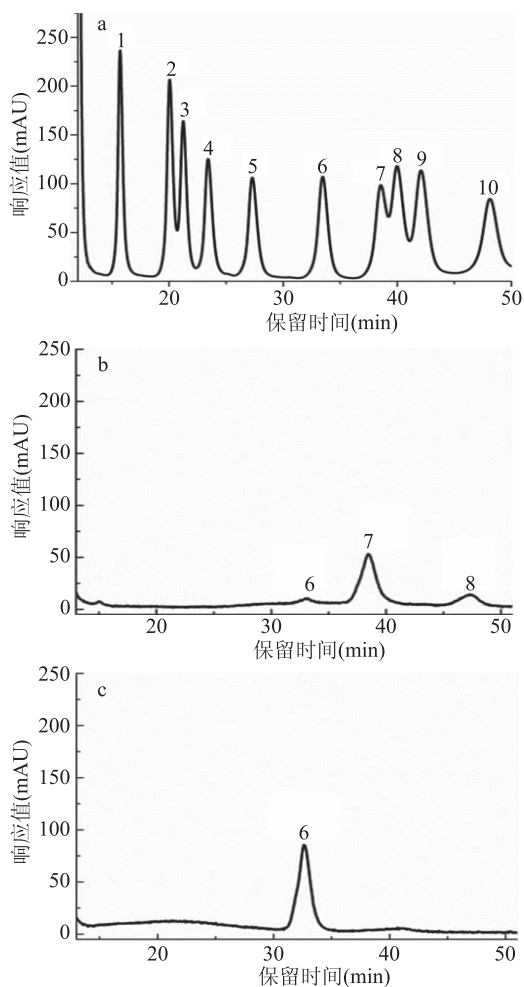


图5 高效液相色谱图

Fig.5 High performance liquid chromatography
注:a:单糖标准品,b:RLP-1-1,c:RLP-2-1。

酸基团^[29];1150 和 1080 cm^{-1} 的特征峰表明它们具有 C-OH 和 C-O-C 的结构;RLP-1-1 在 932 cm^{-1} 有吸收峰表明其具有 3,6-内醚半乳糖,而 RLP-2-1 不具有^[30]。

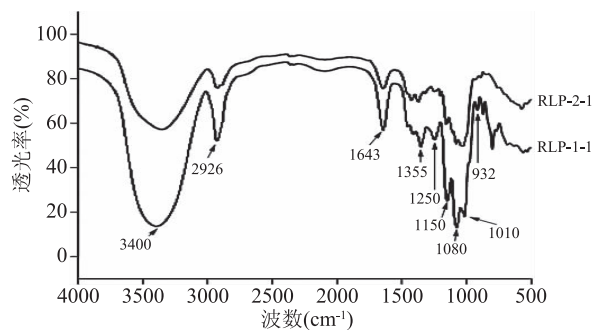


图6 RLP-1-1 和 RLP-2-1 红外谱图

Fig.6 FT-IR spectra of RLP-1-1 and RLP-2-1

刚果红实验结果如图 7 所示,刚果红可与具有三股螺旋的多糖络合,表现为其最大吸收波长(λ_{max})的增大, λ_{max} 与多糖-刚果红溶液的 NaOH 浓度呈负相关,原理是高浓度 NaOH 可解开刚果红与三股螺旋多糖的络合并降低 λ_{max} 。RLP-2-1 的 λ_{max} 先增加后减小,说明其可能含有三股螺旋。RLP-1-1 的 λ_{max} 一直呈减小趋势,说明其不含三股螺旋结构^[31]。研

究表明三股螺旋结构与其生物活性有关,如三股螺旋结构的香菇多糖同时具有较高的抗肿瘤活性,而破坏其三股螺旋结构后,抗肿瘤活性明显降低^[32]。茯苓多糖通常不具有抗肿瘤活性,采用化学手段使其形成三股螺旋后可获得抗肿瘤活性^[33]。由此可推测具有三股螺旋的 RLP-2-1 可能具有较高的抗肿瘤活性,今后应对其进行抗肿瘤活性的研究,为铜绿菇多糖的在抗肿瘤药物的开发提供科学支持。

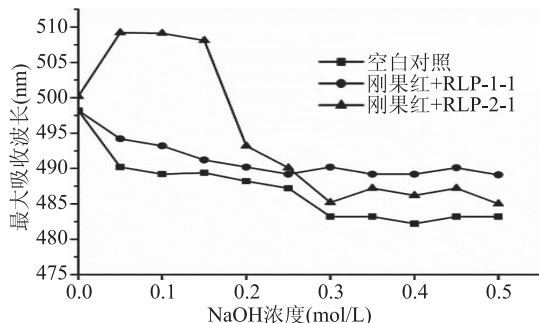


图7 NaOH 浓度对多糖波长的影响

Fig.7 Effect of NaOH concentration on polysaccharide wavelength

RLP-1-1 的 SEM 如图 8(a 和 b), 10 μm 的结果(图 8a)表明多糖呈紧密的微观颗粒状,表面光滑且相对平整,边缘凹凸不平,颗粒的大小厚度各异,杂乱的附着堆积。20 μm 的结果(图 8b)多糖分子呈分散的小颗粒,这说明多糖分子主要呈现的是相互斥力,而吸引力较小^[29]。RLP-2-1 的 SEM 如图 8(c 和 d), 10 μm 的结果(图 8c)和 50 μm 的结果(图 8d)的结果类似,多糖均呈厚度不一薄片堆积的形貌,表面伴有许多裂纹,糖分子形成的羽状结构表明排斥力较弱,存在较强相互作用力,多糖分子可能存在螺旋结构^[34]。

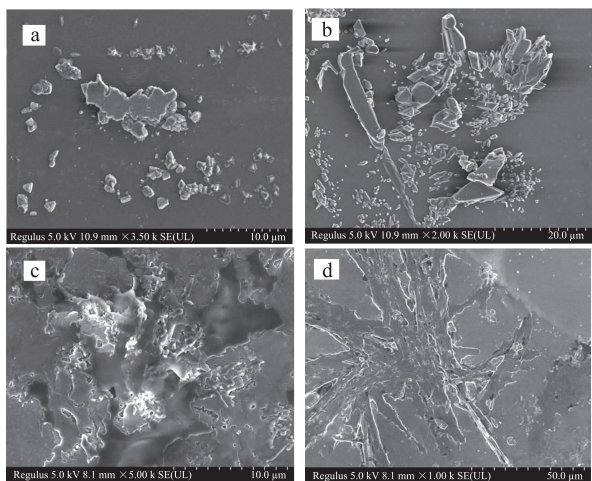


图8 铜绿菇多糖的电镜扫描图

Fig.8 The SEM picture of *Russula aeruginea* Lindb.:Fr

注:a,b:RLP-1-1 的 SEM,c,d:RLP-2-1 的 SEM。

RLP-1-1 的 AFM 的平面图如图 9a 所示, 400 nm 呈大小均匀的纤维网络结构,表明多糖的纯度很高,链长约为 1.1~1.2 nm。RLP-2-1 的 AFM 的平面图如图 9b 所示,多糖呈现较为明显的纤维状结

构,链长约为 1.9~2.1 nm。而通常多糖分子链一般为 0.1~1 nm,RLP-1-1 和 RLP-2-1 链长均大于 1 nm,这表明多糖都呈现多个糖分子的聚合状态^[35]。结合刚果红和扫描电镜的结果分析,RLP-2-1 存在三股螺旋结构。

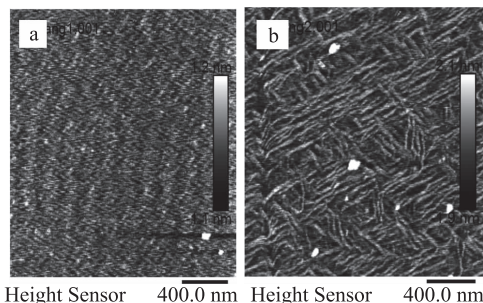


图9 铜绿菇多糖的原子力显微镜

Fig.9 The AFM picture of *Russula aeruginea* Lindb.:Fr

注:a:RLP-1-1 的 AFM,b:RLP-2-1 的 AFM。

2.5 铜绿菇多糖的抗氧化活性

铜绿菇多糖的 DPPH 自由基清除率和金属离子螯合率的结果如图 10 所示。

DPPH 自由基清除率的实验的结果如图 10a, 由图可知 RLP-1-1 和 RLP-2-1 对 DPPH 自由基的清除能力相差不大,且两者清除该自由基的清除率要弱于粗提物。在 0~4.0 mg/mL 多糖范围内,随着各组分多糖浓度的增加,而各组分清除能力有所增加。在浓度为 4.0 mg/mL 时, Crude RLP、RLP-1-1 和 RLP-2-1 的 DPPH 自由基清除率分别为 41.19%、38.97% 和 39.27%。由于 RLP-2-1 分子量过大且空间结构复杂,在体外 DPPH 抗氧化模型中表现不佳,在未来的研究中可采用化学方法对其进行修饰得到

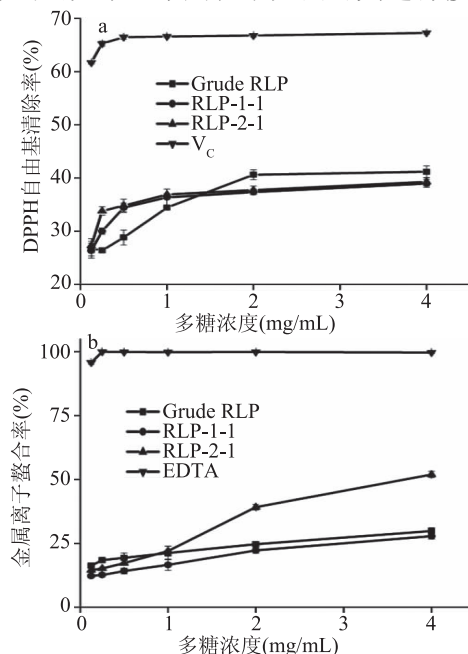


图10 铜绿菇多糖抗氧化活性

Fig.10 Antioxidant activity of polysaccharides from *Russula aeruginea* Lindb.:Fr

注:a:DPPH 自由基清除率,b:金属离子螯合率。

活性更高的多糖衍生物。阿魏菇两种水溶性多糖的清除率分别为 62.0% 和 49.8%^[36], 而羊肚菌多糖的清除率 32.42%^[37], 铜绿菇多糖的清除能力介于阿魏菇多糖和羊肚菌多糖之间, 铜绿菇多糖可作为抗氧化剂良好来源。

金属离子螯合率实验的结果如图 10b, 由图可知, RLP-2-1 的金属离子螯合率高于 RLP-1-1 和粗提物。在 0~4.0 mg/mL 多糖范围内, 随着各组分多糖浓度的增加, 而各组分的金属离子螯合率有所增加。在浓度为 4.0 mg/mL 时, Crude RLP、RLP-1-1 和 RLP-2-1 的金属离子螯合率分别为 29.83%、27.81% 和 51.96%。羊肚菌多糖金属离子螯合率为 27.83%^[37], 紫丁香蘑多糖的金属离子螯合率为 70.09%^[38], 可见铜绿菇多糖的金属离子螯合能力介于羊肚菌多糖和紫丁香蘑多糖之间, 铜绿菇多糖可作为抗氧化剂良好来源用于食品药品中。

3 结果与讨论

本研究采用单因素实验结合响应面实验建立了铜绿菇多糖的水提醇沉工艺, 当提取温度为 84 ℃, 提取时间为 2.6 h, 料液比为 1:23 g/mL 时, 多糖的提取率为 4.30%。并利用 DEAE-纤维素-52 和 Sephadex G-150 分离纯化得到两种分子量分别为 18.05 kDa 和 2398.83 kDa 水溶性多糖。RLP-1-1 的葡萄糖、半乳糖和岩藻糖等三种单糖的摩尔百分含量分别为 5.35%、67.02% 和 27.63%, 而 RLP-2-1 仅由葡萄糖组成, 它们均具有多糖的典型官能团, 其中一种多糖具有三股螺旋, 两种水溶性多糖均表现出一定的抗氧化活性。在未来研究中, 我们拟进一步研究其体外细胞抗氧化活性、体外细胞和动物体内的免疫活性和抗肿瘤活性等, 从而为推广铜绿菇食用菌资源的利用和其多糖的开发提供科学依据。

参考文献

- [1] 宋斌, 李泰辉, 吴兴亮, 等. 中国红菇属种类及其分布[J]. 菌物研究, 2007, 5(1): 20-42.
- [2] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术, 2000: 946-948.
- [3] 李国杰, 文华安. 中国红菇属分类研究进展[J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 303-309.
- [4] 王青云, 石木标. 中国红菇的研究现状与展望[J]. 中国食用菌, 2004, 23(4): 10-12.
- [5] 汪艳群, 孟宪军. 超声波处理对北五味子多糖抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 66-70.
- [6] Chen J, Li W, Gu X, et al. Optimized extraction, preliminary characterization, and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research, 2017, 23: 1783-1791.
- [7] Feng K, Chen W, Sun L, et al. Optimization extraction, preliminary characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from *Stachys sieboldii* Miq. tubers [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 125: 45-52.
- [8] Chen H, Wang Z, Qu Z, et al. Physicochemical characterization

and antioxidant activity of a polysaccharide isolated from oolong tea[J]. European Food Research and Technology, 2009, 229(4): 629-635.

- [9] Wei D, Cheng W, Wei Y, et al. Phosphorylated modification and *in vitro* antioxidant activity of *Radix Hedysari* polysaccharide [J]. Glycoconjugate Journal, 2012, 29(4): 167-172.
- [10] Ren J, Hou C, Shi C, et al. A polysaccharide isolated and purified from *Platycladus orientalis* (L.) Franco leaves, characterization, bioactivity and its regulation on macrophage polarization[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 213: 276-285.
- [11] 李国杰, 李赛飞, 赵东, 等. 红菇属研究进展[J]. 菌物学报, 2015, 34(5): 821-848.
- [12] 李森, 李东, 王贺祥, 等. 一种具有增殖活性的铜绿红菇核糖核酸酶[J]. 中国食用菌, 2013, 32(2): 28-32.
- [13] 宝秋利. 白音敖包沙地云杉外生菌根真菌调查及其共生菌土生空团菌纯培养条件的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
- [14] 梁建庆, 李岩. 两种外生菌根菌-黑乳菇和铜绿红菇的生理学研究初报[J]. 微生物学杂志, 1998, 18(3): 54-57.
- [15] 张丽娟, 闫静芳, 乐田, 等. 长根菇多糖的分离提取[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(8): 224-228.
- [16] 田有秋, 武奔月, 谢广杰, 等. 一种淡红侧耳多糖的制备工艺[J]. 食品科学学报, 2017, 35(5): 72-77.
- [17] 黄瑶, 蒋琳, 刘影, 等. 羊肚菌多糖提取、分离纯化及免疫调节活性[J]. 生物加工过程, 2018, 16(6): 35-41.
- [18] 田有秋, 贾金霞, 束旭, 等. 淡红侧耳子实体多糖的分离纯化及结构解析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 66-72.
- [19] 袁清霞. 桑叶多糖分离纯化、结构分析及生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [20] Chen L, Huang G. The antioxidant activity of derivatized cushaw polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 1-4.
- [21] 陈睿, 孙润广, 王小梅, 等. 猪肚菇多糖 WPG1 的相对分子质量测定及原子力显微镜观测[J]. 生物加工过程, 2013, 11(5): 61-66.
- [22] Yuan Q, Xie Y, Wang W, et al. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves [J]. Carbohydr Polym, 2015, 128: 52-62.
- [23] Jiang S, Ma Y, Yan D, et al. Antioxidant and antimicrobial properties of water soluble polysaccharide from *Arachis hypogaea* seeds [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(10): 2839-2844.
- [24] 宋佳敏, 王鸿飞, 孙朦, 等. 响应面法优化金蝉花多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 275-281.
- [25] 刘炳福, 宫志远, 张华, 等. 灰树花多糖提取工艺的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2014(3): 104-106.
- [26] 胡欣蕾, 田雪梅, 李文香, 等. 花脸香蘑菌丝体多糖提取条件优化及其体外免疫活性[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 185-190.
- [27] 胡亚平, 王锦, 郑丽, 等. 硫磺菌多糖的分离纯化及体外抗氧化、抗肿瘤活性初探[J]. 中国现代中药, 2018, 20(9):

(下转第 200 页)

- [14]倪添雨,张雅洁,刘敏,等.基于胶原蛋白的干细胞3D打印研究进展[J].中国材料进展,2019,38(6):551-558,550.
- [15]Zhang L,Jiang W,Wang Q J,et al.Reintroduction and post-release survival of a living fossil:The chinese giant salamander[J].PLos One,2016,11(6):e0156715.
- [16]Yuan Pan.Comparing the status of Chinese giant salamanders between three nature reserves in Guizhou province using local ecological knowledge[D].London:University of London,2015.
- [17]李正友,罗永成,谢巧雄,等.贵州大鲵产业现状及发展分析[J].贵州农业科学,2013,41(9):118-121.
- [18]K Arunmozhiarman, Robinson J J Abraham, V Apparao. Extraction and molecular characterization of collagen from poultry meat processing by-product (chicken skin) [J]. International Journal of Pure & Applied Bioscience, 2017, 5(5): 1085-1091.
- [19]王锡念,徐志善,孙钦军,等.超声波辅助酶解提取鳊鲮鱼皮胶原蛋白的工艺优化[J].食品工业科技,2019,40(1):175-180.
- [20]Jae-Young Je, Zhong-Ji Qian, Hee-Guk Byun, et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(5): 840-846.
- [21]李莉,顾赛麟,王锡昌,等.响应面法优化酶法提取大鲵皮胶原蛋白工艺[J].中国水产科学,2013,20(4):876-883.
- [22]李华.大鲵皮中胶原蛋白的提取及性质研究[J].淡水渔业,2013,43(2):71-74.
- [23]张敏.酸法和酶法提取齐口裂腹鱼皮胶原蛋白及鉴定性质研究[D].雅安:四川农业大学,2014.
- [24]王海轩,谷瑞增,金振涛,等.胶原蛋白水解物中L-羟脯氨酸两种检测法对比分析[J].食品研究与开发,2016,37(22):119-122.
- [25]杨碧仙,陈扬,曹宇,等.人工养殖的大鲵皮中胶原蛋白含量的测定[J].贵阳学院学报:自然科学版,2017,12(3):83-85.
- [26]何俊燕,李来好,郝淑贤,等.硫酸铵盐析法分离罗非鱼肌红蛋白的研究[J].南方水产,2009,5(2):17-22.
- [27]赵媛媛,王战勇,张晶,等.中国林蛙皮肤胶原蛋白的提取及体外抗氧化活性研究[J].应用化工,2017,46(4):685-688.
- [28]Sadia Tasnim, Md Hasan-Al Jubayed, Md Nazmul Hossain. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of methanolic extract of *Zingiber officinale* [J]. World Journal of Pharmaceutical Research, 2018, 7(18): 1517-1529.
- [29]Ki Sung KANG, Hyun Young KIM, Jae Sung PYO. Increase in the free radical scavenging activity of ginseng by heat-processing[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(4): 750-754.
- [30]刘琨,姜斌,汪秋宽,等.海燕体壁胶原蛋白肽的制备及其抗氧化活性的研究[J].食品科技,2016,41(8):59-63.
- [31]淑英,敖冉,宋佳,等.响应面法优化鳊鱼皮酸性胶原蛋白的提取工艺[J].食品工业科技,2015,36(24):269-272.
- [32]温慧芳,赵利,陈丽丽,等.碱法提取鲟鱼皮胶原蛋白工艺优化的研究[J].食品工业科技,2015,36(19):233-236,242.

(上接第194页)

1131-1136.

[28]Guo X, Zou X, Sun M, et al. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(2): 344-349.

[29]Shu X, Zhang Y, Jia J, et al. Extraction, purification and properties of water-soluble polysaccharides from mushroom *Lepista nuda* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 858-869.

[30]Jiang B, Zhang H, Liu C, et al. Extraction of water-soluble polysaccharide and the antioxidant activity from *Ginkgo biloba* leaves [J]. Medicinal Chemistry Research, 2010, 19(3): 262-270.

[31]Milani P, Ambrosi G, Gammoh O, et al. SOD1 and DJ-1 converge at Nrf2 pathway: A clue for antioxidant therapeutic potential in neurodegeneration [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013, 2013: 1-12.

[32]王斌,连宾.食药真菌多糖的研究与应用[J].食品与机

械, 2005, 21(6): 96-100.

[33]王强,刘红芝,钟葵,等.多糖分子链构象变化与生物活性关系研究进展[J].生物技术进展,2011,1(5):318-326.

[34]张亚男,王昌禄,李贞景,等.金针菇根部多糖的结构特征[J].食品科技,2015,40(3):283-286.

[35]莫开菊,程超,庄洋,等.基于原子力显微镜和流变学特性的葛仙米多糖构象分析[J].食品科学,2017,38(21):49-54.

[36]Chen Y, Gao L, Gao R, et al. Purification, chemical characterization and antioxidant activities of polysaccharides of fruiting bodies of *Pleurotus ferulae* mushroom [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12: 1-9.

[37]He P, Geng L, Mao D, et al. Production, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from submerged culture of *Morchella crassipes* [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2012, 35(8): 1325-1332.

[38]束旭.紫丁香蘑水溶性多糖的分离纯化和性质研究[D].南京:南京农业大学,2019.

权威·高效·核心·领先·精湛·实用