秀珍菇多糖 PMP-2a 的理化性质及其体外抗氧化活性研究

孙玉军[1,2]，江昌俊[3]，祝嫦巍[2]，戴世华[2]
（1. 安徽农业大学生命科学学院，安徽合肥 230036）（2. 安徽科技学院生命科学学院，安徽凤阳 233100）
（3. 安徽农业大学茶与食品科技学院，安徽合肥 230036）

摘要：本文以秀珍菇菌丝体为原料提取水溶性粗多糖，经脱蛋白、脱色、DEAE-Sepharose F.F 和 Superdex-200 柱层析纯化，得到一种秀珍菇菌丝体多糖（PMP-2a）。高效液相色谱鉴定其纯度；比色法测定其总糖、糖醛酸、蛋白质含量；紫外光谱、红外光谱、β-消去等方法研究其理化性质和部分结构；通过清除超氧阴离子自由基、羟基自由基来研究 PMP-2a 的体外抗氧化活性。结果表明，PMP-2a 为均一组分，其中性糖部分由鼠李糖（Rha）、葡萄糖（Glc）、半乳糖（Gal）、甘露糖（Man）、阿拉伯糖（Ara）组成（摩尔比为 1:13.18:2.19:7.23:3.15）；其总糖、糖醛酸、蛋白质含量分别为 82.6%、19.8%、10.6%，不含有核酸；红外光谱呈现典型的多糖特征峰，含有 α-D-吡喃糖苷键；相对分子质量为 9.28×10^4 Da，β-消去反应表明糖链与蛋白之间存在-O-的连接键；PMP-2a 对超氧阴离子自由基、羟基自由基的清除效果显著，且与多糖浓度呈明显的量效关系。

关键词：秀珍菇；菌丝体多糖；分离纯化；抗氧化活性

文章篇号：1673-9078(2014)12-79-84 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.014

Physicochemical Characteristics and *in vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharide PMP-2a from *Pleurotus geesteranus*

SUN Yu-jun[1,2], JIANG Chang-jun[3], ZHU Chang-wei[2], DAI Shi-hua[2]
(1.College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)
(2.School of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)
(3.Science and Technology College of Tea and Food, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In this study, a water-soluble, crude polysaccharide was extracted from *Pleurotus geesteranus* and the mycelium polysaccharide was obtained by deproteinization, discoloration, and purification using diethylaminoethanol (DEAE)-Sepharose Fast-Flow ion-exchange chromatography and Superdex-200 column chromatography. The purity of the polysaccharide was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC); Colorimetric measurement of the total sugar, uronic acid and protein content; and physicochemical properties and partial structural characteristics, studied by ultraviolet (UV), infrared (IR) and β-elimination reaction methods. The *in vitro* antioxidant activity of PMP-2a was determined by superoxide radical and hydroxyl radical scavenging assays. The results showed that PMP-2a was a homogeneous polysaccharide, consisting of Rha, Glc, Gal, Man, and Ara in a molar ratio of 1:13.18:2.19:7.23:3.15. The total sugar, uronic acid, and protein content of PMP-2a were 82.6%, 19.8%, and 10.6%, respectively; no nucleic acid was found. Typical absorption bands of polysaccharides and glycosidic bonds in α-D-pyranoside were found in the IR spectrum. The molecular weight was 9.28×10^4 Da, and the β-elimination reaction indicated that PMP-2a was linked to peptide chains through an -O- bond. PMP-2a showed significant superoxide radical- and hydroxyl radical-scavenging activities in a dose-dependent manner.

Key words: *Pleurotus geesteranus;* mycelium polysaccharide; isolation and purification; antioxidant activity

收稿日期：2014-06-02

基金项目：安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目（KJ2014A052）；国家自然科学基金项目（31100070）；2013 年国家级大学生创新创业训练计划项目（201310879021）

作者简介：孙玉军（1975-），男，博士研究生，副教授，研究方向：多糖的分离纯化及其活性

通讯作者：江昌俊（1957-），男，教授，研究方向：茶与食品生物技术

食用菌是一类可供人类食用的大型真菌，因味美、营养丰富，常被作为一种健康食品[1]，备受人们的青睐。多糖是其一种重要的活性成分，是由菌丝体或子实体所产生的一类代谢产物，在国际上被称为“生物反应调节物”（BRM），具有抗肿瘤、抗凝血、抑菌抗病毒、清除自由基、抑制脂质过氧化、抗衰老、提高免疫力等作用，成为保健食品开发的重要来源。近年来国内外已对香菇多糖、灵芝多糖、黑木耳多糖、银耳多糖等多种食用菌多糖进行了较为深入的研究。

秀珍菇(*Pleurotus geesteranus*)，又名袖珍菇、姬平菇、小平菇等，隶属于担子菌纲、伞菌目、侧耳科、侧耳属[2]。秀珍菇菇形秀小、菇香浓郁、味道鲜美，含有蛋白质、多糖、维生素、微量元素及人体必需的多种氨基酸等营养成分，是一种深受人们喜爱的食用菌。秀珍菇子实体多糖近年来成为人们研究的热点，如Mei Zhang[3]从秀珍菇子实体中分离得到4种多糖，其中一种多糖具有较强的抑瘤活性；杨润亚[4]等研究发现秀珍菇子实体多糖具有一定的体外抗氧化活性；张安强等[5]对秀珍菇子实体多糖PGPS1的结构进行了解析，但目前关于秀珍菇菌丝体多糖的研究报道较少。

本文对秀珍菇菌种进行液体发酵培养获得菌丝体，以菌丝体为原料提取粗多糖，采用离子交换柱层析和凝胶过滤柱层析分离纯化得到一种精制多糖PMP-2a，采用比色、光谱分析等方法并对其理化性质、组分和结构进行了测定，通过对超氧阴离子自由基、羟基自由基的清除作用研究其体外抗氧化活性，为秀珍菇菌丝体多糖的进一步研究提供参考，为秀珍菇菌丝体多糖的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种

秀珍菇(*Pleurotus geesteranus*)，由安徽科技学院食用菌研究所陆晓民教授提供。

1.1.2 主要试剂

标准D-Glc，D-Xyl，D-Gal，D-Man，L-Ara，L-Rha，德国Merk公司；考马斯亮蓝G-250，B.D.H进口分装；标准葡聚糖T_{10}、T_{40}、T_{70}、T_{100}、T_{200}、T_{500}，Blue Dextran 2000，瑞典Pharmacia公司；DEAE-Sepharose F.F，瑞典Pharmacia公司；其它试剂皆为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器设备

Ultrospec 3100 pro 紫外/可见分光光度计，美国Amersham Biotech公司；AKTA Purifier10 FPLC，瑞典Pharmacia公司；XK16/60 Superdex-200预装柱，瑞典Pharmacia公司；Labofuge 400R台式冷冻离心机，德国Heraeus公司；PE 1730红外光谱仪，美国PEAKIN-ELMER公司；Agilent 1200高效液相色谱仪，美国Agilent公司。

1.2 方法

1.2.1 秀珍菇菌丝体及其粗多糖的制备

将秀珍菇菌种接种于PDA培养基上，经活化、一级种子液、二级种子液培养，按10%的接种量接种于50 L发酵罐中，转速180 r/min，25 ℃发酵培养7 d，过滤得菌丝体，自来水淋洗，冷冻干燥，粉碎，过80目筛，得秀珍菇菌丝体粉末，备用。

称取秀珍菇菌丝体粉末，按料液比1:20加入蒸馏水于80 ℃温水中浸提3次，合并提取液，旋转蒸发浓缩至适当体积，5000 r/min离心15 min，上清液加4倍95%乙醇沉淀过夜，5000 r/min离心15 min，沉淀经无水乙醇、无水乙醚和丙酮洗涤，蒸馏水溶解，Sevag法脱蛋白，活性炭脱色素，冷冻干燥得秀珍菇菌丝体多糖粗品。

1.2.2 秀珍菇菌丝体多糖的分离纯化

1.2.2.1 阴离子交换柱层析

将秀珍菇粗多糖用0.02 mol/L的PBS（pH 7.2）充分溶解，12000 r/min离心8 min，取5 mL上样，过DEAE-Sepharose Fast Flow离子柱（2.6×50 cm），0~2 mol/L NaCl溶液连续梯度洗脱，流速为1 mL/min，每管收集5 mL，硫酸-蒽酮法检测，以管号为横坐标，以A_{620}为纵坐标，绘制洗脱曲线，合并收集同一洗脱峰，浓缩、透析、冷冻干燥得秀珍菇菌丝体多糖PMP-1、PMP-2和PMP-3。

1.2.2.2 凝胶过滤柱层析

将PMP-2用0.02 mol/L的PBS（pH 7.2）配制成10 mg/mL的多糖溶液，0.22 μm微孔滤膜过滤，AKTA，Superdex-200（1.6 cm×60 cm）凝胶柱层析，PBS洗脱，流速1 mL/min，每管收集3 mL，波长215 nm、254 nm、280 nm在线检测，同时硫酸-蒽酮法跟踪检测，分峰收集，浓缩、透析、冷冻干燥得PMP-2a、PMP-2b。

1.2.3 PMP-2a的纯度鉴定

采用HPGPC法[6]。色谱条件：色谱柱ZORBAX GF-250；流动相为双蒸水，流速为1 mL/min；柱温柱温30 ℃，进样量为20 μL，样品用双蒸水溶解，并用0.22 μm微孔滤膜过滤，示差折光检测器检测。

1.2.4 PMP-2a的相对分子质量测定

采用HPGPC法[6]。准确配制1 mg/mL标准葡聚糖Dextran T_{10}、T_{40}、T_{70}、T_{100}、T_{200}、T_{500}溶液，采用

HPGPC 法测定各自的保留时间。以保留时间为横坐标，log Mw 为纵坐标绘制相对分子质量标准曲线。配制 1 mg/mL 的 PMP-2a 溶液，测定保留时间，根据标准曲线回归方程计算其相对分子质量。

1.2.5 PMP-2a 的总糖、糖醛酸和蛋白质含量测定

以 Dextran T_{10} 为标准品，采用苯酚-硫酸法[7]测定其总糖含量；以葡萄糖醛酸为标准品，间羟联苯法测定其糖醛酸含量；以牛血清蛋白为标准品，采用考马斯亮蓝法测定其蛋白质含量。

1.2.6 PMP-2a 的紫外扫描

取少量的 PMP-2a 配制成一定浓度的水溶液，于 200~400 nm 波长范围内紫外扫描。

1.2.7 PMP-2a 的红外光谱分析

采用 KBr 压片法，PMP-2a 于 400 cm^{-1}~4000 cm^{-1} 波数范围内扫描。

1.2.8 PMP-2a 的中性糖单糖组成分析[8]

分别称取 3 mg D-Gal，D-Man，D-Xyl，L-Ara，L-Rha，D-Glc 溶于 3 mL 超纯水中，进行 ELSD-HPLC 分析。

称取 PMP-2a 30 mg 溶于 3 mL 1mol/L H_2SO_4 中，封管，105 ℃水解 12 h，$BaCO_3$ 中和至中性，离心，取上清液水解样品，进行 ELSD-HPLC 分析。

1.2.9 PMP-2a 的刚果红实验[9]

将 5 mg PMP-2a 多糖样品中加入 2.0 mL 蒸馏水和 2.0 mL 80 umol/L 刚果红试剂，逐渐加入 4.0 mol/L NaOH，使溶液中 NaOH 浓度在 0-0.5 mol/L 范围内，然后通过紫外扫描测定各碱性条件下的最大吸收波长。

1.2.10 PMP-2a 的糖肽键连接键型分析

采用 β-消去法[10]。准确称取 20 mg PMP-2a，溶于 4 mL 0.2 mol/L NaOH-1.0 mol/L Na_2SO_3 溶液，于 45 ℃反应 1.5 h，在冰浴中用 1.0 mol/L 的乙酸调至 pH7.0。在 200~400 nm 范围内扫描，观察在 240 nm 处的紫外吸收情况。

1.2.11 PMP-2a 的体外抗氧化活性

1.2.11.1 超氧阴离子自由基清除率的测定

采用邻苯三酚自氧化法[11]。

1.2.11.2 羟基自由基清除率的测定

参照 Li Q 等的试验方法[12]。

1.2.11.3 数据处理

采用 SPSS10.0 软件对试验结果进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 PMP-2a 的分离纯化

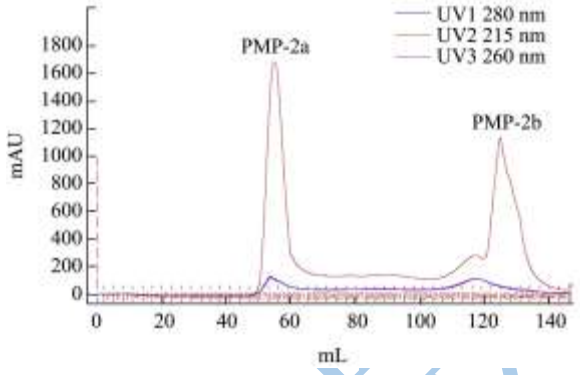


图 1 PMP-2 的 AKTA 柱层析洗脱曲线

Fig.1 Eluent curve of PMP-2 on AKTA column

秀珍菇菌丝体经温水浸提、乙醇沉淀、除蛋白、脱色素、DEAE-Sepharose F.F 阴离子柱层析和AKTA，Superdex-200凝胶柱层析分离纯化得到一种白色絮状多糖PMP-2a（如图1所示）。PMP-2a水溶性好，不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂。

2.2 PMP-2a 的纯度鉴定

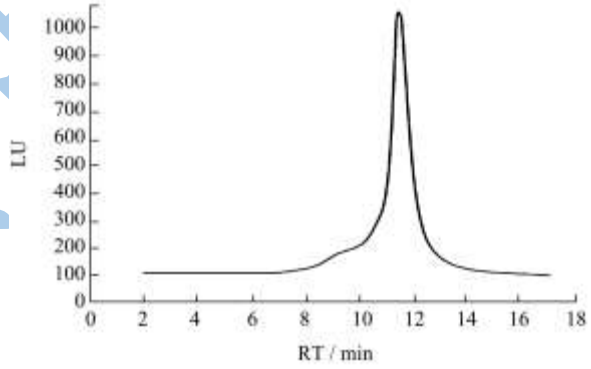


图 2 PMP-2a 的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of PMP-2a

由图2可以看出，秀珍菇多糖PMP-2a的液相色谱图呈单一狭长对称单峰，表明其纯度高，为均一组分。根据标准葡聚糖线性回归方程log Mw=8.6258-0.4125t，R^2=0.9969计算，计算得出PMP-2a的相对分子质量为 9.28×10^4 Da。

2.3 PMP-2a 的相关含量测定结果

经分光光度比色法测定，PMP-2a的总糖含量为82.6%，糖醛酸含量为19.8%，蛋白含量为10.6%。

2.4 PMP-2a 的紫外光谱分析

由图 3 可以看出，PMP-2a 溶液在 260 nm 处没有吸收峰，表明 PMP-2a 不含有核酸；在 280 nm 处有一

吸收峰，表明 PMP-2a 含有一定量的蛋白质。

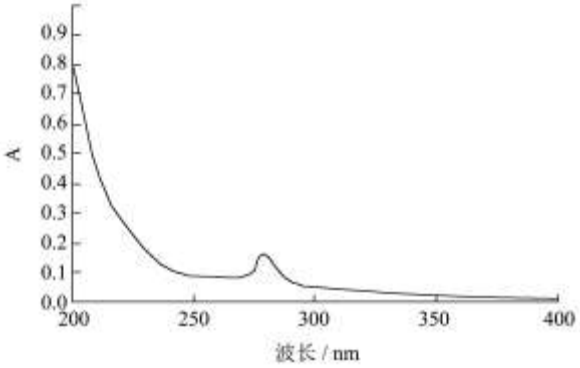


图 3 PMP-2a 的紫外扫描图谱

Fig.3 UV spectrum of PMP-2a

2.5 PMP-2a 的红外光谱分析

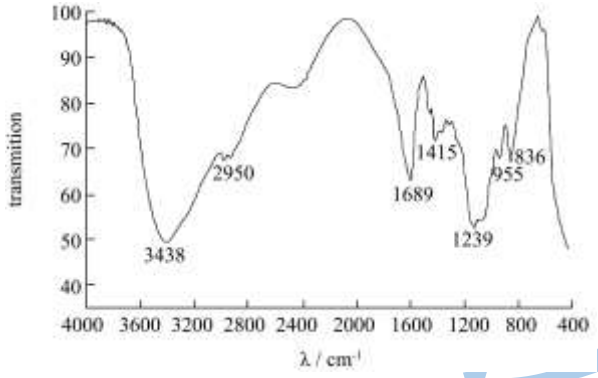


图 4 PMP-2a 的红外扫描图谱

Fig.4 IR spectrum of PMP-2a

由图 4 可以看出，PMP-2a 主要强吸收峰有 3438 cm^{-1}、2950 cm^{-1}、1689 cm^{-1}、1415 cm^{-1}、1239 cm^{-1}、955 cm^{-1}、836 cm^{-1}。对该谱峰归属分析：3438 cm^{-1} 是 O-H 的伸缩振动引起的吸收，2950 cm^{-1} 是由糖类 C-H 伸缩振动引起的吸收，它是糖类的特征吸收峰；1689 cm^{-1} 是多糖中-COO^-的 C=O 非对称伸缩振动引起的吸收，表明 PMP-2a 有糖醛酸存在；1415 cm^{-1}、1239 cm^{-1} 是由糖类 C-H 变角振动引起的吸收；955 cm^{-1} 表明含有吡喃糖环；833 cm^{-1} 是 α-D-葡萄吡喃糖苷键振动引起的吸收[10]。红外光谱结果表明 PMP-2a 是一种具有 α-D-葡萄吡喃糖苷键的酸性多糖。

2.6 PMP-2a 的单糖组成分析

由图 5 可以看出，通过标准单糖保留时间（a）定性分析，PMP-2a 的中性糖部分由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖组成的（b），根据峰面积计算出它们的摩尔比为 1:13.18:2.19:7.23:3.15，葡萄糖含量最高，其次是甘露糖，含量最少的是鼠李糖。

2.7 PMP-2a 的刚果红实验结果

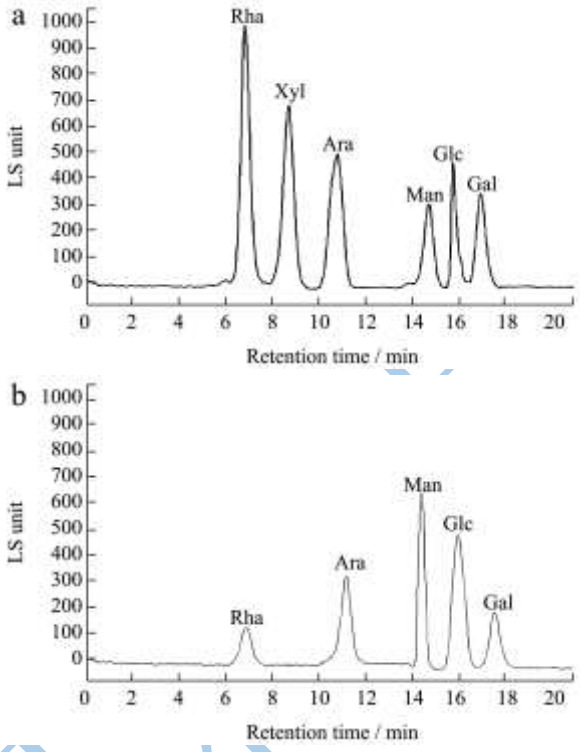


图 5 单糖标准品（a）和 PMP-2a 水解产物（b）的高效液相色谱

Fig.5 HPLC chromatograms of standard monosaccharides (a) and hydrolyzed monosaccharides (b) from PMP-2a

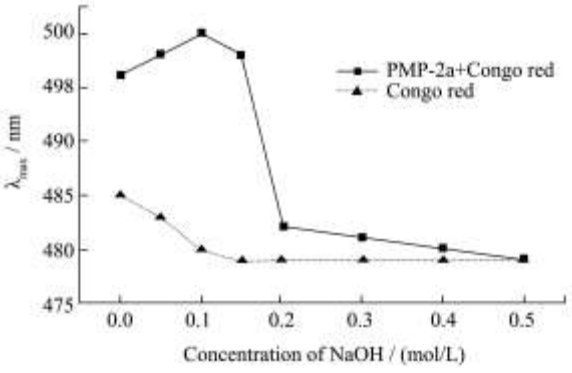


图 6 不同碱浓度下刚果红与 PMP-2a 结合的波长变化

Fig.6 Changes in absorption wavelength of Congo red-PMP-2a complex in NaOH solutions of different concentrations

刚果红是一种染料，它可与具有多股螺旋构象的多糖形成络合物，络合物的最大吸收波长同刚果红相比发生红移[13]。由图 6 可以看出，PMP-2a 与刚果红形成的络合物在 0~0.4 mol/L 的 NaOH 溶液范围内最大吸收波长发生红移，出现亚稳区，在中等碱性条件下发生构象转变；在强碱性条件下解体为单股无规线团，不能再与刚果红形成络合物，λmax 急骤下降到与刚果红相同。因此可以判断 PMP-2a 分子存在三股螺旋构象。

2.8 PMP-2a 的糖肽键连接键型分析

紫外分析表明，PMP-2a在β-消去后，240 nm出现

明显的吸收增加。这是因为PMP-2a经NaOH处理后的O-糖肽键会产生α-氨基丙烯酸或α-氨基丁烯酸，结果导致240 nm处的光吸收值增加[14]，因此可以判断PMP-2a中糖和蛋白之间的连接键型为O-型糖肽键。

2.9 PMP-2a 的体外抗氧化测定

2.9.1 PMP-2a 对超氧阴离子自由基清除能力的测定

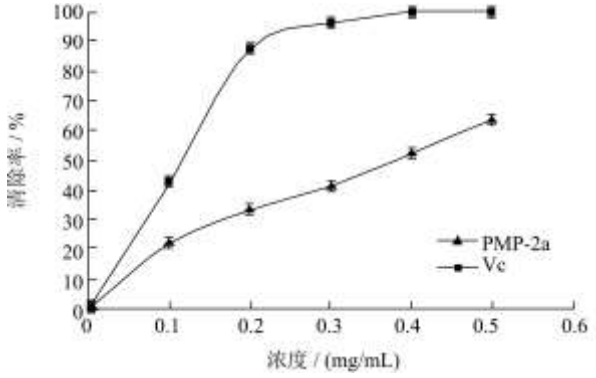


图 7 PMP-2a 对超氧阴离子的清除作用

Fig.7 Scavenging effect of PMP-2a on superoxide anion radicals

超氧阴离子自由基的清除率是反映物质抗氧化作用的重要指标之一。由图7可知，在试验设计的浓度范围内，PMP-2a和Vc对超氧阴离子自由基的清除率均随着浓度的升高而增大，且PMP-2a的清除效果具有明显的量效关系。PMP-2a的IC_{50}为0.37 mg/mL，Vc的IC_{50}为0.14 mg/mL，PMP-2a的清除能力比Vc弱。由于Vc是一种公认的抗氧化剂，因此可以说明PMP-2a具有较强的清除超氧阴离子自由基的能力。

2.9.2 PMP-2a 对羟基自由基清除能力的测定

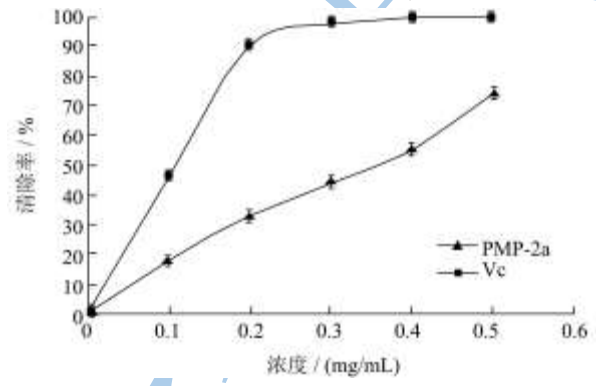


图 8 PMP-2a 对羟基自由基的清除作用

Fig.8 Scavenging effect of PMP-2a on hydroxyl free radicals

羟基自由基对生物机体危害较大、毒性较强，是造成有机体过氧化损伤的主要因素。对羟基自由基的清除能力也是物质抗氧化的重要指标之一。由图 8 可知，PMP-2a 对·OH 具有一定的清除能力，且清除率随着浓度的升高而增大，与浓度存在一定的量效关系。PMP-2a 的 IC_{50} 为 0.34 mg/mL，Vc 的 IC_{50} 为 0.13 mg/mL，PMP-2a 的清除能力也比 Vc 弱，同样也可以说明 PMP-2a 具有较强的清除羟基自由基的能力。

3 结论

3.1 秀珍菇菌丝体经温水提取、sevag 法脱蛋白、活性炭法初步纯化、再经离子交换柱层析和凝胶色谱柱层析等方法进一步纯化，得到一种水溶性多糖 PMP-2a。通过红外、紫外、液相色谱等光谱分析方法分析，确定秀珍菇菌丝体多糖 PMP-2a 相对分子质量为 9.28×10^4 Da，其中性糖部分含有鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖等单糖组分，是一种均一的具有 α-D 吡喃糖苷键的酸性多糖，糖链与蛋白之间是以-O-的相连接的。秀珍菇菌丝体多糖 PMP-2a 具有较好的清除清除超氧阴离子自由基和羟基自由基的能力，且清除能力与其浓度呈一定的正相关性，因此具有较好的体外抗氧化活性。

3.2 本文只是解析秀珍菇菌丝体多糖 PMP-2a 的部分结构，关于其详细的结构信息要结合高碘酸氧化、Smith 降解、甲基化等化学方法和核磁共振波谱、气质联用等物理手段加以分析才能进一步确定；另外 PMP-2a 的体外抗氧化活性与其结构存在何种构效关系还有待进一步研究与分析。

参考文献

[1] 胡淑琴,陈智毅,邹宇晓,等.比色法测定15种食用菌中甘露醇的含量[J].现代食品科技,2010,26(8):901-903,912
HU Shu-qin, CHEN Zhi-yi1, ZOU Yu-xiao, et al. Determination of mannitol content in 15 kinds of edible mushrooms by colorimetry [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(8): 901-903, 912

[2] 忻雅,阮松林,王世恒,等.基于RAPD和EST-SSR标记的秀珍菇菌株聚类分析[J].食用菌学报, 2008, 15(4): 20-25
XIN Ya, RUAN Song-lin, WANG Shi-heng, et al. Cluster analysis of ten *Pleurotus geesteranus* strains based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and expressed sequence tag-single sequence repeats (EST-SSR) markers [J]. Acta Edulis Fungi, 2008, 15(4): 20-25

[3] Mei Z, Lin Z, Steve W C, et al. Fractionation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides and polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus geesteranus* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(1): 5-12

[4] 杨润亚,李维焕,吕芳芳.秀珍菇子实体多糖的提取工艺优化及体外抗氧化性[J].食品与生物技术学报,2012,31(10): 1093-1099

YANG Run-ya, LI Wei-huan, LU Fang-fang. Optimization of the extraction technique and the antioxidant activity of polysaccharides from *Pleurotus geesteranus* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(10): 1093-1099

[5] 张安强,许媚,周赛静,等.秀珍菇子实体多糖中3-O-甲基-半乳糖组分的谱学鉴定[J].药物分析杂志,2013,33(1): 90-93,115

ZHANG An-qiang, XU Mei, ZHOU Sai-jing, et al. Spectroscopic identification of 3-O-methyl-galactose in polysaccharide isolated from the fruiting body of *Pleurotus geesteranus* [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 33(1): 90-93, 115

[6] Sadhan K Roy, Debabrata Maiti, Subhas Mondal, et al. Structural analysis of a polysaccharide isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, Pleurotus sajor-caju, cultivar Black Japan [J]. Carbohydrate Research, 2008, 343(6): 1108-1113

[7] TIAN L M, ZHAO Y, GUO C, et al. A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal *Houttuynia cordata* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83: 537-544

[8] Zhang H L, Li J, Li G, et al. Structural characterization and anti-fatigue activity of polysaccharides from the roots of *Morinda officinalis* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 44(3): 257-261

[9] 白日霞.红海藻多糖的提取和结构研究[J].天然产物研究与开发,1999,11(4):45-48

Bai Ri-xia. Isolation and structural identification of a polysaccharide of red seaweed [J]. Natural Product Research and Development, 1999, 11(4): 45-48

[10] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1999

Zhang W J. The glycoconjugates biochemical research techniques [M]. Hang Zhou: Zhejiang University Press, 1999

[11] Cheung Y C, Siu K C, Liu Y S, et al. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide-protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(5): 892-895

[12] Li Q, Yu N W, Wang Y P, et al. Extraction optimization of Bruguiera gymnorhiza polysaccharides with radical scavenging activities [J]. Carbohydrate Polymers. 2013, 96: 148-155

[13] Lendel C, Bolognesi B, Wahlstro A, et al. Detergent-like interaction of congo red with the amyloid beta peptide [J]. Biochemistry, 2010, 49(7): 1358-1360

[14] 陈健,向莹.滑子菇多糖的结构分析[J].现代食品科技,2013, 29(7):1544-1550

CHEN Jian, XIANG Ying. Structural analysis of polysaccharides from *Pholiota nameko* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1544-1550

现代食品科技