

灰树花子实体多糖的结构特性分析及提高小鼠的运动耐力

权树琳^{1*}, 张班¹, 徐瑞豪², 王慧慧²

(1. 郑州工商学院体育学院, 河南郑州 451400) (2. 河南中医药大学药学院, 河南郑州 450046)

摘要: 探究灰树花子实体多糖(GFP)的结构特性, 同时考察其对小鼠运动耐力的影响, 为后续灰树花多糖的深入研究提供参考。通过超声波、水提醇沉法获得灰树花粗多糖, 采用 DE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 进行分离纯化, 在扫描电镜下观察多糖的形貌特征, 高效凝胶渗透色谱分析多糖的分子量, 红外光谱分析多糖糖苷键构型, 高效液相色谱测定多糖的单糖组成。构建小鼠力竭游泳和转棒疲劳实验模型, 通过测定小鼠体内肝糖原(Hepatic Glycogen, HG)、肌糖原(Muscle Glycogen, MG)及血清生化指标, 考察多糖对小鼠运动耐力的作用。结果表明, GFP 纯化后分离得到 3 个多糖组分, GFP-A1 的占比最大, 得率为 62.98%, 其重均分子量为 18 374 u, 异头碳为 α 构型, 由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖组成, 摩尔比为 1:10.52:11.38:18.67。小鼠的动物实验结果显示, 与 CK 组相比, GFP-A1 低、中、高剂量组的小鼠力竭游泳时间和转棒疲劳时间均显著提高 ($P<0.05$), HG、MG 含量和超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)活性同样显著增加 ($P<0.05$), 血乳酸(Blood Lactic Acid, BLA)、血尿素氮(Blood Urea Nitrogen, BUN)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量则显著降低 ($P<0.05$), 表明 GFP-A1 可以显著提高小鼠的运动耐力, 且呈剂量依赖关系。结果表明, 从灰树花子实体中提取的 GFP-A1 具有明显提高小鼠运动耐力的作用, 该研究为灰树花多糖在运动食品领域上的开发应用提供了理论依据, 具有广阔的应用前景。

关键词: 灰树花; 多糖提取; 结构特性; 运动耐力

文章编号: 1673-9078(2023)10-25-34

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1336

Structural Characteristics of the Polysaccharides Isolated from the Fruiting Bodies of *Grifola frondosa* and Their Effects on Improving Exercise Endurance in Mice

QUAN Shulin^{1*}, ZHANG Ban¹, XU Ruihao², WANG Huihui²

(1. College of Physical Education, Zhengzhou Technology and Business University, Zhengzhou 451400, China)

(2. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: The structural characteristics of polysaccharides from *Grifola frondosa* (GFP) and their effects on exercise endurance in a mouse model were assessed. The crude polysaccharides of *G. frondosa* were obtained by ultrasound-assisted aqueous extraction followed by ethanol precipitation. The crude polysaccharides were separated with a DE-52 column and purified using a Sephadex G-100 column. Thereafter, scanning electron microscopy was employed to evaluate the morphological characteristics of GFP. Meanwhile, molecular weight of GFP was analyzed by HPGPC, and the glycosidic bond configuration was determined by infrared spectroscopy. Finally, the monosaccharide composition was determined by HPLC. A mouse model for exhaustive swimming and rotarod fatigue was established. The hepatic glycogen (HG), muscle glycogen (MG), and serum biochemical indices of the mice were evaluated to assess the effects of GFP on exercise endurance. Three

引文格式:

权树琳,张班,徐瑞豪,等.灰树花子实体多糖的结构特性分析及提高小鼠的运动耐力[J].现代食品科技,2023,39(10):25-34

QUAN Shulin, ZHANG Ban, XU Ruihao, et al. Structural characteristics of the polysaccharides isolated from the fruiting bodies of *Grifola frondosa* and their effects on improving exercise endurance in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 25-34

收稿日期: 2022-10-20

基金项目: 河南省科技支撑项目(2018-ZZJH-170); 河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZY2148)

作者简介: 权树琳(1988-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 体育营养学和体育教育训练学, E-mail: 37179557@qq.com

polysaccharide components were separated following GFP purification; GFP-A1 was most abundant with a 62.98% yield. GFP-A1 had an average molecular weight of 18 374 u, and anomeric carbon was in α configuration. Moreover, it comprised rhamnose, glucose, galactose, and fucose at a molar ratio of 1:10.52:11.38:18.67. The mouse model revealed that compared with the CK group, the groups treated with low-, medium-, or high-dose GFP-A1 exhibited significantly longer exercise in the exhaustive swimming and rotarod fatigue tests ($P<0.05$). Meanwhile, the HG and MG contents, as well as the SOD activity were markedly increased in the GFP-A1-treated groups ($P<0.05$), whereas the blood lactic acid, blood urea nitrogen, and serum malondialdehyde levels were significantly reduced ($P<0.05$). These results indicate that GFP-A1 can significantly improve the exercise endurance of mice in a dose-dependent manner. Hence, this study provides a theoretical basis for the development and application of *Grifola frondosa*-derived polysaccharides, which are believed to have broad application potential in sports nutrition.

Key words: *Grifola frondosa*; polysaccharide extraction; structural characteristics; exercise endurance

运动耐力是机体承受持续运动的最大负荷, 人们在高强度、持续性的运动或工作节奏下, 身体容易出现运动性疲劳。在此状态下, 体内的糖原物质会大量分解, 产生过多的乳酸, 同时还会加剧蛋白质的分解, 生成大量的尿素氮, 进而导致细胞内环境 pH 值下降, 生理环境因而发生一定程度的改变, 新陈代谢紊乱^[1]。研究表明, 在剧烈运动时, 体内产生的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS) 会攻击细胞产生脂质过氧化物丙二醛(MDA), 使细胞处于氧化应激水平, 从而会降低机体的运动耐力, 甚至导致机体免疫力下降, 器官组织细胞受损^[2]。因此, 通过增加机体的糖原储存, 提高乳酸、尿素氮、ROS 的分解速度, 改善细胞的氧化应激水平, 对提高机体的运动耐力有着重要作用。Cai 等^[3]研究表明灵芝多糖可以降低小鼠细胞内 MDA、血乳酸(BLA)水平, 提高抗氧化酶活性, 进而有效缓解小鼠的运动性疲劳, 提高运动耐力; Zhong 等^[4]研究发现补充多肽可以提高小鼠的糖原储备, 降低细胞的氧化应激水平, 从而提高运动耐力, 减少小鼠的体力疲劳; 任广泉等^[5]研究发现从玉米耳中提取的多糖可以显著提高小鼠肝糖原和肌糖原的储备, 促进乳酸和尿素氮的分解, 提高体内抗氧化酶活性, 延长力竭游泳时间, 从而提高了小鼠的运动耐力。这些研究表明, 通过体外补充外源物质可以有效提高机体的运动耐力。

灰树花(*Grifola frondosa*)是一种兼具营养和药用价值的食药两用真菌。早在神农本草就记载, 其具有益气健脾、补虚扶正的作用, 《本草纲目》记载其味甘、中立、无毒。研究表明, 灰树花含有多糖、多酚、矿物质和微量元素以及丰富的蛋白质、维生素等^[6], 而多糖是灰树花最主要的药理活性物质, 现代药理研究表明, 灰树花多糖具有抗疲劳^[7]、抗氧化^[8]、抗肿瘤^[9]、降血糖^[10]、调节炎症^[11]等功效。王金菊等^[12]、李炳功^[13]曾研究发现灰树花的发酵液多糖可以提高小鼠的跑笼圈数, 具有提高小鼠抗运动疲劳的能力。然而目前, 对于灰树花子实体多糖的抗运动疲劳作用还研究较

少, 且对其具体的作用机制尚不清晰。因此, 本研究以灰树花子实体为材料, 提取纯化并分析灰树花多糖的结构特性, 通过转棒实验和力竭游泳实验考察灰树花多糖对小鼠运动耐力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

灰树花子实体: 成都市农林科学院, 品种, 川灰 1 号; SPF 级昆明小鼠: 河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 生产许可证号: SCXK(豫)2020-0005, 小鼠的耐力实验方案经河南中医药大学实验动物中心伦理委员会审核通过(批准号: 2021-023), 该实验方法和操作符合国家实验动物饲养管理与使用指南。人参皂苷(卫生健字(2002)第 0247 号, 食品生产许可证编号: SC12721021303621, 规格 100 mg/粒, 每 100 g 含活性物质 2.57 g), 大连富生制药有限公司; 离子交换纤维素(DEAE-52), 福州飞净生物科技有限公司; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-100(规格: 26 mm×600 mm), 北京华迈科生物技术有限; 葡萄糖(Glucose, Glu)、核糖(Ribose, Rib)、甘露糖(Mannose, Man)、半乳糖(Galactose, Gal)、木糖(Xylose, Xyl)、阿拉伯糖(Arabinose, Ara)、岩藻糖(Fucose, Fuc)、鼠李糖(Rhamnose, Rha)等单糖标准品, 西格玛(上海)有限公司; 肝糖原(HG)、肌糖原(MG)、血尿素氮(BUN)、血乳酸(BLA)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所; 苯酚、硫酸、盐酸、乙醇、乙腈、甲醇均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

单糖分析色谱柱 SUPELCO SIL LC-NH2(规格 250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 上海楚定分析仪器有限公司; XR-6C 型小鼠转棒疲劳仪, 上海欣软信息科技有限公司; LC-20A 高效液相色谱仪, 日本岛津; Beta2-8LSCplus 冷冻干燥机, CHRIST 德国; AG-9230 旋转蒸发仪, 瑞士步琪公司; VERTEX 80v 红外光谱

分析仪,德国布鲁克公司;UV-2550 紫外-可见分光光度计,日本岛津;DB080 恒温游泳箱,北京智鼠多宝生物科技有限责任公司。GPC-220 高温凝胶色谱仪,美国 Agilent;JM-30D-28 型超声波清洗器,深圳市洁盟清洗设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 灰树花多糖提取

灰树花子实体在 50 °C 烘箱中,烘至水分低于 5%,粉碎后过 0.5 mm 筛,称取 2 000 g 粉末,分成 4 份,每份 500 g,分 4 次提取。取 500 g 粉末,加入 95%乙醇浸泡,脱脂处理 12 h,过滤后置于 50 °C 烘箱中去除乙醇。向干燥后的粉末中加入 3 倍体积的蒸馏水,在超声波清洗仪中进行超声处理,设置功率 400 W、温度为 30 °C,时间 10 min,然后将超声后的粉末和提取液一起在恒温水浴锅中进行热水浸提,浸提温度 90 °C,浸提时间 2 h,过滤后收集滤液,向滤渣中再次加入 3 倍体积蒸馏水进行重复操作 1 次,最后合并滤液。滤液经过旋转蒸发浓缩后体积约 200 mL,向浓缩液中加入 5 倍体积无水乙醇,4 °C 冰箱静置 12 h,离心收集沉淀,鼓风机中干燥沉淀,加入无菌蒸馏水搅拌使其全部溶解,采用 Sevage 法脱蛋白处理,重复多次至无蛋白质产生。最后再加入无水乙醇,4 °C 冰箱静置 12 h,离心收集后的沉淀再经丙酮和乙醚洗涤,沉淀用蒸馏水溶解,3 500 u 透析袋,4 °C 冰箱透析 48 h,渗透液干燥后即得灰树花粗多糖(GFP)。

1.2.2 灰树花粗多糖分离

称取 150 g 灰树花粗多糖粉末,加入 3 750 mL 蒸馏水配制成 40 mg/mL 的粗多糖溶液,每次吸取 20 mL 溶液上样于 DEAE-52 离子交换层析柱内,分别用无菌去离子水和 0.1、0.2、0.3 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,洗脱流量为 1.0 mL/min,每管收集 10 mL,不同洗脱液分别收集 25 管,苯酚-硫酸法检测每管洗脱液的吸光值^[14],再将相同洗脱液合并,旋转蒸发浓缩,透析冷冻干燥,即得分离多糖半成品。绘制洗脱曲线,以收集的管数为横坐标(x),各管收集液的吸光值 and 不同洗脱液浓度为纵坐标(y),绘制洗脱曲线。

1.2.3 灰树花多糖半成品的纯化

根据 1.2.2 分离的实验结果,共分离得到 3 个样品(GFP-A、GFP-B 和 GFP-C),由于经去离子水洗脱分离收集并干燥后的多糖粉末(GFP-A)占比最多,可满足后续实验,因此,本研究选 GFP-A 进行纯化处理。将分离收集到的 GFP-A 用蒸馏水配置成溶液,用 1 mL 移液枪将 GFP-A 溶液加入到葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-100 中,使用去离子水进行洗脱,流速

0.5 mL/min,10 mL/管,苯酚-硫酸法测定每管收集液的吸光值,合并相同组分,最后将所有合并收集液浓缩、冷冻干燥,即得到灰树花多糖纯品(GFP-A1)。计算纯化多糖得率,参照 1.2.2 方法绘制洗脱曲线。

$$R = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R——纯化多糖得率, %;

m_2 ——灰树花多糖纯品(GFP-A1)质量, g;

m_1 ——灰树花粗多糖(GFP)质量, g。

1.2.4 GFP 与 GFP-A1 的理化特性分析

准确称取 1 mg 的 GFP-A1,配成 0.1 mg/mL 的多糖样品溶液,采用苯酚-硫酸法^[14]、3,5-二硝基水杨酸法^[15]、考马斯亮蓝法^[16]、间羟基联苯法^[17]和硫酸钡比浊法^[18]分别测定 GFP 与 GFP-A1 中总糖、还原糖、蛋白质、糖醛酸、硫酸基的含量。

1.2.5 GFP-A1 的紫外可见吸收光谱分析

准确称取 10 mg 的 GFP-A1,加入 10 mL 蒸馏水,配成 1 mg/mL 的多糖样品溶液,利用紫外-可见分光光度计对样品溶液进行 200~600 nm 全波段扫描。以波长为 x 轴,吸光值为 y 轴,绘制吸收光谱曲线。

1.2.6 GFP-A1 的分子量分析

精密称取 GFP-A1 样品 20 mg 于样品瓶中,加入浓度为 0.1 mol/L NaNO₃ 溶液 2 mL,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上层液体,过 0.45 μm 滤膜。采用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)测定 GFP-A1 的分子量^[19],通过 GPC 软件分析,并绘制曲线。

1.2.7 GFP-A1 的电镜扫描分析

称取 0.5 g 纯化的 GFP-A1 粉末,放置碳导电胶带上经真空喷金处理后,按扫描电镜基本操作,将样品置于 SEM 下 200 倍和 2 000 倍观察。

1.2.8 GFP-A1 的红外光谱分析

将 1 mg GFP-A1 粉末与 KBr 充分混合研磨后进行压片处理,红外光谱扫描波长为 4 000~500 cm⁻¹。

1.2.9 GFP-A1 的单糖组成分析

参考金鑫等^[20]的方法对 GFP-A1 样品和单糖标准品进行柱前衍生,流动相 A 为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液,流动相 B 为乙腈,流动相和样品溶液经 0.45 μm 水相过滤膜,体积比 A:B 为 83:17,设置柱温 35 °C,检测波长 250 nm,流速 0.8 mL/min,上样量 20 μL。

1.2.10 小鼠的运动耐力实验

1.2.10.1 小鼠实验分组及剂量确定

将 75 只小鼠适应性饲养一周后,随机进行分组,分别为空白对照组(CK)、阳性对照组(人参皂苷)、GFP-A1 低中高剂量组(GFP-A1-L 组、GFP-A1-M 组、

GFP-A1-H组), 每组15只, 每个鼠笼5只, 饲养期间小鼠自由饮食。

参考人参皂苷产品说明书, 成人的推荐剂量为每天2次, 每次2粒, 每粒100 mg, 每100 g含有人参皂苷2.57 g, 依据60 kg成人服用人参皂苷的剂量换算成小鼠灌胃剂量为20 mg/kg·bw, 根据小鼠的体质量, 试验选取的阳性对照(人参皂苷)的剂量为20 mg/kg·bw, 因此, 实验确定GFP-A1低剂量为10 mg/kg·bw, 记为GFP-A1-L; GFP-A1中剂量为20 mg/kg·bw, 记为GFP-A1-M; GFP-A1高剂量为40 mg/kg·bw, 记为GFP-A1-H, 空白对照组灌胃无菌生理盐水, 所有小鼠的灌胃体积均为0.2 mL/10 g·bw。连续灌胃4周, 灌胃时间为每周一至周六的上午9:00, 周日休息。实验开始前和实验开始后的第7、14、21、28天分别对小鼠称体质量。

1.2.10.2 转棒实验和力竭游泳实验

在实验的第27天时, 小鼠给药后休息1 h, 所有小鼠进行转棒预实验, 设置转速10 r/min, 预实验时间5 min/只。第28天上午9:00开始正式进行小鼠转棒实验, 随机取各组5只小鼠置于转棒疲劳仪上, 设置转速为20转/min, 记录小鼠跌落时间, 重复3次, 每次休息5 min, 累计时间记作转棒时间。

在实验的第28天下午13:00开始进行小鼠力竭游泳实验, 从各组剩余小鼠中随机取5只, 根据小鼠体质量在尾根处系上5%的铅块, 将小鼠放入恒温水箱中, 水温(28±2)℃, 水深30 cm, 用玻璃棒在小鼠周围轻轻搅动, 使小鼠四肢一直处于运动状态, 记录小鼠自游泳开始至头部沉入水下7 s内不能浮出水面的时间。

1.2.10.3 小鼠生化指标测定

取各组剩下的5只小鼠进行不负重游泳试验, 时间30 min, 游泳结束后麻醉小鼠, 通过眼球采血, 4 000 r/min低温离心5 min, 吸取上层液体, 保存于-20℃冰箱中, 分别用试剂盒测定血清中BLA、BUN、MDA含量和SOD活性。再通过颈椎脱臼处死小鼠, 小心取出肝脏组织和后腿肌肉组织, 用预冷的PBS缓冲液清洗干净, 无菌滤纸控干, 分别称取0.1 g组织, 各加入0.9 mL预冷的PBS溶液, 研磨机上打成匀浆, 离心后上清液采用试剂盒测定肝脏组织HG和肌肉组织MG含量。

1.3 数据分析

实验数据采用Excel 2010处理, SPSS 22.0进行组间单因素方差分析, 数据使用($\bar{x} \pm s$)表示, Origin 8.0作图分析, $P < 0.05$ 表示数据差异显著具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 GFP的提取和纯化

通过提取得到灰树花粗多糖(GFP)156.75 g, 粗多糖的提取率为7.84%, 进一步通过分级萃取, 将GFP溶液上样到DE-52层析柱上, 其洗脱曲线见图1a, 通过去离子水洗脱得到第一个组分GFP-A, 含量最高, 0.1 mol/L的NaCl溶液洗脱得到另一个组分GFP-B, 0.2 mol/L的NaCl溶液的洗脱得到第三个组分GFP-C, 第三个组分含量最低。从图中可知, 将1~20管洗脱液进行合并, 旋转蒸发浓缩干燥后得到GFP-A, 114.43 g。李彦颖等^[21]通过碱提法并分离纯化同样获得了3个灰树花多糖组分, 其中第一个组分占比最多, 这与本研究的结果一致, 许盈盈^[22]采用Vc-H₂O₂辅助法提取灰树花多糖, 分离纯化得到了3个多糖组分, 其中通过0.1 mol/L的NaCl洗脱出的第二个组分占比最高, 而本研究是通过去离子水收集得到的第一个组分最高, 这一结果差异可能是由于灰树花子实体产地、品种的不同或者提取多糖的方法不同造成的。

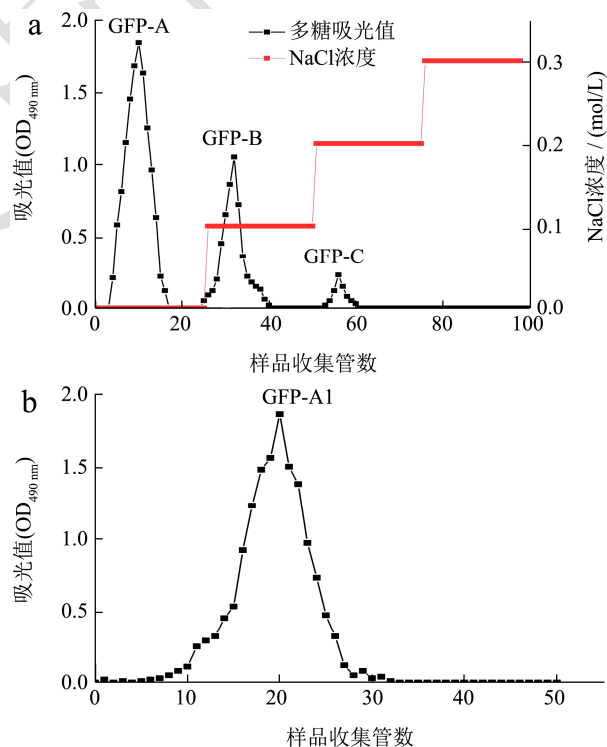


图1 灰树花多糖纯化的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of purified polysaccharide from *Grifola frondosa*

注: a为DEAE-52色谱层析洗脱曲线; b为葡聚糖凝胶色谱层析洗脱曲线。

将GFP-A经葡聚糖凝胶色谱进一步纯化, 纯化后的曲线见图1b。GFP-A纯化后只得到一个组分, 命名

GFP-A1, 位于第 10~30 管, 将 10~30 管洗脱液合并, 旋转蒸发浓缩干燥后得到 98.72 g, 计算纯化多糖的得率为 62.98%。

2.2 灰树花粗多糖 (GFP) 和纯化多糖 (GFP-A1) 的理化特性分析

分别配制不同浓度葡萄糖、蛋白质、葡萄糖醛酸、硫酸基标准溶液, 测得不同浓度标准溶液的吸光值, 绘制标准曲线, 测得总糖含量的线性回归方程为 $y=2.75416x+0.01254$, $R^2=0.99842$, 蛋白质含量的线性回归方程为 $y=0.03546x+0.00984$, $R^2=0.99864$, 糖醛酸含量的线性回归方程为 $y=0.00314x+0.00259$, $R^2=0.99941$, 硫酸基含量的线性回归方程为 $y=0.00048x+0.00117$, $R^2=0.99748$ 。灰树花多糖的理化特性见表 1, 测得 GFP 的总糖占比为 64.675%, 蛋

表 1 GFP 和 GFP-A1 样品中总糖、蛋白质、糖醛酸、硫酸根含量 (%)

Table 1 Contents of total sugar, protein, uronic acid and sulfate in GFP and GFP-A1 samples (%)

样品	总糖含量	蛋白质含量	糖醛酸含量	硫酸基含量
GFP	64.67±5.34	12.58±1.67	3.28±0.47	7.35±0.68
GFP-A1	89.32±2.48	0	0	4.85±0.52

2.3 GFP-A1 的紫外可见吸收光谱分析

GFP-A1 在 200~600 nm 波段的吸收峰见图 2, 从图 2 可以看出, 在 200~600 nm 范围内均具有较强的吸光值, 在 200~400 nm 之间吸光值呈现一条光滑的曲线, 说明 GFP-A1 的纯度较高。研究表明, 在紫外可见分光光度计, 核酸的特征吸收峰出现在 260 nm 处, 蛋白质的特征吸收峰出现在 280 nm 处, 色素的特征吸收峰出现在 400 nm 处^[23], 图中曲线显示, GFP-A1 在 260、280、400 nm 处均未出现明显的吸收峰, 可见, 提取的 GFP-A1 中未含有核酸、蛋白质和色素。该结果正好与 GFP-A1 的理化特性分析一致。

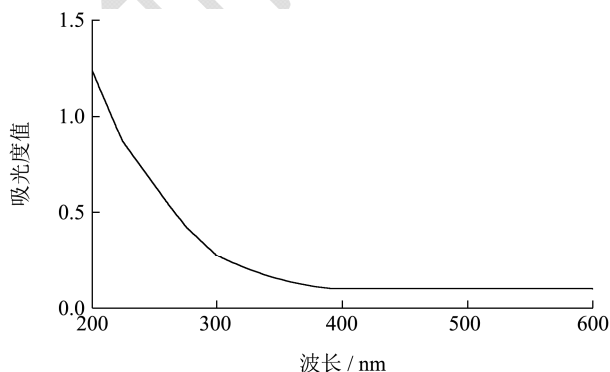


图 2 GFP-A1 的紫外可见吸收光谱分析

Fig.2 Ultraviolet visible absorption spectrum analysis of GFP-A1

白质占比为 12.58%, 糖醛酸占比为 3.28%, 硫酸基占比为 7.35%, 可见, 提取的灰树花粗多糖 GFP 里的蛋白质含量较高, GFP 里含有一定比例的酸性多糖, 且含有硫酸基团。纯化后的 GFP-A1 中仅检测到了总糖和硫酸基含量, 蛋白质被完全清除, GFP-A1 是由去离子水洗脱而来, 为中性水溶液多糖, 其多糖基团中不含有糖醛酸, 其硫酸基含量较 GFP 降低了 34.01%, 可见, GFP 组分中除了 GFP-A1 还含有其他组分多糖, 这一结果与 GFP 纯化后洗脱出 3 个多糖组分的结果一致。许盈盈^[22]和赵厚宽^[23]研究结果显示, 去离子水洗脱的灰树花多糖组分中总糖占比最大, 均大于 85%, 同时均存在少量的硫酸基, 不含有蛋白质, 这一结果与本研究的结果相似, 然而本研究分离的 GFP-A1 中不含有糖醛酸, 这与前两位学者的研究结果不同, 这主要是多糖的提取、纯化方法不同引起^[24]。

2.4 GFP-A1 的分子量分析

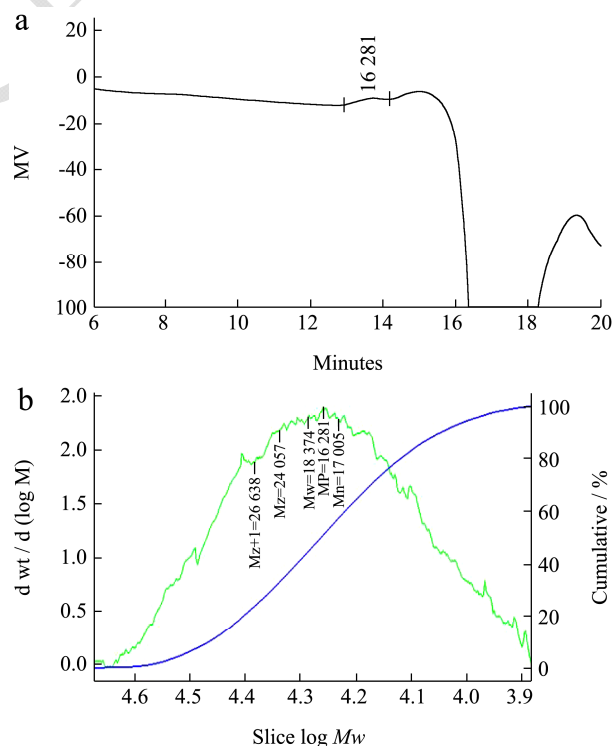


图 3 GFP-A1 的分子量

Fig.3 Molecular weight of GFP-A1

注: a 为 GFP-A1 最高峰分子量; b 为 GFP-A1 分子量分布。

通过高效凝胶渗透色谱和 GPC 软件分析, GFP-A1 的分子质量曲线见图 3, 从图中可知, 图 3a 12.5~14 min 时间段出的峰比较稳定, 显示的是最高峰分子量, 图 3b 是平均分子量分布, 分子量分布比较集中, 曲线相对平滑。结果显示 GFP-A1 的 z 均分子量 (Mz) 为 24 057 u, 重均分子量 (Mw) 为 18 374 u, 最大峰的分子量 (Mp) 为 16 281 u, 数均分子量 (Mn) 为 17 005 u。分散度 (Mw/Mn) 为 1.08。Mao 等^[25]通过硫酸铵/乙醇双水相提取纯化得到灰树花多糖的重均分子量为 2.954×10^6 u, Zhao 等^[26]在低温下提取获得了一个平均分子量约为 1.79×10^3 u 灰树花多糖, He 等^[27]研究发现分别采用热水提取法、酸碱提取法和微波提取法, 提取得到的灰树花菌多糖分子量存在一定差异。可见, 采用不同的提取方法, 所获得的灰树花多糖的分子量存在显著差异。Zhang 等^[28]采用热水浸提获得的灰树花多糖分子量达到 2.04×10^6 u, 显著高于本研究提取的 GFP-A1 分子量, 可能原因是由于本研究采取的热水浸提温度较高, 同时进行了超声波前处理, 超声波的能量具有较高的穿透性, 较高的提取温度和超声波能量打破了大分子多糖的糖苷键。另外, Su 等^[29]研究发现随着提取温度的升高, 提取的灰树花多糖分子量呈现明显的降低趋势, 进一步证实了温度对多糖分子量的影响。

2.5 GFP-A1 的电镜扫描分析

GFP-A1 在扫描电镜下放大 200 倍 (左图) 和 2 000 倍 (右图) 观察多糖的形貌特征, 见图 4, 在 200 倍下观察到干燥后多糖表面光滑, 黏成较大的块状, 说明 GFP-A1 分子黏连、凝聚力较强。但在块状上可明显看出存在较多的裂纹, 裂口处较粗糙。在 2 000 倍下观察到多糖裂口处表面粗糙, 呈现颗粒状, 边缘还有不同的孔结构。GFP-A1 的形貌特征说明其具有较强的水溶性和一定的生物活性^[30]。

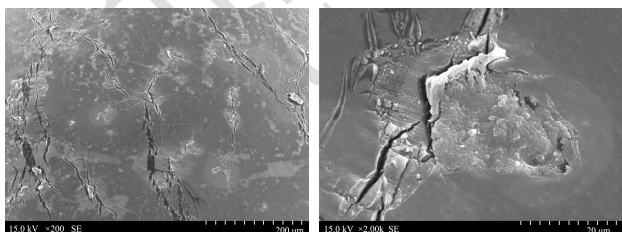


图 4 GFP-A1 的电镜扫描图

Fig.4 SEM of GFP-A1

2.6 GFP-A1 的红外光谱分析

GFP-A1 的红外光谱见图 5, $3\ 374\ \text{cm}^{-1}$ 处的宽吸收峰为-OH 官能团, $2\ 913\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为糖类的

C-H 伸缩震动引起^[31], $1\ 621\ \text{cm}^{-1}$ 处为酰胺基 C=O 伸缩震动, $1\ 317\ \text{cm}^{-1}$ 是 C-H 的变角振动引起的吸收峰^[32], $1\ 262\ \text{cm}^{-1}$ 处存在一个较小的吸收峰, 该吸收峰由 S=O 的不对称震动引起^[33], 表明 GFP-A1 中存在一定的硫酸基, 这正好与其理化特性分析一致; $1\ 124\ \text{cm}^{-1}$ 由两种 C-O 伸缩振动引起的, $848\ \text{cm}^{-1}$ 处为 α -端基差向异构的 C-H 变角震动, $757\ \text{cm}^{-1}$ 处为 α -D-木吡喃环的对称振动^[34], 说明 GFP-A1 具有 α -糖苷键, 其异头碳为 α 构型。Zhang 等^[28]通过热水浸提灰树花子实体同样得到一个具有 α -D 糖苷键的水溶性多糖, Su 等^[29]从灰树花中分离的水溶性多糖为 β -D 糖苷键构型, 另外 Li 等^[35]提取的一种新型灰树花多糖 GFP-22 则同时存在 α -D 糖苷键和 β -D 糖苷键, 可见, 灰树花子实体中存在多种构型的多糖。

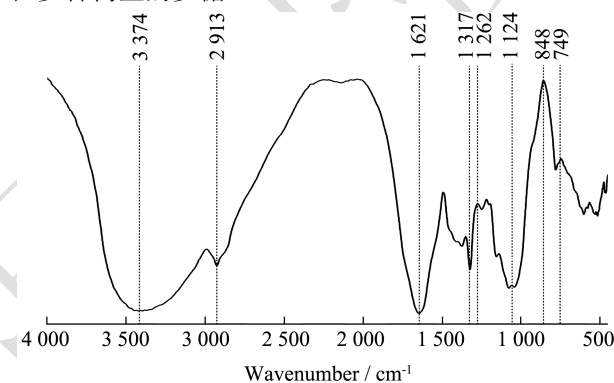


图 5 GFP-A1 的红外光谱

Fig.5 Infrared spectrum of GFP-A1

2.7 GFP-A1 的单糖组成分析

表 2 8 种单糖的线性范围和回归方程

Table 2 Linear range and regression equations of eight monosaccharides

单糖标准品	回归方程	相关系数
葡萄糖 (Glu)	$y=1.05 \times 10^5 x + 410.25$	0.996 2
核糖 (Rib)	$y=2.57 \times 10^5 x - 146.35$	0.994 7
甘露糖 (Man)	$y=7.50 \times 10^4 x - 223.16$	0.992 6
半乳糖 (Gal)	$y=1.96 \times 10^5 x + 103.84$	0.998 1
木糖 (Xyl)	$y=1.82 \times 10^5 x - 564.28$	0.999 2
阿拉伯糖 (Ara)	$y=2.55 \times 10^5 x + 274.85$	0.997 3
岩藻糖 (Fuc)	$y=6.84 \times 10^4 x + 241.74$	0.999 5
鼠李糖 (Rha)	$y=3.26 \times 10^5 x - 634.72$	0.996 4

分别称取葡萄糖 (Glu)、核糖 (Rib)、甘露糖 (Man)、半乳糖 (Gal)、木糖 (Xyl)、阿拉伯糖 (Ara)、岩藻糖 (Fuc)、鼠李糖 (Rha) 样品 50 mg, 分别加入 5 mL 蒸馏水, 配制 10 mg/mL 的母液, 再分别吸取 10、20、40、80、160 μL 母液加入到 0.5 mL 蒸馏水中配制成不同浓度的各单糖的标准溶液, 进行 HPLC 分析,

以单糖浓度和峰面积进行线性回归,各单糖的线性回归方程见表2。再分别吸取各单糖母液40 μL,混合后再加入80 μL蒸馏水,使得混合标准液中各单糖浓度为1 mg/mL,进行HPLC分析,标准混合样品的HPLC图见图6。

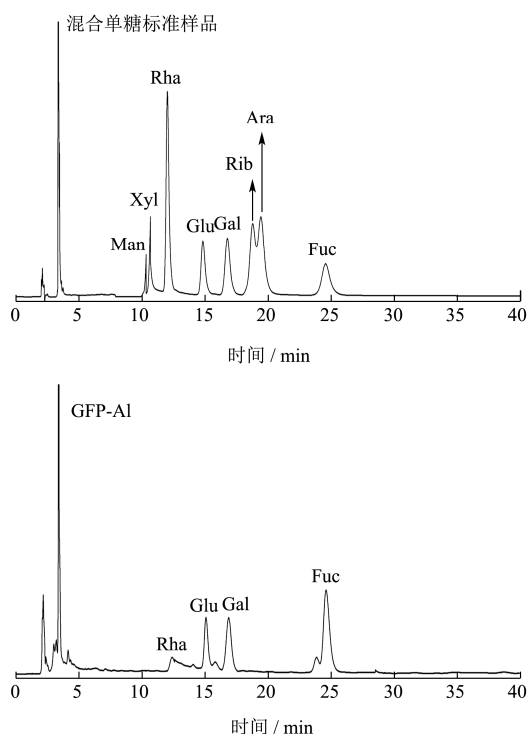


图6 GFP-A1 的单糖组成

Fig.6 Monosaccharide composition of GFP-A1

GFP-A1 的 HPLC 图与混合标准单糖 HPLC 图相比较,结果表明,GFP-A1 主要由 Rha、Glu、Gal、Fuc 组成,其中 Fuc 占比最大,其次依次为 Gal、Glu 和 Rha。通过标准单糖的线性方程计算,得出 Rha、Glu、Gal、Fuc 的摩尔比为 1:10.52:11.38:18.67。这一研究结果与 Chen 等^[36]和许盈盈等^[22]研究的灰树花多糖的单糖组成结果相似,但各单糖占比存在较大差异,GFP-A1 单糖组成中占比最大的为岩藻糖,而其他学

者的研究结果中均是葡萄糖占比最大,例如,陈沛等^[37]研究显示灰树花多糖的单糖组成为 Glu、Gal、Man,而 Glu 占比达到 42%,这可能是由于灰树花品种、栽培原料的差异所致。另外,相关研究表明,多糖的单糖组成中半乳糖的占比较大时,其抗氧化活性和促进细胞的增殖作用会越强。因此,GFP-A1 可能具有较高的生物活性。

2.8 GFP-A1 对小鼠体质量和力竭游泳、转棒时间的影响

实验期间小鼠的体质量变化见下表3,可以看出,实验开始前组间小鼠体质量不存在显著差异($P>0.05$),实验开始后的第7、14、21、28天时,组间小鼠体质量均不存在显著差异($P>0.05$)。由此可见,实验期间小鼠的体质量变化属于自然生长体质量的增加,GFP-A1 对小鼠的体质量影响较小,对小鼠的生长发育没有促进或抑制作用。

力竭游泳和转棒运动被广泛应用于评价小鼠的运动耐力作用,运动时间越长表明机体的运动耐力越持久^[38]。表4为小鼠的耐力训练实验结果,从表4可以看出,CK 组的力竭游泳时间和转棒时间均最低,阳性对照组(人参皂苷)力竭游泳时间和转棒时间比CK组分别显著提高了41.32%、49.22% ($P<0.05$),GFP-A1-L、GFP-A1-M、GFP-A1-H 的力竭游泳时间和转棒时间比CK组分别显著提高了24.94%、64.21%、77.45%和25.76%、52.33%、68.77% ($P<0.05$),可见GFP-A1 可以显著提高小鼠的运动耐力,且随着GFP-A1 剂量的提高,小鼠的力竭游泳时间和转棒时间随之显著提高。另外,还可以看出,与人参皂苷相比,GFP-A1-M、GFP-A1-H 的力竭游泳时间和转棒时间均有不同程度提高,表明GFP-A1-M 比相同剂量人参皂苷具有更好的提高小鼠耐力能力。

表3 GFP-A1 对小鼠体质量的影响

Table 3 Effect of GFP-A1 on body mass of mice

组别	实验前小鼠体质量/g	实验期间小鼠体质量/g			
		7 d	14 d	21 d	28 d
空白对照组 (CK)	23.26±1.23 ^a	27.86±0.75 ^a	34.68±1.85 ^a	39.48±2.15 ^a	45.71±0.87 ^a
阳性对照 (人参皂苷)	22.78±0.96 ^a	28.42±1.06 ^a	33.75±2.11 ^a	38.47±2.45 ^a	46.15±2.74 ^a
GFP-A1-L	23.85±1.52 ^a	28.69±0.87 ^a	35.47±1.74 ^a	39.55±1.64 ^a	46.55±2.78 ^a
GFP-A1-M	22.69±0.74 ^a	27.85±0.63 ^a	34.65±1.63 ^a	40.08±2.31 ^a	45.90±1.84 ^a
GFP-A1-H	22.42±0.85 ^a	28.12±1.34 ^a	33.41±1.86 ^a	39.76±2.33 ^a	47.05±2.25 ^a

注: 同列右肩相同的小写字母表示不具有显著差异 ($P>0.05$)。

表 4 GFP-A1 对小鼠力竭游泳和转棒时间的影响

Table 4 Effect of GFP-A1 on exhaustive swimming and rod turning time of mice

组别	力竭游泳时间/min	转棒时间/min
空白对照组(CK)	47.80±8.47 ^c	18.67±1.58 ^d
阳性对照组(人参皂苷)	67.55±6.32 ^c	27.86±2.57 ^b
GFP-A1-L	59.72±9.26 ^d	23.48±2.14 ^c
GFP-A1-M	78.49±8.49 ^b	28.44±1.48 ^b
GFP-A1-H	84.82±12.72 ^a	31.51±1.95 ^a

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异($P<0.05$)。

2.9 GFP-A1 对小鼠体内 HG 和 MG 含量的影响

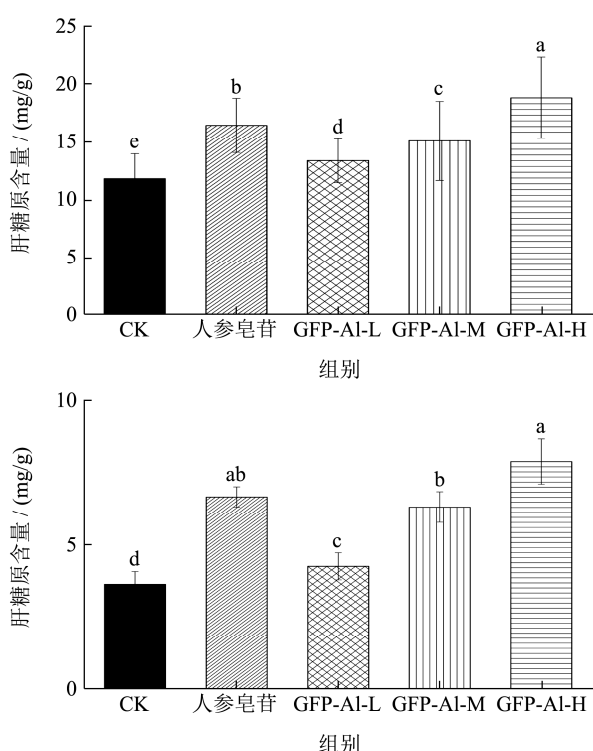


图 7 GFP-A1 对小鼠体内 HG 和 MG 含量的影响

Fig.7 Effect of GFP-A1 on HG and MG contents in mice

注: 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著, 下同。

研究表明, 机体内 HG 和 MG 含量越高其为机体提供能量越持久, 机体的耐力越强^[39]。图 7 为 GFP-A1 对小鼠体内 HG 和 MG 含量的影响, 从图 7 可以看出, CK 组的 HG 和 MG 含量均最低, 分别为 11.82、3.64 mg/g, 最高的为 GFP-A1-H, 分别为 18.82、7.89 mg/g。与 CK 相比, 阳性对照组(人参皂苷)小鼠体内 HG 和 MG 分别显著提高了 39.00%、83.24% ($P<0.05$), 可见, 选取人参皂苷作为阳性对照对 GFP-A1 的小鼠耐力实验具有重要的参考意义。另外, 与 CK 组相比, GFP-A1-L、GFP-A1-M、GFP-A1-H 组小鼠体内 HG、MG 分别显著提高了 13.11%、27.58%、59.22%和 17.03%、73.63%、116.76% ($P<0.05$), 表明 GFP-A1 能显著的提高小鼠

体内 HG 和 MG 的储存, 从而提高小鼠的运动耐力, 且与 GFP-A1 剂量呈现一定的正相关。

2.10 GFP-A1 对小鼠血清 BLA、BUN、MDA 含量和 SOD 活性的影响

含量和 SOD 活性的影响

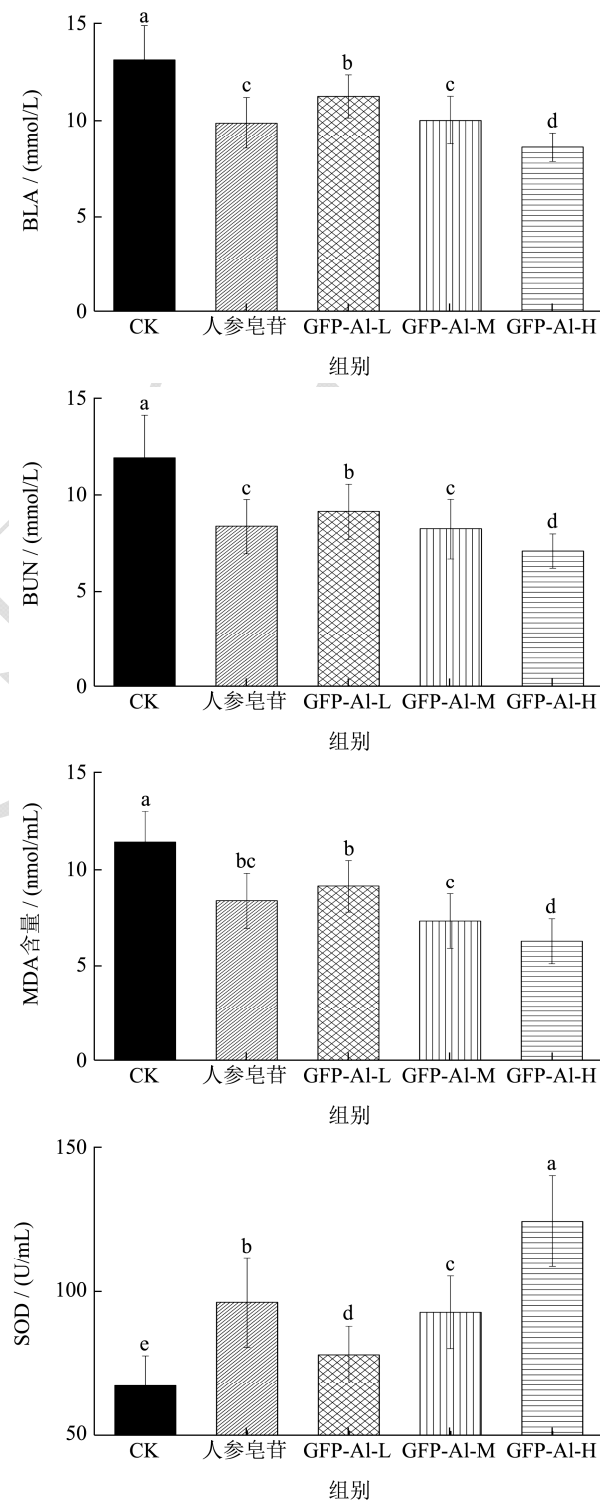


图 8 GFP-A1 对小鼠血清 BLA、BUN、MDA 含量和 SOD 活性的影响

Fig.8 Effect of GFP-A1 on serum BLA, BUN, MDA content and SOD activity in mice

较多的研究证明,影响小鼠运动耐力因素有很多,其中血清 BLA、BUN、MDA 含量和抗氧化酶活性对运动能力具有重要的影响作用^[40]。BLA、BUN、MDA 含量越高,小鼠的运动持久性越差,而抗氧化酶活性越高,小鼠受到的氧化应激作用越弱,运动能力越强^[41]。从图8中可明显的看出,CK组小鼠血清中BLA、BUN、MDA 含量最高,SOD 活性最低,可见,CK组小鼠运动后体内产生了大量乳酸、尿素氮和MDA,这些代谢产物在体内的堆积显著的降低了运动能力。与CK组相比,人参皂苷组BLA、BUN、MDA 含量显著降低($P<0.05$),SOD 活性显著升高($P<0.05$),可见人参皂苷作为广泛的抗疲劳物质,具有显著的提高运动耐力的作用;此外,与CK组相比,不同剂量的GFP-A1组小鼠血清内BLA、BUN、MDA 含量均显著降低($P<0.05$),而SOD活性显著升高($P<0.05$),表明GFP-A1能提高小鼠体内清除BLA、BUN、MDA的能力,同时提高体内抗氧化酶活性,降低细胞的氧化应激作用,从而表现出提高小鼠运动耐力的作用,且从GFP-A1剂量关系上可以看出,剂量越高其提高小鼠运动耐力的作用越强。与人参皂苷组相比,活性物质浓度相同的GFP-A1-M组的BLA、BUN、MDA 含量均较低,但不存在显著差异($P>0.05$),SOD 活性则显著升高($P<0.05$),可见,GFP-A1对提高小鼠的运动耐力作用稍微优于人参皂苷。

3 结论

灰树花多糖纯化后得到3个多糖组分,分别为GFP-A、GFP-B、GFP-C,GFP-A经葡聚糖凝胶色谱纯化后得到GFP-A1。GFP-A1是由鼠李糖(Rha)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、岩藻糖(Fuc)组成的杂多糖,其中总糖占89.32%,硫酸基占4.85%,且不含有核酸、蛋白质和色素。高效凝胶渗透色谱分析GFP-A1的重均分子量为18 374 u。扫描电镜下,GFP-A1呈块状,有一定的裂口,结果显示多糖分子黏连、凝聚力较强,同时裂口处存在吸水孔结构,表明GFP-A1是一个中性水溶性多糖;另外,红外光谱显示GFP-A1的异头碳为 α 构型。在小鼠的运动耐力实验中,结果显示,GFP-A1低、中、高剂量组小鼠的力竭游泳时间和转棒时间均显著高于CK组,且呈现剂量依赖关系;同时,添加GFP-A1的低、中、高剂量组小鼠体内HG、MG含量、SOD活性分别显著高于CK组,血清BLA、BUN、MDA含量则分别显著低于CK组。结果表明,GFP-A1可提高小鼠体内糖原的储备,提高运动后血清中BLA、BUN、MDA的分解速度,改善细胞的氧化应激水平,从而提高小

鼠的运动耐力。因此,GFP-A1可作为食品添加剂应用于功能运动食品领域,同时,本研究也为灰树花多糖的深入开发利用提供了科学依据。但关于GFP-A1如何在转录组、蛋白质代谢水平提高小鼠运动耐力的具体作用机制还有待进一步研究,下一步将分别对GFP-B、GFP-C的理化特性和对小鼠运动耐力的影响进行比较,同时运用转录组学、蛋白组学进行分析,以期深入解析灰树花多糖各组分提高小鼠运动耐力的作用机制。

参考文献

- [1] Mason S A, Morrison D, Mcconell G K, et al. Muscle redox signalling pathways in exercise. Role of antioxidants [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2016, 98: 29-45.
- [2] 郑聪,李胜楠,余甘子圣女果复合饮料发酵工艺及对运动耐力的影响[J].食品工业科技,2022,43(4):358-365.
- [3] Cai M, Xing H Y, Tian B M, et al. Characteristics and anti-fatigue activity of graded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* separated by cascade membrane technology [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 269: 118329.
- [4] Zhong H, Shi J Y, Zhang J H, et al. Soft-shelled turtle peptide supplementation modifies energy metabolism and oxidative stress, enhances exercise endurance, and decreases physical fatigue in mice [J]. Foods, 2022, 11(4): 600.
- [5] 任广泉,许志凌云,刘金秋,等.玉木耳多糖对小鼠的抗疲劳作用[J].食品与机械,2021,37(7):148-152.
- [6] Wu J Y, Siu K C, Geng P. Bioactive ingredients and medicinal values of *Grifolafrondosa* (Maitake) [J]. Foods, 2021, 10(1): 95-95
- [7] 雷露,余波,周景瑞,等.天麻、苦荞醇提物对灰树花胞外多糖合成酶类的影响及天麻苦荞醇提物复配发酵液的抗疲劳作用[J].现代食品科技,2022,38(10):33-39.
- [8] Aguilera Braico D M, Balogh G A. CD3 ϵ immune restorative ability induced by maitake Pro4x in immune suppressed BALBc mice [J]. BMC Research Notes, 2022, 15(1): 307-307.
- [9] Ji H Y, Yu J, Liu A J. Structural characterization of a low molecular weight polysaccharide from *Grifolafrondosa* and its antitumor activity in H₂₂ tumor-bearing mice [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 61(C): 103472.
- [10] Jiang T, Wang L, Ma A J, et al. The hypoglycemic and renal protective effects of *Grifolafrondosa* polysaccharides in early diabetic nephropathy [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(12): 13515.
- [11] Jiang X, Hao J, Zhu Y F, et al. The anti-obesity effects of a

- water-soluble glucan from *Grifolafrondosa* via the modulation of chronic inflammation [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 962341.
- [12] 王金菊,黄剑,李超,等.灰树花发酵液对小鼠抗疲劳作用的实验研究[J].*中国酿造*,2013,32(8):21-24.
- [13] 李炳功.灰树花液态发酵培养及抗疲劳功能研究[D].天津:天津科技大学,2018.
- [14] 王迎香,唐子惟,彭腾,等.苯酚-硫酸法测定酒蒸多花黄精多糖含量的优化[J].*食品工业科技*,2021,42(18):308-316.
- [15] 王鹏亨,赵宗杰,周荣灵,等.3,5-二硝基水杨酸法测定樟芝中多糖的含量[J].*食品研究与开发*,2016,37(9):163-167.
- [16] 聂昌宏,郑欣,阿依居来克·卡得尔,等.考马斯亮蓝法检测不同乳中乳清蛋白含量[J].*食品安全质量检测学报*,2019,10(5):1138-1142.
- [17] 任珍芸,刘爱萍,陈晓航,等.改良间羟基联苯法用于测定肺炎球菌荚膜多糖中糖醛酸含量[J].*中国新药杂志*,2018,27(6):644-649.
- [18] 张亚男.硫酸钡比浊法测定皂角多糖修饰物中硫酸基的研究[J].*泰山学院学报*,2011,33(3):67-71.
- [19] 彭天祥,张娟,张利,等.梯棱羊肚菌多糖的理化性质及神经保护活性研究[J].*现代食品科技*,2019,35(9):87-95.
- [20] 金鑫,熊川,李萍,等.三株海南岛野生灵芝的鉴定、多糖组成及其抗氧化活性研究[J].*天然产物研究与开发*,2020,32(2):190-199.
- [21] 李彦颖,张冰茹,林庚兰,等.灰树花多糖的分离纯化、结构表征及精氨酸酶抑制活性[J].*食品与发酵工业*,2022,48(23):179-186.
- [22] 许盈盈.灰树花多糖的提取、分离纯化、表征及生物活性的研究[D].杭州:浙江工商大学,2022.
- [23] 赵厚宽.灰树花中具有生物活性多糖的提取、纯化、结构分析与应用[D].北京:中国矿业大学,2022.
- [24] 方嘉沁,郑青松,文雨欣,等.不同提取方法的莲子心多糖结构与理化性质比较[J].*现代食品科技*,2023,39(1):92-103.
- [25] Mao G H, Yu P, Zhao T, et al. Aqueous two-phase simultaneous extraction and purification of a polysaccharide from *Grifolafrondosa*: Process optimization, structural characteristics and antioxidant activity [J]. *Industrial Crops & Products*, 2022, 184(15): 114962.
- [26] Zhao H K, Wei X Y, Xie Y M. Optimization of extraction technology, structure, and antioxidant activity of polysaccharide from *Grifolafrondosa* [J]. *Starch-Stärke*, 2021, 73(9-10): 1-12.
- [27] He Y L, Zhang L J, Wang H. The biological activities of the antitumor drug *Grifolafrondosa* polysaccharide [J]. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2019, 163: 221-261.
- [28] Zhang A Q, Deng J Y, Yu S Y, et al. Purification and structural elucidation of a water-soluble polysaccharide from the fruiting bodies of the *Grifolafrondosa* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 115: 221-226
- [29] Su C H, Lai M N, Ng L T. Effects of different extraction temperatures on the physicochemical properties of bioactive polysaccharides from *Grifolafrondosa* [J]. *Food Chemistry*, 2017, 220: 400-405.
- [30] Zhao H K, Wei X Y, Xie Y M, et al. Preparation of nanocellulose and lignin-carbohydrate complex composite biological carriers and culture of heart coronary artery endothelial cells [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137: 1161-1168.
- [31] Li G, Wang F, Wang M M, et al. Physicochemical, structural and rheological properties of pectin isolated from citrus canning processing water [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 195: 12-21.
- [32] Hu S M, Zhou J M, Zhou Q Q, et al. Purification, characterization and biological activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 isolated from milk [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2021, 147: 111561.
- [33] Ji H Y, Yu J, Liu A J. Structural characterization of a low molecular weight polysaccharide from *Grifolafrondosa* and its antitumor activity in H22 tumor-bearing mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 61: 103472.
- [34] 牧丹,萨仁高娃,包良,等.天冬多糖的结构、免疫调节活性及体外抗氧化活性[J].*中国食品学报*,2022,22(8):51-60.
- [35] Li Q, Zhang F M, Chen G Y, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Grifolafrondosa* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 1293-1303.
- [36] Chen X Y, Ji H Y, Zhang C F, et al. Structural characterization and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Grifolafrondosa* [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 14(1): 272-282.
- [37] 陈沛,刘会平,孙娜新,等.灰树花多糖的分离纯化及其体外抗肿瘤活性[J].*现代食品科技*,2018,34(6):107-114.
- [38] 高畅,葛永喆,魏月,等.牛磺酸—小麦肽复合饮料的研制及其体能恢复功效的研究[J].*中国食品添加剂*,2022,33(9):104-112.
- [39] 于亚莉,蒲奕灵,高绿莎,等.大豆肽缓解小鼠体力疲劳的功能评价[J].*中国食品学报*,2022,22(7):105-114.
- [40] 张振刚,王峰.有氧运动联合补充 D-核糖对小鼠抗疲劳和抗氧化的作用[J].*食品工业科技*,2022,43(2):368-375.
- [41] 赵云龙.茺菁山楂复合饮料配方优化及其对运动耐力的影响[J].*食品工业科技*,2022,43(14):401-408.