

# 不同提取方法对灵芝多糖性质的影响研究

游丽君<sup>1</sup>, 冯梦莹<sup>1</sup>, 刘钧发<sup>1</sup>, 赵强忠<sup>1</sup>, 罗维<sup>2</sup>, 赵谋明<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 华南理工大学分析测试中心, 广东广州 510640)

**摘要:** 本研究比较了超声波法 (UP)、超声波结合纤维素酶法 (UCP)、超声波结合胰酶法 (UPP)、传统热水提取法 (TP) 四种方法提取灵芝多糖的性质区别。结果表明采用超声波结合胰酶法提取多糖得率最高, 可达 4.93%, 比传统水提法的多糖得率高 1.58 倍。相比传统水提法所得多糖的分子量, 超声处理可显著降低多糖分子量, 超声结合酶法提取对多糖的降解作用更加显著, 其中胰酶效果最为明显, 可将多糖分子量降至 5 kDa 以下。此外, 采用超声波结合胰酶法提取的多糖也具有较好的抗氧化活性, 其还原力在浓度 1.0 mg/mL 时为 1.408, 羟自由基清除能力在浓度 2.0 mg/mL 时为 50.08%, ABTS<sup>+</sup>清除能力在浓度 1.0 mg/mL 时为 82.5%, 氧自由基吸收能力 (ORAC) 值可达 2484.14  $\mu\text{mol Trolox/g}$ 。

**关键词:** 灵芝多糖; 超声; 酶; 抗氧化; 自由基

文章编号: 1673-9078(2013)6-1207-1212

## Characteristics of *Ganoderma lucidum* Polysaccharide Prepared by Different Methods

YOU Li-jun<sup>1</sup>, FENG Meng-ying<sup>1</sup>, LIU Jun-fa<sup>1</sup>, ZHAO Qiang-zhong<sup>1</sup>, LUO Wei<sup>2</sup>, ZHAO Mou-ming<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Analytical and Testing Center, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Different extraction methods, including ultrasound extraction (UP), ultrasonic wave complex cellulose (UCP), ultrasonic wave complex pancreatin (UPP) and traditional hot water extraction (TP), were used to prepare *Ganoderma Lucidum* polysaccharide and the characteristics of the extracted polysaccharides were compared. Results showed that the extraction yield of polysaccharides by UPP reached 4.93%, 1.58 times higher than that by TP. The molecular weight of polysaccharides by UP was smaller than that by TP. The lowest molecular weight (<5 kDa) was found when UPP was employed. Moreover, the polysaccharides by UPP exhibited the highest reducing power (1.408 at 1.0 mg/mL), hydroxyl radical scavenging ability (50.08% at 2.0 mg/mL), ABTS<sup>+</sup> scavenging ability (82.5% at 1.0 mg/mL) and the oxygen radical absorbance capacity (2484.14  $\mu\text{mol Trolox/g}$ ).

**Key words:** *Ganoderma lucidum* polysaccharides; ultrasonic wave; enzyme; antioxidant activity; free radicals

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌, 是拥有数千年药用历史的珍贵药材。《神农本草经》记载, 灵芝具有扶正固本、滋补强壮、延年益寿等功效。灵芝多糖作为灵芝的主要功效成分之一, 具有抗氧化<sup>[1]</sup>、抗肿瘤、提高免疫<sup>[2]</sup>、降血糖<sup>[3]</sup>、抗炎<sup>[4]</sup>等多种药理作用。目前工业上提取灵芝多糖多采用传统热水法, 这种方法提取时间长, 温度高, 能耗大, 得率低, 活性差, 大大限制了灵芝产业的发展。

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31101222 和 31101221); SRP 项目《生物活性多糖的分离纯化及功效研究》; 广州地区分析测试基金 (201208)

作者简介: 游丽君 (1982-), 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向食品生物技术

通讯作者: 赵谋明 (1964-), 男, 博士, 教授, 博导, 研究方向食品生物技术

因此, 灵芝多糖的高效提取成为目前的研究热点。

灵芝子实体主要由纤维素、半纤维素和木质素三种成分构成, 三者可形成木素结合层, 纤维素自身也可形成束状结晶区域, 这都使得灵芝子实体具有较好的维持力和紧密的结构, 使得存在于子实体细胞壁内的灵芝多糖不容易被提取出来, 因而采用传统的水提法提取灵芝多糖往往得率较低<sup>[5]</sup>。而采用酶法提取灵芝多糖, 可通过酶来降解细胞壁, 使得胞内多糖溶出, 可提高灵芝多糖的得率。近年来, 超声波在植物、真菌活性物质的提取方面得到了广泛的应用, 并取得了很好的效果。但是, 目前采用超声波结合酶法提取灵芝多糖的研究及相关报道很少。本实验采用超声波法、超声波结合纤维素酶法、超声波结合胰酶法、传统热水提取法四种方法提取灵芝多糖, 并比较不同方法对灵芝多糖的得率、分子量、单糖组成以及抗氧化

活性的影响,旨在寻找一种最优的提取方法,为灵芝多糖的开发利用奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

灵芝,无限极有限公司提供。

ABTS(2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid)、Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)、AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamide)-dihydrochloride)Fluorescein、标准葡聚糖、各单糖标准品, Sigma 公司;胰酶(10000 u/g)、纤维素酶(100000 u/g), 杰能科公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、过氧化氢、铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁、邻二氮菲、乙二胺四乙酸二钠、硫酸亚铁、过硫酸钾、葡萄糖、三氟乙酸、盐酸羟胺、二氯甲烷、醋酸酐、吡啶、肌醇,均为分析纯;甲醇为色谱纯;BHT、Vc,均为食品级。

### 1.2 仪器与设备

DFY-500 摇摆式中药粉碎机,温岭市林大机械有限公司;高功率数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;DLSB-5/20 低温冷却液循环泵,郑州长城科工贸有限公司;电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;UV-2100 紫外可见分光光度计,广州广一科学仪器有限公司;数显式电热恒温水浴锅,上海博迅实业有限公司;全波长扫描多功能读数仪 赛默飞世尔科技公司;GL-21M 高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;7890A GC System Agilent Technologies 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 灵芝原料预处理

将灵芝切片粉碎,用 95%乙醇和灵芝粉末以 6:1 ( $m/V$ )的比例,加入圆底蒸馏瓶,用电热套加热,控制温度使液体保持微沸,回流 3 h,弃去上清液,滤渣按上述方法继续回流 1 h,滤布过滤,得滤渣(去除原料中的油脂、色素、低聚糖和小分子物质等),40℃烘干,置于干燥处保存。

#### 1.3.2 灵芝多糖的提取

##### 1.3.2.1 超声波法提取灵芝多糖

取经过预处理的灵芝粉末 8 g,加入 200 mL 蒸馏水,根据前期工艺优化结果,在超声功率为 320 W、50℃下提取 34 min,抽滤,浓缩至原液的 1/3,加入四倍体积 95%乙醇,置 4℃冰箱中,静置 12 h,离心(4800 r/min, 20 min),所得沉淀除去乙醇,再将所

得沉淀以水复溶,配制成水溶液,即灵芝粗多糖溶液,为样品 Ultrasonic (UP)。

##### 1.3.2.2 超声波结合纤维素酶法提取灵芝多糖

取经过预处理的灵芝粉末 8 g,加入 200 mL 蒸馏水,调整 pH 值至 6.0,加入 2%纤维素酶,在超声功率 320 W、50℃下提取 34 min,其余步骤同 1.3.2.1,得样品 Ultrasonic-cellulase (UCP)。

##### 1.3.2.3 超声波结合胰酶法提取灵芝多糖

取经过预处理的灵芝粉末 8 g,加入 200 mL 蒸馏水,调整 pH 值至 8.0,加入 2%胰酶,在超声功率 320 W、50℃下提取 34 min,其余步骤同 1.3.2.1,得样品 Ultrasonic-pancreatin (UPP)。

##### 1.3.2.4 传统热水提取法

取经过预处理得灵芝粉末 8 g,加入 200 mL 蒸馏水,微沸提取 2 h,提取物抽滤,将滤渣按上述方法再提取 2 h,抽滤,合并滤液,浓缩提取液,其余步骤同 1.3.2.1,得样品 Tradition (TP)。

### 1.3.3 灵芝多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法测定,以葡萄糖为标准品绘制标准曲线。

### 1.3.4 灵芝多糖得率的计算

多糖得率( $m/m$ )=[提取液中多糖含量(g)/原料重量(g)] $\times 100$

### 1.3.5 灵芝多糖分子量的测定

将已知分子量的葡聚糖标准品分别用流动相配制成 2.0 mg/mL 的溶液,采用凝胶渗透色谱法(GPC)测定分子量。色谱条件<sup>[6]</sup>: TSK 凝胶保护柱(PW $\times$ L 6.0 $\times$ 40), TSK G-4000K PW $\times$ L 7.8 $\times$ 300 凝胶柱, TSKG-2500K PW $\times$ L 7.8 $\times$ 300 凝胶柱;流动相为 0.2 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液, pH 6.0;流速 0.6 mL/min;柱温 35℃;进样 30  $\mu$ L;标样为已知分子量的葡聚糖标准品(Dextran, 分子量为 4400 Da, 9900 Da, 21400 Da, 43500 Da, 124000 Da, 196000 Da, 277000 Da, 401000 Da, 1285000 Da, Sigma 公司);检测器为 Waters 2414 示差折光检测器。

### 1.3.6 灵芝多糖单糖组成的测定

参照 Guerrant<sup>[7]</sup>等和 Luo 等<sup>[8]</sup>报道的糖精乙酸酯衍生物气相色谱法,并将方法适当修改后对灵芝多糖的单糖组成进行分析。

称取多糖样品 20 mg,加入 4 M 三氟乙酸 5 mL,密封,110℃水解 2 h。水解液于 50℃真空旋转蒸发至干,加入甲醇 3 mL,再旋干,重复 3 次得灵芝多糖水解物。

水解物中加入盐酸羟胺 10 mg、内标肌醇六乙酸酯 1 mg 和吡啶 2 mL,密封,90℃水浴 30 min,再加

入 2 mL 醋酸酐后又 90 °C 水浴 30 min, 加入 2 mL 水终止反应, 加入 2 mL 二氯甲烷萃取, 重复两次, 弃去水层, 定容至 5 mL, 加入无水硫酸钠干燥过膜备用。

气相色谱检测程序: HP-5 石英毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm); 恒压模式, 20PSI; 程序升温: 初始柱温 100 °C, 保持 0.5 min; 然后以 20 °C/min 升温, 保持 5 min; 以 3 °C/min 升至 160 °C; 再以 10 °C/min 升到 250 °C, 保持 5 min; 进样口采用不分流模式, 温度 250 °C, 载气为氮气; FID 检测器的温度 250 °C, 氢气、空气和氮气流速分别为 30、400 和 25 mL/min; 进样体积 1 μL。

各种标准单糖 (鼠李糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖) 在相同条件下进行糖精乙酸酯衍生化处理, 相同条件气相色谱分析。

### 1.3.7 灵芝多糖抗氧化活性的测定

#### 1.3.7.1 还原力测定

参考 Oyaizu<sup>[9]</sup>的方法, 并作适当修改。将各样品稀释至 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL。取 2 mL 样品稀释液, 加入 pH 6.6 的磷酸缓冲液 2 mL 和 1% (m/m) 铁氰化钾溶液 2 mL, 混合后在 50 °C 放置 20 min, 加入 10% (m/m) 三氯乙酸溶液 2 mL, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL, 加入 2 mL 蒸馏水和 0.1% (m/m) 氯化铁 0.4 mL, 混匀, 静置 10 min, 在 700 nm 处测定其吸光度。

#### 1.3.7.2 羟基自由基(·OH)清除能力测定

参考游丽君<sup>[10]</sup>的方法, 并作适当修改。将各样品稀释至 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL。取 0.6 mL 邻二氮菲溶液 (5 mmol/L) 加入 0.4 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 M, pH 7.4) 混匀后, 加入 0.6 mL 样品溶液及 0.6 mL EDTA (15 mmol/L), 再次混匀, 加入 0.6 mL FeSO<sub>4</sub> 溶液 (5 mmol/L), 以去离子水补至体积 2.8 mL, 充分混匀后加入 0.8 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1%), 摇匀后于 37 °C 保温 1 h, 测 536 nm 处吸光值为 A<sub>样品</sub>。以去离子水代替 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 其余步骤同上, 所测吸光值为 A<sub>空白</sub>。以去离子水代替样品, 其余步骤同上, 吸光值为 A<sub>对照</sub>。·OH 清除率按以下公式计算。

$$\cdot\text{OH清除率}(\%) = (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

#### 1.3.7.3 ABTS<sup>+</sup>清除能力测定

参考 Awika<sup>[11]</sup>的方法, 并做适当修改。配制 ABTS 储备液: 将 4.9 mmol/L 过硫酸钾溶液与 14 mmol/L ABTS 溶液等体积混合, 室温下避光保存 12~16 h。测定时, 取适量 ABTS 储备液, 在 30 °C 下用 50% 乙醇稀释至波长 734 nm 处检测其吸光度为 0.7±0.020。将各样品稀释至 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL。准确吸取 2.9 mL ABTS 测定液, 加入 0.1 mL

样品待测液混匀, 30 °C 下反应 20 min, 测定其在波长 734 nm 处的吸光值为 A<sub>样品</sub>。以去离子水代替样品, 其余步骤同上, 所测吸光值为 A<sub>对照</sub>。ABTS<sup>+</sup>清除率按以下公式计算。

$$\text{ABTS}^+\text{清除率}(\%) = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

#### 1.3.7.4 氧自由基吸收能力 (ORAC) 测定

参考 Ou 等<sup>[12]</sup>的方法, 并作适当修改。在 96 孔板各微孔中分别加入浓度为 0.05 mg/mL 的多糖样品 20 μL 后添加 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 20 μL 及浓度为 7 nmol/L 的荧光素溶液 20 μL, 在 37 °C 下预置 15 min 后, 用多道移液器迅速在各孔中加入 12 mmol/L 的 AAPH 140 μL 启动反应, 并将微孔板置于酶标仪中在 37 °C 下以激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm 进行连续测定, 每 2 min 测定一次各孔荧光强度, 测定时间共 2 h。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同提取方法的灵芝多糖得率

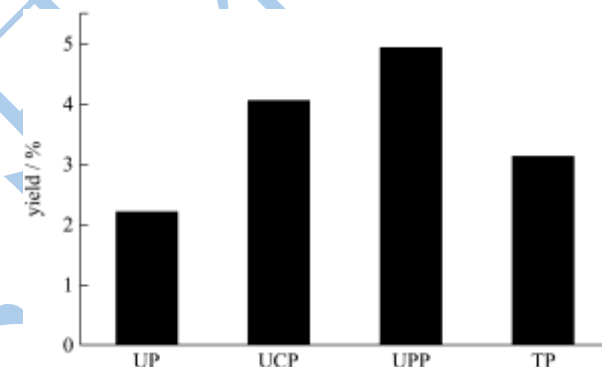


图 1 不同提取方法所得灵芝多糖的得率

Fig.1 The extraction yield of *Ganoderma lucidum* polysaccharides by different methods

如图 1 所示, 超声波法提取多糖得率为 2.22%, 超声波结合纤维素酶法提取多糖得率为 4.06%, 超声波结合胰酶法提取多糖得率为 4.93%, 传统热水法提取多糖得率为 3.12%。由结果可知超声波法提取多糖得率最低, 可能由于超声时间过短所致。而超声波结合胰酶法可显著提高多糖得率, 比传统水提法的多糖得率高 1.58 倍, 这可能是由于酶可降解细胞壁, 利于多糖的溶出。这与姜在祥等<sup>[13]</sup>的报道相一致。传统热水提取法所需温度高, 提取时间长, 能耗高, 且由于灵芝结构致密, 得率较低, 因而不是提取灵芝多糖的最优方法。

### 2.2 不同提取方法所得灵芝多糖的分子量

从图 2 中可以看出, UP 有两个峰, 分别为 18.54 kDa (28.51%) 和 6.11 kDa (71.49%); UCP 只有一个峰, 为 6.05 kDa; UPP 有两个峰, 分别为 20.36 kDa

(1.50%) 和 4.50 kDa (98.50%); TP 有三个峰, 为 598.72 kDa (48.72%)、18.60 kDa (20.91%) 和 6.72 kDa (30.37%)。可见超声处理可显著降低多糖分子量, 而超声结合酶法提取对多糖的降解作用更加显著, 其中胰酶效果最为明显, 可将多糖分子量降至 5 kDa 以下。研究表明, 多糖分子量与其分子量有密切联系。You 等<sup>[14]</sup>的研究表明中等分子量 (306.2 kDa) 的香菇多糖有相对较高的抗氧化活性; Sun 等<sup>[15]</sup>的研究表明紫球藻多糖的分子量对其抗氧化活性影响很大, 其中分子量为 6.55 kDa 的多糖组分活性最高。

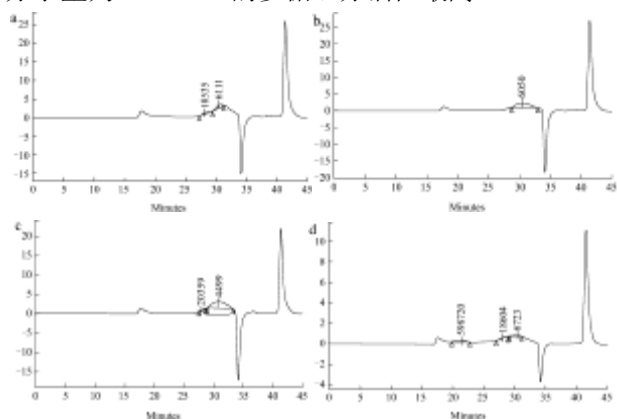


图2 不同提取方法所得灵芝多糖的分子量分布

Fig.2 The molecular weight distribution of *Ganoderma lucidum* polysaccharides

注: a: UP 的分子量分布; b: UCP 的分子量分布; c:

UPP 的分子量分布; d: TP 的分子量分布。

### 2.3 不同提取方法所得灵芝多糖的单糖组成

表1 不同提取方法所得灵芝多糖的单糖组成及摩尔百分比/%

Table 1 The composition of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and their molar percentages

单糖	UP	UCP	UPP	TP
鼠李糖	1.28	0.38	-	0.41
阿拉伯糖	0.77	0.76	0.98	-
岩藻糖	2.17	1.06	1.33	2.33
甘露糖	10.61	12.09	11.73	6.85
葡萄糖	60.94	73.12	68.93	78.68
半乳糖	24.23	12.58	17.03	11.73

由表1可以看出, 不同提取方法提取的灵芝多糖单糖组成相近, 葡萄糖均占很大比重, 其中 UP 中葡萄糖占 60.94%, UCP 中葡萄糖占 73.12%, UPP 中葡萄糖占 68.93%, TP 中葡萄糖占 78.68%。其次是半乳糖和甘露糖, 另外含有微量的岩藻糖、阿拉伯糖和鼠李糖。Wang 等<sup>[2]</sup>的研究结果中, 灵芝多糖中葡萄糖占 58.0%, 甘露糖占 15.5%, 另岩藻糖占 9.7%, 半乳糖占 9.3%, 外还含有少量木糖和鼠李糖。与本研究类似, 葡萄糖均是灵芝多糖的主要组成成分, 但本研究中还

含有阿拉伯糖, 而不含木糖。这可能与灵芝品种及提取方法的不同有关。

### 2.4 不同提取方法所得灵芝多糖的抗氧化活性

#### 2.4.1 还原力

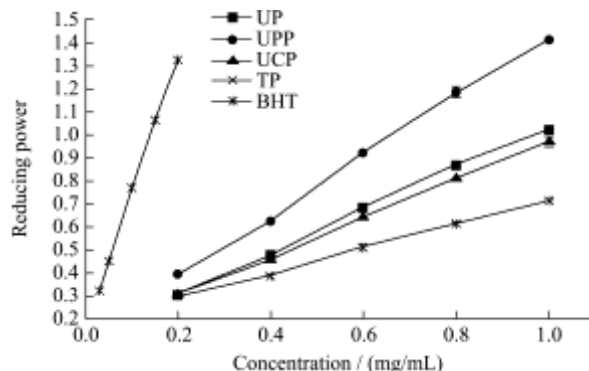


图3 不同提取方法所得灵芝多糖的还原力

Fig.3 The reducing power of *Ganoderma lucidum* polysaccharides

由图3可以看出, 所有样品的还原力均随多糖浓度的升高而提高, 且基本呈线性关系。BHT 的还原力显著高于同等浓度的样品, 在浓度为 0.2 mg/mL 时就达到  $1.32 \pm 0.02$ 。UPP 还原力最高, 在浓度为 1.0 mg/mL 时达到  $1.41 \pm 0.00$ 。UP 还原力略高于 UCP, 在 1.0 mg/mL 时达到  $1.02 \pm 0.02$ 。TP 还原力最低, 在 1.0 mg/mL 时只有  $0.71 \pm 0.00$ 。因此, 还原力大小顺序依次为: UPP>UP>UCP>TP。

#### 2.4.2 羟基自由基( $\cdot$ OH)清除能力

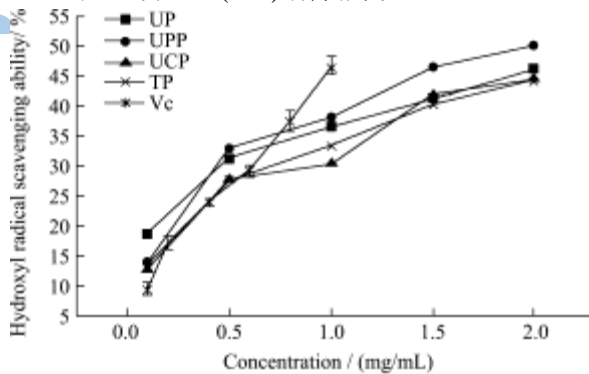


图4 不同提取方法所得灵芝多糖的羟自由基清除能力

Fig.4 The hydroxyl radical scavenging ability of *Ganoderma lucidum* polysaccharides

由图4可以看出, 所有样品的 $\cdot$ OH清除能力均随浓度的升高而升高。总体来看, UPP清除率较高, 其次是UP, UCP与TP清除率最差。当多糖浓度为 2.0 mg/mL 时, UPP、UP、UCP、TP 的清除率分为  $50.08 \pm 1.19\%$ 、 $46.18 \pm 1.35\%$ 、 $44.47 \pm 1.74\%$ 、 $44.22 \pm 0.50\%$ 。在低浓度下, 灵芝多糖的清除率均略高于同等浓度的Vc, 当浓度高于 0.8 mg/mL 时, Vc 的清除率超过灵芝多糖, 但相差不大。当多糖浓度为 1.0 mg/mL 时,

UPP 清除率可达 1.0 mg/mL Vc 的 82%。

#### 2.4.3 ABTS<sup>+</sup>清除能力

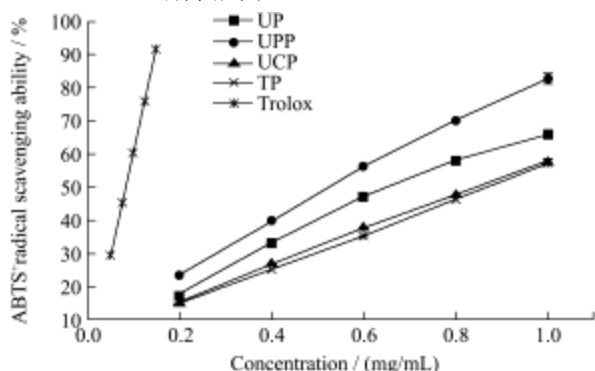


图 5 不同提取方法所得灵芝多糖的 ABTS<sup>+</sup>清除能力

Fig.5 The ABTS<sup>+</sup> radical scavenging ability of *Ganoderma lucidum* polysaccharides

由图 5 可以看出,所有样品 ABTS<sup>+</sup>清除率均随多糖浓度的升高而提高,且基本呈线性关系。ABTS<sup>+</sup>清除能力由高到低依次为 UPP>UP>UCP>TP,当多糖浓度为 1.0 mg/mL 时,分别达到 82.5±1.59%、65.87±1.06%、57.57±1.31%、56.83±1.23%。但是灵芝多糖的 ABTS<sup>+</sup>清除能力均显著低于同等浓度的 Trolox。ABTS<sup>+</sup>清除能力与还原力的结果相似,UPP 均显示出较高的抗氧化活性。之前的研究也发现还原力与清除能力相关<sup>[6]</sup>,灵芝多糖可能通过提供电子与自由基反应,将其转化为更加稳定的形式,从而终止自由基链反应。

#### 2.4.4 氧自由基吸收能力 (ORAC)

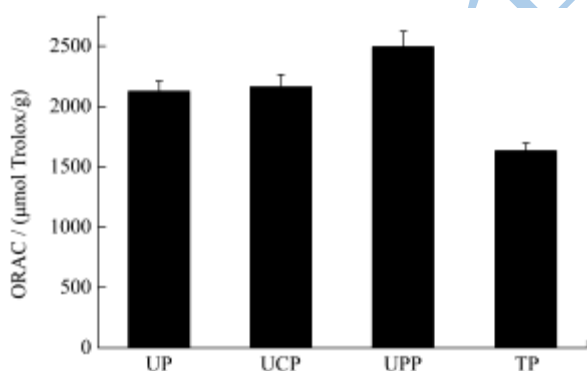


图 6 不同提取方法所得灵芝多糖的 ORAC 值

Fig.6 The ORAC value of *Ganoderma lucidum* polysaccharides

抗氧化能力指数 (ORAC) 法,是目前抗氧化研究领域为人们所关注的一个评价方法。利用荧光素 FL 在自由基攻击下荧光特性消失的现象,以偶氮类化合物 AAPH 作为过氧自由基来源,采用抗氧化剂作用下的荧光衰退曲线下面积与荧光自然衰退曲线下面积的差,作为衡量抗氧化剂的抗氧化能力指标,将结果以抗氧化物质 Trolox 作为标准进行表达。ORAC 实验通常需要设定两种对照,即没有添加自由基的 FL 荧

光自然衰减对照 (-AAPH) 和没有抗氧化剂存在时的自由基作用对照 (+AAPH)。样品的抗氧化能力与自由基作用下荧光衰退曲线的延缓部分面积 (NetAUC) 直接相关<sup>[12]</sup>。

由图 6 可知,UPP 的氧自由基吸收能力最强,可达 2484.14±142.11 μmol Trolox/g。UP 与 UCP 的 ORAC 值无显著性差异,分别是 2117.44±97.35 μmol Trolox/g 和 2155.62±112.44 μmol Trolox/g。TP 的 ORAC 值最低,为 1621.17±69.82 μmol Trolox/g。

研究表明,多糖的生物活性与其结构有密切关系,如分子量、化学组成、糖苷键、分支度、立体构象等<sup>[7]</sup>。从本研究来看,不同的提取方法所得灵芝多糖抗氧化活性有明显差异,这可能与分子量、单糖组成等有密切关系。Wei 等<sup>[8]</sup>的研究表明,分子量为 5.2 kDa 的灵芝多糖具有较好的抗氧化活性;Kao 等<sup>[9]</sup>也表明一种低分子量的灵芝多糖 (3.979 kDa) 具有较好的抗氧化活性。而本研究中 UPP 的分子量主要为 4.499 kDa,在四种多糖中最低,其抗氧化活性也较强,这与报道相一致。研究表明,多种真菌生物活性多糖都是 β-(1→3) (1→6) 的葡聚糖<sup>[20]</sup>,而本研究中灵芝多糖也主要由葡萄糖组成,因此抗氧化活性高。多糖分子量、单糖组成与抗氧化活性的内在联系还需进一步研究。

### 3 结论

本实验采用超声波法、超声波结合纤维素酶法、超声波结合胰酶法、传统热水提取法四种方法提取灵芝多糖,其中超声波结合胰酶法所得多糖的得率最高,分子量最低,抗氧化活性也最强,且不同方法所得灵芝多糖的单糖组成也有差异。至于超声结合胰酶法提取灵芝多糖为何得率最高、抗氧化活性最强,相关的机制及构效关系有待进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Chen Y, Xie M Y, Nie S P, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 231-241
- [2] Wang Y Y, Khoo K H, Chen S T, et al. Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (*Reishi*) polysaccharides: Functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10(4): 1057-1062
- [3] Zhang H N, Lin Z B. Hypoglycemic effect of *Ganoderma*

- lucidum* polysaccharides [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2002, 25(2): 191-195
- [4] Joseph S, Sabulal B, George V, et al. Antitumor and anti-inflammatory activities of polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* [J]. *Acta Pharmaceutica*, 2011, 61(3): 335-342
- [5] 于淑娟,高大维,李国基.超声波酶法提取灵芝多糖的机理研究[J].华南理工大学学报(自然科学版),1998,26(2):123-127
- [6] 金鑫,赖凤英.仙人掌多糖的提取、分离纯化及 GPC 法测定其分子量[J].2006,22(2):138-140
- [7] Guerrant G O, Moss C W. Determination of monosaccharides as aldononitrile, O-methylxime, alditol and cyclitol acetate derivatives by gas chromatography [J]. *Analytical Chemistry*, 1984, 56(4): 633-638
- [8] Luo J, Liu J, Sun Y, et al. Medium optimization, preliminary characterization and antioxidant activity in vivo of mycelia polysaccharide from *Phellinus baumii* Piat [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 81(3): 533-540
- [9] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine [J]. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986, 44: 307-315
- [10] 游丽君.泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[D].广州:华南理工大学博士学位论文,2010
- [11] Awika JM, Rooney L W, Wu X L, et al. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sor-g-hum products [J]. *Agric. Food Chem*, 2003, 51: 6657-6662
- [12] Ou B X, Hampsch-Woodill M, Prior R L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49 (10): 4619-4626
- [13] 姜在祥,张有林,王洪新.超声波协同酶法提取黑木耳多糖 [J]. *食品工业*, 2007, 1: 29-31
- [14] You R X, Wang K P, Liu J Y, et al. A comparison study between different molecular weight polysaccharides derived from *Lentinus edodes* and their antioxidant activities in vivo [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2011, 49 (12): 1298-1305
- [15] Sun L Q, Wang C, Shi Q J, et al. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 45 (1): 42-47
- [16] Wang X F, Wang J L, Zhang J, et al. Structure-antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 46: 59-66
- [17] Qi H M, Zhao T T, Zhang Q B, et al. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17(6): 527-534
- [18] Wei L, Wang H Y, Pang X B, et al. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 46: 451-457
- [19] Kao P F, Wang S H, Hung W T, et al. Structural Characterization and Antioxidative Activity of Low-Molecular-Weights Beta-1, 3-Glucan from the Residue of Extracted *Ganoderma lucidum* Fruiting Bodies [J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: 1-8
- [20] Kozarski M, Klaus A, Niksic M, et al. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus* [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129 (4): 1667-1675