

# 香菇柄多糖的提取及其硫酸化产物的免疫调节活性比较

苗冰冰<sup>1</sup>, 孙玉姣<sup>1,2\*</sup>, 薛原野<sup>1</sup>, 李宝宝<sup>1</sup>, 常大伟<sup>1\*</sup>

(1. 陕西科技大学食品科学与工程学院, 陕西西安 710021)

(2. 陕西省农产品加工技术研究院, 陕西西安 710021)

**摘要:** 香菇是世界第二大栽培食用菌, 其在加工过程中会产生大量香菇柄废弃物造成资源浪费和环境污染。该文以香菇柄为原料, 通过水提分级醇沉纯化得到三种多糖 LESP-20、LESP-50、LESP-80, 利用化学法、高效凝胶渗透色谱、气相色谱、红外光谱对其组成及结构特性进行分析。结果表明, LESP-50 的糖含量最高, 为 84.31%, 其相对分子质量为 477.41 ku; 此外, LESP-20、LESP-50 和 LESP-80 均含有 Man、Glc 和 Gal, 但单糖摩尔比存在差异; 三种多糖均是含有  $\beta$  型糖苷键的中性杂多糖, 且葡萄糖占主要成分。对香菇柄多糖 (*Lentinus edodes* Stem Polysaccharides) LESP 进行硫酸化修饰, 深入对比原始样品与硫酸化修饰后免疫调节活性的变化。结果表明, 硫酸化修饰后多糖的免疫调节活性更加优越, 能显著提高细胞 RAW 264.7 的细胞活力、吞噬能力、酸性磷酸酶活力、NO 分泌量; 并且硫酸基含量越高, 其免疫调节活性越好。研究结果将对香菇柄的高值化开发利用提供理论依据。

**关键词:** 香菇柄; 多糖; 硫酸化修饰; 免疫调节活性

文章编号: 1673-9078(2024)09-226-237

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.0858

## Extraction of Polysaccharides from the Stem of *Lentinus edodes* and Comparison of Their Immunomodulatory Activities with Those of Their Sulfated Products

MIAO Bingbing<sup>1</sup>, SUN Yujiao<sup>1,2\*</sup>, XUE Yuanye<sup>1</sup>, LI Baobao<sup>1</sup>, CHANG Dawei<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

(2. Shaanxi Research Institute of Agricultural Products Processing Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** *Lentinus edodes* is the second largest cultivated edible fungus in the world. During its process, of *Lentinus edodes* stem, a large amount of *Lentinus edodes* stem (LES) waste is generated, which causes resource waste and environmental pollution. In this study, LES was used as the raw material, three polysaccharides, LESP-20, LESP-50

引文格式:

苗冰冰, 孙玉姣, 薛原野, 等. 香菇柄多糖的提取及其硫酸化产物的免疫调节活性比较[J]. 现代食品科技, 2024, 40(9):226-237.

MIAO Bingbing, SUN Yujiao, XUE Yuanye, et al. Extraction of polysaccharides from the stem of *Lentinus edodes* and comparison of their immunomodulatory activities with those of their sulfated products [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 226-237.

收稿日期: 2023-07-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31801491); 西安市科技局农业技术研发项目 (22NYYF032); 陕西省科协青年托举人才项目 (20220216)

作者简介: 苗冰冰 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 糖化学与糖生物学, E-mail: bingmiao@outlook.com

通讯作者: 孙玉姣 (1988-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 糖化学与糖生物学, E-mail: sunyujiao@sust.edu.cn; 共同通讯作者: 常大伟

(1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能性配料与添加剂, E-mail: changdawei@sust.edu.cn

and LESP-80, were obtained from LES by water extraction then purification by step gradient alcohol precipitation, and their composition and structural characteristics were analyzed by chemical methods, high-performance gel permeation chromatography, gas chromatography and infrared spectroscopy. The results showed that LESP-50 had the highest sugar content (84.31%) and its relative molecular weight was 477.41 ku. In addition, LESP-20, LESP-50 and LESP-80 all contained Man, Glc and Gal, but their molar ratios of monosaccharides differed. All the three polysaccharides were neutral heteropolysaccharides containing  $\beta$ -glucosidic bonds, with glucose being the main component. The LESP were sulfated and the differences in immunomodulatory activity between the original sample and the sulfated sample were compared in depth. The results showed that the immunomodulatory activities of the sulfated polysaccharides were superior, and they could improve the cell viability, phagocytic ability, acid phosphatase activity and the amount of secreted NO of RAW 264.7 cells. The higher the content of sulfate group, the better the immunomodulatory activity. The results of this study will provide a theoretical basis for the high-value development and utilization of the *Lentinus edodes* stem.

**Key words:** *Lentinus edodes* stem; polysaccharides; sulfated modification; immunoregulatory activity

食用菌因其药用价值和营养价值而在全球范围内受到重视,我国食用菌的生产和出口量居于世界前列<sup>[1]</sup>。食用菌产业的发展离不开现代微生物工业的发展,当前人们对它的认识和应用正在不断加深,这促进了食用菌产业链的延续<sup>[2]</sup>。当前,对食用菌的加工主要集中在三个方面,第一主要作为可食用的蔬菜类;第二是工厂加工的原材料;第三阶段是对食用菌的药品、功能食品的开发,以及其副产物的综合利用。食用菌的营养成分和活性成分除受食用菌种类和栽培环境的影响外,所采用的加工方式和贮藏保鲜技术也会影响食用菌的化学成分和商业价值。目前采用的加工方法主要有干燥、腌制、冷冻和罐装,已用于长期保存食用菌<sup>[3]</sup>。食用菌在生产和加工过程中会产生大量副产品(菌盖、菌柄、菌菇基质)和液体废弃物,但大部分都被直接丢弃,这不仅造成了资源的损失,也造成了严重的经济和环境问题<sup>[4]</sup>。研究食用菌废弃物的高值化利用已经成为当务之急<sup>[5]</sup>。

多糖是自然界中广泛存在的一种高分子聚合物,多糖的分子量、构象、类型和溶解度在很大程度上决定其生物活性。食用菌多糖具有复杂的结构和高分子量,由至少10个单糖分子通过糖苷键连接而成。由于食用菌多糖具有较少的糖蛋白和较低的毒副作用,它们越来越多地被用于食品、药品和化妆品<sup>[6]</sup>。大量研究已证实它具有许多极具潜力的生物学活性和治疗功效,如:抗氧化、抗癌、抗肿瘤、免疫调节活性以及降低胆固醇和降脂功能<sup>[7-9]</sup>。而自然界中更多的多糖不具有生物活性或活性较低,一些则是由于多糖分子量太大,无法与细胞表面受体更好地结合,因此无法发挥活性。另一些多糖由于缺乏某些基团而活性较差<sup>[10]</sup>。而研究表明对多糖进行分子修饰能够提高其生物活性。硫酸化、

磷酸化、乙酰化、羧甲基化修饰等多糖的主要修饰方法,多糖通过引入官能团就可以改变自身的生物活性<sup>[11]</sup>。磷酸化修饰能明显提高多糖水溶性,并在一定程度上改善多糖的抗氧化、抗衰老活性,但磷酸化试剂和反应条件会影响磷酸化修饰的结果,可能导致多糖降解使产物成分复杂,限制了磷酸化的应用;在多糖中引入乙酰基可以改变糖链分子的空间排布,从而改变生物活性,但目前对于如何采取适当的方法在特定位置引入乙酰基使其发挥特定功能还有待研究;硫酸化是糖链修饰中最广泛应用的方法之一,能够显著提高多糖的生物活性,研究发现寡糖和硫酸多糖具有免疫调节活性,可参与激活免疫细胞识别、控制免疫细胞活性和减少炎症反应引起的副作用。硫酸化多糖能参与很多生命过程,如生长分化、器官发生等,对生命活动十分重要,是多糖改性的一个重要方向,具有优越的开发潜力<sup>[12,13]</sup>。

据此,本研究拟以香菇柄为研究对象,分离纯化香菇柄多糖,利用硫酸化修饰制备衍生化产物,并从理化性质和分子形貌两方面来对其衍生物进行验证,进而评估衍生物的体外免疫调节活性,以拓宽香菇柄多糖在功能性食品方面的开发和应用,为进一步实现香菇柄的利用提供理论参考,对促进食用菌产业的健康、可持续发展,具有十分重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料、试剂和仪器

#### 1.1.1 实验材料

香菇柄购自陕西陇县,RAW 264.7细胞株购于中国科学院上海细胞库。

### 1.1.2 实验试剂

葡聚糖标准（相对分子质量分别为5、12、25、50、80和150 ku）、二甲基亚砷（DMSO）、MTT（四氮唑蓝）、脂多糖（LPS）、中性红、对硝基苯磷酸、Triton X-100和硫酸化试剂三乙胺-三氧化硫，购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；DMEM高糖培养基，购于美国Hyclone公司；胎牛血清，购于浙江天杭生物科技股份有限公司；青链霉素混合液，购于北京索莱宝科技有限公司；NO测定试剂盒，购于碧云天生物技术研究所；其余试剂都是国产分析纯。

### 1.1.3 实验仪器

T2600紫外分光光度计，上海佑科仪器仪表有限公司；EQUINOX-55型傅里叶红外光谱仪，德国Bruker公司；LC-16型高效液相色谱仪，日本岛津公司；PEI Q 45+EDAX Octane型环境扫描电子显微镜，美国FEI公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 香菇柄多糖的分离提取

将香菇柄（LES）粉碎后过100目筛，准确称取50 g，添加40倍的水，并于60℃搅拌4 h，用纱布过滤渣滓，收集上清，上述步骤重复一次，共收集4 L上清液，旋蒸浓缩得到0.4 L。添加95%（V/V）乙醇，使其达到20%（V/V），在4℃下静置1 d，9 000 r/min离心，之后将收集的沉淀物用少量水溶解，按梯度加入乙醇，重复上述步骤，收集20%、50%、80%（V/V）的沉淀物，按溶解沉淀物溶液的20%（V/V）添加用80 mL三氯甲烷和20 mL正丁醇配制的Sevage溶液，剧烈摇晃，9 000 r/min离心除去蛋白<sup>[14]</sup>，重复多次直到无白色沉淀。将所得水溶液透析、冻干后收集香菇柄多糖。采用Sephadex G-100型凝胶柱（40 cm×100 cm）依次对三种多糖进行纯化。称取100 mg样品溶于2 mL蒸馏水，离心收集上清液上样，洗脱液选择0.1 mol/L NaCl。选择自动部分收集仪分别每管得到2 mL。收集结束，用紫外-可见光度计隔管测定总糖含量（苯酚-硫酸法，490 nm）、蛋白质含量（280 nm）<sup>[15,16]</sup>。根据吸收值，绘制洗脱曲线，对主要组分进行透析和冻干得到20%、50%、80%体积分数醇沉的三个纯化多糖组分，分别命名为LESPs-20、LESPs-50、LESPs-80。

### 1.2.2 香菇柄多糖理化性质分析

#### 1.2.2.1 总糖含量

采用苯酚-硫酸法<sup>[17]</sup>测定香菇柄多糖（LESPs）样品中的总糖含量，配制0.1 mg/mL Gal溶液，将0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL分别加入试管并加蒸馏水补到2 mL，分别加入50 μL 80%苯酚和2.5 mL浓硫酸，涡旋混匀后静置20 min，于490 nm处测定，配制0.1 mg/mL LESP溶液，重复上述方法。之后根据Gal的质量及其吸光度，绘制标准曲线，得到回归方程，根据回归方程计算样品的总糖含量。

#### 1.2.2.2 蛋白质含量

配制0.1 mg/mL的鸡蛋白溶液，分别向试管中加入0、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mL，加蒸馏水补至1 mL，加入5 mL由乙醇和85%浓H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>配制的考马斯亮蓝G-250溶液，涡旋混匀后静置5 min，在590 nm波长下进行测定，配制0.1 mg/mL LESP溶液，按照上述方法测定。之后根据鸡蛋白的质量及其吸光度，绘制标准曲线，得到回归方程，根据回归方程计算样品的总蛋白质含量<sup>[18]</sup>。

#### 1.2.2.3 相对分子质量测定

选用HPGPC测定LESPs的相对分子质量<sup>[19]</sup>，配制2 mg/mL葡聚糖（670、410、25、12、5 ku），测定其保留时间，根据对应的数据计算标准曲线。配制5 mg/mL的LESPs溶液，离心过0.22 μm水系膜，测定其保留时间，代入标准曲线，计算其分子量。

#### 1.2.2.4 单糖组成测定

准确称取5 mg的LESPs溶于2 mL的4 mol/L三氟乙酸，在121℃水解2 h，冷却后调至中性，加入30 mg硼氢化钠，加2 mL水，混匀在室温放置1.5 h。加入醋酸至无气泡产生。在60℃减压蒸干，加入0.1%（V/V）盐酸甲醇2 mL，振荡减压后蒸干，重复三次以上，后放入105℃烘箱15 min。后加入1 mL吡啶和醋酸酐，封管后沸水1 h，减压蒸干。加入1.5 mL吡啶和1.5 mL蒸馏水萃取样品，弃去水相，保留有机相，重复三次得到样品，同时以九种单糖样品（Rha、Fuc、Ara、Xyl、Man、Glc、Gal、GlcA、GalA）为标准，按照以上方法进行衍生化处理和GC解析<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.2.5 香菇柄多糖的全波长扫描分析

配制2 mg/mL的LESPs溶液，离心取上清后，于200~600 nm在石英比色皿中进行全波长扫描<sup>[21]</sup>。

#### 1.2.2.6 香菇柄多糖傅里叶红外光谱（FT-IR）分析

准确称取5 mg LESP，加入50 mg提前烘干

KBr 后在研钵后压片, 于  $4\ 000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$  下通过 FT-IR 对其进行扫描<sup>[22]</sup>。

### 1.2.3 香菇柄多糖的硫酸化修饰

将三乙胺-三氧化硫分别称取 20 mg (低剂量 L)、40 mg (中剂量 M) 和 80 mg (高剂量 H), 加入 25 mL 二甲基甲酰胺和 (300 mg) LESP<sub>s</sub>-20、LESP<sub>s</sub>-50、LESP<sub>s</sub>-80, 在 50 °C 搅拌反应 12 h, 用 5 mol/L NaOH 结束反应, 加入 4 倍体积  $\varphi=95\%$  乙醇, 1 d 后离心, 沉淀物溶解在水中, 选择 300 u 透析袋透析, 冻干, 得到 LESP<sub>s</sub>-20、LESP<sub>s</sub>-50、LESP<sub>s</sub>-80 的硫酸化多糖, 分别命名为 LESP<sub>s</sub>-20L、LESP<sub>s</sub>-20M、LESP<sub>s</sub>-20H, LESP<sub>s</sub>-50L、LESP<sub>s</sub>-50M、LESP<sub>s</sub>-50H 和 LESP<sub>s</sub>-80L、LESP<sub>s</sub>-80M、LESP<sub>s</sub>-80H<sup>[23]</sup>。

### 1.2.4 香菇柄多糖硫酸化产物的理化性质分析

#### 1.2.4.1 硫酸化产物的硫酸基含量测定

选用 BaCl<sub>2</sub>-明胶法<sup>[24]</sup>, 选择 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 配制 0.1 mg/mL 溶液, 分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0 mL 补至 1 mL, 计 A 液为 BaCl<sub>2</sub>-明胶比浊液, B 液为明胶, 先加入 A 液和 1 mL 的三氯乙酸, 摇匀, 20 min 后, 于 360 nm 处记为 A1, 重复上述操作将 A 液替换为 B 液, 测定记为 A2, 纵坐标为  $C=A1-A2$ , 横坐标为硫酸基团毫克数, 绘制标准曲线。样品的处理取 5 mg 溶于 1 mol/mL HCl 1 mL, 100 °C 水解 6 h。冷却离心后, 吸取各样品溶液 0.1 mL, 按照以上方法测定样品的吸收值, 根据标准曲线计算硫酸基含量。

#### 1.2.4.2 硫酸化产物的相对分子质量分析

选用 HPGPC 测定硫酸化 LESP<sub>s</sub> 的相对分子质量<sup>[19]</sup>, 配制 2 mg/mL 葡聚糖 (670、410、25、12、5 ku), 测定其保留时间, 根据对应的数据计算标准曲线。配制 5 mg/mL 的 LESP<sub>s</sub> 溶液, 离心过 0.22  $\mu\text{m}$  水系膜, 测定其保留时间, 代入标准曲线计算其分子量。

#### 1.2.4.3 硫酸化产物的傅里叶红外光谱 (FT-IR) 分析

准确称取 5 mg 硫酸化的 LESP<sub>s</sub>, 加入 50 mg 提前烘干 KBr 后在研钵后压片, 于  $4\ 000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$  下通过 FT-IR 对其进行扫描<sup>[22]</sup>。

### 1.2.5 香菇柄多糖硫酸化产物的免疫调节活性

#### 1.2.5.1 巨噬细胞株 RAW 264.7 的培养

采用 1 wt.% 青霉和链霉素 DMEM 并加入  $\varphi=10\%$  胎牛血清作为完全培养基, 于 37 °C,  $\varphi=5\%$

CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 隔天传代。

#### 1.2.5.2 细胞活力测定

选用完全培养基将细胞液调节到每毫升  $1\times 10^5$  cells, 接种到 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 混合后, 放置在 37 °C、CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱培养 24 h 之后移去上清, 各列分别加入 100  $\mu\text{L}$  无血清培养基和 100  $\mu\text{L}$  脂多糖 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为空白和阳性对照, 并加入不同浓度 100  $\mu\text{L}$  硫酸化香菇柄多糖 (12.5、25、50、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 24 h 后移去上清液, 加入 100  $\mu\text{L}$  0.5 mg/mL 噻唑蓝 MTT, 培养 4 h, 移去上清液, 加入 200  $\mu\text{L}$  的 DMSO, 小心混匀, 在酶标仪 570 nm 处测定<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.5.3 细胞吞噬能力测定

选用完全培养基将细胞液调整至每毫升  $1\times 10^5$  cells, 接种到 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 混合后, 放置在 37 °C、CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱培养 24 h。之后移去上清, 各列分别加入 100  $\mu\text{L}$  无血清培养基和 100  $\mu\text{L}$  脂多糖 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为空白和阳性对照, 并加入 100  $\mu\text{L}$  不同质量浓度硫酸化香菇柄多糖 (12.5、25、50、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 培养 24 h, 后抽出上清, 加入 0.1% (V/V) 的中性红生理盐水溶液, 培养 4 h, 用 PBS 洗去残留物, 加入用冰乙酸和乙醇 1:1 配制的裂解液, 1 h 后用酶标仪于 540 nm 检测<sup>[25]</sup>。

#### 1.2.5.4 酸性磷酸酶活力测定

选用完全培养基将细胞液调整至每毫升  $1\times 10^5$  cells, 接种到 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 混匀后, 放置在 37 °C、CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱培养 24 h。之后移去上清, 各列分别加入 100  $\mu\text{L}$  无血清培养基和 100  $\mu\text{L}$  脂多糖 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 空白和阳性对照, 并加入不同质量浓度 100  $\mu\text{L}$  硫酸化香菇柄多糖 (12.5、25、50、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 24 h 后抽出上清液, 每孔分别加入 1% (V/V) Triton X-100 (25  $\mu\text{L}$ ) 和对硝基苯磷酸 (150  $\mu\text{L}$ ), 培养 1 h 后。添加 50  $\mu\text{L}$  (3 mol/L) NaOH 进行终止实验, 后于 405 nm 酶标仪检测<sup>[26]</sup>。

#### 1.2.5.5 NO 分泌量测定

选用完全培养基将细胞液调整至每毫升  $1\times 10^5$  cells, 接种到 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 混匀后, 放置在 37 °C、CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱培养 24 h。之后移去上清, 各列分别加入 100  $\mu\text{L}$  无血清培养基和 100  $\mu\text{L}$  脂多糖 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为空白和阳性对照, 并加入不同质量浓度硫酸化香菇柄多糖 (12.5、25、50、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 100  $\mu\text{L}$ , 24 h 后收集上清液, 吸取 50  $\mu\text{L}$  的上清液, 分别加入 50  $\mu\text{L}$

GriessA 溶液 50  $\mu$ L GriessB 溶液。酶标仪于 540 nm 测定<sup>[27]</sup>。选用无血清培养基配制亚硝酸钠标准溶液, 根据吸光度和浓度做标准曲线。

### 1.3 数据分析

通过 Microsoft Excel 2019 处理数据, 独立重复  $n=5$ , 数据表示方法: 平均值  $\pm$  标准差, SPSS 22 进行统计学分析, 采用 LSD 检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 香菇柄多糖的分离纯化提取

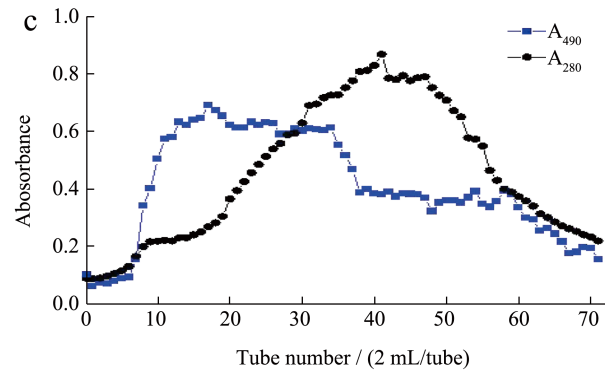
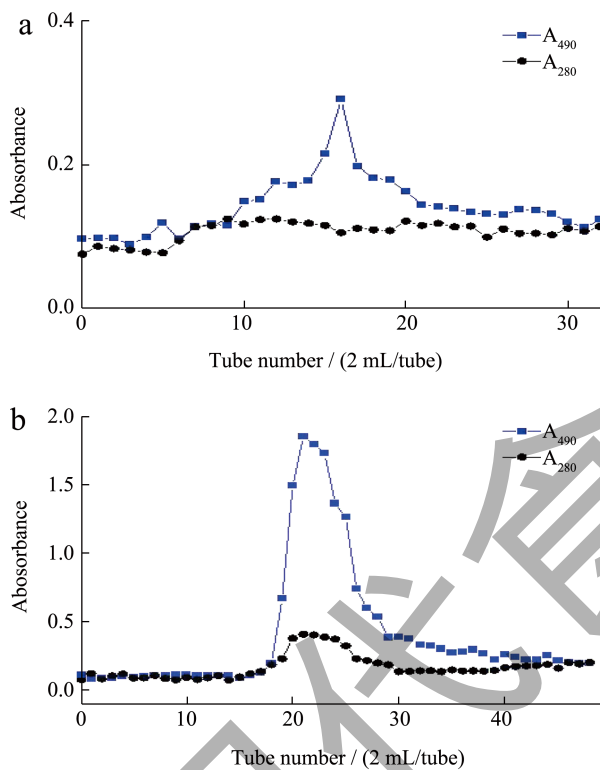


图1 用 Sephadex G-100 凝胶色谱柱纯化得到 LESP-20 ( a )、LESPs-50 ( b )、LESPs-80 ( c ) 的洗脱图  
Fig.1 Purification elution curves of LESP-20 (a), LESP-50 (b), LESP-80 (c)

体积分数 20%、50%、80% 分别醇沉后粗多糖的得率为 11.42%、2.51%、1.42%。为了提高香菇柄多糖的纯度, 将得到的香菇柄多糖用 Sephadex G-100 凝胶色谱柱进行纯化。如图 1 所示, 分别收集主要峰。图 1a, 收集 10~20 管; 图 1b, 收集 18~30 管; 图 1c, 收集 9~30 管; 将收集的洗脱液透析、冷冻后得到 3 种纯化后的组分 LESP-20、LESP-50、LESP-80。洗脱图如图 1。

### 2.2 香菇柄多糖的理化性质分析

#### 2.2.1 总糖含量测定

通过标准品 Gal 质量及其所测吸光值计算, 得到标准方程为:  $y=4.2890x-0.0107$ ,  $R^2=0.9946$ 。将 LESP 吸光值带入标准方程得到 LESP-20、LESP-50、LESP-80 的糖含量如表 1 所示, 其中 LESP-50 的糖含量最高。

表 1 LESP-20、LESP-50、LESP-80 的得率、理化性质、相对分子量和单糖组成  
Table 1 Yield, physicochemical properties, relative molecular weight and monosaccharide composition of LESP-20, LESP-50 and LESP-80

项目	LESP-20	LESP-50	LESP-80	
得率/%	1.23 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	5.21 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	
理化性质	总糖含量/%	65.82 $\pm$ 3.23 <sup>c</sup>	84.31 $\pm$ 4.21 <sup>a</sup>	71.21 $\pm$ 3.23 <sup>b</sup>
	蛋白质含量/%	1.37 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	1.87 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	5.81 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>
相对分子质量/ku	473.25 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	477.41 $\pm$ 2.86 <sup>a</sup>	455.21 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>	
单糖组成	Man	1.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
	Glc	5.09 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	8.39 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	4.36 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
	Gal	T	1.01 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	1.72 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>

注: 在  $P < 0.05$  的情况下, 表中的不同字母代表有显著性差异。T: 忽略不计。

### 2.2.2 蛋白质含量测定

通过鸡蛋白标准品质量和所测吸光值, 得到标准方程:  $y=3.4217x+0.0154$ ,  $R^2=0.9967$ 。将 LESP 吸光值代入标准方程得到 LESP-20、LESP-50、LESP-80 的蛋白质含量如表 1 所示, 三种多糖的蛋白质含量都相对较低, 可忽略不计。

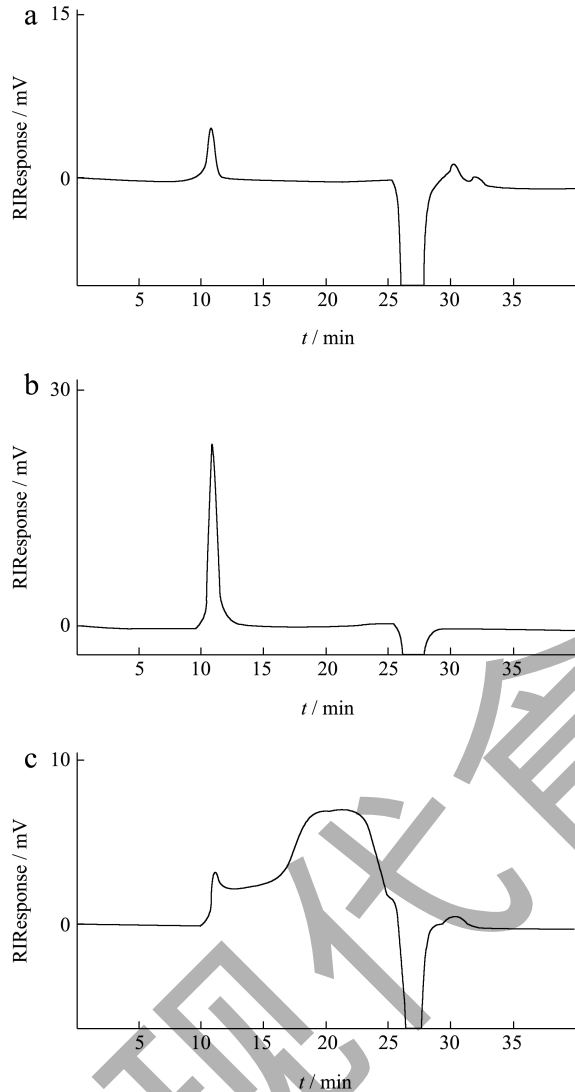


图 2 LESP-20 (a)、LESP-50 (b)、LESP-80 (c) 的相对分子质量

Fig.2 The molecular mass of LESP-20 (a), LESP-50 (b) and LESP-80 (c)

### 2.2.3 香菇柄多糖的相对分子质量分析

以标品葡聚糖分子量 670、410、25、12 及 5 ku 为标准, 得出了线性回归公式:  $y=-0.1648x+7.5397$ ,  $R^2=0.9911$ 。在 3 种 LESP 都显示出一个单独的峰, 如图 2 所示, 说明 LESP 的分子量是均一的。将测得 LESP 的保持时间代入公式, LESP-20、

LESP-50 和 LESP-80 的相对分子质量分别为 473.25、477.41、455.21 ku, 如表 1 所示。

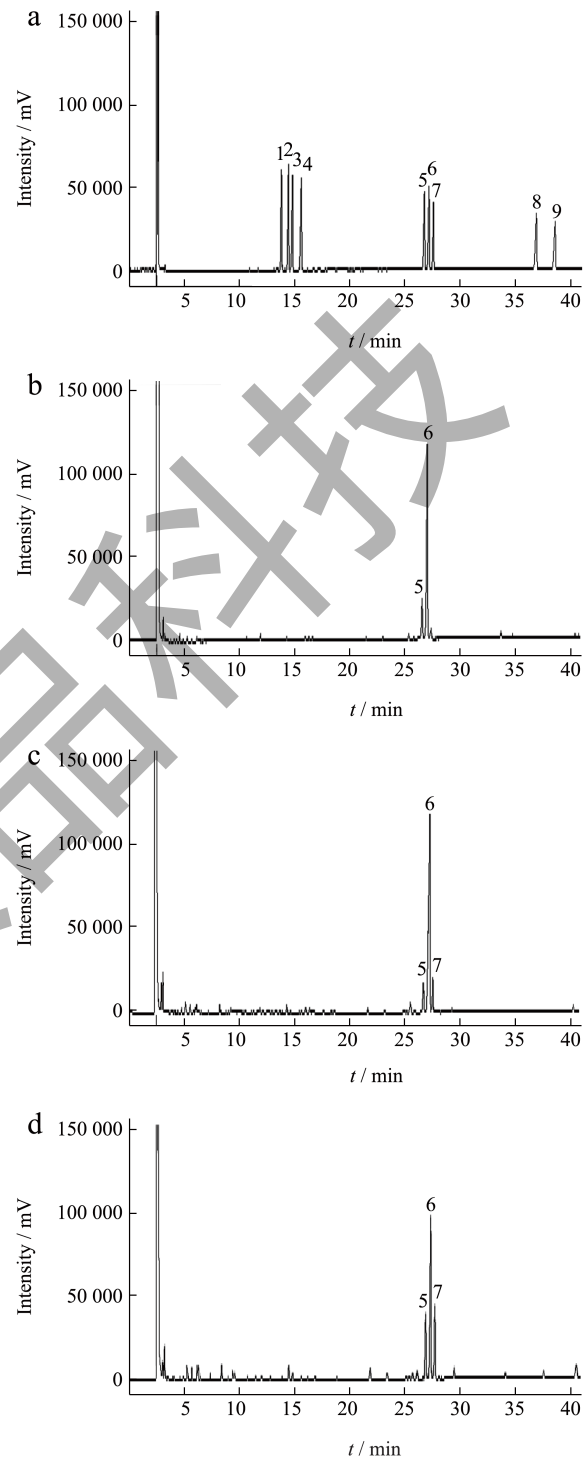


图 3 单糖标准品 (a) 和 LESP-20 (b)、LESP-50 (c)、LESP-80 (d) 的单糖组成

Fig.3 Monosaccharide standard (a) and the monosaccharide composition of LESP-20 (b), LESP-50 (c) and LESP-80 (d)

注: (1) Rha, (2) Fuc, (3) Ara, (4) Xyl, (5) Man, (6) Glc, (7) Gal, (8) GclA, (9) GalA。

### 2.2.4 香菇柄多糖的单糖组成分析

使用 GC 法, 对单糖组成进行分析, 其中 Rha、Fuc、Ara、Xyl、Man、Glc、Gal、GlcA 及 GalA 作为标准单糖, 针对在气相色谱仪上不同单糖产生不同响应计算其响应因子, 将 LESP s 的结果通过归一法进行定量分析其单糖组成。将 LESP s 图 3 与混合标准单糖图 3a 保留时间相对应, 计算表明 LESP s-20、LESP s-50、LESP s-80 是由 Man、Glc 及 Gal 组成。LESP s-20 中 Man、Glc 的摩尔比为 1.00:5.09; LESP s-50 中 Man、Glc 及 Gal 的摩尔比为 1:8.39:1.01; LESP s-80 中 Man、Glc 及 Gal 的摩尔比为 1:4.36:1.72。结果表明, LESP s 是一种中性杂多糖。现有研究表明, 香菇多糖是以葡聚糖为主链的结构, 还含有岩藻糖、半乳糖等<sup>[28]</sup>, 这与香菇柄多糖的结构相类似, 可为深入分析香菇柄多糖糖苷键的连接结构提供依据。

### 2.2.5 香菇柄多糖的全波长扫描分析

为了验证香菇柄多糖蛋白质含量之间的差异与化学法作对比。如图 4 所示, 三种 LESP s 在 250~280 nm 处都存在吸收峰, 但强度不大。LESP s-80 的吸收峰对比于 LESP s-50 和 LESP s-20 较强, 与化学法结果相同, 三种多糖中 LESP s-80 的蛋白质含量高于其他两种多糖。

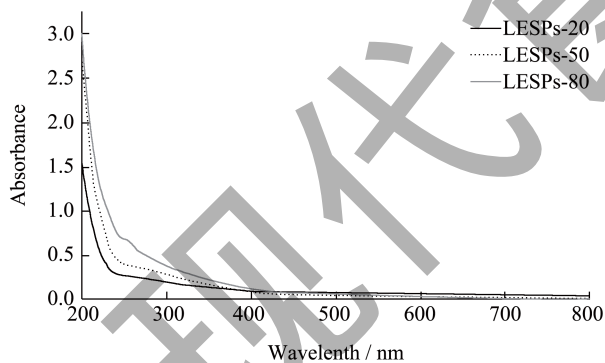


图 4 LESP s-20、LESP s-50、LESP s-80 的紫外光谱图

Fig.4 UV spectrum of LESP s-20, LESP s-50 and LESP s-80

### 2.2.6 香菇柄多糖的傅里叶红外光谱 (FT-IR) 分析

如图 5 所示, 红外图谱显示有多糖的特征峰, 在  $3\ 371.47\ \text{cm}^{-1}$  处为 O-H 的伸缩振动峰, 在  $2\ 918.23\ \text{cm}^{-1}$  处为甲基和亚甲基中 C-H 的振动有关, 且均有较强的峰; 三种多糖在  $858.30\ \text{cm}^{-1}$  处为  $\beta$  型

糖苷键的特征峰, 表明 LESP s 是一种含有  $\beta$  型糖苷键的中性多糖。其他文献也表明, 香菇多糖大多是含有  $\beta$  型糖苷键的多糖<sup>[29]</sup>。

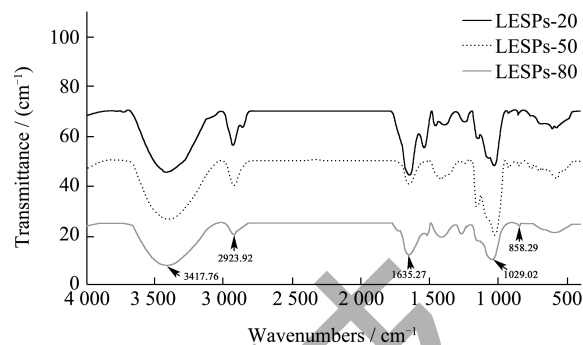


图 5 LESP s-20、LESP s-50、LESP s-80 的红外光谱图

Fig.5 FT-IR spectrum of LESP s-20, LESP s-50 and LESP s-80

## 2.3 香菇柄多糖硫酸化修饰及其产物的理化性质测定

### 2.3.1 硫酸化修饰产物的硫酸基含量测定

通过标准品  $\text{K}_2\text{SO}_4$  质量及其所测吸光值计算, 得到标准方程为:  $y=5.229x+0.019\ 5$ ,  $R^2=0.994\ 6$ 。将所测硫酸化 LESP s 的吸光值代入标准方程, LESP s-20L、LESP s-20M 及 LESP s-20H; LESP s-50L、LESP s-50M 及 LESP s-50H; LESP s-80L、LESP s-80M 及 LESP s-80H 的硫酸基含量如图 6, 分别为 12.4%、20.3% 及 25.1%; 17.3%、24.9% 及 27.3%; 13.2%、22.1% 及 27.3%。结果表明, 硫酸化程度越高, 硫酸基含量也随之增高。

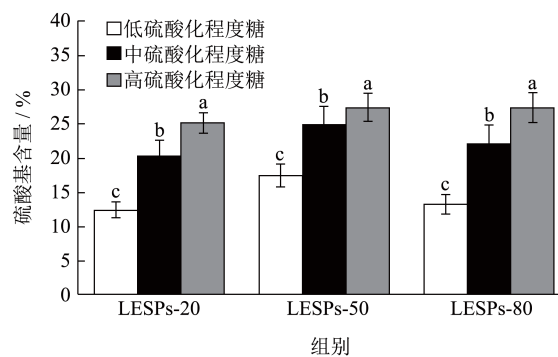


图 6 硫酸化修饰产物的硫酸基含量

Fig.6 Sulfate group content of sulfated modified products

### 2.3.2 硫酸化多糖的相对分子质量

如图 7 所示, 选用 HPGPC 法测定硫酸化 LESP s 的相对分子质量。结果表明, 硫酸基含量越高, 分子量越大。

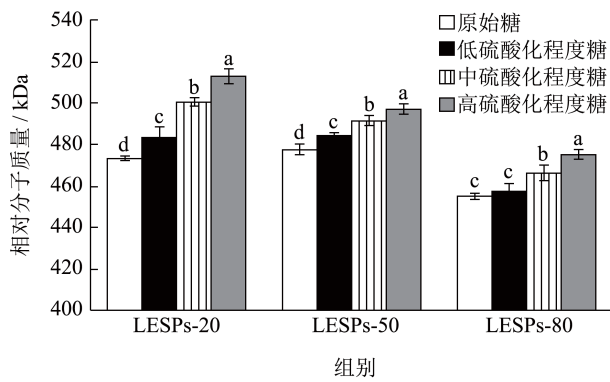


图7 硫酸化多糖的相对分子质量

Fig.7 Average molecular weight of sulfated polysaccharides

注：在  $P < 0.05$  的情况下，图中的不同字母代表有显著性差异。

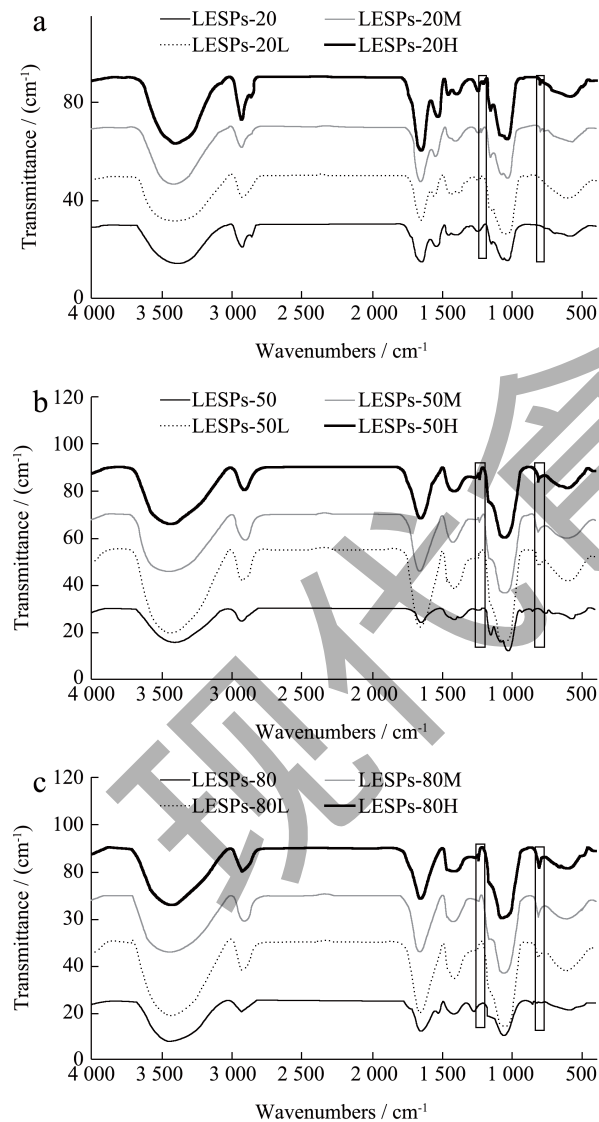


图8 LESP-20 (L、M、H) (a)、LESP-50 (L、M、H) (b) 和 LESP-80 (L、M、H) (c) 的红外光谱图

Fig.8 FT-IR spectrum of LESP-20 (L-M-H) (a), LESP-50 (L-M-H) (b) and LESP-80 (L-M-H) (c)

### 2.3.3 硫酸化多糖傅里叶红外光谱 (FT-IR) 的分析

如图8所示，对比原始多糖发现其出现两个新的特征峰，其中  $1228\text{ cm}^{-1}$  和  $810\text{ cm}^{-1}$  处有明显的峰，此处分别为硫酸化多糖的 S=O 和 C-O-S 的伸缩振动峰；且随着硫酸化程度越高，可看出峰的吸收升高。这说明三种多糖 LESP-20、LESP-50 及 LESP-80 硫酸化修饰成功。

### 2.4 硫酸化修饰产物对免疫调节活性的影响

#### 2.4.1 硫酸化修饰产物对小鼠巨噬细胞RAW 264.7 细胞活力的影响

如表2所示，与空白组相比，不同硫酸化修饰的 LESP-20、LESP-50、LESP-80 在一定浓度范围内均能显著增强巨噬细胞的细胞活力 ( $P < 0.05$ )。与其他程度的硫酸化多糖相比，LESP-20H、LESP-50H 和 LESP-80H，对细胞活力表现出最强的效果。在质量浓度范围为  $12.5\sim 200\text{ }\mu\text{g/mL}$  多糖作用下，不同多糖对细胞活力的增长顺序是 LESP-20H > LESP-20M > LESP-20L > LESP-20；LESP-50H > LESP-50M > LESP-50L > LESP-50；LESP-80H > LESP-80M > LESP-80L > LESP-80。高硫酸化程度多糖的细胞活力都明显高于原始多糖样品，LESP-50H 的细胞活力最高，其次为 LESP-80H。由此可见，硫酸基含量越高，细胞活力的增长效果越好；相比于原样品，硫酸多糖对细胞活力的增长效果更好。

#### 2.4.2 硫酸化修饰产物对小鼠巨噬细胞RAW 264.7 吞噬能力的影响

吞噬作用是游离微生物以及任何外来颗粒被巨噬细胞和多形核嗜中性白细胞从宿主体内清除的主要机制。吞噬作用的增强是活化巨噬细胞的显著特征之一<sup>[30]</sup>。用中性红摄取实验测定巨噬细胞的吞噬活性。如表3可见，与空白组相比，不同硫酸化修饰 LESP-20、LESP-50、LESP-80 在一定浓度范围内均能显著增强巨噬细胞的吞噬能力 ( $P < 0.05$ )。与其他程度的硫酸化多糖相比，LESP-20H、LESP-50H、LESP-80H 对吞噬能力表现出最强的效果。在质量浓度范围为  $12.5\sim 200\text{ }\mu\text{g/mL}$  多糖作用下，不同硫酸化多糖对吞噬能力的增长顺序是 LESP-20H > LESP-20M > LESP-20L；LESP-50H > LESP-50M > LESP-50L；LESP-50H > LESP-50。LESP-50H、LESP-80H 的吞



噬作用明显高于其他样品。由此可见，范围内在 LESP<sub>s</sub>-80L (12.5~100 μg/mL)、LESP<sub>s</sub>-80M (12.5~200 μg/mL) 和 LESP<sub>s</sub>-80H(12.5~25 μg/mL

和 100~200 μg/mL) 这些范围内，硫酸基含量高，吞噬能力的增长效果越高。相比于原样品，硫酸多糖对细胞吞噬能力的增长效果更好。

表 2 不同质量浓度LESP<sub>s</sub>对RAW 264.7细胞活力影响

Table 2 Effect of different concentrations of LESP<sub>s</sub> on the cell viability of RAW 264.7

Control	LPS	LESP <sub>s</sub>	200 μg/mL	100 μg/mL	50 μg/mL	25 μg/mL	12.5 μg/mL
1.00 ± 0.08 <sup>hi</sup>	1.93 ± 0.02 <sup>a</sup>	LESP <sub>s</sub> -20	0.98 ± 0.01 <sup>gh</sup>	0.99 ± 0.01 <sup>i</sup>	1.19 ± 0.01 <sup>h</sup>	1.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.01 <sup>h</sup>
		LESP <sub>s</sub> -20L	0.01 ± 0.01 <sup>gh</sup>	1.15 ± 0.02 <sup>h</sup>	1.18 ± 0.01 <sup>h</sup>	1.25 ± 0.01 <sup>f</sup>	1.27 ± 0.02 <sup>h</sup>
		LESP <sub>s</sub> -20M	1.13 ± 0.03 <sup>f</sup>	1.28 ± 0.01 <sup>g</sup>	1.34 ± 0.03 <sup>fg</sup>	1.38 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.44 ± 0.03 <sup>ef</sup>
		LESP <sub>s</sub> -20H	1.15 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.36 ± 0.02 <sup>f</sup>	1.42 ± 0.01 <sup>f</sup>	1.56 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.01 <sup>d</sup>
		LESP <sub>s</sub> -50	1.04 ± 0.01 <sup>g</sup>	1.14 ± 0.01 <sup>h</sup>	1.30 ± 0.02 <sup>g</sup>	1.42 ± 0.01 <sup>de</sup>	1.52 ± 0.01 <sup>cd</sup>
		LESP <sub>s</sub> -50L	1.35 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.45 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.56 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.58 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.45 ± 0.04 <sup>ef</sup>
		LESP <sub>s</sub> -50M	1.41 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.53 ± 0.05 <sup>d</sup>	1.68 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.64 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.04 <sup>c</sup>
		LESP <sub>s</sub> -50H	1.54 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.99 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.06 <sup>b</sup>
		LESP <sub>s</sub> -80	0.90 ± 0.01 <sup>i</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>i</sup>	0.98 ± 0.02 <sup>i</sup>	1.06 ± 0.02 <sup>g</sup>	1.38 ± 0.01 <sup>fg</sup>
		LESP <sub>s</sub> -80L	1.33 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.53 ± 0.03 <sup>d</sup>	1.55 ± 0.02 <sup>e</sup>	1.56 ± 0.02 <sup>cd</sup>	1.35 ± 0.03 <sup>g</sup>
		LESP <sub>s</sub> -80M	1.41 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.67 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.62 ± 0.03 <sup>de</sup>	1.52 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.52 ± 0.02 <sup>d</sup>
		LESP <sub>s</sub> -80H	1.54 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.68 ± 0.02 <sup>cd</sup>	1.59 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.57 ± 0.01 <sup>c</sup>

注：细胞活力为实验组吸光度值与空白组吸光度值的比值。在  $P < 0.05$  的情况下，表中的不同字母代表相同浓度下不同 LESP<sub>s</sub> 有显著性差异。下同。

表 3 不同质量浓度LESP<sub>s</sub>对RAW 264.7吞噬能力影响

Table 3 Effect of different concentrations of LESP<sub>s</sub> on the phagocytic capacity of RAW 264.7

Control	LPS	LESP <sub>s</sub>	200 μg/mL	100 μg/mL	50 μg/mL	25 μg/mL	12.5 μg/mL
1.00 ± 0.03 <sup>ij</sup>	1.76 ± 0.03 <sup>a</sup>	LESP <sub>s</sub> -20	1.11 ± 0.02 <sup>g</sup>	1.18 ± 0.01 <sup>hi</sup>	1.23 ± 0.03 <sup>hi</sup>	1.19 ± 0.01 <sup>f</sup>	1.27 ± 0.03 <sup>h</sup>
		LESP <sub>s</sub> -20L	1.04 ± 0.02 <sup>h</sup>	1.05 ± 0.03 <sup>j</sup>	1.14 ± 0.02 <sup>j</sup>	1.23 ± 0.02 <sup>ef</sup>	1.25 ± 0.02 <sup>h</sup>
		LESP <sub>s</sub> -20M	1.18 ± 0.01 <sup>f</sup>	1.16 ± 0.02 <sup>i</sup>	1.24 ± 0.02 <sup>h</sup>	1.25 ± 0.04 <sup>e</sup>	1.33 ± 0.02 <sup>g</sup>
		LESP <sub>s</sub> -20H	1.23 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.35 ± 0.03 <sup>f</sup>	1.43 ± 0.04 <sup>de</sup>	1.45 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.44 ± 0.04 <sup>c</sup>
		LESP <sub>s</sub> -50	1.12 ± 0.01 <sup>g</sup>	1.22 ± 0.01 <sup>g</sup>	1.40 ± 0.03 <sup>f</sup>	1.45 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.55 ± 0.02 <sup>bc</sup>
		LESP <sub>s</sub> -50L	1.15 ± 0.02 <sup>f</sup>	1.22 ± 0.02 <sup>h</sup>	1.42 ± 0.02 <sup>e</sup>	1.45 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.44 ± 0.02 <sup>c</sup>
		LESP <sub>s</sub> -50M	1.43 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.45 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.49 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.46 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.55 ± 0.02 <sup>cd</sup>
		LESP <sub>s</sub> -50H	1.56 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.59 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.57 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.55 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.59 ± 0.01 <sup>b</sup>
		LESP <sub>s</sub> -80	1.26 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.31 ± 0.03 <sup>f</sup>	1.37 ± 0.04 <sup>g</sup>	1.47 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.49 ± 0.02 <sup>de</sup>
		LESP <sub>s</sub> -80L	1.45 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.42 ± 0.02 <sup>e</sup>	1.40 ± 0.01 <sup>f</sup>	1.35 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.32 ± 0.02 <sup>fg</sup>
		LESP <sub>s</sub> -80M	1.49 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.55 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.54 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.42 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.37 ± 0.02 <sup>f</sup>
		LESP <sub>s</sub> -80H	1.55 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.64 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.55 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.57 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.02 <sup>c</sup>

注：细胞吞噬指数为实验组吸光度值与空白组吸光度值的比值。

表 4 不同质量浓度LESPs对RAW 264.7酸性磷酸酶活力影响

Table 4 Effect of different concentrations of LESP s on the acid phosphatase activity of RAW 264.7

Control	LPS	LESPs	200 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$
		LESPs-20	1.02 $\pm$ 0.02 <sup>g</sup>	1.14 $\pm$ 0.06 <sup>f</sup>	1.18 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>	1.18 $\pm$ 0.01 <sup>h</sup>	1.12 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>
		LESPs-20L	1.14 $\pm$ 0.02 <sup>f</sup>	1.25 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	1.24 $\pm$ 0.02 <sup>g</sup>	1.24 $\pm$ 0.03 <sup>g</sup>	1.32 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
		LESPs-20M	1.14 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	1.24 $\pm$ 0.01 <sup>ef</sup>	1.35 $\pm$ 0.04 <sup>ef</sup>	1.44 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	1.35 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
		LESPs-20H	1.23 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>	1.27 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	1.52 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	1.54 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.54 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
		LESPs-50	1.34 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.35 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	1.27 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	1.27 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>	1.22 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>
1.00 $\pm$ 0.02 <sup>hi</sup>	1.91 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	LESPs-50L	1.15 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	1.18 $\pm$ 0.06 <sup>ef</sup>	1.14 $\pm$ 0.02 <sup>hi</sup>	1.18 $\pm$ 0.05 <sup>h</sup>	1.13 $\pm$ 0.03 <sup>g</sup>
		LESPs-50M	1.21 $\pm$ 0.06 <sup>cd</sup>	1.35 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	1.34 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	1.36 $\pm$ 0.03 <sup>f</sup>	1.31 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
		LESPs-50H	1.26 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	1.45 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	1.63 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.43 $\pm$ 0.02 <sup>dc</sup>	1.34 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
		LESPs-80	1.19 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	1.34 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	1.20 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>	1.13 $\pm$ 0.01 <sup>hi</sup>	1.20 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>
		LESPs-80L	1.02 $\pm$ 0.02 <sup>g</sup>	1.05 $\pm$ 0.05 <sup>g</sup>	1.14 $\pm$ 0.04 <sup>hi</sup>	1.24 $\pm$ 0.01 <sup>i</sup>	1.13 $\pm$ 0.06 <sup>g</sup>
		LESPs-80M	1.25 $\pm$ 0.03 <sup>de</sup>	1.44 $\pm$ 0.03 <sup>cd</sup>	1.45 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	1.35 $\pm$ 0.03 <sup>ef</sup>	1.25 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>
		LESPs-80H	1.34 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.56 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.55 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	1.48 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	1.45 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>

注：细胞酸性磷酸酶活力为实验组吸光度值与空白组吸光度值的比值。

#### 2.4.3 硫酸化修饰产物对小鼠巨噬细胞RAW 264.7酸性磷酸酶活力的影响

酸性磷酸酶是一种在活化的 RAW 264.7 细胞的吞噬作用中起核心作用的酶<sup>[31]</sup>。如表 4 可见，与空白组相比，不同硫酸化修饰 LESP s-20、LESP s-50、LESP s-80 在一定质量浓度范围下均能显著增强巨噬细胞的酸性磷酸酶活力 ( $P < 0.05$ )。与其他程度的硫酸化多糖相比，LESP s-20H 在 25~50  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度下，LESP s-50H 50  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度范围内，LESP s-80H 在 50~100  $\mu\text{g/mL}$  范围下，分别对酸性磷酸酶活力表现出最强的效果。在质量浓度范围为 12.5~200  $\mu\text{g/mL}$  多糖作用下，巨噬细胞酸性磷酸酶活力的增长顺序是 LESP s-20H > LESP s-20M > LESP s-20L > LESP s-20 ; LESP s-50H > LESP s-50M > LESP s-50L ; LESP s-80H > LESP s-80M > LESP s-80L。由此可见，硫酸基含量越高，酸性磷酸酶活力的增长效果越高。相比于原样品，硫酸多糖对细胞酸性磷酸酶活力的增长效果更好。LESP s-50H 和 LESP s-80H 对酸性磷酸酶活力的促进效果最佳。

#### 2.4.4 硫酸化修饰产物对小鼠巨噬细胞RAW 264.7 NO分泌量的影响

NO 是与巨噬细胞溶细胞功能相关的信号分子之一，对于对抗微生物、寄生虫和肿瘤细胞至关重要<sup>[32]</sup>。如表 5 可见，与空白组相比，不同硫酸化修饰 LESP s-20、LESP s-50、LESP s-80 在 12.5~200  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度范围下均能显著增强巨噬

细胞的 NO 分泌量 ( $P < 0.05$ )。与其他程度的硫酸化多糖相比，LESP s-20H、LESP s-50H 在 50  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度下，LESP s-80H 在 200  $\mu\text{g/mL}$  范围下，对 NO 分泌量表现出最强的效果。不同多糖对 NO 分泌量的增长顺序是 LESP s-20H > LESP s-20M > LESP s-20L > LESP s-20 ; LESP s-50H > LESP s-50M > LESP s-50L > LESP s-50 ; LESP s-80H > LESP s-80M > LESP s-80L > LESP s-80。高硫酸化程度多糖的 NO 分泌量都明显高于原始多糖样品。由此可知，在 LESP s-80L (50~200  $\mu\text{g/mL}$ )、LESP s-80M (12.5~100  $\mu\text{g/mL}$ ) 和 LESP s-80H (12.5~200  $\mu\text{g/mL}$ ) 这些范围内，硫酸基含量越高，NO 分泌量的增长越高。相比于原样品，硫酸多糖对细胞 NO 分泌效果更好。

现有研究表明，香菇多糖是一种  $\beta$ -葡聚糖，而  $\beta$ -葡聚糖由于其特别的一级结构，具有较高的免疫调节活性<sup>[33]</sup>，研究发现，硫酸化的香菇多糖也能提高机体的免疫调节活性。上述细胞实验表明，硫酸化多糖对 RAW 264.7 巨噬细胞免疫调节活性相比于原样品更好，且硫酸基含量越高，其免疫调节活性越强，LESP s-50H 的免疫调节活性最高。这可能是由于硫酸基团的引入，导致多糖的一级结构和分子量发生变化<sup>[34,35]</sup>。此外，经过硫酸化修饰后，多糖的静电排斥力和空间电阻发生了剧烈变化，增加了多糖分子链的伸展性，提高了水溶性，从而有利于其活性表达<sup>[33]</sup>。但高浓度样品的免疫活性降低，可能是由于高浓度的多糖会对细胞产生毒害作用，该现象也在其他文献报道中出现<sup>[36,37]</sup>。

表 5 不同质量浓度LESPs对RAW 264.7 NO分泌量的影响 (  $\mu\text{mol/L}$  )

Table 5 Effect of different concentrations of LESP s on the NO secretion of RAW 264.7

Control	LPS	LESPs	200 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$
		LESPs-20	$10.08 \pm 0.15^h$	$10.73 \pm 0.31^h$	$11.68 \pm 0.22^{fg}$	$12.53 \pm 0.15^f$	$12.14 \pm 0.29^f$
		LESPs-20L	$11.37 \pm 0.48^g$	$12.28 \pm 0.44^{fg}$	$12.51 \pm 0.43^e$	$13.55 \pm 0.23^{de}$	$14.53 \pm 0.33^c$
		LESPs-20M	$13.54 \pm 0.42^{ef}$	$14.47 \pm 0.33^e$	$14.36 \pm 0.33^d$	$15.54 \pm 0.33^b$	$15.59 \pm 0.28^b$
		LESPs-20H	$14.54 \pm 0.34^{de}$	$15.63 \pm 0.55^{bc}$	$16.56 \pm 0.33^b$	$15.81 \pm 0.29^b$	$15.38 \pm 0.90^b$
		LESPs-50	$10.75 \pm 0.07^{gh}$	$11.82 \pm 0.35^{gh}$	$12.76 \pm 0.25^{ef}$	$14.16 \pm 0.22^{cd}$	$12.68 \pm 0.29^e$
$5.75 \pm 1.23^{hi}$	$18.74 \pm 0.50^a$	LESPs-50L	$15.58 \pm 0.27^{bc}$	$15.11 \pm 0.30^{de}$	$14.59 \pm 0.35^{cd}$	$13.67 \pm 0.22^{de}$	$13.14 \pm 0.16^{de}$
		LESPs-50M	$16.18 \pm 0.24^b$	$15.40 \pm 0.17^{cd}$	$15.19 \pm 0.28^c$	$14.51 \pm 0.30^c$	$13.76 \pm 0.27^d$
		LESPs-50H	$16.47 \pm 0.37^b$	$16.56 \pm 0.35^b$	$17.49 \pm 0.35^b$	$16.45 \pm 0.30^b$	$14.68 \pm 0.29^c$
		LESPs-80	$9.97 \pm 0.01^h$	$10.40 \pm 0.33^h$	$10.97 \pm 0.46^g$	$12.73 \pm 0.19^{ef}$	$11.58 \pm 0.16^{gh}$
		LESPs-80L	$12.94 \pm 0.19^f$	$12.66 \pm 0.12^f$	$12.60 \pm 0.42^c$	$11.67 \pm 0.40^g$	$10.91 \pm 0.32^h$
		LESPs-80M	$15.21 \pm 0.32^{cd}$	$14.31 \pm 0.68^{de}$	$13.23 \pm 0.75^e$	$13.11 \pm 0.58^d$	$11.96 \pm 0.36^{fg}$
		LESPs-80H	$16.18 \pm 0.42^b$	$16.03 \pm 0.45^{bc}$	$15.42 \pm 0.36^c$	$14.79 \pm 0.44^c$	$13.53 \pm 0.31^d$

### 3 结论

本论文以陕西香菇柄废弃物为原料, 阐明了香菇柄多糖的理化特性实现初级利用, 并对香菇柄多糖进行硫酸化修饰, 研究不同修饰程度对免疫调节活性的影响实现二级利用。研究发现三种香菇柄多糖均是主要由葡萄糖组成的中性  $\beta$  型杂多糖, 但其单糖组成存在差异。硫酸基修饰后的多糖能显著提高小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的细胞活力、吞噬能力、酸性磷酸酶活力、NO 分泌量。初步明确了硫酸化修饰程度与多糖活性的关系, 硫酸化修饰程度越高, 多糖免疫调节活性越好, 但具体的免疫增强效应仍有待进一步深入研究。研究结果将为深入阐明硫酸化香菇柄多糖增强免疫作用的机制提供基础依据, 为功能性香菇柄活性成分的进一步加工提供技术支持。

### 参考文献

- [1] LI C, XU S. Edible mushroom industry in China: current state and perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(11): 3949-3955.
- [2] 鲍大鹏, 潘迎捷, 谭琦. 中国食用菌产业发展基本面的认识及其启迪[J]. 菌物研究, 2022, 20(3): 160-165.
- [3] XUE Z, HAO J, YU W, et al. Effects of processing and storage preservation technologies on nutritional quality and biological activities of edible fungi: A review [J]. Journal of Food Process Engineering, 2017, 40(3): e12347.
- [4] KUMAR H, BHARDWAJ K, SHARMA R, et al. Potential usage of edible mushrooms and their residues to retrieve valuable supplies for industrial applications [J]. Journal of

Fungi, 2021, 7(6): 427.

- [5] ANTUNES F, MARCAL S, TAOFIQ O, et al. Valorization of mushroom by-products as a source of value-added compounds and potential applications [J]. Molecules, 2020, 25(11): 2673.
- [6] ZHANG Z, LV G, SONG T, et al. Comparison of the preliminary characterizations and antioxidant properties of polysaccharides obtained from *Phellinus baumii* growth on different culture substrates [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 132: 397-399.
- [7] LIU C. Extraction, separation and purification of acidic polysaccharide from morchella esculenta by high voltage pulsed electric field [J]. International Journal Bioautomation, 2019, 23(2): 193-202.
- [8] ZHAO Y, SONG J, WANG J, et al. Optimization of cellulase-assisted extraction process and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(13): 4484-4491.
- [9] MA G, DU H, HU Q, et al. Health benefits of edible mushroom polysaccharides and associated gut microbiota regulation [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(24): 6646-6663.
- [10] HUANG S Y, CHEN F, HAO C, et al. Modification and application of polysaccharide from traditional Chinese medicine such as *Dendrobium officinale* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 385-393.
- [11] SIMSEK M, ASIYANBI H T, RASQAQ N, et al. Progress in bioactive polysaccharide-derivatives: A review [J]. Food Reviews International, 2021, 132: 970-977.
- [12] 谢苗, 亓小妮, 吴杨洋, 等. 多糖的化学修饰及其结构鉴定研究进展[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(3): 11-17.

- [13] 申林卉,刘丽侠,陈冠,等.多糖化学结构修饰方法的研究进展[J].药物评价研究,2013,36(6):465-468.
- [14] ZHANG S, ZHANG H, CHEN L, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activities of different varieties of *Chimonanthus Praecox* [J]. *Industrial Crops and Products*, 2016, 85: 11-21.
- [15] SUN Y J, GONG G P, GUO Y M, et al. Purification, structural features and immunostimulatory activity of novel polysaccharides from *Caulerpa lentillifera* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 314-323.
- [16] SUN Y J, HOU S T, SONG S, et al. Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of *Laminaria japonica* polysaccharides [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 985-995.
- [17] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [18] HAN L R, MENG M, GUO M Z, et al. Immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide obtained from highland barley on immunosuppressive mice models [J]. *Food & Function*, 2019, 10(1): 304-314.
- [19] SUN Y J, SUN W, GUO J T, et al. Sulphation pattern analysis of chemically sulphated polysaccharide LbGp1 from *Lycium barbarum* by GC-MS [J]. *Food Chemistry*, 2015, 170: 22-29.
- [20] ROSTAMI H, GHARIBZAHEDI S. Microwave-assisted extraction of jujube polysaccharide: Optimization, purification and functional characterization [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 143: 100-107.
- [21] 郑伊琦,张安强,张小军,等.响应面优化猪苓菌核多糖超声辅助提取工艺及抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2023,44(16):255-263.
- [22] CERNA M, BARROS A S, NUNES A, et al. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 51(4): 383-389.
- [23] 孙玉姣,高润凝,崔湘怡,等.枸杞多糖及其硫酸化产物的免疫调节活性[J].陕西科技大学学报,2020,38(1):44-49.
- [24] DODGSON K, PRICE R. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides [J]. *Biochemical Journal*, 1962, 84(1): 106-110.
- [25] WANG M, JUANG C, MA L, et al. Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *Hovenia dulcis* [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 41-47.
- [26] KE C, QIAO D, LUO J, et al. Immunostimulatory activity and structure of polysaccharide from *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 57: 218-225.
- [27] ZHA X Q, LU C Q, CUI S H, et al. Structural identification and immunostimulating activity of a *Laminaria japonica* polysaccharide [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 78: 429-438.
- [28] 汪文琦,陆磊,田卫,等.香菇多糖分离纯化及结构表征[J].西北民族大学学报(自然科学版),2023,44(1):10-15.
- [29] 聂少平,王玉箫,殷军艺.食用菌多糖结构相对有序性研究概述[J].中国食品学报,2021,21(8):1-24.
- [30] WU M J, CHENG T L, CHENG S Y, et al. Immunomodulatory properties of *Grifola frondosa* in submerged culture [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2006, 54(8): 2906-2914.
- [31] ZHANG Y, ZENG Y, CUI Y S, et al. Structural characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of a neutral polysaccharide from *Cordyceps militaris* cultivated on hull-less barley [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 235: 115965.
- [32] HIRAYAMA D, IIDA T, NAKASE H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 19(1): 92.
- [33] LIANA I D, FHERNANDA R, LUCIMARA M, et al. Simple and effective purification approach to dissociate mixed water-insoluble  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucans and its application on the medicinal mushroom *Fomitopsis betulina* [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 200: 353-360.
- [34] LIU X, CHEN X, XIE L, et al. Sulfated chinese yam polysaccharide enhances the immunomodulatory activity of RAW 264.7 cells via the tlr4-mapk/nf- $\kappa$ b signaling pathway [J]. *Food & Function*, 2022, 13(3): 1316-1326.
- [35] LIU Y T, LIU Y X, ZHANG M Y, et al. Structural characterization of a polysaccharide from *Suillus luridus* and its antidiabetic activity via nrf2/ho-1 and nf- $\kappa$ b pathways [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 935-945.
- [36] YANG J, CAO M X, HU W Y, et al. Sophorasubproprate polysaccharide suppress the inflammatory reaction of RAW264.7 cells infected with PCV2 via regulation NF- $\kappa$ B/MAPKs/c-Jun signal pathway and histone acetylation modification [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 159: 957-965.
- [37] BAO Z J, YAO L Q, ZHANG X Y, et al. Isolation, purification, characterization, and immunomodulatory effects of polysaccharide from *Auricularia auricula* on RAW 264.7 macrophages [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(12): e13516.