

真菌多糖抗氧化作用的研究进展

郭丽娜, 刘颖, 魏希颖*

陕西师范大学生命科学学院, 西安 710119

摘要: 真菌多糖是一类低毒、安全有效、来源广泛的天然抗氧化剂新资源。近年来, 真菌多糖抗氧化性的研究已经成为多糖及抗氧化剂研究的热点。本文从真菌多糖的结构、提取及抗氧化作用评价方法等方面对近年来国内外的研究进行了综述和展望, 以期对真菌多糖的研究、开发和利用提供参考价值。

关键词: 真菌多糖; 结构; 提取; 抗氧化性评价方法

中图分类号: O629.12

文献标识码: A

Recent Studies on Antioxidant Activities of Fungal Polysaccharides

GUO Li-na, LIU Ying, WEI Xi-ying*

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China

Abstract: Fungal polysaccharides are regarded as one of the most promising new resources of antioxidants with low toxicity, high safety and extensive sources. The research on polysaccharides of antioxidant activities had been one of the focus of polysaccharides and antioxidant field. Recent studies both at home and abroad on the structure, extraction and evaluation method of antioxidant activity of fungal polysaccharides were reviewed in this paper so as to offer references for the research, the development and the use of fungal polysaccharides.

Key words: fungal polysaccharides; structure; extraction; evaluation method of antioxidant activity

多糖是由醛糖和(或)酮糖通过糖苷键连接成的一种天然大分子聚合物, 来源于动植物及微生物细胞等, 是机体不可缺少的成分^[1]。近年来的研究表明, 多糖作为广谱免疫促进剂, 具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、降血脂等多种生物学功能^[2], 在功能性食品和医药领域中发挥着重要的作用^[3]。

真菌多糖是一类广泛存在于真菌中的天然高分子聚合物, 可从菌丝体或子实体中提取出来。上世纪 60 年代以来, 真菌多糖作为广谱免疫促进剂及其抗氧化活性已引起人们的重视^[4]。20 世纪 60 年代中期, 英国学者 Harman 提出了衰老机制的自由基学说^[5]。正常情况下, 人体内自由基处于动态平衡。随着年龄的增长, 这种平衡被逐渐破坏, 过量的自由基可诱发一系列脂质氧化连锁反应, 攻击细胞膜及核酸、蛋白质、酶类等生物大分子, 导致细胞功能严重受损, 组织器官老化^[6]。抗氧化剂可以通过增强细胞自然抵抗能力和直接清除自由基来减轻氧

化损伤^[7]。鉴于人工合成的抗氧化剂具有对肝脏造成损伤甚至导致癌症发生^[8]的较强毒副作用, 人们将研究重点转向了开发和利用低毒、安全有效的天然抗氧化剂。近年来对真菌多糖的研究表明, 其对羟自由基、超氧阴离子等多种活性氧(reactive oxygen species, ROS)具有清除能力, 具有抑制脂质过氧化和提高抗氧化酶活性的功能, 是一种应用前景广阔天然抗氧化剂。

1 真菌多糖的结构及提取方法

1.1 真菌多糖的结构

真菌多糖的结构可分为四级。一级结构是指其单糖残基的组成、排列序列、连接方式等。真菌多糖的一级结构主链是均多糖, 主要有两种: (1) 葡聚糖 β -1,3 糖苷键为主, 兼有少量 β -1,4 或其他糖苷键。吴亚林等研究冬虫夏草菌丝体多糖表明其主链由 (1 \rightarrow 4)-D-葡萄糖糖苷键连接, 支链由 (1 \rightarrow 6)-D-葡萄糖糖苷键^[9]连接。(2) 甘露聚糖主要由 α -糖苷键连接形成主链^[10]。真菌多糖的二级结构是指多糖骨架链间以氢键结合形成的各种聚合体。三级结构是指多糖糖残基中的羟基、氨基、羧基及其他功能基团通

收稿日期: 2014-03-21 接受日期: 2014-04-30

基金项目: 陕西省自然科学基金(2013JM3006)

* 通讯作者 Tel: 86-015389259609; E-mail: 2239139019@qq.com

过非共价作用而导致的有序、规则而粗大的空间结构。四级结构是指多糖多聚链间以非共价作用力而结合形成的聚集体。真菌多糖有四种物理形状:可拉伸带状、卷曲螺旋状、皱纹状及不规则卷曲状^[11]。

1.2 真菌多糖的提取方法

真菌多糖可从胞外液、子实体、菌丝体和孢子粉中提取。提取真菌多糖需破坏多糖链与其他物质的共价结合。从不同部位提取多糖应采取不同的方法。胞外液中多糖的提取主要是乙醇沉淀法,真菌子实体、菌丝体中多糖的提取主要有热水浸提法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法、碱提取法及酶法辅助提取等。

根据多糖易溶于热水而不易溶于乙醇的性质,提取真菌发酵胞外液多糖多用水提醇沉的方法,除去小分子杂质、色素和蛋白质,即得多糖。闫景坤通过水提醇沉的方法提取冬虫夏草胞外多糖,得出最佳提取条件为95%乙醇添加倍数为4.3倍,沉淀时间10.5 h,发酵液PH控制在6.8^[12]。

从真菌子实体、菌丝体中提取多糖需先将材料粉碎,然后用沸水浴抽提,离心、收集上清,减压浓缩,加数倍体积的无水乙醇,收集沉淀物,干燥得粗多糖。由于菌丝体多糖存在于细胞间质和细胞壁中,热水浸提需要的时间长,效率低。为了使胞内多糖更多的释放出来,可借助超声波、微波和酶辅助提取法提取多糖。温露等人通过热水浸提法和超声波浸提法从藏红花内生真菌中提取多糖,粗多糖得率分别为9.47%和9.12%;多糖含量分别为26.35%和57.65%^[13]。翁梁等对蛹虫草运用沸水浴、超声波、微波提取方法提取多糖,测其多糖得率及抗氧化性。结果表明,利用微波提取的蛹虫草多糖具有更好的抗氧化性,且提取时间短,得率高^[14]。Zuofa Zhang等运用热水浸提法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法及酶解的方法从金针菇中提取多糖,比较了不同方法所得多糖的抗氧化性。结果可知酶解法得到的多糖在金属螯合能力及羟自由基清除能力方面较其他种方法强,超声波辅助提取的多糖在DPPH自由基清除方面能力强,热水浸提法所得多糖抗氧化性的优势体现为具有较强的还原力^[15]。

2 真菌多糖抗氧化活性分析评价方法

目前对真菌多糖体外抗氧化活性的分析评价方法主要有以下几类:

2.1 ABTS 自由基清除能力

ABTS法是一种用于体外测定物质总抗氧化能力的方法。ABTS在适当的氧化剂作用下氧化成绿色ABTS⁺,在抗氧化物存在时,ABTS⁺的产生会被抑制。在414 nm或734 nm测定ABTS⁺的吸光度即可测得样品的总抗氧化能力。在此测定方法中,抗氧化剂V_E及类似物Trolox可作为对照。Chatchai Thetsrimuang等测定了香菇粗多糖对ABTS自由基的清除能力,其清除能力的范围是53.4~131 umol trolox/g dw^[16]。Fang Wang等人亦对香乳菇多糖的ABTS自由基的清除能力进行了测定,结果表明其具有很强的ABTS自由基清除能力^[17]。

2.2 羟自由基(·OH)清除能力

可利用Fenton法测定真菌多糖的羟自由基清除能力,其原理是:Fe²⁺催化H₂O₂产生羟自由基·OH,加入显色剂后产生有色物质,该物质在510 nm波长处有吸收峰,测吸光度A₅₁₀值可表示样品清除羟自由基·OH能力的大小,A值越高,说明样品清除羟自由基·OH能力越弱^[18]。Hongtao Bi等就保加利亚胶螺菌多糖对羟自由基·OH的清除进行实验,其清除能力具有剂量依赖性,EC₅₀值为0.55 mg/mL,对照品抗坏血酸的EC₅₀值为0.65 mg/mL,结果显示保加利亚胶螺菌多糖对羟自由基具有很好的清除效果^[19]。

2.3 超氧阴离子清除能力

可利用超氧阴离子与氯化硝基四氮唑蓝反应生成紫红色物质,测550 nm处吸光值判定样品多糖对超氧阴离子的清除能力,以水作为空白对照,抗坏血酸(Vc)作为阳性对照。清除率(%)=(A₀-A_x)/A₀×100%,其中A₀为空白对照溶液的吸光值,A_x为加入样品或Vc后的吸光值。Zhanyong Wang等就黑盖木层孔菌多糖对超氧阴离子清除能力进行了测定,其虽较对照物抗坏血酸的清除能力弱,EC₅₀值(728.2±3.5 mg/L)比抗坏血酸EC₅₀值(227.3±4.8 mg/L)高,但对超氧阴离子仍具有很强的清除能力^[20]。

2.4 DPPH 自由基清除能力

DPPH自由基在517 nm波长处有最大吸收值,其在溶液中为紫红色,当有自由基清除剂存在时,与DPPH作用,溶液颜色变浅,517 nm处吸光值减少,测IC₅₀值(清除DPPH的半清除率)可判定样品对DPPH自由基清除能力。Chunyan Wang等对土曲霉多糖清除DPPH能力进行测定,其虽较对照物抗坏

血酸的清除能力弱,但在 8.0 mg/mL 时 DPPH 自由基清除率达 83.0%,具有很强的自由基清除能力^[21]。

2.5 金属离子螯合能力

真菌多糖对金属离子的螯合能力在评价其抗氧化能方面也常常作为一个重要指标。多糖可络合产生活性氧自由基所需要的金属离子(如 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 等),从而抑制羟基自由基的产生^[22],螯合能力越强,其潜在的抗氧化性就越强。用 EDTA 做阳性对照,测 562 nm 下的吸光度,清除率(%) = $(A_0 - A_x) / A_0 \times 100\%$,其中 A_0 为未加试样菲洛嗪- Fe^{2+} 复合物时的吸光度, A_x 为加试样后的吸光度^[23]。Min Shi 等在灵芝中提取四种多糖 GLP-I、GLP-II、GLP-III、GLP-IV,它们与 EDTA 在浓度为 10 mg/mL 时清除率分别为 30.48%, 25.18%, 39.76%, 42.00%, 98.87%, 显示出所有样品均有抗氧化能力^[24]。

2.6 总还原力的测定

运用铁氰化钾还原法,在 2.5 mL pH 值为 6.6 的磷酸缓冲液中加 1% 的铁氰化钾 2.5 mL 及真菌多糖样品 1.0 mL,混合物在 50 °C 恒温条件下加热 20 min,急速冷却,加 2.5 mL 10% 三氯乙酸,3000 rpm 离心分离 10 min,取上清液 2.5 mL,双蒸水 2.5 mL,0.5 mL 0.1% 三氯化铁,混合均匀,静置 10 min 后在波长 700 nm 处测吸光值 A, A 值越大,则样品还原力越大^[25]。Zhanyong Wang 等提取的黑盖木层孔菌多糖 PNMP 即具有较强的还原能力,显示出潜在的抗氧化性^[20]。

抗氧化能力分析评价方法多样,常常用一种方法来评价一种物质的抗氧化能力是不够的,需要多种方法结合使用,才可以准确地判断。

3 总结和展望

自从英国学者 Harman 提出了衰老机制的自由基学说以来,大量研究表明过量的活性氧会对人体细胞、组织、机体造成损伤,科研人员致力于寻找安全有效的抗氧化剂。真菌多糖是一种具有多种生物学活性的微生物新资源,近年来对其抗氧化作用有了更深入的认识,有可能是其抗炎症、抗肿瘤、防衰老等活性的作用机理之一。

然而由于多糖结构的复杂性,相对于核酸和蛋白质,真菌多糖的研究还较为零散,缺乏系统性。目前的研究多集中在粗多糖的提取、药理作用分析等,

而对多糖的结构和功能的关系缺乏系统性的认识,多糖发挥药理作用的活性形式及临床用药具体的剂量及最佳给药途径尚不明确,限制了真菌多糖的临床发展及应用。此外,生物体具有高度的复杂性,在体外测得的抗氧化性并不代表在体内的抗氧化活性,体内抗氧化作用需进一步探讨。针对上述存在的问题,今后的研究应注重真菌多糖提取工艺的优化,结构的测定,尤其是对其构效关系的探讨方面,从而为真菌多糖的应用提供科学依据。

参考文献

- 1 Liu AM(刘爱民). Resources & utilization of microorganism (微生物资源与应用). Nanjing: Southeast University Press, 2008. 236.
- 2 Hongtao Bi, et al. Structural elucidation and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from the fruit bodies of *Bulgaria inquinans* (Fries). *Food Chemistry*, 2013, 138: 1470-1475.
- 3 Xin Zhang, et al. Extrusion treatment for improved physicochemical and antioxidant properties of high-molecular weight polysaccharides isolated from coarse tea. *Food Research International*, 2013, 53: 726-731.
- 4 Yu HH(俞慧红), et al. Advances of the antioxidative activities research of polysaccharides. *Food R&D*(食品研究与开发), 2008; 29: 172-175.
- 5 Zeng EK(曾尔亢), et al. A new era of aging mechanism studies. *Chin J Social Med*(中国社会医学杂志), 2006; 23(2): 74-77.
- 6 Guo JY(郭江玉), Liang H(梁辉). Free radical theory of aging anti-aging discussion and measures. *Harbin Med J*(哈尔滨医药), 2001, 21: 77-78.
- 7 Schinella GR, et al. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences*, 2002, 70: 1023-1033.
- 8 Qi HM, et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. *Int J Biol Macromolecules*, 2005, 37: 195-199.
- 9 Wu YL, Sun CR., Pan YJ. Studies on isolation and structural features of a polysaccharide from the mycelium of a Chinese edible fungal (*Cordyceps sinensis*). *Carbohydrate Polymers*, 2006, 63: 251-256.
- 10 Zhu JH(朱建华), Yang XQ(杨晓泉). Recent advances in fungus polysaccharomyces survey on bioactive structure, functional properties and prepared methods. *China Food Additives*, 2005, 6: 75-80.
- 11 Chen CH(陈传红), et al. Advances in pharmacological

- effects of fungal polysaccharides. , *Lishizhen medicine and materiamedica research* (时珍国医国药), 2006, 17: 933-934.
- 12 Yan JK(闫景坤). Preparation, structure, and solution properties of a novel antioxidant exopolysaccharide from *Cordyceps sinensis*. Guangzhou: South China University of Technology(华南理工大学), PhD. 2010.
- 13 Wen L(温露), Min Y(闵颖), Yan CY(严春艳). Extraction and antioxidant activity polysaccharide from the endophytes fungus from *Crocus sativus* L. *Lishizhen Med Mater Res*(时珍国医国药), 2011, 22:1850-1852.
- 14 Weng L(翁梁), *et al.* Empirical study of different extraction methods influence on the antioxidation of polysaccharide in *cordyceps militari*. *Food Sci Tech*, 2008, 33:180-182.
- 15 Zhang ZF, *et al.* Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98:1524-1531.
- 16 Chatchai Thetsrimuang, *et al.* Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous* Lév. *Food Chemistry*, 2011, 128:634-639.
- 17 Fang Wang, *et al.* Structure elucidation and antioxidant effect of a polysaccharide from *Lactarius camphoratum* (Bull.) Fr. . *Int J Biol Macromolecules*, 2013, 62:131-136.
- 18 Liu JL(刘建利). Isolation and determination of antioxidant activity of endophytic fungi from *Lycium barbarum*. *Lishizhen Med Mater Res*(时珍国医国药), 2011;22:857-860.
- 19 Hongtao Bi, *et al.* Structural elucidation and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from the fruit bodies of *Bulgaria inquinans* (Fries). *Food Chemistry*, 2013, 138: 1470-1475.
- 20 Wang ZY, *et al.* Extraction of polysaccharides from *Phellinus nigricans* mycelia and their antioxidant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 99:110-115.
- 21 Wang CY, *et al.* Purification, structural characterization and antioxidant property of an extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus*. *Process Biochemistry*, 2013, 48: 1395-1401.
- 22 VolpiN, TanIgiP. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu²⁺ mediated Oxidation of human low-density lipoproteins effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate. *J Biochem*, 1999, 125:297.
- 23 Liu XZ(刘晓珍), *et al.* Triterpenoids content and antioxidant activity of neutral components from *Ganoderma atrum*. *J Nanchang Univ, Engineering & Technology*, 2011, 33: 332-337.
- 24 Min Shi, *et al.* Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydrate Polymers*, 2013, 95:200-206.
- 25 Shen T(申彤), Chen HZ(陈红征), Yang J(杨洁). Selection of aroma-producing yeast for Hami melon wine and Its Properties. *Liquor-making. Sci Tech*, 2004, 3:36-38.

(上接第 348 页)

- 17 Matsuda H, *et al.* Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol-or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci*, 1998;63:245-250.
- 18 Han LK, *et al.* Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. *BMC Complement Altern Med*, 2005, 5:9.
- 19 Murata K, *et al.* Effects of ginseng rhizome and ginsenoside Ro on testosterone 5 α -reductase and hair re-growth in testosterone-treated mice. *Phytother Res*, 2012, 26:48-53.
- 20 Hosono-Nishiyama K, *et al.* Suppression of Fas-mediated apoptosis of keratinocyte cells by chikusetsusaponins isolated from the roots of *Panax japonicus*. *Planta Med*, 2006, 72: 193-198.