

## 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

金鑫<sup>1</sup>,熊川<sup>1</sup>,李萍<sup>1</sup>,  
李强<sup>2</sup>,陈祖琴<sup>1</sup>,张璐<sup>1</sup>,黄文丽<sup>1\*</sup><sup>1</sup>四川省农业科学院生物技术核技术研究所,成都 610061;<sup>2</sup>成都大学药学与生物工程学院,成都 610106

**摘要:**为探究海南岛部分野生灵芝的功效活性以及对野生灵芝的合理利用,分别对采集于海南岛的三株野生灵芝进行了形态和分子鉴定,并对子实体多糖的单糖组分和抗氧化活性进行了分析。结果表明,HN-1 为紫芝(*Ganoderma sinense*)、HN-2 为南方灵芝(*Ganoderma australe*)、HN-3 为无柄紫灵芝(*Ganoderma mastoporium*);三株灵芝多糖的单糖组成和摩尔比存在一定的差异,HN-1 多糖主要由甘露糖、木糖、鼠李糖组成,其摩尔比为 1:0.29:0.14,HN-2 多糖主要由甘露糖、葡萄糖组成,其摩尔比为 1:1.7,HN-3 多糖主要由甘露糖、木糖、葡萄糖组成,其摩尔比 1:1.98:1.8;三株灵芝的多糖都具有较强的抗氧化能力,其抗氧化能力都随着多糖质量浓度的增加而提高,HN-1 的抗氧化活性最强,其次是 HN-3,HN-2 的抗氧化活性最弱。该研究结果为更好的保护和利用海南岛野生灵芝资源提供了基础资料,具有一定的参考价值。

**关键词:**灵芝;系统进化;多糖组成;抗氧化活性

中图分类号:Q938.2;Q936

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)2-0190-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.2.003

## Identification, polysaccharide composition and antioxidant activity of three wild *Ganoderma* strains in Hainan Island

JIN Xin<sup>1</sup>, XIONG Chuan<sup>1</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, LI Qiang<sup>2</sup>, CHEN Zu-qin<sup>1</sup>, ZHANG Lu<sup>1</sup>, HUANG Wen-li<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China;<sup>2</sup>College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

**Abstract:** In order to explore the efficacy and activity of some wild *Ganoderma* in Hainan Island and the rational utilization of wild *Ganoderma*. The morphological and molecular identification of three wild *Ganoderma* collected from Hainan Island was carried out, and the monosaccharide composition and antioxidant capacity of fruiting polysaccharides were analyzed. The results showed that HN-1 was *Ganoderma sinense*, HN-2 was *Ganoderma australe*, HN-3 was *Ganoderma mastoporium*. Different *Ganoderma* showed a difference in the monosaccharide composition and molar ratio. HN-1 polysaccharide is mainly composed of mannose, xylose and rhamnose with a molar ratio of 1:0.29:0.14. The HN-2 polysaccharide is mainly composed of mannose and glucose, and the molar ratio is 1:1.7. HN-3 polysaccharide is mainly composed of mannose, xylose and glucose, and its molar ratio is 1:1.98:1.8. The polysaccharides of three *Ganoderma* have strong antioxidant capacity, and their antioxidant capacity increases with the increase of polysaccharide concentration. HN-1 has the strongest antioxidant activity, followed by HN-3, and HN-2 has the weakest antioxidant activity. The results of this study provide basic information for better protection and utilization of wild *Ganoderma* resources in Hainan Island, and have certain reference value.

**Key words:** *Ganoderma*; phylogenetic evolution; polysaccharide composition; antioxidant activity灵芝(*Ganoderma lingzhi* Sheng H. Wu, Y. Cao & Y. C. Dai)是担子菌门、伞菌纲、多孔菌目、灵芝科、灵芝属真菌<sup>[1,2]</sup>,为我国名贵传统中药材,已有2 000多年的应用研究历史,最早《神农本草经》认为灵芝具有益气强身、扶正固本、延年益寿等功效,现代研究表明灵芝主要活性物质有多糖、三萜类、甾醇类、氨基酸、核苷、蛋白质等<sup>[3]</sup>,其中灵芝多糖是最主要的药效成分<sup>[4,6]</sup>,目前已经从不同来源的灵芝材料中

收稿日期:2019-10-18 接受日期:2019-12-20

基金项目:四川省科技支撑计划(2018GZ0378);国际科技交流合作提升行动计划(真菌中神经活性成分分离纯化与结构鉴定);四川省科技支撑计划(2018NFP0058)

\*通信作者 Tel:86-28-84592187; E-mail: wenli11@126.com

分离获得 200 多个多糖组分,其中大部分为葡聚糖,单糖主要有葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、阿拉伯糖、鼠李糖等<sup>[7,8]</sup>。大量的临床试验表明灵芝多糖具有抗肿瘤、免疫调节、降血脂、降血糖、抗菌解毒等作用<sup>[9-13]</sup>。

近年来灵芝的研究越来越热,人们对野生灵芝资源的需求不断增大,导致野生资源越来越匮乏,而野生灵芝品种的驯化研究是资源利用中重要的一环。在这种形势下,对灵芝野生资源种类的正确认识以及活性研究有着积极的意义,目前,虽然对海南岛野生灵芝的研究已有一些报道<sup>[14,15]</sup>,但是研究集中在资源分类和分离驯化,还没有对海南岛野生灵芝子实体多糖的组成和活性研究的报道。本研究首先对三株海南野生灵芝子实体进行形态和分子鉴定;其次通过 HPLC 分析了子实体多糖的单糖组成;最后测定多糖的 DPPH 自由基清除能力、羟自由基清除能力、超氧阴离子清除能力进行抗氧化活性评价。鉴定海南岛的野生灵芝资源和深入研究其活性是重要的基础工作,本研究以期对海南岛野生灵芝资源的保护利用或深入研究其多糖活性提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

样品采集于海南岛五指山国家级自然保护区,三株灵芝分别编号为 HN-1、HN-2 和 HN-3。

#### 1.1.2 试剂

三氟乙酸(TFA)、乙酸铵、乙腈(Merck,德国),1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)分析纯(Sigma,美国)、DNA 提取试剂盒(OMEGA 公司的 D3390-02 E. Z. N. A. TM Fungal DNA Kit 试剂盒)、葡萄糖(Glc, ≥98%)、D-木糖(Xyl, 98%)、D-半乳糖(Gal, ≥99%)、D-甘露糖(Man, ≥98%)、核糖(Rib, >98%)、D-鼠李糖(Rha, ≥98%)等标准品(成都普思生物科技股份有限公司),其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

#### 1.1.3 仪器

紫外分光光度计(Molecular Devices 美国),旋转蒸发仪(Eyelaosb 2000 日本),冷冻干燥机(CHRIST Beta 2-8 LSCplus 德国),高效液相色谱仪(Perkinelmer CT 06484 美国),全波长扫描酶标仪(Thermo Fisher Scientific,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 DNA 提取、扩增及测序

将子实体表面用无菌水清洗干净,取 2 g 子实

体用液氮研磨,采用试剂盒提取 DNA,采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对 DNA 进行扩增,扩增条件参考文献<sup>[16]</sup>,扩增样品送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.2.2 灵芝子实体粗多糖的提取

灵芝子实体于 60 °C 下烘干,粉碎。称取 50.0 g 灵芝子实体粉末,按料液比 1:30 (W/V) 加入蒸馏水,90 °C 水浴提取 3 h,提取 2 次,合并滤液,50 °C 旋转蒸发浓缩至约 30 mL,经过 3 000 Da 膜过滤,向溶液中加入其体积 1/3 的 Sevag 试剂( $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}} = 4:1$ )混合震荡后静置 30 min,5 000 rpm,离心 10 min,除去有机层及水层和有机层交界处的变性蛋白质,重复多次至无蛋白质产生。除蛋白后的多糖,再经过 95% 酒精醇沉,最后 5 000 rpm 离心 10 min 去上清,冷冻干燥保存,多糖含量采用苯酚-硫酸法测定<sup>[17]</sup>。

### 1.2.3 混合单糖标样的衍生

单糖混合标准溶液与灵芝多糖按 Feng 等<sup>[18]</sup>的方法并做改进,进行柱前衍生化后进行 HPLC 分析;其中单糖混合标准溶液为 D-甘露糖(D-mannose, Man)、D-木糖(D-xylose, Xyl)、L-鼠李糖(L-rhamnose, Rha)、D-葡萄糖(D-glucose, Glc)、D-半乳糖(D-galactose, Gal)、核糖(ribose, Rib)、D-阿拉伯糖(D-arabinose, arab)、L-岩藻糖(L-fucose, Fuc)标准品,分别配成 5 mg/mL,同等体积混合。分别取 300 μL 的混合单糖标准液与 300 μL 0.6 mol/L NaOH 溶液,置于 2 mL 的离心管中并混合均匀;再取 150 μL 的混合液于 5 mL 的具塞刻度试管中,加 150 μL 0.5 mol/L 的 PMP(0.435 5 g/5 mL)甲醇溶液,漩涡混匀;在 70 °C 烘箱中反应 120 min;取出放置 10 min 冷却至室温;加 150 μL 0.3 mol/L 的 HCl 中和;再加水至 3 mL,再加等体积的氯仿,振荡,静置,弃去氯仿相,如此萃取 3 次。将水相用 0.2 μm 微孔膜过滤后供 HPLC 进样分析。

### 1.2.4 多糖衍生样品制备

吸取 300 μL 质量浓度为 5 mg/mL 的多糖样品溶液于 5 mL 的具塞刻度试管中,加入 300 μL 的 4 mol/L TFA,充 N<sub>2</sub> 封管,110 °C 烘箱中水解 70 min;取出室温放置 10 min,冷却后打开盖,加 600 μL 甲醇后用 N<sub>2</sub> 吹干,如此重复加甲醇并用 N<sub>2</sub> 吹 3 次,去除溶液中的 TFA;再加入 150 μL 0.3 mol/L NaOH 溶液充分溶解残渣,再加 150 μL 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液,漩涡混匀,同样在 70 °C 的烘箱中反应 120

min,冷却后按“1.2.3”进行中和和萃取,最后用0.2 μm 微孔膜过滤。

### 1.2.5 液相色谱条件

色谱柱 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol/L 磷酸盐 (pH 6.7), 缓冲液-乙腈, 体积比为 83:17; 柱温: 30 °C; 检测波长: 250 nm; 流速: 1 mL/min; 进样体积: 50 μL。

### 1.2.6 灵芝多糖对 DPPH 的清除作用

参照 Feng<sup>[18]</sup> 和 Feng<sup>[19]</sup> 的方法,略作修改。称取一定质量的粗多糖,分别配成不同质量浓度(0、0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 mg/mL)的粗多糖水溶液各 10 mL。各取 0.5 mL 的样品,分别加入 0.5 mL 0.04 mg/mL 的 DPPH 的乙醇溶液,在振荡器上混匀 30 s,后放入 25 °C 烘箱中避光反应 30 min,用酶标仪 517 nm 处测定其吸光值(A)。空白组用 0.5 mL 去离子水代替样品,对照组用 0.5 mL 无水乙醇溶液,阳性对照为不同浓度的维生素 C。三次重复取平均值。

$$\text{清除率} = (1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}) \times 100\%$$

式中: A<sub>空白</sub> 为空白组吸光值; A<sub>对照</sub> 为对照组吸光值; A<sub>样品</sub> 为样品组吸光值,下同。

### 1.2.7 对羟基自由基的清除作用

参照 Zhang<sup>[20]</sup> 和 Ma 等<sup>[21]</sup> 方法,进行了部分修改。分别取 1.2.6 方法中配制好的不同质量浓度的多糖溶液 1 mL 于试管中,向各管中加入新鲜配制的硫酸亚铁溶液(6 mmol/L)和水杨酸溶液(6 mmol/L)各 0.3 mL,在振荡器上混匀 30 s,之后加入 0.1% 的过氧化氢溶液 0.3 mL,继续振荡混匀 30 s,37 °C 烘箱中反应 30 min,酶标仪 510 nm 处测定吸光值。空白组以去离子水代替多糖样品,阳性对照为不同浓度的 Vc。三次重复取平均值

$$\text{清除率} = (1 - \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}}) 100\%$$

### 1.2.8 对超氧阴离子的清除作用

参照 Ma<sup>[21]</sup> 和 Han<sup>[22]</sup> 的方法,进行适当修改。

选取 10 mL 的具塞试管,向各管中加入 50 mmol/L pH 为 8.2 的磷酸盐缓冲液 0.9 mL,在 25 °C 烘箱中静置 30 min,再向各试管中加入 0.2 mL “1.2.6” 中配制好的不同质量浓度的多糖样品,然后加入 25 mmol/L 的邻苯三酚溶液 0.08 mL,振荡器上混匀 30 s,25 °C 烘箱中避光反应 10 min,再加入浓度为 80 mmol/L 的 HCl 0.2 mL,水浴摇床反应 5 min,摇床转速为 180 rpm,然后在酶标仪 420 nm 处测定吸光度值。空白组以去离子水代替多糖样品,对照组为 80 mmol/L HCl 代替邻苯三酚,阳性对照为不同浓度的 Vc。三次重复取平均值。

$$\text{清除率} = (1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}) \times 100\%$$

## 1.3 数据分析

采用 Excel 2010, SPSS19 软件处理数据,并用 Origin 9.0 作图,所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 野生灵芝形态鉴定和系统进化分析

将 HN-1、HN-2 和 HN-3 子实体样品的 ITS 测序序列上传 NCBI,分别获得序列号 MK968730、MK968731、MK968732,同时将其测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,同时在 GenBank 中寻找同源性最大的序列,每个样品各找 4 条与之对应相似的同源序列(相似度 ≥ 99%),构建系统发育树,同时以假芝(*Amauroderma subrugosum*)为外参。从图 1 中可以看出,HN-1、HN-2 和 HN-3 都属于灵芝种,但处于不同的分支上,与赤芝(*G. lingzhi*)距离较远。HN-1 与 KT318604.1 (*G. sinense*) 相似度非常高,相似性 ≥ 99%; HN-2 与 KT318590.1 (*G. australe*) 相似度 ≥ 99%; HN-3 与 JX840350.1 (*G. mastoporum*) 相似度 ≥ 99%。

三株野生灵芝子实体性状和生境见表 1,三株野生灵芝子实体形态图(见图 2),通过 ITS 序列分析和形态鉴定,可确定 HN-1 为紫芝(*G. sinense*), HN-2 为南方灵芝(*G. australe*), HN-3 为无柄紫灵芝(*G. mastoporum*)。

表 1 三株野生灵芝子实体性状和生境

Table 1 Characters and habitats of fruiting bodies of three wild *Ganoderma*

样品 Sample	HN-1	HN-2	HN-3
菌盖直径、厚度 Diameter and thickness (cm)	直径 5.8 ~ 6.2, 厚 0.9 ~ 1.3	菌盖直径 17.8 × 22.5, 基部厚度 4.7	菌盖椭圆形, 菌盖直径 13.5 × 18.9
菌盖正面 Positive	菌盖表面中间紫红褐色, 光滑有似漆样光泽, 有明显的环纹和纵皱, 菌盖边缘薄、乳白色	菌盖扇形、表面黄褐色, 有明显的环轮, 不光泽, 中厚间边缘薄, 边缘为白色	表面黑褐色, 有少量孢子粉, 菌盖有稠密的同心环纹, 纵皱明显, 基部较厚, 厚度达到 7.8 cm

续表 1 (Continued Tab. 1)

样品 Sample	HN-1	HN-2	HN-3
菌盖背面 Back	纯白色,能看到细小的微孔	白色,有微孔但不明显	褐色,较光滑
菌柄长度 Length of stipe (cm)	菌柄较细长 18.5	无菌柄	无菌柄
菌柄形状 Stipe shape	紫褐色,光滑	无菌柄	无菌柄
菌肉颜色、味道 Color and taste of mushroom meat	褐色,无苦味	新鲜菌肉浅褐色,木栓质,干燥后变为深褐色,苦味较浓	菌肉暗褐色,木栓质,微苦味浓
生境 Habitat	混交林里,以阔叶树、竹子为主,潮湿	生长在活榕树上,所生长地位为断枝处,有一个狭窄的柄基	生长在卧倒的腐木上
相似物种 Similar species	紫芝 ( <i>G. sinense</i> )	南方灵芝 ( <i>G. australe</i> )	无柄紫灵芝 ( <i>G. mastoporium</i> )

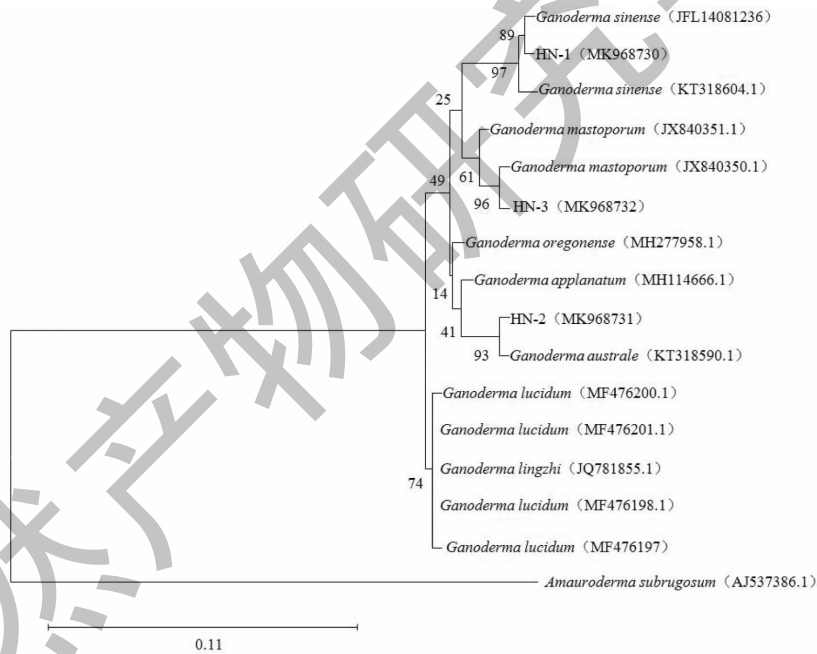


图 1 灵芝 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed by *Ganoderma* based on ITS sequences

### 2.2 多糖含量及多糖电镜分析

表 2 为三种灵芝子实体的多糖提取率数据,从表中可以看出 HN-1 的多糖提取率最高,为 2.39% ± 0.05%,其次为 HN-3,最低的为 HN-2,三者之间的多糖提取率存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

将干燥后的多糖放大 50 倍电镜扫描,图 3 为 HN-1、HN-2 和 HN-3 的多糖电镜扫描结果。目前,对于多糖表面结构的表征,还没有统一标准,但电镜

扫描结果可显示样品的部分表面结构,从中可以比较不同样品间多糖结构的差异。可观测到 HN-1 和 HN-2 多糖能较好的均匀分散开,呈现块状,块状中均存在空洞和凹槽,而 HN-3 同样呈现块状,但不能较好的分散开,块状较致密;HN-1 的块状多糖部分表面光滑、部分表面出现绒毛状,HN-2 的块状多糖表面大部分为绒毛状、小部分表面光滑,而 HN-3 的块状多糖大部分表面光滑,只有断裂处出现少量绒

毛。可见,三种多糖组分表面结构存在一定的差异。



图2 3种野生灵芝形态图

Fig. 2 three species of wild *Ganoderma*

注:A-1;HN-1 正面,A-2;HN-1 背面;B-1 HN-2 正面;B-2;HN-2 背面;C-1 HN-3 正面;C-2;HN-3 背面。Note:A-1;HN-1 front,A-2;HN-1 back;B-1 HN-2 front;B-2;HN-2 back;C-1 HN-3 front;C-2;HN-3 back.

表2 多糖提取率

Table 2 Extraction rate of polysaccharides

灵芝 <i>Ganoderma</i>	提取率 Extraction rate (%)
HN-1	2.39 ± 0.05 <sup>a</sup>
HN-2	1.72 ± 0.07 <sup>c</sup>
HN-3	2.00 ± 0.11 <sup>b</sup>

注:不同小写字母表示不同灵芝多糖含量间具有显著差异( $P < 0.05$ ),下同。

Note:Different lowercase letters indicate significant differences between different *Ganoderma* polysaccharide contents ( $P < 0.05$ ), the same below.

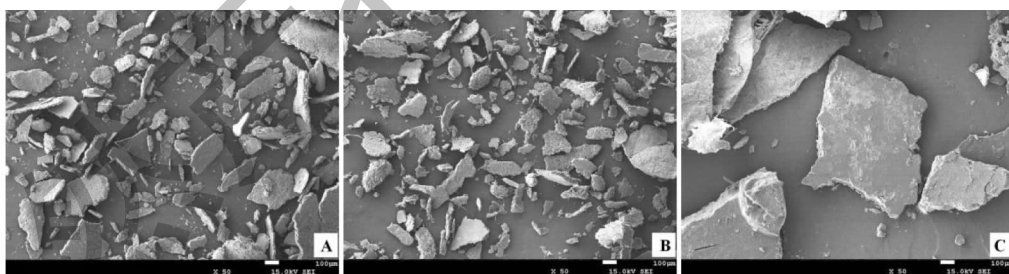


图3 灵芝多糖扫描电镜(50×)

Fig. 3 *Ganoderma* polysaccharide scanning electron microscope (50 ×).

注:A;灵芝 HN-1,B;灵芝 HN-2,C;灵芝 HN-3。Note:A;HN-1,B;HN-2,C;HN-3.

## 2.3 灵芝多糖的单糖组成

### 2.3.1 标准单糖的PMP衍生化分析

将各单糖标准品的混合标样衍生化,并进行HPLC分析,结果见图4。由图4可知各单糖标准品的PMP衍生物实现了良好的分离。

### 2.3.2 各种单糖标准品的线性关系

分别各取单糖的标准溶液 10、25、50、100、150

$\mu\text{L}$  稀释至 500  $\mu\text{L}$  进行 HPLC 分析。根据各单糖的质量浓度对应的峰面积进行线性回归分析,进而获得各单糖的回归方程。结果表明,8 种单糖标准品在相应浓度范围内线性关系均较好,结果如表 3。

### 2.3.3 灵芝多糖组分的水解产物 PMP 衍生物分析

同单糖标准品衍生物的色谱图进行对照分析,HN-1 多糖含有甘露糖、木糖和鼠李糖;HN-2 多糖含

有甘露糖和葡萄糖;HN-3 多糖含有甘露糖、木糖和葡萄糖(见图5)。

通过对照标准单糖的线性回归方程,可以计算

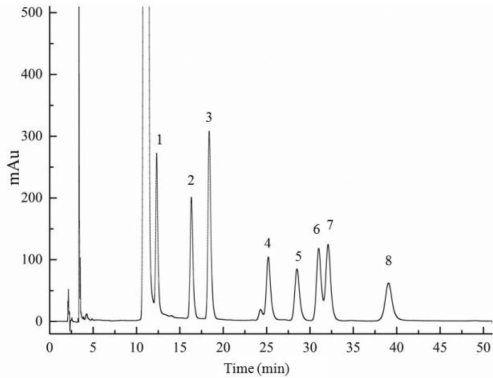


图4 8种单糖标准品混合物高效液相色谱图

Fig. 4 HPLC of eight monosaccharide standard mixtures

注:1:甘露糖;2:木糖;3:鼠李糖;4:葡萄糖;5:半乳糖;6:核糖;7:阿拉伯糖;8:岩藻糖。Note:1: Mannose;2: Xylose;3: Rhamnose;4: Glucose;5: Galactose;6: Ribose;7: Arabinose;8: Fucose.

样品中各单糖的摩尔比,具体数据见表4。三株海南野生灵芝子实体其多糖的单糖组成都不相同,但都含有相同的甘露糖成分。

## 2.4 多糖抗氧化活性分析

### 2.4.1 对 DPPH 自由基的清除能力

以  $V_c$  作为阳性对照,三株海南野生灵芝多糖(HN-1、HN-2、HN-3)对 DPPH 的清除能力均随其浓度的升高而增大(图6),在浓度和清除率之间有着良好的正相关关系,当多糖浓度为 0.25 mg/mL 时,三株灵芝多糖清除率均在 35% 左右,随着浓度的逐渐上升,HN-1 多糖的清除率明显高于其他两组;当多糖浓度达到 5 mg/mL,HN-1 的清除率为 84.68%,HN-2 为 76.36%,HN-3 为 81.68%,但仍显著低于  $V_c(P < 0.05)$ ;  $IC_{50}$  值越小,其抗氧化活性的能力越好,从下表5的  $IC_{50}$  值可以看出,HN-1 的  $IC_{50}$  值最小,其清除 DPPH 能力最强,其次为 HN-3 和 HN-2 的清除 DPPH 能力最低。

表3 8种单糖的回归方程和相关系数

Table 3 Linear range and regression equations of eight monosaccharaides

单糖 Monosaccharide	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient
甘露糖 Man	$y = 365.38x + 2.3242$	0.9999
木糖 Xyl	$y = 311.35x - 9.8257$	0.9998
鼠李糖 Rha	$y = 377.68x + 3.2768$	0.9999
葡萄糖 Glc	$y = 338.56x - 5.6821$	0.9994
半乳糖 Gal	$y = 383.47x - 7.2530$	0.9996
核糖 Rib	$y = 370.58x - 6.4535$	0.9999
阿拉伯糖 Rra	$y = 377.49x - 4.3528$	0.9997
岩藻糖 Fuc	$y = 383.54x - 2.9843$	0.9998

表4 灵芝多糖单糖组成及摩尔比

Table 4 Composition and molar ratio of monosaccharide of *Ganoderma* polysaccharides

多糖 Polysaccharide	单糖组成 Monosaccharide composition	摩尔比 Molar ratio
HN-1	Man-Xyl-Rha	1:0.29:0.14
HN-2	Man- Glu	1:1.7
HN-3	Man-Xyl-Glu	1:1.98:1.8

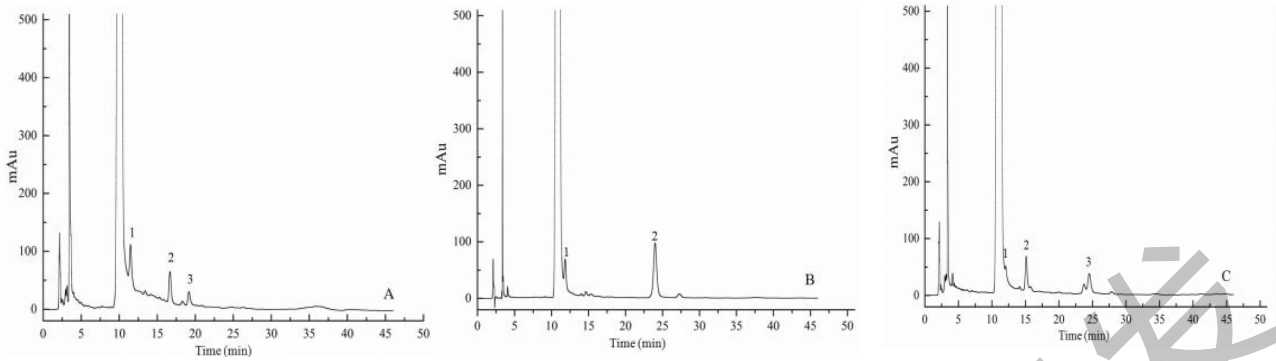


图5 三种灵芝多糖高效液相色谱图

Fig. 5 High performance liquid chromatogram of three kinds of *Ganoderma* polysaccharides

注: A (HN-1), 1: 甘露糖, 2: 木糖, 3: 鼠李糖; B (HN-2), 1: 甘露糖, 2: 葡萄糖; C (HN-2), 1: 甘露糖, 2: 木糖, 3: 葡萄糖。Note: A (HN-1), 1: Mannose, 2: Xylose, 3: Rhamnose; B (HN-2), 1: Mannose, 2: Glucose; C (HN-2), 1: Mannose, 2: Xylose, 3: Glucose.

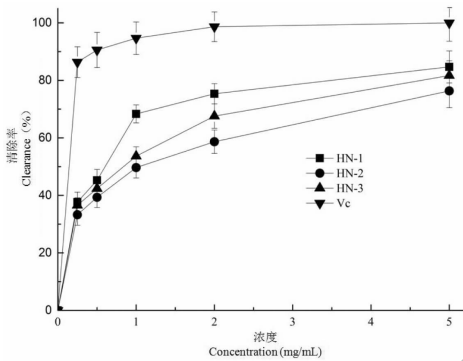


图6 不同灵芝多糖对DPPH的清除能力

Fig. 6 Scavenging capacity of different *Ganoderma* polysaccharides on DPPH

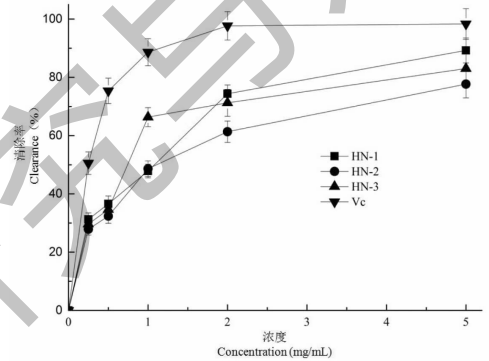


图7 不同灵芝多糖对羟基自由基的清除能力

Fig. 7 Scavenging capacity of different *Ganoderma* polysaccharides on hydroxyl radicals

#### 2.4.2 对羟基自由基的清除能力

三株野生灵芝子实体多糖清除 $\cdot\text{OH}^-$ 的活性与多糖浓度存在不同程度的依赖关系,见图7。在多糖质量浓度为0.25和0.5 mg/mL时,三种灵芝多糖对 $\cdot\text{OH}^-$ 的清除率差异较小,处在28%~35%之间,清除率大小顺序为HN-1>HN-3>HN-2;当多糖质量浓度达到1时,清除率都显著上升,HN-3的清除率最高,达到了66.34%,而HN-1和HN-2的清除率基本相同;当多糖质量浓度分别为2和5 mg/mL时,HN-1的清除率升高幅度明显大于HN-1和HN-3,清除率顺序都为HN-1>HN-3>HN-2。从下表5中可以看出,HN-1和HN-3的 $\text{IC}_{50}$ 值不存在显著差异( $P>0.05$ ),说明HN-3和HN-1对 $\cdot\text{OH}^-$ 的清除能力显著优于HN-2( $P<0.05$ )。

#### 2.4.3 对超氧阴离子的清除能力

三种灵芝子实体多糖对超氧自由基清除活性同样随着多糖质量浓度的提高而增加(图8),当多糖

浓度从0.25 mg/mL提高到2 mg/mL时,HN-1、HN-2和HN-3的清除率都显著上升,当多糖浓度从2 mg/mL提高到5 mg/mL时,三种多糖的清除率升高幅度较小。从表5中可以看出,HN-1、HN-2和HN-3的 $\text{IC}_{50}$ 相互间存在显著差异( $P<0.05$ ),HN-1的 $\text{IC}_{50}$ 最低,其对超氧自由基清除活性显著高于其他两种多糖。当多糖质量浓度达到5.0 mg/mL时,HN-1的清除率为78.62%,HN-2的清除率为69.54%,HN-3的清除率为72.35%,但仍显著低于Vc。

### 3 讨论

#### 3.1 野生灵芝的鉴定分析

海南岛属于热带和亚热带雨林气候,其独特的气候优势为野生灵芝生长提供了适宜的温度和湿度,同时丰富的原始森林为灵芝生长提供了充足的营养。目前,海南岛已记载有分布的灵芝属资源达78种之多<sup>[15]</sup>,其中野生灵芝资源有28种<sup>[23,24]</sup>,是

表5 不同多糖对自由基清除的半抑制浓度  
Table 5 IC<sub>50</sub> for free radical-scavenging capacity

多糖 Polysaccharide	IC <sub>50</sub> (mg/mL)		
	DPPH	羟自由基 Hydroxyl radical	超氧阴离子 Superoxide anion
HN-1	1.69 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.70 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.93 ± 0.12 <sup>c</sup>
HN-2	2.08 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.73 ± 0.15 <sup>a</sup>
HN-3	1.71 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.65 ± 0.11 <sup>b</sup>	2.29 ± 0.08 <sup>b</sup>

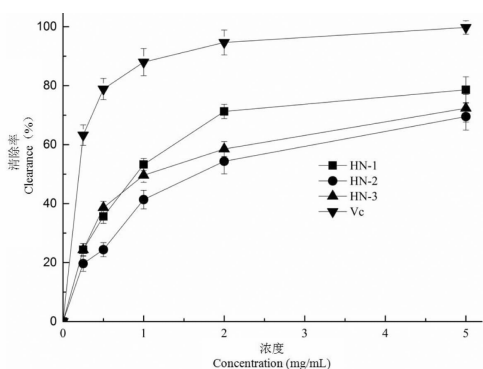


图8 不同灵芝多糖对超氧阴离子的清除能力

Fig. 8 Scavenging capacity of different *Ganoderma* polysaccharides on superoxide anion

我国野生灵芝分布最丰富的地区之一,本研究对采集于海南岛的三株野生灵芝进行了形态鉴定和分子鉴定,HN-1 鉴定为紫芝 (*G. sinense*),HN-2 鉴定为南方灵芝 (*G. australe*),HN-3 鉴定为无柄紫灵芝 (*G. mastoporium*),三株野生灵芝的鉴定结果同 Wen<sup>[15]</sup>对采集于海南岛的7种野生灵芝的形态与分子鉴定结果相似。

### 3.2 灵芝多糖的单糖组成差异分析

多糖是灵芝主要活性成分之一,多糖的分子结构和空间构象常常携带着大量的生物学信息,在生物体的中发挥着至关重要的作用,它是由单一或多种单糖聚合而成的高分子化合物。大量学者对灵芝多糖的单糖组成和含量进行了研究,Yang 等<sup>[25]</sup>从灵芝子实体中分离得到2个多糖组分,且其单糖组成存在较大的差异;Zhang<sup>[26]</sup>对不同灵芝孢子粉的多糖组成进行分析,发现其单糖组成主要由半乳糖、葡萄糖、甘露糖组成,各单糖含量存在显著差异;Xu<sup>[27]</sup>研究发现多糖主要由阿拉伯糖、木糖、甘露糖和葡萄糖组成,同时表明多糖的抗氧化活性与单糖组成存在密切相关,另外还有研究发现灵芝子实体中多糖主要由葡萄糖和半乳糖组成,而菌丝体和孢

子粉中多糖的单糖组成主要为葡萄糖<sup>[28]</sup>,通过热水浸提法提取的灵芝子实体多糖由葡萄糖、木糖、阿拉伯糖组成,而通过碱抽提法得到的灵芝多糖则为葡聚糖<sup>[29]</sup>。本研究通过热水浸提法提取野生灵芝子实体部位的多糖,结果显示多糖表征存在一定的差异,各单糖组成和含量同样存在较大差异。对于灵芝多糖的单糖组成差异较大,部分学者对出现这一差异的原因进行过研究<sup>[30-32]</sup>,发现灵芝种类的不同、产地不同、灵芝部位不同以及提取多糖方法的不同,都会导致灵芝多糖在化学结构和组成上有较大的多样性。

### 3.3 灵芝多糖的抗氧化活性分析

多糖结构特征包括单糖组成及含量、主链结构、分子量大小、糖苷键构型等,灵芝多糖化学结构差异很大,对其生物活性具有很大影响,尤其是单糖组成和主链结构。大量体外抗氧化试验证实,从灵芝中分离提取出多糖具有显著抗氧化活性。本研究提取的3株野生灵芝子实体多糖同样具有较高的清除自由基能力,在进一步研究中发现,相同浓度下,HN-1多糖的抗氧化能力大于HN-3,HN-2最弱,这可能是由于各多糖的单糖组成及含量的差异变化引起,HN-1和HN-3多糖都由三种单糖组成且都含有木糖,HN-2则只由两种单糖组成。Liao<sup>[33]</sup>曾研究发现富含岩藻糖的灵芝多糖具有更好的免疫调节作用,Ni<sup>[34]</sup>在分析多糖的单糖组成与活性的相关性分析发现多糖的抗氧化能力与多糖的单糖组成有着较大相关性关系,其含有木糖的多糖样品其抗氧化活性明显较高。还有一些研究表明,多糖的抗氧化能力与多糖的单糖组成、分子量有较大关系<sup>[35]</sup>。较多单糖组成以及较高含量的木糖可能是决定灵芝子实体多糖具有较高的抗氧化活性的原因之一,本文仅限于灵芝子实体多糖的单糖组成展开研究,而未对多糖进行纯化以及深入研究多糖的具体结构,在今后的试验中将会更深入研究多糖的详细结构和多糖



发挥自身抗氧化作用的机制。

#### 4 结论

海南岛的野生灵芝特点显著,可作为灵芝驯化栽培和品种改良的重要材料,采集于海南岛的三株野生灵芝子实体多糖的单糖组成及单糖含量具有一定差异,HN-1 多糖主要由甘露糖、木糖、鼠李糖组成,其摩尔比为 1:0.29:0.14,HN-2 多糖主要由甘露糖、葡萄糖组成,其摩尔比为 1:1.7,HN-3 多糖主要由甘露糖、木糖、葡萄糖组成,其摩尔比 1:1.98:1.8。另外,三株灵芝的多糖都具有较强的抗氧化能力,其抗氧化能力都随着多糖质量浓度的增加而提高,HN-1 的抗氧化活性最强,其次是 HN-3 和 HN-2 的抗氧化活性最弱。通过对海南岛野生灵芝资源鉴定、子实体多糖的单糖组成和抗氧化活性研究,为灵芝资源的保护利用以及相关的科学研究提供数据参考,为后续海南岛野生灵芝驯化后人工栽培子实体多糖的产品开发研究奠定实验基础。

#### 参考文献

- Cao Y, Wu SH, Dai YC. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi" [J]. *Fungal Divers*, 2012, 56:49-62.
- Dai YC, Cao Y, Zhou LW, et al. On the scientific name of Chinese *Ganoderma* [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2013, 32:947-952.
- Tang KP, Liu SR, Wu XP, et al. Screening of *Ganoderma lucidum* strains suitable for submerged fermentation by grey correlation degree method [J]. *J Nucl Agr Sci* (核农学报), 2015, 29:1963-1969.
- Hwang, IW, Kim BM, Kim YC, et al. Improvement in  $\beta$ -glucan extraction from *Ganoderma lucidum* with high-pressure steaming and enzymatic pre-treatment [J]. *Appl Biol Chem*, 2018, 61:235-242.
- Xu JW, Zhao W, Zhong JJ. Biotechnological production and application of ganoderic acids [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87:457-466.
- Wang Y, Wei JY, Wu SJ, et al. Research progress in the structural characteristics and pharmacological action of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2019, 41:627-635.
- Nie S, Zhang H, Li W, et al. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: isolation, structure and bioactivities [J]. *Bio Carbo Die Fib*, 2013, 1(1):10-20.
- Wang Y, Wang Z, Xu WY, et al. Preliminary study on the quality control method of polysaccharide in *Ganoderma lucidum*

- um extract [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2018, 38:1442-1447.
- Krishna KV, Karuppuraj V, Perumal K. Antioxidant activity and Folic acid content in indigenous isolates of *Ganoderma lucidum* [J]. *Asian J Pharm Anal*, 2016, 6:213-215.
- Ishimoto Y, Ishibashi KI, Yamanaka D, et al. Enhanced release of immunostimulating  $\beta$ -1,3-glucan by autodigestion of the lingzhi medicinal mushroom, *Ganoderma lingzhi* (Agaricomycetes) [J]. *Int J Med Mushrooms*, 2017, 19(1):1-16.
- Xiao C, Wu Q, Zhang J, et al. Antidiabetic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides  $\beta$ 1 down-regulated hepatic glucose regulatory enzymes in diabetic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 196:47-57.
- Zhou GL, Song YS, Xin YF, et al. Research progress on antioxidative and antitumor activities of *Ganoderma* polysaccharides [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2014, 32:1002-1005.
- Lin ZB. Modern research of *Ganoderma lucidum*: 4th Edition (灵芝的现代研究:第四版) [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2015:222-427.
- Chen Y, Hu JJ, Chen ZY, et al. Optimization of culture medium formulation of Hainan wild *Ganoderma lucidum* [J]. *J Qiongzhou Univ* (琼州学院学报), 2013, 20(2):32-35.
- Wen TC, Deng CY, Wu XL, et al. Morphological and molecular identification of seven wild *Ganoderma* species in Hainan Island [J]. *Guizhou Sci* (贵州科学), 2015, 33(6):1-8.
- Xiong C, Chen C, Huang WL, et al. Protective effect of water extract of white meat *Ganoderma lucidum* on apoptosis of PC<sub>12</sub> cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. *J Food Saf Qual* (食品安全质量检测学报), 2016, 7:662-668.
- Wang Y, Xian J, Xi X, et al. Multi-fingerprint and quality control analysis of tea polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92:583-590.
- Feng SZ, Lu YF, Liu NY, et al. Effect of monosaccharide composition on antioxidant activity of algal polysaccharides [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:116-121.
- Feng XZ, Wu SG, Kong J, et al. Optimization of phenolsulfuric acid determination conditions of polysaccharide in *Ulva lactuca* L. by orthogonal test [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2013, 25(12):94-96.
- Zhang JH, Yao Z, Sun Y, et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from *Morus alba* and evaluation of its beneficial life and antioxidant activity [J]. *Mod Food Sci Tech* (现代食品科技), 2018, 34:143-149.
- Ma J, Hou P, Chen Y, et al. Studies on the antioxidative activity and anti lipid peroxidation of several seaweed polysac-

- charides[J]. South China Fish Sci(南方水产科学), 2017, 13(6):97-104.
- 22 Hang SH, Zhu JB, Wang YY, et al. Study on the determination of antioxidant activity by pyrogallol autoxidation [J]. China Brewing(中国酿造), 2009, 6:155-157.
- 23 Wu XL, Dai YC, Li TH, et al. Chinese tropical fungi [M]. Beijing: Science Press, 2011; 1-548.
- 24 Wu XL, Mao YL, Tuliguer, et al. Chinese medicinal fungi [M]. Beijing: Science Press, 2013; 1-923.
- 25 Yang H, Dai J, Chen SW, et al. Isolation, purification, composition and immunoactivity of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* fruit body [J]. Food Mach(食品与机械), 2015, 31:132-136.
- 26 Zhang ZH, Yu L, Liu YF, et al. Comparison of polysaccharide components of different ganoderma spore powder products [J]. Acta Edulis Fungi(食用菌学报), 2017, 24(4):59-64.
- 27 Xu XF, Li GJ, Yan H, et al. Study on the separation, purification and in vitro antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide [J]. Food Mach(食品与机械), 2017, 33:144-148.
- 28 Yu HZ, Liu YF, Zhou S, et al. Comparison of the polysaccharides from fruiting bodies, mycelia and spore powder of *Ganoderma lingzhi* [J]. Mycosystema(菌物学报), 2016, 35(02):170-177.
- 29 Kao PF, Wang SH, Hung WT, 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]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012:673-764.
- 30 Li XL, Zhou AG, Li XM. Inhibition of *Lycium barbarum* polysaccharides and *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative injury induced by  $\gamma$ -irradiation in rat liver mitochondria [J]. Carbohydr Polym, 2007, 69:172-178.
- 31 Liu YJ, Shen J, Xia YM, et al. The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells [J]. Carbohydr Polym, 2012, 90:1210-1215.
- 32 Zhang J, Liu YJ, Park H S, et al. Antitumor activity of sulfated extracellular polysaccharides of *Ganoderma lucidum* from the submerged fermentation broth [J]. Carbohydr Polym, 2012, 87:1539-1544.
- 33 Liao SF, Liang CH, Ho MY, et al. Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series epitopes [J]. P Natl Acad Sci USA, 2013, 110:13809-13814.
- 34 Ni LJ, Wang YY, He WY, et al. Monosaccharide composition, activity and correlation analysis of eight polysaccharides [J]. J Tianjin Univ; Sci Technol(天津大学学报: 自然科学与工程技术版), 2014, 47:326-330.
- 35 Jin HY, Shi SS, Wang SC, et al. Purification and structural analysis of neutral polysaccharide cip-c from *Chrysanthemum indicum* [J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2012, 33:755-760.
- (上接第 189 页)
- 15 Rostami H, Gharibzadeh SMT. Microwave-assisted extraction of jujube polysaccharide: optimization, purification and functional characterization [J]. Carbohydr Polym, 2016, 143:100-107.
- 16 Azarnezhad A, Tabrizi M, Javan F, et al. Detection of CC-ND1, C-MYC and FGFR1 amplification using modified SYBR Green qPCR and FISH in breast cancer [J]. Turk J Med Sci, 2018, 48:759-767.
- 17 Zhai Da-cai, Fang Zhen, Wang Yong. Chemical constituents of the seed of *ormosia hosiei* and its antioxidant and antimicrobial activity [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:946-951.
- 18 Wu L, Wu W, Jing X, et al. Trisodium citrate-assisted biosynthesis of silver nanoflowers by *Canarium album* Foliar broths as a platform for SERS detection [J]. Ind Eng Chem Res, 2013, 52:5085-5094.
- 19 Wei SM, Tang ZS, Li HM, et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cornus officinalis* aqueous extract [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50:52-58.
- 20 Chen WY, Lan GY, Chang HT. Use of fluorescent DNA-templated gold/silver nanoclusters for the detection of sulfide ions [J]. Anal Chem, 2011, 83:9450-9455.
- 21 Eckhardt S, Brunetto PS, Gagnon J, et al. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine [J]. Chem Rev, 2013, 113:4708-4754.
- 22 Pugazhendhi S, Kirubha E, Palanisamy PK, et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Alpinia calcarata* by green approach and its applications in bactericidal and nonlinear optics [J]. Appl Surf Sci, 2015, 357:1801-1808.