

## 梯度乙醇沉淀工艺对灵芝多糖结构特征及生物活性的影响

陆建能<sup>1,2,3</sup>, 麦碧仪<sup>1,2\*</sup>, 刘义军<sup>1,2\*\*</sup>, 赵雨诗<sup>1,2</sup>, 陈云兰<sup>3\*\*</sup>, 林丽静<sup>1,2</sup>, 周大圣<sup>4</sup>,  
张明<sup>5</sup>

1. 中国热带农业科学院农产品加工研究所/海南省果蔬贮藏与加工重点实验室, 广东湛江 524001; 2. 农业农村部热带作物产品加工实验室, 广东湛江 524001; 3. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 650201; 4. 春秋扶正(广东)健康管理有限公司, 广东湛江 524033; 5. 广东省科学院微生物研究所, 广东广州 510030

**摘要:** 灵芝多糖是灵芝子实体主要的功效成分之一, 其在提高免疫力、抗肿瘤、护肝等方面具有显著疗效, 为了揭示梯度乙醇沉淀工艺对灵芝多糖结构特征及生物活性的影响, 本研究以赤灵芝为原料, 采用无水乙醇除杂, 热水浸提工艺提取灵芝多糖, 采用不同乙醇浓度(40%、50%、60%、70%、80%、90%, V/V)梯度沉淀灵芝多糖, 分别得到 GLP40、GLP50、GLP60、GLP70、GLP80、GLP90 等 6 个多糖组分, 并采用气相色谱-质谱仪、近红外光谱仪、凝胶色谱仪等现代仪器对灵芝多糖组成、官能团特征、分子量分布等结构特征, 以及体外抗氧化活性、鼠李糖乳杆菌 LGG 的生长效果等生物活性进行表征。研究结果表明: 6 个灵芝多糖组分由鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成, 且以葡萄糖、甘露糖和木糖为主, 其中 GLP40 主要由甘露糖和木糖组成, GLP50、GLP60、GLP70、GLP80 和 GLP90 主要由葡萄糖和甘露糖组成, 6 个多糖组分中 GLP80 和 GLP90 的葡萄糖占比最高。6 个灵芝多糖组分在 892.9、1048~1084  $\text{cm}^{-1}$  等处的典型官能团完整, 相互之间无明显差异, 皆为  $\beta$ -型葡聚糖构型。6 个灵芝多糖组分的分子量存在差异, 重均分子量、数均分子量与峰位分子量均呈正相关, GLP40、GLP50、GLP60、GLP70、GLP80、GLP90 的分子量范围分别为 97~14 925、99~49 410、98~32 030、3614~19 589、3614~10 795、4385~11 084  $\text{g/mol}$ , 低浓度乙醇下高分子量灵芝多糖优先沉淀。6 个多糖组分均具有较强的 DPPH 自由基清除能力、羟基自由基清除能力和总抗氧化能力, 其中 GLP90 比其他组分具有更强的抗氧化活性。6 个灵芝多糖组分均有助于促进鼠李糖乳杆菌 LGG 的生长。本研究结果为灵芝多糖提取工艺研究及产品开发提供了基础数据支撑。

**关键词:** 灵芝; 乙醇; 梯度沉淀; 多糖; 理化特性

中图分类号: S567.3.11 文献标识码: A

## Effect of Gradient Alcohol Precipitation Process on the Structural Characteristics and Biological Activity of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides

LU Jianneng<sup>1,2,3</sup>, MAI Biyi<sup>1,2\*</sup>, LIU Yijun<sup>1,2\*\*</sup>, ZHAO Yushi<sup>1,2</sup>, CHEN Yunlan<sup>3\*\*</sup>, LIN Lijing<sup>1,2</sup>,  
ZHOU Dasheng<sup>4</sup>, ZHANG Ming<sup>5</sup>

1. Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory of Storage & Processing of Fruits and Vegetables, Zhanjiang, Guangdong 524001, China; 2. Key Laboratory of Tropical Crop Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhanjiang, Guangdong 524001, China; 3. College of Tropical Crops Science, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 650201, China; 4. Chunqiu Fuzheng (Guangdong) Health Management Co., Ltd., Zhanjiang, Guangdong 524033, China; 5. Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510030, China

收稿日期 2022-04-24; 修回日期 2022-07-25

基金项目 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 320QN326); 广东省科技创新战略专项资金项目 (No. 2021A101, No. 2021A05217)。

作者简介 陆建能 (2001—), 男, 本科生, 研究方向: 药用真菌。\*同等贡献作者: 麦碧仪 (1999—), 女, 本科生, 研究方向: 药用真菌。\*\*通信作者 (Corresponding author): 刘义军 (LIU Yijun), E-mail: liuyijun-1@163.com; 陈云兰 (CHEN Yunlan), E-mail: 286089445@qq.com。

**Abstract:** *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLPs), the main efficacy components of *G. lucidum* body, have remarkable efficacy in improving immunity, anti-tumor and liver protection and so on. In order to reveal the effect of gradient ethanol precipitation process on the structural characteristics and biological activity of GLPs, the crude GLPs were extracted from *G. lucidum* body using anhydrous ethanol to removal impurities such as pigments and hot water extraction process. GLPs were classified by gradient ethanol (40%, 50%, 60%, 70%, 80% and 90%) precipitation, and 6 GLPs, including GLP40, GLP50, GLP60, GLP70, GLP80 and GLP90, were obtained. The structural features of GLPs such as composition, functional group characteristics, molecular weight distribution, and biological activities such as in vitro antioxidant activity and the growth effect of *Lactobacillus rhamnosus* LGG were characterized by GC-MS, near infrared GC-MS, NIR spectroscopy, gel chromatography and other modern instruments. The results showed that the 6 GLPs contained rhamnose, xylose, arabinose, mannose, glucose and galactose, with glucose, mannose and xylose predominating, GLP40 mainly consisted of mannose and xylose, GLP50, GLP60, GLP70, GLP80 and GLP90 mainly consisted of glucose and mannose, and the highest percentage of glucose was found in GLP80 and GLP90. The typical functional groups of the 6 GLPs fractions at 892.9  $\text{cm}^{-1}$ , 1048–1084  $\text{cm}^{-1}$ , etc. were intact and did not differ significantly from each other, and all of them were  $\beta$ -type glucan conformations. The molecular weight of the 6 GLPs was different, and the heavy average molecular weight, number average molecular weight and peak molecular weight showed positive correlations. 97–14 925, 99–49 410, 98–32 030, 3614–19 589, 3614–10 795, 4385–11 084 g/mol, with preferential precipitation of high molecular weight GLPs at low ethanol concentrations. 6 GLPs had stronger DPPH radical scavenging ability, hydroxyl radical scavenging ability, and total antioxidant capacity, and GLP90 had stronger antioxidant activity than the other fractions. The 6 GLPs helped to promote the growth of *L. rhamnosus* LGG. The above findings would provide data support for the study of GLPs extraction process and product development.

**Keywords:** *Ganoderma lucidum*; ethanol; gradient precipitation; polysaccharide; physical and chemical characteristics

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.04.019

灵芝是我国重要的药食两用真菌，具有扶正固本、滋补强壮、延年益寿等功效<sup>[1]</sup>。灵芝子实体中含有糖类、三萜类、甾醇类和氨基酸等成分，在免疫调节、降血脂和免疫性肝损伤等方面具有良好的临床疗效<sup>[2-3]</sup>，灵芝药效与灵芝多糖活性和含量密切相关，灵芝多糖成为衡量灵芝产品质量优劣的最重要指标之一<sup>[4]</sup>。

灵芝多糖 (GLPs) 的结构和分子量是影响其免疫调节、抗肿瘤和调血脂以及保护肝脏等生物活性的关键因素<sup>[5-7]</sup>。灵芝多糖的支链种类以及支链和主链间的比例会随提取方法的不同而有所变化<sup>[8]</sup>，灵芝多糖分子量也会随分离方法的不同而有所变化，从而影响灵芝多糖的生物活性<sup>[9]</sup>。醇法、膜法等分离技术是国内外实现不同分子链灵芝多糖的常见方法。CAI 等<sup>[10]</sup>利用级联膜技术从灵芝多糖分离出 322.0、18.8、6.4 kDa 3 种呈  $\beta$  构型的多糖，所有分级的 GLPs 均可以延长老鼠的游泳时间，提高耐力和促进疲劳恢复，推断分子量在 10 kDa 以上的 GLPs 可能是潜在的抗疲劳药物。MA 等<sup>[11]</sup>采用超滤膜法从灵芝多糖中分离出 GLP1 (>10 kDa)、GLP2 (8~10 kDa)、GLP3 (2.5~8 kDa) 和 GLP4 (<2.5 kDa) 4 个灵芝多糖，GLP1 和 GLP2 具有更强的抗氧化和抗增殖活性，高分子量灵芝多糖成分具有更强的生物活性。KAN 等<sup>[12]</sup>

从超微灵芝子实体粉中提取多糖，采用无水乙醇分级沉淀得到 4 种不同乙醇浓度下的灵芝多糖，GLP80 的抗氧化活性最好，由于该方法获得的 80% 浓度下醇沉的灵芝多糖含有 GLP40 和 GLP60 成分，并不能准确地表达乙醇浓度对灵芝多糖的分离效果，而关于乙醇逐级分离沉淀灵芝多糖的相关报道较少。为了揭示灵芝多糖在不同浓度乙醇中的分布规律，以及各浓度下分离的灵芝多糖理化特性等相关性质的差异，本研究采用乙醇逐级分离沉淀得到不同灵芝多糖组分，对其单糖组成、分子量分布等结构特征进行表征，并研究不同组分的体外抗氧化活性及对鼠李糖乳杆菌生长的影响，为灵芝多糖多样化产品的开发提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

灵芝由本实验室栽培，栽培方法参考 LIU 等<sup>[13]</sup>的方法。D-甘露糖 (D-Man)、L-鼠李糖 (L-Rha)、D-葡萄糖 (D-Glc)、D-半乳糖 (D-Gal)、L-阿拉伯糖 (L-Ara)、D-岩藻糖 (D-Fuc)、D-木糖 (D-Xyl)、D-果糖 (D-Fru) 标准品购自上海源叶生物科技有限公司。DPPH 自由基清除能力试剂盒 (分光法)、总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒 (分

光法)、羟自由基清除能力试剂盒(分光法)购自北京艾普希隆生物科技有限公司。鼠李糖乳杆菌 LGG 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。

## 1.2 方法

**1.2.1 灵芝多糖的提取** 将灵芝切片粉碎,用灵芝粉末和无水乙醇以 1:15 (m/V) 的比例,加入圆底蒸馏瓶,在真空提取系统中 50 °C 回流提取 3 h,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),50 °C 烘干。取灵芝粉末 1000 g,按料水比 1:15 (m/V) 加入蒸馏水,在 90 °C 水浴锅中提取 2 h,过滤,上清液浓缩至原液的 1/3,5000 r/min 离心 10 min 进一步除杂,得到灵芝多糖溶液。在灵芝多糖溶液中加入适量无水乙醇,调节溶液乙醇浓度为 40% (V/V) 时得到絮状沉淀,5000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,命名为 GLP40;所得上清液继续加入适量无水乙醇,调节溶液乙醇浓度为 50% (V/V) 时得到絮状沉淀,5000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,命名为 GLP50;按照上述方法,分别沉淀得到 GLP60、GLP70、GLP80、GLP90;所得沉淀置于-40 °C 冷冻干燥机冻干 48 h,然后置于 4 °C 冰箱中保存备用。

**1.2.2 多糖含量测定** 采用苯酚-硫酸法测定灵芝子实体中的多糖含量。以葡萄糖为标准品,配制 0.1 mg/mL 的葡萄糖溶液。分别吸取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 葡萄糖溶液于 15 mL 具塞玻璃试管中,加蒸馏水补至 1 mL 配成不同浓度的标准葡萄糖溶液,然后分别加入 1.0 mL 6% 苯酚溶液,快速加入 5.0 mL 硫酸,振荡 20 s 混匀,100 °C 水浴 15 min,快速冷却至室温,在 490 nm 处测定其吸光值(A)。根据不同浓度葡萄糖溶液(C)的吸光值建立标准曲线  $A=0.01 \times C+0.0017$  ( $R^2=0.9994$ )。

多糖含量的测定:称取 10 mg 各样品于 10 mL 离心管中,加 3 mL 水溶解,振荡 20 s 混匀,沸水浴 2 h,冷却至室温,过 0.45 μm 有机微孔滤膜至 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,即为测试液。按照上述步骤处理,在 490 nm 处测定其吸光值,根据曲线计算多糖含量。

**1.2.3 单糖组成分析** 根据邓永智等<sup>[14-15]</sup>的方法分析灵芝多糖单糖组成,稍加改进。准确称取 10 mg 多糖样品与 2 mL 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)

在 110 °C 烘箱中水解 6 h,氮气吹干,加入同体积甲醇沸水浴蒸干,重复 3 次。加入 10 mg 盐酸羟胺和 1 mL 吡啶,轻轻摇晃使其充分溶解,于 90 °C 水浴锅中反应 30 min,冷却至室温,加入 1 mL 乙酸酐,90 °C 水浴 30 min,氮气吹干,加入 1 mL 氯仿溶解,过 0.45 μm 微孔滤膜,进行 GC-MS 分析。另外以 D-甘露糖、L-鼠李糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖、D-岩藻糖、D-木糖、D-果糖等标准品经相同条件处理,进样。

气相色谱-质谱(GC-MS)分析条件。色谱柱:HP-5ms (30 mm×0.25 mm×0.25 μm) 毛细管柱;升温程序:初始柱温 130 °C,保持 5 min 后,以 2.5 °C/min 的升温速度升温至 220 °C,再以 10.0 °C/min 升温至 260 °C,进样温度 280 °C;载气为 99.99% 高纯度氮气,柱流量为 1.0 mL/min,分流比 1:50;进样量为 1.0 μL。质谱(MS)条件:离子源温度 230 °C,接口温度 260 °C,扫描质量范围为 30~450 m/z,溶剂延迟时间 5.0 min。

**1.2.4 近红外光谱测定** 将 1 mg/mL 多糖水溶液置于金镜表面上,滴入一滴样品溶液,置于 Thermo Nicolet iN10 近红外分析仪(美国赛默飞)测量,整个测量过程采用液氮和氮气保护,每次样品测量之前使用相同参数采集清洁金镜表面的背景光谱(采集背景),扫描范围为 4000~400 cm<sup>-1</sup>,分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>。

**1.2.5 分子量分布测定** 采用高效液相凝胶色谱仪(HPGPC)测定灵芝多糖分子量和纯度。将多糖样品以及 5000、11 600、23 800、48 600、80 900、148 000、273 000、409 800、667 800 Da 多糖标准品配制成 5 mg/mL 标准品溶液,12 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,移入 1.8 mL 进样瓶中。溶液注入高效液相色谱仪(LC-10A, Shimadzu)串联凝胶柱中(BRT105-104-102, 8 mm×300 mm)建立保留时间(RT, min)与峰位分子量(Mp)、重均分子量(Mw)、数均分子量(Mn)的线性回归方程,其中检测器为示差检测器(RI-10A, Shimadzu),流动相为 0.05 mol/L NaCl 溶液,柱温 40 °C,流速 0.6 mL/min,进样量 20 μL。分子量与保留时间的校正曲线为  $\lg Mp = -0.1799RT+11.556$ ,  $R^2=0.995$ ;  $\lg Mw = -0.1917RT+12.108$ ,  $R^2=0.9934$ ;  $\lg Mn = -0.1776X+11.392$ ,  $R^2=0.9905$ 。

**1.2.6 体外抗氧化活性测定** 总抗氧化能力(T-AOC)的测定。采用 FRAP 法测定,吸取 75 μL

125  $\mu\text{g/mL}$  灵芝多糖水溶液于 1.5 mL 测定管中, 依次加入 75  $\mu\text{L}$  蒸馏水和 850  $\mu\text{L}$  显色液(苏州格锐思生物科技有限公司 FRAP 试剂盒试剂), 振动混匀, 置于室温反应 10 min, 在 590 nm 处测其吸光值 ( $A_1$ ), 若吸光值  $>1.8$ , 则采用蒸馏水稀释至一定的倍数 ( $D$ )。蒸馏水作空白对照, 按照上述步骤, 在 590 nm 处测其吸光值 ( $A_0$ )。多糖的总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol/mL}$ )  $=0.36 \times [(A_1 - A_0) + 0.0262] \times D$ 。采用蒸馏水调零, 重复 3 次。

**1.2.7 DPPH 自由基清除能力的测定** 吸取 400  $\mu\text{L}$  500  $\mu\text{g/mL}$  多糖溶液于 1.5 mL 测定管中, 然后加入 600  $\mu\text{L}$  工作液(苏州格锐思生物科技有限公司 FRAP 试剂盒试剂), 振动混匀, 置于室温避光反应 30 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 在 517 nm 处测其吸光值 ( $A_2$ ), 作为测定组。吸取 400  $\mu\text{L}$  500  $\mu\text{g/mL}$  多糖溶液于 1.5 mL 测定管中, 加入 600  $\mu\text{L}$  80% 甲醇, 振动混匀, 按照上述步骤, 在 517 nm 处测其吸光值 ( $A_1$ ), 作为对照组。吸取 400  $\mu\text{L}$  80% 甲醇以及 600  $\mu\text{L}$  工作液于测定管中, 振动混匀, 按照上述反应步骤, 在 517 nm 处测其吸光值 ( $A_0$ ), 作为空白组。多糖的 DPPH 自由基清除率  $= [1 - (A_2 - A_1) / A_0] \times 100\%$ 。采用无水乙醇调零, 重复 3 次。

**1.2.8 羟自由基清除能力的测定** 吸取 125  $\mu\text{L}$  试剂盒中的试剂 1 于 1.5 mL 测定管中, 依次加入 125  $\mu\text{L}$  试剂盒中的试剂 2, 625  $\mu\text{L}$  1000  $\mu\text{g/mL}$  灵芝多糖溶液, 125  $\mu\text{L}$  试剂盒中的试剂 3, 振动混匀, 置于 37  $^\circ\text{C}$  反应 20 min, 在 517 nm 处测其吸光值 ( $A_2$ ), 作为测定组。吸取 125  $\mu\text{L}$  试剂 1 于 1.5 mL 测定管中, 依次加入 125  $\mu\text{L}$  试剂 2, 625  $\mu\text{L}$  1000  $\mu\text{g/mL}$  灵芝多糖溶液, 125  $\mu\text{L}$  蒸馏水, 振动混匀, 置于 37  $^\circ\text{C}$  反应 20 min, 在 510 nm 处测其吸光值 ( $A_1$ ), 作为对照组。吸取 125  $\mu\text{L}$  试剂 1 于 1.5 mL 测定管中, 依次加入 125  $\mu\text{L}$  试剂 2, 625  $\mu\text{L}$  蒸馏水, 125  $\mu\text{L}$  试剂 3, 振动混匀, 置于 37  $^\circ\text{C}$  反应 20 min, 在 510 nm 处测其吸光值 ( $A_0$ ), 作为空白组。多糖的羟自由基清除率  $= [A_0 - (A_2 - A_1)] / A_0 \times 100\%$ 。上述测试采用蒸馏水调零, 所有测试重复 3 次。

**1.2.9 多糖对鼠李糖乳杆菌生长的影响** 在无菌条件下, 取鼠李糖乳杆菌 LGG 200  $\mu\text{L}$  接种于 MRS 肉汤培养基上, (37 $\pm$ 1) $^\circ\text{C}$  厌氧培养 12 h, 进行菌种活化。在接种 2% (体积分数) 鼠李糖杆菌 LGG 的 MRS 液体培养基中添加灭菌 1% 多糖溶

液, 以添加去离子水为空白对照, 在 (37 $\pm$ 1) $^\circ\text{C}$  培养 20 h, 从 0 h 开始, 每隔 2 h 测定菌液  $OD_{600}$  值, 绘制鼠李糖乳杆菌的生长曲线。

### 1.3 数据处理

采用 Excel 2013 软件对试验数据进行整理, 利用 Origin 8.0 软件作图, 采用 SPSS 22.0 软件进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 灵芝多糖中总糖和单糖含量分析

由图 1 可知, 不同浓度醇沉所得灵芝多糖颜色和外观形貌存在较大差异。由表 1 可知, GLP70 的总糖含量最高, GLP90 的总糖含量最低, 说明 70% 乙醇浓度能将提取液中的大部分灵芝多糖沉淀下来, 同时 90% 乙醇浓度有助于将灵芝提取液中的大部分杂质沉淀下来。不同浓度所得粗多糖中均含有 6 种单糖, 包括鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖。根据这 6 种单糖的摩尔比可知, 不同多糖样本中的单糖占比存在较大差异, GLP40 主要由甘露糖和木糖组成, GLP50、GLP60、GLP70、GLP80 和 GLP90 主要由葡萄糖和甘露糖组成, GLP80 和 GLP90 的葡萄糖占比比较高。

### 2.2 灵芝多糖近红外光谱分析

为了进一步确定不同浓度醇沉所得灵芝多糖的结构差异, 分别对 6 种多糖进行红外光谱分析(图 2)。6 种多糖均在 3311~3376  $\text{cm}^{-1}$  之间具有较宽的吸收峰, 为 O-H 的伸缩振动, 在 2935  $\text{cm}^{-1}$  附近具有弱吸收峰, 为烷基的 C-H 伸缩振动, 在 1618~1630  $\text{cm}^{-1}$  处出现的较强的峰是 C=O 伸缩振动, 在 1404~1411  $\text{cm}^{-1}$  处出现的峰是 -CH 的变角

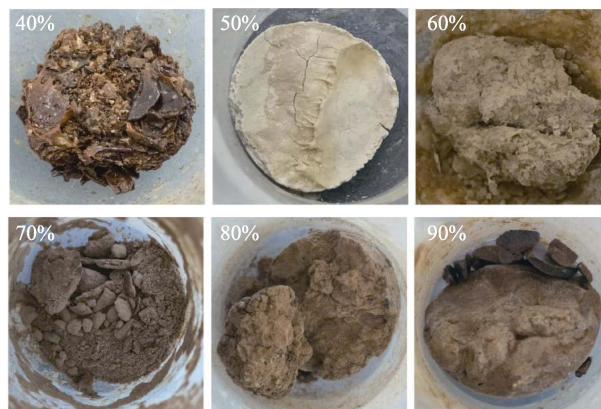


图 1 不同乙醇浓度所得灵芝多糖

Fig. 1 Physical map of GLPs with different ethanol concentrations

表 1 不同乙醇浓度所得灵芝多糖中糖含量及单糖组成

Tab. 1 Total sugar content and monosaccharide composition of GLPs with different ethanol concentrations %

指标 Index	GLP40	GLP50	GLP60	GLP70	GLP80	GLP90
总糖	25.73±0.14	32.36±0.35	35.52±0.07	36.23±0.42	23.45±0.07	17.14±0.35
L-鼠李糖	6.12	2.41	2.76	0.27	0.34	1.09
D-木糖	30.32	10.92	7.50	3.31	4.50	12.45
L-阿拉伯糖	2.23	2.14	2.72	1.16	0.31	0.31
D-甘露糖	52.05	26.10	27.07	34.65	13.29	11.58
D-葡萄糖	8.68	48.20	48.43	52.47	71.15	74.32
D-半乳糖	0.61	10.23	11.52	8.14	10.41	0.25

注：单糖组成为摩尔百分比。

Note: Monosaccharide composition is molar percentage.

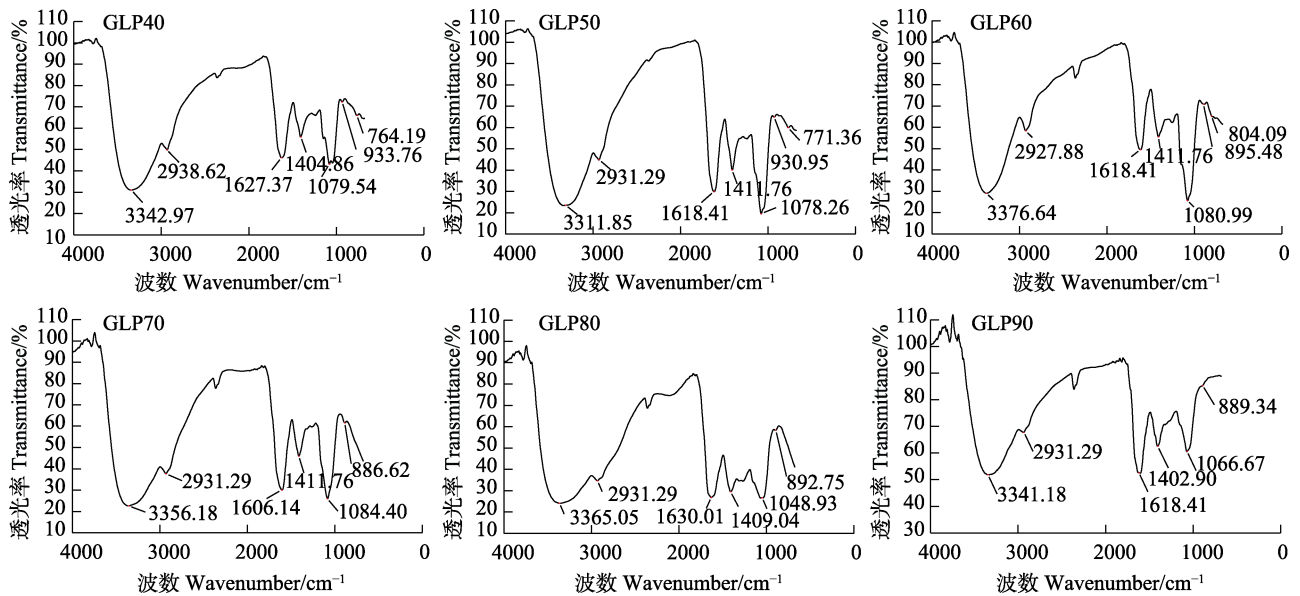


图 2 不同乙醇浓度所得灵芝多糖的红外光谱图

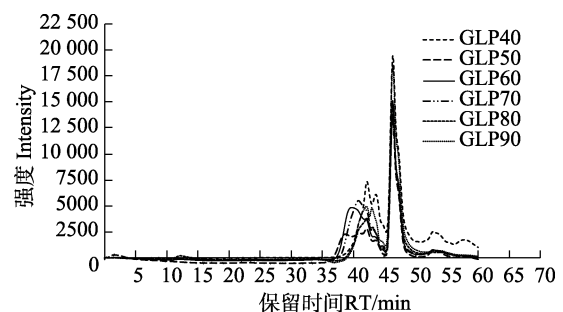
Fig. 2 NIR spectra of GLPs with different ethanol concentrations

振动引起的，在 1048~1084  $\text{cm}^{-1}$  附近出现的峰是常见的吡喃糖环内酯和羟基的吸收峰共振吸收峰，是由于糖环上 C-O-C 醚键的不对称伸缩振动构成了糖类的特征吸收峰，也是葡聚糖典型的红外光谱信号<sup>[16]</sup>。此外 892.9  $\text{cm}^{-1}$  处是典型的吡喃葡聚糖和  $\beta$ -型糖苷键链接特征吸收峰<sup>[17]</sup>，说明 6 种灵芝多糖均为  $\beta$ -型葡聚糖构型。同时 930  $\text{cm}^{-1}$  处的弱峰为端基碳 C-H 弯曲振动峰<sup>[18]</sup>，GLP40 和 GLP50 在 930  $\text{cm}^{-1}$  附近有特征吸收峰，而在 890  $\text{cm}^{-1}$  处较弱，说明 60%及以上浓度醇沉所得的灵芝多糖主要为  $\beta$ -型葡聚糖构型，且官能团无明显差异。

### 2.3 灵芝多糖分子量分布规律分析

采用 HPGPC 对不同乙醇浓度所得灵芝多糖的分子量和纯度进行测定。由图 3 可知，不同乙醇浓度所得灵芝多糖的高效凝胶渗透色谱图有明显差

异。利用峰位分子量 (Mp)、峰重均分子量 (Mw)、数均分子量 (Mn) 对不同乙醇浓度所得灵芝多糖的分子量等参数进行计算 (表 2)。由表 2 可知，



46.3 min 为流动相的峰。

46.3 min is the peak of mobile phase.

图 3 不同乙醇浓度所得粗多糖的高效凝胶渗透色谱图

Fig. 3 HPLC gel permeation chromatogram of GLPs with different ethanol concentrations

表2 不同乙醇浓度所得灵芝多糖中分子量参数  
Tab. 2 Molecular weight parameters of GLPs with different ethanol concentrations

样本 Sample	保留时间 RT/min	lgMp	lgMw	lgMn	峰位分子量 Mp/(g·mol <sup>-1</sup> )	重均分子量 Mw/(g·mol <sup>-1</sup> )	数均分子量 Mn/(g·mol <sup>-1</sup> )	峰面积比 Peak area ratio/%
GLP40	41.388	4.1	4.2	4.0	12 891	14 925	11 002	18.196
	42.159	4.0	4.0	3.9	9367	10 620	8027	36.842
	43.584	3.7	3.8	3.7	5191	5662	4482	25.838
	44.304	3.6	3.6	3.5	3852	4120	3339	8.638
	52.792	2.1	2.0	2.0	114	97	104	10.487
GLP50	38.676	4.6	4.7	4.5	39 645	49 410	33 354	34.695
	40.943	4.2	4.3	4.1	15 501	18 165	13 198	22.379
	42.069	4.0	4.0	3.9	9723	11 050	8328	22.763
	43.469	3.7	3.8	3.7	5444	5957	4698	10.633
	52.752	2.1	2.0	2.0	116	99	105	9.531
GLP60	39.658	4.4	4.5	4.3	26 395	32 030	22 322	69.873
	41.953	4.0	4.1	3.9	10 201	11631	8733	16.482
	43.270	3.8	3.8	3.7	5912	6503	5096	7.169
	44.640	3.5	3.6	3.5	3352	3552	2910	0.563
	52.774	2.1	2.0	2.0	115	98	105	5.914
GLP70	40.772	4.2	4.3	4.2	16 639	19 589	14 154	62.647
	41.721	4.1	4.1	4.0	11 230	12 885	9602	21.702
	43.076	3.8	3.9	3.7	6407	7085	5517	12.428
	44.601	3.5	3.6	3.5	3406	3614	2957	3.223
GLP80	42.122	4.0	4.0	3.9	9512	10 795	8150	70.818
	43.074	3.8	3.9	3.7	6412	7091	5522	24.423
	44.601	3.5	3.6	3.5	3406	3614	2957	4.759
GLP90	42.062	4.0	4.0	3.9	9751	11 084	8352	61.059
	42.941	3.8	3.9	3.8	6775	7520	5830	31.555
	44.163	3.6	3.6	3.5	4084	4385	3537	7.386

不同乙醇浓度所得粗多糖的分子量分布存在较大差异,重均分子量越大,其数均分子量与峰均分子量也越大。以重均分子量为例, GLP40 分子量分布在 97~14 925 g/mol 之间, GLP50 分子量为 99~49 410 g/mol, GLP60 分子量为 98~32 030 g/mol, GLP70 分子量分布在 3614~19 589 g/mol 之间, GLP80 分子量分布在 3614~10 795 g/mol 之间, GLP90 分子量分布在 4385~11 084 g/mol 之间。不同灵芝多糖组分中分子量占比也有差异, Mw>10 000 g/mol 中, GLP40、GLP50、GLP60、GLP70、GLP80、GLP90 分别占比 55.038%、79.837%、86.355%、84.349%、70.818%和 61.059%, 且呈先增后降的趋势。

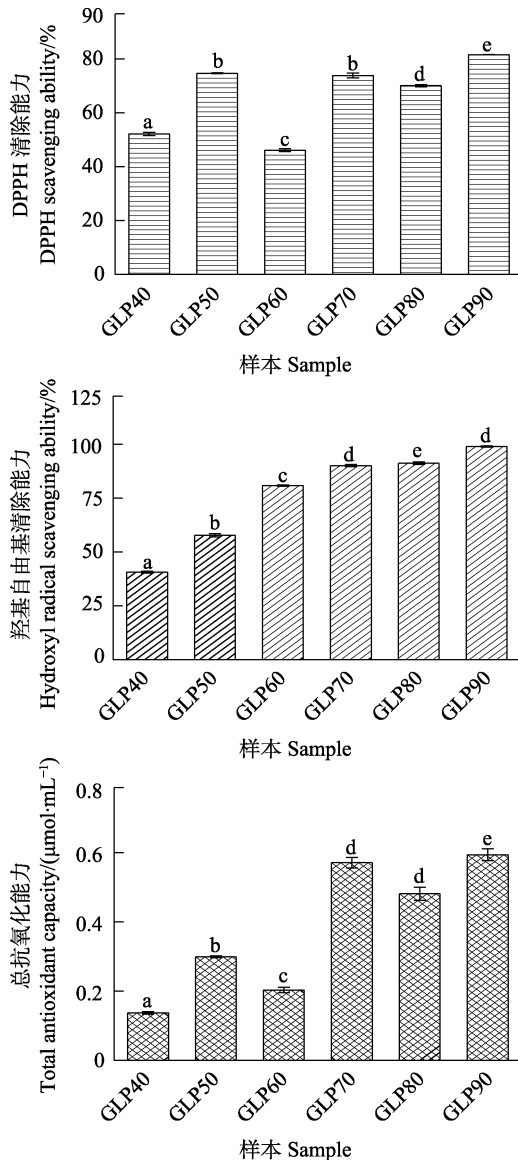
#### 2.4 灵芝多糖体外抗氧化活性分析

不同乙醇浓度所得灵芝多糖体外抗氧化活性如图 4 所示, 不同浓度醇沉所得灵芝多糖均具有一定的 DPPH 清除能力、羟基自由基清除能力及总抗氧化能力, 且呈显著差异。显著性分析结果

表明: GLP40、GLP50、GLP60、GLP80、GLP90 两两间的 DPPH 清除能力存在显著性差异, GLP70 与 GLP50 的 DPPH 清除能力差异不显著, 与其他差异显著。GLP40、GLP50、GLP60、GLP80、GLP90 两两间的羟基自由基清除能力存在显著性差异, GLP70 与 GLP90 的羟基自由基清除能力差异不显著, 与其他差异显著。GLP40、GLP50、GLP60、GLP70、GLP90 两两间的总抗氧化能力存在显著性差异, GLP70 与 GLP80 的总抗氧化能力差异不显著, 与其他差异显著。其中, 羟基自由基清除能力随着乙醇浓度的增加而增强, 而 DPPH 清除能力和总抗氧化能力无明显变化规律, GLP90 的 DPPH 清除能力、羟基自由基清除能力、总抗氧化能力均最大。

#### 2.5 灵芝多糖对鼠李糖乳杆菌 LGG 生长的影响

不同乙醇浓度所得灵芝多糖对鼠李糖乳杆菌 LGG 的生长曲线如图 5 所示。由图 5 可知, 与对照相比, 灵芝多糖能促进鼠李糖乳杆菌 LGG 的生



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 4 不同乙醇浓度所得灵芝多糖抗氧化活性

Fig. 4 Antioxidant activity *in vivo* of GLPs with different ethanol concentrations

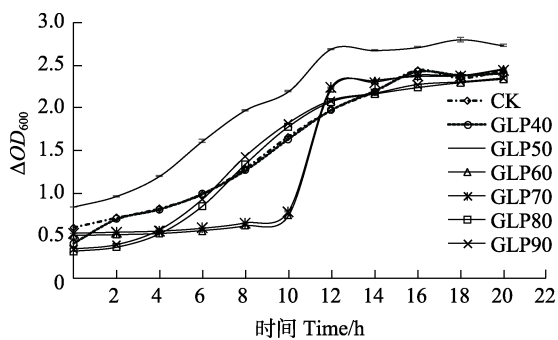


图 5 不同乙醇浓度所得灵芝多糖对鼠李糖乳杆菌 LGG 生长的影响

Fig. 5 Effect of GLPs from different ethanol concentrations on the growth of *L. rhamnosus* LGG

长,且不同乙醇浓度沉淀所得多糖的促进作用有差异。GLP40 处理的初始刺激效果最强,4 h 以后快速进入对数生长期;而其他多糖处理在 4 h 之前比对照生长慢,但是 4 h 之后快速超过对照,进入对数生长期,同时对数期比对照延迟 2 h 以上。经过培养 20 h, GLP40、GLP50、GLP60、GLP70、GLP80、GLP90 处理的生长曲线有多次重复交叉,可能源于不同灵芝多糖样品中含有刺激鼠李糖乳杆菌 LGG 不同生长阶段的成分,但是还需进一步研究。

### 3 讨论

多糖是灵芝子实体中重要的功能性成分之一,多糖中单糖种类、分子量、官能团等影响着多糖的结构特征。灵芝子实体中多糖种类丰富,含岩藻糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖、葡萄糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸等单糖中的一种或几种,且以  $\alpha$ -或  $\beta$ -糖苷键相连<sup>[19]</sup>,其中  $\beta$  型多糖起主要的生物活性作用<sup>[20-21]</sup>。同一品种不同状态(发酵液、菌丝体和子实体)灵芝多糖的组成存在差异<sup>[22]</sup>,且不同提取方法的灵芝多糖结构和生物活性也存在差异,由于不同浓度乙醇对不同分子量的灵芝多糖具有不同的沉淀效果<sup>[23]</sup>,导致本研究中 6 种多糖样本的单糖占比存在较大差异。KAN 等<sup>[12]</sup>研究表明,分级沉淀中各组分存在浓度的交叉性,比如 GLP60 组分含有 40%、50%、60% 3 种浓度下沉淀的多糖成分,GLP60 中葡萄糖含量最高,由于沉淀方法的差异导致二者结果也有差异。官能团组成是灵芝多糖结构的另一个重要特征,本研究所得 6 种灵芝多糖组分官能团组成无较大差异,与刘钧发等<sup>[24-25]</sup>的研究结果一致。由此可见,栽培方式、提取方法等因素对灵芝多糖结构官能团的影响较小。

灵芝多糖的体外抗氧化活性及其生物活性与多糖构型、分子量等结构特征紧密相关<sup>[26-27]</sup>。ZHEN 等<sup>[28]</sup>从树舌中分离纯化出灵芝均质多糖,其中分子量为  $6.82 \times 10^5$  Da 的多糖组分能显著抑制 MCF-7 细胞的增殖。KAN 等<sup>[12]</sup>采用分级沉淀得到 GLP40、GLP60 和 GLP80 三种多糖组分,GLP80 的 DPPH 清除能力、羟基自由基清除能力及总抗氧化能力最强,其次是 GLP60 和 GLP40,高浓度乙醇沉淀物的体外抗氧化活性较强,与本研究结果一致。可能由于 DPPH 清除能力、羟基自由基清除能力及总抗氧化能力 3 种检测方法的

作用机理不同, 且与 KAN 等<sup>[12]</sup>的提取方法不同, 从而导致本研究中 6 种多糖组分的 3 种体外抗氧化活性的变化规律不一致。CAI 等<sup>[10]</sup>采用级联膜技术分离得到 3 种多糖组分, 进行小鼠实验发现分子量在 10 kDa 以上的多糖能延长游泳时间, 提高耐力和促进疲劳恢复。本研究中乙醇浓度大于 70%所得分子量在 10 kDa 以上的多糖组分呈下降趋势, 由此可以推断 70%乙醇能将大部分灵芝功效成分分离出来。吴林秀<sup>[29]</sup>的研究结果表明, 茶树菇多糖可以有效防止鼠李糖杆菌 LGG 被活性氧抑制, 并且提供碳源能促进鼠李糖杆菌生长, 同时作为益生元能促进益生菌的增殖, 从而更好地调节胃肠道功能。本研究结果表明, 6 种灵芝多糖组分均有助于促进鼠李糖乳杆菌 LGG 的生长, 为灵芝多糖的产品开发提供基础数据支撑, 但其作用效果存在一定差异, 今后需进一步研究灵芝多糖刺激鼠李糖杆菌生长的作用机理。

本文研究了梯度乙醇沉淀工艺对灵芝多糖结构特征及生物活性的影响, 结果表明: 灵芝多糖主要由鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成, 梯度乙醇沉淀工艺未改变 6 个多糖组分中单糖种类组成和官能团组成, 但影响了 6 个多糖组分的各单糖含量、分子量分布、体外抗氧化活性等, 灵芝多糖能促进鼠李糖乳杆菌 LGG 的生长。本研究为灵芝多糖提取工艺研究及产品开发提供了基础数据支撑。

## 参考文献

- [1] 陈文华, 程显好, 谭会颖, 苏阳, 郭宁, 孙晓蕾, 郑晓文, 刘政, 邴帅, 徐凌川. 灵芝多糖的药理作用及其机制研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(24): 3446-3450.  
CHEN W H, CHENG X H, TAN H Y, SU Y, GUO N, SUN X L, ZHEN X W, LIU Z, BING S, XU L C. Research progress on pharmacological action and mechanism of *Ganoderma lucidum* polysaccharide[J]. China Pharmacy, 2018, 29(24): 3446-3450. (in Chinese)
- [2] CHEN S D, GUAN X Y, YONG T Q, GAO X, XIAO C, XIE Y Z, CHEN D L, HU H P, WU Q P. Structural characterization and hepatoprotective activity of an acidic polysaccharide from *Ganoderma lucidum*[J]. Food Chemistry: X, 2022, 13: 100204.
- [3] 林志彬. 灵芝的现代研究(第二版)[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2001.  
LIN Z B. Modern research of *Ganoderma lucidum* (Second edition)[M]. Beijing: Beijing Medical University Press, 2001. (in Chinese)
- [4] 张劲松, 贾薇, 邢增涛, 唐庆九, 刘艳芳, 杨焱, 周昌艳, 刘方. 灵芝子实体和菌丝体的提取物及其各纯化组份生物活性的比较[J]. 菌物学报, 2004(1): 85-92.  
ZHANG J S, JIA W, XING Z T, TANG Q J, LIU Y F, YANG Y, ZHOU C Y, LIU F. Comparison of bioactivity of fruiting body and mycelia of *Ganoderma lucidum* and their purified fractions[J]. Mycosystema, 2004(1): 85-92. (in Chinese)
- [5] 才晓玲, 何伟, 杨国琴. 灵芝多糖生物活性研究进展[J]. 食用菌, 2018, 40(3): 1-4.  
CAI X L, HE W, YANG G Q. Research progress on biological activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide[J]. Edible Fungi, 2018, 40(3): 1-4. (in Chinese)
- [6] 宋立立, 张兆英. 食用菌多糖的生物活性研究现状[J]. 中国食用菌, 2019, 38(2): 14-16.  
SONG L L, ZHANG Z Y. The status of biological activity of mushroom polysaccharides[J]. Edible Fungi of China, 2019, 38(2): 14-16. (in Chinese)
- [7] FARUQUE A, ALI A F, IDREESH K M, ABDULRAHMAN A, SHADMA W, INTAKHAB A M, FAIYAZ A, IDREESH K M. *Ganoderma lucidum*: a potential source to surmount viral infections through  $\beta$ -glucans immunomodulatory and triterpenoids antiviral properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 187: 769-779.
- [8] 王颖, 魏佳韵, 吴思佳, 章春豪, 王兴亚. 灵芝多糖结构特征及药理作用的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(3): 627-635.  
WANG Y, WEI J Y, WU S J, ZHANG C H, WANG X Y. Research progress on structural characteristics and pharmacological effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(3): 627-635. (in Chinese)
- [9] LI J, GU F, CAI C, HU M H, FAN L D, HAO J J, YU G L. Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of the polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 806-813.
- [10] CAI M, XING H, TIAN B, XU J, LI Z H, ZHU H, YANG K, SUN P L. Characteristics and antifatigue activity of graded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* separated by cascade membrane technology[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 269: 118329.
- [11] MA C W, FENG M, ZHAI X, HU M, YOU L, LUO W, ZHAO M. Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2013, 44(6): 886-894.
- [12] KAN Y, CHEN T, WU Y, WU J G, WU J Z. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology[J]. International

- Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 151-157.
- [13] LIU Y J, QIAN Y Y, SHU B, LIU Y Y, TU X H, OUYANG H J, LI Y H, TAN G, YU Z W, CHEN F, LIN L J. Effects of four drying methods on *Ganoderma lucidum* volatile organic compounds analyzed via headspace solid-phase microextraction and comprehensive two-dimensional chromatography-time-of-flight mass spectrometry[J]. Microchemical Journal, 2021, 166: 106258.
- [14] 邓永智, 李文权, 袁东星. 海水小球藻中多糖的提取及其单糖组成的气相色谱-质谱分析[J]. 分析化学, 2006(12): 1697-1701.
- DENG Y Z, LI W Q, YUAN D X. Microwave-assisted extraction and ultrasonic hydrolyzation of polysaccharides from the marine chlorella and gas chromatography-mass spectrometric analysis of monosaccharide compositions[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006(12): 1697-1701. (in Chinese)
- [15] 江和栋, 牛仙, 万仁口, 邓泽元, 李红艳. 灵芝孢子多糖的提取工艺优化及单糖组成、抗氧化活性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 159-167.
- JIANG H D, NIU X, WAN R K, DENG Z Y, LI H Y. Optimization of extraction and analysis of monosaccharide composition and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* spore polysaccharide[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 159-167. (in Chinese)
- [16] 何晋浙, 邵平, 孟祥河, 孙培龙. 灵芝多糖的结构特征分析[J]. 分析化学, 2010, 38(3): 372-376.
- HE J Z, SHAO P, MENG X H, SUN P L. Analysis of structural characteristics of polysaccharide from *Ganoderma lucidum*[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(3): 372-376. (in Chinese)
- [17] VIRKKI L, JOHANSSON L, YLINEN M, MAUNU S, EKHOLM P. Structural characterization of water-insoluble nonstarchy polysaccharides of oats and barley[J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 59(3): 357-366.
- [18] 夏朝红, 戴奇, 房韦, 陈和生. 几种多糖的红外光谱研究[J]. 武汉理工大学学报, 2007(1): 45-47.
- XIA C H, DAI Q, FANG W, CHEN H S. Research on the IR spectroscopy of kinds of polysaccharide[J]. Journal of Wuhan University of Technology, 2007(1): 45-47. (in Chinese)
- [19] 叶立斌. 灵芝子实体多糖(缀合物)的纯化、结构鉴定、分子改性和生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- YE L B. Study on purification, structure identification, molecular modification and biological activity of *Ganoderma lucidum* fruiting body polysaccharide (conjugate)[D]. Nanjing: Agricultural University of Nanjing, 2008. (in Chinese)
- [20] LU J H, HE R J, SUN P L, ZHANG F M, LINHARDT R J, ZHANG A. Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150(C): 765-774.
- [21] NIE S, ZHANG H, LI W, XIE M Y. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: isolation, structure and bioactivities[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 1(1): 10-20.
- [22] LI K K, YU M, HU Y, REN G, ZANG T, XU X H, QU J. Three kinds of *Ganoderma lucidum* polysaccharides attenuate DDC-induced chronic pancreatitis in mice[J]. Chemico-Biological Interactions, 2016, 247: 30-38.
- [23] 刘艳芳. 赤芝多糖结构和构象表征及其免疫调节构效关系研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- LIU Y F. Study on structure and conformation characterization of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and structure-activity relationship of immunoregulation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018. (in Chinese)
- [24] 刘钧发, 冯梦莹, 游丽君, 罗维, 赵强忠, 赵谋明. 超声和水提法提取灵芝多糖的结构和抗氧化性的比较研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 88-92.
- LIU J F, FENG M Y, YOU L J, LUO W, ZHAO Q Z, ZHAO M M. Comparative study on structure and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide extracted by ultrasonic extraction and water extraction[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(24): 88-92. (in Chinese)
- [25] 张倩倩, 黄青. 近红外光谱测定灵芝子实体多糖含量[J]. 菌物学报, 2021, 40(1): 252-260.
- ZHANG Q Q, HUANG Q. Quantitative analysis of *Ganoderma* polysaccharides content in fruiting bodies by near-infrared spectroscopy[J]. Mycosystema, 2021, 40(1): 252-260. (in Chinese)
- [26] PENG Y, ZHANG L, ZENG F, KENNEDY J F. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 59(3): 385-392.
- [27] GAO Y H, ZHOU S F, JIANG W Q, HUANG M, DAI X H. Effects of ganopoly (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients[J]. Immunological Investigations, 2003, 32(3): 201-215.
- [28] ZHEN D, SU L, MIAO Y, ZHAO F, REN G, MAHFUZ S, SONG H. Purification, partial characterization and inducing tumor cell apoptosis activity of a polysaccharide from *Ganoderma applanatum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 10-17.
- [29] 吴林秀. 茶树菇多糖与鼠李糖乳杆菌协同抗衰老作用研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2018.
- WU L X. Synergistic anti-aging effect of *Agrocybe cylindracea* polysaccharides with *Lactobacillus rhamnosus* GG strain[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2018. (in Chinese)