

榆黄菇多糖提取工艺优化及其免疫调节活性评价

文丁苑^{1,2}, 梁双敏^{1,2}, 国琦^{1,2}, 宋晓晓^{1,2}, 葛长荣¹, 肖智超^{2,3*}

(1. 云南农业大学云南省畜产品加工工程技术研究中心, 云南昆明 650201)

(2. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (3. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201)

摘要:以榆黄菇为研究对象,对榆黄菇多糖(PCP)提取工艺进行优化、纯化、测定单糖组成和分子量,再对其体外免疫活性进行评价。在单因素基础上通过响应面法确定榆黄菇多糖最优提取工艺为:提取温度 59.81℃,提取时间 2.40 h,液料比 29.91 mL/g,在此条件下,预测得率为 18.82%,实际得率为 18.60%。经 DEAE-Sephacel Fast Flow 柱层析从榆黄菇多糖中分离纯化出 3 个多糖组分(PCP-1、PCP-2、PCP-3),采用离子色谱法和高效凝胶渗透色谱法分析多糖成分和分子量,得出 PCP-1 由半乳糖组成,分子量为 1.90×10^4 u; PCP-2 由半乳糖和葡萄糖组成,摩尔比为 4.36:5.64,分子量为 2.76×10^4 u; PCP-3 由岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸组成,其摩尔比为 0.07:0.11:0.51:7.46:1.85,分子量为 4.81×10^4 u。通过体外试验评估 PCP 对巨噬细胞 RAW264.7 免疫调节活性。结果表明,PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 多糖质量浓度在 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内对巨噬细胞 RAW264.7 无毒性并具有一定增殖作用、显著提高了 NO 释放量并增强了巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬能力。当 PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 多糖质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,巨噬细胞 RAW264.7 NO 释放量达到最大值,分别为 11.40、11.56、11.76 $\mu\text{mol/L}$ 。该研究结果可为榆黄菇的精深加工综合利用提供理论依据。

关键词:榆黄菇多糖;得率;单糖组成;免疫调节作用

文章编号:1673-9078(2023)10-233-243

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1409

Optimization of the Extraction of Polysaccharides from *Pleurotus citrinopileatus* and Evaluation of Their Immunomodulatory Activity

WEN Dingyuan^{1,2}, LIANG Shuangmin^{1,2}, GUO Qi^{1,2}, SONG Xiaoxiao^{1,2}, GE Changrong¹, XIAO Zhichao^{2,3*}

(1. Livestock Product Processing and Engineering Technology Research Center of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(3. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The extraction of polysaccharides from *Pleurotus citrinopileatus* (PCP) was optimized, and the immunomodulatory effects of the purified polysaccharides were assessed. The optimal conditions to extract polysaccharides from *P. citrinopileatus* were determined using a single-factor response surface methodology and comprised an extraction temperature of 59.81 °C, extraction time of 2.40 h, and liquid-solid ratio of 29.91 mL/g. Under these conditions, the predicted yield was 18.82%, and the actual yield was 18.60%. Three polysaccharide components (PCP-1, PCP-2, and PCP-3) were separated and purified from PCP using DEAE Sepharose Fast Flow column. The polysaccharide compositions and molecular weights were analyzed using ion chromatography and high-performance gel permeation chromatography. PCP-1 was found to be composed of galactose, with a molecular weight of 1.90×10^4 u; PCP-2 was composed of galactose and glucose at a molar ratio of 4.36:5.64, with a molecular weight of 2.76×10^4 u; PCP-3 was composed of fucose, glucosamine hydrochloride, galactose, glucose, and

引文格式:

文丁苑,梁双敏,国琦,等.榆黄菇多糖提取工艺优化及其免疫调节活性评价[J].现代食品科技,2023,39(10):233-243

WEN Dingyuan, LIANG Shuangmin, GUO Qi, et al. Optimization of the extraction of polysaccharides from *Pleurotus citrinopileatus* and evaluation of their immunomodulatory activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 233-243

收稿日期: 2022-11-05

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目(202102AE090027); 云南省博士后科研基金项目

作者简介: 文丁苑(1998-),女,硕士研究生在读,研究方向: 功能性食品, E-mail: 1014949976@qq.com

通讯作者: 肖智超(1985-),男,博士,副教授,研究方向: 畜产品加工、功能性食品, E-mail: ynzcxiao@126.com

glucuronic acid at a molar ratio of 0.07:0.11:0.51:7.46:1.85, with a molecular weight of 4.81×10^4 u. The immunomodulatory activity of PCP in macrophage RAW264.7 cultures was evaluated *in vitro*. PCP-1, PCP-2, and PCP-3 at 25~200 g/mL were non-toxic to RAW264.7 cells and enhanced their proliferation. Moreover, the polysaccharides substantially increased NO release and enhanced the phagocytic ability of RAW264.7 cells. Additionally, following treatment with PCP-1, PCP-2, or PCP-3 at 200 $\mu\text{g/mL}$, NO production by RAW264.7 peaked at 11.40, 11.56, and 11.76 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

Key words: polysaccharides; *Pleurotus citrinopileatus*; yield; monosaccharide composition; immunomodulatory

榆黄菇 (*Pleurotus citrinopileatus*) 又名金顶侧耳、玉皇蘑, 属担子菌亚门 (Basidiomycotina), 侧耳科 (Tricholomataceae), 侧耳属 (*Pleurotus*)^[1,2], 原产于中国、日本等东方国家^[3], 在我国主要分布于黑龙江、吉林和云南等地区^[4]。根据中国食用菌协会统计, 2021 年榆黄菇产量为 4.06 万 t, 产量较大的省主要是山东省, 占全国比重约 68.01%。

榆黄菇味道鲜美, 是一种广受欢迎的食用菌。野生榆黄菇生长在榆树、桦树等阔叶树木的枯立木或倒木上^[5,6], 其子实体色泽鲜艳呈亮黄色, 单菇形状为浅漏斗形、菌肉白色, 成簇生长^[7,8]。榆黄菇含有人体必需氨基酸、多糖、蛋白质等多种活性物质^[9,10]。多糖不仅是食用菌的重要组成部分, 还是食用菌主要活性成分之一, 具有降血糖^[11]、润肠通便^[12]、抑制癌细胞增殖^[13]等广泛功效。与植物多糖、动物多糖相比, 食用菌多糖的生产周期短, 不受地域、气候等条件限制, 来源广泛, 应用前景广阔^[14]。多糖的生物活性与结构特征有关, 如单糖组成、支化程度和分子量分布^[15-17]等。目前关于榆黄菇多糖的活性研究主要集中在榆黄菇菌丝体和发酵液中多糖的抗氧化活性^[18]、抗肿瘤活性^[19]和免疫调节活性^[20]上。Hao 等^[21]从榆黄菇菌丝体中分离纯化出分子量为 3.22×10^6 u 的中性多糖, 并且具有一定的降糖作用。然而对于榆黄菇子实体多糖的结构与生物活性及其作用机制的研究较少。

本文选取榆黄菇子实体作为研究对象, 通过超声波辅助水提醇沉法提取榆黄菇多糖 (PCP), 选取提取温度、液料比、提取时间为自变量进行单因素试验, 再以多糖得率作为响应值进行响应面法优化提取工艺, 得到最佳提取条件。对榆黄菇多糖进行分离纯化, 进一步测定各多糖组分的单糖组成、摩尔比以及分子量, 通过测定巨噬细胞 RAW264.7 的增殖指数、吞噬活性以及 NO 释放量评价不同组分的榆黄菇多糖的体外免疫活性, 为后续榆黄菇多糖结构特征与免疫活性之间的关系研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

榆黄菇购自云南易门县德桦菌业有限公司, 50 °C 烘干处理, 打粉过筛得榆黄菇粉; 巨噬细胞 RAW264.7: 中国科学院干细胞库 (上海)。

主要试剂有: 二甲基亚砜 (DMSO), Adamas 公司; 牛血清蛋白, 上海源叶生物科技有限公司; 脂多糖 (LPS), 美国 Sigma 公司; 三氟乙酸 (TFA), 比利时 ACROS 公司; DEME 培养基, 青链霉素, Gibco 公司; 16 种单糖标准品 (岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、氨基半乳糖盐酸盐、盐酸氨基葡萄糖、N-乙酰-D 氨基葡萄糖、古罗糖醛酸、甘露糖醛酸), 上海博睿糖生物技术有限公司; 其它均为分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

DEAE-Sepharose Fast Flow (4.6 cm×50 cm), 美国 GE Healthcare 公司; LGJ-10 冷冻干燥机, 北京四环科技有限公司; ICS5000 离子色谱仪, 美国 ThermoFisher 公司; SPX-150B-Z 二氧化碳细胞培养箱, 上海博讯有限公司; 其余均为通用设备。

1.3 试验方法

1.3.1 榆黄菇粗多糖的提取

取榆黄菇粉末 5 g, 根据设计的液料比 (10~50 mL/g, *m/V*) 加入超纯水, 搅拌, 超声 20 min, 将超声后的溶液在不同提取时间 (1~3 h)、提取温度 (45~85 °C) 下进行提取。6 500 r/min 离心 20 min, 保留上清液, 反复提取两次。55 °C 下真空浓缩后, 在 4 °C 下加入 3 倍体积的无水乙醇醇沉 24 h, 4 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀。冷冻干燥后得到榆黄菇粗多糖 (PCP)。采用苯酚-硫酸法测定榆黄菇粗多糖的含量, 以葡萄糖作为标准品^[22]。榆黄菇粗多糖的得率 (%) 计算如下:

$$Y = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y——为榆黄菇粗多糖得率, %;

M_1 ——为榆黄菇粗多糖质量, g;

M_2 ——为榆黄菇粉末质量, g。

1.3.2 优化试验设计

根据单因素试验结果, 采用 Box-Behnken 法^[23]设计试验。提取温度、液料比、提取时间为自变量, 多糖得率作为响应值^[24]。试验因素和水平如表 1 所示。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Responsesurface experimental factor level table

水平	水浴时间/h	提取温度/℃	液料比/(mL/g)
-1	2	45	1:20
0	2.5	55	1:30
1	3	65	1:40

1.3.3 榆黄菇粗多糖的纯化

采用 Sevage 法^[25]除去榆黄菇粗多糖中的蛋白质后经 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析分离纯化榆黄菇多糖。将粗多糖溶于去离子水中, 取 40 mL 溶液进行 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析, 分别用蒸馏水和 0.1、0.3、0.5 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 流速为 2 mL/min, 自动收集洗脱液 (10.0 mL/管), 根据苯酚-硫酸法跟踪显色定性^[26], 收集管数为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制洗脱曲线。收集同一峰洗脱液浓缩体积, 透析后冷冻干燥得到四个多糖组分^[27,28]。

1.3.4 榆黄菇多糖初步结构分析

1.3.4.1 分子量测定

参照谢添等^[29]的方法并稍加修改, 通过高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定三个多糖组分的分子量: 称取样品和标准品配制 5 mg/mL 溶液, 过 0.22 μ m 滤膜后用注入 HPGPC 系统, 色谱条件如下, RI-10A 示差检测器; 色谱柱: BRT105-104-102 串联凝胶柱 (8 mm×300 mm); 流动相: 0.05 mol/L NaCl 溶液; 流速: 0.6 mL/min, 柱温: 40 ℃; 进样体积: 20 μ L。

1.3.4.2 单糖组成分析

取 16 种单糖标准品配置成单糖标准溶液 (0.1、0.5、1、5、10、20、50 mg/mL)。根据绝对定量方法, 测定不同单糖质量, 根据单糖摩尔质量计算出摩尔比。

用离子色谱仪分析多糖的单糖组成^[30]。取 5 mg 榆黄菇多糖样品 (PCP-1、PCP-2 和 PCP-3) 于安瓿中, 加入 10 mL 的 2 mol/L TFA, 120 ℃分解 5 h。用 N_2 干燥酸水解液, 加入 5 mL 水涡旋混匀后吸取 100 μ L 于 900 μ L 去离子水中, 水解样品溶液与 10 mg/mL 标准单糖混合物注入色谱系统。色谱条件: 色谱柱为 DionexCarbopacTMPA20 (3×150); 流动相: A 相: H_2O ; B 相: 15 mmol/L NaOH; C 相: 15 mmol/L NaOH 和 100 mmol/L NaOAc; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μ L, 柱温: 30 ℃; 检测器: 电化学检测器。

1.3.5 榆黄菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 免疫

活性测定

1.3.5.1 榆黄菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 增殖实验

采用 MTT 法^[31]检测榆黄菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的增殖影响。将处于对数生长期的细胞悬液接种于 96 孔板, 细胞密度约每孔 1×10^5 个, 每孔 100 μ L, 培养 24 h 后弃培养基, 分为空白组、阳性对照组和样品组, 分别用等体积的培养基、LPS (10 μ g/mL) 和多糖溶液 (12.5、25、50、100、200 μ g/mL) 培养细胞。在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后弃培养基, 向每孔中加入 100 μ L MTT 溶液 (0.5 mg/mL), 培养 4 h, 吸取出培养基, 添加 150 μ L DMSO 在黑暗中振荡至溶解出活细胞内的甲臍晶体, 在 570 nm 处测定吸光值, 并按照公式计算:

$$B = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

B——为细胞存活率, %;

A_1 ——样品组吸光值;

A_0 ——空白组吸光值。

1.3.5.2 榆黄菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬活性实验

参照 Shi 等^[32]方法通过中性红实验评估巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬活性, 将细胞培养到不同质量浓度的样品中 24 h 后弃培养基, PBS 清洗 2 次, 每孔加入质量分数为 0.075% 中性红溶液 100 μ L, 在恒温箱内孵育 3 h, 弃培养基, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 再加入 100 μ L 细胞裂解液, 室温下孵育 1 h 后于 540 nm 处测量吸光度。吞噬指数的计算公式如下:

$$C = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C——为细胞存活率, %;

A_1 ——样品组吸光值;

A_0 ——空白组吸光值。

1.3.5.3 榆黄菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的测定

RAW264.7 细胞的处理方法同 1.3.5.1, 细胞培养结束后, 收集上清液, 按 Griess 试剂盒操作说明检测巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 释放量。

1.3.6 统计分析

所有试验均进行 3 次平行测定, 试验数据通过 SPSS 19.0 统计软件等软件进行分析, 单因素方差分析 (ANOVA), Duncant 检验进行显著性分析 ($P < 0.05$ 表示差异显著)。图形绘制采用 Origin 2018 软件。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验分析

2.1.1 提取温度对榆黄菇粗多糖得率的影响

温度升高有助于多糖溶出,但温度过高会导致多糖结构被破坏,多糖部分活性降低,进而降低多糖得率^[33]。当提取时间为2 h,液料比为30 mL/g时,研究不同提取温度对榆黄菇粗多糖得率的影响。由图1可知,榆黄菇粗多糖的得率在45~55℃时升高,在55~85℃时,随着温度升高得率下降。郑婷婷等^[34]采用热水浸提黄皮疣柄牛肝菌多糖的最适提取温度为51℃,得率为16.67%。与本文研究的提取温度相近。当提取温度为55℃时,榆黄菇粗多糖的得率最高,为8.28%。因此,榆黄菇粗多糖最佳提取温度为55℃。

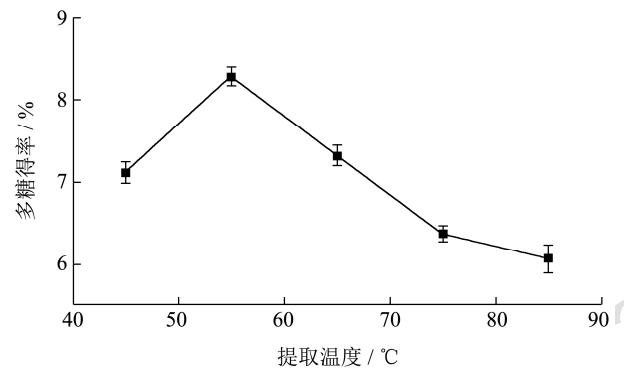


图1 提取温度对榆黄菇粗多糖得率的影响

Fig.1 Effect of extraction temperature on the yield of crude polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus*

2.1.2 提取时间对榆黄菇粗多糖得率的影响

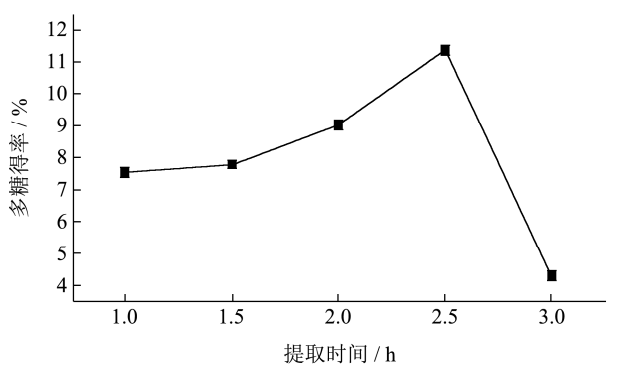


图2 提取时间对榆黄菇粗多糖得率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on the yield of crude polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus*

提取时间是影响多糖得率的重要因素^[35]。当提取温度为55℃,液料比为30 mL/g时,研究不同提取时间对榆黄菇粗多糖得率的影响如图2所示。当提取时间在1~2.5 h时榆黄菇多糖得率逐渐上升,在2.5~3 h呈下降趋势,在提取2.5 h时,得率最高达11.39%。

提取时间不足多糖溶解不充分,提取时间过长可能导致多糖降解,进而影响多糖得率。因此,选择最佳的提取时间为2.5 h。

2.1.3 液料比对榆黄菇粗多糖得率的影响

在提取温度为55℃、提取时间为2.5 h时,不同液料比对榆黄菇粗多糖得率的影响如图3所示。当液料比从10 mL/g增加到20 mL/g,得率从6.40%缓慢上升至6.87%,当液料比增加至30 mL/g,得率达最大值为9.01%,液料比继续增加后,榆黄菇粗多糖得率出现下降趋势。液料比较低时,溶液粘度大,不利于多糖溶出,液料比较大时后期浓缩过程会造成多糖损失,多糖得率降低^[36]。

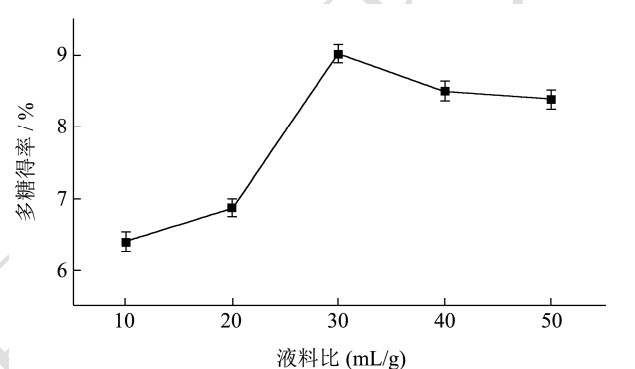


图3 液料比对榆黄菇粗多糖得率的影响

Fig.3 Effect of liquid-solidratio on the yield of crude polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus*

表2 试验设计和结果

Table 2 Experimental design and results				
编号	A 提取温度 /°C	B 提取时间 /h	C 液料比 (mL/g)	R 得率 /%
1	65	2.5	20	11.86
2	45	3	30	11.38
3	45	2	30	13.99
4	65	2	30	12.39
5	45	2.5	40	13.91
6	55	2	20	13.94
7	55	2.5	30	19.62
8	55	2	40	15.91
9	55	3	20	12.77
10	55	2.5	30	19.29
11	55	2.5	30	18.40
12	55	3	40	12.92
13	55	2.5	30	18.80
14	55	2.5	30	16.91
15	65	3	30	9.80
16	45	2.5	20	14.85
17	65	2.5	40	10.27

2.2 榆黄菇粗多糖提取条件优化

根据单因素试验结果,研究提取温度(A)、提取时间(B)和液料比(C)三个因素对榆黄菇粗多糖得率(Y)的影响,建立试验模型,进行17组试验,试验设计和结果见表2。

表3 回归模型方差分析

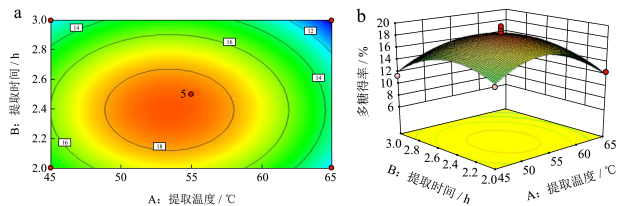
Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型 Model	149.53	9	16.61	13.25	0.001 3	**
A-提取温度	12.03	1	12.03	9.59	0.017 4	*
B-提取时间	10.95	1	10.95	8.73	0.021 3	*
C-液料比	0.021	1	0.021	0.017	0.900 6	
WS	1×10^{-4}	1	1×10^{-4}	7.974×10^{-5}	0.993 1	
WL	0.11	1	0.11	0.084	0.780 1	
SL	0.83	1	0.83	0.66	0.443 2	
W ²	65.3	1	65.30	52.07	0.000 2	**
S ²	32.44	1	32.44	25.87	0.001 4	**
L ²	15.9	1	15.90	12.68	0.009 2	**
残差	8.78	7	1.25			
失拟项	4.33	3	1.44	1.30	0.390 9	
纯误差	4.45	4	1.11			
总和	158.31	16				

注: $R^2=0.94$, $R^2_{Adj}=0.87$, $C.V=7.71\%$, $PRESS=76.17$, **差异极显著 ($P<0.01$), *差异显著 ($0.01<P<0.05$)。

由表3可知, F 值(13.25)和 P 值($P=0.001\ 3<0.01$)表明该模型具有统计学意义^[35]。失拟项的 F 值和 P 值分别为1.30和0.39。 P 值 >0.05 表明该回归方程的拟合度高,而模型 $P=0.0013<0.01$ 极显著则说明可以直接利用该方程分析及预测榆黄菇粗多糖得率随相关因素变化的情况^[37]。测定系数 R^2 、校正决定系数 R^2_{Adj} 和变异系数 $C.V$ 分别为94.46%, 87.33%和7.71%。离散系数 $C.V$ (Y 的变异系数)反映试验的稳定性和可信度, $C.V$ 值越小,这表明试验值的可靠性很高,观测值和预测值之间具有高度相关性^[38]。 P 值越小,相应的系数越显著^[39]。由 F 值可知,影响榆黄菇粗多糖得率的因素排序为:提取温度(A) $>$ 提取时间(B) $>$ 液料比(C)。

2.2.2 各因素交互作用对榆黄菇粗多糖得率的影响



2.2.1 模型建立及显著性检验

根据多元回归分析结果,榆黄菇粗多糖得率的多元回归方程为:

$$Y=18.60-1.23A-1.17B-0.051C+0.005AB-0.16AC-0.46BC-3.94A^2-2.78B^2-1.94C^2$$
。响应面二次模型的方差分析(ANOVA)如表3所示。

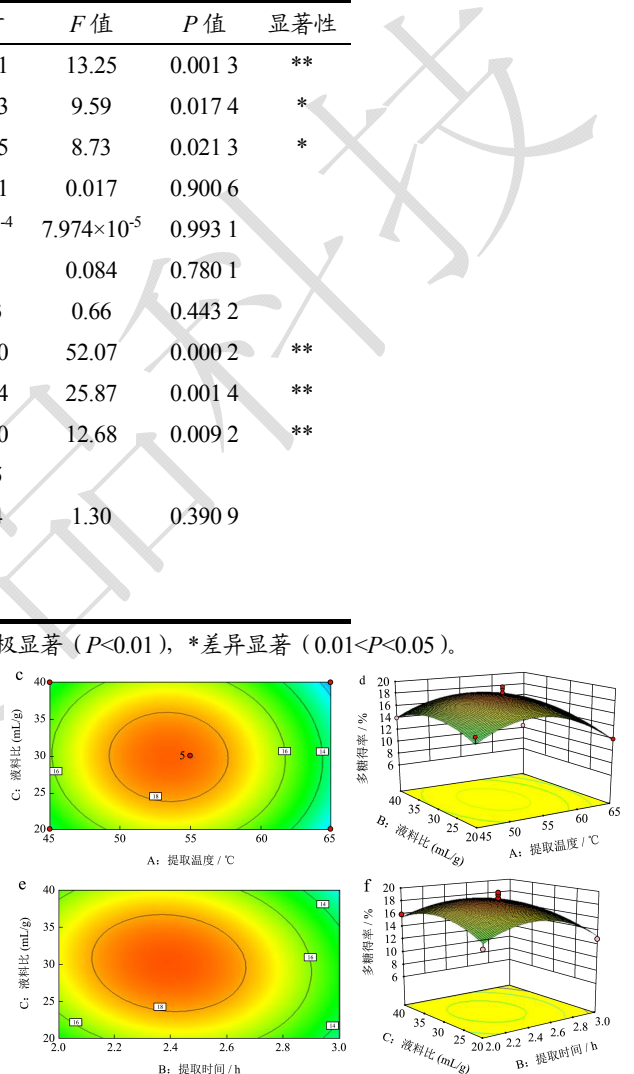


图4 提取时间和提取温度(a, b)、液料比和提取温度(c, d)、液料比和提取时间(e, f)对多糖得率的影响
Fig.4 The effects of extraction time and extraction temperature (a, b), extraction time and liquid-material ratio (c, d), liquid-material ratio and extraction temperature (e, f) on the yield of polysaccharides

响应面和等高线图直观反映提取温度、提取时间和液料比三者之间的交互作用对榆黄菇粗多糖得率的影响。提取时间和提取温度的等高线呈椭圆形,二者交互显著(图4a、b)。从液料比和提取温度的等高线

图可以看出提取温度对榆黄菇多糖的得率要大于液料比,二者交互作用不明显(图4c、d)。因此最佳提取条件为:提取温度 59.81 ℃,提取时 2.40 h,液料比 29.91 mL/g,多糖得率最高为 18.82%。与其他食用菌多糖得率相比,徐昱烨等^[40]用超声波辅助提取桦褐孔菌多糖得率为 3.81%,鲁斌等^[41]用热水浸提梨园块菌多糖得率为 10.57%,冉靓等^[42]采用微波辅助提取青杠菌多糖得率为 9.42%。本研究所采用的提取工艺能提高榆黄菇多糖的得率。

2.2.3 响应面试验模型的验证

经回归模型分析,榆黄菇粗多糖的最佳提取条件为:提取温度 53.44 ℃,提取时间 2.39 h,液料比 30.19 mL/g。根据实验实际可操作条件,最终确定榆黄菇粗多糖提取工艺为:提取温度 55 ℃,提取时间 2.5 h,液料比 30 mL/g。在此条件下榆黄菇粗多糖实际得率为 18.60%,与理论预测值 18.82%较为接近。通过验证试验充分说明该模型具有可行性,适用于榆黄菇粗多糖提取。

2.3 榆黄菇粗多糖的纯化

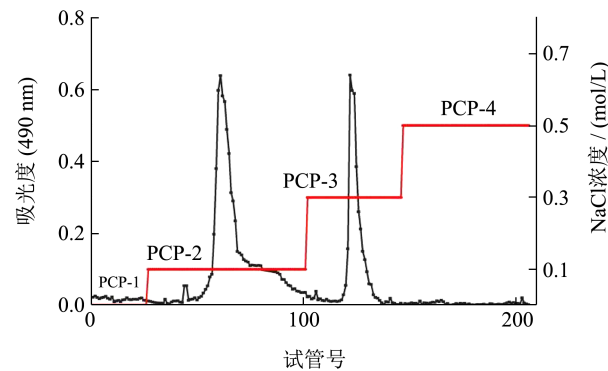


图 5 DEAE-Sephacrose Fast Flow 洗脱曲线

Fig.5 Elution curve of DEAE sepharose fast flow column

经 Sevage 法得到去除蛋白质的榆黄菇粗多糖。如图 5 所示,根据 DEAE-Sephacrose Fast Flow 的洗脱曲线,将榆黄菇多糖分为四个不同组分:PCP-1、PCP-2、PCP-3 和 PCP-4。收集三个组分后浓缩、透析、冷冻

表 4 PCP-1、PCP-2、PCP-3 的相对分子量

Table 4 Relative molecular weight of PCP-1, PCP-2 and PCP-3

样品	出峰时间/min	lg Mp	lg Mw	lg Mn	Mp	Mw	Mn
PCP-1	41.465	4.2	4.3	4.1	16 232	18 976	13 727
PCP-2	40.646	4.4	4.4	4.3	23 056	27 591	19 418
PCP-3	39.428	4.6	4.7	4.5	38 855	48 144	32 523

注:得到 lgMp-RT 为峰位分子量;lgMw-RT 为重均分子量;lgMn-RT 为数均分子量。

本研究通过 HPGPC 色谱法测定 PCP-1、PCP-2、PCP-3 的分子量,如图 6 所示。根据标品的出峰时间及分子量得到多糖分子量的标准曲线,线性回归方程

干燥后进行后续细胞试验(PCP-4 多糖含量最低的组分除外)。

2.4 榆黄菇多糖分子量测定

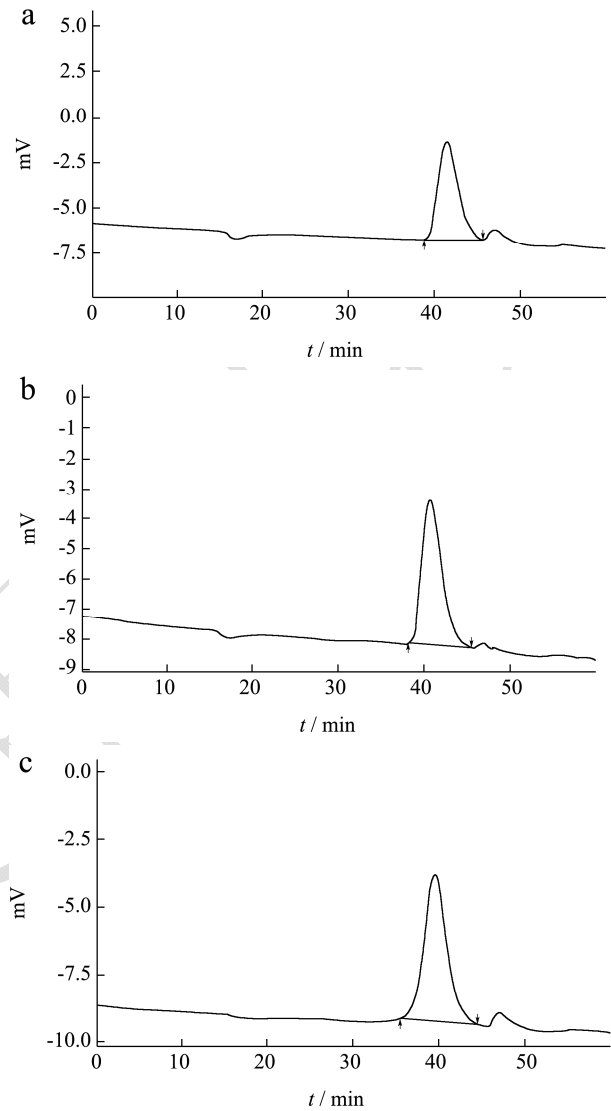


图 6 PCP-1 (a)、PCP-2 (b)、PCP-3 (c) 多糖的色谱图

Fig.6 Chromatogram of PCP-1(a), PCP-2(b), PCP-3(c) polysaccharide

为: $y = -0.1985x + 12.509$, $R^2 = 0.9964$ 。PCP-1 (图 6a)、PCP-2 (图 6b) 和 PCP-3 (图 6c) 的出峰时间分别为 41.47、40.65、39.43 min, PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 中

均只有一个峰，且峰的分布较为对称，可以判断出 PCP-1、PCP-2、PCP-3 多糖成分相对均一。如表 4 所示，PCP-1、PCP-2、PCP-3 的分子量分别为 1.90×10^4 、 2.76×10^4 、 4.81×10^4 u。He 等^[43]从榆黄菇子实体分离出一种水溶性多糖，分子量为 2.74×10^4 u，这与本试验榆黄菇多糖的分子量存在差异，这可能是提取的方法及醇沉使用的乙醇浓度不同导致的^[44]。

2.5 榆黄菇多糖单糖组成分析

榆黄菇多糖离子色谱图如图 7 所示。图 7a 表明 16 种单糖彼此有效分离，并且校准曲线种的 R^2 值均高于 0.99 表明该分析方法的可靠性^[45]。将榆黄菇多糖

与标准品的离子色谱图比对确定榆黄菇多糖的单糖组成。PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 的单糖组成及摩尔比见表 5。根据面积归一法计算出各单糖的组成摩尔比^[46]。结果表明，PCP-1 单糖组成分析只检出半乳糖(图 7b)；PCP-2 由半乳糖和葡萄糖组成，摩尔比为 4.36:5.64 (图 7c)；PCP-3 由岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸组成，其摩尔比为 0.07:0.11:0.51:7.46:1.85 (图 7d)。PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 中均含有半乳糖，PCP-2 和 PCP-3 的主要成分为葡萄糖。杨金涛等^[47]采用水提法从榆黄菇中分离出由葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸组成的 α 型呋喃葡聚糖，与本试验中的 PCP-3 的单糖组成相似。

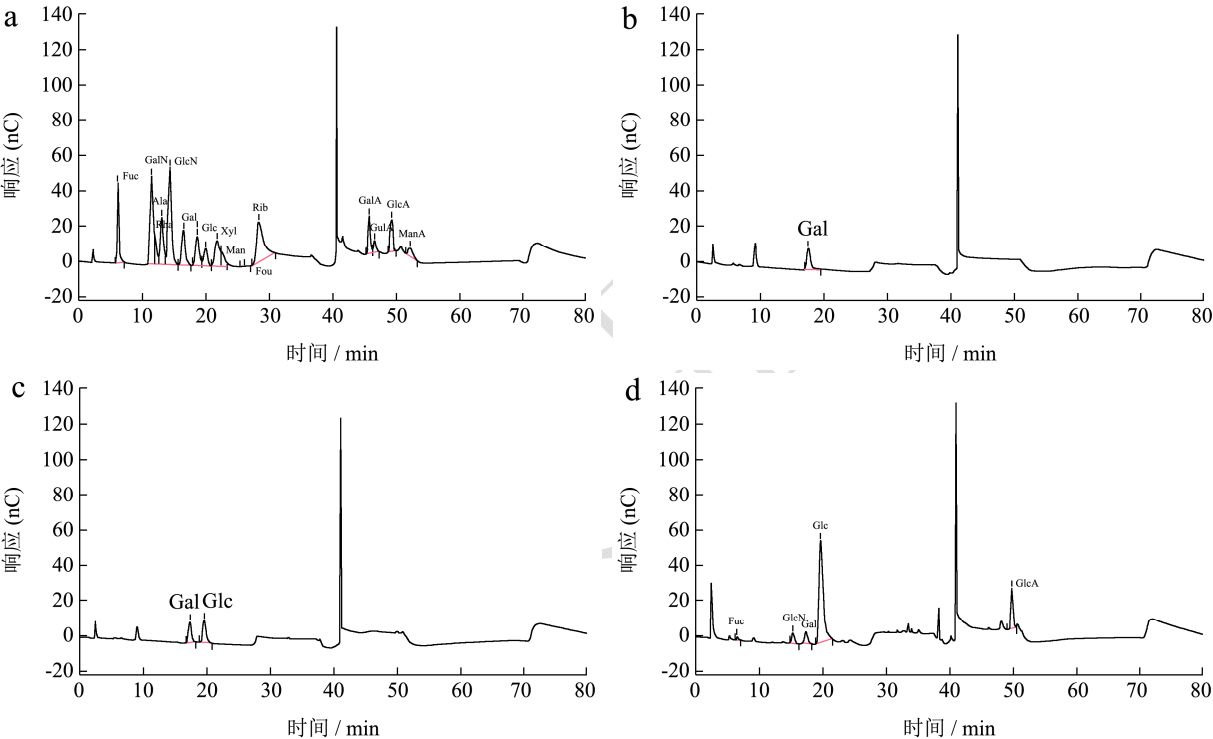


图 7 16 中标准单糖 (a) 和 PCP-1 (b)、PCP-2 (c) 和 PCP-3 (d) 组分单糖的离子色谱图

Fig.7 The ion chromatograms of 16 standard monosaccharides (a) and component monosaccharides released from PCP-1 (b), PCP-2 (c) and PCP-3 (d)

表 5 3 种纯化多糖的单糖组成摩尔比

Table 5 The molarity ratio of monosaccharide composition of three kinds of purified polysaccharides

样品	岩藻糖	盐酸氨基葡萄糖	半乳糖	葡萄糖	葡萄糖醛酸
PCP-1	-	-	1	-	-
PCP-2	-	-	4.36	5.64	-
PCP-3	0.07	0.11	0.51	7.46	1.85

2.6 榆黄菇多糖对巨噬细胞免疫活性的影响

2.6.1 榆黄菇多糖对RAW264.7增殖活性的影响

巨噬细胞的增殖活性是评估多糖免疫调节活性的指标之一^[48]。研究不同质量浓度的 PCP-1、PCP-2 和

PCP-3 对巨噬细胞 RAW264.7 增殖的影响，如图 8 所示。PCP-2 与空白组相比，在 12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内可以极显著增强巨噬细胞 RAW264.7 的增殖活性 ($P<0.01$)，且在质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时效果最好。PCP-1 在 12.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内，巨噬细胞 RAW264.7 的增殖指数呈先上升后下降的趋势，与空白组相比差异极显著 ($P<0.01$)，在 100~200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内，增殖率有所下降，但与空白组相比无显著差异。PCP-3 在 12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内对巨噬细胞 RAW264.7 有一定的增殖作用，但与空白组相比无显著差异。结果表明，PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 对巨噬细胞 RAW264.7 无毒性并具有

一定增殖作用。但三种组分多糖对巨噬细胞的增殖活性的影响有差异,这可能与单糖种类、摩尔比以及化学结构不同有关^[49]。

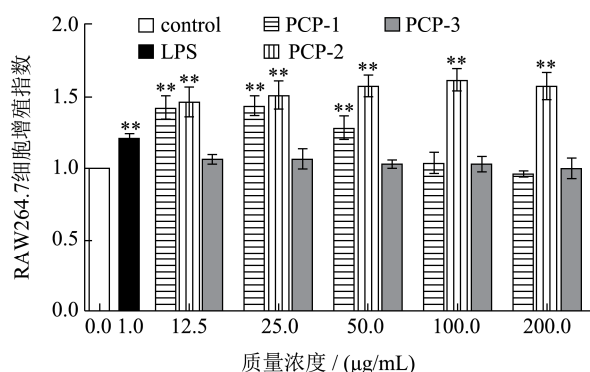


图8 PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 对 RAW264.7 细胞增殖的作用

Fig.8 Effect of PCP-1, PCP-2, and PCP-3 on RAW264.7 cell proliferation

注:与空白对照组相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

2.6.2 榆黄菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬活性的影响

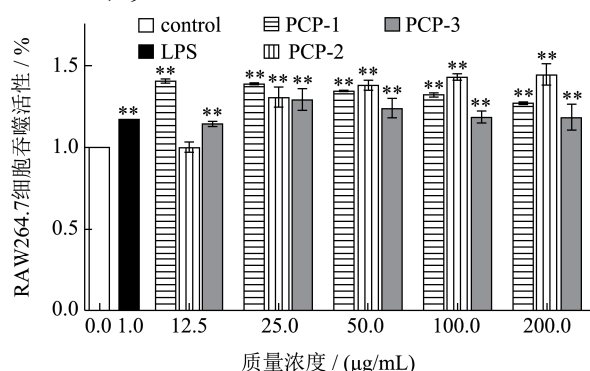


图9 PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 对 RAW264.7 细胞吞噬指数的影响。

Fig.9 Effect of PCP-1, PCP-2, and PCP-3 on phagocytic index of RAW264.7 cells

吞噬活性增强是巨噬细胞活化的标志之一^[50],活化的巨噬细胞作为先天免疫应答的关键参与者,可以清除微生物感染和其他病原体^[51],多糖通过提高巨噬细胞的吞噬能力进而提高生物体的免疫功能^[52]。如图9所示,与空白组相比,LPS显著增加巨噬细胞 RAW264.7 吞噬活性($P<0.01$)。当 PCP-2 多糖质量浓度为 12.5 μg/mL 对增强巨噬细胞 RAW264.7 吞噬活性效果不明显,在 25~200 μg/mL 时,巨噬细胞的吞噬指数与多糖质量浓度呈正相关,且极显著高于空白组($P<0.01$)。PCP-1 多糖在 12.5~200 μg/mL 质量浓度范围内,随着质量浓度的增加,巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬指数缓慢下降。PCP-3 多糖在质量浓度为 25 μg/mL 时,巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬指数达到最大,随着多糖质量浓度的增加,吞噬指数逐渐下降。

结果表明 PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 都能在不同程度上增进巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬活性。本研究 PCP-1 对细胞吞噬活性影响与董楠等^[53]研究相似,竹荪多糖呈浓度依赖性降低巨噬细胞 RAW264.7 吞噬能力。

2.6.3 榆黄菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 释放量的影响

多糖通过刺激一氧化氮合酶直接刺激 NO 的产生调节巨噬细胞的免疫功能^[54],低浓度的 NO 有助于修复组织和消除炎症^[55],而过量 NO 与各种炎症以及 DNA 损伤有关^[56]。由图10可知,与空白对照组相比,经 LPS 处理后 RAW264.7 的 NO 释放量显著升高($P<0.05$)。12.5~200 μg/mL 质量浓度范围的 PCP-1、PCP-2、PCP-3 作用于巨噬细胞 RAW264.7 后,NO 的释放量均随着多糖质量浓度的增加而增大,并且显著高于正常对照组($P<0.05$),呈浓度依赖性。当 PCP-1、PCP-2、PCP-3 质量浓度为 200 μg/mL 时,巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 释放量达到最大值。韩曾姣等^[57]用不同质量浓度刺糖精多糖作用巨噬细胞后,NO 释放量与刺糖精多糖质量浓度呈正相关,且刺糖精多糖质量浓度为 100 μg/mL、200 μg/mL 时,NO 生成量高于 LPS 组。LPS 作为阳性对照极大地促进了 NO 的释放量,本研究结果 Chen 等^[50]研究一致,茯砖茶杂多糖能促进巨噬细胞中 NO 分泌,且呈剂量依赖性。

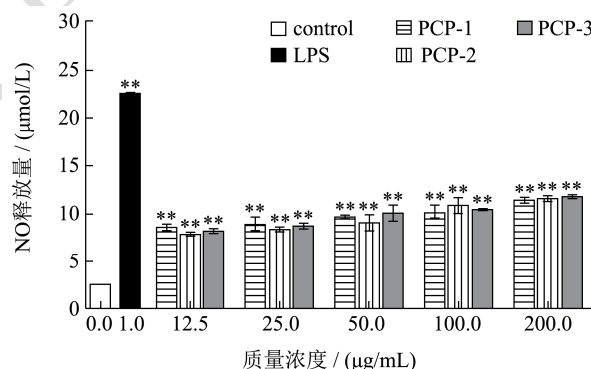


图10 PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响

Fig.10 Effects of PCP-1, PCP-2 and PCP-3 on NO release in RAW264.7 cells

3 结论

本文采用超声波辅助水提醇沉法从榆黄菇子实体中提取榆黄菇粗多糖,经响应面优化的最佳工艺得到的榆黄菇多糖得率为 18.60%。经 DEAE-Sephacrose Fast Flow 纯化得三种主要组分多糖:PCP-1、PCP-2 和 PCP-3。离子色谱和 HPGPC 色谱显示 PCP-1 由半乳糖组成,分子量为 1.90×10^4 u; PCP-2 由半乳糖和葡萄糖组成,分子量为 2.76×10^4 u; PCP-3 由岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸组成,分子

量为 4.81×10^4 u。体外免疫试验表明, PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 对巨噬细胞 RAW264.7 无毒性并具有一定增殖作用、促进巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬活性和释放 NO。PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 在体外均具有较好的免疫促进作用。由于 PCP-1、PCP-2 和 PCP-3 的基本结构存在差异, 它们的免疫调节活性也存在差异, PCP-2 对巨噬细胞 RAW264.7 的增殖促进作用更显著。后续研究可进一步对榆黄菇不同组分多糖的糖苷键连接方式、官能团、高级结构等进行测定, 以便进一步深入研究榆黄菇多糖结构与其免疫活性间关系。

参考文献

- [1] 辛晓林, 张桂春, 黄清荣. 榆黄菇发酵全液多糖抗肿瘤活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 324-325.
- [2] 黄年来. 我国食用菌产业的现状与未来[J]. 中国食用菌, 2000, 19(4): 3-5.
- [3] Kim A, Lcl B, Ivd B, et al. *Pleurotus citrinopileatus* polysaccharide stimulates anti-inflammatory properties during monocyte-to-macrophage differentiation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 122: 705-712.
- [4] 严源辉, 宋爽, 宋庆港, 等. 三种类型榆黄菇菌种应用比较试验[J]. 食用菌, 2021, 43(5): 63-65.
- [5] 魏晶晶, 张浩然, 王志鸽, 等. 真菌金顶侧耳的研究进展[J]. 青海草业, 2020, 29(2): 28-31.
- [6] 图力古尔, 李玉. 我国侧耳属真菌的种类资源及其生态地理分布[J]. 中国食用菌, 2001, 5: 8-10.
- [7] 姜佳岷. 不同配比沙柳和柠条木屑对榆黄蘑生长的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [8] 周赛静. 榆黄菇子实体多糖的分离纯化、结构鉴定和生物活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013.
- [9] Chen P H, Weng Y M, Lin S M, et al. Molecular weight affected antioxidant, hypoglycemic and hypotensive activities of cold water extract from *Pleurotus citrinopileatus* [J]. Journal of Food Science, 2017, 82: 2456-2461.
- [10] Liang Z C, Wu C Y, Shieh Z L, et al. Utilization of grass plants for cultivation of *Pleurotus citrinopileatus* [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2009, 63(4): 509-514.
- [11] 郝亚利. 榆黄菇多糖的提取、结构表征及降血糖活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2020.
- [12] 樊莹润, 郑婷婷, 刘琨毅, 等. 黄皮疣柄牛肝菌多糖对小鼠通便作用及血清指标的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(4): 48-56.
- [13] 田建霞, 朱长俊, 许越, 等. 桦褐孔菌多糖对前列腺癌细胞增殖的抑制作用[J]. 山东化工, 2021, 50(20): 25-26.
- [14] 刘清泉. 几种极具商业价值的新型微生物多糖的功能及应用[J]. 中国食品添加剂, 2004, 6: 7-13.
- [15] Chen Y Q, Liu Y Y, Sarker Md, et al. Structural characterization and antidiabetic potential of a novel heteropolysaccharide from *Grifola frondosa* via IRS1/PI3K-JNK signaling pathways [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 198: 452-461.
- [16] Lo T C, Kang M W, Wang B C, et al. Glycosyl linkage characteristics and classifications of exo-polysaccharides of some regionally different strains of *Lentinula edodes* by amplified fragment length polymorphism assay and cluster analysis [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 592(2): 146-153.
- [17] Zhang L, Hu Y, Duan X, et al. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from thirteen boletus mushrooms [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 1-7.
- [18] Hughes J M, Bailey T, Jeong S C, et al. Antioxidant and immunomodulating activities of exo-and endopolysaccharide fractions from submerged mycelia cultures of culinary-medicinal mushrooms [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2013, 15(3): 251.
- [19] Wang J C, Hu S H, Liang Z C, et al. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(6): 759-766.
- [20] Wu S Q, Gao S L, Liu H H, et al. Intracellular polysaccharide and its antioxidant activity by *Pleurotus citrinopileatus* SM-01 [J]. Macromolecular Research, 2013, 21(6): 660-668.
- [21] Hao Y L, Sun H Q, Zhang X J, et al. A novel polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* mycelia: Structural characterization, hypoglycemic activity and mechanism [J]. Food Bioscience, 2020, 37: 100735.
- [22] Yin C M, Fan X Z, Fan Z, et al. Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes* polysaccharides and determination of its antioxidant activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 446-454.
- [23] 张璐, 乔旭光, 刘晓宇, 等. 响应面法优化姜脯糖煮液活性炭脱色工艺[J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 3072-3078.
- [24] Zhu M, Nie P, Liang Y K, et al. Optimizing conditions of polysaccharide extraction from shiitake mushroom using response surface methodology and its regulating lipid metabolism [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95(2): 48-56.

- 644-648.
- [25] 杨星星,杨锦颖,董庆军,等.马齿苋粗多糖除蛋白方法的筛选及优化[J].现代食品,2021,13:117-120.
- [26] 董洲,李惠娴,张猛猛,等.野葛根酸性多糖的结构鉴定及免疫活性[J].现代食品科技,2018,34(7):68-75.
- [27] Wang C R, Ng T B, Li L, et al. Isolation of a polysaccharide with antiproliferative, hypoglycemic, antioxidant and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the fruiting bodies of the abalone mushroom *Pleurotus abalonus* [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, 63: 825-832.
- [28] Yin Z H, Zhang W, Zhang J J, et al. Isolation, purification, structural analysis and coagulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Ligustrum lucidum* Ait flowers [J]. Chemistry Central Journal, 2017, 11(1): 98.
- [29] 谢添,郝正祺,常明昌,等.广叶绣球菌水溶性多糖结构表征及其对巨噬细胞 RAW264.7 增殖能力的影响[J].山西农业科学,2021,49(2):150-155.
- [30] Wang X Y, Yin J Y, Nie S P, et al. Isolation, purification and physicochemical properties of polysaccharide from fruiting body of *Hericium erinaceus* and its effect on colonic health of mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 1310-1319.
- [31] Nie C, Zhu P, Wang M, et al. Optimization of water-soluble polysaccharides from stem lettuce by response surface methodology and study on its characterization and bioactivities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 809-817.
- [32] Shi M, Yang Y, Hu X, et al. Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue [J] Food Chemistry, 2014, 155: 50-56.
- [33] 李乐,陈本寿,袁莹.无花果多糖的微波提取工艺优化[J].现代食品科技,2021,37(12):215-220.
- [34] 郑婷婷,张文杰,严亮,等.热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖工艺研究[J].食品研究与开发,2019,40(4):38-42.
- [35] 国琦,梁双敏,葛长荣,等.黑松露多糖提取工艺优化及体外抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2021,37(12):187-196,308.
- [36] 李益,杨小斌,武林贺,等.响应面法优化羊肚菌多糖制备工艺及其抗氧化活性研究[J].医学食疗与健康,2020,18(2):23-24.
- [37] Chen C, Shao Y, Tao Y, et al. Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria* polysaccharides using RSM, and their biological activity [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 64(2): 1263-1269.
- [38] Guo X, Zou X, Sun M. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(2): 344-349.
- [39] Muralidhar R V, Chirumamila R R, Marchant R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 9: 17-23.
- [40] 徐晔,吕重宁,王晓波,等.响应面法优化桦褐孔菌多糖提取工艺及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2021,42(4): 143-148.
- [41] 鲁斌,张凤明,蔡正达,等.梨园块菌多糖提取工艺优化及其单糖组成分析[J].食品工业科技,2022,43(13):218-224.
- [42] 冉靓,刘渊,周婵媛,等.青杠菌多糖的微波协助提取及抗氧化活性研究[J].食品科技,2021,46(10):184-188.
- [43] He P F, Zhang A Q, Zhou S J, et al. Structural elucidation of polysaccharide containing 3-O-methyl galactose from fruiting bodies of *Pleurotus citrinopileatus* [J]. Carbohydrate Research, 2016, 434: 72-76.
- [44] 谢美林,徐海清,李景明,等.太子参多糖的纯化、组成及对 LPS 损伤 Raw264.7 巨噬细胞的保护作用[J].食品工业科技, 2022, 43(14): 392-400.
- [45] Shi H F, Wang Y J, Li O Y, et al. Two-step hydrolysis method for monosaccharide composition analysis of natural polysaccharides rich in uronic acids [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101: 105524.
- [46] Hou X J, Wei C. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible Bachu mushroom by response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(1): 67-74.
- [47] 杨金涛,信传鑫,戴晓婧,等.基于不同提取方法的榆黄蘑多糖构效关系[J].菌物研究,2022,20(3):190-197.
- [48] 谌淑平,李明智,董楠,等.不同食用菌多糖复配物对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J].食品工业科技, 2021,42(17):366-372.
- [49] 刘淑贞,周文果,叶伟建,等.活性多糖的生物活性及构效关系研究进展[J].食品研究与开发,2017,38(18):211-218.
- [50] Wu J, Xu Y, Zhu B, et al. Characterization of an arabinogalactan from the fruit hulls of *Ficus pumila* Linn. and its immunomodulatory effect [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 73:104091.
- [51] Chen G, Bai Y, Zeng Z, et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of heteropolysaccharides from Fuzhuan brick tea [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(4): 1368.

- [52] 徐展翅. 蝉花多糖 JCH-1 理化性质及其对 RAW264.7 细胞免疫调节机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [53] 董楠, 李明智, 徐德昌, 等. 5 种食用菌多糖及复配多糖对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(9): 1-10.
- [54] Schepetkin I A, Faulkner C L, Nelson-Overton L K, et al. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum* [J]. International Immunopharmacology, 2005, 5(13-14): 1783-1799.
- [55] Guastadisegni C, Nicolini A, Balduzzi M, et al. Modulation of PGE2 and TNF α by nitric oxide in resting and LPS-activated RAW 264.7 cells [J]. Cytokine, 2002, 19(4): 175-180.
- [56] Surh Y J, Chun K S, Cha H H, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: Down-regulation of Cox-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation [J]. Mutation Research, 2001, 480(3): 243-268.
- [57] 韩曾姣, 贺家勇, 常军民. 刺糖精多糖对巨噬细胞 RAW264.7 免疫活性的影响研究[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(3): 361-365.