

• 食品生物技术 •

鸡腿菇子实体多糖的分离纯化、理化性质及抗氧化活性

许女, 张天震, 陈旭峰, 张浩, 王如福

山西农业大学 食品科学与工程学院, 山西 太谷 030801

许女, 张天震, 陈旭峰, 等. 鸡腿菇子实体多糖的分离纯化、理化性质及抗氧化活性. 生物工程学报, 2017, 33(5): 808–816.
Xu N, Zhang TZ, Chen XF, et al. Separation, purification and antioxidant activity of polysaccharide from *Coprinus comatus*.
Chin J Biotech, 2017, 33(5): 808–816.

摘要: 本研究对水溶醇沉法提取的鸡腿菇粗多糖脱蛋白方法进行了比较, 最终确定 Sevage 法为最优的脱蛋白方法。经 DEAE-纤维素 52 离子交换及 Sephadex G-200 分子层析柱分级、纯化, 最终得到 2 个主要的多糖组分 Ccp-I-A 和 Ccp-I-B。理化性质测定结果表明, 二者均为白色絮状固体, 能溶于水, 不溶于无水乙醇、丙酮等有机溶剂; 与斐林试剂, CTAB、硫酸-吡啶、碘-碘化钾及三氯化铁反应均为阴性。GC 测定结果可知 Ccp-I-A 主要由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 摩尔比为 2.03 : 9.52 : 1; Ccp-I-B 主要由岩藻糖和半乳糖组成, 其摩尔比为 1 : 5.21。另外, Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 对 DPPH 和·OH 显示出良好的清除能力, 而且, 相比于 Ccp-I-B, Ccp-I-A 的清除能力更高, 当浓度为 300 μg/mL, 其对 DPPH 和·OH 的清除能力可分别达到 72.1%和 55.3%。

关键词: 鸡腿菇多糖, 纯化, 理化性质, 抗氧化

Separation, purification and antioxidant activity of polysaccharide from *Coprinus comatus*

Nü Xu, Tianzhen Zhang, Xufeng Chen, Hao Zhang, and Rufu Wang

Food Science and Engineering College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

Abstract: We compared the ways of deproteinization for crude polysaccharides of *Coprinus comatus*, and finally selected Sevage method as the optimal method. Two main fractions of Ccp-I-A and Ccp-I-B were obtained after DEAE-52 cellulose and Sephadex G-200 chromatography, both were white-floc, soluble in water, insoluble in absolute ethyl alcohol, acetone and other organic solvents. Additionally, Fehling reagent, CTAB, Sulphuric acid-carbazole, I-KI and FeCl₃ reaction were all negative. GC analysis showed Ccp-I-A was composed of mannitose, glucose and galactose in molar ratios of 2.03:9.52:1,

Received: November 10, 2016; **Accepted:** March 15, 2017

Supported by: Research and Development Projects of Shanxi Provincial Science and Technology (No. 2015-TN-10).

Corresponding author: Rufu Wang. Tel: +86-354-6288325; E-mail: wrf558@126.com

山西省科技重点研发计划项目 (No. 2015-TN-10) 资助。

whereas Ccp-I-B was composed of fucose and galactose with molar ratios of 1:5.21. Antioxidant activity test showed that Ccp-I-A and Ccp-I-B had good scavenging abilities on DPPH and $\cdot\text{OH}$. Compared to Ccp-I-B, the scavenging activity of Ccp-I-A was much stronger, and the scavenging rate could reach 72.1% and 55.3% respectively when the concentration was 300 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Coprinus comatus* polysaccharides, purification, physico-chemical property, antioxidation

鸡腿菇, 学名毛头鬼伞 *Coprinus comatus*, 是一种名贵的食用和药用真菌, 味甘滑性平, 有益脾、清心安神, 经常食用有助消化、增加食欲和治疗痔疮^[1]。现代研究结果还证实其具有降血糖^[2-3]、提高免疫活性^[4-5]和抗肿瘤^[6]等生物学功能。鸡腿菇子实体含有丰富的糖类, 总糖含量为 57.65%, 其中还原糖的含量为 53.54%, 多糖含量为 4.11%, 是鸡腿菇发挥生理功能的重要组成部分^[7]。

目前关于鸡腿菇多糖活性的研究, 大都是采用其多糖粗提物^[8-9], 并未对纯化、分级后的多糖各组分进行系统研究, 而关于其单糖组分、物理化学性质及结构解析更加鲜有报道。本文主要对鸡腿菇子实体多糖组分进行了分离纯化, 初步研究各多糖组分的理化性质及抗氧化生物活性, 以为鸡腿菇子实体多糖的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

鸡腿菇子实体干粉由山西农业大学食用菌中心提供。DEAE-纤维素 52 购于 Whatman 公司。Sephadex G-200 购于 Pharmacia 公司。DPPH 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

F22E 型可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); HL-1 型恒流泵 (上海青浦沪西仪

器厂); 真空冷冻干燥机 (德国 KENDRO 公司); TDL-4 低速离心机 (上海安亭科学仪器厂); HHS-21-4 数显恒温水浴锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); R201D-11 旋转蒸发器 (郑州长城工贸有限公司); GC-2010 型气相色谱仪 (日本岛津仪器公司)。

1.3 方法

1.3.1 鸡腿菇子实体多糖的提取

准确称取一定质量的鸡腿菇子实体的干粉, 放入圆底烧瓶中, 按照料液比为 1:25 加入蒸馏水, 混合均匀, 在 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下浸提 4 h, 重复提取 2 次后, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 加入 3 倍体积的 95% 乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下醇沉过夜, 之后 4 000 r/min 离心 15 min, 取沉淀真空冷冻干燥, 研钵研碎即鸡腿菇粗多糖样品。采用苯酚-硫酸法和考马斯亮蓝染色法进行多糖和蛋白质含量的测定。

1.3.2 鸡腿菇子实体多糖的脱蛋白方法

Sevage 法脱蛋白: 将 1.3.1 中得到的粗多糖样品配制成 1% 的粗多糖溶液, 将粗多糖溶液与 Sevage 试剂 (氯仿:正丁醇=4:1) 按 4:1 的比例混匀, 振荡 20 min 后静置 30 min, 3 500 r/min 离心 20 min 去沉淀, 测定上清液中多糖含量和蛋白质含量。

三氯乙酸 (TCA) 法脱蛋白: 将 1.3.1 中得到的粗多糖样品配制成 1% 的粗多糖溶液, 向粗多糖溶液中加入终浓度为 12% 的 TCA, 振荡 20 min

后静置 30 min, 3 500 r/min 离心 15 min 去沉淀, 测定上清中多糖和蛋白质的含量。

鸡腿菇子实体多糖的柱层析: DEAE-纤维素 52 离子交换柱层析: 鸡腿菇粗多糖经 Sevage 法去除蛋白质后, 流水透析 48 h (除去无机离子、低聚糖等杂质), 采用旋转蒸发器浓缩, 使其浓度达到 10 mg/mL。将 1 mL 浓缩好的鸡腿菇糖液加到处理好的 DEAE-纤维素 52 离子交换柱 (30 cm×2.0 cm) 中, 依次用浓度为 0.15、0.25、0.35、0.45 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 进行分段梯度洗脱, 洗脱速率为 36 mL/h, 每管 3 mL 分布收集, 每个梯度收集 10 管, 即每个梯度的洗脱体积为 30 mL。采用苯酚-硫酸法逐管检测多糖含量。

Sephadex G-200 凝胶柱层析: 经 DEAE-纤维素 52 离子交换层析后得到的多糖峰值管中的收集液合并, 浓缩 5 倍后经 Sephadex G-200 层析柱 (50 cm×1.0 cm) 层析, 上样量为 1 mL, 用 0.005 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.2) 进行洗脱, 采用苯酚-硫酸法逐管检测多糖含量。

1.3.3 多糖基本理化性质

测试纯化后的鸡腿菇多糖 Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 在水、乙醇、乙醚、丙酮、氯仿、正丁醇等有机溶剂中的溶解度, 进行斐林试剂反应, 三氯化铁反应, CTAB 反应和硫酸-唑啉反应, 碘-碘化钾反应^[10]。

1.3.4 多糖的单糖组成分析

取待分析的 Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 多糖样品 10 mg 于 10 mL 离心管中, 加入 2 mL CF₃COOH (TFA), 充氮气封管于 120 °C 下油浴 3 h。减压蒸干水解液, 加甲醇反复处理 5 次, 以除尽 CF₃COOH, 真空干燥水解物, 然后进行衍生化。

衍生物的制备 (糖腈乙酰酯化衍生法): 称

取 10 mg 固体水解糖样、10 mg 盐酸羟胺和 1 mL 无水吡啶, 待溶解后于 90 °C 下水浴反应 30 min 并间歇振荡。取出后冷却至室温, 加入 1 mL 无水醋酸酐, 于 90 °C 下继续水浴反应 30 min 进行乙酰化。取出后在冰浴中迅速冷却, 加入 1 mL 蒸馏水搅拌, 用氯仿萃取 3 次, 合并氯仿层, 减压蒸干。

样品用 1 mL 氯仿溶解后, 用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤备用。

气相色谱检测条件如下:

色谱柱: 毛细管柱 DB-17, 30 m, I.D. 0.25 μm; 载气: N₂, 流速: 30 mL/min; 燃气: H₂, 流速: 40 mL/min; 助燃气: 空气, 流速: 400 mL/min; 分流比: 100 : 1; 检测器: FID1; 汽化室温度: 320 °C; 检测器温度: 320 °C; 色谱柱温度: 190 °C。

1.3.5 抗氧化活性

总还原能力的测定: 参考 Oyaizu 等^[11]的方法并略做改动。基本操作步骤为: 1 mL 样品溶液, 加入 2.5 mL 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.6) 和 2.5 mL 1% K₃[Fe(CN)₆] 于试管中混匀, 50 °C 水浴中反应 20 min, 迅速冷却并加入 2.5 mL 10% TCA, 混匀后 3 500 r/min 离心 10 min, 取 3 mL 上清液加入 0.6 mL 0.1% FeCl₃ 混匀, 再加 3 mL 蒸馏水摇匀, 波长 700 nm 测定。以蒸馏水为空白对照, Vc 为阳性对照。

DPPH 自由基清除能力测定: 取 3 mL 样品溶液, 加入 1 mL 无水乙醇配制的 DPPH 溶液, 振荡后室温条件下放置于暗处 30 min, 用无水乙醇调零, 于 517 nm 波长处测定其吸光度 (A₁); 空白组用 3 mL 无水乙醇代替样品溶液, 其余处理同上, 在 517 nm 下测定吸光度 (A₀); 对照组用 1 mL 无水乙醇代替 DPPH 溶液, 其余处理同上, 在 517 nm 下测定吸光度 (A₂); 以 Vc 作阳性对照。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 自由基清除能力测定^[12]: 取 1 mL 样品溶液, 加入 1 mL 硫酸亚铁溶液 (9 mmol/L), 1 mL 水杨酸乙醇溶液 (9 mmol/L) 和 1 mL 过氧化氢溶液 (0.03%, *V/V*), 37 °C 反应 30 min, 3 500 r/min 离心 15 min 后得上清, 于 510 nm 处测定吸光度 (A_1); 空白组以 1 mL 蒸馏水代替样品溶液, 其余处理同上, 于 510 nm 下测定吸光度 (A_0); 对照组以 1 mL 蒸馏水代替过氧化氢溶液, 其余处理同上, 在 510 nm 下测定吸光度 (A_2); 以 Vc 作阳性对照。

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 两种脱蛋白方法的比较

2.1.1 Seville 法脱蛋白

多糖中蛋白质的存在形式主要有两种, 一是游离蛋白, 另一种是与糖链结合成糖蛋白或糖肽。多糖脱蛋白主要以脱除游离蛋白为主。Seville 法脱蛋白具有条件温和、能够有效避免多糖降解等优点, 是比较经典的脱蛋白方法。由图 1 可知, 鸡腿菇多糖中蛋白质的脱除率随着脱蛋白次数的增加而增加, 当用此法重复脱蛋白 3 次以后, 蛋白脱除率的增加幅度渐趋于平缓; 而多糖保留率随着脱蛋白次数的增加而降低, 用 Seville 法脱蛋白 3 次, 此时蛋白质脱除率为 61.30%, 多糖保留率为 53.12%。

2.1.2 TCA 法脱蛋白

TCA 法脱蛋白的结果如图 2 所示。由图 2 可知, 鸡腿菇多糖中蛋白质的脱除率随脱蛋白次数的增加而提高, 当用此法重复脱蛋白 2 次

以后, 蛋白脱除率的增加幅度渐趋于平缓, 而多糖保留率随脱蛋白次数的增加而降低, 因此选择用 TCA 法脱蛋白 2 次, 此时蛋白质脱除率为 72.27%, 多糖保留率为 59.23%。

表 1 试验结果显示采用 Seville 法脱蛋白 3 次后得到的鸡腿菇多糖的抗氧化活性明显强于采用 TCA 法脱蛋白 2 次后的多糖。TCA 法是根据蛋白质在有机溶剂中容易变性沉淀的特点将其除去, 具有蛋白脱除率高、操作简单等优点。然而用此法脱除蛋白质时, 低浓度的 TCA 可使变性蛋白在沉淀过程中吸附部分多糖, 从而导致多糖的损失; 高浓度的 TCA 会同时沉淀变性的游离蛋白和部分糖肽, 并且会引起糖链的断裂

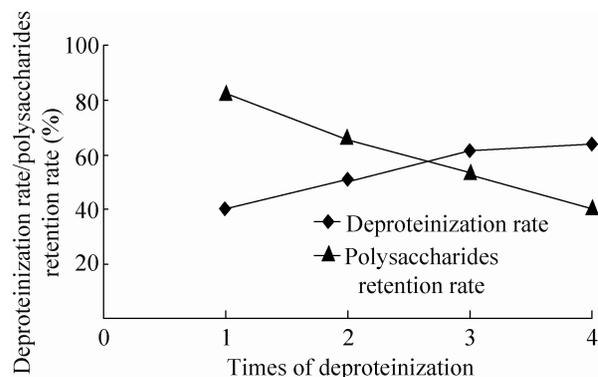


图 1 Seville 法脱蛋白结果

Fig. 1 Results of deproteinization by Seville method.

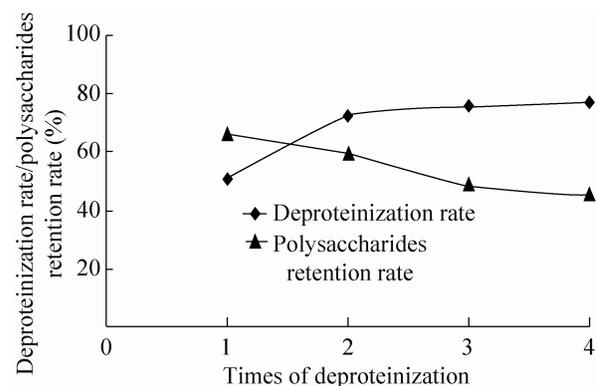


图 2 TCA 法脱蛋白结果

Fig. 2 Results of deproteinization by TCA method.

表 1 采用两种方法脱蛋白后的鸡腿菇多糖的抗氧化活性比较

Table 1 Antioxidant activity of Ccp-S3 and Ccp-T2

	Antioxidant activity		
	DPPH scavenging rate (%)	·OH scavenging rate (%)	OD ₇₀₀
V _c (300 μg/mL)	70.0	30.0	1.20
Ccp-S3 (300 μg/mL)	27.1	10.1	0.21
Ccp-T2 (300 μg/mL)	20.0	8.2	0.15

Ccp-S3: deproteinization three times by Sevage method; Ccp-T2: deproteinization two times by TCA method.

导致部分多糖降解, 进而对多糖的活性造成不利影响^[6]。因此从保护多糖活性等角度出发, 本文采用 Sevage 法脱蛋白。

2.2 鸡腿菇多糖的柱层析

2.2.1 DEAE-纤维素 52 离子交换层析

将经过脱蛋白和透析处理的鸡腿菇多糖样品, 按照 1.3.2 中的方法进行 DEAE-纤维素 52 离子交换层析, 梯度洗脱, 每个梯度收集 10 管, 每管 3 mL, 用苯酚-硫酸法跟踪监测多糖含量, 得到洗脱曲线, 见图 3。其中 1-10 管为 0.15 mol/L NaCl 洗脱收集的组分, 10-20 管为 0.25 mol/L NaCl 洗脱收集的组分, 20-30 管为 0.35 mol/L NaCl 洗脱收集的组分, 30-40 管为 0.45 mol/L NaCl 洗脱收集的组分。共收集到 3 个主要洗脱峰依次命名为 Ccp-I、Ccp-II 和 Ccp-III。

2.2.2 Sephadex G-200 凝胶层析

将经 DEAE-纤维素 52 离子交换层析柱纯化后所得主要多糖洗脱峰 Ccp-I (9-14 管) 合并收集, 浓缩 5 倍过 Sephadex G-200 层析柱, 用 0.005 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.2) 进行洗脱, 苯酚-硫酸法跟踪监测多糖含量, 洗脱曲线如图 4。收集到 2 个主要洗脱峰 Ccp-I-A 和 Ccp-I-B。

2.3 鸡腿菇多糖的一般理化性质

鸡腿菇纯化多糖 Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 的一般理化性质测定结果如表 2 所示。Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 均为白色絮状固体, 能溶于水, 不溶于无水乙醇、乙醚、丙酮、氯仿及正丁醇等有机溶剂; 两种多糖与斐林试剂和三氯化铁反应均为阴性, 说明不含游离单糖和多酚类物质; 与 CTAB 和硫酸-咔唑反应阴性, 说明不含有糖醛酸; 与碘-碘化钾反应阴性, 说明不是淀粉类多糖。

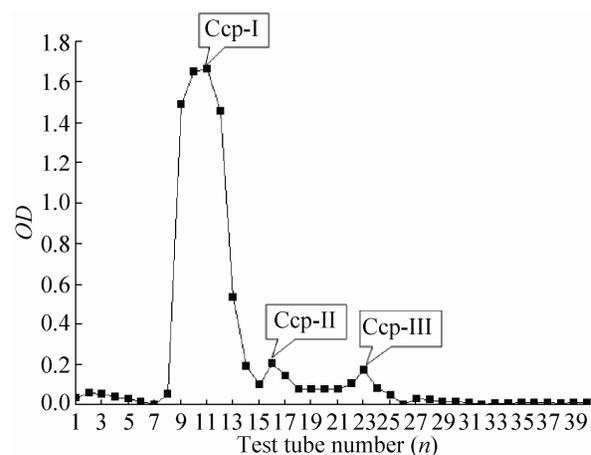


图 3 DEAE-52 离子交换柱梯度洗脱图

Fig. 3 Gradient elution of *Coprinus* polysaccharide by DEAE-52 cellulose chromatography.

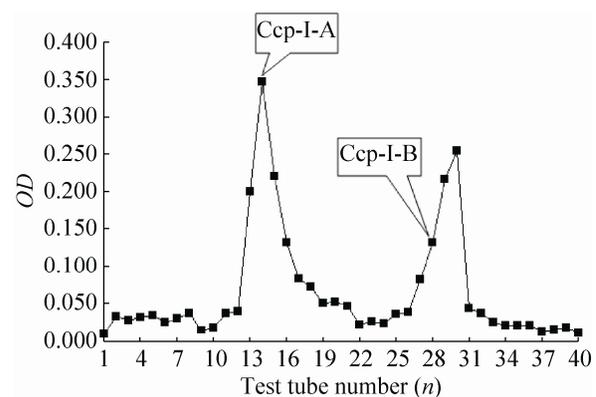


图 4 Sephadex G-200 柱层析洗脱图

Fig. 4 Elution of Ccp-I by Sephadex G-200 chromatography.

表 2 鸡腿菇多糖的一般理化性质

Table 2 The general physico-chemical property of Ccp-I-A and Ccp-I-B

	Ccp-I-A	Ccp-I-B
Appearance	White-floc solid	White-floc solid
Solubility		
Water	Soluble	Soluble
Ethyl alcohol	Insoluble	Insoluble
Ether	Insoluble	Insoluble
Acetone	Insoluble	Insoluble
Chloroform	Insoluble	Insoluble
N-butanol	Insoluble	Insoluble
Chemical Reaction		
Fehling reagent	-	-
FeCl ₃	-	-
CTAB	-	-
Sulphuric Acid-carbazole	-	-
I-KI	-	-

Note: “-”, negative.

2.4 鸡腿菇多糖的单糖组成

鸡腿菇纯化多糖 Ccp-I-A 样品经酸水解并进行糖脲乙酸酯衍生化,在 1.3.4 的检测条件下所得结果如图 5 和图 6 所示。各单糖峰面积/对应分子量所得的比值即为各单糖的摩尔比,由分析可知,Ccp-I-A 由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,摩尔比为 2.03 9.52 1。相似地,吴艳兵等^[13]采用高效阴离子色谱法 (HPAEC),对经乙醇分级沉淀及 DEAE Sephadex A-25 离子交换纯化后的鸡腿菇子实体多糖组分 CCP60 中的单糖组成进行分析,结果表明其主要由葡萄糖和半乳糖组成。

Ccp-I-B 由岩藻糖和半乳糖组成,其摩尔比为 1 5.21。姚毓婧等^[14]也对鸡腿菇子实体多糖组分 CC30w-l 完全酸水解后进行 HPAEC-PAD 分析,结果表明其主要由岩藻糖和半乳糖组成,其

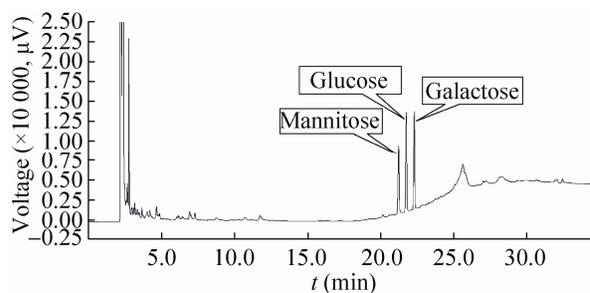


图 5 Ccp-I-A 多糖样品的气相色谱图

Fig. 5 Gas chromatograms of Ccp-I-A.

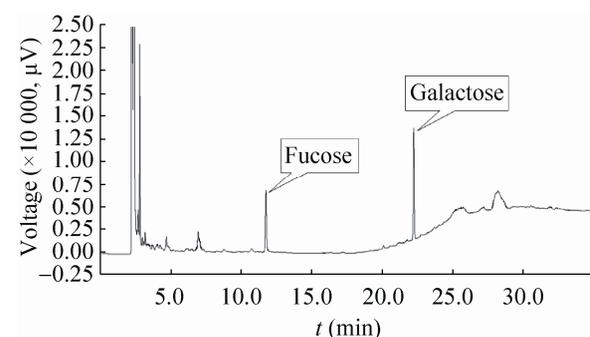


图 6 Ccp-I-B 多糖样品的气相色谱图

Fig. 6 Gas chromatograms of Ccp-I-B.

摩尔比为 1 4.02。Fan 等^[15]也曾在鸡腿菇菌丝体中获得岩藻半乳聚糖。另外,其他真菌也曾被报道存在岩藻半乳聚糖,如树舌 *Ganoderma applanatum* 中的岩藻半乳聚糖^[16]、拟层孔菌属 *Fomitopsis fraxionae*^[17]、绒状火菇 *Flammulina velutipes*^[18]、猪苓 *Polyporus pinicola*^[19]、火绒蕈 *Polyporus fomentarius* 和桑黄 *Polyporus igniarius*^[20] 中的甘露岩藻半乳聚糖,以及硫磺多孔菌 *Laetiporus sulphureus*^[21] 中的岩藻甘露半乳聚糖。

2.5 鸡腿菇多糖两种组分的体外抗氧化活性

2.5.1 Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 对 DPPH 的清除作用

DPPH 是一种稳定的自由基,且在乙醇溶液中 517 nm 处存在最大吸收峰。当 DPPH 遇到抗氧化剂等能提供质子的物质时,自由基被清除同时吸光度值降低。图 7 为不同浓度下为

Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 对 DPPH 的清除作用,可见,随着鸡腿菇多糖组分的浓度越高,对 DPPH 的清除作用越强,当浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 对 DPPH 的清除率分别为 72.1%和 38.6%,高于分级纯化前 Ccp-S3 (27.1%) 的清除率,其中,Ccp-I-A 对 DPPH 的清除率与 V_C 相当 (70%) (表 1)。本文中报道的 Ccp-I-A 对 DPPH 的清除率高于文献[22]报道中平菇多糖分级组分 PSPO-1a (41%, 1 mg/mL) 的清除率,但低于灵芝菌糠^[23]及茶树菇多糖^[24]分级组分 GRPS-2 (74.21%, 100 $\mu\text{g/mL}$) 和 EPS-2 (88%, 100 $\mu\text{g/mL}$) 对 DPPH 的清除率。

2.5.2 Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用见图 8,由图 8 可知鸡腿菇多糖组分对羟基自由基的清除效果也与浓度呈正相关。在浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率分别为 55.3%和 15.5%,高于分级纯化前 Ccp-S3 (10.1%) 的清除率,而且,Ccp-I-A 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率高于 V_C (30%) (表 1)。本文中报道的 Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 对 DPPH 的清除率高于文献[22]中报道的平菇多糖的分级组分 PSPO-1a (10.5%, 2.5 mg/mL)^[22]的清除率;但低于灵芝菌糠^[23]及茶树菇多糖^[24]分级组分 GRPS-2 (69.94%, 100 $\mu\text{g/mL}$) 和 EPS-2 (90%, 100 $\mu\text{g/mL}$) 对羟基自由基的清除率。

2.5.3 Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 的还原力测定

如图 9 所示,在 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,Ccp-I-A 和 Ccp-I-B 在 700 nm 处测得的还原力分别为 0.55 和 0.22,远远低于同浓度下 V_C 的还原力 (1.2) (表 1),并且也低于文献报道中灵芝菌糠和茶树菇多糖分级组分 GRPS-2 (0.42, 100 $\mu\text{g/mL}$) 和 EPS-2 (0.91, 100 $\mu\text{g/mL}$) 的还原力^[23-24]。

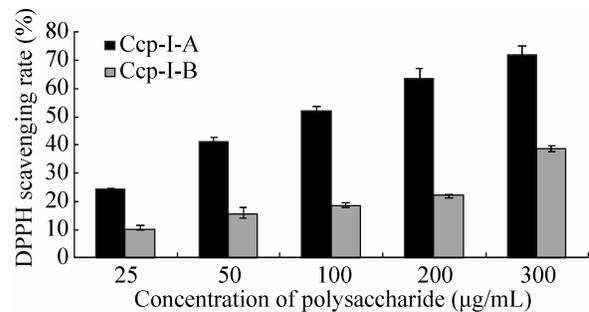


图 7 鸡腿菇多糖组分对 DPPH 的清除作用
Fig. 7 Scavenging effects of polysaccharide components from *Coprinus comatus* on DPPH radicals.

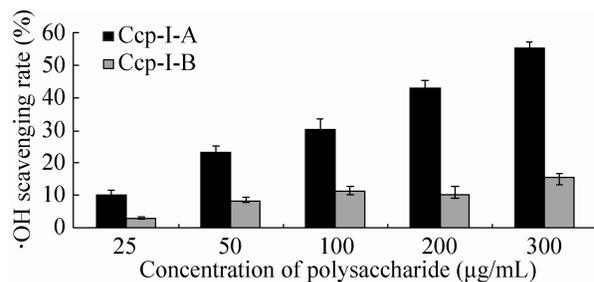


图 8 鸡腿菇多糖对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用
Fig. 8 Scavenging effects of polysaccharide components from *Coprinus comatus* on hydroxyl radicals.

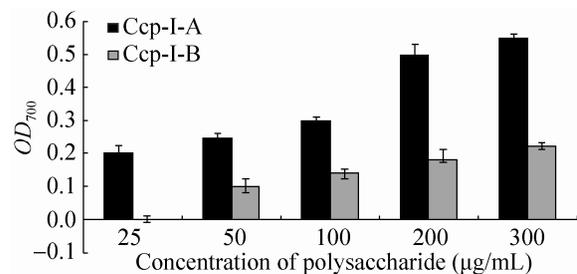


图 9 鸡腿菇多糖的还原力
Fig. 9 Reducing power of polysaccharides components from *Coprinus comatus*.

经分级纯化后多糖组分的抗氧化活性可能降低,也可能升高。对于前者,一方面可能是由于粗多糖在分级纯化过程中除去了许多具有抗氧化能力的糖蛋白、糖肽等活性成分而导致

整体抗氧化能力下降^[25]；另一方面也可能是由于粗多糖中各级组分的协同作用使其具有较强的抗氧化能力，经柱层析分离后此协同作用减弱所致。对于后者，层析分级步骤使得某些具有强氧化活性的多糖单元等组分得到了富集与纯化，使得单位浓度的活性增强。另外，经柱层析分级纯化后的各种多糖组分的抗氧化活性大小也不相同，这可能与各自的空间结构、所含糖单元类型及糖苷键构型、取代基不同有关^[26]。

今后需对鸡腿菇两个分离纯化后的多糖组分进行进一步的结构解析及抗氧化活性的动物实验，深入研究其构效关系，为其作为天然抗氧化剂奠定一定理论基础，也为鸡腿菇水溶性多糖药物的开发及相关功能性食品的研制开辟一条新的路径。

REFERENCES

- [1] Stojković D, Reis FS, Barros L, et al. Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O. F. Müll.) Pers. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 289–296.
- [2] Liu YF, Zhao Y, Yang Y, et al. Structural characteristics and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Coprinus comatus*. *Bioact Carbohyd Diet Fibre*, 2013, 2(2): 164–169.
- [3] Ding ZY, Lu YJ, Lu ZX, et al. Hypoglycaemic effect of comatin, an antidiabetic substance separated from *Coprinus comatus* broth, on alloxan-induced-diabetic rats. *Food Chem*, 2010, 121(1): 39–43.
- [4] Wang Y, Guan HQ, Ma XD. Effects of Maotou Guishan polysaccharide upon body fruit immunologic function in mice with immuno-suppression. *Jilin J Trad Chin Med*, 2010, 30(3): 260–261 (in Chinese).
王岩, 关洪全, 马贤德. 毛头鬼伞多糖对免疫抑制小鼠体液免疫功能的影响. *吉林中医药*, 2010, 30(3): 260–261.
- [5] Yu J, Cui PJ, Xing LG, et al. Effects of selenium-enriched mycelia powder from *Coprinus comatus* on immunity and antioxidation function in diabetic mice. *Acta Nutr Sin*, 2009, 31(2): 198–220 (in Chinese).
余杰, 崔鹏举, 邢立刚, 等. 富硒鸡腿菇菌粉对糖尿病小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响. *营养学报*, 2009, 31(2): 198–220.
- [6] Jiang XG, Lian MX, Han Y, et al. Retraction notice to “Antitumor and immunomodulatory activity of a polysaccharide from fungus *Coprinus comatus* (Mull.: Fr.) Gray” [Int. J. Biol. Macromol 58 (2013) 349–353]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 61: 501.
- [7] Li B, Dobruchowska JM, Gerwig GJ, et al. Structural investigation of water-soluble polysaccharides extracted from the fruit bodies of *Coprinus comatus*. *Carbohyd Polym*, 2013, 91(1): 314–321.
- [8] Xu N, Li XM, Xie RJ, et al. Extraction and bioactivity of polysaccharide from *Coprinus comatus*. *J Chin Inst Food Sci Tech*, 2013, 13(7): 34–39 (in Chinese).
许女, 李向明, 谢瑞杰, 等. 鸡腿菇多糖的提取及生物活性的研究. *中国食品学报*, 2013, 13(7): 34–39.
- [9] Wu YB, Xie LY, Xie LH, et al. A preliminary study on anti-TMV activity of polysaccharide from *Coprinus comatus*. *Chin Agr Sci Bull*, 2007, 23(5): 338–341 (in Chinese).
吴艳兵, 谢荔岩, 谢联辉, 等. 毛头鬼伞多糖抗烟草花叶病毒 (TMV) 活性研究初报. *中国农学通报*, 2007, 23(5): 338–341.
- [10] Zhao HH. Study on the extraction, purification and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from Okra[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2012 (in Chinese).
赵焕焕. 黄秋葵多糖提取纯化及体外抗氧化活性的探讨[D]. 郑州: 郑州大学, 2012.
- [11] Oyaizu M. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic

- solvent and thin layer chromatography. Nipp Shok Kogyo Gakk, 1986, 35(11): 771–775.
- [12] Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 1989, 28(4): 1057–1060.
- [13] Wu YB, Xie LY, Xie LH, et al. Physico-chemical characteristics and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharide from *Coprinus comatus*. *Acta Laser Biol Sin*, 2007, 16(4): 438–442 (in Chinese).
吴艳兵, 谢荔岩, 谢联辉, 等. 毛头鬼伞 (*Coprinus comatus*)多糖的理化性质及体外抗氧化活性. *激光生物学报*, 2007, 16(4): 438–442.
- [14] Yao YJ, Yang RZ, Zhang JS, et al. Optimum isolation and structural analysis of polysaccharide from the fruiting bodies of *Coprinus comatus*. *Microbiol China*, 2007, 34(6): 1071–1076 (in Chinese).
姚毓婧, 杨仁智, 张劲松, 等. 鸡腿菇子实体多糖分离纯化工艺及结构研究. *微生物学通报*, 2007, 34(6): 1071–1076.
- [15] Fan JM, Zhang JS, Tang QJ, et al. Structural elucidation of a neutral fucogalactan from the mycelium *Coprinus comatus*. *Carbohyd Res*, 2006, 341(9): 1130–1134.
- [16] Usui T, Iwasaki Y, Mizuno T. Isolation and characterization of two kinds of heterogalactan from the fruit bodies of *ganoderma applannatum* by employing a column of concan. *Carbohyd Res*, 1981, 92(1): 103–114.
- [17] Cho SM, Koshino H, Yu SH, et al. A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz.). *Carbohyd Res*, 1998, 37(1): 13–18.
- [18] Mukumoto T, Yamaguchi H. The chemical structure of a mannofucogalactan from the fruit bodies of *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. *Carbohyd Res*, 1977, 59(2): 614–621.
- [19] Fraser RN, Karácsonyi S, Lindberg B. Polysaccharides elaborated by *Polyporus pinicola* (Fr.). *Acta Chem Scand*, 1967, 21: 1783–1789.
- [20] Björndal H, Lindberg B. Polysaccharides elaborated by *Polyporus fomentarius* (Fr.) and *Polyporus igniarius* (Fr.): part I. Water-soluble neutral polysaccharides from the fruit bodies. *Carbohyd Res*, 1969, 10(1): 79–85.
- [21] Alquini G, Carbonero ER, Rosado FR, et al. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 230(1): 47–52.
- [22] Zhang YX. Extraction, characterization and antioxidant activities of polysaccharids from *Pleurotus ostreatus*[D]. Hefei: Anhui University, 2012 (in Chinese).
张云侠. 平菇多糖的提取、鉴定及其抗氧化活性研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2012.
- [23] Zhai GY. Extraction, antioxidant, antiaging activity and characteristic of *Ganoderma Lucidum* residue polysaccharide[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
翟国印. 灵芝菌糠多糖的提取、抗氧化抗衰老活性与结构分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- [24] Hao L. Optimization and antioxidant activities of exopolysaccharide and intracellular Selenium polysaccharides by *Agrocybe aegerita*[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
郝龙. 茶树菇胞外多糖及胞内硒多糖的提取优化和抗氧化研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [25] Zhong XK, Jin X, Lai FY, et al. Chemical analysis and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharide extracted from *Opuntia ficus indica* Mill.cultivated in China. *Carbohyd Polym*, 2010, 82(3): 722–727.
- [26] Li YY. Study on the separation, purification, structure and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from *Phyllanthus emblica*. [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010 (in Chinese).
李永裕. 余甘多糖分离纯化、结构和抗氧化活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.

(本文责编 郝丽芳)