

香菇多糖内源性金属离子对其结构和活性的影响

董赵微, 王岸娜, 王慧, 朱俊友*

(河南工业大学粮油食品学院 郑州 450001)

摘要 香菇多糖是香菇中主要活性物质,其结构复杂,活性机制尚不明确,因此对香菇多糖的应用具有局限性。采用水提醇沉法制备香菇粗多糖,Sevage 法脱蛋白得香菇多糖。利用 EDTA-2Na 脱除香菇多糖中金属离子,通过刚果红试验、傅里叶红外光谱、原子力显微镜试验和 DPPH、ABTS、羟基自由基清除试验,以及抑菌试验,比较脱除金属离子前、后香菇多糖结构、抗氧化和抑菌活性的变化。结果表明,脱除金属离子后,香菇多糖三螺旋结构刚性减弱,厚度由 1.2 nm 降低至 0.8 nm;ABTS 和羟基自由基清除能力下降,而 DPPH 自由基清除能力增强,当多糖质量浓度为 1 mg/mL 时,对 DPPH、ABTS 和羟基自由基的清除率分别为 94.94%、83.52% 和 26.52%。抑菌试验表明:脱除金属离子使香菇多糖抑菌作用降低,当多糖质量浓度为 40 mg/mL 时,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈范围分别由 9.50 mm 减小至 8.30 mm、12.25 mm 减小至 11.33 mm。金属离子作为香菇多糖主要成分,参与其结构组成,并对香菇多糖活性有重要影响。

关键词 香菇多糖; 金属离子; AFM; 抗氧化; 抑菌

文章编号 1009-7848(2024)09-0060-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.006

香菇(*Lentinula Edodes*),别名香蕈、香信、冬菇等,伞菌目口蘑科香菇属,是一种含特异芳香物质鸟嘌呤的食用菌^[1]。其肉质肥美,鲜香可口,素有“菌菇皇后”的美誉。香菇在贵州、云南等地大量种植,且我国是香菇出口大国^[2]。据统计,2022 年我国香菇出口量达 52 000.00 t。香菇含有氨基酸、维生素 D、矿物质、多糖、腺苷等多种营养成分^[3-5],具有预防佝偻病,提高免疫力等功效^[6]。香菇多糖的典型结构是以 β -D-(1 \rightarrow 3)葡聚糖残基为主链,侧链为(1 \rightarrow 6)葡聚糖残基的葡聚糖,是香菇子实体中最主要的功能性成分。两个 β -D-(1 \rightarrow 6)Glc 连接到 5 个 β -D-(1 \rightarrow 3)Glc 组成的主链上^[7],形成香菇多糖的三螺旋结构。香菇多糖的单糖组成主要为 D-葡萄糖,除此之外,部分多糖还包括 D-半乳糖、L-阿拉伯糖、D-甘露聚糖等^[8]。多糖与蛋白和核酸相比,其复杂的结构使多糖携带大量的信息。

近几年,多项研究表明,香菇多糖具有抗肿瘤^[9-10]、抗病毒^[11]、抗氧化、免疫调节^[7,12]、降血糖、抗炎^[13]等多种生物活性,香菇多糖之所以具有这些功能,与其独特的结构密不可分。同时分子质量大

小、单糖组成、化学修饰、聚合度以及离子都会影响香菇多糖的活性。香菇多糖含有多种金属离子,这些金属离子会对香菇多糖结构和生物活性产生影响。硒是人体微量元素,参与人体代谢活动,对氧化-还原反应和酶的活性有重要作用。有研究表明,将香菇多糖转化成硒基-香菇多糖后,使人类宫颈癌细胞中产生的活性氧增加,且不同的结合方式会导致不同的生物活性变化^[14]。唐敏等^[15]通过在茶多糖中加入三氯亚铁形成茶多糖-铁复合物,发现在缺铁小鼠体内复合铁的利用率在 102%~110%之间,有望治疗缺铁性贫血。目前针对香菇多糖金属离子的研究主要倾向于外源金属离子,对内源性金属离子的研究相对较少。香菇多糖中含有 K、Mn、Zn、Ca、Mg、Fe 等多种金属元素^[16]。Zn²⁺可以增加细胞膜的渗透性,进而增强抗肿瘤效果。香菇多糖中所含部分金属离子是多种酶的共同因子,可以减少氧化应激的危害^[1,17]。

本研究针对内源性金属离子对香菇多糖结构和活性的影响,通过提取并分离得到香菇粗多糖,用 EDTA-2Na 对香菇多糖进行螯合处理,检测螯合前、后香菇多糖的金属元素组成及含量,比较去除金属元素前、后香菇多糖的结构和生物活性变化,为今后多糖资源的开发利用提供理论依据。

收稿日期: 2023-09-20

基金项目: 河南省重点研发专项(221111112000)

第一作者: 董赵微,女,硕士

通信作者: 朱俊友 E-mail: 18623717532@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

香菇,购自南阳西峡县;无水乙醇(分析纯),四川西陇科学有限公司;金属标准溶液,国家有色金属及电子材料分析测试中心;三氯甲烷(分析纯),洛阳化学试剂厂;正丁醇(分析纯)、乙二醇四乙酸二钠(分析纯)、65%硝酸(优级纯),天津市科密欧化学试剂有限公司;DPPH、ABTS,上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

RE-52AA 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;Ultimaye 3000-ICP RQ 型 ICP-MS,美国赛默飞世尔;MFP-3D Infinity 型原子力显微镜,牛津;759MC 型紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;IARffinity-1s 傅里叶变换红外光谱仪,美国 Thermo Scientific 公司;SHA-BA 型水浴恒温振荡器,上海汉诺仪器有限公司。

1.3 香菇粗多糖的制备

采用水提醇沉法制备香菇粗多糖^[18]。取干香菇,切成 1 mm 的薄片,60 °C 热水浸提 3 h,固液比 1:20 g/mL,浸提 2 次,用 300 目滤袋过滤,收集滤液。合并滤液,于 60 °C 旋蒸浓缩至约 300 mL,加入 3 倍体积无水乙醇醇沉^[19-20]。醇沉液 4 000 r/min 离心,得沉淀,60 °C 干燥箱干燥得香菇粗多糖。

1.4 香菇粗多糖的纯化

采用 Sevage 法对香菇粗多糖进行脱蛋白处理^[21]。取 10 g 粗多糖,溶于 100 mL 去离子水。多糖溶液:Sevage 试剂为(三氯甲烷:正丁醇=4:1):1。剧烈振荡 1 h,3 500 r/min 离心 8 min,取上清液。重复操作 8~10 次,至无白色蛋白质分出。收集上清液,75%乙醇沉淀过夜,4 000 r/min 离心收集沉淀,香菇多糖(LNT)干燥备用。

1.5 内源金属离子螯合

取 LNT,加入等质量 EDTA-2Na,加入去离子水,4 °C 振荡 6 h。振荡结束后,4 °C 去离子水中透析(3 500 u)72 h,每 6 h 更换一次透析液。透析结束后干燥收集备用,得到去离子香菇多糖(EL-NT)。

1.6 金属离子及含量测定

1.6.1 标准曲线的绘制 配制 Fe、Ca、Al、Mn、Cu、Zn、Cr、K、Mg 标准溶液(0.0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,

1.0 mg/kg),以 2%铷元素为内标液,使用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS/MS)测定标准溶液浓度,得到标准曲线回归方程。

1.6.2 样品的测定 采用硝酸辅助微波消解对样品进行消化^[22-24]。准确称取 20 mg 样品于消化管中,加入 5 mL 硝酸。微波消解仪 1 600 W 升温 25 min,爬升至 180 °C,1 600 W 保温消解 30 min。直至管内溶液澄清透明。120 °C 赶酸 3 h,冷却至室温,去离子水定容至 10 mL。采用 ICP-MS 测定其金属含量。

1.7 傅里叶红外测定

试验参照伍芳芳^[25]的方法。溴化钾 150 °C 干燥 24 h,将样品与溴化钾以质量比 1:100 混合均匀,研磨。压制成均匀薄片,4 000~400 cm⁻¹ 频率范围内进行 FT-IR 分析,分辨率为 2 cm⁻¹。

1.8 刚果红试验

参考许盈盈^[26]的方法。配制 2 mg/mL 样品溶液,样品溶液与刚果红溶液(0.2 mmol/L)分别移取 1 mL,加入 2 mL 不同浓度梯度 NaOH 溶液,混合均匀,避光反应 10 min。300~700 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描,测量样品在 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mol/L 氢氧化钠浓度中最大吸收峰。以不加样刚果红溶液为空白对照。

1.9 原子力显微镜

试验方法在 Meng 等^[27]的基础上进行修改。配制 1 μg/mL LNT 和 ELNT 样品溶液,取 0.4 μL 滴加至云母片中心位置,室温条件下自然干燥,进行原子力显微镜扫描,所得图像数据由 AFM 附属软件进行处理。

1.10 体外抗氧化测定

1.10.1 DPPH 自由基清除 试验方法参考 Zi 等^[28]。配制 0.05 mg/mL DPPH 乙醇溶液,避光保存。配制 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/mL 样品溶液。取不同浓度样品溶液 2 mL,加入 2 mL DPPH 溶液。避光反应 30 min,于 517 nm 处测量吸光度,记为 A_s。以无水乙醇代替 DPPH 溶液,吸光度记为 A_b,取 2 mL 的 DPPH 溶液加入 2 mL 无水乙醇,作为对照,记为 A_c,所有样品共用一个对照。所有试验均做 3 个平行。

$$\text{DPPH 自由基清除率(\%)} = [1 - (A_s - A_b) / A_c] \times 100 \quad (1)$$

1.10.2 ABTS 自由基清除 将 ABTS 水溶液(0.699 mg/mL)与过硫酸钾水溶液(4.08 mg/mL)

等体积混合,室温避光反应 12~16 h。将 ABTS 溶液稀释至吸光度为 0.7 ± 0.02 。配制 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL 样品溶液。分别移取各浓度样品溶液 0.8 mL, 加入 4 mL ABTS 溶液, 避光反应 6 min, 于 734 nm 处测吸光度值 A_s , 以去离子水代替样品溶液, 测吸光度值 A_0 。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = (1 - A_s/A_0) \times 100 \quad (2)$$

1.10.3 羟自由基清除 配置 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL 样品溶液。取 2 mL 样品溶液, 加入 2 mL FeSO_4 水溶液 (9 mmol/L), 2 mL 水杨酸-乙醇溶液 (9 mmol/L), 最后加入 2 mL H_2O_2 水溶液 (8.8 mmol/L) 启动反应。漩涡振荡均匀, 于 37 °C 避光水浴 30 min。510 nm 处测吸光度值 A_s 。去离子水代替 H_2O_2 溶液, 测吸光度值 A_c 。去离子水代替样品溶液, 测吸光度值 A_b 。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [A_b - (A_s - A_c)]/A_b \times 100 \quad (3)$$

1.11 微生物抑制试验

1.11.1 菌种活化 配制 LB 液体培养基 (胰蛋白胨 10 g/L, 酵母浸膏 5 g/L, 氯化钠 10 g/L)。以体积比 1:100 添加大肠杆菌 (金黄色葡萄球菌) 菌浊液。37 °C 培养 24 h, 备用。

1.11.2 香菇多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌试验 将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 生化培养箱中培养 24 h, 无菌生理盐水稀释菌悬液至 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL, 涂布接种于固体培养基。制备直径 6.0 mm 的圆形滤纸, 分别浸泡于质量浓度为 10, 20, 30, 40, 50 mg/mL 香菇多糖溶液中, 浸泡时间为 2 h, 浸泡结束后烘干备用。对照组浸泡在无菌生理盐水中, 其它处理条件同前。将滤纸贴到固体培养基上, 每个培养基上做 3 个平行, 无菌生理盐水做空白对照。37 °C 培养 24 h 后, 观察抑菌圈大小, 用游标卡尺测量并记录抑菌圈直径平均值。

1.12 数据处理与统计分析

运用 Excel 数据处理软件, 采用 SPSS 软件处理试验数据, $P < 0.05$ 为显著性差异。所有数据均为 3 次重复试验的平均值。使用 Origin 2018 绘图。

2 结果与分析

2.1 金属离子种类及含量

通过热水浸提法所得香菇多糖提取率为

(15.56 ± 3.12)%, 与胡洋等^[29]热水浸提结果一致。经过 EDTA-2Na 螯合作用, 香菇多糖中部分金属离子被脱除, 用 ICP-MS 检测螯合前后香菇多糖金属离子的种类和含量。去除空白样品中所含金属离子, 结果见表 1。

表 1 LNT 和 ELNT 金属元素组成及含量 (mg/g)

Table 1 Composition and content of metal elements in LNT and ELNT (mg/g)

金属元素	LNT	ELNT
K	112.28 ± 9.55	5.58 ± 0.42
Ca	0.56 ± 0.06	0.86 ± 0.09
Mg	11.10 ± 0.95	7.15 ± 0.47
Fe	0.29 ± 0.06	0.21 ± 0.08
Zn	0.27 ± 0.01	0.08 ± 0.00
Mn	0.16 ± 0.02	0.04 ± 0.00
Cu	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Cd	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

香菇中金属离子主要来源于环境, 因此不同地区香菇所含金属离子各有不同^[6]。螯合前后香菇多糖中均含有 K、Ca、Na、Mg 等多种金属元素, 只是含量不同。经过 EDTA-2Na 螯合过后, 香菇多糖中含量较高的 Mg、Fe、Zn 脱除效果显著。K 离子含量最高为 112.28 mg/g, 通过螯合作用, 香菇多糖中 K 被有效脱除。Ca 脱除后含量增高可能是由于试验过程中产生的环境污染。香菇多糖具有金属离子螯合能力, 因此部分金属离子并未完全去除。该试验结果证明香菇多糖螯合金属离子能力小于 EDTA-2Na, EDTA-2Na 螯合作用可以有效脱除香菇多糖中金属离子。

2.2 傅里叶红外光谱分析

红外光谱可以判断糖苷键类型, 官能团类型和糖环构型, 常用于判断多糖的初级结构。如图 1 所示, LNT 在 3393 cm^{-1} 附近有强吸收峰, 该吸收峰为糖特征吸收峰, 是羟基伸缩运动和 C-H 拉伸振动^[30]。在 2929 cm^{-1} 附近的吸收峰为 C-H 键对称伸缩振动, 说明存在 -CH, -CH₂, -CH₃^[31]。在 1633 cm^{-1} 处的吸收峰代表 H-O-H 弯曲伸缩振动, 是结合水分子剪切运动引起^[32]。在 1305 cm^{-1} 附近波段为 O-H 变形振动, 1078 cm^{-1} 处吸收峰代表吡喃糖环。ELNT 在 $3399, 2922 \text{ cm}^{-1}$ 和

1 634 cm^{-1} 附近同样出现糖的特征吸收峰,在 1 207~1 242 cm^{-1} 波段出现的吸收峰为 O-H 变形振动,表明金属离子可能链接在 O-H 上。在 1 417 cm^{-1} 附近的吸收峰为糖醛酸的羧基吸收峰^[31],因为 -C=O 结构具有螯合金属离子的作用,去除金属离子后,羧基吸收峰增强。1 085 cm^{-1} 和 1 028 cm^{-1} 处的吸收峰的代表吡喃糖环。在 899 cm^{-1} 附近的吸收峰 β 型葡聚糖,在 850 cm^{-1} 附近的吸收峰为 α 型葡聚糖^[32]。由图可以看出 LNT 和 ELNT 都是 β 型葡聚糖。说明经过 EDTA-2Na 处理,部分金属离子去除后并未对糖的特征峰产生影响,但其取代基和官能团发生一定变化。

2.3 刚果红试验

香菇多糖的三螺旋结构主要受键连接方式、分子质量大小、支化结构、分子间氢键及取代基团的静电排斥作用的影响^[33]。刚果红是一种酸性染料,可以与含有三螺旋结构的多糖形成络合物,强碱破坏刚果红-多糖络合物时,最大吸收波长发生红移,因此常用来检测多糖中是否存在三螺旋结构^[11]。由图 2 可以看出,与刚果红相比,LNT 最大吸收波长发生明显红移,由此可知 LNT 中存在有序三螺旋结构^[34]。随着碱浓度增加,三螺旋结构由有序逐渐转变为无序三螺旋。ELNT 最大吸收峰红移趋势较弱,可能是由于金属离子的去除影响了分子间氢键和键的连接方式,使得链的刚性变弱,三螺旋结构由有序变为无序或相对松散的结构,或者部分被破坏^[21]。

2.4 原子力显微镜

香菇多糖由于分子质量大,结构复杂,无法得到较好晶型,对其二级结构和其高级结构的研究较为复杂,原子力显微镜是研究多糖高级结构十分有力的工具。香菇多糖的原子力显微镜如图 3 所示,香菇多糖链的密度依赖于糖液原始浓度,浓度越大,糖链含量越高。LNT 和 ELNT 在水溶液中均存在链状结构,LNT 糖链分子之间由于氢键作用相互缠绕,链间通过糖单元间不同链接方式形成环状侧链结构^[35],香菇多糖平均厚度约为 1.12 nm^[36-37]。香菇多糖在水溶液中由于聚合度不同而高度不同。从 3D 图可以看出 LNT 糖链高度约为 1 nm,该结果与 Zhang 等^[36]研究结果一致。ELNT 样品 3D 图中可以看出 ELNT 表面形貌凹凸不平,

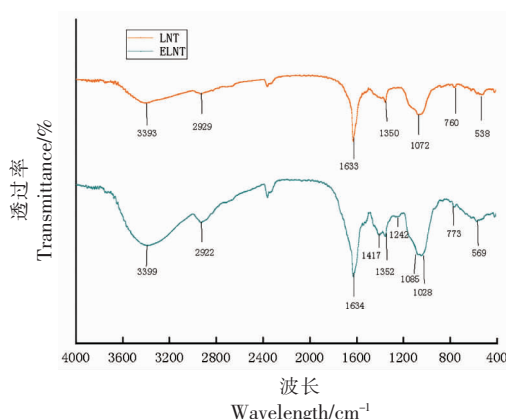


图 1 LNT 和 ELNT 的傅里叶红外光谱

Fig.1 The IR spectra of LNT and ELNT

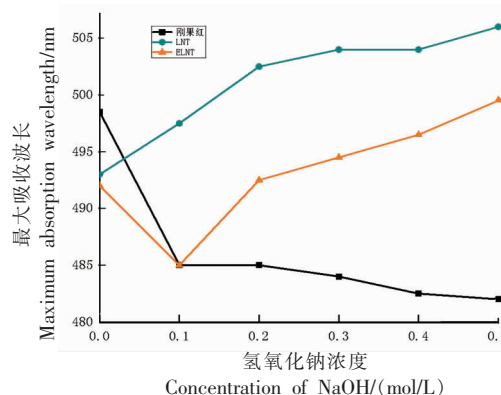


图 2 LNT 和 ELNT 的刚果红试验结果

Fig.2 The results of Congo red experiments for LNT and ELNT

链高 0.8 nm,而颗粒状多糖高度较低,可能和其内部三维结构的相互作用力有关。香菇多糖脱除金属离子后一定程度上破坏了糖链结构,使得糖链发生解旋,分子间缠绕减少,说明金属离子参与糖链链接,脱除金属离子后,糖链高度降低。3D 图可以看出香菇多糖有许多高低不同,形似山丘状的突起结构,直接证实香菇多糖大分子具有高度分支的化学结构^[38]。

2.5 体外抗氧化

2.5.1 DPPH 自由基清除能力 DPPH 是一种稳定的自由基,其醇溶液呈紫红色,当存在自由基清除剂的时候,DPPH 的单电子可以接收氢离子或电子,而使颜色变浅,常用于检测各种天然成分的自由基清除能力^[32]。本研究显示,样品的自由基清

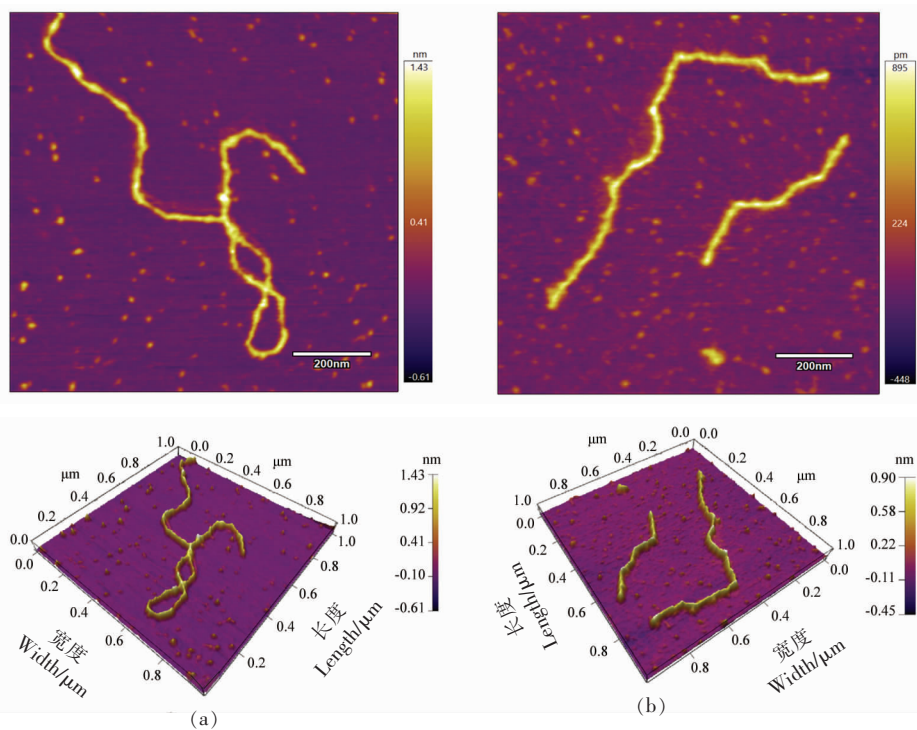
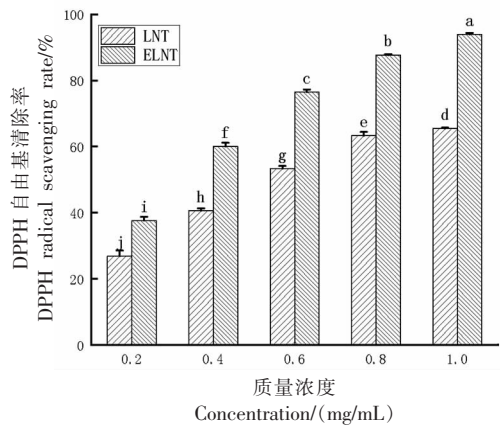


图3 LNT(a)和ELNT(b)的原子力显微镜图

Fig.3 AFM images of LNT(a) and ELNT(b)



注：不同小写字母表示不同浓度的各样品与DPPH自由基清除率之间存在显著差异(P<0.05)。

图4 LNT和ELNT清除DPPH自由基活性

Fig.4 DPPH radical scavenging activity of LNT and ELNT

除率随样品浓度增加而增强,具有剂量依赖性。脱除金属离子后样品的DPPH自由基清除率高于未脱除金属离子多糖。这可能是因为ELNT主要元素含量和多糖结构发生了变化,单电子含量升高,从而使得抗氧化性增强。

2.5.2 ABTS自由基清除能力分析 ABTS在氧化剂作用下氧化成绿色,该颜色变化是由于抗氧化剂转移氢原子或使电子失活。如图LNT和ELNT对ABTS自由基的抑制作用随样品浓度增大而增强,且不同浓度间差异性显著。多糖脱除金属离子后清除ABTS自由基的能力下降。试验结果与Qian等^[17]研究结果一致。可能是由于脱除金属离子后香菇多糖提供电子能力下降,导致其活性降低。

2.5.3 羟自由基清除能力分析 由图可以看出,随着样品浓度的增加,羟自由基清除率增强,且具有剂量依赖性。脱除金属离子的样品羟自由基清除率显著下降。且随着ELNT浓度的增加,羟自由基清除能力缓慢上升,0.2 mg/mL和0.4 mg/mL之间自由基清除率差异性不显著,但随着ELNT浓度升高,自由基清除率表现出显著性差异。在浓度为1 mg/mL时,LNT的羟自由基清除率最高,可达89%,ELNT的羟自由基清除率达到27%。金属离子减少,减少羟自由基的生成量,使得抗氧化性降低。由此可见,金属离子对羟自由基的清除作用有较大影响^[17]。

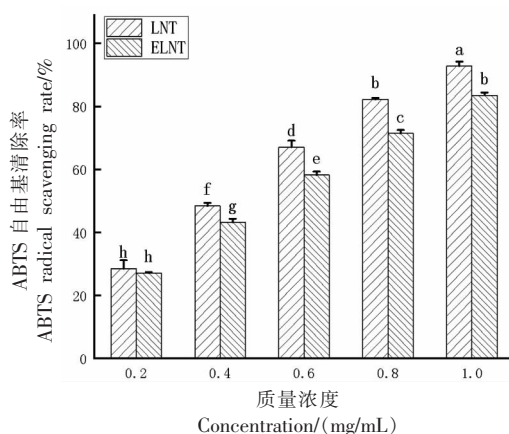


图 5 LNT 和 ELNT 清除 ABTS 自由基活性
Fig.5 ABTS radical scavenging activity of LNT and ELNT

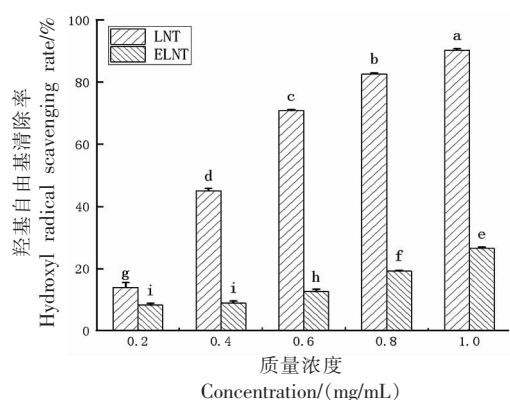


图 6 LNT 和 ELNT 的羟基自由基清除
Fig.6 Hydroxyl radical scavenging of LNT and ELNT

2.6 微生物抑制试验

由表 2 可以看出, LNT, ELNT 均可抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长, 且对金黄色葡萄球菌抑制作用更加显著。脱除金属离子后 ELNT 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制作用均下降, 但随着多糖浓度的增大, 其抑菌效果越好。由此推

测香菇多糖内源性金属离子脱除后, 静电斥力、分子内以及分子间氢键的相互作用减弱, 使得香菇多糖三螺旋结构遭受一定程度的破坏。且部分多糖链的分子间缠绕解旋, 颗粒状多糖增多, 导致其抑菌活性降低。

表 2 LNT 和 ELNT 抑菌效果

Table 2 Antimicrobial effects of LNT and ELNT

样品质量浓度/ (mg/mL)	LNT		ELNT	
	大肠杆菌/mm	金黄色葡萄球菌/mm	大肠杆菌/mm	金黄色葡萄球菌/mm
10	6.03 ± 0.06 ^c	10.38 ± 0.18 ^b	6.08 ± 0.14 ^c	9.38 ± 0.53 ^c
20	7.83 ± 0.76 ^b	10.58 ± 0.52 ^b	7.00 ± 0.25 ^c	10.00 ± 0.41 ^{bc}
30	8.88 ± 1.24 ^{ab}	11.25 ± 0.50 ^{ab}	8.25 ± 0.87 ^b	10.33 ± 0.72 ^b
40	9.50 ± 0.90 ^a	12.25 ± 1.09 ^a	8.30 ± 1.00 ^b	11.33 ± 0.52 ^a
50	10.17 ± 0.58 ^a	12.58 ± 1.01 ^a	10.2 ± 0.50 ^a	11.75 ± 0.35 ^a

注: 不同字母表示同列之间数据存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 结论

香菇多糖具有抗氧化、抗衰老、抗抑郁、抗炎等方面的作用, 近年来对其活性研究较多, 但对其构效关系研究较少。在本研究中, 经过 EDTA-2Na 螯合处理后, 香菇多糖金属离子含量相对降低。去除金属离子后, 香菇多糖的糖苷键类型, 糖环构型均未发生变化, 但其三螺旋结构刚性变弱, 部分三螺旋结构被破坏; 原子力显微镜扫描图谱可以看出, ELNT 颗粒状多糖含量较多, 链的厚度变低, 由此可知, 金属离子的存在参与了香菇多糖高级结

构的形成。因为香菇多糖复杂的结构携带大量的信息, 其构效关系至今仍为研究热点, 且其复杂的结构使得香菇多糖具有多种生物活性。研究表明, 香菇多糖的三螺旋结构是生物活性的主要来源。去除金属离子后, 香菇多糖的 ABTS 自由基和羟自由基清除能力均有所下降, 但其 DPPH 自由基清除率有所提高, 表明金属离子对香菇多糖的活性有较大影响。脱除金属离子后, LNT 仍对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有抑制作用, 但其抑菌效果下降。

参 考 文 献

- [1] 缪士毅. 菇中之王数香菇[J]. 保健医苑, 2018(10): 60-61.
MIAO S Y. The king of mushrooms is shiitake mushrooms[J]. Health Care, 2018(10): 60-61.
- [2] 徐玉妹, 张润清. 我国香菇产业现状及未来发展分析[J]. 中国食用菌, 2021, 40(10): 89-92, 96.
XU Y M, ZHANG R Q. Analysis on the present situation and future development of *lentinus edodes* industry in China[J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(10): 89-92, 96.
- [3] 黄世群, 秦琳, 仲伶俐, 等. 羊肚菌与香菇主要营养成分分析及氨基酸评价[J]. 四川农业科技, 2022, 417(6): 58-60.
HUANG S Q, QIN L, ZHONG L L, et al. Analysis of main nutrients and amino acid parity of morel mushroom and mushroom [J]. Sichuan Agricultural Science and Technology, 2022, 417(6): 58-60.
- [4] 孙恬, 姚松君, 刘凤松, 等. 我国四大产区香菇的营养成分比较[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 97-103, 293.
SUN T, YAO S Y, LIU F S, et al. A comparative study on nutritional compositions of *lentinula edodes* in four main producing regions in China[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 97-103, 293.
- [5] 李巧珍, 姜宁, 李正鹏, 等. 香菇营养品质评价体系的构建[J]. 核农学报, 2021, 35(4): 881-890.
LI Q Z, JIANG N, LI Z P, et al. Establishment of the nutritional quality evaluation system for *lentinula edodes*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(4): 881-890.
- [6] 张弘, 王琦, 姚骏, 等. 香菇柄营养成分及生物活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(7): 203-206.
ZHANG H, WANG Q, YAO J, et al. Study on nutritional composition and biological activity of *lentinus edodes* stipe[J]. Food Research and Development, 2019, 40(7): 203-206.
- [7] ROSZCZYK A, TURŁO J, ZAGOŹDŹON R, et al. Immunomodulatory properties of polysaccharides from *Lentinula edodes*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 8980.
- [8] 戴伟, 刘新义, 胡雄彬, 等. 香菇多糖的分子量和结构与生物活性之间的关系[J]. 中南药学, 2012, 10(6): 453-456.
DAI W, LIU X Y, HU X B, et al. The relationship between molecular weight and structure of lentinan and its biological activity[J]. Central South Pharmacy, 2012, 10(6): 453-456.
- [9] XU H Y, QI Z W, ZHAO Q, et al. Lentinan enhances the antitumor effects of Delta-like 1 via neutrophils[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 918.
- [10] WANG W, YANG X, LI C, et al. Immunogenic cell death (ICD) of murine H22 cells induced by Lentinan [J]. Nutrition and cancer, 2021, 74 (2): 640-649.
- [11] REN G M, XU L M, LU T Y, et al. Structural characterization and antiviral activity of lentinan from *Lentinus edodes* mycelia against infectious hematopoietic necrosis virus[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 1202-1210.
- [12] YANG Y, SONG S, NIE Y Y, et al. Lentinan alleviates arsenic-induced hepatotoxicity in mice via downregulation of OX40/IL-17A and activation of Nrf2 signaling[J]. BMC Pharmacology & Toxicology, 2022, 23(1): 16.
- [13] MENG M J, HUO R, WANG Y, et al. Lentinan inhibits oxidative stress and alleviates LPS-induced inflammation and apoptosis of BMECs by activating the Nrf2 signaling pathway[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222: 2375-2391.
- [14] JIA X W, LIU Q Y, ZOU S W, et al. Construction of selenium nanoparticles/ β -glucan composites for enhancement of the antitumor activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 434-442.
- [15] 唐敏敏, 汪东风, 侯仰锋, 等. 茶多糖铁复合物对缺铁性贫血大鼠补铁效果研究[J]. 微量元素与健康研究, 2009, 26(2): 4-7, 11.
TANG M M, WANG D F, HOU Y F, et al. Effect of polysaccharide iron complex on iron supplementation in iron-deficiency anemia rats [J]. Studies of Trace Elements and Health, 2009, 26(2): 4-7, 11.
- [16] 钱怡霖, 汪东风, 范明昊, 等. 多糖中金属离子对其抗氧化活性及抗肿瘤活性的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 52-60.
QIAN Y L, WANG D F, FAN M H, et al. Effects of metal ions in polysaccharides on their antioxidant activity and antitumor activity[J]. Journal of Chinese

- Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 52-60.
- [17] QIAN Y L, WANG D F, FAN M H, et al. Effects of intrinsic metal ions of lentinan with different molecular weights from *Lentinus edodes* on the antioxidant capacity and activity against proliferation of cancer cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120(PA): 73-81.
- [18] 敖珍, 罗迎春, 刘杨, 等. 香菇多糖提取技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(8): 202-208.
- AO Z, LUO Y C, LIU Y, et al. Extraction technology of lentinan: A review[J]. Food Research and Development, 2022, 43(8): 202-208.
- [19] 胡丽玲, 刘世柱, 吴志君, 等. 水提法同步提取分离香菇中蛋白质和多糖的工艺研究[J]. 食药菌, 2019, 27(5): 316-319.
- HU L L, LIU S Z, WU Z J, et al. Study on simultaneous extraction and separation of protein and polysaccharide from lentinula edodes by water extraction[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2019, 27(5): 316-319.
- [20] 鹿士峰. 香菇活性物质的提取分离纯化及抗氧化活性研究[D]. 聊城: 聊城大学, 2019.
- LU S F. Study on extraction, isolation, purification and antioxidant activity of active component from lentinus edodes[D]. Liaocheng: Liaocheng University, 2019.
- [21] HUA Y, ZHANG H H, FU Q, et al. Effects of ultrasound modification with different frequency modes on the structure, chain conformation, and immune activity of polysaccharides from *Lentinus edodes*[J]. Foods, 2022, 11(16): 2470.
- [22] 方文清, 郭娜, 董昌平, 等. 9种中药材中25种微量元素含量的ICP-MS法测定及统计分析[J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(10): 31-38.
- FANG W Q, GUO N, DONG C P, et al. Determination of 25 trace elements in 9 kinds Chinese herbal medicine by ICP-MS and its statistical analysis[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2021, 40(10): 31-38.
- [23] 胡军华, 刘威, 仲海洁, 等. ICP-MS对六味地黄多糖部位微量元素含量及其溶出特性的研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 649-653.
- HU J H, LIU W, ZHONG H J, et al. Investigation of elemental concentration and extraction rate of polysaccharides from Liuwei Dihuang prescription"by ICP-MS[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(4): 649-653.
- [24] WANG Y, YUAN X, LIU L, et al. Multielement principal component analysis and origin traceability of rice based on ICP-MS/MS[J]. Journal of Food Quality, 2021, 2021(1): 5536241.
- [25] 伍芳芳. 猴头菇多糖的结构表征、免疫调节活性及其机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- WU F F. Structural characterization, immunomodulatory activities and underlying mechanism of hericium erinaceus polysaccharide[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [26] 许盈盈. 灰树花多糖的提取、分离纯化、表征及生物活性的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022.
- XU Y Y. Study on extraction, purification, characterization and bioactivity of Grifola frondosa polysaccharide[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2022.
- [27] MENG Y, SHI X D, CAI L Q, et al. Triple-helix conformation of a polysaccharide determined with light scattering, AFM, and molecular dynamics simulation[J]. Macromolecules, 2018, 51(24): 10150-10159.
- [28] ZI Y S, ZHANG B, JIANG B, et al. Antioxidant action and protective and reparative effects of lentinan on oxidative damage in HaCaT cells[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2018, 17(6): 1108-1114.
- [29] 胡洋, 崔春, 陶倩, 等. 热水浸提及乙醇沉淀的工艺优化提高猴头菇多糖提取率[J]. 中国调味品, 2020, 45(1): 1-4, 19.
- HU Y, CUI C, TAO Q, et al. Optimization of hot water extraction and ethanol precipitation process for improving the extraction rate of polysaccharides from hericium erinaceus[J]. China Condiment, 2020, 45(1): 1-4, 19.
- [30] WANG Y F, JIA J X, REN X J, et al. Extraction, preliminary characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella radicata* mushroom[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 175.
- [31] 汪梦雯. 灵芝、香菇和茯苓多糖的提取、结构表征及降糖活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2021.
- WANG M W. Optimization of extraction technology and biological activity of polysaccharides from Ganoderma lucidum, lentinus edodes and fu brick tea[D]. Xian: Shaanxi University of Science and Technolo-

- gy, 2021.
- [32] CHEN Y, XIE M Y, NIE S P, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*[J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 231–241.
- [33] 王家腾, 王贺聪, 刘蕾. 香菇多糖构效关系的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(19): 363–369.
WANG J T, WANG H C, LIU L. Progress in research on structure–function relationship of lentinan [J]. Food Science, 2019, 40(19): 363–369.
- [34] ZHANG C, FU Q, HUA Y, et al. Correlation of conformational changes and immunomodulatory activity of lentinan under different subcritical water temperature[J]. Food Bioscience, 2022, 50(PA): 102061.
- [35] 孙润广, 张静. 甘草多糖螺旋结构的原子力显微镜研究[J]. 化学学报, 2006(24): 2467–2472.
SUN R G, ZHANG J. A study of helical structure of glycyrrhiza polysaccharides by atomic force microscope[J]. Acta Chimica Sinica, 2006(24): 2467–2472.
- [36] ZHANG X F, ZHANG L N, XU X J. Morphologies and conformation transition of lentinan in aqueous NaOH solution[J]. Biopolymers, 2004, 75(2): 187–195.
- [37] WANG X H, XU X J, ZHANG L N. Thermally induced conformation transition of triple–helical lentinan in NaCl aqueous solution[J]. The Journal of Physical Chemistry, 2008, 112(33): 10343–10351.
- [38] 杨永利, 郭守军, 叶文斌, 等. 银合欢种子多糖微结构的原子力显微镜观察[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 99–102.
YANG Y L, GUO S J, YE W B, et al. Microstructural observation of leucaena glauca seed polysaccharides under atomic force microscope [J]. Food Science, 2012, 33(15): 99–102.

Effects of Endogenous Metal Ions on the Structure and Activity of Lentinan

Dong Zhaowei, Wang Anna, Wang Hui, Zhu Junyou*

(College of Grain and Oil Food, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001)

Abstract Lentinan is the main active substances in *Lentinus edodes*, but its structure is complex and the activity mechanism is not clear, so the application of lentinan is limited. Therefore, deepening the discussion of the structure–activity relationship of lentinan is helpful to fully explore the medicinal value of lentinan, and it is of great significance for the research and development of new products. *Lentinus edodes* crude polysaccharide was prepared by water extraction and alcohol precipitation method, and *Lentinus edodes* polysaccharide was deproteinized by Sevage method. EDTA–2Na was used to remove metal ions from lentina edodes. Congo red test, Fourier infrared spectroscopy, atomic force microscopy, DPPH, ABTS, hydroxyl radical scavenging experiments and antibacterial experiments were used to compare the changes of the structure, antioxidant and antibacterial activities of lentina edodes before and after metal ions removal. The results showed that after metal ions were removed, the rigidity of the triple helix structure of lentinus was weakened, and the chain thickness decreased from 1.2 nm to 0.8 nm. The scavenging ability of Lentinan on ABTS and hydroxyl free radicals decreased, while the scavenging ability of DPPH free radicals increased. When the concentration of polysaccharide was 1 mg/mL, the scavenging rates of DPPH, ABTS and hydroxylradical were 94.94%, 83.52% and 26.52%, respectively. The bacteriostatic test showed that the bacteriostatic effect of lentinan was decreased by removing metal ions. When the concentration of polysaccharide was 40 mg/mL, the range of inhibition zone against *E. coli* and *Staphylococcus aureus* decreased from 9.50 mm to 8.30 mm and 12.25 mm to 11.33 mm, respectively. Metal ions, as the main components of lentinan, participate in its structural composition and play an important role in its activity.

Keywords lentinan; metal ions; atomic force microscope; antioxidant; inhibition of bacteria