

## 富硒前、后海鲜菇菌粉多糖的制备、表征和免疫活性

肖小年<sup>1</sup>, 于苗苗<sup>1</sup>, 万谦<sup>1</sup>, 易醒<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南昌大学 中德联合研究院 南昌 330047

<sup>2</sup>南昌大学 中德食品工程中心 南昌 330047)

**摘要** 为研究富硒前、后海鲜菇菌粉多糖的理化性质、微观形貌、化学键结合方式和免疫活性,以富硒海鲜菇菌粉和海鲜菇菌粉为原料,制备富硒海鲜菇菌粉多糖(Se-HMP)和海鲜菇菌粉多糖(HMP)。采用糖醛酸含量测定、刚果红试验、傅里叶红外光谱扫描、电镜扫描等表征试验,利用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型,以增殖活性、吞噬活性、细胞因子含量为评价指标评价多糖免疫活性。结果表明,富硒海鲜菇菌粉的粗多糖得率为(22.90±1.62)%,是海鲜菇菌粉的 1.99 倍。Se-HMP 中的糖醛酸含量为(15.60±1.46)%,显著高于 HMP(P<0.05)。Se-HMP 和 HMP 均无三螺旋结构,而二者微观形貌相差较大。Se-HMP 中多糖与硒以 Se=O 键和 O-Se-O 键的形式结合。与 HMP 相比,Se-HMP 质量浓度在 0.05~1.00 mg/mL 范围内可提高 RAW264.7 细胞的增殖活性,显著促进其分泌 NO 和 TNF- $\alpha$ (P<0.05),而二者上调 IL-6 水平的能力相近。此外,低质量浓度( $\leq 0.25$  mg/mL)的 Se-HMP 和高质量浓度( $\geq 0.50$  mg/mL)的 HMP 均可促进巨噬细胞的吞噬作用。结论:与未富硒的 HMP 相比,Se-HMP 具有更高的免疫活性,这可能与 Se-HMP 中多糖和硒的有机结合及糖醛酸含量较高有一定关系。

**关键词** 富硒多糖; 海鲜菇菌粉; 表征; RAW264.7 细胞; 免疫活性

**文章编号** 1009-7848(2025)01-0085-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.008

海鲜菇(*Hypsizygus marmoreus*)是真菌界担子菌门担子菌纲伞菌目白蘑科玉蕈属大型真菌,为真姬菇的纯白色品系,菌柄较长,口感松脆,具有独特的蟹味<sup>[1]</sup>。市场销售的海鲜菇通常是由菌丝体分化发育形成的子实体,其生长周期长,需要消耗大量人力、物力才能获得。海鲜菇的子实体和菌丝体均具有良好的富硒能力,且菌丝体发酵有较多优势,如:可不受季节和气候的限制,发酵周期短,富硒率高,所需生长空间小,污染几率低,产物含有子实体功效相似的胞内外物质等。近年来,海鲜菇菌丝体作为富硒载体的研究和应用逐渐受到关注<sup>[2]</sup>。

利用食用菌菌丝体富硒发酵对其多糖进行硒化修饰,可获得富硒多糖<sup>[3]</sup>。这种生物转化法与化学法<sup>[4]</sup>相比,所获得的天然富硒多糖具有更好的生理活性和安全性<sup>[5]</sup>。由于菌丝体发酵产物中含有丰富的多糖类物质,因此它可作为提取富硒多糖的优质原料<sup>[6]</sup>。与普通菌菇多糖相比,富硒食用菌菇多糖作为生物大分子多糖与硒的天然结合体,在

抗肿瘤、抗氧化,提高免疫力等作用方面具有优势<sup>[4]</sup>,其中多糖富硒后,调节免疫系统的作用尤为受到重视。据报道,富硒多糖可通过促进免疫细胞,如巨噬细胞、树突状细胞、淋巴细胞等的增殖和分化来调节免疫系统,促进免疫系统清除抗原性异物,提高机体免疫能力<sup>[7-8]</sup>,维持人体生理平衡和健康<sup>[9]</sup>。已报道的富硒食用菌多糖有灵芝菌丝多糖<sup>[10]</sup>、羊肚菌丝多糖<sup>[11]</sup>、杏鲍菇多糖<sup>[12]</sup>等。

目前有关富硒海鲜菇菌粉多糖的研究还较少,对其认识不足。本文通过富硒前、后海鲜菇菌粉的提取和初步纯化,分别得到富硒海鲜菇菌粉多糖(Selenium-enriched *Hypsizygus marmoreus* mycelium polysaccharide, Se-HMP)和海鲜菇菌粉多糖(*Hypsizygus marmoreus* mycelium polysaccharide, HMP),对它们的理化性质、微观形貌、化学键结合形式和免疫活性进行研究,可为富硒海鲜菇菌粉多糖的应用提供理论支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

富硒海鲜菇菌粉、海鲜菇菌粉,实验室自制;氢氧化钠、浓硫酸、硫酸铵、硝酸、高氯酸、溴化钾、四硼酸钠均为分析纯级,西陇科学股份有限公司;

收稿日期: 2024-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(32360575, 31960455)

第一作者: 肖小年,女,硕士,教授

通信作者: 易醒 E-mail: yixingt@hotmail.com

苯酚、刚果红、牛血清白蛋白、咪唑、半乳糖醛酸均为分析纯级,上海麦克林生化技术有限公司;考马斯亮蓝(分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;小鼠巨噬细胞(RAW264.7),中科院上海细胞库;DEME高糖培养基、青链霉素双抗、胎牛血清、Cell Counting Kit-8(CCK-8),北京索莱宝生物科技有限公司;小鼠NO试剂盒,南京建成生物工程研究所;小鼠TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒、小鼠IL-6 ELISA试剂盒,上海抚生实业有限公司。

## 1.2 主要仪器与设备

PHS-25型pH计,雷兹互感器(上海)有限公司;N-110型旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司;1510型酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Nicolet 5700型傅里叶红外光谱仪,美国热电尼高力公司;7800型电感耦合等离子体质谱仪,安捷伦科技有限公司;JSM-6701F型扫描电镜,日本电子株式会社;BB150型二氧化碳培养箱、1300系列II级A2型生物安全柜,赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 菌粉多糖的制备** 采用超声辅助稀碱液浸提醇沉法<sup>[13]</sup>提取菌粉粗多糖,取菌粉适量,加入0.03 mol/L氢氧化钠溶液(料液比1:30, g/mL),85℃下浸提2 h后超声20 min(功率250 W),冷却至室温,5 000 r/min离心10 min,收集上清液,浓缩至原体积1/4,加入3倍体积无水乙醇后静置过夜,离心并收集沉淀,60℃烘干至恒重,粉碎,得到粗多糖。将粗多糖配制成10 mg/L水溶液,边搅拌边加入硫酸铵使其饱和度达到35%,完全溶解后磁力搅拌30 min(转速600 r/min),4℃静置12 h后,5 000 r/min离心15 min,收集上清液,使用透析袋(3 500 u)透析3 d。取透析后的多糖溶液冷冻干燥制得Se-HMP和HMP。

**1.3.2 理化性质的测定** Se-HMP、HMP放于白瓷板上,观察其色泽、状态,并嗅其气味;配制1 mg/mL的Se-HMP、HMP水溶液,(20 $\pm$ 1)℃下测定pH值;取1.3.1节中上清液,适当稀释,采用苯酚-硫酸法<sup>[14]</sup>测定并按照式(1)计算粗多糖得率;配制1 mg/mL的Se-HMP、HMP水溶液,适当稀释后采用苯酚-硫酸法测定并按式(2)计算多糖含量;配制1 mg/mL的Se-HMP、HMP水溶液,稀释后采

用咪唑-硫酸法<sup>[15]</sup>测定并按式(3)计算出多糖中糖醛酸含量;准确称取0.200 g Se-HMP,参照《食品安全国家标准 食品中硒的测定》(GB 5009.93-2017)进行湿法消解,消化结束后冷却至室温,转移至10 mL容量瓶中,蒸馏水定容,混匀,适当稀释后过0.22  $\mu$ m水相滤膜,依据《食品安全国家标准 食品中硒的测定》(GB 5009.93-2017)第三法(电感耦合等离子体质谱法)进行硒含量测定,并按式(4)计算多糖硒含量。

$$\text{粗多糖得率}(\%) = \frac{C \times V \times D}{M \times 10^6} \times 100 \quad (1)$$

式中: $C$ 为多糖质量浓度, $\mu$ g/mL; $V$ 为浸提液总体积,mL; $D$ 为稀释倍数; $M$ 为菌粉总质量,g。

$$\text{多糖含量}(\%) = \frac{C_1 \times D}{C_{\text{原}}} \times 100 \quad (2)$$

式中: $C_1$ 为多糖质量浓度, $\mu$ g/mL; $D$ 为稀释倍数; $C_{\text{原}}$ 为配制得多糖质量浓度,mg/mL。

$$\text{糖醛酸含量}(\%) = \frac{C_1 \times D}{C_2} \times 100 \quad (3)$$

式中: $C_1$ 为糖醛酸质量浓度, $\mu$ g/mL; $C_2$ 为多糖质量浓度,mg/mL; $D$ 为稀释倍数。

$$\text{多糖硒含量}(\text{mg/kg}) = \frac{c \times D}{C} \quad (4)$$

式中: $c$ 为总硒质量浓度,mg/L; $D$ 为稀释倍数; $C$ 为菌粉多糖质量浓度,kg/L。

**1.3.3 刚果红试验** 取2 mg/mL Se-HMP和HMP水溶液1.0 mL于离心管中,加入浓度为0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mol/L的NaOH溶液3 mL,再加入0.2 mmol/L刚果红溶液1.5 mL及超纯水0.5 mL,漩涡混匀后静置1 h。以超纯水为空白对照,在波长200~800 nm范围内扫描,以不同浓度NaOH溶液体系的最大吸收波长为纵坐标,NaOH溶液浓度为横坐标作图,探究多糖是否具有三螺旋结构<sup>[16]</sup>。

**1.3.4 傅里叶红外光谱扫描** 称取1 mg Se-HMP、HMP干燥粉末,采用KBr压片法在4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ 范围进行傅里叶红外光谱扫描<sup>[17]</sup>。

**1.3.5 电镜扫描** 取干燥的Se-HMP、HMP固体粉末适量,黏附于样品台上,真空镀金,于高真空条件下扫描,并保存不同倍数图像<sup>[18]</sup>。

**1.3.6 RAW264.7细胞的免疫活性试验** 设置试验组、对照组和空白组,每组设置3个重复孔。各

组分别配制对应的培养基:试验组以 DMEM 培养基为溶剂配制 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 mg/mL 的 Se-HMP 或 HMP 溶液; 对照组为完全培养基, 由 DEME 培养基加入 10% 胎牛血清和 1% 双抗而得; 空白组直接用 DMEM 培养基。试验开始后, 取冻存的 RAW264.7 细胞, 经复苏和传代后, 收集对数期 RAW264.7 细胞制成单细胞悬液, 血球计数板计数后调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/mL, 接入 96 孔板 (100  $\mu$ L/孔), 37  $^{\circ}$ C, 5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养 12 h, 弃去旧培养基, 加入试验各组对应培养基 100  $\mu$ L<sup>[19]</sup>, 继续培养至各检测方法规定的时间, 分别按照 CCK-8 法测定 RAW264.7 细胞增殖活性<sup>[20]</sup>, 中性红法测定 RAW264.7 细胞吞噬活性<sup>[21]</sup>, 检测试剂盒法测定并计算 NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量。

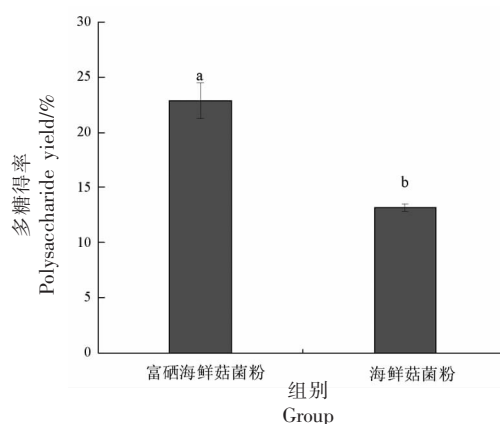
#### 1.4 数据分析

用 Excel 2019 软件进行平均数和标准偏差的统计分析, 用 SPSS 软件做显著性分析, Origin 进行图片处理。试验均设置 3 组平行, 结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 粗多糖的得率

如图 1 所示, 富硒海鲜菇菌粉、海鲜菇菌粉的粗多糖得率分别为  $(22.90 \pm 1.62)\%$  和  $(11.48 \pm 2.55)\%$ , 富硒海鲜菇菌粉的粗多糖得率是海鲜菇菌粉的 1.99 倍, 表明可以从富硒后的海鲜菇菌粉中获得更多的胞内、外多糖。



注: 不同字母表示具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。

图 1 不同菌粉的粗多糖得率

Fig.1 Crude polysaccharide yield of different mycelium powder

### 2.2 多糖的理化性质

如表 1 所示, Se-HMP 的多糖含量达到  $(76.61 \pm 9.10)\%$ , 高于 HMP; Se-HMP 糖醛酸含量为  $(15.60 \pm 1.46)\%$ , 显著高于 HMP ( $P < 0.05$ ), 是 HMP 的 1.27 倍, 表明富硒后海鲜菇菌粉含有更多的糖醛酸。糖醛酸又名透明质酸, 是一种活性多糖, 有文献报道, 糖醛酸含量较高的多糖具有更高的生物活性, 如较强的抗氧化活性、免疫调节活性及抗病毒活性等<sup>[22-23]</sup>。糖醛酸等酸性多糖的存在是导致多糖呈酸性的直接原因, 糖醛酸含量最高的 Se-HMP 具有最低的 pH 值为  $4.85 \pm 0.32$ 。此外, Se-HMP 的总硒含量为  $(316.37 \pm 1.85)$  mg/kg。

表 1 Se-HMP 和 HMP 理化特性

Table 1 Physicochemical property of Se-HMP and HMP

组别	特性	多糖含量/%	pH 值	糖醛酸含量/%	总硒含量/(mg/kg)
Se-HMP	浅褐色粉末状固体, 易吸潮	$76.61 \pm 3.84^a$	$4.85 \pm 0.32^b$	$15.60 \pm 1.46^a$	$316.37 \pm 1.85$
HMP	浅褐色粉末状固体, 易吸潮	$69.34 \pm 3.04^a$	$5.46 \pm 0.24^a$	$12.26 \pm 0.11^b$	—

注: 同一列不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 刚果红试验分析

具有三螺旋结构的多糖可与刚果红染色剂形成络合物, 在弱碱性条件下, 络合物的最大吸收波长与对照组相比会发生红移现象, 而随着碱性增强, 三股螺旋链解链为单链, 络合物的最大吸收波长会降低<sup>[24]</sup>。由图 2 可知, 与对照组相比, 当 NaOH 溶液浓度在 0.2 mol/L 以下时, Se-HMP 没有出现

红移, HMP 出现红移, 随着 NaOH 溶液浓度升高, HMP 最大吸收波长没有降低, 由此推断, Se-HMP、HMP 均不具有三螺旋结构。

### 2.4 傅里叶红外光谱的分析

由图 3 可知, 3 340  $\text{cm}^{-1}$  附近有强且宽的吸收峰是 O-H 的伸缩振动, 说明多糖存在分子间或分子内氢键, 在 2 925  $\text{cm}^{-1}$  及 1 300  $\text{cm}^{-1}$  附近有弱而



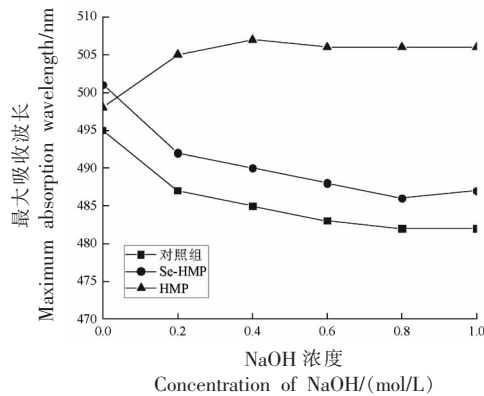


图2 刚果红试验结果

Fig.2 Results of the Congo red experiment

窄的吸收峰,是多糖 C-H 的伸缩振动及弯曲振动,  $1371.15\text{ cm}^{-1}$  为饱和的 C-H 变角振动,这 4 组吸收峰为糖类的特征吸收峰。 $1400\text{ cm}^{-1}$  处出现的吸收峰表明多糖主链可能有糖醛酸的存在。与 HMP 相比,Se-HMP 中  $761.88\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰归因于 Se=O 的典型伸缩振动, $1024.07\text{ cm}^{-1}$  是硒酯的 O-Se-O 键,表明富硒多糖中多糖与硒可能以 Se=O 和 O-Se-O 的形式结合<sup>[25]</sup>。

## 2.5 多糖的形貌

如图 4 所示,在  $1\times 10^3$  倍下,Se-HMP 呈大小、形状不一的碎片状结构,同时出现较小的球状、柱状结构;HMP 呈表面光滑、边缘粗糙、有空隙的较大片状结构。在  $1\times 10^4$  倍下,Se-HMP 呈较小碎片状结构;HMP 呈大块片状结构和少量球状结构。两种多糖微观形貌差异明显,可能受到多糖的相对分子质量、分子间距等共同影响。

## 2.6 RAW264.7 细胞的增殖和吞噬活性

如图 5 所示,Se-HMP 处理后 RAW264.7 细胞的增殖活性提高,显著高于对照组 ( $P<0.05$ ),  $1.00\text{ mg/mL}$  时达到最大,为  $(169.96\pm 0.87)\%$ ;HMP 处理 RAW264.7 细胞后,细胞增殖活性在  $0.05\sim 0.50\text{ mg/mL}$  时,呈现剂量依赖性, $0.50\text{ mg/mL}$  时达到最高的增殖活性,为  $(132.90\pm 0.79)\%$ ,处理剂量达到  $1.00\text{ mg/mL}$  时,反而降低为  $(115.49\pm 5.40)\%$ 。两种多糖对 RAW264.7 细胞没有产生毒害作用,且促进其增殖,与 HMP 相比,Se-HMP 促进 RAW264.7 细胞增殖的效果更佳。

巨噬细胞是机体中分布最广泛的抗原呈递细

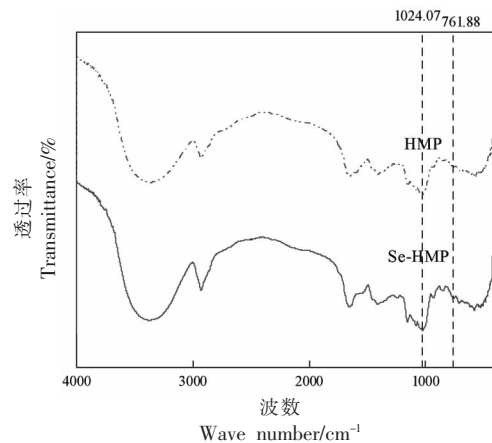


图3 Se-HMP 和 HMP 红外光谱图

Fig.3 IR spectra of Se-HMP and HMP

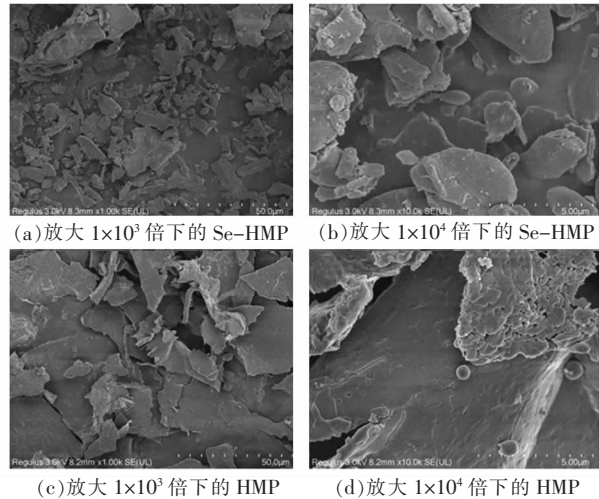


图4 Se-HMP 和 HMP 形貌图

Fig.4 Morphology of Se-HMP and HMP

胞,其活化最显著的特征之一是吞噬能力的增强<sup>[26]</sup>。如图 6 所示,低质量浓度下 Se-HMP ( $<0.25\text{ mg/mL}$ ) 表现出促进 RAW264.7 细胞吞噬的作用, $0.10\text{ mg/mL}$  时吞噬活性达到最高,为  $(127.07\pm 6.62)\%$ ,而剂量过高时,Se-HMP 抑制了 RAW264.7 细胞的吞噬作用。在  $0.05\sim 1.00\text{ mg/mL}$  范围内的 HMP 对 RAW264.7 细胞的吞噬作用表现出不同程度的增强作用,且呈剂量依赖性, $1.00\text{ mg/mL}$  时达到最高,为  $(123.54\pm 4.53)\%$ 。

## 2.7 RAW264.7 细胞上清液中细胞因子的分泌情况

巨噬细胞在感染和损伤时会分泌 NO 激活防御机制,NO 的产生可作为巨噬细胞活化的标志<sup>[27]</sup>。

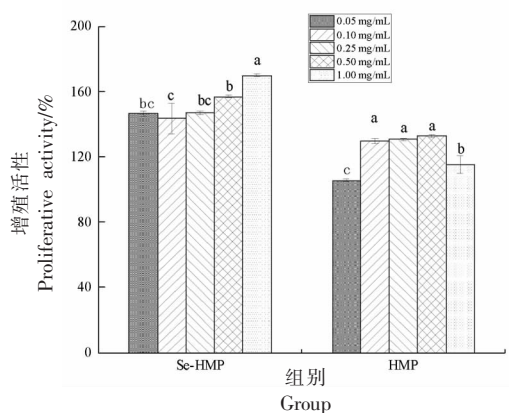


图 5 Se-HMP 和 HMP 对 RAW264.7 细胞增殖能力的影响

Fig.5 Effects of Se-HMP and HMP on proliferative activity of RAW264.7 cells

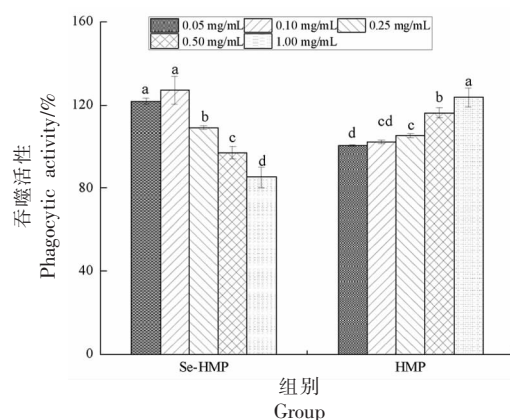


图 6 Se-HMP 和 HMP 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响

Fig.6 Effects of Se-HMP and HMP on phagocytic activity of RAW264.7 cells

如图 7 所示,处理剂量范围内的 Se-HMP 和 HMP 均能显著提高 RAW264.7 细胞分泌 NO 的能力,并呈剂量依赖性,1.00 mg/mL 时 RAW264.7 细胞上清液中 NO 含量达到最大,分别为(4.56±0.125) μmol/L 和 (4.22±0.14) μmol/L,显著高于对照组 (P<0.05)。与 HMP 对比,Se-HMP 促进 RAW264.7 细胞释放 NO 的效果更明显,表明 Se-HMP 更利于 RAW264.7 细胞的活化,促进 RAW264.7 细胞分泌 NO。

TNF-α 是由活化的巨噬细胞表达的一种多效

性细胞因子,可通过激活免疫反应发挥抗感染和消灭肿瘤细胞等作用<sup>[28]</sup>。如图 8 所示,Se-HMP、HMP 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 后,与对照组相比,二者均能显著促进 RAW264.7 细胞释放 TNF-α (P<0.05)。Se-HMP 在 0.50 mg/mL 时 TNF-α 释放量达到最大,为 (14.21±0.19) pg/mL,高于 0.05 mg/mL HMP 培养 RAW264.7 细胞时最大的 TNF-α 含量 (13.34±0.75) pg/mL,表明 Se-HMP 促进 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 效果更佳。

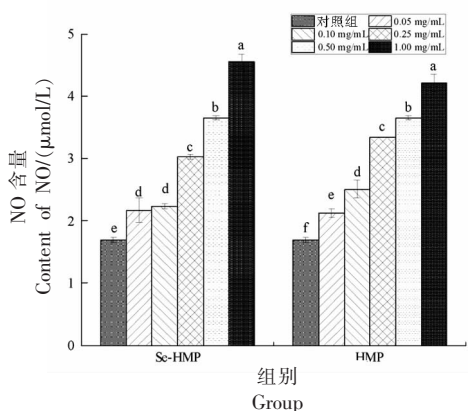


图 7 Se-HMP 和 HMP 对 RAW264.7 细胞上清液 NO 含量的影响

Fig.7 Effects of Se-HMP and HMP on NO content from RAW264.7 cells supernatant

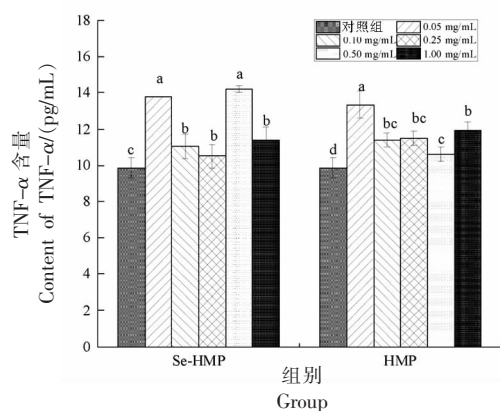


图 8 Se-HMP 和 HMP 对 RAW264.7 细胞上清液 TNF-α 含量的影响

Fig.8 Effects of Se-HMP and HMP on TNF-α content from RAW264.7 cells supernatant

被活化的巨噬细胞会产生另一重要细胞因子 IL-6,能够通过激活 B 淋巴细胞,活化 NK 细胞并

提高杀伤效力来发挥增强免疫的作用<sup>[29]</sup>。如图 9 所示,与对照组相比,两种多糖均能显著促进

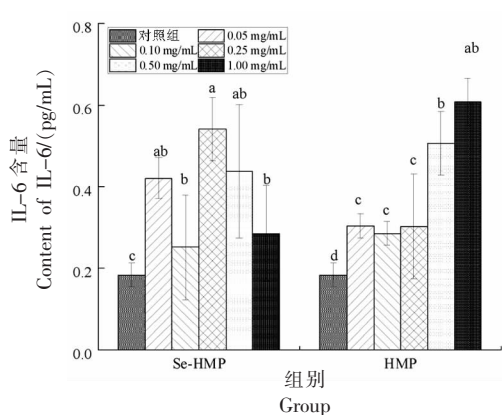


图9 Se-HMP和HMP对RAW264.7细胞上清液IL-6含量的影响

Fig.9 Effects of Se-HMP and HMP on IL-6 content from RAW246.7 cells supernatant

RAW264.7细胞分泌IL-6 ( $P < 0.05$ ), Se-HMP为0.25 mg/mL和HMP为1.00 mg/mL时, RAW264.7细胞上清液中IL-6含量最大, 分别为(0.54±0.08) pg/mL和(0.61±0.06) pg/mL, 与HMP相比, Se-HMP并没有显著促进RAW264.7细胞分泌IL-6。

### 3 结论

富硒发酵过程不仅促进食用菌菌丝体合成更多的多糖和糖醛酸, 影响富硒多糖的理化性质、微观形貌、化学键结合方式、结构等, 还提高多糖的生理活性, 尤其是免疫活性。通过对比研究发现, 富硒后海鲜菇菌粉的粗多糖得率为(22.90±1.62)%, 是海鲜菇菌粉的1.99倍, Se-HMP的糖醛酸含量为(15.60±1.46)%, 是HMP的0.33倍, 表明富硒后海鲜菇菌粉含有更多的多糖和糖醛酸。Se-HMP和HMP均无三螺旋结构, 而二者微观形貌相差较大, Se-HMP中多糖与硒是以Se=O键和O-Se-O键的形式结合。Se-HMP促进RAW264.7增殖和分泌NO、TNF- $\alpha$ 的能力优于HMP, 具有更高的免疫活性。因此, 富硒前、后海鲜菇菌粉多糖存在较大差异, 尤其是Se-HMP具有更高的免疫活性, 这可为富硒海鲜菇菌粉多糖的应用研究提供基础。

由于本研究仅对富硒前、后的海鲜菇菌粉多糖进行了初步纯化, 其中仍有较复杂的成分组成, 后续试验可对Se-HMP进行分级、纯化, 并可通过

动物实验对Se-HMP发挥免疫作用的机理进行深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] WANG Y X, ZHANG T, YIN J Y, et al. Structural characterization and rheological properties of an alkali-extracted  $\beta$ -glucan from *Hypsizygus marmoratus*[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 126: 107475.
- [2] 李琳玲, 张国国际, 郭杰, 等. 植物对硒的吸收和代谢研究进展及对富硒种植业发展的启示[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(6): 5-14.  
LI L L, ZHANG G J, GUO J, et al. Research progress on plant accumulation and metabolism of selenium and enlightenment on the development of selenium-rich planting industry[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(6): 5-14.
- [3] XU M M, ZHU S, LI Y R, et al. Effect of selenium on mushroom growth and metabolism: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 118: 328-340.
- [4] LI J, SHEN B X, NIE S L, et al. A combination of selenium and polysaccharides: Promising therapeutic potential [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 206: 163-173.
- [5] GU Y G, QIU Y, WEI X, et al. Characterization of selenium-containing polysaccharides isolated from selenium-enriched tea and its bioactivities[J]. Food Chemistry, 2020, 316: 126371.
- [6] LIU Y T, YOU Y X, LI Y W, et al. The characterization, selenylation and antidiabetic activity of mycelial polysaccharides from *Catathelasma ventricosum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 174: 72-81.
- [7] SUN Z P, LIU C, PAN T R, et al. Selenium accelerates chicken dendritic cells differentiation and affects selenoproteins expression[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 77: 30-37.
- [8] 房佳敏, 马成瑶, 张彦龙. 黑木耳凝集素对RAW264.7细胞免疫调节作用的研究[J]. 中国农学通报, 2021, 37(9): 125-130.  
FANG J M, MA C Y, ZHANG Y L. The immunomodulatory effect of *Auricularia curricula* lectin on RAW264.7 cells[J]. Chinese Agricultural Science Bull, 2021, 37(9): 125-130.
- [9] YU S S, MA R J, DONG X D, et al. A novel

- polysaccharide from *Boletus edulis*: Extraction, purification, characterization and immunologic activity [J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 186: 115206.
- [10] 杨晶莹, 商龙臣, 张驰. 富硒灵芝菌丝多糖、蛋白的提取及其体外抗氧化和抗肿瘤活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(3): 453-459.
- YANG J Y, SHANG L C, ZHANG C. Extraction of polysaccharides and proteins from selenium-enriched *Ganoderma lucidum* mycelium and their *in vitro* antioxidant and antitumor activities[J]. *Product Research and Development*, 2023, 35(3): 453-459.
- [11] 张跃非. 探析羊肚菌菌丝体富硒培养条件优化及其菌丝体硒多糖抗氧化活性[J]. *农业开发与装备*, 2018(7): 134-203.
- ZHANG Y F. Study on the optimization of selenium-rich culture conditions of morchella mycelium and the antioxidant activity of selenium-rich mycelium polysaccharide[J]. *Agricultural Development and Equipments*, 2018(7): 134-203.
- [12] JI Y, HU Q H, MA G X, et al. Selenium biofortification in *Pleurotus eryngii* and its effect on lead adsorption of gut microbiota via *in vitro* fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2022, 396: 133664.
- [13] 钱春强, 林文飞, 吴德平, 等. 碱提法提取大球盖菇多糖工艺及其清除氧自由基研究[J]. *现代食品*, 2021(3): 99-102.
- QIAN C Q, LIN W F, WU D P, et al. Study on the extraction of polysaccharides from *Stropharia rugoso-annulata* by alkaline extraction and its scavenging oxygen free radical[J]. *Modern Food*, 2021(3): 99-102.
- [14] 赵文瑾. 芫根多糖提取、分离及抗疲劳机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- ZHAO W J. Extraction, fractionation and anti-fatigue mechanism of polysaccharides from *Brassica rapa* L.[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [15] 方东军, 赵润琴, 张晓娟. 茯苓多糖的总糖含量及糖醛酸含量测定[J]. *中医药信息*, 2011, 28(4): 42-44.
- FANG D J, ZHAO R Q, ZHANG X J. Determination of total carbohydrate and uronic acid contents in polysaccharides from *poria cocos* [J]. *Information Tradition Chinese Medicine*, 2011, 28(4): 42-44.
- [16] 杨许花. 藏药柳茶多糖分离纯化及其免疫活性研究[D]. 兰州: 西北民族大学, 2022.
- YANG X H. Isolation, purification and immunological activity of polysaccharides from Tibetan medicine *Sibiraea angustata*[D]. Lanzhou: Northwest Minzu University, 2022.
- [17] 苏攀峰. 葛仙米多糖的提取分离、结构和活性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- SU P F. Study on extraction, structure and activity of *Nostoc sphaeroids kütz* polysaccharide[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [18] XIA F, CAO S L, WANG M W, et al. Optimizing extraction, structural characterization, and *in vitro* hypoglycemic activity of a novel polysaccharide component from *Lentinus edodes* [J]. *Food Bioscience*, 2023, 55: 103007.
- [19] WANG H L, MA C Y, SUN-WATERHOUSE D X, et al. Immunoregulatory polysaccharides from *Apocynum venetum* L. flowers stimulate phagocytosis and cytokine expression via activating the NF- $\kappa$ B/ MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(4): 806-814.
- [20] 朱俊豪. 川灵芝菌胞外多糖的结构表征及其免疫调节作用研究[D]. 成都: 成都大学, 2021.
- ZHU J H. Structural characterization and immunomodulatory effect of exopolysaccharide from the mycelium of *Ganoderma sichuanense* [D]. Chengdu: Chengdu University, 2021.
- [21] 徐孝宙, 朱孟玲, 连雪, 等. 灵芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬力和分泌活性的影响[J]. *畜牧兽医杂志*, 2020, 39(5): 1-4.
- XU X Z, ZHU M L, LIAN X, et al. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the activity of mouse peritoneal[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020, 39(5): 1-4.
- [22] 李知弦. 揉捻和发酵工艺对红茶多糖组分、理化性质及抗氧化活性的影响研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2022.
- LEE JEE-HYUN. Effect of rolling and oxygen fermentation process on the composition, physicochemical properties and antioxidant activity of the polysaccharides from black tea[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2022.
- [23] YANG M, ZHOU D Q, XIAO H, et al. Marine-derived uronic acid-containing polysaccharides: Structures, sources, production, and nutritional functions[J]. *Trends in Food Science & Technology*,



- 2022, 122: 1–12.
- [24] 汤陈鹏, 吕峰, 王蓉琳. 孔石莼多糖锌结构表征与体外降血糖活性[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 52–58.
- TANG C P, LV F, WANG R L. Structural characterization and hypoglycemic activity *in vitro* of *Ulva pertusa* polysaccharides–zinc complex[J]. Food Science, 2020, 41(7): 52–58.
- [25] LI Q, WANG W, ZHU Y, et al. Structural elucidation and antioxidant activity a novel Se–polysaccharide from Se–enriched *Grifola frondosa*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 161: 42–52.
- [26] 陈健, 申超群, 贺婷, 等. 正红菇多糖的抗癌和免疫调节活性研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 16–21.
- CHEN J, SHEN C Q, HE T, et al. Anticancer and immunoregulation activities of a polysaccharide from *Russula vinosa*[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(11): 16–21.
- [27] 牛越, 王新茹, 姚秀君, 等. 血耳多糖对小鼠 Raw264.7 巨噬细胞的免疫调节作用研究[J]. 农产品加工, 2022(8): 1–3, 11.
- NIU Y, WANG X R, YAO X J, et al. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Tremella sanguinea* peng[J]. Farm Products Processing, 2022(8): 1–3, 11.
- [28] 杜青, 陈林, 贺炜, 等. 黄精多糖对 RAW 264.7 细胞活性及炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS 表达的影响[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2676–2679.
- DU Q, CHEN L, HE W, et al. Effects of *Polygonatum polygonatum* polysaccharide on the activity of RAW 264.7 cells and the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(8): 2676–2679.
- [29] ZHU Y L, YU X F, GE Q, et al. Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from *Cordyceps cicadae*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 394–400.

### Preparation, Characterization and Immune Activity of Polysaccharide from Mycelium of *Hypsizygus marmoreus* before and after Selenium–enriched Fermentation

XIAO Xiaonian<sup>1</sup>, YU Miaomiao<sup>1</sup>, WAN Qian<sup>1</sup>, YI Xing<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Sino–German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047*

<sup>2</sup>*Sino–German Food Engineering Center, Nanchang University, Nanchang 330047*

**Abstract** Selenium–enriched *Hypsizygus marmoreus* mycelium polysaccharide (Se–HMP) and *H. marmoreus* mycelium polysaccharide (HMP) were prepared from the powder of *H. marmoreus* before and after selenium–enriched fermentation, respectively, and then investigated their physical and chemical properties, microscopic morphology, chemical bonding mode and immune activity. The properties were conducted by uronic acid content determination, Congo red test, Fourier transform infrared spectroscopy and electron microscope. The immune activity was evaluated by means of proliferative activity, phagocytic activity and cytokine content using mouse macrophage RAW264.7 model. The results indicated that the yield of crude polysaccharide from selenium–enriched *H. marmoreus* was (22.90±1.62)%, which was 1.99 times that of *H. marmoreus* without selenium–enrichment. The content of uronic acid in Se–HMP was (15.60±1.46)%, which was significantly higher than that in HMP ( $P<0.05$ ). Both Se–HMP and HMP have no triple helix structure, but their micromorphology is quite different. Polysaccharides in SE–HMP are bound with selenium in the form of Se=O bond and O–SE–O bond. In the range of 0.05–1.00 mg/mL, Se–HMP increased the proliferative activity of RAW264.7 cells and significantly promoted the secretion of NO and TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ ) in comparison with HMP, but their ability to up–regulate IL–6 level was similar. In addition, both Se–HMP in low mass concentration ( $\leq 0.25$  mg/mL) and HMP in high mass concentration ( $\geq 0.50$  mg/mL) can promote phagocytosis of macrophages. Therefore, Se–HMP has higher immune activity in comparison with HMP, which may be due to the organic binding of polysaccharide and selenium and the higher content of uronic acid in Se–HMP.

**Keywords** selenium–enriched polysaccharide; *Hypsizygus marmoreus* mycelium powder; characterization; RAW264.7 cells; immune activity