

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240819006

引用格式: 刘冰, 李沛, 曾馨俞, 等. 三地羊肚菌菌丝体胞外多糖分离纯化及降血糖和抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(5): 86–93.

LIU B, LI P, ZENG XY, et al. Extraction and isolation of *Morchella eohespera* mycelium extracellular polysaccharides and its hypoglycemic and antioxidant activities [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(5): 86–93. (in Chinese with English abstract).

三地羊肚菌菌丝体胞外多糖分离纯化及 降血糖和抗氧化活性研究

刘冰^{1*}, 李沛¹, 曾馨俞¹, 刘小春¹, 邹名洋¹, 林杉¹, 赵萍¹, 曹建雄²

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050; 2. 兰州理工大学理学院, 兰州 730050)

摘要: **目的** 以三地羊肚菌菌丝体胞外多糖(*Morchella eohespera* mycelium extracellular polysaccharides, MEP)为研究对象, 采用 DEAE 琼脂糖凝胶 FF (DEAE Sepharose Fast Flow) 柱层析纯化得到多糖 MEP-H 和 MEP-N, 分别对其理化性质、体外降血糖活性和抗氧化活性进行分析。**方法** 通过碳水化合物含量测定、紫外扫描分析、傅里叶变换红外光谱分析和扫描电子显微镜对多糖 MEP-H 和 MEP-N 进行理化性质研究; 通过 α -淀粉酶抑制率、 α -葡萄糖苷酶抑制率、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除能力、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS] 阳离子自由基清除能力、还原力和超氧阴离子清除能力, 评价 MEP-H 和 MEP-N 的体外降血糖活性和抗氧化活性。**结果** 三地羊肚菌菌丝体胞外多糖 MEP-H 和 MEP-N 碳水化合物含量分别为(78.12±0.14)%和(77.37±0.03)%。降血糖研究表明, 当质量浓度 0.75 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 对 α -淀粉酶抑制率最高, 分别为(8.06±1.93)%和(11.08±1.05)%; 质量浓度 0.50 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 对 α -葡萄糖苷酶抑制率最高, 分别为(74.93±2.72)%和(69.48±2.97)%。抗氧化研究表明, MEP-H 和 MEP-N 在质量浓度分别为 4 mg/mL、2 mg/mL 时达到最佳 DPPH 自由基清除活性, 清除率分别为(47.54±10.88)%和(47.16±6.91)%; 质量浓度为 8 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 的最大 ABTS 阳离子自由基清除率分别为(8.67±0.53)%和(17.00±4.21)%, 最大还原力吸光值分别为 0.13±0.004 和 0.17±0.008, 最大超氧阴离子清除率分别为(40.95±6.02)%和(29.87±3.18)%。**结论** 羊肚菌菌丝体胞外多糖 MEP-H 和 MEP-N 均具有降血糖活性和抗氧化活性, 本研究为液态发酵羊肚菌的深入研究提供了理论依据。**关键词:** 三地羊肚菌菌丝体; 胞外多糖; 理化性质; 降血糖活性; 抗氧化活性

Extraction and isolation of *Morchella eohespera* mycelium extracellular polysaccharides and its hypoglycemic and antioxidant activities

LIU Bing^{1*}, LI Pei¹, ZENG Xin-Yu¹, LIU Xiao-Chun¹, ZOU Ming-Yang¹, LIN Shan¹,
ZHAO Ping¹, CAO Jian-Xiong²

收稿日期: 2024-08-19

基金项目: 甘肃省知识产权计划项目(22ZSCQ005, 22ZSCQ008); 兰州理工大学博士科研启动基金项目(062002)

第一作者/*通信作者: 刘冰(1988—), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为食药资源开发、农产品加工与副产物综合利用等。E-mail: lbjyl223@163.com

(1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;
2. School of Science, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: Objective To study the *Morchella eohespera* mycelium extracellular polysaccharides (MEP), purify MEP-H and MEP-N by DEAE Sepharose Fast Flow column chromatography, and analyze their physicochemical properties, hypoglycemic activities, and antioxidant activities *in vitro*. **Methods** The physicochemical properties of MEP-H and MEP-N were studied by carbohydrate content determination, analysis of ultraviolet scanning, Fourier transform infrared spectroscopy analysis, and scanning electron microscopy. The hypoglycemic activities and antioxidant activities of MEP-H and MEP-N were evaluated by α -amylase inhibition rate, α -glucosidase inhibition rate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging ability, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt (ABTS) cationic free radical scavenging ability, reducing power and superoxide anion scavenging ability. **Results** The carbohydrate content of MEP-H and MEP-N was (78.12±0.14)% and (77.37±0.03)%, respectively. Hypoglycemic studies showed that at a mass concentration of 0.75 mg/mL, MEP-H and MEP-N had the highest α -amylase inhibition rates, which were (8.06±1.93)% and (11.08±1.05)%, respectively; at a mass concentration of 0.50 mg/mL, MEP-H and MEP-N had the highest α -glucosidase inhibition rates, which were (74.93±2.72)% and (69.48±2.97)%, respectively. Antioxidant studies showed that MEP-H and MEP-N achieved the best DPPH free radical scavenging activity at mass concentrations of 4 mg/mL and 2 mg/mL, with scavenging rates of (47.54±10.88)% and (47.16±6.91)%, respectively; at a mass concentration of 8 mg/mL, the maximum ABTS cationic free radical scavenging rates of MEP-H and MEP-N were (8.67±0.53)% and (17.00±4.21)%, respectively, the maximum reducing power absorbance values were 0.13±0.004 and 0.17±0.008 respectively, and the maximum superoxide anion scavenging rates were (40.95±6.02)% and (29.87±3.18)%, respectively. **Conclusion** Both MEP-H and MEP-N, the extracellular polysaccharides from the mycelium of *Morchella eohespera*, exhibit hypoglycemic and antioxidant activities. This study provides a theoretical basis for further research on liquid fermentation of *Morchella eohespera*.

KEY WORDS: *Morchella eohespera* mycelium; extracellular polysaccharides; physicochemical properties; hypoglycemic activity; antioxidant activity

0 引 言

羊肚菌(*Morchella esculenta*)在世界范围内广泛分布,因其菌盖形似羊肚而得名^[1]。现代药理学研究表明,羊肚菌具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3-4]、免疫调节^[5]及降血脂^[6-7]等生物活性。羊肚菌逐步成为食品、保健品研究与开发的焦点。但是,由于羊肚菌野生资源有限,现阶段液态深层发酵技术仍然是羊肚菌扩大规模培养的主要手段^[8-10]。

多糖是羊肚菌生物活性多样性的重要物质基础^[11]。本课题组前期已经对甘肃省野生三地羊肚菌菌丝体胞外多糖(*Morchella eohespera* mycelium extracellular polysaccharides, MEP)液态发酵培养基配方进行优化,并进行了胞外粗多糖的制备及降血糖活性评价^[12]。但是,并未对 MEP 进行进一步分离纯化及活性评价。

因此,本研究以 MEP 为研究对象,采用 DEAE 琼脂糖凝胶 FF (DEAE Sepharose Fast Flow)柱层析纯化得到多糖 MEP-H 和 MEP-N,分别对其理化性质、体外降血糖活性和抗氧化活性进行分析,为三地羊肚菌多糖研究提供基

础,为羊肚菌相关产品开发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

DEAE Sepharose Fast Flow(北京索莱宝科技有限公司); α -淀粉酶(2000 U/g)、 α -葡萄糖苷酶(300000 U/g)(上海源叶生物科技有限公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS][纯度 98%, 迈瑞尔(上海)化学技术有限公司]; 铁氰化钾(分析纯,天津市凯信化学工业有限公司)。

1.2 仪器与设备

Cary50 紫外分光光度计(美国瓦里安公司); IFS66V/S 傅里叶变换红外光谱仪(德国布鲁克公司); 680 i-Mark 酶标仪(美国伯乐公司); Easy NanoScan 多功能桌面式扫描电镜(麦克奥迪实业集团有限公司); FA2004 电子天平(精度

0.001 g, 上海良平仪器仪表有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 羊肚菌菌丝体胞外粗多糖的制备

按照林杉等^[12]建立方法进行三地羊肚菌菌丝体胞外粗多糖的制备, 发酵液离心取上清液, 旋转蒸发至原体积 1/10, 加入无水乙醇, 4 °C 条件下沉淀多糖。加无水乙醇, 离心充分洗涤沉淀。使用 Sevag 法除蛋白, 考马斯亮蓝法和紫外扫描检测(波长 260 nm)至无蛋白。再次醇沉、离心, 加蒸馏水复溶, 冷冻干燥得到羊肚菌胞外粗多糖。

1.3.2 羊肚菌菌丝体胞外多糖的分离纯化

采用湿法装柱法将 DEAE Sepharose Fast Flow 填料装于层析柱(1.6 cm×60 cm)中, 将 100 mg 多糖样品离心(8000 r/min, 10 min)除杂后上样于层析柱中, 以浓度为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱, 收集洗脱组分, 测定多糖含量。将各洗脱组分旋蒸浓缩后转移至 3500 Da 透析袋, 经流动水、蒸馏水透析各 24 h 后冷冻干燥, 得到不同组分的液态发酵羊肚菌胞外多糖 MEP-H 和 MEP-N^[13]。

1.3.3 羊肚菌菌丝体胞外多糖的理化性质

(1) 碳水化合物含量测定

采用苯酚-硫酸法^[14]测定多糖中碳水化合物的含量。取 10 支洁净的试管, 加 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 葡萄糖标准溶液, 加蒸馏水补至 1 mL, 再加入 25 μL 80%苯酚溶液, 混匀后加入浓硫酸 2.5 mL, 待溶液充分反应后, 30 °C 水浴 30 min。在 490 nm 处测定吸光值, 以葡萄糖质量浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。样品测定同标准曲线。

(2) 紫外扫描分析

将不同组分的多糖配制成 2 mg/mL 的溶液, 于紫外可见分光光度计 190~400 nm 波长范围内进行扫描。

(3) 多糖的红外表征

取干燥的多糖样品 2.0 mg, 加少许干燥的 KBr, 充分研磨, 均匀后, 压片。在傅里叶变换红外光谱仪上扫描分析, 扫描范围: 4000~400 cm⁻¹。

1.3.4 羊肚菌菌丝体胞外多糖的扫描电镜分析

将羊肚菌菌丝体胞外多糖 MEP-H 和 MEP-N 经过冷冻干燥制成白色絮状物, 用扫描电镜观察多糖结构^[15]。

1.3.5 羊肚菌菌丝体胞外多糖降血糖活性测定

(1) α-淀粉酶抑制活性

采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 比色法测定多糖的 α-淀粉酶抑制活性^[16-17]。37 °C 条件下, 将 0.4 mL 的 α-淀粉酶(2 U/mL)溶液与 0.2 mL 不同质量浓度(0.10、0.25、0.50、0.75 和 1.00 mg/mL)的多糖水溶液混合, 反应 10 min, 加 0.3 mL 5%淀粉溶液, 反应 10 min, 再加入 2 mL 的 DNS 试剂, 混合液于沸水浴 15 min, 冷却后,

测量在 540 nm 处的吸光值, 以阿卡波糖作阳性对照, 按照公式(1)计算 α-淀粉酶抑制活性。

$$\text{抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0 - A_3}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_1 : 样品实验组吸光值; A_0 : 空白对照组(以等体积 pH 6.8 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替样品溶液)吸光值; A_2 : 样品空白组(以等体积 pH 6.8 PBS 取代 α-淀粉酶溶液)吸光值; A_3 : 对照空白组(以等体积蒸馏水和 pH 6.8 PBS 分别取代待测溶液和 α-淀粉酶溶液)吸光值。

(2) α-葡萄糖苷酶抑制活性

参考 ZHONG 等^[18]和 LIU 等^[19]的方法测定多糖的 α-葡萄糖苷酶抑制活性。37 °C 条件下, 100 μL α-葡萄糖苷酶溶液(0.5 U/mL)与 50 μL 不同质量浓度(0.10、0.25、0.50、0.75 和 1.00 mg/mL)多糖水溶液混合, 反应 10 min, 加入 100 μL β-D-葡萄糖苷酶底物(5 mmol/L), 反应 20 min, 再加入 1 mL 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液, 测量在 405 nm 处的吸光值, 以阿卡波糖作阳性对照。按照公式(1)计算 α-葡萄糖苷酶抑制活性。

1.3.6 羊肚菌菌丝体胞外多糖抗氧化活性测定

(1) DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基清除活性按沈佳琳^[20]报道的方法, 并略做修改。将 50 μL 不同质量浓度(1、2、4、6、8 mg/mL)的多糖样品溶液加入 96 孔板, 再加入 25 μL 现配的 0.4 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液, 100 μL 蒸馏水, 混匀, 常温暗处反应 30 min, 于波长 517 nm 处测吸光值, 记为 B_1 。用无水乙醇溶液代替 B_1 中的 DPPH 溶液, 步骤同 B_1 , 记为 B_2 。用蒸馏水代替 B_1 中不同浓度多糖样品溶液, 步骤同 B_1 , 记为 B_0 , 以维生素 C (vitamin C, VC)为阳性对照。每组实验平行 3 次。DPPH 自由基清除结果按公式(2)计算:

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

(2) ABTS⁺自由基清除能力

参考 ZHANG 等^[21]的方法, 稍作修改。将 5 mL 7 mmol/L ABTS⁺溶液与 5 mL 4.95 mmol/L K₂S₂O₈ 溶液混合, 室温暗处放置 12 h, 即为 ABTS⁺储备液。用 pH 7.4 0.2 mol/L PBS 将 ABTS⁺储备液稀释至在 734 nm 处吸光值为 0.70±0.02, 即为 ABTS⁺工作液。将 20 μL 不同质量浓度(1、2、4、6、8 mg/mL)的多糖样品溶液加入 96 孔板, 再加入 250 μL ABTS⁺工作液, 振荡混匀, 室温暗处反应 6 min, 于波长 734 nm 处测吸光值, 记为 C_1 。用 PBS 代替 C_1 中的 ABTS⁺工作液, 步骤同 C_1 , 记为 C_2 。用蒸馏水代替 C_1 中的不同浓度多糖样品溶液, 步骤同 C_1 , 记为 C_0 , 以 VC 为阳性对照。ABTS⁺自由基清除结果按公式(3)计算。

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{C_1 - C_2}{C_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

(3) 超氧阴离子自由基清除活性

参考秦丹丹等^[22]的方法, 稍作修改。将 20 μL 不同质量浓度(1、2、4、6、8 mg/mL)的多糖样品溶液与 180 μL pH 8.2 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐[Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, Tris-HCl]缓冲液于 96 孔板混合, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预热 20 min, 然后加入 20 μL 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预热的 3 mmol/L 邻苯三酚溶液, 混匀, 于波长 325 nm 处测吸光值, 记为 D_0 。用蒸馏水代替 D_0 中的邻苯三酚溶液, 步骤同 D_0 , 记为 D_1 。用蒸馏水代替 D_0 中的不同浓度多糖样品溶液, 步骤同 D_0 , 记为 D_2 , 以 VC 为阳性对照。超氧阴离子自由基清除活性按公式(4)计算。

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{D_1 - D_2}{D_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

(4) 还原力

参考 LIANG 等^[23]的方法, 稍作修改。将不同质量浓度(1、2、4、6、8 mg/mL)的多糖样品溶液取 50 μL , 再加入 50 μL 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液和 50 μL pH 6.6 0.2 mol/L PBS 缓冲液, 混匀后 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min, 冷却至室温后, 加入 50 μL 10% 三氯乙酸溶液和 25 μL 0.1% FeCl_3 溶液, 于波长 700 nm 处测吸光值, 以 VC 为阳性对照。还原力按公式(5)计算:

$$\text{还原力} = E_1 - E_2 \quad (5)$$

式中, E_1 : 多糖样品溶液的吸光值; E_2 : 蒸馏水代替多糖样品的吸光值。

1.4 数据处理

有效数据均用 3 组平行实验的平均值表示, 用 Excel 2010、OriginPro 2019b、SPSS Statistics 21、GraphPad Prism 8.0.2 进行作图与数据分析, 实验结果均以平均值 \pm 标准偏差值表示。

2 结果与分析

2.1 羊肚菌菌丝体胞外多糖的分离纯化结果

MEP 洗脱曲线如图 1 所示, 收集 NaCl 洗脱浓度为 0 mol/L 和 0.9 mol/L 对应多糖组分, 冷冻干燥, 分别命名

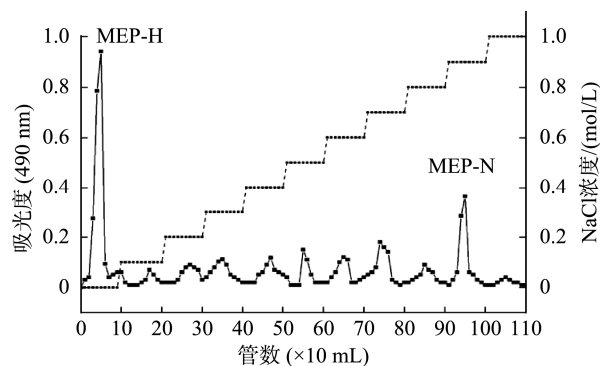


图 1 MEP 离子交换层析洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of MEP by ion-exchange chromatography

为 MEP-H 和 MEP-N, 进行下一步实验研究。

2.2 羊肚菌菌丝体胞外多糖的理化性质分析结果

2.2.1 碳水化合物含量

羊肚菌多糖 MEP-H 碳水化合物含量为(78.12 \pm 0.14)%, MEP-N 碳水化合物含量为(77.37 \pm 0.03)%, 说明分离纯化得到的多糖 MEP-H 和 MEP-N 纯度较好。

2.2.2 紫外扫描分析结果

如图 2a 和 2b 所示, 紫外扫描发现 MEP-H 和 MEP-N 在 260 nm、280 nm 波长处无吸收峰, 说明这两种多糖中不含蛋白质和核酸。

2.2.3 红外光谱分析结果

MEP-H 和 MEP-N 的红外光谱如图 3 所示。由图 3a 和 3b 可知 MEP-H 和 MEP-N 具有多糖的特征吸收峰, 在 3403 cm^{-1} 和 3342 cm^{-1} 处的吸收峰表示糖分子内或分子间出现了 -OH 的伸缩振动^[24], 在 2925 cm^{-1} 和 2919 cm^{-1} 处的较弱吸收峰为 C-H 伸缩振动, 1639 cm^{-1} 和 1647 cm^{-1} 处的弱峰为 C=O 不对称和对称拉伸振动, 1404 cm^{-1} 和 1424 cm^{-1} 处为多糖分子中 C-H 的伸缩振动吸收峰, 1097 cm^{-1} 和 1108 cm^{-1} 则表示吡喃环中的 C-O 的伸缩振动^[25-27]。

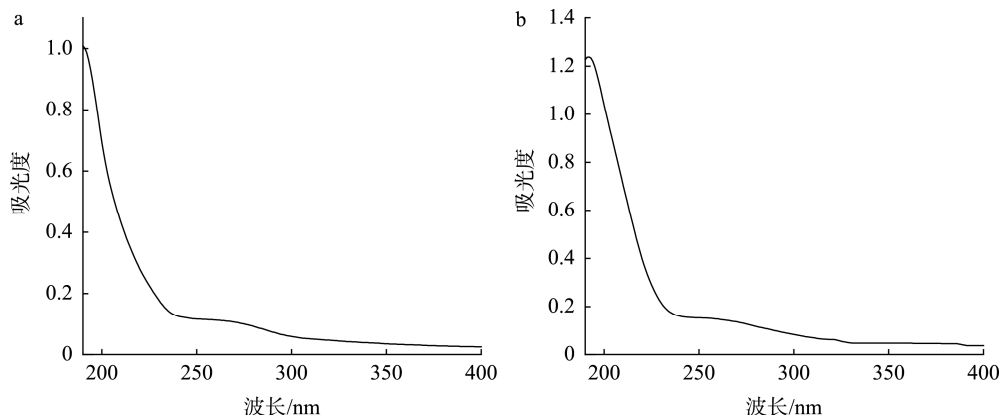


图 2 MEP-H (a) 和 MEP-N (b) 的紫外扫描波谱图
Fig.2 Ultraviolet spectrums of MEP-H (a) and MEP-N (b)

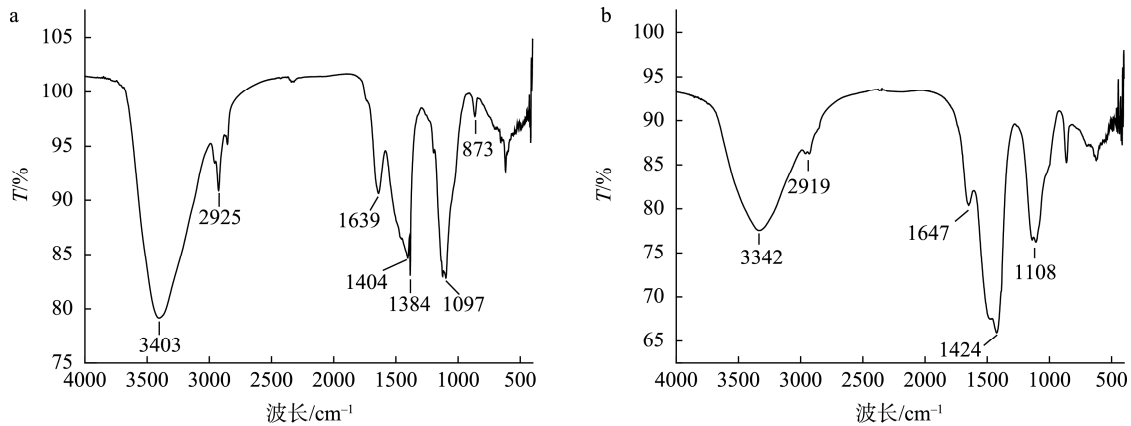


图 3 MEP-H (a)和 MEP-N (b)的红外光谱图
Fig.3 Infrared spectrograms of MEP-H (a) and MEP-N (b)

2.3 羊肚菌菌丝体胞外多糖的扫描电镜分析结果

MEP-H 和 MEP-N 的扫描电镜如图 4 所示。由图 4a 可知, MEP-H 主要呈现致密的片状和碎屑状结构, 多糖片状结构较为清晰, 存在大小不一的孔洞, 这可能是由于多糖内分子交联程度较高, 结构紧密。由图 4b 可知, MEP-N 整体聚集成团, 表面凹凸不平, 有明显的孔洞, 且孔径大

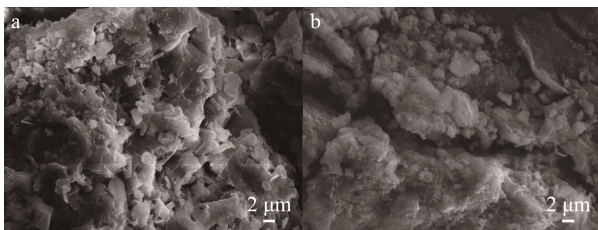


图 4 MEP-H (a)和 MEP-N (b)扫描电镜图(5000×)
Fig.4 Scanning electron microscopy atlas of MEP-H (a) and MEP-N (b) (5000×)

小不一。通过扫描电镜图可以看出两者表面形态存在差异, 可能是由于 MEP-H 和 MEP-N 的相对分子量、化学组成等不同^[28]。

2.4 羊肚菌菌丝体胞外多糖的降血糖活性分析结果

2.4.1 α-淀粉酶抑制活性

由图 5a 可知, MEP-H 和 MEP-N 均具有抑制 α-淀粉酶活性, 在 0.10~0.75 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 的 α-淀粉酶抑制活性随着质量浓度的升高而增强, 且 MEP-H 的抑制活性低于 MEP-N, 但随着质量浓度的继续升高, MEP-H 的活性较高于 MEP-N。在 0.75 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 的 α-淀粉酶抑制活性最好, 其抑制率分别为(8.06±1.93)% 和(11.08±1.05)%, 均低于阿卡波糖的抑制率。当质量浓度达到 1.00 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 对 α-淀粉酶的抑制率不再增强, 说明多糖对 α-淀粉酶的抑制活性具有饱和效应^[29]。

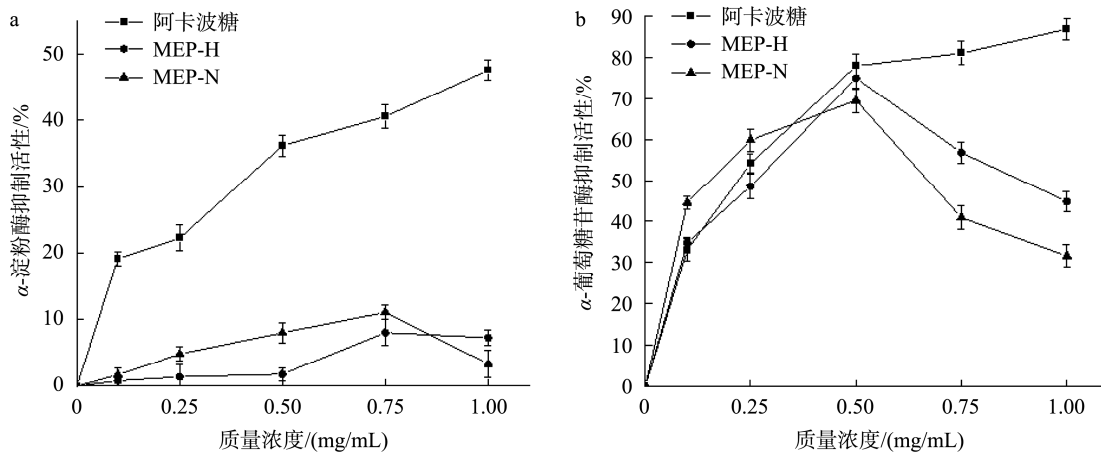


图 5 MEP-H 和 MEP-N 对 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶抑制率
Fig.5 Rates of α-amylase and α-glucosidase inhibition by MEP-H and MEP-N

2.4.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性

由图 5b 可知, MEP-H 和 MEP-N 对 α -葡萄糖苷酶均有很好的抑制效果, 且在一定质量浓度范围内呈现出明显的剂量效应关系, MEP-H 和 MEP-N 在质量浓度为 0.50 mg/mL 时达到最佳抑制活性, 抑制率分别为 (74.93±2.72)% 和 (69.48±2.97)%。随后, 随着质量浓度的升高, MEP-H 和 MEP-N 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性逐渐降低。有研究表明蛹虫草多糖在一定质量浓度范围内, 质量浓度越高, 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率越高, 但当质量浓度较高或多糖高级结构发生改变时, 其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用会趋于平缓甚至下降^[30], 本研究结果中羊肚菌菌丝体胞外多糖也表现出相同的趋势。

2.5 羊肚菌菌丝体胞外多糖的抗氧化活性分析结果

MEP-H 和 MEP-N 对 DPPH 自由基清除活性如图 6a 所示, 在一定质量浓度范围内, MEP-H、MEP-N 对 DPPH 自由基的清除能力整体上随着质量浓度的升高而增强, 但均低于 VC 的清除能力。MEP-H 和 MEP-N 在质量浓度

分别为 4 mg/mL、2 mg/mL 时达到最佳 DPPH 自由基清除活性, 清除率分别为 (47.54±10.88)% 和 (47.16±6.91)%。MEP-H 和 MEP-N 对 ABTS⁺ 自由基清除活性如图 6b 所示, 在 1~8 mg/mL 质量浓度范围内, MEP-H 和 MEP-N 对 ABTS⁺ 自由基有一定清除作用, 随着质量浓度的增加, 其清除能力整体上逐渐增强, 但均低于阳性对照 VC。当质量浓度为 8 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 对 ABTS⁺ 自由基清除率达到最佳, 清除率分别为 (8.67±0.53)% 和 (17.00±4.21)%。MEP-H 和 MEP-N 对超氧阴离子自由基清除活性如图 6c 所示, 在 1~8 mg/mL 质量浓度范围内, MEP-H 和 MEP-N 的超氧阴离子自由基清除能力整体上随着质量浓度的增加而增强, 但显著低于阳性对照 VC。当质量浓度为 8 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 对超氧阴离子的清除率分别为 (40.95±6.02)% 和 (29.87±3.18)%。MEP-H 和 MEP-N 的总还原力如图 6d 所示, 在 1~8 mg/mL 质量浓度范围内, MEP-H 和 MEP-N 的总还原力均远低于阳性对照 VC。此外, 当质量浓度为 8 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 的最大还原力吸光值分别为 0.13±0.004 和 0.17±0.008。

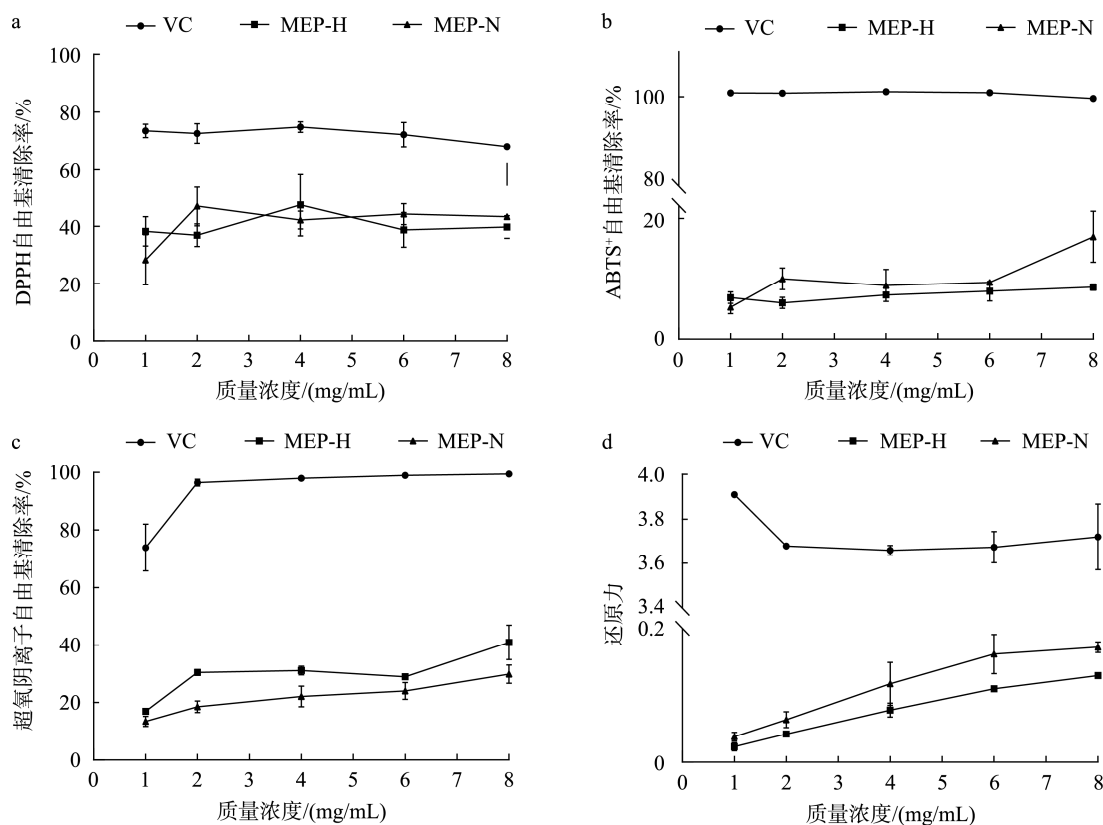


图 6 MEP-H 和 MEP-N 抗氧化活性分析
Fig.6 Antioxidant activities analysis of MEP-H and MEP-N

3 结 论

多糖是羊肚菌生物活性多样性的重要物质基础^[11]。本研究表明, 三地羊肚菌菌丝体胞外多糖 MEP-H 和 MEP-N

均具有良好的降血糖活性。文献报道了羊肚菌多糖可以抑制 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶活性并可以抑制血液中葡萄糖的扩散速率^[29], 与本研究结果一致。本研究中降血糖活性研究同样采用了 α -淀粉酶抑制率和对 α -葡萄糖苷酶抑制

率为评价指标, MEP-H 和 MEP-N 表现出对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性更为显著。当质量浓度 0.75 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 对 α -淀粉酶抑制率最高, 而质量浓度 0.5 mg/mL 时, MEP-H 和 MEP-N 对 α -葡萄糖苷酶抑制率表现较好, 表明 MEP-H 和 MEP-N 在不同浓度对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性表现不同。本研究还表明, 三地羊肚菌菌丝胞外多糖 MEP-H 和 MEP-N 均具有良好的抗氧化活性。MEP-H 和 MEP-N 在质量浓度分别为 4 mg/mL、2 mg/mL 时达到最高 DPPH 自由基清除活性, 而质量浓度为 8 mg/mL 时, 表现出 ABTS⁺ 自由基清除率、总还原力和超氧阴离子清除率最高, 表明 MEP-H 和 MEP-N 在不同浓度对抗氧化活性表现不同。多糖生物活性的差异性体现可能与其化学结构密切相关^[31-32], 未来可以对 MEP-H 和 MEP-N 进行进一步的结构解析, 并对其活性和构效关系进行深入研究。

本研究对 MEP 进行纯化, 得到多糖 MEP-H 和 MEP-N。羊肚菌菌丝胞外多糖 MEP-H 和 MEP-N 碳水化合物含量分别为(78.12±0.14)%和(77.37±0.03)%, 紫外扫描分析表明 MEP-H 和 MEP-N 不含蛋白质和核酸, 红外光谱分析表明 MEP-H 和 MEP-N 具有多糖的特征吸收峰。MEP-H 和 MEP-N 均具有良好的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性, 其中对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性更为显著; 通过 DPPH 自由基清除活性、ABTS⁺ 自由基清除活性、超氧阴离子自由基清除活性以及总还原力实验, 表明 MEP-H 和 MEP-N 均具有良好的抗氧化活性。本研究结果为液态发酵羊肚菌的深入研究提供了理论依据, 同时为羊肚菌胞外多糖在食品和医药行业的应用奠定基础。

参考文献

- [1] 刘伟, 张亚, 何培新. 羊肚菌生物学及栽培技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2017.
LIU W, ZHANG Y, HE PX. *Morel* biology and cultivation [M]. Changchun: Jilin Science and Technology Press, 2017.
- [2] 陈彦, 潘见, 周丽伟, 等. 羊肚菌胞外多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 食品科学, 2008(9): 553-556.
CHEN Y, PAN J, ZHOU LW, et al. Antitumor activity of extracellular polysaccharides from *Morchella esculenta* [J]. Food Science, 2008(9): 553-556.
- [3] 柏秋月, 邓百万, 杨学英, 等. 4 株羊肚菌胞外多糖含量及其生物活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(8): 25-31.
BAI QY, DENG BW, YANG XY, et al. Study on extracellular polysaccharide content and biological activity of four *Morchella* strains [J]. Food Research and Development, 2020, 41(8): 25-31.
- [4] CAI ZN, LI W, MEHMOOD S, et al. Structural characterization, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of a heteropolysaccharide from the fruiting bodies of *Morchella esculenta* [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 1: 29.
- [5] 黄瑶, 蒋琳, 刘影, 等. 羊肚菌多糖提取、分离纯化及免疫调节活性[J]. 生物加工过程, 2018, 16(6): 35-41.
HUANG Y, JIANG L, LIU Y, et al. Extraction, isolation, purification and immunoregulatory activity of polysaccharides from *Morehella esculenta* [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2018, 16(6): 35-41.
- [6] 董雨菡. 羊肚菌酶提子实体多糖的抗氧化、降血脂和器官保护作用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
DONG YH. Antioxidant, anti-hyperlipidemia and organic protection effects of enzyme-assisted polysaccharide from *Morehella esculenta* [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2019.
- [7] 明建, 曾凯芳, 赵国华, 等. 羊肚菌水溶性多糖 PMEP-1 降血脂作用研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 285-288.
MING J, ZENG KF, ZHAO GH, et al. Hypolipidemic activity of water soluble polysaccharide PMEP-1 from *Morchella esculenta* (L.) Pers [J]. Food Science, 2009, 30(17): 285-288.
- [8] 聂建军, 潘保华, 李彩萍, 等. 基于液态黑脉羊肚菌菌丝培养基配方的研究[J]. 中国食用菌, 2014, 33(4): 35-36.
NIE JJ, PAN BH, LI CP, et al. Study on the formula of liquid culture medium based on mycelium of *Morchella angusticeps* [J]. Edible Fungi of China, 2014, 33(4): 35-36.
- [9] 刘华晶, 赵妍. 羊肚菌液体培养基最适碳源氮源优化研究[J]. 南方农业, 2019, 13(26): 136-137, 145.
LIU HJ, ZHAO Y. Optimization of optimal carbon and nitrogen sources for morel liquid medium [J]. South China Agriculture, 2019, 13(26): 136-137, 145.
- [10] 金朝霞, 王云龙, 王培忠, 等. 羊肚菌液体发酵培养基条件优化[J]. 大连工业大学学报, 2014, 33(6): 416-419.
JIN ZX, WANG YL, WANG PZ, et al. Optimization of liquid fermentation conditions of *Morchella* [J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 2014, 33(6): 416-419.
- [11] 李婷, 刘冰, 林杉, 等. 羊肚菌多糖提取分离及生物活性研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(11): 117-125.
LI T, LIU B, LIN S, et al. Advances in extraction, isolation and bioactivity of polysaccharides from *Morel* [J]. China Biotechnology, 2022, 42(11): 117-125.
- [12] 林杉, 赵萍, 付云娜, 等. 羊肚菌胞外多糖液态发酵培养基配方优化及其体外降血糖活性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 196-203.
LIN S, ZHAO P, FU YN, et al. Optimization of liquid fermentation medium formulation of *Morchella eohespera* exopolysaccharide and its hypoglycemic activity *in vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 196-203.
- [13] LIU B, SHANG ZZ, LI QM, et al. Structural features and anti-gastric cancer activity of polysaccharides from stem, root, leaf and flower of cultivated *Dendrobium huoshanense* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143(1): 651-664.
- [14] DUBOLS M, GILLES KA, HAMILTON JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [15] 范三红, 贾槐旺, 张锦华, 等. 羊肚菌多糖纯化、结构分析及抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 65-71.
FAN SH, JIA HW, ZHANG JH, et al. Purification, structural analysis and antioxidant activity of polysaccharides from *Morchella esculenta* [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(3): 65-71.
- [16] XU YQ, GAO YK, LIU F, et al. Sulfated modification of the polysaccharides from blackcurrant and their antioxidant and α -amylase

- inhibitory activities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 1344–1354.
- [17] 杨小倩, 孙佳明, 吴楠, 等. 玉蜀黍不同部位提取物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(1): 15–21, 27.
YANG XQ, SUN JM, WU N, *et al.* Inhibitory effects of extracts from different parts of *Maize* on α -glucosidase and α -amylase [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(1): 15–21, 27.
- [18] ZHONG QW, ZHOU TS, QIU WH, *et al.* Characterization and hypoglycemic effects of sulfated polysaccharides derived from brown seaweed *Undaria pinnatifida* [J]. *Food Chemistry*, 2021, 341: 128148.
- [19] LIU YT, SUN J, LUO ZY, *et al.* Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(5): 1238–1244.
- [20] 沈佳琳. 黑果枸杞多糖的提取纯化、抗氧化活性及体外模拟消化和发酵研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
SHEN JL. Isolation, purification, antioxidant bioactivity, stimulated digestion and fermentation of polysaccharides from *Lycium ruthenicum* Murr [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [21] ZHANG XX, NI ZJ, ZHANG F, *et al.* Physicochemical and antioxidant properties of *Lycium barbarum* seed dreg polysaccharides prepared by continuous extraction [J]. *Food Chemistry-X*, 2022, 14: 100282.
- [22] 秦丹丹, 曹慧馨, 白洋, 等. 黑木耳黑枸杞复合饮料研制及其体外抗氧化性[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(3): 108–116.
QIN DD, CAO HX, BAI Y, *et al.* Study on preparation of *Auricularia auricular* and *Lycium ruthenicum* Murr. compound beverage and its antioxidant activity [J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(3): 108–116.
- [23] LIANG J, ZHAO YL, YANG FR, *et al.* Preparation and structure-activity relationship of highly active black garlic polysaccharides [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 220: 601–612.
- [24] LIU XC, ZHU ZY, TANG YL, *et al.* Structural properties of polysaccharides from cultivated fruit bodies and mycelium of *Cordyceps militaris* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 142: 63–72.
- [25] BOULET JC, WILLIAMS P, DOCO T. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 69(1): 79–85.
- [26] WANG SQ, LIU B, LIU S, *et al.* Structural features of an acidic polysaccharide with the potential of promoting osteoblast differentiation from *Lycium ruthenicum* Murr [J]. *Natural Product Research*, 2020, 36(16): 2249–2254.
- [27] 刘利娜, 王仁中, 吴丝雨, 等. 两种桑黄多糖的结构分析及其抗炎活性研究[J]. *安徽中医药大学学报*, 2024, 43(1): 107–112.
LIU LN, WANG RZ, WU SY, *et al.* Structure and anti-inflammatory activity of two Sanghuang *Porus vaninii* polysaccharides [J]. *Journal of Anhui University of Chinese Medicine*, 2024, 43(1): 107–112.
- [28] 逢梦玉, 隋昕怡, 刘丹, 等. 桑黄多糖提取工艺优化、结构表征及抗氧化活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(12): 48–57.
PANG MY, SUI XY, LIU D, *et al.* Optimization of extraction process, structural characterization and antioxidant activity of *Sanghuangporus* polysaccharides [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(12): 48–57.
- [29] 李井雷, 刘玉婷, 宗帅, 等. 羊肚菌胞外多糖体外降血糖降血脂活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(16): 39–45.
LI JL, LIU YT, ZONG S, *et al.* *In vitro* hyperglycemic and hypolipidemic activity of *Morchella esculenta* extracellular polysaccharides [J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(16): 39–45.
- [30] 王晓婷. 蛹虫草多糖分子结构与 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
WANG XT. Study on the molecular structure of polysaccharide of *Cordyceps militaris* and inhibitory of α -glucosidase activity [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2017.
- [31] 刘冰. 霍山石斛(栽培)多糖化学结构系统解析及抗胃癌活性构效关系研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019.
LIU B. Study on chemical structural characteristics and relationship between structure and anti-gastric cancer activity of polysaccharides from cultivated *Dendrobium huoshanense* [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.
- [32] 林润, 江雪儿, 傅嘉懿, 等. 两种单丛茶多糖的表征及体外抗氧化活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(14): 234–241.
LIN R, JIANG XER, FU JY, *et al.* Characterization and *in vitro* antioxidant activity study of two polysaccharides from Dancong tea [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(14): 234–241.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)