

不同处理方法对灵芝 β -葡聚糖降解效果的比较研究

秦秀^{1,2} 刘艳芳^{2*} 张劲松² 唐庆九² 周帅² 冯杰² 王晨光³

李德顺² 韩伟^{1*}

①华东理工大学药学院制药工程与过程化学教育部工程研究中心 上海市新药设计重点实验室 上海 200237

②上海市农业科学院食用菌研究所 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心 上海市农业遗传育种重点实验室 上海 201403

③上海百信生物科技有限公司 上海 201403

摘要: 本研究采用酸法、碱法、酶法和微波法对灵芝 β -葡聚糖进行降解, 通过降解率、产物分子量变化、产物聚合度分布等指标比较了不同方法的降解效果。结果表明, 微波法降解率高达 94%, 处理后产物的分子量明显降低, 寡糖产物聚合度分布广。酶法降解率约为 40%, 寡糖产物中含有 DP2-5 的成分。酸法及碱法降解率低于 20%, 寡糖产物少。研究表明, 与其他 3 种方法相比, 微波法降解率高、产物丰富、操作条件易于控制, 是一种简单、高效的降解灵芝 β -葡聚糖、制备灵芝 β -葡寡糖的方法。

关键词: 灵芝 β -葡聚糖, β -葡寡糖, 降解

[引用本文] 秦秀, 刘艳芳, 张劲松, 唐庆九, 周帅, 冯杰, 王晨光, 李德顺, 韩伟, 2021. 不同处理方法对灵芝 β -葡聚糖降解效果的比较研究. 菌物学报, 40(9): 2495-2504

Qin X, Liu YF, Zhang JS, Tang QJ, Zhou S, Feng J, Wang CG, Li DS, Han W, 2021. A comparative study of different methods of degrading *Ganoderma lingzhi* β -glucan. Mycosystema, 40(9): 2495-2504

基金项目: 上海市自然科学基金 (20ZR1418700); 上海市闵行区领军人才项目 (201844)

Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (20ZR1418700) and Leading Talent Project of Minhang District, Shanghai (201844).

* Corresponding authors. E-mail: aliu-1980@163.com, whan@ecust.edu.cn

ORCID: QIN Xiu (0000-0002-0749-239X), LIU Yan-Fang (0000-0001-9913-6482), HAN Wei (0000-0001-9517-3198)

Received: 2021-03-14, accepted: 2021-04-08

A comparative study of different methods of degrading *Ganoderma lingzhi* β -glucan

QIN Xiu^{1, 2} LIU Yan-Fang² ZHANG Jing-Song² TANG Qing-Jiu² ZHOU Shuai²
FENG Jie² WANG Chen-Guang³ LI De-Shun² HAN Wei¹

① Engineering Research Centre of Pharmaceutical Process Chemistry, Ministry of Education; Shanghai Key Laboratory of New Drug Design; School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

② Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Resources and Utilization of Edible Fungi (South), Ministry of Agriculture, P.R. China, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201403, China

③ Shanghai Baixin Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 201403, China

Abstract: Different methods were used to degrade *Ganoderma lingzhi* β -glucan, and the degradation rate, molecular weight variation and polymerization degree distribution were used as indexes to compare the degradation effects. Results showed that the degradation rates of the β -glucans treated by microwave, enzymatic and chemical methods were about 94%, 40% and 20%, respectively. By use of microwave method, the molecular weight of degradation products significantly reduced, and the polymerization degree of oligosaccharides was widely distributed. The distribution of oligosaccharide polymerization degree in β -glucan degradation products obtained through enzymatic treatment was narrow, and the oligosaccharide products under acid and alkali treatments were less. Among four tested methods, microwave exhibited the highest efficiency, and the operation was simple and controllable, being suitable for the preparation of *Ganoderma lingzhi* β -glucooligosaccharide.

Key words: *Ganoderma* β -glucan, β -glucooligosaccharide, degradation

灵芝自古就有“仙草”、“瑞草”之称，营养丰富，药用价值高，在我国已有 4 000 年的药用历史 (Zhang *et al.* 2010)。多糖作为灵芝中最主要的活性成分之一，具有广泛的药理作用，如免疫调节 (Wang *et al.* 2018)、抗肿瘤 (Zhang 2017; Faruque 2018) 及抗炎 (Chung *et al.* 2017; Zhang 2017) 等。 β -葡聚糖是灵芝多糖的主要组成部分，已经被证明具有免疫调节 (Wang *et al.* 2017; Li *et al.* 2020)、抗炎 (Wang *et al.* 2014)、抗肿瘤 (Fu *et al.* 2019) 等多种活性。但灵芝中的 β -葡聚

糖分子量多为百万级，水溶性较差且溶液黏度较高，这些特性影响了其功效发挥及应用。

已有研究表明， β -葡聚糖降解后得到的寡糖生物学活性有所提高，例如香菇 β -葡聚糖作为我国抗肿瘤和抗肝炎病毒的临床一线用药，其降解产物香菇六糖对实体瘤和腹水瘤的抑瘤率明显提高 (张志平等 2005)；不溶性的可德兰多糖经 β -1,3-内切葡聚糖酶处理后免疫活性提高 (Kataoka *et al.* 2002)；经化学降解法得到的较低聚合度的寡糖能够快速激发烟草的防御活性 (Fu *et al.* 2011)；此

外, Klarzynski *et al.* (2000) 发现从海带 β -葡聚糖中得到的昆布五糖为诱导植物防御反应的最小结构单元。这类 β -葡聚糖与灵芝 β -葡聚糖在结构上存在较高相似性, 均以 β -1,3-糖苷键为主链, 并含有不同比例的 β -1,6-糖苷键连接的侧链, 因此将灵芝 β -葡聚糖降解为寡糖片段是提高其生物活性的有效手段之一。目前已有关于微生物、谷物及酵母 β -葡聚糖的降解研究, 但由于不同的 β -葡聚糖在分子量、结构及物理特性等方面存在差异, 其降解效果也会存在明显的不同, 而目前对于灵芝 β -葡聚糖的降解研究较少, 因此寻找一种有效降解灵芝 β -葡聚糖的方法至关重要。

目前常用的 β -葡聚糖降解方法主要有化学法 (Li *et al.* 2013; Lee *et al.* 2016; Zhu & Wu 2019)、物理法 (Khan *et al.* 2015; Ahmad *et al.* 2016; Liu *et al.* 2018) 及酶法 (Li *et al.* 2014; Fu *et al.* 2015; Li *et al.* 2018) 等。实验室前期以 20%乙醇沉淀法从灵芝子实体水提物中制备得到了灵芝 β -葡聚糖 GLP20 (Liu *et al.* 2014), 分析显示, 其总糖含量为 95.9%, 分子量为 2.42×10^6 g/mol, 结构是以 β -(1 $\rightarrow$ 3)-糖苷键连接为主链、以 β -(1 $\rightarrow$ 6)-糖苷键连接为支链的葡聚糖, 支链和主链比例为 1:3, 可作为研究灵芝 β -葡聚糖降解的原料 (Liu *et al.* 2018)。本研究分别采用酸法、碱法、微波法及酶法对其进行降解, 以降解率、产物的分子量变化以及聚合度分布等为评价指标对不同方法的降解效果进行比较, 旨在确定一种降解率高、产物丰富、简单高效的降解方法, 为灵芝 β -葡聚糖降解产物的制备及活性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 材料: 灵芝 β -葡聚糖编号为 GLP20, 由

实验室制备获得。

1.1.2 试剂: 溶壁酶 (lysing enzymes from *Trichoderma*, 批号 SLBJ0553V) 购于 Sigma 公司; β -1,3-内切葡聚糖酶 (endo-1,3- β -glucanase, 批号 180503a)、昆布二糖 (laminaribiose, 批号 150402a)、昆布三糖 (laminaritriose, 批号 170603)、昆布四糖 (laminaritetraose, 批号 150104)、昆布五糖 (laminaripentaose, 批号 150305)、昆布六糖 (laminarihexaose, 批号 190606) 等寡糖标准品均购于 Megazyme 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器设备: 恒温混匀仪, 杭州奥盛仪器有限公司; 高通量密闭高压微波消解仪, 美国 CEM 公司; Waters2695 高效液相色谱仪 (配有 2414 型示差折光检测器), 美国 Waters 公司; Dionex ICS-5000⁺ 离子色谱系统, 美国 Dionex 公司。

1.2 方法

1.2.1 灵芝 β -葡聚糖溶液的配制: 定量称取灵芝 β -葡聚糖, 加入 0.2 mol/L 的氢氧化钠溶液在 40 $^{\circ}$ C 水浴中搅拌使其充分溶解, 以 6 mol/L 的硫酸溶液调节 pH 至中性, 定容备用。

1.2.2 酸法对灵芝 β -葡聚糖的降解研究: 参考 Li *et al.* (2013) 的降解方法并略作修改, 取 5 mL 20 mg/mL 的灵芝 β -葡聚糖溶液, 缓慢加入 6 mol/L 的硫酸溶液和水, 使灵芝 β -葡聚糖终浓度为 10 mg/mL, 并使酸的终浓度分别为 0.1、0.5、1 mol/L, 60 $^{\circ}$ C 下加热降解, 分别在 0、2、4、6、8 h 取样, 以 10 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至中性, 用于后续分析。

1.2.3 碱法对灵芝 β -葡聚糖的降解研究: 定量称取 4 份 100 mg 的灵芝 β -葡聚糖固体, 缓慢加入 10 mol/L 的氢氧化钠溶液和水, 使灵芝 β -葡聚糖的终浓度为 10 mg/mL, 并使碱的终浓度分别为 0.2、0.5、1、2 mol/L, 40 $^{\circ}$ C 条件下加热降解, 每隔 20 h 取样一次, 以 6 mol/L 的硫酸溶液调节 pH 至中性, 用于后续分析。

1.2.4 酶法对灵芝 β -葡聚糖的降解研究:取灵芝 β -葡聚糖溶液, 参考说明书所述最适水解条件(溶壁酶 pH 6.5, 40℃; β -1,3-内切葡聚糖酶 pH 4.5, 40℃), 分别于 10mL 灵芝 β -葡聚糖溶液中加入 4mg 溶壁酶, 9mL 灵芝 β -葡聚糖溶液中加入 1mL β -1,3-内切葡聚糖酶并使灵芝 β -葡聚糖的终浓度为 10mg/mL, 酶解 4–8h 后分别取样在沸水浴中加热 10min 使酶灭活, 所得酶解产物用于后续分析。

1.2.5 微波法对灵芝 β -葡聚糖的降解研究:将 10mg/mL 的灵芝 β -葡聚糖置于微波消解罐中, 设定微波功率为 1 000W, 温度分别为 140、160、180℃, 处理 60min 后收集产物用于后续分析。

1.2.6 降解率的测定:降解率以醇沉分离与苯酚-硫酸法测定总糖含量(左琦等 2008)相结合的方式进行分析, 降解产物经 50%乙醇醇沉后离心得到上清和沉淀, 分别测定其总糖含量, 基于以下公式计算降解率: $\omega = A_1 / (A_1 + A_2) \times 100\%$, 式中: A_1 为 50%醇沉上清中糖含量; A_2 为 50%醇沉沉淀中糖含量; ω 为降解率(%)。

1.2.7 高效凝胶尺寸排阻色谱法 (HPSEC) 分析产物分子量变化:色谱柱: TSK-GEL 系列 G6000PW_{XL} 和 G4000PW_{XL} (7.8mm×300mm, 日本 TOSOH 公司)串联; 检测器: Waters 2414 示差折光检测器; 流动相: 0.15mol/L 硝酸钠, 0.05mol/L 磷酸二氢钠, 0.02%叠氮钠; 柱温: 30℃; 流速: 0.5mL/min; 上样量: 100 μ L。

1.2.8 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法 (HPAEC-PAD) 分析降解产物中的片段组成:色谱柱: 美国 Dionex 公司 CarboPacTM PA-100 柱 (4mm×250mm); 洗脱液: 流动相 A: 150mmol/L 氢氧化钠; 流动相 B: 150mmol/L NaOH 和 500mmol/L 醋酸钠; 柱温和脉冲安培检测器的温度维持在 30℃; 进样量: 25 μ L。梯度洗脱程序如下: 0–5min, A/B, 90/10 (V/V); 5–30min, A/B, 80/20 (V/V);

30–30.1min, A/B, 30/70 (V/V); 30.1–40min, A/B, 0/100 (V/V); 40–45min, A/B, 90/10 (V/V)。

2 结果与分析

2.1 酸法降解对灵芝 β -葡聚糖降解效果的分析

灵芝 β -葡聚糖经不同浓度的硫酸溶液降解 8h 所得产物的分子量变化分析结果见图 1A, 可以看出在硫酸浓度为 0.1–1.0mol/L 之间, 随着酸浓度的增加, 产物峰的保留时间出现右移, 但是分子量变化不明显, 仅从 2.42×10^6 g/mol 降至 1.05×10^6 g/mol, 表明此浓度范围内的硫酸对灵芝 β -葡聚糖的降解效果较差, 测定其降解率仅为 5%–12%, 与液相结果相符。对酸浓度为 1.0mol/L 时不同时间下降解产物片段分析发现, 其出峰时间主要集中于 2–7min, 表明降解后寡糖产物主要为单糖及二糖, 寡糖种类较少; 对比降解 2–8h 的产物可知, 随着时间的改变, 产物的寡糖种类并未表现出明显的变化, 但随着降解时间的延长, 单糖含量逐渐增加(图 1B)。

2.2 碱法降解对灵芝 β -葡聚糖降解效果的分析

灵芝 β -葡聚糖的水溶性较差, 可溶于 NaOH 溶液中, 并且随着 NaOH 浓度的提高, 其结构由三螺旋结构变为无规则的卷曲形式(Liu *et al.* 2014)。本研究分别选用了 0.2–2mol/L 的氢氧化钠对灵芝 β -葡聚糖进行降解, 结果发现降解率随着碱浓度的增加由 11.95%提高至 18.57%, 并且 4 种浓度下碱降解产物的出峰时间、峰个数及峰形基本一致。灵芝 β -葡聚糖经 2mol/L 的氢氧化钠降解 0–120h 产物的分子量变化见图 2A, 结果表明随着碱降解时间的延长, 产物的分子量仅从 2.42×10^6 g/mol 降至 1.01×10^6 g/mol, 结合降解率结果可知, 碱降解对灵芝 β -葡聚糖降解效果较弱。不同

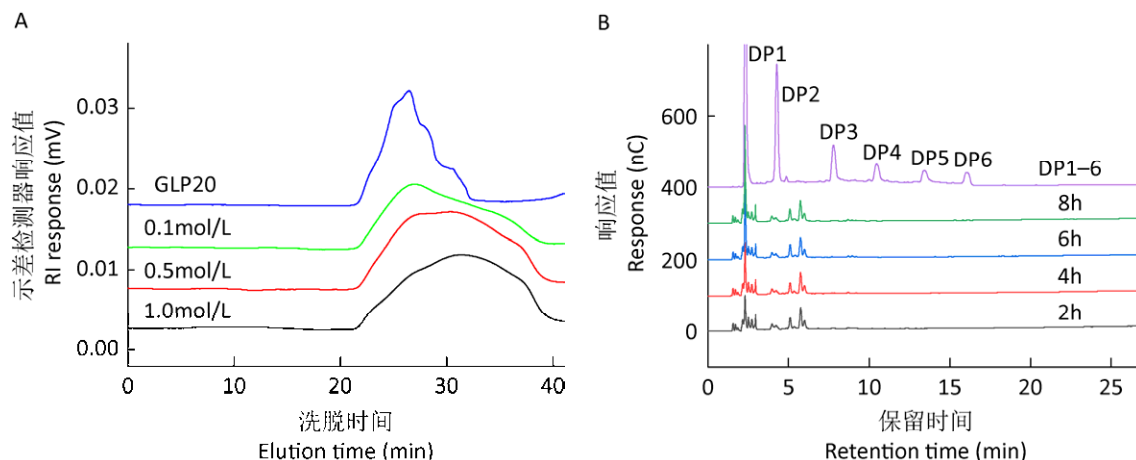


图 1 酸降解产物分析 A: 不同浓度硫酸降解产物的高效凝胶尺寸排阻色谱图. B: 1mol/L 硫酸降解不同时间所得产物的高效阴离子色谱图; DP1–6 代表不同聚合度标品, DP1: 葡萄糖; DP2: 昆布二糖; DP3: 昆布三糖; DP4: 昆布四糖; DP5: 昆布五糖; DP6: 昆布六糖. 下同

Fig. 1 Analysis of β -glucan degradation products obtained through acid treatment. A: HPSEC analysis of degradation products obtained under treatments of different concentrations of H_2SO_4 . B: HPAEC analysis of degradation products obtained through degradation using 1mol/L H_2SO_4 under different periods; DP1–6 indicate standard products with different degrees of polymerization, DP1: Glucose; DP2: Laminaribiose; DP3: Laminaritriose; DP4: Laminaritetraose; DP5: Laminaripentaose; DP6: Laminarihexaose. The same below.

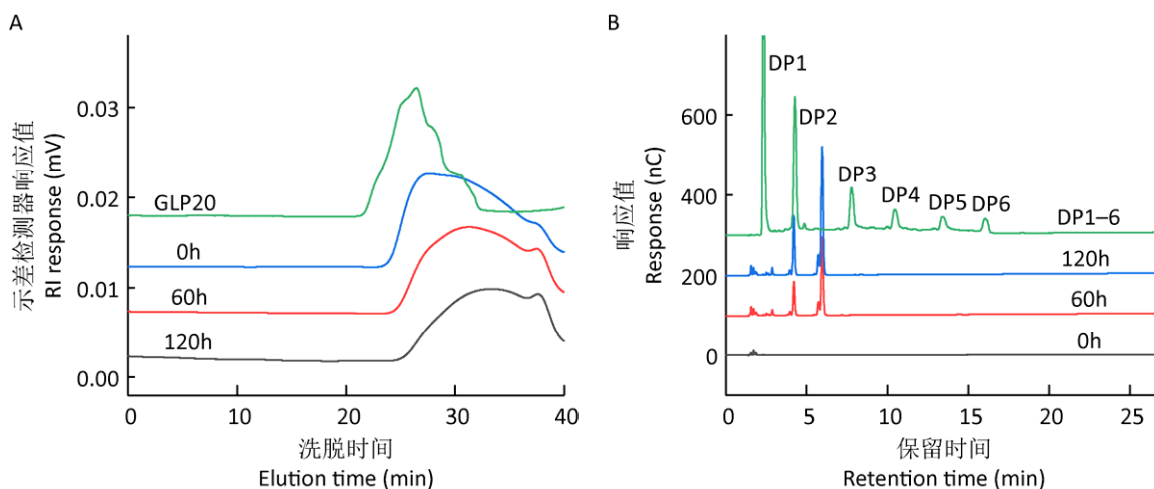


图 2 碱降解产物的分析 A: 2mol/L NaOH 降解不同时间所得产物的高效凝胶尺寸排阻色谱图; B: 2mol/L NaOH 降解不同时间所得产物的高效阴离子色谱图

Fig. 2 Analysis of β -glucan degradation products obtained through alkali treatment. A: HPSEC analysis of degradation products obtained through degradation using 2mol/L NaOH under different periods; B: HPAEC analysis of degradation products obtained through degradation using 2mol/L NaOH under different periods.

时间下碱降解产物片段的分析结果显示,产物出峰时间主要在 4–7min 之间,并且随着降解时间的增加,产物峰的个数保持不变,仅在峰

面积上有所增加 (图 2B)。

2.3 酶法降解对灵芝 β -葡聚糖降解效果的分析

本研究基于灵芝 β -葡聚糖的结构特征,

选择溶壁酶和 β -1,3-内切葡聚糖酶对其进行降解。两种酶降解产物的分子量分布特征分析结果显示, 产物在原样处的峰均有明显的降低, 测得溶壁酶降解率为 37.28%, β -1,3-内切葡聚糖酶降解率为 39.93%, 表明两种酶均能将大分子量的 β -葡聚糖降解为分子量较小的片段 (图 3A)。以高效阴离子色谱对产物进行分析, 降解后片段主要在 2–10min 之间, 寡糖聚合度较集中 (图 3B)。

2.4 微波法降解对灵芝 β -葡聚糖降解效果的分析

基于 Wang *et al.* (2016) 在采用微波法对可德兰多糖进行降解时发现作用温度对降解率及产物的寡糖组成具有较大的影响, 本研究对固定微波功率下不同温度对灵芝 β -葡聚糖的降解影响进行了考察。结果表明, 不同温度下微波降解产物的寡糖种类差异较大。降解产物的分子量变化情况见图 4A, 不同温度下的微波降解产物在原样处的色谱峰基本消失, 结合其产物的降解率高于 94%, 说明微波法对灵芝 β -葡聚糖有明显的降解效

果。微波降解产物片段分析见图 4B, 140℃ 条件下产物中寡糖种类较丰富, 而 160℃ 及 180℃ 所得到的产物中寡糖种类明显降低, 产物中主要为单糖及较低聚合度的寡糖。

2.5 降解方法比较

2.5.1 降解率比较: 将不同降解方法对灵芝 β -葡聚糖的降解率进行对比发现, 酸法及碱法对灵芝 β -葡聚糖的降解效率较低, 其中酸法降解率为 12.04%, 碱法降解率为 18.57%。专一性的 β -1,3-内切葡聚糖酶的降解率较化学法有明显提高, 可达 39.93%, 而微波降解法的降解率高达 94.09% (表 1)。

2.5.2 降解产物分析: 通过对不同方法得到的降解产物进行比较, 可以看出: 酸法、碱法及酶法降解率明显低于微波降解; 酸法与碱法降解产物中寡糖种类较少; β -1,3-内切葡聚糖酶降解产物中寡糖种类较化学法降解产物明显增多, 但寡糖产物主要集中于聚合度较小的三糖及四糖, 聚合度较高的寡糖产物较少; 微波法降解产物分布较广, 寡糖种类明显优于其余 3 种降解产物。

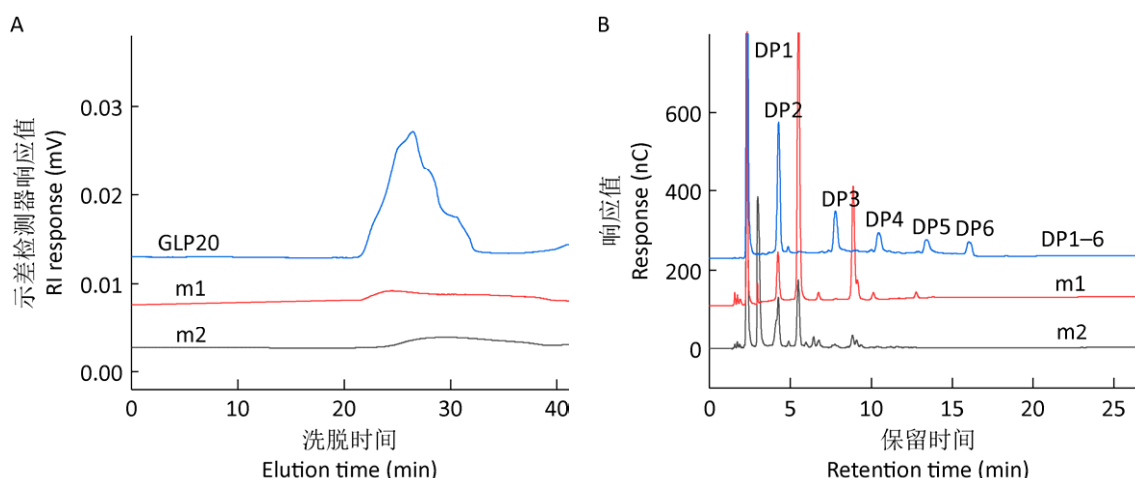


图 3 酶降解产物的高效凝胶尺寸排阻色谱图 (A) 和高效阴离子色谱图 (B) m1: β -1,3-内切葡聚糖酶降解产物; m2: 溶壁酶降解产物

Fig. 3 HPSEC (A) and HPAEC (B) analysis of β -glucan degradation products obtained through enzymatic treatment. m1: The degradation product obtained through endo-1,3- β -glucanase treatment; m2: The degradation product obtained through lysing enzyme treatment.

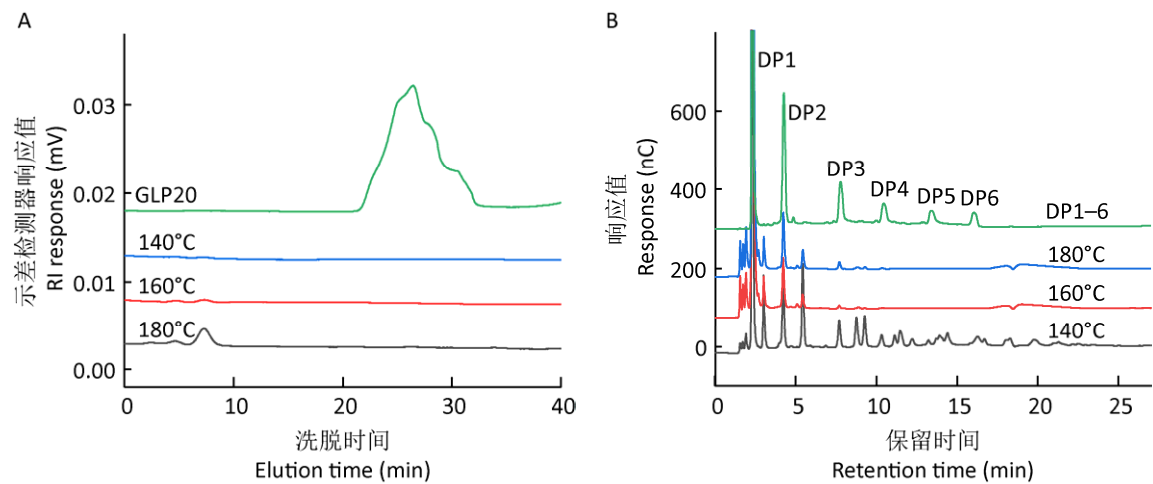


图 4 不同温度下微波降解产物的高效凝胶尺寸排阻色谱图 (A) 和高效阴离子色谱图 (B)
Fig. 4 HPSEC (A) and HPAEC (B) analysis of β -glucan degradation products obtained through microwave treatment at different temperatures.

表 1 不同降解方法的降解率

Table 1 The degradation rate of *Ganoderma lingzhi* β -glucan degraded by using different methods

降解方法	酸法	碱法	酶法	微波法
Degradation methods	Acid method	Alkali method	Enzyme method	Microwave method
降解率	12.04 $\pm$ 0.87 ^a	18.57 $\pm$ 0.36 ^b	39.93 $\pm$ 1.31 ^c	94.09 $\pm$ 1.09 ^d
Degradation rate (%)				

注：不同小写字母表示差异显著性 ($P<0.01$)
Note: Different lowercase letters indicate a significant difference at $P<0.01$.

3 讨论

作为灵芝中的有效成分之一，灵芝 β -葡聚糖因具有多种活性而备受关注，但其分子量大、溶解性差及黏度大的特点使应用受到限制，而将葡聚糖降解为葡寡糖可降低分子量、提高水溶性、减小黏度并增强生物活性，因此寻找一种有效降解灵芝 β -葡聚糖的方法至关重要。目前降解 β -葡聚糖的方法有化学法、酶法及物理法等，酸降解作为目前降解多糖常用的方法之一，其优势在于成本低、简单易行、可通过控制条件使多糖降解为单糖及不同聚合度的寡糖，例如 Warrand & Janssen (2007) 采用 0.45mol/L 的盐酸对淀粉进行降解时发现，作用时间为 45min 时降

解程度达到 88.9%，同时产物主要为 DP1-7 的寡糖。但本研究发现硫酸对灵芝 β -葡聚糖的降解率仅为 12%，且产物中主要为单糖和二糖，这可能与灵芝 β -葡聚糖独特的三螺旋结构有关，此前 Grandpierre *et al.* (2008) 采用硫酸对可德兰多糖进行降解时发现作用时间长达 90h 时降解率仍低于 25%，且产物主要为单糖及二糖，这进一步证明了此猜测。前期 Liu *et al.* (2014) 以氢氧化钠对灵芝 β -葡聚糖进行研究时发现在碱浓度大于 0.15mol/L 时灵芝 β -葡聚糖会发生构象转变，其三股螺旋结构在碱的作用下会解螺旋为单链结构。本研究进一步以更高浓度的碱对其进行降解，结果发现在高浓度碱作用下 β -葡聚糖的分子量有明显的降低，但是降解率低

于 20%，并且产物中寡糖种类较少。酶降解法因其降解速度快、降解产物的分子量易于控制等优点在 β -葡聚糖的降解研究中具有较大潜力。本研究基于灵芝 β -葡聚糖的结构特点选择了可断裂 β -糖苷键的酶，结果发现酶法降解率约为 40%，效率明显高于化学法，此外寡糖产物分布较窄、可基于专一性酶断键的特点推测产物的结构，因此酶法降解产物在特定聚合度产物的制备上具有明显的优势。然而酶本身价格昂贵，对 pH、温度、样品浓度等要求较高，极大地增加了降解成本。微波法作为一种物理降解方法，有操作简便、环境污染小、产品后处理简单等优势，本研究探讨了不同作用温度下微波降解灵芝 β -葡聚糖的效果，结果表明微波温度为 140℃ 时降解效率高、寡糖产物丰富，而 160℃ 及 180℃ 条件下灵芝 β -葡聚糖的降解率高，但产物主要以葡萄糖为主。温度作为微波能量的一种表现形式，研究不同温度下微波降解产物实际是在考察微波辐射能对样品的降解产生怎样的影响，从实验结果可知微波能量对降解产物具有较大影响，较低辐射能量下，产物的组成较为丰富；而辐射能量过高会导致寡糖含量降低，单糖含量显著增加；此外不同结构的 β -葡聚糖所对应的最优降解温度可能不同，例如 Wang *et al.* (2016) 采用微波法进行降解结构为直链 β -葡聚糖的可德兰时，发现在 180℃ 下处理 60min 时可德兰的降解率可高达 98.4%，且产物中寡糖种类较多，因此采用微波法对 β -葡聚糖进行降解时选择合适的降解条件至关重要。

本研究采用了酸、碱、微波及酶法降解灵芝 β -葡聚糖，研究中采用的标准品为葡萄糖及聚合度为 2–6 的昆布寡糖，其结构为 β -1,3-糖苷键连接而成的直链葡寡糖。采用阴离子色谱对产物进行分析时发现，样品的聚

合度、单糖组成、侧链分支度等均会对保留时间造成一定的影响，此外不同聚合度的寡糖在同一浓度下的色谱峰响应值会有不同。因缺少与灵芝 β -葡聚糖 GLP20 结构单元相似的寡糖标准品，阴离子色谱仅能对降解产物中寡糖的种类和丰富程度进行定性分析，于是本研究中结合了高效凝胶排阻色谱法及苯酚硫酸法对各方法的降解效果进行比较，结果发现微波法降解的效率显著优于化学法和酶法，可作为后期大量降解灵芝 β -葡聚糖、制备灵芝 β -葡寡糖的主要方法。此前已有研究表明 β -葡聚糖的生物活性与其高级构象、分子量大小、支链比例等结构特征相关 (Zhang *et al.* 2005; Wang *et al.* 2017)，但目前对 β -葡寡糖聚合度与活性之间的关系研究较少。本研究通过微波降解法制备了一批聚合度分布较广的寡糖，为进一步明确寡糖的构效关系，将在后期对降解后的产物进行分离纯化，得到单一聚合度的寡糖并对其进行结构鉴定，以便为将来不同聚合度寡糖的定量、定性分析及活性评价提供基础。

[REFERENCES]

- Ahmad M, Gani A, Shah A, Gani A, Masoodi FA, 2016. Germination and microwave processing of barley (*Hordeum vulgare* L.) changes the structural and physicochemical properties of β -D-glucan and enhances its antioxidant potential. *Carbohydrate Polymers*, 153: 696-702
- Chung DJ, Yang MY, Li YR, Chen WJ, Hung CY, Wang CJ, 2017. *Ganoderma lucidum* repress injury of ethanol-induced steatohepatitis via anti-inflammation, anti-oxidation and reducing hepatic lipid in C57BL/6J mice. *Journal of Functional Foods*, 33: 314-322
- Faruque AM, 2018. *Ganoderma lucidum*: persuasive biologically active constituents and their health endorsement. *Biomedicine and Pharmacotherapy*,

- 107: 507-519
- Fu YB, Cheng LK, Meng YY, Li SG, Zhao XM, Du YG, Yin H, 2015. Cellulosimicrobium cellulans strain E4-5 enzymatic hydrolysis of curdlan for production of (1→3)-linked beta-D-glucan oligosaccharides. Carbohydrate Polymers, 134: 740-744
- Fu YB, Yin H, Wang WX, Wang MY, Hang HY, Zhao XM, Du YG, 2011. β-1,3-Glucan with different degree of polymerization induced different defense responses in tobacco. Carbohydrate Polymers, 86(2): 774-782
- Fu YL, Shi L, Ding K, 2019. Structure elucidation and anti-tumor activity *in vivo* of a polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. International Journal of Biological Macromolecules, 141: 693-699
- Grandpierre C, Janssen HG, Laroche C, Michaud P, Warrand J, 2008. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β-(1→3) oligoglucans. Carbohydrate Polymers, 71(2): 277-286
- Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K, 2002. Activation of macrophages by linear (1→3)-β-d-glucans. Journal of Biological Chemistry, 277(39): 36825-36831
- Khan AA, Gani A, Shah A, Masoodi FA, Hussain PR, Wani IA, Khanday FA, 2015. Effect of γ-irradiation on structural, functional and antioxidant properties of β-glucan extracted from button mushroom (*Agaricus bisporus*). Innovative Food Science & Emerging Technologies, 31: 123-130
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B, 2000. Linear β-1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. Plant Physiology, 124(3): 1027-1037
- Lee SH, Jang GY, Kim MY, Hwang IG, Kim HY, Woo KS, Lee MJ, Kim TJ, Lee J, Jeong HS, 2016. Physicochemical and *in vitro* binding properties of barley β-glucan treated with hydrogen peroxide. Food Chemistry, 192: 729-735
- Li J, Gu FF, Cai C, Hu MH, Fan LD, Hao JJ, Yu GL, 2020. Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of the polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. International Journal of Biological Macromolecules, 143: 806-813
- Li J, Zhu L, Zhan XB, Xu M, Lin CC, Zheng ZY, Li WJ, 2014. Purification and characterization of a new endo-β-1,3-glucanase exhibiting a high specificity for curdlan for production of β-1,3-glucan oligosaccharides. Food Science and Biotechnology, 23(3): 799-806
- Li J, Zhu L, Zheng ZY, Zhan XB, Lin CC, Zong Y, Li WJ, 2013. A new effective process for production of curdlan oligosaccharides based on alkali-neutralization treatment and acid hydrolysis of curdlan particles in water suspension. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(19): 8495-8503
- Li KK, Chen W, Wang WX, Tan HD, Li SG, Yin H, 2018. Effective degradation of curdlan powder by a novel endo-β-1→3-glucanase. Carbohydrate Polymers, 201: 122-130
- Liu YF, Tang QJ, Zhang JS, Xia YM, Yang Y, Wu D, Cui SW, 2018. Triple helix conformation of β-D-glucan from *Ganoderma lucidum* and effect of molecular weight on its immunological activity. International Journal of Biological Macromolecules, 114: 1064-1070
- Liu YF, Zhang JS, Tang QJ, Yang Y, Guo QB, Wang Q, Wu D, Cui SW, 2014. Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β-D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Polymers, 101: 968-974
- Wang CH, Shi SS, Chen Q, Lin SQ, Wang R, Wang SZ, Chen CM, 2018. Antitumor and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in glioma-bearing rats. Integrative Cancer Therapies, 17(3): 674-683
- Wang D, Kim DH, Yoon JJ, Kim KH, 2016. Production of high-value β-1,3-glucooligosaccharides by microwave-assisted hydrothermal hydrolysis of curdlan. Process Biochemistry, 52: 233-237
- Wang JG, Yuan YH, Yue TL, 2014. Immunostimulatory activities of β-d-glucan from *Ganoderma*

- lucidum*. Carbohydrate Polymers, 102: 47-54
- Wang Q, Sheng XJ, Shi A, Hu H, Yang Y, Liu L, Fei L, Liu HZ, 2017. β -Glucans: relationships between modification, conformation and functional activities. Molecules, 22(2): 257
- Wang YT, Liu YF, Yu HZ, Zhou S, Zhang Z, Wu D, Yan MQ, Tang QJ, Zhang JS, 2017. Structural characterization and immuno-enhancing activity of a highly branched water-soluble β -glucan from the spores of *Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Polymers, 167: 337-344
- Warrand J, Janssen HG, 2007. Controlled production of oligosaccharides from amylose by acid-hydrolysis under microwave treatment: comparison with conventional heating. Carbohydrate Polymers, 69(2): 353-362
- Zhang JS, Tang QJ, Zhou CY, Jia W, Silva LD, Nguyen LD, Reutter W, Fan H, 2010. GLIS, a bioactive proteoglycan fraction from *Ganoderma lucidum*, displays anti-tumour activity by increasing both humoral and cellular immune response. Life Sciences, 87(19-22): 628-637
- Zhang LN, Li XL, Xu XJ, Zeng FB, 2005. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. Carbohydrate Research, 340(8): 1515-1521
- Zhang Y, 2017. *Ganoderma lucidum* (reishi) suppresses proliferation and migration of breast cancer cells via inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. Biochemical and Biophysical Research Communications, 488(4): 679-684
- Zhang ZP, Yi YT, Ning J, 2005. Synthesis of core gluco-hexasaccharide of lentinan. Chinese Journal of Organic Chemistry, 25(10): 1240-1243 (in Chinese)
- Zhu Q, Wu SJ, 2019. Water-soluble β -1,3-glucan prepared by degradation of curdlan with hydrogen peroxide. Food Chemistry, 283: 302-304
- Zuo Q, Yang HF, Xing ZT, Han Y, Gu SH, 2008. Determination of total sugar in fruit bodies of five edible mushroom species. Acta Edulis Fungi, 15(4): 57-61 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 张志平, 衣悦涛, 宁君, 2005. 香菇多糖核心片段六糖的合成研究. 有机化学, 25(10): 1240-1243
- 左琦, 杨海锋, 邢增涛, 韩烨, 顾赛红, 2008. 食用菌总糖含量测定方法的研究. 食用菌学报, 15(4): 61-65

(本文责编: 韩丽)