

文章编号: 1673-3851 (2011) 04-0616-05

桦褐孔菌多酚的液体深层制备及抗氧化活性研究

朱金卫, 徐向群

(浙江理工大学理学院, 杭州 310018)

摘 要: 用液体深层发酵方式培养并提取了不同时间的桦褐孔菌胞内外多酚, 福林-酚法测定桦褐孔菌胞内外多酚的含量, 通过清除 DPPH· 自由基和羟基自由基测定桦褐孔菌多酚的抗氧化活性, 液质联用技术测定了胞内外多酚的基本组成和含量。结果表明, 桦褐孔菌胞内外多酚最大含量分别为 12.47 mg GAE/g 和 34.7 mg GAE/L, DPPH· 自由基的最大清除率分别为 52.5% 和 54.6%, 羟基自由基的清除率为 80.5% 和 66.2%, 液质联用检测结果显示胞内外多酚含量分别为 96.4% 和 86.3%, 且种类和单一组分含量差异显著。

关键词: 桦褐孔菌; 多酚; 抗氧化活性; 深层发酵

中图分类号: Q538

文献标识码: A

0 引 言

桦褐孔菌是民间长期使用证明具有特定医药保健功效的珍稀药用真菌^[1]。桦褐孔菌多酚是桦褐孔菌重要的药用成分, 具有很强的生理活性, 尤其在抗氧化、延缓衰老、增强免疫等方面有着很好的功效^[2-4]。近年来对桦褐孔菌多酚的研究主要集中在子实体上, 一般通过溶剂萃取法提取天然子实体里活性多酚^[2], 再经过色谱柱进一步纯化分离出单一组分并综合运用质谱、核磁共振等分析手段来鉴定^[5]。目前的研究和应用材料一般来自野生菌, 但桦褐孔菌天然资源有限, 价格昂贵。液体深层发酵作为现代发酵工程的产物有着生产周期短, 不受季节气候限制, 产物产量高和易于控制等优点^[6], 可以作为获得桦褐孔菌的可靠途径。桦褐孔菌菌丝体人工培养及其酚类化合物的研究, 国内外报道得较少^[7]。本文通过桦褐孔菌胞内外多酚清除 DPPH· 自由基和羟基自由基实验, 显示桦褐孔菌胞内外酚均具有显著的抗氧化活性, 通过液质联用技术发现, 胞内外多酚的组成和含量不同, 从而导致抗氧化活性不同。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

桦褐孔菌胞菌丝体通过液体深层培养获得。菌种来源: Centraal Bureau voor Schimmelcultuur, Utrecht, Netherlands。

1.2 主要试剂

DPPH· 试剂和没食子酸购买于 sigma, 其他试剂均为国内购买的分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 液体深层发酵

将 100mL 基础培养基(葡萄糖 30 g/L, 蛋白胨 4 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, CaCl₂ 0.1 g/L)装

收稿日期: 2010-11-12

基金项目: 浙江省科技厅科技计划项目(2007C24016)

作者简介: 朱金卫(1983-), 男, 江苏兴化人, 硕士研究生, 主要从事生物技术与生物化工的研究。

通讯作者: 徐向群, 电子邮箱: xuxiangqun@zstu.edu.cn

入 250 mL 锥形瓶,121℃灭菌 20 min,移液器分别接种 10 mL 液体种子^[8]于上述锥形瓶中,摇床培养,温度 28℃,培养基 pH 5.5,转速 150 r/min,培养 288 h。

1.3.2 摇床胞外发酵液的获取

自发酵 48 h 开始,每隔 24 h 抽滤菌丝体,收集滤液,得每天的胞外发酵液。

1.3.3 胞内外多酚的提取

胞内多酚类化合物的提取:将菌丝体用去离子水清洗 3 次,干燥后研磨成粉末。用 10 倍体积 70% 的丙酮溶解,在冰水浴中超声破壁 5 min,间隔 9 s。匀浆液用滤纸过滤后,干燥菌丝体,称重。然后用体积比为 70% 的丙酮(水占 30%)在室温下萃取 24 h,萃取 3 次。4 500 g 离心 10 min,得上层清液。冷冻干燥后,得胞内多酚。

胞外多酚类化合物的提取:将发酵液减压浓缩至 20 mL,加入 4 倍体积 95% 的乙醇,充分搅拌后,用保鲜膜密封,在 4℃冰箱中静置过夜。离心分离(8 000 r/min,10 min),减压浓缩除去乙醇后加入适量蒸馏水将体积调至 100 mL,先后用 20 mL 氯仿,20 mL 乙酸乙酯萃取 3 次,将乙酸乙酯萃取层冷冻干燥,得到胞外多酚。

1.3.4 多酚含量的测定

福林-酚法测定多酚的含量^[9],用没食子酸(GAE)的量来表示多酚的含量。没食子酸标准品标准曲线为

$$Y=0.005\,75+0.103\,01X \tag{1}$$

其中 Y 为吸光度, X 为样品浓度, $R^2=0.992\,4$, 线性范围为 0~60 mg/L。

1.3.5 多酚清除 DPPH·自由基

参考 Yang^[10]的方法,于 10 mL 的试管中加入 0.8 mL 的 DPPH·溶液,再加入 2.4 mL 的不同发酵时间的多酚样品(浓度为 0.1 mg/mL)混合,充分振动,并在室温下黑暗处保持 30 min,于 517 nm 处测 OD₁ 值。对照组含有 2.4 mL 的甲醇和 0.8 mL DPPH·自由基,并且在相同的波长下测定其 OD₀ 值。样品对照组含有 0.8 mL 甲醇和 2.4 mL 多酚样品,于 517 nm 处测定其 OD₂ 值。DPPH·清除率用以下公式计算:

$$\text{DPPH}\cdot\text{自由基清除率}=\frac{\text{OD}_0-(\text{OD}_1-\text{OD}_2)}{\text{OD}_0}\times 100\% \tag{2}$$

1.3.6 多酚清除羟基自由基

桦褐孔菌多酚的羟基自由基(·OH)清除率由改动后的 Nicholas Smirnoff^[11]法测得。反应体系(4 mL)包括:1 mL H₂O₂(8.8 mmol/L),1 mL FeSO₄(9 mmol/L),1 mL 水杨酸(9 mmol/L),1 mL 多酚溶液(0.4 mg/mL)。H₂O₂ 最后加入以启动整个反应。反应体系在 37℃条件下温育 60 min,在 15 000×g 条件下离心 6 min。在 510 nm 处检测吸光度,·OH 清除率用以下公式计算:

$$\text{羟基自由基清除率}=\frac{A_0-(A_x-A_{x0})}{A_0}\times 100\% \tag{3}$$

式中:A₀—对照(双蒸水)实验吸光度,A_x—多酚样品液的吸光度,A_{x0}—背景实验吸收(反应体系中无 H₂O₂)。

1.3.7 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 分析多酚的组成

液相色谱条件:色谱柱 Kromasil C18(250×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈(A)和体积分数 0.5% 的甲酸超纯水溶液(B)。梯度洗脱流程如下:

A : B=0 : 100→25 : 75(0~20 min);A : B=25 : 75(20~35 min),A : B=25 : 75→100 : 0(35~45 min),A : B=100 : 0→100 : 0(45~50 min),A : B=100 : 0→0 : 100(50~51 min),A : B=0 : 100→0 : 100(51~61 min)。进样量 20 μL;流速 1.00 mL/min;柱温 30℃;检测波长 280 nm 和 310 nm。

质谱条件:离子极性为 ESI(+),ACPI(-);扫描范围 100~1 500 m/z;干燥气流速 12.0 L/min;温度 350℃;喷雾电压 50 psig;毛细管电压 4 000 V(ESI),3 500 V(ACPI);蒸发器温度 325℃;传输电压 70 V。

1.3.8 桦褐孔菌胞内外多酚含量测定

精确称取标准品没食子酸,咖啡酸,山柰酚,阿魏酸,对香豆酸,槲皮素,异鼠李亭,异鼠李亭-3-O-芸香糖苷,芸香柚皮苷,野漆树甙,异野漆树甙,原儿茶酸,表没食子儿茶素没食子酸酯,表儿茶素没食子酸酯,4,5,7-三羟黄酮,芦丁和 Phellgridin G 适量,配制成浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,将上述溶液分别稀释 2、5、

10、25、50 倍。每个标准品质量浓度分别进样 3 次,以质量浓度(X)为横坐标,平均峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。216 h 胞外酚和 72 h 的胞内酚按照液相色谱条件进样,组分中的成分与标准品对照,带入标准曲线求算,即为样品组分对应的含量。

2 结果与分析

2.1 培养基中胞内外多酚的含量

胞内外多酚含量与发酵时间关系曲线见图 1 和图 2。由图 1 可知,桦褐孔菌胞外多酚在发酵培养的前 120 h,含量相对较低。120 h 后,胞外多酚含量开始急剧上升,并在 216 h 达到最大值 34.7 mg GAE/L。此后多酚含量基本维持在这一水平并开始逐渐下降。而胞内多酚的情况则有很大不同,胞内多酚的含量在发酵的第 48 h 含量就处在一个相对较高的水平,72 h 后达到最大值 12.47 mg GAE/g,然后含量开始急剧下降到一个较低值。

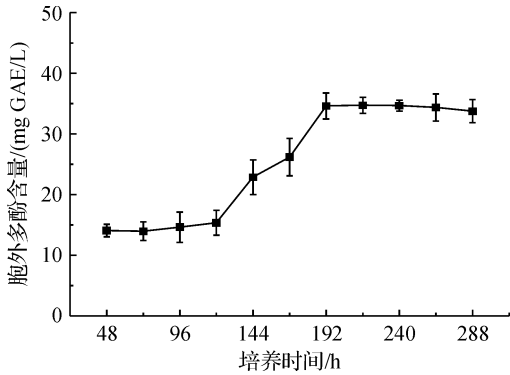


图1 胞外多酚含量与发酵时间的关系

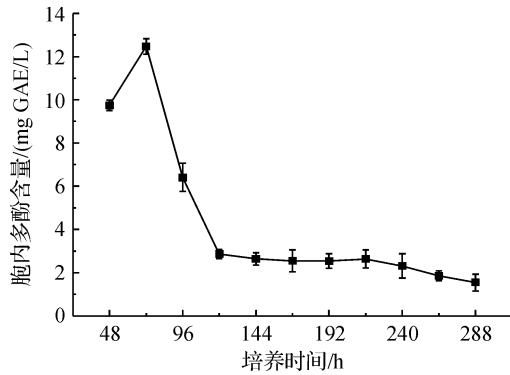


图2 胞内多酚含量与发酵时间的关系

2.2 桦褐孔菌胞内外多酚的抗氧化活性的研究

桦褐孔菌胞内外多酚对 DPPH· 自由基和羟基自由基的清除率与发酵时间的关系见图 3 和图 4。整个发酵过程中,胞内外多酚在抗氧化活性上有着较为显著的差异。在发酵前期,胞内多酚显示出了较强的抗氧化活性,而在发酵后期胞外多酚的抗氧化活性则更强。桦褐孔菌胞内外多酚对 DPPH· 自由基的最大清除率分别为 52.5%和 54.6%,对羟基自由基的清除率则高达 80.5%和 66.2%。

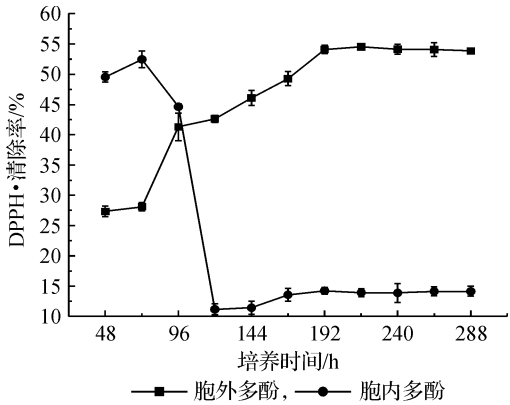


图3 胞内外酚清除 DPPH· 自由基清除率与发酵时间的关系

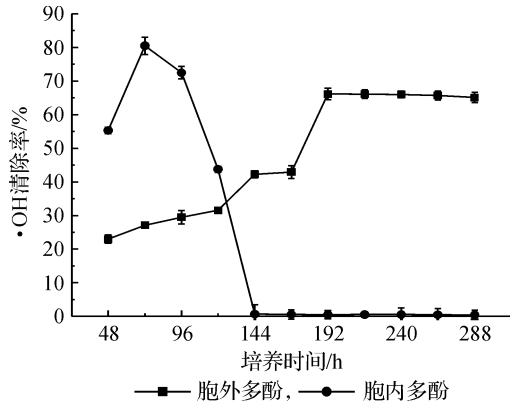


图4 胞内外酚清除羟基自由基清除率与发酵时间的关系

2.3 胞内外酚的组成

不同发酵时间下桦褐孔菌胞内外酚的组成分析结果见表 1。胞内外酚类物质在组成和组分上有很大的差异,并且胞内外主要酚类物质没食子酸,胞内比胞外含量多了 19.7%。胞外酚中,表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯和 Phellgridin G 酚含量分别为 10.6%、4.5%和 10.2%,而胞内没有这些组分。72 h胞内酚却含有骨碎补内酯这种活性较强的多酚,以及对香豆酸、阿魏酸、野漆树甙、异野漆树甙这类活性相对较高酚类化合物,且含量较高,如阿魏酸和野漆树甙的含量分别达到了 15.2%和 17.6%。

3 讨 论

发酵过程中胞内外多酚的含量在不同时期有着显著的区别,这可能和胞内外多酚不同的产酚机理有关。胞内外多酚的产生主要和它对应的酶有很大关联,如葡萄糖氧化酶,乙二醛氧化酶,以及一些还原酶(硝基还原酶,醌还原)等^[12]。酚类物质是白腐菌生长的次级代谢产物,它的产生需要借助酶的活性。在胞外,发酵前期菌种生长比较缓慢,菌种一开始需要一定的时间去适应新的液体环境,这也导致了酶的活性相对较低,故产生的多酚较少。进入营养期后,菌种适应了新的生长环境,菌体显著增长,酶的活性提升,多酚的产量增多。这个过程一直持续到繁殖期,但由于碳、氮源有限,一旦被消耗殆尽,酶的活性就会受到抑制,从而导致多酚的量基本不再增加,甚至开始下降^[12]。关于胞内多酚的研究机理则相对较少,目前为止还没有相关理论解释这一现象。如果将取样时间定在 216 h,可以获取大量的胞外多酚类化合物,而在 72 h 取样,则可以最大量地得到胞内多酚。而一般天然子实体中多酚类化合物的含量约为 1.53%^[2],发酵培养胞内酚类化合物含量可以达到 16.3mg GAE/g,胞外为 160 mg GAE/L^[7],与天然子实体中提取的多酚相比,发酵培养材料来源广泛,成本低廉,生产操作简单,具有很大的优势。

桦褐孔菌胞内外多酚在抗氧化活性上有也有很大差异,这主要和胞内外多酚的不同组成和结构有关。在整个发酵周期中,胞外多酚在发酵后期的抗氧化活性较高,这很有可能是此时的多酚含量相对较高,或者多羟基化合物较多,导致多酚的活性较高。胞内多酚在发酵前期有很好的抗氧化活性,通过对此时样品的组分分析,胞内新增了许多活性较强的多酚如骨碎补内酯、阿魏酸等,且含量较高。总之,桦褐孔菌胞内外多酚都有较强的抗氧化活性,如果合理利用控制好发酵条件可以使得效益最大化。

本研究结果显示,液体深层发酵培养后的胞内外多酚具有较高的含量和抗氧化活性。这为今后将此研究转为工业化提供了一定的依据,同时也为合理利用、保护稀缺资源和名贵物种提供了新思路。

参考文献:

[1] Saar Maret. Fungi in khanty folk medicine[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1991, 31(2): 175-179.

[2] Yong Cui, Dong-Seok Kim, Kyoung-Chan Park. Antioxidant effect of Inonotus obliquus[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 96(1-2): 79-85.

[3] In-Kyoung Lee, Young-Sook Kim, Yoon-Woo Jang, et al. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom Inonotus obliquus[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17(24): 6678-6681.

[4] Zheng W, Zhao Y, Zhang M, et al. Phenolic compounds from Inonotus obliquus and their immune-stimulating effects[J]. Mycosystema, 2008, 27, 574-581.

[5] Babitskaia V G, Shcherba V V. The nature of melanin pigments from some micro-and macromycetes[J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2002, 38(3): 286-291.

[6] 杜德清, 王丽霞, 陈志生. 液体深层发酵技术在食用菌方面的应用[J]. 浙江林业科技, 2003, 84(23): 83-85.

[7] Zheng W, Zhang M, Zhao Y, et al. Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of Inonotus obliquus[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(3): 1327-1335.

[8] 武永德, 陈 辉, 徐向群. 两种不同来源桦褐孔菌多糖免疫活性的比较[J]. 浙江理工大学学报, 2010, 27(4): 645-648.

[9] Singleton V L, Ross J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents[J]. American

表 1 不同发酵时间基础培养基中
桦褐孔菌胞内外酚的组成

酚的种类	216 h 下胞外 酚含量/%	72 h 下胞内 酚含量/%
表没食子儿茶素没食子酸酯	10.6±0.7	—
表儿茶素没食子酸酯	4.5±0.9	—
骨碎补内酯	—	4.3±0.6
Phelligridin G	10.2±1.1	—
4,5,7-三羟黄酮	8.3±0.8	—
芦丁	9.2±0.5	—
咖啡酸	0.9±0.0	7.0±1.4
没食子酸	17.2±1.0	38.2±2.5
山柰酚	5.7±0.4	—
槲皮素	3.6±0.3	3.8±0.7
异鼠李亭	4.8±0.6	—
异鼠李亭-3-O-芸香糖苷	3.1±0.0	—
芸香柚皮苷	5.8±1.3	—
原儿茶酸	2.4±0.2	4.9±1.2
对香豆酸	—	2.3±0.1
阿魏酸	—	15.2±0.9
野漆树甙	—	17.6±2.1
异野漆树甙	—	3.1±0.0

Journal of Enology and Viticulture, 1965, 16(3): 144-158.

- [10] Yang Z Y, Tu Y Y, Xia H L, et al. Suppression of free-radicals and protection against H_2O_2 -induced oxidative damage in HPF-1 cell by oxidized phenolic compounds present in black tea[J]. Food Chemistry, 2007, 105(4): 1349-1356.
- [11] Nicholas S, Quinton J C. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [12] 李慧荣. 白腐真菌生物学和生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 25-26.

The Synthetics, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Polyphenols in Submerged Cultures of *Inonotus Obliquus*

ZHU Jin-wei, XU Xiang-qun

(School of Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The intracellular polyphenols(IPP) and extracellular polyphenols(EPP) production and antioxidant activity by *I. obliquus* are investigated in a submerged fermentation. Polyphenols production is measured by Folin-Ciocalteu reagent method. Antioxidant activity of IPP and EPP is determined by scavenging the DPPH free radicals and hydroxyl free radicals. Phenolic compositions are analyzed by LC-MS approach. The highest content of IPP and EPP can attain to 12.47 mg GAE/g and 34.7 mg GAE/L, respectively. Moreover, the hydroxyl radical scavenging rates of IPP and EPP is 52.5% and 54.6%, respectively. The DPPH free radical scavenging rates of IPP and EPP is 80.5% and 66.2%, respectively. LC-MS result shows that the contents of IPP and EPP is 96.4% and 86.3%, respectively. And the reason lies in the big difference of its components.

Key words: *inonotus obliquus*; polyphenols; antioxidant activity; submerged fermentation

(责任编辑: 许惠儿)