

# 桦褐孔菌胞外多糖级份的化学性质和抗氧化活性研究

向玉玲, 李 娟, 徐向群

(浙江理工大学理学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 研究桦褐孔菌发酵胞外多糖的抗氧化活性。采用液体深层发酵培养桦褐孔菌, 利用水溶醇沉法从发酵液中分离提取胞外多糖 EPS, 中性蛋白酶+Sevage 试剂法对 EPS 去除蛋白分离得到多糖 DEPS。DEPS 经 DEAE-52 阴离子交换色谱和 Sephadex G-200 凝胶色谱柱层析后得到三个多糖级份, 其中, 具有较高蛋白质和甘露糖含量以及具有较低分子量的级份 DEPS2 和 DEPS3 的抗氧化活性较好。表明桦褐孔菌胞外多糖的抗氧化活性与其蛋白质、甘露糖含量及分子量有关。

**关键词:** 桦褐孔菌; 胞外多糖; 抗氧化活性; 液体深层发酵; 组成; 分子量

**中图分类号:** Q538

**文献标识码:** A

## 0 引 言

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)是一种应用很广泛的药用真菌, 主要寄生于白桦树、银桦、赤杨等的树干或树皮上, 菌丝体极其耐寒, 主要分布于俄罗斯北部、北欧和中国黑龙江、吉林长白山及日本北海道等北纬 40~50°地区<sup>[1]</sup>。桦褐孔菌多糖具有免疫调节活性<sup>[2]</sup>、抗肿瘤活性<sup>[3]</sup>、抗氧化、降血脂、降血糖<sup>[4-7]</sup>等功能, 在医药工业上有着广阔的应用前景。但是目前关于液体深层发酵培养的桦褐孔菌胞外多糖各级份的化学性质和抗氧化活性鲜有报道, 特别是化学性质对抗氧化活性的影响未见报道。我们实验室用响应面法, 以胞外多糖产量和羟基自由基清除率为指标, 对液体深层培养桦褐孔菌产胞外多糖的培养条件进行了优化<sup>[8]</sup>。本研究在此基础上利用色谱法进一步对桦褐孔菌胞外多糖(EPS)进行分离纯化, 并研究各多糖级份的化学性质和抗氧化活性, 发现各多糖级份的抗氧化活性与多糖的蛋白含量、甘露糖含量及分子量有关。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 发酵培养胞外多糖

液体培养基组成: 玉米粉 53 g/L、蛋白胨 3.2 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.55 g/L、 $\text{MgSO}_4$  1.5 g/L、 $\text{CaCl}_2$  0.1 g/L; pH=6.0。将培养好的液体菌种(CBS314.39)在超净工作台上用移液管移至装有 100 mL 发酵基础培养基的 250 mL 发酵摇瓶中, 接种比例为 10%(体积分数)。将接种好的发酵三角瓶放置于恒温摇床中, 发酵温度 28℃, 摇床转速 150 r/min, 培养 9 d, 收集发酵液以提取胞外多糖<sup>[8]</sup>。

#### 1.1.2 主要试剂

二乙胺基乙基纤维素(DEAE-52), Wathman 公司; 中性蛋白酶、葡聚糖凝胶(Sephadex G-200), 北京瑞达恒辉科技有限公司; BCA 试剂盒, 凯基生物; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH), Sigma 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 胞外多糖的提取

用滤纸过滤除去菌丝体得到发酵液,发酵液真空浓缩至原体积的 1/4 左右,加入 4 倍体积 95% 的乙醇,充分搅拌使多糖沉淀出来,在 4℃ 条件下静置过夜。然后将多糖沉淀用 95% 的乙醇反复冲洗,以除去掺杂于其中的还原糖和小分子物质。然后离心 (8 000 r/min, 6 min),冷冻干燥得到的胞外多糖样品记作 EPS。

用中性蛋白酶 + Sevage 试剂法除蛋白。EPS 用水溶解,加入多糖水溶液体积 1/5 的氯仿和 1/25 的正丁醇于分液漏斗中,充分振荡,静置后放出下层的白色粘稠物质。如此反复多次直至水层和氯仿层之间基本无白色粘稠状物质为止。多糖溶液再用蒸馏水透析 48 h,然后浓缩醇沉,收集下层沉淀,冷冻干燥得到除去蛋白质的胞外多糖样品记作 DEPS。

### 1.2.2 胞外多糖的分级纯化

将 DEAE-52 预处理后,以 0.01 mol/L 的 pH 7.8 PBS 溶液浸泡平衡 10 h 并装柱 (2.4 cm × 50 cm),体积流量控制在 72 mL/h,将 DEPS 溶于少量 PBS 中然后上柱。依次用 200 mL 的 PBS、150 mL 0.1 mol/L NaCl-PBS、150 mL 0.2 mol/L NaCl-PBS、200 mL 0.3 mol/L NaCl-PBS 洗脱,自动部分收集器收集 (每管 6 mL),苯酚-硫酸法跟踪检测多糖含量,收集前三个单一组分,然后透析脱盐浓缩醇沉,冷冻干燥得到各多糖级份,记作 DEPS1、DEPS2、DEPS3。

DEPS1、DEPS2、DEPS3 分别经 Sephadex G-200 (2.4 cm × 50 cm) 柱层析,用 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱,体积流量控制在 18 mL/h,每管 3 mL 自动部分收集器收集,苯酚-硫酸法跟踪检测多糖含量。收集每个样品中的单一组分,透析脱盐浓缩醇沉,冷冻干燥得到各多糖级份,分别记作 PDEPS1、PDEPS2、PDEPS3。

### 1.2.3 组成分析

用苯酚-硫酸法测定各多糖样品的含糖量。用 BCA 试剂盒测定各多糖样品的蛋白质含量。

单糖的组成分析采用气相色谱法测定,多糖的水解物及各单糖标准品采用糖腈乙酸酯法进行衍生化。气相色谱分析条件:弹性石英毛细管柱 CP-Sil 5 CB, 25 m × 0.53 mm,液膜厚度 0.25 μm。程序升温:110℃ 保持 5 min, 3℃/min 到 180℃,维持 5 min, 5℃/min 升温至 220℃,保持 10 min。气化室温度 270℃,FID 检测器温度 250℃,载气压力 (氮气)

0.6 MPa,氢气 0.65 MPa,空气 0.50 MPa,分流比 30 : 1<sup>[9]</sup>。

### 1.2.4 分子量测定

多糖分子量的测定采用 SEC-LLS 法 (size exclusion chromatography with laser light scattering)。待测样品 PDEPS1、PDEPS2、PDEPS3 各 1 mg 溶于 1 mL 0.2 mol/L NaCl 中,使其浓度约为 1 mg/mL。进样前样品经 0.2 μm 的微孔滤膜过滤,进样量为 500 μL。测量前仪器先用聚乙二醇进行校正,调节折射率增量 ( $dn/dc$ ) 为 0.125 mL/g,多角度激光光散射仪检测波长调至  $\lambda = 658$  nm,检测温度为 25℃<sup>[10]</sup>。

### 1.2.5 羟基自由基清除活性测定

以 Smirnoff 等<sup>[11]</sup>的方法为基础加以改进,反应体系 (4 mL) 包括:1 mL FeSO<sub>4</sub> (9 mmol/L), 1 mL 水杨酸 (9 mmol/L), 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8.8 mmol/L), 不同浓度的胞外多糖溶液 1 mL。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 最后加入以启动整个反应。反应体系在 37℃ 条件下温育 60 min,然后在 12 000 r/min 条件下离心 6 min。最后在 510 nm 处检测吸光度,清除率由如下方程计算:

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $A_0$ —对照 (蒸馏水) 实验吸光度,

$A_x$ —多糖样品液的吸光度,

$A_{x0}$ —背景实验吸收 (反应体系中无 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。

### 1.2.6 DPPH 自由基清除活性测定

参考 Yang 等<sup>[12]</sup>的方法,于 10 mL 的试管中加入 0.4 mM 的 DPPH 溶液 0.5 mL,再加入 1.5 mL 的测试样品混合,之后充分振荡。并在室温下黑暗处保持 30 min,于 517 nm 处测  $A_x$  值。对照组含有相同量的乙醇和 DPPH 自由基,并且在相同的波长下测定其  $A_0$  值。样品对照组除不加 DPPH 外,其余均加入相同的量,并在相同的条件下测定其  $A_{x0}$  值。清除率由如下方程计算:

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $A_0$ —对照 (蒸馏水) 实验吸光度,

$A_x$ —多糖样品液的吸光度,

$A_{x0}$ —背景实验吸收 (反应体系中无 DPPH)。

## 2 结果与分析

### 2.1 DEPS 的 DEAE-52 离子交换分级纯化

DEPS 经 DEAE-52 柱层析后得到 DEPS1、DEPS2、DEPS3 三个级份,如图 1 所示,三个级份的

得率分别为 25.1%、18.5%、8.78%，总的多糖回收率为 52.4%。DEPS 的第四个级份由于含量过少，未予以收集。

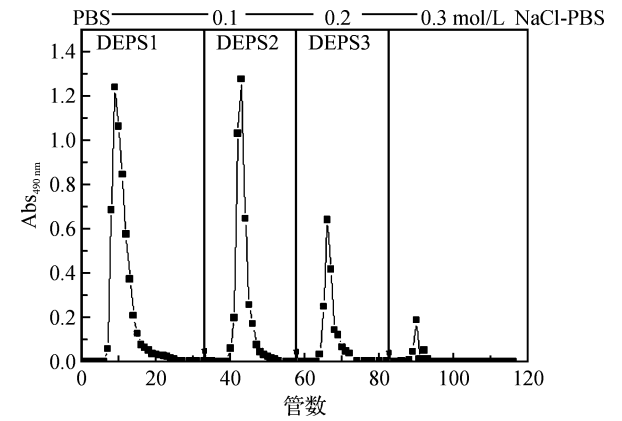


图 1 DEPS 的 DEAE-52 柱层析洗脱曲线

2.2 DEPS 的 Sephadex G-200 凝胶柱分级纯化

DEPS 经 DEAE-52 柱层析后得到的三个级份，再经 Sephadex G-200 柱层析作进一步的分离纯化，其结果如图 2 所示。收集图中虚线所示各级份，分别记作 PDEPS1、PDEPS2、PDEPS3，待作分子量测定。

2.3 EPS、DEPS 及其纯化级份的组成分析

EPS、DEPS 及其各纯化级份的多糖和蛋白质含量分析结果见表 1。由表 1 可知，DEPS 的三个经 DEAE-52 分离纯化的级份 DEPS1、DEPS2、DEPS3 的多糖含量比较接近，分别是 71.4%、68.1%、64.5%，蛋白含量也比较相近，DEPS2 的蛋白含量（18.2%）稍高于 DEPS1（13.6%）和 DEPS3（16.6%）。EPS 的多糖含量和蛋白含量都较低，主要是因为粗多糖中可能还有很多杂质未除去，如无机和有机的小分子物质、色素等。EPS 除去蛋白后仍然还有蛋白质保留其中，说明这些多糖是糖和蛋白质的复合物。DEPS1、DEPS2 和 DEPS3 均不含木糖，其原因可能是 DEPS 经 DEAE-52 柱层析时只收集了前三个组分，含量极少未予以收集的组分中可能含有少

量木糖。DEPS3 的甘露糖含量最高为 49.8%。

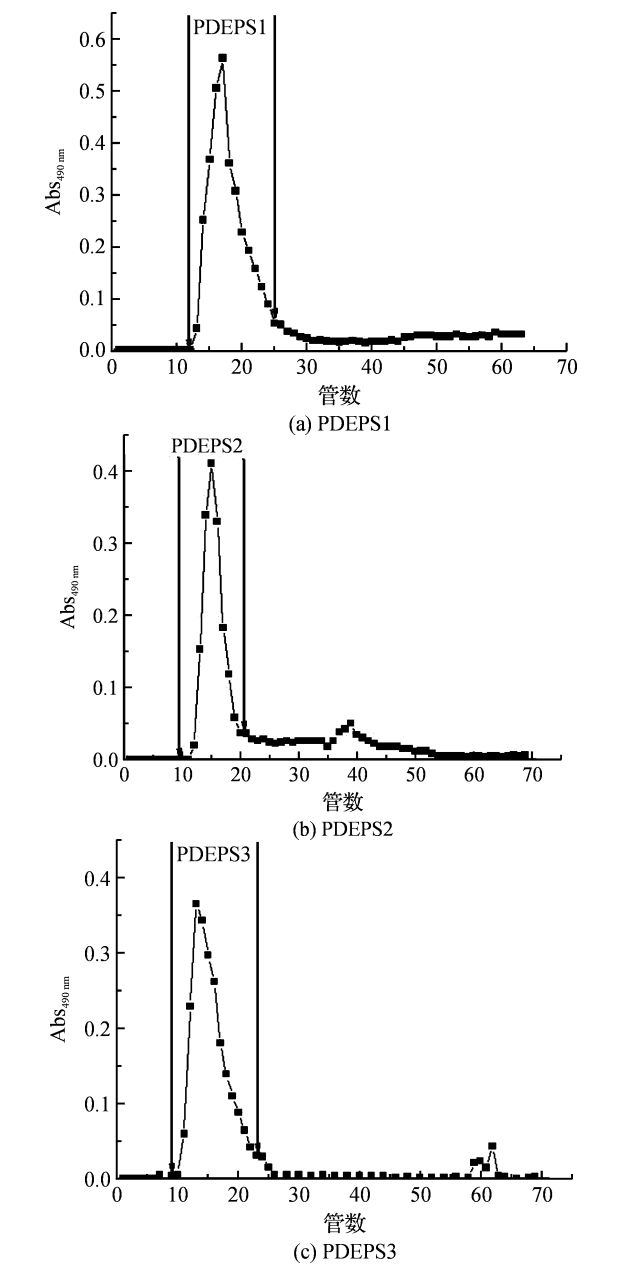


图 2 DEPS1、DEPS2 和 DEPS3 Sephadex G-200 柱层析洗脱曲线

表 1 EPS、DEPS 及其纯化级份的组成

	Sugar content	Protein content	Sugar component <i>n</i> /%					
	<i>w</i> /%	<i>w</i> /%	rhamnose	arabinose	xylose	mannose	glucose	galactose
EPS	44.3	13.3						
DEPS	70.5	16.5	2.64	5.09	3.03	24.8	10.3	54.1
DEPS1	71.4	13.6	—	—	—	24.2	18.9	56.9
DEPS2	68.1	18.2	3.86	3.59		23.8	15.8	52.9
DEPS3	64.5	16.6	—	—	—	49.8	16.5	33.7

2.4 多糖分子量

经 DEAE-52 和 Sephadex G-200 柱层析后的各多糖级份的分子量如表 2 所示。数均分子量 MN

的范围是 29 000~36 000，重均分子量 MW 的范围是 35 000~41 000。PDEPS1 的分子量最大，从表中可以看到，来自于 DEPS 的三个多糖级份的 MW/

MN 值都不是很大, MW/MN 值越接近 1, 多糖分散度越小, 其分子量分布相对更均一。

表 2 各多糖级份的分子量

	MN	MW	MW/MN
PDEPS1	36 000	41 000	1.14
PDEPS2	29 000	35 000	1.21
PDEPS3	29 000	35 000	1.21

2.5 羟基自由基清除活性

如图 3 所示, DEPS 的纯化多糖级份在 0.1~2 mg/mL 浓度范围内表现出了较明显的剂量效应, 各级份在 0.5 mg/mL 以后, 活性随浓度的变化则不是很明显。DEPS 的三个级份中, DEPS3 的活性最强, 最高羟基自由基清除率分别为 24.4%、32.7%、40.2%。

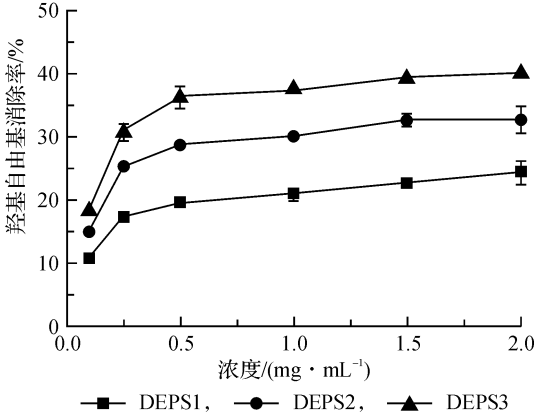


图 3 DEPS1、DEPS2 和 DEPS3 的羟基自由基清除活性图

2.6 DPPH 自由基清除活性

如图 4 所示, 在 0.1~2 mg/mL 浓度范围内, DEPS 三个级份的羟基和 DPPH 自由基的清除活性差异较明显。DEPS2 的 DPPH 清除活性要稍高于 DEPS3 的清除活性, DEPS1 的活性仍然最低, 最高 DPPH 自由基清除率分别为 21.6%、38.6%、35.6%。

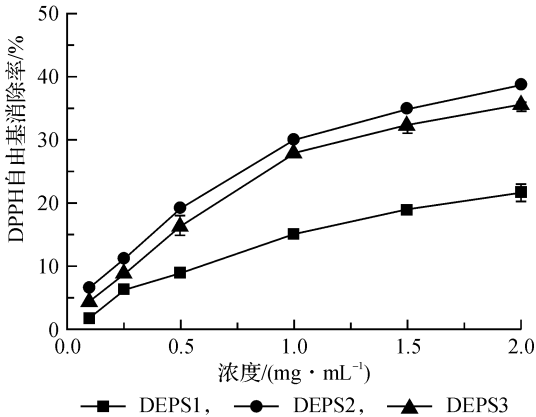


图 4 DEPS1、DEPS2 和 DEPS3 的 DPPH 自由基清除活性图

3 结 论

在对 DEPS 经 DEAE-52 分离纯化的各级份的抗氧化活性研究中发现级份 DEPS2 和 DEPS3 的抗氧化活性较好, 经化学组成及分子量测定后发现其原因很可能是 DEPS2 和 DEPS3 具有较高的蛋白质含量、甘露糖含量和较低的分子量<sup>[4-5,8]</sup>。经响应面法优化的培养桦褐孔菌发酵胞外多糖极有可能还具有其它较高的生物活性, 但还需更多的活性实验和结构研究来证明。桦褐孔菌发酵胞外多糖体现出的抗氧化活性和便利来源在药用和保健品的开发和研究中具有广阔的应用前景, 这对保护珍稀的野生桦褐孔菌具有积极作用。

参考文献:

[1] 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌-桦褐孔菌[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 7-8.

[2] Kim Y O, Han S B, Lee H W, et al. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharides produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*[J]. Life Science, 2005, 77(19): 2438-2456.

[3] Kim Y O, Park H W, Kim J H, et al. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*[J]. Life Science, 2006, 79(1): 72-80.

[4] Chen H, Zhang M, Qu Z, et al. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 559-563.

[5] Asker M M S, Ahmed Y M, Ramadan M F. Chemical characteristics and antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Microbacterium terregens*[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(3): 563-567.

[6] Hu H, Zhang Z, Lei Z, et al. Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 107(1): 42-48.

[7] Xu X, Wu Y, Chen H. Comparative antioxidative characteristics of polysaccharide-enriched extracts from natural sclerotia and cultured mycelia in submerged fermentation of *Inonotus obliquus*[J]. Food Chemistry, 2011, 127(1): 74-79.

[8] Chen H, Xu X, Zhu Y. Optimization of hydroxyl radical scavenging activity of exo-polysaccharides from *Inonotus obliquus* in submerged fermentation using response surface methodology[J]. Journal of Microbiology and Bio-

- technology, 2010, 20(4): 835-843.
- [9] Chen H, Yan M, Zhu J, et al. Enhancement of exo-polysaccharide production and antioxidant activity in submerged cultures of *Inonotus obliquus* by lignocellulose decomposition[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(2): 291-298.
- [10] Tamura N, Wada M, Isogai A. TEMPO-mediated oxidation of (1-3)- $\beta$ -D-glucans[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(2): 300-305.
- [11] Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [12] 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.

## Chemical Properties and Antioxidant Activity of Exopolysaccharides Fractions from *Inonotus obliquus* in Submerged Fermentation

XIANG Yu-ling, LI Juan, XU Xiang-qun

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

**Abstract:** We evaluate the exopolysaccharide (EPS) fractions of *Inonotus obliquus* in submerged fermentation. The deproteinized sample (DEPS) by Sevage method from crude EPS sample is obtained. The DEPS is separated into three fractions via DEAE-cellulose 52 chromatography. The antioxidant effect and chemical properties of the three fractions are studied. The findings show that the fractions DEPS2 and DEPS3 with a higher protein and mannose content and lower molecular weight have a stronger hydroxyl radical and DPPH radical-scavenging activity.

**Key words:** *Inonotus obliquus*; exopolysaccharides; antioxidant activity; submerged fermentation; composition; molecular weight

(责任编辑: 许惠儿)