

液体发酵黑木耳多糖的分离纯化及保湿性研究

范秀芝, 殷朝敏, 姚芬, 史德芳, 高虹

(湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 国家食用菌加工技术研发分中心, 湖北武汉 430064)

摘要: 为缩短生产周期、提高多糖产量, 本研究利用优选的黑木耳菌株和培养基进行液体发酵, 获得发酵胞外和胞内粗多糖产量分别为 10.49 ± 0.27 g/L 和 3.05 ± 0.03 g/L。为进一步实现发酵多糖的合理利用, 对液体发酵多糖采用酶-Sevag 法除蛋白和 DEAE-52、Sephadex G-200 柱层析分离纯化, 并对纯化的多糖组分进行红外光谱、抗氧化和保湿性研究。结果表明, 酶-Sevag 法能很好脱除发酵多糖中蛋白质, 脱蛋白后胞外 DEPS 和胞内 DIPS 多糖纯度均大于 95%; 柱层析分离纯化获得胞外 PEPS 和胞内 PIPS 多糖均为单一组分, 经红外光谱官能团分析推测二者均为 β -构型的吡喃糖; 比较 PEPS 和 PIPS 的抗氧化活性和保湿性发现, PEPS 在还原力、超氧阴离子自由基清除能力方面优于 PIPS, 而后者在 DPPH 自由基、羟基自由基清除能力以及保湿性能方面优于 PEPS。本研究为黑木耳液体发酵胞外和胞内多糖组分的合理利用提供依据, 并为其在食品和化妆品等方面的应用奠定理论基础。

关键词: 黑木耳; 液体发酵; 胞外多糖; 胞内多糖; 抗氧化; 保湿性

文章编号: 1673-9078(2018)10-49-57

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.008

Research on Purification and Moisturization Effect of Polysaccharides from *Auricularia heimuer* under Submerged Fermentation

FAN Xiu-zhi, YIN Chao-min, YAO Fen, SHI De-fang, GAO Hong

(Institute of Agro-Products Processing and Nuclear-Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences/National Research and Development Center for Edible Fungi Processing (Wuhan), Wuhan 430064, China)

Abstract: In order to shorten the production cycle and increase the yield of polysaccharides, the selected strain and the optimized fermentation medium were used for liquid fermentation of *Auricularia heimuer*. Under these conditions, the yields of crude extracellular (EPS) and intracellular (IPS) polysaccharide respectively were 10.49 ± 0.27 g/L and 3.05 ± 0.03 g/L. Furthermore, in order to realize the reasonable utilization of fermented polysaccharides, the enzyme-Sevag method was used to remove the protein from the EPS and IPS. And then the polysaccharides were separated and purified by DEAE-52 and Sephadex G-200 column chromatography. Subsequently, the functional group analysis of the purified polysaccharides was conducted by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and the effects of the purified polysaccharides on antioxidant and moisturizing were evaluated *in vitro*. The results showed that the enzyme-Sevag method could nicely remove the protein from the fermented polysaccharides with the purity of the deproteinizing polysaccharides (DEPS and DIPS) more than 95%, after the column chromatography, two mono-component PEPS and PIPS were obtained, respectively. By the FT-IR functional group analysis, both PEPS and PIPS were presumed to be β -configuration pyranose. Finally, with the comparison of antioxidant activity and moisture retention, it was found that PEPS was superior to PIPS in reducing ability and scavenging ability of superoxide anion radical, while the PIPS possessed higher abilities in DPPH radical, hydroxyl radical scavenging and moisturizing than PEPS. In summary, these findings provide a basis for the rational use of different components of polysaccharides from the submerged fermentation of *A. heimuer*, and lay a theoretical foundation for their application in food and cosmetics.

Key words: *Auricularia heimuer*; submerged fermentation; extracellular polysaccharide; intracellular polysaccharide; antioxidant activity; moisturizing effect

收稿日期: 2018-06-05

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31601806); 湖北省农业科学院青年基金项目 (2014NKYJJ05)

作者简介: 范秀芝 (1984-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食用菌活性物质合成调控及功能食品研发

通讯作者: 高虹 (1971-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工和功能食品开发研究

多糖 (Polysaccharide) 是一类由醛糖或酮糖通过糖苷键连接成的天然高分子聚合物, 它广泛存在于高等植物、真菌、藻类、细菌及动物体细胞中, 是构成生命的四大基本物质之一^[1,2]。真菌多糖不仅作为细胞壁的结构组成和细胞中能量存储分子发挥重要作用, 还具有多种生物活性, 如对心脑血管、肿瘤和急慢性炎症等疾病具有预防和治疗作用, 在调节免疫、降血压、降血糖、降低胆固醇和甘油三酯, 抗肿瘤、抗炎、抗血小板凝集、抗氧化及抗衰老等方面具有独特的生物活性, 而且毒副作用低^[3-7]。

黑木耳 (*Auricularia heimuer*)^[8] 是一种药食兼用的胶质菌, 在中国、泰国、韩国和日本等东南亚国家广泛种植和消费, 是全球第三大栽培食用菌^[9]。在中国, 黑木耳子实体作为传统食品和民间药物已有 1000 多年的历史, 而且已有研究证实黑木耳具有多种生物学活性, 包括增强免疫^[10]、抗肿瘤^[11]、抗病毒^[12]、抗凝血^[13]、抗氧化^[14]、降血糖^[15]、降血脂^[16]、降低胆固醇^[17]以及保护心脏^[18]等功效, 其中上述功效的明确主要来自对黑木耳子实体中多糖 (胞内多糖) 的研究。

然而, 食用菌子实体的生产受季节和气候的影响较大, 而且栽培周期长, 劳动强度大, 子实体中多糖的提取存在工艺繁琐、提取效率低等问题。因此, 近年来越来越多的研究者将目光转向具有生产周期短、成本低、易于控制, 活性产量高、质量好等优势的深层发酵 (液体发酵) 技术上。且已有研究表明液体发酵产物中具有与子实体相同的营养、风味以及活性物质, 发酵产物中各类成分含量均显著高于子实体^[19]; 液体发酵所得的多糖具有与子实体多糖相同的结构和活性^[21,22]。

目前, 在黑木耳中已有液体发酵研究主要集中在液体发酵菌株的筛选^[23], 液体发酵培养基及培养条件优化、发酵所得胞内或胞外多糖的抑菌性、抗氧化活性研究^[24-27], 以及外源添加中药提取物对黑木耳多糖合成、活性影响以及合成调控机理研究^[28,29]。本研究, 在优化培养基基础上, 开展液体发酵多糖, 包括胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) 和胞内多糖 (intracellular polysaccharide, IPS) 的分离、纯化以及官能团分析, 并对纯化胞外和胞内多糖的抗氧化和保湿性进行比较研究, 在明确二者异同的同时为开展黑木耳液体发酵多糖的合理利用奠定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

优选的黑木耳菌株, 黑木耳 2 号^[23] (HME2, 国家审定编号 2007018)。

1.1.2 试剂

纤维素 DEAE-52、葡聚糖凝胶 Sephadex G-200, 上海源叶生物科技有限公司; 中性蛋白酶 (50000 U/g), 南京庞博生物工程有限公司; 葡萄糖、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、无水乙醇、苯酚、硫酸、三氯甲烷、正丁醇、抗坏血酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、铁氰化钾、三氯乙酸、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA- Na_2)、双氧水、三羟甲基氨基甲苯 (Tris)、邻苯三酚、甘油等试剂。

1.1.3 供试培养基

液体完全培养基 (LCYM): 葡萄糖 20.00 g, 蛋白胨 2.00 g, 酵母膏 2.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g, K_2HPO_4 1.00 g, KH_2PO_4 0.46 g, 加蒸馏水定容至 1.00 L, pH 自然;

基础发酵培养基 (BFM): 葡萄糖 20.00 g, 蛋白胨 2.00 g, KH_2PO_4 2.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00 g, 加蒸馏水定容至 1.00 L, pH 自然;

发酵培养基: 葡萄糖 28.67 g/L, 麸皮 117.83 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00 g/L, K_2HPO_4 2.00 g/L。麸皮浸泡 30 min 后, 沸水煮 30 min, 取滤液用于发酵培养基^[30]。

1.2 仪器与设备

LRH-250L 恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; ZWY-2102 恒温摇床, 上海智城分析仪器制造厂; SW-CJ-1CU 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; LDZM-80KCS 高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; FE-20 pH 计, 梅特勒; RE-52 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 3K15 高速冷冻离心机, 德国 Sigma; 101-2AB 型电热恒温鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; SCIENTZ-18N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; KQ-5200DE 超声波清洗器, 昆山市超声波仪器公司; 数控计滴 SBS-100A 自动部分收集器, 上海沪西分析仪器厂; UV-1800 紫外可见分光光度计, 日本岛津; Nanodrop 2000C 超微量分光光度计, 美国热电; BSC-250 恒温恒湿箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; TENSOR 27 傅立叶变换红外光谱仪, 德国 Bruker。

1.3 方法

1.3.1 菌种制备及培养条件

菌种接种到含固体完全培养基的 90 mm 平板于 25 °C 培养 5 d; 用 8 mm 打孔器打孔后取接种块接入 30 mL LCYM 培养基中培养 5 d; 匀浆取 5 mL 菌液接

种到 100 mL 基础发酵培养基中, 25 °C、120 r/min 振荡培养 4 d; 按 1:10 接种量吸取菌液接种到优化的发酵培养基中, 25 °C、160 r/min 振荡培养 7 d。

1.3.2 多糖的分离、提取

培养结束后将发酵液连同菌球于 6000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 用蒸馏水洗涤菌球 2 次, 离心后合并上清液, 60 °C 真空减压浓缩, 加入 4 倍体积无水乙醇于 4 °C 沉淀过夜^[27]; 8000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 冷冻干燥后称重得到胞外粗多糖, 记 EPS。

将洗涤后的菌球冷冻干燥、称重, 根据发酵液体积计算菌丝体产量 (g/L)。粉碎过 60 目筛, 按料液比 1:10 加入蒸馏水, 于 121 °C 高压蒸汽灭菌锅中提取 1.5 h, 冷却后过滤出滤液, 重复上述操作 2 次, 合并滤液进行减压浓缩、醇沉, 离心冻干后得胞内粗多糖, 记作 IPS。

1.3.3 含量的测定

多糖含量的测定采用苯酚-硫酸法。参考标准 NY/T 1676-2008 绘制葡萄糖标准曲线, $Y=10.003X-0.022$ ($R^2=0.996$)。将干燥至恒重的粗多糖研磨成粉末, 精确称取 0.50 g 用蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 按照葡萄糖标准品的苯酚-硫酸法浓度测定步骤, 测定样品 490 nm 处吸光度, 对照标准曲线, 计算多糖含量 (C, g/100 g)。并由此计算出多糖产量 (Y, g/L):

$$Y=C \times m/V \quad (1)$$

其中, C 为多糖含量; m 为粗多糖 EPS 或 IPS 的重量, g; V 是发酵液体积, L。

蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 法。

1.3.4 粗多糖除蛋白

采用酶-Sevag 法去除粗多糖 EPS 和 IPS 中蛋白质。将干燥粗多糖制成 1.00% (m/V) 的多糖水溶液, 加入多糖质量 3.00% 的中性蛋白酶, 调节 pH 到 7.0, 42 °C 酶解 3 h。室温下将多糖水溶液和 Sevag 试剂[氯仿:正丁醇=4:1(V/V)]按 4:1 体积比混合, 充分振摇, 4000 r/min 离心 15 min, 收集上层水相。重复上述步骤直至水相和有机相间无明显白色粘稠物质, 期间取上层水相, 用超微量分光光度计扫描其在 220~400 nm 波长内吸光度, 确保在 260 nm 和 280 nm 处无明显的吸收峰。最后将除蛋白的多糖水溶液浓缩、醇沉, 冷冻干燥得到除蛋白的多糖样品 DEPS 和 DIPS。苯酚-硫酸法检测多糖含量(p, %), 计算多糖损失率(L, %)。

$$L=[1-(m_d \times p/Y)] \times 100\% \quad (2)$$

式中, L 为多糖损失率; m_d 为 DEPS 或 DIPS 产量, g/L; p 为 DEPS 或 DIPS 的纯度; Y 为式 (1) 中对应 EPS 和 IPS 的产量, g/L。

1.3.5 多糖的柱层析分离纯化

选用 26 mm×30 cm 玻璃层析柱, 称取 50.00 g DEAE-52 粉末, 超纯水浸泡过夜, 装柱, 0.01 mol/L pH 7.8 的 PBS 溶液平衡柱子。准确称取 200 mg 去除蛋白的多糖粉末溶于 10 mL 超纯水中, 0.45 μm 微孔滤膜过滤上样, 依次用 PBS、0.10 mol/L NaCl-PBS、0.20 mol/L NaCl-PBS、0.30 mol/L NaCl-PBS 溶液各 125 mL 进行梯度洗脱, 洗脱流速为 1.0 mL/min, 每 5 mL 收集一管^[32]。

苯酚-硫酸法测定每管 490 nm 波长处吸光度, 以收集的管号对应吸光值作图得洗脱曲线, 根据出峰情况收集各组分, 浓缩、透析, 醇沉后冻干。

将多糖含量最多的组分用 Sephadex G-200 进一步分离纯化, 流动相选用 0.10 mol/L NaCl 溶液, 上样前柱子用流动相平衡 10 h。超纯水溶解多糖组分制成 20 mg/mL 溶液, 1 mL 上样, 流速为 0.3 mL/min, 3 mL/管, 收集液用苯酚-硫酸法检测多糖含量, 绘制洗脱曲线, 合并同一色谱峰的各管收集液为单一组分, 浓缩、透析, 醇沉冻干备用, 分别记 PEPS 和 PIPS。

1.3.6 红外光谱分析

取充分干燥的纯化多糖组分 2.00 mg, 分别与 KBr 混合, 研磨后压片, 放入傅里叶变换红外光谱仪内进行扫描, 扫描区间为 400~4000 cm^{-1} 。

1.3.7 液体发酵黑木耳多糖抗氧化活性研究

1.3.7.1 还原能力的测定

吸取 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 20.0 mg/mL 的纯化多糖组分溶液各 2.5 mL, 分别加入 2.5 mL PBS 缓冲液 (0.2 mol/mL, pH=6.6) 和 2.5 mL 1% 的铁氰化钾, 混匀后于 50 °C 水浴反应 20 min。向反应液加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸, 混匀后 1000 r/min 离心 10 min, 取 5.0 mL 上清液, 加入 5.0 mL 蒸馏水和 1.0 mL 0.1% 三氯化铁溶液, 混匀后静置 10 min 测定 700 nm 处吸光度^[33]。用相同浓度的抗坏血酸 (Vc) 水溶液作阳性对照, 每个浓度三个平行, 取平均值 (下同)。

1.3.7.2 羟基自由基清除能力测定

番红在 520 nm 处有最大紫外吸收峰, 通过利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 反应产生羟基自由基 ($\text{OH}\cdot$) 可特异地使番红褪色原理, 根据番红褪色程度来表示羟基自由基含量^[33]。吸光度越大, 表明羟基自由基含量越少, 样液清除羟基自由基能力越强。

配制反应体系, 总体积为 10.0 mL, 包括 1.0 mL PBS 缓冲液 (150 mmol/mL, pH=7.4), 2.0 mL 番红溶液 (520 μg/mL), 1.0 mL EDTA- $\text{Na}_2\text{-Fe}^{2+}$ 溶液 (6 mmol/mL), 0.8 mL 新鲜配制 0.3% H_2O_2 溶液, 0.5 mL 不同浓度 (0.5~20.0 mg/mL) 的多糖溶液和 4.7 mL 蒸

馏水。40 °C恒温水浴 30 min, 取出冷却 20 min 后测定 520 nm 处吸光度 A_i 。对照组不添加多糖溶液, 吸光度记 A_c ; 空白组以蒸馏水代替 H_2O_2 和多糖溶液, 吸光度记 A_0 。以相同浓度的 Vc 水溶液作阳性对照。

$$\text{羟基自由基清除率}(\%)=(A_i-A_c)/(A_0-A_c)\times 100\% \quad (3)$$

1.3.7.3 DPPH 自由基清除能力的测定

分别取 4.0 mL 不同浓度多糖溶液 (0.05~0.80 mg/mL) 加入 1.0 mL DPPH 溶液 (0.2 mmol/mL), 震荡混匀, 室温下避光静置 30 min, 测定 517 nm 处吸光度 A_i ; 取 4.0 mL 不同浓度多糖溶液加 1.0 mL 无水乙醇作为空白组, 摇匀后室温放置 30 min, 测定吸光度为 A_0 ; 取 4.0 mL DPPH 溶液加 1.0 mL 无水乙醇作对照组, 混匀后室温静置 30 min, 测定吸光度为 A_c 。相同浓度的 Vc 水溶液作阳性对照, 操作方法同上。

$$\text{清除率}(\%)=[1-(A_i-A_0)/A_c]\times 100\% \quad (4)$$

1.3.7.4 超氧阴离子自由基清除能力的测定

取 Tris-HCl (50 mmol/L, pH=8.2) 缓冲液 4.5 mL, 25 °C 平衡 20 min, 分别加入 0.1 mL 不同浓度 (0.05~0.50 mg/mL) 的多糖溶液, 然后加入 0.2 mL 5 mmol/mL 邻苯三酚溶液 (10 mmol/L HCl 溶液配制), 混匀后 25 °C 保温 10 min, 迅速加入 10 mol/L HCl 溶液 1 mL 终止反应, 立即于 320 nm 下测吸光度记 A_i 。10 mmol/mL HCl 代替邻苯三酚溶液做空白组, 测定吸光度为 A_0 ; 对照组以蒸馏水多糖溶液, 吸光度为 A_c 。相同浓度的 Vc 水溶液作对照, 操作方法同上。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%)=[1-(A_i-A_0)/A_c]\times 100\% \quad (5)$$

1.3.8 多糖体外保湿性评价

参照文献^[34,35], 将纯化多糖和甘油分别用蒸馏水配成 5% 的溶液, 选用 60 mm 培养皿 (恒重), 分别在培养皿内侧贴一层 3 M 医用透气胶带, 分别吸取多糖溶液、甘油溶液、蒸馏水各 500 μ L 点在透气胶带上, 称重后放入 25 °C 相对湿度 60% 的恒温恒湿箱内 6 h, 每隔 1 个小时称重一次, 据与初始重量差计算保湿率:

$$L(\%)=M_t/M_0\times 100\% \quad (6)$$

注: M_0 为初始重量, g; M_t 为取样点重量, g; t 为取样时间, h。

1.3.9 统计分析

每个实验重复 3 次以上, 试验数据采用 Excel 进行整理, 再使用 SPSS 17.0 软件对数据进行差异显著性分析, 以 $p<0.05$ 和 $p<0.01$ 判断差异显著性程度, 实验结果以 (mean \pm SD) 表示。采用 Origin 8.0 软件进行数据分析作图。

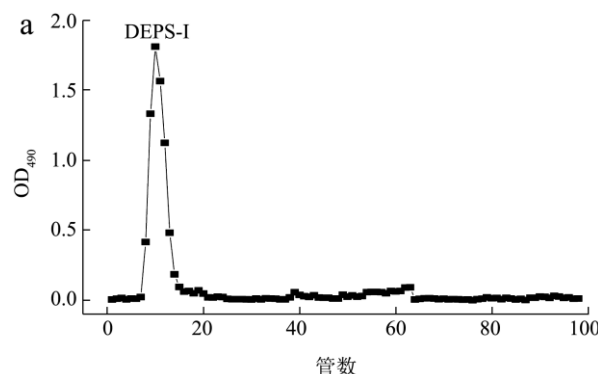
2 结果与讨论

2.1 液体发酵黑木耳多糖含量

发酵结束后, 得到粗多糖 EPS 21.50 \pm 0.51 g/L, 苯酚-硫酸法检测得胞外多糖的含量为 48.79 \pm 0.11 g/100 g, 由公式 (1) 得胞外多糖产量为 10.49 \pm 0.27 g/L, 显著高于其他黑木耳品种液体发酵胞外多糖产量^[24-29]。冻干菌丝体产量为 24.78 \pm 0.63 g/L, 高压热水浸提得到粗多糖 IPS 产量为 4.23 \pm 0.03 g/L, 苯酚-硫酸法检测胞内多糖的含量为 72.13 \pm 0.17 g/100 g, 胞内多糖产量为 3.05 \pm 0.03 g/L。醇沉所得 EPS 和 IPS 中蛋白质含量分别为 7.96 \pm 0.61 g/L 和 0.67 \pm 0.06 g/L。酶-Sevag 法脱除粗多糖 EPS 和 IPS 中蛋白质后得到 DEPS 和 DIPS 分别为 9.83 \pm 0.27 g/L 和 2.79 \pm 0.04 g/L, 苯酚-硫酸法检测 DEPS 和 DIPS 中多糖含量分别为 95.22 \pm 0.91% 和 98.50 \pm 0.30%, 表明酶-Sevag 法可以很好的脱除黑木耳液体发酵所得 EPS 和 IPS 中蛋白质。由公式 (2) 计算胞外和胞内多糖损失率为 10.75 \pm 0.77% 和 10.06 \pm 0.67%, 表明酶-Sevag 法在脱蛋白提高多糖纯度的同时会造成一定的多糖损失, 分析原因可能是部分糖链与蛋白质共价相连构成糖蛋白而被去除。考马斯亮蓝法测定 DEPS 和 DIPS 中蛋白质含量分别为 0.43 \pm 0.17 g/L 和 0.03 \pm 0.01 g/L, 这些未被完全去除蛋白质的存在使得多糖纯度达不到 100%。

2.2 多糖分离纯化

DEAE-52 纤维素柱层析对 200 mg DEPS 和 DIPS 分离纯化结果见图 1。由洗脱曲线可以看出, DEPS (a) 只有一个主峰 (DEPS-I), 分析原因可能是优化的培养基和培养条件在提高胞外多糖产量的同时可使其组分更加单一化。DIPS (b) 的在 PBS 洗脱液中有一个主峰 (DIPS-I), 另在 0.10 mol/L NaCl-PBS 和 0.20 mol/L NaCl-PBS 洗脱液中有 2 个小峰 (DIPS-II 和 DIPS-III)。分别收集 DEPS 和 DIPS 最多的组分 DEPS-I 和 DIPS-I, 经浓缩、透析、醇沉后得冻干样品 167.64 \pm 3.48 mg 和 132.72 \pm 2.64 mg, 回收率分别为 83.82 \pm 1.74% 和 66.36 \pm 1.32%。



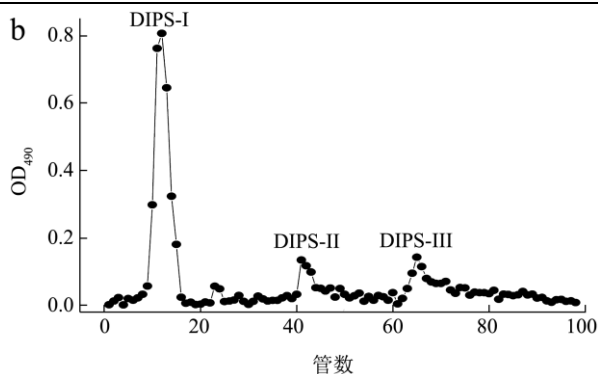


图1 除蛋白多糖 DEPS (a) 和 DIPS (b) 的 DEAE-52 柱层析洗脱曲线

Fig.1 Elution profile of the deproteinized polysaccharide DEPS (a) and DIPS (b) by column chromatography of DEAE-52

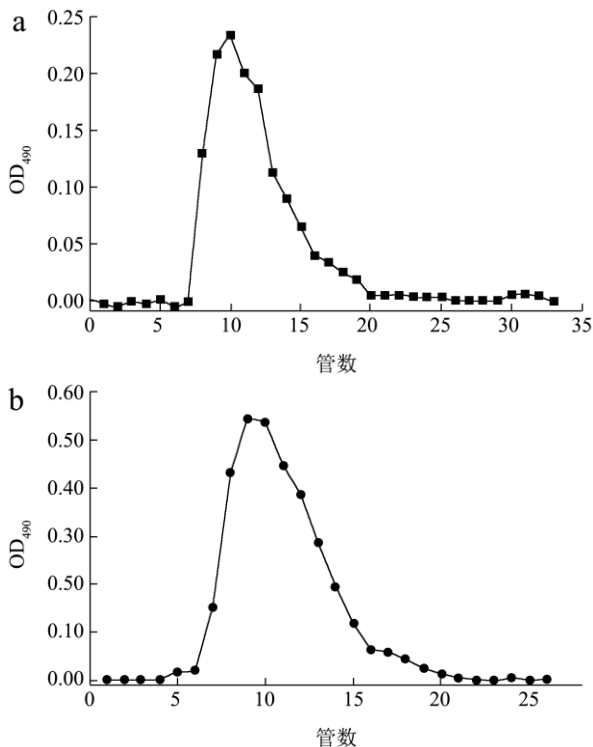


图2 多糖分离组分 DEPS-I (a) 和 DIPS-I (b) 的 Sephadex G-200 柱层析纯化曲线

Fig.2 Sephadex G-200 column chromatographic purification curves of the polysaccharide components DEPS-I (a) and DIPS-I (b)

将 DEPS-I 和 DIPS-I 用 Sephadex G-200 进一步分离纯化, 洗脱曲线如图 2。可以看出, DEPS-I 和 DIPS-I 组分都是单峰, 表明采用 DEAE-52 分离所得 DEPS 和 DIPS 各组分是可靠的。从峰形来看, DIPS-I 的峰型较 DEPS-I 的对称性好且峰宽, 表明 DIPS-I 组分的分子量分布较 DEPS-I 的广。分别收集 DEPS-I 和 DIPS-I 经 0.10 mol/L NaCl 溶液洗脱的第 7~20 管和 5~20 管, 经浓缩、透析、醇沉后得冻干样 PEPS 和 PIPS。

称重后计算回收率分别为 $93.63 \pm 2.76\%$ 和

$95.85 \pm 2.02\%$, 表明 DEPS-I 和 DIPS-I 纯度较高, 即 DEAE-52 对黑木耳液体发酵多糖组分的分离效果好。因此, 在后续的黑木耳液体发酵多糖应用中可只用 DEAE-52 进行一次分离纯化, 既可节省时间又能节约成本。

2.3 红外光谱分析

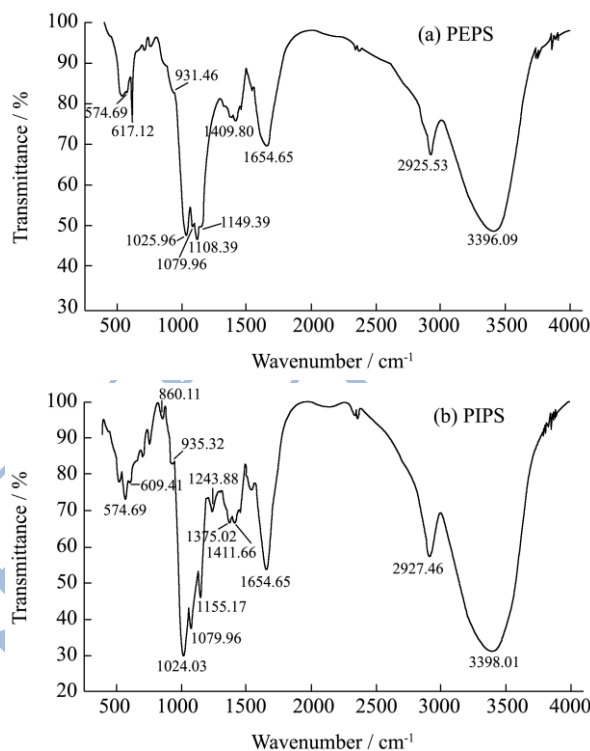


图3 多糖组分 PEPS (a) 和 PIPS (b) 的红外光谱图

Fig.3 FT-IR spectra of PEPS (a) and PIPS (b)

PEPS 和 PIPS 红外光谱官能团分析见图 3。PEPS (a) 和 PIPS (b) 的峰型基本一致, 且与已报道的黑木耳子实体多糖^[37-39]、固体发酵菌质多糖^[36]以及液体发酵胞外多糖^[29]的红外图谱相似, PEPS (a) 和 PIPS (b) 分别在 3396.09 cm^{-1} 和 3398.01 cm^{-1} 处有强的 O-H 伸缩振动吸收峰, 在 2925.53 cm^{-1} 和 2927.46 cm^{-1} 处具有 C-H 伸缩振动峰, 这两处吸收峰为多糖类物质的典型特征峰^[29,36,37]。PEPS (a) 和 PIPS (b) 在 1654.65 cm^{-1} 处吸收峰可能由 C=O 伸缩振动导致^[37], 或因存在结合水^[38,40]或少量蛋白质^[41]。PEPS (a) 和 PIPS (b) 分别在 1407.80 cm^{-1} 和 1411.66 cm^{-1} 处有 C-H 变角振动吸收峰, 在 $1200 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 范围内各有三个由 C-O-H 和吡喃糖环 C-O-C 中 C-O 伸缩振动引起的吸收峰, 说明 PEPS 和 PIPS 是吡喃型多糖^[29,36,37,39,41]; PEPS 和 PIPS 分别在 931.46 cm^{-1} 和 935.32 cm^{-1} 处有吸收峰, 与 β -糖苷键的存在有关, 推测黑木耳液体发酵 PEPS 和 PIPS 为 β -构型^[38]吡喃糖。此外, PIPS 在 1243.88 cm^{-1} 处有 S=O 对称拉伸振动吸收峰^[42], 表明 PIPS 中存在

硫酸根。

2.4 多糖的抗氧化活性研究

2.4.1 还原力

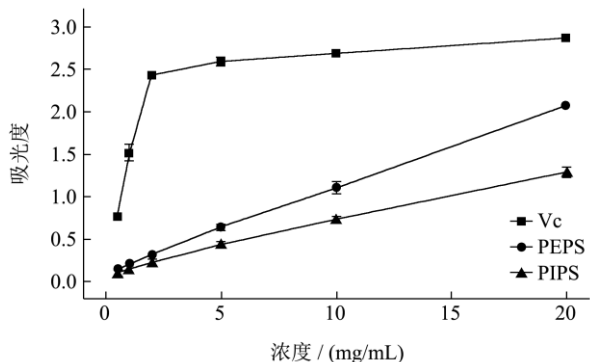


图4 黑木耳液体发酵 PEPS 和 PIPS 还原力

Fig.4 The reducing power of PEPS and PIPS from submerged fermentation of *A. heimer*

由图4可知,在0.5~20.0 mg/mL的浓度范围内,黑木耳纯化 PEPS、PIPS 的还原力与其浓度均呈良好的线性关系 ($Y_{PEPS}=0.1129+0.0984X$, $R^2=0.9996$; $Y_{PIPS}=0.1040+0.0598X$, $R^2=0.9983$),随着浓度的增加,还原力逐渐增强。在检测浓度范围内,DEPS 的还原力极显著高于 PIPS 的 ($p<0.01$),且随着浓度的增加差异性越来越大,这与已报道的未纯化黑木耳液体发酵胞外和胞内多糖还原力比较结果相反^[27],推测原因可能是所用培养基组成不同,改变了 PEPS 的单糖组成^[29],从而提高了其还原力。与 Vc 相比,PEPS 和 PIPS 还原力均显著低于同浓度的 Vc,这与已有报道一致^[26,27]。

2.4.2 对羟基自由基 (OH) 清除能力

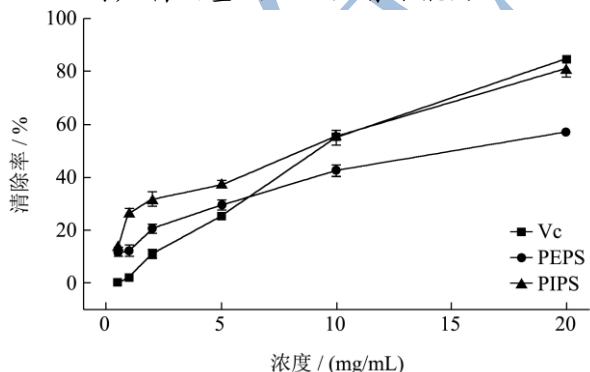


图5 黑木耳液体发酵 PEPS 和 PIPS 对羟基自由基的清除效果
Fig.5 Scavenging capacity of PEPS and PIPS from submerged fermentation of *A. heimer* on hydroxyl free radicals

浓度在0.5~20.0 mg/mL之间,各样品的羟基自由基清除率随着浓度的增加而增大(图5)。当浓度在0.5~5.0 mg/mL范围内时,PEPS 和 PIPS 的羟基自由基清除能力均显著高于 Vc ($p<0.01$);在浓度大于5.0 mg/mL

时,PEPS 的羟基自由基清除能力极显著低于 Vc ($p<0.01$),而 PIPS 的清除能力与 Vc 差异不显著 ($p<0.05$),清除率为 $81.03\pm 2.92\%$,表明 PIPS 抗氧化力较强。在检测浓度范围内 PIPS 的清除能力始终高于 PEPS,表明黑木耳液体发酵胞内多糖羟基自由基清除能力显著高于胞外多糖的,与报道未纯化液体发酵胞内和胞外多糖清除羟基自由基能力比较结果一致^[27]。

2.4.3 对 DPPH 自由基清除能力

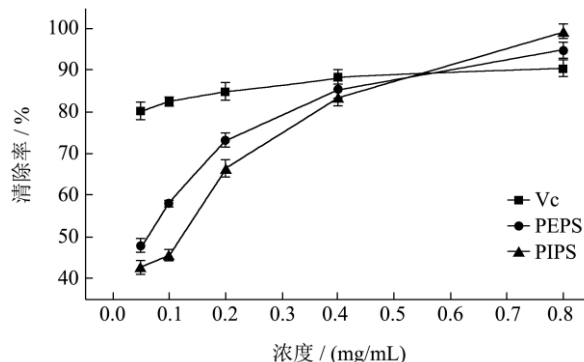


图6 黑木耳液体发酵 PEPS 和 PIPS 对 DPPH 自由基的清除效果
Fig.6 Scavenging capacity of PEPS and PIPS from submerged fermentation of *A. heimer* on DPPH free radicals

由图6可知,随着浓度的增加,Vc、PEPS 和 PIPS 对 DPPH 自由基清除能力均有所增加,其中 PEPS 和 PIPS 增加幅度明显大于 Vc。当浓度在0.05~0.4 mg/mL时,DPPH 自由基清除能力为 Vc>PEPS>PIPS,而当浓度大于0.4 mg/mL时,PEPS 和 PIPS 的 DPPH 自由基清除能力迅速增强超过 Vc 的,其中 PIPS 的 DPPH 自由基清除清除率显著高于 PEPS 和 Vc 的 ($p<0.05$),最高为 $98.77\pm 1.73\%$ 。PIPS 较强的 DPPH 自由基清除能力,可能是由于其得电子能力更强,与 DPPH 自由基上电子结合更快,从而使其清除率更高^[33]。

2.4.4 对超氧阴离子自由基 (O²⁻·) 清除能力

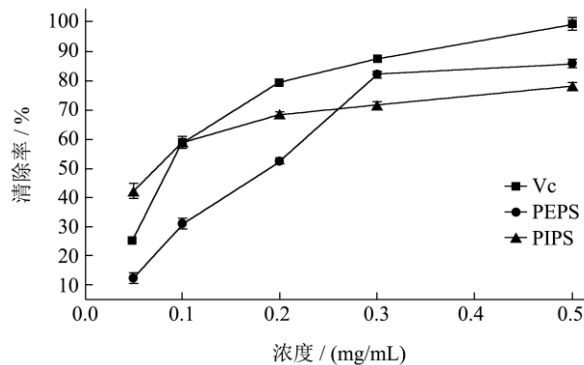


图7 黑木耳液体发酵 PEPS 和 PIPS 对超氧阴离子自由基的清除效果
Fig.7 Scavenging capacity of PEPS and PIPS from submerged fermentation of *A. heimer* on superoxide anion free radicals

由图7可知,当浓度在0.05~0.5 mg/mL范围内时,

Vc、PEPS 和 PIPS 对超氧阴离子自由基清除能力随着浓度的增加而提高。当浓度 ≤ 0.2 mg/mL 时, PIPS 的超氧阴离子自由基清除能力显著高于 PEPS 的($p < 0.05$), 但清除率仅为 $68.20 \pm 0.86\%$; 而当浓度 ≥ 0.3 mg/mL 时, PEPS 的超氧阴离子自由基清除率超过 PIPS, 当浓度为 0.5 mg/mL 时, PEPS 的超氧阴离子自由基清除率最高为 $85.79 \pm 1.60\%$, 显著高于 PIPS 的 ($p < 0.05$), 这与已报道未纯化胞内和胞外多糖的研究结果一致^[27]。

2.5 多糖的保湿性评价

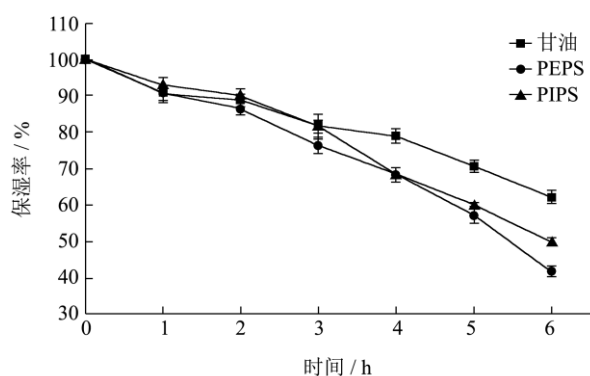


图 8 黑木耳液体发酵 PEPS 和 PIPS 的保湿效果

Fig.8 Moisturizing effect of PEPS and PIPS from submerged fermentation of *A. heimuer*

25 °C 相对湿度 60% 条件下 5% 的 PEPS、PIPS 溶液以及 5% 甘油溶液在一定时间内的保湿率如图 8 所示。随时间延长, 3 种样品的保湿性均呈下降趋势, 比较检测周期内 PEPS 和 PIPS 的保湿率发现: 6 h 内, PIPS 的保湿率均高于 PEPS 的, 但仅在第 3 h 和第 6 h 表现出明显的优势 ($p < 0.01$), 表明纯化所得黑木耳液体发酵胞内多糖保湿效果稍优于胞外多糖的, 推测可能是 PIPS 含有较多的羟基等亲水性基团, 能够吸附更多的水分子, 从而表现出更好的保湿效果。与 5% 甘油溶液相比, PIPS 在 1~3 h 内保湿率高于甘油的, 虽差异不显著, 但 5% PIPS 3 h 后保湿率仍在 80% 以上 ($81.63 \pm 2.09\%$), 表明纯化的液体发酵黑木耳胞内多糖 3 h 内具有良好的保湿效果。

3 结论

利用优选的黑木耳菌株和优化培养基进行液体发酵获得胞外和胞内粗多糖产量分别为 10.49 ± 0.27 g/L 和 3.05 ± 0.03 g/L, 经除蛋白与分离纯化获得单一的纯化组分 PEPS 和 PIPS, 通过红外光谱官能团分析推测二者均为 β -构型吡喃糖。比较 2 种多糖组分的抗氧化活性和保湿性发现, PEPS 在还原力、超氧阴离子自由基清除能力方面优于 PIPS, 而 PIPS 在 DPPH 自由基、羟基自由基清除能力以及保湿性能方面优于

PEPS。本研究为黑木耳液体发酵多糖不同组分的合理利用提供依据, 为它们在食品、化妆品等方面的应用奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Leung M, Liu C, Koon J, et al. Polysaccharide biological response modifiers [J]. Immunology Letters, 2006, 105(2): 101-114
- [2] 王恒禹, 刘玥, 姜猛, 等. 多糖在食品工业中的应用现状 [J]. 食品科学, 2013, 34(21): 431-438
WANG Heng-yu, LIU Yue, JIANG Meng, et al. Application of polysaccharide in food industry [J]. Food Science, 2013, 34(21): 431-438
- [3] Amirullaha N A, Abidin N Z, Abdullah N. The potential applications of mushrooms against some facets of atherosclerosis: A review [J]. Food Research International, 2018, 105: 517-536
- [4] Muszyńska B, Grzywacz-Kisielewska A, Kała K, et al. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review [J]. Food Chemistry, 2018, 243: 373-381
- [5] Roncero-Ramos I, Delgado-Andrade C. The beneficial role of edible mushrooms in human health [J]. Current Opinion in Food Science 2017, 14: 122-128
- [6] Meng X, Liang H, Luo L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities [J]. Carbohydrate Research, 2016, 424: 30-41
- [7] Singdevsachan S K, Auroshree P, Mishra J, et al. Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2016, 7: 1-14
- [8] Wu F, Yuan Y, Malysheva VF, et al. Species clarification of the most important and cultivated *Auricularia* mushroom "Heimuer": evidence from morphological and molecular data [J]. Phytotaxa, 2014, 186(5): 241-253
- [9] Zhang JX, Chen Q, Huang CY, et al. History, current situation and trend of edible mushroom industry development [J]. Mycosystema, 2015, 34: 524-540
- [10] Nguyen T L, Wang D, Hu Y, et al. Immuno-enhancing activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(4): 1117-1122
- [11] Ma Z, Wang J, Zhang L, et al. Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 977-983

- [12] Nguyen T L, Chen J, Hua Y, et al. In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(3): 1254-1258
- [13] Yoon SJ, Yu MA, Pyun YR, et al. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin [J]. Thrombosis Research, 2003, 112(3): 151-158
- [14] Zhang H, Wang Z Y, Yang L, et al. In vitro antioxidant activities of sulfated derivatives of polysaccharides extracted from *Auricularia auricular* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(5): 3288-3302
- [15] Lu A, Yu M, Shen M, et al. Preparation of the *Auricularia auricular* polysaccharides simulated hydrolysates and their hypoglycaemic effect [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 1139-1145
- [16] Takeuchi H, He P, Mooi L. Reductive effect of hot-water extracts from woody ear (*Auricularia auricula-judae* Quel) on food intake and blood glucose concentration in genetically diabetic KK-A^y mice [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2004, 50(4): 300-304
- [17] Chen G, Luo Y C, Ji B P, et al. Hypocholesterolemic effects of *Auricularia auricula* ethanol extract in ICR mice fed a cholesterol-enriched diet [J]. Journal of Food Science and Technology, 2011, 48(6): 692-698
- [18] Wu Q, Tan Z, Liu H, et al. Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(3): 284-288
- [19] Tang Y J, Liu R S, Li H M. Current progress on truffle submerged fermentation: a promising alternative to its fruiting bodies [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(5): 2041-2053
- [20] 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
- [21] Yang S, Jin L, Ren X, et al. Optimization of fermentation process of *Cordyceps militaris* and antitumor activities of polysaccharides in vitro [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2014, 22(4): 468-476
- [22] Yang S, Zhang H. Optimization of the fermentation process of *Cordyceps sobolifera* Se-CEPS and its anti-tumor activity in vivo [J]. Journal of Biological Engineering, 2016, 10: 8
- [23] 范秀芝,陈丽冰,史德芳,等.黑木耳液体发酵菌株筛选及发酵特性分析[J].湖北农业科学,2015,54(20):5117-5120
- FAN Xiu-zhi, CHEN Li-bing, SHI De-fang, et al. Screening of *Auricularia auricula-judae* strain with high polysaccharide contents for liquid fermentation and analysis on the fermentation characteristics [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(20): 5117-5120
- [24] 唐青涛,余若黔,陈福生.深层发酵黑木耳产孢外多糖的初步研究[J].食品科学,2002,23(3):46-49
- TANG Qing-tao, YU Ruo-qian, CHEN Fu-sheng. Preliminary study on the production of polysaccharides from *Auricularia auricula* under submerged fermentation [J]. Food Science, 2002, 23(3): 46-49
- [25] Wu J, Ding ZY, Zhang KC. Improvement of exopolysaccharide production by macro-fungus *Auricularia auricula* in submerged culture [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(4): 743-749
- [26] 朱文斌.黑木耳液体发酵及其多糖活性研究[D].合肥:安徽农业大学,2015
- ZHU Wen-bin. Study on the submerged fermentation of black fungus and activity of fungal polysaccharides [D]. Anhui: Anhui Agricultural University, 2015
- [27] 刘芳茗.黑木耳液态深层发酵中试生产工艺优化及多糖功能性研究[D].长春:吉林农业大学,2015
- LIU Fang-ming. Studies on the submerged fermentation of *Auricularia auricular* in pilot scale [J]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2015
- [28] 陈丽华,章克昌.8味中药对黑木耳发酵的影响[J].食品与生物技术学报,2007,26(5):104-109
- CHEN Li-hua, ZHANG Ke-chang. Effects of eight kinds of Chinese traditional medicines on submerged fermentation of *Auricularia auricular* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(5): 104-109
- [29] 张颖.刺五加对黑木耳菌胞外多糖发酵的影响及机理研究[D].天津:天津科技大学,2017
- ZHANG Ying. Effects of aqueous extract from *Eleutherococcus senticosus* on exopolysaccharides fermentation of *Auricularia auricular* and possible mechanism [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2017
- [30] Zou Y, Hu W, Liu C, et al. Production of tyrosinase by *Auricularia auricula* using low cost fermentation medium [J]. Annals of Microbiology, 2013, 63: 699-705
- [31] 孙小梅,戴军,陈尚卫,等.灵芝子实体多糖提取方法优化及不同来源赤芝子实体的多糖分子质量比较[J].食品与发酵工业,2014,40(7):212-217

- SUN Xiao-mei, DAI Jun, CHEN Shang-wei, et al. Optimization of extraction conditions of *G lucidum* fruiting bodies polysaccharides and comparison of molecular weight of polysaccharides from different *G lucidum* fruiting bodies [J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(7): 212-217
- [32] 黄奕诚,陈雪香,贺丽苹,等.蛹虫草多糖的纯化及其分子量的测定[J].现代食品科技,2012,28(8):1054-1057
- HUANG Yi-cheng, CHEN Xue-xiang, HE Li-ping, et al. Isolation, purification and molecular weight determination of polysaccharides from *Cordyceps militaris* [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(8): 1054-1057
- [33] 方汝滔.大杯蕈菇柄多糖的提取纯化及抗氧化性研究[D].福州:福建农林大学,2012
- FANG Ru-tao. Extraction, purification and antioxidant activity of the polysaccharides from the stem of *Clitocybe maxima* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012
- [34] 张琪,钟葵,周素梅.裂褶多糖保湿功效评价[J].中国食品学报,2015,15(3):221-226
- ZHANG Qi, ZHONG Kui, ZHOU Su-mei. Moisturizing effect evaluation about *Schizophyllum* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(3): 221-226
- [35] 吴龙月,陈瑶,向福,等.杏鲍菇多糖的酶法提取及其保湿和抗氧化活性评价[J].中国酿造,2017,36(5):161-165
- WU Long-yue, CHEN Yao, XIANG Fu, et al. Optimization of enzyme extraction conditions of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* and its moisture retention and antioxidant activity [J]. China Brewing, 2017, 36(5): 161-165
- [36] 曾峰.黑木耳菌质多糖分离纯化及其降血脂活性初步研究[D].福州:福建农林大学,2012
- ZENG Feng. Isolation and purification of mycelium polysaccharide from *Auricularia auricula* and its biological activity on hypolipidemic [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012
- [37] 孙永敢,鄢为唯,聂少平,等.井冈山黑木耳多糖的制备及结构分析[J].现代食品科技,2018,34(3):1-8
- SUN Yong-gan, YAN Wei-wei, NIE Shao-ping, et al. Preparation and structure analysis of polysaccharide from *Auricularia auricular* in Jinggangshan [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 1-8
- [38] 宋广磊,杜琪珍.黑木耳多糖 AAPS-3 的化学结构[J].菌物学报,2010,29(4):576-581
- SONG Guang-lei, DU Qi-zhen. Chemical structure of polysaccharide AAPS-3 from *Auricularia auricula-judae* [J]. Mycosystema, 2010, 29(4): 576-581
- [39] 樊黎生.黑木耳多糖 AAP-IIa 级分的制备及其生物活性的研究[D].武汉:华中工业大学,2006
- FAN Li-sheng. Studies on preparation and bioactivities of the AAP-II a fraction of polysaccharides from *Auricularia auricula* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006
- [40] 廖文镇.竹荪多糖的化学结构、生物活性及其功能化抗肿瘤药物的研究[D].广州:华南理工大学,2015
- LIAO Wen-zhen. Structure characterization and bioactivity evaluation of polysaccharides from *Dictyophora indusiata* and its application in functionalization of anticancer drugs [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [41] 朱磊.黑木耳多糖分离纯化、理化性质及抗疲劳功能的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2008
- ZHU Lei. Study on isolation, purification, physicochemical properties and anti-fatigue function of polysaccharides from *Auricularia auricula* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2008
- [42] Ren B, Chen C, Li C, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 173: 192-201