瓦布贝母内生真菌 WBS020 多糖理化性质和抗氧化活性

潘 峰[1]， 张慧慧[1]， 许晓燕[2]， 杨玉霞[2]， 吴 卫[*1]
（1. 四川农业大学 农学院，四川 成都 611130；2. 四川省中医药科学院，四川 成都 610041）

摘要：以一株分离自药用植物瓦布贝母的内生真菌 *Fusarium tricinctum* WBS020 为材料，对其胞外多糖进行研究。首先采用多种有机溶剂对 WBS020 发酵液进行脱脂除杂，用醇沉法获取粗多糖。随后用大孔吸附树脂法除色素，蛋白酶-Sevag 联用法除蛋白质，半透膜法除盐等小分子物质，纤维素 DEAE-52 和 Sephadex G-150 柱色谱分离法获取纯化多糖。再用 HPGPC-ELSD 色谱法分析纯化多糖的均一性和平均相对分子质量，用 PMP 衍生法结合 HPLC-DAD 色谱法分析单糖组分，用 UV、FT-IR 分析多糖的部分理化性质。最后利用 DPPH 和 ABTS 自由基清除活性及亚铁离子螯合能力评价多糖的抗氧化活性。结果表明，经过一系列的提取分离纯化，得到一个胞外多糖主成分 WBS020EPS1-2，其为含有少量结合蛋白质的纯度在 95%以上的均一多糖，平均相对分子质量约为 3.137×10^4，主要由甘露糖，鼠李糖，葡萄糖，半乳糖和阿拉伯糖以摩尔比 0.43:0.13:10.00:1.92:0.11 组成，同时，还含有一个未知成分，且单糖成分主要为 α-构型链接的吡喃糖；此外，多糖 WBS020EPS1-2 对 DPPH 自由基清除活性较弱，而对 ABTS 自由基清除能力和亚铁离子螯合能力则较强，IC_{50} 分别为 1.93 mg/mL 和 4.52 mg/mL。

关键词：内生真菌 WBS020；胞外多糖；分离纯化；理化结构性质，抗氧化活性
中图分类号：Q 939.99　**文章编号**：1673-1689(2019)06-0144-09　DOI：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.020

Preliminary Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Polysaccharide Fraction from Endophytic Fungal WBS020 Originated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*

PAN Feng[1]， *ZHANG Huihui*[1]， *XU Xiaoyan*[2]， *YANG Yuxia*[2]， *WU Wei*[*1]
（1. College of Agronomy，Sichuan Agricultural University，Chengdu 611130，China；2. Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine，Chengdu 610041，China）

Abstract：The exopolysaccharide extracted from the fermentation broth of endophytic fungal *Fusarium tricinctum* WBS020 originated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis* (FUW) was studied. At first，the crude polysaccharide was precipitated with ethanol from the fermentation broth

收稿日期：2016-11-02
基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金项目(20115103110009)。
作者简介：潘 峰(1989—)，男，博士研究生，主要从事药用植物资源开发与利用及其内生真菌的研究。E-mail：panfengpf123@126.com
*** 通信作者**：吴 卫(1970—)，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事药用植物资源研究。E-mail：ewuwei@sicau.edu.cn
引用本文：潘峰，张慧慧，许晓燕，等. 瓦布贝母内生真菌 WBS020 多糖理化性质和抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(06)：144-152.

after being degreased by organic solvent, and further were preliminary purified by macroporous resin methods for decoloration, proteases in combination with Sevag reagent methods for deproteinization, equilibrium dialysis methods for desalination *in vitro*, the DEAE cellulose DE-52 anion exchange chromatography and sephadex G-150 column chromatography methods for the separation of polysaccharide. Subsequently, homogeneity average relative molecular weight and monosaccharide composition of the purified polysaccharide were studied by the methods of high-performance gel permeation chromatography coupled with evaporative light scattering detection (HPGPC-ELSD), PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone) precolumn derivatization with high performance liquid chromatography coupled to photodiode array detector (PMP-HPLC-DAD), respectively. And partial physicochemical properties were also analyzed by ultra violet (UV) spectra and fourier transform infrared (FT-IR) methods. Finally, the antioxidant activities were determined by DPPH radical scavenging assay, ABTS radical scavenging assay and ferrous ion chelating activity assay. Results showed that WBS020EPS1-2, as the main exopolysaccharide, was obtained after the extraction, separation and purification. WBS020EPS1-2 was homogeneous exopolysaccharide with 95% purity and contained a small quantity of binding proteins, and was comprised of mannose, rhamnose, glucose, galactose and ara binose with a molar ratios of 0.43 :0.13 :10.00 :1.92 :0.11. Besides, there was a unknown monosaccharides. The monosaccharide in WBS020EPS1-2 was a pyranose, which was connected by an α-glycosidic linkage. The average relative molecular weight of WBS020EPS1-2 was approximately 3.137×10^4. In addition, exopolysaccharide WBS020EPS1-2 had a weak DPPH radical scavenging activity, while possessed a strong ABTS radical scavenging effect and a good ferrous ion chelating activity with the IC_{50} value of 1.93 mg/mL and 4.52 mg/mL, respectively.

Keywords: endophytic fungus WBS020, exopolysaccharide, purification and isolation, structure and physiochemical properties, antioxidant activity

多糖是一类由十个或十个以上单糖组成的聚合物，目前在食品、医药和材料等方面有着重要应用。微生物作为多糖来源的最主要资源之一越来越受到人们的重视。从真菌中提取分离到的多糖表现出良好的抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、抗菌消炎、抗衰老等多种生理活性[1-3]。内生真菌作为一类重要的真菌资源，已有研究表明其不仅能够产生活性多样的小分子化合物[4]，还可产生大量的大分子多糖类物质[5-7]。然而相对于内生真菌小分子天然产物而言，关于内生真菌的多糖研究明显偏少。

瓦布贝母（*Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*）是百合科贝母属川贝母的栽培品种，为名贵中药川贝的基源种[8]。近年来，实践证明瓦布贝母较暗紫贝母等品种更能适应环境变化，形态也较大[9]。本课题组曾从瓦布贝母新鲜鳞茎中分离到多株内生真菌，对其研究后发现部分内生真菌可产生物碱类活性成分[10-11]，作者还发现瓦布贝母内生真菌 WBS020 发酵液具有良好的抗氧化活性，但其多糖成分尚未进行研究。为此，本研究提取菌株 WBS020 发酵液胞外多糖，对其进行了分离纯化并对部分理化结构信息初步研究，考察其抗氧化活性，以期对瓦布贝母内生真菌多糖的开发利用奠定基础，也为其他药用植物内生真菌多糖研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

内生真菌 WBS020 为分离自瓦布贝母的优势菌株，并且由四川农业大学吴卫教授用分子生物学方法鉴定为 *Fusarium tricinctum*（Accession No. KU350730）。

1.2 试剂

DEAE-纤维素（type DE52），购于 Whatman 公

司;Sephadex G-150,购于 Pharmacia 公司;S-8 型和 D101 resin 大孔吸附树脂，购于广州翔博生物科技有限公司。不同相对分子质量的 T-系列葡聚糖(T-5、T-10、T-40、T-70、T-500)、甘露糖 (D-(+)-mannose)、鼠李糖(L-rhamnose monohydrate)、半乳糖醛酸(D-(+)-galacturonic acid)、葡萄糖(D-(+)-glucose)、半乳糖(D-(+)-galactose)、木糖(D-(+)-xylose)、阿拉伯糖(L-(+)-arabinose)、岩藻糖(L-(-)-fucose)、DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)和 ABTS (2,2-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) acid),购于上海 Sigma-Aldrich 公司。氧化氘(D_2O,99.9 atom % D),购于上海麦克林生化科技有限公司;(色谱级)乙腈,购于飞世尔实验器材(上海)有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器设备

SW-CJ-1F 型洁净工作台，苏州安泰空气技术有限公司产品;HY-150s 型生物摇床，武汉汇诚生物科技公司产品;RE-2000 型旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂制造;SJIA-10N 型普通多歧管冷冻干燥机,宁波市鄞州双嘉仪器有限公司产品;自动馏分收集器，美国 Bio-Rad 公司产品;Waters 1525 HPLC 系统，美国 Waters 公司产品;ELSD 检测器，美国 Alltech 公司产品；岛津 UV-2450 紫外分光光度计,日本岛津公司产品;安捷伦 1100 高效液相色谱仪 (HPLC)，美国 Agilent 公司产品;TSK-GEL G5000PWXL 凝胶注 (7.8 mm × 30 cm)，日本 TOSOH 公司产品;Phenomenex Luna 5u C18(2) 100 Å 柱 (250 mm × 4.6 mm i.d.,5 μm)，丹麦 Phenomenex 公司产品；傅里叶变化红外光谱仪,美国 Perkin Elmer 公司产品;酶标仪(Multiskan GO)，美国 Thermo Scientific 公司产品;MD34 型透析袋(截留量 3 500),美国联合碳化公司产品。

1.4 供试菌株发酵及粗多糖提取

取保存的菌种于新鲜 PDA 培养基上活化,将新长出的菌丝接种到 PDB 液体培养基上,按照 Pan 所描述的培养方法制备种子液和发酵[11]。采用抽滤方法分离菌丝体和发酵液,收集发酵液,在 50~60 ℃条件下利用旋转蒸发仪减压浓缩到原体积的 20%。之后用石油醚(30~60 ℃),乙酸乙酯和正丁醇依次分别重复 2~3 次等体积萃取浓缩液，进行初步脱脂,除色素等。然后加入其体积 4 倍的无水乙醇,在 4 ℃冰箱静置过夜。除去上层澄清液之后,4 000 r/min 离心 30 min 并收集沉淀,用无水乙醇清洗。水浴去除乙醇后将所得粗多糖在冷冻干燥机冻干备用。

1.5 粗多糖除杂

1.5.1 粗多糖除色素 称取适量粗多糖复溶于 50 mL 蒸馏水中,然后参考 Liu 的方法选用 S-8 和 D101 2 种大孔吸附树脂进行脱色素[12-13]。即首先将预处理好的 S-8 大孔吸附树脂用湿法装柱的方法制备大孔吸附树脂色谱柱(3.0 cm×40 cm),将 50 mL 粗多糖溶液以 1.0 mL/min 流速采用动态吸附法过 S-8 树脂色谱柱,再用 25 mL 蒸馏水冲洗色谱柱,收集洗脱液,选取新的 S-8 树脂色谱柱重复上述过程一次。将吸附过的多糖溶液再次浓缩到约 50 mL,再以同样的方法和过程用 D101 大孔吸附树脂色谱柱进行脱色素。收集多糖溶液并冷冻干燥备用。

1.5.2 粗多糖除蛋白质 采用蛋白酶和 Sevag 试剂联用的方法清除多糖溶液中的蛋白质成分[14]。首先将多糖溶于 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(PBS,pH 7.4)中,使溶液质量浓度约为 100 mg/mL。再加入胰蛋白酶适量使得溶液中其终浓度为 5 U/mL，在 37 ℃水浴 3 h,随后 4 000 r/min 离心 10 min,由于多糖溶解于水层,收集上清液。在 55 ℃预热的上清液中加入木瓜蛋白酶(终浓度为 5 U/mL),并在此温度下水浴 3 h,且 4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。最后选用 Sevag 试剂法除蛋白质,重复 3~5 次。4 000 r/min 离心后收集下清液备用。

1.5.3 粗多糖除小分子物质 将除色素和蛋白质的多糖溶液置于分子截留量为 3 500 的透析袋中,于蒸馏水中进行透析。每 12 h 更换一次蒸馏水,共透析 48 h,以除去盐离子,小分子物质等。完成透析后冻干备用。

1.6 多糖分离

多糖分离纯化选用纤维素 DEAE-52 色谱和 sephadex G-150 色谱进行。将纤维素 DEAE-52 按照说明书处理后,采用湿法装柱(31.2 mm×195 mm),然后用去离子水在 0.6 mL/min 条件下平衡色谱柱 10 h 左右，加入多糖样品，分别用去离子水、0.1、0.2、0.4、0.6 mol/L 的 NaCl 溶液以 0.5 mL/min 流速梯度洗脱,10 mL 每管收集洗脱液。用苯酚-浓硫酸法检测,并绘制纤维素 DEAE-52 洗脱曲线,得到 5 个洗脱峰,其中以蒸馏水洗脱得到的峰为主峰。收集主峰,浓缩,得中性多糖备用。将 sephadex G-150 按照说明书预处理后，按照纤维素 DEAE-52 相同

方法装柱、平衡。上样后用 0.5 mL/min 流速以去离子水冲洗,10 mL 每管收集洗脱液,用苯酚-浓硫酸法检测,并绘制洗脱曲线,得到 2 个洗脱峰,将其中的主峰命名为 WBS020EPS1-2。收集冷冻干燥备用。

1.7 纯度和平均相对分子质量测定

纯度和平均相对分子质量测定采用高效液相凝胶渗透色谱蒸发光散射检测器法(High-performance gel-permeation chromatography combined with evaporative light scattering detector, HPGPC-ELSD)色谱法,参考 Liu 所述步骤[15],并略做修改。具体为,选用 Waters 1525 HPLC 高效液相色谱系统;TSK-GEL G5000PWXL 凝胶注为色谱柱;流动相为水,流速 0.5 mL/min;ELSD 检测器参数:以压缩空气为载气,流速 3.2 L/min,漂移管温度 115 ℃,并选用 Alltech 2000ES 色谱工作站(浙江大学);样品进样量为 10 μL。根据葡聚糖凝胶柱的色谱图的峰形、出峰数量和主峰所占比例判断 WBS020EPS1-2 的纯度。此外,选用 T-系列葡聚糖(T-5,T-10,T-40,T-70,T-500 和 T-2 000)作为标准多糖按照上述条件进行 HPGPC-ELSD 分析。以标准多糖相对分子质量对数和保留时间对数绘制标准曲线,根据样品出峰的保留时间(RT)推算多糖 WBS020EPS1-2 的平均相对分子质量。

1.8 UV 扫描

取质量浓度为 1.0 mg/mL 的 WBS020EPS1-2 多糖溶液在 UV-2450 紫外分光光度计上扫描 200~400 nm 紫外区间的吸光谱。

1.9 单糖组分分析

WBS020EPS1-2 多糖的单糖组分采用强酸水解后利用 PMP 柱前衍生法结合 HPLC-DAD 色谱法进行分析[16-17]。单糖标准品为甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖(内标),按照相同衍生化过程配置标准单糖供试液。将多糖水解样品和标准多糖样品分别于安捷伦 1100 高效液相色谱系统分析。色谱条件为:色谱柱为 Phenomenex Luna 5u C_{18}(2) 100 Å 柱,流动相为体积分数 17%的乙腈和体积分数 83%磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.0,体积比)等度洗脱,流速为 1 mL/min,检测波长 245 nm,柱温为 30 ℃,进样体积 15 μL。

1.10 FT-IR 光谱分析

称取 WBS020EPS1-2 多糖干样 2~3 mg,用 KBr 法压片,在 4 000~450 cm^{-1} 的红外区间于 PerkinElmer Spectrum 100 系列傅立叶变换红外分光光度计进行扫描。

1.11 抗氧化活性分析

1.11.1 DPPH 自由基清除活性 DPPH 自由基清除活性的测定参考 Jin Boo Jeong[18]所述方法执行,略做修改。简而言之,将多糖样品 WBS020EPS1-2 溶解到水中,配置成 0.1~8.0 mg/mL 一系列质量浓度梯度溶液。根据酶标板体积,取 70 μL 多糖样品溶液于 96 孔酶标板,加入 180 μL 体积分数 0.004% DPPH 乙醇溶液,混合均匀后在 27 ℃条件下反应 5 min(反应完全),然后在 517 nm 波长下用酶标仪测定吸光度。用水替代样品作阴性对照,用乙醇替代 DPPH 溶液作空白对照。Vc 作标准抗氧化剂,试验重复 3 次。DPPH 自由基清除活性按照如下公式(1)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除活性}/\% = [1-(A_i-A_0)/A_c]\times 100 \quad (1)$$

其中 A_i 为样品测量值,A_0 为空白对照,A_c 为阴性对照。

1.11.2 ABTS 自由基清除活性 ABTS 自由基清除活性的测定参考 Yang Tao 所述方法[19],并略作修改。简而言之,根据预实验结果,取 30 μL 多糖样品溶液于 96 孔酶标板,加入 180 μL ABTS 试液,混合均匀后在 37 ℃条件下反应 5 min,然后在 734 nm 波长下用酶标仪测定其吸光度。用水替代样品作阴性对照,用乙醇替代 ABTS 溶液作空白对照。Vc 作标准抗氧化剂,试验重复 3 次。ABTS 自由基清除活性按照如下公式(2)计算:

$$\text{ABTS 自由基清除活性}/\% = [1-(A_i-A_0)/A_c]\times 100 \quad (2)$$

其中 A_i 为样品测量值,A_0 为空白对照,A_c 为阴性对照。

1.11.3 亚铁离子螯合活性 亚铁离子螯合实验参考文献[20-21]中所述邻二氮杂菲紫外光谱检测方法,并略作修改。具体如下,先取 0.3 mL 多糖样品溶液或者水(阴性对照)加入到装有 0.3 mL 浓度为 150 mmol/L $FeSO_4\cdot 7H_2O$ 溶液的试管中,摇匀后在室温静置 10 min,然后加入 0.3 mL 醋酸钠缓冲液(HAc-NaA,pH 4.6)和 0.3 mL 质量分数为 0.1% 1,10-邻二氮杂菲溶液来测量体系中未被螯合的 Fe^{2+}离子含量。用水替代 $FeSO_4\cdot 7H_2O$ 溶液作空白对照。取 200 μL 上述反应完成溶液于 96 孔酶标板中,在 510 nm 条件下用酶标仪测定其吸光度。

EDTA 溶液作阳性对照。亚铁离子螯合率计算采用如下公式(3)：

$$螯合率/\%=[1-(A_i-A_0)/A_c]\times 100 \quad (3)$$

其中 A_i 为样品测量值，A_0 为空白对照，A_c 为阴性对照。

2 结果与讨论

2.1 内生真菌 WBS020 多糖的提取纯化及分离

经发酵、浓缩、石油醚和乙酸乙酯等初步脱脂和除色素后，再经过醇沉得到的内生真菌 WBS020 胞外多糖粗提物，呈现深棕褐色浸膏状，在 4 ℃冰箱保存后呈块状。利用 S-8 型和 D101 型大孔吸附树脂对其进行多次脱色素处理，不仅获得了明显的除色素效果，还除去了一部分蛋白质等成分，并且整个吸附过程相对温和，不会破坏多糖成分结构[12-13]。利用酶法和 Sevag 试剂联用脱去多糖中剩余的蛋白质较相对单一方法脱蛋白质效率更高[14]，利用半透膜透析法可有效除去一些小分子物质。通过上述脱色素、脱蛋白质和除去小分子，成分的样品中多糖质量分数进一步提高。将经过纯化的多糖纤维素 DEAE-52 阴离子交换色谱柱后得到 5 个洗脱的多糖馏分，分别编号为 WBS020EPS-1、WBS020EPS-2、WBS020EPS-3、WBS020EPS-4 和 WBS020EPS-5。其中以 WBS020EPS-1 为主要成分(图 1(a))，且该成分为中性多糖(纯水洗脱得到的馏分)[22]，将其收集之后，浓缩冻干，经 sephadex G-150 进一步分离得到 2 个馏分（图 1 (b)），分别编号为 WBS020EPS1-1 和 WBS020EPS1-2，以后者质量较高。收集 WBS0020EPS1-2 并浓缩冻干后得到浅白色多糖粉末 WBS0020EPS1-2。HPGPC-ELSD 分析结果表明多糖 WBS020EPS1-2 为质量分数在 95% 以上的纯多糖。

2.2 多糖相对分子质量和 UV 分析

由于不同相对分子质量大小的葡聚糖在 HPGPC-ELSD 上的色谱峰保留时间(RT)的自然对数与其相对分子质量(M_w)的自然对数存在线性关系，通过测定已知相对分子质量标准葡聚糖在 HPGPC-ELSD 色谱上的 RT 值，得到了其 M_w 与 RT 值的线性关系式为：$\ln(M_w)=-8.039\ 9\ln(RT)+33.983$，$R^2=0.99-36$。因此根据 WBS020EPS1-2 主峰的保留时间可以得到其平均分子质量约为 3.137×10^4。

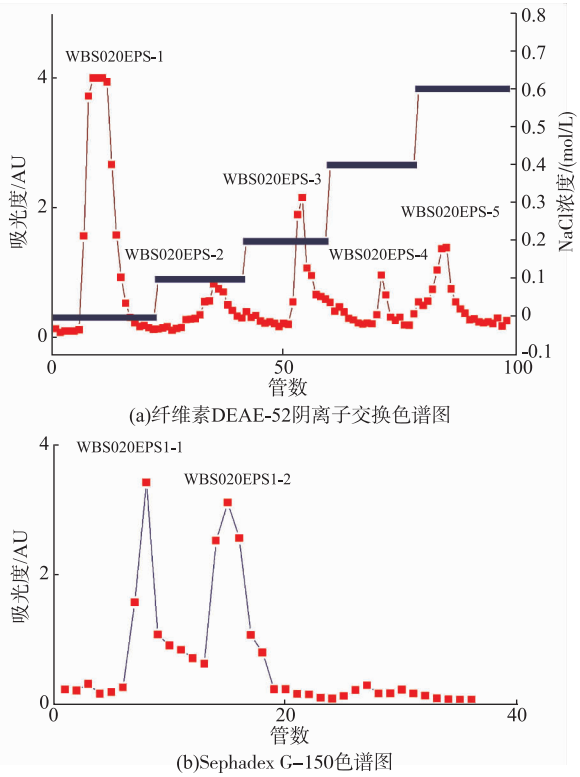


图 1 菌株 WBS020 发酵液胞外粗多糖分离纯化柱色谱图

Fig. 1 Purification column chromatogram of the crude exopolysaccharide (EPS) extracted from the fermentation broth of strain WBS020

2.3 UV 分析

如图 2 所示，从在 200~400 nm 扫描范围内的 WBS020EPS1-2 的 UV 扫描图中可以看出，在 280 nm 有一个较小的吸收峰，除此外整个曲线无其他吸收峰，说明色素和核酸成分已被除完，仅含有少量的蛋白质。取少量多糖进行试验，在其水溶液加入乙醇(乙醇的终体积分数控制在 80%以上)，多糖溶液溶解良好，表明其所含的蛋白质应该是结合在多糖链上的结合蛋白。另外，UV 分析也显示上述大孔吸附树脂法和酶法与 Sevag 试剂联用已基本除去样品中的色素和蛋白质等杂质。

2.4 单糖组成分析

多糖的单糖组分分析采用 PMP 衍生 HPLC-DAD 色谱法。由图 3 可知，在所选色谱条件下，衍生后的单糖可达到基线分离，且峰形良好。由图 3 所知，WBS020EPS1-2 主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成，其摩尔比为 0.43:0.13:10.00:1.92:0.11。此外，由图 3 所示，在出峰时间为

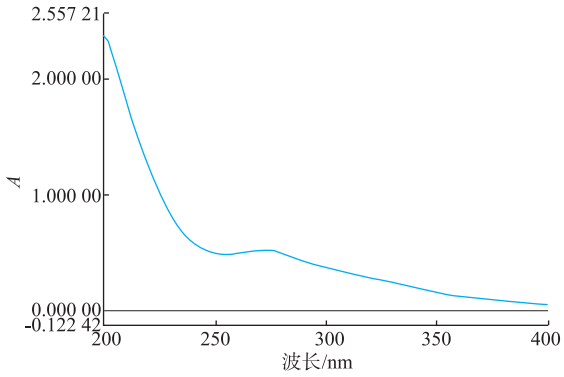
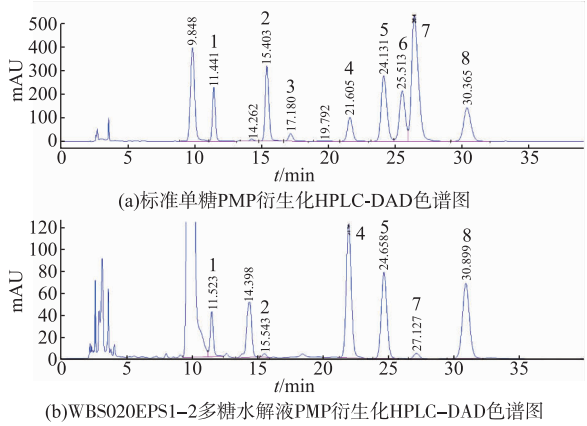


图 2 WBS020EPS1-2 多糖馏分 UV 扫描图(200~400 nm)

Fig. 2 UV spectra (200-400 nm) of polysaccharides WBS020EPS1-2

14.398 min 处,有一个面积较大峰,但是由于未有标准品与之对应,所以暂时无法判断其成分种类,这也表明内生真菌多糖的单糖组分较为丰富,将更有利于产生出结构复杂的多糖产物。在 WBS020EPS1-2 中,葡萄糖为其主要单糖组分。由培养基中添加的单糖成分为葡萄糖推测菌株 WBS020 能够直接利用培养基中的葡萄糖来合成以葡萄糖为主的糖链。同时,半乳糖相对含量也相对较高,这也表明 WBS020EPS1-2 在主链或侧链中含有部分半乳糖的杂多糖。



(a)标准单糖PMP衍生化HPLC-DAD色谱图

(b)WBS020EPS1-2多糖水解液PMP衍生化HPLC-DAD色谱图

1. 甘露糖,2. 鼠李糖,3. 半乳糖醛酸,4. 葡萄糖,5. 半乳糖,6. 木糖,7. 阿拉伯糖,8. 岩藻糖(内标)。

图 3 单糖 PMP 衍生化 HPLC-DAD 色谱图

Fig. 3 HPLC-DAD chromatography of monosaccharide standards after PMP derivatization

2.5 红外光谱分析

多糖 WBS020EPS1-2 的 FT-IR 光谱图如图 4 所示。在 3 400 cm^{-1} 处的强吸收为羟基的伸缩振动吸收峰。在 2 940 cm^{-1} 处为 C-H 的伸缩振动吸收峰,1 420 cm^{-1} 出现的峰为 C-H 的变角振动,它和 C-H 键的伸缩振动构成了糖类的特征吸收峰。在 1 750~1 700 cm^{-1} 区间内无吸收峰,表明 WBS020EPS1-2 多糖样品中不含有糖醛酸成分[23],进一步证实其为中性多糖。1 635 cm^{-1} 处可能为 C=O 的不对称伸缩振动导致的吸收峰,而之前试验的研究结果已经表明 WBS020EPS1-2 多糖为中性多糖,且 UV 分析中 280 nm 处的微弱吸收峰,表明可能存在酰胺羧基,此处信号峰可能是样品中存在着少量的与多糖结合的蛋白质引起,但需进一步验证。1 300~1 250 cm^{-1} 和 1 240 cm^{-1} 处无明显吸收峰,表明样品中无磷酸基和磺酸基取代。1 149、1 075 cm^{-1} 和 1 045 cm^{-1} 处的吸收峰归为糖苷键 C-O-C 或 C-O-H 中的 C-O 的伸缩振动[24],此 3 个吸收峰表明吡喃糖苷的存在。939 cm^{-1} 左右的吸收峰为 α-构型葡聚糖的特征吸收峰[25];871 cm^{-1} 处的吸收峰表示存在甘露糖,结合 939 cm^{-1} 左右的吸收峰,可以判断存在甘葡聚糖[26]。可见多糖 WBS020EPS1-2 主要为 α-构型葡萄吡喃糖和甘露吡喃糖组成的中性多糖,并且可能含有少量的结合蛋白。这与多糖的单糖组分分析和紫外扫描分析结果基本一致。但是作为摩尔分数次高的半乳糖在糖链中的构型,以及单糖的链接方式等还需要借助其它方法进一步分析。

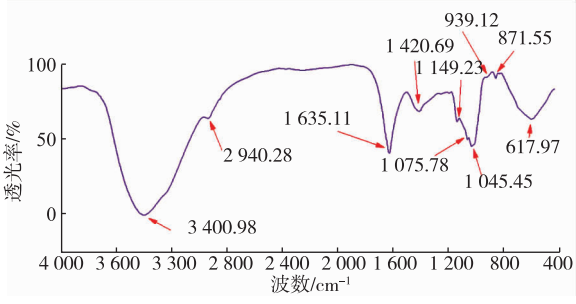


图 4 多糖组分 WBS020EPS1-2 的傅里叶变化红外光谱图

Fig. 4 FT-IR spectra of polysaccharide WBS020EPS1-2

2.6 抗氧化活性分析

2.6.1 DPPH 自由基清除活性 DPPH 是一种稳定自由基组成的深蓝色结晶粉末,通常用于天然产物对自由基清除活性的评价。如图 5 所示,分离自瓦布贝母内生真菌的多糖WBS020EPS1-2 表现出较弱的 DPPH 自由基清除活性,其 IC_{50} 值远低于所测

样品的最大质量浓度 8.00 mg/mL,而且其量效关系也不明显。可见多糖成分 WBS020EPS1-2 不适合清除DPPH 自由基。

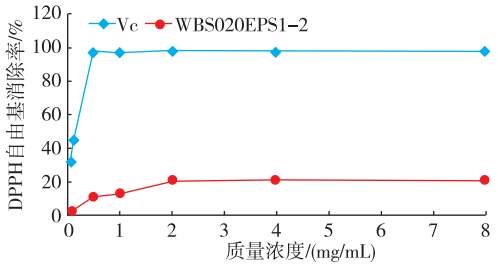


图 5　瓦布贝母内生真菌 WBS020EPS1-2 多糖DPPH 自由基清除活性

Fig. 5　DPPH free radical scavenging activities of the polysaccharide WBS020EPS1 -2 of endophytic fungus from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*

2.6.2　ABTS 自由基清除活性　ABTS 自由基清除试验通常用于评价化合物总抗氧化活性[27]。如图 6 所示，来源于瓦布贝母内生真菌的多糖 WBS020EPS1-2 表现出良好的抗氧化活性，其 IC_{50} 为 1.93 mg/mL,在所测最大质量浓度 8.00 mg/mL 时清除率达到 (89.83±3.59)%。在所测样品质量浓度范围内随着质量浓度增加，其 ABTS 自由基清除活性也随之增强，其拟合线性公式为 Y=6.948 4X+36.609,R^2=0.962 9，可见 ABTS 自由基清除活性与样品质量浓度之间有良好的量效关系。虽然与阳性对照 VC 溶液相比,所得多糖活性仍然相对较低,但是多糖是大分子物质,在相同质量条件下多糖的活性中心远少于 VC 小分子，因此以其摩尔浓度相比而言,多糖表现出较强的 ABTS 自由基清除活性。

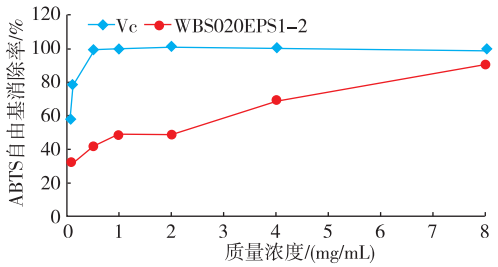


图 6　瓦布贝母内生真菌 WBS020EPS1-2 多糖 ABTS 自由基清除活性

Fig. 6　ABTS free radical scavenging activities of the polysaccharide WBS020EPS1 -2 of endophytic fungus from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*

2.6.3　亚铁离子螯合分析　亚铁离子(Fe^{2+})具有很强的助氧化活性，在溶液中会发生 Fenton 反应($Fe^{2+}+H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}+\cdot OH+OH\cdot$),并通过破坏氢键和脂质过氧化酶加速细胞损伤[28],可通过亚铁离子螯合作用,降低亚铁离子浓度,从而避免或者减小其氧化活性。1,10-邻二氮杂菲会结合亚铁离子形成稳定的有颜色的复合物，并且在 510 nm 处有最强的吸收峰[29]。如果样品具有螯合亚铁离子的活性,当样品加入后,亚铁离子浓度将降低,通过测定与 1,10-邻二氮杂菲反应后颜色变化,就可测定溶液中螯合除去的亚铁离子的浓度。由图 7 所示，多糖 WBS020EPS1-2 表现出较强的亚铁离子螯合活性,在所测最大质量浓度 8.00 mg/mL 时螯合率达到 (74.34±1.23)%,其 IC_{50} 为 4.52 mg/mL。并且在所测样品质量浓度范围内随着质量浓度增加,亚铁离子螯合能力也增强。其拟合线性公式为 Y=7.706X+15.135,R^2=0.977 4,可见其样品质量浓度和亚铁离子螯合率之间有良好的量效关系。

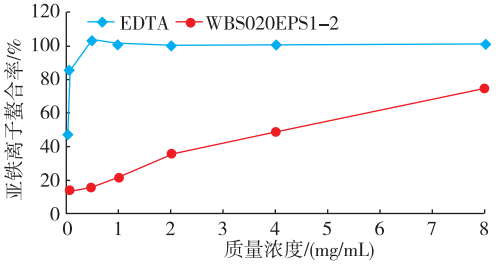


图 7　瓦布贝母内生真菌 WBS020EPS1-2 多糖亚铁离子螯合能力

Fig. 7　Ferrous ions chelating activities of the polysaccharide WBS020EPS1 -2 of endophytic fungus *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*

3 结　语

本试验中对一株分离自珍稀药用植物瓦布贝母的内生真菌 *F. tricinctum* WBS020 胞外多糖进行了研究,通过醇沉,除杂和分离最终得到了多糖成分 WBS020EPS1-2。研究表明,WBS020EPS1-2 平均相对分子质量约为 3.137×10^4,为含有少量结合蛋白的中性多糖,其主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成，其中以葡萄糖摩尔分数最高,其次是半乳糖。而抗氧化活性研究表明,多糖 WBS020EPS1-2 对 ABTS 阳离子自由基具有良好的清除能力,对亚铁离子也有较强的螯合能力。本研

究是首次对瓦布贝母内生真菌 WBS020 的多糖的研究,这对其他药用植物内生真菌的开发利用具有一定的参考价值,同时也对 WBS020 多糖成分的开发利用鉴定了基础。

参考文献:

[1] WU Mingxia,ZHAO Wenjing. Two-stage temperature controlling strategy for improving the yield of expolysaccharide[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(5):542-546.(in Chinese)

[2] HU D J,CHEONG K L,ZHAO J,et al. Chromatography in characterization of polysaccharides from medicinal plants and fungi[J]. **Journal of Separation Science**,2013,36(1):1-19.

[3] SHENG Jie,LIU Yujun,ZHANG Jue. Sulfated modification of extracellular polysaccharide from submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(6):666-671.(in Chinese)

[4] KAUL S,GUPTA S,AHMED M,et al. Endophytic fungi from medicinal plants:a treasure hunt for bioactive metabolites[J]. **Phytochemistry Reviews**,2012,11(4):487-505.

[5] CHEN Y,MAO W,TAO H,et al. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16[J]. **Bioresource Technology**,2011,102(17):8179-8184.

[6] LI P,MOU Y,SHAN T,et al. Effects of polysaccharide elicitors from endophytic *Fusarium oxysporium* Dzf17 on growth and diosgenin production in cell suspension culture of *Dioscorea zingiberensis*[J]. **Molecules**,2011,16(11):9003-9016.

[7] MAHAPARA S,BANERJEE D. Production and structural elucidation of exopolysaccharide from endophytic *Pestalotiopsis* sp. BC55[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2016,82:182-191.

[8] LIU Zhendong,WANG Shu,CHEN Xinqi. A taxonomic note of *Fritillaria wabuensis*(Liliaceae)[J]. **Acta Botanica Yunnanica**,2009,31(2):145.(in Chinese)

[9] PAN Feng,HOU Kai,DONG Pinli,et al. Simultaneous determination on three alkaloids in bulbs of *Fritillaria unibracteata* var. *wabensis* by HPLC-ELSD[J]. **Journal of Nuclear Agricultural Sciences**,2014,28(10):1854-1859.(in Chinese)

[10] PAN F,HOU K,GAO F,et al. Peimisine and peiminine production by endophytic fungus *Fusarium* sp. isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabensis*[J]. **Phytomedicine**,2014,21(8):1104-1109.

[11] PAN F,SU X,HU B,et al. Fusarium redolens 6WBY3,an endophytic fungus isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*,produces peimisine and imperialine-3β-d-glucoside[J]. **Fitoterapia**,2015,103:213-221.

[12] LIU J,LUO J,SUN Y,et al. A simple method for the simultaneous decoloration and deproteinization of crude levan extract from *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 by macroporous resin[J]. **Bioresource Technology**,2010,101(15):6077-6083.

[13] YANG R,MENG D,SONG Y,et al. Simultaneous decoloration and deproteinization of crude polysaccharide from pumpkin residues by cross-linked polystyrene macroporous resin[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2012,60(34):8450-8456.

[14] ZHA X,XIAO J,ZHANG H,et al. Polysaccharides in *Laminaria japonica* (LP):extraction,physicochemical properties and their hypolipidemic activities in diet-induced mouse model of atherosclerosis[J]. **Food Chemistry**,2012,134(1):244-252.

[15] LIU L,LU Y,LI X,et al. A novel process for isolation and purification of the bioactive polysaccharide TLH-3′ from *Tricholoma lobayense*[J]. **Process Biochemistry**,2015,50(7):1146-1151.

[16] LV Y,YANG X,ZHAO Y,et al. Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection[J]. **Food Chemistry**,2009,112(3):742-746.

[17] CHEN R,LIU Z,ZHAO J,et al. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*[J]. **Food Chemistry**,2011,127(2):434-440.

[18] JEONG J B,PARK J H,LEE H K,et al. Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect[J]. **Food and Chemical Toxicology**,2009,47(3):525-529.

[19] TAO Y,WANG P,WANG Y,et al. Power ultrasound as a pretreatment to convective drying of mulberry(*Morus alba* L.) leaves:Impact on drying kinetics and selected quality properties[J]. **Ultrasonics Sonochemistry**,2016,31:310-318.

[20] BAYLIAK M M,LYLYK M P,VYTVYTSKA O M,et al. Assessment of antioxidant properties of alpha-keto acids *in vitro* and *in vivo*[J]. **European Food Research and Technology**,2016,242(2):179-188.

[21] ZHAO M,HU J,ZHANG L,et al. Study of amphotericin B magnetic liposomes for brain targeting[J]. **International Journal of Pharmaceutics**,2014,475(1):9-16.

[22] WANG C C,CHANG S C,INBARAJ B S,et al. Isolation of carotenoids,flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity[J]. **Food Chemistry**,2010,120(1):184-192.

[23] ZHENG Y,ZHANG Q,LIU X,et al. Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on *Magnolia kwangsiensis* figlar & noot[J]. **Carbohydrate Polymers**,2016.

[24] CAI W,XIE L,CHEN Y,et al. Purification,characterization and anticoagulant activity of the polysaccharides from green tea[J]. **Carbohydrate Polymers**,2013,92(2):1086-1090.

[25] ZHOU Jiguo,LIU Gang,LIU Jianhong,et al. Fourier transform infrared spectroscopic study of *Coprinus Comatus*[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**,2008,28(2):321-323.(in Chinese)

[26] CHEN Z,HU T Q,JANG H F,et al. Modification of xylan in alkaline treated bleached hardwood kraft pulps as classified by attenuated total-internal-reflection(ATR) FTIR spectroscopy[J]. **Carbohydrate Polymers**,2015,127:418-426.

[27] NITHIYANANTHAM S,SIDDHURAJU P,FRANCIS G. A promising approach to enhance the total phenolic content and antioxidant activity of raw and processed *Jatropha curcas* L. kernel meal extracts[J]. **Industrial Crops and Products**,2013,43:261-269.

[28] ZHANG C,YU Y,LIANG Y,et al. Purification,partial characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Glycyrrhiza uralensis*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2015,79:681-686.

[29] CHEN X,WANG S,LU M,et al. Formation and characterization of light-responsive TEMPO-oxidized *Konjac glucomannan* microspheres[J]. **Biomacromolecules**,2014,15(6):2166-2171.

科　技　信　息

加拿大批准在部分食品中使用 L-赖氨酸盐酸盐抑制丙烯酰胺的形成

2019 年 5 月 13 日,加拿大卫生部发布 NOP/ADP-0032 号文件,修订《允许的食品添加剂列表》,批准在面团制成的加工小吃食品中使用 L-赖氨酸盐酸盐(L-lysine monohydrochloride)抑制丙烯酰胺的形成。

据了解,加工小吃食品的主要成分是土豆干或小麦粉。按赖氨酸计算,要求的最大用量为 0.8%。该规定自发布之日起生效。

[信息来源]食品伙伴网. 加拿大批准在部分食品中使用 L-赖氨酸盐酸盐抑制丙烯酰胺的形成 [EB/OL]. (2019-5-17). http://news.foodmate.net/2019/05/518732.html