

杨树桑黄胞外多糖的分子结构及抗氧化活性

何培新¹, 吴双双¹, 郑凯², 许春平^{*1}

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450002;2. 河南中烟工业有限责任公司许昌卷烟厂,河南 许昌 461000)

摘要:对杨树桑黄胞外多糖(EPS)的相对分子质量、结构及抗氧化活性进行了研究。利用凝胶过滤法分离纯化 EPS 并测定多糖的相对分子质量,红外分析 EPS 结构的异头碳类型,GC/MS 分析 EPS 的单糖组分,SEC/MALLS 结合粘度法分析 EPS 的分子构象,利用·OH 自由基和·DPPH 自由基的清除率测定 EPS 的抗氧化活性。结果表明:杨树桑黄 EPS 分离纯化得到两个组分(Fr-I 和 Fr-II),其相对分子质量分别为 627 500 和 55 000;红外分析可知,Fr-I 为含有 α -和 β -构型共存的吡喃型甘露糖苷酸性杂多糖,Fr-II 为含有 α -吡喃型甘露糖苷酸性杂多糖;气质分析结果表明,Fr-I 和 Fr-II 所含单糖组分为核糖、木糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖醛酸;SEC/MALLS 结果表明,EPS 分散性很低,在水溶液中以球形构象存在,是一种高度紧密且具有分支结构的多糖聚集体。抗氧化测定表明,EPS 质量浓度为 10 mg/mL 时,对·OH 自由基的清除率为 38.58%;质量浓度为 5 mg/mL 时,对·DPPH 自由基的清除率高达 59.17%,表现出良好的抗氧化活性。

关键词: 杨树桑黄;胞外多糖;结构;抗氧化

中图分类号: Q 71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)09—0939—09

Molecular Structure and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Phellinus vaninii* Ljup

HE Peixin¹, WU Shuangshuang¹, ZHENG Kai², XU Chunping^{*1}

(1. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China; 2. Xuchang Cigarette Factory, China Tobacco Henan Industry Co. Ltd, Xuchang 461000, China)

Abstract: The molecular weight, structure and antioxidant activity of extracellular polysaccharide (EPS) from *Phellinus vaninii* Ljup was investigated in this study. The EPS was isolated and purified, and the molecular weight of EPS was determined by gel filtration. The type of anomeric carbon in the EPS structure was investigated by FT-IR, the carbohydrate composition of the EPS was determined by GC/MS, the molecular conformation of EPS was analyzed by SEC/MALLS binding viscosity method, the antioxidant activity of EPS was determined according to OH and DPPH radical

收稿日期: 2015-08-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1604176, B080704)。

作者简介: 何培新(1970—),男,河南民权人,理学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物工程方面的研究。

E-mail: hepeixin@zzuli.edu.cn

* 通信作者: 许春平(1977—)男,河南焦作人,工学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物化工和烟草工程方面的研究。

E-mail: xuchunping05@163.com

引用本文: 何培新,吴双双,郑凯,等. 杨树桑黄胞外多糖的分子结构及抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(09):939-947.

scavenging activity. The results showed that two EPS fractions (Fr-I and Fr-II) were obtained after separation and purification, and the relative molecular weight of Fr-I and Fr-II were 627 500 and 55 000 respectively. FTIR results showed that the Fr-I was coexistence of α - and β -configuration of mannopyranoside acidic polysaccharides, while Fr-II α -mannopyranoside acidic polysaccharides. GC/MS results showed that the monosaccharide components of Fr-I and Fr-II contained ribose, xylose, glucuronic acid, galactose, glucose, mannose and galactose; SEC/MALLS results showed that the dispersion of the EPS is very low, and the EPS kept spherical conformation in aqueous solution. The EPS is a highly compact aggregates with branch. The antioxidant activity tests showed that the $\cdot\text{OH}$ scavenging rate was 38.58% when EPS concentration was 10 mg/mL, and the $\cdot\text{DPPH}$ scavenging rate was 59.17%, which when the EPS concentration was 5 mg/mL, which suggested EPS had good antioxidant activity.

Keywords: *Phellinus vaninii* Ljup, exo-polysaccharide, structure, antioxidant activity

杨树桑黄, 即瓦尼木层孔菌 (*Phellinus vaninii* Ljub), 是一种生长在杨树上的药用真菌, 俗称为杨黄, 属担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、锈革孔菌科 (Hymenochaetaceae), 木(针)层孔菌属 (*Phellinus*)^[1], 是近年来被广泛关注的桑黄“新秀”。桑黄是国际公认的生物治癌领域中效率最高的大型真菌^[2], 有报道杨黄具有与传统桑黄同样的抑制肿瘤的功效^[3-4], 我国传统中药中用于治疗痢疾、盗汗、血崩等^[5]。近几年, 对瓦尼木层孔菌的驯化栽培已经获得成功^[6-8], 但是关于瓦尼木层孔菌活性物质多糖结构和生物活性相关的报道很少。

作者对发酵罐制得的杨树桑黄 EPS 进行分离纯化、结构表征和抗氧化的测定, 为进一步研究杨树桑黄 EPS 的构效关系及其在医药行业的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 杨树桑黄来源于郑州轻工业学院发酵工程研究室, 于斜面培养基上 4 °C 保存。

1.1.2 发酵罐种子液的制备 用打孔器取平板边缘新生菌丝两块, 接种到含有 50 mL 种子液的 250 mL 锥形瓶中, 于 160 r/min、26 °C 的摇床中培养 4 d。然后向种子液中加入适量灭菌磁珠和玻璃珠, 用磁力搅拌器将菌丝球打碎后备用。本研究所有接种体积分数均为 4%。

1.1.3 发酵培养条件 采用摇瓶优化的发酵培养基: 40 g/L 蔗糖, 4 g/L 玉米粉, 4 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7, 发酵培养温度 28 °C, 搅拌速度 160 r/min, 进气量

2 vvm。

1.1.4 透析袋 采用截留相对分子质量 3 500, 直径 22 mm, 压平宽度 34 mm (上海索莱宝生物科技有限公司) 的透析袋。

1.1.5 主要仪器 SW-CJ-2F 超净工作台: 苏净安泰空气技术有限公司; 5L 搅拌式发酵罐: 上海百伦科技有限公司; CXG-1 恒温层析柜 (含 DLH-A 恒流泵, DBS-100 全自动收集器): 上海青浦沪西仪器公司; UV-17001C 紫外分光光度计: 上海凤凰光学仪器有限公司; Sepharose CL-6B 层析柱: 上海索莱宝生物技术公司; 日本 EYELA 全自动旋转蒸发仪 N-2100: 东京理化器械株式会社; Nicolet 5700 傅立叶变换红外光谱仪: 美国尼高力仪器公司; 尺寸排阻色谱-多角度激光光散射 (SEC-MALLS): 美国怀亚特技术公司。

1.1.6 主要化学试剂 蔗糖、苯酚、浓硫酸、氯仿、正丁醇、无水乙醇、 KH_2PO_4 、 NaNO_3 、 NaN_3 、KBr、吡啶、甲醇: 均为分析纯, 购自天津市科密欧化学试剂有限公司; 玉米粉: 购自莲花市场; 蓝色葡聚糖 2000、标准葡聚糖 (Dextran T10、T40、T70、T150): 购自上海玉博生物科技有限公司; Sepharose CL-6B: 购自 Solarbio 公司; 三氟乙酸 (色谱纯): 购自阿拉丁; 三甲基氯硅烷 (BSTFA:TMCS, 99:1) (色谱纯): 东京化成工业株式会社。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵液中多糖的提取 利用抽滤法^[9]分离菌丝体和发酵液, 将所得发酵液旋蒸浓缩至 100 mL 左右, 加入 4 倍体积无水乙醇, 4 °C 静置过夜, 然后 10 000 r/min 离心 15 min, 得到多糖沉淀。

1.2.2 sevag 法脱蛋白 用适量蒸馏水使所得多糖沉淀完全溶解,加入约 1/3 多糖溶液的脱蛋白液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=5:1$),置于磁力搅拌器上 30 min,然后于分液漏斗中静置 20 min,除去下层的有机相,保留水相,重复操作 4~5 次,直至有机相与水相间无明显沉淀为止。将所有水相浓缩至 100 mL 左右,加入 4 倍体积无水乙醇,4 ℃静置过夜,然后 10 000 r/min 离心 15 min,得到粗多糖沉淀。粗多糖沉淀冷冻干燥即得胞外粗多糖^[10]。

1.2.3 胞外粗多糖的分离纯化 称量 20 mg 粗多糖,溶解于 2 mL、0.2 mol/L 的 NaCl 溶液中,用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤后通过 Sepharose CL-6B 柱层析。调整恒流泵使洗脱液流速为 1.15 mL/min,利用自动收集器收集。从每管取 1 mL 收集液,用苯酚硫酸法^[11]于 490 nm 处检测多糖,于 280 nm 处直接检测收集液的蛋白质,记录吸光度值。然后以收集管数为横坐标,多糖和蛋白质的吸光度值为纵坐标,绘制粗多糖的分离纯化图。重复过层析柱 8~10 次,将同一组分的多糖收集在一起,浓缩后用截留相对分子质量为 3 500 的透析袋透析 3 d,每天换蒸馏水 3 次。最后将透析过的精制胞外多糖冷冻干燥,置于干燥器中备用。

1.2.4 凝胶过滤法测胞外多糖的相对分子质量 用 0.2 mol/L NaCl 溶液平衡 Sepharose CL-6B 层析柱 24 h 后,先用蓝色葡聚糖 2000 加入柱内测得外水体积 V_0 ,然后取 2 mL 质量浓度为 2 mg/mL 的相对分子质量不同的标准葡聚糖 (Dextran T10、T40、T70、T150) 分别相继上样,调整恒流泵使洗脱液流速为 1.15 mL/min,利用自动收集器收集。用苯酚硫酸法检测吸光度值,合并洗脱液,分别求得洗脱体积 V_e 。凝胶柱所能容纳的总体积定为 V_t ,其计算方法见公式(1)。以各标准多糖的分配系数 K_{aw} 值为横坐标,相对分子质量的对数值为纵坐标做标准曲线。 K_{aw} 值的计算公式见式(2)。

$$V_t = \pi(D/2)^2 h \quad (1)$$

$$K_{aw} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad (2)$$

其中: D 为层析柱直径, h 为层析柱高, V_e 为洗脱体积, V_0 为外水体积, V_t 为柱床总体积。

按上述方法测得真菌胞外多糖的 V_e ,由标准曲线求得其相对分子质量^[12]。

1.2.5 精制 EPS 的红外光谱(IR)测定 称取 2~3 mg 精制 EPS,加入适量的 KBr,研磨均匀后压片,用

傅立叶变换红外光谱仪在 4 000~400 cm^{-1} 波长区间内扫描红外吸收值^[13]。

1.2.6 精制 EPS 的气相色谱/质谱 (GC/MS) 测定 称取精制 EPS 3 mg,放入棕色小瓶中,加入 3 mL、2 mol/L 的三氟乙酸,密封后置于 121 ℃的烘箱中恒温 2 h。冷却后过 0.22 μm 的水相滤膜,将所得滤液旋蒸干后,加入 3 mL 甲醇再次旋蒸干,重复操作 3 次。最后加入 1.5 mL 吡啶和 0.1 mL 衍生试剂 BSTFA:TMCA(99:1),密封后置于 80 ℃的烘箱中恒温 1 h,冷却后过 0.22 μm 的有机滤膜,送样检测^[14]。

上样条件:色谱柱型号为 HP-5 MS 60 m,分流比 100:1,进样量 0.1 μL,延迟时间 7 min,进样口 280,传输线 280。升温程序:起始温度为 60 ℃,保持 2 min,然后以 5 ℃/min 的速度升温至 280 ℃,保持 20 min。MS 分析条件:溶剂延迟 7 min,扫描范围 35~455 aum,进样口 280 ℃,传输线温度 280 ℃,EI 能量 70 eV,离子源温度 230 ℃,四级杆温度 160 ℃。

1.2.7 SEC/MALLS 测定精制 EPS 的绝对分子质量及分子构象 研究表明,将尺寸排阻色谱(SEC)、多角度激光光散射检测仪(MALLS)和示差折光检测仪(RI)联用,可以测定多糖的绝对分子质量及分子构象^[15]。

用 50 mmol/L NaNO_3 和 0.02% NaN_3 溶解精制 EPS 样品,配制成 2 mg/mL 的样品溶液,用 0.22 μm 的水相膜过滤后备用。流速设定为 0.5 mL/min,进样量为 100 μL, dn/dc 值根据相关研究设为 0.14 mL/g^[16]。多糖的相对分子质量和均方根旋转半径由软件 Astra 4.72(美国怀亚特公司)计算得出。由均方根旋转半径对相对分子质量的双对数曲线,可判断多糖分子在水溶液中的构象。具体条件由以下公式给出:

$$\text{球形: } r_i^3 \propto M_i \rightarrow \lg r_i = k + 1/3 \lg M_i$$

$$\text{无规则卷曲: } r_i^3 \propto M_i \rightarrow \lg r_i = k + 1/2 \lg M_i$$

$$\text{刚性杆状: } r_i^3 \propto M_i \rightarrow \lg r_i = k + \lg M_i$$

其中, r_i 为多糖的均方根旋转半径; M_i 为多糖的相对分子质量; k 为均方根半径的截距;1/3、1/2 和 1 为多糖不同构象的临界值。

1.2.8 精制 EPS 的粘度测定^[17] EPS 的粘度用乌氏粘度计在(25±0.1) ℃的水浴中进行测定。为了忽略动能的校正,需要选择溶剂流出毛细管时间大于 120 s 的粘度计。采用逐步稀释法按照 Huggins 方程(3)和 Kraemer 方程(4),将浓度外推至零计算 $[\eta]$:

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + k'[\eta]^2 c \quad (3)$$

$$\ln \eta_r/c = [\eta] - \beta[\eta]^2 c \quad (4)$$

其中, η_{sp}/c 为比浓粘度; $\ln \eta_r/c$ 为比浓对数粘度; k' 和 β 为多糖在恒定温度下溶剂中的常数。

1.2.9 精制 EPS 均方根旋转半径 (R_g) 和流体力学半径 (R_h) 的测定^[18] 分子质量中心到各质点 (基团) 距离平方的平均值的平方根被定义为均方根旋转半径 (R_g), 它反映单个高分子分子链在空间的伸展程度。流体力学半径 (R_h) 反映流体力学作用时大分子在溶液中的尺寸, 它是一个与高聚物链有相同平移扩散系数的等效球体的半径^[19]。 R_g 通过 SEC-MALLS 法测得, 而 R_h 通过粘度法获得, 根据 Einstein 理论公式 (5) R_h 推算得:

$$R_h = (3M_w[\eta]/10N_A\pi)^{1/3} \quad (5)$$

其中, N_A 为阿伏伽德罗常数 (6.022×10^{23}); M_w 和 $[\eta]$ 分别为重均相对分子质量和特性粘度。

均方旋转半径和流体力学半径的比值可以用 ρ 表示:

$$\rho = R_g/R_h \quad (6)$$

1.2.10 邻二氮菲法测定 EPS 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力

配置质量浓度梯度分别为 2、4、6、8、10 mg/mL 的 EPS 溶液 10 mL。取 7 支试管, 其中 5 支为实验组, 1 支作为对照组, 1 支为调零组。向实验组中加入 1 mL pH 7.4 磷酸缓冲液 (0.02 mmol/L, PBS), 1 mL 7.5 mmol/L 邻二氮菲溶液, 1 mL 3.25 mmol/L FeSO_4 溶液, 1 mL 1.5% H_2O_2 , 2 mL 多糖溶液^[21]。其中调零组以蒸馏水替代 2 mL 多糖溶液, 对照组以蒸馏水替代 2 mL 多糖溶液和 1 mL 1.5% H_2O_2 。混匀后, 37 °C 水浴 1 h。调零组调零后, 用紫外分光光度计于 510 nm 处测定实验组和对照组的吸光度值。每组做 3 次平行, 取其平均值。EPS 对 $\cdot\text{OH}$ 清除率的计算公式如下:

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率} = A_i/A_j \times 100\%$$

其中, A_i 为实验组的吸光度值; A_j 为对照组的吸光度值。

1.2.11 EPS 对 $\cdot\text{DPPH}$ 清除能力的测定 配置质量浓度梯度为 1、2、3、4、5 mg/mL 的 EPS 溶液 20 mL。取 11 支试管, 5 支为实验组, 5 支为对照组, 1 支为空白组。向实验组分别加入 2 mL EPS 溶液、2 mL 0.1 g/L 的 DPPH 50% 乙醇溶液, 混匀后 25 °C 水浴 1 h, 以 50% 乙醇溶液为空白, 于 517 nm 处测定其吸光度 B_i ; 向空白组分别加入 2 mL 0.1 g/L 的 DPPH

50% 乙醇溶液、2 mL 蒸馏水, 混匀后 25 °C 水浴 1 h, 测定其吸光度 B_0 ^[22]; 向对照组分别加入 2 mL EPS 溶液、2 mL 50% 乙醇, 混匀后 25 °C 水浴 1 h, 测定其吸光度 B_j 。EPS 对 $\cdot\text{DPPH}$ 清除率的计算公式如下:

$$\cdot\text{DPPH} \text{ 清除率} = 1 - (B_i - B_j)/B_0$$

其中, B_i 为实验组的吸光度值; B_j 为对照组的吸光度值; B_0 为空白组的吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 杨树桑黄 EPS 的分离纯化

发酵罐发酵杨树桑黄所产 EPS 经除蛋白质后, 通过 Sepharose CL-6B 柱层析进行分离纯化, 结果见图 1。通过分析可知, 杨树桑黄粗多糖纯化时有两个多糖吸收峰, 即两个组分 (Fr-I 和 Fr-II)。Fr-I 为 12~28 管, Fr-II 为 29~40 管, 对这两个组分的管数分别进行收集, 透析袋透析, 然后冷冻干燥, 即得精制多糖。而且可以看出, 蛋白质吸收峰在两个多糖吸收峰中都有, 说明其精制多糖的两个组分均可能含有糖蛋白。

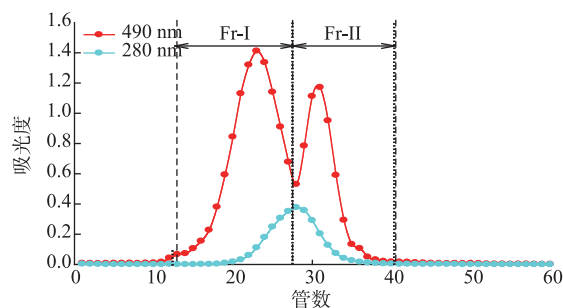


图 1 杨树桑黄产 EPS 分离纯化结果

Fig. 1 Separation and purification of EPS from *P. vaninii* Ljup

2.2 杨树桑黄 EPS 的相对分子质量

以 K_{aw} 值为横坐标, 葡聚糖标准品系列的 $\lg M$ 值为纵坐标, 绘得相对分子质量标准曲线, 回归方程为 $y = -5.4858x + 6.5379$, 相关性系数为 $R^2 = 0.9993$ 。由标准曲线推算杨树桑黄 EPS 精制组分的相对分子质量, 结果见图 2。实验测得杨树桑黄 EPS Fr-I 和 Fr-II 的 V_e 分别为 115、155 mL, 根据标准曲线推算得杨树桑黄 EPS Fr-I 和 Fr-II 的相对分子质量分别为 627 500 和 55 000。

2.3 杨树桑黄 EPS 的红外分析

杨树桑黄 EPS Fr-I 和 Fr-II 的红外光谱见图 3。杨树桑黄 EPS Fr-I 在 3289.3 cm^{-1} 有宽展圆滑强

吸收峰,为 O-H 伸缩振动,说明其以分子间氢键为主;2 927.4 cm^{-1} 处有较强吸收峰,是由多糖中甲基- CH_3 或次甲基- CH_2 的 C-H 的伸缩振动引起的,具有典型的多糖特征;在 1 736.5 cm^{-1} 处有吸收峰,说明有酯基或 O-乙酰基的存在;在 1 642.9 cm^{-1} 处出现红外吸收峰,是 N-H 的变角振动,为氨基或酰胺基的结构^[23];1 554.7 cm^{-1} 处为 C=O 伸缩振动;1 382.8 cm^{-1} 处的红外吸收峰为磺酰基-O-SO₂-R 的 S=O 非对称伸缩振动;1 129.8 cm^{-1} 处有红外吸收峰,为 C-O-C 环内醚的 C-O 伸缩振动;1 025.8 cm^{-1} 处的红外吸收峰为-OH 的 O-H 变角振动;在 974.0 cm^{-1} 处出现红外吸收峰,此处为吡喃环末端次甲基的横摇振动;912.1 cm^{-1} 处的红外吸收峰为 α -吡喃糖的吸收峰;887.4 cm^{-1} 处的红外吸收峰为 β -吡喃糖的吸收峰^[24];810.5 cm^{-1} 处的红外吸收峰为甘露糖特征吸收峰^[25]。由此推测杨树桑黄 EPS Fr-I 为 α -和 β -构型共存的吡喃型甘露糖苷酸性杂多糖^[26]。其 Fr-II 图谱与 Fr-I 不同的是没有 C-O-C 环内醚的 C-O 伸缩振动,917.0 cm^{-1} 处的红外吸收峰为 α -吡喃糖的吸收峰,推断其 Fr-II 为 α -吡喃型甘露糖苷酸性杂多糖。

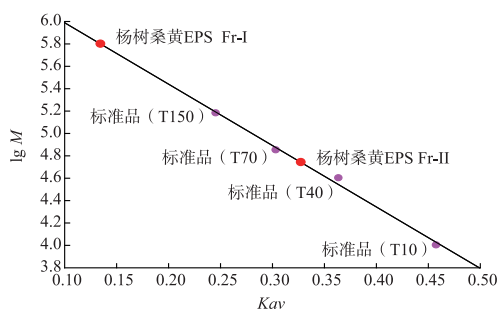


图2 杨树桑黄 EPS 精制组分的相对分子质量

Fig. 2 Relative molecular weight of refined EPS fractions from *P. vaninii* Ljup

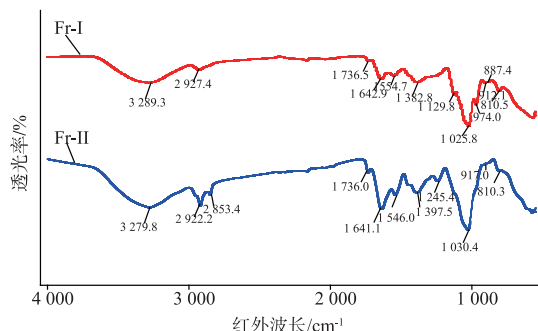


图3 杨树桑黄 EPS 精制组分的红外光谱图

Fig. 3 RT-IR spectra of refined EPS fractions from *P. vaninii* Ljup

2.4 杨树桑黄 EPS 单糖组分分析

将杨树桑黄 EPS 的各精制组分分别进行 GC/MS 检测,把各个组分的气相色谱图中每个峰的保留时间与标准单糖的保留时间进行比对。分别对杨树桑黄 EPS 精制组分的气相色谱图进行分析,结果见图 4。

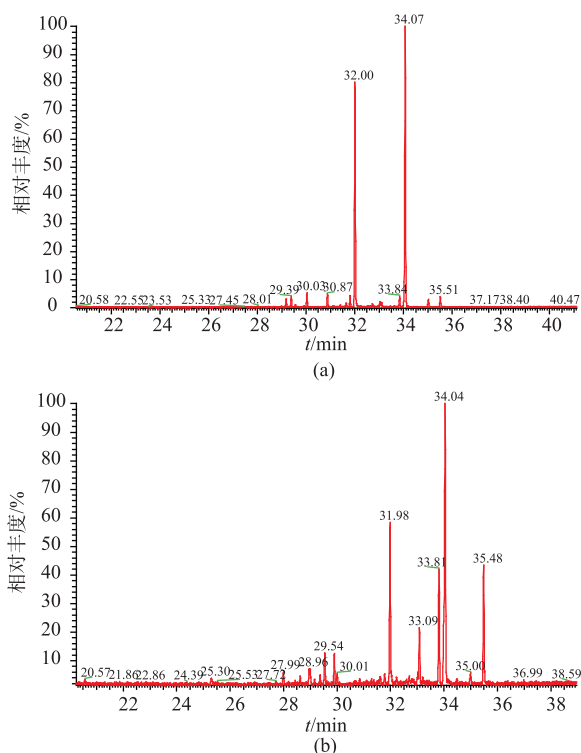


图4 杨树桑黄 EPS 精制组分气相色谱图

Fig. 4 GC of refined EPS fractions from *P. vaninii* Ljup

采用面积归一化法对杨树桑黄 EPS 单糖组分进行分析,结果见表 1。其 Fr-I 和 Fr-II 所含单糖组分和质量分数分别为:核糖 1.45%、1.92%,木糖 2.52%、3.86%,葡萄糖醛酸 40.31%、20.89%,半乳糖 1.68%、7.09%,葡萄糖 1.90%、14.79%,甘露糖 50.24%、36.15%,半乳糖醛酸 1.89%、15.32%,两个组分所含单糖组分的种类一样,质量分数有差异。杨树桑黄 EPS 各精制组分均含有葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸,说明发酵所得的 EPS 可能为酸性多糖^[26-27],与其红外光谱分析结果一致;其单糖组分中甘露糖的含量较多,与红外光谱中 810 cm^{-1} 处出现的甘露糖特征吸收峰一致。

2.5 杨树桑黄 EPS 的 SEC/MALLS 分析

采用尺寸排阻色谱(SEC)、多角度激光光散射检测器(MALLS)和示差折光检测器(RI)联用技术,

可检测杨树桑黄 EPS 精制组分的相对分子质量及其在水溶液中的分布情况,结果见表 2。

表 1 杨树桑黄 EPS 单糖组分分析

Table 1 Carbohydrate composition analysis of refined EPS fractions from *P. vaninii* Ljup

单糖组分/%	杨树桑黄 EPS Fr-I	杨树桑黄 EPS Fr-II
核糖	1.45	1.92
木糖	2.52	3.86
葡萄糖醛酸	40.31	20.89
半乳糖	1.68	7.09
葡萄糖	1.90	14.79
甘露糖	50.24	36.15
半乳糖醛酸	1.89	15.32

表 2 杨树桑黄 EPS 精制组分 SEC/MALLS 测试结果

Table 2 SEC/MALLS results of refined EPS fractions from *P. vaninii* Ljup

参数	Fr-I (error%)	Fr-II (error%)
M_n /(g/mol)	$3.087 \times 10^6 (\pm 1.586\%)$	$5.236 \times 10^4 (\pm 2.787\%)$
M_w /(g/mol)	$4.746 \times 10^6 (\pm 1.483\%)$	$2.469 \times 10^5 (\pm 1.825\%)$
M_z /(g/mol)	$6.748 \times 10^6 (\pm 3.412\%)$	$4.160 \times 10^6 (\pm 4.115\%)$
M_w/M_n	$1.537 (\pm 2.172\%)$	$4.715 (\pm 3.331\%)$
R_h /nm	$40.5 (\pm 3.6\%)$	$31.9 (\pm 9.8\%)$
R_w /nm	$46.0 (\pm 2.8\%)$	$27.8 (\pm 10.2\%)$
R_z /nm	$53.8 (\pm 2.1\%)$	$51.5 (\pm 2.8\%)$
均方根半径对相对分子质量的双对数曲线斜率	0.10	0.16

表 2 中, M_n 、 M_w 、 M_z 、 M_w/M_n 、 R_n 、 R_w 和 R_z 依次为数均相对分子质量、重均相对分子质量、平均相对分子质量、多分散系数、数学均方旋转半径、质量均方旋转半径和均方旋转半径的均值。

由表 2 数据可知, 杨树桑黄 EPS Fr-I 和 Fr-II 的重均相对分子质量分别为 4.746×10^6 和 2.469×10^5 , M_w/M_n 即多分散系数分别为 1.537 和 4.715, 表明两个组分的分散性均很低, 即在水溶液中很容易形成大量的聚集体, 溶解度很小。杨树桑黄 EPS Fr-I 和 Fr-II 的均方根半径分别为 22.0、12.8 nm, Fr-I 和 Fr-II 的均方根半径对相对分子质量的双对数曲线的斜率分别为 0.10 和 0.16, 说明其在水溶液中以球形构象存在, 是一种高度紧密而且具有分支结构的多糖聚集体。通过 SEC/MALLS 测得杨树桑黄产 EPS Fr-I 和 Fr-II 的相对分子质量均大于凝胶过滤

法测得的相对分子质量, 这可能是因为精制多糖经过透析时多糖分子发生了聚集, 溶解度降低所致。杨树桑黄产 EPS 精制组分 Fr-I(左)和 Fr-II(右)的均方根半径对相对分子质量的双对数曲线见图 5。

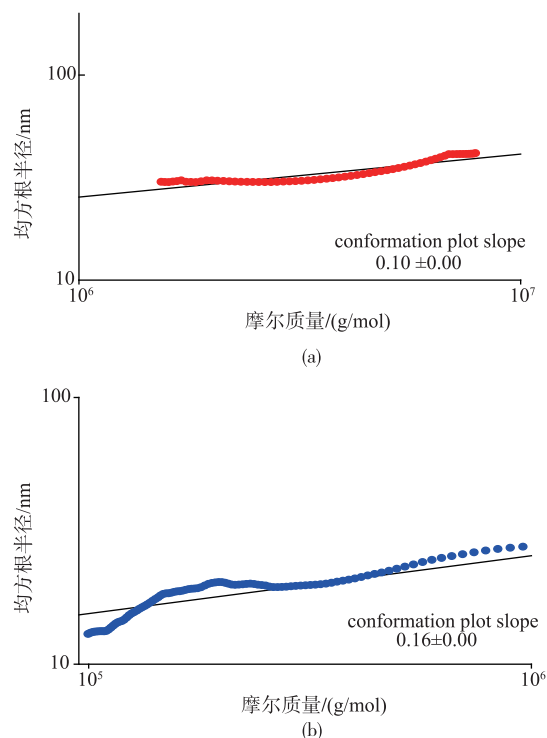


图 5 杨树桑黄 EPS 精制组分均方根半径对相对分子质量的双对数曲线

Fig. 5 Double logarithmic curve of root mean square radius vs molecular weight for refined EPS fractions from *P. vaninii* Ljup

2.6 杨树桑黄 EPS 的分子构象分析

杨树桑黄 EPS 分子构象的参数见表 3。其中 M_w 和 R_g 值通过 SEC-MALLS 法测得, 而 R_h 通过粘度法获得, 根据 Einstein 理论公式推算得。粘度由乌氏粘度计测定, 它反映了在稀溶液中多糖所占的水的体积。通常认为, 粘度越小, 多糖越具有比较致密的构象^[28]。由表 3 可知, 实验测得杨树桑黄 EPS Fr-I 的粘度值较 Fr-II 小, 说明其链未舒展开, 结构较为致密。而且相对分子质量相对较大的 EPS 精制组分测得的粘度值相对较小, 这可能是因为 EPS 发生了聚集, 在水溶液中的溶解度不高, 其构象呈高支化的多糖聚集体, 该结果与 SEC-MALLS 中均方根半径对相对分子质量的双对数曲线斜率的分析结果一致。

k' 值在 0.3~0.5 时,表明该溶液对聚合物是良溶剂。由表 3 可知,杨树桑黄 EPS 各精制组分的 k' 均大于 0.5,说明其在水溶液中的溶解性较低。 R_g 和 R_h 的比值为 ρ , ρ 值可以用来描述多糖分子在水溶液中的链构象。 $\rho \approx 0.3$ 时,为均一紧密的球形构象;

$\rho \approx 0.5$ 时,为一个松散连接的超支化链或聚合物; $\rho \approx 1$ 时,为刚性杆状链。杨树桑黄 EPS 各精制组分的 ρ 值均接近于 1,说明其 EPS 各精制组分在水溶液中可能为刚性链状的多糖聚集体。

表 3 杨树桑黄 EPS 精制组分的分子构象参数

Table 3 Molecular conformation parameters of refined EPS fractions from *P. vaninii* Ljup

杨树桑黄	$M_n \times 10^3 / (\text{g/mol})$	R_g / nm	$[\eta] / (\text{mL/g})$	k'	R_h / nm	ρ
Fr-I	47.46	46.0	169	0.59	50.3	0.91
Fr-II	2.469	27.8	603	0.58	28.7	0.97

2.7 杨树桑黄 EPS 的抗氧化活性分析

杨树桑黄 EPS 对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基的清除率见图 6。当杨树桑黄 EPS 质量浓度为 10 mg/mL 时,其对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率高达 38.58%,而当杨树桑黄 EPS 质量浓度为 5 mg/mL 时,其对 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基的清除率已高达 59.17%。其 EPS 对 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基的清除率明显高于其对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率,表现出良好的抗氧化活性。

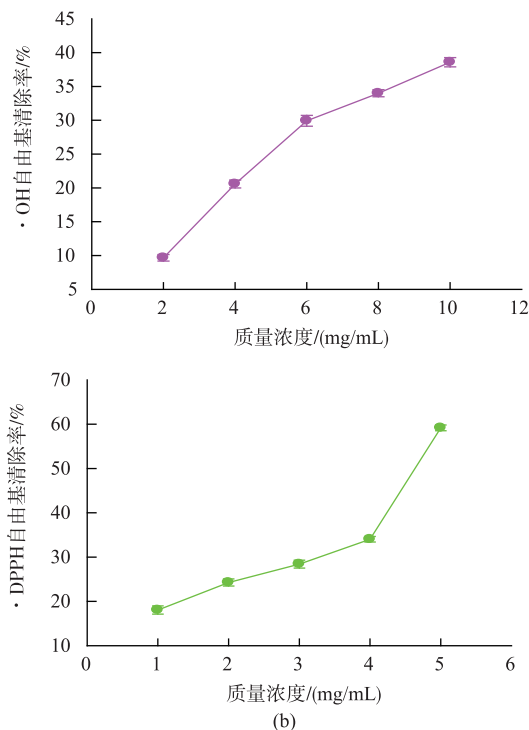


图 6 杨树桑黄 EPS 精制组分对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{DPPH}$ 自由基的清除率

Fig. 6 $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{DPPH}$ radical scavenging rate of refined EPS fractions from *P. vaninii* Ljup

3 结 语

研究表明,杨树桑黄 EPS 含有两个组分,Fr-I 和 Fr-II 的相对分子质量分别为 627 500 和 55 000。红外分析可知,其 EPS 具有明显的多糖特征吸收峰,其 Fr-I 为 α -和 β -构型共存的吡喃型甘露糖苷酸性杂多糖,其 Fr-II 为 α -吡喃型甘露糖苷酸性杂多糖。杨树桑黄 EPS Fr-I 和 Fr-II 所含单糖组分和质量分数分别为:核糖 1.45%、1.92%,木糖 2.52%、3.86%,葡萄糖醛酸 40.31%、20.89%,半乳糖 1.68%、7.09%,葡萄糖 1.90%、14.79%,甘露糖 50.24%、36.15%,半乳糖醛酸 1.89%、15.32%,两个组分所含单糖组分的种类一样,质量分数有所差异;其 Fr-I 和 Fr-II 均含有葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸,说明发酵所得 EPS 可能为酸性多糖,与其红外光谱分析结果一致;其单糖组分中甘露糖的含量较多,与红外光谱中 810 cm^{-1} 处出现的甘露糖特征吸收峰一致。SEC/MALLS 结果表明,其 EPS 分散性很低,在水溶液中很容易形成大量的聚集体,溶解度很小,且在水溶液中以球形构象存在,是一种高度紧密而且具有分支结构的多糖聚集体。杨树桑黄 EPS 的分子构象参数结果表明,相对分子质量较大的 EPS 精制组分测得的粘度值相对较小,这可能是因为 EPS 发生了聚集,在水溶液中的溶解度不高,其构象呈高支化的多糖聚集体,该结果与 SEC-MALLS 中均方根半径对相对分子质量的双对数曲线斜率的分析结果一致;杨树桑黄 EPS 的 ρ 值接近于 1,说明其 EPS 在水溶液中可能为高度分支的多糖聚集体。杨树桑黄 EPS 质量浓度为 10 mg/mL 时,对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率为 38.58%,其质量浓度为 5 mg/mL 时,

对·DPPH 自由基的清除率高达 59.17%，表现出良好的抗氧化活性。本研究结果为进一步研究杨树桑

黄 EPS 的构效关系及其在医药、保健食品行业的应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] DAI Yucheng. A new medicinal fungus- *Phellinus vaninii*[J]. **Edible Fungi of China**, 2003, 22(5): 7-8. (in Chinese)
- [2] CHEN Liumeng, XIAO Jing, LI Jing, et al. Research and development of *Phellinus igniarius* [J]. **Acta Agriculturae Jiangxi**, 2007, 19(5): 88-90. (in Chinese)
- [3] 李彦生. 瓦尼木层孔菌菌丝体培养特性及多糖提取工艺研究[D]. 延边: 延边大学, 2009.
- [4] FAN Yuguang, QIN Liwu, WU Xiuling. Medicinal fungi *Phellinus vaninii* and its artificial cultivation [J]. **Edible Fungi of China**, 2009, 28(2): 24-25. (in Chinese)
- [5] 江西新医学院. 中药大词典[M]. 上海: 科学技术出版社, 1995.
- [6] LIU Zuoxi, WANG Hangsheng, LIU Shanhong, et al. The technique of *Phellinus torielosus* planting and controlling[J]. **Edible Fungi of China**, 2005, 24(5): 28-29. (in Chinese)
- [7] HUANG Z, HUANG Y, LI X, et al. Molecular mass and chain conformations of *Rhizoma panacis Japonici* polysaccharides[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2009, 78(3): 596-601.
- [8] SEVAG M G. Mechanism of the respiration of pneumococci. II [J]. **Biochem Z**, 1934, 273: 419-429.
- [9] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. **Analytical Chemistry**, 1956, 28(3): 350-356.
- [10] CHEN Yong, LU Xu, TAN Xiaojing, et al. Isolation and molecular weight of polysaccharides from *Acanthopanax giraldii* hams[J]. **Journal of Sichuan University**, 2005, 42(2): 373-376. (in Chinese)
- [11] XIA Chaohong, DAI Qi, FANG Wei, et al. Research on the IR spectroscopy of kinds of polysaccharide [J]. **Journal of Wuhan University of Technology**, 2007, 29(1): 45-47. (in Chinese)
- [12] LIN Qinbao, JIANG Meifeng, YANG Chun. GC-MS determination of monosaccharide composition of oligosaccharides from fruits of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill var. *muzao*) [J]. **Food Science**, 2009, 30(16): 210-212. (in Chinese)
- [13] LI Y, WEISS I V, ROBERTS C J. Characterization of high-molecular-weight nonnative aggregates and aggregation kinetics by size exclusion chromatography with in line multi-angle laser light scattering [J]. **J Pharm Sci**, 2009, 98: 3997-4016.
- [14] JUMEL K, FIEBRIG I, STEPHEN E. Harding rapid size distribution and purity analysis of gastric mucus glycoproteins by size exclusion chromatography/multi angle laser light scattering [J]. **Int J Biol Macromol**, 1996, 18: 133-139.
- [15] SHI Lei, HAN Long, LIU Chao. Methodology of study on conformation of polysaccharide [J]. **Journal of Qufu Normal University**, 2012. (in Chinese)
- [16] 王家堂. 竹荪多糖的结构表征、链构象及形貌研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2009.
- [17] 许淑琴. 黑木耳刚性链葡聚糖结构、链构象转变及自组装行为[D]. 武汉: 武汉大学, 2013.
- [18] DEBYE P, BUECHE A M. Intrinsic viscosity, diffusion, and sedimentation rate of polymers in solution [J]. **The Journal of Chemical Physics**, 1948, 16(6): 573-579.
- [19] GUO Tianian, Y U Guihong, GUO Tao, et al. Structure and antioxidant activity of an exopolysaccharide from the mangrove soil fungus *Aspergillus versicolor* sp. PJX-9 [J]. **Chinese Journal of Marine Drugs**, 2015, 34(2): 29-33. (in Chinese)
- [20] NIE Shaoping, XIE Mingyong, LUO Zhen. Antioxidative activity evaluation study on tea polysaccharide by scavenging DPPH [J]. **Food Science**, 2006, 27(3): 34-36. (in Chinese)
- [21] WU Cuiling, DENG Yongkang, MENG Yanfa. Isolation, purification and structural investigation of polysaccharide from *Calvatia gigantea* [J]. **Natural Product Research & Development**, 2008, 20(6): 1027-1030. (in Chinese)
- [22] ZHOU Peng, XIE Mingyong, Fu Boqiang. A review of the studies on the polysaccharide structure [J]. **Journal of Nanchang University**, 2001, 25(2): 197-204. (in Chinese)
- [23] NICOLA V. Milligram-scale preparation and purification of oligosaccharides of defined length possessing the structure of chondroitin from defructosylated capsular polysaccharide K4 [J]. **Glycobiology**, 2003, 13(9): 635-640.
- [24] TANG Yuwei, ZHANG Yu, WANG Yuliang, et al. Isolation and structure feature analysis of astragalus polysaccharides [J].

Lishizhen Medicine & Materia Medica Research, 2014, 25(5): 1097-1100. (in Chinese)

- [25] MA Suyun, YAO Lifen, YE Changwen, et al. Isolation, purification and structural characteristics of a single polysaccharide from tremella fuciformis berk[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science & Technology**, 2013, 13(1): 172-177. (in Chinese)

会 议 消 息

会议名称(中文): 第七届中国二次离子质谱会议

所属学科: 光学, 分析化学, 仪器仪表与装置

开始日期: 2018-10-09 结束日期: 2018-10-12

所在城市: 江苏省 苏州市

主办单位: 中国真空学会

承办单位: 中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所纳米真空互联实验站

联系人: 陈肖(Xiao Chen)、黄荣(Rong Huang)、李坊森(Fangsen Li)、李政成(Zhengcheng Li)、芮芳(Fang Rui)

联系电话: 0512-62872899

传真: 0512-62872899

E-MAIL: nanox@sinano.ac.cn

会议网站: <http://2018sims.csp.escience.cn/dct/page/1>

会议背景介绍: 第七届中国二次离子质谱会议将于 2018 年 10 月 9-12 日在江苏省苏州市召开。本次会议由中国真空学会主办, 中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所纳米真空互联实验站承办。会议将为我国二次离子质谱界的学术研讨、技术交流与合作提供平台, 推动二次离子质谱的发展, 促进二次离子质谱技术在各领域的应用, 会议组委会热忱欢迎中国大陆、港澳台地区以及海外从事二次离子质谱相关工作的专家学者和研究生前来参会, 共襄盛举。

中国二次离子质谱会议自 1993 年以来, 至今已经成功举办了六届, 已经成为两岸三地以及海外专家二次离子质谱领域的盛会。第一届会议于 1993 年 5 月 31-6 月 5 日在北京清华大学举行; 第二届会议于 1998 年 4 月 6-10 日在北京清华大学举办; 第三届会议于 2005 年 1 月 5-10 日在台湾新竹清华大学举办; 第四届会议于 2008 年 10 月 26-29 日在北京中国矿业大学举办; 第五届会议于 2014 年 10 月 18-20 日在北京中科院地质与地球物理研究所举办; 第六届会议于 2016 年 10 月 8-11 日在大连中国科学院大连化学物理研究所举办; 中国二次离子质谱会议旨在促进二次离子研究领域的学术交流, 带动学科研究, 为领域内专家学者搭建一个交流和展示的平台。欢迎大家参加第七届中国二次离子质谱会议并持续关注学术年会的信息。

研讨专题: 1. 二次离子质谱仪器和理论; 2. 半导体/微电子科学中的表面和剖面分析; 3. 地球科学中的元素与同位素分析; 4. 核科学中的微区分析和同位素分析; 5. 材料的微区分析、表面分析和 3D 分析; 6. 生命科学和临床医学中质谱原位分析、质谱成像和单细胞质谱分析; 7. 环境科学中的微区和原位分析; 8. 微纳尺度样品的质谱分析; 9. 二次离子质谱的样品前处理方法和复杂样品分析; 10. 原子探针/质谱原位分析新技术; 11. 新型离子源(纳米/团簇)和后电离技术; 12. 质谱成像数据分析、数据处理、数据融合和识别方法