

超微粉碎对桑黄子实体粗多糖理化性质和刺激巨噬细胞活性的影响

李婷婷^{1,2}, 杨焱¹, 刘艳芳^{1*}, 邵倩^{1,3}, 张劲松¹, 鲍大鹏¹

¹农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心
上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403;

²上海海洋大学食品学院; ³上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

摘要:以桑黄子实体为材料, 比较了普通粉碎和超微粉碎对桑黄子实体多糖提取及其理化性质和刺激巨噬细胞活性的影响。结果表明, 相对于传统粉碎方式, 超微粉碎可以显著提高桑黄子实体多糖的得率, 分级醇沉所得各组分中 β -葡聚糖含量明显提高。HPSEC-MALLS-RI 联用分析桑黄多糖分子量分布结果显示, 超微粉碎所得各组分分子量较大, 且分布范围较宽。两种方法处理所得的 6 个组分均具有刺激 RAW264.7 细胞释放 NO 的活性, 其中 30% 乙醇沉淀组分(CW30 和 FP30)活性最好, 超微粉碎后 50% 和 70% 乙醇沉淀组分(CW50 和 CW70)活性低于普通粉碎后所得的相应组分(FP50 和 FP70)。

关键词: 桑黄多糖; 超微粉碎; β -葡聚糖; 分子量; 生物活性

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.027

Effects of Superfine Grinding on Physicochemical Properties and Macrophages-activation Activity of Crude Polysaccharides from *Phellinus baumii*

LI Ting-ting^{1,2}, YANG Yan¹, LIU Yan-fang^{1*}, SHAO Qian^{1,3}, ZHANG Jing-song¹, BAO Da-peng¹

¹National Engineering Research Center of Edible Fungi; Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, the People's Republic of China; Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; ²Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; ³Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract: The physicochemical properties and macrophages-activation activity of *Phellinus baumii* polysaccharides extracted from the fruiting bodies ground by different methods were studied in this paper. Compared with ordinary grinding methods, superfine grinding technology exerted significantly higher yields of crude polysaccharides, polysaccharide contents and β -glucan contents of six samples. HPSEC-MALLS-RI analysis showed the molecular weight distribution of *P. baumii* crude polysaccharides, which indicated superfine grinding technique generated higher molecular weight fractions and larger polydispersities. The 6 crude polysaccharide fractions had obvious effects on NO generation of RAW264.7 cells, which indicated that crude polysaccharides from *P. baumii* might have some immune-enhancing effects. Meanwhile, CW30 and FP30 showed the best immune-enhancing effects. However, CW50 and CW70 exerted lower immune-enhancing effects compared with FP50 and FP70.

Key words: *Phellinus baumii* polysaccharides; superfine grinding; β -glucan; molecular weight; biological activity

桑黄(*Phellinus baumii* Pilát), 又叫鲍氏层孔菌, 隶属于担子菌亚门(*Basidiomycota*)、层菌纲(*Hymenozymetes*), 非褶菌目(*Aphylllophorales*), 锈革孔菌科(*Hymenochaetaceae*), 针层孔菌属(*Phellinus*), 是一种多年生、黄褐色的珍稀药用真菌, 药用最早记载于

李时珍的《本草纲目》中^[1]。研究表明, 桑黄子实体具有抗肿瘤、增强免疫、降血糖、抗氧化、抗诱变、抗突变等药理作用^[2,3]。多糖是桑黄的主要活性成分之一, 目前对桑黄多糖的研究主要集中在提取技术、分离纯化及其抗癌效果方面。

超微粉碎技术是基于微米技术原理, 对物料进行碾磨、冲击、剪切等, 将粒径 3 mm 以上的物料粉碎至粒径为 10 ~ 25 μm 以下的微细颗粒, 从而使产品具有界面活性, 呈现出特殊的功能。通常把粒度

低于 25 μm 的粉末称为超微粉体,而传统的工艺方法,很难将固形物料粉碎到如此的细度。大量研究表明,超微粉碎技术具有提高药物中有效组分的溶出率,增大药物的生物利用量,节省药材,同时有利于保存生物活性成分,改善中药(或食品、保健品)口感等优点^[4]。近年来,超微粉碎技术在新药研制、保健品开发、生物工程、食品加工等方面的研究日益增多,超微粉碎应用于银杏叶中黄酮的提取、茯苓多糖提取、香菇功能性质等方面的研究已有报道^[5-7],但超微粉碎技术对桑黄子实体粗多糖提取及多糖理化性质的影响未见报道。本研究选取鲍氏针层孔菌子实体,比较超微粉碎与普通粉碎方式对其多糖理化性质的影响,并比较了两种方式粉碎后提取得到的多糖在生物活性上的差异,为桑黄多糖的进一步研究与利用提供基础。

1 材料与仪器

1.1 材料来源

桑黄,菌种为 *Phellinus baumii* Pilát, 来自中国微生物菌种保藏中心上海食用菌分中心,编号为: *Phellinus baumii* Pilát 3249,子实体在安徽金寨县桑黄合作社栽培获得。

1.2 试剂

青霉素(#0610S02)和链霉素(#3061B12)为 Amersco 公司产品;DMEM(#946880)高糖培养基、RPMI-1640(#1016442)、胎牛血清(FBS,#8172881)、胰酶(#1128331)为 Gibco 公司产品;细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS, #L2630)为 Sigma 公司产品;酵母 β -葡聚糖试剂盒为爱尔兰 Megazyme 公司产品;苯酚(#100153008),分析纯重蒸馏试剂;其余试剂均为国产分析纯试剂。RAW 264.7 细胞株购自中科院细胞所。

1.3 仪器

中药粉碎机 DJ-10A(上海淀久公司),超微粉碎震动磨机 BFM100B(济南倍力粉公司),Büchi Vacuum Controller V-800 旋转蒸发仪(BüCHI 公司),冷冻干燥仪(Thermo Savant 公司),Synergy HT 多功能酶标仪(Bio-Tek 公司),二氧化碳培养箱(Thermo Forma 公司),细胞计数仪(Beckman coulter 公司),Dionex ICS 2500 高效阴离子色谱仪(Dionex 公司),HPSEC-MALLS-RI 联用系统:由 Waters 2695 HPLC 泵,凝胶色谱柱(TSK PWXL6000 和 TSK PWXL3000),Waters 717 plus 自动进样器,氦-氖激

光光源的八角度激光光散射检测器(MALLS, Wyatt 公司)和 Waters 2414 示差检测器(RI)组成。

2 实验方法

2.1 子实体水溶性粗多糖制备

取桑黄子实体样品 600 g 两份,一份采用传统中药粉碎机室温粉碎 10 min 至木屑状,一份采用超微粉碎震动磨机-10 $^{\circ}\text{C}$ 下粉碎 30 min,过 200 目筛。分别加 6 L 蒸馏水沸水浴提取 2 h,滤渣重复提取 2 次,合并提取液,在旋转蒸发仪上减压浓缩至 1 L;取浓缩液,8000 \times g 离心 30 min,去除沉淀,浓缩液再加无水乙醇分级醇沉至乙醇终浓度为 30%、50%、70%,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h,倒去上清液,8000 \times g 离心 30 min,沉淀分别用对应醇沉浓度的乙醇反复洗涤 3~4 次,倒去上清液,沉淀部分加 100 mL 蒸馏水溶解,8000 \times g 离心 30 min,除去不溶物质,分子截留量 3500 Da 的透析袋透析 2 d,去除小分子物质,冷冻干燥机冻干,得桑黄子实体水溶性粗多糖。普通粉碎得到的桑黄子实体粗多糖根据醇沉的乙醇终浓度分别以 FP30、FP50、FP70 命名,超微粉碎的子实体同样方法制得的桑黄粗多糖样品分别以 CW30、CW50、CW70 命名。

2.2 粗多糖得率及多糖含量的测定

分析天平称量冻干后粗多糖的重量。按以下公式计算粗多糖得率。

$$\text{粗多糖得率}(\%) = \frac{\text{粗多糖的重量}(\text{g})}{\text{子实体的重量}(\text{g})} \times 100\%$$

由于粗多糖在制备时已经过醇沉去除小分子,故粗多糖中还还原糖含量极低,可以忽略不计,用苯酚硫酸法^[8]测得的总糖含量,即为多糖含量。

2.3 水溶性粗多糖中 β -葡聚糖含量测定

称取 10 mg 左右冻干后的粗多糖,参照 Megazyme 公司提供的酵母和蘑菇 β -葡聚糖检测试剂盒中的方法进行 β -葡聚糖含量测定^[9]。

2.4 HPSEC-MALLS-RI 联用分析桑黄多糖分子量分布

2.4.1 样品的制备和处理

称取 2 mg 样品,溶解于 1 mL 流动相中,配制成浓度 2 mg/mL 的溶液。用 12000 \times g 离心 10 min 后取上清液,经 0.25 μm 的水相微孔膜过滤后进行 HPSEC-MALLS-RI 分析。

2.4.2 色谱分析条件

分析柱选 TSK PWXL6000 和 TSK PWXL3000 凝

胶色谱柱串联后分析,流动相为含 0.05 mol/L 的 NaH_2PO_4 和 0.15 mol/L 的 NaNO_3 溶液 ($\text{pH} = 7$, 0.02% 叠氮钠),流速为 0.5 mL/min,色谱柱温用柱温箱恒定在 35 °C;激光检测器光源波长选用 623.8 nm。多糖在溶液中的折光指数增量 (dn/dc) 按照 0.146 mL/g 计算。

2.4.3 数据处理

使用 Astra (version 6.1.1, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA) 数据分析软件对光散射数据进行采集和分析,计算分子量。

2.5 粗多糖样品的单糖组成分析

参照文献^[10]方法进行。

2.6 水溶性粗多糖对 RAW264.7 细胞释放 NO 量的影响

分别称取各粗多糖组分 5 mg,加 1 mL PBS 将其配成 5 mg/mL 的母液,15000 × g 离心 30 min,将上清液转移至另一离心管中,然后取一定量稀释成 200 μg/mL 和 50 μg/mL,并以 10 μg/mL 的 LPS 为阳性对照,以 PBS 为阴性对照,按文献^[11]的方法测定巨噬细胞释放 NO 的产量。

表 1 粉碎方式对桑黄粗多糖得率、多糖含量和 β -葡聚糖含量的影响

Table 1 Effect of different grinding methods on yields, polysaccharide content and β -glucan content of *P. baumii* crude polysaccharides

多糖组分 Crude polysaccharide	粗多糖得率 Extraction yield (%)	多糖含量 Polysaccharide content (%)	β -葡聚糖含量 β -Glucan content (%)	β -葡聚糖/粗多糖 β -Glucan/crude polysaccharides (%)
CW30	1.18	71.02 ± 0.73	51.54 ± 0.68	72.57
CW50	2.23	66.43 ± 1.25	58.37 ± 0.53	87.86
CW70	1.07	85.54 ± 0.45	78.55 ± 1.06	91.82
FP30	0.14	45.20 ± 0.46	41.59 ± 1.23	92.01
FP50	0.43	43.04 ± 0.58	31.11 ± 0.86	72.28
FP70	0.40	50.60 ± 1.05	20.91 ± 0.59	41.34

3.2 粉碎方式对桑黄子实体粗多糖组分分子量分布的影响

各桑黄多糖组分的 HPSEC-MALLS-RI 分析图谱如图 1 所示。超微粉碎方式所得各多糖组分分子量分布范围较宽,而普通粉碎的组分分子量分布范围很窄。如图 1 所示,FP30 和 CW30 均主要含有 3 个峰,且出峰时间相近,CW30 略早。超微粉碎所得组分 CW30 的 3 个峰,分子量相近,很难得到有效分离,而 FP30 的 3 个峰的分子量分布范围窄且分子量差异非常明显。这可能是因为超微粉碎对多糖的结构造成了一定影响,使多糖的部分糖苷键断裂,从而形成很多分子量相近组分。同时,如图 2 和图 3 所

3 结果与分析

3.1 粉碎方式对桑黄子实体粗多糖提取率及多糖和 β -葡聚糖含量的影响

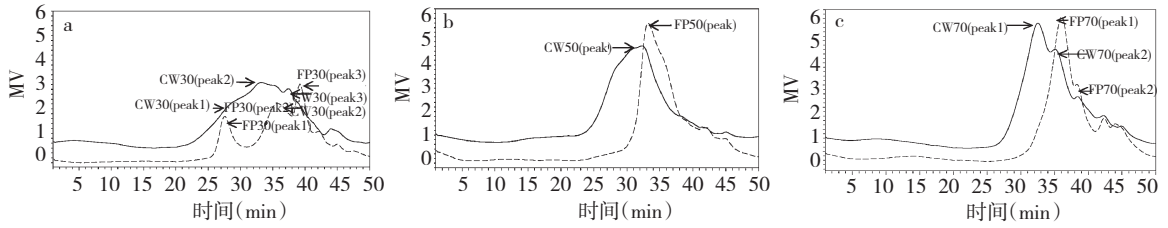
与普通粉碎方式相比,桑黄子实体经超微粉碎处理后,提取率和多糖含量均得到显著提高(表 1)。普通粉碎所得桑黄子实体粗多糖的总得率仅为 0.97% (表 1 中 FP30、FP50、FP70 得率之和),而超微粉碎后其粗多糖总得率为 4.48% (表 1 中 CW30、CW50、CW70 得率总和),相对普通粉碎方式,粗多糖得率提高了 3.6 倍。针对各醇沉组分而言,CW30 的得率比 FP30 提高了近 8 倍,CW50 的得率是 FP50 的 5 倍,CW70 的得率是 FP70 的 2 倍。且超微粉碎后提取所得各组分的 β -葡聚糖含量均高于普通粉碎所得的相应组分,这跟细胞壁多糖的大量释放有关。子实体经超微粉碎后提取的粗多糖中 β -葡聚糖所占比例随着醇沉浓度的增加而提高,而普通粉碎后提取的桑黄粗多糖中 β -葡聚糖所占比例随着醇沉浓度的增加而降低。这表明不同粉碎方式所得粗多糖成分存在明显差异。

示,CW50 和 CW70 两个组分出峰时间相对于普通粉碎方式的多糖组分有所提前,这可能是超微粉碎有助于大分子多糖的溶出。

使用 Astra 数据分析软件对桑黄粗多糖各组分的分子量进行计算,结果如表 2 所示。结果显示 CW30 糖峰比较多,而且分布集中,对 CW30 的 3 个主峰进行分析发现,Peak1 的重均分子量 2.201×10^6 Da,相比于 FP30 的 Peak1 的 1.895×10^6 Da 略大一些。同时,CW30 的 Peak2,Peak3 分子量均大于 FP30 (图 Fig1a)。图 Fig1b 显示,CW50 和 FP50 这一组样品只有一个主峰,重均分子量分别为 3.614×10^5 Da 和 3.089×10^4 Da,CW50 的分子量比 FP50

大得多;另外,CW50 的多分散性指数为 2.463,远远大于 FP50 的 1.307,这说明 CW50 分子量分布很宽,可能是由很多分子量相近的多糖组成,而 FP50 的组分相对单一。CW70 和 FP70 这一组样品的分子量分析数据表现出同样的趋势(Fig1c)。

对两种处理方式进行对比发现,超微粉碎有助于大分子多糖的溶出,同时对大分子多糖的结构产生破坏,引起部分糖苷键断裂,形成很多分子量相近组分。所以超微粉碎得到的粗多糖组分在多糖组成上比普通粉碎复杂的多,很难达到分离纯化的效果。



a:粗多糖 CW30、FP30 液相图谱;b:粗多糖 CW50、FP50 液相图谱;c:粗多糖 CW70、FP70 液相图谱

a: CW30 and FP30;b: CW50 and FP50;c: CW70 and FP70

图 1 不同粉碎方式桑黄子实体粗多糖的液相图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of crude polysaccharides extracted from *P. baumii* fruiting bodies ground by different methods

表 2 不同粉碎方式提取的桑黄子实体多糖分子量分布范围

Table 2 Molecular weight distribution of crude polysaccharides extracted from *P. baumii* fruiting bodies ground by different methods

多糖组分 Fractions	峰编号 Peak number	重均分子量 Weight average molecular weight Mw (Da)	数均分子量 Number average molecular weight Mn (Da)	多分散指数 Polydispersity index (Mw/Mn)
CW30	Peak1	2.201×10^6	1.635×10^6	1.347
	Peak2	1.387×10^5	1.197×10^5	1.159
	Peak3	4.456×10^4	4.345×10^4	1.026
FP30	Peak1	1.895×10^6	1.685×10^6	1.124
	Peak2	1.293×10^5	8.348×10^4	1.549
	Peak3	2.518×10^4	2.195×10^4	1.147
CW50	Peak	3.614×10^5	1.468×10^5	2.463
FP50	Peak	3.089×10^4	2.364×10^4	1.307
CW70	Peak1	7.771×10^4	6.105×10^4	1.273
	Peak2	3.547×10^4	3.219×10^4	1.102
FP70	Peak1	4.033×10^4	2.430×10^4	1.660
	Peak2	1.989×10^4	1.425×10^4	1.393

3.3 桑黄子实体粗多糖单糖组成分析

不同粉碎方式提取的桑黄子实体多糖分级醇沉后所得的 6 个组分,经高效阴离子色谱(HPLC)检测后所得的单糖组成摩尔百分比结果如表 3 所示。由表 3 可知,6 个多糖组分的单糖组成基本相同,都含有岩藻糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖这四种单糖,但每个组分中各单糖所占比例不同,葡萄糖所占比

例最高,其次是半乳糖和甘露糖,岩藻糖比例最低。同时,超微粉碎后所得各组分中葡萄糖所占比例相对普通粉碎的组分有所提高,这和表 1 中超微粉碎的组分 β -葡聚糖含量较高相吻合。这可能是超微粉碎使得细胞壁破裂,细胞壁上的 β -葡聚糖大量溶出造成的。

表 3 6 个多糖组分的单糖组成摩尔百分比

Table 3 Molar ratio of monosaccharide of six samples

多糖组分 Fractions	岩藻糖 Fucose (%)	半乳糖 Galactose (%)	葡萄糖 Glucose (%)	甘露糖 Mannose (%)
CW30	0.84	2.09	92.17	4.90
CW50	1.79	6.43	79.58	12.20

CW70	1.69	4.85	83.26	10.20
FP30	1.61	5.77	86.11	6.51
FP50	8.02	22.32	52.86	16.80
FP70	5.37	15.77	50.44	28.42

3.4 桑黄子实体粗多糖样品对 RAW264.7 细胞释放 NO 量的影响

不同粉碎方式的桑黄子实体粗多糖体外活性测试结果如图 2 所示。结果表明,两种粉碎方式所得 6 个桑黄多糖组分均具有体外刺激巨噬细胞释放 NO 的活性。CW30 和 FP30 活性相当,且都表现出很好的浓度依赖性。CW50 和 CW70 的活性明显低于 FP50 和 FP70,且四组样品均未表现出活性与浓度间的依赖性,这可能与多糖的纯度、种类及结构相关,尚需进一步深入研究。

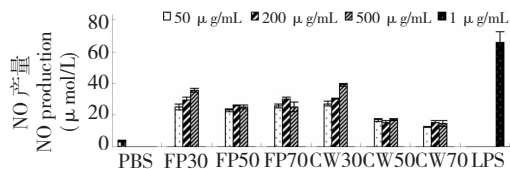


图 2 不同粉碎方式桑黄分级醇沉粗多糖对 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响

Fig. 2 Effects of crude polysaccharides extracted from *P. baumii* fruiting bodies ground by different methods and step ethanol precipitation on NO release from RAW264.7 cells

4 讨论

目前,市场上有不少灵芝超细粉、桑黄超细粉这一类的产品,但这种超细粉主要成分多糖的理化性质和生物活性还未见报道。本文以桑黄超细粉为研究对象比较了不同粉碎方式提取的桑黄子实体多糖理化性质和生物活性的差异,发现超微粉碎处理后得到的桑黄粗多糖,在多糖得率,多糖含量以及 β -葡聚糖含量上都有显著增加。因此,超微粉碎技术应用于桑黄多糖提取的前处理,可以大幅提高桑黄多糖的得率。

近年来研究表明 β -葡聚糖具有免疫调节功能和抗肿瘤活性,是食用菌中存在的一类重要多糖,食用菌 β -葡聚糖主要来源于食用、药用担子真菌和子囊酵母菌的细胞壁。在超微处理过程中,细胞壁多糖(主要是 β -葡聚糖)溶出^[12],这可能是桑黄超微粉体 β -葡聚糖含量高的一个重要原因。超微粉碎前后的子实体多糖在单糖组成摩尔比以及分子量分

布上有明显差异;相对于传统粉碎方式,超微粉碎所得的小分子部分的桑黄多糖体外活性略有下降,可能是超微粉碎过程对其多糖的结构产生一定的破坏作用,从而影响了其生物活性。

实验研究发现,超微粉碎得到的粗多糖组分分子量分布宽泛,很难达到分离纯化的效果。因此,超微粉碎技术适用于工业上大规模制备桑黄粗多糖前处理,从而提高多糖得率,降低桑黄多糖的成本;而不适用于多糖的分离纯化及相关均一多糖结构分析的研究。

参考文献

- Huang NL(黄年来), Lin ZB(林志彬), Chen GL(陈国良), *et al.* Medicinal and Edible Fungi(中国食药菌学). Shanghai: Scientific and Technical Documentation Press, 2010. 1690-1693.
- Zhang LF(张林芳), Zou L(邹莉). The research progress of polysaccharides of *Phellinus. Edib Fun Chin*(中国食用菌), 2012,31(4):1-4.
- Yang Y(杨焱), Ye LB(叶利斌), Zhang JS(张劲松). Structural analysis of a bioactive polysaccharide, PISP1, from the medicinal mushroom *Phellinus igniarius*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009;73:134-139.
- Zhang J(张洁), Yu Y(于颖), Xu GH(徐桂花). Technology of superfine grinding and its application in food industry. *J Agric Sci*, 2010,31:51-54.
- Huang QC(黄其春), Lin MX(林梅香), Hong YP(洪燕萍), *et al.* Effect of ultrafine grinding on the dissolution of total flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2012,40:5884-5885.
- Mei GM(梅光明), Li FJ(李孚杰), Shen S(沈思), *et al.* Extraction of alkali soluble polysaccharide in poriacocos and study on ultramicro smashing modification. *Food Sci*(食品科学), 2007,28:278-282.
- Gao H(高虹), Shi DF(史德芳), He JJ(何建军), *et al.* Effect of superfine grinding on functional components and properties of *Lentinus edodes* stems. *Food Sci*(食品科学), 2010,31(5):40-43.