

银耳粗多糖的纯化及抗氧化活性研究

颜 军, 徐光域, 郭晓强, 刘 崑, 李晓光, 苟小军*
(成都大学中药化学实验室, 四川 成都 610106)

摘 要: 本文对银耳多糖进行提取、分离, 并采用 DEAE-纤维素和 Sephadex G-200 进行纯化, 得到均一酸性多糖 TPP2。以银耳多糖清除羟基自由基能力为指标, 对银耳多糖分离纯化的每一步进行跟踪, 并研究了酸性多糖 TPP2 体外抗氧化活性。实验表明银耳酸性多糖 TPP2 清除羟基自由基的作用明显, 50% 清除率的样品浓度为 66.5 μg/ml。银耳酸性多糖 TPP2 对猪油的过氧化有明显的抑制作用。

关键词: 银耳多糖; 纯化; 自由基清除; 抗氧化

Research on the Purification and Anti-Oxidize Activity of Tremella Polysaccharide

YAN Jun, XU Guang-yu, GUO Xiao-qiang, LIU Wei, LI Xiao-guang, GOU Xiao-jun*
(The Laboratory of Traditional Chinese Medicine of Chengdu university, Chengdu 610106, China)

Abstract: The tremella polysaccharide was purified by DEAE-Cellulose and Sephadex G-200, and then obtained a pure homopolysaccharide TPP2. The ability of the tremella polysaccharide to scavenge the hydroxyl free radical in the test was carefully observed, and the outside anti-oxidize activity of acid polysaccharide was researched. It was proven in the test that TPP2 showed active ability in scavenging the hydroxyl free radical, the sample thickness was 66.5 μg/ml in 50% scavenging rate.

收稿日期 2005-07-26

*通讯作者

基金项目: 四川省中医药管理局重点及专项项目(2003A001, 2003C001)

作者简介: 颜军(1971-), 男, 实验师, 研究方向为生物活性成分的提取及检测。

参考文献:

- [1] 国家海洋局. 2004年中国海洋经济统计公报—主要海洋产业情况.
- [2] Richard F Ablett, et al. Frozen storage performance of cooked cultured mussels (*Mytilus edulis* L.) [J]. *J Food Sci*, 1986, 51: 1118-1121.
- [3] 刘亚, 章超桦, 张静. 贝类功能性成分的研究现状及其展望[J]. *海洋科学*, 2003, 27(8): 34-37.
- [4] Sootawat Benjakul. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage [J]. *Food Research International*, 2003, 36: 787-795.
- [5] 罗永康, 周新华. 鲢鱼蛋白质低温变性保护剂的研究[J]. *肉类研究*, 1995, (4): 15-19.
- [6] Uijtendboogart TG, Trziszka TL, Schreurs F. 1. Cryoprotectant Effects During Short-time Frozen Storage of Chicken Myofibrillar Protein Isolates [J]. *J Food Sci*, 1993, (58): 274.
- [7] 毛玉英, 包建强, 冯志哲. 冻藏温度对带鱼品质的影响[J]. *冷饮与速冻食品工业*, 1996, (4): 11-13.
- [8] 汪之和, 等. 防止白鲢鱼糜蛋白质冷冻变性的研究[J]. *水产科技情报*, 1996, 23(4): 173-177.
- [9] 刘年生, 郭东红, 曲映红. 贝类在冻藏时的质构和蛋白质特性研究[J]. *集美大学学报*, 1997, 2(1): 31-35.
- [10] 福田裕, 柞木田善治, 川村满, 等. 冻结および贮藏によるマサバ肌原繊維タンパク質の変性日誌[J]. 1982, 48: 1627-1632.
- [11] 万建荣, 洪玉蕾, 奚印慈, 等. 水产食品化学分析手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1993.
- [12] Katherine A. Pikaal-Cleland. Protein Denaturation during Freezing and Thawing in Phosphate Buffer Systems: Monomeric and Tetrameric β -Galactosidase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 384(2): 398-406.
- [13] 汪之和, 等. 漂洗条件对鲢鱼糜蛋白质冷冻变性的影响[J]. *上海水产大学学报*, 1999, 8(3): 210-214.
- [14] 吴光红, 等, 译. 水产食品学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 22-47.

TPP2 restrains obviously the peroxide of lard.

Key words: tremella polysaccharide; purification; scavenging; anti-oxidize

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)09-0169-04

银耳(*Tremella fuciformis* Berk)在我国已有悠久的药用和食用历史。近年来,对银耳的化学成分及药理活性进行许多研究和大量的现代药理证明,多数药理活性都与银耳多糖有关,特别是酸性银耳多糖^[1]。酸性银耳多糖具有广泛的药理活性,能提高机体免疫力,增强机体耐缺氧能力,清除自由基,抑制肿瘤,能使人体产生抗体及干扰素,可治疗高血压、高血脂、糖尿病、乙型肝炎等多种现代医学中的疑难病症。

本文以椴木银耳为材料,对银耳多糖进行提取、分离、纯化;并以多糖清除羟基自由基能力为指标,初步纯化出均一多糖 TPP2。为开发、利用银耳资源、探索银耳多糖药理活性的物质基础提供研究线索。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

通江椴木银耳;试剂均为国产分析纯。

7200 分光光度计(UNICO);UV2802PC 紫外-可见扫描分光光度计(UNICO);旋转蒸发浓缩仪(Buchi);DEAE-Sepharose Fast Flow(Sweden);Sephadex G-200(Sweden)。

1.2 提取

称取一定量的通江椴木银耳,将其在 70℃ 的烘箱中烘 3h,粉碎(粒度 60 目)。用 80% 的乙醇浸泡银耳粉末,用减压抽滤将乙醇浸出物除去。然后加水(1:10),在 70℃ 条件浸提 5h,8000r/min 离心 30min,取上清液;重复抽提一次,合并两次上清液,即银耳多糖粗提液。采用本室改进的苯酚-硫酸定糖法(另文发表,下文中所涉及的多糖测定方法均为此方法)测定多糖的含量,并进行清除羟基自由基能力的测定。

浓缩银耳多糖粗提液,搅拌下加入无水乙醇至终浓度 80%,静置 2h 后,离心分离,采用 Sevag 法除蛋白。获得精制银耳多糖,干燥,称重。并进行清除羟基自由基能力的测定。

1.3 分离纯化

1.3.1 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析

层析柱(2.6cm × 30cm),介质为 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换纤维素,用蒸馏水平衡;粗多糖上样量 200mg,上样体积 20ml;流速 1.5ml/min;蒸馏水洗脱 150ml 后,以蒸馏水 250ml 和 3mol/L NaCl 250ml 梯度洗脱;采用分部收集,收集液测定多糖浓度,按峰 2 管号范围合并多糖洗脱液,透析后冻干,备用。

1.3.2 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析

溶解峰 2 冻干品 10mg 于 10ml 蒸馏水中;层析柱(2cm × 80cm),介质为 Sephadex G-200;用蒸馏水洗脱;流速 0.5ml/min;采用分部收集,收集液测定多糖浓度,合并糖峰收集液,冻干,得均一多糖,该组分命名为 TPP2(*Tremella fuciformis* Berk Polysaccharide Peak 2)。

1.4 紫外吸收测定

将 TPP2 配成 0.4mg/ml 的溶液,在 200~400nm 波长范围进行紫外扫描。

1.5 纯度鉴定

取 10mg TPP2 溶于 10ml 蒸馏水中, Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析(2cm × 80cm)。采用分部收集,5ml/管,分别测定每管多糖浓度,绘制洗脱曲线。

1.6 清除羟基自由基活性测定

以清除羟基自由基能力为指标,对银耳多糖分离纯化的每一步进行跟踪。

清除羟基自由基实验方法:按照 Smirnov^[2]的方法。

清除率计算公式:

$$E\% = [A_0 - (A_x - A_0')] / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 — 为空白对照液的吸光度。

A_x — 为加入多糖溶液后的吸光度。

A_0' — 为不加显色剂 H_2O_2 多糖溶液本底的吸光度。

EC_{50} 表示清除率为 50% 时的样品浓度。

1.7 银耳多糖的抗氧化实验

银耳多糖对油脂的抗氧化能力采用强化实验法。即将 VC、银耳多糖加入新炼制的猪油中,置于 65℃ 的恒温烘箱中,定时取样检测猪油的过氧化值(POV 值)。以 POV 值来表示油脂的氧化速度,进而衡量抗氧化剂的活性。POV 值的测定方法按 GB5009.37-96 标准执行。

2 结果与分析

2.1 提取

先用 80% 的乙醇浸泡可以使大分子蛋白质变性,同时脂肪和色素留在乙醇溶液中。然后加水浸提多糖,这样所得的多糖色白,经检测不含脂肪、蛋白质,并且减少了后面脱色、脱脂的复杂工序。

随着乙醇加入量的增加,有白色丝状物析出,即为多糖。随着乙醇的递增白色析出物不断增加,当乙醇的浓度达到 80% 时,多糖完全析出。静置后,上层液体清澈透明。离心分离,进一步采用 Sevag 法除去

蛋白质。获得精制银耳多糖,干燥、称重,得率为9.75%。

2.2 分离纯化

2.2.1 DEAE-Sepharose Fast Flow柱层析

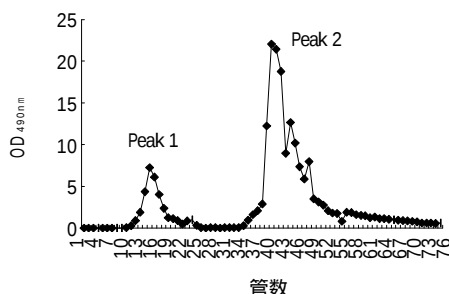


图1 银耳粗多糖的DEAE-Sepharose Fast Flow柱层析洗脱曲线
Fig.1 The elution curve of crude polysaccharides by DEAE-Sepharose Anion-exchange chromatography

测定各管多糖浓度得到洗脱曲线(图1),结果显示分离的两个峰,峰1由蒸馏水洗脱,初步判断为中性多糖。峰2为NaCl梯度洗脱,为酸性多糖成分。分别收集峰1、2透析冻干,备用。

2.2.2 Sephadex G-200分子筛凝胶层析

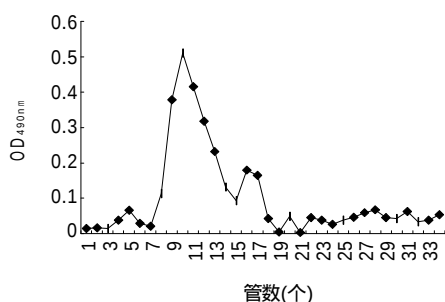


图2 多糖峰2样品的凝胶Sephadex G-200层析洗脱曲线
Fig.2 The elution curve of the peak 2 of polysaccharide by Sephadex G-200 chromatography

经DEAE-Sepharose Fast Flow柱层析后,所得银耳多糖峰2经Sephadex G-200凝胶过滤层析,洗脱曲线如图2。得一主峰,收集此峰,冻干。

2.3 紫外扫描

采用紫外扫描分光光度仪,在200~300nm进行扫描。结果显示,银耳多糖TPP2溶液在260nm和280nm处无明显吸收峰(实验结果略),表明银耳多糖中不含核酸和蛋白质等杂质成分。

2.4 纯度鉴定

TPP2溶液采用Sephadex G-200分子筛排阻层析,得单一正态峰(见图3),证明TPP2为均一多糖。

2.5 银耳多糖活性测定

以银耳多糖清除羟基自由基能力为指标,对银耳多

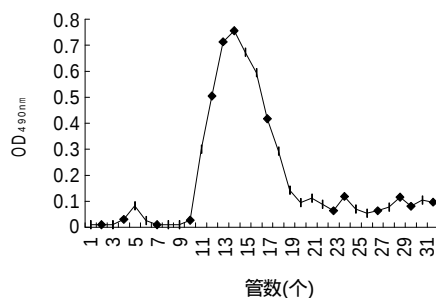


图3 TPP2的Sephadex G-200分子筛排阻层析洗脱曲线
Fig.3 The elution curve of the TPP2 by Sephadex G-200 size-exclusion chromatography

糖分离纯化的每一步进行跟踪。对银耳多糖粗提液、精制银耳多糖和TPP2进行清除羟基自由基能力的测定。结果如图4。银耳多糖粗提液、精制银耳多糖和TPP2的 EC_{50} 分别为147.9、97.5、66.5 $\mu\text{g/ml}$ 。随着银耳多糖的纯度提高,其清除羟基自由基活性也随着提高。

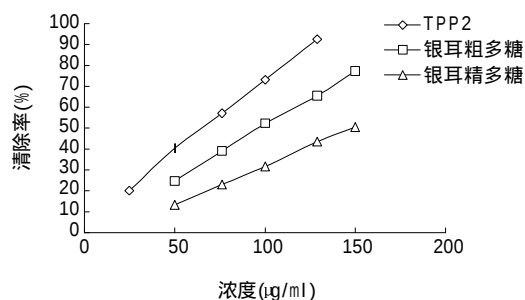


图4 不同银耳多糖样品对羟基的清除作用
Fig.4 Ability in scavenging the hydroxyl free radical of polysaccharides

2.6 抗氧化性能研究

通过不同银耳多糖样品对猪油的抗氧化能力测定,结果如图5所示,银耳多糖粗提液、精制银耳多糖和TPP2的抗氧化作用随纯度提高而增强。特别是加入TPP2的油脂过氧化值变化曲线的变化率与加入VC的油脂的过氧化值变化曲线的变化率相近,说明TPP2的抗氧化作用较高。

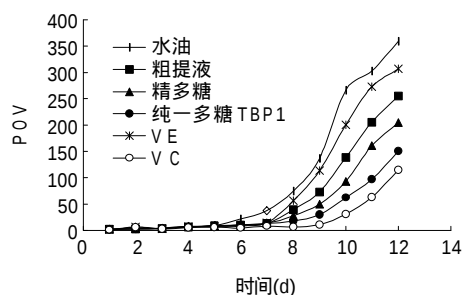


图5 不同银耳多糖样品对猪油的抗氧化作用
Fig.5 Anti-oxidize activity of polysaccharides

3 讨 论

3.1 银耳粗多糖为灰白色粉末,可溶于水,易溶于碱水溶液,但不溶于高浓度的乙醇、苯、甲苯、甲醇、丙酮等有机溶剂。用离子交换纤维素 DEAE-Sephacel Fast Flow 柱层析,可得到分离的两个峰。根据 DEAE-纤维素的性质、洗脱液的性质及洗脱体积,初步判断峰 2 为酸性多糖。由图 1 可得峰 2 为主峰,说明酸性多糖的含量较高。证明提取的银耳多糖以酸性多糖为主。由于酸性银耳多糖为银耳的主要生理活性成分^[1],含量的多少直接影响到它的各种生理作用。在我们的实验中,发现本文所采用的通江椴木银耳的酸性多糖的含量最高(另文发表)。这也是我们选用通江椴木银耳作为酸性银耳多糖研究对象的原因。

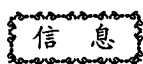
3.2 多糖是继蛋白质、核酸之后的又一信息分子,由于其结构的不均一性,如分子质量、极性、组成等的不均一,因此它的分离纯化和纯度鉴定上存在一定的困难。也无专门的活力测定手段。我们在对多糖进行纯化过程中,根据清除羟基自由基的实验结果,发现随着蛋白质等杂质的去除,其清除羟基自由基的作用相应增强。因此我们采用银耳多糖清除羟基自由基能力为指标,对银耳多糖分离纯化的每一步进行跟踪。分别采用 DEAE-Sephacel Fast Flow 柱层析和 Sephadex G-200 凝胶柱层析逐级纯化。最后得到清除羟基自由基活性较高的均一酸性多糖 TPP2,并且经过我们的测定,其中性多糖组分清除自由基能力不明显。实验结果显示均一酸性银耳多糖 TPP2 有较好的清除羟基自由基能力,50%清除率的样品浓度为 66.5 μg/ml。对猪油的过氧化有明显的抑制作用。此结果只是初步肯定银耳多糖的体外抗氧化作用,能否作为抗衰老药物还需要进一步通过体内药理实验证实。

经过我们的工作得到了清除羟基自由基活性较高的酸性多糖 TPP2,并进行了抗氧化实验。但要更加深入的了解银耳多糖的药理作用机理,应该深入地从事多糖的化学组成及其结构、明确其构效关系等方面,来揭示

银耳多糖的生理活性。在这些方面,1984 年吴梧桐等人对银耳孢子多糖的结构作了初步分析^[6];高其品等人对银耳子实体多糖结构、单糖残基的连接方式和糖苷键的构型进行了初步的分析研究^[7~9]。为了说明均一银耳多糖 TPP2 的生理活性机理,我们应该在前人的基础上,从分子量、单糖残基实质、单糖残基间的顺序、单糖残基在糖苷键中的位置、环状结构的类型、糖苷键的构型六个方面进行表征。既从理论水平揭示银耳多糖的化学本质及构效关系,又在应用水平上为开发新药或提高现有药物的药效,为攻克自由基带来的人类顽症提供新的思路。

参考文献:

- [1] 郑建仙. 功能性食品[M]. 北京: 中国轻工出版社, 1995.
- [2] Smironoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1051-1560.
- [3] 谭周进, 谢达平, 王征, 等. 蜜环菌多糖分离纯化及性质的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(9): 49-51.
- [4] 梁立, 郭晓强, 徐光域, 等. 冲调式银耳食品的速溶性及粘度研究[J]. 成都大学学报, 2004, 23(3): 38-43.
- [5] 傅明辉, 林总华. 沙棘果水溶性多糖的分离纯化、组分分析及抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 73-75.
- [6] 吴梧桐, 余品华, 夏尔宁, 等. 银耳孢子多糖 TF-A、TF-B、TF-C 的分离、纯化及组成单糖的鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(4): 393-398.
- [7] Gao Qipin, Rolf Seljelid, Chen Huiqun, et al. Characterisation of acidic heteroglycans from Tremella fuciformis Berk with cytokine stimulating activity[J]. Carbohydrate Research, 1996, 288: 135-142.
- [8] Gao Qipin, Jiang Ruizhi, Chen Huiqun, et al. Characterisation and cytokine stimulating activities of heteroglycans from Tremella fuciformis[J]. Planta Medica, 1996, 62: 297-302.
- [9] Gao Qipin, Killie Mette Kjaer, Chen Huiqun, et al. Characterisation and cytokine-stimulating activities of acidic heteroglycans from Tremella fuciformis[J]. Planta Medica, 1997, 63: 457-460.



黄海水产所 - 塞内加尔鲷种苗培育成功

由黄海水产研究所率先在国内开展的欧洲名贵海水鱼养殖 - 塞内加尔鲷规模化种苗培育技术日前获得成功。

黄海水产研究所已培育出 3cm 鱼苗 180 多万尾。这是继大菱鲆、半滑舌鲷等优质种苗繁育养殖成功后, 青岛市在海水养殖优质苗种培育技术方面取得的又一重大突破。