

酿酒酵母发酵法制备桑黄多糖工艺优化及其结构表征和抗氧化活性研究

逢梦玉, 隋昕怡, 刘 丹, 刘养山, 任洪飞, 张 景, 杜秀菊*

聊城大学生命科学学院, 聊城 252000

摘 要: 为提高桑黄多糖提取得率和活性, 优化发酵桑黄多糖 (fermented *Sanghuangporus sanghuang* polysaccharide, SSP-F) 的制备工艺, 并对其进行结构表征及抗氧化活性评估。以临清桑黄为研究材料, 以酿酒酵母为发酵菌种, 以 SSP-F 的提取得率为响应值, 基于单因素和响应面实验优化发酵工艺条件, 采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法、傅里叶红外光谱、扫描电镜及 X-衍射对其结构进行表征, 并对其清除自由基的活性进行研究。结果表明: 最佳工艺为发酵时间 30.3 h、接种量 9.3%、pH 7.0。在此条件下, SSP-F 的提取得率为 3.30%, 比水提桑黄多糖 (water extracted *S. sanghuang* polysaccharide, SSP-W) 的提取得率 (2.34%) 提高了 41.03%。SSP-W 和 SSP-F 均以吡喃环为基本骨架, 由 Fuc、GlcN、Glc 和 Man 4 种单糖组成, 但其摩尔比有明显不同。此外, SSP-F 的羟自由基清除率、还原力和 ABTS⁺ 自由基清除率均高于 SSP-W。本研究将为桑黄资源的合理开发和精深加工提供科学依据。

关键词: 桑黄多糖; 酿酒酵母; 工艺优化; 结构表征; 抗氧化活性

中图分类号: Q93 文献标识码: A

Process optimization, structural characterization, and antioxidant activity of *Sanghuangporus sanghuang* polysaccharides prepared by *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

PANG Meng-yu, SUI Xin-yi, LIU Dan, LIU Yang-shan, REN Hong-fei, ZHANG Jing, DU Xiu-ju*

College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China

Abstract: In order to improve the extraction rate and activity of *Sanghuangporus sanghuang* polysaccharide, the fermentation process of fermented *S. sanghuang* polysaccharide (SSP-F) was optimized, and its structure was characterized and antioxidant activities were evaluated. The fermentation conditions were optimized based on single factors and response surface experiments using Linqing *S. sanghuang* as the research material, *Saccharomyces cerevisiae* as the fermentation strain, and the extraction rate of SSP-F as the response value. The structure was characterized by high-performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, and X-diffraction. Furthermore, the radical-scavenging activities of SSP-F were investigated. The results showed the optimal fermentation conditions were as follows: fermentation time 30.3 h, inoculum amount 9.3%, pH 7.0. Under the optimal conditions, the rate of SSP-F was 3.30%, which was 41.03% higher than that of water extracted *S. sanghuang* polysaccharide (SSP-W) (2.34%). Both SSP-W and SSP-F had the pyran

ring as their basic backbone, and both of them were composed of four monosaccharides, including Fuc, GlcN, Glc, and Man, but their molar ratios were significantly different. In addition, the hydroxyl radical-scavenging rate, reducing power, and ABTS⁺ radical-scavenging rate of SSP-F were higher than those of SSP-W. The results would provide a scientific basis for the rational development and deep processing of *S. sanghuang* resources.

Key words: *Sanghuangporus sanghuang* polysaccharide; *Saccharomyces cerevisiae*; process optimization; structural characterization; antioxidant activity

桑黄 (*Sanghuangporus sanghuang*) 是一种大型多年生食药兼用真菌, 属于担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、锈革孔菌科, 通常被称为“森林金”^[1]。主要分布于中国、日本和韩国, 被我国用作传统中药已有 2 000 多年的历史^[2], 主要用于活血、止血、止泻等^[3]。现代研究表明, 桑黄含有多种生物活性物质^[4], 其中, 多糖是其主要活性成分, 具有抗氧化、抗菌、抗炎和降血糖等功效^[5]。

目前, 桑黄多糖传统的提取方法主要是热水浸提法^[6], 此方法条件温和, 但提取得率较低; 还有一些新型的提取方法^[7], 可以提高提取得率, 但存在提取设备要求高, 易破坏多糖结构等不足之处^[8]。微生物发酵提取是一种生物转化的方法, 其原理是利用微生物在生长代谢过程中产生具有破壁功能的复合生物酶系, 如纤维素酶、果胶酶等, 大大促进活性成分的溶出, 从而提高多糖提取得率^[9,10], 具备成本能耗低、易操作、反应条件温和等特点。酵母菌是一种常见的益生菌^[11], 目前, 利用酿酒酵母发酵法制备多糖已应用于香菇^[12]、黄精^[10]、党参^[13]等, 均达到了较好的效果, 其中发酵法党参多糖的提取得率 (17.46%) 明显高于水提法 (12.69%)。但, 酿酒酵母用于制备桑黄多糖鲜有报道。

本研究以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为试验菌种对桑黄进行发酵, 在单因素试验基础上设计响应面试验进行发酵工艺优化, 制备发酵桑黄多糖 (fermented *S. sanghuang* polysaccharide, SSP-F), 通过高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法、傅里叶红外光谱、扫描电镜、X-衍射及抗氧化活性试验与本实验室制备的水提桑黄多糖 (water extracted *S. sanghuang* polysaccharide, SSP-W) 进行结构和活性两方面的比较。以为桑黄资源的合理开发和高效利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与菌种

桑黄 (批号: QYZB01240101, 山东省临清市清源正本生物医药科技有限公司), 经聊城大学农学院戴明勋副教授鉴定为桑树桑黄 (*Sanghuangporus sanghuang*) 子实体, 标本 (230201) 现保存于聊城大学生命科学学院; 酿酒酵母 (*S. cerevisiae* S-04) 购于弗曼迪斯酵母有限公司 (原产地: 比利时), 现保存于聊城大学生命科学学院微生物实验室。

1.2 试剂与仪器

浓硫酸 (纯度: $\geq 98\%$, 批号: 20231106, 莱阳经济技术开发区精细化工厂); 抗坏血酸 (vitamin C,

V_C) (纯度: ≥99.7%, 批号: 20211108, 天津市风船化学试剂科技有限公司)、蔗糖(分析纯, 批号: 20181214, 国药集团化学试剂有限公司); 苯酚(纯度: ≥99%, 批号: 20230504, 天津市大茂化学试剂厂); 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA) (批号: 20230706, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基 (yeast extract peptone dextrose medium, YPD) (批号: 20201008, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); 无水乙醇(纯度: ≥99.7%, 批号: 20220903, 烟台远东精细化工有限公司)。

Nicolet iS50 傅里叶红外光谱仪、CarboPac PA20 阴离子交换分析柱 (3 mm×150 mm)、Helios-G4-CX 双束扫描电镜、Sorvall Biofuge Stratos 高速冷冻离心机 (美国赛默飞世尔科技公司); abonce-150CH 恒温恒湿箱 (天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司); HNYC-203T 智能恒温培养振荡器 (天津欧诺仪器股份有限公司); FD-1C-50 冷冻干燥机 (上海比朗仪器制造有限公司); RE-2 000B 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); 721 可见分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 水提桑黄多糖的制备

参照本实验室前期获得的最佳提取工艺进行 SSP-W 的制备。方法如下: 称取原料 1.0 g, 提取时间 2.4 h、提取温度 95 °C、液料比 27 : 1 (mL/g)。离心 (5 000 r/min, 20 min)、抽滤 (15~20 μm), 得上清液, 80 °C 旋转蒸发浓缩, 加入 4 倍体积 95%乙醇, 4 °C 醇沉 10 h, 离心 (5 000 r/min, 10 min) 弃上清, 冷冻干燥, 得 SSP-W。

1.3.2 酿酒酵母发酵法制备桑黄多糖的工艺优化

1.3.2.1 酿酒酵母的活化

采用连续划线法将前期保存的酿酒酵母接种于 PDA 平板培养基上, 倒置于 30 °C 恒温恒湿箱中活化 2 d, 活化后挑取单菌落连续划线接种于 PDA 斜面培养基上, 置于 30 °C 恒温恒湿箱中活化 2 d, 备用。

1.3.2.2 种子液的制备

取活化后的酿酒酵母接种于 YPD 液体培养基中, 摇床 (180 r/min, 30 °C) 培养 12 h, 即得种子液。

1.3.2.3 发酵过程与多糖制备

发酵液中加入蔗糖 (9 mg/mL), 混匀, 添加酿酒酵母种子液, 于摇床 30 °C、180 r/min 进行发酵。所得发酵液离心 (5 000 r/min, 20 min), 抽滤, 滤液 100 °C 水浴灭菌 20 min, 80 °C 浓缩, 加入 4 倍体积 95%乙醇, 4 °C 醇沉 10 h。醇沉液离心 (5 000 r/min, 10 min), 沉淀冷冻干燥, 得 SSP-F。

1.3.2.4 单因素试验

设计发酵时间 (16、22、28、34、40 h)、接种量 (4%、6%、8%、10%、12%) 和 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0) 三个单因素, 分别考察发酵时间、接种量、pH 对 SSP-F 提取得率 (R) 的影响。按公式 (1) 计

算 SSP-F 的提取得率 (R)。

$$R = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中, m 为桑黄多糖质量, g; M 为桑黄子实体粉末质量, g。

1.3.2.5 响应面试验设计

利用 Design-Expert.8.05 软件, 在单因素试验基础上, 设计 Box-Behnken 中心组合试验, 相关因素水平见表 1。

表 1 响应面设计因素与水平

Table 1 Response surface design factors and levels

| 水平 | 因素 Factor | | |
|-------|-----------------------|----------------------|-------|
| Level | A: 发酵时间 | B: 接种量 | C: pH |
| | Fermentation time (h) | Vaccination load (%) | |
| -1 | 22 | 8 | 5.0 |
| 0 | 28 | 10 | 6.0 |
| 1 | 34 | 12 | 7.0 |

1.3.3 多糖和蛋白含量测定

参照 Ren 等^[8]的方法分别测定总糖、还原糖和蛋白含量, 并稍作改动。它们的标准曲线分别为 $Y=9.6986X-0.0174$ ($R^2=0.9980$)、 $Y=0.9327X-0.0539$ ($R^2=0.9901$)、 $Y=8.4129X+0.0422$ ($R^2=0.9922$), 根据标准曲线可计算样品中各项指标的质量浓度 (C)。按公式 (2) 计算总糖含量 (W_1)、还原糖含量 (W_2) 和蛋白含量 (W_3)。根据公式 (3) 计算多糖含量 (W_4)。

$$W = \frac{C \times V}{M} \times 100\% \quad (2)$$

$$W_4 = W_1 - W_2 \quad (3)$$

式中, C 为根据标曲计算得到的样品总糖、还原糖、蛋白质量浓度, mg/mL; V 为样品溶液总体积, mL; M 为粗多糖质量, mg。

1.3.4 结构表征

1.3.4.1 单糖组分分析

采用高效离子交换色谱法进行检测, 具体实验步骤参照 Ren 等^[8]。

1.3.4.2 傅里叶红外光谱

采用傅里叶红外光谱法 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 进行检测, 取 1 mg 多糖样品按 1:100 的比例加入 KBr 粉末, 研匀压片, 扫描范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 累积 32 次。

1.3.4.3 扫描电镜分析

取多糖样品 1.0 mg，双面胶碳带固定，置于离子溅射仪中镀一层导电金粉，之后安放在扫描电镜下观察，在加速电压为 10.0 kV，10 000×和 30 000×倍率下进行扫描电子显微镜观察。

1.3.4.4 X-射线衍射

在电压 40 kV，电流 30 mA，角度 5~45°，扫描速率 10°/min 进行 X-射线衍射仪测定。

1.3.5 抗氧化活性测定

1.3.5.1 羟自由基清除能力

参考 Zhang 等^[14]的方法并稍作改动，分别配制不同浓度的 SSP-W 和 SSP-F 样品液（62.5、125.0、250.0、500.0、1 000.0、1 500.0、2 000.0 μg/mL），以相同浓度梯度范围的 V_C为阳性对照，测定各反应 510 nm 处的吸光值，按公式（4）计算羟自由基清除率（I）

$$I = 1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中，A₀为蒸馏水代替样液反应的吸光值，A_i为样品组吸光值，A_j为无水乙醇代替水杨酸反应液所得吸光值。

1.3.5.2 还原力测定

参考 Liu 等^[15]的方法并稍作改动，分别配制不同浓度的 SSP-W 和 SSP-F 样品液（62.5、125.0、250.0、500.0、1 000.0、1 500.0、2 000.0 μg/mL），以相同浓度梯度范围的 V_C做阳性对照，测定各反应 700 nm 处的吸光值。

1.3.5.3 ABTS⁺自由基清除能力

参考 Liu 等^[15]的方法并稍作改动，分别配制不同浓度的 SSP-W 和 SSP-F 样品液（62.5、125.0、250.0、500.0、1 000.0、1 500.0、2 000.0 μg/mL），以相同浓度梯度范围的 V_C为阳性对照，测定各反应 734 nm 处的吸光值，按公式（4）计算 ABTS⁺自由基清除率。式中，A₀为蒸馏水代替样液反应的吸光值，A_i为样品组吸光值，A_j为蒸馏水代替 ABTS 反应液所得吸光值。

1.4 数据处理

实验数据重复 3 次，结果以均值±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，数据采用 Excel、SPSS Statistics 19 和 Origin 2021 进行统计、分析及绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

发酵时间对 SSP-F 提取得率的影响见图 1A。发酵时间在 16~28 h 时，SSP-F 提取得率不断提高，且在 28 h 达到最大值，随后开始下降。原因可能是发酵时间过长，培养基中营养物质缺乏，酿酒酵母为维持生长，消耗了发酵液中的糖分及其他营养物质^[10]。因此，选取 28 h 为最佳发酵时间。

接种量对 SSP-F 提取得率的影响见图 1B。当接种量在 4%~10%时，SSP-F 提取得率不断提高，且在

10%达到最大值，随后开始下降。原因可能是接种量过少时，菌体数量少，代谢产酶量低，导致提取得率低；接种量过多时，培养基中的营养不足以供菌体生长，导致菌体衰老自溶，产酶量下降，进而导致提取得率降低^[16]。由此可得，10%为最佳接种量。

pH 对 SSP-F 提取得率的影响见图 1C。pH 在 3.0~6.0 时，多糖提取得率逐渐上升，pH 为 6 时，多糖得率最高，随后出现下降的趋势。这可能是因为酿酒酵母适宜在偏酸性环境生长，pH 过高或过低都会影响酿酒酵母对发酵液中营养物质的吸收利用情况^[17]。因此，选取 pH 6.0 为最佳 pH。

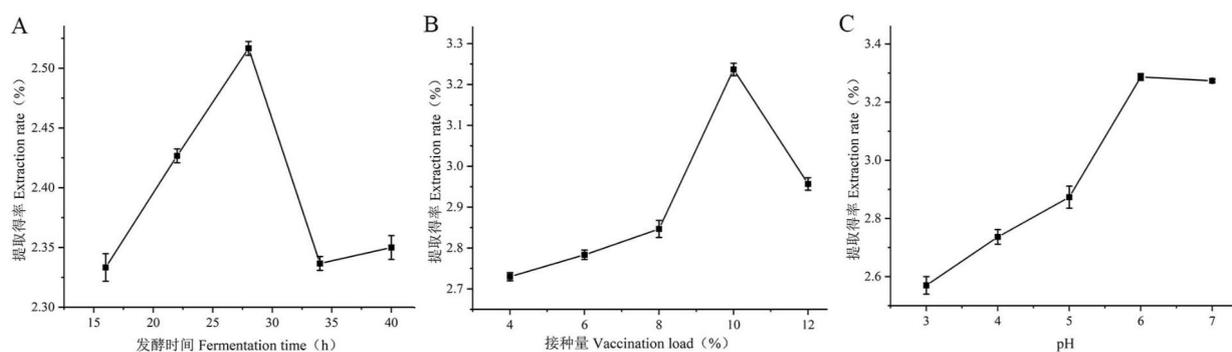


图 1 不同因素对 SSP-F 提取得率的影响

Fig.1 Effect of different factors on SSP-F extraction rate

2.2 响应面设计

响应面 17 组试验组合及结果见表 2，回归方程为： $Y=3.15+0.027 5A-0.023 8B+0.121 2C+0.017 5AB+0.072 5AC-0.105 0BC-0.124 5A^2-0.177 0B^2-0.022 0C^2$ 。

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results of response surface

| 编号 | A: 发酵时间 | B: 接种量 | C: pH | Y: 提取得率 |
|-----|-------------------|------------------|-------|-----------------|
| No. | Fermentation time | Vaccination load | | Extraction rate |
| | (h) | (%) | | (%) |
| 1 | -1 | 0 | -1 | 2.92 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 3.20 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 3.02 |
| 4 | -1 | -1 | 0 | 2.93 |
| 5 | 0 | -1 | 1 | 3.21 |
| 6 | -1 | 0 | 1 | 2.96 |
| 7 | 0 | 1 | 1 | 3.00 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 3.24 |

| | | | | |
|----|----|----|----|------|
| 9 | 1 | 0 | -1 | 2.91 |
| 10 | 1 | 1 | 0 | 2.81 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 3.13 |
| 12 | 1 | -1 | 0 | 2.87 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 3.15 |
| 14 | 0 | -1 | -1 | 2.70 |
| 15 | -1 | 1 | 0 | 2.80 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 3.26 |
| 17 | 0 | 0 | -1 | 2.91 |

由表 3 可知, 该模型 $P=0.0140 < 0.05$, 显著, 失拟项 $P=0.4500 > 0.05$, 不显著, 模型拟合度较好; $R^2=0.8847$, 说明模型与实际试验拟合度较好; $R_{Adj}^2=0.7364$, 说明该模型能够解释 73.64% 的响应值变化, 说明该模型具有较高的准确性。

表 3 方差结果分析

Table 3 Analysis of variance results

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|--------------------|----------------|--------------------|-------------|---------|---------|---------------------|
| Source of variance | Sum of squares | Degrees of freedom | Mean square | F value | P value | Significance |
| 模型 Model | 0.4084 | 9 | 0.0454 | 5.97 | 0.0140 | * |
| A | 0.0061 | 1 | 0.0061 | 0.7954 | 0.4021 | - |
| B | 0.0045 | 1 | 0.0045 | 0.5932 | 0.4664 | - |
| C | 0.1176 | 1 | 0.1176 | 15.46 | 0.0057 | ** |
| AB | 0.0012 | 1 | 0.0012 | 0.1610 | 0.7002 | - |
| AC | 0.0210 | 1 | 0.0210 | 2.76 | 0.1404 | - |
| BC | 0.0441 | 1 | 0.0441 | 5.80 | 0.0469 | * |
| A ² | 0.0653 | 1 | 0.0653 | 8.58 | 0.0220 | * |
| B ² | 0.1319 | 1 | 0.1319 | 17.34 | 0.0042 | ** |
| C ² | 0.0020 | 1 | 0.0020 | 0.2679 | 0.6207 | - |
| 残差 Residual | 0.0532 | 7 | 0.0076 | - | - | - |
| 失拟项 Lack of fit | 0.0239 | 3 | 0.0080 | 1.09 | 0.4500 | 不显著 Not significant |
| 纯误差 Pure error | 0.0293 | 4 | 0.0073 | - | - | - |
| 总误差 Cor total | 0.4616 | 16 | - | - | - | - |

| | | | | | |
|-------------|---------|---|---|---|---|
| R^2 | 0.884 7 | - | - | - | - |
| R_{Adj}^2 | 0.736 4 | - | - | - | - |

注: *差异显著 ($P<0.05$) ; **差异极显著 ($P<0.01$) 。

Note: *Differences are significant ($P<0.05$); **Differences are highly significant ($P<0.01$).

响应面曲线、等高线及方差结果分析中的 F 值均可作为判断各因素交互作用强弱的标准。响应面曲线越陡、等高线越趋于椭圆形, F 值越大, 因素间交互作用越强; 反之越弱。由图 2 及 F 值可以看出: BC 交互作用最强, AC 交互作用次之, AB 交互作用最弱。

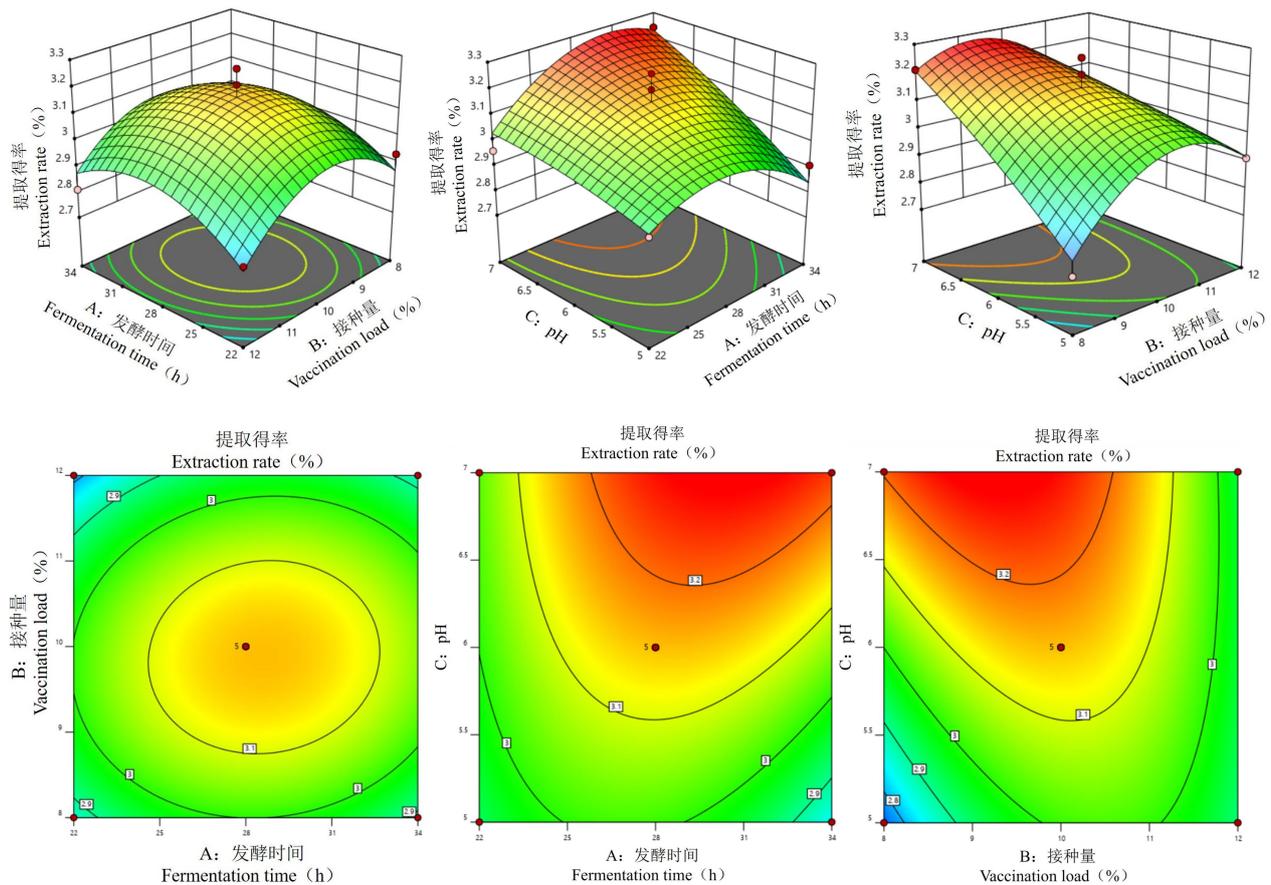


图 2 不同因素交互作用对 SSP-F 提取得率的影响

Fig.2 Effect of different factor interactions on SSP-F extraction rate

响应面预测最优工艺条件为: 发酵时间 30.265 h、接种量 9.311%、pH 7.0, 预测提取得率 3.294%。微调发酵时间 30.3 h、接种量 9.3%、pH 7.0, 实际提取得率 (3.300 ± 0.105)%, 与预测值误差为 0.18%。

2.3 单糖组分和理化性质

由图 3 可知, SSP-W 和 SSP-F 的单糖组成均为岩藻糖 (Fuc)、氨基葡萄糖 (GlcN)、葡萄糖 (Glc) 和甘露糖 (Man), 摩尔比分别为 40.17 : 32.96 : 74.97 : 43.09; 32.87 : 35.59 : 70.83 : 45.85。SSP-W 和 SSP-F 的单糖组分相同, 但其摩尔百分比有明显不同。造成这两种多糖单糖组成差异的原因可能是发酵产生了新的多糖组分^[18]。

由表 4 可知, SSP-F 的总糖含量、还原糖含量、多糖含量及蛋白含量均高于 SSP-W, 其中多糖含量提高了 14.37%; 二者均未检测出糖醛酸, 但从图 3 可以看出, SSP-F 的糖醛酸吸收峰略高于 SSP-W。

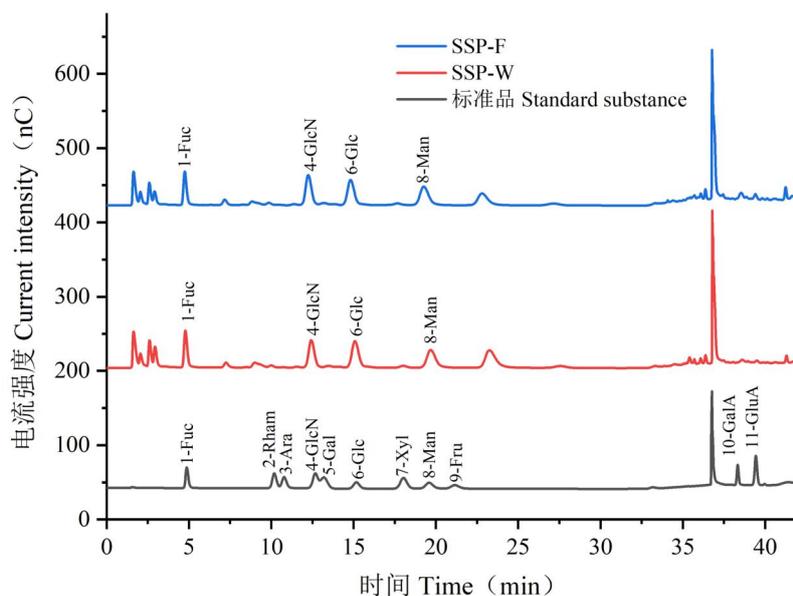


图 3 SSP-W 和 SSP-F 的 HPAEC-PAD 色谱图

Fig.3 HPAEC-PAD chromatograms of SSP-W and SSP-F

表 4 SSP-W 和 SSP-F 的理化性质与单糖组成

Table 4 Physicochemical property and monosaccharide composition of SSP-W and SSP-F

| 样品 Sample | | SSP-W | SSP-F |
|-----------------------------------|-----------|------------|-------------|
| 总糖含量 Total sugar content (W%) | | 30.73±1.19 | 34.03±1.50* |
| 还原糖含量 Reducing sugar content (W%) | | 9.42±0.22 | 9.67±0.17 |
| 多糖含量 Polysaccharide content (W%) | | 21.31±1.33 | 24.36±1.47 |
| 蛋白含量 Protein content (W%) | | 9.71±0.22 | 12.08±0.04* |
| 糖醛酸 Uronic acid (W%) | | - | - |
| 单糖组成 Carbohydrate composition | Fuc (M%) | 21.01 | 17.75 |
| | GlcN (M%) | 17.24 | 19.22 |
| | Glc (M%) | 39.21 | 38.26 |
| | Man (M%) | 22.54 | 24.77 |

注: W%表示质量百分比; M%表示摩尔百分比; “-”表示未检测出; *与 SSP-W 相比, 差异显著 ($P<0.05$)。

Note: W% indicates mass percentage; M% indicates molar percentage; “-” indicates not detected; *Indicates significant difference compared to SSP-W ($P<0.05$).

2.4 傅里叶红外光谱分析

SSP-W 和 SSP-F 的 FT-IR 结果见图 4。SSP-W 和 SSP-F 在 3415 cm^{-1} 和 3412 cm^{-1} 处较宽的强吸收峰为 OH 伸缩振动； 2923 cm^{-1} 和 2852 cm^{-1} 的较弱峰为甲基中 C-H 伸缩振动； 1644 cm^{-1} 和 1644 cm^{-1} 可能为 -CHO 中 C=O 伸缩振动； 1390 cm^{-1} 和 1401 cm^{-1} 为 -COOH 伸缩振动；在 1240 cm^{-1} 和 1244 cm^{-1} 为 SO_4^{2-} 中 S=O 的吸收峰；在 1079 cm^{-1} 和 1080 cm^{-1} 的吸收峰表明吡喃环的存在^[8]。由此表明 SSP-F 的特征吸收峰较 SSP-W 并没有发生明显的变化，也没有出现新的官能团，这说明发酵并没有破坏桑黄多糖的基本骨架。

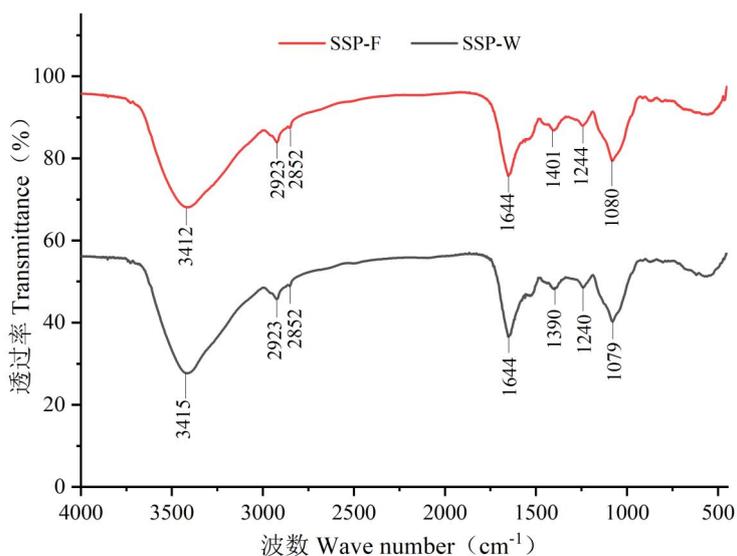


图 4 SSP-W 和 SSP-F 的 FT-IR 图

Fig.4 FT-IR spectrum of SSP-W and SSP-F

2.5 扫描电镜

SSP-W 和 SSP-F 的表面微观结构见图 5。在 10 000 倍显微条件下，SSP-W 整体呈现出聚集成团的状态，表面出现明显的凹凸不平，而 SSP-F 整体较分散，表面有凸起（见图 5A、5B）；在 30 000 倍显微条件下，可以明显观察到 SSP-W 表面存在孔洞，且孔径呈现出大小不一的特征，结构疏松，而 SSP-F 表面有圆球状凸起，排列紧密（见图 5C、5D）。推测可能是发酵改变了桑黄多糖的形貌，使之与 SSP-W 存在差异，进而改变了桑黄多糖的吸水性、导电性及结构分布^[19]。

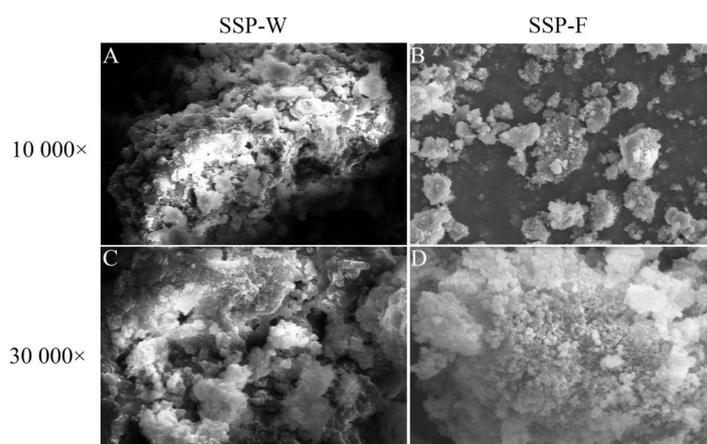


图 5 SSP-W 和 SSP-F 的扫描电镜图谱

Fig.5 Scanning electron microscopy atlas of SSP-W and SSP-F

2.6 X-衍射

SSP-W 和 SSP-F 的 XRD 结果如图 6 所示，SSP-W 在 30° 左右存在两个尖锐的衍射峰，表明其中有结晶态聚合物，SSP-F 未发现尖锐衍射峰；此外，这两种多糖均显示出较大的馒头峰，这表明其内部含有丰富的无定形成分^[20]。由此表明，SSP-W 是以结晶态聚合物和非结晶态聚合物的形式共存，而 SSP-F 是以非结晶态聚合物的形式存在。

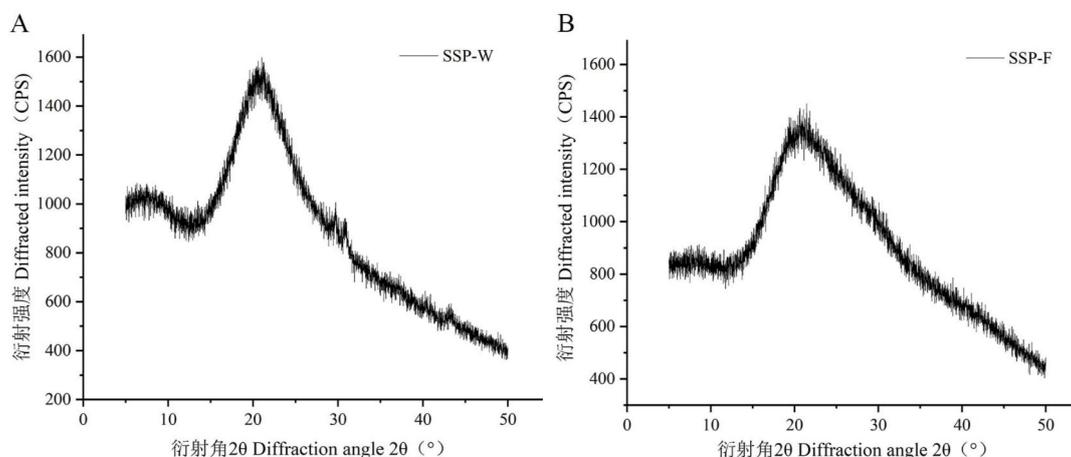


图 6 SSP-W 和 SSP-F 的 X 射线衍射图

Fig.6 X-ray diffraction diagrams of SSP-W and SSP-F

2.7 抗氧化活性

SSP-W 和 SSP-F 清除羟自由基试验结果如图 7A 和表 5 所示，以 V_C 为阳性对照，随着样品浓度不断增加，清除率不断升高，在样品浓度为 $2000.0 \mu\text{g/mL}$ 时，SSP-F 的清除率为 90.94%，比 SSP-W (84.27%) 提高了 7.92%，且 SSP-W 和 SSP-F 的半最大效应浓度 EC_{50} 值 (concentration for 50% of maximal effect, 表示自由基清除率达到 50% 时的样品浓度) 分别为 $488 \mu\text{g/mL}$ 和 $408 \mu\text{g/mL}$ ，说明 SSP-F 具有较强的羟自由基清除能力。

还原力的强弱与吸光值的高低成正比, $RP_{0.5AU}$ 值 (reducing power, 表示吸光值达到 0.5 时的样品浓度) 越低还原力越强。还原力测定试验结果如图 7B 所示, 随着样品浓度不断增加, 还原力不断升高。SSP-W 和 SSP-F 的 $RP_{0.5AU}$ 值分别为 654 $\mu\text{g/mL}$ 和 587 $\mu\text{g/mL}$ (见表 5)。说明 SSP-F 具有较强的还原力。

如图 7C 和表 5 (V_C 为阳性对照), 随着样品浓度不断增加, 清除率不断升高, 在浓度为 2 000.0 $\mu\text{g/mL}$ 时 SSP-F 的 $ABTS^+$ 自由基清除率更接近 V_C , 且 SSP-W 和 SSP-F 的 EC_{50} 值分别为 75 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$ 。说明 SSP-F 具有显著的 $ABTS^+$ 自由基清除能力。

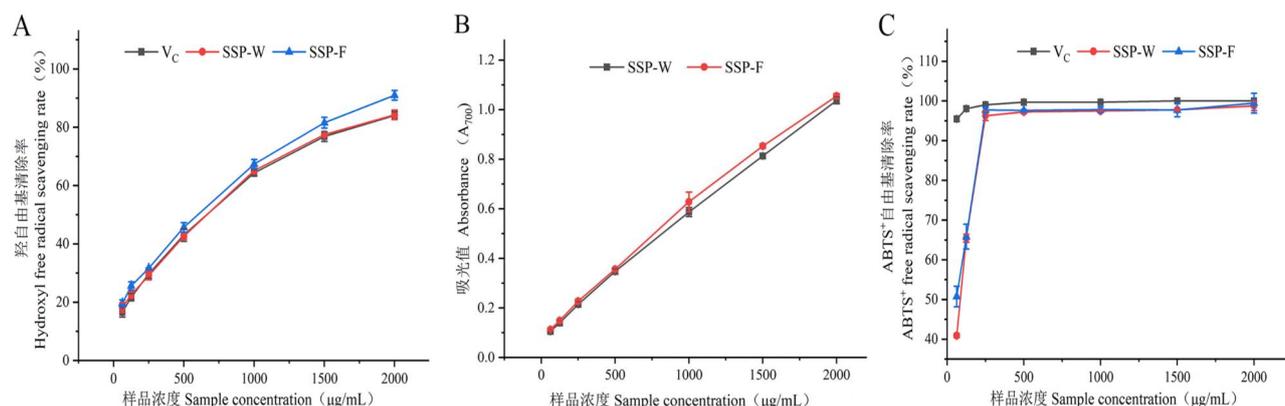


图 7 SSP-W 和 SSP-F 的抗氧化活性

Fig.7 Antioxidant activity of SSP-W and SSP-F

表 5 SSP-W 和 SSP-F 的抗氧化活性 EC_{50} 值

Table 5 EC_{50} values of antioxidant activity of SSP-W and SSP-F

| 样品 Sample | EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | | $RP_{0.5AU}$ ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| | 羟自由基 Hydroxyl radical | $ABTS^+$ 自由基 $ABTS^+$ free radical | |
| | Vc | 499 | |
| SSP-W | 488 | 75 | 654 |
| SSP-F | 408 | 64 | 587 |

3 讨论与结论

本研究以酿酒酵母为试验菌种, 用来发酵桑黄成功制备了 SSP-F, 最佳发酵工艺为: 发酵时间 30.3 h、接种量 9.3%、pH 7.0。在此条件下, 提取得率为 3.30%。较本实验室前期 SSP-W 的提取得率 (2.34%) 提高了 41.03%。SSP-W 和 SSP-F 均是以吡喃环为基本骨架的复合多糖, 由 Fuc、GlcN、Glc 和 Man 4 种单糖组成, 但其摩尔比有明显不同。电镜结果表明, SSP-W 有明显的孔洞, 排列疏松; SSP-F 表面有圆球状凸起, 排列紧密。X-衍射结果表明, SSP-W 是结晶态聚合物和非结晶态聚合物共存的多糖, 而 SSP-F 是以非结晶态聚合物的形式存在。抗氧化活性结果表明, SSP-F 的羟自由基清除率、还原力及 $ABTS^+$ 自由基清除率均高于 SSP-W。

综上所述,酿酒酵母发酵桑黄显著提高了桑黄多糖的提取得率和抗氧化活性,由此表明,酿酒酵母发酵法制备桑黄多糖是一种有效的方法。本研究为制备桑黄多糖提供了新思路,开辟了一条新途径,后续研究将对 SSP-F 进一步分离纯化和活性评价,并对其化学结构和构效关系做进一步的探讨,以期为大型真菌的发酵法制备活性多糖提供科学依据。

参考文献

- 1 Ni ZZ,Li JT,Qian XY,et al.*Phellinus igniarius* polysaccharides ameliorate hyperglycemia by modulating the composition of the gut microbiota and their metabolites in diabetic mice[J].*Molecules*,2023,28:7136.
- 2 Liu JZ,Song JY,Gao FS,et al.Extraction,purification,and structural characterization of polysaccharides from *Sanghuangporus vaninii* with anti-inflammatory activity[J].*Molecules*,2023,28:6081.
- 3 Xu WW,Lu CX,Xiao X,et al.Research progress on the extraction and purification technology and pharmacological effects of polysaccharides from *Sanghuangporus*[J].*News Seric Sci(蚕学通讯)*,2022,42:20-30.
- 4 Wan XL,Jin X,Xie ML,et al.Characterization of a polysaccharide from *Sanghuangporus vaninii* and its antitumor regulation via activation of the p53 signaling pathway in breast cancer MCF-7 cells[J].*Int J Biol Macromol*,2020,163:865-877.
- 5 Lu JG,Su MM,Zhou X,et al.Research progress of bioactive components in *Sanghuangporus spp*[J].*Molecules*,2024,29:1195.
- 6 Qin DD,Han S,Liu ML,et al.Polysaccharides from *Phellinus linteus*:a systematic review of their extractions,purifications,structures and functions[J].*Int J Biol Macromol*,2023,230:123163.
- 7 Lin GL,Li YY,Chen XH,et al.Extraction,structure and bioactivities of polysaccharides from *Sanghuangporus spp.*:a review[J].*Food Biosci*,2023,53:102587.
- 8 Ren HF, Pang MY,Sui XY,et al.Freeze-thaw extraction optimization, structural features and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J].*Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*,2024,45:11-20.
- 9 Wu YL,Xu Z,Fei SY,et al.Study on the extraction process of active components of *Ganoderma lucidum* after microbial fermentation pretreatment[J].*J Zhejiang Agric Sci(浙江农业科学)*,2023,64:2510-2514.
- 10 Wang RN,Li RY,Zheng P,et al.Microbial fermentation extraction,characterization and antioxidant activity of *Polygonatum* polysaccharide[J].*China Food Addit(中国食品添加剂)*,2022,33:54-62.
- 11 Chen L,Zhou SW,Xu KK,et al.Optimization of solid state fermentation conditions of *Rabdosia rubescens* dregs[J].*J Henan Agric Sci(河南农业科学)*,2024,53:169-180.
- 12 He Y,Wang XF.Response surface optimization for the extraction of lentinan feed additives by yeast fermentation[J].*China Feed(中国饲料)*,2022,7:106-110.
- 13 Fan JM,Bai RB,Wang Y,et al.Study on the extraction process and immune activity of polysaccharides from fresh *Codonopsis Sslosula* by yeast fermentation[J].*Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*,2022,39:2444-2450.

- 14 Zhang HQ,Zhu LQ,Zeng NY,et al.Optimization of extraction process of *Phellinus lonicerinus* polysaccharide and analysis of its antioxidant activity *in vitro*[J]. NatProd Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:581-588.
- 15 Liu YS,Zhang J,REN HF, et al. Extraction, purification, structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from the fruiting body of Guanxian *Ganoderma lucidum* [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2023,44:81-89.
- 16 Ma B,Sun LX,Qiao YZ.Research on extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* by *Paenibacillus polymyxa* fermentation method[J].China Condiment,2020,45:38-40.
- 17 Zhou XL,Lu Y,Zhu KL,et al.Optimization of polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt pomace by fermentation and its antioxidant activity[J].Food Res Dev(食品研究与开发),2019,40:24-29.
- 18 Chen X,Zhang HB,Du WQ,et al.Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Crataegus pinnatifida* Bunge[J].Int J Biol Macromol,2020,150:1011-1019.
- 19 Yang Z,Liu YL,Li LX,et al.Process optimization,physicochemical properties and antioxidant activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide prepared by solid-state fermentation[J].Food Ferment Ind(食品与发酵工业),2024,50:92-98.
- 20 Chen YY,Ping H,Gao Y,et al.Isolation,purification,structure characterization and antibacterial activity of polysaccharides from proso millet bran[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2024,45:1-7.

收稿日期：2024-05-31 接受日期：

基金项目：国家自然科学基金(32300031)；山东省自然科学基金项目(ZR2023MB095)；聊城大学科研基金项目(318011707)

*通信作者 Tel: 8230787; E-mail: wyxx2008@163.com