

In Vitro Hypoglycemic and Hypolipidemic Activities of LEP

Yuting Liu, Jin Wang, Ming Ye, Jinglei Li*

School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei Anhui
Email: *lijinglei2010@hotmail.com

Received: Feb. 14th, 2019; accepted: Feb. 28th, 2019; published: Mar. 8th, 2019

Abstract

Several fungal polysaccharides possess hypoglycemic, hypolipidemic and other biological activities. Through deep fermentation, *Lachnum* sp. can produce extracellular polysaccharides which have shown a variety of biological activities proved by previous studies. In this study, a 100 L fermenter was used to ferment *Lachnum* YM240, and the extracellular polysaccharide was extracted and separated from the fermentation broth. The results showed that the extraction rate of exopolysaccharide (LEP) was 0.14 g/L which is presumed to be mainly neutral and acidic polysaccharides. Then, *in vitro* hypolipidemic and hypoglycemic activities of LEP were examined. It was found that LEP has a significant inhibitory effect on α -glucosidase and α -amylase activity, showing certain *in vitro* hypoglycemic activity. At the same time, LEP inhibited lipase activity and could significantly bind cholate, showing a strong *in vitro* hypolipidemic activity. Through the above studies, it is shown that LEP has a certain hypoglycemic and hypolipidemic activity *in vitro*, which provides a scientific basis for further elucidation of the working mechanism.

Keywords

Polysaccharides, *Lachnum* sp., Hypoglycemic, Hypolipidemic

粒毛盘菌胞外多糖体外降血糖和降血脂活性研究

刘玉婷, 王进, 叶明, 李井雷*

合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥
Email: *lijinglei2010@hotmail.com

收稿日期: 2019年2月14日; 录用日期: 2019年2月28日; 发布日期: 2019年3月8日

*通讯作者。

摘要

多种真菌活性多糖具有降血糖、降血脂等生物活性作用。粒毛盘菌经深层发酵可以产生胞外多糖，前期研究显示其具有多种生物活性。本研究首先采用大罐发酵粒毛盘菌YM240，再对其发酵液进行胞外多糖的提取、分离纯化，结果显示粒毛盘菌胞外多糖(LEP)的提取率为0.14 g/L，主要组分推测为中性多糖和酸性多糖。然后对LEP降血糖、降血脂活性进行了体外活性检测，发现LEP对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性具有明显的抑制作用，表现出一定的体外降血糖活性；同时，LEP可以抑制脂肪酶活性，并且可以显著结合胆酸盐，表现出较强的体外降血脂活性。通过以上研究，表明了LEP在体外具有一定的降血糖和降血脂活性，为进一步阐明作用机理提供了科学根据。

关键词

多糖，粒毛盘菌，降血糖，降血脂

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

粒毛盘菌属(*Lachnum* sp.)是一种广泛分布于自然界的腐生性真菌，隶属于盘菌纲(Discomycetes)柔膜菌目(Helotiales)晶杯菌科(Hyaloscyphaceae) [1]。本课题组前期对多种粒毛盘菌的生物活性物质已经进行了诸多研究[2] [3] [4]。粒毛盘菌胞外多糖(LEP)是粒毛盘菌通过深层发酵产生的多糖类生物活性物质。LEP具有多种生物活性，包括降血糖、降血脂、抗炎症、抗癌等[3] [4] [5]。同时，LEP的分子量、单糖组成、糖苷键类型、空间构象等理化因素对其生物活性具有重要的影响。

随着生活水平的提高和饮食习惯的改变，高血糖、高血脂等各种慢性疾病的发病率日益提高，已经成为严重影响国人身体健康的疾病类型。由于高血糖和高血脂疾病一般都伴随出现，因此寻找开发具有同时降低血糖和血脂的天然药物具有重要的现实意义[6]。

本文研究深层发酵粒毛盘菌 YM240，从发酵液中分离获得 LEP 粗提物，并进行了初步的纯化处理，同时利用体外实验方法检测了 LEP 的降血糖和降血脂活性。研究结果显示 LEP 可以有效地抑制 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶和脂肪酶活性，同时有效结合胆酸盐，表现出较强的体外降血糖和降血脂活性，为进一步阐明其作用机理提供了一定的科学根据。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

菌株：粒毛盘菌 YM240 由合肥工业大学微生物资源与应用研究室分离。

葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、氯仿购自天津市博迪化工有限公司；可溶性淀粉、3,5-二硝基水杨酸、四水合酒石酸钾钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸钠、聚乙烯醇、橄榄油、胰脂肪酶、胃蛋白酶、 α -淀粉酶、阿卡波糖购自国药集团化学试剂有限公司； α -葡萄糖苷酶、PNPG 购自阿拉丁试剂公司；浓盐酸、浓硫酸、苯酚购自上海中成化学试剂有限公司；其他常规药品均为市售分析纯药品。

2.2. 仪器与设备

SW-CJ-ICU 型超净工作台, 上海博讯实业有限公司; 250 D 数显光照培养箱, 江苏省正基仪器有限公司; TDL-50B 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; RE-85 旋转蒸发器, 上海青浦沪西仪器厂; 冷冻干燥机 FD-1B-50, 北京博医康实验仪器有限公司; 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 680 iMark 酶标仪; 美国伯乐公司; 100 L 发酵罐, 镇江东方生物工程设备公司。

2.3. 粒毛盘菌 YM240 发酵条件

2.3.1. 种子发酵液制备

发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L, 酵母膏 5 g/L, 蛋白胨 5 g/L。配制 1 L, 分装于 10 个 250 mL 锥形瓶中, 用高压蒸汽灭菌锅 121℃ 下灭菌 30 分钟。待冷却至室温, 在超净工作台内将保藏良好的 YM 240 菌种接种于装有活化培养液的锥形瓶中, 置于摇床内在 25℃ 条件下活化 4 天, 摇床转速为 160 r/min。

2.3.2. 大罐发酵

配置 70 L 的发酵液, 发酵液配方与种子发酵液一致, 称取定量的葡萄糖, 酵母膏, 蛋白胨于 5 L 量杯中溶解待定。

使用 100 L 自控发酵罐进行发酵。首先将发酵罐清洗干净, 然后倒入发酵液, 加入蒸馏水至 70 L, 倒入 10 mL 左右色拉油(消泡剂), 于 121℃ 高压灭菌 30 min。灭菌结束后待发酵液冷却到 30℃ 时, 无菌条件下接种种子液。发酵条件设定为温度 30℃、搅拌速度 180 r/min, 发酵时间 12 天。

2.3.3. 生物量测定

于 250 mL 锥形瓶中接种一定量的粒毛盘菌, 摇床培养。培养一定时期, 将发酵液抽滤, 菌丝体用蒸馏水清洗 2~3 次后于 60℃ 干燥箱中烘干至恒重, 称重换算为菌体干重, 并记录不同发酵时间的生物量结果(生物量 = 菌体干重/发酵液体积)。

2.4. 粒毛盘菌 YM240 胞外多糖的提取纯化

2.4.1. LEP 粗多糖分离

发酵结束后, 将 70 L 发酵液抽滤后, 滤液抽入旋转蒸发器中, 利用真空泵抽真空于 50℃ 条件下浓缩, 直至留下 1 L 左右的浓缩液。向发酵液浓缩液中加入 3 倍体积的 95% 乙醇溶液, 在 4℃ 条件下醇沉 12 h。然后在室温条件在 4000 r/min 离心 10 min, 取沉淀物, 为 LEP 粗多糖[7]。

2.4.2. LEP 的初步纯化

1) 脱蛋白

由于粗多糖含有一定的蛋白质, 需要进行脱蛋白处理, 本研究采用 Sevage 法脱蛋白[8]。取多糖溶液加入 1/3 体积的 Sevage 试剂(氯仿、正丁醇体积比 5:1), 将混合物剧烈振荡 20 min, 静止 20 min。用分液漏斗分液, 分去水层与溶剂层交界处的变性蛋白, 重复以上操作至水相与溶剂相的交界面无胶状变性蛋白质时, 最终将多糖液集中于干净烧杯。

2) 脱色

脱蛋白结束后, 进行 H₂O₂ 脱色处理[9], 向多糖溶解液中加入其体积 10% 的浓度 30% 的 H₂O₂, 50 ℃ 保温脱色 2 天, 期间每隔 12 小时加一次 H₂O₂, 脱色最终得到淡黄色的溶液。

3) 多糖透析

将脱蛋白、脱色处理后的多糖水溶液置于透析袋(直径 25 mm、截留分子量 3500 Da)中, 自来水逆向流动透析 48 h, 再用蒸馏水透析 24 h。将透析后的多糖溶液倒入培养皿中分装, -80℃ 冷冻 24 h, 最后冷

冻干燥即得粒毛盘菌 YM240 胞外多糖(LEP)。

2.5. 粒毛盘菌 YM240 胞外多糖的分级分离

过柱前对 Sephadex G-100 凝胶进行预处理[10], 使用玻璃层析柱(1.6 × 60 cm), 填充高度 50 cm, 蒸馏水平衡过夜, 平衡流速 0.5~1 mL/min, 上样量为 15 mg, 用双蒸水洗脱, 层析柱上端进液口链接恒流泵, 每 2.5 分钟收集一管, 每管 2 mL。分别用蒸馏水, 0.1 mol/L, 0.3 mol/L, 0.5 mol/L NaCl 进行洗脱。用苯酚-硫酸法逐管追踪检测, 于 490 nm 下测定吸光度, 以管数对吸光度值绘制其洗脱曲线, 分离得到组分较多的单一组分。

2.6. 苯酚-硫酸法测多糖含量

采用苯酚-硫酸法测多糖含量[11], 取 1 mL LEP 溶液、5 mL 浓硫酸、1 mL 6%的苯酚于试管中混匀, 静置 10 min, 在 25℃水浴中保温 20 min, 490 nm 处测吸光值。对照葡萄糖标准曲线, 求得多糖含量。

2.7. 发酵过程中发酵液多糖含量的测定

取发酵第 7~11 天的锥形瓶内的发酵液利用苯酚-硫酸法测多糖含量。

2.8. LEP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

参照相关文献并做一定的修改, 检测 LEP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性[12]。通过 100 mM 磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 5.0)制备不同浓度(0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/mL)样品溶液, α -葡萄糖苷酶(2 U/mL)和对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG, 1.5 mM)。将样品(10 μ L)和 α -葡萄糖苷酶(20 μ L)的混合物在 37℃下保持 10 min。再加入 20 μ L 的 PNPG 在 37℃下温育 20 min, 最后加入 200 μ L Na₂CO₃(1 M)终止反应。不含样品的混合物作为对照, 阿卡波糖(Acarbose)作为阳性对照, 再做各自的空白实验。在 400 nm 读取吸光度, α -葡萄糖苷酶的抑制百分比按下式计算: 抑制率(%) = $[1 - (A_{\text{样品实验组}} - A_{\text{样品空白组}}) / (A_{\text{对照实验组}} - A_{\text{对照空白组}})] \times 100\%$ 。

2.9. LEP 对 α -淀粉酶的抑制作用

参照相关文献检测 LEP 对 α -淀粉酶的抑制作用[13]。在 0.1 M PBS (pH6.9)中制备不同浓度(0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/mL)样品溶液、2 U/mL α -淀粉酶和 1%可溶性淀粉。通过将 10 mg/mL 3,5-二硝基水杨酸与 120 mg/mL 酒石酸钠钾四水合物在 0.4 M 氢氧化钠中混合来制备定体积二硝基水杨酸(DNS)试剂。在 500 μ L 样品中加入 500 μ L 的 α -淀粉酶, 37℃下水浴 10 min, 随后加入 500 μ L 的马铃薯淀粉, 37℃下水浴 10 min, 加入 1 mL DNS 试剂终止反应, 100℃保持 5 min。冷却至室温后, 用 10 mL 去离子水稀释混合物。没有样品的反应混合物作为对照, 阿卡波糖作为阳性对照, 再做各自的空白实验。在 540 nm 处测量吸光度, 按下式计算 α -淀粉酶的抑制百分比: 抑制率(%) = $[1 - (A_{\text{样品实验组}} - A_{\text{样品空白组}}) / (A_{\text{对照实验组}} - A_{\text{对照空白组}})] \times 100\%$ 。

2.10. LEP 对脂肪酶抑制作用

脂肪酶抑制实验参照相关文献并做一定修改[14]。取 100 mL 锥形瓶 12 个, 每瓶加入 5 mL 0.025 mol/L PBS 和 4 mL 聚乙烯醇橄榄油乳化液, 置于 40℃水浴中保温 5 min。实验过程如下: 1) 在 1 个锥形瓶中各加入 1 mL 脂肪酶溶液, 从加入酶液开始计时, 继续保温 30 min; 取出后立即各加入体积分数为 95%的乙醇 15 mL, 以停止酶作用; 再加入酚酞指示剂 3 滴, 用 0.05 mol/L 氢氧化钠滴定至溶液呈粉红色为止, 记录氢氧化钠消耗的量。另取 1 只锥形瓶设对照, 不加入脂肪酶, 按相同方法进行, 再做各自的空白实

验。2) 取 5 只锥形瓶, 先加入多糖溶液 1 mL, 再加入 1 mL 脂肪酶溶液, 然后按(1)进行实验。另取 5 只锥形瓶设空白对照, 不加入脂肪酶, 按相同方法进行。

2.11. LEP 胆酸盐结合能力实验(模拟肠道环境)

本研究通过检测 LEP 胆酸盐结合能力判断其降血脂活性, 实验方法参照相关文献[14]。首先利用甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠绘制胆酸盐标准曲线, 然后在模拟肠道环境下检测 LEP 与胆酸盐结合能力, 判断其体外降血脂活性。

1) 胆酸盐标准曲线的绘制

首先分别绘制胆酸盐标准曲线, 取不同浓度的标准溶液(甘氨酸胆酸钠 0.03、0.06、0.12、0.18、0.24、0.30 mmol/L, 牛磺胆酸钠 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L) 2 mL 于具塞试管中, 加入 6 mL 质量分数 60%的 H_2SO_4 。反应溶液于 70℃水浴 20 min, 取出冰浴 5 min, 在 387 nm 波长处测定吸光度。以胆酸盐含量为横坐标, 吸光度为纵坐标绘得胆酸盐含量标准曲线, 由标准曲线求得样液中胆酸盐的浓度。

2) 模拟肠道环境下 LEP 与胆酸盐结合实验

分别移取 3 mL 不同浓度的 LEP 多糖溶液于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 3 mL 10 mg/mL 胃蛋白酶(用 pH6.3 的 0.1 mol/L PBS 配制), 1 mL 0.01 mol/L 的 HCl 溶液, 在 37℃条件下恒温振荡消化 1 h, 模拟肠道环境; 以 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 6.3, 随后加入 4 mL 10 mg/mL 胰蛋白酶(用 pH6.3 的 0.1 mol/L PBS 配制), 在 37℃条件下, 振荡速度为 150 r/min, 恒温振荡消化 1 h, 模拟肠道环境进行消化。每个样品中加入 4 mL 0.4 mmol/L 甘氨酸胆酸钠(用 pH 6.3 的 0.1 mol/L PBS 配制)、0.5 mmol/L 牛磺胆酸钠(用 pH6.3 的 0.1 mol/L PBS 配制), 在 37℃条件下恒温振荡 1 h 后混合物转移至离心管中, 4000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 比色法测定甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠含量, 每个样品平行 3 次。甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠结合率按式(1)、(2)计算。

$$\text{甘氨酸胆酸钠结合率}(\%) = (C1 - C2) / C1 \times 100 \quad (1)$$

式中: C1 为甘氨酸胆酸钠加入量/ μmol ; C2 为甘氨酸胆酸钠剩余量/ μmol 。

$$\text{牛磺胆酸钠结合率}(\%) = (C3 - C4) / C3 \times 100 \quad (2)$$

式中: C3 为牛磺胆酸钠加入量/ μmol ; C4 为牛磺胆酸钠剩余量/ μmol 。

3. 结果与分析

3.1. 粒毛盘菌生物量增长曲线

本研究从培养第七天(培养七天之后生物量较为显著)开始检测发酵液中粒毛盘菌 YM240 生物量, 并绘制其生长曲线(图 1)。从图 1 中可以看出, 随着发酵时间的延长, 生物量逐渐提高, 但是发酵后期的增长率逐渐降低, 推测原因为发酵液中营养物质的浓度已经处于下降趋势, 限制了粒毛盘菌的生物量的增加。同时, 从图 1 中还可以看出在发酵第 11 天, 粒毛盘菌 YM240 的生物量达到了最大值, 为 8.7 g/L。本课题组前期研究了不同的培养条件对萼状粒毛盘菌生物量和胞外多糖产量的影响, 不同培养条件萼状粒毛盘菌的生物量为 6~12 g/L [15]。赵天瑞等人研究了吡啶乙酸对冬虫夏草生物量的影响, 结果显示吡啶乙酸对冬虫夏草的生长有一定的刺激作用, 最大的生物量为 18.3 g/L [16]。与之前的研究结果相比, 本研究中获得生物量稍低, 可能的原因为不同的菌种和培养条件对生物量有一定的影响。

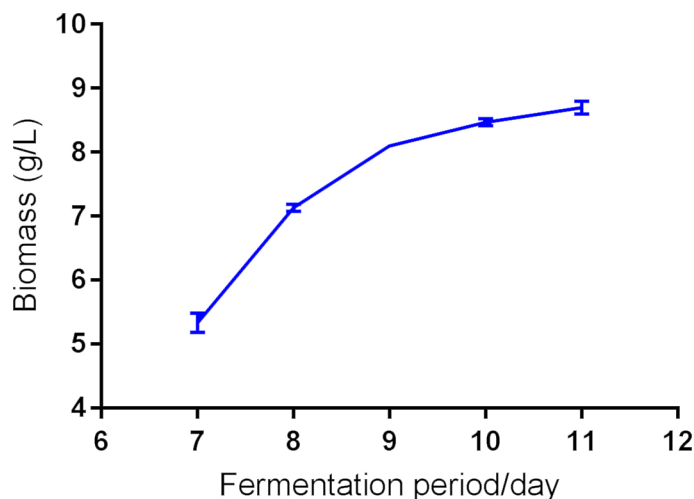


Figure 1. Biomass curve of YM240 during fermentation
图 1. 粒毛盘菌 YM240 生物量变化曲线

3.2. 粒毛盘菌胞外多糖生产曲线

在发酵过程中, 通过苯酚-硫酸法检测其发酵液中的胞外多糖含量。由图 2 可以看出, 发酵液中的胞外多糖含量在发酵第 7~9 天内不断提高, 在发酵第 10 天的时候胞外多糖的含量达到了峰值, 为 139.8 mg/L。之后, 胞外多糖含量明显下降。可能的原因推测为随着发酵过程的进行, 发酵液中的营养物质不断消耗, 在第 10 天的时候发酵液中的营养物质已经达到了临界值, 真菌开始通过降解胞外多糖来获得必须的营养物质, 导致胞外多糖的浓度开始下降。和本课题组前期研究结果相比[15], 我们在这里报道的多糖产量较低, 主要的原因可能是不同的菌种和发酵条件可能对多糖产量有影响。同时, 本研究中的多糖含量是经过分离纯化之后的多糖量, 在分离纯化过程中去除了蛋白质等杂质, 并且透析过程中也会损失部分多糖, 所以最终获得的多糖含量较低, 而前期的报道中主要是测量粗多糖的含量, 因此报道的数值较大[17] [18]。

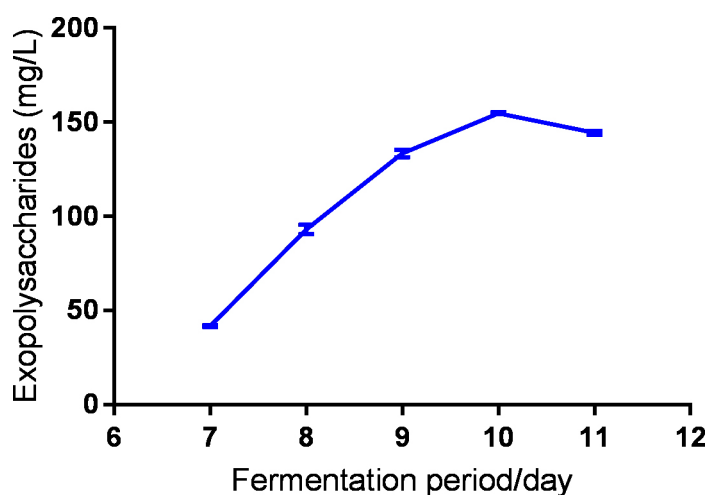


Figure 2. LEP production curve of YM240 during fermentation
图 2. 粒毛盘菌 YM240 发酵液中胞外多糖(LEP)生产曲线

3.3. 胞外多糖(LEP)的分级分离

对 LEP 进行脱蛋白、脱色和透析处理后, 进一步使用 Sephadex G-100 对 LEP 进行初步分离纯化。

LEP 经凝胶柱层析洗脱后得到四个主要的洗脱峰, 分别是用蒸馏水, 0.1 mol/L NaCl, 0.3 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaCl 四种溶液洗脱得到的多糖曲线(图 3)。由图 3 可知蒸馏水洗脱条件下所得多糖峰面积最大即洗脱含量最多, 在 0.1 mol/L NaCl 洗脱条件下获得的多糖含量稍少, 而 0.3 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L NaCl 洗脱条件下获得的多糖组分最少, 这和之前的研究报道结果较为相似[19]。根据 LEP 的分级分离洗脱曲线可以判断 LEP 主要由不带电荷的中性多糖(蒸馏水洗脱部分)和带有部分负电荷的酸性多糖(0.1 mol/L NaCl 洗脱部分)组成, 且中性多糖的含量略多于酸性多糖的含量[20]。

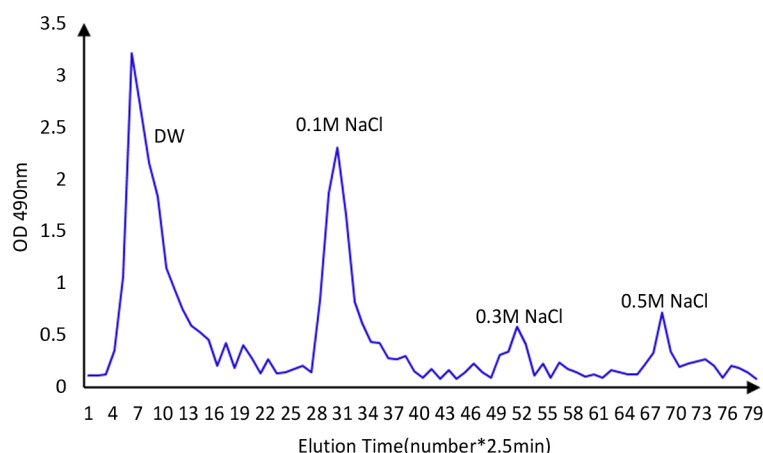


Figure 3. Elution curve of LEP using different elution phase
图 3. 粒毛盘菌胞外多糖(LEP)的分级分离洗脱曲线

3.4. LEP 对 α -葡萄糖苷酶抑制率

消化道分泌多种消化酶, 其中 α -葡萄糖苷酶可以水解葡萄糖苷键, 释放葡萄糖, 提高血糖浓度, 因此通过抑制 α -葡萄糖苷酶能够有效抑制餐后血糖上升, 这也成为筛选降血糖药物的常规检测方法[21]。目前为止, α -葡萄糖苷酶抑制剂如阿卡波糖(Acarbose)是 2 型糖尿病常见的和有效的临床治疗剂之一。本研究中检测粒毛盘菌胞外多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 并且与降血糖药品阿卡波糖进行对比。由图 4 可知, 粒毛盘菌 YM240 胞外多糖具有抑制 α -葡萄糖苷酶的作用, 但不如药品阿卡波糖抑制强烈; 并且在一定范围内, 随着多糖浓度增大, 其抑制作用越强; 由于随着浓度增加, 其抑制增长率在下降, 推测可能是由于多糖的抑制作用趋于稳定或者饱和造成。阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率最高可以达到 80%作用, 而同等浓度下 LEP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率大约为 40%左右。多种真菌多糖对 α -葡萄糖苷酶都有一定的抑制作用。朱振元等人报道了蛹虫草多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用, 发现多糖的抑制作用低于阿卡波糖, 半数抑制浓度为 4.22 mg/mL, 而且当浓度较高时其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用趋于平缓, 呈现出饱和的状态, 这与我们的研究结果较为一致[12]。而鲁梅芳等人研究了灰树花多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性, 他们报道的半数抑制浓度为 35.79 mg/mL, 远高于我们的实验结果, 说明 LEP 对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制作用[22]。

3.5. LEP 对 α -淀粉酶的抑制率

食物中的淀粉类物质通过肠道过程中经过 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶水解产生葡萄糖, 随后会被小肠吸收进入血液。研究表明, 抑制 α -淀粉酶是治疗糖尿病重要的方法之一[23]。本研究中检测了 LEP 对 α -淀粉酶的抑制作用, 并且与降血糖药品阿卡波糖进行效果对比。由图 5 可知, LEP 具有抑制 α -淀粉酶的作用, 但不如药品阿卡波糖抑制强烈; 并且在一定范围内, 随着多糖浓度增大, 其抑制作用越强; 同图 4 中显示的结果相似, 随着真菌多糖浓度的增加, 其对 α -淀粉酶的抑制增长率下降, 这和之前的报道结果类

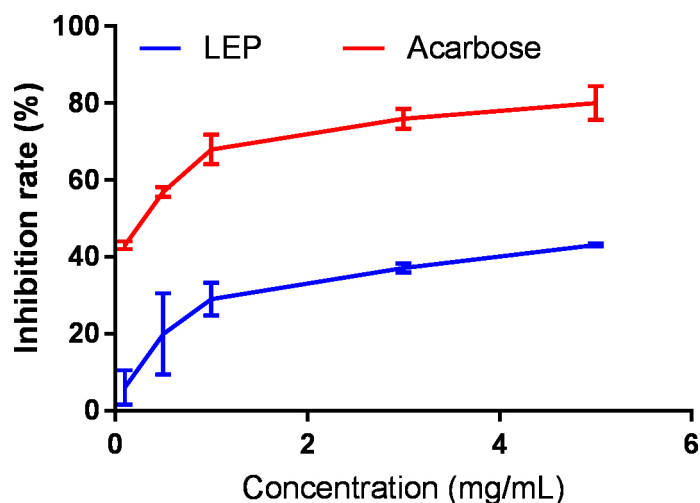


Figure 4. Inhibition rate of LEP to α -glucosidase

图 4. LEP 对 α -葡萄糖苷酶抑制率

似, 说明多糖对 α -淀粉酶的活性抑制作用可能有饱和效应[24]。影响多糖对 α -淀粉酶抑制活性的因素较多, 不仅包括其分子结构和空间构象, 还包括多糖中杂质的含量。尤玲玲等人报道了黄秋葵多糖的对 α -淀粉酶的抑制活性, 研究结果表明相比于粗多糖, 经过脱蛋白处理后的多糖其对 α -淀粉酶的抑制活性显著降低[13]。

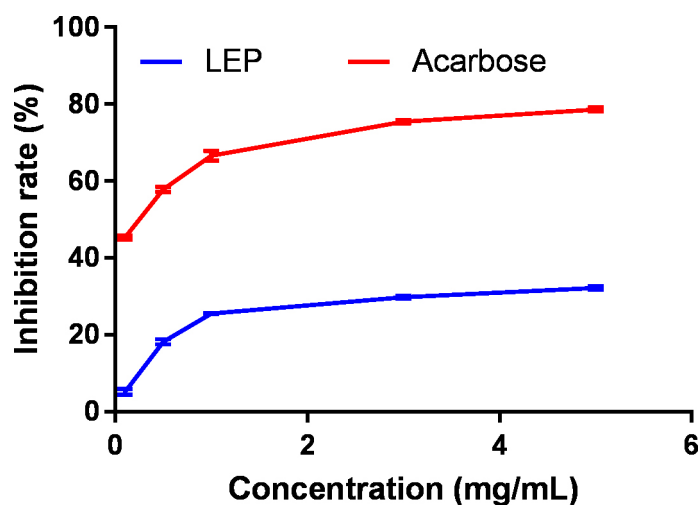


Figure 5. Inhibition rate of LEP to α -amylase

图 5. LEP 对 α -淀粉酶的抑制率

3.6. LEP 对脂肪酶抑制率

本研究中针对 LEP 的降血脂活性主要通过脂肪酶抑制率和胆酸盐结合实验来确定。脂肪酶抑制实验原理是脂肪酶水解油脂产生脂肪酸, 游离脂肪酸再与 NaOH 结合, 通过滴定来确定消耗 NaOH 的量间接确定脂肪酶的活性, 多种活性多糖在脂肪酶水解甘油三酸酯反应中起抑制剂作用。由图 6 可知, 在一定范围内, 随着 LEP 浓度增大, 其抑制作用也增强, 在 LEP 达到 3 mg/mL 的浓度后, 脂肪酶的抑制率达到 44% 以上, 但是之后随着多糖浓度的提高, 抑制率增长比较缓慢, 推测可能的原因是 LEP 对脂肪酶的抑制作用达到饱和。何刚等人研究了黑木耳多糖对脂肪酶的抑制作用, 其研究结果显示当黑木耳多糖对脂肪酶的最高抑制率为 47% 作用, 之后即使提高多糖浓度亦不会降低脂肪酶的活性, 他们推测黑木耳多

糖可以改变脂肪酶的构象, 从而影响其催化活性, 但是不能使脂肪酶失活[25]。

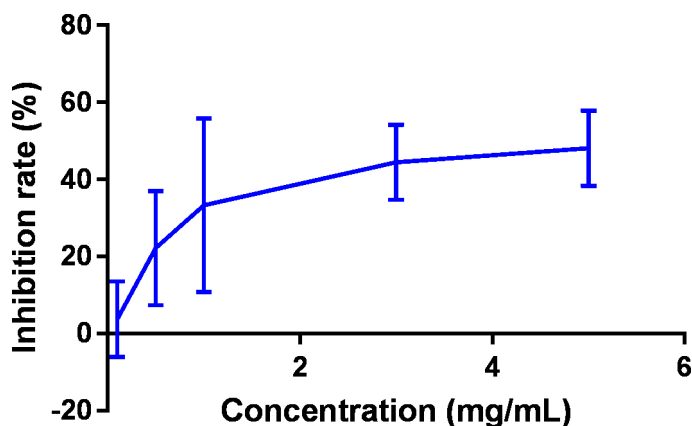


Figure 6. Inhibition rate of LEP to lipase
图 6. LEP 对脂肪酶的抑制率

3.7. LEP 的胆酸盐结合率

胆酸盐是体内排泄胆固醇的主要途径, 大部分胆酸盐经过肠道-肝脏进行回收, 而通过结合胆酸盐, 促进胆酸盐排泄可以有效排除体内胆汁酸, 间接降低胆固醇含量, 达到降低血脂的目标[26]。本研究中以甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠作为标准物质, 首先在 387 nm 波长下检测不同浓度的甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠标准溶液的吸光值, 根据标准溶液的吸光值计算其回归方程, 分别为 $y = 0.1919x + 0.00581$ 和 $y = 0.1726x + 0.0588$, 相关系数分别为 $R^2 = 0.9984$ 和 $R^2 = 0.9976$ 。

然后分别制备 1.6 μM 和 2.0 μM 的甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠溶液作为检测 LEP 胆酸盐结合率的工作溶液, 在不同 LEP 浓度情况下检测反应溶液的吸光值来判断 LEP 的胆酸盐结合率, 具体结果整理在图 7 和图 8 中。从结果中可以看出, LEP 对两种形式的胆酸盐都有一定的结合能力, 当 LEP 浓度达到 5 mg/mL 的时候, 对胆酸盐的结合率达到了 30% 和 40% 左右, 说明其具有一定的降血脂活性。同文献报道的结果相比, LEP 的胆酸盐结合率和赵艳等人报道的水溶性红雪茶多糖结合胆酸盐率比较接近[27], 但是低于王振宇等人报道的黑木耳多糖的胆酸盐结合率[25]。

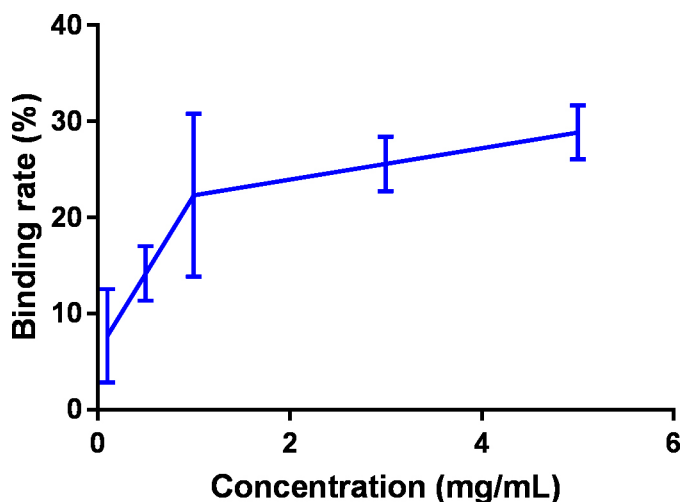


Figure 7. Binding rate of LEP to sodium glycocholate
图 7. LEP 对甘氨酸胆酸钠结合率

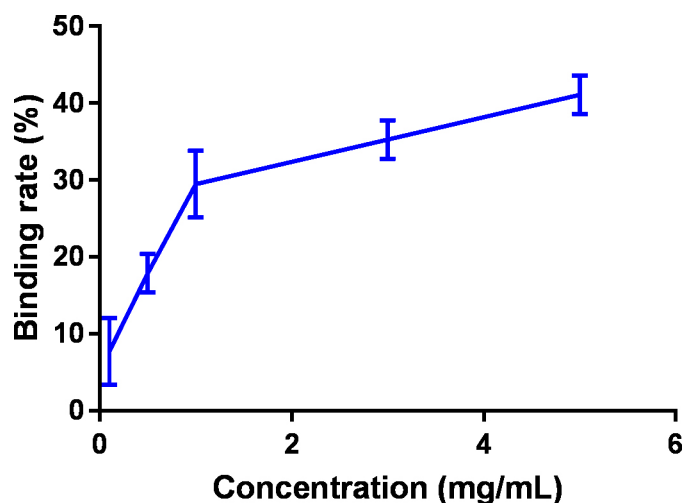


Figure 8. Binding rate of LEP to sodium taurocholate
图 8. LEP 对牛磺胆酸钠结合率

4. 结论

活性多糖是一种重要的真菌资源物质，具有多种生理功能，包括降血糖，降血脂，抗氧化，抗癌，抗血栓等。开发新型真菌源活性多糖，解析其化学结构并阐释其作用机理具有重要的理论和应用价值。多年来，本课题组对多种粒毛盘菌多糖进行了深入的研究，解析了粒毛盘菌多糖的化学结构，检测了其多种生物活性并阐述了其作用机理。前期研究显示，粒毛盘菌多糖是一种生物活性显著，具有较大潜在开发价值的多糖资源物质。

高血糖、高血脂等慢性病已经成为现代社会的较为普遍的慢性疾病，但是大部分药物只针对某一种症状进行治疗，作用靶点单一，同时毒副作用较大，对于同时具有多种症状的“代谢综合征”症状的病人效果较差。因此，有必要挖掘同时针对多种症状，毒副作用较小的天然活性物质。

本研究中我们利用体外实验方法检测了粒毛盘菌 YM240 胞外多糖(LEP)的降血糖和降血脂活性。结果显示，LEP 主要由中性多糖和酸性多糖构成，发酵过程中胞外多糖的产量在第 10 天达到最大值，说明粒毛盘菌 YM240 可以产生大量的胞外多糖物质；LEP 可以有效地抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的活性，显示出一定的降血糖活性；同时，LEP 可以抑制脂肪酶活性，有效结合胆汁酸，显示出一定的降血脂活性。

粒毛盘菌 YM240 通过深层发酵法可以获得大量的胞外多糖，生产和提取工艺简单，便于大规模生产，同时 LEP 具有显著的体外降血糖和降血脂活性，这也为后续的深入研究提供了一定的科学基础。

参考文献

- [1] Ye, M., Cao, S.Q., Jiang, S.T., *et al.* (2006) Species Diversity of Lachnum (Helotiales, Hyaloscyphaceae) from Temperate China. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, **7**, 20-27. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0020>
- [2] Xu, C., Li, J., Yang, L., *et al.* (2016) Antibacterial Activity and a Membrane Damage Mechanism of Lachnum YM30 Melanin against *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, **73**, 1445-1451.
- [3] Jing, L., Zong, S., Li, J., *et al.* (2016) Purification, Structural Features and Inhibition Activity on α -Glucosidase of a Novel Polysaccharide from Lachnum YM406. *Process Biochemistry*, **51**, 1706-1713. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.007>
- [4] Song, S., Li, S., Su, N., *et al.* (2016) Structural Characterization, Molecular Modification and Hepatoprotective Effect of Melanin from Lachnum YM226 on Acute Alcohol-Induced Liver Injury in Mice. *Food Function*, **7**, 3617. <https://doi.org/10.1039/C6FO00333H>

- [5] Zong, S., Li, J., Yang, L., *et al.* (2018) Synergistic Antitumor Effect of Polysaccharide from *Lachnum sp.* in Combination with Cyclophosphamide in Hepatocellular Carcinoma. *Carbohydrate Polymers*, **196**, 33-46.
- [6] 马中书, 冯晓路, 朱萍. 代谢综合征与相关疾病的临床研究进展[J]. 中国全科医学, 2015(17): 1991-1995.
- [7] 叶明, 彭伟, 房聪, 等. 萼状粒毛盘菌多糖提取及其生物活性[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 69-72.
- [8] 屈小玄, 郑永清, 吕远平. 猴头菇多糖脱蛋白方法的比较研究[J]. 食品科技, 2015(9): 170-175.
- [9] 陈健, 耿安静, 徐晓飞. 香菇多糖的过氧化氢脱色工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010(3): 293-295.
- [10] 秦建鲜, 黄锁义. 广西壮药鸡骨草总多糖和分级多糖相对分子质量的测定[J]. 化学世界, 2016, 57(10): 617-622.
- [11] 茆广华, 吴向阳, 仰榴青, 等. 苯酚-硫酸法测定银杏外种皮多糖的含量[J]. 食品科技, 2008, 33(6): 197-199.
- [12] 朱振元, 刘晓翠, 郭蓉, 等. 蛹虫草多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制研究[J]. 现代食品科技, 2014(12): 55-60.
- [13] 尤玲玲, 田楠, 任寅, 等. 秋葵多糖的提取及对 α -淀粉酶的抑制作用[J]. 食品科技, 2017(2): 193-196.
- [14] 黄明圈, 上官新晨, 徐明生, 等. 青钱柳多糖降血脂作用的研究[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(1): 157-161.
- [15] 叶明, 陈吴西, 彭伟, 等. 分批与流加培养对萼状粒毛盘菌生物量和胞外多糖产量的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2010, 36(6): 630-634.
- [16] 张志红, 吴素蕊, 邵丽梅, 等. 吡啶乙酸对冬虫夏草生物量、胞外多糖产量及其抗氧化性能的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(12): 181-184.
- [17] 王振河, 武忠伟, 赵现方, 等. 营养物质对桑黄菌丝生物量及胞外多糖产量的影响[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(1): 37-40.
- [18] 肖彩霞, 王玉红, 章克昌. 黑木耳深层发酵工艺条件的研究[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 70-72.
- [19] 陈志刚, 朱泉, 王芬. 百合多糖纯化及分子质量测定[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 1-4.
- [20] 顾林, 姜军. 山药多糖的分离纯化及组成研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 158-161.
- [21] 尚禹东, 张郑瑶, 丁云录, 等. 银杏叶提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及其降血糖作用机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2011, 37(3): 427-432.
- [22] 鲁梅芳, 金玉妍, 曹小红, 等. 灰树花胞外多糖主要成分 GFP-1 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 中国新药杂志, 2009(23): 2250-2254.
- [23] 王黎明, 夏文水. 茶多糖降血糖机制的体外研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 354-358.
- [24] 万艳娟, 刘晓娟, 赵力超, 等. 南瓜多糖抑制 α -淀粉酶及抑菌活性的研究[J]. 食品科技, 2012(3): 44-47.
- [25] 冉琳, 何钢, 梁立, 等. 黑木耳多糖对胰脂肪酶活性的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2017(22): 56-60.
- [26] 刘荣, 王蕾, 栾淑莹, 等. 水溶性黑木耳多糖体外结合胆酸盐能力的分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(17): 358-361.
- [27] 杨青松, 陈小玲, 高路, 等. 水溶性红雪茶多糖体外结合胆酸盐能力的分析[J]. 中国食品添加剂, 2017(9): 49-54.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: amb@hanspub.org