



瓦布贝母内生真菌 *Fusarium redolens* 6WBY3 多糖的理化性质及抗氧化活性

潘峰, 姚芸欣, 唐鑫, 吴卫*

四川农业大学农学院, 四川 成都 611130

摘要:【目的】对瓦布贝母内生真菌芳香镰孢菌 6WBY3 胞外多糖及其抗氧化活性进行研究。【方法】利用液体发酵, 有机溶剂脱脂, 乙醇沉淀、大孔吸附树脂除色素, 酶法和 sevag 法结合除蛋白、透析除盐等小分子物质、纤维素 DE-52 阴离子交换柱对胞外多糖进行分离; 通过高效凝胶色谱-蒸发光检测器 (HPGPC-ELSD)、紫外光谱(UV)、扫描电镜(SEM)、PMP 柱前衍生高效液相色谱(PMP-HPLC)、傅立叶变换红外光谱(FT-IR)和氢核磁共振谱(^1H NMR)等方法对胞外多糖的理化特征进行研究; 利用 DPPH 和 ABTS 自由基清除实验, 铁离子螯合实验对其抗氧化活性进行研究。【结果】从菌株 6WBY3 发酵液中分离出 2 个均一的胞外多糖 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4, 分子量分别约为 17.41×10^6 Da 和 8.84×10^5 Da, 主要单糖组分及摩尔比分别为甘露糖 葡萄糖 半乳糖=8.16 4.96 10.00, 甘露糖 鼠李糖 葡萄糖 半乳糖=8.08 1.71 6.32 10.00; SEM 特征前者呈现不规则多边形结构, 后者呈现规则四边体结构; FT-IR 和 ^1H NMR 结果表明 6WBY3EPS-3 含有丰富的半乳呋喃糖和甘露呋喃糖及少量的 α -D-吡喃葡萄糖的酸性多糖, 而 6WBY3EPS-4 同样主要为吡喃环糖, 并且二者均含有 α -和 β -糖苷构型异头氢, 均以 α -构型为主。抗氧化研究结果表明多糖 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 有较弱的 DPPH 自由基清除能力, 中等的 ABTS 自由基清除能力和中等的铁离子螯合能力。【结论】首次对瓦布贝母内生真菌 6WBY3 的胞外多糖进行了研究, 该研究表明内生真菌 6WBY3 的胞外多糖具有良好的抗氧化活性, 具有开发成抗氧化剂应用于医药食品等工业的潜力。同时本研究也可为其他内生真菌胞外多糖的研究提供理论参考。

关键词: 内生真菌, 胞外多糖, 理化特征, 抗氧化活性

多糖是由 10 个以上的单糖经糖苷键连接而成的聚合物, 多糖的分子量一般为数万甚至达数百万, 多糖在自然界中广泛分布, 并且作为生物大

分子物质多糖在医药、食品和材料等方面有着重要应用。多糖存在于高等植物、藻类、菌类及动物体内, 是自然界含量最丰富的生物大分子聚合

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20115103110009)

*通信作者。Tel/Fax: +86-28-86290870; E-mail: ewuwei@sicau.edu.cn

收稿日期: 2016-06-16; 修回日期: 2016-09-05

物之一。研究表明,多糖有丰富的生理功能,包括抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等^[1-4],同时多糖有丰富多样的来源和极低的毒副作用,使得多糖逐渐成为研究的热点,多糖相关的报道层出不穷,说明多糖有着不可估量的应用前景,并对新药的研制有重要的意义。例如,有研究发现在 D-半乳糖诱导的小鼠体内,真菌的体外多糖有减少脂质体产物和提高 SOD 等抗氧化酶活力的作用^[5]。但与蛋白和核酸等大分子物质相比,多糖由于结构更为复杂,其研究仍然相对落后。

微生物产生的多糖是多糖种类中最具有可利用价值的一类^[6]。从真菌子实体、菌丝体和发酵液中均可以分离出多糖,提取部位多样不受限制,并且在生产中,真菌繁殖不受季节和地域影响,生产周期短,使真菌生产多糖得以推广投产。内生真菌作为一类极其重要的真菌资源,具有丰富的生物多样性,据推测至少有 100 万种^[7],由于生境特殊,还能够产生丰富的代谢产物,是目前筛选活性天然产物非常重要的资源^[8]。尽管内生真菌来源多糖也表现出良好的生物活性,例如分离自 *Alstonia scholaris* 内生真菌 *Fusarium solani* SD5 胞外多糖 PS-1 表现出显著的清除 DPPH 自由基的活性 $[IC_{50}$ 值为 $(578.541 \pm 33.256) \mu\text{g/mL}$]^[9]。但目前,无论是与内生真菌小分子代谢产物的研究相比,还是与海洋真菌以及大型食用真菌等的研究相比,涉及内生真菌来源多糖的研究仍然较少。

药用植物瓦布贝母(*Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*)具有丰富的内生真菌,其中本课题组分离得到的内生真菌 6WBY3 不仅能够产生贝母类生物碱^[10],还具有良好的抗氧化活性。本试验首次对瓦布贝母内生菌 6WBY3 开展了多糖结构特性和相关抗氧化性质的研究,以期了解内生真菌胞外多糖组分的部分理化结构性质和抗氧化活性

大小,为瓦布贝母内生真菌的进一步研究和开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 实验材料:瓦布贝母内生真菌芳香镰孢菌 6WBY3,分离自瓦布贝母的鳞茎组织^[10],保存于 4 °C 冰箱。

1.1.2 主要试剂:DEAE-纤维素(种类 DE52)购置于英国布兰特福德的沃特曼公司,大孔吸附树脂 S-8 购于中国广州的香博生物技术公司,不同分子质量的葡聚糖(T5、T-10、T-40、T-70、T-500 和 T-2000)、多糖标品[D-(+)-甘露糖、L-水合鼠李糖、D-(+)-半乳糖醛酸、D-(+)-葡萄糖、D-(+)-半乳糖, D-(+)-木糖, L-(+)-阿拉伯糖, L-(-)-海藻糖]购于中国上海的西格玛奥瑞奇公司。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和考马斯亮蓝 G-250 分别购于北京华迈科生物技术公司,胰蛋白酶和木瓜蛋白酶分别购于上海励瑞生物技术公司。

1.2 菌株发酵及多糖提取

将保存的菌株于新鲜 PDA 培养基中在 28 °C 条件下活化 6-7 d,再用打孔器获得直径为 6 mm 的菌饼,接种到 PDB 培养基中,在 28 °C、130 r/min 黑暗条件下培养 7 d。将制备好的发酵液经布氏漏斗过滤,收集滤液,用减压旋转蒸发法将滤液浓缩至原体积的 20%。然后将浓缩液分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次进行等体积脱脂除杂,每种溶剂除杂至少重复 2 次。收集水相,再向其中加入其体积 4 倍的无水乙醇,4 °C 冰箱静置过夜,沉淀多糖。然后收集沉淀多糖,冻干后得到粗多糖样品,于 4 °C 冰箱保存备用。

1.3 粗多糖脱色素、蛋白质和小分子物质

根据刘骏的色素吸附方法^[5], 选用 S-8 和 D-101 两种型号的大孔吸附树脂除色素。树脂依据说明书进行预处理后采用动态吸附法。具体为: 将样液通过装有 S-8 树脂的层析柱(3.0 cm×40 cm), 用去离子水进行冲洗, 达到平衡状态后将一定浓度的粗多糖样液以 1.0 mL/min 的流速通过 S-8 树脂层析柱, 再用 25 mL 蒸馏水冲洗, 收集洗脱液并在新的 S-8 树脂层析柱重复吸附 1 次, 收集洗脱液。将收集的洗脱液适当浓缩后于 D-101 树脂采用相同的步骤再次对其进行动态吸附。

收集除色素后的多糖溶液, 冻干后用磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.4)溶解。首先采用酶法进行除蛋白, 参考文献[11]所述并进行适当修改。具体为: 在 37 °C 下预热的多糖中加入胰蛋白酶并在 37 °C 水浴 3 h, 然后 4000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。将上清液在 55 °C 下预热, 然后再加入木瓜蛋白酶并于 55 °C 下水浴 3 h, 4000 r/min 离心 10 min。酶法除蛋白后再采用 sevag 法除蛋白^[12]。根据蛋白质经过氯仿溶液浸泡会变性的特点, 用氯仿 正丁醇=4 1 浓度配制成溶液, 将多糖样品放置于 sevag 溶液中剧烈振荡 3–5 min, 出现蛋白质凝胶物后进行离心, 用移液枪吸出水层, 再加入 sevag 溶液重复 3–5 次, 直至水层和溶剂层交界处再无蛋白质层产生。最后收集多糖溶液放入截留量为 3500 Da 的透析袋中, 在蒸馏水中进行透析。每 12 h 换 1 次水, 透析 48 h。除去小分子后冷冻干燥, 得到初步除杂的多糖样品。

1.4 多糖分离

取 100 g DEAE-cellulose-52 干粉在蒸馏水中溶解, 搅拌均匀后在室温下放置 1 d, 让干粉充分溶胀; 之后用 0.5 mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液交替

进行预处理, 期间需要使用去离子水洗至中性。预处理完毕后, 湿法装柱(31.2 mm×195.0 mm), 然后用去离子水以 0.6 mL/min 的流速冲洗至平衡状态。取 1.3 步得到的粗多糖溶于 2 mL 去离子水中, 然后进行上样, 分别使用去离子水和 0.1、0.2、0.4、0.6 mol/L NaCl 溶液依次进行梯度洗脱, 流速 0.5 mL/min, 10 mL 每管收集洗脱液。使用苯酚-硫酸法进行多糖显色, 并在 490 nm 下测量其吸光度, 以吸光度为纵坐标, 以洗脱管数为横坐标绘制洗脱曲线, 根据图形合并对应的洗脱多糖组分, 浓缩后在低温下保存。

1.5 多糖组分均一性分析及分子量测定

多糖组分均一性分析及分子量测定采用高效液相凝胶渗透色谱-蒸发光散射检测(HPGPC-ELSD)法, 参考文献[13]并略作修改。取一定量的多糖成分 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 以及标准 T-系列葡聚糖(T-5、T-10、T-40、T-70、T-500 和 T-2000) 溶解于去离子水中均配成约 1 mg/mL 的溶液, 再用 0.45 μm 的滤膜过滤进行色谱分析。所用设备为 Waters 1525 HPLC (Waters, USA) 高效液相色谱系统配以 TSK-GEL G5000PWXL 凝胶(7.8 mm×30 cm) 色谱柱及 ELSD 检测器(Alltech, Deerfield, Illinois, USA)。流动相为水, 流速 0.5 mL/min; ELSD 检测器参数: 压缩空气为载气, 流速 3.2 L/min, 漂移管温度 115 °C, 并选用 Alltech 2000ES 色谱工作站(浙江大学, 杭州); 样品进样量为 10 μL。根据所得样品 HPGPC-ELSD 色谱图中峰的个数、主峰含量及峰形来判断多糖组分的均一性。依据已知葡聚糖分子量的自然对数和出峰时间的自然对数绘制标准曲线, 并根据样品保留时间和标准曲线来计算多糖组分的平均分子量(M_w)。

1.6 紫外线扫描分析

将经过多糖组分均一性分析得到的均一多糖

6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 分别溶于蒸馏水后于 200–400 nm 进行紫外扫描, 根据 260 nm 和 280 nm 等处是否有吸收峰判断是否有核酸和蛋白质, 多肽等物质。

1.7 单糖组分分析

参照文献[14]所述的柱前 PMP 衍生高效液相色谱-紫外检测(PMP-HPLC-DAD)方法进行, 并略作修改。取 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 多糖粉末约 2.5 mg, 分别加入 0.5 mg 岩藻糖(内标), 溶解于 0.5 mL 浓度为 3 mol/L 三氟乙酸中, 移入安瓿管中, 充满氩气后封管置于 90 °C 水浴 8 h, 冷却后转至 EP 管中在 12000 r/min 离心 2 min, 再加入甲醇溶解后减压蒸干。吸取 200 μ L 水解的多糖溶液加入 300 μ L 0.3 mol/L NaOH 溶液, 再加入 300 μ L 浓度为 0.5 mol/L 的 PMP 溶液在 70 °C 下水浴 1 h 进行衍生化, 待其衍生完成并冷却到室温后加入 300 μ L 0.3 mol/L 的 HCl 溶液中和, 最后加入 1 mL 三氯甲烷萃取, 收集水层, 重复 3 次, 12000 r/min 离心 1 min 后, 取上清液, 加入 200 μ L 超纯水, 用 0.22 μ m 水相滤膜过滤备用。同样称取适量单糖标准品: 甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖(内标), 按照上述的衍生化过程的标准配制单糖供试液。将 PMP 衍生好的多糖样品溶液和标准单糖溶液按照下述色谱条件于安捷伦 1100 高效液相色谱系统进行分析, 然后对色谱图进行积分。色谱柱为 Phenomenex Luna 5u C₁₈(2) 100Å 柱(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μ m) (Phenomenex, Allerød, Denmark), 流动相为 17%的乙腈和 83%磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)等梯度洗脱, 流速为 1 mL/min, 检测波长 245 nm, 柱温为 30 °C, 进样体积 15 μ L。

1.8 电子显微镜扫描

取少量 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 多糖样

品粉末, 减压条件下喷镀一薄层金原子(Au), 用扫描电子显微镜(JSM-6390A, JOEL, Japan)在 15 kV 的加速电压下放大 1000×成像并拍照。

1.9 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)及氢谱(1H NMR)分析

6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 各称取适量, 用溴化钾压片, 用 FT-IR 色谱仪(PerkinElmer, USA)于红外光 4000–450 cm⁻¹ 区间下扫描。再取适量 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 多糖样品粉末溶于 0.5 mL 重水(D₂O)中, 用 600 MHz 的核磁共振仪测定。

1.10 抗氧化活性测定

1.10.1 DPPH 自由基清除活性: 参照李伟等^[15]的方法, 并稍作修改。先取 70 μ L 不同浓度的多糖溶液(1.0–8.0 mg/L), 再加入 180 μ L 的 0.004% 的 DPPH 溶液(用乙醇溶液溶解 DPPH), 将混合物在室温下反应 5 min, 之后在 517 nm 下用酶标仪(Thermo Scientific, NH, USA, 下同)测定其吸光度, 每份样品平行操作 3 次。以蒸馏水代替多糖样品作为阴性对照, 以 Vc 作为阳性对照, 按照上述方法测定 DPPH 的清除活性。计算公式如下: 自由基清除率(%)=[1-(A₁-A₂)/A₀] \times 100。其中, A₀ 为阴性对照值(即以水代替多糖样品); A₁ 是样品试验与 DPPH 反应后的吸光度值; A₂ 是样品自身试验干扰的吸光度值(即以水代替 DPPH 溶液)。

1.10.2 ABTS 自由基清除活性: 参照文献[16]的方法, 配制 ABTS 自由基母液。将样品用甲醇配制成一系列浓度, 取 30 μ L 样品加入 180 μ L ABTS 自由基工作液, 混合, 放置 5 min 后, 在 734 nm 处用酶标仪测定其吸光度。每份样品平行操作 3 次。以蒸馏水代替多糖样品作为阴性对照, 以 Vc

作为阳性对照,按照上述方法测定 ABTS 的清除活性。计算公式为:自由基清除率($\%$)= $[1-(A_1-A_2)/A_0] \times 100$ 。 A_0 为阴性对照值(即以水代替多糖样品); A_1 为多糖样品与 ABTS 液反应后的吸光值; A_2 为样品自身试验干扰的吸光度值(即以水代替 ABTS 溶液)。

1.10.3 亚铁离子螯合能力:参照文献[17]的方法并略做修改,取 0.3 mL 多糖样品溶液加入到装有 0.3 mL 浓度为 150 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液的试管中,摇匀后在室温静置 10 min,然后加入 0.3 mL 醋酸钠缓冲液(HAc-NaA, pH 4.6)和 0.3 mL 0.1% 1,10-邻二氮杂菲溶液来测量体系中未被螯合的 Fe^{2+} 离子含量。用水替代 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液作空白对照,以水代替多糖样品作为阴性对照。取 200 μL 上述反应完全的溶液于 96 孔酶标板中,在 510 nm 条件下用酶标仪测定其吸光度。EDTA 溶液作阳性对照也按照上述的方法对其的铁离子螯合进行测定。亚铁离子螯合能力的计算公式:螯合率($\%$)= $[1-(A_1-A_2)/A_0] \times 100$ 。其中 A_0 为阴性对照(即以水代替多糖样品), A_2 为空白对照(即以水代替 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液), A_1 为多糖样品测量值。

1.11 数据分析

多糖分离,分子量计算,抗氧化活性评价等

数据均利用 Office Excel 2010 software 处理。抗氧化活性评价每次试验均重复 3 次。 ^1H NMR 数据利用软件 MestReNova 分析。

2 结果和分析

2.1 多糖分离纯化

粗多糖干样呈棕褐色膏状,在 4°C 下变为块状,表面较为光滑。经过除色素和蛋白质及透析等的处理后,多糖呈浅黄色,表明粗多糖中大量杂质已被除去。进一步采用 DEAE-52 纤维素色谱柱对粗多糖进行分离,梯度洗脱曲线如图 1 所示。用水和不同浓度的 NaCl 溶液洗脱,收集到 4 个馏分,分别编号为 6WBY3EPS-1、6WBY3EPS-2、6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4。其中 6WBY3EPS-1、6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的峰型对称单一,说明此 3 个多糖馏分极可能纯度较高。根据峰面积大小与其含量成正比可知,6WBY3EPS-3 多糖馏分最多,为多糖主成分,其次 6WBY3EPS-1,而 6WBY3EPS-4 多糖馏分含量比较少。

2.2 多糖均一性和分子量

对 6WBY3EPS-1、6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 进行 HPGPC-ELSD 检测。由图 2 所示,多糖 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 为均一多糖。而多

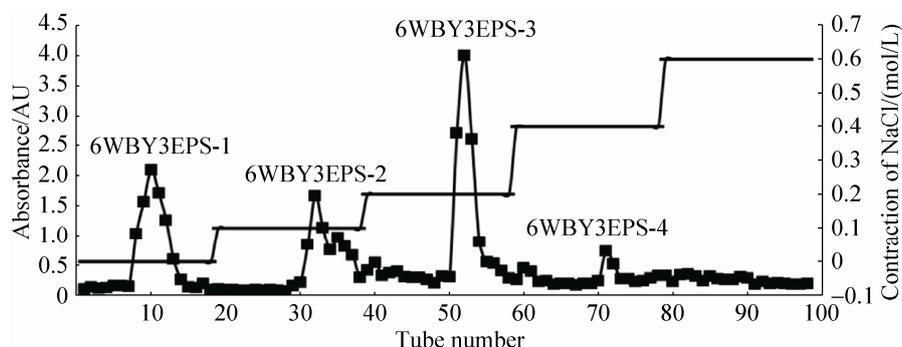


图 1. 内生真菌 6WBY3 粗多糖成分经 DEAE-纤维素-52 柱的梯度洗脱曲线

Figure 1. Stepwise elution curve of crude polysaccharide from fungal endophytic 6WBY3 on DEAE-cellulose-52.

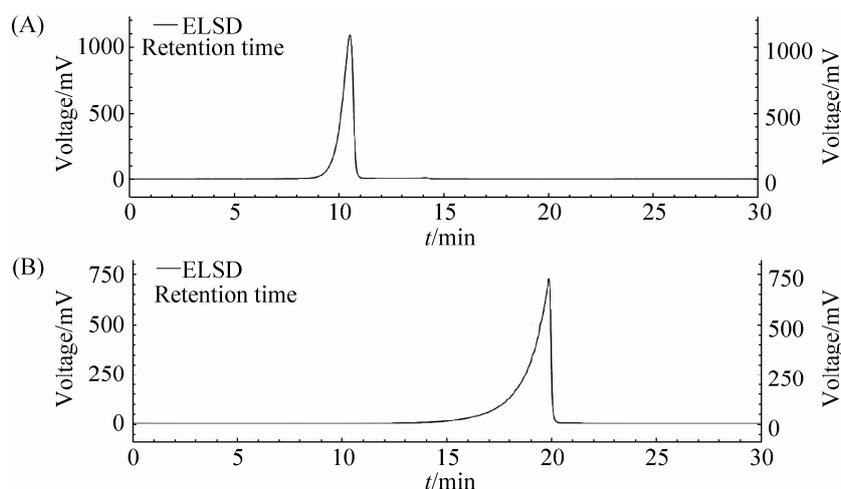


图 2. 内生真菌 6WBY3 多糖馏分 HPGPC-ELSD 色谱图

Figure 2. HPGPC-ELSD chromatograms of polysaccharides from fungal endophytic 6WBY3. A: HPGPC-ELSD chromatogram of 6WBY3EPS-3; B: HPGPC-ELSD chromatogram of 6WBY3EPS-4.

糖 6WBY3EPS-1 至少含有 2 种多糖类成分, 需进一步纯化, 但是由于 6WBY3 多糖的最主要馏分为 6WBY3EPS-3, 因此本试验对 6WBY3EPS-1 不再进行进一步研究。

凝胶色谱具有分子筛的效果, 可以使分子量不同的物质分开, 因为凝胶色谱的保留时间(RT)的自然对数与相对分子量(M_w)的自然对数呈线性关系, 因此可以根据 RT, 结合标准葡聚糖的 M_w 绘制标准曲线, 从而推测多糖的平均分子量。如图 2 所示, 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 在色谱柱上的 RT 分别是 10.526 min 和 19.874 min, 再根据已知标准分子量多糖标准品的 HPGPC-ELSD 测定结果和公式 $\ln(M_w) = -13.491 \ln(RT) + 49.033$, $R^2 = 0.9794$ [其中 $\ln(M_w)$ 为标准葡聚糖分子量的自然对数, RT 为其在色谱图上的保留时间], 计算可以得出 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的相对分子量分别为 17.28×10^6 Da 和 8.70×10^5 Da。

2.3 紫外扫描

对多糖组分 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 在波长 200–400 nm 范围内进行扫描, 结果如图 3

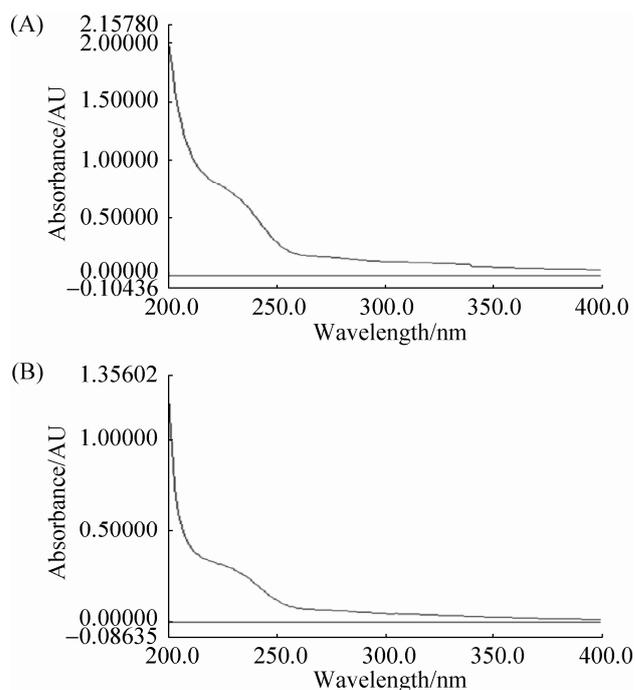


图 3. 内生真菌 6WBY3 多糖馏分紫外光谱图

Figure 3. UV spectra of polysaccharides from fungal endophytic 6WBY3. A: UV spectra of 6WBY3EPS-3; B: UV spectra of 6WBY3EPS-4.

所示。260 nm 和 280 nm 的波长范围内仅有一个十分微弱的吸收峰, 由此可以说明 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 中几乎不含核酸和蛋白质等杂质,

证明前期的除杂纯化效果好,表明 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的纯度很高。

2.4 电子显微镜扫描

由图 4-A、C 所示,6WBY3EPS-3 呈乳黄色,6WBY3EPS-4 呈乳白色。在电子显微镜下得到图像如图 4-B、D 所示,多糖成分 6WBY3EPS-3 呈现不规则多边形结构;多糖组分 6WBY3EPS-4 呈现规则四边体结构。电镜得到的结果进一步说明分离到的 2 种多糖的晶体结构不完全相同。

2.5 单糖组成分析

单糖标准品和 6WBY3EPS-3 及 6WBY3EPS-4 的水解所得单糖的 HPLC-DAD 图见图 5。单糖标准品甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、木糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和岩藻糖的保留时间分别

为 16.000、22.853、27.695、19.899、33.884、38.067、41.408 和 47.989 min。从高效液相色谱可以看出,6WBY3EPS-3 是由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,6WBY3EPS-4 是由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖和半乳糖组成。且 6WBY3EPS-3 和 6WBYEPS-4 对应单糖摩尔比分别为 8.16 4.96 10.00 和 8.08 1.71 6.32 10.00 (表 1)。在 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 中单糖组成均含有甘露糖、葡萄糖和半乳糖,且半乳糖含量均最高,其次均是甘露糖。此外,仅 6WBY3EPS-3 含有少量的鼠李糖。可见 2 种多糖主要单糖组成相近,但仍有不同。

2.6 FT-IR 分析

分离自菌株 6WBY3 的多糖成分 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的 FT-IR 色谱图如图 6 所示。由

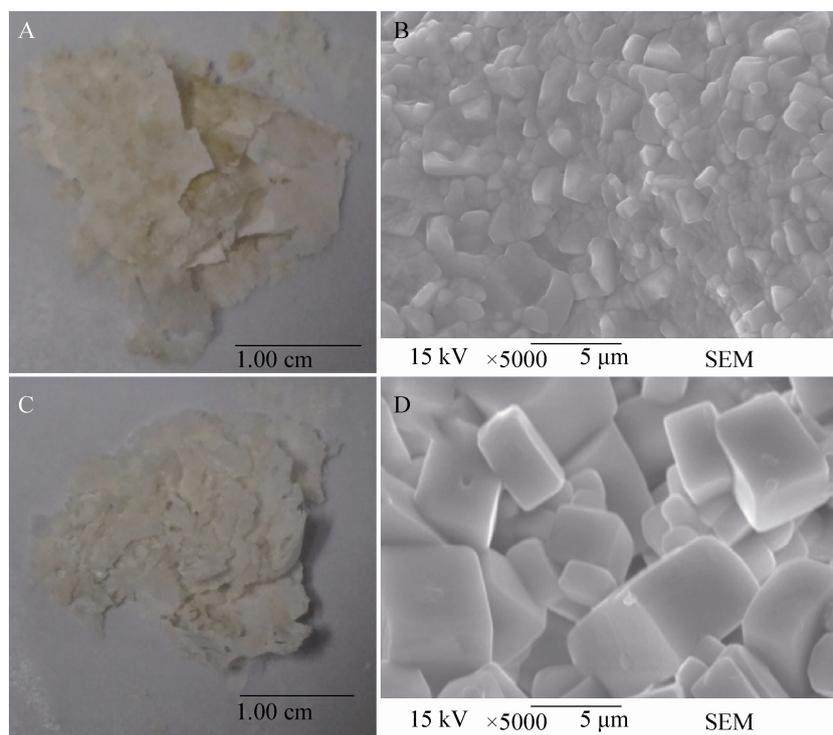


图 4. 内生真菌 6WBY3 多糖馏分干燥后形态照片和电镜照片

Figure 4. Physical form photos and electron microscopy images of polysaccharides from fungal endophytic 6WBY3. A: physical form photo of 6WBY3EPS-3; B: electron microscopy image of 6WBY3EPS-3; C: physical form photo of 6WBY3EPS-4; D: electron microscopy image of 6WBY3EPS-4.

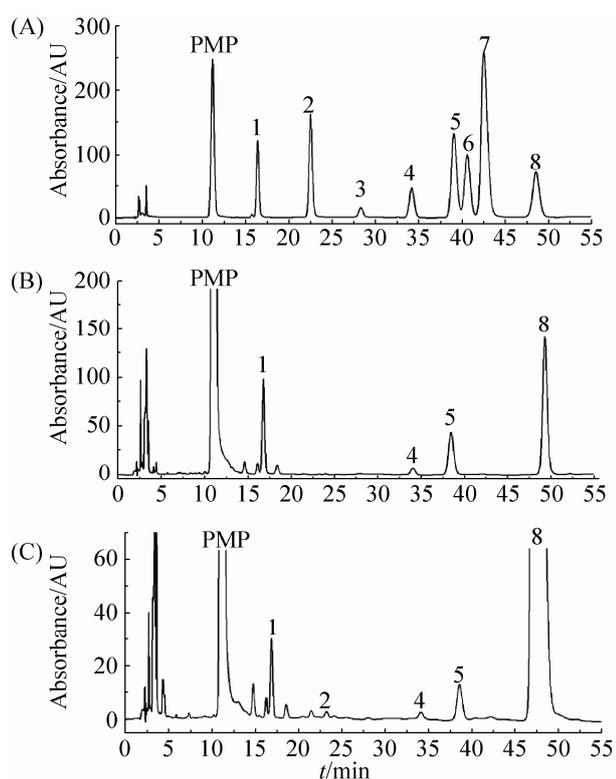


图 5. 内生真菌 6WBY3 多糖及单糖标准品的 HPLC-DAD 色谱图

Figure 5. HPLC-DAD chromatography of monosaccharide standard and polysaccharide from the fungal endophytic 6WBY3. A: HPLC-DAD chromatography of monosaccharide standard; B: HPLC-DAD chromatography of 6WBY3EPS-3; C: HPLC-DAD chromatography of 6WBY3EPS-4; 1: mannose; 2: rhamnose monohydrate; 3: galacturonic acid; 4: glucose; 5: galactose; 6: xylose; 7: arabinose; 8: fucose.

表 1. 内生真菌 6WBY3 多糖馏分 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 单糖成分的含量

Table 1. The content of monosaccharide composition from 6WBY3EPS-3 and 6WBY3EPS-4 from fungal endophytic 6WBY3

	Mannose	Rhamnose monohydrate	Glucose	Galactose
6WBY3EPS-3	8.16	—	4.96	10.00
6WBY3EPS-4	8.08	1.71	6.32	10.00

于分子在电磁场中, 带有特定基团的分子发生分子跃迁时需要的能量是相似的, 因此可以利用红外光谱来推断化合物的特有基团。如图 6 所示, 3418.14 cm^{-1} (6WBY3EPS-3)和 3446.60 cm^{-1} (6WBY3EPS-4)吸收峰归为糖链上的羟基伸缩振动引起。 2932.84 cm^{-1} (6WBY3EPS-3)的吸收峰为 C-H 的伸缩振动的吸收峰, 而 1415.85 cm^{-1} (6WBY3EPS-3)和 1406.45 cm^{-1} (6WBY3EPS-4)为 C-H 键弯曲(变角)振动引起, 这两组峰为多糖类化合物的特征吸收峰, 再次验证所得样品为多糖。 2299.95 cm^{-1} (6WBY3EPS-3)和 2306.92 cm^{-1} (6WBY3EPS-4)处吸收峰为脂肪族 C-H 键伸缩振动引起。在 $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ 内 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 均没有吸收峰, 表示 2 种多糖均不含糖醛酸成分^[4]。 1614.90 cm^{-1} (6WBY3EPS-3)和 1635.17 cm^{-1} (6WBY3EPS-4)出现很强的吸收信号, 为 C=O 的特征吸收峰^[18]。此外, 多糖 6WBY3EPS-3 在 1069.56 cm^{-1} 和 1034.00 cm^{-1} 处有较明显的强吸收峰, 是糖苷键 C-O-C 的非对称振动峰, 加上在 1100 cm^{-1} 和 1010 cm^{-1} 间只有 2 个吸收峰, 表明存在呋喃糖环^[19]; 在 925 cm^{-1} 处有一个极微弱的吸收信号, 归属为少量的 α -D-吡喃葡萄糖基的非对称伸缩振动^[19]; 在 878.77 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 C-H 横向振动, 在 808.67 cm^{-1} 有弱的吸收峰是呋喃环中 C-H 变角振动引起^[20], 此两处吸收峰的存在也表明糖链中含有半乳糖和甘露糖^[21], 这与单糖组分分析结果完全一致; 720.28 cm^{-1} 吸收峰归属于 CH_2 的弯曲振动, 表明存在烷基链。6WBY3EPS-3 多糖在 $1300\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ 处的明显吸收峰, 表明有磷酸基和磺酸基取代, 进一步说明 6WBY3EPS-3 为酸性多糖。而多糖 6WBY3EPS-4 在 1060.01 cm^{-1} 处的吸收峰归属为吡喃环糖上 C-O 的伸缩振动^[22]。与 6WBY3EPS-3 相比, 6WBY3EPS-4 的主要吸收

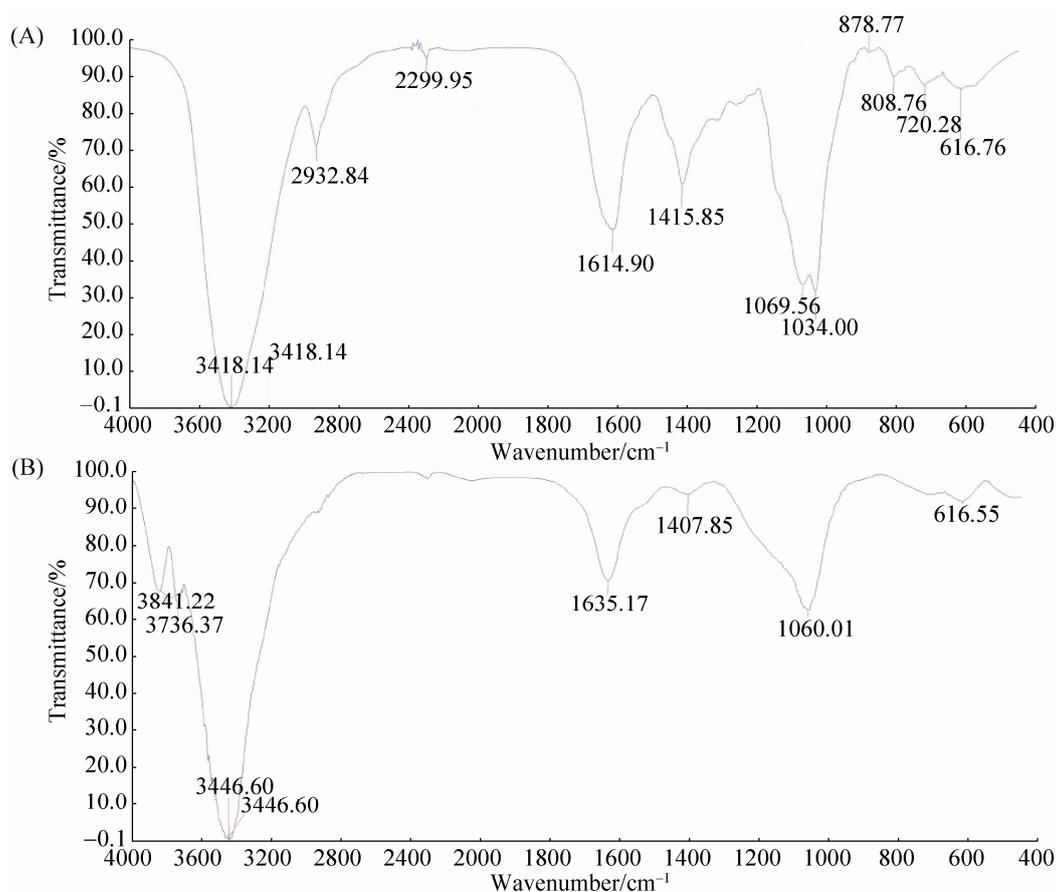


图 6. 内生真菌 6WBY3 多糖馏分的红外光谱图

Figure 6. FT-IR spectra of polysaccharide fraction from fungal endophytic 6WBY3. A: FT-IR spectra of 6WBY3EPS-3; B: FT-IR spectra of 6WBY3EPS-4.

峰与 6WBY3EPS-3 虽然相似,但在指纹区,却未出现与 6WBY3EPS-3 一样的密集吸收峰,相比 6WBY3EPS-3,6WBY3EPS-4 通过 FT-IR 色谱得到的信息相对较少。此外,6WBY3EPS-4 在 890 cm^{-1} 和 840 cm^{-1} 附近均未出现吸收峰,原因可能是 1060 cm^{-1} 附近的强峰对其进行了遮盖,所以无法判断糖苷键连接构型。综上,6WBY3EPS-3 含有丰富的半乳呋喃糖和甘露呋喃糖并含有少量的 α -D-吡喃葡萄糖的酸性多糖,而 6WBY3EPS-4 为吡喃环糖。

2.7 ^1H NMR 分析

6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的 ^1H NMR 谱

图如图 7 所示。已知 β 型异头质子区域化学位移为 $\delta 4.4\text{--}5.0\text{ ppm}$, α 型异头质子区域化学位移为 $\delta 5.0\text{--}5.5\text{ ppm}$ 。6WBY3EPS-3 多糖 ^1H NMR 信号中有 $\delta 5.34$ 、 5.27 、 5.24 、 5.14 、 4.95 、 4.77 和 4.41 ppm ,可见同时存在 α -和 β -糖苷构型异头氢,并且以前者为主。6WBY3EPS-4 多糖 ^1H NMR 信号中有 $\delta 5.37$ 、 5.28 、 5.17 、 5.04 和 4.98 ppm ,可见同时存在 α -和 β -糖苷构型异头氢,并且同样以前者为主。图 7 中化学位移在 $\delta 3.4\text{--}4.2\text{ ppm}$ 之间的信号主要是糖残基上 $\text{C}_2\text{-H}$ 到 $\text{C}_6\text{-H}$ 的信号位移峰^[2]。化学位移在 $\delta 1.1\text{--}1.3\text{ ppm}$ 之间可能是甲基碳上氢的化学位移信号,化学位移在 $\delta 1.37\text{ ppm}$ 附近为鼠李糖

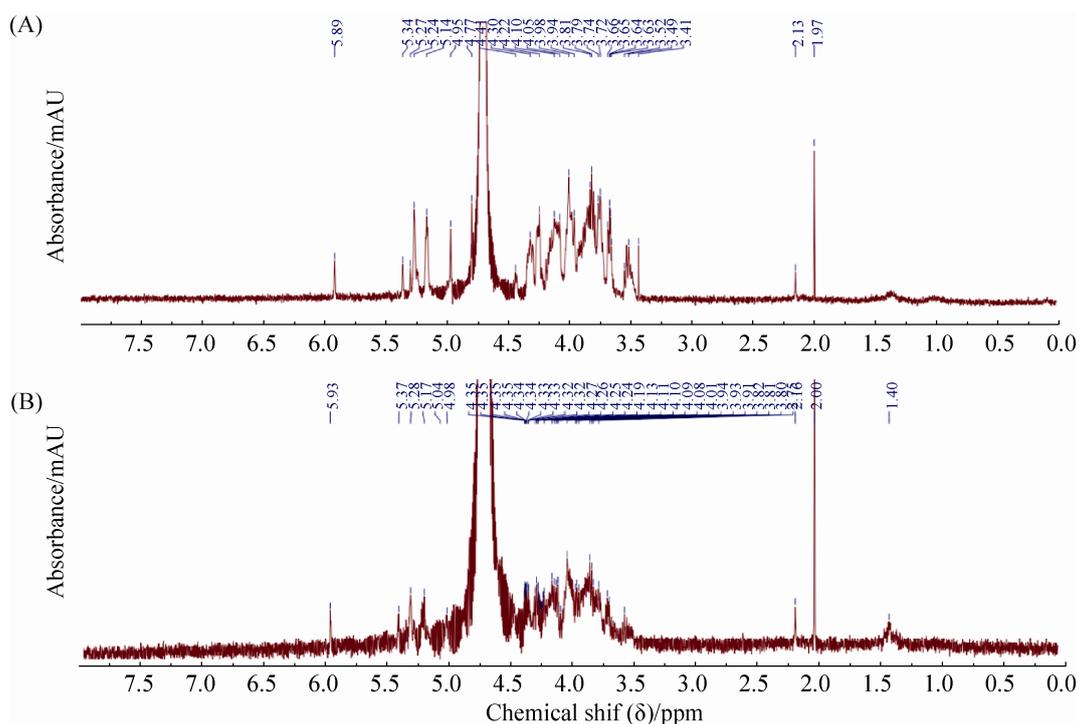


图 7. 内生真菌 6WBY3 多糖馏分的 ^1H 核磁共振图

Figure 7. ^1H NMR spectra of polysaccharide fraction from fungal endophytic 6WBY3. A: ^1H NMR spectra of 6WBY3EPS-3; B: ^1H NMR spectra of 6WBY3EPS-4.

C-6 位甲基上的质子氢信号, 化学位移在 $\delta 2.00$ ppm 附近可能为乙酰化糖结构中乙酰基的甲基氢的信号^[23], 此外, 6WBY3EPS-3 在化学位移 $\delta 3.4$ ppm 附近的吸收峰为甲氧基信号。综上分析结果表明, 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 均为主要以 α 构型链接的并存在少量 β 构型的杂多糖。

2.8 抗氧化活性

2.8.1 DPPH 自由基清除活性: 如图 8 所示, 在 DPPH 自由基清除试验中, 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 与标准抗氧化剂(Vc)比较, 对 DPPH 自由基均有一定的清除作用, 并且 2 种多糖成分具有较为相似的清除自由基能力。此外多糖的活性随着多糖样品浓度的增加而升高, 当样品浓度为 8 mg/mL 时, 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 清除的活性为 $(21.77 \pm 0.86)\%$ 和 $(16.07 \pm 2.51)\%$, Vc

的活性明显高于多糖样品, 在浓度为 1 mg/mL 时, Vc 的清除活性就达到 $(96.93 \pm 0.12)\%$ 。综上可知, 内生真菌 6WBY3 主要的胞外多糖 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 具有较低的 DPPH 自由基清除活性。

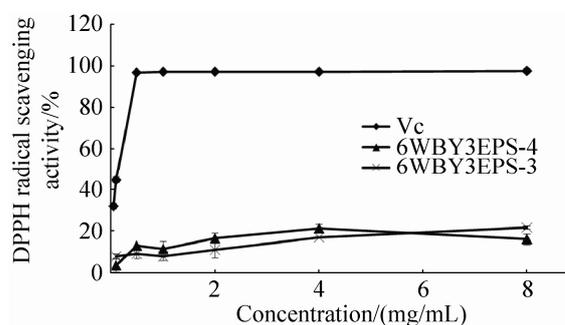


图 8. 内生真菌 6WBY3 多糖馏分 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的 DPPH 自由基清除

Figure 8. Scavenging activities of 6WBY3EPS-3 and 6WBY3EPS-4 on superoxide radical by DPPH.

2.8.2 ABTS 自由基消除:如图 9 所示,在 ABTS 自由基清除试验中,虽然 Vc 的活性明显高于多糖样品,在浓度为 0.5 mg/mL 时,其清除活性达到 $(98.62 \pm 0.82)\%$,但 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 对 ABTS 自由基仍然有良好的清除能力,其自由基清除活性随着多糖样品浓度的增加而升高,当样品浓度为 8 mg/mL 时,6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 清除的活性为 $(36.6 \pm 2.01)\%$ 和 $(41.02 \pm 4.16)\%$,且 2 种多糖成分对 ABTS 自由基清除活性较为相似。综合来看,对高分子化合物多糖而言,其 ABTS 自由基的清除活性仍较强。

2.8.3 铁离子螯合试验:如图 10 所示,在铁离子螯合实验中,EDTA 的金属离子螯合能力显著高于多糖样品,在浓度为 0.5 mg/mL 时,其金属离子螯合力几乎达到 100%。多糖样品的金属离子螯合能力与浓度是具备一定正相关性的,随着浓度的增加,多糖与金属发生螯合的能力也随之增加。当多糖浓度为 8 mg/mL 时,6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的多糖金属离子螯合力分别是 $(21.74 \pm 0.72)\%$ 和 $(26.43 \pm 0.55)\%$,这 2 种多糖成分的铁离子螯合能力相似。比较所得结果,多糖成分仍然具有良好的与金属结合来抑制脂质体过氧化化的能力。

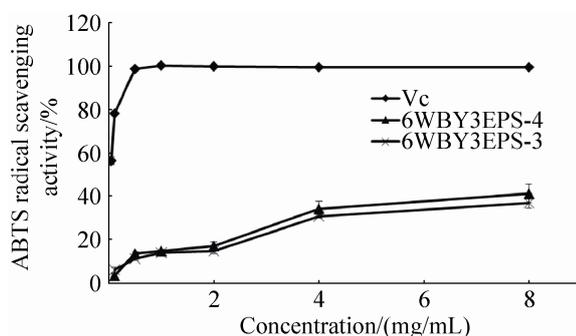


图 9. 多糖 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的 ABTS 自由基消除活性

Figure 9. Scavenging activities of 6WBY3EPS-3 and 6WBY3EPS-4 on superoxide radical by ABTS.

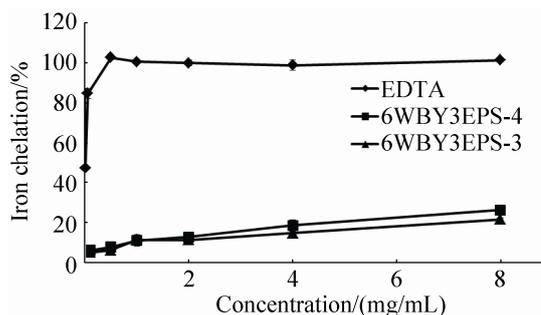


图 10. 多糖 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的铁离子螯合能力

Figure 10. Metal iron chelating activities of 6WBY3EPS-3 and 6WBY3EPS-4.

3 讨论

植物内生真菌是一类具有丰富生物多样性的生物群体,但在很长一段时间内并没有得到足够的重视,直到 1993 年,Stierle 等^[24]首次从红豆杉内生真菌中筛选出具有产生抗癌功能成分紫杉醇的菌株之后,内生真菌才引起了人们的重视。近年来,关于植物内生真菌的报道不断涌现,涉及该领域的研究也十分活跃。川贝母作为川产珍贵道地药材,本课题组曾对其不同基源种(瓦布贝母,暗紫贝母,梭砂贝母,川贝母和甘肃贝母)内生真菌进行过研究,主要涉及其内生真菌的多样性和次生代谢产物等方面^[25-26]。其中,发现内生真菌 6WBY3 不仅能够产生贝母类生物碱^[10],进一步研究还发现其水溶性成分还具有较强的抗氧化活性。而多糖作为水溶性成分之一,已有研究表明其具有明显的抗氧化活性^[9,27]。本文首次对瓦布贝母内生真菌 6WBY3 的多糖进行了研究。经过提取分离纯化,首次得到 2 个多糖馏分 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4。

由于在纯化过程中,色素,蛋白质等杂质较多,这些成分不仅会对多糖分离造成干扰,而且还会损伤阴离子交换等色谱柱,所以在分离前有

必要进行充分的除杂。研究表明大孔吸附树脂除去色素不仅条件温和, 不会破坏多糖结构, 而且效率较高^[5], 同样酶法和传统化学变性法(Sevag法)结合比单一一种方法除蛋白效率更好^[11]。而 HPGPC-ELSD 分析和 UV 分析结果也进一步表明上述除杂方法对内生真菌 6WBY3 的胞外多糖也非常有效。除此之外, 本文仅采用阴离子交换色谱柱就分离得到两种均一多糖, 与同时采用阴离子交换色谱柱和葡聚糖色谱柱相比而言, 不仅分离效率更高, 还有效地避免了多次分离过程中造成的多糖损失。

由于多糖的分子量、分子结构等与其活性关系密切^[6]。多糖 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 平均分子量分别约为 17.28×10^6 Da 和 8.70×10^5 Da, 且二者单糖组成基本相似, 主要是甘露糖、葡萄糖和半乳糖。此外, 6WBY3EPS-3 是含有丰富的半乳呋喃糖和甘露呋喃糖及少量的 α -D-吡喃葡萄糖的酸性多糖, 同时存在 α -和 β -构型糖基异头氢, 且以前者为主。6WBY3EPS-4 多糖馏分单糖也主要为吡喃环糖, 同时存在 α -和 β -构型糖基异头氢, 且也以前者为主。可见尽管 2 种多糖组分存在一定差异, 但是在多个方面仍具有相似的特性。

通过其抗氧化活性发现, 尽管多糖 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 与阳性对照 Vc 相比, 其抗氧化活性较低, 但由于其为大分子化合物, 所以多糖样品和 Vc 对照品相同质量浓度时, 多糖物质的量浓度显著低于 Vc, 因此可见, 此 2 种多糖仍具有良好的抗氧化活性, 且其活性强度相近。这也进一步证实相似的结构具有相似的活性。但 6WBY3EPS-3 和 6WBY3EPS-4 的结构与其活性间的关系仍需进一步研究。

总之, 分离自瓦布贝母内生真菌 6WBY3 的多糖成分可以作为 1 种抗氧化剂进一步研究并应用

于食品等领域。内生真菌作为一类重要的真菌资源, 多糖作为一类具有重要应用价值的生物大分子, 从内生真菌中筛选活性多糖, 不仅对真菌资源的开发利用具有重要价值, 还对获得更多, 更强活性的多糖天然产物也具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Meng L, Zhang LW. Immune regulation activity and mechanism of Tibetan Kefir exopolysaccharide fractions. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(12): 1660–1664. (in Chinese) 孟利, 张兰威. 西藏灵菇胞外多糖组分对小鼠免疫调节作用及机制的研究. *微生物学报*, 2009, 49(12): 1660–1664.
- [2] Chen Y, Mao WJ, Yang YP, Teng XC, Zhu WM, Qi XH, Chen YL, Zhao CQ, Hou YJ, Wang CY, Li N. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 218–226.
- [3] Chen X, Jiang HR, Yang YM, Liu N. Effect of exopolysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* on cell of gastric cancer and human telomerase reverse transcriptase. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(1): 117–122. (in Chinese) 陈旭, 江虹锐, 杨艳梅, 刘宁. 两歧双歧杆菌胞外多糖对胃癌细胞及端粒酶逆转录酶的影响. *微生物学报*, 2009, 49(1): 117–122.
- [4] Zheng YF, Zhang Q, Liu XM, Ma L, Lai F. Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on *Magnolia kwangsiensis* Figlar & Noot. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 142: 98–104.
- [5] Liu J. Fermentation conditions, structures, chemical modification and antioxidant activity of exopolysaccharides from *Paenibacillus polymyxa*. Doctor Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2010. (in Chinese) 刘俊. 多粘类芽孢杆菌胞外多糖的发酵条件、结构、化学修饰及其抗氧化活性的研究. 南京农业大学博士学位论文, 2010.
- [6] Wang XJ, Wei CW, Xu SY, Lv MX, Zeng HP. Progress in polysaccharides chemical structure and structure-activity. *Guangzhou Chemical Industry*, 2004, 32(1): 6–10. (in Chinese) 王晓娟, 魏传晚, 徐淑永, 吕梅香, 曾和平. 生物活性多糖结构与功效关系的研究进展. *广州化工*, 2004, 32(1): 6–10.
- [7] Guo LD. Advances of researches on endophytic fungi. *Mycosystema*, 2001, 20(1): 148–152. (in Chinese) 郭良栋. 内生真菌研究进展. *菌物系统*, 2001, 20(1):

- 148–152.
- [8] Zhang Y, Han T, Ming Q, Wu L, Rahman K, Qin L. Alkaloids produced by endophytic fungi: a review. *Natural Product Communications*, 2012, 7(7): 963–968.
- [9] Mahapatra S, Banerjee D. Evaluation of *in vitro* antioxidant potency of exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 53: 62–66.
- [10] Pan BF, Su X, Hu B, Yang N, Chen Q, Wu W. *Fusarium redolens* 6WBY3, an endophytic fungus isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*, produces peimisine and imperialine-3 β -D-glucoside. *Fitoterapia*, 2015, 103: 213–221.
- [11] Zha XQ, Xiao JJ, Zhang HN, Wang JH, Pan LH, Yang XF, Luo JP. Polysaccharides in *Laminaria japonica* (LP): extraction, physicochemical properties and their hypolipidemic activities in diet-induced mouse model of atherosclerosis. *Food Chemistry*, 2012, 134(1): 244–252.
- [12] Hromádková Z, Ebringerová A, Valachovič P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 2002, 9(1): 37–44.
- [13] Liu L, Lu YM, Li XH, Zhou LY, Yang D, Wang LM, Chen Y. A novel process for isolation and purification of the bioactive polysaccharide TLH-3' from *Tricholoma lobayense*. *Process Biochemistry*, 2015, 50(7): 1146–1151.
- [14] Lv Y, Yang XB, Zhao Y, Ruan, Y, Yang Y, Wang ZZ. Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection. *Food Chemistry*, 2009, 112(3): 742–746.
- [15] Li W, Ji J, Xu XY, Hu B, Wang K, Xu DL, Dong MS. Extraction and antioxidant activity *in vitro* of capsular polysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1 in sayram yogurt from Xinjiang. *Food Science*, 2012, 33(21): 34–38. (in Chinese)
李伟, 纪鹃, 徐希研, 胡波, 王凯, 徐冬兰, 董明盛. 源自新疆赛里木酸奶的瑞士乳杆菌 MB2-1 荚膜多糖提取及其抗氧化活性. *食品科学*, 2012, 33(21): 34–38.
- [16] Chun SS, Vatter DA, Lin YT, Shetty K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 2005, 40(2): 809–816.
- [17] Bayliak MM, Lylyk MP, Vytvytska OM, Lushchak VI. Assessment of antioxidant properties of alpha-keto acids *in vitro* and *in vivo*. *European Food Research and Technology*, 2016, 242(2): 179–188.
- [18] Ge Y, Duan YF, Fang GZ, Zhang Y, Wang S. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: isolation, purification, structural features and antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(2): 188–193.
- [19] Ghasemlou M, Khodaiyan F, Jahanbin K, Gharibzadeh SMT, Taheri S. Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium. *Food Chemistry*, 2012, 133(2): 383–389.
- [20] Sun WJ, Meng K, Qi CH, Yang XY, Wang YG, Fan WT, Yan ZG, Zhao XN, Liu JZ. Immune-enhancing activity of polysaccharides isolated from *Atractylodes macrocephalae* Koidz. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 126: 91–96.
- [21] Kačuráková M, Capek P, Sasinková V, Wellner, N, Ebringerová A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 43(2): 195–203.
- [22] Zheng YF, Zhang S, Wang Q, Lu X, Lin LM, Tian YT, Xiao JB, Zheng BD. Characterization and hypoglycemic activity of a β -pyran polysaccharides from bamboo shoot (*Leleba oldhami* Nakal) shells. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 144: 438–446.
- [23] Xing XH, Cui SW, Nie SP, Phillips GO, Goff HD, Wang Q. Study on *Dendrobium officinale* O-acetyl-glucomannan (Dendronan[®]): Part I. Extraction, purification, and partial structural characterization. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2014, 4(1): 74–83.
- [24] Strobel G, Stierle A, Stierle D, Hess WM. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with *Pacific yew* (*Taxus brevifolia*). *Mycotaxon*, 1993, 47: 71–80.
- [25] Chen Q. Studies on endophytic fungi and its secondary metabolites from bulbous *Fritillariae Cirrhosae*. Master dissertation of Sichuan Agricultural University, 2012. (in Chinese)
陈鹤. 川贝母内生真菌及其次生代谢产物的研究. 四川农业大学硕士学位论文, 2012.
- [26] Pan F, Hou K, Gao F, Hu B, Chen Q, Wu W. Peimisine and peiminine production by endophytic fungus *Fusarium* sp. isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabensis*. *Phytomedicine*, 2014, 21(8/9): 1104–1109.
- [27] Chen Y, Mao WJ, Tao HW, Zhu WM, Qi XH, Chen YL, Li HY, Zhao CQ, Yang YP, Hou YJ, Wang CY, Li N. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 8179–8184.

Physicochemical property and antioxidant activity of exopolysaccharide produced by endophytic fungal *Fusarium redolens* 6WBY3 isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*

Feng Pan, Yunxin Yao, Xin Tang, Wei Wu*

Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] To study the exopolysaccharide (EPS) of endophytic fungal *Fusarium redolens* 6WBY3 isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis* (FUW) including its antioxidant activities. [Methods] We isolated the EPS from the culture medium of strain 6WBY3 using the methods of degreasing with organic solvent, precipitation with ethanol, decoloration with macroporous resins, deproteinization with protease in combination with sevag reagent, desalination with dialysis and separation with DEAE-cellulose ion exchange chromatography. Then, we analyzed the EPS fractions using high-performance gel-permeation chromatography with evaporative light scattering detector (HPGPC-ELSD), ultra violet (UV) spectra, scanning electron microscope (SEM), PMP precolumn derivatization with high performance liquid chromatography (PMP-HPLC), fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and ^1H -nuclear magnetic resonance (^1H NMR) methods. We evaluated the antioxidant activity of the EPS using DPPH and ABTS radical scavenging activities and iron ion chelating ability methods. [Results] We obtained two homogeneous EPSs, namely 6WBY3EPS-3 and 6WBY3EPS-4, with the molecular weight (Mw) of 17.41×10^6 and 8.84×10^5 Da, respectively. 6WBY3EPS-3 was composed of mannose, glucose and galactose in a molar ratio of 8.16:4.96:10.00, while 6WBY3EPS-4 was composed of mannose, rhamnose, glucose and galactose in a molar ratio of 8.08:1.71:6.32:10.00. The results of SEM showed that 6WBY3EPS-3 was the irregular multilateral body, and 6WBY3EPS-4 was rules of quadrilateral body. The results of FT-IR and ^1H NMR analysis exhibited that 6WBY3EPS-3 was acidic polysaccharose with abundant galactofuranose, mannofuranose and a few α -D-glucopyranose, while 6WBY3EPS-4 possessed pyranose ring mainly. Those two EPSs had anomeric hydrogen with α - (main) and β -glycosidic configuration. Furthermore, the results of antioxidant activity suggested that both 6WBY3EPS-3 and 6WBY3EPS-4 had a weak DPPH radical scavenging ability, a moderate ABTS radical scavenging activity and a moderate iron ion chelating effect. [Conclusion] The two EPSs from the endophytic fungus 6WBY3 were firstly obtained and investigated. Our investigation indicated that the EPS from 6WBY3 had the application potential as an antioxidant in medicine and food industries. In addition, this work can also provide theory reference for improving development of EPS from other endophytic fungi.

Keywords: endophytic fungi, exopolysaccharide, physicochemical property, antioxidant activity

(本文责编: 李磊)

Supported by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20115103110009)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-28-86290870; E-mail: ewuwei@sicau.edu.cn

Received: 16 June 2016; Revised: 5 September 2016