

竹荪多糖提取工艺及其抗氧化性

敢小双¹,熊晨阳²,刘光荣¹,薛燕²,董银卯^{2,*}

(1.无限极(中国)有限公司,广东广州 510623;

2.北京工商大学,北京 100048)

摘要:以竹荪为原料,采用水提法提取竹荪多糖,比较了提取温度、pH、料液比和提取时间对竹荪多糖得率的影响,并且在单因素实验的基础上,采用正交实验,确定了水提法提取竹荪多糖的最佳工艺参数,即提取温度为 90 ℃、pH 为 8.0、料液比为 1:70 g/mL,时间为 2.5 h。在上述提取条件下,提取竹荪多糖得率可达 13.09%。抗氧化实验结果表明,0.6 mg/mL 的竹荪多糖对 ABTS 自由基的清除率可达 92.76%,25 mg/mL 的竹荪多糖对 DPPH 自由基的清除率可达 70.55%。竹荪多糖提取工艺合理、可行,所提多糖具有较强的抗氧化性。

关键词:提取,竹荪多糖,得率,抗氧化性

Extraction Technology of *Dictyophora* Polysaccharide and its Antioxidative Activity

GAN Xiao-shuang¹, XIONG Chen-yang², LIU Guang-rong¹, XUE Yan², DONG Yin-mao^{2,*}

(1.Wuxianji (China) Co., Ltd., Guangzhou 510623, China;

2.Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: *Dictyophora* polysaccharide from *Dictyophora* was extracted by hot water extraction. The effects of extraction temperature, pH, the powder-to-water ratio and extraction time were studied by single factor experiment and orthogonal experiment. The results showed that optimal extract was at temperature 90 ℃, pH 8.0, powder-to-water ratio 1:70 g/mL and extraction in 2.5 h. Under this condition, the yield of *Dictyophora* polysaccharide was 13.09%. The results of anti-oxidation experiments of *Dictyophora* polysaccharide showed that the scavenging rate of ABTS free radicals by the 0.6 mg/mL *Dictyophora* polysaccharide was 92.76% and the scavenging rate of DPPH free radical by the 25 mg/mL *Dictyophora* polysaccharide was 70.55% respectively. The extraction technology is reasonable and feasible, and the polysaccharide has stronger antioxidant activity.

Key words: extraction; *Dictyophora* polysaccharide; yield; antioxidant activity

中图分类号:TS255.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2018)13-0223-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.13.039

引文格式:敢小双,熊晨阳,刘光荣,等.竹荪多糖提取工艺及其抗氧化性[J].食品工业科技,2018,39(13):223-226.

竹荪是竹荪属(*Dictyophora*)的总称,又名竹参、竹笙、仙人笠等,是一类名贵的食用菌,素有“真菌皇后”、“山珍之王”、“药房之宝”等美称。我国有长裙竹荪、短裙竹荪、黄裙竹荪、朱红竹荪、红托竹荪、皱盖竹荪和棘托竹荪 7 个种。食用珍品的竹荪为长裙竹荪和短裙竹荪。竹荪多糖广泛存在于子实体的细胞壁中,是具有生物活性的大分子物质,在抑菌、抗肿瘤、降血压、降血糖、抗凝血和刺激免疫等方面有一定的疗效,也对艾滋病有一定的抑制作用,被广泛应用于食品保健方面^[1-8]。竹荪多糖提取的方法有水提法、酸提法和碱提法等。水提法能提取结合态和非结合态的多糖,酸、碱提法是通过破坏多糖与其他物质结合的化学键,使多糖游离出来,其中水提法使用较普遍^[2]。水提工艺的研究显示,料液比、提取

时间、提取温度、浸提次数、pH 等因素对多糖得率有影响^[9-10],然而对于竹荪多糖水提法的文献报道中对 pH 的考察研究较少。故本实验旨在以提取温度、pH、料液比和提取时间为考察因素,探讨各因素对水提法提取竹荪多糖工艺的影响,并通过正交实验确定其最佳提取工艺,为竹荪进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

竹荪干品(含水量≤3%,杂质≤0.1%,耳片厚度≥1 mm) 福建古田;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS) 美国 Sigma 试剂公司;葡萄

收稿日期:2017-10-18

作者简介:敢小双(1981-),女,硕士研究生,研究方向:化妆品植物原料,E-mail:sunny.gan@infinitus-int.com。

* 通讯作者:董银卯(1963-),男,博士,教授,研究方向:植物源化妆品功效成分研究与应用,E-mail:ydmong2008@163.com。

糖 生物试剂;其他试剂 均为分析纯。

XS205DU 电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司;TECAN 酶标仪 奥地利 TACAN 有限公司;雷磁 PHS-3C 型 pH 计 上海仪电科学仪器股份公司;真空冷冻干燥机 美国 Virtis 公司;热回流装置、QL-861 漩涡混合器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;EYELA 旋转蒸发仪 上海爱朗仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制 绘制葡萄糖标准曲线;准确量取 2 mg/mL 的葡萄糖标准溶液定容于 5 mL 容量瓶中,将其分别稀释成不同浓度:0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 和 0.08 mg/L。用苯酚-硫酸法测定不同浓度的吸光值,用同等体积的蒸馏水做空白对照,重复 3 次,取平均值。以吸光度值为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标,得线性回归方程 $Y = 9.2568X - 0.0282$ ($R^2 = 0.9993$),表明竹荪多糖在该浓度范围内线性关系良好^[10]。

1.2.2 多糖含量的测定方法 采用苯酚-硫酸法^[11]测定多糖含量。

多糖得率 (%) = 多糖质量 (g) / 竹荪质量 (g) × 100^[12]。

1.2.3 单因素实验 以竹荪多糖得率为指标,固定 pH 为 5.0、料液比为 1:70 g/mL、提取时间为 2 h,设计提取温度为 30、50、70、90、100 °C,研究提取时间对多糖得率的影响;固定提取温度为 70 °C、料液比为 1:70 g/mL、提取时间为 2 h,设计 pH 为 5.0、7.0、8.0、9.0、11.0,研究 pH 对多糖得率的影响;固定提取温度为 70 °C、pH 为 8.0、提取时间为 2 h,设计料液比为 1:50、1:60、1:70、1:80、1:90 g/mL,研究料液比对多糖得率的影响;固定提取温度为 70 °C、pH 为 8.0、料液比为 1:70 g/mL,设计提取时间为 1、1.5、2、2.5、3 h,研究提取时间对多糖得率的影响。进行单因素实验,研究各因素变量对竹荪多糖得率的影响。

1.2.4 正交实验 以提取温度、pH、料液比和提取时间为考查因素,设定正交实验的因素水平,见表 1。

表 1 正交实验因素和水平表

水平	因素			
	A 温度 (°C)	B pH	C 料液比 (g/mL)	D 时间 (h)
1	50	7.0	1:60	1.5
2	70	8.0	1:70	2
3	90	9.0	1:80	2.5

1.2.5 抗氧化实验

1.2.5.1 竹荪多糖对 ABTS 自由基清除能力的测定 ABTS 试剂的制作:将 7 mmol/L 的 ABTS 水溶液与 2.45 mmol/L 的 $K_2S_2O_8$ 溶液等量混合,低温避光反应 13 h。取 1 mL 用无水乙醇稀释,得到溶液在 734 nm 处的吸光度值为 0.71^[13]。将竹荪多糖用去离子水配制成不同的浓度梯度 (0.01、0.05、0.1、0.2、0.4 和 0.6 mg/mL),取 0.8 mL ABTS 试剂与 0.2 mL 多糖溶液在暗处混合,重复三次,充分混匀后在室温条件

下避光反应 30 min,在 734 nm 处测吸光值,记为 A;用去离子水代替多糖溶液,吸光值记为 A_0 ,以 0.01、0.02、0.04、0.08 和 0.15 mg/mL 的抗坏血酸做阳性对照。

ABTS 清除率 (%) = $(A_0 - A) / A_0 \times 100$

1.2.5.2 竹荪多糖对 DPPH 自由基清除能力的测定 DPPH 试剂的配制:避光称取 8 mg DPPH,加入无水乙醇溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中。利用 DPPH 无水乙醇溶液呈现典型紫色,在 517 nm 处有最大吸收峰,加入抗氧化剂后,溶液的紫色变浅,在 517 nm 处的吸光值下降来表示其对 DPPH 自由基的清除能力。将竹荪多糖用去离子水配制成不同的浓度梯度 (1、5、10、15、20 和 25 mg/mL),取 1 mL DPPH 试剂与 1 mL 多糖溶液在暗处混合,重复三次,充分混匀后在室温条件下避光反应 30 min,在 517 nm 处测吸光值,记为 A;用去离子水代替多糖溶液,吸光值记为 B;用无水乙醇代替 DPPH 试剂,吸光值记为 $C^{[14]}$,以 0.3125、0.625、1.25、2.5 和 5 mg/mL 的抗坏血酸做阳性对照。

DPPH 清除率 (%) = $(B + C - A) / B \times 100$

1.3 数据处理

数据采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 浸提工艺参数对竹荪中可溶性多糖得率的影响

2.1.1 提取温度对多糖得率的影响 由图 1 可以看出,当温度在 30~70 °C 时,竹荪多糖得率随温度上升而升高,在 70~100 °C 时,竹荪多糖得率随温度升高而降低。这是因为多糖的溶解度随着温度的升高而升高,使得在一定范围内多糖得率随温度升高而升高;但是当温度继续升高时,由于多糖的热不稳定性而发生分解,且温度过高会消耗能量,多糖得率反而下降^[15],故提取温度为 70 °C 左右较为合理。

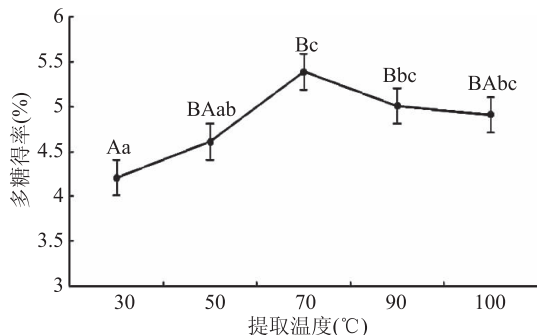


图 1 提取温度对竹荪多糖得率的影响

Fig.1 Effect of temperature on extraction amount of dictyophora polysaccharides

注:标有不同大写字母表示组间差异极显著 ($p < 0.01, n = 3$),标有不同小写字母表示组间差异显著 ($p < 0.05, n = 3$);图 2~图 6 同。

2.1.2 pH 对多糖得率的影响 由图 2 可以看出,当 pH 在 5.0~8.0 之间时,竹荪多糖得率随 pH 上升而升高,在 8.0~11.0 之间时,竹荪多糖得率随 pH 升高而降低。这是因为多糖的溶解度在碱性条件下较高^[16],使得在一定范围内多糖得率随 pH 升高而升

高;但是当 pH 继续升高时,由于碱性条件会促进多糖分解,从而出现了多糖得率下降的现象,故 pH 为 8.0 左右较为合理。

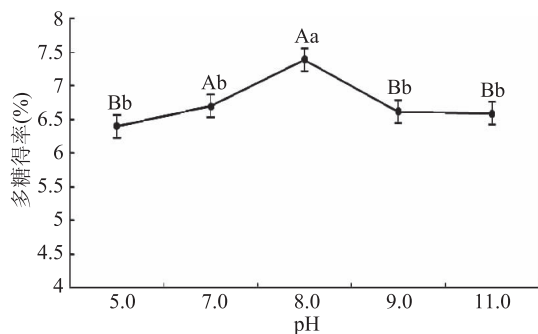


图2 pH对竹荪多糖得率的影响
Fig.2 Effect of pH on extraction amount of dictyophora polysaccharides

2.1.3 料液比对多糖得率的影响 由图3可以看出,竹荪多糖得率随着加水量的增加而升高,当料液比在 1:50~1:70 g/mL 之间时,竹荪多糖得率随着加水量的增加呈升高趋势;在 1:70~1:90 g/mL 之间时,竹荪多糖得率基本不变。这是因为虽然竹荪多糖被不断的浸出,但是溶剂水的量特别少,多糖还没有完全溶解就已达到了饱和,随着水量的增加,溶解的多糖也增多,且在一定范围内增加浸提液的体积可以增大溶剂与浸提物的接触面积,使水溶性的多糖能够较多的溶出,于是产生了随水量增加多糖得率升高的现象。当水量增加到可以溶解所有提取出的多糖时,继续增加水量,所溶解的多糖也不会再有所增加,出现了继续加水而多糖得率趋于平稳的现象^[17]。考虑到浸提液体积过大会增加提取时间、消耗能量,浸提液体积过小会造成多糖提取不能完全而浪费原料,选择料液比在 1:60~1:80 g/mL 之间较为合理。

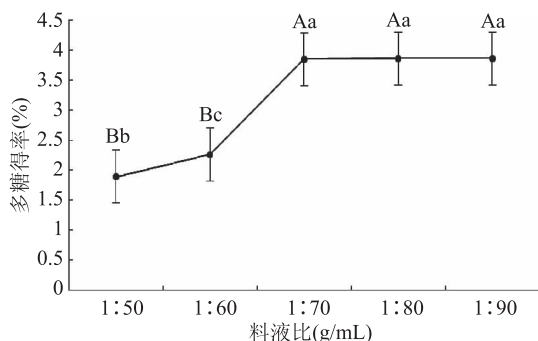


图3 料液比对竹荪多糖得率的影响

Fig.3 Effect of ratios of water to material on extraction amount of dictyophora polysaccharides

2.1.4 提取时间对多糖提取量的影响 由图4可以看出,当提取时间在 1~2 h 时,竹荪多糖得率随时间增加而升高,在 2~3 h 时,竹荪多糖得率随时间增加而变化较小。这是因为在提取初期,竹荪多糖能够被不断浸出;但是随着时间延长,竹荪多糖浸出量逐渐升高而不再有明显变化,所以尽管时间有延长也无法再提高多糖得率,故提取时间为 2 h 左右较为合理。

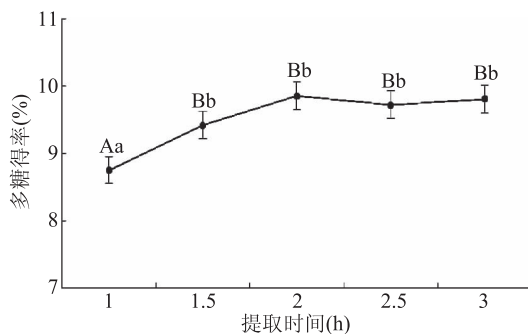


图4 提取时间对竹荪多糖得率的影响
Fig.4 Effect of time on extraction amount of dictyophora polysaccharides

2.2 正交实验

由表2分析可知,提取温度(A)、pH(B)、料液比(C)和提取时间(D)4个因素对竹荪多糖提取率影响的主次顺序为 A > B > D > C,并得到最佳提取工艺条件:提取温度为 90 °C, pH 为 8.0,料液比为 1:70 g/mL,提取时间为 2.5 h,即 A₃B₂C₂D₃。在此最佳提取条件下,竹荪多糖的得率为 13.09%。

表2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	多糖得率 (%)
1	1	1	1	1	8.60
2	1	2	2	2	9.36
3	1	3	3	3	9.43
4	2	1	2	3	7.14
5	2	2	3	1	7.78
6	2	3	1	2	5.96
7	3	1	3	2	9.54
8	3	2	1	3	12.87
9	3	3	2	1	12.35
K ₁	27.40	25.30	27.44	28.75	
K ₂	20.89	30.02	28.86	24.86	
K ₃	34.78	27.75	26.76	29.45	
k ₁	9.13	8.43	9.14	9.58	
k ₂	6.96	10.00	9.62	8.28	
k ₃	11.59	9.25	8.92	9.81	
R	13.88	4.72	2.09	4.58	

2.3 竹荪多糖抗氧化性分析

2.3.1 清除 ABTS 自由基能力测定 ABTS 在适当的氧化剂作用下会生成蓝绿色水溶性的 ABTS 自由基,其在 734 nm 处有最大吸收峰,当抗氧化剂存在时,ABTS 自由基产生受到抑制,溶液颜色变浅,吸光值降低,能直观地反映化合物的抗氧化活性^[18]。

由图5可知,在实验浓度范围内,随着质量浓度的增加,竹荪多糖对 ABTS 自由基的清除率逐渐增大。当竹荪多糖浓度为 0.6 mg/mL 时,清除率达到 92.76%。结果表明,当竹荪多糖达到一定浓度时对 ABTS 自由基具有较好的清除能力。抗坏血酸通过逐级供给电子而转变为半脱氧抗坏血酸和脱氢抗坏

血酸的过程清除体内多余的自由基,被广泛认可,竹荪多糖清除 ABTS 自由基的能力虽弱于抗坏血酸,但仍可作为抗氧化剂的储备。

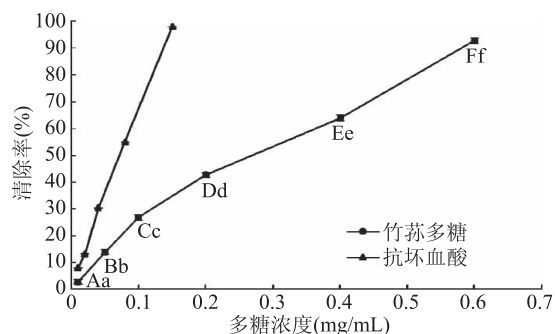


图5 竹荪多糖对 ABTS 自由基的清除作用

Fig.5 Scavenging activity of polysaccharides on ABTS radicals

2.3.2 清除 DPPH 自由基能力测定 DPPH 自由基具有单电子,在 517 nm 处有最大吸收峰,其醇溶液呈现典型紫色,当有自由基清除剂存在时,会与 DPPH 自由基的单电子配对,使其吸收逐渐减弱,溶液的典型紫色变浅,进而评价清除剂的清除能力^[14]。

竹荪多糖对 DPPH 自由基的清除作用结果如图 6 所示,在实验浓度范围内,随着质量浓度的增加,竹荪多糖对 ABTS 自由基的清除率逐渐增大。当竹荪多糖浓度为 25 mg/mL 时,清除率达到 70.55%。结果表明,当竹荪多糖达到一定浓度时对 ABTS 自由基具有较好的清除能力。抗坏血酸通过逐级供给电子而转变为半脱氧抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的过程清除体内多余的自由基,被广泛认可,竹荪多糖清除 DPPH 自由基的能力虽弱于抗坏血酸,但仍可作为抗氧化剂的储备。

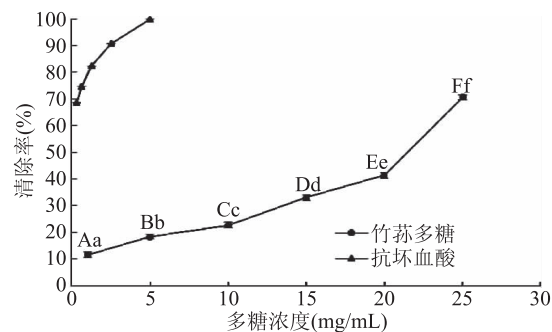


图6 竹荪多糖对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.6 Scavenging activity of polysaccharides on DPPH radicals

3 结论

通过研究提取温度、pH、料液比和提取时间对竹荪多糖得率的影响,用单因素实验和正交实验确定了水提法提取竹荪多糖的最佳工艺参数,即提取温度为 90 ℃,pH 为 8.0,料液比为 1:70 g/mL,提取时间为 2.5 h。在此条件下竹荪多糖的提取率达到 13.09%。抗氧化实验表明,当竹荪多糖浓度为 0.6 mg/mL 时,对 ABTS 自由基的清除率达到 92.76%;当竹荪多糖浓度为 25 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率达到 70.55%。说明竹荪多糖对

DPPH 自由基和 ABTS 自由基都具有一定的清除作用,具有较好抗氧化活性。

参考文献

- [1] 王俊杰,刘影.不同地区竹荪微量元素主成分分析[J].微量元素与健康研究,2016(1):46-47.
- [2] 郑杨,邹青青,张岱,等.竹荪的化学成分及生理活性研究进展[J].食品科学技术学报,2013(3):39-45.
- [3] W Liao, Z Yu, Z Lin, et al. Biofunctionalization of selenium nanoparticle with *Dictyophora indusiata* polysaccharide and its antiproliferative activity through death-receptor and mitochondria-mediated apoptotic pathways[J]. Scientific Reports, 2015(5): 1-13.
- [4] W Liao, Y Lu, J Fu, et al. Preparation and characterization of *Dictyophora indusiata* polysaccharide-zinc complex and its augmented antiproliferative activity on human cancer cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(29): 6525-6534.
- [5] 范巧宁,张伟刚,赵珮,等.棘托竹荪菌盖多糖的提取及体外抗氧化活性的研究[J].食品工业科技,2013(23):112-117.
- [6] 饶先军,汪立成,刘春梅,等.红托竹荪中营养成分的测定与研究[J].食品与发酵科技,2015(2):78-80.
- [7] C Deng, H Fu, L Teng, et al. Anti-tumor activity of the regenerated triple-helical polysaccharide from *Dictyophora indusiata*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 61(10): 453-458.
- [8] B Zhong, Y Ma, D Fu, et al. Induction of apoptosis in osteosarcoma S180 cells by polysaccharide from *Dictyophora indusiata*[J]. Cell Biochemistry Funct, 2013, 31(8): 719-723.
- [9] 张素斌,李晓平.竹荪多糖提取方法的比较研究[J].食品工业科技,2013(14):246-250.
- [10] 丁瑞瑞,令狐娅,郭春连,等.竹荪多糖提取工艺及其对肿瘤抑制作用的研究[J].广州化工,2014(15):61-63.
- [11] 裴莉昕,纪宝玉,陈随清,等.葛根多糖提取工艺的优化[J].中国现代中药,2017,19(4):553-567.
- [12] 张锐,曾冬云,龚兴国,等.羊栖菜多糖的提取工艺研究[J].中国食品学报,2006(3):14-18.
- [13] 陈虹霞,王成章,叶建中,等.漆树籽粕多糖的提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2016(4):254-258.
- [14] 白雨鑫,郭斌,韩冠英,等.罗摩果壳多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2015,36(20):278-283.
- [15] 马钊,李景明,李丽梅,等.洋葱多糖提取工艺的研究[J].食品工业科技,2005(5):98-99.
- [16] 刘芳,劳邦盛,吉立,等.甘蔗渣生物降解制备可溶性糖的研究[J].广东农业科学,2011(21):93-109.
- [17] 叶敏.红托竹荪多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性[J].贵州农业科学,2012,40(21):172-175.
- [18] 王森雨.马鞭石斛的多糖动态积累及抗氧化活性研究[D].成都:四川农业大学,2016.