

黑木耳多糖的磷酸化修饰 及其抗氧化活性研究

郑常领¹, 赵柄舒¹, 王玉华¹, 于寒松¹, 张永生², 刘俊梅^{1,*}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130118;

2. 吉林华鑫菌业有限责任公司, 吉林舒兰 132600)

摘要:本研究对黑木耳胞外多糖(*Auricularia auricular* polysaccharide, AAP)进行磷酸化修饰,通过响应面法优化了磷酸化修饰黑木耳多糖的工艺条件,并对磷酸化黑木耳多糖(phosphorylated *auricularia auricula* polysaccharide, P-AAP)进行抗氧化活性研究。结果显示磷酸化修饰黑木耳多糖的最佳条件为磷酸化试剂中三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, STPP)与三偏磷酸钠(sodium trimetaphosphate, STMP)质量比为5:2,反应温度88℃,反应时间5 h,反应pH为8.6,此条件下多糖中磷酸根含量为9.93%。抗氧化活性试验结果表明,与AAP相比,经过DEAE-Sephadex Fast Flow柱及葡聚糖凝胶G-100柱纯化后的P-AAP1对DPPH自由基的清除率提高了34.37%,半抑制浓度(IC₅₀)为1.07 mg/mL;对羟基自由基的清除率提高了30.39%,IC₅₀值为0.91 mg/mL;对超氧阴离子自由基的清除率提高了26.40%,IC₅₀值为0.41 mg/mL。因此,黑木耳胞外多糖通过磷酸化修饰后其抗氧化活性能被显著提高。

关键词:磷酸化修饰,黑木耳多糖,工艺优化,抗氧化

Study on the Phosphorylation Modification and Antioxidant Activity of Polysaccharides of *Auricularia auricular*

ZHENG Chang-ling¹, ZHAO Bing-shu¹, WANG Yu-hua¹, YU Han-song¹, ZHANG Yong-sheng², LIU Jun-mei^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Jilin Huaxin Fungus Industry Co., Ltd., Shulan 132600, China)

Abstract: In this study, phosphorylation modification of *Auricularia auricular* polysaccharide (AAP) was explored. The conditions for the phosphorylation of *Auricularia auricula* polysaccharide were optimized by response surface methodology. At the same time, the antioxidant activity for phosphorylated *Auricularia auricula* polysaccharide (P-AAP) was still explored. The results showed that the optimal conditions for the phosphorylation of *Auricularia auricular* polysaccharide were the mass ratio of sodium tripolyphosphate (STPP) to sodium trimetaphosphate (STMP) in phosphorylation reagent was 5:2, the temperature 88℃, pH was 8.6 and time was 5 h. Under these conditions, the content of phosphate in polysaccharides was 9.93%. In addition, P-AAP1 were obtained through DEAE-Sephadex Fast Flow and Sephadex G-100 chromatography. And the results of antioxidant activity showed that the DPPH radical scavenging rate of P-AAP1 increased by 34.37% compared with AAP, the half inhibitory concentration (IC₅₀) was 1.07 mg/mL. And the scavenging rate of hydroxyl radical increased by 30.39% compared with AAP, the IC₅₀ was 0.91 mg/mL. The scavenging rate of superoxide anion radicals increased by 26.40% compared with AAP, and the IC₅₀ was 0.41 mg/mL. In conclusion, the antioxidant activity of *Auricularia auricular* polysaccharide can be improved by phosphorylation modification.

Key words: phosphorylation modification; *Auricularia auricular* polysaccharide; optimization; antioxidant

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)17-0134-09

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.17.022

引文格式: 郑常领, 赵柄舒, 王玉华, 等. 黑木耳多糖的磷酸化修饰及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(17): 134-141, 147.

黑木耳(*Auricularia auricula*)是我国珍贵的食用菌之一^[1], 东北地区资源丰富, 其含有丰富的蛋白质、

收稿日期: 2018-11-19

作者简介: 郑常领(1992-), 男, 硕士, 研究方向: 食品生物化学与功能性食品, E-mail: changling614@163.com。

* 通讯作者: 刘俊梅(1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物化学与功能性食品, E-mail: spring430817@163.com。

基金项目: 吉林省科学技术厅重大专项(20116034); 吉林省科学技术厅重大专项(20150203001NY); 吉林省科学技术厅成果转化项目(20170307024NY)。

脂肪、维生素和微量元素等^[2], 并且还拥有极为丰富的多糖成分^[3]。随着近年来研究的深入, 已发现木耳多糖具有抗氧化^[4-5]、抗癌^[6]、抗凝血^[7]以及降低胆固醇^[8]等多种功能活性。作为一种天然活性物质, 黑木耳多糖成了食品、医药等领域的研究热点。

多糖的生物活性取决于聚合物的分子性质, 如单糖的分子量, 链的构象, 支链聚合的程度和糖苷键的类型等^[9], 研究发现, 合理的多糖化学修饰有利于提高多糖的生物活性, 如抗氧化^[10]、抗衰老^[11]、抗病毒^[12]等。多糖的化学修饰方法主要包括磷酸化、乙酰化、硫酸化等^[13], 其中磷酸化修饰是多糖支链结构中羟基被游离的磷酸根基团所取代的过程^[10]。近年来, 不少科研人员已经发现磷酸化修饰后的多糖抗氧化活性显著提高, 如 Yuan 等^[14]的研究表明, 磷酸化修饰显著提高了卡拉胶低聚糖清除 DPPH 自由基及羟基自由基的能力, 表明多糖的抗氧化活性经磷酸化修饰后被提高; 南征^[15]发现磷酸化修饰显著增强了杏鲍菇多糖超氧阴离子及羟基自由基的清除能力; Li 等^[16]报道了采用不同的化学修饰对芍药多糖的抗氧化活性的影响, 结果显示, 在羟基自由基清除能力上磷酸化表现出较其他修饰方法更高的清除率, 同时也证明了磷酸化修饰能提高多糖的抗氧化活性。虽然磷酸化修饰在理论上可以提高多糖的抗氧化活性, 但目前还没有针对磷酸化黑木耳多糖的抗氧化活性研究的报道。因此, 本研究对黑木耳胞外多糖进行磷酸化修饰, 并且通过测定其对 DPPH 自由基、羟基自由基以及超氧阴离子自由基的清除能力来评价磷酸化黑木耳多糖的抗氧化活性, 以期在黑木耳多糖的深加工和新型功能性食品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑木耳菌种 (HX01) 由吉林华鑫菌业有限责任公司提供; 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、水杨酸、邻苯三酚 美国 Sigma 公司; 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、三聚磷酸钠 (sodium tripolyphosphate, STPP)、三偏磷酸钠 (sodium trimetaphosphate, STMP)、浓硫酸、浓硝酸、Tris、钼酸铵、无水乙醇 以上试剂均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 液体发酵培养基 葡萄糖 20 g/L, 马铃薯浸提液 200 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, VB_1 0.05 g/L, 灭菌后备用。

FDU-7006 型真空冷冻干燥机 韩国 Operon 公司; IR-Prestige-21 型 FTIR 光谱仪 日本 Shimadzu 公司; UV-1700 型酶标仪 日本 Shimadzu 公司; DDS-11A 型台式电导率仪 上海贝威科技有限公司; AVY220 型分析天平 Mettler Toledo 公司; HH-SY11-Ni 型恒温水浴箱 北京长丰仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑木耳多糖的制备 参照刘俊梅等^[17]的方法, 略作修改。无菌条件下, 取直径约 1 cm² 的保存于斜面的种子菌丝块, 接种于装有 100 mL 液体发酵

培养基的 250 mL 锥形瓶中, 28 ℃, 150 r/min 的条件下摇瓶发酵 5 d, 得到液体种子。将液体种子按 10% 的接种量接种于装有 100 mL 液体发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 28 ℃, 150 r/min 的条件下液态深层发酵 5 d, 得到液态深层发酵液。液态深层发酵液于 5000 r/min 离心 10 min 后收集上清液。上清液浓缩至原体积的 1/5 倍后, 以三倍浓缩液体积的 95% 乙醇沉淀 24 h, 之后经真空冷冻干燥得到黑木耳多糖粗品。将粗多糖在 60 ℃ 水浴中复溶, 通过 Seavage 法除蛋白, H_2O_2 脱色, 然后利用透析袋透析除盐处理后得到黑木耳多糖纯品 (AAP)。

1.2.2 黑木耳多糖的磷酸化 参照 Ye 等^[18]的方法, 略作修改。称取磷酸化试剂 7 g (STPP 5 g + STMP 2 g), 溶解于蒸馏水中, 定容至 100 mL, 配制为 70 mg/mL 的磷酸化试剂。定容后加入 AAP 1 g, 硫酸钠 5 g, 溶解后调节 pH 至 9.0, 80 ℃ 条件下反应 5 h。反应结束后, 三倍体积的 95% 乙醇沉淀 24 h。5000 r/min 离心 10 min 去除乙醇, 将沉淀样品真空冷冻干燥。冻干样品在 60 ℃ 复溶, 复溶溶液于截流分子量为 8000~14000 Da 的透析袋中透析^[19], 检测样品中的电导率, 当电导率降至 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 时, 结束透析。透析后, 样品浓缩至原体积的 1/5 倍, 浓缩样品经三倍体积的 95% 乙醇沉淀 24 h, 除去乙醇后冻干样品即为磷酸化黑木耳多糖 (P-AAP)。

1.2.3 磷酸根含量的测定 磷酸根含量的测定采用钼蓝比色法^[20], 以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 KH_2PO_4 为磷酸根标准物。在试管中分别取 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 mL 磷酸根标准溶液, 用去离子水定容至 5 mL。依次添加 1 mol/L 的 Tris 3 mL, 20% V_C 水溶液 1 mL, 3 mol/L 硫酸溶液 1 mL, 3% 的钼酸铵溶液 1 mL, 之后在 30 ℃ 的恒温条件下反应 30 min, 测定样品溶液于 580 nm 波长处的吸光度。绘制标准曲线。

磷酸化黑木耳多糖中磷酸根的测定: 在烧杯中取 0.5 g 均匀的样品, 依次加入浓硫酸、浓硝酸各 1 mL, 并在通风橱中加热以产生白烟。冷却至室温, 之后加入 1 mL 30% H_2O_2 , 再次加热, 重复上述操作直至不产生白烟, 以完全分解有机物。加入浓度为 1 mL 的 6 mol/L HCl 并加热以分解酸。在进行测定时, 取 5 mL 样液通过标准曲线方法测定, 并计算多糖中的磷酸根含量 (以 P 计)。

1.2.4 黑木耳多糖磷酸化修饰的单因素实验

1.2.4.1 磷酸化试剂 (STPP 与 STMP 质量比) 磷酸化试剂通常由 STPP 及 STMP 组成, 浓度为 70 mg/mL 磷酸化试剂更利于磷酸化修饰多糖^[21], 本实验选用 STPP 及 STMP 质量比分别为 0:7、1:6、2:5、3:4、4:3、5:2、6:1 的磷酸化试剂, 在反应温度 80 ℃, pH = 8.0 的条件下反应 5 h 后通过钼蓝比色法测定其磷酸根含量, 研究不同 STPP 与 STMP 质量比的磷酸化试剂对 P-AAP 中磷酸根含量影响。

1.2.4.2 反应时间 选用 STPP 及 STMP 质量比为 5:2 的磷酸化试剂, 在 80 ℃ 和 pH = 8.0 的条件下, 分别反应 2、3、4、5、6 h, 研究不同反应时间对 P-AAP 磷酸根含量的影响。

1.2.4.3 反应温度 选用 STPP 及 STMP 质量比为

5:2的磷酸化试剂,分别在60、70、80、90、100℃,pH8的条件下反应5h。研究不同的温度对P-AAP中磷酸根含量的影响。

1.2.4.4 反应pH 选用STPP及STMP质量比为5:2的磷酸化试剂,在反应温度80℃,pH分别为6、7、8、9、10的条件下反应5h,探究不同反应pH对P-AAP中磷酸根含量的影响。

1.2.5 响应面法优化磷酸化条件 在单因素实验确定各因素取值范围的基础上,利用Box-Behnken中心组合试验设计原则。使用P-AAP中磷酸根的含量作为响应值,以磷酸化试剂中STPP质量(g),反应时间(h),反应温度(℃),反应pH为独立变量,设计四因素三水平响应面分析试验,以确定磷酸化修饰的最优工艺条件,响应面试验设计因素表见表1。

表1 响应面试验因素与水平

Table 1 Levels and factors of Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
A STPP质量(g)	4	5	6
B 温度(℃)	80	90	100
C pH	8.0	9.0	10.0
D 时间(h)	4	5	6

1.2.6 磷酸化黑木耳多糖的分离纯化 多糖在进行抗氧化试验之前有必要对其进行二次纯化,以排除其他因素对抗氧化试验结果的影响^[22],因此本试验对磷酸化多糖P-AAP先后通过DEAE-Sephadex Fast Flow柱以及Sephadex G-100柱进行分离纯化,以提高磷酸化多糖抗氧化试验结果的准确性。

1.2.6.1 DEAE-Sephadex Fast Flow 凝胶柱分离纯化 取磷酸化多糖P-AAP 5mg,溶于5mL蒸馏水中,加入到DEAE-Sephadex Fast Flow柱(1.6cm×30cm)中,以0.1、0.3、0.5、1mg/mL的NaCl溶液梯度洗脱,流速为1mL/min。逐管收集洗脱液,每管收集5mL,苯酚硫酸法检测多糖含量,并绘制曲线。

收集到的不同多糖洗脱液组分,经浓缩,冷冻干燥后得到磷酸化多糖的各个组分。

1.2.6.2 葡聚糖凝胶G-100柱纯化 取1.2.6.1中收集到的组分5mg,溶于5mL蒸馏水中,加入到Sephadex G-100柱(1.6cm×30cm)中,以蒸馏水进行洗脱,流速为0.5mL/min,每管收集3mL,苯酚硫酸法检测多糖含量,并绘制曲线。收集到的多糖洗脱液,经浓缩,冷冻干燥后得到磷酸化多糖组分。

1.2.7 红外光谱分析 使用FTIR光谱仪测定多糖的红外光谱。纯化后的P-AAP及AAP用光谱级KBr粉末以1:200的比例研磨后压片,在4000~400cm⁻¹的波数范围内进行测量。

1.2.8 DPPH自由基清除能力试验 参照You等^[23]的方法,略作修改。在比色管中添加3mL的5mmol/L DPPH-乙醇溶液,不同浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mg/mL)的多糖样液1mL。摇匀后,在黑暗中静置30min。于517nm处测定吸光值,记为A₁;样品溶液用1mL无水乙醇代替,

517nm处吸光值分别记为A₀;用3mL蒸馏水代替DPPH-乙醇溶液,517nm处吸光值分别记为A₂。V_c作为参照物。按照式(1)计算多糖对DPPH自由基的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.9 羟基自由基清除能力试验 采用水杨酸法测定,参照Sun等^[24]的方法,稍作修改。依次向比色管中加入9mmol/L FeSO₄ 1mL,9mmol/L水杨酸-乙醇溶液1mL,不同浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mg/mL)的多糖样液1mL,加入8.8mmol/L H₂O₂ 1mL后摇匀,在37℃下反应30min,于510nm处测定样液的吸光值,记为A₁。用1mL蒸馏水代替样液,记510nm处吸光值为A₀;用1mL蒸馏水代替H₂O₂溶液,记517nm处吸光值为A₂。以V_c为参照物。以公式(1)计算多糖对羟基自由基的清除率。

1.2.10 超氧阴离子自由基清除能力试验 采用邻苯三酚法^[25]测定,在比色管中加入0.05mol/L,pH7.4的Tris-HCl缓冲液3mL,不同浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mg/mL)的多糖样液1mL,60mmol/L邻苯三酚溶液1mL,快速混合,每隔30s测定325nm处吸光值,直至300s,A₀=A_{300s}-A_{30s};以1mL蒸馏水替代样液,325nm处吸光值,A₁=A_{300s}-A_{30s}。以V_c为参照物。按照式(2)计算多糖对超氧阴离子自由基的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.3 数据处理

本实验所有实验数据均重复测定三次,采用Origin 2017软件作图分析结果,利用Design Expert 8.0.6软件设计响应面实验并分析数据,采用SPSS 22软件进行数据统计学分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 磷酸化试剂对黑木耳多糖中磷酸根含量的影响 以黑木耳胞外多糖中磷酸根含量作为磷酸化修饰程度的评价指标,磷酸根含量越高表示磷酸根基团接枝率越高,修饰程度也越高^[26]。由表2可知,单独使用STPP或STMP的磷酸化试剂后多糖的磷酸根含量均不及二者复合使用时磷酸根的含量,说明反应中二种试剂相互影响,使多糖中磷酸根含量发生变化。磷酸化试剂中STPP质量在1~5g的范围内时,随着STPP质量的增加,磷酸根的含量呈上升趋势,当磷酸化试剂中STPP质量达到5g时,磷酸根含量达到最大值,为7.94%。随后当磷酸化试剂中STPP质量为6g时磷酸根含量呈下降趋势,因为磷酸化试剂中STPP质量达到一定值后会导致黑木耳多糖结构的破坏^[27],从而影响多糖中磷酸根的含量。因此,选择磷酸化试剂中STPP质量为5g进行响面试验。

2.1.2 反应时间对黑木耳多糖中磷酸根含量的影响 由图1可知,反应时间在2~5h范围内时,随反应时间的延长,磷酸根的含量呈现上升趋势,其中反

表2 磷酸化试剂对黑木耳多糖中磷酸根含量的影响

Table 2 Effect of phosphorylation reagents on the content of phosphate group in AAP

试验号	STPP: STMP (g)	磷酸根含量 (%)
1	0:0	1.50 ± 0.05
2	0:7	5.58 ± 0.21
3	1:6	5.97 ± 0.33
4	2:5	6.15 ± 0.18
5	3:4	6.49 ± 0.06
6	4:3	7.00 ± 0.27
7	5:2	7.94 ± 0.31
8	6:1	6.89 ± 0.26
9	7:0	5.77 ± 0.15

注:1 号为 AAP 中磷酸根的含量。

应时间为 5 h 时,黑木耳多糖磷酸根含量达到最大值,为 8.02%。但当时间达到 6 h 时,磷酸根的含量有所下降,这是由于高温下长时间反应对多糖结构有所破坏,导致磷酸根含量降低^[28]。因此,选择反应时间为 5 h 进行响应面试验。

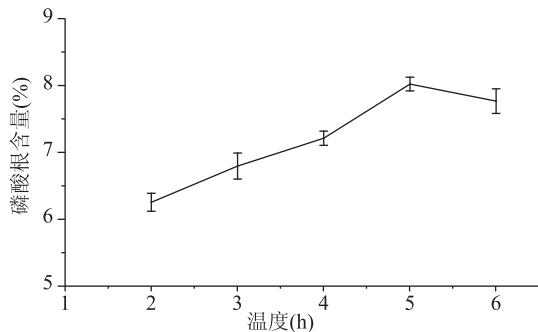


图1 反应时间对黑木耳多糖中磷酸根含量的影响

Fig.1 Effect of reaction time on the content of phosphate group in AAP

2.1.3 反应温度对黑木耳多糖中磷酸根含量的影响 从图2可以看出,在温度为 60~100 ℃ 范围内时,温度升高,磷酸根含量增加,在 90 ℃ 达到最大值,为 8.19%。然而,当温度进一步升高时,由于过高的温度导致多糖结构的破坏,从而磷酸根含量降低^[28]。因此,选择反应温度为 90 ℃ 进行响应面试验。

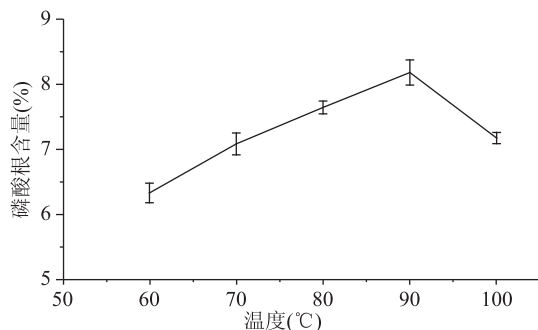


图2 反应温度对黑木耳多糖中磷酸根含量的影响

Fig.2 Effect of reaction temperature on the content of phosphate group in AAP

2.1.4 反应 pH 对黑木耳多糖中磷酸根含量的影

响 由图3可知,碱性条件下对于磷酸根接枝于黑木耳多糖的结构上更加有利,因为糖苷键在酸性条件下容易水解,多糖降解严重^[29-30]。pH 在 6.0~9.0 时,磷酸根含量逐渐上升,其原因是因为碱性条件下更利于磷酸根的接支作用。当 pH 为 9.0 时,磷酸根含量达到最大值,为 8.15%。但当 pH 继续升高时,磷酸根含量呈现下降趋势,这是由于过高的碱性环境会抑制磷酸化试剂的接支作用所造成的^[31]。因此,选择反应 pH 为 9.0 进行响应面试验。

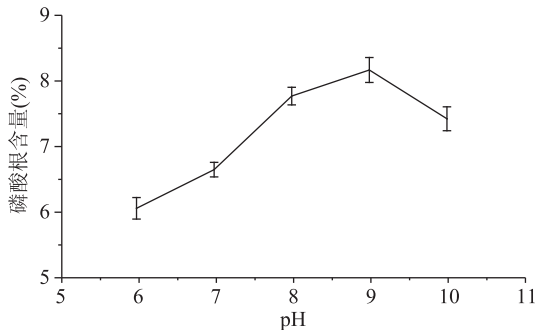


图3 反应 pH 对黑木耳多糖中磷酸根含量的影响

Fig.3 Effect of pH on the content of phosphate group in AAP

2.2 响应面法优化黑木耳多糖磷酸化修饰条件的结果

2.2.1 响应面试验设计及结果 在单因素优化试验的基础上,以磷酸化试剂中 STPP 的质量、反应时间、反应温度以及反应 pH 为自变量,黑木耳多糖中磷酸根含量作为响应值,设计四因素三水平响应面分析试验,试验方案设计及结果见表3。

2.2.2 回归模型方差分析 回归模型方差以及显著性分析的结果如表4所示。

由表4可以得出,此模型的 $P < 0.01$,表明模型差异极显著,失拟项的 $P > 0.05$,不显著;总决定系数 $R^2 = 0.9613$,表明此模型拟合良好,校正系数 $R^2_{adj} = 0.9226$,表明此模型可以解释 92.26% 的响应值。综上,该模型可被用于分析和预测磷酸化修饰黑木耳多糖的工艺优化。对表4的数据进行拟合,得到磷酸根含量(Y)及自变量之间的回归方程,即:

$$Y = -304.00333 + 9.63583A + 3.59982B + 21.63317C + 15.00583D - 3.5 \times 10^{-3}AB + 0.105AC - 0.4275AD - 0.04375BC - 5.5 \times 10^{-3}BD + 0.215CD - 0.81925A^2 - 0.018018B^2 - 1.12175C^2 - 1.40925D^2$$

由表4可知,因素中一次项 B、C,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对磷酸根含量具有极显著的影响,表明各因素与响应值之间不是简单的线性关系,其中 AD、BC 对磷酸根含量影响显著。

2.2.3 响应面分析与优化 各因素以及两两因素之间交互作用对响应值的影响情况可以直观地从响应面图形中反映出来^[32]。如图4、图5显示了黑木耳多糖磷酸根含量的 3D 响应面图及等高线图。

由图4~图5可以看出,磷酸化试剂中 STPP 质量与反应时间以及温度与 pH 之间有交互作用。且图4~图5中响应面图形开口向下,有最大值,表明此模

表3 磷酸化修饰参数响应面方案设计及结果

Table 3 Optimization of response surface analysis and design of phosphorylated conditions

试验号	A	B	C	D	磷酸根含量 (%)	试验号	A	B	C	D	磷酸根含量 (%)
1	-1	1	0	0	6.32	16	0	0	1	1	6.34
2	1	0	1	0	6.47	17	0	0	0	0	9.73
3	0	0	0	0	9.33	18	0	0	0	0	9.75
4	0	1	1	0	5.11	19	-1	0	0	-1	6.88
5	1	0	0	-1	7.83	20	-1	0	1	0	6.52
6	0	-1	0	-1	7.09	21	1	-1	0	0	7.43
7	1	0	0	1	7.49	22	0	1	-1	0	7.08
8	-1	0	0	1	8.25	23	0	-1	0	1	7.41
9	0	0	-1	-1	7.95	24	-1	0	-1	0	8.83
10	0	1	0	-1	5.25	25	0	0	1	-1	5.34
11	0	0	-1	1	8.09	26	1	0	-1	0	8.36
12	-1	-1	0	0	7.58	27	0	-1	-1	0	7.85
13	0	-1	1	0	7.63	28	0	0	0	0	9.29
14	0	0	0	0	9.88	29	0	1	0	1	5.35
15	1	1	0	0	6.03						

表4 回归模型的方差分析数据

Table 4 Variance analysis data of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	51.73	14	3.70	24.83	<0.0001	**
A	0.049	1	0.049	0.33	0.5637	
B	8.09	1	8.09	54.32	<0.0001	**
C	9.63	1	9.63	64.70	<0.0001	**
D	0.56	1	0.56	3.76	0.0731	
AB	0.0049	1	0.0049	0.033	0.8586	
AC	0.0441	1	0.044	0.30	0.5948	
AD	0.73	1	0.73	4.91	0.0438	*
BC	0.77	1	0.77	5.14	0.0397	*
BD	0.012	1	0.012	0.081	0.7797	
CD	0.18	1	0.18	1.24	0.2838	
A ²	4.35	1	4.35	29.25	<0.0001	**
B ²	21.06	1	21.06	141.47	<0.0001	**
C ²	8.16	1	8.16	54.84	<0.0001	**
D ²	12.88	1	12.88	86.55	<0.0001	**
残差	2.08	14	0.15			
失拟项	1.80	10	0.18	2.51	0.1948	不显著
纯误差	0.29	4	0.072			
总和	53.82	28				

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

型可进行最优结果分析。通过软件优化，以磷酸根含量为指标，得到磷酸化修饰黑木耳多糖的工艺参数为磷酸化试剂中 STPP 质量为 4.93 g，反应温度 88.16 ℃，反应时间 5.06 h，反应 pH 为 8.64，磷酸根含量预期值为 9.84%。考虑到实际条件，参数确定为磷酸化试剂中 STPP 质量为 5 g，STMP 质量 2 g，反应温度 88 ℃，反应时间 5 h，反应 pH 为 8.6。在当前条件下，对 AAP 进行磷酸化修饰，测得磷酸根含量为 (9.93% ± 0.21%，n = 3)，与预期值接近，说明该模型可应用于磷酸化修饰黑木耳多糖。

2.3 磷酸化多糖的分离纯化结果

如图 6，磷酸化黑木耳多糖 P-AAP 经 DEAE-Sephrose Fast Flow 柱层析，分别于蒸馏水以及 0.1 mol/L 的 NaCl 两个洗脱溶液处得到了 2 个洗脱峰。由于第二个峰不易收集，所以对第一个峰收集，之后经浓缩，真空冷冻干燥，命名为 P-AAP1，进行下一步试验。

如图 7，P-AAP1 经 Sephadex G-100 柱纯化后，在蒸馏水的洗脱下得到一个单一对称峰，表明该多糖组分无其他杂质，P-AAP1 磷酸化多糖组分经液

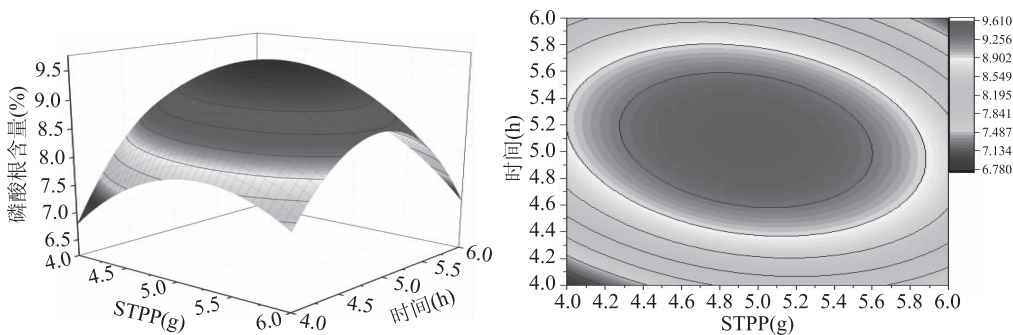


图4 STPP 质量及反应时间对磷酸根含量的影响

Fig.4 Effect of STPP addition and reaction time on the content of phosphate group

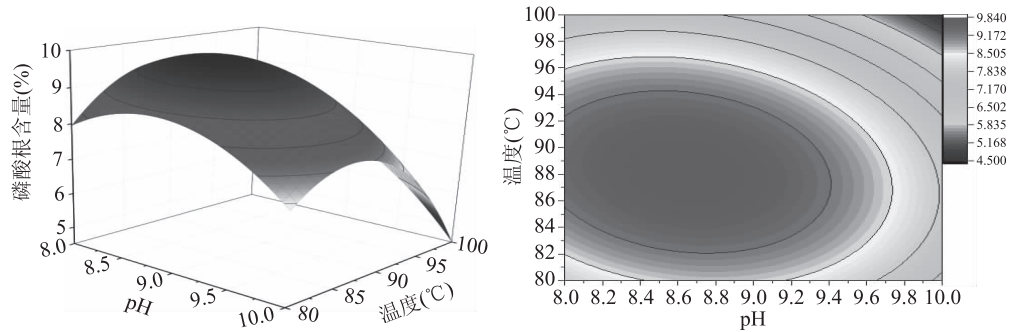


图5 反应 pH 及反应温度对磷酸根含量的影响

Fig.5 Effect of pH and reaction temperature on the content of phosphate group

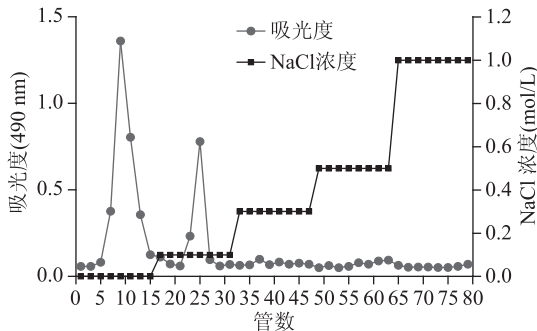


图6 磷酸化多糖 P-AAP 的 DEAE-Sephrose Fast Flow 洗脱曲线

Fig.6 Chromatography of P-AAP on DEAE-Sephrose Fast Flow

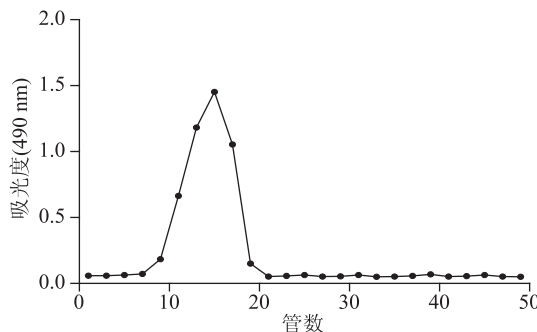


图7 磷酸化多糖 P-AAP1 的 Sephadex G-100 洗脱曲线

Fig.7 Chromatography of P-AAP1 on Sephadex G-100

缩,真空冷冻干燥后进行下一步试验。

2.4 磷酸化黑木耳多糖的红外光谱分析结果

AAP 及 P-AAP1 在 4000~400 cm^{-1} 波数范围内的红外光谱图结果如图 8 所示。

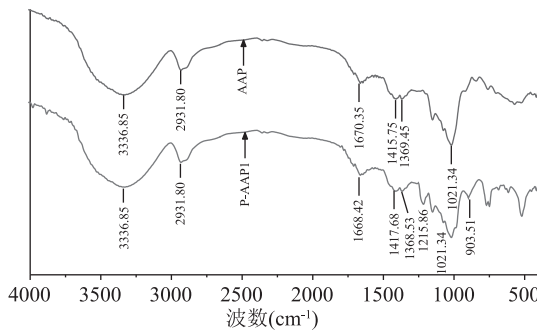


图8 黑木耳多糖 AAP 及磷酸化黑木耳多糖 P-AAP1 的红外光谱图

Fig.8 Infrared (IR) analysis of AAP and P-AAP1

该吸收峰为典型的多糖吸收峰并且磷酸化前后峰型未发生较大变化,说明多糖的主体结构没有变化^[33]。P-AAP1 和 AAP 在 3336 cm^{-1} 处的吸收峰为 -OH 的伸缩振动吸收峰,表明 P-AAP1 和 AAP 中含有分子内氢键^[34];2931、1417 cm^{-1} 处为 C-H 的伸缩振动吸收峰,为糖类的特征吸收峰^[35];其中 1668 cm^{-1} 处的吸收峰是羰基 C=O 键的吸收峰;1021 cm^{-1} 处的吸收峰表明 P-AAP1 和 AAP 为吡喃糖^[36]。除此之外, P-AAP1 在 1215 cm^{-1} 处的吸收峰为 P=O 键的伸缩振动吸收峰,903 cm^{-1} 处的吸收峰为 P-O-C 键的吸收峰^[37],这两个峰的变化表明有磷酸基团接入。综上,磷酸化修饰黑木耳多糖成功,所得产物为磷酸化黑木耳多糖。

2.5 磷酸化黑木耳多糖的抗氧化活性分析结果

2.5.1 DPPH 自由基清除能力分析 AAP 及 P-AAP1 的 DPPH 自由基的清除率结果如图 9 所示。

由图 9 可知,P-AAP1 在一定浓度范围内,浓度

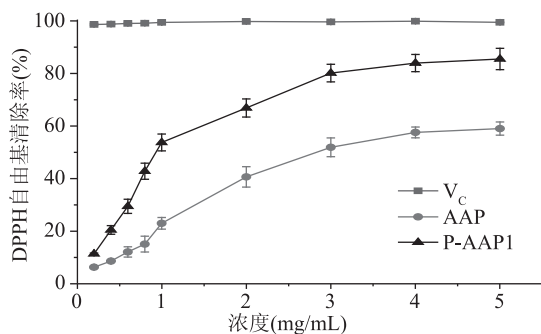


图9 磷酸化黑木耳多糖的 DPPH 自由基的清除率

Fig.9 Scavenging rate of DPPH radical

by phosphated *Auricularia auricular* polysaccharides

与清除率呈现量效关系,并且浓度越高,多糖对 DPPH 自由基的清除率越高。在浓度为 5 mg/mL 时, P-AAP1 和 AAP 的清除率分别为 87.97%、53.60%, P-AAP1 较 AAP 的清除率提高了 34.37 个百分点,说明磷酸化修饰提高了黑木耳多糖清除 DPPH 自由基的能力。更低的半抑制浓度 IC_{50} 值反应了更强的清除自由基能力^[38], P-AAP1、AAP 及 V_c 的 IC_{50} 值分别为 1.07、3.14、0.19 mg/mL, P-AAP1 的 IC_{50} 值虽高于 V_c ,但低于 AAP,说明磷酸化修饰可以提高黑木耳多糖清除 DPPH 自由基的能力。Deng 等^[39]证明了大型真菌竹荪中的多糖,经磷酸化修饰后提高了多糖对 DPPH 自由基的清除能力,并且同样拥有剂量依赖性。

2.5.2 羟基自由基清除能力分析 AAP 及 P-AAP1 的羟基自由基的清除率结果如图 10 所示。

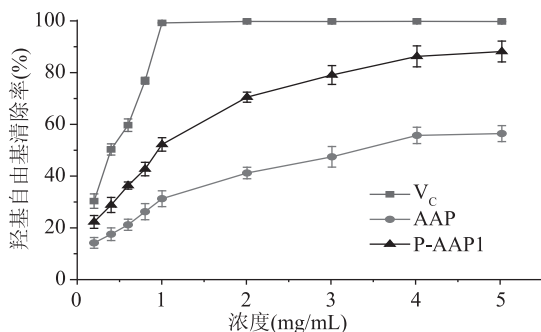


图 10 磷酸化黑木耳多糖的羟基自由基的清除率

Fig.10 Scavenging rate of hydroxyl radical

by phosphated *Auricularia auricular* polysaccharides

由图 10 可知, P-AAP1 和 AAP 对羟基自由基都有清除作用,并且反映出清除率对多糖浓度具有依赖性。在浓度为 5 mg/mL 时, P-AAP1 和 AAP 的清除率分别为 86.63%、56.24%, P-AAP1 较 AAP 的清除率提高了 30.39 个百分点,表明磷酸化修饰后对羟基自由基的清除作用有所提高。P-AAP1 的 IC_{50} 值为 0.91 mg/mL, 高于 V_c 的 IC_{50} 值 0.42 mg/mL,但低于 AAP 的 IC_{50} 值 3.34 mg/mL,说明黑木耳多糖经磷酸化修饰后可以有效的提高其清除羟基自由基的能力。Guo 等^[40]对乳酸乳球菌的胞外多糖进行磷酸化修饰后证明了同样的结论。

2.5.3 超氧阴离子自由基清除能力分析 AAP 及 P-AAP1 的超氧阴离子自由基的清除率结果如图 11 所示。

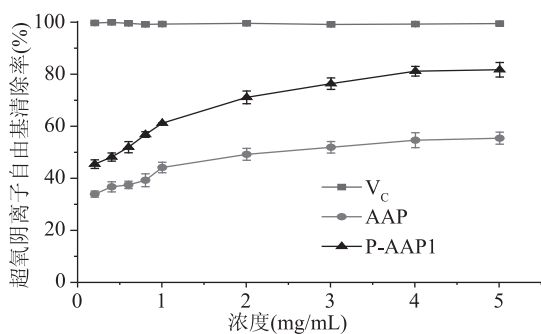


图 11 磷酸化黑木耳多糖的超氧阴离子自由基的清除率

Fig.11 Scavenging rate of superoxide anion radical

by phosphated *Auricularia auricular* polysaccharides

由图 11 可知, P-AAP1 对超氧阴离子自由基的清除能力在浓度的增加的同时呈现上升趋势,在浓度为 5 mg/mL 时, P-AAP1 和 AAP 的清除率分别为 81.26%、54.86%, P-AAP1 较 AAP 的清除率提高了 26.40 个百分点,表明磷酸化修饰后提高了黑木耳多糖对超氧阴离子自由基的清除率。P-AAP1、AAP 和 V_c 的 IC_{50} 值分别为 0.41、2.24、0.12 mg/mL, P-AAP1 的 IC_{50} 值虽高于 V_c 的 IC_{50} 值,但相对于 AAP 的 IC_{50} 值明显降低,表明磷酸化修饰可以提高黑木耳多糖清除超氧阴离子的能力,而且与其他两种自由基清除能力相比, P-AAP1 对超氧阴离子自由基的清除能力,表现的更突出。孙婕等^[41]对南瓜多糖磷酸化修饰后也证明了同样的结论,即磷酸化后的多糖具有对超氧阴离子更强的清除能力。

3 结论

通过单因素与响应面试验优化后,得到磷酸化修饰黑木耳多糖的最优工艺参数,在最优工艺参数下多糖中磷酸根含量为 9.93%,与模型预期值 9.84% 接近。红外光谱试验结果显示磷酸化修饰前后多糖的主体结构未发生变化,并且多糖结构中有磷酸基团的出现,说明磷酸化修饰成功。抗氧化活性试验结果表明, P-AAP1 较 AAP 具有更强的抗氧化活性。其中 P-AAP1 在浓度为 5 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率为 87.97%, IC_{50} 值为 1.07 mg/mL;浓度为 5 mg/mL 时,对羟基自由基的清除率为 86.63%, IC_{50} 值为 0.91 mg/mL;浓度为 5 mg/mL 时,对超氧阴离子自由基的清除率为 81.26%, IC_{50} 值为 0.41 mg/mL。本试验中三种自由基清除率均提升, IC_{50} 值均降低,说明通过磷酸化修饰的方法能够提高黑木耳多糖的抗氧化活性。

多糖的抗氧化活性是因其含有的羟基和糖蛋白复合物而产生的,黑木耳多糖经过磷酸化修饰后其分子结构发生了衍生,从而生物活性发生改变,进一步影响黑木耳多糖的抗氧化活性。也有学者认为多糖经化学修饰,化学基团取代多糖上的羟基后,结构发生变化,更多的羟基被暴露从而抗氧化活性增强。但目前磷酸化黑木耳多糖的抗氧化作用机理还不明确,仍需进一步探讨研究。

参考文献

[1] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.

- [2] Sun S, Zhang X, Chen W, et al. Production of natural edible melanin by *Auricularia auricula* and its physicochemical properties[J]. Food Chemistry, 2016, 196: 486–492.
- [3] Ma Z, Wang J, Zhang L, et al. Evaluation of water soluble β -d-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 977–983.
- [4] Zeng W C, Zhang Z, Gao H, et al. Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(2): 694–700.
- [5] Xu Y, Shen M, Chen Y, et al. Optimization of the polysaccharide hydrolysate from *Auricularia auricula* with antioxidant activity by response surface methodology [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 543–549.
- [6] Ma Y, Wang C, Zhang Q, et al. The effects of polysaccharides from *Auricularia auricula* (Huaier) in adjuvant anti-gastrointestinal cancer therapy: A systematic review and network meta-analysis[J]. Pharmacological Research, 2018, 132: 80–89.
- [7] Yoon S J, Yu M A, Pyun Y R, et al. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin [J]. Thrombosis Research, 2003, 112(3): 151–158.
- [8] Zhao S, Rong C, Liu Y, et al. Extraction of a soluble polysaccharide from *Auricularia polytricha* and evaluation of its anti-hypercholesterolemic effect in rats [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 122: 39–45.
- [9] Song Y, Ni Y Y, Hu X S, et al. Effect of phosphorylation on antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita pepo*, *Lady godiva*) polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 41–48.
- [10] Wang J, Yang T, Tian J, et al. Synthesis and characterization of phosphorylated galactomannan: The effect of DS on solution conformation and antioxidant activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 113(11): 325–335.
- [11] Zhang M, Su N, Zhang Q, et al. Phosphorylation and antiaging activity of polysaccharide from *Trichosanthes peel* [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(4): 976–983.
- [12] Feng H, Fan J, Yang S, et al. Antiviral activity of phosphorylated *Radix Cyathulae officinalis* polysaccharide against Canine Parvovirus *in vitro* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 511–518.
- [13] Chen F, Huang G. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 211–216.
- [14] Yuan H, Zhang W, Li X, et al. Preparation and *in vitro* antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(4): 685–692.
- [15] 南征. 杏鲍菇多糖的化学修饰及体外生物活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2014.
- [16] Li X L, Kiran T, Zhang Y Y, et al. Effects of different chemical modifications on the antibacterial activities of polysaccharides sequentially extracted from peony seed dreg [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 664–675.
- [17] 刘俊梅, 丁伟, 王庆, 等. 基于黑木耳菌 Aas1502 液态深层发酵培养基组成的优化 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(5): 196–200, 215.
- [18] Ye M, Yuan R Y, He Y L, et al. Phosphorylation and anti-tumor activity of exopolysaccharide from *Lachnum YM120* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(2): 690–694.
- [19] 孙雪, 潘道东, 曾小群, 等. 浒苔多糖的磷酸化修饰工艺 [J]. 食品科学, 2011, 32(24): 73–77.
- [20] 张难, 吴远根, 莫莉萍, 等. 磷酸化香菇多糖制备工艺的研究 [J]. 食品科技, 2008, 33(2): 81–85.
- [21] 李益, 钱慈, 郭明, 等. 香菇多糖磷酸化修饰的工艺研究 [J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2013, 30(5): 664–670.
- [22] Chen J, Huang G. Antioxidant activities of garlic polysaccharide and its phosphorylated derivative [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 125: 432–435.
- [23] You L, Zhao M, Regenstein J M, et al. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion [J]. Food Chemistry, 2011, 124(1): 188–194.
- [24] Sun Y, Yang B, Wu Y, et al. Structural characterization and antioxidant activities of κ -carrageenan oligosaccharides degraded by different methods [J]. Food Chemistry, 2015, 178: 311–318.
- [25] Zhu H, Tian L, Zhang L, et al. Preparation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from spent *Lentinus edodes* substrate [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 976–984.
- [26] Feng H, Fan J, Yang S, et al. Antiviral activity of phosphorylated *Radix Cyathulae officinalis* polysaccharide against Canine Parvovirus *in vitro* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 511–518.
- [27] 陈立贵, 王忠, 付蕾, 等. 魔芋葡甘聚糖的磷酸酯化改性研究 [J]. 安徽农业科学, 2007(33): 10841–10842.
- [28] 倪海钰, 关珊, 衣蕾, 等. 响应面法对磷酸化淫羊藿多糖制备工艺的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(7): 114–119.
- [29] Chen F, Huang G. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 211–216.
- [30] 田苏阳. 当归多糖的提取、化学修饰、抗氧化活性及其结构的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2016.
- [31] 路焱. 磷酸化姬松茸多糖的制备及药理作用研究 [D]. 天津: 天津农学院, 2016.
- [32] 陈炼红, 杨丽珠, 索化夷, 等. 响应面法优化松茸多糖酶法提取工艺及其体外抗氧化性分析 [J]. 食品科学, 2014, (16): 23–28.
- [33] Wang X, Zhang Z, Yao Q, et al. Phosphorylation of low-molecular-weight polysaccharide from *Enteromorpha linza* with antioxidant activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(2): 371–375.
- [34] Sun J, Zhou B, Tang C, et al. Characterization, antioxidant

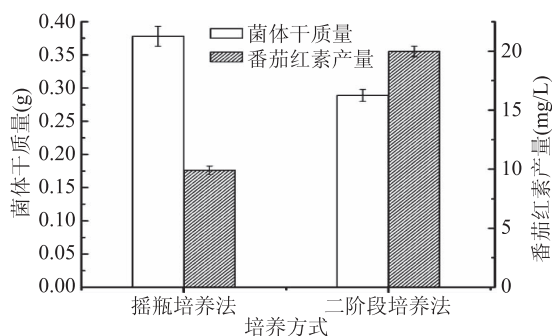


图6 二阶段培养法与摇瓶培养法
对菌体干质量和番茄红素产量的影响

Fig.6 Effects of two-stage culture and shake

culture on dry cell weight and lycopene production

23.54%，番茄红素的产量提高了102.54%。

参考文献

- [1] Ferreira A L A, Corrêa C R. Lycopene bioavailability and its effects on health[M]. Vienna: Springer, 2013: 63-76.
- [2] Müller L, Carisveyrat C, Lowe G, et al. Lycopene and its antioxidant role in the prevention of cardiovascular diseases - a critical review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(11): 1868-1879.
- [3] Yang T, Yang X, Wang X, et al. The role of tomato products and lycopene in the prevention of gastric cancer: A meta-analysis of epidemiologic studies [J]. Medical Hypotheses, 2013, 80(4): 383-388.
- [4] Eenwyk J V, Davis F G, Bowen P E. Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia [J]. International Journal of Cancer, 2010, 48(1): 34-38.
- [5] Ascenso A, Ribeiro H, Marques H C, et al. Chemoprevention of photocarcinogenesis by lycopene [J]. Experimental Dermatology, 2015, 23(12): 874-878.
- [6] Friedman M. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(40): 9534-9550.
- [7] 耿英龙, 陈钢, 苏伟, 等. 粗糙脉孢菌产番茄红素发酵条件的优化 [J]. 食品科学, 2014, 35(17): 181-185.

(上接第141页)

- activity and hepatoprotective effect of purple sweetpotato polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 69-76.
- [35] Ming K, Chen Y, Shi J, et al. Effects of chrysanthemum indicum polysaccharide and its phosphate on anti-duck hepatitis a virus and alleviating hepatic injury [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102: 813-821.
 - [36] Nie C, Zhu P, Ma S, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 188: 236-242.
 - [37] Wang J, Wang Y, Xu L, et al. Synthesis and structural features of phosphorylated *Artemisia sphaerocephala* polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 181: 19-26.

- [8] 李陈陈, 陈钢, 苏伟, 等. 固体培养粗糙脉孢菌产番茄红素及抗氧化活性研究 [J]. 中国酿造, 2017, 36(4): 30-35.
- [9] Papagianni M. Recent advances in solid-state fermentation applications for the food industry [J]. Current Biochemical Engineering, 2014, 1(1): 2-8.
- [10] Zalokar M. Studies on biosynthesis of carotenoids in *Neurospora crassa* [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1954, 50(1): 71-80.
- [11] He C, Sun X Y, Duan B H. *Neurospora lca-1* regulates conidiation and carotenoid production [J]. Agricultural Science & Technology, 2013, 14(1): 14-17, 71.
- [12] Morton A G. The Induction of sporulation in mouldfungi [J]. Proceedings of the Royal Society of London, 1961, 153(953): 548-569.
- [13] Axelrod D E. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans* [J]. Journal of general microbiology, 1972, 73(1): 181-184.
- [14] 刘静, 李中元, 王军娥, 等. 丝状真菌产孢机制及其相关基因研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2009, 37(4): 81-84.
- [15] Zhu Y X, Yao L Y, Jiao R H, et al. Enhanced production of Fumigaclavine C in liquid culture of *Aspergillus fumigatus* under a two-stage process [J]. Bioresource Technology, 2014, 152(1): 162-168.
- [16] 欧明花, 陈钢, 耿英龙, 等. 响应面法优化粗糙脉孢菌中番茄红素的提取工艺 [J]. 食品科学, 2015, 36(18): 75-79.
- [17] Barba A I O, Hurtado M C, Mata M C S, et al. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables [J]. Food Chemistry, 2006, 95(2): 328-336.
- [18] Csamaniego-sánchez C, Stagno J J, Quesada-grana-Dos, et al. HPLC method and antioxidant activity for bioactive component determination of *Lycopodium esculentum* Mill. varieties from a coastal area of southern Spain [J]. Food Anal Method, 2014, 7(3): 660-668.
- [19] Lopez-nieto M J, Costa J, Peiro E, et al. Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 66(2): 153-159.
- [20] 杨倩, 蔡茜茜, 郭淋凯, 等. 响应面法优化提取小球藻蛋白质及其性质研究 [J]. 中国食品学报, 2018, 6(18): 183-189.

- [38] Shao L L, Xu J, Shi M J, et al. Preparation, antioxidant and antimicrobial evaluation of hydroxamated degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* [J]. Food Chemistry, 2017, 237: 481-487.
- [39] Deng C, Fu H, Xu J, et al. Physicochemical and biological properties of phosphorylated polysaccharides from *Dictyophora indusiata* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 894-899.
- [40] Guo Y, Pan D, Sun Y, et al. Antioxidant activity of phosphorylated exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(2): 849-854.
- [41] 孙婕, 尹国友, 牛美艳, 等. 磷酸酯化南瓜多糖的制备及抗氧化活性研究 [J]. 四川农业大学学报, 2013, 31(3): 322-327.