

杨申明,王振吉,管春平,等.微波辅助提取白背毛木耳多糖的工艺优化及抗氧化性研究[J].江苏农业科学,2016,44(8):357-359.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.103

微波辅助提取白背毛木耳多糖的工艺优化及抗氧化性研究

杨申明,王振吉,管春平,代东

(楚雄师范学院化学与生命科学学院,云南楚雄 675000)

摘要:采用微波辅助提取白背毛木耳(*Auricularia polytricha*)多糖,通过单因素试验和正交试验对多糖提取工艺参数进行优化,并研究所提取的多糖对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除作用。结果表明:多糖的最佳提取工艺参数为微波时间 3.0 min、料液比 1:45(g/mL)、微波功率 640 W;在此条件下多糖平均提取率为 14.87%,平均加样回收率为 98.25%;多糖对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除率最大分别为 44.57% 和 60.68%。本试验首次测定了白背毛木耳多糖的抗氧化活性,为白背毛木耳多糖的开发利用提供了依据。

关键词:白背毛木耳;多糖;正交试验;活性氧自由基

中图分类号:TS201.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0357-03

白背毛木耳(*Auricularia polytricha*)属于真菌门担子菌纲银耳目黑木耳科黑木耳属^[1],是从台湾引进的一种毛木耳新品种。它是一种药食两用食用菌,分布于全国各地,营养成分种类齐全,含量丰富,具有较高营养价值。白背毛木耳作蔬菜食用,可烹制出多种菜肴,风味独特,深受广大消费者的喜爱。它性味甘平,具有补益气血、润肺止咳、止血等功效,在民间常用于气血两亏、肺虚咳嗽、咯血、吐血及痔疮出血等症状。有研究表明,毛木耳多糖作为一种重要的生物活性物质,在疑难病症的治疗方面有较好的疗效,特别在抗凝血和降血脂、增强免疫细胞、抗肿瘤、抗氧化和防治心血管疾病等方面具有较好的效果^[2-3]。

多糖类化合物具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗病毒、抗衰老、抗疲劳以及抗凝血、抗炎、抗菌、抗惊厥、镇静、止喘及降血压等^[4-6]多种生物活性及药理作用,很可能是白背毛木耳抗凝血、增强免疫细胞和抗肿瘤的有效成分之一。目前,白背毛木耳的研究主要集中在栽培技术方面,而对其多糖的开发和利用研究相对较少,张丹凤等对白背毛木耳胞内多糖和胞外多糖的提取与纯化进行了研究^[7],魏燕平等对白背毛木耳子实体多糖和胞内多糖提取方法进行了研究^[8]。但有关白背毛木耳多糖的提取工艺及抗氧化性的研究尚未见相关报道。本研究采用微波辅助提取白背毛木耳多糖,通过单因素试验和 $L_9(3^3)$ 正交试验对多糖提取工艺参数进行了优化,并研究了所提取的多糖对于活性氧自由基的清除作用,为

白背毛木耳多糖的开发利用提供了科学的依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

白背毛木耳采自云南省楚雄市东华镇,经鉴定为黑木耳属毛木耳种。样品依次用自来水、蒸馏水洗净后置于(50℃)干燥箱中烘干,用植物粉碎机粉碎后过 40 目筛,得白背毛木耳干粉,备用。葡萄糖对照品(HPLC \geq 98%),其他试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 白背毛木耳多糖的提取 准确称取 3 份白背毛木耳干粉各 2.00 g,用 90 mL 蒸馏水在功率 680 W 处微波提取 3.0 min,提取完后减压抽滤,浓缩滤液,滤液用 sevag 法^[9]除蛋白后,再往滤液中加入 4 倍体积的 95% 乙醇沉淀多糖,静止 24 h,将醇沉后的白色絮状物进行离心,得白背毛木耳多糖。将白背毛木耳多糖全部转移至 100 mL 容量瓶中用蒸馏水定容至刻度,摇匀,然后再准确吸取上述制备液 1.00 mL 用蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶中,摇匀,得供试品溶液。

1.2.2 葡萄糖标准曲线的建立及白背毛木耳多糖含量的测定 采用苯酚-浓硫酸法测多糖含量,参照文献[10]的方法绘制标准曲线。以吸光度(D)为纵坐标,葡萄糖浓度(C , mg/mL)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程式: $y = 15.652x - 0.0062$,相关系数 $R^2 = 0.9991$,表明葡萄糖在 0.00~0.06 mg/mL 范围内与吸光度有良好的线性关系。

准确吸取待测液 2.00 mL,加入 1.00 mL 新配制的 5% 苯酚溶液,参照文献[10]绘制标准曲线,测定吸光度,根据回归方程计算白背毛木耳多糖含量。

1.2.3 提取工艺单因素试验 参照文献[11]的方法,分别考察单因素影响:(1)选择微波时间分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 min 进行比较,料液比 1 g:40 mL,微波功率 640 W;(2)确定了微波时间 3.0 min 提取效果较好,分别在料液比为 1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50

收稿日期:2015-07-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300370);云南省应用基础研究计划(编号:2011FZ186);云南省应用基础研究计划项目青年项目(编号:2012FD049);云南省楚雄师范学院重点建设学科基金(编号:05YJJSXK03);云南省高校科技创新团队支持计划(编号:IRT-STYN)。

作者简介:杨申明(1976—),男,云南双柏人,实验师,主要从事天然化学研究。E-mail:ysm@exte.edu.cn。

(g : mL) 的条件下微波提取,微波功率 640 W;(3) 确定了料液比 1 g : 40 mL 提取效果较好,分别在 100、160、320、480、640、800 W 的条件下进行微波提取 3.0 min,从而确定各因素的影响作用。

1.2.4 提取工艺参数优化 在单因素试验的基础上,以微波时间、料液比和微波功率为考察因素,以白背毛木耳多糖提取率为评价指标,设计 $L_9(3^3)$ 正交试验优化提取工艺参数。因素及水平见表 1。

表 1 白背毛木耳多糖提取正交试验因素水平

水平	A:微波时间 (min)	B:料液比 (g : mL)	C:微波功率 (W)
1	2.0	1 : 35	480
2	3.0	1 : 40	640
3	4.0	1 : 45	800

1.2.5 重复性试验 准确称取 5 份各 2.0 g 的白背毛木耳干粉,按供试品溶液制备方法进行提取,按标准曲线绘制方法测定吸光度,并计算样品中多糖提取率。

1.2.6 加标回收率试验 准确移取 5 份供试样品溶液 2.0 mL,分别加入 0.100 0 mg/mL 的葡萄糖标准溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,按标准曲线绘制方法测定吸光度,计算加标回收率。

1.2.7 白背毛木耳多糖抗氧化性测定 白背毛木耳多糖对 ·OH 的清除作用,参照 Fenton 反应的方法建立反应体系模型,参考文献[12]的方法。将待测样品的浓度分别换为 0.005 9、0.011 8、0.017 7、0.023 6、0.029 5 mg/mL,其他操作按参考文献的方法进行试验。按下式计算清除率:

$$\cdot\text{OH 清除率} = [D_0 - (D_x - D_{s0})] / D_0 \times 100\%$$

式中: D_0 为空白对照液的吸光度; D_x 为待测样品液吸光度; D_{s0} 为本底吸光度。

白背毛木耳多糖对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除作用采用邻苯三酚自氧化法测定,参考文献[13]的方法。将待测样品的浓度分别换为 0.005 9、0.011 8、0.017 7、0.023 6、0.029 5 mg/mL,其他操作按参考文献的方法进行。按下式计算清除率:

$$\text{O}_2^- \cdot \text{清除率} = (F_0 - F_x) / F_0 \times 100\%$$

式中: F_0 为空白对照的吸光度随时间的变化率, F_x 为待测样品吸光度随时间的变化率。

2 结果与分析

2.1 提取工艺单因素试验结果

2.1.1 微波时间对多糖提取效果的影响 如图 1 所示,微波时间对白背毛木耳多糖的提取效果有一定影响,开始随着微波时间的增加,多糖提取率提高,当微波时间为 3.0 min 时提取率最高,之后随着微波时间的增加,多糖提取率呈下降趋势。说明有少部分多糖被降解了,微波时间过长,使局部温度和压强过大,使多糖发生变性或结构不稳定的大分子多糖断裂而损失。因此选择微波时间为 2.0 ~ 4.0 min 用于进一步优化试验。

2.1.2 料液比对多糖提取效果的影响 如图 2 所示,料液比对白背毛木耳多糖的提取效果有一定影响,刚开始增加很明显后缓慢增加,当料液比达 1 g : 40 mL 时多糖提取率最大,之后随着料液比的继续增大多糖提取率略有降低,可能是因

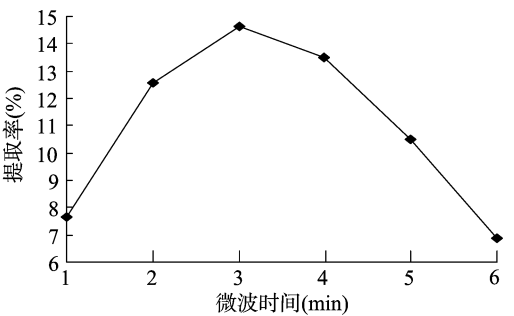


图1 微波时间对多糖提取率的影响

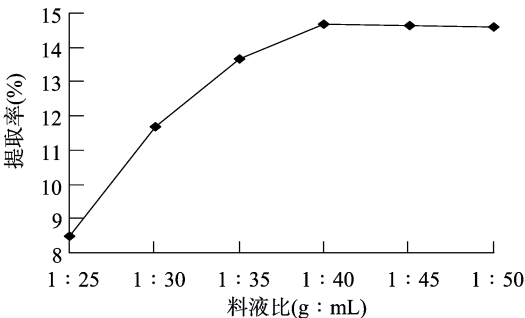


图2 料液比对多糖提取率的影响

为随着溶剂进一步增加,温度上升趋于缓慢,能耗效率下降,同时杂质溶出增加,相当于多糖被稀释,得率反而降低。从节约方面考虑,选择料液比 1 g : (35 ~ 45) mL 用于进一步优化试验。

2.1.3 微波功率对多糖提取效果的影响 如图 3 所示,微波功率对白背毛木耳多糖的提取效果有一定的影响,多糖得率随微波功率的升高而增加,当微波功率为 640 W 时提取率最高,之后随着微波功率的继续升高,多糖提取率呈下降趋势,可能是微波功率过高使少量多糖降解。因此选择微波功率为 480 ~ 800 W 用于进一步优化试验。

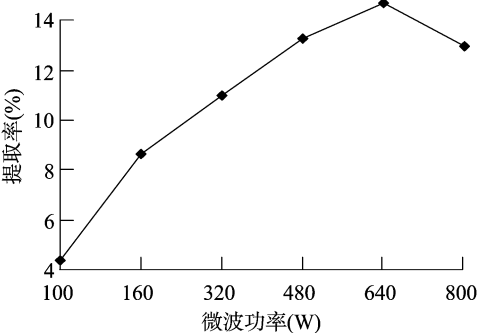


图3 微波功率对多糖提取率的影响

2.2 提取工艺参数优化

从表 2 分析可知,各因素对白背毛木耳多糖提取率的影响程度依次为 C > B > A,即微波功率 > 料液比 > 微波时间。优化后得最佳提取工艺为 $A_2B_3C_2$,即微波时间 3.0 min,料液比 1 g : 45 mL,微波功率 640 W。在此条件下进行重复性试验,测得白背毛木耳样品中多糖平均提取率为 14.87%。

2.3 重复性试验结果

结果平均吸光度为 0.925,相对标准偏差 RSD 值为

表 2 白背毛木耳多糖提取正交试验结果

试验序号	A	B	C	多糖提取率 (%)
1	1	1	1	12.16
2	1	2	2	14.38
3	1	3	3	12.47
4	2	1	2	14.75
5	2	2	3	12.28
6	2	3	1	13.19
7	3	1	3	11.24
8	3	2	1	13.60
9	3	3	2	14.62
k_1	13.00	12.72	12.98	
k_2	13.41	13.42	14.58	
k_3	13.15	13.43	12.00	
R	0.41	0.71	2.58	

0.47% ($n=5$),表明该方法重复性良好。

2.4 回收率试验结果

结果平均回收率为 98.25%,相对标准偏差 RSD 值为 0.85%,表明该方法加样回收率较高,相对标准偏差较小,测定的准确度较高。

2.5 多糖对 $\cdot OH$ 和 $O_2\cdot^-$ 的清除作用

如表 3 所示,白背毛木耳多糖对 $\cdot OH$ 和 $O_2\cdot^-$ 具有清除作用,且在试验浓度 0.005 9 ~ 0.029 5 mg/mL 范围内,随着多糖浓度的升高,清除率也逐渐增加,即清除率与多糖的浓度存在着一定的量效关系。

表 3 白背毛木耳多糖对 $\cdot OH$ 和 $O_2\cdot^-$ 的清除作用

多糖的浓度 (mg/mL)	$\cdot OH$ 的清除率 (%)	$O_2\cdot^-$ 的清除率 (%)
0.005 9	14.36	18.84
0.011 8	20.28	29.59
0.017 7	29.35	41.41
0.023 6	36.14	52.52
0.029 5	44.57	60.68

3 结论与讨论

多糖的提取方法有很多^[14-16],本试验采用微波辅助水提法从白背毛木耳中提取多糖,经单因素试验和正交试验结果表明,微波功率、料液比、微波时间各因素对白背毛木耳多糖提取效果的影响程度不同,其影响的主次顺序分别为微波功率 > 料液比 > 微波时间。优化后的最佳提取工艺参数为:微波时间 3.0 min、料液比 1 g : 45 mL、微波功率 640 W。在此条件下,白背毛木耳多糖平均提取率为 14.87%, RSD 值为 0.47%,平均回收率为 98.25%, RSD 值为 0.85%。该提取方法快速简便,准确度高,重复性好,可作为提取和测定白背毛木耳多糖含量的一种有效方法。

该研究采用体外模型从羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力 2 个方面评价其抗氧化性,试验结果表明,白背毛

木耳多糖提取物具有一定的清除羟基自由基和超氧阴离子自由基的能力,且随提取物多糖浓度的升高,对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除率能力增加,在所试浓度 0.005 9 ~ 0.029 5 mg/mL 范围内,羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除率最大分别为 44.57% 和 60.68%,说明白背毛木耳多糖具有一定的抗氧化活性,可作为抗氧化的功能性食品进一步开发利用。

本研究结果表明,白背毛木耳中富含多糖类化合物,白背毛木耳多糖具有很强的抗氧化活性,有关研究结果对白背毛木耳的进一步开发和综合利用具有重要的意义。但本研究仅对白背毛木耳多糖提物进行体外抗氧化活性评价,有必要在此基础上对白背毛木耳多糖的体内抗氧化活性进行研究,为开发安全性高的天然抗氧化剂和保健产品提供科学依据和参考。

参考文献:

[1] 应建浙. 中国药用真菌图鉴[M]. 北京:科学出版社,1985: 25-30.

[2] 杜梅,张松. 食用菌多糖降血糖机理研究[J]. 微生物学杂志,2007,27(2):83-87.

[3] 吴春敏,陈琼华. 毛木耳多糖的抗凝血和降血脂作用[J]. 中国药科大学学报,1991,22(3):164-166.

[4] 罗祖友,胡筱波,吴谋成. 植物多糖的降血糖与降血脂作用[J]. 食品科学,2007,28(10):596-600.

[5] 彭会军,邹群. 植物多糖的生物活性研究进展[J]. 西北药学杂志,2008,23(6):406-408.

[6] 韩江余,张光霁,石森林. 植物多糖抗肿瘤研究近况[J]. 浙江中医药大学学报,2008,32(2):281-282.

[7] 张丹凤,郑仕栋,陈国平,等. 白背毛木耳胞内多糖的提取与纯化[J]. 食用菌学报,2010,17(3):51-54.

[8] 魏燕平,杨梅. 白背木耳子实体多糖和胞内多糖提取方法的研究[J]. 宁德师专学报,1998,10(1):66-68.

[9] 刘立梅. 黑木耳多糖的分别酶解法提取及脱蛋白工艺研究[J]. 中国酿造,2009,28(3):124-126.

[10] 刘敏,郭丽梅,张丽. 苯酚-硫酸法测定油松花粉多糖含量研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(6):1526-1528.

[11] 许海燕,杨义芳,黄春跃. 微波提取黄芪中多糖的工艺研究[J]. 中草药,2008,39(10):1496-1499.

[12] She G M, Xu C, Liu B, et al. Polyphenolic acids from mint (the aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(4): C359-C362.

[13] 杨申明,王振吉,王应顺. 隔山消总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化特性[J]. 上海大学学报:自然科学版, 2015, 21(2): 220-228.

[14] 雷涛涛,莫绍凌,姜艳霞. 托盘根中多糖提取及体外对一葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):262-263.

[15] 潘莹. 冬枣多糖的 2 种提取工艺优化比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):262-265.

[16] 王莹,王华,丁宁,等. 响应曲面法优化水溶性银杏叶多糖提取工艺[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):268-270.