

不同处理方法对贺兰山紫蘑菇多糖 抗氧化活性的影响

刘继婷, 鲁晓丽, 张自萍*

(宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 采用热水浸提法提取贺兰山紫蘑菇多糖, 分别考察真空冷冻干燥法、真空干燥法(丙酮乙醚洗涤、乙醇洗涤)对其抗氧化活性的影响, 确定最优干燥方法; 干燥后多糖再分别经Sevag法脱蛋白、大孔树脂脱色、双氧水脱色3种方法进一步处理, 采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼法分析不同处理方法对其抗氧化活性的影响。结果表明, 真空干燥法(乙醇洗涤)对贺兰山紫蘑菇多糖的抗氧化活性影响最小; 大孔树脂脱色效果优于双氧水脱色, Sevag法对该多糖抗氧化活性影响较大, 应尽量避免使用。

关键词: 多糖提取; 干燥; 脱色; 脱蛋白; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼法; 抗氧化

Effect of Processing Method on Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Cortinarius purpurascens* Fr.

LIU Jiting, LU Xiaoli, ZHANG Ziping*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western China, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Crude polysaccharides with significant antioxidant activity were obtained from *Cortinarius purpurascens* Fr. by hot water extraction. Three drying methods, vacuum freeze drying, vacuum drying after washing only with absolute ethanol and vacuum drying after successive washing with absolute ethanol and other organic solvents were comparatively studied on the antioxidant activity of the fungal polysaccharides by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay after deproteinization by Sevag method, and discoloration by macroporous resin chromatography or hydrogen peroxide. Vacuum drying after washing only with absolute ethanol had the smallest effect on the antioxidant activity of the purified polysaccharides. Macroporous resin chromatography was an advantageous discoloration method over hydrogen peroxide. Sevag method exerted a significant negative effect on the antioxidant activity of the polysaccharides.

Key words: polysaccharides; drying method; discoloration; deproteinization; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; antioxidant activity

中图分类号: Q539

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)04-0006-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201504002

氧化还原反应在机体中时刻发生, 自由基在氧化反应中起重要作用, 自由基学说认为引起人类衰老的主要原因就是细胞代谢过程中不断产生自由基^[1]。正常机体中自由基氧化作用与抗氧化防御作用处于动态平衡中, 当自由基产生过多或抗氧化防御系统作用减弱时, 体内自由基极易与其他物质发生反应形成新的自由基或氧化物, 导致加速衰老。研究表明, 自由基可导致脂质过氧化, 损害膜蛋白, 降低细胞膜的渗透性^[2-3]。多种疾病的发生都与自由基密切相关, 如炎症、动脉粥样硬化、中风、糖尿病、癌症、皮肤病、艾滋病等^[4-6]。

食品中广泛应用的人工合成抗氧化剂如丁基羟基甲苯、叔丁对甲氧酚制剂、特丁基对苯二酚等具有明显抗氧化作用, 但由于这些物质具有潜在毒性和致癌作用而受到人们的排斥^[7]。因此, 研究开发一种天然有效的抗氧化剂、保护人体不受自由基的破坏具有重要意义。

真菌多糖具有抗肿瘤^[8]、抗氧化^[9-10]、免疫调节^[11-13]等多方面的生物活性。You Yuhong等^[14]研究表明, 灵芝多糖具有一定的抗衰老作用, 其主要是通过提高体内抗氧化酶的活性、清除体内自由基来起到抗衰老的作用。多糖的生物活性与其结构存在密切的关系。多糖提取工

收稿日期: 2014-05-08

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(21162020)

作者简介: 刘继婷(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: 570054759@qq.com

*通信作者: 张自萍(1970—), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然产物。E-mail: zipingzhang@163.com

艺的不同对其结构、活性有一定的影响,大分子多糖及糖蛋白复合物的提取方法按提取溶剂不同可以分为热水浸提法、酸提法、碱提法、有机溶剂提取法、酶提取法等^[15-16]。在提取多糖前,先用乙醇等有机溶剂处理原料,能除去原料中的脂类物质,并使分解多糖的酶失活,防止直接提取时的多糖降解^[17]。

影响多糖抗氧化活性的因素较多,如单糖组成、分子质量大小、分枝结构、空间构象^[18-21],甚至是干燥方法^[22-23]。真空干燥法适用于高温条件下易被破坏的物质,可以避免物质与氧结合而被氧化。冷冻真空干燥是一种将物质冷冻后真空脱水的过程,能产生高质量的干燥品,但其干燥时间长、能耗大。另外,脱蛋白、脱色过程都能影响多糖的抗氧化活性。本研究旨在通过检测不同处理工艺获得贺兰山紫蘑菇多糖对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基的清除能力,确定合适的干燥、脱色、脱蛋白方法,提取有一定活性的贺兰山紫蘑菇多糖,为贺兰山紫蘑菇多糖的分离提取提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

贺兰山紫蘑菇 银川宁安堡土特产品有限公司; 95%乙醇、无水乙醇(分析纯) 天津市光复科技发展有限公司; 浓硫酸(优级纯) 白银西区银环化学制剂厂; 5%重蒸苯酚、氢氧化钠、氯化钠(分析纯) 天津市大茂化学制剂厂; 36%双氧水 天津市福晨化学制剂厂; D318大孔树脂 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 定性滤纸($\phi=9$ cm) 杭州特种纸业业有限公司。

1.2 仪器与设备

HJ-5磁力多功能电动搅拌机 江苏省金坛市国旺实验仪器厂; RE-52A旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; AL104电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; GAMMA1-16LSC真空冷冻干燥机 德国Christ公司; 玻璃真空干燥器 盐城市双丰玻璃仪器有限公司; U-5100可见分光光度计(配有Seya-Namioka单色仪、比例双光束和闪烁氙灯) 日本Hitachi公司。

1.3 方法

1.3.1 贺兰山紫蘑菇多糖的提取

取贺兰山紫蘑菇200 g依次用95%乙醇、甲醇-氯仿(体积比1:1)混合液按料液比1:10(g/mL)浸泡脱脂48 h,脱脂后于50℃烘干粉碎,取干粉200 g,按料液比1:10加入80%乙醇溶液2 L,于80℃回流处理2次,每次2 h,过滤后晾干滤渣。取上述滤渣,以料液比1:10加入蒸馏水2 L,于80℃提取2次,每次提取2 h。合并提取

液,旋转蒸发,以苯酚-硫酸法^[24]检测糖含量约20 mg/mL,边搅拌边缓慢加入95%乙醇,至乙醇终体积分数达60%,静置6 h,4 000 r/min离心得沉淀编号为P1,采用苯酚-硫酸法测定糖含量,考马斯亮蓝法测定其蛋白含量^[25];离心上清液继续加入95%乙醇,至乙醇的终体积分数达到80%,静置6 h,离心得沉淀编号为P2。

1.3.2 贺兰山紫蘑菇多糖的处理

1.3.2.1 干燥

将80%醇沉的样品P2平均分成3份,第1份沉淀6 g依次用100 mL无水乙醇、丙酮、乙醚充分搅拌洗涤后4 000 r/min离心,弃去上清液,沉淀置真空干燥器中干燥,编号为P3;第2份沉淀6 g用100 mL无水乙醇充分搅拌洗涤后4 000 r/min离心,弃去上清液,沉淀置真空干燥器干燥,编号为P4;第3份沉淀6 g加50 mL蒸馏水,在50℃加热复溶后,真空冷冻干燥,编号为P5。

1.3.2.2 大孔树脂脱色

精确称取一定量的样品P4,加蒸馏水配成3 mg/mL的样品溶液,按料液比1:5加入已处理的大孔树脂D318,用5% HCl溶液将pH值调为6,于摇床上180 r/min振摇脱色3 h,脱色后抽滤收集滤液,滤液浓缩至50 mL左右,搅拌加入4倍体积95%乙醇溶液,静置6 h,4 000 r/min离心,沉淀用无水乙醇搅拌洗涤后离心,沉淀真空干燥,编号为P6。

1.3.2.3 双氧水脱色

精确称取P4样品0.5 g,加蒸馏水溶解,配成5 mg/mL的多糖溶液100 mL,加入体积分数为30%的双氧水30 mL,在40℃保温3 h脱色后浓缩至50 mL左右,搅拌加入4倍体积95%乙醇溶液,静置6 h,4 000 r/min离心,沉淀用无水乙醇洗涤后真空干燥,编号为P7。

1.3.2.4 脱蛋白

精确称取P4样品1.0 g,加入蒸馏水150 mL使其完全溶解,按多糖溶液体积1/4加入氯仿-正丁醇混合液(4:1, V/V),在分液漏斗中充分振摇后,3 600 r/min离心10 min,弃去中间层变性蛋白及下层有机溶剂,上清液按体积加入1/4有机混合液除蛋白,重复多次至无中间层变性蛋白。上清液浓缩后搅拌加入4倍体积95%乙醇溶液,静置6 h,4 000 r/min,沉淀用无水乙醇洗涤后真空干燥,编号为P8。

1.3.3 贺兰山野紫蘑菇多糖抗氧化活性的测定

1.3.3.1 DPPH法测定原理

DPPH自由基是一种稳定的有机自由基,其孤对电子在517 nm波长处有强吸收(显深紫色),当存在自由基清除剂时,可与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,可通过分光光度法定量测定其减弱的程度,进而判断自由基清除剂的清除能力。自由基清除能力的大小用清除率表示,清除率越大,其抗氧化能力越强,VC是一种较强的抗氧化剂,作为阳性对照。

DPPH在无水体系中的最大吸收波长在517 nm左右, 在水体系中的最大吸收波长在525 nm左右。本实验为有水体系, 选用波长为525 nm。

1.3.3.2 样液配制

精密称取DPPH 4 mg, 用50%乙醇溶液溶解并定容到250 mL, 精确称量P1~P8号多糖样品, 分别配成质量浓度为5.0、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156、0.078 mg/mL的溶液。

1.3.3.3 反应步骤

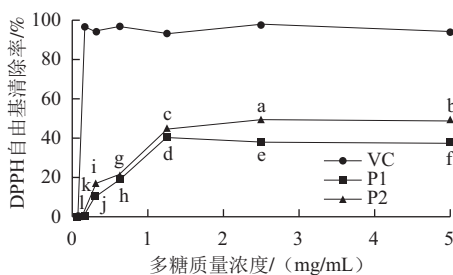
分别取不同质量浓度的样品1 mL样品液加入3 mL DPPH溶液, 作为样品管, 反应30 min, 在525 nm波长处测定吸光度, 记为 A_i ; 取1 mL蒸馏水加入3 mL DPPH溶液, 作为空白管, 反应30 min, 在525 nm波长处测定吸光度, 记为 A_c ; 另分别取1 mL样品液加入3 mL 50%乙醇溶液, 作为对照管反应30 min, 在525 nm波长处测定吸光度, 记为 A_j 。以VC作为阳性对照, 精密称取200.0 mg VC用蒸馏水定容到20 mL, 取1 mL VC标准液加入3 mL DPPH溶液, 作为阳性对照, 反应30 min, 在525 nm波长处测定吸光度。以上各组设3个平行, 结果取平均值, 按如下清除率公式分别进行计算。

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 分级醇沉对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响

在多糖溶液中, 分次加入乙醇, 使乙醇含量逐步增大, 可以逐级沉淀出分子片段由大到小的多糖。在多糖水提液中加入95%乙醇溶液, 当乙醇终体积分数达60%时, 有絮状沉淀析出, 当加大乙醇体积分数到80%时, 有细小沉淀析出。



不同字母表示组间差异显著, $P < 0.05$ 。

图1 分级醇沉对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响

Fig.1 Effect of ethanol fractional precipitation on antioxidant activity

如图1所示, 贺兰山紫蘑菇多糖分级醇沉的不同组分均具有一定的抗氧化能力, 但其活性都低于VC阳性对照组, 图中相同质量浓度条件下, P1对自由基清除率与P2相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。多糖的抗氧化能力与

其质量浓度有一定关系, 质量浓度在2.5 mg/mL时达到稳定, 多糖质量浓度继续增加, 抗氧化能力无明显变化, 当多糖质量浓度低于1.25 mg/mL时, 抗氧化能力急剧下降, 这可能与多糖清除自由基的机制有关^[26]。且P2的抗氧化活性高于P1, 说明多糖的抗氧化活性与其平均相对分子质量大小及空间结构有密切联系, P1的平均相对分子质量略大于P2, 大分子质量的多糖其分枝庞大, 空间结构复杂, 可能不利于与自由基结合, 分子质量略小的多糖其结构较为简单, 活性中心便于和自由基快速、紧密的结合。

2.2 不同干燥方式对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响

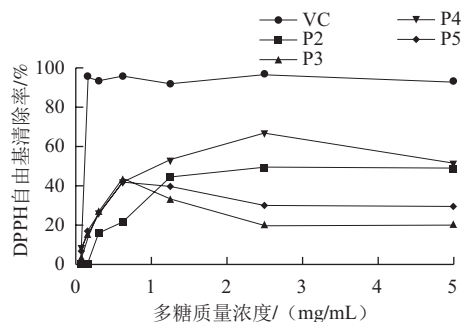


图2 不同干燥方式对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响

Fig.2 Effects of different drying methods on antioxidant activity

如图2所示, 采用不同方式干燥的贺兰山紫蘑菇多糖均具有抗氧化活性, 但都弱于阳性对照组; 抗氧化能力的高低与多糖质量浓度有一定关系, 多糖质量浓度低于0.625 mg/mL时, 不同方式干燥的多糖抗氧化能力相似, 当多糖质量浓度大于1.25 mg/mL时, 样品P4的抗氧化活性明显强于P3、P5和P2, 且在多糖质量浓度为2.5 mg/mL时, 其抗氧化能力可达到阳性对照的65%左右。在3种干燥方式中, 只用无水乙醇洗涤而不用丙酮、乙醚洗涤的样品活性较好, 这可能是由于用无水乙醇洗涤可以去除部分小分子单糖和寡糖以及一些脂溶性杂质, 能够提高多糖的纯度, 因此活性略高; 但用乙醚、丙酮等有机溶剂洗涤后, 可能破坏了多糖的结构, 改变了多糖的空间构象, 从而影响了其抗氧化活性。并且, P2的活性要高于P5, 这可能是在冻干时, 多糖中原来与水分子形成的分子间氢键断开, 破坏了其空间结构, 影响其活性; 或者由于水分子的升华, 使其分子间隙液体浓缩, 电解质浓度增加, pH值改变, 以上只是推测, 需要进一步的研究证实。

2.3 不同脱色方法对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响

大孔树脂脱色是一种温和的脱色方法, 对多糖的抗氧化活性影响较小, 而双氧水脱色虽然脱色效果较好, 但其对多糖的抗氧化活性的影响较大。如图3所示, 贺兰山紫蘑菇多糖脱色和脱蛋白处理后均具有抗氧化活性,

但都低于阳性对照组；双氧水脱色效果较好，但对活性影响很大，在低体积分数时清除率还出现了负值，这是因为双氧水脱色仅是双氧水与色素分子作用，改变了色素的生色基团，并没用去除色素分子，多糖含有较多的羟基、醛基等活性基团，双氧水还可以导致其氧化降解或者改变多糖的链状结构，使得多糖的有效质量浓度降低，影响其生物活性^[27]；综合脱色效果和抗氧化活性等因素，大孔树脂是一种较优的脱色方法，能有效去除色素，并且脱色后多糖的抗氧化活性要高于脱色前，活性增加，这可能是由于大孔树脂吸附了色素分子及其他小分子杂质，一定程度上纯化了多糖^[28]。

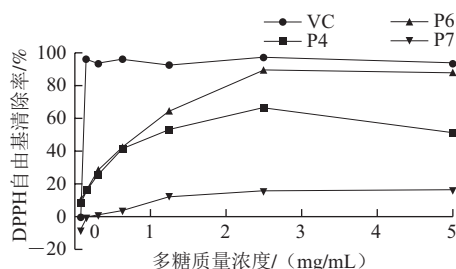


图3 不同脱色方法对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响

Fig.3 Effects of different discoloration methods on antioxidant activity

2.4 不同脱蛋白方法对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响

表1 不同处理方法对多糖糖含量及蛋白含量的影响

Table 1 Effects of different deproteinization methods on the contents of polysaccharides and proteins

组分	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
糖含量	37.19	43.33	42.17	41.98	42.25	68.37	58.5	55.21
蛋白含量	4.51	4.13	3.97	4.09	4.11	1.23	3.54	0.87

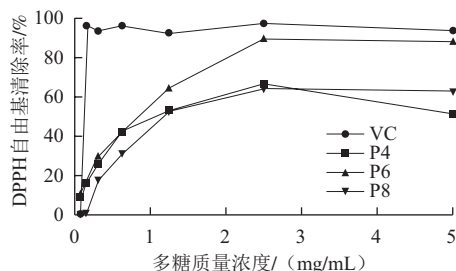


图4 不同脱蛋白方法对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响

Fig.4 Effects of different deproteinization methods on antioxidant activity

如表1所示，大孔树脂同时还具有较好的脱蛋白作用，其蛋白清除率仅次于Sevag法，但对多糖的抗氧化活性的影响较小，如图4所示，Sevag法脱蛋白的过程会影响多糖的空间结构，从而改变多糖的抗氧化活性。贺兰山紫蘑菇多糖脱蛋白后具有抗氧化活性，但低于阳性对照组；采用Sevag法脱蛋白处理后，多糖的抗氧化活性略

有降低，这可能是由于氯仿、正丁醇等有机试剂在使蛋白变性的过程中影响了多糖分子的空间构象，从而影响了其抗氧化活性。相比较而言，大孔树脂脱蛋白的效果较好，并且对抗氧化活性的影响较小。

3 结论

80%醇沉的多糖抗氧化活性强于60%醇沉组分，这可能是由于80%醇沉的相对分子质量略大于60%醇沉的组分^[29]，大分子质量多糖分子体积较大，分枝过多，空间位阻较大，可能不利于活性中心的结合，而分子片段较小的多糖由于其分枝结构较少，空间位阻相对较小，更容易与活性中心结合；不同干燥方法对多糖的抗氧化活性有一定影响，本实验采用的3种干燥方法中，真空干燥（乙醇洗涤）对抗氧化活性的影响最小，而且此方法较经济，耗时少，在扩大生产中更具有可行性；采用不同脱色方法对多糖的抗氧化活性有不同的影响，大孔树脂脱色对多糖的抗氧化活性影响较小，并且有较高的多糖保留率，双氧水脱色对多糖抗氧化活性的影响较大，可能是多糖链中活泼的羟基和醛基易被双氧水氧化，改变了多糖的空间结构，降解了多糖；Sevag法脱蛋白对多糖的抗氧化活性影响较大，脱蛋白后多糖的抗氧化活性大大降低，其最大抗氧化能力为处理前的24%左右，这可能是由于有机溶剂使蛋白质变性时，一些与多糖结合的糖蛋白也变性除去，使得多糖的空间结构发生了改变。影响多糖抗氧化活性的因素很多，若想阐明其影响机制则需要更进一步的研究。

参考文献:

- [1] 贾秀月, 高艳华, 赵晓莲, 等. 自由基与抗衰老的研究概况[J]. 黑龙江医药科学, 2007, 30(2): 75-76.
- [2] 王春霖, 郭芳, 王永利. 自由基与衰老[J]. 河北医科大学学报, 2005, 26(4): 308-309.
- [3] 李素云, 王立芹, 郑稼琳, 等. 自由基与衰老的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(20): 2046-2047.
- [4] BORCHANI C, BESBES S, MASMOUDI M, et al. Effect of drying methods on physico-chemical and antioxidant properties of date fibre concentrates[J]. Food Chemistry, 2010, 125(4): 1194-1201.
- [5] 马晓华, 连宾. 几种常见食用菌清除羟基自由基能力的研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 25-26.
- [6] 邓育红. 自由基与人体健康[J]. 化学教育, 2003, 24(6): 26-27.
- [7] 张唐伟, 杨乐, 刘青海, 等. 地木耳多糖的抗氧化性与抑菌作用[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(6): 868-873.
- [8] WHYSNER J F C. Toxic[M]. Boca Raton: CRC Press, 1994: 215.
- [9] ZHANG Tangwei, YANG Le, LIU Qinghai, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of nostoc commune polysaccharide[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(6): 868-873.
- [10] MAU J L, LIN H C, SONG S F. Antioxidant properties of several specialty mushroom[J]. Food Research International, 2002, 35: 519-526.

- [11] LUO D H. Identification of structure and antioxidant activity of a fraction of polysaccharide purified from *Dioscorea nipponica* Makino[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(4): 544-549.
- [12] 阿燕. 真菌多糖抗氧化活性的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2012, 34(4): 83-85.
- [13] LIU Lei, JIA Jun, ZENG Guang, et al. Studies on immunoregulatory and anti-tumor activities of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* Bunge[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(1): 479-483.
- [14] YOU Yuhong, LIN Zhibin. Proective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury macrophases induced by reactive oxygen specises[J]. Acta Pharmacol Sinica, 2002, 23(9): 787.
- [15] MA Jiangwei, QIAO Zengyong, XIANG Xia. Optimisation of extraction procedure for black fungus polysaccharides and effect of the polysaccharides on blood lipid and myocardium antioxidant enzymes activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84: 1061-1068.
- [16] ZHANG Shenshen, NIE Shaoping, HUANG Danfei, et al. Immunomodulatory effect of *Ganoderma atrum* polysaccharide on CT26 tumorbearing mice[J]. Food Chemistry, 2013, 136(3/4): 1213-1219.
- [17] 韩伟, 黄兮, 张玲玲, 等. 中药多糖的提取分离纯化及分析方法的研究进展[J]. 工程工艺与设备, 2012(14): 19-24.
- [18] HAI Hongsun, WEN Junmao, YIN Chen, et al. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78: 117-124.
- [19] 刑小黑, 吴明忠, 朱述钧, 等. 灵芝多糖化学研究[J]. 中国食用菌, 1996, 2(6): 6-7.
- [20] ZHANG Zhongshan, WANG Xiaomei, HAN Zhiping, et al. Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(3): 2332-2337.
- [21] 戴伟, 刘新义, 胡雄彬, 等. 香菇多糖的分子量和结构与生物活性之间的关系[J]. 中南药学, 2012, 10(6): 453-456.
- [22] TANIOKA A, AN W W, KUGE T, et al. Barley low molecular weight beta-glucan potently induces maturation of mouse dendritic cells[J]. Anticancer Research, 2011, 31(5): 1647-1651.
- [23] FAN L P, LI J W, DENG K Q, et al. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 87(2): 1849-1854.
- [24] 郭小群. 苯酚-硫酸显色法测定多糖[J]. 广东化工, 2010, 37(5): 207.
- [25] 宿玮, 常耀光, 薛长湖, 等. 海地瓜多糖中蛋白含量测定方法比较[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 201-203.
- [26] 谢好贵, 陈美珍, 张玉强. 多糖抗肿瘤构效关系及其机制研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 329-333.
- [27] 付学鹏, 杨晓杰. 植物多糖脱色技术的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(11): 166-168.
- [28] 何余堂, 潘孝明, 宫照杰. 利用大孔树脂对玉米花丝多糖脱色的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 299-301.
- [29] 闫巧娟, 韩鲁佳, 江正强, 等. 黄芪多糖的分子量分布[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 27-29.