



杨玲

贵州科学院生物研究所高级工程师，贵州省食药菌协会会员、贵州省菌物学会会员。主要从事果蔬及食药菌采后保鲜和精深加工研发。

红托竹荪菌托多糖提取工艺及抗氧化降血糖活性

杨玲^{*}，王万坤，罗丽平，李冰晶，康超，曾维军，郑旋

贵州省生物研究所，贵州 贵阳 550009

摘要：为利用红托竹荪菌托，采用酶解法提取菌托多糖，优化多糖提取工艺，并测定多糖分子量、单糖组成、抗氧化及降血糖活性。结果表明，最佳酶解法提取工艺为纤维素酶 2.5%、果胶酶 0.4%、木瓜蛋白酶 1.5%，50 ℃酶解 1 h，料液比 1:60、提取温度 80 ℃、时间 3 h，该条件下多糖提取率达 15.37%，比热水浸提法提高 39.60%。酶解法多糖分子量为 3 344 Da (Mn)、522 208 Da (Mw)、2 929 Da (Mp)，主要由葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖和岩藻糖等组成，葡萄糖占最高，达 48.82%。菌托多糖为 2.0 mg/mL 时，DPPH·清除率为 93.83%，Fe³⁺还原能力为 0.140 7，α-葡萄糖苷酶活性抑制率为 54.62%、α-淀粉酶活性抑制率为 56.45%，与热水浸提法相比差异极显著或显著。酶解法提取红托竹荪菌托多糖，提取率较高，具有较高的抗氧化、降血糖活性，具有推广应用价值。

关键词：红托竹荪菌托多糖；酶法提取；分子量；单糖组成；抗氧化；降血糖

[引用本文]

杨玲，王万坤，罗丽平，李冰晶，康超，曾维军，郑旋，2023. 红托竹荪菌托多糖提取工艺及抗氧化降血糖活性. 菌物学报，42(1): 418-429

Yang L, Wang WK, Luo LP, Li BJ, Kang C, Zeng WJ, Zheng X, 2023. Extraction process and antioxidant hypoglycemic activities of polysaccharides from *Dictyophora rubrovolvata* volva. Mycosystema, 42(1): 418-429

资助项目：贵州省科技计划项目(黔科合重大专项字 ZWCQ[2019]3013-5，黔科合支撑[2019]2376，黔科合支撑[2019]2451-5，黔科合重大专项字[2019]3004-4)

This work was supported by the Science and Technology Plan Project of Guizhou Province (Qiankehezhongdazhuanxiangzi ZWCQ[2019]3013-5, Qiankehezicheng [2019]2376, Qiankehezicheng[2019]2451-5, Qiankehezhongdazhuanxiangzi[2019]3004-4).

*Corresponding author. E-mail: 675609008@qq.com

Received: 2022-10-10; Accepted: 2022-11-11

Extraction process and antioxidant hypoglycemic activities of polysaccharides from *Dictyophora rubrovolvata* volva

YANG Ling^{*}, WANG Wankun, LUO Liping, LI Bingjing, KANG Chao, ZENG Weijun, ZHENG Xuan

Guizhou Institute of Biology, Guiyang 550009, Guizhou, China

Abstract: The polysaccharide from volva of *Dictyophora rubrovolvata* is extracted by enzymatic method, and the extraction process is optimized. The molecular weight, monosaccharide composition, antioxidant and hypoglycemic activity of polysaccharides are determined. The results showed that the best process for the enzymatic extraction of polysaccharides is: cellulase 2.5%, pectinase 0.4% and papain 1.5%; enzymatic digestion at 50 °C for 1 h; regulation of material to liquid ratio of 1:60 and extraction temperature of 80 °C. Under such conditions the extraction yield of polysaccharides in 3h reaches 15.37%, 39.60% higher than that under hot water extraction condition. The molecular weights of polysaccharides extracted by enzymatic method are 3 344 Da (Mn), 522 208 Da (Mw), and 2 929 Da (Mp). The polysaccharides are mainly composed of glucose, mannose, glucuronic acid, galactose and fucose, with the highest percentage of glucose being 48.82%. Under polysaccharide concentration of 2.0 mg/mL, clearance of DPPH· is 93.83%, capability of Fe³⁺ reduction is 0.140 7, inhibition rate of α -glucosidase activity is 54.62%, and α -amylase activity inhibition rate is 56.45%, showing extremely significant difference or significant difference as compared with the polysaccharide extracted by hot water. The polysaccharide extraction process by using enzymatic method shows high-yielding and the extracted polysaccharides have better antioxidant and hypoglycemic activities, and thereby the process is worth popularization and application.

Keywords: polysaccharides of *Dictyophora rubrovolvata* volva; extraction by enzymes; molecular mass; monosaccharide composition; anti-oxidation; hypoglycemic

红托竹荪 *Dictyophora rubrovolvata* 是我国西南地区的重要食用菌(戴玉成等 2010), 全株由菌托、菌柄和菌盖 3 部分构成, 菌托约占全株鲜重的 25%, 含有多糖、氨基酸和蛋白质等营养成分(杨晶莹和张弛 2020; 曾维军等 2022), 目前菌托在采收时都摘除废弃, 不仅是对食用菌资源的浪费, 而且还可能造成环境污染, 因此利用红托竹荪菌托提取多糖, 不仅可以解决种植过程中废弃资源的再利用问题, 保护环境, 而且还能提高红托竹荪的附加值。食用菌中的多糖主要分布于组织中、细胞内以及结合于菌丝细胞的细胞膜和细胞壁上, 只有充

分破坏细胞结构, 有效成分才能充分释放出来(Wu *et al.* 2013)。目前对多糖的提取多采用热水、酸、碱及有机溶剂浸提法, 提取效率较低, 且易造成多糖活性降低, 还存在化学溶剂残留问题, 而超声波、微波和超临界流体萃取等物理方法, 设备投入大、运行成本高(孙靖轩等 2012; 王娟娟等 2017; Liu & Huang 2019)。酶法是利用生物酶的高效性和专一性, 通过破坏植物细胞壁和提高细胞膜的通透性来加速胞内物质溶出, 提取条件温和, 成本低, 是适合食用菌多糖提取的方法(林魁等 2012; 马丽媛等 2022)。抗氧化降血糖是食用菌多糖的重要

生物活性(叶敏等 2016; Liu *et al.* 2017; Wang *et al.* 2018; Wu *et al.* 2019), 多糖的化学结构对其影响明显(郑婷婷等 2017)。因此本研究采用酶法提取红托竹荪菌托多糖, 优化提取工艺, 并对多糖的分子量、单糖组成及抗氧化降血糖活性进行分析, 以探究不同提取方法对多糖提取率及生物活性的影响, 为红托竹荪菌托多糖的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 竹荪材料

红托竹荪菌托干品, 贵州织金汇苑特色农业有限公司提供。

1.1.2 试剂

纤维素酶50 000 U/g、木瓜蛋白酶800 000 U/g、果胶酶60 000 U/g: 食品级, 北京索莱宝科技有限公司; 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG): 分析纯, α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶、阿卡波糖: 生物试剂, 南京都莱生物技术有限公司; 鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、岩藻糖、半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、核糖: 标品, 上海安谱实验科技股份有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器和设备

LGJ-10N冷冻干燥机; RE-10L旋转蒸发仪; TGL-16高速冷冻离心机; DK-98-II电热恒温水浴锅; FA1004B分析天平; 1200液相色谱仪、1260 Infinity II MDS凝胶渗透色谱仪; UV-1800SPC紫外/可见分光光度计; MTN-5800氮吹仪。

1.2 方法

1.2.1 原料预处理

取红托竹荪菌托干品, 用适量75%乙醇浸泡, 脱脂48 h, 置于烘箱内, 50–60℃烘干, 粉碎过40目筛, 得菌托粉备用。

1.2.2 多糖提取工艺

取竹荪菌托粉30 g, 加入纤维素酶、果胶

酶、木瓜蛋白酶, 按料液比(质量体积比)加入纯净水, 调pH值至4.6–4.8, 50℃酶解1 h, 升温至90℃灭酶活, 热水浸提, 过滤, 离心, 上清液真空减压浓缩, 加入浓缩液3倍体积的95%食品级乙醇, 置于0–4℃冰箱过夜(12 h以上), 醇沉, 过滤, 离心, 沉淀用水充分溶解, 加入等体积的Sevage试剂(氯仿:异戊醇=3:1)脱蛋白3–4 h, 过滤, 上清液真空减压浓缩, 再用95%食品级乙醇醇沉, 过滤, 离心, 沉淀真空冷冻干燥, 得菌托多糖。按公式(1)计算多糖提取率。

多糖提取率(%) = $\frac{\text{菌托多糖质量(g)}}{\text{菌托粉质量(g)}} \times 100$ (1)

1.2.3 酶用量单因素试验

参考程俊文等(2010)和陈海强等(2012)的方法, 采用单因素试验分别比较不同纤维素酶用量(0.5%、1%、1.5%、2.0%和2.5%)、果胶酶用量(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%和1.0%)及木瓜蛋白酶用量(0.3%、0.6%、0.9%、1.2%和1.5%)对菌托多糖提取率影响。

1.2.4 酶用量正交试验

根据单因素试验结果, 对纤维素酶、果胶酶及木瓜蛋白酶进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察3种酶用量对多糖提取率的影响及最佳配比, 正交设计因素水平见表1。

表1 酶用量 $L_9(3^4)$ 正交因素及水平表
Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment of enzyme dosage

水平	因素		
Level	Factor		
	A	B	C
	纤维素酶	果胶酶	木瓜蛋白酶
	Cellulase (%)	Pectinase (%)	Papain (%)
1	1.5	0.2	0.9
2	2.0	0.4	1.2
3	2.5	0.6	1.5

1.2.5 酶解后热水浸提单因素试验

确定酶用量的最佳配比后, 分别考察不同料液比(1:30、1:40、1:50、1:60和1:70)、提取温度(50、60、70、80和90℃)及提取时间(1、

2、3、4 和 5 h)对多糖提取率的影响。

1.2.6 酶解后热水浸提正交试验

在单因素试验基础上, 对料液比、提取温度、提取时间进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察热水浸提法中 3 个因子对多糖提取率的影响及最佳提取条件, 正交设计及因素水平见表 2。

表 2 热水浸提 $L_9(3^4)$ 正交因素及水平表
Table 2 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment of water extraction of *Dictyophora rubrovolvata* volva polysaccharides

水平	因素		
Level	Factor		
	A	B	C
	温度	提取时间	料液比
	Temperature	Extraction	Material: liquid
	(°C)	time (h)	ratio (g/mL)
1	60	2	1:40
2	70	3	1:50
3	80	4	1:60

1.3 单糖组成测定

参考 Lee *et al.* (2018)、Jabastin *et al.* (2019) 和 Yang *et al.* (2019) 的方法测定, 数据采集仪器系统包括(Agilent)1200、紫外检测器。色谱柱: C18 Agilent 4.6 mm×250 mm×5 μm; 流动相 A: 0.1 mol/L KH_2PO_4 (pH 6.8), 流动相 B: 乙腈; 流动相梯度: A:B=82:18, 等度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL; 检测波长: 245 nm。按公式(2)计算单糖含量。

$$W = \frac{(C - C_0) \times V \times N}{m} \quad (2)$$

W 为试样中目标物含量(mg/kg); C 为试样测定液中目标物的浓度(mg/L); C_0 为空白对照中目标物的浓度(mg/L); V 为定容体积(mL); N 为稀释倍数; m 为试样的取样量(g)。

1.4 分子量测定

准确称取适量样品用流动相溶解, 配制成浓度约 1–3 mg/mL 溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜后上机测试。色谱柱: PL aquagel-OH Mixed-H, 8 μm, 7.5 mm×300 mm (分子量范围 200–10 000 000); 检测器: 示差检测器、双角度激光散射检测器、

黏度检测器; 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 45 °C; 进样量: 50 μL; 流动相: 0.1 mol/L 硝酸钠 (0.01%叠氮化钠), 等度洗脱。通过样品的黏度、出峰时间等利用 GPC 软件拟合计算出样品的分子量 M_p 、 M_n 和 M_w 。

1.5 抗氧化活性测定

参考罗丽平等(2020)的方法, 以 Vc 为阳性对照, 测定 DPPH·自由基清除率, 按公式(3)计算清除率; 采用铁氰化钾显色法测定 Fe^{3+} 总还原力, 按公式(4)计算总还原力。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A}\right) \times 100 \quad (3)$$

A_1 为测定混合体系吸光值; A_2 为蒸馏水代替反应体系中 DPPH·溶液本底吸光值; A 为蒸馏水代替反应体系中样品空白吸光值。

$$\text{Fe}^{3+} \text{总还原力} = A_1 - A_0 \quad (4)$$

A_1 为测定混合体系吸光值; A_0 为蒸馏水代替反应体系中样品空白吸光值。

1.6 降血糖活性测定

参考罗丽平等(2020)的方法, 以阿卡波糖为阳性对照, 采用二硝基水杨酸(DNS)法测定 α-淀粉酶活性抑制率, 按公式(5)计算抑制率; 采用 4-硝基酚-α-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)比色法测定 α-葡萄糖苷酶活性抑制率, 按公式(6)计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_0}{A}\right) \times 100 \quad (5)$$

A_1 为测定混合体系吸光值; A_0 为缓冲液代替反应体系中 α-淀粉酶溶液本底吸光值; A 为缓冲液代替反应体系中样品空白吸光值。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_0}{A}\right) \times 100 \quad (6)$$

A_1 为测定混合体系吸光值; A_0 为缓冲液代替反应体系中 α-葡萄糖苷酶溶液本底吸光值; A 为缓冲液代替反应体系中样品空白吸光值。

1.7 数据处理

每个样品 3 个重复, 结果取平均值, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采用 SPSS Version 22 进行统计分析, Origin 8.5 作图, 利用 Design-Expert 10 软件进行

正交设计和分析。

2 结果与分析

2.1 酶用量单因素试验结果

随着酶用量增加,多糖提取率都逐渐提高(图1)。当纤维素酶用量为1.5%、2.0%时,提取率提高显著,但当用量达到2%以上,提取率增长缓慢(图1A),说明菌托纤维素已接近充分酶解。因此选取纤维素酶用量为1.5%、2%和2.5%进行正交试验。当果胶酶用量达到0.6%以上时,多糖提取率趋于稳定(图1B),说明菌托果胶已接近充分酶解。因此选取果胶酶用量为0.2%、0.4%和0.6%进行正交试验。当木瓜蛋白酶用量达到1.2%以后,提取率增长开始变缓(图1C),说明菌托蛋白质已接近充分酶解。因此选取木瓜蛋白酶用量为0.9%、1.2%和1.5%进行正交试验。

2.2 酶用量正交试验结果分析

正交试验结果及直观分析见表3,方差分析见表4。

3个试验因素对菌托多糖提取率影响的 R 值大小为 $A>B>C$ (表3),表明各因素影响顺序为 $A>B>C$ 。纤维素酶用量对提取率影响极显著

($P<0.01$),为最主要因素,其次为果胶酶用量,对提取率影响显著($P<0.05$),木瓜蛋白酶用量影响不显著($P>0.05$)(表4)。通过表3分析出最优酶组合为 $A_3B_2C_3$,但此结果与表3中提取率最高 $13.36\%\pm 0.40\%$ 的组合 $A_3B_3C_2$ 不符,故进行验证试验其提取率为 $13.47\%\pm 0.42\%$,因此确定酶用量的最优组合为 $A_3B_2C_3$,即纤维素酶2.5%、果胶酶0.4%、木瓜蛋白酶1.5%。

2.3 酶解后热水浸提单因素试验结果

3种酶最优组合酶解后提取菌托多糖,提取条件对多糖提取率的影响见图2。随着温度上升,多糖提取率明显提高,当温度达到 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,提取率为最大值 13.07% ,而温度继续升高到 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后,多糖提取率略有下降为 12.92% (图2A)。这可能是由于温度过高破坏多糖内部结构,从而影响多糖提取率(吴雪艳等2015)。因此,选取提取温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行正交试验。提取时间 2 h 比 1 h 的提取率显著提高,但 2 h 后随着提取时间的延长,多糖提取率增加缓慢(图2B),考虑到提取时间过长,可能会增加其他溶解性杂质,为节约时间、减低能耗及保证多糖纯度,选取提取时间 2 h 、 3 h 和 4 h 进行正交试验。

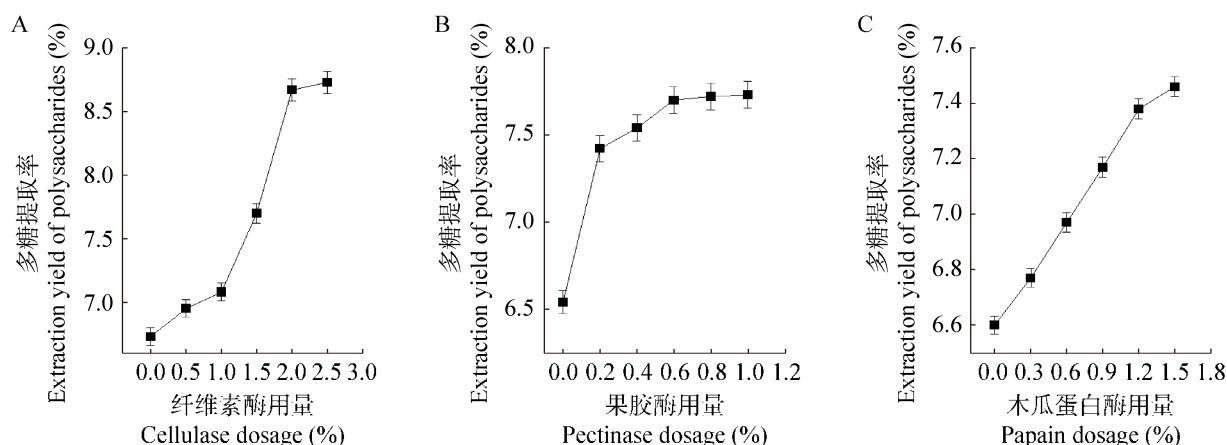


图1 酶用量对多糖提取率的影响 A: 纤维素酶用量对多糖提取率的影响. B: 果胶酶用量对多糖提取率的影响. C: 木瓜蛋白酶用量对多糖提取率的影响

Fig. 1 Effects of enzymes dosages on extraction yield of volva polysaccharides of *Dictyophora rubrovolvata*. A: Effect of cellulase dosage on extraction yield of volva polysaccharides of *D. rubrovolvata*. B: Effect of pectinase dosage on extraction yield of volva polysaccharides of *D. rubrovolvata*. C: Effect of papain dosage on extraction yield of volva polysaccharides of *D. rubrovolvata*.

表 3 酶用量 $L_9(3^4)$ 正交试验结果及直观分析表
Table 3 The $L_9(3^4)$ orthogonal array of applied dosage of enzymes and results of assessment

实验组 Experimental group	A	B	C	D	Y
	纤维素酶 Cellulase (%)	果胶酶 Pectinase (%)	木瓜蛋白酶 Papain (%)	空白 Blank	多糖提取率 Extraction yield of polysaccharides (%)
1	1	1	1	1	9.51±0.29
2	1	2	2	2	11.35±0.45
3	1	3	3	3	11.19±0.39
4	2	1	2	3	10.95±0.37
5	2	2	3	1	12.51±0.50
6	2	3	1	2	10.81±0.37
7	3	1	3	2	12.51±0.44
8	3	2	1	3	12.85±0.51
9	3	3	2	1	13.36±0.40
K_1	32.05	32.97	33.17		因素主次: $A>B>C$
K_2	34.27	36.71	35.66		Factors ranking: $A>B>C$
K_3	38.72	35.36	36.21		
k_1	10.68	10.99	11.06		较优条件: $A_3B_2C_3$
k_2	11.42	12.24	11.89		The optimal conditions: $A_3B_2C_3$
k_3	12.91	11.79	12.07		
R	2.23	1.25	1.01		
排序 Rank	1	2	3		

表 4 酶作用多糖提取率方差分析表
Table 4 The ANOVA of orthogonal experimental results of enzymes effecting extraction yield of polysaccharides

变异来源 Variation source	III类平方和 Squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	显著性 P P-value Prob>F
截距 Intercede	3 678.734	1	3 678.734	3 685.760	0.000**
A	23.098	2	11.549	11.571	0.000**
B	7.151	2	3.576	3.583	0.047*
C	5.236	2	2.618	2.623	0.097
误差 e	19.962	20	0.998		
总计 Total	3 734.181	27			

**表示 $P<0.01$, 差异极显著; *表示 $P<0.05$, 差异显著
** Means extremely significant difference ($P<0.01$); * Means significant difference ($P<0.05$).

随着料液比增大, 提取率逐渐增加, 当料液比为 1:60 时达最大值 13.09%, 而料液比达到 1:70 时, 提取率下降至 12.41% (图 2C), 这可能是由于水的体积增大, 使溶出性杂质增加, 反而竞争性抑制了多糖的溶解(王蓓蓓 2012), 而且料液比增大会增加后续过滤、离心操作的工作量, 因此, 选取料液比 1:40、1:50、1:60 进行正交试验。

2.4 酶解后热水浸提正交试验结果
正交试验结果及直观分析见表 5, 方差分析见表 6。
3 个试验因素对菌托多糖提取率影响的 R 值大小为 $C>B>A$ (表 5), 表明各因素影响顺序为 $C>B>A$ 。料液比、提取时间对多糖提取率影响极显著($P<0.01$), 提取温度对多糖提取率影响显著($P<0.05$), 料液比为最主要因素, 其次为提取时

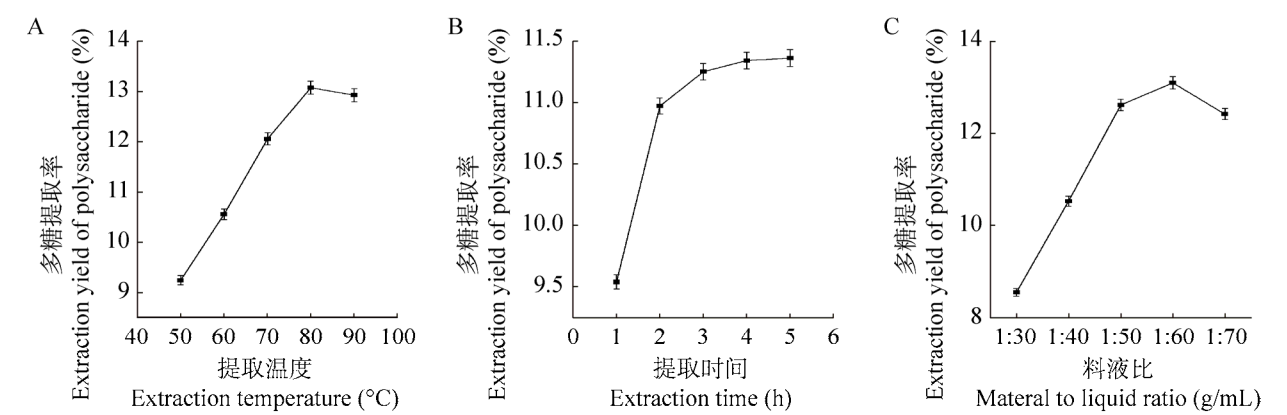


图 2 提取条件对多糖提取率的影响 A：提取温度对多糖提取率的影响. B：提取时间对多糖提取率的影响. C：料液比对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effects of extraction conditions on extraction yield of polysaccharide. A: Effect of extraction temperature on extraction yield of polysaccharide. B: Effect of extraction time on extraction yield of polysaccharide. C: Effect of material to liquid ratio on extraction yield of polysaccharide.

表 5 L₉ (3⁴)酶解后热水浸提正交试验结果及直观分析表

Table 5 The L₉ (3⁴) orthogonal array of water extraction after enzymolysis and results of assessment

实验组	A	B	C	D	Y
Experimental group	温度 Temperature (°C)	提取时间 Extraction time (h)	料液比 Material to liquid ratio (g/mL)	空白 Blank	多糖提取率 Extraction yield of polysaccharides (%)
1	1	1	1	1	9.41±0.03
2	1	2	2	2	10.99±0.06
3	1	3	3	3	11.81±0.05
4	2	1	2	3	8.95±0.02
5	2	2	3	1	14.11±0.02
6	2	3	1	2	8.19±0.02
7	3	1	3	2	11.31±0.04
8	3	2	1	3	11.69±0.02
9	3	3	2	1	10.46±0.04
K ₁	32.21	29.67	29.29		因素主次: C>B>A
K ₂	31.25	36.79	30.40		Factors ranking: C>B>A
K ₃	33.46	30.46	37.23		
k ₁	10.74	9.89	9.76		较优条件: A ₃ B ₂ C ₃
k ₂	10.42	12.26	10.13		The optimal conditions: A ₃ B ₂ C ₃
k ₃	11.15	10.15	12.41		
R	0.73	2.37	2.65		
排秩 Rank	3	2	1		

间，最后是提取温度(表 6，表 7)，A₃B₂C₃组合为酶解后热水浸提多糖的最优组合，但表 6 中提取率最高(14.11%±0.02%)的组合是 A₂B₂C₃，故进行验证试验，A₃B₂C₃组合提取率为 15.37%±0.03%，显著高于 A₂B₂C₃组合(P<0.05)，因此确定酶解后热水浸提条件的最优组合为 A₃B₂C₃，即提取温

度 80 ℃、提取时间 3 h、料液比 1:60 (g/mL)。再按 A₃B₂C₃ 组合不加酶提取多糖，其提取率为 11.01%±0.03%，与加酶 A₃B₂C₃ 组合相比，后者显著提高了多糖提取率(P<0.01)。这可能是由于酶对细胞壁与细胞膜的破坏作用，促进了细胞内多糖的溶出，导致提取率显著提高(颜梦秋等

2015)。因此酶解后热水浸提是竹荪菌托多糖提取的较优工艺。

2.5 不同提取方法的竹荪菌托多糖中的单糖组成、分子量对比

测定不加酶热水浸提菌托多糖(WP)和酶解后热水浸提菌托多糖(EP)的单糖组成、分子量(表 7), WP、EP 均主要由葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖和岩藻糖等组成, 但二者中岩藻糖所占比例差异显著($P<0.05$), 其他占比高的单糖差异极显著($P<0.01$)。EP 中葡萄糖含量最高为 48.82%, 且明显高于其他单糖。WP 中葡萄糖醛酸含量最高为 28.90%, 甘露糖次之为 26.95%。WP 的分子量 M_p 、 M_n 、 M_w 均比

EP 的大, 且差异极显著($P<0.01$)。WP 分子量主要分布在 32 941Da 左右, 而 EP 分子量主要分布在 2 929 Da 左右。这可能是由于酶对多糖有降解作用, 导致二者的单糖组成差异及分子量降低(张海芸等 2019)。

2.6 不同提取方法的竹荪菌托多糖抗氧化活性对比

由于EP和WP水溶液最大浓度为2.0 mg/mL, 因此在此浓度下测定抗氧化活性。EP、WP 和 Vc 对 DPPH·自由基清除率分别为 93.83%、37.87%和 58.69%(图 3), 三者差异极显著($P<0.01$), EP 的清除率极显著高于 WP 与 Vc, 而 WP 的清除率极显著低于 Vc,说明 EP 具有较强的 DPPH·

表 6 酶解后热水浸提多糖提取率方差分析表

Table 6 The ANOVA of orthogonal experimental results of polysaccharide yield obtained from water extraction after enzymolysis

变异来源	III类平方和	自由度	均方	F 值	显著性 P
Variation source	Squares	df	Mean square	F-value	P-value Prob>F
截距 Intercede	3 132.024	1	3 132.024	10 297.616	0.000**
A	2.464	2	1.232	4.050	0.033 0*
B	30.450	2	15.225	50.058	0.000**
C	36.962	2	18.481	60.763	0.000**
误差 e	6.083	20	0.304		
总计 Total	3 207.983	27			

**表示 $P<0.01$, 差异极显著; *表示 $P<0.05$, 差异显著
** Means extremely significant difference ($P<0.01$); * Means significant difference ($P<0.05$).

表 7 不同提取方法菌托多糖中的单糖组成及分子量对比

Table 7 A comparison of the composition of monosaccharides and molecular weight in polysaccharides obtained by different extraction methods

单糖组成及分子量	WP	EP
Composition of monosaccharide and Mw averages		
葡萄糖 Glucose (%)	16.19±0.05A	48.82±0.10B
甘露糖 Mannose (%)	26.95±0.04A	16.74±0.02B
葡萄糖醛酸 Glucuronic acid (%)	28.90±0.05A	14.28±0.04B
半乳糖 Galactose (%)	19.29±0.03A	9.70±0.04B
岩藻糖 Fucose (%)	5.16±0.01a	5.99±0.02b
木糖、核糖、鼠李糖 Xylose, ribose, rhamnose (%)	3.51±0.02A	4.47±0.03B
M_p (Da)	32 941±12A	2 929±8B
M_n (Da)	102 151±18A	3 344±6B
M_w (Da)	767 707±21A	522 208±19B

同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); 同行不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)
The different small letters mean significant difference in same row ($P<0.05$); The different capital letters mean extremely significant difference in same row ($P<0.01$).

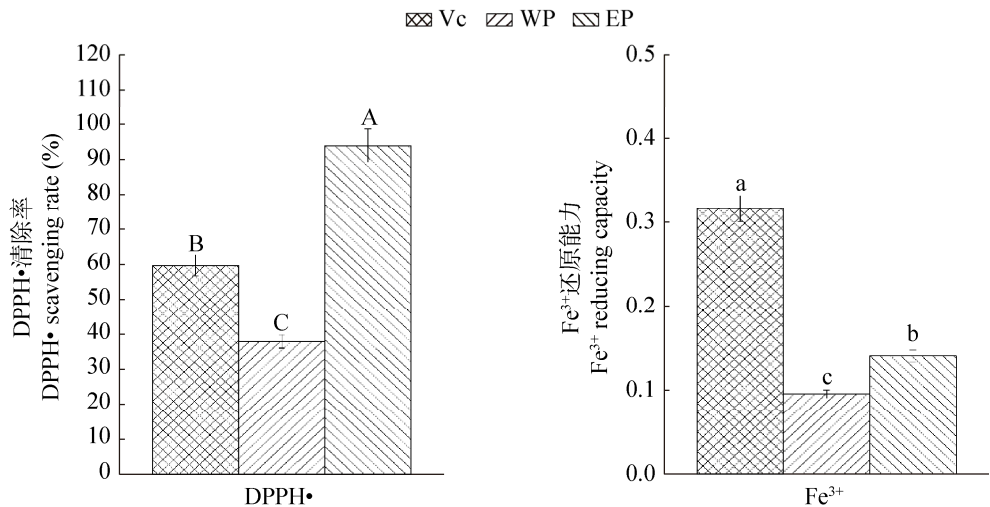


图3 不同提取方法的竹荪菌托多糖 DPPH·自由基清除率和 Fe³⁺还原能力 WP表示热水浸提法提取的菌托多糖；EP 表示酶解法提取的菌托多糖. 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)；不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$). 下同

Fig. 3 DPPH· radical scavenging rate and Fe³⁺ reducing capacity of polysaccharides obtained by different extraction methods. WP means polysaccharides of volva extracted by hot water; EP means polysaccharides of volva extracted by enzymatic method. The different small letters mean significant difference ($P<0.05$); The different capital letters mean extremely significant difference ($P<0.01$). The same below.

自由基清除能力，而 WP 的清除能力较弱；EP、WP 和 Vc 对 Fe³⁺还原能力分别为 0.140 7、0.095 4 和 0.316 1，三者差异显著($P<0.05$) (图 3)，EP、WP 的还原能力均显著低于 Vc，但 EP 的还原能力还是显著高于 WP。

2.7 不同提取方法的竹荪菌托多糖降血糖活性对比

在浓度为 2.0 mg/mL 下测定 EP、WP 的降血糖活性。EP、WP 和阿卡波糖对 α-淀粉酶抑制率为 56.45%、29.73%和 67.01%，三者差异显著($P<0.05$)，对 α-葡萄糖苷酶抑制率为 54.62%、40.40%和 96.61%，三者差异显著($P<0.05$) (图 4)，EP 和 WP 的抑制率均低于阿卡波糖，但 EP 的抑制率显著高于 WP，且大于 50%，说明 EP 对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶活性抑制能力较强且明显强于 WP。结合 EP 和 WP 的单糖组成、分子量和抗氧化活性差异，可能是 EP 的单糖组成改变以及分子量降低导致其生物活性提高(冯燕茹等 2019)。

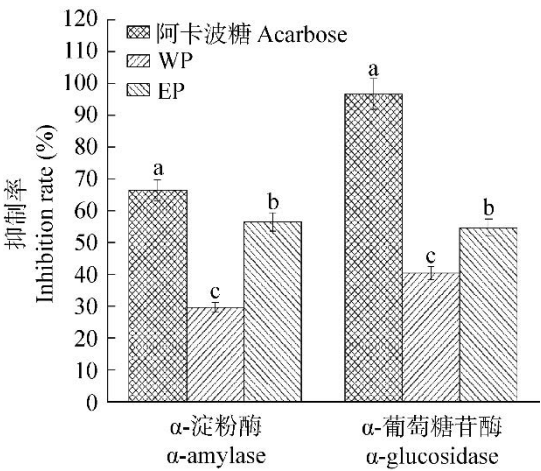


图4 不同提取方法的竹荪菌托多糖对 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶抑制率

Fig. 4 The inhibition rate of α-amylase and α-glucosidase of polysaccharides obtained by different extraction methods.

3 讨论

本研究结果显示，酶解法提取红托竹荪菌托多糖最佳工艺为：纤维素酶 2.5%、果胶酶 0.4%、木瓜蛋白酶 1.5%，50 °C 酶解 1 h，料液比 1:60，

提取温度 80 ℃、提取时间 3 h。此工艺条件下多糖的提取率为 15.37%，而不加酶的提取率为 11.01%，提取率显著提高，也高于徐耀(2012)、吴雪艳等(2015)的研究结果(10.89%、13.016%)，说明 3 种酶组合能充分发挥各种生物酶之间的协同作用，促进多糖的溶出。酶解法在实际应用中虽然添加酶增加了生产成本，但由于产量显著提高所产生的增值更大，所以最终产品利润提升，具有较好的经济效益。

酶解后热水浸提与不加酶热水浸提得到的多糖均主要由葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、岩藻糖等组成，但它们的质量百分比不同，而且酶解提取的多糖分子量显著降低，这可能是由于提取过程中酶对多糖有降解作用。王荣琨等(2020)的研究表明，不同提取方法对红托竹荪多糖提取率和单糖组成有影响。陈文等(2014)发现纤维素酶能降解燕麦多糖，使其分子量明显降低。杜玲等(2017)研究报道果胶酶、糖化酶均导致浒苔多糖低分子量片段增加，高分子量片段减少。

体外抗氧化、降血糖活性研究表明，酶解后热水浸提多糖对 DPPH·自由基清除率、对 Fe^{3+} 还原能力及对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶抑制率都显著高于不加酶热水浸提的多糖，说明前者具有更好的抗氧化、降血糖活性。多糖的生物活性与其化学组成和结构特征密切相关，例如分子量大小、单糖组成等(Ferreira *et al.* 2015)，酶解导致多糖的单糖组成改变和分子量降低，高分子量多糖对细胞膜的渗透能力相对较差，活性低于低分子量多糖，降解之后其水溶性增加，渗透能力增强，从而可能提高其生物活性(Wu *et al.* 2007)。Soltani *et al.* (2013)报道单糖组成影响虫草多糖的抗氧化活性；陈春娟等(2017)发现低分子量蛹虫草多糖具有降血糖效果。

综上所述，本研究表明与传统的热热水浸提法相比，酶解后热水浸提红托竹荪菌托多糖提取率较高，提取的多糖有较高的抗氧化降血糖活性，

经济效益较好，具有推广应用价值。对于菌托多糖抗氧化降血糖功效的动物实验、抑菌抗肿瘤等活性以及作用机制还有待进一步研究。

[REFERENCES]

- Chen CJ, Zhu ZY, Chen L, 2017. Study of the hypoglycemic activity of low molecular weight polysaccharides from *Cordyceps militaris*. *Modern Food Science and Technology*, 33(4): 25-30 (in Chinese)
- Chen HQ, Hu RX, Huang XH, Peng YX, Wang CH, Tan ZJ, 2012. Study on hydrolysis technology of *Lentinula edodes* degraded by composite enzyme. *Microbiology China*, 39(1): 62-67 (in Chinese)
- Chen W, Wang N, Zhang M, 2014. Cellulase degradation and physicochemical property analysis of oat polysaccharide. *China Food Additives*, 2014(2): 159-163 (in Chinese)
- Cheng JW, He L, Wu XQ, Fu LZ, Hu CJ, Wu QQ, Li HB, Wei HL, 2010. Optimization of extracting technique of polysaccharide from fructus orni with compound enzymes. *Forest By-Product and Speciality in China*, 2010(3): 1-4 (in Chinese)
- Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised checklist of edible fungi in China. *Mycosystema*, 29(1): 1-21 (in Chinese)
- Du L, Shan H, Lü HT, 2017. Enzymatic degradation of *Enteromorpha prolifera* polysaccharide and its antioxidant activity. *Feed Research*, 2017(8): 25-31 (in Chinese)
- Feng YR, Liu W, Yang JG, 2019. Preparation of carboxymethylated pachyman with different molecular weight and study on its antioxidative activity. *China Food Additives*, 2019(3): 67-74 (in Chinese)
- Ferreira SS, Passos CP, Madureira P, Vilanova M, Coimbra MA, 2015. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*, 132: 378-396
- Jabastin J, Palanisamy BD, Digambar K, Venkatesan BP, Prathap Kumar HS, 2019. Prebiotic potential of water extractable polysaccharide from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology*, 101: 703-710
- Lee SJ, Shin NH, Jeong JS, Kim ET, Lee SK, Lee ID, Lee SS, 2018. Effects of *Gelidium amansii* extracts on *in vitro* ruminal fermentation characteristics, methanogenesis, and microbial populations. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(1): 71-79
- Lin K, Zhang YQ, Wei YH, 2012. Research progress on enzymatic extraction of polysaccharides from edible

- fungi. Modern Agricultural Science and Technology, 2012(19): 285-289 (in Chinese)
- Liu XY, Chen YX, Wu LX, Wu XQ, Huang YF, Liu B, 2017. Optimization of polysaccharides extraction from *Dictyophora indusiata* and determination of its antioxidant activity. International Journal of Biological Macromolecules, 103: 175-181
- Liu Y, Huang G, 2019. Extraction and derivatisation of active polysaccharides. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 34(1): 1690-1696
- Luo LP, Li BJ, Zhao JF, Yang L, Li W, 2020. Antioxidant and hypoglycemic activity of three edible fungus extracts *in vitro*. Science and Technology of Food Industry, 41(20): 324-329 (in Chinese)
- Ma LY, Shang EK, Zhang JF, Du LH, Guo YB, 2022. Study on the extraction of aloe polysaccharide by ultrasound assisted compound enzyme. China Food Additives, 2022(3): 51-56 (in Chinese)
- Soltani M, Kamyab H, Enshasy HAE, 2013. Molecular weight (Mw) and monosaccharide composition (MC): two major factors affecting the therapeutic action of polysaccharides extracted from *Cordyceps sinensis*. Journal of Pure and Applied Microbiology, 7(3): 1601-1613
- Sun JX, Wang YF, Wang JH, Shi L, Liu ZT, Pan CL, 2012. Research advances on polysaccharide extracting technology of edible fungi. Edible Fungi of China, 31(3): 6-9 (in Chinese)
- Wang BB, 2012. Study on the isolation, purification, structure, antioxidation and antibacteria of polysaccharide from *Dictyophora rubrovolvata*. Master Thesis, Shaanxi Normal University, Xi'an. 1-63 (in Chinese)
- Wang JJ, Wu LX, Chen YX, Liu XY, Liu B, 2017. Effect on antioxidant activity of *Dictyophora indusiata* (Vent. ex Pers.) Fisch. from different extraction. Food Science and Technology, 42(5): 225-229 (in Chinese)
- Wang RK, Wang Q, Luo X, Sun DF, Jiang JX, Zhu LW, 2020. Effects of different extraction methods on the extraction rate and antioxidant properties of *Dictyophora indusiata* polysaccharide. Edible Fungi of China, 39(3): 24-28 (in Chinese)
- Wang YX, Shi XD, Yin JY, Nie SP, 2018. Bioactive polysaccharide from edible *Dictyophora* spp.: extraction, purification, structural features and bioactivities. Bioactive Carbohydrides and Dietary Fibre, 14: 25-32
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98: 1-76
- Wu Q, Zheng C, Ning ZX, Yang B, 2007. Modification of low molecular weight polysaccharides from *Tremella fuciformis* and their antioxidant activity *in vitro*. International Journal of Molecular Sciences, 8(7): 670-679
- Wu SH, Gong GL, Wang YY, Li F, Jia SY, Qin FX, Ren HT, Liu Y, 2013. Response surface optimization of enzyme-assisted extraction polysaccharides from *Dictyophora indusiata*. International Journal of Biological Macromolecules, 61: 63-68
- Wu XY, Luo P, Ye JF, Xiao JY, Zhang Y, Ding K, Zhang JM, Liu JZ, 2015. Optimization of extraction technique of polysaccharide from volva of *Dictyophora indusiata* by response surface methodology. Journal of Southern Agriculture, 46(3): 480-485 (in Chinese)
- Xu Y, 2012. Extraction technology and antioxidant activity of polysaccharides of different parts of *Dictyophora rubrovolvata* *in vitro*. Science and Technology of Food Industry, 3(24): 350-352, 368 (in Chinese)
- Yan MQ, Wu D, Yang L, Zhou S, Liu YF, Zhang JS, 2015. Enzymatic extraction of free amino acid and polysaccharide from *Coprinus comatus* fruit bodies. The Food Industry, 36(7): 13-16 (in Chinese)
- Yang JY, Zhang C, 2020. Research progress on the structure and extraction methods of polysaccharides from *Dictyophora indusiata*. Shandong Chemical Industry, 49(17): 54-56, 59 (in Chinese)
- Yang T, Chiu CY, Lu TJ, 2019. The anti-obesity effect of polysaccharide-rich red algae (*Gelidium amansii*) hot-water extracts in high-fat diet-induced obese hamsters. Marine Drugs, 17(9): 532
- Ye M, Wen Z, Peng YF, Zhang DG, 2016. Effects of *Dictyophora rubrovolvata* polysaccharide on anti-aging and hypoglycemic in mice. Science and Technology of Food Industry, 37(7): 343-345 (in Chinese)
- Zeng WJ, Yang L, Luo LP, Kang C, Wang WK, Zheng X, 2022. Comprehensive evaluation of the output value and quality of *Phallus rubrovolvatus* with different cultivation methods. Northern Horticulture, 10: 102-110 (in Chinese)
- Zhang HY, He L, Li Q, Yang B, Yang G, 2019. Study on the effect of degradation on the physicochemical properties and biological activity of plant polysaccharides. Food and Fermentation Sciences & Technology, 55(3): 15-19 (in Chinese)
- Zheng TT, Fan JP, Gu DH, Liao GZ, Ge CR, Pu YH, 2017. Study on the composition and activity mechanism of polysaccharide from four kinds of wild edible mushrooms. Farm Products Processing, 2017(4): 51-59 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 陈春娟, 朱振元, 陈璐, 2017. 低分子量蛹虫草多糖降血糖活性的研究. 现代食品科技, 33(4): 25-30
- 陈海强, 胡汝晓, 黄晓辉, 彭运祥, 王春晖, 谭周进, 2012. 复合酶法水解香菇工艺的研究. 微生物学通报, 39(1): 62-67
- 陈文, 王楠, 张民, 2014. 燕麦多糖的纤维素酶降解及理化性质分析. 中国食品添加剂, 2014(2): 159-163
- 程俊文, 贺亮, 吴学谦, 付立忠, 胡传久, 吴庆其, 李海波, 魏海龙, 2010. 复合酶法提取山茱萸多糖的工艺条件优化. 中国林副特产, 2010(3): 1-4
- 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉, 2010. 中国食用菌名录. 菌物学报, 29(1): 1-21
- 杜玲, 单虎, 吕海涛, 2017. 酶法降解浒苔多糖及其抗氧化活性研究. 饲料研究, 2017(8): 25-31
- 冯燕茹, 刘玮, 杨继国, 2019. 不同分子量羧甲基茯苓多糖的制备及其抗氧化活性的研究. 中国食品添加剂, 2019(3): 67-74
- 林魁, 张燕青, 魏云华, 2012. 食用菌多糖酶法提取工艺研究进展. 现代农业科技, 2012(19): 285-289
- 罗丽平, 李冰晶, 赵景芳, 杨玲, 李威, 2020. 三种食用菌提取物体外抗氧化与降血糖活性研究. 食品工业科技, 41(20): 324-329
- 马丽媛, 尚尔坤, 张金凤, 杜丽红, 郭元博, 2022. 超声波辅助复合酶法提取芦荟多糖的研究. 中国食品添加剂, 2022(3): 51-56
- 孙靖轩, 王延锋, 王金贺, 史磊, 刘姿彤, 潘春磊, 2012. 食用菌多糖提取技术研究概况. 中国食用菌, 31(3): 6-9
- 王蓓蓓, 2012. 红托竹荪多糖的分离纯化、结构分析及其生物活性研究. 陕西师范大学硕士论文, 西安. 1-63
- 王娟娟, 吴林秀, 陈艺煊, 刘晓艳, 刘斌, 2017. 不同提取方法对竹荪提取液抗氧化活性的影响研究. 食品科技, 42(5): 225-229
- 王荣琨, 王钦, 罗欣, 孙达锋, 蒋建新, 朱莉伟, 2020. 不同提取方法对竹荪多糖提取率及抗氧化性影响. 中国食用菌, 39(3): 24-28
- 吴雪艳, 罗鹏, 叶建方, 肖佳艳, 张豫, 丁镨, 张吉梅, 刘继中, 2015. 响应面法优化竹荪菌托多糖的提取工艺. 南方农业学报, 46(3): 480-485
- 徐耀, 2012. 红托竹荪不同部位多糖提取及体外抗氧化活性研究. 食品工业科技, 3(24): 350-352, 368
- 颜梦秋, 吴迪, 杨敛, 周帅, 刘艳芳, 张劲松, 2015. 酶法提取鸡腿菇子实体中游离氨基酸及多糖的工艺研究. 食品工业, 36(7): 13-16
- 杨晶莹, 张驰, 2020. 竹荪多糖的研究进展. 山东化工, 49(17): 54-56, 59
- 叶敏, 文竹, 彭源芳, 张达贵, 2016. 红托竹荪多糖抗衰老和降血糖作用研究. 食品工业科技, 37(7): 343-345
- 曾维军, 杨玲, 罗丽平, 康超, 王万坤, 郑旋, 2022. 不同栽培方法红托竹荪产值与品质综合评价. 北方园艺, 10: 102-110
- 张海芸, 贺亮, 李琴, 杨波, 杨光, 2019. 降解对植物多糖理化性质以及生物活性影响的研究. 食品与发酵科技, 55(3): 15-19
- 郑婷婷, 范江平, 谷大海, 廖国周, 葛长荣, 普岳红, 2017. 四种食用野生菌多糖成分及活性机理研究进展. 农产品加工, 2017(4): 51-59