

金耳多糖纤维素酶提工艺优化及其初步结构研究

王宣东, 李 策, 康梅松, 田淑雨, 鹿士峰, 吴杨洋, 杜秀菊*

聊城大学生命科学学院, 聊城 252059

摘要:以金耳为研究材料, 采用4种提取方法, 包括热水提取、超声提取、酶提取和微波提取得到4种金耳多糖, 分别命名为H-TAP、U-TAP、E-TAP和M-TAP, 通过高效阴离子色谱(HPAEC-PAD)和傅里叶红外(FT-IR)对它们的化学特征进行了初步研究, 采用羟自由基清除试验对它们的抗氧化活性进行了评估。综合考察4种多糖的提取得率和抗氧化活性, 确定了酶提为最优提取方法。通过单因素试验和正交试验 $L_9(3^4)$, 得出酶提的最佳提取工艺为: 酶解时间50 min, 料液比1:80 g/mL, 酶解温度55 °C, pH为4.5。在此条件下, 金耳多糖的提取得率为22.68%。

关键词: 金耳多糖; 提取; 纤维素酶; 羟自由基; 正交试验

中图分类号: TS95; R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.010

Cellulase Extraction Optimization and Preliminary Structural Characterization of Polysaccharides from *Tremella aurantialba*

WANG Xuan-dong, LI Ce, KANG Mei-song, TIAN Shu-yu, LU Shi-feng, WU Yang-yang, DU Xiu-ju*

College of Life Science, Liaocheng University, Shandong 252059, China

Abstract: In this study, four different methods were used to extract polysaccharides from *Tremella aurantialba* fruiting bodies, which included hot water extraction (H-TAP), ultrasonic-assisted extraction (U-TAP), enzyme-assisted extraction (E-TAP) and microwave-assisted extraction (M-TAP). Their chemical compositions and yields were determined and compared by using high-performance anion-exchange pulsed-amperometric detection chromatography (HPAEC-PAD) and fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR). *In vitro* antioxidant activities were also studied on the basis of hydroxyl radical-scavenging activity. The results showed that the cellulase-assisted extraction (E-TAP) was the most optimal method in terms of their yields and hydroxyl radical-scavenging rates. Single-factor tests and orthogonal experimental design ($L_9(3^4)$) were used to obtain the optimal extraction conditions. Results showed that the optimal parameters were as follows: ultrasonic time, 50 min; enzyme temperature, 55 °C; water to raw material ratio, 80 mL/g; pH, 4.5. Under the optimal extraction conditions, the highest extraction yield of polysaccharide TAP was 22.68%.

Key words: *Tremella aurantialba* polysaccharide; extraction; cellulase; hydroxyl radical; orthogonal test design

大型真菌是重要的医药宝库。金耳(*Tremella aurantialba*)是一种食药兼具、疗效特殊的大型名贵真菌。中医记载“具有化痰、止咳、定喘、调气、平肝阳之功效”。现代研究表明, 金耳具有丰富的营养价值和广泛的药理作用, 是“三耳”(金耳、银耳、黑木耳)中的佼佼者, 且毒性极低, 是一种非常具有开发价值的大型真菌。金耳多糖是金耳的主要活性成分之一, 含有丰富的胶质多糖, 药理试验表明, 金耳多糖具有明显的增强机体免疫^[1,2]、抗肿瘤^[3]、降血

糖^[4]、防治高脂血症^[5]和抗氧化^[6]等多种药理活性。

目前对于金耳产品的利用还处于低级粗放阶段, 主要以传统的直接食用子实体为主。虽然国内外学者对金耳多糖已经开展了一些研究, 但与其他真菌多糖相比, 还不够深入。对于金耳多糖的提取主要以传统的热热水浸提为主。随着对多糖提取制备技术的发展, 一些新的提取技术, 如超声提取、酶提取、微波提取逐渐应用到多糖领域, 为高效开发金耳这一珍稀资源提供了技术支撑。

本研究以野生金耳子实体为研究对象, 采用热水提取、超声提取、纤维素酶提取和微波提取等4种方法, 获得4种多糖(分别命名为H-TAP、U-TAP、E-

收稿日期: 2018-01-23 接受日期: 2018-02-26

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2015CL002); 聊城大学大学生科技文化创新基金(26312170902)

* 通讯作者 E-mail: wyxx2008@163.com

TAP 和 M-TAP), 采用高效阴离子色谱 (high-performance anion-exchange pulsed-amperometric detection chromatography, HPAEC-PAD) 和傅里叶红外 (fourier transform infrared spectrophotometer, FT-IR) 对它们的化学组分、结构特征进行研究和比较, 综合考虑提取得率和抗氧化活性, 选出最佳方法, 在此基础上, 采用单因素实验和正交设计试验, 优化出最佳提取工艺, 旨在为高效开发金耳多糖类药品和保健品奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金耳子实体, 由昆明食用菌研究所提供。

标准单糖鼠李糖 (L-rhamnose, L-Rha)、L-阿拉伯糖 (L-arabinose, D-Ara)、果糖 (D-fructose, D-Fru)、D-葡萄糖 (D-glucose, D-Glc)、D-木糖 (D-xylose, D-Xyl)、D-甘露糖 (D-mannose, D-Man)、D-半乳糖 (D-galactose, D-Gal)、D-岩藻糖 (D-fucose, D-Fuc)、D-葡萄糖醛酸 (D-glucuronic acid, D-GlcA) 和 D-半乳糖醛酸 (D-galacturonic acid, D-GalA) 均购 Sigma Chemical Co. (Shanghai, China)。三氟乙酸 (TFA) 购自 Merck 公司。纤维素酶 (酶活为 3 U/mg), 购自 Solarbio 公司 (上海索莱宝)。其他均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 材料预处理

金耳子实体烘干至恒重→粉碎过 60 目筛→按 1:15 (g/mL) 料液比加入 95% 无水乙醇→浸泡 24 h, 重复 2 次, 滤渣室内风干后备用。

1.2.2 不同提取方法金耳多糖的制备

1.2.2.1 热水浸提法制备金耳多糖

取处理后的样品 3 g, 按料液比 1:60 (g/mL) 加蒸馏水→浸提 (100 °C, 2 h)→离心 (7000 rpm, 20 min)→上清 60 °C 真空浓缩→醇沉 (加无水乙醇浓度至 80%, 4 °C, 静置 24 h)→离心 (3000 rpm, 10 min) 得沉淀→加适量蒸馏水 (DW) 溶解→透析 48 h (截留分子量为 8000 Da)→上清 60 °C 真空浓缩→离心 (3000 rpm, 10 min) 除去不溶物→上清 60 °C 烘干→得多糖 H-TAP。

1.2.2.2 纤维素酶提取法制备金耳多糖

取处理后的样品 5 g, 按料液比 1:60 (g/mL) 加蒸馏水→加入纤维素酶反应 2 h→热水浸提 (1 h, 80 °C, 同时酶也被灭活)→离心 (7000 rpm, 20 min)→

上清 60 °C 真空浓缩→醇沉 (加无水乙醇浓度至 80%, 4 °C, 静置 24 h)→离心 (3000 rpm, 10 min) 得沉淀→加适量蒸馏水 (DW) 溶解→透析 48 h (截留分子量为 8000 Da)→上清 60 °C 真空浓缩→离心 (3000 rpm, 10 min) 除去不溶物→上清 60 °C 烘干→得多糖 E-TAP。

1.2.2.3 超声提取法制备金耳多糖

取处理后的样品 3 g, 按料液比 1:60 (g/mL) 加蒸馏水→超声波热水浸提 (70 °C, 45 kHz, 1 h, 100 w)→离心 (7000 rpm, 20 min)→上清 60 °C 真空浓缩→醇沉 (加无水乙醇浓度至 80%, 4 °C, 静置 24 h)→离心 (3000 rpm, 10 min) 得沉淀→加适量蒸馏水 (DW) 溶解→透析 48 h (截留分子量为 8000 Da)→上清 60 °C 真空浓缩→离心 (3000 rpm, 10 min) 除去不溶物→上清 60 °C 烘干→得多糖 U-TAP。

1.2.2.4 微波提取法制备金耳多糖

取处理后的样品 3 g, 按料液比 1:60 (g/mL) 加蒸馏水→微波提取 (247 w, 10 min)→离心 (7000 rpm, 20 min)→上清 60 °C 真空浓缩→醇沉 (加无水乙醇浓度至 80%, 4 °C, 静置 24 h)→离心 (3000 rpm, 10 min) 得沉淀→加适量蒸馏水 (DW) 溶解→透析 48 h (截留分子量为 8000 Da)→上清 60 °C 真空浓缩→离心 (3000 rpm, 10 min) 除去不溶物→上清 60 °C 烘干→得多糖 M-TAP。

1.2.3 多糖组分及含量的测定

总糖测定采用苯酚-硫酸法^[7], 还原糖测定采用 DNS 法^[8], 蛋白含量采用考马斯亮蓝法^[9,10]。糖醛酸含量和中性糖含量测定采用高效阴离子色谱-脉冲安培检测法 (HPAEC-PAD)^[11]。多糖含量采用如下公式计算:

$$\text{多糖含量}(\%) = \text{总糖含量}(\%) - \text{还原糖含量}(\%)$$

1.2.4 单糖组分分析

单糖组分分析采用 HPAEC-PAD^[11]。采用 D-Glc, D-Gal, D-Ara, L-Fuc, D-Man, L-Rha, D-Fru, D-Xyl, D-GlcA 和 D-GalA 作为单糖标准。简述如下: 取样品 2 mg 放于茄形瓶中, 加入 2 M 三氟乙酸 (TFA), 110 °C 下保持 5 h, 然后加入 3 mL 甲醇真空旋转蒸发, 直至完全干燥。定容至 100 mL 后采用离子色谱仪进行检测。洗脱条件为: 采用 CarboPac™ PA20 (3 mm × 150 mm) 检测柱, 洗脱液浓度为 2 mmol/L 的 NaOH 溶液, 流速为 0.45 mL/min, 分析时间为 40 min。脉冲安培检测器参数为 E1 为 100 mv, 400 ms; E2 为 2000 mv, 20 ms; E3 为 600 mV, 10

ms; E4 为 100 mV, 70 ms。所用仪器为 ICS-5000 型高效离子色谱仪 (Dionex, USA)。

1.2.5 红外光谱分析

傅立叶-红外 (FT-IR): 分别取 4 种多糖样品 2 mg, KBr 压片进行常规红外光谱分析, 光谱测定范围 4000-400 cm^{-1} 。所用仪器为: FT/IR Scimitor 800 (Varian, USA)。

1.2.6 抗氧化活性试验

1.2.6.1 供试样品的配制

用蒸馏水分别将 H-TAP、E-TAP、U-TAP 和 M-TAP 样品彻底溶解, 离心 (3000 rpm), 取上清分别配成 62.5、125、250、500、1000、1500、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 备用。

1.2.6.2 羟自由基清除活性的测定

参照 Smirnoff (1989) 的方法^[12], 并稍作改动。取 1 mL 4 mmol/L FeSO_4 溶液, 1 mL 4 mmol/L 30% H_2O_2 溶液, 1 mL 超纯水和 1 mL 4 mM 水杨酸乙醇溶液混合均匀, 避光下 37 $^\circ\text{C}$ 保温 30 min, 3000 rpm 离心 10 min, 510 nm 处测溶液的吸光度值为 A_0 。取 1 mL 4 mmol/L FeSO_4 溶液, 1 mL 4 mmol/L 30% H_2O_2 溶液, 1 mL 样品液和 1 mL 4 mmol/L 水杨酸乙醇溶液混合均匀, 避光下 37 $^\circ\text{C}$ 保温 30 min, 3000 rpm 离心 10 min, 510 nm 处测溶液的吸光度值为 A_i 。

取 1 mL 4 mmol/L FeSO_4 溶液, 1 mL 4 mmol/L 30% H_2O_2 溶液, 1 mL 样品液和 1 mL 乙醇溶液混合均匀, 避光条件下 37 $^\circ\text{C}$ 保温 30 min, 3000 rpm 离心 10 min, 510 nm 处测溶液的吸光度值为 A_j 。以维生素 C (Vc) 代替样品液作为阳性对照。吸光值平行测 3 次。清除率按如下公式计算:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

其中, A_0 为空白对照液的吸光度, A_i 为加入多糖溶液后的吸光度, A_j 为待测液本底的吸光度。

1.2.7 纤维素酶提取工艺优化

1.2.7.1 单因素试验

选定酶用量为 300 U, 酶解温度 45 $^\circ\text{C}$, 料液比例 1:80 (g/mL), 酶解时间 50 min, 溶液 pH 4.5 为基础条件, 分别改变单因素, 包括酶用量 (100、150、200、250、300 U); 酶解温度 (25、35、45、55、65 $^\circ\text{C}$); 料液比例 (1:60、1:70、1:80、1:90、1:100); 酶解时间 (30、40、50、60、70 min); 溶液 pH (3.5、4.5、5.5、6.5、7.5), 研究每一个因素对金耳多糖提取得率的影响。

1.2.7.2 正交试验设计

在单因素试验的基础上, 固定酶用量为 200 U, 选择料液比、酶解温度、酶解时间、溶液 pH 4 个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交设计试验, 设计方案见表 1。

表 1 正交试验设计

Table 1 Factors and levels for orthogonal test design

水平	酶解时间 Enzymatic time (min)	液料比 Ratio of water to material (g/mL)	酶解温度 Temperature ($^\circ\text{C}$)	溶液 pH Solution pH
1	40	1:70	35	4.5
2	50	1:80	45	5
3	60	1:90	55	5.5

1.2.8 数据统计分析

数据以平均值 \pm 标准偏差 (mean \pm SD) 表示, 统计学采用组间 t 检验进行处理, $n = 3$, 使用 STST 统计软件包进行方差统计分析。

2 结果与分析

2.1 四种多糖的提取得率与组分含量

为了筛选出适合金耳多糖的最佳提取方法, 分别采用了 4 种方法进行提取, 分别是: 热水浸提、酶提、微波提取和超声波提取, 制备的多糖分别命名为 H-TAP、E-TAP、M-TAP 和 U-TAP。4 种多糖的提取

得率和化学组分见表 2 所示。在 4 种方法中, 酶提 (E-TAP) 和热水浸提 (H-TAP) 的得率较高, 分别为 44.39% 和 41.52%。微波提取 (M-TAP) 得率最低, 仅为 3.70%。多糖含量高低顺序为: E-TAP > M-TAP > H-TAP > U-TAP, 其中酶提 E-TAP 的多糖含量高达 44.46%, 显著高于其他 3 种提取方式。而且, 在 4 种多糖中, 酶提 E-TAP 的糖醛酸含量 (8.38%) 最高, 蛋白质含量最低, 仅为 0.40%。

2.2 四种多糖的单糖组成

多糖结构是其生物活性的基础。多糖中的单糖组成及其摩尔比对其活性有很大影响^[13]。本研究

表2 四种金耳多糖的提取得率与所含组分比较

Table 2 Properties of various polysaccharides from *T. aurantialba* using different extraction methods

样品 Sample	H-TAP	E-TAP	M-TAP	U-TAP
^a 提取得率 Extraction yield(^b W%)	41.52	44.39	3.70	20.79
总糖含量 Total sugar(W%)	38.29	49.21	41.61	14.85
还原糖 Reducing sugar(W%)	5.26	4.75	3.46	4.62
多糖含量 Polysaccharide content(W%)	33.03	44.46	38.15	10.23
中性糖含量 Neutral sugar content(^c M%)	93.36	91.62	95.28	93.99
糖醛酸含量 Uronic acid content(M%)	6.64	8.38	4.72	6.01
蛋白质含量 Protein content(W%)	2.30	0.40	2.80	5.53
单糖组分 Monosaccharide components (M%)				
半乳糖 D-Galactose (M%)	^d nd	3.73	5.76	2.51
葡萄糖 D-Glucose (M%)	22.50	13.31	21.12	19.70
木糖 D-Xylose (M%)	24.47	23.46	22.08	24.21
甘露糖 D-Mannose (M%)	46.39	51.12	46.32	47.57
葡萄糖醛酸 D-GluA (M%)	6.64	8.38	4.72	6.01

注:^a 提取得率:是指所得粗多糖(H-TAP、E-TAP、M-TAP和U-TAP)与提取所用预处理后的原材料质量之比,再乘以100的得数。^b W% :表示质量百分比;^c M% :表示摩尔百分比;^d nd:表示没有检测到。

Note:^a Extraction yield:It refers to the ratio of the mass of crude polysaccharide (H-TAP,E-TAP,M-TAP and U-TAP) to the mass of pretreated materials, and then multiply by 100. ^b W% :Expressed as the mass present. ^c M% :Expressed as the mole present. ^d nd:Expressed that it was not detected.

中,采用HPAEC-PAD对4种多糖的单糖组分及其摩尔比进行了测定。如图1和表2所示,10种标准单糖的HPAEC-PAD图谱分析结果如图1a,H-TAP、E-TAP、M-TAP和U-TAP的单糖组分图谱如图1b-e。通过与单糖标准图谱(图1a)进行比对,发现H-TAP主要由4种单糖组成,分别为:D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露糖和D-葡萄糖醛酸,它们的摩尔比为:22.50:24.47:46.29:6.64。E-TAP、M-TAP和U-TAP主要由5种单糖组成,分别为:D-半乳糖、D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露糖和D-葡萄糖醛酸,它们的单糖摩尔比分别为:3.37:13.31:23.46:51.12:8.38

(E-TAP) 5.76:21.12:22.08:46.32:4.72(M-TAP)和2.51:19.70:24.21:47.57:6.01(U-TAP)。也就是说,除H-TAP之外,E-TAP、M-TAP和U-TAP具有相同的单糖组分,但其摩尔比不相同。由表2发现,D-甘露糖是4种多糖(H-TAP、E-TAP、M-TAP和U-TAP)中最主要的单糖组分,其摩尔比例分别为46.39%、51.12%、46.32%和47.57%。另外,在图2b、2c、2d和2e中,均有一个保留时间为39.00的未知峰,表明4种多糖中均可能存在一个新的未知化合物。

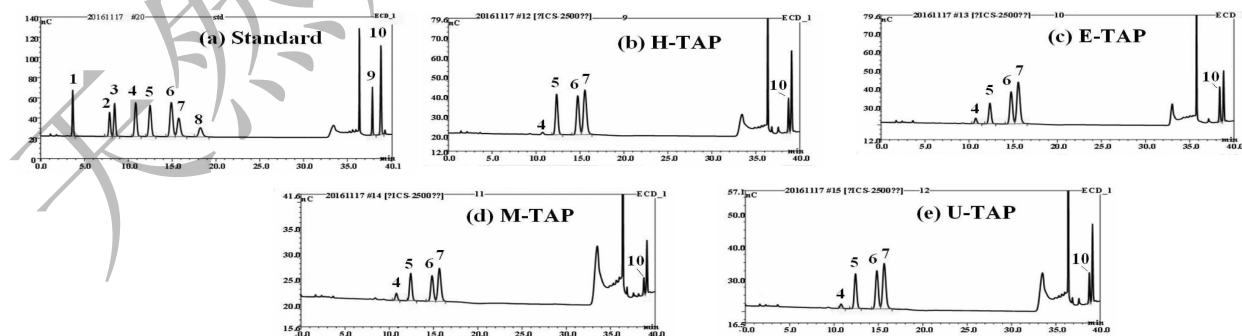


图1 十种标准单糖(a)和四种多糖H-TAP(b)、E-TAP(c)、M-TAP(d)和U-TAP(e)的HPAEC-PAD图谱

Fig.1 The spectra of HPAEC-PAD of 10 standard monosaccharides (a) and monosaccharide components of four polysaccharide H-TAP (b), E-TAP (c), M-TAP(d), and U-TAP(e).

(1)岩藻糖(2)鼠李糖(3)阿拉伯糖(4)半乳糖(5)葡萄糖(6)木糖(7)甘露糖(8)果糖(9)半乳糖醛酸(10)葡萄糖醛酸

Peaks:(1) L-fucose,(2) L-rhamnose,(3) L-arabinose,(4) D-galactose,(5) D-glucose,(6) D-xylose,(7) D-mannose,(8) D-fructose,(9) D-GalA and (10) D-gluA

2.3 红外图谱分析

分析红外图谱(见图2)发现,4种多糖具有相似的结构,这与HPAEC-PAD的分析结果基本相吻合。在 $3434 \sim 3341 \text{ cm}^{-1}$ 处宽而强的波段为O-H的伸缩振动。在 $2929 \sim 2925 \text{ cm}^{-1}$ 处有一个小波峰是由于C-H的伸缩振动^[14]。在 $1251 \sim 1249 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1734 \sim 1730 \text{ cm}^{-1}$ 处为乙酰基或O-乙酰基的特征吸

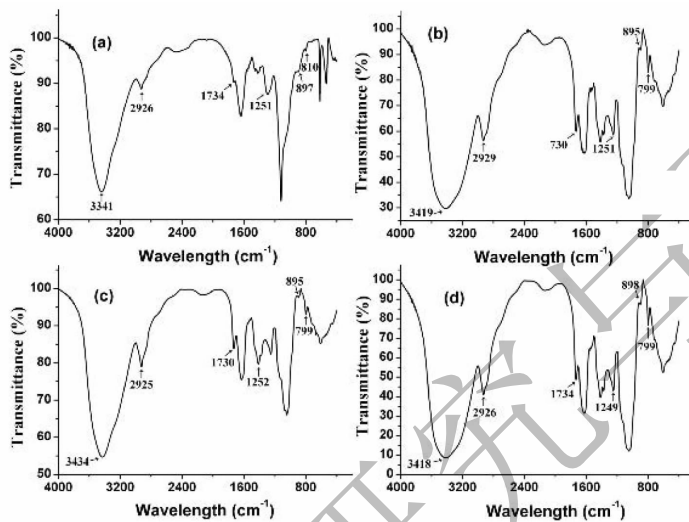


图2 4种多糖在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 波数下的红外扫描结果

Fig.2 Infrared spectrum of H-TAP, M-TAP, E-TAP and U-TAP($4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$)

2.4 四种金耳多糖的抗氧化活性

疾病的发生与自由基对组织细胞的损伤程度息息相关。羟自由基是三种重要的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)之一,杀伤力最强、最活跃,它可引起细胞病变,能直接造成体内组织损伤或引起人类疾病的发生^[18]。羟自由基清除活性是评价抗氧化能力的重要指标之一。为了筛选出药理活性较高的提取方法,对4种多糖H-TAP、E-TAP、M-TAP和U-TAP的羟自由基清除活性进行了测定。

采用水杨酸法测定羟自由基清除率的原理是: Fe^{2+} 和 H_2O_2 混合生成羟自由基,即 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{Fe}^{3+}$,水杨酸能捕获体系内的羟自由基并可生成有色物质,此有色物质在 510 nm 处的吸光值与羟自由基量呈正相关性。因此,清除率越高其抗氧性越强。由图3可以看出,在试验浓度为 $62.5 \sim 1500 \mu\text{g/mL}$ 范围内,4种多糖均表现出了浓度-活性依赖性,H-TAP、E-TAP、M-TAP和U-TAP和阳性对照Vc的 EC_{50} 值分别为 2.46×10^4 、 1.58 、 7.57 、 1.51 和 $2.93 \mu\text{g/mL}$,因此,它们的抗氧化活性高低顺序为 $\text{U-TAP} > \text{E-TAP} > \text{Vc} > \text{M-TAP} > \text{H-TAP}$

收峰,表明4种多糖中均可能含有糖醛酸或者乙酰基^[15]。结合HPAEC-PAD图谱,表明4种金耳多糖中均含有D-葡萄糖醛酸,这与Du *et al.* (2015)对金耳多糖的研究结果相吻合^[16]。在4种多糖的图谱中, $898 \sim 897 \text{ cm}^{-1}$ 处均有一个微弱的峰,表明在4种多糖中均有 β 型-吡喃糖存在^[17]。

TAP,其中,U-TAP和E-TAP的抗氧化活性较强,均高于阳性对照Vc,且二者活力相当,而M-TAP和H-TAP的清除能力相对较差。

综合考虑得率和抗氧化活性,在4种制备方法中,纤维素酶提取法是提取金耳多糖的最佳方法。

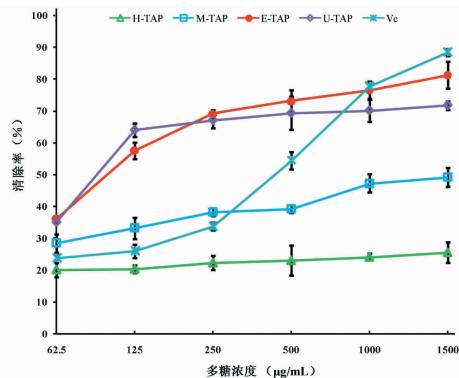


图3 四种多糖的羟自由基清除活性

Fig.3 OH radical scavenging ability of H-TAP, M-TAP, E-TAP and U-TAP

2.5 纤维素酶提取金耳多糖的单因素试验

纤维素酶提取金耳多糖的单因素试验结果见图

4 所示。由图 4a 可以发现,在酶用量为 50 ~ 200 U 时,多糖提取得率随酶用量增加而提高,当酶用量为 200 U 时,提取得率达到最高,超过 200 U 以后,酶用量与多糖提取得率呈负相关。究其原因应该是随着于酶用量的加大,酶活力值越大,会利于多糖的浸出;但酶用量超过大一定程度时,同时会增加被酶催化分解变质的多糖的量。因此,纤维素酶的最佳酶用量为 200 U。

据报道,料液比对多糖提取得率至关重要^[19]。如图 4b 所示,料液比对得率有很大影响,当料液比在 1:60 ~ 1:80 g/mL 范围内,多糖得率由 13.04% 升高到 17.23%,料液比为 1:100 g/mL 时,降为最低。因此,最佳提取料液比选为 1:80 g/mL。

提取溶液的 pH 影响纤维素酶的构象、等电点和活性,因而对多糖的提取得率有显著影响^[20]。如图 4c 所示,当 pH 为 3.5 时,多糖得率达最高值(18.29%),当 pH 由 3.5 升到 6.5 时,多糖得率由最高降为最低(14.06%),考虑到多糖提取溶液的

酸碱度对多糖结构的影响,所以选择 4.5 作为最佳的提取 pH。

研究表明,温度也是影响多糖提取得率的一个重要因素,在一定范围内,温度的提高有助于多糖的溶出^[21],加之纤维素有它本身特定的最佳工作温度。因此,在 25 ~ 65 °C 温度范围内选取了 5 个不同温度点考察了对提取得率的影响。结果如图 4d 所示,当温度在 25 ~ 55 °C 范围内,随着温度升高,多糖得率有明显提高,当 55 °C 时达到最高,而在有 55 °C 升到 65 °C 时,提取得率反而有所下降,推测可能是温度超过 55 °C 时,对酶有灭活或抑制效应。因此,纤维素酶的最佳提取温度为 55 °C。

酶作用时间对金耳多糖得率的影响如图 4e 所示。从 30 min 到 50 min,多糖得率呈现升高趋势,50 min 时达到最高,然后随着时间延长,呈现明显的下降趋势,70 min 时降为最低。因此,最佳作用时间选为 50 min。

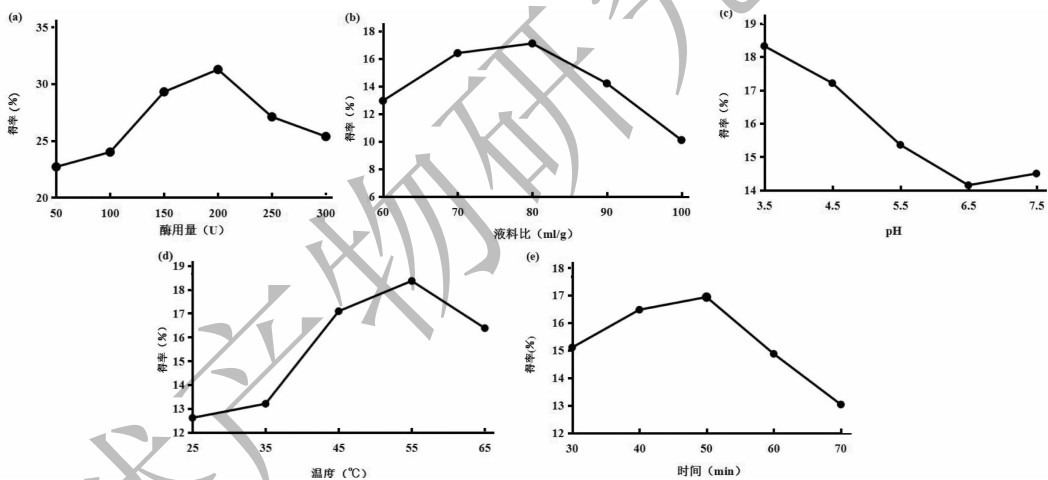


图 4 纤维素酶提取金耳多糖单因素试验结果

Fig. 4 The single-factor result of yields of polysaccharides from *T. aurantialba* by cellulase extraction method

2.6 正交试验结果

正交试验结果及分析见表 4 和表 5。由表 4 得知,金耳多糖的提取得率高低受酶解时间(A)、料液比(B)、酶解温度(C)和反应 pH(D)4 个因素的交叉影响,各因素影响主次次序为:C > D > A > B,即酶解温度 > 反应 pH > 酶解时间 > 料液比。在金耳多糖正交试验所选取因素和水平范围内,因素 C 即酶解反应的 pH 的影响达到了显著水平 ($P < 0.05$),而因素 D、A 和 B 的影响未达到显著水平。由 F 值结果表明,方差分析结果与极差分析结果一

致。因此,纤维素酶法提取金耳多糖的最佳水平组合为 $A_2B_2C_3D_1$,即酶解时间 50 min,料液比 1:80 g/mL,酶解温度 55 °C,反应 pH 4.5。通过验证性试验(3 次重复),在此条件下,金耳多糖的提取得率为 22.68%。

与前面的金耳多糖的 4 种提取方法(即热水浸提法、超声波提取法、纤维素酶提取法和微波提取法)的比较研究中,其中酶法提取率为 44.39% (见表 2),而在本研究中,金耳多糖提取得率仅为 22.68%。究其原因推测应该是所用金耳原料(预处理后

的)的总量不同导致的,前者所用原料为 3 g,后者 仅为 1 g。

表 4 正交试验结果

Table 4 Analysis of $L_9(3^4)$ test results

序号 No.	酶解时间 Ultrasonic time (min) (A)	料液比 Liquid to ratio solid (g/mL) (B)	酶解温度 Enzyme temperature (°C) (C)	反应 pH Reaction pH (D)	多糖得率 Extraction yield (%)
1	1	1	1	1	15.66
2	1	2	2	2	17.09
3	1	3	3	3	17.77
4	2	1	2	3	18.40
5	2	2	3	1	22.45
6	2	3	1	2	14.95
7	3	1	3	2	17.32
8	3	2	1	3	15.29
9	3	3	2	1	18.56
k_1	16.84	17.13	15.30	18.89	
k_2	18.60	18.28	18.02	16.45	
k_3	17.06	17.09	19.18	17.15	
R	1.76	1.184	3.88	2.44	

表 5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of square deviation	自由度 Degree of freedom	F 比 F ratio	显著性 Significant
酶解时间 Ultrasonic time	5.526	2	0.533	
料液比 Liquid to ratio solid	2.724	2	0.263	
酶解温度 Enzyme temperature	23.788	2	2.294	*
反应 pH Reaction pH	9.443	2	0.911	
误差 Error	41.480	8		

3 结论

多糖的提取方法有多种,包括有溶剂提取法、酸提法、碱提法、酶解法、超声法和微波法等^[22]。不同方法制备的多糖的化学结构和生物活性有明显不同^[23]。本研究采用了 4 种方法,即热水浸提法(H-TAP)、超声波提取法(U-TAP)、纤维素酶提取法(E-TAP)、微波提取法(M-TAP),制备了 4 种多糖,并对它们的提取得率、化学结构和抗氧化活性进行了研究和比较。

不同方法制备的金耳多糖的得率和组分各不相同。酶提(E-TAP)和热水浸提(H-TAP)的得率较高,分别为 44.39% 和 41.52%。多糖含量高低顺序为:E-TAP > M-TAP > H-TAP > U-TAP,其中酶提 E-TAP 的多糖含量高达 44.46%,显著高于其他 3 种提取方式。而且,酶提 E-TAP 的糖醛酸含量

(8.38%)最高,而蛋白质含量在 4 种多糖中最低,仅为 0.40%。

4 种多糖的抗氧化活性也有明显不同,从清除羟自由基的能力来看,活性高低顺序为:U-TAP > E-TAP > M-TAP > H-TAP,其中,其中酶提 E-TAP 和超声提 U-TAP 的抗氧化活性较高,并且二者活力相当,它们的 EC_{50} 值分别为 1.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$,明显优于其他两种多糖。

FT-IR 和 HPAEC-PAD 图谱分析结果表明,4 种多糖含有相似的单糖组分(主要组分含量高低顺序均为:D-甘露糖 > D-木糖 > D-葡萄糖),而且均为含有 D-葡萄糖醛酸的酸性多糖,但其摩尔比明显不同。它们的化学结构不同是其药理活性不同的物质基础。

综合考虑金耳多糖得率和抗氧化活性,在 4 种提取方法中,纤维素酶法提取为最佳方法。单因素

试验和正交试验结果表明,纤维素酶法提取金耳多糖的最佳工艺为:酶解时间 50 min,料比 1:80 g/mL,酶解温度 55 ℃,反应 pH4.5。在此条件下,金耳多糖的提取得率为 22.68%。采用纤维素酶提取金耳多糖(E-TAP),所用时间短、制备效率高、条件温和,而且具有较高的抗氧化活性和较高的提取得率。在以后的工作中将对 E-TAP 进行深入研究。

参考文献

- Du XJ, Zhang JS, Lv ZW, et al. Chemical modification of an acidic polysaccharide (TAPA1) from *Tremella aurantialba* and potential biological activities [J]. *Food Chem*, 2014, 142:336-340.
- Zhao XN, Hu YL, Wang DY, et al. The comparison of immune-enhancing activity of sulfated polysaccharides from *Tremella* and *Condonopsis pilosula* [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98:438-443.
- Yuan XL(苑小林), Zhang PD(张培德), Chen SG(陈石根). Preliminary study on chemical properties of A soluble polysaccharide from the mushroom *Tremella aurantia*, and its oncosuppressive activity [J]. *J Fudan Univ* (复旦大学学报), 1996, 35:703-706.
- Kiho T, Kochi M, Usui S, et al. Inakuma T. Antidiabetic effect of an acidic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia* and its degradation product (TAP-H) [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24:1400-1403.
- Wang H(汪虹), Qu WJ(瞿伟菁), Chu SD(褚书地), et al. Studies on the preventive and therapeutic effects of the polysaccharide of *Tremella aurantiabla* Mycelia on diet-induced hyperlipidemia in mice [J]. *Acta Nutrimenta Sinica* (营养学报), 2002, 24:431-432.
- Deng YX, Qu WJ. *In vitro* antioxidant function of extracellular polysaccharides from *Tremella aurantialba* [J]. *Acta Educlis Fungi*, 2007, 14(3):50-52.
- Zhang WJ(张惟杰). Biochemical research techniques of glycoconjugates(糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999:197.
- Zhao ZG(赵子高), Yang Y(杨焱), Liu YF(刘艳芳), et al. Optimum of submerged fermentation parameters for medicinal fungus *Phellinus baumii* [J]. *Microbiol China* (微生物学通报), 2007, 3:459-463.
- Lu P(路苹), Yu TQ(于同泉), Wang SY(王淑英), et al. A review on determination of protein [J]. *J Beijing Agr College* (北京农学院学报), 2006, 21:65-68.
- Liu XH(刘小华), Zhang MX(张美霞), Yu CM(于春梅), et al. The determination of protein in chitosan with coomassie brilliant Blue G-250 [J]. *China Med J Comm* (中国交通医学杂志), 2006, 20:159-160.
- Chen Y, Du XJ, Zhang Y, et al. Ultrasound extraction optimization, structural features, and antioxidant activity of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* [J]. *J Zhejiang Univ-Sci B*, 2017, 18:674-684.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. *Phytochem*, 1989, 28:1057-1060.
- Youl, Yang X, Yan Z, et al. Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection [J]. *Food Chem*, 2009, 112:742-746.
- Wang K, Zhang J, Ping S, et al. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus canadensis*) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155:300-311.
- Jin ZY(金正宇), Gu ZB(顾正彪), Tong QY(童群义), et al. Carbohydrate chemistry(碳水化合物化学) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007:202.
- Du XJ, Zhang Y, Mu HM, et al. Structural elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide (TAPB1) from *Tremella aurantialba* [J]. *Food Hydrocolloid*, 2015, 43:459-464.
- Luo Q, Zhang J, Yan L, et al. Composition and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from *Tuber indicum* [J]. *J Med Food*, 2011, 14:1609-1616.
- Tursun K, Zhan R, Zhang H, et al. Study on antioxidant activity of *Acroptilon repens* [J]. *Lett Biol*, 2010, 21:406-411.
- Huang SQ, Ning ZX. Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47:336-341.
- Liu X, Zhang MS, Guo K. Cellulase-assisted extraction, characterization, and bioactivity of polysaccharides from *Polygonatum odoratum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 75:258-265.
- Hu J, Jia XJ, Fang XB, et al. Ultrasonic extraction, antioxidant and anticancer activities of novel polysaccharides from *Chuanxiong rhizome* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 85:277-284.
- Zhang SJ(张淑杰), Kang YF(康玉凡). Advances in Bioactive Polysaccharides [J]. *Sci Techn Food Ind* (食品工业科技), 2017, 38:379-382.
- Zhao CC, Li X, Miao J, et al. The effect of different extraction techniques on property and bioactivity of polysaccharides from *Dioscorea hemsleyi* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 102:847-856.