

中国被毛孢亚临界水提取多糖结构特征及抗氧化活性

代千千^{1,2,3}, 胡娜^{1,2}, 王洪伦^{1,2}, 丁晨旭^{1,2*}

¹中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室;

²青海省藏药研究重点实验室, 西宁 810008; ³中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 本实验以中国被毛孢菌粉为原料, 通过响应面实验对亚临界水提取中国被毛孢多糖的工艺进行优化, 并对提取的多糖进行结构分析和抗氧化活性研究, 以开发先进的中国被毛孢多糖的提取方法, 从而为中国被毛孢的合理开发和應用提供理论依据。结果表明, 亚临界水提取最佳工艺条件为温度 160 °C、时间 35 min、流速 3.5 mL/min, 此条件下多糖提取率为 18.32%。体外抗氧化活性实验结果表明, 亚临界水提取中国被毛孢多糖具有一定的抗氧化能力。该研究结果表明亚临界水提取是一种潜在的多糖提取方式, 可获得高产率和良好抗氧化能力的中国被毛孢多糖。

关键词: 中国被毛孢; 多糖; 亚临界水提取; 抗氧化; 结构特征

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023) Suppl-0046-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.S.006

Structural characteristic and anti-oxidant activity of polysaccharide from *Hirsutella sinensis* extracted by subcritical water

DAI Qian-qian^{1,2,3}, HU Na^{1,2}, WANG Hong-lun^{1,2}, DING Chen-xu^{1,2*}

¹Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences;

²Key Laboratory of Tibetan Medicine Research of Qinghai Province, Xining 810008, China;

³University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The extraction condition of polysaccharide from *Hirsutella sinensis* by subcritical water was optimized using the response surface experiment. Then, analyze the structure and antioxidant activity of polysaccharide to provide theoretical basis for the rational development and application of *H. sinensis* polysaccharide. The optimal extraction conditions were that the extraction temperature was 160 °C, the time was 35 min and the extraction flow rate was 3.5 mL/min, and the extraction rate of polysaccharide was up to 18.32%. The study on antioxidant revealed that the polysaccharide had certain antioxidant activity. The results indicate that subcritical water extraction was a potential method to extract polysaccharides from *H. sinensis* with high yield and good antioxidant capacity.

Key words: *Hirsutella sinensis*; polysaccharide; subcritical water extraction; anti-oxidant; structural characteristics

冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*) 是指麦角菌目线虫草科 (*Ophiocordycipitaceae*) 冬虫夏草菌侵染蝙蝠蛾科 (*Hepialidae*) 昆虫越冬幼虫形成的真菌子座和充满菌核的幼虫尸体所构成的虫菌复合体^[1,2]。天然冬虫夏草与人参、鹿茸并称为“中药三大宝”^[3], 用药历史悠久, 主要分布于青藏高原、云贵高原等高海拔地区^[4]。天然冬虫夏草寄主单一^[5], 生长环境特殊^[6,7], 导致其资源稀缺, 价格昂

贵。为有效保护冬虫夏草野生资源, 从上个世纪 80 年代起, 我国研究人员陆续从天然冬虫夏草中分离到多种内寄生菌^[8-10], 其中中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 已被证实是冬虫夏草的无性型^[10-12]。中国被毛孢经深层发酵获得的菌丝体, 在化学成分、药理活性方面与冬虫夏草基本一致^[13-15], 以发酵菌丝体为原料制成的百令胶囊被收载于《中国药典》, 并且因其发酵成本低、条件易于控制, 利于产业化^[7], 已逐渐成为冬虫夏草的替代品。现代药理学研究表明, 中国被毛孢多糖是中国被毛孢的关键药效成分之一^[16], 具有抗氧化^[17]、抗肿瘤^[18,19]、调节免疫^[20]

等多种药理作用。

为了进一步开发和应用虫草多糖资源,开发一种有效的提取方法至关重要。亚临界水由于其均匀、高效、省时、保持有效成分活性等优点有望成为一种主要的工业提取方法^[21]。亚临界水提取是指水在温度在 100 ~ 374 °C 范围内时,通过改变压力仍保持液态,其介电常数、密度、粘度、扩散率、表面张力等性质均发生变化^[22],从而提高提取物的传质效率,保持其生物活性,具有很好的应用前景,被广泛地应用于多糖^[23,24]、多酚^[25]、精油^[26]、植物蛋白等天然产物的提取。Liu 等^[27]利用亚临界提取技术优化了红枣多糖的提取,粗多糖提取率为 7.9%,纯化组分在抗氧化方面有良好的表现;Ti 等^[28]探讨了亚临界水提取温度对黄花菜多糖生物活性的影响,发现 160 °C 提取的多糖有良好的自由基清除能力及胰脂肪酶抑制作用。然而关于中国被毛孢多糖提取集中在热水^[29]、超声^[30]、微波^[31]等方面,亚临界水提取的相关研究较少。与天然冬虫夏草为原料相比,以中国被毛孢为原料制备多糖能够提高多糖的产量,经济、高效、绿色环保,能够实现连续化生产。

因此,本试验以中国被毛孢菌粉为原料,通过亚临界提取装置应用三水平三因素的 Box-Behnken 实验设计对中国被毛孢多糖的提取工艺进行优化,利用软件 Design expert 进行数据的模型拟合,利用方差分析(ANOVA)研究各因素及相互项对响应值的影响,最后优化得到最佳提取条件,以开发先进的中国被毛孢多糖的提取方法。对提取的多糖进行结构分析和抗氧化活性研究,从而为中国被毛孢多糖的合理开发和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

中国被毛孢菌粉(*Hirsutella sinensis*):杭州众芝康菇生物技术有限公司,中国被毛孢菌粉液体发酵菌种由中国工业微生物菌种保藏管理中心鉴定为中国被毛孢,检测报告编号为 21-387-890-1635 号。无水乙醇、葡萄糖、苯酚、硫酸、三氟乙酸、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)(试剂纯,国药集团化学试剂有限公司);单糖对照品甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖(纯度大于 97%,中国食品药品检定研究院);FRAP 法总抗氧化能力检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,S0116)。

1.2 仪器设备

紫外分光光度计(Cary 300,美国 Aglient 公司);高效液相色谱仪(1260,美国 Aglient 公司);UPH-II-100L 超纯水制造系统(成都优普科技有限公司);亚临界提取装置:输液系统:液相色谱输液泵(LC-20AT,岛津,日本京都);加热系统:气相色谱柱烘箱(GC-14B,上海科创色谱仪器),不锈钢盘管预热器(内径 0.3 mm,长度 2.0 m);压力系统:背压调节器(TECOM,美国明尼苏达州);SS-0006WT-B-P 型微通道换热器(杭州盛世杭州节能科技有限公司);萃取系统:100 cm³ 不锈钢提取装置(内径 2.0 cm,长 8.0 cm)。

1.3 实验方法

1.3.1 多糖样品制备

1.3.1.1 中国被毛孢菌粉多糖的亚临界水提取法

准确称取 1.00 g 菌粉,采用亚临界水设备萃取,萃取完成后,用冷水快速冷却萃取液。萃取液 4 000 r/min 离心 10 min,去除沉淀,上清浓缩至一定体积,加入 4 倍体积的无水乙醇,于 4 °C 静置 12 h 后,4 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,冷冻干燥,得粗多糖,通过苯酚硫酸法测定多糖得率。

1.3.1.2 传统热水浸提法

采用热水浸提获得中国被毛孢菌粉多糖,提取条件为料液比 20:1,提取温度为 90 °C,提取时间为 2 h,低速磁力搅拌,重复两次,提取物的后续处理步骤同亚临界水提取法。

1.3.2 多糖含量的测定

1.3.2.1 标准曲线的绘制

采用苯酚硫酸法绘制葡萄糖标准曲线,具体操作如下:将葡萄糖在 105 °C 的烘箱中干燥至恒重。配置 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液,精密量取 0.00、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80、1.00 mL,分别置于具塞试管中,加蒸馏水补充至 2 mL,再分别加入 5% 苯酚 0.5 mL、2.5 mL 浓硫酸,迅速混匀室温静置 30 min 后,自来水冷却 10 min,用紫外分光光度计测定波长 490 nm 处的吸光值。以葡萄糖质量浓度为横坐标,490 nm 处吸光度值为纵坐标,得回归曲线方程 $y = 0.0184x + 0.0053$, $R^2 = 0.9984$,在 0 ~ 50 μg/mL 范围内线性关系良好,如图 1 所示。

1.3.2.2 中国被毛孢多糖含量的测定

将“1.3.1”获得的粗多糖样品于 60 °C 水复溶,离心去除不溶物,稀释至一定浓度,按照标准曲线加

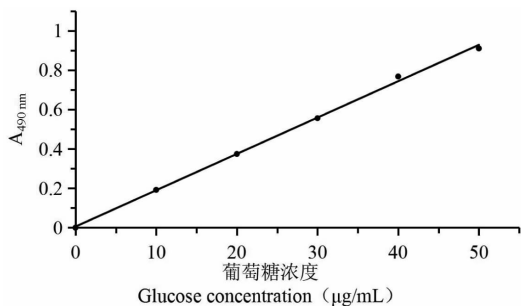


图1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Glucose standard curve

样步骤进行测定,多糖得率计算见公式(1)。

$$\text{多糖得率} = \frac{C \times V \times N}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C :以标准曲线计算出的葡萄糖浓度(mg/mL); V :粗多糖复溶体积(mL); N :稀释倍数; W :粗多糖样品质量(mg)。

1.3.3 响应面实验设计

根据文献调研以及前期预实验结果,选取亚临界温度、时间、流速为考察因素,以菌粉多糖得率为响应值进行 Box-Behnken 组合方法的 3 因素 3 水平响应面正交试验设计,评估温度、时间、流速对多糖得率的影响,并确定菌粉多糖亚临界水提取的最优工艺参数,因素与水平设计见表 1。

表1 响应面实验设计因素与水平表

Table 1 Factors and levels of response surface design

水平 Level	因素 Factor		
	A 温度 Temperature (°C)	B 时间 Time (min)	C 流速 Velocity of flow (mL/min)
-1	130	25	1
0	160	40	3
1	190	55	5

1.3.4 红外光谱分析

参照 Li 等^[32]的方法,利用傅里叶红外光谱仪对多糖样品的红外光谱进行采集。KBr 压片,在 4 000 ~ 450 cm^{-1} 的频率范围内测量记录,扫描次数为 32 次,分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.3.5 分子量分析

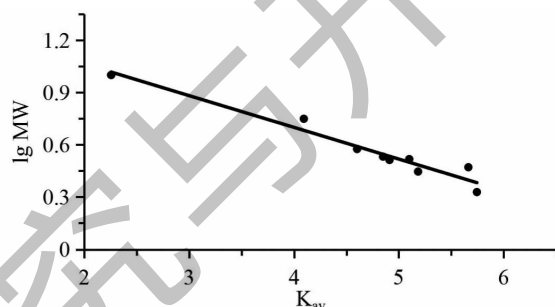
分子量测定标准曲线绘制:精确称取 2 000、500、461、153 和 81.6 kDa 的多糖分子量标准品各 5 mg,以 1 mL 超纯水溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜后上样至 Shimadzu 高效液相色谱系统(LC-10ATvp 泵,

RID-10A 检测器和 TSKgel G4000PWXL 色谱柱)。流动相为 0.15 mol/L NaCl,流速为 0.6 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 20 μL 。以标准品分子量(Molecular weight, MW)的对数 lg MW 为纵坐标,以有效分配系数(K_{av})为横坐标,绘制标准曲线。

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

式中: V_e :洗脱体积; V_t :凝胶柱床总体积, $V_t = 11.5326$ mL; V_0 :外水体积, $V_0 = 6.1668$ mL。

标准曲线见图 2,回归方程为 $\lg MW = -0.01819K_{av} + 1.4273$, $R^2 = 0.9491$ 。

图2 TSKgel G4000PW_{XL} 色谱柱分子量标准曲线Fig. 2 Molecular weight standard curve of TSKgel G4000PW_{XL} chromatography column

样品分子量测定:将样品配置为 5 mg/mL 的溶液,通过 HPSEC-MALS-RID 进行分析,利用保留时间代入标准曲线公式计算多糖分子量分布范围。

1.3.6 单糖组成分析

采用 PMP 柱前衍生法^[33],以高效液相色谱仪分析样品的单糖组成,与混合单糖标准品对照。样品酸水解:准确称取 10 mg 多糖样品,加入 2 mol/L 的三氟乙酸 5 mL,120 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 2 h,加入甲醇反复浓缩除去 TFA,以蒸馏水溶解得样品多糖水解液。标品及样品的 PMP 衍生:单糖标准品混合溶液和样品多糖水解溶液各取 0.5 mL,加入 0.5 mL 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液、0.5 mL 0.3 mol/L NaOH 溶液,混合后 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴衍生 30 min,冷却至室温加入 0.5 mL 0.3 mol/L HCl 溶液混合,以 1 mL 氯仿萃取,重复三次以去除多余衍生试剂 PMP,水相过 0.22 μm 滤膜进行液相分析。

色谱条件:色谱柱为 Kromasil C₁₈ (4.6 nm × 250 nm, 5 μm),流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液-乙腈 (84:16),流速 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 245 nm。

1.3.7 化学组成分析

糖含量:采用苯酚硫酸法,具体操作同“1.3.2.2”。

蛋白含量:采用考马斯亮蓝法测定多糖样品蛋白含量。在96孔板中分别加入0.5 mg/mL BSA标准液1.25、2.50、3.75、5.00、6.25、7.50 μ L,再用PBS补充使每孔液体体积为10 μ L,空白孔只加生理盐水10 μ L,慢慢摇匀后,分别各加考马斯亮蓝显色液200 μ L摇匀,室温放置5 min后,在酶联免疫测定仪600 nm直接测定吸光度。将各自测定的结果再作直线回归,并作图。样品配置为10 mg/mL溶液,测定时稀释至合适浓度,按照标准曲线测定方法操作,根据标准曲线计算含量。标准曲线见图3,回归方程为 $y=0.0726x+0.6699$,在0~10 μ g之间线性良好。

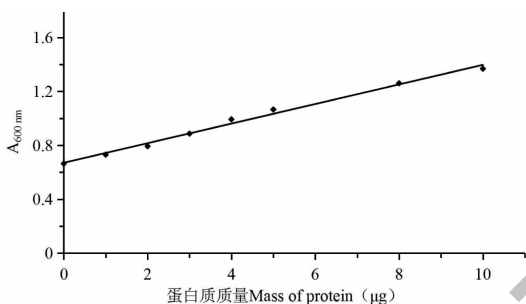


图3 蛋白质含量标准曲线

Fig. 3 Protein content standard curve

糖醛酸含量:采用间羟基联苯法测定糖醛酸含量。取0.1 mg/mL D-半乳糖醛酸0.0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.3、0.4 mL,纯水补充至0.4 mL,加入40 μ L 4 mol/L氨基磺酸,摇匀后加入2.5 mL浓硫酸,沸水浴20 min后冰水冷却至室温,加入40 μ L 0.3%间羟基联苯/0.5%氢氧化钠,静置15 min后于525 nm测定吸光值。以吸光值为纵坐标,半乳糖醛酸质量为横坐标绘制标准曲线。样品配置为10 mg/mL溶液,测定时稀释至合适浓度,按照标准

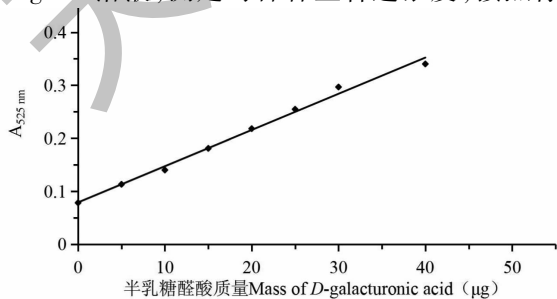


图4 D-半乳糖醛酸标准曲线

Fig. 4 D-Galacturonic acid standard curve

曲线测定方法操作,根据标准曲线计算含量。标准曲线如图4,回归方程为 $y=0.0068x+0.0789$, $R^2=0.9934$,在0~40 μ g之间线性关系良好。

1.3.8 抗氧化活性

1.3.8.1 铁离子还原抗氧化能力 (ferric reducing antioxidant potential, FRAP)

利用FRAP法原理测定总抗氧化能力^[34],依据总抗氧化能力检测试剂盒(FRAP法)使用说明书,在96孔板中检测孔中分别加入5 μ L不同浓度(0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 mmol/L)的硫酸亚铁(FeSO_4)标准溶液和不同浓度(1、2、3、4、5、8、10 mg/mL)的多糖溶液,加入180 μ L的FRAP工作液,振荡混匀器37 $^{\circ}$ C下反应5 min,在593 nm处测定吸光度值。根据不同浓度 FeSO_4 的吸光度建立标准曲线,多糖溶液的总还原力用 FeSO_4 标准溶液的浓度表示。

1.3.8.2 DPPH 自由基清除能力

参照Yang^[35]的方法并加以修改,1、2、3、4、5、8、10 mg/mL的多糖溶液分别取100 μ L样品溶液加入100 μ L 0.2 mmol/L的DPPH-乙醇溶液1.0 mL,避光孵育30 min后,酶标仪测定517 nm处吸光度,计算DPPH自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 :为1 mL水与1 mL DPPH-乙醇溶液的吸光度; A_1 :1 mL多糖溶液与1 mL DPPH-乙醇溶液的吸光度(mL); A_2 :1 mL多糖溶液与1 mL乙醇溶液的吸光度。

2 结果与分析

2.1 中国被毛袍多糖亚临界水提取工艺优化结果

2.1.1 Box-Behnken 响应面实验结果

采用Box-Behnken组合方法对中国被毛袍多糖提取工艺进行响应面设计,响应面实验方案及结果见表2。

2.1.2 数学模型建立与数据分析

利用软件Design expert对数据进行模型的拟合分析,以温度(A)、时间(B)及流速(C)为自变量,多糖提取率为因变量(响应值Y),得到回归方程: $Y=17.38+0.28A+1.14B+0.43C+1.0 \times 10^{-3}AB+0.48AC+0.25BC-1.04A^2-0.34B^2-1.66C^2$, $R^2=0.9777$

对回归模型方差分析及模型系数进行检验,结果见表3,该模型的P值<0.01,说明模型极显著;

表2 实验设计和结果

Table 2 Experimental design arrangement and results

运行序 Run	因素 Factor			得率 Yield (%)
	A(°C)	B(min)	C(mL/min)	
1	130	25	3	15.48
2	190	25	3	15.69
3	160	25	1	14.72
4	160	25	5	15.58
5	190	40	1	14.9
6	160	40	3	17.88
7	130	40	5	15.11
8	160	40	3	18.07
9	190	40	5	16.96
10	160	40	3	18.21
11	160	40	3	18.57
12	130	40	1	14.96
13	160	40	3	18.18
14	160	55	5	17.56
15	130	55	3	17.08
16	190	55	3	17.29
17	160	55	1	15.19

失拟项 P 值 > 0.05 , 说明未知因素对该实验结果影响较小; $R^2 = 0.9777$, $R^2_{adj} = 0.9491$, 说明该模型与实际实验值有较好拟合度和较高可靠性, 可以解释 94.91% 的响应值变化; 变异系数 C. V. % = 1.90, 低数值说明实验值可靠。信噪比为 14.865, 说明模型精度很高。该模型拟合程度较好、可信度高, 可以利用该模型对亚临界法提取法进行预测。方差分析结果中, 一次项 A 、 B 、 C 对多糖得率有极显著影响 ($P < 0.01$), 交互项 AC 、 BC 对多糖得率有显著影响 ($P < 0.05$), 二次型 A^2 、 B^2 、 C^2 对多糖得率有极显著影响; 且由 F 值知, 三个因素对多糖得率的影响: B -时间 $> C$ -流速 $> A$ -温度。

2.1.3 响应面三维图分析

因素间相互作用响应面图及等高图结果见图 5。图 5A 为流速在中心水平时, 温度和时间对多糖提取率的影响, 多糖提取率随时间的增加呈现逐渐增加的趋势, 随温度的增加先增加后减少, 温度、时间交互的等高线接近圆形, 三维曲面较为平坦, 说明时间、温度之间的交互作用较小; 图 5B 中, 多糖提取率随温度、流速的增加都是呈先增加后减少的趋势, 等高线为椭圆形, 结合表 3 结果说明两者有交互作用并且交互作用显著; 图 5C 中, 多糖提取率随时间逐渐增加, 随流速的增加先增加后减少, 等高线呈椭圆形, 且表 3 说明两者间交互作用显著。

表3 回归模型方差分析表

Table 3 Analysis of variance for the regression model

方差来源 Source of variance	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean of square	F	P
模型 Model	9	30.25	3	34.13	< 0.0001
A	1	0.61	3	3.29	0.1124
B	1	5.38	3	54.64	0.0002
C	1	0.77	5	7.81	0.0267
AB	1	9×10^{-6}	5	9.14×10^{-5}	0.9926
AC	1	0.91	1	9.20	0.0190
BC	1	0.57	3	5.79	0.0471
A^2	1	4.54	3	46.01	0.0003
B^2	1	2.42	5	24.56	0.0016
C^2	1	11.66	3	118.44	< 0.0001
残差 Residual	7	0.69	3	-	-
失拟项 Lack of fit	3	0.43	5	2.27	0.2223
纯误差 Pure error	4	0.25	1	-	-
总离差 Cor total	16	30.94	-	-	-

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

Note: $P < 0.05$, significant difference; $P < 0.01$, extremely significant difference.

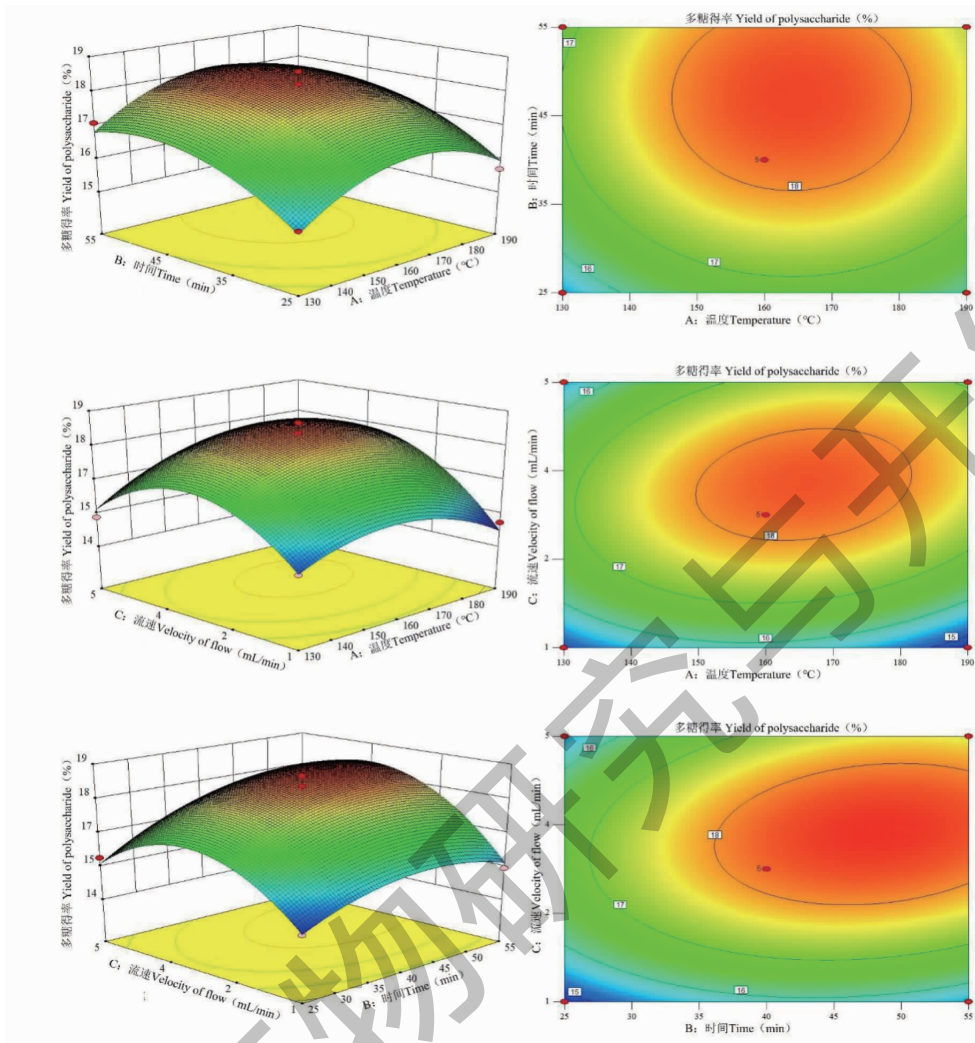


图5 因素间相互作用响应面图与等高线图

Fig. 5 Response surface and contour plots of interactions among factors

2.2 亚临界水提取的最佳条件验证分析以及和热水提取的比较

经过模型拟合得到中国被毛孢最佳工艺条件为温度 166.04 °C、时间 35.39 min、流速 3.59 mL/min,此条件下多糖提取率理论预测值为 18.5%。考虑到实际操作,将提取条件修改为提取温度 160 °C、时间 35 min,流速 3.5 mL/min,此条件下多糖得率为 $(18.32 \pm 0.08)\%$,与预测值接近,表明该模型

较为可靠,具有一定的实际应用价值。

亚临界水提取和热水提取条件和提取得率的比较如表4,提取总时间缩短了 3.4 h,提取率提高了 1.04%,可归因于两个因素:首先,相较于水而言,亚临界水具有较低的介电常数、较低的粘度和较高的电离常数。这些性质导致多糖在亚临界水中更好的溶解性;其次,亚临界提取的高温、高压提升了质量传递效率,使得多糖更易释放和扩散到溶剂中。

表4 亚临界水提取法和热水提取法的比较

Table 4 Comparison of subcritical water extraction and hot water extraction

提取方式 Extraction method	温度 Temperature(°C)	时间 Time(min)	多糖得率 Yield of polysaccharide(%)
热水 Hot water	90	240	17.28
亚临界水 Subcritical water	160	35	18.32

2.3 多糖的红外光谱

中国被毛孢的亚临界水提取及热水提取多糖的 FT-IR 光谱结果见图 6, 主要特征吸收峰归属, 3 297 ~ 3 327 cm^{-1} 处强而宽的吸收峰为 O-H 键伸缩振动峰, 多糖特征峰; 2 927 cm^{-1} 处较弱的吸收峰为多糖中 C-H 键伸缩和弯曲振动峰; 1 637 ~ 1 644 cm^{-1} 处吸收峰为糖醛酸 C = O 的伸缩振动; 1 015 ~ 1 016 cm^{-1} 的吸收峰表明多糖中存在吡喃糖环; 846 ~ 850 cm^{-1} 处的吸收峰表明多糖中存在 α 构型的单糖残基, 两种提取方式的多糖 FT-IR 光谱图未见明显区别, 说明亚临界水提取对多糖的糖苷键构型未产生影响。

2.4 多糖的分子量分析

通过高效凝胶渗透色谱分析可知, 洗脱体积 $V_e = 9.9798 \text{ mL}$, 经计算样品多糖平均分子量为 8 565.57 Da。

2.5 单糖组成

采用高效液相色谱法对亚临界提取中国被毛孢

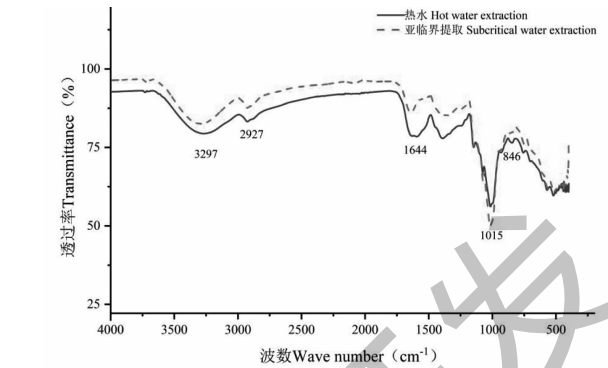


图 6 亚临界水提取和热水提取多糖的红外光谱图
Fig. 6 FT-IR spectrum of polysaccharide extracted by subcritical water and hot water

单糖组成进行测定, 与混合单糖标准品对照, 结果见图 7。亚临界提取中国被毛孢由甘露糖 (16.89%)、鼠李糖 (3.09%)、葡萄糖醛酸 (2.09%)、半乳糖醛酸 (5.15%)、葡萄糖 (54.06%)、半乳糖 (12.65%)、木糖 (3.22%)、阿拉伯糖 (2.04%) 组成。

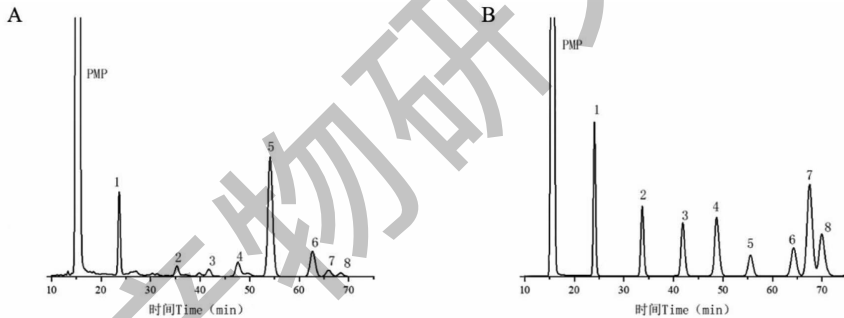


图 7 单糖混合对照品 (A) 及多糖 (B) PMP 衍生物的 HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of PMP derivatives of monosaccharide and polysaccharide

注: 1 半乳糖; 2 鼠李糖; 3 葡萄糖醛酸; 4 半乳糖醛酸; 5 葡萄糖; 6 半乳糖; 7 木糖; 8 阿拉伯糖。Note: 1 Gal; 2 Rha; 3 Glc UA; 4 Gal UA; 5 Glc; 6 Gal; 7 Xyl; 8 Ara.

2.6 化学组成分析

考马斯亮蓝法测得亚临界水提取中国被毛孢粗多糖蛋白含量为 $(4.09 \pm 0.14)\%$, 间羟基联苯法测得糖醛酸含量为 $(1.68 \pm 0.05)\%$ 。

2.7 抗氧化

2.7.1 铁离子还原/抗氧化能力

通过 FRAP 法测定 FeSO_4 线性回归方程为 $y = 0.2938x + 0.00609$, $R^2 = 0.9997$, 说明在测定的浓度范围内, 标准曲线线性关系较好。由图 8 可知, 在 1 ~ 5 mg/mL 内, 多糖样品的铁离子还原/抗氧化能力呈剂量依赖性, 随着质量浓度增加而增加, 由公式

求得, 其 OD 值对应的硫酸亚铁标准溶液浓度为

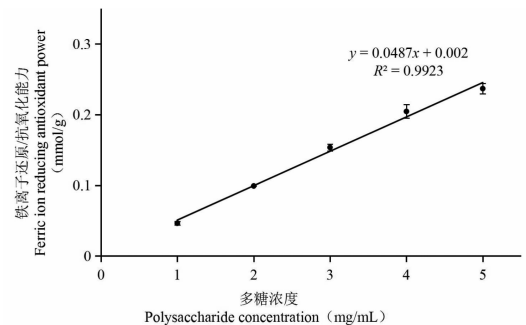


图 8 中国被毛孢粗多糖铁离子还原能力

Fig. 8 Ferric ion reducing antioxidant power of *H. sinensis* crude polysaccharide

0.048 9 mmol/L,即中国被毛孢亚临界水提取粗多糖还原/抗氧化能力为0.048 9 mmol/L(以 FeSO_4 的当量浓度表示)。

2.7.2 DPPH 自由基清除能力

由图 9 可知,在 1 ~ 10 mg/mL 内,多糖样品的 DPPH 自由基清除能力随着质量浓度增加而增加。当浓度 10 mg/mL 时,自由基清除率达 $(81.09 \pm 5.10)\%$ 。

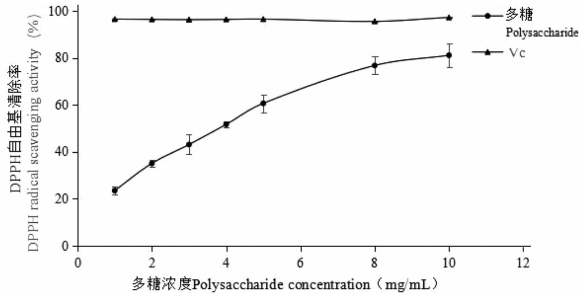


图 9 中国被毛孢粗多糖 DPPH 自由基清除能力

Fig. 9 The DPPH radical scavenging activity of *H. sinensis* crude polysaccharide

3 结论

本文使用 Design-Expert 软件,应用响应面法优化中国被毛孢的亚临界水提取工艺,根据 Box-Behnken 组合原理对亚临界提取温度(A)、时间(B)、流速(C)3个因素进一步优化,得到中国被毛孢多糖的最佳亚临界水提取条件为温度 160 °C、时间 35 min、流速 3.5 mL/min,此条件下多糖提取率为 $(18.32 \pm 0.08)\%$,与理论预测值接近,说明拟合模型可以对中国被毛孢多糖的亚临界水提取进行预测和分析,采用响应面优化多糖提取工艺具有可行性。亚临界提取和热水提取获得的粗多糖的红外光谱扫描结果显示在 $4000 \sim 450 \text{ cm}^{-1}$ 内并未有明显差异,说明亚临界提取对多糖的糖苷键结构未产生影响。体外抗氧化活性实验结果表明,亚临界水提取中国被毛孢多糖具有一定的还原能力。该研究结果表明亚临界水提取是一种潜在的多糖提取方式,可获得高产率和良好抗氧化能力的中国被毛孢多糖。

参考文献

- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi [J]. *Stud Mycol*, 2007, 57: 5-59.
- Li SP, Yang FQ, Tsim KWK. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine [J]. *J Pharm*

- Biom Anal*, 2006, 41: 1571-1584.
- Lo HC, Hsieh C, Lin FY, et al. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in DongChongXiaCao (Dōng Chóng Xià Cǎo) and related bioactive ingredients [J]. *J Tradit Complement Med*, 2013, 3: 16-32.
- Li Y, Wang XL, Jiao L, et al. A survey of the geographic distribution of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *J Microbiol*, 2011, 49: 913-919.
- Qiu XH, Cao L, Han RC. The progress, issues and perspectives in the research of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *J Environ Entomol (环境昆虫学报)*, 2016, 38: 1-23.
- Dong CH, Yao YJ. On the reliability of fungal materials used in studies on *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 38: 1027-1035.
- Han RC, Wu H, Tao HP, et al. Research on Chinese cordyceps during the past 70 years in China [J]. *Chin J Appl Entomol (应用昆虫学报)*, 2019, 56: 849-883.
- Guo MY, Liu Y, Gao YH, et al. Identification and bioactive potential of endogenous fungi isolated from medicinal caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* from Tibetan Plateau [J]. *Int J Agric Biol*, 2017, 19: 307-313.
- Zhang YJ, Sun BD, Zhang S, et al. Mycobacterial investigation of natural *Ophiocordyceps sinensis* based on culture-dependent investigation [J]. *Mycosystema (菌物学报)*, 2010, 29: 518-527.
- Jiang Y, Yao YJ. Anamorphic fungi related to *Cordyceps sinensis* [J]. *Mycosystema (菌物系统)*, 2003, 22: 161-176.
- Liu XJ, Guo YL, Yu YX, et al. Isolation and identification of the anamorphic state of *Cordyceps sinensis* (Berk.) SACC. [J]. *Acta Mycol Sin (真菌学报)*, 1989, 8: 35-40.
- Li ZZ, Huang B, Li CR, et al. Molecular evidence for anamorph determination of *Cordyceps sinensis* (Berk.) SACC. I. Relation between *Hirsutella sinensis* and *C. sinensis* [J]. *Mycosystema (菌物系统)*, 2000, 19: 60-64.
- Wang JQ. Characterization of chemical composition and polysaccharide structure from natural *Cordyceps sinensis* and cultured mycelium [D]. Nanchang: Nanchang University (南昌大学), 2017.
- Yao SW, Li Y, Chen LH. Pharmacodynamic differences in the literature research of *Cordyceps sinensis* and its fermented mycelium [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2015, 26: 294-298.
- Fang MS. The study on the therapeutic effect and mechanism of *Hirsutella sinensis* mycelium on the model of heart failure [D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2021.
- Yuan QH, Fan Xie, Jing Tan, et al. Extraction, structure and

- pharmacological effects of the polysaccharides from *Cordyceps sinensis*; a review [J]. J Funct Foods, 2022, 89: 104909.
- 17 Meng L, Sun SS, Li R, et al. Antioxidant activity of polysaccharides produced by *Hirsutella* sp. and relation with their chemical characteristics [J]. Carbohydr Polym, 2015, 117: 452-457.
- 18 Qi WC, Zhou XT, Wang JQ, et al. *Cordyceps sinensis* polysaccharide inhibits colon cancer cells growth by inducing apoptosis and autophagy flux blockage via mTOR signaling [J]. Carbohydr Polym, 2020, 237: 116113.
- 19 Liu WB, Xie F, Sun HQ, et al. Anti-tumor effect of polysaccharide from *Hirsutella sinensis* on human non-small cell lung cancer and nude mice through intrinsic mitochondrial pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 99: 258-264.
- 20 Rong L, Li GQ, Zhang YX, et al. Structure and immunomodulatory activity of a water-soluble α -glucan from *Hirsutella sinensis* mycelia [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 189: 857-868.
- 21 Basak S, Annapure US. The potential of subcritical water as a "green" method for the extraction and modification of pectin; a critical review [J]. Food Research International, 2022, 161: 111849.
- 22 Toor SS, Rosendahl L, Rudolf A. Hydrothermal liquefaction of biomass; a review of subcritical water technologies [J]. Energy, 2011, 36: 2328-2342.
- 23 Ti YR, Wang WZ, Zhang YL, et al. Polysaccharide from *Hemerocallis citrina* Borani by subcritical water; bioactivity, purification, characterization, and anti-diabetic effects in T2DM rats [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 215: 169-183.
- 24 Trigueros E, Alonso-Riaño P, Ramos C, et al. Kinetic study of the semi-continuous extraction/hydrolysis of the protein and polysaccharide fraction of the industrial solid residue from red macroalgae by subcritical water [J]. J Environ Chem Eng, 2021, 9: 106768.
- 25 Gan A, Baroutian S. Subcritical water extraction for recovery of phenolics and fucoidan from New Zealand Wakame (*Undaria pinnatifida*) seaweed [J]. J Supercrit Fluids, 2022, 190: 105732.
- 26 Halim NAA, Abidin ZZ, Siajam SI, et al. Optimization studies and compositional analysis of subcritical water extraction of essential oil from *Citrus hystrix* DC. leaves [J]. J Supercrit Fluids, 2021, 178: 105384.
- 27 Liu XX, Liu HM, Yan YY, et al. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides extracted from jube using subcritical water [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 117: 108645.
- 28 Ti YR, Wang WZ, Zhang YL, et al. Polysaccharide from *Hemerocallis citrina* Borani by subcritical water; bioactivity, purification, characterization, and anti-diabetic effects in T2DM rats [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 215: 169-183.
- 29 Liu JH, Li FQ, Jia DR, et al. Research on extraction, purification and physicochemical properties of mycelia polysaccharides of *Hirsutella sinensis* [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2014, 40: 222-226.
- 30 Liu ZY, Du J, Wang Y, et al. Study on optimization of ultrasound assisted extraction technology of polysaccharides in *Cordyceps sinensis* by response surface method [J]. Mod Food (现代食品), 2016, 22: 111-117.
- 31 Zha Y, Zhang ZH, Li XZ, et al. Optimization of polysaccharide extraction of *Ophiocordyceps sinensis* mycelium by plackett-burman design combined with box-behnken response surface methodology [J]. Edible Fungi of China (中国食用菌), 2020, 39: 25-31.
- 32 Li D, Li PP, Luan ZJ, et al. Discriminant analysis by MIR spectroscopy on different parts of Tibetan medicine *Meconopsis quintuplinervia* regel [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 805-812.
- 33 Wei YF, Song H, Zong YX, et al. Study on the content, monosaccharide composition and antioxidant activity of the *Sibiraea angustata* polysaccharides precipitated by gradient ethanol [J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志), 2018, 33: 489-493.
- 34 Wang BS, Huang HY, Tan WH, et al. Ultra-high pressure assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharide from *Moringa oleifera* seeds [J]. Chin J Trop Crops (热带作物学报), 2022, 43: 2132-2138.
- 35 Yang JA, Zhang C, Wen YB, et al. Antioxidant activity of different molecular modified products of polysaccharide from *Camellia oleifera* seed meal [J]. China Oils Fats (中国油脂), 2022, 47: 143-148.