

# 井冈山黑木耳多糖的制备及结构分析

孙永敢, 鄢为唯, 聂少平, 胡婕伦

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

**摘要:** 本研究以江西井冈山黑木耳为原料提取制备黑木耳多糖 (*Auricularia auricular* polysaccharide, AAP), 对其提取工艺进行探讨并对其结构进行分析。通过比较超声法、纤维素酶法、超声协同纤维素酶法、超声协同纤维素酶及胰蛋白酶四种不同提取工艺制得的黑木耳粗多糖的含量及得率确定最优提取方法。结果表明, 超声协同纤维素酶法制得的黑木耳粗多糖多糖含量最高 (85.93%), 得率为 1.55%; 以该法提取取得的多糖为研究对象, 经脱蛋白、脱色及醇沉处理, 在异丙醇体积分数为 20%及 60%时得到两种黑木耳分级精多糖 (AAP3-20、AAP3-60), AAP3-20 单糖组成分析只检出葡萄糖 (77.82%); AAP3-60 单糖组成相对复杂主要是甘露糖 (51.91%)、木糖 (43.62%) 及少量的葡萄糖和半乳糖。甲基化结果表明, AAP3-20 和 AAP3-60 的支化度分别为 73.1%和 27.4%, AAP-60 在  $669\text{ cm}^{-1}$  处存在吸收峰, 表明该多糖可能为一种  $\beta$ -吡喃多糖。本研究可为探讨黑木耳多糖精细结构以及产品开发提供理论依据。

**关键词:** 黑木耳多糖; 提取; 结构分析; 甲基化

文章编号: 1673-9078(2018)03-39-45

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.006

## Preparation and Structure Analysis of *Auricularia auricular* Polysaccharide from Jinggang Mountains

SUN Yong-gan, YAN Wei-wei, NIE Shao-ping, HU Jie-lun

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** The polysaccharides of *Auricularia auricular* (AAP) sampled from Jinggang mountains, Jiangxi province, was extracted and structural identified. The optimal extraction method was established by comparing the content and yield of crude AAP by 4 different extraction methods, including ultrasound, cellulase, ultrasound synergistic cellulase, ultrasound synergistic cellulase and trypsin. The results showed that the content of AAP extracted by ultrasound synergistic cellulase method was the highest (85.93%), and the yield was 1.55%. Two kinds of *A. auricular* polysaccharides, named AAP3-20 and AAP3-60, were obtained when the volume fraction of isopropanol was 20% and 60%, respectively, after deproteinization, decoloration and alcohol precipitation. Monosaccharide analysis suggested that the monosaccharide composition of AAP3-20 was only glucose (77%) and the AAP3-60 was composed of mannose (51.91%), xylose (43.62%) and a small amount of glucose and galactose. Methylation analysis showed that the branching degree of AAP3-20 and AAP3-60 were 73.1% and 27.4%, respectively, and AAP-60 had an absorption peak at  $669\text{ cm}^{-1}$ , indicating that the polysaccharide might be in the form of  $\beta$ -pyran ring. This research could provide a theoretical basis for investigate the fine-structure of AAP and the development of related products.

**Key words:** *Auricularia auricular* polysaccharide; extraction; structure analysis; methylation

黑木耳 (*Auricularia auricular*) 属真菌界、真菌门、子菌纲、木耳目、木耳科、木耳属<sup>[1,2]</sup>, 又称木耳、云耳<sup>[3]</sup>。子实体群生或丛生, 胶质体, 浅圆盘形、耳状或不规则形状, 直径为 2~12 cm<sup>[4]</sup>。根据《食物成分表》中的记载, 每 100 g 黑木耳干品含有蛋白质约 10 g,

收稿日期: 2017-10-11

基金项目: 国家重点研发计划资助 (2017YFD0400203); 江西省优势科技创新团队建设计划项目 (20165BCB19001); 食品科学与技术国家重点实验室目标导向项目 (SKLF-ZZA-201611)

作者简介: 孙永敢 (1993-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品营养  
通讯作者: 胡婕伦 (1988-), 女, 博士研究生, 副研究员, 研究方向: 食品营养

与肉类相当, 远高于蔬菜, 且吸收率也远高于肉类; 高纤维、高糖、低脂; 含铁量约是猪肝的 7 倍, 芹菜的 20 倍, 肉类的 100 倍。黑木耳除了可供食用之外更重要的是它的药用价值<sup>[5-7]</sup>, 自古以来, 就有用黑木耳治疗多种疾病的记录<sup>[8]</sup>。《神农本草经》记载, “桑耳黑者, 主女子漏下赤汁”, 本草纲目谓之“木耳生犍为山谷, 六月多雨时采”等<sup>[9]</sup>。现代医学表明, 黑木耳具有多种生物学功效如降血糖、抗氧化、降血脂、清除人体内自由基和抗癌等<sup>[10-14]</sup>。

研究表明, 黑木耳的很多生物学功效都与黑木耳多糖的组分密切相关<sup>[15]</sup>, 多糖是由大量单糖分子通过糖苷键相互连接形成的聚合物, 多糖的提取工艺较为

复杂且通过不同方法制备的黑木耳多糖的得率、糖含量、单糖组分等大不相同<sup>[16,17]</sup>。本实验通过对比超声法、纤维素酶法、超声协同纤维素酶法、超声协同纤维素酶及胰蛋白酶四种不同提取工艺制得的黑木耳多糖的含量及得率,得出最优提取方法并选出最优的黑木耳多糖 AAP3,此工艺探讨为黑木耳多糖的工业化生产提供理论参考。

AAP3 经过分级纯化后,在异丙醇体积分数为 20%及 60%得到相对单一的多糖组分 AAP3-20 和 AAP3-60。此外,本实验还对 AAP3-20 和 AAP3-60 进行了分子质量、单糖组成和红外光谱等理化性质和组成成分分析,为黑木耳多糖进一步的开发利用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黑木耳干制品购自江西省吉安市井冈山产区,纤维素酶、胰蛋白酶(上海阿拉丁试剂有限公司,酶活力分别为 10 U/mg、4.2 U/mg); Dextran T-10、Dextran T-40、Dextran T-50、Dextran T-70、Dextran T-500、蓝色葡聚糖、岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸(美国 Sigma 公司,纯度≥99.4%);牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G-250,磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、苯酚、浓硫酸、叠氮钠、硝酸钠、浓硫酸、95%工业乙醇、85%磷酸等试剂。

### 1.2 仪器与设备

DFY-500 摇摆式高速万能粉碎机,温岭市林大机械有限公司; pH 计,德国 Sartorius 公司; KQ 5200E 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; EYELA SB-1000 旋转蒸发仪,东京理化器械株式会社; 冷冻干燥机,美国 Labconco 公司; Milli-Q 超纯水仪,美国 Millipore 公司; 1260 高效液相色谱,美国 Agilent 公司; 多角度激光光散射凝胶色谱联用系统,美国 Wyatt Technology 公司; TWCL-G 磁力搅拌器,北京瑞成伟业仪器设备有限公司; T6 紫外可见分光光度计,北京普析通用有限责任公司; Dionex ICS-5000 DC 离子交换色谱仪,美国 Thermo 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黑木耳粗多糖的提取

##### 1.3.1.1 超声法

(1) 称粉碎后的黑木耳粉末 40 g,过 20 目筛,

pH 4.5,温度 50 °C,蒸馏水:原料=1:25 (g/mL) 浸提 60 min,间歇搅拌;

(2) 超声加热 80 min,取出升温至 100 °C,反应 10 min;

(3) 80 °C 回流提取多糖 2 h,过滤,旋蒸浓缩滤液,加入 4 倍滤液体积的 95%乙醇,4 °C 过夜醇沉,沉淀复溶于蒸馏水中,冷冻干燥,得黑木耳粗多糖 AAP1。

##### 1.3.1.2 纤维素酶法

(1) 同超声法(1);

(2) 加入纤维素酶 0.6 g,继续加热 80 min,升温至 100 °C,10 min 灭酶;

(3) 同超声法(3),得黑木耳多糖 AAP2。

##### 1.3.1.3 超声协同纤维素酶法

(1) 同超声法(1);

(2) 加入纤维素酶 0.6 g,边超声边加热 80 min,升温至 100 °C,10 min 灭酶;

(3) 同超声法(3),得黑木耳多糖 AAP3。

##### 1.3.1.4 超声协同纤维素酶及蛋白酶复合法

(1) 同超声法(1);

(2) 加入纤维素酶 0.6 g,边超声边加热 80 min,降温至 40 °C,调节 pH 至 7.0 加入胰蛋白酶 0.12 g,反应 15 min,升温至 100 °C,10 min 灭酶;

(3) 同超声法(3),得黑木耳多糖 AAP4。

### 1.3.2 多糖得率测定

总糖测定采用苯酚-硫酸法(以葡萄糖为标准),还原糖用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定<sup>[18]</sup>。按如下公式计算黑木耳粗多糖得率:

$$\text{黑木耳多糖得率}/\% = \frac{\text{总糖质量} - \text{还原糖质量}}{\text{样品质量}} \times 100$$

### 1.3.3 多糖分级纯化及含量分析

取总糖含量最高的 AAP3 复溶于蒸馏水中,采用 Sevag 法脱蛋白,取脱蛋白后的 AAP3 复溶于蒸馏水中滴加 20%双氧水,于 40~50 °C 水浴中保温 2~3 h,进行脱色,将脱色后样液透析 72 h,浓缩,冷冻干燥,得纯化后黑木耳多糖 AAP3-P。

取脱蛋白、脱色后的 AAP3-P 复溶于 0.1 M NaCl 的蒸馏水中,用异丙醇进行梯度醇沉,于 20%及 60% 体积分数时收集到多糖组分(分别命名为 AAP3-20 及 AAP3-60),复溶,透析,浓缩,冷冻干燥,得黑木耳分级多糖。对分级后的多糖进行糖含量和蛋白含量分析,蛋白质含量采用考马斯亮蓝法(以牛血清蛋白为标准)<sup>[19,20]</sup>进行测定。

### 1.3.4 多糖分子质量及分布分析

采用 HPSEC-MALLS 分析 AAP3 的分子质量分布

情况:分别采用 HPSEC 广谱校正和 HPSEC 串联多角度激光散射的标准方法对黑木耳多糖的  $M_w$  及其分布进行分析。HPSEC 串联多角度激光光散射检测器 (MALLS, DAWN HELEOS-II)、黏度检测器 (DP, ViscoStar-II) 和示差检测器 (RI, Optilab T-rEX)。Model 1500 HPLC 泵连接两个分析柱: SB-806 HQ 和 SB-804 HQ (日本 Showa Denko K.K 公司, Shodex OHpak, 8×300 mm), 柱温 35 °C。流动相为 0.2 mol/L  $\text{NaNO}_3$  (含 0.02%  $\text{NaN}_3$ ), 流速为 0.6 mL/min, ASTRA 6.1 software 采集和分析数据。

准确称取 5 mg 样品, 用流动相进行溶解, 配制成浓度为 1 mg/mL 的样品溶液, 并用 0.22  $\mu\text{m}$  水系滤膜过滤 3 次。

### 1.3.5 单糖组成分析

离子色谱工作条件: Dionex ICS-5000 离子交换色谱系统, 脉冲安培检测器, 色谱柱分别为 CarboPac PA20 (3×30 mm) 保护柱及 CarboPac<sup>TM</sup> PA20 (3×150 mm) 分析柱, 流动相包括 A (250 mmol/L NaOH 溶液)、B ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 及 C (1 mol/L NaOAc), 柱温 30 °C, 流速 0.5 mL/min, 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 运用 Chromeleon 色谱工作站采集处理数据。

样品水解: 精确称取 5 mg 黑木耳粗多糖 AAP3 于 20 mL 具塞试管中, 冰浴条件下, 加入 12 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 mL, 磁力搅拌 30 min, 取出加入超纯水 2.5 mL, 于 100 °C 油浴中磁力搅拌 2 h, 取出转移至 50 mL 容量瓶中定容, 室温放置约 20 min 后, 吸取 2 mL, 加水至 10 mL 容量瓶中定容, 得到多糖样品水解液, 绘制标准曲线。

### 1.3.6 红外光谱分析

称取充分干燥的多糖样品 2 mg 与 KBr 混匀研磨后压片, 上机扫描分析 (扫描范围 400~4000  $\text{cm}^{-1}$ )。

### 1.3.7 甲基化分析

称取干燥样品 3 mg, 加入无水二甲基亚砷 1 mL, 磁力搅拌使样品完全溶解, 加入干燥 NaOH 粉末 20 mg, 密封并磁力搅拌 3 h, 冰浴搅拌下避光加入 1 mL 碘甲烷, 密封并避光磁力搅拌 2.5 h, 滴加蒸馏水终止反应, 加入等量二氯甲烷进行萃取, 并用蒸馏水洗涤 3 次, 加入过量无水硫酸钠, 吸出样液, 置于  $\text{N}_2$  下挥干, 得干燥的甲基化多糖, 红外光谱检测。若样品在 3500  $\text{cm}^{-1}$  附近没有吸收峰, 表示多糖上的羟基已甲基化完全。

用 1 mL 二氯甲烷将甲基化产物洗入安瓿管中, 置于  $\text{N}_2$  下挥干, 加入 4 M 三氟乙酸 0.5 mL, 真空下 100 °C 水解 6 h, 用少量水将水解液转移出安瓿管, 置于  $\text{N}_2$  下挥干, 加入蒸馏水 0.3 mL 及  $\text{NaBD}_4$  5 mg, 室

温下过夜搅拌还原, 滴加冰醋酸至无气泡产生, 置于  $\text{N}_2$  下挥干, 依次用 10% 醋酸甲醇溶液及纯甲醇除尽还原过程中产生的硼酯, 加入醋酐 0.5 mL, 真空下 100 °C 乙酰化 2 h, 得部分甲基化的糖醇乙酸酯衍生物, 置于  $\text{N}_2$  下挥干, 复溶于二氯甲烷中, 进行 GC-MS 分析<sup>[21,22]</sup>。

GC-MS 工作条件: 色谱柱为 SP-2330 ms 毛细管柱 (美国 Supelco 公司, 30 m×0.25 mm×0.2  $\mu\text{m}$ ), 载气为 He, 升温程序为 160~210 °C (2 °C/min)、210~240 °C (5 °C/min), 离子化模式为 EI (70 kV)。

### 1.3.8 数据统计分析

以下数据均用 excel 2013、origin 7.0、SPSS17.0 等软件处理完成。各组数据以  $\bar{x}\pm s$  表示。应用 SPSS 17.0 软件单因素方差分析, LSD 检验。 $p<0.05$  表示差异显著,  $p<0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取工艺条件下黑木耳多糖的含量

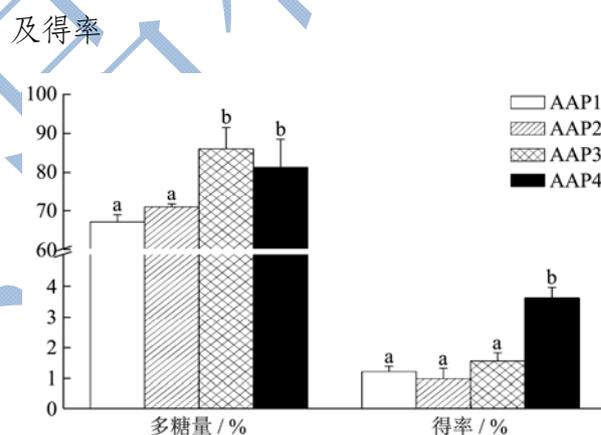


图 1 不同提取工艺制得的黑木耳多糖含量及得率

Fig.1 Content and yield of *Auricularia auricular* polysaccharides extracted by different extraction methods

注: 结果以平均数±标准差表示 (n=4), 不同上标字母表示组间差异显著 ( $p<0.05$ ), 下同。

AAP3 黑木耳多糖的含量最高, AAP4 黑木耳多糖的得率最大, 高于其他三组, AAP3 的糖含量与 AAP4 无明显差异, 但 AAP3 与 AAP4 的得率有显著性差异, 我们可以推测胰蛋白酶对黑木耳多糖的糖含量无太大影响, 但对黑木耳多糖的得率有较大影响。对比 AAP1 和 AAP3 的糖含量, 得出纤维素酶对黑木耳多糖的糖含量影响较为显著。AAP3 的糖含量最高且得率高于 AAP1 和 AAP2, 综合考虑, 选定 AAP3 进行进一步的分级纯化和结构表征。

### 2.2 多糖纯化

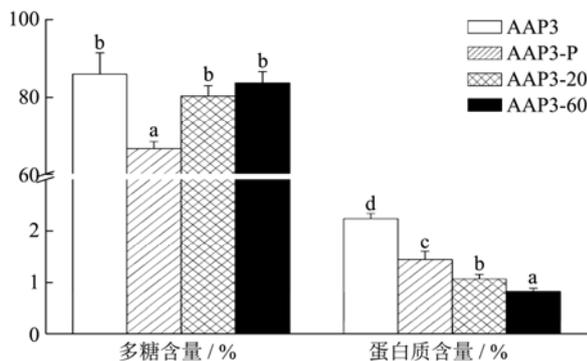


图2 黑木耳多糖的化学组成

Fig.2 Chemical composition of *Auricularia auricular* polysaccharides

从图2中可以看出,脱蛋白及脱色处理对糖含量有一定的影响。黑木耳多糖的多糖含量由纯化前的85.93% (AAP3) 下降至 66.56% (AAP3-P)。这可能是由于多糖与部分蛋白质结合形成糖蛋白,脱蛋白时损失了部分糖,这也符合黑木耳多糖分子量较大,样品溶液较粘稠的特性。相比之下,AAP3-20及AAP3-60样品在经过脱蛋白及脱色处理后,蛋白质含量分别为1.06%和0.82%,证明这两种级份多糖的纯度较高,杂质较少。

2.3 HPSEC 分析

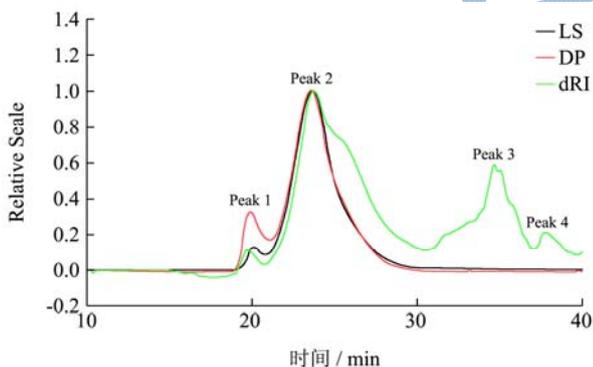


图3 AAP3的HPSEC色谱图

Fig.3 HPSEC chromatogram of AAP3

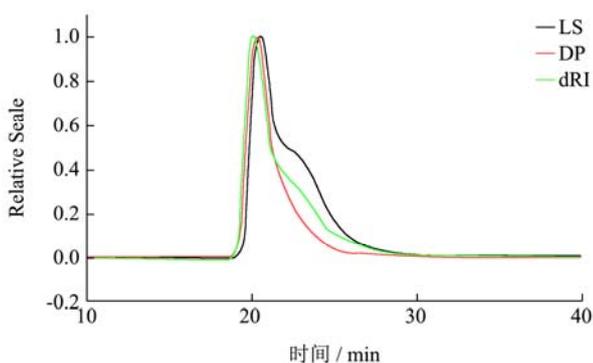


图4 AAP3-20的HPSEC色谱图

Fig.4 HPSEC chromatogram of AAP3-20

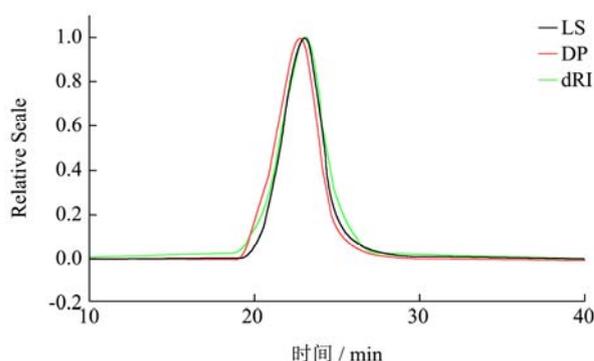


图5 AAP3-60的HPSEC色谱图

Fig.5 HPSEC chromatogram of AAP3-60

HPSEC 串联多检测器(多角度激光光散射检测器 MALLS、粘度检测器 DP 和示差检测器 RI)技术已经被广泛应用于聚合物分子质量和大小的分析。图3为黑木耳多糖 AAP3 在不同检测器下的洗脱曲线,如图所示 AAP3 主要由四个峰组成,Peak1、2、3 的重均分子量分别为  $3.7 \times 10^3$ 、 $5.8 \times 10^2$  和 44 ku (Peak 4 分子量过小未能检出)。

表1 AAP3-20 和 AAP3-60 的分子参数

Table 1 Molecular parameters of AAP3-20 and AAP3-60

指标	AAP3-20	AAP3-60
出峰时间	18.3~29.7	18.757~29.414
质量分数/%	74.9	68.1
$M_n$ /ku	$1.87 \times 10^3$	$6.10 \times 10^2$
$M_w$ /ku	$2.53 \times 10^3$	$1.20 \times 10^3$
$M_w/M_n$	1.36	2.12
分子旋转半径/nm	180.2	119.7
$\alpha$	0.439	0.723

对纯化前黑木耳粗多糖 AAP3 和纯化后级份多糖 AAP3-20 和 AAP3-60 进行 HPSEC 分析(图3、图4和图5),结果表明纯化后的精多糖 AAP3-20 和 AAP3-60 的主要组分较纯化前粗多糖 AAP3 均一。表1为 AAP3-20 和 AAP3-60 的主要组分分子参数。AAP3-20 和 AAP3-60 主要组分的重均分子量分别为  $2.53 \times 10^3$  和  $1.20 \times 10^3$  ku,数均分子量分别为  $1.87 \times 10^3$  和  $6.10 \times 10^2$  ku,由此可知 AAP3-20 和 AAP3-60 的多分散系数 PI ( $M_w/M_n$ ) 分别为 1.36 和 2.12,表明该两种级份多糖的分子尺寸是一种宽分布。ASTRA 软件分析多糖样品的构象,即由分子旋转半径 RMS 与分子摩尔数之间的关系曲线可得,该关系曲线用  $\alpha$  表示<sup>[23-25]</sup>。一般认为  $\alpha$  在 0.5~0.8 之间,表明多糖分子呈柔性无规则线团;当  $\alpha$  增大,多糖的刚性随之增强。当  $\alpha$  超过 1 时,表明多糖链呈棒状结构,低于 0.3 时则呈球形结构<sup>[26,27]</sup>。AAP3-20 和 AAP3-60 的  $\alpha$  值分别为 0.439 和 0.723,表明 AAP3-60 的刚性较 AAP3-20 大,

AAP3-20 可能呈高支化紧缩链构象, 而 AAP3-60 可能呈无规则线团结构。

### 2.4 单糖组分分析

表 2 为 AAP3、AAP3-20 和 AAP3-60 的单糖组成, 结果表明 AAP3 主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖组成, 是一种杂多糖, 其中葡萄糖含量最高 (48.43%), 其次是甘露糖、木糖, 半乳糖, AAP3 单糖组成总和 (80.75%) 与多糖含量结果 (85.93%) 相似。

AAP3-20 组分仅由葡萄糖组成 (77.82%), 这与魏红<sup>[28]</sup>报道的黑木耳多糖 (CMAAP33) 单糖组成一致; AAP3-60 组分则含有 4 种单糖, 其中大部分为甘露糖 (51.91%) 与木糖 (43.62%), 还含有少量的葡萄糖及半乳糖, AAP3-60 单糖种类及比例与 Anthony<sup>[29]</sup>提取的黑木耳多糖 (AAPW-1) 相近, 但葡萄糖和甘露糖的比例有一定差异, 这可能是黑木耳的产地或提取工艺不同导致。AAP3-20 和 AAP3-60 两种级份多糖中各单糖组成总和与多糖含量的结果基本一致。

表 2 AAP3-20 及 AAP3-60 单糖组成情况

Table 2 Monosaccharide composition of AAP3-20 and AAP3-60

样品	甘露糖/% <sup>a</sup>	葡萄糖/% <sup>a</sup>	半乳糖/% <sup>a</sup>	木糖/% <sup>a</sup>
AAP3	16.98±0.37	48.43±0.44	2.44±0.16	12.90±0.19
AAP3-20	/	77.82±0.33	/	/
AAP3-60	51.91±1.15	6.17±0.03	2.51±0.04	43.62±0.06

注: <sup>a</sup>表示基于离子色谱所得的不同单糖的相对质量比; / 表示未检出。

### 2.5 FT-IR 光谱分析

AAP3-20 和 AAP3-60 的红外光谱分析见图 6, AAP3-20 和 AAP3-60 在 3600~3200 cm<sup>-1</sup>, 3000~2800

表 3 AAP3-20 和 AAP3-60 的甲基化分析结果

Table 3 Methylation analysis of AAP3-20 and AAP3-60

保留时间/min	AAP3-20			保留时间/min	AAP3-60		
	甲基化残基	糖苷键类型	百分比/% <sup>a</sup>		甲基化残基	糖苷键类型	百分比/% <sup>a</sup>
20.16	2,3-Me <sub>2</sub> -Glu	1,4,6-Glcp	18.32	20.57	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glu	t-Glcp	22.57
23.50	2,4-Me <sub>2</sub> -Glu	1,3,6-Glcp	43.44	21.56	2,4-Me <sub>2</sub> -Xyl	1,3-Xylp	8.81
28.14	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glu	1,6-Glcp	26.90	22.58	2,3-Me <sub>2</sub> -Man	1,4,6-Manp	4.84
28.39	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glu	t-Glcp	11.34	23.47	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1,4-Manp	61.36
				27.68	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glu	1,6-Glcp	2.42

注: <sup>a</sup>表示基于峰面积计算所得的不同糖残基的相对百分比。

AAP3-20 甲基化 PMAA 产物主要由 2,4-Me<sub>2</sub>-Glu (43.44%), 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glu (26.90%), 2,3-Me<sub>2</sub>-Glu (18.32%), 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glu (11.34%) 组成, 结合单糖组成结果及文献, AAP3-20 残基主要有 1,3,6-Glcp,

cm<sup>-1</sup> 和 1400~1200 cm<sup>-1</sup> 的峰均是糖类化合物的特征吸收峰。3350 cm<sup>-1</sup> 处是多糖分子中 O-H 的伸缩振动引起的吸收, 说明存在分子内和分子间氢键<sup>[30,31]</sup>。2910 cm<sup>-1</sup> 波长处的峰是多糖类 C-H 或亚甲基伸缩振动, 1650 cm<sup>-1</sup> 为羰基伸缩振动, 1380 cm<sup>-1</sup> 之间的吸收峰是多糖类 C-H 的变角振动<sup>[33]</sup>。1050 cm<sup>-1</sup> 的中等强度的信号峰是 C-O-H 和吡喃糖环 C-O-C 中 C-O 键伸缩振动引起的。相比于 AAP-20, AAP-60 在 669 cm<sup>-1</sup> 处存在吸收峰, 说明该多糖为一种 β-型吡喃多糖<sup>[33]</sup>。

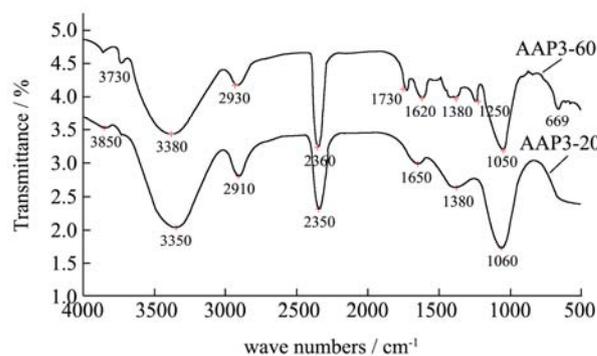


图 6 黑木耳多糖的红外光谱图

Fig.6 FT-IR spectrum of *Auricularia auricular* polysaccharides

### 2.6 甲基化分析

在单糖组成基础上, 对 AAP3-20 和 AAP3-60 甲基化分析, 甲基化分析通过甲基化试剂将多糖中各单糖残基上的游离羟基甲基化, 再将多糖中的糖苷键水解以暴露出单糖残基的连接位点, 再通过还原和乙酰化反应得到它们的衍生物进行 GC-MS 检测分析, 确定出不同单糖残基的连接位点。同时, 根据不同单糖残基在甲基化产物中的比例得到不同连接类型单糖在多糖中的分子比例<sup>[34,35]</sup>。AAP3-20 和 AAP3-60 甲基化后对应的质谱碎片、糖苷键类型及百分比见表 3。

1,6-Glcp, 1,4,6-Glcp, t-Glcp; AAP3-60 中 1,4-Manp 含量最高 (61.36%), t-Glcp (22.57%), 1,3-Xylp (8.81%), 1,4,6-Manp (4.84%), 1,6-Glcp (2.42%), 该结论与刘大政<sup>[36]</sup>提取的黑木耳多糖 (AA4HE2) 甲

基化结果几乎一致,主要体现在 1,4-Manp 及 1,3-Xylp 残基所占比例。根据 Harker、Lee 和 Frechet 的计算方法[37], AAP3-20 和 AAP3-60 的支化度分别为 73.1% 和 27.4%, 表明 AAP3-20 属于支化度较高的多糖链。

### 3 结论

本研究通过对比四种黑木耳多糖的提取工艺,得出黑木耳粗多糖的最佳提取方式是超声协同胰蛋白酶法,在该条件下制得的黑木耳粗多糖 AAP3 是一种葡萄糖含量较高的杂多糖。经过进一步的分级纯化得到纯度较高的 AAP3-20 和 AAP3-60 两种组分多糖, AAP3-20 仅由葡萄糖组成,而 AAP3-60 主要由甘露糖和木糖组成;甲基化结果表明 AAP3-20 含有 1,4,6-Glcp、1,3,6-Glcp、1,6-Glcp、t-Glcp 四种残基, AAP3-60 含有 t-Glcp、1,3-Xylp、1,4,6-Manp、1,4-Manp、1,6-Glcp 五种残基,结合 HPSEC 分析和甲基化结果表明, AAP3-20 可能呈高支化紧缩链构象, AAP3-60 可能是一种呈无规则线团结构的  $\beta$ -型吡喃多糖。

### 参考文献

- [1] 王献友,陈培云,吴广臣,等.黑木耳多糖提取及其药理活性的研究进展[J].南方农业学报,2012,43(5):683-687  
WANG Xian-you, CHEN Pei-yun, WU Guang-chen, et al. Advances on polysaccharide extraction from *Auricularia auricular* and its pharmacological activity [J]. Journal of Southern Agriculture, 2012, 43(5): 683-687
- [2] 周国华,于国萍.黑木耳多糖降血脂作用的研究[J].现代食品科技,2005,21(1):46-48  
ZHOU Guo-hua, YU Guo-ping. Effect study of *auricularia* polysaccharide on reducing blood lipid [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(1): 46-48
- [3] 江雄波,陈益娟,张俊青,等.氮源比例和耳场条件对黑木耳胶原蛋白含量的影响[J].中国食用菌,2016,35(1):50-52  
JIANG Xiong-bo, CHEN Yi-xian, ZHANG Jun-qing, et al. Effects of nitrogen source and fruiting environment on collagen content of *auricularia auricular-judae* [J]. Edible Fungi of China, 2016, 35(1): 50-52
- [4] 黄来年.中国大型真菌原色图鉴[M].北京:中国农业出版社,1998  
HUANG Lai-nian. China's large-scale fungal primary colors [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998
- [5] 卞春,王振宇,John Shi.黑木耳多糖生物功能的研究进展[J].食品工业科技,2015,16:390-394  
BIAN Chun, WANG Zhen-yu, John Shi. Research progress of *Auricularia auricular* polysaccharide(AAP)biological functions [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 16: 390-394
- [6] 白海娜,王振宇,刘瑞海,等.白藜芦醇与黑木耳多糖协同清除 ABTS 自由基活性的研究[J].现代食品科技,2014, 3:64-68  
BAI Hai-na, WANG Zhen-yu, LIU Rui-hai, et al. Synergistic ABTS radical scavenging activity of resveratrol with *auricularia auricular* polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 3: 64-68
- [7] Guo H Y, Lu Y D, Li Z H, et al. A new drimane-type sesquiterpenoid from fermentation broth of *fomitiporia punicata* [J]. Natural Product Research and Development, 2014, 26(1): 6-82
- [8] 朱宝兰.中国黑木耳生产[M].北京:中国农业出版社,2000  
ZHU Bao-lan. Production of *Auricularia auricular* in China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000
- [9] 彭强.黑木耳培养料及营养生理特性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2007  
PENG Qiang. Studies on substrates and nutrient physiological characteristics of *auricularia auricular* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2007
- [10] Jun G, Hua T, Bao-shu L, et al. Steroids from fungus *engyodontium album* associated with the South China Sea cucumber *Holothuria nobilis Selenka* [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2013, 33(3): 310-314
- [11] Yi Y. Study on chemical constituents of *hippocampus erinaceus* [J]. China Pharmacy, 2014, 19(1): 13-17
- [12] Noh H J, Yang H H, Kim G S, et al. Chemical constituents of *Hericium erinaceum* associated with the inhibitory activity against cellular senescence in human umbilical vascular endothelial cells [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2015, 30(6): 934-940
- [13] Du Z Z, Shen Y M. A rare new cleistanthane diterpene from the pericarp of *Trewia nudiflora* [J]. Helvetica Chimica Acta, 2006, 89(11): 2841-2845
- [14] Khaskheli S G, Zheng W, Sheikh S A, et al. Characterization of *Auricularia auricular* polysaccharides and its antioxidant properties in fresh and pickled product [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 381-395
- [15] 周鹏,谢明勇.多糖的生物活性[J].食品研究与开发,2001, 22(2):6-8  
ZHOU Peng, XIE Ming-yong. Biological activity of polysaccharides [J]. Food Research and Development, 2001, 22(2): 6-8
- [16] 许淑琴.黑木耳刚性链葡聚糖结构、链构象转变及自组装

- 行为[D].武汉:武汉大学,2013
- XU Shu-qin. Chemical structure, chain conformational transition, and self-assembly behaviors of stiff glucan from *auricularia auricular-judae* [D]. Wuhan: Wuhan University, 2013
- [17] Cui S W. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications [M]. CRC Press, 2005
- [18] Kim Y S, Martin D F. Colorimetric estimation of acidic polysaccharide content of *Gymnodinium Breve* [J]. Environmental Letters, 1973, 4(2): 109-116
- [19] Ozturk S, Aslim B, Suludere Z, et al. Metal removal of cyanobacterial exopolysaccharides by uronic acid content and monosaccharide composition [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 265-271
- [20] Georgiou C D, Grintzalis K, Zervoudakis G, et al. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 391(1): 391-403
- [21] Hakomori S. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide [J]. Journal of Biochemistry, 1964, 55(2): 205-208
- [22] Gray G R. The reductive cleavage method for polysaccharide structural analysis [J]. Carbohydrate Polymers, 1998, 34(4): 429
- [23] 王海燕,戴军,陈尚卫.灵芝菌丝体多糖的分离纯化及其单糖组成分析与分子质量测定[J].食品与机械,2015, 5:201-205
- WANG Hai-yan, DAI Jun, CHEN Shang-wei. Separation, monosaccharide composition and molecular weight analysis of polysaccharide from *Glucidum mycelium* [J]. Food and Machinery, 2015, 5: 201-205
- [24] PU X, MA X, LU L, et al. Structural characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from angelica, and astragalus [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 137: 154-164
- [25] 张攀峰,陈玲,李晓玺,等.不同直链支链比的玉米淀粉分子质量及其构象[J].食品科学,2010,31(19):157-160
- ZHANG Pan-feng, CHEN Ling, LI Xiao-xi, et al. Molecular mass and conformation of corn starches with different amylose/amylopectin ratios [J]. Food Science, 2010, 31(19): 157-160
- [26] 康继.天然高性能乳化剂-印度树胶的精细分子结构和构象特性研究[D].无锡:江南大学,2011
- KANG Ji. Study of fine structures and conformational properties of gum ghatti [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011
- [27] 杨涛,郭龙,李灿,等.红芪多糖 HPS1-D 的化学结构和抗补体活性研究[J].中国中药杂志,2014,39(1):89-93
- YANG Tao, GUO Long, LI Can, et al. Studies on chemical structure and anti-complement activity of HPS1-D in astragalus polysaccharides [J]. Chinese Journal of Chinese Medicine, 2014, 39(1): 89-93
- [28] 魏红.黑木耳多糖的羧甲基化修饰及抗氧化活性研究[D].苏州:江苏大学,2010
- WEI Hong. Carboxymethylated derivative and their antioxidant activities of polysaccharides from *auricularia auricular* [D]. Suzhou: Jiangsu University, 2010
- [29] Anthony Daniel Foday. Sequential isolation and fractionation of polysaccharides from *auricularia auricular* fruit bodies and their pharmacological activities [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2012
- [30] 黄静涵,艾斯卡尔·艾拉提,毛健.灵芝多糖的分离纯化及结构鉴定[J].食品科学,2011,32(12):301-304
- HUANG Jing-han, Asker Erati, MAO Jian. Purification and structural identification of a bioactive polysaccharide fraction from *ganoderma lucidum* [J]. Food Science, 2011, 32(12): 301-304
- [31] ZHOU X, XU L, FENG S, et al. Characteristics and bioactivities of different molecular weight polysaccharides from camellia seed cake [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 9: 1025-1032
- [32] 许峰,吴玲芳,林善,等.发酵冬虫夏草菌丝体中虫草多糖含量的检测及结构鉴定[J].基因组学与应用生物学,2014,33(6):1294-1302
- XU Feng, WU Ling-fang, LIN Shan, et al. The content determination and structural characterization of polysaccharides from the mycelium of *ophiocordyceps sinensis* [J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(6): 1294-1302
- [33] WU F, YAN H, MA X, et al. Comparison of the structural characterization and biological activity of acidic polysaccharides from *Cordyceps militaris*, cultured with different media [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(5): 2029-2038
- [34] Mischnick P. Structural analysis of polysaccharides and polysaccharide derivatives [J]. Macromolecular Symposia, 1995, 99: 3-13
- [35] Mukerjea R, Kim D, Robyt J F. Simplified and improved methylation analysis of saccharides, using a modified

- procedure and thin-layer chromatography [J]. Carbohydrate Research, 1996, 292(1): 11-20
- [36] 刘大政. 黑木耳多糖的分离纯化及结构分析[D]. 长春: 东北师范大学, 2008
- LIU Da-zheng. Fractionation and structural analysis of the polysaccharides from *Auricularia auricula* [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2008
- [37] Hawker C J, Lee R, Frechet J M J. One-step synthesis of hyperbranched dendritic polyesters [J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 113(12): 4583-4588

现代食品科技