

酸碱性和分子量对木耳多糖抗氧化活性及相关性的影响

朱晓冉¹, 徐颖¹, 李德海¹, 赵楠楠¹, 龚金华²

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

(2. 香港教育大学博文及社会科学学院科学与环境学系, 香港 999077)

摘要: 为研究提取溶剂酸碱性和分子量对黑木耳多糖抗氧化活性的影响及其抗氧化相关性, 本试验以野生黑木耳为原料制备黑木耳多糖, 采用 LabScale TFF System 超滤系统对黑木耳多糖进行分子量分级, 分别测定黑木耳多糖的得率、纯度和抗氧化活性, 并使用 SPSS 软件分析黑木耳多糖分子量与抗氧化活性之间的相关性。结果表明, 酸性未脱色黑木耳多糖的得率最高 (12.48%), 碱性脱色黑木耳多糖的纯度最高 (68.78%), 中性未脱色黑木耳多糖体外抗氧化活性最好。不同分子量中性未脱色黑木耳多糖抗氧化试验表明, 分子量小于 30 ku 的黑木耳多糖 (Sp3) 抗氧化活性最好, 抗氧化活性与 Vc 相近。其次是分子量为 30 ku~100 ku 的黑木耳多糖 (Sp2), 最差的是分子量大于 100 ku 的黑木耳多糖 (Sp1), Sp3 与抗氧化活性之间存在极显著相关 ($p < 0.01$), 本试验结果为深入开发黑木耳多糖抗氧化产品提供理论依据。

关键词: 黑木耳多糖; 提取工艺; 分子量; 体外抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2018)03-59-67

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.009

Correlation of the Antioxidant Activity and of Polysaccharides from *Auricularia Auricula* with its Molecular Weight and extracting agent Properties

ZHU Xiao-ran¹, XU Ying¹, LI De-hai¹, ZHAO Nan-nan¹, GONG Jin-hua²

(1. College of Forestry, Northeast Forest University, Harbin 150040, China)

(2. Department of Science and Environmental Studies, Faculty of Liberal Arts and Social Sciences, Education University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

Abstract: The *Auricularia auricula* polysaccharides were prepared from wild *Auricularia auricula* in this study and the molecular weight was fractionated by LabScale TFF System laboratory ultrafiltration system to investigate the effects of acid-base property of extraction solvent and molecular weight on the antioxidant activity of *Auricularia auricula* polysaccharides. The yield, purity and antioxidant activity of the *Auricularia auricula* polysaccharides were determined and the correlation between molecular weight and antioxidant activity were analyzed by SPSS software. The highest yield of acidic non-decolorized polysaccharides (12.48%) and the highest purity of the alkaline decolorized polysaccharides (68.78%) were obtained, and the neutral decolorized *Auricularia auricula* polysaccharides had the best antioxidant activity in vitro. The antioxidant experiment of neutral non-decolorized *Auricularia auricula* polysaccharides with different molecular weights showed that the antioxidant activity of polysaccharides with the molecular weight of less than 30 ku was best, which was similar to that of Vc, followed by the polysaccharides with the molecular weight of 30 ku to 100 ku, and the worst were those with the molecular weight greater than 100 ku. There was a significant correlation between molecular weight and antioxidant activity ($p < 0.01$). The results provided a theoretical basis for the further development of antioxidant products of *Auricularia auricula* polysaccharide.

Key words: *Auricularia auricula* polysaccharides; extraction process; molecular weight; vitro antioxidant activity

收稿日期: 2017-10-22

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2572014CA19、2572014EA02); 黑龙江省自然科学基金面上项目 (G2015062)

作者简介: 朱晓冉 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 活性物质提取、功能性质的研究

通讯作者: 李德海 (1976-), 男, 副教授, 研究方向: 食品化学及植物有效成分研究

长期接触辐射环境,使机体处于氧化应激状态,导致体内自由基浓度升高,加速细胞衰老死亡,造成机体组织损伤,增加心血管疾病和癌症的发病率^[1]。研究表明食用外源性天然抗氧化剂能有效拮抗体内过剩的自由基,减少氧化作用产生的活性氧化簇,相比人工合成抗氧化剂具有来源广泛、低毒和无副作用等优势^[2],因此开发天然抗氧化剂受到研究者的极大关注。

黑木耳(*Auricularia auricula*)又名木耳、光木耳,属真菌门担子纲,是我国重要的药食同源真菌,具有防治动脉硬化、高血压、眼底出血和缺铁性贫血等功效,有“素中之荤”的美称^[3]。黑木耳多糖(*Auricularia auricular polysaccharides*, AAP)是黑木耳中含量最多、最主要的活性成分。研究表明,黑木耳多糖具有抗氧化、抗辐射^[4]、抗凝血、降血脂^[5]、降血糖和抗肿瘤^[6]等生物学功能,因此利用黑木耳多糖开发功能性食品、保健品和药物具有广阔的前景。

但多糖聚合度较大,组成多样,空间结构复杂,使黑木耳多糖的开发受到限制。研究学者发现多糖分子量大小显著影响多糖的生理活性。ZhouXu等^[7]发现山茶籽饼低分子量多糖有更强的自由基清除能力和金属螯合能力。

MZhong等^[8]研究发现,与高分子的牡蛎多糖相比,低分子量的牡蛎多糖能够显著增加细胞中相容性复合物II(MHC-II)CD40和CD86的表达,进一步诱导肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-12的分泌。FanYang等^[9]研究发现低分子量的黄芪根多糖显著提高小鼠血清中IgG、IgG1、IgG2b、IL-2、IL-4、IL-10和IL-12对重组热休克蛋白-90疫苗的特异性抗体滴度($p < 0.05$)。

本文以野生黑木耳为原料,采用 Labscale TFF System 实验室超滤系统对黑木耳多糖进行分子量分级,以体外抗氧化指标为评价手段,研究分子量大小与黑木耳多糖抗氧化功能的相关性,以期在黑木耳多糖的功能活性及其功能性食品研发提供科学的参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

市售大兴安岭地区野生黑木耳,购自哈尔滨市南极市场;Tris、ABTS、DPPH, Sigma 公司;无水乙醇、葡萄糖和抗坏血酸等其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Labscale TFF System 实验室超滤系统, Pellicon XL 超滤膜包(膜面积 50 cm², 截留分子量 30 ku、100 ku), 美国 Millipore 公司; RT-6000 酶标仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; TU-1810 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; JA2003 万分之分析天平, 上海良平仪器仪表有限公司; R-205B 旋转蒸发仪, 上海申胜仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

黑木耳烘干粉碎, 石油醚脱脂, 置于 4 °C 条件下保藏备用。

1.3.2 黑木耳多糖的制备

准确称取黑木耳干粉按照一定的料液比分别加入 0.1 mol/L 的盐酸、去离子水和 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液于 90 °C 水浴锅中浸提 4 h。提取液离心、抽滤调至中性后旋蒸, 得黑木耳多糖浓缩液; 浓缩液采用 Servge 法脱蛋白, 5% H₂O₂、37 °C 条件下脱色, 经透析、醇沉、超滤、冻干后分别得到酸性未脱色黑木耳多糖、酸性脱色黑木耳多糖、中性未脱色黑木耳多糖、中性脱色黑木耳多糖、碱性未脱色黑木耳多糖和碱性脱色黑木耳多糖六种多糖。

1.3.3 黑木耳多糖得率和纯度

采用苯酚-硫酸法测定黑木耳多糖含量^[11]。

准确称取一定量的黑木耳多糖粉, 配制成黑木耳多糖溶液, 按照葡萄糖标准曲线制作的方法测定吸光度, 同时以蒸馏水做空白对照, 三次平行, 取平均值, 代入标准曲线 $y = 7.9120x + 0.0798$ ($R^2 = 0.9992$) 计算黑木耳多糖的得率、纯度, 计算公式如下所示:

$$\text{多糖得率} = \frac{C \times N \times V}{M} \times 100\%$$

式中: C 为稀释后提取液中多糖浓度, g/mL; N 为稀释倍数, V 为提取液体积, mL; M 为原料质量, g。

$$\text{多糖纯度} = \frac{C \times V}{M} \times 100\%$$

式中: C 为稀释后提取液中多糖浓度, g/mL; V 为提取液体积, mL; M 为原料质量, g。

1.3.4 ABTS 自由基 (ABTS⁺) 清除能力测定

参照文献^[12], 并稍作修改。将 5 mL 7.4 mmol/L ABTS 与 88 μ L 2.6 mmol/L K₂S₂O₈ 混匀, 室温下避光静置过夜, 形成 ABTS 储备液。使用前用无水乙醇稀释至常温条件下于波长 734 nm 处测定吸光度为 0.7 \pm 0.02。将 250 μ L ABTS 工作液与 50 μ L 样品溶液混合, 常温避光静置 6 min, 于 734 nm 处测吸光值, 平行测定 3 次, 结果取平均值。

$$\text{ABTS}^+ \cdot \text{清除率} = (1 - \frac{A_1}{A_0}) \times 100\%$$

式中: A_0 为样品空白组吸光值; A_1 为样品组吸光值。

1.3.5 DPPH 自由基 (DPPH·) 清除能力测定

参考 PRIOR^[13]的方法, 在 2 mL 样液中加入 2 mL 0.1 mmol/L DPPH·溶液, 混匀室温下避光静置 20 min 后, 在 517 nm 处测定吸光值, DPPH·清除率按下列公式计算。试验设 3 组平行, 结果取平均值。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\%$$

式中: A_0 为样品空白组吸光值; A_1 为样品组吸光值; A_2 为对照组吸光值。

1.3.6 羟自由基 (·OH) 清除能力测定

参考 Furai Lai 的方法^[14], 并作出改动, 样品组反应体系中加入 1 mL 样品溶液、1 mL 9 mmol/L 硫酸亚铁、1 mL 9 mmol/L 水杨酸乙醇溶液和 1 mL 8.8 mmol/L 过氧化氢, 混合均匀, 在波长 510 nm 处测定各溶液的吸光值, 未加硫酸亚铁和未加样品作为空白对照组, ·OH 清除率按下列公式计算试验设 3 组平行, 结果取平均值。

$$\cdot\text{OH} \text{清除率} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\%$$

式中: A_0 为样品空白组吸光值; A_1 为样品组吸光值; A_2 为对照组吸光值。

1.3.7 超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 清除能力测定

参照 CHANDRIKP 等^[15]的方法并作一定调整, 试管中加入 1 mL 样液和 3 mL pH 8.2 的 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 混匀后 25 °C 水浴平衡 8 min, 加入 35 mmol/L 的邻苯三酚 200 μL , 两者混合均匀, 加入 8 mmol/L HCL 1 mL 终止反应, 325 nm 处测定吸光值。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \cdot \text{清除率} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\%$$

表 1 黑木耳多糖的得率及纯度分析

Table 1 Yield and purity analysis of *Auricularia auricula* polysaccharides

	碱性未脱色 木耳多糖	碱性脱色 木耳多糖	中性未脱色 木耳多糖	中性脱色 木耳多糖	酸性未脱色 木耳多糖	酸性脱色 木耳多糖
得率/%	10.52±0.57	8.21±0.32	8.65±0.26	6.21±0.33	12.48±0.59	9.76±0.39
纯度/%	50.95±3.21	68.78±4.20	45.19±4.32	62.25±3.31	43.48±2.47	59.95±3.42

由表 1 可知, 提取溶剂的酸碱性、脱蛋白和脱色处理对黑木耳多糖的得率和纯度影响较大。

得率结果表明酸性条件提取多糖得率最高, 其次是碱性条件, 最低的是中性条件, 可以看出碱性和酸性条件有利于黑木耳多糖的提取。

酸碱溶液能够破坏组织细胞壁结构, 从而促进胞

式中: A_0 为样品空白组吸光值; A_1 为样品组吸光值; A_2 为对照组吸光值。

1.3.8 总还原力的测定

采用铁氰化钾还原法测定黑木耳多糖的总还原能力^[16]。样液 1.00 mL 加入 2.50 mL、1%铁氰化钾溶液, 在 50 °C 下反应 20 min, 速冷后向溶液加入 2.50 mL、10%的三氯乙酸溶液, 5 min 后, 加入 5 mL 去离子水, 0.50 mL、0.1%三氯化铁溶液, 反应 30 min, 在 700 nm 处测定吸光值。

1.3.9 不同分子量黑木耳多糖体外抗氧化能力的比较

从六种不同方法提取黑木耳多糖中筛选出抗氧化能力最佳黑木耳多糖作为试验原料。参考姜帆^[10]等人的方法, 采用 Labscale TFF System 实验室超滤系统, 选用截留分子量为 100 ku 和 30 ku 的聚醚砜超滤膜, 先后对黑木耳多糖溶液进行分离。通过超滤处理, 将黑木耳多糖分为三个分子量段: Sp1(>100 ku)、Sp2(30 ku~100 ku)和 Sp3(<30 ku)。三种黑木耳多糖液浓缩, 脱色, 透析, 冻干得 Sp1、Sp2 和 Sp3 干粉。采用五种方法, 评价三种不同分子量黑木耳多糖的体外抗氧化能力。

1.4 统计分析

数据结果以平均值±标准方差 (means±SD) 表示, 数据处理, 结果采用统计分析软件 SPSS 21.0 与 Origin 8.5 进行统计分析, 以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 黑木耳多糖得率及纯度分析

试验研究了溶剂酸碱性脱蛋白以及脱色处理对黑木耳多糖得率和纯度的影响, 结果见表 1。

内多糖的释放, 提高黑木耳多糖的得率^[17]。但纯度结果表明, 碱性条件提取多糖纯度最高, 其次是中性条件, 酸性条件提取多糖的纯度最低, 说明提取的碱性条件能够促进更多的非多糖成分溶出, 而酸性条件不利于非多糖成分溶出。

从表 1 数据中还可以看出, 脱蛋白的黑木耳多糖

脱色处理后黑木耳多糖的纯度提高但得率却降低, 说明脱蛋白后使用双氧水脱除的色素时会造成部分的多糖损失, 且对不同酸碱性的多糖损失率也不同, 其中酸性多糖损失最大, 碱性的多糖损失最小, 这个可能是因为碱性条件下提取的酸性黑木耳多糖含有较多的糖醛酸, 而双氧水具有很强氧化性对其的影响较大 [18]。

2.2 不同提取方式提取黑木耳多糖体外抗氧化能力的比较

溶剂种类及溶剂的 pH 均显著影响提取成分的生理活性, 因此本实验研究了不同酸碱性的溶剂对黑木耳多糖体外抗氧化功能的影响, 试验结果见表 2。

表 2 不同黑木耳多糖抗氧化指标 IC₅₀ 值比较

Table 2 Antioxidant indexes (IC₅₀) of different *Auricularia auricula* polysaccharides

	碱性未脱色木耳多糖	碱性脱色木耳多糖	中性未脱色木耳多糖	中性脱色木耳多糖	酸性未脱色木耳多糖	酸性脱色木耳多糖
ABTS ⁺ ·	2.02±0.04 ^f	4.78±0.04 ^c	2.26±0.03 ^e	5.24±0.06 ^b	3.67±0.06 ^d	89±0.95 ^a
DPPH·	52.07±0.14 ^a	20.27±0.82 ^c	10.32±0.11 ^f	15.14±0.14 ^e	22.48±0.15 ^b	19.31±0.01 ^d
·OH	20.15±0.08 ^b	77.67±0.94 ^a	14.18±0.15 ^c	75.81±7.81 ^a	13.59±0.36 ^c	6.48±0.04 ^d
O ₂ ^{·-}	24.94±1.16 ^a	11.81±0.14 ^e	10.09±0.01 ^f	20.22±0.17 ^b	14.55±0.04 ^c	12.72±0.04 ^d
总还原能力	4.82±0.05 ^c	65.83±1.01 ^a	2.36±0.05 ^f	5.40±0.24 ^b	2.46±0.07 ^e	4.17±0.03 ^d

注: 不同小写字母表示同一行比较具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.3 分子量对黑木耳多糖体外抗氧化活性的影响

研究表明不同分子量的多糖其功能有着显著差异, 因此本实验采用超滤膜分离技术对抗氧化能力较好的中性未脱色黑木耳多糖进行了分子量分级, 分别得到了三个分子量段的中性未脱色黑木耳多糖, 即 Sp1 (>100 ku)、Sp2 (30 ku~100 ku) 和 Sp3 (<30 ku), 比较分子量对木耳多糖抗氧化功能的影响。

2.3.1 不同分子量黑木耳多糖分布结果

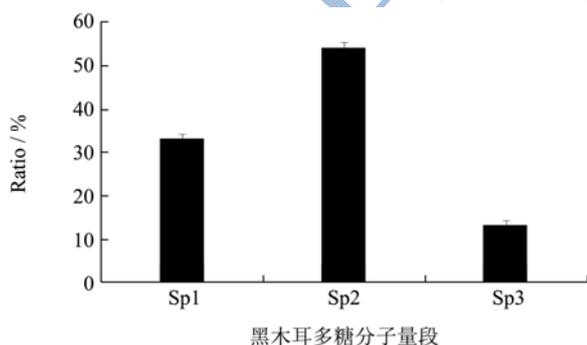


图 1 不同分子量段黑木耳多糖分布比例

Fig.1 Distribution proportion of *Auricularia auricula* polysaccharides with different molecular weight

中性未脱色黑木耳多糖经过超滤膜分离后, 不同分子量段黑木耳多糖占黑木耳多糖比例见图 1。

由图 1 可知, Sp2 占总多糖含量最高为 54%, Sp1 占总多糖含量 33%、Sp3 占总多糖含量 13%。采用苯酚-硫酸法、考马斯亮蓝法、3,5-二硝基水杨酸比色法

测定超滤前后总糖、蛋白质和还原糖含量的变化, 结果表明 Sp1 组分中蛋白质含量最高, Sp2、Sp3 中蛋白质含量较低, 可能由于蛋白质、糖蛋白等物质的分子量大于 100 ku 而无法透过第一层超滤膜, 因此仅对 Sp1 进行脱蛋白处理。脱蛋白后的 Sp1 多糖占总多糖比例减小, 可能是由于蛋白质、糖蛋白等被去除导致大分子黑木耳多糖所占比例降低。此外, Sp1、Sp2 中几乎不含还原糖, 由此说明超滤过程可以有效地去除小分子还原糖等杂质, 因此可以通过截留液中还原糖含量的多少来判断超滤结点。

2.3.2 不同分子量黑木耳多糖对 ABTS⁺· 的清除作用

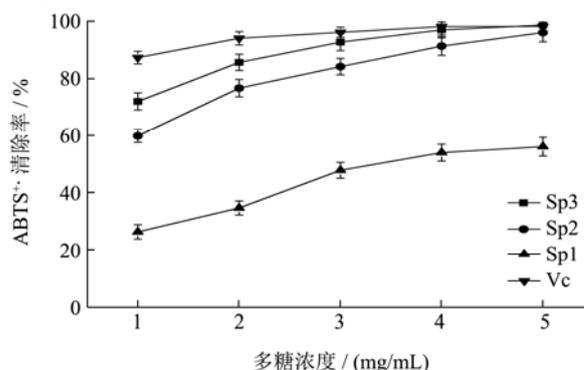


图 2 不同分子量黑木耳多糖对 ABTS⁺· 的抑制作用

Fig.2 Inhibition effects of *Auricularia auricula* polysaccharides with different molecular weight on ABTS⁺·

抗氧化剂提供电子或氢原子清除自由基, 导致 ABTS 溶液颜色发生变化, 通过吸光值测定清除 ABTS⁺· 能力, 从而反映抗氧化能力, 因此本实验研究了 Sp1、Sp2 和 Sp3 对 ABTS⁺· 的清除率, 结果如图 2

所示。

从图2中可以看出,三段分子量的中性未脱色黑木耳多糖和抗氧化剂Vc对 $ABTS^+$ 均有抑制作用,且与黑木耳多糖浓度呈现良好的量效关系,说明均具有较好的抗氧化能力^[20],多糖浓度大于4 mg/mL时抑制能力达到最高后趋于平缓。Sp1、Sp2、Sp3抑制能力均低于Vc,但Sp3抑制能力与Vc抑制能力相近。从图1中还可知,分子量大小不同显著影响黑木耳多糖对 $ABTS^+$ 的抑制能力,其中小分子量的Sp3对 $ABTS^+$ 的抑制能力最强可达到90%左右,其次是Sp2,抑制能力最弱的是大分子量的Sp1,为51%,因此说明小分子量的中性未脱色黑木耳多糖具有最好的抗氧化能力。何芳^[21]等超滤膜分级不同分子量条斑紫菜多糖的体外抗氧化性,结果表明分子量最小的条斑紫菜多糖具有最强的抗氧化活性,与本试验研究结果基本一致。

2.3.3 不同分子量黑木耳多糖对DPPH·的清除作用

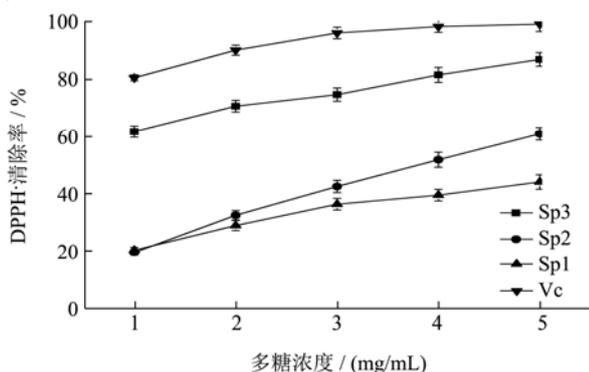


图3 不同分子量黑木耳多糖对DPPH·的清除作用

Fig.3 Scavenging effects of *Auricularia auricula* polysaccharides with different molecular weight on DPPH

抗氧化活性物质与DPPH·的孤对电子配对,深紫色的DPPH自由基被还原成黄色的DPPH-H非自由基形式,从而使溶液褪色,褪色程度与接受的电子数成定量关系^[22]。实验研究了Sp1、Sp2和Sp3对DPPH·的清除率,结果如图3所示。

由图3可知,在试验浓度范围内,三种不同分子量的黑木耳多糖随浓度增加,对DPPH·的清除率均呈现提高的趋势,呈明显的剂量依赖关系。黑木耳多糖能够清除DPPH·可能是多糖能够提供质子,配对孤对电子,使DPPH自由基生成稳定的化合物^[23]。三种分子量的黑木耳多糖对DPPH·的清除能力均显著弱于Vc。在黑木耳多糖质量浓度为5 mg/mL时,Sp3清除率最高为81%,是Sp2的1.42倍、Sp1的1.96倍,因此说明随着分子量的升高,多糖清除DPPH·的能力逐渐下降,最小分子量的多糖具有最强的抗氧化能力。

何喜珍等^[24]通过控制降解条件得到不同分子量的大豆多糖样品,并分别测定比较了四种多糖抗氧化活性,结果表明四种大豆多糖都有一定的抗氧化活性,但小分子量的285 ku大豆多糖对自由基的清除能力最强,还原能力最强。

2.3.4 不同分子量黑木耳多糖对·OH的清除作用

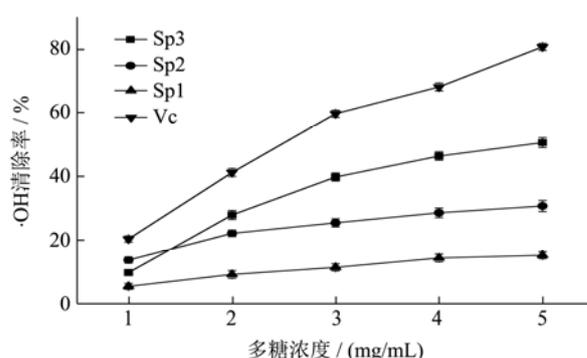


图4 不同分子量黑木耳多糖对·OH的清除作用

Fig.4 Scavenging effects of *Auricularia auricula* polysaccharides with different molecular weight on ·OH

羟基自由基是毒性最强的活性氧自由基,几乎能和所有的细胞成分发生反应,且反应速度很快,是生物体内过氧损伤的主要因素。试验研究了三种不同分子量的黑木耳多糖清除·OH的能力,结果如图4所示。

由图4可知,不同分子量段黑木耳多糖对于·OH均具有显著的清除作用,并且呈明显的量效关系。当三种分子量段的木耳多糖浓度为1 mg/mL时,对·OH清除率最低,当多糖浓度达到5 mg/mL时,对·OH清除率达到最大,其中Sp3对·OH清除率显著增加到50.56%,提高了5.15倍,Sp2对·OH清除率增加到30.75%,提高了2.23倍,Sp1对·OH清除率显著增加到15.12%,提高了2.78倍。与抗氧化剂Vc相比,三种不同分子量的黑木耳多糖的清除能力均低于Vc对·OH的清除能力。黑木耳多糖具有抑制和清除·OH的能力,主要是由于多糖分子中的醇羟基能够螯合金属离子,从而抑制了金属离子催化过氧化氢产生·OH的反应^[25]。同时从图中还可以看出,分子量的大小对黑木耳多糖清除·OH的能力具有显著影响,Sp3具有最高的·OH清除能力,Sp2次之,Sp1最差。不同分子量黑木耳多糖清除能力存在差异的原因可能是多糖大分子在溶液中的构象不同,导致发挥活性的醇羟基的数量不同,因此导致清除·OH的能力也有所不同。

2.3.5 不同分子量黑木耳多糖对O₂·的清除作用

超氧阴离子是反应性氧中间物的一种,是其他活

性氧的前体,能导致 DNA 损伤和细胞死亡,因此,清除超氧阴离子自由基在抗氧化过程中起着重要的作用,不同分子量的中性黑木耳多糖对超氧阴离子的清除能力见图 5。

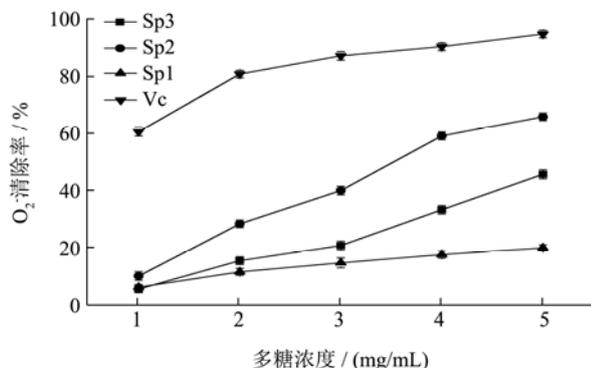


图 5 不同分子量黑木耳多糖对 O₂^{·-} 的清除作用

Fig.5 Scavenging effects of *Auricularia auricula* polysaccharides with different molecular weight on O₂^{·-}

邻苯三酚在碱性条件下可发生自氧化反应释放 O₂^{·-},并生成有色中间产物,该有色中间产物在 325 nm 波长处有特征吸收峰,黑木耳多糖中的活性氢与 O₂^{·-}反应生成水,终止 O₂^{·-}自由链基反应,从而阻止中间产物的积累^[26]。图 5 反映了 Sp1、Sp2、Sp3 对于 O₂^{·-}的清除能力。从图中可知,三种黑木耳多糖对 O₂^{·-}的清除能力均与剂量浓度呈正相关。总体来说,三个分子量段的黑木耳多糖清除 O₂^{·-}的能力强弱顺序为:Sp2、Sp3、Sp1,但三种分子量的黑木耳多糖清除 O₂^{·-}的能力均弱于 Vc 对 O₂^{·-}的清除能力。在试验浓度范围内,Sp1 的清除率从 6.01% 上升至 19.80%,Sp2 的清除率从 9.92% 上升至 65.41%,Sp3 的清除率从 5.34% 上升至 45.37%。结果表明 Sp2 具有更好的 O₂^{·-}清除功能。这可能是由于低分子量的多糖具有更多的醛酮类强电基团,且 Sp2 含量比 Sp1 高,因而具有更强清除 O₂^{·-}能力。

2.3.6 不同分子量黑木耳多糖总还原能力的比较

具有还原力的物质是通过提供氢原子来破坏自由基反应链,从而达到抗氧化的目的^[27]。Sp1、Sp2 和

Sp3 三种多糖总还原能力测定结果如图 6 所示。

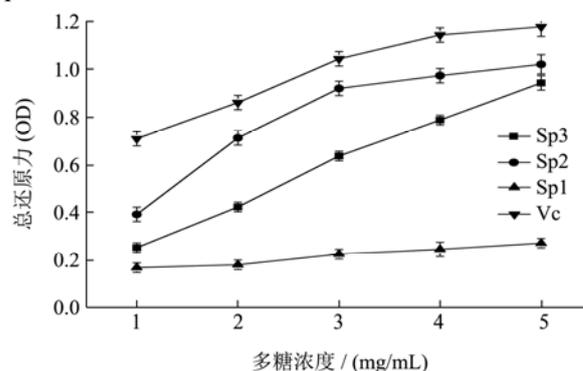


图 6 不同分子量黑木耳多糖的还原能力

Fig.6 Reducing capacity of *Auricularia auricula* polysaccharides with different molecular weight

从图 6 中可以看出,在试验浓度范围内,总还原力随着多糖的浓度升高而增强。与 Vc 相比,三种不同分子量的黑木耳多糖还原能力均低于 Vc 的还原能力。

当质量浓度为 5 mg/mL 时,总还原能力大小顺序为 Sp2、Sp3、Sp1,小分子量的黑木耳多糖具有较强还原金属离子的能力,这可能是由于相对分子量较小的黑木耳多糖结构松散,氢键作用弱,活性醛基易暴露在外,能够提供更多电子,且大分子量黑木耳多糖黏度大不利于发挥功能,相对分子量小的多糖更容易结合活性位点^[28]。刘红辉等^[29]采用超声辅助 H₂O₂-Vc 体系降解紫球藻胞外多糖,并用 Sepharose6B 对其进行分离,得到 3 种不同分子量的多糖,通过铁氰化钾法测定其还原力发现,紫球藻多糖各组分的总还原能力随多糖分子量的增大而不断减小。

2.4 不同分子量黑木耳多糖体外抗氧化能力比较

本试验通过计算得出 3 种不同分子量的中性黑木耳多糖各抗氧化指标的 IC₅₀ 值(半数清除率),并与抗氧化剂 Vc 及中性未脱色黑木耳多糖进行比较,试验结果见表 3。

表 3 不同分子量黑木耳多糖抗氧化指标 IC₅₀ 值比较

Table 3 Antioxidant indexes (IC₅₀) of *Auricularia auricula* polysaccharides with different molecular weight

	Sp1	Sp2	Sp3	Vc	中性未脱色黑木耳多糖
ABTS ⁺ ·	3.58±0.04 ^a	0.81±0.05 ^c	0.61±0.01 ^d	0.239±0.04 ^e	2.26±0.03 ^b
DPPH·	7.05±0.15 ^b	3.66±0.04 ^c	0.60±0.03 ^d	0.461±0.08 ^e	10.32±0.11 ^a
·OH	52.90±4.48 ^a	17.78±0.58 ^b	4.48±0.07 ^d	0.745±0.03 ^e	14.18±0.15 ^c
O ₂ ^{·-}	27.28±1.21 ^a	3.48±0.01 ^d	6.08±0.01 ^c	2.37±0.24 ^e	10.09±0.01 ^b
总还原能力	65.68±0.12 ^a	1.23±0.35 ^d	2.00±0.05 ^c	0.569±0.35 ^e	2.36±0.05 ^b

注:不同小写字母表示同一行比较具有显著性差异 (p<0.05)。

由表 3 可知, 具有较大分子量的 Sp1 对于抗氧化指标的清除能力均显著低于其他两种多糖, 且除 DPPH·外, 其余 4 种抗氧化指标的 IC₅₀ 均要高于中性未脱色黑木耳多糖。综上所述, 低分子量的黑木耳多糖具有更高的抗氧化活性。黑木耳多糖的分子量大小对生物活性的影响存在相关性, 结构决定理化性质, 分子体积较大, 黏度过大不利于反应, 分子体积较小耦合活性位点能力强, 但太小无法形成聚合结构, 从而影响活性。由于 Sp3 在中性未脱色黑木耳多糖中的含量较低, 且相对分子量过低, 故为考虑生产的可行性与便利性, 也可选择抗氧化性能比较好的 Sp2 量产。

2.5 黑木耳多糖分子量分级与抗氧化能力的相关性

为进一步研究不同分子量黑木耳多糖与抗氧化能力之间的相关性, 特通过 SPSS 统计学软件分析比较, 相关性结果见表 4。

由表 4 可知, 三种不同分子量的黑木耳多糖与 ABTS⁺清除能力、DPPH·清除能力、·OH 清除能力、O₂⁻清除能力、总还原力之间均存在相关性 ($p < 0.05$), 其中 Sp3 与各抗氧化指标间存在极显著相关 ($p < 0.01$), 其中 Sp3 与 ABTS⁺相关性是 0.942 ($p < 0.01$), 与 DPPH·相关性是 0.994 ($p < 0.01$), 与·OH 相关性是 0.962 ($p < 0.01$), 与 O₂⁻相关性是 0.991

($p < 0.01$), 与总还原力相关性是 0.998 ($p < 0.01$), Sp3 与各抗氧化指标间相关性最强, 其中 Sp1 与 ABTS⁺相关性是 0.871 ($p < 0.05$), 与 DPPH·相关性是 0.882 ($p < 0.05$), 与·OH 相关性是 0.884 ($p < 0.05$), 与 O₂⁻相关性是 0.816 ($p < 0.05$), 与总还原力相关性是 0.832 ($p < 0.05$), Sp1 与各抗氧化指标间相关性最弱, 由此可以看出相关性分析结果与上述抗氧化活性试验结果一致。可以说明小分子量的黑木耳多糖含量的多少与黑木耳多糖抗氧化能力的强弱呈正相关, 但是由图 1 可知, 黑木耳多糖中大分子量多糖占很大比例, 因此为开发具有较强抗氧化功能的黑木耳多糖可以通过对木耳多糖进行降解处理, 提高小分子量黑木耳多糖含量从而优化抗氧化木耳多糖的应用。此外研究报道多糖的抗氧化活性并非仅与分子量相关, 还与多糖的黏度、溶解度、糖苷键的构型、单糖组成、多糖构象以及连接点类型等因素有关^[30], 一般来说具有 β -螺旋型立体结构的多糖抗氧化活性较高, 有可拉伸带状或皱纹型带状的多糖抗氧化活性较低甚至没有, 而且多糖的水溶性提高, 其活性功能也会提高, 因此黑木耳多糖的体外抗氧化性理论上也是这些因素综合作用的结果。此外黑木耳多糖的体内抗氧化机理要比体外抗氧化复杂得多, 如类胡萝卜素等物质体外抗氧化能力弱, 但却具有一定体内抗氧化作用, 这与多糖及蛋白质等生物大分子体内缔合聚集所形成的微环境密切相关, 因此黑木耳多糖的体内抗氧化机理有待进一步研究。

表 4 黑木耳多糖分子量分级与抗氧化能力的相关性

Table 4 Correlation between grading molecular weight and antioxidant capacity of *Auricularia auricula* polysaccharides

	ABTS ⁺ 清除能力	DPPH·清除能力	·OH 清除能力	O ₂ ⁻ 清除能力	总还原力
Sp3	0.942*	0.994**	0.962**	0.991**	0.998*
Sp2	0.969**	0.997**	0.960**	0.991**	0.988**
Sp1	0.871*	0.882*	0.884*	0.816*	0.832*

注: *, 显著相关 ($p < 0.05$); **, 极显著相关 ($p < 0.01$)。

3 结论

本论文结果表明提取溶剂酸碱性和多糖分子量对黑木耳多糖的制备和抗氧化功能有显著的影响。酸性和碱性溶剂均能够提高黑木耳多糖的得率, 而且酸性条件有利于多糖的纯化。同时六种黑木耳多糖均具有一定的抗氧化活性, 其中中性未脱色黑木耳多糖的抗氧化活性最好。不同分子量中性未脱色黑木耳多糖抗氧化试验表明, 小分子量的 Sp3 抗氧化活性最好, 与 Vc 的抗氧活性相近, 相关性分析结果进一步证明, 小分子量多糖与抗氧化功能相关性最显著。本实验研究的结果为东北黑木耳的精深加工以及开发天然抗氧化剂的开发提供了科学数据。

参考文献

- [1] Bassenge E, Schneider H T, Daiber A. Oxidative stress and cardiovascular diseases [J]. Deutsche Wochenschrift, 2005, 130(50): 2904-9
- [2] Elmastas M, Isildak O, Turkecul I, et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2007, 20(4): 337-345
- [3] 许海林, 吴小勇, 聂少平, 等. 黑木耳多糖提取工艺优化及其对小鼠巨噬细胞功能的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 100-104
XU Hai-lin, WU Xiao-yong, NIE Shao-ping, et al.

- Optimization of extraction conditions of crude polysaccharide from *Auricularia auricular* and its effects on the functions of mouse peritoneal macrophages [J]. Food Science, 2016, 37(10): 100-104
- [4] Fan L S, Gong C R, Zhang S H. Study on radio-protective effects of the polysaccharide from *auricular auricula* in mice [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2005, 27(6): 525-526
- [5] Song G L, Du Q Z. Isolation of a polysaccharide with anticancer activity from *Auricularia polytricha* using high-speed countercurrent chromatography with an aqueous two-phase system [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(38): 5930-4
- [6] Ma J, Qiao Z, Xiang X. 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(3): 1061-1068
- [7] Xu Z, Li X, Feng S, et al. Characteristics and bioactivities of different molecular weight polysaccharides from camellia seed cake [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 1025
- [8] Zhong M, Zhong C, Wang T, et al. Activation of dendritic cells by low molecular weight oyster polysaccharides [J]. International Immunopharmacology, 2017, 44: 183
- [9] Yang F, Xiao C, Qu J, et al. Structural characterization of low molecular weight polysaccharide from *Astragalus membranaceus*, and its immunologic enhancement in recombinant protein vaccine against systemic candidiasis [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 145: 48-55
- [10] 姜帆, 韩建春, 陈成, 等. 超滤法分级纯化五味子多糖及其影响因素的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 276-279
JIANG Fan, HAN Jian-chun, CHEN Cheng, et al. Classification and purification of *Schisandra chinensis* polysaccharide by ultrafiltration and research of its influencing factors [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(20): 276-279
- [11] 刁文超, 王然, 王凤舞, 等. 超声波协同复合酶法提取南瓜多糖工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(18): 14-20
DIAO Wen-chao, WANG Ran, WANG Feng-wu, et al. Optimization of the extraction of pumpkin polysaccharides by combined ultrasonic treatment and multi-enzyme hydrolysis [J]. Food Science, 2012, 33(18): 14-20
- [12] Taruscio T G, Barney D L, Exon J. Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest Vaccinium berries [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2004, 52(10): 3169
- [13] Prior R L, Wilkes S E, Rogers T R. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(7): 3970-3976
- [14] Lai F R, Wen Q B, Lin L, et al. Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata L.*) hull with ultrasonic assisted treatment [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(2): 323-329
- [15] Chandrika L P, Fereidoon S. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2005, 93(1): 47-56
- [16] 周晔, 王伟, 陶冉. 超声波提取核桃内种皮多酚的响应面优化及其抗氧化研究[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(4): 73-78
ZHOU Ye, WANG Wei, TAO Ran. Optimization of extraction of phenolics from walnut pellicle using response surface methodology and their antioxidant capacities [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2013, 33(4): 73-78
- [17] 李翠丽, 王炜, 张英, 等. 中药多糖提取、分离纯化方法的研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(19): 2700-2703
LI Cui-li, WANG Wei, ZHANG Ying, et al. Research progress of extraction, isolation and purification methods of Polysaccharides from Chinese herbal medicine [J]. Chinese Pharmacy, 2016, 27(19): 2700-2703
- [18] 刘丽丽, 张玉倩, 韩现伟, 等. 酸性多糖中糖醛酸还原方法的改良[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(4): 1-7
LIU Li-li, ZHANG Yu-qian, HAN Xian-wei, et al. Modification of reduction method about uronic acids in acidic polysaccharides [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2014, 33(4): 1-7
- [19] 王文彤, 张岩, 陶遵威. 正交试验优化苦豆子多糖的双氧水脱色工艺研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1234-1237
WANG Wen-tong, ZHANG Yan, TAO Zun-wei. Optimization of decolorization technology of *Sophora alopecuroides* polysaccharide with H₂O₂ by orthogonal test [J]. Drugs & Clinic, 2014, 29(11): 1234-1237
- [20] Jeddou K B, Chaari F, Maktouf S, et al. Structural, functional and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potato peels [J]. Food Chemistry, 2016, 205: 97-105
- [21] 何芳, 汪之和, 马婉婉, 等. 不同分子量条斑紫菜多糖体外抗氧化活性研究[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(5): 783-788
HE Fang, WANG Zhi-he, MA Wan-wan, et al. Study on antioxidant activity of *Porphyra yezoensis* polysaccharides

- with different molecular weights in vitro [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(5): 783-788
- [22] 王姣,魏好程,何传波,等.鲍内脏多糖的抗氧化活性[J].食品科学,2017:4-5
WANG Jiao, WEI Hao-cheng, HE Chuan-bo, et al. Study on antioxidant activity of polysaccharides from abalone visceral [J]. Food Science, 2017: 4-5
- [23] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等.DPPH 法评价抗氧化活性研究进展[J].食品科学,2014,35(9):317-322
WEI Xian-ya, YIN Li-qin, ZHONG Cheng, et al. Advances in the DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity evaluation [J]. Food Science, 2014, 35(9): 317-322
- [24] 何喜珍,牛延宁,金明飞,等.不同分子量大豆多糖的表征和抗氧化研究[J].大豆科学,2016,35(5):805-808
HE Xi-zhen, NIU Yan-ning, JIN Ming-fei, et al. Characterization and antioxidation study of different molecular weight of soluble soybean polysaccharides [J]. Soybean Science, 2016, 35(5): 805-808
- [25] MACDONALD J, GALL E Y H F, WEBSTER N R. Oxidative stress and gene expression in sepsis [J]. British Journal of Anaesthesia, 2003, 90(2): 221-232
- [26] PAN Daodong, MEI Xiuming. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12 [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 908-914
- [27] PAN Y M, WANG K, HUANG S Q, et al. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of long an (*Dimocarpus long an* Lour.) peel [J]. Food Chemistry, 2008, 106: 1264-1270
- [28] 贾俊强,沈健,陈炼,等.蛹虫草多糖的酶法修饰及其抗氧化活性[J].食品科学,2013,34(1):114-120
JIA Jun-qiang, SHEN Jian, CHEN Lian, et al. Enzymatic modification and antioxidant activity of polysaccharides from *Cordyceps militaris* fruit bodies [J]. Food Science, 2013, 34(1): 114-120
- [29] 刘红辉,李敏,汲红丽,等.紫球藻胞外多糖抗氧化和保湿性能的研究[J].食品研究与开发,2014,35(5):1-6
LIU Hong-hui, LI Min, JI Hong-li, et al. Antioxidation and moisture retention activity of extracellular polysaccharides from *Porphyridium cruentum* [J]. Food Research and Development, 2014, 35(5): 1-6
- [30] Chen H X, Zhang M, Qu Z S, et al. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2008, 106: 559-563