

冠突散囊菌子囊孢子粗多糖抗氧化活性的比较分析

胡治远^{1,2}, 刘素纯¹, 刘石泉²

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128)

(2. 湖南城市学院黑茶金花湖南省重点实验室, 湖南益阳 413000)

摘要: 采用超微粉碎法、超声波法、反复冻融-研磨法, 对冠突散囊菌子囊孢子进行破壁处理, 探讨不同破壁方法对孢子粗多糖抗氧化活性的影响。结果表明, 破壁率由高至低依次为反复冻融-研磨法(93.73%)、超微粉碎法(82.27%)、超声波法(66.54%), 粗多糖的提取率分别为2.18%、2.06%、1.84%, 均显著高于未破壁孢子(1.15%)。抗氧化试验表明, 3种破壁孢子粗多糖均具一定抗氧化活性, 且与质量浓度间存在着显著量效关系。以超微粉碎法破壁孢子粗多糖活性为最强, 在其质量浓度为2.50 mg/mL时, 对DPPH、OH、ABTS⁺三种自由基清除能力分别为89.13%、95.22%、80.26%, 铁离子还原能力为0.78。反复冻融-研磨组和超声波组粗多糖活性低于超微粉碎组, 说明此型号粉碎机低温下的高速剪切作用对冠突散囊菌子囊孢子多糖分子造成的损伤低于超声空化作用与反复冻融, 适宜用于冠突散囊菌子囊孢子的破壁。

关键词: 冠突散囊菌; 子囊孢子; 破壁; 粗多糖; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2019)09-102-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.012

Comparative Analysis of Antioxidant Activity of Crude Polysaccharides from *Eurotium cristatum* Ascospores

HU Zhi-yuan^{1,2}, LIU Su-chun¹, LIU Shi-quan²

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2. Hunan Provincial Key Laboratory of Dark Tea and Jin-hua, Hunan City University, Yiyang 413000, China)

Abstract: The ultrafine grinding method, ultrasonic method, and repeated freeze-thaw and grinding method were used to break the wall of *Eurotium cristatum* ascospore. The effects of these wall-breaking methods on the antioxidant activity of crude polysaccharides from the ascospore were investigated. The results showed that the wall-breaking rate decreased in the order of the repeated freeze-thaw and grinding method (93.73%), the ultrafine grinding method (82.27%), and the ultrasonic method (66.54%), with their corresponding extraction rates for crude polysaccharides as 2.18%, 2.06% and 1.84%, respectively, all of which were significantly higher than the extraction rate for the unbroken spores (1.15%). The results of the antioxidant tests showed that the crude polysaccharides obtained from the three types of broken ascospores exhibited a certain degree of anti-oxidative activity (which had a significant relationship with the mass concentration: dose-dependent effect). The crude polysaccharide obtained from the broken ascospores by ultrafine grinding showed the highest antioxidant activity, and at a mass concentration of 2.50 mg/mL, its capacity to scavenge DPPH, ABTS⁺ and ·OH radicals was 89.13%, 95.22% and 80.26% respectively with the reducing capacity for iron ions being 0.78. The antioxidant activities of the crude polysaccharides obtained by the repeated freeze-thaw and grinding method and the ultrasonic method were lower than that obtained by the ultrafine grinding method. These results indicated that the damage on the polysaccharide molecules of *Eurotium cristatum* ascospore due to the high-speed shear generated by this type of crusher at low temperature was less than that caused by the ultrasonic cavitation and repeated freeze-thaw process. Thus, the ultrafine grinding method is suitable for breaking the cell wall of *Eurotium cristatum* ascospores.

Key words: *Eurotium cristatum*; ascospore; cell wall-broken; crude polysaccharides; antioxidant capacity

收稿日期: 2019-02-28

基金项目: 黑茶金花湖南省重点实验室项目(2016TP1022); 湖南省重点研发计划资助项目(2018NK2036); 益阳市科技计划项目(2017YZ04)

作者简介: 胡治远(1987-), 男, 讲师, 在读博士, 研究方向: 园艺产品采后科学与技术

通讯作者: 刘素纯(1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 园艺产品采后科学与技术

冠突散囊菌 (*Eurotium cristatum*) 是茯砖茶发花过程中的优势微生物, 在茯砖茶进入到烘房的中后期, 冠突散囊菌有性繁殖结构-闭囊壳开始大量堆积从而形成肉眼可见的金黄色颗粒^[1], 俗称“金花”, “金花”的颗粒大小、数量多少是判定茯砖茶品质优劣的重要依据^[2]。近年来, 随着天然药物研发的升温, 研究者们也愈加重视冠突散囊菌保健价值的开发。大量相关研究证实, 冠突散囊菌所发酵的茶叶或其他代谢产物具有抑菌^[3]、抗辐射^[4]、降脂^[5,6]、降糖^[7]、抗氧化^[8,9]、增强免疫^[10]、减肥^[11]等保健作用。但对于冠突散囊菌菌体自身活性成分的研究则相对较少, 对其子囊孢子中多糖的开发利用尚未见于报道。此外, 冠突散囊菌子囊孢子有一层较厚的孢子壁^[12], 其质地坚韧、不易分解, 对孢子在干燥环境下的休眠具有积极意义, 但另一方面也阻碍了人体对其中物质的有效利用。探寻一种高效、对活性成分影响小的破壁方法, 是开发冠突散囊菌子囊孢子活性成分的重要前提。

本研究采用超微粉碎法、超声波法、反复冻融-研磨法三种物理方法对冠突散囊菌子囊孢子 (*Eurotium cristatum* ascospore, EA) 进行破壁处理, 分别获得超微粉碎破壁冠突散囊菌子囊孢子 (ultrafine grinding broken *Eurotium cristatum* ascospore, UGEA)、超声波破壁冠突散囊菌子囊孢子 (ultrasonic broken *Eurotium cristatum* ascospore, UEA)、反复冻融-研磨破壁冠突散囊菌子囊孢子 (repeated freezing and thawing-grinding broken *Eurotium cristatum* ascospore, REA), 用水提醇沉淀法提取破壁孢子内的粗多糖, 以 DPPH·、ABTS⁺·、·OH 三种自由基清除能力和铁离子还原能力的强弱为依据, 探讨孢子粗多糖的抗氧化活性, 以期冠突散囊菌孢子活性成分的综合利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

EA 采用茶渣固态发酵法^[13]制取: 选取冠突散囊菌 JH1205 (黑茶金花湖南省重点实验室提供), 制成孢子悬液并接种至茶渣培养基发酵, 干燥后轻微揉搓使孢子与基质分离, 过 200 目筛, 即获得试验所需 EA。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2'-联氮基双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 购自美国 Sigma 公司; 葡萄糖、苯酚、无水乙醇、三氯乙酸、氯化铁、邻苯三酚、甲醇、浓盐酸、二甲基亚砷、过氧化氢、铁氰化钾、七水合硫酸亚铁、水杨酸、丙酮、氢氧化钠、乙酸乙酯等均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

AUW220 型电子天平, 日本岛津公司; HH-2 型数显恒温水浴锅, 浙江力辰仪器科技有限公司; UVmini-1240 型紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; BLD-210 型倒置显微镜, 北京世纪科信科学仪器有限公司; JY96-IIN 型超声波细胞破碎仪, 上海沪析实业有限公司; RE-2000A 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; SIM/FD8-5P 型真空冷冻干燥机, 广州深华生物技术有限公司; Vortex-1 型漩涡振荡器, 上海沪析仪器设备有限公司; ZKY-6L 型超微粉碎机, 北京中科浩宇科技有限公司; S-3400N 型扫描电子显微镜, 日本日立公司。

1.3 试验方法

1.3.1 EA 破壁方法

1.3.1.1 超微粉碎机破壁处理

称取 200 g 干燥的 EA, 放入超微粉碎机内, 设置转速 1440 r/min、破碎槽温度-35 °C、破壁时间 15 min 进行处理, 获得 UGEA。

1.3.1.2 超声波破壁处理

称取 8 g 干燥的 EA, 放入 150 mL 烧杯内, 加入 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 100 mL, 搅拌使孢子分散, 将烧杯置冰水浴中进行超声破碎, 超声条件设置频率为 15 kHz、脉冲 6 s/间隙 6 s, 总处理时间为 20 min, 破壁完成后, 减压干燥获得 UEA, 重复进行数次以获得试验所需的材料量。

1.3.1.3 反复冻融-研磨破壁处理

称取 8 g EA 放入 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 70%乙醇并振摇混匀, 将离心管置液氮中冷却 5 min, 取出并置于水浴锅内 95 °C 水浴 5 min, 重复进行 3 次, 将孢子悬液转入研钵中研磨 10 min, 减压干燥获得 REA, 重复进行数次以获得试验所需的材料量。

1.3.2 不同破壁组样品的观察与破壁率统计

不同破壁方法处理 EA 的破壁率按血球计数板法进行统计, 将破壁的样品制片, 在 640 倍倒置显微镜下统计破壁和未破壁的孢子数量, 并计算破壁率。另将样品制片后^[14], 在扫描电子显微镜下观察孢子的破壁效果。

1.3.3 不同破壁方法 EA 粗多糖的提取

破壁 EA 样品粗多糖的提取采用水提醇沉淀法^[15,16], 分别称取 UGEA、UEA、REA 各 20 g, 加入 300 mL 蒸馏水, 在 55 °C 下回流提取 4 h, 过滤去除沉淀, 加入 60 mL 的 Sevage 试剂于滤液中并混合振荡 30 min, 离心后取上清液, 浓缩至 100 mL, 加入 400 mL

95%乙醇,在4℃冰箱内放置24h使多糖沉淀,8000 r/min离心收集沉淀物,即制成UGE A、UEA、REA粗多糖,用称量法计算样品粗多糖提取率。

1.3.4 总糖质量分数的测定

破壁EA总糖含量的测定采用苯酚-硫酸法进行^[15,16],以葡萄糖为标准品,测定其在490 nm处吸光度值,绘制苯酚-硫酸法标准曲线,标准曲线线性回归方程为: $Y=0.6645X+0.0110$, $R^2=0.997$ (X为葡萄糖溶液质量浓度mg/mL)。

称取0.01 g样品粗多糖,溶解并定容至100 mL,制成1.00 mg/mL多糖溶液。取1 mL多糖溶液置于试管中,加入1 mL蒸馏水,另取2 mL蒸馏水为空白对照,分别加入1 mL苯酚试剂并摇匀,迅速加入5 mL浓硫酸,混匀后静置20 min,在490 nm处测定吸光度,按式(1)计算多糖溶液的质量浓度。

$$W_2 = \frac{0.9W_1 \times V_1}{V_2} \quad (1)$$

式中: W_2 (mg/mL)为多糖溶液质量浓度; W_1 (mg/mL)为葡萄糖标准液质量浓度; V_1 (mL)为所测样液吸光度对应的葡萄糖标准液体积; V_2 (mL)为样液体积;0.9为校正系数。

计算出多糖质量浓度 W_2 后,按式(2)计算粗多糖样品中的总糖质量分数 W_x 。

$$W_x = \frac{W_2 \times V_2 \times n}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中: W_x (%)为总糖质量分数; V_2 (mL)为多糖样液体积; m (mg)为粗多糖样品的质量; n 为稀释倍数。

1.3.5 不同样品组粗多糖抗氧化活性的测定

1.3.5.1 DPPH清除能力测定

DPPH自由基清除能力的测定参考Wojdylo^[17]的试验方法进行,称取2 mg DPPH,用甲醇定容至10 mL,配成0.50 mmol/L DPPH溶液。称取不同重量的3组粗多糖样品加入蒸馏水制成不同浓度溶液(0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mg/mL),取1 mL多糖溶液,分别加入0.50 mmol/L DPPH溶液1 mL、60%乙醇溶液10 mL,混合均匀后置避光环境下反应30 min,于517 nm处测定样品组吸光值,另以Vc为阳性对照,每个样品重复测定3次,取平均值。以1 mL无水乙醇代替DPPH溶液,测定样品的本底吸光度 A_1 ;以1 mL蒸馏水代替粗多糖溶液测定空白对照吸光度 A_0 ,DPPH自由基清除率按式(3)计算。

$$I = \frac{A_0 - (A_x - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: I %为DPPH自由基清除率, A_0 为空白对照组吸光度, A_x 为样品组吸光度, A_1 为样品本底吸光度。

1.3.5.2 ·OH清除能力测定

样品组的·OH清除能力利用Feton反应来进行^[18]。取不同质量浓度(0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mg/mL)的3组样品溶液(见1.3.5.1)以及阳性对照Vc各1 mL,各加入2.25 mmol/L的FeSO₄溶液1 mL、9.00 mmol/L的水杨酸-甲醇溶液1 mL并摇匀、最后加入8.80 mmol/L的H₂O₂溶液1 mL,混合均匀后,37℃避光反应30 min,在波长510 nm处测定各组样品吸光度,每组测3个平行。以1.00 mL蒸馏水代替H₂O₂溶液测定样品本底吸光度 A_1 ,以1 mL蒸馏水代替粗多糖溶液测定空白对照吸光度 A_0 。按公式(4)计算·OH清除率。

$$I = \frac{A_0 - (A_x - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中: I 为·OH清除率,%, A_0 为空白对照组吸光度, A_x 为样品组吸光度, A_1 为样品本底吸光度。

1.3.5.3 ABTS·⁺清除能力测定

ABTS·⁺自由基清除能力的测定参考Shen Y^[19]的试验方法进行,称取38.14 mg ABTS,加入蒸馏水定容至10 mL,制成7.00 mmol/L ABTS溶液,另称取6.628 mg过硫酸钾,加入蒸馏水定容至10 mL,制成2.45 mmol/L过硫酸钾溶液,将两者混匀,常温避光放置12 h后,用磷酸缓冲液(pH 7.4)稀释该混合液,使其在734 nm处吸光值为0.70±0.02,即制成ABTS工作液。取不同质量浓度(0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mg/mL)的3组样品溶液(见1.3.5.1)以及Vc各1 mL,加入ABTS工作液6 mL,置于10 mL离心管内混合均匀,在30℃下水浴避光反应6 min,测定734 nm波长处的吸光度。以1 mL蒸馏水代替ABTS工作液测定样品本底吸光度 A_1 ,以1 mL蒸馏水代替粗多糖溶液测定空白对照吸光度 A_0 。按公式(5)计算ABTS·⁺清除率。

$$I = \frac{A_0 - (A_x - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中: I 为ABTS·⁺清除率,%, A_0 为空白对照组吸光度, A_x 为样品组吸光度, A_1 为样品本底吸光度。

1.3.5.4 还原力测定

样品组的还原力测定通过铁氰化钾法进行^[20]。取不同质量浓度(0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mg/mL)的3组破壁样品溶液(见1.3.5.1)以及Vc溶液各1 mL,各加入1 mL 1%铁氰化钾溶液、1 mL磷酸缓冲液(pH 6.6)混匀后,置水浴锅内50℃持续30 min,将试液取出,加入10%三氯乙酸溶液2 mL,置离心机内3000 r/min离心10 min,取1 mL上清液,加入等量蒸馏水、0.3%三氯化铁溶液0.2 mL,混合均匀后,置水浴锅内50℃反应10 min,在700 nm波长下测定样品的吸光

度。以 0.2 mL 蒸馏水代替三氯化铁溶液测定样品本底吸光度,按公式(6)计算还原力。

$$R=A_x-A_l \quad (6)$$

式中: R 为还原力, A_x 为样品组吸光度; A_l 为样品本底吸光度。

1.3.6 数据统计分析

孢子破壁处理与抗氧化试验重复进行 3 次,采用 DPS 15.10 对试验数据进行统计分析,显著性水平为 $p<0.05$,试验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 不同破壁方法对 EA 破壁效果及多糖得率的影响

由表 1 可知,三种破壁方法破壁率高低顺序为 REA>UGEA>UEA,其中反复冻融-研磨法处理的破壁率达到 93.73%,这说明,将 EA 孢子进行反复冻融处理时,孢子内的水分形成冰晶,造成外壁破损使其强度下降,此时再施加一定的机械力即可有效进行破壁。同时,冷冻下的孢子脆化程度大为提高,也更有利于破壁的完成,胡筱波等^[21]采用温差法对油菜花粉进行破壁得出了类似的研究结论。超微粉碎法是通过高速机械运动,产生的剪切力将孢子壁破坏或撕裂,达到使内容物溢出的目的,EA 孢子体积在(5.20~6.00 μm) \times (4.00~5.00 μm)之间^[12],颗粒极为微小,破壁需要较高的临界应力^[22]。此型号超微粉碎机在试验设置的条件下对 EA 的破壁率达到 82.27%,说明该仪器粉碎度已基本能满足 EA 破壁所需,还有待通过更改试验条件来进一步提升破壁率。超声波法破壁率为 66.14%,在三种方法中为最低,说明在本试验所选用的超声频率和持续时间下,由超声波所引起的空泡崩解和溃灭产生的剪切力还不足以充分裂解孢子壁^[23]。

在扫描电镜观察下,未经破壁处理的 EA 呈完整双凸镜形,结构完好(图 1a);经超声波破壁处理后(图 1b),视野中存在较多孢子碎片,但仍有较多孢子保持原有形状;经超微粉碎破壁处理后(图 1c),

部分孢子完全碎裂开,另一部分孢子大致保持完整,但表面出现裂口;经反复冻融-研磨破壁处理后(图 1d),已较难观察到结构完整的孢子,而是基本分解成大小不一的残片,同时内容物大量溢出,与孢子残片粘附在一起。可知反复冻融-研磨法所破壁的孢子不仅破壁率较高,而且孢子破裂程度高,在后续的提取过程中可更有效的将其孢内物质溶出。

水提醇沉淀法提取 EA、UGEA、UEA、REA 所获的粗多糖提取率分别为 1.15%、2.06%、1.84%、2.18%,可知多糖提取率随破壁率升高而增加,这说明 EA 孢子壁是阻碍孢子中多糖成分溶出的重要因素。EA、UGEA、UEA、REA 粗多糖中总糖含量分别为 69.73%、70.22%、65.53%、63.34%,4 组样品中主要成分均为多糖,其中 UEA 与 REA 中总糖含量较为接近,低于 UGEA 与 EA,推测是此型号粉碎机低温下的高速剪切作用对多糖分子造成的损伤低于超声空化作用与反复冻融,也有可能是不同的破壁工艺使粗多糖中杂质含量变化所致,对于 EA 多糖的具体组成成分还有待进一步研究。此外,EA 中其他活性成分如黄色素、生物碱等也对高温、pH 变化较为敏感^[24,25],因此,相对温和的破壁及提取方法是开发冠突散囊菌活性成分的重要前提。

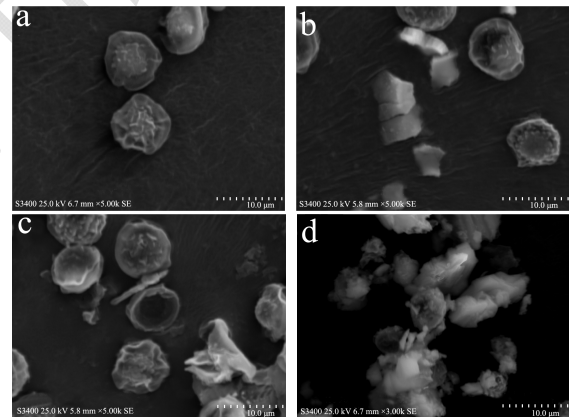


图 1 不同样品组的电镜图片

Fig.1 Electron microscopy photographs of different sample groups

注: a: EA; b: UEA; c: UGEA; d: REA。

表 1 不同样品组的破壁率、粗多糖提取率与总糖含量

Table 1 The broken wall rate, crude polysaccharide extraction rate and total sugar content in different sample groups

破壁方法	破壁率/%	粗多糖得率/%	总糖含量/%
未破壁子囊孢子 (EA)	0	1.15±0.09 ^b	69.73±7.06 ^a
超微粉碎机破壁 (UGEA)	82.27±10.74 ^b	2.06±0.18 ^a	70.22±4.62 ^a
超声波破壁 (UEA)	66.54±5.26 ^c	1.84±0.12 ^a	65.53±8.21 ^b
反复冻融-研磨破壁 (REA)	93.73±7.24 ^a	2.18±0.06 ^a	63.34±5.16 ^b

注: 同一列中小写字母不同代表各组数据间的 5%显著性差异水平 ($p<0.05$); 测试重复样本数 $n=3$ 。

2.2 不同破壁方法对样品粗多糖的 DPPH 清除能力影响

DPPH 自由基是一种以氮为中心的质子自由基, 当其溶液中有抗氧化剂存在时, 可与其电子配对使溶液颜色变浅, 且褪色程度与抗氧化能力正相关, 可依托吸光度测定来分析抗氧化剂的活性强弱^[26]。由图 2 可知, EA 经不同破壁处理后所提粗多糖均对 DPPH 自由基有显著清除作用。3 组粗多糖在质量浓度为 0.50~1.50 mg/mL 时, DPPH 清除能力随多糖浓度上升而快速增强, 超过 2.00 mg/mL 后上升较慢。在质量浓度为 2.50 mg/mL 时, UGEA、UEA、REA 三组粗多糖对 DPPH 自由基清除率分别为 89.13%、84.81%、67.04%, 相同浓度下 UGEA 粗多糖的清除率与 UEA 接近。参照杨新河等^[27]利用不同茶类提取物清除 DPPH 的研究, EA 粗多糖对 DPPH 自由基清除率相较于茯砖茶的清除率 (41.14%) 有明显优势, 说明 EA 内含成分可能是茯砖茶中抗氧化物质的重要来源。

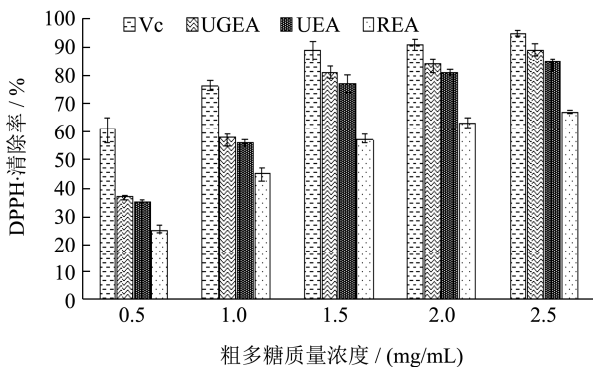


图 2 不同样品组粗多糖 DPPH 清除率

Fig.2 DPPH clearance rate of crude polysaccharides from different sample groups

2.3 不同破壁方法对样品粗多糖的 ·OH 清除能力影响

·OH 自由基具有极强的得电子能力, 能与大多数物质发生氧化反应, 有效清除 ·OH 自由基是降低人体过氧化损伤的重要因素^[28]。由图 3 可知, 不同破壁处理后的孢子粗多糖对 ·OH 自由基的清除能力均较为显著, 且清除率与粗多糖质量浓度之间存在显著的量效关系。相同质量浓度下, 3 组样品粗多糖对 ·OH 自由基的清除能力由强至弱分别是 UGEA、UEA 和 REA, 其中效果最好的 UGEA 组, 在粗多糖质量浓度超过 2.00 mg/mL 时, 其 ·OH 清除率曲线几乎与 Vc 重叠, 质量浓度为 2.50 mg/mL 时 ·OH 清除率更是达到了

95.22%。·OH 清除能力相对较弱的 REA 组, 在质量浓度为 2.50 mg/mL 时, 仍有 76.19% 的清除率。说明 EA 粗多糖具有较强清除 ·OH 自由基的能力。

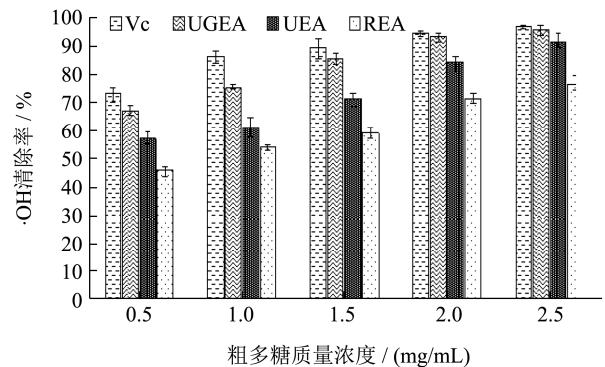


图 3 不同样品组粗多糖 ·OH 清除率

Fig.3 ·OH clearance rate of crude polysaccharides from different sample groups

2.4 不同破壁方法对样品粗多糖的 ABTS⁺清除能力影响

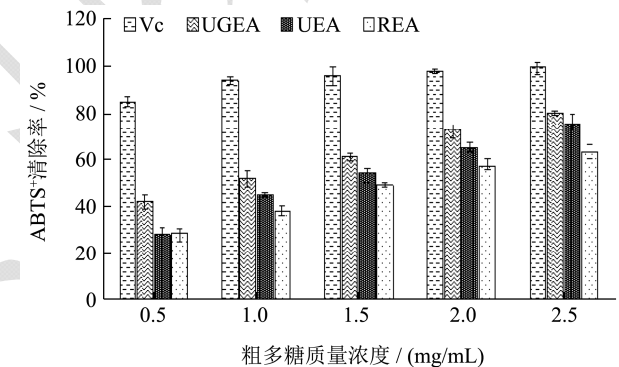


图 4 不同样品组粗多糖 ABTS⁺清除率

Fig.4 ABTS⁺ clearance rate of crude polysaccharides from different sample groups

ABTS 溶液经硫酸钾氧化后生成较为稳定的自由基阳离子 ABTS⁺, 其溶液色泽为蓝绿色, 抗氧化剂可使之还原而褪色^[29]。由图 4 可知, EA 经不同破壁处理后的粗多糖对 ABTS⁺自由基均具有一定清除能力, 其活性规律与对 DPPH 自由基及 ·OH 自由基的清除率变化规律较为一致, 且呈现出较为显著的剂量依赖性。UGEA、UEA 和 REA 粗多糖在质量浓度为 0.25 mg/mL 时清除率分别为 80.26%、75.61%、63.19%, 对比前两组抗氧化试验结果, 可知 EA 粗多糖对 ABTS⁺的清除能力略弱于 DPPH 与 ·OH, 但仍有一定利用价值。欧阳梅等^[30]的研究发现经过冠突散囊菌发酵后的绿茶提取物浓度为 6 mg/mL 时对 ABTS⁺自由基的清除率为 56.09%, 远超过未发酵的绿毛茶 (34.06%), 说明茯砖茶抗氧化活性与冠突散囊菌的代谢活动是密不

可分的。

2.5 不同破壁方法对样品粗多糖的还原能力

影响

还原能力可较大程度反映物质的潜在抗氧化活性^[31]，由图 5 可知，UGEA 组和 UEA 组粗多糖铁离子还原能力较为接近，显著低于同浓度下的 Vc 溶液。在试验取样的质量浓度范围内，还原能力随浓度上升而缓慢提升。当粗多糖质量浓度为 2.50 mg/mL 时，UGEA、UEA 和 REA 三组样品的铁离子还原力依次为 0.78、0.69、0.54，可见不同破壁方法 EA 粗多糖仍具有一定的还原能力，通过与金亮等^[32]的研究结果对比，可知 EA 粗多糖还原能力强于相同质量浓度下发酵茶（普洱熟茶）的提取物，说明其可作为一种较好的电子供应者从而终止自由基链的反应，具有一定潜在抗氧化活性。

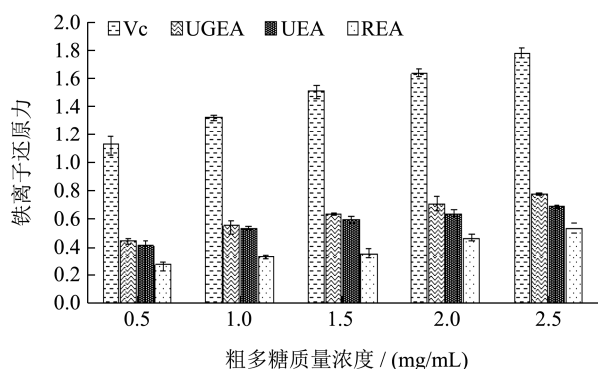


图 5 不同样品组粗多糖还原能力

Fig.5 Reducing power of crude polysaccharides from different sample groups

3 结论

3.1 采用超微粉碎法、超声波法、反复冻融-研磨法三种不同方法对 EA 进行破壁处理，其破壁率分别为 82.27%、66.54%、93.73%。超微粉碎法、超声波法破壁率低于反复冻融-研磨法，说明 EA 坚韧的孢子壁在超微粉碎机高速剪切、摩擦及超声波空化作用下仍具有维系原构造的能力，而反复冻融过程可有效降低其孢子壁物理强度，从而提高破壁率。用水提醇沉淀法对破壁孢子进行提取后，所获粗多糖的得率分别为 2.06%、1.84%、2.18%，与破壁率呈正相关，均显著高于未破壁孢子的 1.15%，可知 EA 孢子壁是阻碍其内含物溶出的关键因素，对子囊孢子进行破壁处理可以有效提高其活性物质的溶出率。

3.2 抗氧化试验结果表明，不同方法破壁粗多糖的质量浓度与 DPPH、·OH、ABTS⁺三种自由基的清除能

力以及铁离子还原能力间均存在着一定的量效关系。三种破壁方法中，以超微粉碎 EA 粗多糖综合抗氧化活性为最强，尤其是对 DPPH、·OH 两种自由基的清除能力较为显著，具有一定的开发价值。此外，超微粉碎法还具有处理量大、操作时间短等优点，也有助于保持 EA 内含成分的活性，可作为破壁的首选方法。对于超微粉碎法破壁率仍不够理想的问题，可通过更改试验设置以进一步提升破壁率；或采用对破壁孢子进行预处理的方式，如在粉碎前进行酶处理、化学处理的方式进行复合破壁。对冠突散囊菌子囊孢子多糖构象及其抗氧化活性的作用机理，还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Yong-yi Ge, Yu-chen Wang, Yong-xiang Liu, et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses of the Fuzhuan brick tea-fermentation fungus *Aspergillus cristatus* [J]. BMC Genomics, 2016, 17: 428
- [2] 国家质量监督检验检疫总局. 紧压茶: 茯砖茶标准: GB/T 9833.3-2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Compressed Tea: Fuzhuan Tea Standard: GB/T 9833-2013 [S]. Beijing: China standard press, 2013
- [3] 李佳莲, 胡博涵, 赵勇彪, 等. 冠突散囊菌发酵液的抑菌作用 [J]. 食品科学, 2011, 32(11): 157-160
LI Jia-lian, HU Bo-han, ZHAO Yong-biao, et al. Anti-microbial activity of fermentation supernatants of *Eurotium cristatum* [J]. Food Science, 2011, 32(11): 157-160
- [4] Long W, Zhang G, Dong Y. Dark tea extract mitigates hematopoietic radiation injury with antioxidative [J]. Journal of Radiation Research, 2018, 59(4): 387-394
- [5] Peng Y, Xiong Z, Li J, et al. Water extract of the fungi from Fuzhuan brick tea improves the beneficial function on inhibiting fat deposition [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 2014, 65(5): 610-614
- [6] Liu T. Effect of *Eurotium cristatum* fermented dark tea extract on body weight and blood lipid in rats [J]. Journal of the American Academy of Nutrition and Dietetics, 2016, 116(9): 77-78
- [7] Yamashita Y, Wang L H, Zhang T S, et al. Fermented tea improves glucose intolerance in mice by enhancing translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(45): 11366-11371
- [8] Hp Lv, Zhang Y, Shi J, et al. Phytochemical profiles and

- antioxidant activities of Chinese dark teas obtained by different processing technologies [J]. *Food Research International*, 2016, 100(3): 486-493
- [9] Yao Y, Wu M, Huang Y, et al. Appropriately raising fermentation temperature beneficial to the increase of antioxidant activity and gallic acid content in *Eurotium cristatum*-fermented loose tea [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 82: 248-254
- [10] Zheng-Fei Yan, Pei Lin, Moo-Chang Kook, et al. Immune activation effects of *Eurotium cristatum* on T cells through NF- κ B signaling pathways in humans [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2017, 28(3): 388-402
- [11] Li Q, Liu Z, Huang J, et al. Anti-obesity and hypolipidemic effects of Fuzhuan brick tea water extract in high fat diet induced obese rats [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, 93(6): 1310-1316
- [12] 黄浩,郑红发,赵熙,等.不同茶类发花茯茶中“金花”菌的分离、鉴定及产黄曲霉毒素分析[J].*食品科学*,2017,38(8):49-55
HUANG Hao, ZHENG Hong-fa, ZHAO Xi, et al. Identification and aflatoxin production of “Golden Flora” fungi isolated from Fu tea produced from different kinds of tea [J]. *Food Science*, 2017, 38(8): 49-55
- [13] 胡治远.一种茶渣添加营养液循环制备金花工艺: ZL201410114978.0[P].2014-06-18
HU Zhi-yuan. Jinhua preparation process with a kind of tea residue added nutrient solution: ZL201410114978.0 [P]. 2014-06-18
- [14] 晏荣军,尹平河,裘俊红.2株球形棕囊藻溶藻细菌的分离及鉴定[J].*环境科学*,2011,32(1):225-230
YAN Rong-jun, YIN Ping-he, QIU Jun-hong, et al. Isolation and characterization of two marine *Algicidal bacteria* against the phaeocystis globosa [J]. *Environmental Science*, 2011, 32(1): 225-230
- [15] 于华峥,刘艳芳,周帅,等.灵芝子实体、菌丝体及孢子粉中多糖成分差异比较研究[J].*菌物学报*,2016,35(2):170-177
YU Hua-zheng, LIU Yan-fang, ZHOU Shuai, et al. Comparison of the polysaccharides from fruiting bodies, mycelia and spore powder of *Ganoderma lingzhi* [J]. *Mycosystema*, 2016, 35(2): 170-177
- [16] 龚淑俐,邓放明,周向荣.冠突散囊菌胞外多糖提取工艺研究[J].*现代食品科技*,2007,2:48-50
GONG Shu-li, DENG Fang-ming, ZHOU Xian-rong. Extraction techniques of extracellular polysaccharide of *Eurotium cristatum* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 2: 48-50
- [17] Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs [J]. *Food Chemistry*, 2007, 105: 940-949
- [18] 范菁华,徐怀德,李钰金,等.超声波辅助提取花椒叶总黄酮及其体外抗氧化性研究[J].*中国食品学报*,2010,10(6):22-28
FAN Qin-hua, XU Huai-de, LI Yu-jin, et al. Ultrasonic assisted extraction of total flavonoids from Chinese prickly ash leaves and its antioxidant activity *in vitro* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010, 10(6): 22-28
- [19] Shen Y, Jin L, Xiao P, et al. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight [J]. *Journal of Cereal Science*, 2009, 49(1): 106-111
- [20] 李慧翔,倪辉,黄高凌,等.破壁方法和溶剂对法夫酵母提取物抗氧化活性的影响[J].*中国食品学报*,2015,15(6):76-82
LI Hui-xiang, NI Hui, HUANG Gao-ling, et al. Effects of wall breaking methods and solvents on the antioxidant activity of fermenting yeast extract [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(6): 76-82
- [21] 胡筱波,徐明刚,吴谋成,等.温差破壁法对油菜花粉中主要营养素含量的影响[J].*食品科学*,2005,10:120-124
HU Xiao-bo, XU Ming-gang, WU Mou-cheng, et al. Study on the effect of temperature change wall-broken method on the content of the main nutrient in rape pollen [J]. *Food Science*, 2005, 10: 120-124
- [22] 李琦,张兰威,韩雪,等.破壁方法对嗜热链球菌SP1.1胞内乳糖代谢关键酶活性的影响及其条件优化[J].*食品科学*, 2011,32(9):183-187
LI Qi, ZHANG Lan-wei, HAN Xue, et al. Effect of different cell wall disruption methods on key enzyme activities involved in intracellular lactose metabolism in *Streptococcus thermophilus* SP1.1 and optimization of lysozyme digestion conditions [J]. *Food Science*, 2011, 32(9): 183-187
- [23] Lida Y, Tuziuti T, Yasui K, et al. Protein release from yeast cells as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field [J]. *Ultra-sonics Sonochemistry*, 2008, 15(6): 995-1000
- [24] 李莹.冠突散囊菌化学成分及其抗氧化活性研究[D].北京:北京中医药大学,2014:18-25
LI Ying. Study on the chemical constituents and antioxidant activities of *Eurotium cristatum* [D]. Bei Jing: Bei Jing University of Chinese Medicine, 2014: 18-25
- [25] 李玉婷,吕嘉彬.金花菌黄色素的稳定性及其抗氧化活性研

- 究[J].微生物学通报,2013,40(11):2030-2036
- LI Yu-ting LÜ Jia-li. Study on stability and antioxidant activity of the yellow pigments from *Eurotium cristatum* [J]. Microbiology China, 2013, 40(11): 2030-2036
- [26] 郭刚军,彭春秀,何享,等.云南晒青毛茶提取物抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2013,13(8):42-48
- GUO Gang-jun, Peng Chun-xiu, He Xiang, et al. Study on the antioxidant activity of extracts from Yunnan Sun-dried tea [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(8): 42-48
- [27] 杨新河,黄明军,马蔚,等.不同黑茶多糖的组成分析及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2017,38(20):16-20
- YANG Xin-he, HUANG MING-jun, MA Wei, et al. Composition and antioxidant activity of polysaccharides of different dark tea [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(20): 16-20
- [28] 赵楠楠,朱晓冉,李德海.红松壳多酚、黄酮和多糖含量及抗氧化活性相关性的研究[J].现代食品科技,2017,33(12): 44-49, 55
- ZHAO Nan-nan, ZHU Xiao-ran, LI De-hai. Study on the correlation between contents of polyphenols, flavonoids, polysaccharides in *Pinus koraiensis* seed putamina and their antioxidant [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(12): 44-49, 55
- [29] Miller N J, Rice-Evans C, Davies M J, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates [J]. Clinical Chemistry, 1993, 84(4): 407-412
- [30] 欧阳梅,熊昌云,屠幼英,等.冠突散囊菌对茶叶品质成分及其抗氧化活性影响[J].菌物学报,2011,30(2):343-348
- OUYANG Mei, XIONG Chang-yun, TU You-ying, et al. Effects of *Eurotium cristatum* on tea quality and antioxidant activity [J]. Mycosystema, 2011, 30(2): 343-348
- [31] Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorisation assay [J]. Free Radical Bio Med, 1999, 26: 1231-1237
- [32] 金亮,李小白,丁华侨,等.不同种类茶叶抗氧化活性及茶汤颜色参数比较[J].中国食品学报,2016,16(2):242-250
- JIN Liang, LI Xiao-bai, DING Hua-qiao, et al. Comparison of antioxidant activity and color parameters of tea soup among different kinds of tea [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(2): 242-250

(上接第 152 页)

- [24] 杨玉玲,周磊,游远,等.氧化对肌原纤维蛋白热诱导凝胶质构特性及保水性的影响[J].中国农业科学,2018,51(18):141-152
- YANG Yu-ling, ZHOU Lei, YOU Yuan, et al. The effects of oxidation on textural properties and water holding capacity of heat-induced myofibrillar protein gel [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(18): 141-152
- [25] Li C P, Ibrahim H R, Sugimoto Y, et al. Improvement of functional properties of egg white protein through phosphorylation by dry-Heating in the presence of pyrophosphate [J]. Journal of Food Science, 2010, 73(2): 84-91
- [26] Chen L, Chen J, Ren J, et al. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 887-897
- [27] 王宁,王晓拓,丁武,等.辐照剂量率对牛肉脂肪和蛋白氧化及蛋白特性的影响[J].现代食品科技,2015,31(8):122-128
- WANG Ning, WANG Xiao-tuo, DING Wu, et al. Effect of dose rate on lipid and protein oxidation and the properties of beef proteins [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(8): 122-128
- [28] Huang L, Wang T, Han Z, et al. Effect of egg yolk freezing on properties of mayonnaise [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 56: 311-317
- [29] Safonova O N, Kholodova E A, Golota V I. Ozone usage for adjustment of technological properties of wheat baking flour [C] // In Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food. Athens: Greece, 2011: 1-6

(上接第 218 页)

- [22] 王珂,马海乐,叶晓非.菊粉双频逆流聚能式超声辅助提取技术及其抗氧化活性研究[J].中国农业科技导报,2015, 17(5):81-87
- WANG Ke, MA Hai-le, YE Xiao-fei. Studies on dual-frequency countercurrent energy-gathered ultrasonic-assisted extraction technology and antioxidant activity of inulin [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2015, 17(5): 81-87