

黑松露多糖提取工艺优化及体外抗氧化活性分析

国琦^{1,2}, 梁双敏^{1,2}, 葛长荣¹, 肖智超^{1,2*}

(1. 云南农业大学云南省畜产品加工工程技术研究中心, 云南昆明 650201)

(2. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201)

摘要: 选取云南黑松露为研究对象, 对黑松露多糖优化提取工艺, 纯化后单糖组成和体外抗氧化活性进行研究。应用响应曲面法优化后最佳提取工艺条件为: 提取温度 75.36 °C, 提取时间 1.02 h 与料液比 1:31.32 g/mL, 在此条件下, 多糖的实验得率为 11.79%, 预测得率为 11.86%。采用 DEAE-Sepharose 快速流动柱从黑松露粗多糖中分离纯化出 4 个新的多糖组分(TSP-1、TSP-2、TSP-3、TSP-4)。应用离子色谱法分析多糖成分, 得出 TSP-1 的单糖组成为盐酸氨基半乳糖、葡萄糖和甘露糖, 比例为 2.8:77.1:20; TSP-2 为鼠李糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖, 比例为 18.7:1.5:2:40.6:37.3; TSP-3 为鼠李糖、盐酸氨基葡萄糖、葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和半乳糖的比例为 13:3.5:58.4:21.1:2.7:1.2。粗多糖(crud TSP)和 TSP-1、TSP-2、TSP-3 三个纯化组分多糖浓度在 0.25~4 mg/mL 范围内, 对 DPPH 自由基的最大清除率分别为 73.93%、36.67%、73.60%和 54.10%; 对 ABTS 自由基的最大清除率分别为 60.47%、36.20%、41.87%和 52.73%; 金属螯合力分别为 61.63%、27.00%、52.50%和 43.17%; 还原力吸光度值分别为 0.39、0.34、0.28 和 0.56。该研究旨在为研究黑松露多糖具生物活性的物质基础及开发利用提供理论依据, 并对其保健食品研发具有重要意义。

关键词: 黑松露多糖; 提取率; 分离纯化; 单糖组成; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2021)12-187-196

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0263

Extraction Optimization for the Polysaccharides from *Tuber sinense* and Their *in vitro* Antioxidant Activities

GUO Qi^{1,2}, LIANG Shuangmin^{1,2}, GE Changrong¹, XIAO Zhichao^{1,2*}

(1. Livestock Product Processing and Engineering Technology Research Center of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: *Tuber sinense* from Yunan was used as the research object, and the extraction process for extracting polysaccharides from *Tuber sinense* was optimized. The monosaccharide compositions and *in vitro* antioxidant activities of the purified polysaccharides were analyzed. The optimal extraction conditions obtained *via* optimization by the response surface method were as follows: extraction temperature 75.36 °C, extraction time 1.02 h and material-liquid ratio 1:31.32 (g/mL). Under these conditions, the experimental yield of polysaccharides was 11.79%, whilst the predictive yield was 11.86%. Four new polysaccharide fractions (TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4) were separated and purified from the crude polysaccharides from *Tuber sinense* by using the DEAE-sepharose fast flow column. The compositions of the polysaccharides were analyzed by ion chromatography. The monosaccharide components of TSP-1 included galactosamine hydrochloride, glucose and mannose in a ratio of 2.8:77.1:20; TSP-2 included rhamnose, glucosamine hydrochloride, galactose and mannose in a ratio of 18:1.4:44.7:35.9; TSP-3 was composed of rhamnose, glucosamine hydrochloride, glucose, mannose, glucuronic acid and galactose in a ratio of 13:3.5:58.4:21.1:2.7:1.2. In the range of 0.25~4 mg/mL, the maximum rates of crude polysaccharide (crud TSP), TSP-1, TSP-2 and TSP-3 were 73.93%, 36.67%, 73.60% and

引文格式:

国琦,梁双敏,葛长荣,等.黑松露多糖提取工艺优化及体外抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2021,37(12):187-196,+308

GUO Qi, LIANG Shuangmin, GE Changrong, et al. Extraction optimization for the polysaccharides from *Tuber sinense* and their *in vitro* antioxidant activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 187-196, +308

收稿日期: 2021-03-12

基金项目: 云南省科技厅基础研究项目青年项目(2020FD016); 云南省教育厅科研基金项目(2020J0253)

作者简介: 国琦(1996-), 女, 硕士研究生在读, 研究方向: 功能性食品, E-mail: 2456058720@qq.com

通讯作者: 肖智超(1985-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 畜产品加工、功能性食品, E-mail: ynzcxiao@126.com

54.10% for scavenging DPPH radical, 60.47%, 36.20%, 41.87% and 52.73% for scavenging ABTS radical, 61.63%, 27.00%, 52.50% and 43.17% for chelating metal, and 0.39, 0.34, 0.28, 0.56 for the absorbance corresponding to reducing power. This research aimed to provide a theoretical foundation for the study of the bioactive material basis and the development and utilization of *Tuber sinense* polysaccharides. The research results are of great significance to the research and development of wellness foods.

Key words: *Tuber sinense* polysaccharides; extraction rate; separation and purification; monosaccharide composition; antioxidant activities

黑松露 (*Tuber sinense*), 中国地区别名又叫做块菌、无娘果等, 属于囊菌门, 西洋块菌科, 西洋块菌属^[1-2]。是一种生长在地表下且能与松科、榛科、壳斗科、桦木科等树木共生的野生食用菌^[3]。其子囊果呈不规则的半球形或块状, 其表面以黑褐色或暗色为主并呈现出明显的疣突, 成熟的黑松露切面白褐相间, 如同大理石纹样^[4]。黑松露的生长条件十分严格, 光照、水分、土壤 pH、微生物等因素对其生长有影响^[5-6]。黑松露风味独特, 营养价值丰富, 含有人体所需的多种营养物质, 如多糖、蛋白质、氨基酸、多不饱和脂肪酸、维生素和微量元素等, 与鱼子酱和鹅肝一起被称为世界三大美食^[7-8]。欧洲和亚洲是黑松露的主要产地^[9-10], 根据 DNA 数据和地理分布分析, 亚洲块菌物种群包括 6 个物种: 中国块菌 (*Tuber sinense*)、台湾块菌 *T. formosanum*、易贡块菌 *T. yigongense*、长刺块菌 *T. longispinosum*、喜马拉雅块菌 *T. himalayense* 和印度块菌 *T. indicum*^[11-13]。近年来, 食用菌多糖的免疫活性、抗氧化、降血糖、抗肿瘤和降血脂等生物活性被逐渐证实, 但目前针对黑松露的研究主要集中于其化学成分, 提取纯化等基础研究, 对于黑松露多糖的单糖组成、单糖结构、生物活性 (抗菌、抗肿瘤等) 及其作用机制的研究较少^[14-16], 这成为制约黑松露资源深度开发利用的瓶颈。

因此, 本研究选取云南黑松露, 采用超声波辅助水提醇沉法提取黑松露多糖, 采用响应曲面法优化提取工艺。并对纯化后黑松露多糖的单糖组成、摩尔比等结构特征进行研究, 还通过 DPPH、ABTB、金属螯合力和还原力测定等方法评价黑松露多糖的体外抗氧化活性, 为黑松露多糖活性的深入研究及其开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

黑松露购于易门县山里香食品有限公司; DEAE-Sephrose 快速流动柱, 美国 GE Healthcare 公司; 无水乙醇, 湖北西陇化工有限公司; 葡萄糖、苯酚, 天津市风船化学试剂科技有限公司; 浓硫酸, 开封东大

化工公司; 氯化钠, 国药化学试剂公司; 氯仿, 天津市元立化工有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2'-氮联-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS)、抗坏血酸 (Vc)、菲罗嗪-钠盐、乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA-2Na), 上海源叶生物科技有限公司; 16 种单糖标准品 (岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、氨基半乳糖盐酸盐、盐酸氨基葡萄糖、N-乙酰-D 氨基葡萄糖、古罗糖醛酸、甘露糖醛酸), 上海博睿糖生物技术有限公司; 三氟乙酸, 比利时 ACROS 公司; 50% 氢氧化钠溶液, 美国 Alfa Aesar 公司; 醋酸钠, 美国 ThermoFisher 公司; 其它均为分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

DFY-400D 摇摆式高速粉碎机, 温岭市林大机械有限公司; BSA224S 数显电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; A360 紫外分光光度计, 上海美普达仪器有限公司; EU-K1-20TQ 超纯水仪, 南京欧铠环境科技有限公司; LGJ-10N 真空冷冻干燥机, 北京亚星仪科发展有限公司; H2-16RK 台式高速离心机, 湖南可成仪器设备有限公司; SCQ-9201B 超声波清洗器, 上海声彦超声仪器有限公司; ULT1386-3-V41 超低温冰箱, 赛默飞仪器有限公司; HH-8 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; RE-57 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; ELX800 酶标仪, 美国 BIO-TEK 公司; ICS5000 离子色谱仪, 美国 ThermoFisher 公司; 101-1BS 电热恒温鼓风干燥箱、UGC-24M 氮吹仪, 力辰科技。

1.3 试验方法

1.3.1 黑松露粗多糖的制备

以黑松露为原料, 在 45 °C 下对其子实体进行干燥粉碎, 设计料液比 (10~50, V/m)、提取温度 (55~95 °C) 和提取时间 (0.5~2.5 h)。称取黑松露固体粉末 5 g, 按料液比加入超纯水, 将溶解后的溶液放入超声波提取仪中超声 20 min, 将超声后的溶液放入 90 °C 恒温水浴锅中水浴 2 h。6500 r/min 离心 20 min,

保留上清液,重复提取两次。抽滤后收集上清液,真空浓缩至约 60 mL,按照 1:3 的比例加入 3 倍体积的无水乙醇,充分搅拌,以致产生沉淀物或絮状物。置于 4 °C 冰箱中静置 24 h,4000 r/min 离心 15 min,收集沉淀物。沉淀物加超纯水复溶得到黑松露多糖溶液。将冷冻后的松露多糖置于真空冷冻干燥机中冻干成粉末状后密封储存于 -20 °C 冰箱,即为黑松露粗多糖提取物。以葡萄糖为标准,采用苯酚-硫酸法测定黑松露粗多糖的含量^[17]。黑松露粗多糖得率 (%) 计算如下:

$$\text{得率}/\% = \frac{\text{粗提物重量}(g)}{\text{粉末重量}(g)} \times 100\%$$

1.3.2 优化实验设计

对单因素实验数据进行分析,采用 Box-Behnken 法优化提取工艺。提取温度 (A)、料液比 (B)、提取时间 (C) 和多糖提取率是因变量^[18]。自变量的因素和水平如表 1 所示。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Responsesurface experimental factor level table

水平	水浴时间/h	提取温度/°C	料液比/(g/mL)
-1	0.5	65	1:20
0	1	75	1:30
1	1.5	85	1:40

1.3.3 黑松露粗多糖的纯化

采用 Sevage 法脱去黑松露粗多糖中的蛋白质,将脱去蛋白质的溶液进行旋转浓缩,浓缩后透析,收集样品,冷冻干燥,得到除去杂质的黑松露粗多糖。将粗多糖溶于去离子水中,40 mL 溶液置于 DEAE-Sepharose 快速流动柱 (4.6 cm×50 cm) 上,依次用蒸馏水、0.1、0.3、0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱。流速为 2 mL/min,自动收集洗脱液 (10.0 mL/管)。以葡萄糖为标准,苯酚-硫酸法测定多糖含量。依据洗脱峰型,收集同一峰洗脱液,浓缩,透析,冻干,从而获得四个多糖组分^[19-20]。

1.3.4 黑松露多糖初步结构分析

取 16 种单糖标准品配成约 10 mg/mL 标准溶液。取各单糖标准溶液精密配置 0.1、0.5、1、5、10、20、50 mg/L 梯度浓度作为标准品。根据绝对定量方法,测定不同单糖质量,根据单糖摩尔质量计算出摩尔比。

用离子色谱仪 (ICS 5000, 美国赛默飞世尔公司) 分析纯化后黑松露多糖三个组分的单糖组成。5 mg 样品在 120 °C 下用 10 mL 的 2 M TFA 在安瓿中分解 5 h。用氮气干燥酸水解液,加入 5 mL 水涡旋混匀,吸取 100 μL 于 900 μL 去离子水中稀释,12000 r/min 离心 5 min,水解样品溶液与 10 mg/mL 标准单糖混合物注入色谱系统。色谱柱: DionexCarbopacTMPA20 (3×150);

流动相 A 相为 H₂O, B 相为 250 mol/L NaOHC:50 mol/L NaOH 和 500 mol/L NaOAC; 流速为 0.3 mL/min; 进样量为 5 μL,柱温为 30 °C^[21]。

1.3.5 黑松露多糖的体外抗氧化活性测定

1.3.5.1 DPPH 自由基清除活性

DPPH 自由基清除活性的测定方法参照 Wang 等^[22]进行稍加修改。通过乙醇溶解制备 0.2 mmol/L DPPH 溶液,并在试验日使用。将 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 样品溶液 (0.25~4 mg/mL) 混合并摇匀。然后将混合物在室温下黑暗中保持 30 min。使用抗坏血酸作为对照。最后用紫外-可见分光光度计测定了样品在 517 nm 处的吸光度。自由基清除能力由以下公式确定:

$$\text{DPPH清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:

A_0 —对照试验的吸光度值 (无水乙醇代替样品);

A_i —样品试验的吸光度值;

A_j —样品干扰试验的吸光度值 (无水乙醇代替 DPPH 溶液)。

1.3.5.2 ABTS 自由基清除活性

ABTS 自由基清除黑松露多糖的实验是根据 Zeng 等^[23]方法进行的,并做了一些修改。通过将 5 mL K₂S₂O₈ 溶液 (7mm ABTS⁺) 与 5 mL 过硫酸钾溶液 (2.45 mm) 在黑暗条件下反应 12 h 制备 ABTS⁺,并在当天使用。用蒸馏水将 ABTS⁺ 溶液稀释至 734 nm 处的吸光度为 0.70±0.02。将 0.4 mL 不同浓度的样品溶液 (0.25~4 mg/mL) 和 3 mL ABTS⁺ 溶液剧烈混合。以抗坏血酸为对照。在室温黑暗条件下反应 30 min 后,于 732 nm 处测量吸光度。ABTS 自由基阳离子清除活性通过以下方程式计算:

$$\text{ABTS自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:

A_0 —对照试验的吸光度值 (用蒸馏水代替样品);

A_i —样品试验的吸光度值;

A_j —样品干扰试验的吸光度 (用蒸馏水代替 ABTS 溶液)。

1.3.5.3 金属螯合能力的测定

多糖的金属螯合能力测定根据先前报道的方法进行少许修改^[24]。将 1.0 mL 样品 (0.25~4 mg/mL) 与 0.1 mL 2.0 mM 氯化亚铁、0.2 mL 5.0 mM 菲咯啉溶液和 3.7 mL 蒸馏水混合。以 EDTA-2Na 为对照。混合反应 10 min 后,在 560 nm 处测定吸光度。金属螯合能力由以下方程式计算:

$$\text{整合率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:

A_0 ——对照试验(用蒸馏水代替样品)的吸光度值;

A_i ——样品试验的吸光度值;

A_j ——样品干扰试验(用蒸馏水代替氯化铁溶液)的吸光度值。

1.3.5.4 还原力的测定

不同黑松露多糖组分还原力的测定采用先前研究^[17]中所述的方法进行少许修改。1 mL 样品(0.25~4 mg/mL)与2.5 mL 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6)和2.5 mL 0.1% $K_3Fe(CN)_6$ (0.1%, m/V)混合。将混合物在50 °C下培养20 min,然后添加2.5 mL 三氯乙酸溶液(10%, m/V),2.5 mL $FeCl_3$ (0.1%, m/V),在700 nm处测量吸光度。还原力测定通过以下公式计算:

$$\text{还原力} = A_i - A_j$$

式中:

A_i ——样品实验的吸光度值,

A_j ——样品干扰实验的吸光度(用蒸馏水代替 $FeCl_3$ 溶液)。

1.3.6 统计分析

所有样品均进行3次平行测定。利用Design-Expert 8.0.6中的Box-Behnken建立实验模型进行试验,试验数据以Excel 2020进行数据初步整理,采用OriginPro 8.6软件进行数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验分析

2.1.1 提取时间对黑松露粗多糖提取率的影响

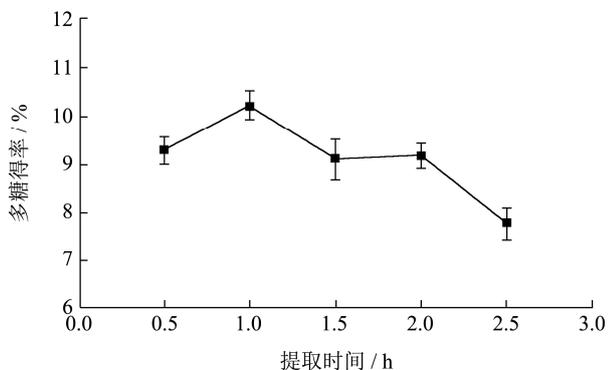


图1 提取时间对黑松露粗多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction time on the yield of crude polysaccharide from *Tuber sinense*

当提取温度为75 °C,料液比为1:30 g/mL时,研究其不同提取时间0.5、1、1.5、2、2.5 h对黑松露粗

多糖提取率的影响。由图1可知,黑松露粗多糖在0~1 h时提取率呈上升趋势,在1~2.5 h时总体呈下降趋势。虽然在2 h粗多糖得率有上升趋势,但是与1 h相比趋势不够明显。时菲菲等^[25]制备多糖的最适提取时间为2.3 h,多糖得率在15.66%。提取过程中超出最适提取时间时,其他非多糖成分会随着提取时间的延长而溶出,多糖也会因过度水解而导致得率下降。本文黑松露多糖在2 h有上升趋势的原因可能是随着提取时间的延长,非多糖物质溶解出来,使得黑松露粗多糖的得率提高^[26]。因此,1 h为黑松露粗多糖最佳提取时间,提取率达到最高为10.45%。

2.1.2 提取温度对黑松露粗多糖得率的影响

温度是影响提取率的一个重要因素,因此在提取时间为1 h,料液比为1:30 g/mL时,分别研究了55、65、75、85和95 °C对黑松露粗多糖提取率的影响。由图2可知,粗多糖提取率随着温度的升高而增大,当温度达到75 °C时,得率达到最高为11.5%,而后随着温度的升高而下降。闫舒雅等^[27]提取鸡腿菇菌丝体多糖最适提取温度为80 °C,其提取率为7.80%。与本文研究的提取温度相近,提取过程中温度不宜过高,温度过高会导致多糖部分水解,使粗多糖得率下降^[28]。因此,本文的最佳提取温度为75 °C。

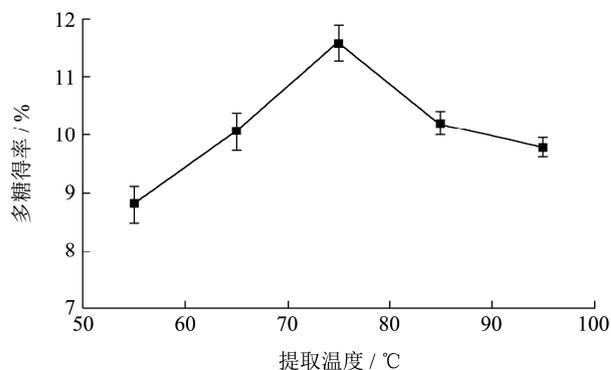


图2 提取温度对黑松露粗多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on the yield of crude polysaccharide from *Tuber sinense*

2.1.3 料液比对黑松露粗多糖提取率的影响

不同料液比也会影响黑松露粗多糖提取率。设定料液比为:1:10、1:20、1:30、1:40和1:50 g/mL,提取时间和温度为1 h和75 °C。不同料液比对黑松露粗多糖提取率的影响如图3所示,当料液比从10 g/mL增加到30 g/mL时,提取率明显提高到10.88%,当料液比达到1:30 g/mL时,最大值为10.88%。然而,当料液比持续增加到30 g/mL和50 g/mL时,曲线开始缓慢下降。葛俊宏等^[29]提取人参多糖,最佳的料液比为1:30 g/mL,最高得率为9.87%。人参多糖料液比超过1:30 g/mL时,多糖得率却出现了下降的趋势,与

本文多糖得率趋势相近。当料液比过大时，溶剂体积越大，提取后在高温下浓缩需要很长的时间，导致黑松露粗多糖的分子结构被破坏^[30]。因此，本文最佳料液比为 1:30 g/mL。

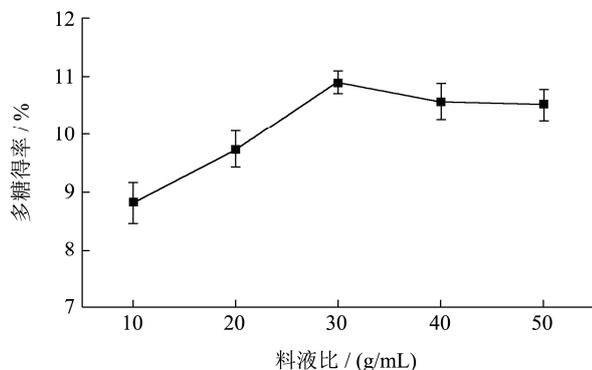


图3 料液比对黑松露粗多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of material liquid ratio on the yield of crude polysaccharide from *Tuber sinense*

2.2 黑松露粗多糖提取条件的优化

根据单因素试验结果，以提取时间、提取温度和料液比 3 个因素为自变量，以黑松露粗多糖得率为响应值，建立试验模型，确定 17 组试验。试验设计和结果见表 2。

2.2.1 模型建立及显著性检验

根据多元回归分析的结果，黑松露多糖的得率 (R) 由以下二次函数求得型号：

$Y=11.64+0.14A+0.44B+0.075C-0.56AB+0.21AC-0.035BC-1.02A^2-1.59B^2-0.85C^2$ 。响应面二次模型的方差分析 (ANOVA) 如表 3 所示。

表 2 响应面分析的试验设计和结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

编号	A 提取温度/°C	B 料液比/(g/mL)	C 提取时间/h	R 得率/%
1	75	30	1	11.89
2	75	30	1	11.48
3	75	30	1	11.82
4	75	20	1.5	8.80
5	75	40	0.5	9.68
6	65	40	1	9.75
7	75	30	1	11.23
8	85	20	1	9.44
9	65	20	1	8.31
10	85	40	1	8.63
11	75	20	0.5	8.15
12	85	30	0.5	9.97
13	75	30	1	11.79
14	85	30	1.5	10.12
15	65	30	0.5	9.82
16	75	40	1.5	10.13
17	65	30	1.5	9.14

表 3 二次回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of the developed quadratic regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	23.20	9	2.58	12.21	0.00	**
A	0.15	1	0.15	0.73	0.42	
B	1.57	1	1.57	7.42	0.03	*
C	0.05	1	0.05	0.22	0.66	
AB	1.27	1	1.27	6.00	0.04	*
AC	0.18	1	0.18	0.87	0.38	
BC	5.041E-003	1	5.041E-003	0.02	0.88	
A ²	4.39	1	4.39	20.79	0.00	**
B ²	10.62	1	10.62	50.28	0.00	**
C ²	3.05	1	3.05	14.46	0.00	**
残差	1.48	7	0.21			
失拟项	1.17	3	0.39	5.01	0.08	
纯误差	0.31	4	0.078			
总和	24.68	16				

注: R²=0.94, R²_{Adj}=0.86, C.V=4.59%, PRESS=29.22, **差异极显著 (p<0.01), *差异显著 (0.01<p<0.05)。

回归模型的统计显著性用 F 检验和 p 值检验，如方差分析表 3 所示，高 F 值 (12.21) 和低 p 值

(p=0.0017<0.01) 表明该模型具有高度的统计学意义。缺乏拟合的 F 值和 p 值分别为 5.01 和 0.08。p

值>0.05 表明, 与纯误差相比, 拟合不足不显著, 这意味模型方程足以预测这些变化^[31]。同时, 测定系数 (R^2)、校正决定系数 (R^2_{adj}) 和变异系数 ($C.V$) 分别为 94.01%、86.31%和 4.59%。这表明该模型在试验误差方面存在可接受范围, 是预测黑松露粗多糖得率的可靠模型^[32]。根据该模型, 影响黑松露粗多糖提取率的因素为 B (料液比) > A (提取温度) > C (提取时间)。

2.2.2 黑松露粗多糖响应面交互作用影响结果

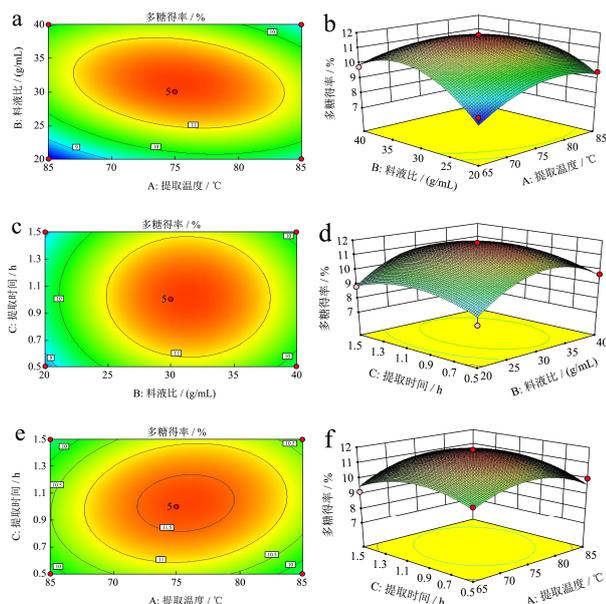


图4 料液比和提取温度 (a, b)、提取时间和料液比 (c, d)、提取时间和提取温度 (e, f) 对多糖得率的响应面图和等值线图

Fig.4 Response surface plot and contour plot of material liquid ratio and extraction temperature (a, b), extraction time and material liquid ratio (c, d), extraction time and extraction temperature (e, f) on the yield of polysaccharides

通过对响应面图和等高线图的分析, 进一步探讨了三者之间的相互作用对黑松露粗多糖提取率的影响^[33]。由料液比与提取温度等高线图的疏密程度可以看出, 表明料液比对云南黑松露提取率的影响要大于提取温度, 二者交互作用显著 (图 4a)。而料液比与提取时间和提取时间与提取温度的等高线图呈现圆形, 表明二者交互不显著 (图 4c、4e), 与方差分析结果一致。如图 4b、4d 和 4f 所示, 它们的响应面上的峰值也同时存在于它们的最小椭圆中, 表明在所选范围内存在极值。三维响应面图和等高线图如图 4a~4f 所示, 最佳提取条件为: 提取时间 1.02 h, 提取温度 75.36 °C, 料液比 1:31.33 g/mL, 多糖得率最高为 11.86%。与其它食用菌多糖提取率相比, 采用超声辅助提取的块菌多糖提取率为 7.17%^[34], 采用水浴提取杏鲍菇和长根菇多糖, 得率分别为 5.4%和 5.85%^[35-36]。因此, 本研究所采用的方法能显著提高多糖的提取率。

2.2.3 云南黑松露粗多糖提取试验的验证

根据对试验数据以及得到模型的整理分析, 得出最大响应值为 11.86%, 通过软件对响应面结果进行优化分析, 得出黑松露粗多糖提取的最佳条件为: 水浴温度为 75.36 °C, 料液比为 1:31.32 g/mL, 提取时间为 1.02 h。为了验证该条件的可靠性, 需完成三次平行验证试验, 将水浴温度修改为 75 °C, 提取时间修改为 1 h, 料液比修改为 1:31 g/mL, 三次试验得到的平均得率为 11.79%, 与理论预测值的相对误差为 0.07%。通过验证试验得到的数据与响应面设计的预测值相差不大, 说明该模型可靠, 可信度较高, 适用于黑松露粗多糖提取工艺的优化。

2.3 黑松露粗多糖的纯化

采用 Sevag 法脱去黑松露粗多糖中的蛋白质, 浓缩后透析, 得到除去杂质的黑松露粗多糖, 最后测定多糖的蛋白含量为 2.23%, 说明黑松露粗多糖经过前处理, 蛋白质基本上已经除去。黑松露粗多糖多酚含量为 0.49%, 表明黑松露粗多糖几乎不含多酚不会对后续抗氧化实验产生干扰。如图 5 所示, 根据 DEAE-Sephacel 快速流动柱的洗脱曲线, 得到四个峰 (TSP-1、TSP-2、TSP-3 和 TSP-4)。对四个组分收集、浓缩、透析、冻干后, 进行多糖活性试验 (TSP-4 含量最低的组分除外)。

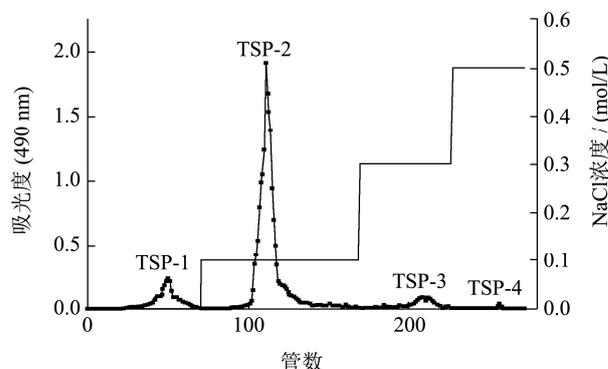
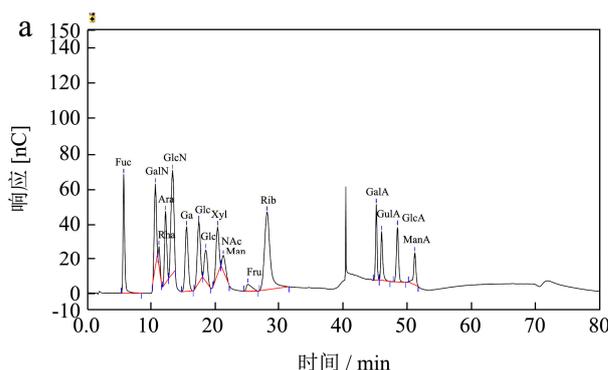


图5 黑松露粗多糖经 DEAE-Sephacel 快速流动柱的梯度洗脱曲线

Fig.5 Stepwise elution curve of crude TSP on DEAE sephacel fast flow column



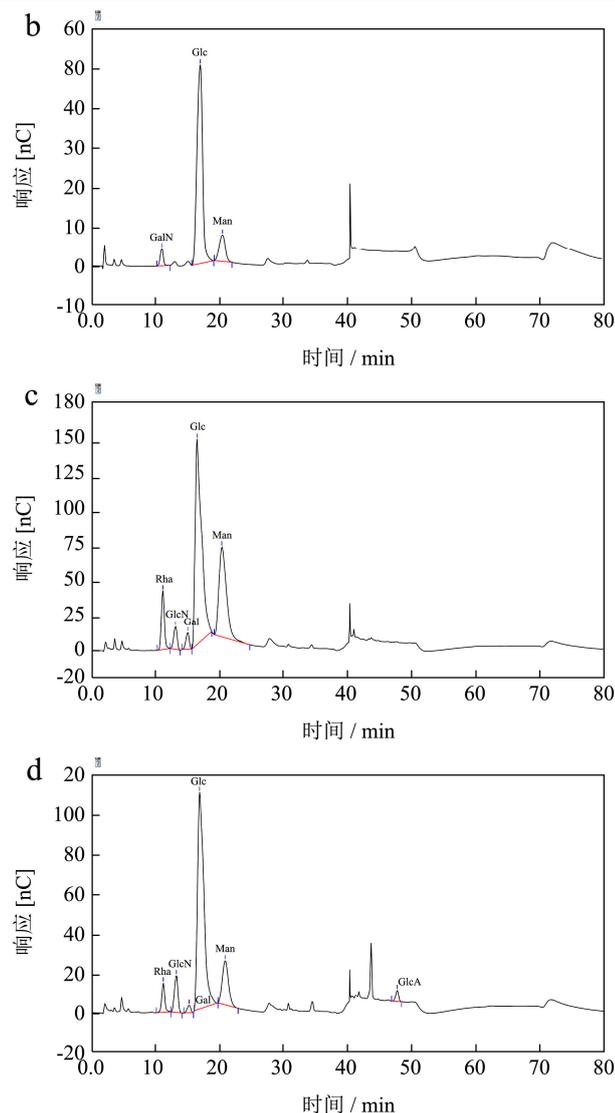


图 6 16 种标准单糖 (a) 和 TSP-1 (b)、TSP-2 (c)、TSP-3 (d) 组分单糖的离子色谱图

Fig.6 The ion chromatograms of 16 standard monosaccharides (a) and component monosaccharides released from TSP-1 (b), TSP-2 (c) and TSP-3 (d)

2.4 黑松露多糖单糖组成分析

黑松露多糖离子色谱图如图 6 所示。将多糖样品的离子色谱图谱与混合单糖标准品的离子色谱图谱比对确定样品的单糖组成；分别记录各组成单糖的峰面积，由面积归一法计算各单糖组成摩尔比^[37]。结果表明，TSP-1 的单糖组成为盐酸氨基半乳糖、葡萄糖和甘露糖，比例为 2.8:77.1:20 (图 6b)；TSP-2 为鼠李糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖，比例为 18.7:1.5:2:40.6:37.3 (图 6c)；TSP-3 为鼠李糖、盐酸氨基葡萄糖、葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和半乳糖的比例为 13:3.5:58.4:21.1:2.7:1.2 (图 6d)。TSP-1、TSP-2 和 TSP-3 的主要成分均为葡萄糖。TSP-2 和 TSP-3 中

含有盐酸氨基葡萄糖，TSP-3 中只含有葡萄糖醛酸。

2.5 黑松露多糖的体外抗氧化活性

2.5.1 不同组分黑松露多糖对 DPPH 自由基清除活性的影响

研究了不同浓度的 Vc、Crude TSP、TSP-1、TSP-2 和 TSP-3 对 DPPH 自由基的清除活性，结果如图 7 所示，TSP-3 在 0~4 mg/mL 浓度下对 DPPH 自由基有明显的清除作用，且呈浓度依赖性。与 TSP-1 和 TSP-3 多糖相比，Crude TSP 和 TSP-2 具有显著的清除活性。在 4.0 mg/mL 浓度下，Crude TSP、TSP-1、TSP-2、TSP-3 和 Vc 对 DPPH 自由基的清除率分别为 73.93%、36.67%、73.60%、54.10%和 95.07%。对 DPPH 自由基的清除能力依次为 Vc>Crude TSP>TSP-2>TSP-3>TSP-1。李银莉等^[38]研究表明纯化前后马齿苋多糖对 DPPH 自由基的最大清除率分别为 69.73%和 64.54%，纯化前多糖对 DPPH 自由基的清除率大于纯化后的多糖，原因可能是粗多糖中多酚等其他抗氧化物也对 DPPH 自由基起到一定清除作用，所以黑松露多糖粗提物对 DPPH 自由基具有良好的清除能力^[39]。

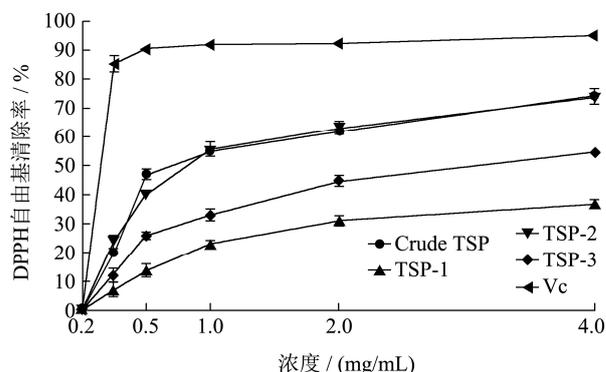


图 7 Crude TSP, TSP-1, TSP-2 和 TSP-3 的 DPPH 自由基清除活性
Fig.7 Sequestering activity of crude TSP, TSP-1, TSP-2 and TSP-3 on DPPH radical

2.5.2 不同组分黑松露多糖对 ABTS 自由基清除活性的影响

ABTS 氧化后形成稳定的蓝绿色 ABTS⁺自由基，在 734 nm 处有特征吸收峰^[40]。加入黑松露多糖样品后，蓝绿色逐渐褪色或消失，吸光度值逐渐降低，从而判断其抗氧化活性。从图 8 可以看出，浓度范围为 0~4 mg/mL，样品和阳性对照 (Vc) 的清除率随浓度的增加而增加。当浓度为 4 mg/mL 时，Crude TSP、TSP-1、TSP-2、TSP-3 和 Vc 的清除率分别为 60.47%、36.20%、41.87%、52.73%和 94.87%。ABTS 的清除能力为 Vc>crude TSP>TSP-3>TSP-2>TSP-1。王晴等^[41]人研究复合真菌多糖的 DPPH 与 ABTS 自由基清除作用均在 70%以上，其它研究表明，多糖对 ABTS 自由

基的清除能力与 DPPH 自由基的清除能力具有一致性^[42]。在本实验中, Crude TSP、TSP-1 和 TSP-3 的 ABTS 表现出与 DPPH 自由基清除能力相似的趋势。

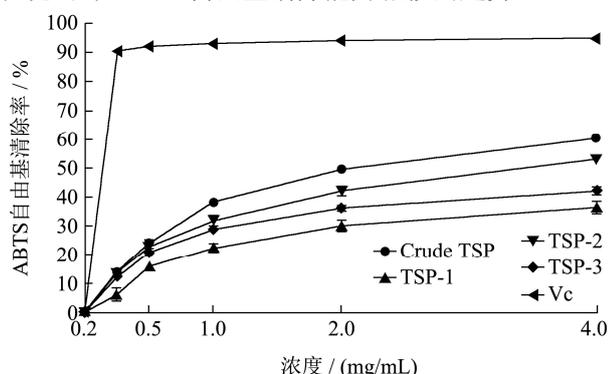


图 8 CrudeTSP, TSP-1, TSP-2 和 TSP-3 的 ABTS 自由基清除活性
Fig.8 Scavenging activity of crude TSP, TSP-1, TSP-2 and TSP-3 on ABTS radical

2.5.3 不同组分黑松露多糖对金属螯合能力的影响

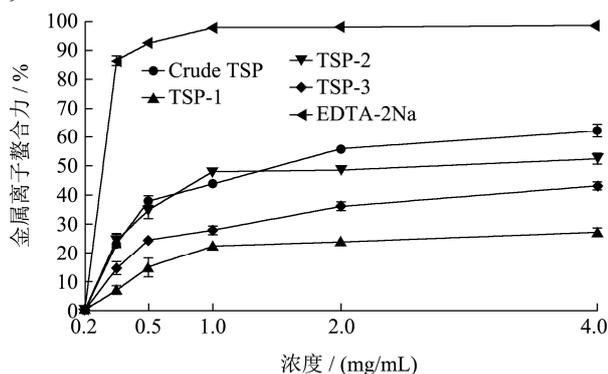


图 9 CrudeTSP, TSP-1, TSP-2 和 TSP-3 的金属离子螯合力
Fig.9 Metalion chelating ability of crude TSP, TSP-1, TSP-2 and TSP-3

人体呼吸作用、一系列酶活性、氧转运和氧化还原反应都与铁离子有关。同时, 铁离子非常活跃, 可以促进许多重要分子的氧化^[43]。因此, 可通过测量其黑松露多糖里的自由基螯合 Fe²⁺络合物, 阻止·OH 的产生来反映其抗氧化能力(图 9)。Crude TSP、TSP-1、TSP-2 和 TSP-3 的金属螯合能力与 EDTA-2Na 有一定差距, 但仍有一定的金属螯合能力。在 4 mg/mL 浓度下, Crude TSP 具有良好的金属螯合能力(61.63%), 其次是 TSP-2、TSP-3 和 TSP-1(52.50%、43.17%和 27.00%)。抗氧化剂的金属螯合能力与其官能团-OH、-SH、-COOH、C=O、-S-、-O-有关。Crude TSP、TSP-2 和 TSP-3 可能含有较多的官能团, 但其具体作用机制有待进一步研究^[44]。

2.5.4 不同组分黑松露多糖对还原力测定的影响

天然产物的还原力也是评价其抗氧化活性的指标

之一。不同组分黑松露多糖的还原能力如图 10 所示, 吸光度越高, 还原能力越强。总的来说, 在确定的浓度范围内, TSP-3 的还原能力随着浓度的增加而增强, 但 TSP-3 的还原能力明显高于其他样品。在 4.0 mg/mL 浓度下, Crude TSP、TSP-1、TSP-2 和 TSP-3 的吸光度分别为 0.39、0.34、0.28 和 0.56。本文测定黑松露多糖的还原力与吴金松等人^[45]研究信阳毛尖茶末多糖的还原力趋势相似, 其最大吸光值为 0.536。

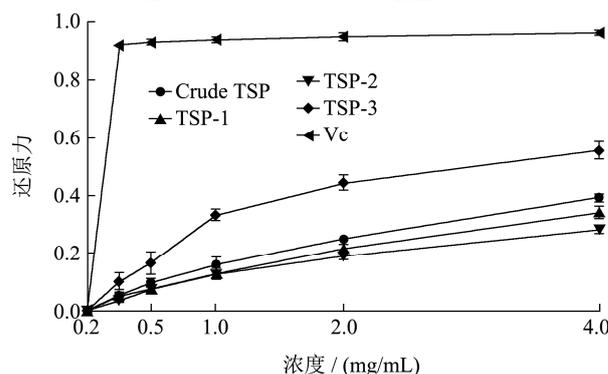


图 10 CrudeTSP, TSP-1, TSP-2 和 TSP-3 的还原能力
Fig.10 Reducing power of crude TSP, TSP-1, TSP-2 and TSP-3

3 结论

采用超声波辅助水浴醇沉法提取黑松露粗多糖, 为确定黑松露粗多糖的最佳提取工艺, 在单因素实验的基础上, 采用 Box-Behnken 法设计了三因素三水平, 以粗多糖的提取率为响应值进行响应面分析。提取率为 11.79%。以 DEAE-Sephrose 快流动柱为基础, 得到了 TSP-1、TSP-2 和 TSP-3 三种主要组分。离子色谱显示 TSP-1 由盐酸氨基半乳糖、葡萄糖和甘露糖组成。TSP-3 中含有鼠李糖、盐酸氨基葡萄糖、葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸和半乳糖, 而 TSP-2 中不含葡萄糖醛酸。Crude TSP、TSP-1、TSP-2 和 TSP-3 具有较强的清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除能力, 有一定的金属螯合能力与还原能力。Crude TSP 的抗氧化活性最好, 这可能与粗多糖中其它抗氧化剂的含量有关。其中 TSP-3 还原力优于粗多糖, 推测纯化后含量最高的 TSP-3 含有一定量的盐酸氨基葡萄糖与葡萄糖醛酸, 可以与产生·OH 等自由基所必需的金属离子络合, 使羟自由基的产生受到抑制, 还原力增强。同时, TSP-2 和 TSP-3 的抗氧化活性均优于 TSP-1。本研究为进一步对黑松露多糖的分离纯化、结构鉴定、功能活性深入研究奠定了基础, 也为黑松露相关食品和药物的开发与应用提供了理论依据。

参考文献

[1] 刘洪玉,陈惠群,李子平,等.块菌的营养价值及其开发利用

- [J].资源开发与市场,1997,2:60-61,66
- LIU Hongyu, CHEN Huiqun, LI Ziping, et al. Nutrition value and exploitation of truffle [J]. Resource Development & Market 1997, 2: 60-61, 66
- [2] Poma A, Limongi T, Pacioni G. Current state and perspectives of truffle genetics and sustainable biotechnology [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2006, 72(3): 437-441
- [3] 马菲菲,王瀚墨,胡昕,等.黑松露酱产品开发工艺研究[J].食品安全质量检测学报,2019,10(11):3536-3541
- MA Feifei, WANG Hanmo, HU Xin, et al. Study on the development technology of black truffle sauce [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(11): 3536-3541
- [4] 刘长姣,于徊萍,李玉.块菌有效成分和活性研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(4):2017-2019
- LIU Changjiao, YU Huiping, LI Yu. Advances in studies on effective components and activity of truffles [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(4): 2017-2019
- [5] Gregory B, Smith M E, Michael N, et al. Historical biogeography and diversification of truffles in the Tuberales and their newly identified southern hemisphere sister lineage [J]. Plos One, 2013, 8(1): e52765
- [6] 张智超,王宏越,路晓玉.块菌的研究现状及药用价值[J].当代化工研究,2018,11:169-170
- ZHANG Zhichao, WANG Hongyue, LU Xiaoyu. Research status and medicinal value of truffle [J]. Modern Chemical Research, 2018, 11: 169-170
- [7] 左志林,李瑞萍.黑松露全球专利信息分析[J].中国食用菌,2018,37(4):66-72
- ZUO Zhilin, LI Ruiping. Analysis on global patent information of *Tuber melanosporum* [J]. Edible Fungi of China, 2018, 37(4): 66-72
- [8] Angelini P, Tirillini B, Properzi A, et al. Identification and bioactivity of the growth inhibitors in *Tuber* spp. methanolic extracts [J]. Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 2015, 149(6): 1000-1009
- [9] águeda, Beatriz, Zambonelli A, et al. Tuber 2013: scientific advances in sustainable truffle culture [J]. Mycorrhiza, 2014, 24(1): 1-4
- [10] 范黎.亚洲黑松露(块菌)系统分类和地理分布研究进展[J].菌物研究,2021,1:6-11
- FAN Li. Current taxonomic and geographic situation on Asian black truffles [J]. Journal of Fungal Research, 2021, 1: 6-11
- [11] Gregpary M, Bonito A P, Gryganskyi J M, et al. A global meta-analysis of *Tuber ITS* rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal [J]. Molecular Ecology, 2010, 19: 4994-5008
- [12] Bonito G, Trappe J M, Donovan S, et al. The Asian black truffle *Tuber indicum* can form ectomycorrhizas with north American host plants and complete its life cycle in non-native soils [J]. Fungal Ecology, 2011, 4: 83-93
- [13] 邓晓娟,闫兴富,刘建利,等.印度块菌-云南松菌根际土壤细菌的种群组成和群落结构[J].生态学报,2018,38(19):7066-7074
- DENG Xiaojuan, YAN Xingfu, LIU Jianli, et al. Study of bacterial population composition and structure of *Tuber indicum* - *Pinus yunnanensis* ectomycorrhizosphere [J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(19): 7066-7074
- [14] 李晓凤,杨兵,张华琦.云南野生黑松露营养价值评定[J].食品研究与开发,2018,39(11):157-161
- LI Xiaofeng, YANG Bing, ZHANG Huaqi, et al. Evaluation of nutritional value of natural black truffle grown in Yunnan [J]. Food Research and Development, 2018, 39(11): 157-161
- [15] Huang Z G, Wei C H, Luo H B, et al. Study on extraction and detection of α -androstenol in truffle [J]. Advanced Materials Research, 2014, 881-883: 781-784
- [16] 王海燕,张隆龙,张凤兰,等.黑松露多糖分离纯化与抗炎活性研究[J].现代食品科技,2017,33(8):30-35
- WANG Haiyan, ZHANG Longlong, ZHANG Fenglan, et al. Isolation, purification, and characterization of anti-inflammatory activity of truffle polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(8): 30-35
- [17] Yin C, Fan X, Fan Z, et al. Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes* polysaccharides and determination of its antioxidant activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 446-454
- [18] Zhu M, Nie P, Liang Y K, et al. Optimizing conditions of polysaccharide extraction from shiitake mushroom using response surface methodology and its regulating lipid metabolism [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95(2): 644-648
- [19] Wang C R, Ng T B, Li L, et al. Isolation of a polysaccharide with antiproliferative, hypoglycemic, antioxidant and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the fruiting bodies of the abalone mushroom *Pleurotus abalonus* [J]. Journal of Pharmacy & Pharmacology, 2011, 63(6): 825-832
- [20] Yin Z, Zhang W, Zhang J, et al. Isolation, purification, structural analysis and coagulatory activity of water-soluble

- polysaccharides from *Ligustrum lucidum* Ait flowers [J]. Chemistry Central Journal, 2017, 11(1): 98
- [21] Wang X Y, Yin J Y, Nie S P, et al. Isolation, purification and physicochemical properties of polysaccharide from fruiting body of *Hericium erinaceus* and its effect on colonic health of mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 1310-1319
- [22] Ren D, Jiao Y D, Yang X B, et al. Antioxidant and antitumor effects of polysaccharides from the fungus *Pleurotus abalonus* [J]. Chemico-biological Interactions, 2015, 237: 166-174
- [23] Zeng D, Zhu S. Purification, Characterization, antioxidant and anticancer activities of novel polysaccharides extracted from Bachu mushroom [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107(Pt A): 1086-1092
- [24] Xu S, Zhang Y, Jiang K. Antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of the polysaccharides from different varieties of *Auricularia auricula* [J]. Food & Function, 2016, 7(9): 8368-8379
- [25] 时菲菲,陈毓,周晨,等.响应面法优化党参多糖提取工艺及抗氧化活性研究[J].畜牧与兽医,2021,53(1):54-60
SHI Feifei, CHEN Yu, ZHOU Chen, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of *Codonopsis pilosula* polysaccharides by response surface methodology [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(1): 54-60
- [26] Chen W, Wang W P, Zhang H S, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87: 614-619
- [27] 闫舒雅,董岳峰,任翔萍,等.响应面法优化鸡腿菇菌丝体多糖的提取工艺[J].化学与生物工程,2021,38(1):38-42
YAN Shuya, DONG Yuefeng, REN Xiangping, et al. Optimization in extraction process of polysaccharides from *Coprinus comatus* mycelium by response surface methodology [J]. Chemistry & Bioengineering, 2021, 38(1): 38-42
- [28] Shian S, Chen D, Li X, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of *Paris polyphylla* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 104: 80-86
- [29] 葛俊宏,许梦然,王迦琦,等.人參多糖提取工艺优化及体外抗氧化作用的研究[J].北华大学学报(自然科学版),2021,22(1):36-41
GE Junhong, XU Mengran, WANG Jiaqi, et al. Optimization of extraction process of polysaccharide from ginseng and its antioxidant activity *in vitro* [J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2021, 22(1): 36-41
- [30] Sun Y X, Liu J C, Kennedy J F. Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from the fruiting bodies of *Chroogomphis rutilus* (Schaeff.: Fr.) O.K. Miller by Box-Behnken statistical design [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(1): 209-214
- [31] Guo X, Zou X, Sun M. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(2): 344-349
- [32] Chunhua X, Zhenle T, Chenju Z, et al. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. Engineering ences, 2014, (1): 17-20
- [33] Chen C, Shao Y, Tao Y, et al. Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria* polysaccharides using RSM, and their biological activity [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 64(2): 1263-1269
- [34] Chen G, Zhang S, Ran C, et al. Extraction, characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from *Tuber huidongense* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 431-442
- [35] Ren D, Wang N, Guo J, et al. Chemical characterization of *Pleurotuseryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 138: 123-133
- [36] Wang Y F, Jia J X, Ren X J, et al. Extraction, preliminary characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella radicata* mushroom [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 1760-1769
- [37] Hou X J, Wei C. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible Bachu mushroom by response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(1): 67-74
- [38] 李银莉,张安勇,牛庆川,等.马齿苋多糖的乙酰化修饰及其抗氧化活性[J].现代食品科技,2020,36(12):84-91,110
LI Yinli, ZHANG Anyong, NIU Qingchuan, et al. Acetylation modification of the polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. and their antioxidant activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 84-91, 110

