

引文格式: 梁双敏, 国琦, 葛长荣, 等. 松茸粗多糖的提取工艺优化、单糖组成及体外抗氧化活性[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(2): 108–118. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202204003](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202204003)

松茸粗多糖的提取工艺优化、单糖组成及 体外抗氧化活性*

梁双敏^{1,2}, 国琦^{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 食品科学与技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】提高松茸粗多糖提取率, 探究松茸多糖纯化组分及抗氧化作用。【方法】采用超声波辅助水提醇沉法提取松茸粗多糖, 优化提取工艺, 使用 DEAE-Sephrose Fast Flow 离子柱分离纯化粗多糖, 采用离子色谱法分析单糖成分, 并测定体外抗氧化活性。【结果】最优提取工艺参数为: 浸提时间 2.25 h, 料液比 1 : 31 (g : mL), 浸提温度 83.50 ℃, 该条件下多糖提取率为 8.67%。松茸粗多糖经分离纯化后收集到 3 种多糖组分 (TMP-1、TMP-2、TMP-3), 主要由岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖组成, 其中 TMP-1 存在鼠李糖, TMP-2 和 TMP-3 存在葡萄糖醛酸。松茸粗多糖和 3 种纯化多糖组分均具有一定的抗氧化活性且存在量效关系, 抗氧化能力强弱为: 松茸粗多糖>TMP-2>TMP-3>TMP-1。【结论】松茸多糖有一定的抗氧化活性, 且松茸粗多糖效果最好, 分离纯化后的多糖组分抗氧化活性有所降低。本研究为松茸多糖的开发利用提供了理论基础, 对其功能食品研发具有重要意义。

关键词: 松茸多糖; 提取工艺; 分离纯化; 单糖组成; 抗氧化活性

中图分类号: S646.150.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2024) 02-0108-11

Optimization Extraction, Monosaccharide Composition and Antioxidant Activity *in Vitro* of Polysaccharide from *Tricholoma matsutake*

LIANG Shuangmin^{1,2}, GUO Qi^{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: [Purpose] To improve the extraction rate of *Tricholoma matsutake* crude polysaccharide, and explore the antioxidant effect of *T. matsutake* polysaccharide (TMP) purified fractions.

[Methods] The crude TMP was extracted by ultrasonic assisted water extraction and alcohol precipitation, and the extraction process was optimized. The crude TMP was separated and purified by DEAE-Sephrose Fast Flow ion column, the monosaccharide components were analyzed by ion chromatography, and the antioxidant activity *in vitro* was determined. [Results] The optimal extraction

收稿日期: 2022-04-05

修回日期: 2024-04-11

网络首发日期: 2024-05-14

*基金项目: 云南省博士后基金项目。

作者简介: 梁双敏 (1996—), 女, 云南玉溪人, 在读硕士研究生, 主要从事功能性食品研究。

E-mail: 550321074@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 肖智超 (1985—), 男, 云南昆明人, 博士, 副教授, 主要从事畜产品加工和功能性食品研究。E-mail: ynzcxciao@126.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240514.1256.001>



process parameters were: extraction time was 2.25 hours, solid-liquid ratio was 1 : 31 (g : mL), extraction temperature was 83.50 °C, under these conditions, the polysaccharide extraction rate was 8.67%. Three polysaccharide components (TMP-1, TMP-2 and TMP-3) were collected after purification, which mainly composed of fucose, glucosamine hydrochloride, galactose, glucose and mannose. Rhamnose existed in TMP-1, and glucuronic acid existed in TMP-2 and TMP-3. Crude TMP and purified polysaccharides had certain antioxidant activity and there was a dose-effect relationship. The antioxidant activity was as follows: crude TMP>TMP-2>TMP-3>TMP-1. [**Conclusion**] TMP has certain antioxidant activity, and the antioxidative activity of crude TMP is the best. The antioxidant activity of TMP after separation and purification is reduced. This study provides a theoretical basis for the development and utilization of *T. matsutake* polysaccharides, and is of a great significance for the research and development of functional foods.

Keywords: *Tricholoma matsutake* polysaccharides; extraction process; separated and purified; monosaccharide composition; antioxidant activity

松茸 [*Tricholoma matsutake* (S.Ito et Imai) Sing] 又称松口蘑、松蕈等, 属担子菌门 (Basidiomycete) 伞菌目 (Agaricales) 口蘑科 (Tricholomataceae) 口蘑属 (*Tricholoma*) 大型真菌^[1], 在中国主要分布于吉林、四川、云南、西藏等地。松茸是世界上最珍贵的大型真菌之一, 具有独特的风味和药理学特性^[2]。其含有多种营养物质, 如多糖、蛋白质、矿物质、维生素、低脂肪等, 具有抗氧化、治疗糖尿病、抗癌等功效^[3]。多糖是松茸的主要活性成分, 也是目前研究最多的组分。临床研究证明: 松茸提取物(多糖)具有美白、抗肿瘤、提高免疫力、抗病毒活性、抗炎、降血糖等作用^[4], 在保健食品和医药领域具有广阔的开发前景。目前, 有关松茸多糖的研究多集中于松茸粗多糖或提取分离的部分多糖, 如: YIN 等^[5]比较了热水提取法、酶辅助提取法、超声波清洗器提取法、静态探针超声波提取法和连续相微萃取法提取松茸多糖的差异; 陈炼红等^[6]采用复合酶法从松茸中提取了多糖; 吴杨洋等^[7]对比了热水浸提、超声提取、酶提取和微波提取法的松茸多糖提取率。但是, 对于松茸多糖分离纯化后各组分单糖组成及结构、生物活性及其结构作用机制之间的关系尚不清楚。不同来源的松茸多糖结构可能存在差异, 阻碍了松茸多糖的充分利用^[8]。基于此, 本研究采用超声波辅助水提醇沉法提取松茸多糖, 利用响应曲面法优化其提取工艺; 对多糖进行分离纯化, 对纯化后的组分进行单糖组成研究; 测定松茸多糖对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除率、金属螯合离子能力以及还原能力,

以评价其抗氧化活性。研究结果将为松茸多糖的进一步开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

松茸购自易门县山里香食品有限公司 (产自云南省玉溪市易门县); 2,2'-联氮双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS)、1-1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 购自天津市风船化学试剂科技有限公司; 抗坏血酸 (Vc)、乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA-2Na) 购自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) 购自上海博睿糖生物技术有限公司。以上试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

A360 紫外分光光度计 (上海美普达仪器有限公司); LGJ-10N 真空冷冻干燥机 (北京亚星仪科技发展有限公司); 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); ICS5000 离子色谱仪 (美国 ThermoFisher 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 松茸粗多糖提取

准确称取松茸粉末 5 g (精确至 0.001) 于烧杯中, 以超纯水为提取溶剂, 溶解后放入超声波提取仪 (功率 600 W, 频率 40 kHz) 超声 20 min, 之

后按照一定浸提时间、料液比和浸提温度进行提取；以 6 500 r/min 离心 20 min，收集上清液，滤渣复提 2 次，合并上清液；旋转蒸发至 1/4 体积，加入上清液体积 3 倍的无水乙醇，醇沉 (4 ℃, 24 h)；静置 24 h 后，以 4 000 r/min 离心 15 min，沉淀物加入超纯水复溶，以 6 500 r/min 离心 20 min；冷冻干燥后置于 -80 ℃ 保存，得到松茸粗多糖。以葡萄糖为标准，采用苯酚—硫酸法测定松茸粗多糖的含量，绘制葡萄糖标准曲线，并计算松茸粗多糖提取率。松茸粗多糖提取率=松茸粗多糖质量/松茸预处理干粉质量×100%。

1.3.2 单因素试验

参考尹秀莲等^[9]的方法。准确称取松茸粉末 5 g (精确至 0.001)，按照 1.3.1 节的方法提取粗多糖，在浸提温度 90 ℃、料液比 1 : 30 (g : mL)、浸提时间 2 h 的条件下进行单因素试验，分别探究浸提温度、液料比和浸提时间对松茸粗多糖提取率的影响。

1.3.3 响应面优化设计

在单因素试验基础上，利用 Box-Behnken 法设计优化试验，响应值为多糖提取率。响应面水平见表 1。

表 1 响应面试验因素及水平
Tab. 1 Experimental factors and levels of response surface

因素 factor	水平 level		
	-1	0	1
浸提时间/h extraction time	1	2	3
浸提温度/℃ extraction temperature	75	85	95
料液比/(g : mL) solid-liquid ratio	1 : 20	1 : 30	1 : 40

1.3.4 松茸粗多糖的纯化与分级

采用 Sevag 法脱去松茸粗多糖中的蛋白质，收集样品，浓缩后透析 72 h，得到脱蛋白松茸粗多糖。参照 BRADFORD^[10]报道的考马斯亮蓝方法制备蛋白质标准曲线，测定多糖中的蛋白质含量。称取脱蛋白松茸粗多糖 0.3 g 溶于 40 mL 蒸馏水中，充分溶解，通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子柱 (4.6 cm×50 cm)，依次用蒸馏水以及 0.1、0.3 和 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱，流速为 2 mL/min，收集洗脱液 (每管 10.0 mL)。以葡萄糖为标准，采用苯酚—硫酸法跟踪测定各管中的多糖含量。依据洗脱峰型，收集同一峰洗脱液，经浓缩、透析、冻干，获得不同松茸多糖组分。

1.3.5 松茸多糖中单糖组成的测定

取 16 种单糖标准品配制成药 10 mg/mL 标准溶液，再精密配制为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 和 50.0 mg/L 的梯度质量浓度标准品。

用离子色谱仪 (IC) 分析纯化后松茸多糖组分的单糖组成^[11]。取样品 5 mg 于安瓿瓶中，加入 2 mol/L TFA 10 mL，120 ℃ 水解 3 h。氮吹后加入水 5 mL 混匀，吸取 100 μL 加至 900 μL 去离子水中，12 000 r/min 离心 5 min。取上清液进 IC 分析，色谱柱：DionexCarbopacTMPA20 (3 mm×150 mm)；流动相：H₂O (A)、250 mmol/L NaOH (B)、50 mmol/L NaOH 和 500 mmol/L NaOAc (C)；流速：0.3 mL/min；进样量：5 μL；柱温：30 ℃；检测器：电化学检测器。

1.3.6 不同组分松茸多糖体外抗氧化活性的测定

(1) DPPH 自由基清除率的测定：参考 SONG 等^[12]的方法。取质量浓度为 0.25、0.50、1.00、2.00 和 4.00 mg/mL 松茸粗多糖和各单糖组分溶液 2.0 mL，分别加入 0.2 mmol/L DPPH 溶液 2.0 mL，混匀，室温下避光静置 30 min，测定波长 517 nm 处的吸光度值，以 Vc 为阳性对照，按公式计算 DPPH 自由基的清除率：

$$\text{DPPH自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%。$$

式中：A₀ 为空白对照组 (超纯水代替样品) 的吸光度值，以下公式同；A₁ 为样品组的吸光度值，以下公式同；A₂ 为样品本底 (无水乙醇代替 DPPH 溶液) 的吸光度值。

(2) ABTS 自由基清除率的测定：参考胡治远等^[13]的方法。将 7 mmol/L ABTS 溶液以磷酸盐缓冲液 (10 mmol/L, pH 7.4) 稀释，在波长 734 nm 处测得吸光度值达到 0.700±0.020。取 ABTS 溶液 3.0 mL，加入不同质量浓度松茸粗多糖和各单糖组分溶液 0.4 mL，混合后室温放置 30 min，再测定波长 734 nm 处的吸光度值，以 Vc 为阳性对照，按公式计算 ABTS 自由基的清除率：

$$\text{ABTS自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%。$$

式中：A₂ 为样品本底 (磷酸盐缓冲液代替 ABTS 工作液) 的吸光度值。

(3) 金属螯合能力的测定：参照文献 [14] 的方法。取不同质量浓度松茸粗多糖和各单糖组分溶液

3.5 mL 至试管中,在室温下加入 2 mmol/L FeCl_2 0.1 mL 和 5 mmol/L 菲咯啉 0.4 mL,振动反应 10 min,测定 562 nm 处的吸光度值,以 EDTA-2Na 为阳性对照,按公式计算金属螯合能力:

$$\text{金属螯合能力} = \left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right) A_0 \times 100\%。$$

式中: A_2 为样品本底(超纯水代替 FeCl_2 溶液)的吸光度值。

(4) 还原能力的测定:参考 FAN 等^[15]方法。取不同质量浓度松茸粗多糖和各单糖组分溶液各 1 mL,加入 1% (ρ) 铁氰化钾溶液 1 mL、pH 6.6 磷酸盐缓冲液 1 mL,混合均匀,混合物在 50 °C 恒温 20 min 后,加入 10% (ρ) 三氯乙酸溶液 2 mL,然后在 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液 2 mL,加入蒸馏水 2 mL、0.1% (ρ) 三氯化铁 0.4 mL,混合均匀,室温静置 10 min,测定 700 nm 处的吸光度值,以 Vc 为阳性对照,按公式计算松茸粗多糖的还原能力:

$$\text{还原能力} = A_1 - A_2。$$

式中: A_2 为样品本底(超纯水代替三氯化铁溶液)的吸光度值。

根据松茸多糖在不同质量浓度下的清除率和吸光度值拟合得到回归方程,通过半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC_{50})比较松茸多糖不同组分的抗氧化活性。

1.4 数据处理与统计分析

各试验做 3 组平行,试验数据采用 Origin 8.0、SPSS Statistics 18.0 和 Design-Expert.8.0.6 进行分析。

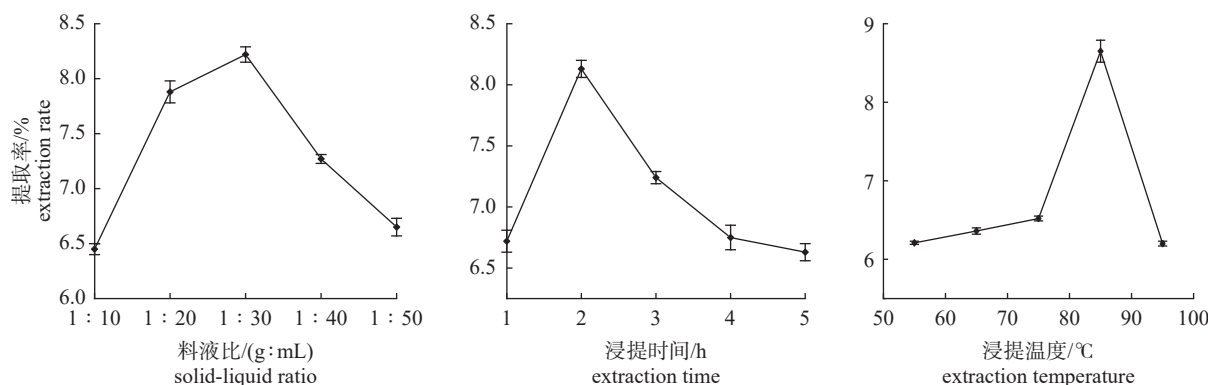


图2 料液比、浸提时间和浸提温度对松茸粗多糖提取率的影响

Fig. 2 Effects of solid-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on the extraction rate of *Tricholoma matsutake* crude polysaccharide

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

葡萄糖标准曲线见图1。回归方程为 $y = 0.009x - 0.001$, $R^2 = 0.9992$, 其中, y 为葡萄糖的吸光度值, x 为葡萄糖质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。

2.2 不同单因素对松茸粗多糖提取率的影响

随着料液比、浸提时间、浸提温度的增加,松茸粗多糖提取率均呈先升高后降低的趋势(图2)。液料比为 1:30 (g:mL)、浸提时间为 2 h、浸提温度为 85 °C 时,松茸粗多糖提取率分别最高,分别为 8.22%、8.13% 和 8.65%,因此,以上条件为最优单因素处理。

2.3 响应面优化结果

在单因素试验基础上设计响应面试验,结果(表2)显示:松茸粗多糖提取率介于 5.130%~8.824% 之间。

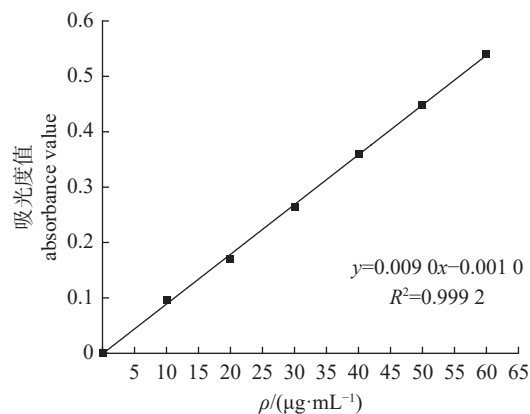


图1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose

表 2 Box-Behnken 试验设计及响应值
Tab. 2 Design and response value of Box-Behnken experiment

组号 number	试验因素 experimental factor			粗多糖提取率/% extraction rate of crude polysaccharide
	浸提时间/h extraction time	料液比/(g : mL) solid-liquid ratio	浸提温度/℃ extraction temperature	
1	2.00	1 : 40	75.00	6.618
2	2.00	1 : 30	85.00	8.642
3	1.00	1 : 30	75.00	5.130
4	1.00	1 : 30	95.00	6.758
5	2.00	1 : 30	85.00	8.824
6	2.00	1 : 20	75.00	7.522
7	3.00	1 : 40	85.00	7.312
8	1.00	1 : 40	85.00	6.118
9	3.00	1 : 30	95.00	6.264
10	2.00	1 : 30	85.00	8.302
11	2.00	1 : 30	85.00	8.652
12	1.00	1 : 20	85.00	5.602
13	2.00	1 : 30	85.00	8.550
14	3.00	1 : 30	75.00	8.030
15	3.00	1 : 20	85.00	6.350
16	2.00	1 : 20	95.00	6.746
17	2.00	1 : 40	95.00	7.358

2.3.1 回归模型分析

松茸粗多糖提取率 (Y) 对浸提时间 (A)、料液比 (B)、浸提温度 (C) 的回归模型为： $Y=8.59+0.544A+0.15B-0.022C-1.38A^2-0.87B^2-0.67C^2+0.11AB-0.85AC+0.38BC$ ，校正系数 $R^2=0.973$ ， $R^2_{Adj}=0.938$ ，变异系数为 3.3%；模型 $P=0.000$ ，失拟项 $P=0.113$ 。影响提取率的因素依次为：浸提时间>料液比>浸提温度。

2.3.2 响应面优化分析

松茸粗多糖提取率受浸提时间的影响大于料

液比，料液比与浸提温度 2 个因素交互作用显著，提取率受浸提时间的影响大于浸提温度 (图 3)。因此，提取率的最大影响因素是浸提时间，其次是料液比和浸提温度，与方差分析结果一致。

2.3.3 松茸粗多糖提取率的验证

经回归模型分析，松茸粗多糖最佳提取工艺为：浸提时间 2.25 h，料液比 1 : 30.67 (g : mL)，浸提温度 83.45 ℃；对该条件进行优化后的提取工艺为：浸提时间 2.25 h，料液比 1 : 31 (g : mL)，浸提温度 83.50 ℃。3 次平行试验结果显示：松

表 3 方差分析与显著性判断
Tab. 3 Analysis of variance and judgment of significance

变异来源 source of variation	平方和 sum of square	自由度 degree of freedom	样本方差 sample variance	F 检验 F -test	显著水平 significant level	显著性 significance
模型 model	20.47	9	2.27	28.14	0.000 1	**
浸提时间 (A) extraction time	2.36	1	2.36	29.25	0.001 0	**
料液比 (B) solid-liquid ratio	0.17	1	0.17	2.17	0.173 7	
浸提温度 (C) extraction temperature	0.00	1	0.00	0.05	0.834 8	
A^2	8.04	1	8.04	99.53	<0.000 1	**
B^2	3.16	1	3.16	39.13	0.000 4	**
C^2	1.87	1	1.87	23.15	0.001 9	**
AB	0.05	1	0.05	0.62	0.458 5	
AC	2.88	1	2.88	35.64	0.000 6	**
BC	0.57	1	0.57	7.11	0.032 2	*
残差 residual	0.57	7	0.08			
失拟项 lack of fit	0.42	3	0.14	3.84	0.113 3	
纯误差 pure error	0.15	4	0.04			
总误差 total error	21.03	16				

注/Note: **, $P<0.01$, *, $0.01<P<0.05$ 。

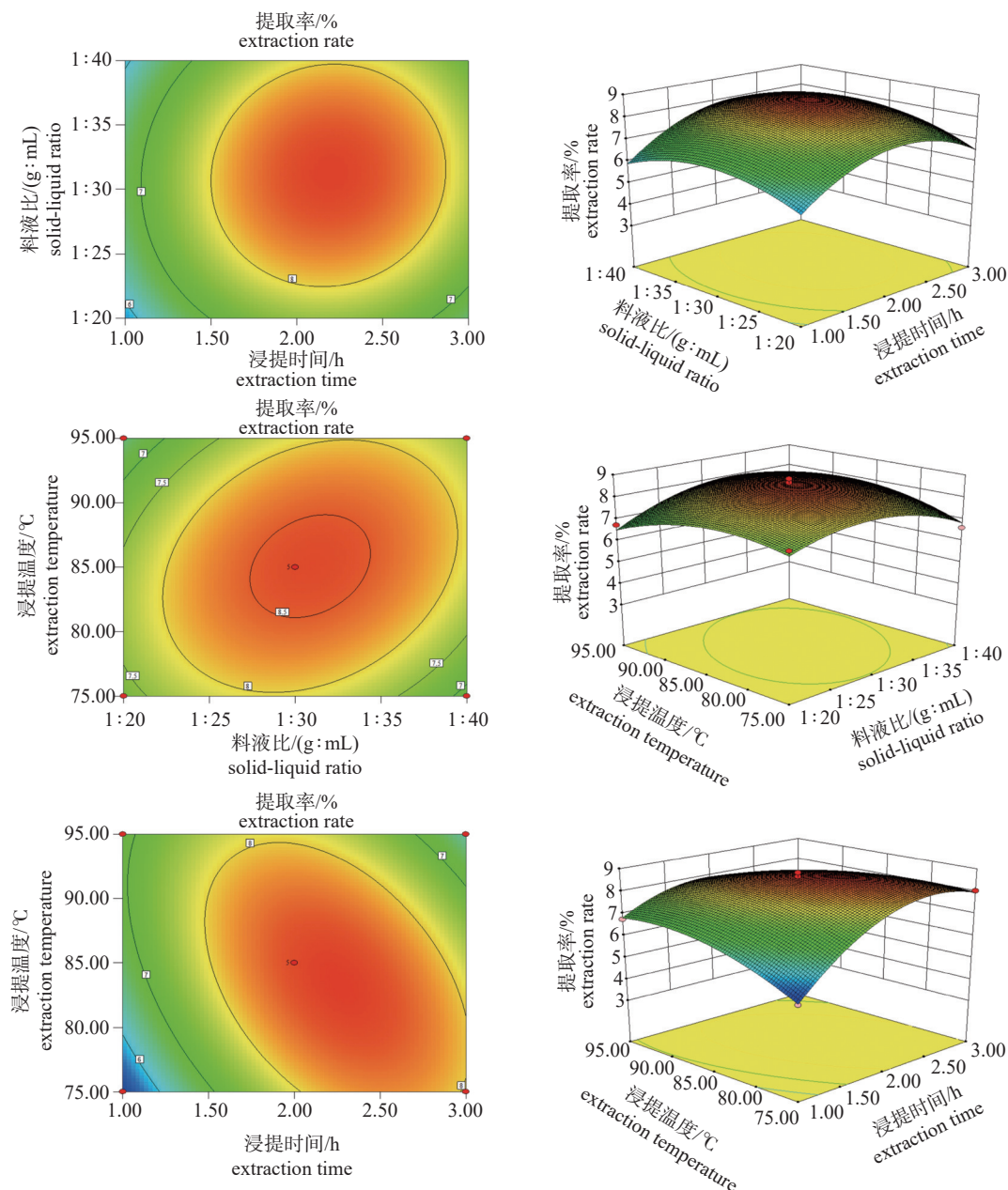


图3 浸提时间、料液比、浸提温度的交互作用对松茸粗多糖提取率的影响

Fig. 3 Effects of interaction among extraction time, solid-liquid ratio and extraction temperature on the extraction rate of *T. matsutake* crude polysaccharide

茸多糖提取率实际测量值为 8.42%，与预测值 (8.67%) 较为接近，表明响应面模型具有可行性，且松茸粗多糖的最佳提取工艺有效。

2.4 松茸粗多糖初步分离纯化结果

2.4.1 松茸粗多糖的蛋白含量

蛋白质标准曲线见图 4。回归方程为 $y = 0.0091x + 0.0071$, $R^2 = 0.9993$ 。未去除蛋白质的松茸粗多糖中蛋白质含量为 15.73%；去除蛋白质后，松茸粗多糖中蛋白质含量为 3.65%。

2.4.2 松茸粗多糖的组分

经分离纯化，去除蛋白质后的松茸粗多糖得到 4 种多糖组分，分别为 TMP-1、TMP-2、TMP-3 和 TMP-4，其总糖含量分别为 84.33%、88.33%、90.04% 和 95.33%，纯度较高 (图 5)；但 TMP-4 组分因含量较低而不予研究。

2.5 松茸多糖纯化组分的单糖组成

由图 6 和表 4 可知：TMP-1 由岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖

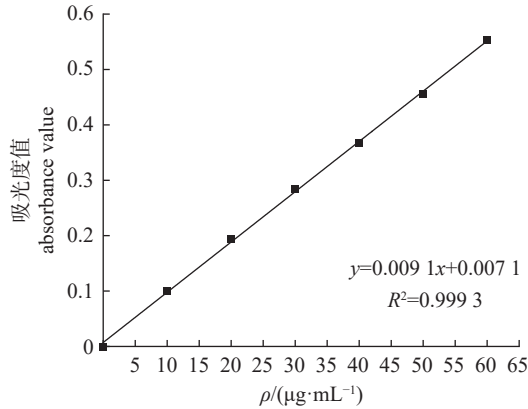


图 4 蛋白质标准曲线

Fig. 4 Standard curve of protein

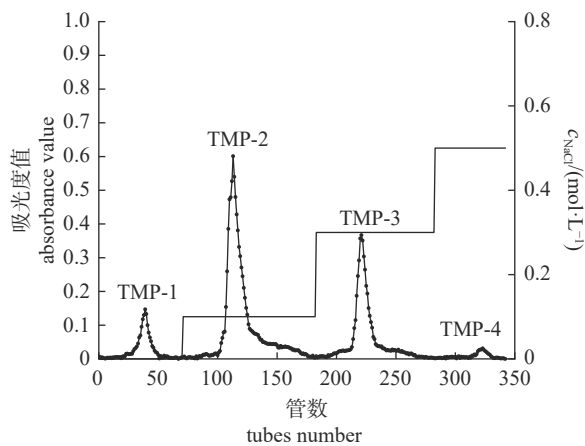


图 5 松茸粗多糖经 DEAE-Sephacrose Fast Flow 离子柱分级分离的图谱

Fig. 5 Stepwise elution curve of *T. matsutake* crude polysaccharide on DEAE-Sephacrose Fast Flow ion column

组成, 单糖质量比为 2.1 : 0.4 : 2.9 : 7.1 : 75.4 : 12.2; TMP-2 和 TMP-3 都由岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成, 其中 TMP-2 单糖质量比为 8.9 : 0.9 : 19.6 : 43.5 : 22.6 : 4.5, TMP-3 单糖质量比为 6.6 : 8.6 : 14.6 : 52.0 : 12.0 : 6.1; 岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖是 TMP-1、TMP-2 和 TMP-3 的主要成分, 鼠李糖仅存在于 TMP-1 中, 葡萄糖醛酸存在于 TMP-2 和 TMP-3 中。

2.6 松茸多糖不同组分的体外抗氧化活性

由图 7 可知: 当质量浓度为 4.00 mg/mL 时, 松茸粗多糖、TMP-1、TMP-2、TMP-3 和 Vc 对 DPPH 自由基清除活性分别为 84.42%、46.54%、66.87%、62.52% 和 93.75%, IC_{50} 值依次为 0.359、10.226、0.873、1.043 和 0 mg/mL, DPPH 清除能

力为 Vc>松茸粗多糖>TMP-2>TMP-3>TMP-1。

由图 8 可知: 当质量浓度为 0.25~4.00 mg/mL 时, 松茸粗多糖、松茸多糖不同组分和 Vc 的 ABTS 自由基清除率均随着质量浓度的增加而升高, 质量浓度为 4.00 mg/mL 时, 松茸粗多糖、TMP-1、TMP-2、TMP-3 和 Vc 的 ABTS 自由基清除率分别为 89.98%、39.91%、85.56%、78.53% 和 100.04%, IC_{50} 值依次为 0.507、14.514、0.525、0.716 和 0.001 mg/mL, ABTS 的清除能力为 Vc>松茸粗多糖>TMP-2>TMP-3>TMP-1。

由图 9 可知: 当质量浓度为 4.00 mg/mL 时, 松茸粗多糖、TMP-1、TMP-2、TMP-3 和 EDTA-2Na 的金属螯合能力分别为 83.41%、36.22%、69.13%、48.18% 和 99.93%, IC_{50} 值依次为 0.602、9.671、0.870、4.786 和 0 mg/mL, 其中, 松茸粗多糖和 TMP-2 表现出较强的金属螯合能力, 但都低于 EDTA-2Na。

由图 10 可知: 松茸多糖的还原能力随着质量浓度的升高而增强, 当质量浓度为 4.00 mg/mL 时, 松茸粗多糖、TMP-1、TMP-2、TMP-3 和 Vc 的还原能力分别为 0.872、0.056、0.822、0.764 和 1.477, IC_{50} 值依次为 1.348、110.142、1.517、1.840 和 0 mg/mL, 还原能力为: Vc>松茸粗多糖>TMP-2>TMP-3>TMP-1。

3 讨论

3.1 松茸多糖单因素试验结果

松茸药用价值极高且较为稀少, 松茸多糖是目前研究热点之一, 如何最大限度获得松茸多糖也成为亟待解决的问题。目前, 松茸粗多糖的提取方法有微波提取法^[16]、热水提取法^[17]、超声波提取法^[18]等, 但存在方式单一、操作复杂的缺点。采用超声辅助水提醇沉法^[19], 将 2 种提取方法进行复合提取, 能够有效提高提取率、缩短提取时间。通过前期预试验, 确定料液比、浸提时间、浸提温度对提取工艺的影响较大, 因此选用这 3 个单因素进行提取工艺研究。杨惠舒等^[20]采用响应面法优化石韦多糖提取工艺, 确定最佳提取料液比为 1 : 27 (g : mL), 提取率为 3.96%, 提取过程中料液比超过最佳料液比时, 总多糖提取率有降低趋势, 与本研究结果相近。分析其原因可能是原料中多糖含量有限, 料液比不断增加, 溶出率出现峰值, 多糖溶出完全; 但料液比持续

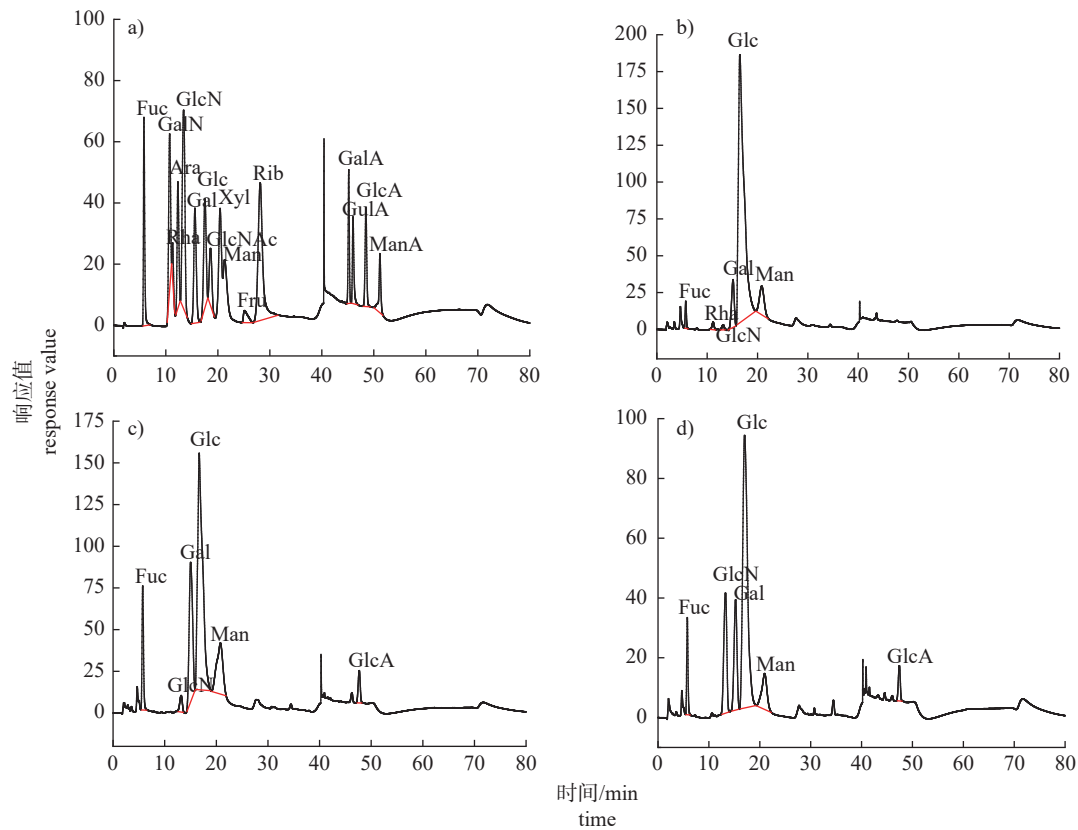


图 6 16 种标准单糖 (a) 和松茸多糖纯化组分 TMP-1 (b)、TMP-2 (c)、TMP-3 (d) 的离子色谱图
Fig. 6 Ion chromatograms of 16 standard monosaccharides (a) and purified components of TMP-1 (b), TMP-2 (c) and TMP-3 (d) from *T. matsutake* polysaccharide

表 4 松茸多糖纯化组分的单糖含量

Tab. 4 Content of purified components of polysaccharides from *T. matsutake* %

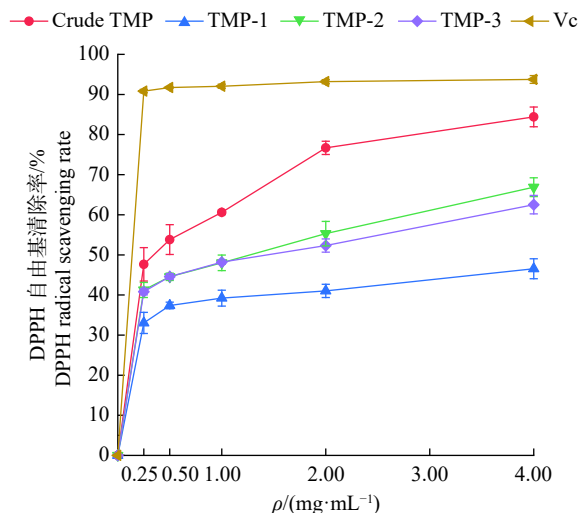
组分 component	岩藻糖 fucose	鼠李糖 rhamnose	盐酸氨基葡萄糖 glucosamine hydrochloride	半乳糖 galactose	葡萄糖 glucose	甘露糖 mannose	葡萄糖醛酸 glucuronic acid
TMP-1	2.1	2.9	0.4	7.1	75.4	12.2	未检出 not detected
TMP-2	8.9	未检出 not detected	0.9	19.6	43.5	22.6	4.5
TMP-3	6.6	未检出 not detected	8.6	14.6	52.0	12.0	6.1

增加,原料与溶液的分离操作难度增加,使部分多糖损失,提取率反而降低。王兰英等^[21]提取发酵虫草多糖 1.5 h 时,多糖提取含量达到最高,超过 1.5 h 后多糖提取含量开始下降,与本研究多糖浸提时间的上升趋势相近。随着浸提时间增加,多糖提取率先增加后下降,可能是部分小分子多糖开始降解,从而降低多糖提取率。王君等^[22]采用超声辅助提取金丝皇菊多糖,提取率随着温度的升高呈先升后降的趋势,并在 70 ℃ 时达到峰值 (84.813 mg/g),这是因为温度不断升高,分子之间运动加快,多糖溶解度不断提高,

从而提高了多糖提取率;当温度达到 85 ℃ 时,多糖已基本溶出,温度持续升高,多糖结构被破坏,多糖提取率降低。因此,本研究最佳料液比为 1 : 30 (g : mL),浸提时间为 2 h,浸提温度为 85 ℃。

3.2 松茸多糖提取条件的优化

基于 Box-Behnken 设计的响应面方法优化松茸多糖的提取,得到最佳工艺条件为:浸提时间 2.25 h,料液比 1 : 31 (g : mL),浸提温度 83.50 ℃,在此条件下多糖提取率为 8.67%。YIN 等^[5]采用响应面法优化了逆流探针超声提取松茸多糖的工



注: Crude TMP. 松茸粗多糖; 下同。

注: Crude TMP. *T. matsutake* crude polysaccharide; the same as below.

图 7 松茸多糖不同组分的 DPPH 自由基清除率

Fig. 7 DPPH radical scavenging rate of different components from *T. matsutake* polysaccharide

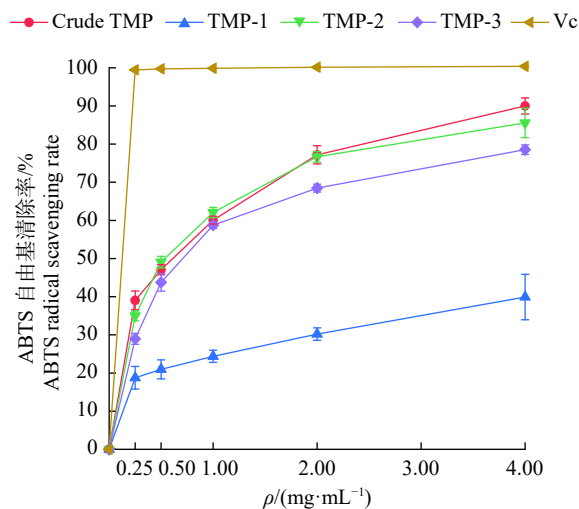


图 8 松茸多糖不同组分的 ABTS 自由基清除率

Fig. 8 ABTS radical scavenging rate of different components from *T. matsutake* polysaccharide

艺, 其最大产率为 8.11%; 陈炼红等^[6]采用复合酶法从松茸中提取多糖, 提取率为 6.95%; 吴杨洋等^[7]研究发现: 热水浸提和超声提取的松茸多糖提取率较高, 分别为 9.34% 和 8.06%。本研究采用超声波辅助水提醇沉法提取松茸粗多糖, 与其他方法相比能够显著提高多糖提取率。此外, 松茸多糖提取率存在差异, 可能与原料生长环境、产地、生长状态等外部条件有关, 在提取多糖时应将这些条件考虑在内。从模型的方差分析、响应面和等高线图可以看出: 料液比与浸提

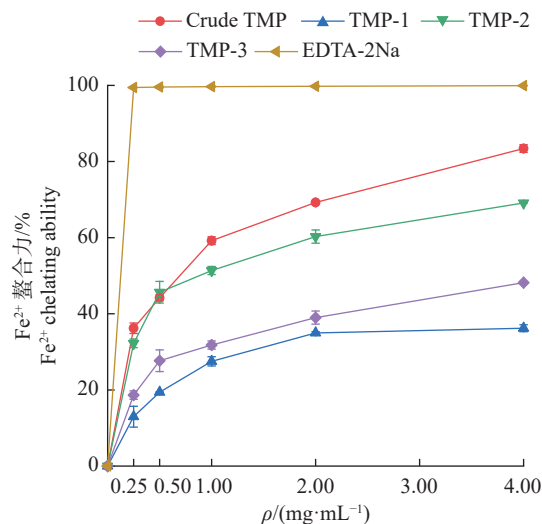


图 9 松茸多糖不同组分的金属离子螯合力

Fig. 9 Metal iron chelating ability of different components from *T. matsutake* polysaccharide

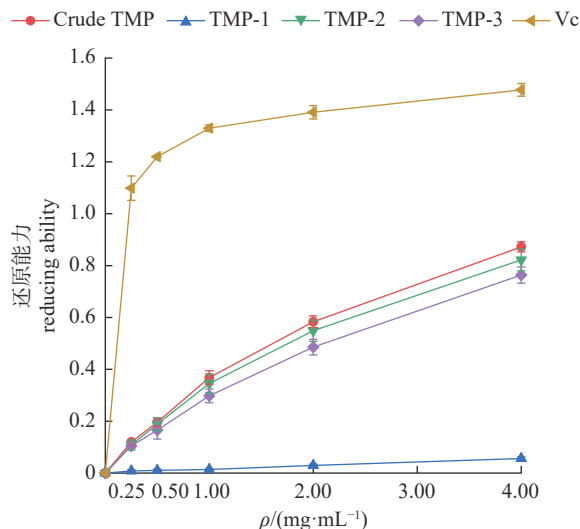


图 10 松茸多糖不同组分的还原能力

Fig. 10 Reducing ability of different components from *T. matsutake* polysaccharide

温度的交互作用项极其显著, 料液比与浸提温度的交互作用项显著, 其余项均为不显著。对松茸粗多糖的提取率影响最大的因素是浸提时间, 其次是料液比和浸提温度。

3.3 松茸多糖的分离纯化与单糖组成

本研究松茸多糖分离纯化出 4 种新多糖组分: TMP-1、TMP-2、TMP-3 和 TMP-4, 其中 TMP-4 含量较低。YAN 等^[23]从杏鲍菇、金针菇、平菇和白褐菇中获得了 4 种水溶性多糖富集组分, 经分离纯化得到 1 种中性多糖和 1 种酸性多糖; LIU 等^[24]将牡蛎王菇粗多糖在 DEAE-纤维素柱洗

脱,得到3种组分。本研究显示:TMP-1单糖组成为岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖;TMP-2和TMP-3单糖组成种类一致,包括岩藻糖、盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸,但含量有差别。食用菌中含有葡萄糖、岩藻糖、半乳糖、甘露糖、木糖等多种杂多糖,TMP-1、TMP-2和TMP-3的单糖组成在灵芝和金针菇中也有发现^[25]。

3.4 不同组分松茸多糖的体外抗氧化活性

本研究表明:松茸粗多糖、TMP-1、TMP-2和TMP-3具有较强的DPPH和ABTS自由基清除能力、金属螯合能力以及还原能力,松茸多糖具有较好的抗氧化能力,其中松茸粗多糖的抗氧化活性最好,可能与粗多糖中其他抗氧化剂含量有关;TMP-2和TMP-3抗氧化活性均优于TMP-1,可能与单糖组成有关。研究表明:多糖组成与抗氧化活性密切相关^[26]。YUAN等^[27]测定了桑叶多糖(MLP)中粗MLP、MLP-3a和MLP-3b对DPPH自由基的清除率分别为68.21%、40.44%和60.17%,与本研究结果相似;粗MLP的DPPH自由基清除率高于分离纯化后的多糖组分,可能是粗多糖中含有多酚,而MLP-3b的抗氧化活性比MLP-3a更高,这可能是由于MLP-3b的糖醛酸含量较高。本研究中,TMP-2和TMP-3清除DPPH自由基的能力高于TMP-1,这可能与2种组分都含有糖醛酸有关。CHEN等^[28]研究表明:茯砖茶中多糖对ABTS自由基清除活性与半乳糖含量有关,而本研究的TMP-1、TMP-2和TMP-3中半乳糖是其主要单糖成分,其半乳糖含量存在一定差异可能是发挥清除ABTS自由基作用的原因之一。JIANG等^[29]研究了青蛤多糖(CSPS)的抗氧化活性,CSPS-3比CSPS-1或CSPS-2具有更好的Fe²⁺螯合作用。据报道,具有金属离子螯合活性的化合物通常包含—OH、—SH、—COOH、C=O、—S—和—O—中2个或2个以上的官能团^[30]。CSPS-3的螯合作用可能是由于结构中的强Fe²⁺螯合基团。本研究中,松茸粗多糖、TMP-2比TMP-1、TMP-3的金属离子螯合活性高,可能是由于TMP-2的结构中含有强Fe²⁺螯合基团。LIU等^[31]对竹荪多糖(DIP)抗氧化性的研究结果与本研究结果相似,DIP的还原能力虽然没有预期高,但具有浓度依赖性,TMP的还原能力也有一定的浓度依赖性。本研究表明:TMP-1、TMP-2

和TMP-3为酸性杂多糖,这与TONG等^[18]的研究结果相似,其研究从松茸子实体中分离出2种具有显著抗氧化活性的多糖成分TM-APS-1和TM-APS-2,2种多糖均由葡萄糖和葡萄糖醛酸组成,且葡萄糖含量较高,有利于氢键形成,可以增强多糖清除自由基的能力,从而提高抗氧化活性。但是,对于松茸多糖的抗氧化机制还需要进一步研究。

4 结论

本研究通过超声波辅助水提醇沉法提取松茸粗多糖,确定最佳提取工艺为:浸提时间2.25 h,料液比1:31(g:mL),浸提温度83.50℃,此条件下多糖提取率为8.42%。松茸粗多糖分离纯化得到3种多糖组分:TMP-1、TMP-2和TMP-3,其组成主要为:葡萄糖、甘露糖和半乳糖,但含量有差别。松茸多糖表现出一定的抗氧化能力,对DPPH和ABTS自由基都有较好的清除效果,同时具有较好的金属离子螯合能力和还原能力。其中,松茸粗多糖的抗氧化活性最好,其次为TMP-2、TMP-3和TMP-1。该研究为松茸粗多糖的分离纯化、结构解析、生物活性研究以及开发具有潜力的功能性食品提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 李万辉,杨什补,苟梅花,等.松茸多糖的研究进展[J].农业技术与装备,2020,369(9):109. DOI: 10.3969/j.issn.1673-887X.2020.09.052.
- [2] 周选围.松茸资源研究概况[J].食用菌学报,2002,9(1):50. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9873.2002.01.012.
- [3] GUERIN-LAGUETTE A, VAARIO L M, MATSUSHITA N, et al. Growth stimulation of a Shiro-like, mycorrhiza forming, mycelium of *Tricholoma matsutake* on solid substrates by non-ionic surfactants or vegetable oil[J]. Mycological Progress, 2003, 2(1): 37. DOI: 10.1007/s11557-006-0042-7.
- [4] 王宏雨,张迪,肖冬来,等.姬松茸胞内多糖和胞外多糖的抗氧化活性研究[J].福建轻纺,2017(12):30. DOI: 10.3969/j.issn.1007-550X.2017.12.002.
- [5] YIN X L, YOU Q H, SU X Y. A comparison study on extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102(1): 419. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.11.072.
- [6] 陈炼红,杨丽珠,索化夷,等.响应面法优化松茸多糖酶法提取工艺及其体外抗氧化性分析[J].食品科学,2014,35(16):23. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201416005.
- [7] 吴杨洋,田淑雨,鹿士峰,等.不同提取方法对松茸多糖

- 理化性质及抗氧化活性的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(19): 5164. DOI: [10.3969/j.issn.2095-0381.2018.19.026](#).
- [8] HOU Y L, DING X, HOU W R, et al. Anti-microorganism, anti-tumor, and immune activities of a novel polysaccharide isolated from *Tricholoma matsutake*[J]. Pharmacognosy Magazine, 2013, 9(35): 244. DOI: [10.4103/0973-1296.113278](#).
- [9] 尹秀莲, 游庆红, 蒋中海. 松茸多糖的提取纯化工艺研究[J]. 中国酿造, 2009(10): 171. DOI: [10.3969/j.issn.0254-5071.2009.10.059](#).
- [10] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248. DOI: [10.1006/abio.1976.9999](#).
- [11] MA W J, CHEN X F, WANG B, et al. Characterization, antioxidativity, and anti-carcinoma activity of exopolysaccharide extract from *Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33013[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 181: 768. DOI: [10.1016/j.carbpol.2017.11.080](#).
- [12] SONG X P, TANG J. Extraction optimization, preliminary characterization and bioactivities *in vitro* of *Ligularia hodgsonii* polysaccharides[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5): 788. DOI: [10.3390/ijms17050788](#).
- [13] 胡治远, 刘素纯, 刘石泉. 冠突散囊菌子囊孢子粗多糖抗氧化活性的比较分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 102. DOI: [10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.012](#).
- [14] FAN J L, WU Z W, ZHAO T H, et al. Characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Ilex latifolia* Thunb[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 990. DOI: [10.1016/j.carbpol.2013.10.037](#).
- [15] FAN L P, LI J W, DENG K Q, et al. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1849. DOI: [10.1016/j.carbpol.2011.10.018](#).
- [16] CHEN Y, DU X J, ZHANG Y, et al. Ultrasound extraction optimization, structural features, and antioxidant activity of polysaccharides from *Tricholoma matsutake*[J]. Journal of Zhejiang University (Science B), 2017, 18: 674. DOI: [10.1631/jzus.B1600239](#).
- [17] 杨丹妮, 汪振炯, 吕胜男. 超声波协同酶法提取姬松茸基质多糖及其抗肿瘤活性研究[J]. 食品科技, 2017, 42(11): 212. DOI: [10.13684/j.cnki.spkj.2017.11.040](#).
- [18] TONG H B, LIU X M, TIAN D, et al. Purification, chemical characterization and radical scavenging activities of alkali-extracted polysaccharide fractions isolated from the fruit bodies of *Tricholoma matsutake*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 29(5): 775. DOI: [10.1007/s11274-012-1232-x](#).
- [19] 朱和权, 冯进, 李春阳, 等. 响应面法优化白首乌多糖超声辅助提取工艺及其结构表征[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 153. DOI: [10.13386/j.issn1002-0306.2020.070135](#).
- [20] 杨惠舒, 林学洋, 陈成龙, 等. 响应面法优化石韦多糖提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J]. 当代化工, 2022, 51(2): 354. DOI: [10.13840/j.cnki.cn21-1457/tq.2022.02.020](#).
- [21] 王兰英, 姜玲, 赵静, 等. 发酵虫草多糖提取工艺优化及其体外抗氧化、免疫活性研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2021, 42(6): 80. DOI: [10.16433/j.1673-2383.2021.06.011](#).
- [22] 王君, 陈新, 高文彬, 等. 响应面法优化超声辅助提取金丝皇菊多糖工艺及生理活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(2): 100. DOI: [10.19804/j.issn1006-2513.2022.02.014](#).
- [23] YAN J M, ZHU L, QU Y H, et al. Analyses of active antioxidant polysaccharides from four edible mushrooms[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 945. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2018.11.079](#).
- [24] LIU X K, WANG L, ZHANG C M, et al. Structure characterization and antitumor activity of a polysaccharide from the alkaline extract of king oyster mushroom[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 118: 101. DOI: [10.1016/j.carbpol.2014.10.058](#).
- [25] LEONG Y K, YANG F C, CHANG J S. Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: emerging technologies and recent advances[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 251: 117006. DOI: [10.1016/j.carbpol.2020.117006](#).
- [26] YANG L Q, ZHANG L M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3): 349. DOI: [10.1016/j.carbpol.2008.12.015](#).
- [27] YUAN Q X, XIE Y F, WANG W, et al. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 128: 52. DOI: [10.1016/j.carbpol.2015.04.028](#).
- [28] CHEN G J, WANG M J, XIE M H, et al. Evaluation of chemical property, cytotoxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from Fuzhuan brick teas[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 120. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2018.04.184](#).
- [29] JIANG C X, XIONG Q P, GAN D, et al. Antioxidant activity and potential hepatoprotective effect of polysaccharides from *Cyclina sinensis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 91(1): 262. DOI: [10.1016/j.carbpol.2012.08.029](#).
- [30] YUAN Y V, BONE D E, CARRINGTON M F. Antioxidant activity of dulce (*Palmaria palmata*) extract evaluated *in vitro*[J]. Food Chemistry, 2005, 91(3): 485. DOI: [10.1016/j.foodchem.2004.04.039](#).
- [31] LIU X Y, CHEN Y X, WU L X, et al. Optimization of polysaccharides extraction from *Dictyophora indusiata* and determination of its antioxidant activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103(4): 175. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2017.04.125](#).

责任编辑: 何承刚