

多汁乳菇多糖的微波辅助提取工艺及其清除 DPPH 自由基研究

张水花, 江永刚, 赵红艳

(曲靖师范学院 化学与化工学院, 云南 曲靖 655011)

摘要:以多汁乳菇为试材,研究了液料比、微波功率、提取时间、提取次数对多糖提取率的影响,并采用正交实验优化了工艺条件,对提取产物进行了 DPPH 自由基清除研究。结果表明:对多糖提取率影响最大是微波功率,其次是液料比,提取时间影响最小;优化工艺条件为液料比 20:1 mL·g⁻¹,微波功率 480 W,提取时间 4 min,提取 3 次。在此条件下多糖提取率达 6.41%。多糖对 DPPH 自由基有一定的清除作用,证明多汁乳菇多糖具有一定的抗氧化活性。

关键词:多汁乳菇;多糖;微波;DPPH 自由基清除

中图分类号:TS 201.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0135-04

食用真菌中的多糖能刺激抗体的形成,提高并调整机体内部的防御能力,降低某些物质诱发肿瘤的发生率,并对多种化疗药物有增效作用^[1-4]。因此,食用真菌中多糖研究成为研究领域的热点之一。多汁乳菇(*Lactarius volemus* Fr.)属真菌门,子囊菌纲,属伞菌目,红菇科,乳菇属,主要分布在云南、贵州、广东、广西等地,因香味浓郁而备受人们喜爱,除此之外多汁乳菇还有健胃、

止咳平喘、祛痰等功效,经常食用能增强人体抗逆能力,另外研究还发现该菌对小白鼠肉瘤 180 的抑制率为 100%,对艾氏癌的抑制率为 90%,被认为具有较高的药用价值^[5-7]。多糖作为野生多汁乳菇中的重要活性物质之一,目前对其的研究较少,因此对野生多汁乳菇中多糖的研究不仅能确定其营养水平,还能为其进一步应用尤其是在医药保健品方面的应用提供理论依据和数据支持。

近年来,对植物多糖提取研究方法较多,常用的有热水提取法、超声辅助提取、稀碱提取等。但对于多汁乳菇多糖浸提方法的深入研究较少,尤其是提取产物多

第一作者简介:张水花(1980-),女,硕士,副教授,研究方向为天然产物化学及保健食品。E-mail:z_shh@163.com.

基金项目:云南省科技厅研究基金资助项目(2013FD047)。

收稿日期:2016-03-26

参考文献

- [1] 中国标准出版社第一编辑室. 农药残留国家标准汇编[M]. 北京:中国标准出版社,1999:176-185.
[2] 何艺兵,刘丰茂,潘灿平,等. 农业部标准 NY/T789-2004,农药残留分析样本的采样方法[S]. 2004-06-01.

[3] 李昌春,孙明娜,王梅,等. 板栗中的农药残留分析[J]. 果树学报,2004,21(5):496-498.

[4] 赵笑天,史惠娟,原超,等. 鲜枣干枣和裂果枣中 9 种真菌毒素及 77 种农药残留的分析与检测[J]. 农产品加工,2011(3):61-67.

Analysis of Chemical Residues in Jujube and Chestnut Fruit

LI Mengchai¹, WU Yajing¹, TANG Fubin²

(1. Hebei Academy of the Forestry Science, Shijiazhuang, Hebei 050061; 2. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400)

Abstract: Using the jujube and chestnut of Hebei Province as the test materials, the fruits of pesticide residue and heavy metal content were studied by gas chromatography method, to provide reference for pollution-free cultivation to jujube and chestnut. The results showed there was excessive pesticide in jujube fruit, chestnut fruit of pesticides and heavy metals were not exceeded, the products complied with national standards.

Keywords: jujube; chestnut; pesticide residue; heavy metal; detection

糖对 DPPH 自由基的清除作用尚鲜见报道。该研究应用微波辅助浸提方法提取多汁乳菇多糖,并以多糖提取率为指标对浸提过程中的影响因素进行了研究,提出了优化工艺条件。对已优化工艺提取的多汁乳菇多糖进行了 DPPH 自由基清除作用研究,以期为多汁乳菇营养水平确定及进一步应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试多汁乳菇购自云南曲靖当地农贸市场,将块菌洗净,低温干燥后在 105 ℃ 下烘干后粉碎并过 40 目筛,得到干燥菌粉备用。

乙醇、丙酮、石油醚、硫酸、蒽酮、葡萄糖、DPPH 等试剂均为分析纯;TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),微波炉(G8023CTL-K3 Ganlanz 型,佛山市顺德区格兰仕微波炉电器有限公司),旋转蒸发器(RE-52AAA 型,上海伊利仪器制造有限公司),精密电子天平(AL204-IC 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)等。

1.2 试验方法

1.2.1 2 种提取方法对多汁乳菇多糖的对比试验 微波辅助提取法(单因素试验和正交实验采用此方法):多汁乳菇样品→无水乙醇浸泡→过滤→菌渣→微波辅助提取→离心抽滤→滤液减压浓缩→二氯甲烷萃取 2 次→乙酸乙酯萃取 3 次→正丁醇萃取 4 次→水相减压浓缩→乙醇沉淀、乙醇和丙酮洗涤→收集沉淀→干燥→粗多糖。热水浸提法参照文献[8]中的方法。

1.2.2 多糖含量的测定方法 采用硫酸蒽酮法。准确称取多汁乳菇粗多糖 10 mg 溶于 50 mL 容量瓶中制得 0.2 g · L⁻¹ 的样品溶液,取 0.8 mL 于试管中,蒸馏水补液至 2.00 mL,再加蒽酮-硫酸溶液(0.2%)8.00 mL,置于冰水浴中冷却 15 min,后置于沸水中加热 15 min,再冷却至室温,在 620 nm 处测吸光度 A。平行测定 3 次,以 2.0 mL 蒸馏水做空白对照。多汁乳菇多糖提取率(%)=[(粗多糖质量×多糖含量)/样品质量]×100。

1.2.3 抗氧化性测定 取不同浓度多汁乳菇多糖待测溶液 2.00 mL 和 DPPH 自由基溶液(2.0×10⁻⁴ mol · L⁻¹) 2.00 mL,加入具塞试管中,混匀 30 min 后置比色皿中,在 517 nm 处测量其吸光度,测定值记为 A_i。同时测定 2.00 mL DPPH 自由基溶液和 2.00 mL 无水乙醇混合后的吸光度,测定值记为 A₀;2.00 mL 相同试样溶液和 2.00 mL 无水乙醇混合后的吸光度,测定值记为 A_j。根据公式计算清除率。抗氧化性能用清除率来表示,清除率越大,抗氧化性能越强。DPPH 清除率(%)=[1-(A_j-A_i)/A₀]×100。

1.2.4 单因素试验液料比对多糖得率的影响 液料比对多糖得率的影响:在微波功率 480 W,提取时间 4 min,提

取次数为 3 次的条件下,研究了液料比(5:1、10:1、15:1、20:1、25:1 mL · g⁻¹)对多汁乳菇多糖得率的影响。微波功率对多糖得率的影响:在提取次数为 3 次,液料比为 20:1 mL · g⁻¹,微波时间 4 min 的条件下,研究了不同微波功率(160、320、480、640、800 W)对多汁乳菇多糖得率的影响。提取时间对多糖得率的影响:在固定提取次数为 3 次,液料比 20:1 mL · g⁻¹,微波功率 480 W 的条件下,研究了不同的提取时间(1、2、3、4、5 min)对多汁乳菇多糖提取率的影响。提取次数对多糖得率的影响:在固定提取时间 4 min,液料比为 20:1 mL · g⁻¹,微波功率 480 W 的条件下,研究了不同提取次数(1、2、3、4、5 次)对多汁乳菇多糖提取率的影响。

1.2.5 正交实验 在单因素试验基础上,采用正交实验 L₉(3⁴)设计方法优化测定方法,因素及水平见表 1。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A 液料比 Ratio of liquid-solid /(mL · g ⁻¹)	B 提取时间 Microwave time /min	C 微波功率 Microwave power /W	D 提取次数 Times of extraction /次
1	10:1	3	320	2
2	15:1	4	480	3
3	20:1	5	640	4

1.2.6 2 种提取方法对多汁乳菇多糖的对比试验 用蒽酮-硫酸法分别测定热水浸提法和微波辅助提取法(各种因素条件为正交实验得出的优化工艺条件)提取的多汁乳菇粗中多糖的含量。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 液料比对多糖得率的影响 由图 1 可知,随着液料比的增大,多汁乳菇多糖得率先增加后减小,液料比小于 20:1 mL · g⁻¹ 时,多糖提取率出现增加趋势,液料比再增加,多糖得率则出现下降趋势。说明在一定范围内增大液料比有利于多糖溶出,但液料比过大,会造成多糖溶解从而使多糖得率下降,另外过大的液料比还会提高能耗和对资源造成浪费。

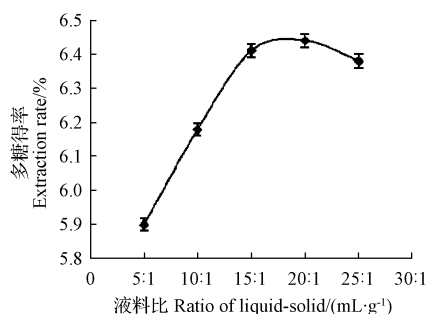


图 1 液料比对多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of ratio of liquid-solid on polysaccharide yield

2.1.2 微波功率对多糖得率的影响 图2表明,当微波功率低于480 W时,随着微波功率的增大,多糖得率提高,当微波功率超过480 W时,随着微波功率的增大,多糖得率则出现下降趋势。可能是由于多糖本身的结构及活性与温度有关,微波功率过大,导致提取体系温度过高,破坏了多糖结构,从而使多糖得率下降^[9]。故选择480 W为最佳微波功率。

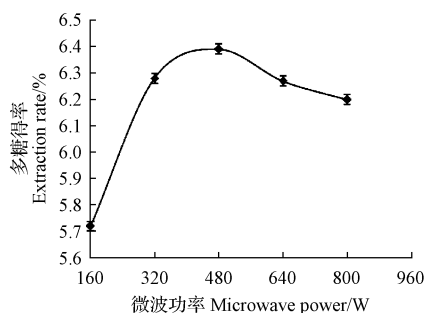


图2 微波功率对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of microwave power on polysaccharide yield

2.1.3 提取时间对多糖得率的影响 由图3可知,随着提取时间的延长多糖得率快速上升,并在4 min时达到最大。4 min之后,提取时间过长,体系中积蓄的能量过多至温度高,可能导致多糖结构破坏从而导致多糖得率下降。

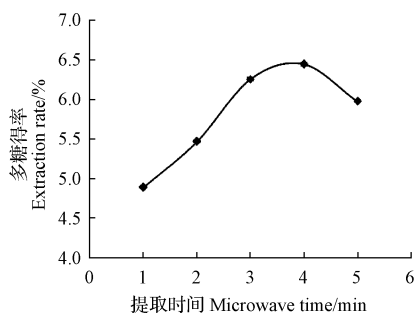


图3 提取时间对多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of microwave time on polysaccharide yield

2.1.4 提取次数对多糖得率的影响 从图4可以看出,随着提取次数的增加,多糖得率先逐步升高然后趋于稳定,当提取次数超过3次时,多糖得率基本不再上升。在实际生产中,提取次数过多既耗时又增加成本,因此综合各种因素考虑选定提取3次为宜。

2.2 正交实验

整个提取过程中影响多糖得率的主要因素有液料比、提取时间、微波功率、提取次数。表2中的极差分析结果表明,对多糖提取率影响最大是微波功率,其次是液料比,提取时间影响最小,各因素影响程度顺序是微波功率>液料比>提取次数>提取时间。表3方差分析表明,微波功率对多糖提取率都有显著影响,参

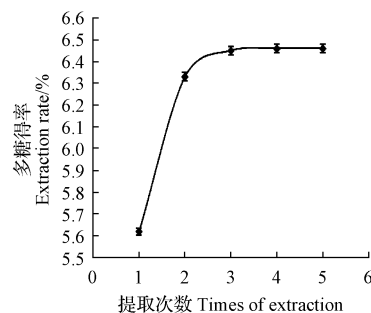


图4 提取次数对多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of times of extraction on polysaccharide yield

表2 正交实验结果

Table 2 Result of orthogonal test

因素 Factor	A 液料比 Ratio of liquid-solid /(mL · g ⁻¹)	B 提取时间 Microwave time /min	C 微波功率 Microwave power /W	D 提取次数 Times of extraction /次	提取率 Polysaccharide yield /%
实验1	10:1	3	320	2	5.48
实验2	10:1	4	480	3	6.10
实验3	10:1	5	640	4	5.50
实验4	15:1	3	480	4	6.40
实验5	15:1	4	640	2	5.62
实验6	15:1	5	320	3	6.04
实验7	20:1	3	640	3	5.74
实验8	20:1	4	320	4	6.20
实验9	20:1	5	480	2	6.15
均值1	5.693	5.873	5.907	5.750	
均值2	6.020	5.973	6.217	5.960	
均值3	6.030	5.897	5.620	6.033	
极差	0.337	0.100	0.597	0.283	

表3 方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

因素 Factor	偏差平方和 Bias squares	自由度 df	F比 F ratio	F临界值 Critical value F	显著性 Significant
A	0.220	2	13.75	19	
B	0.016	2	1.00	19	
C	0.534	2	33.375	19	*
D	0.130	2	8.125	19	
误差	0.02	2			

考正交实验结果兼顾反应速度、经济性等因素,优化工艺条件为:液料比20:1 mL · g⁻¹,微波功率480 W,提取时间4 min,提取3次。按照优化工艺条件进行3次试验,多糖提取率分别6.43%、6.38%、6.44%,平均产率为6.41%。

2.3 2种提取方法对多汁乳菇多糖的对比试验

由表4可知,多糖得率微波辅助提取高于热水浸提法,在提取时间上微波辅助提取仅需4 min,明显短于热水浸提法所需的3.5 h。

2.4 2种提取方法所得粗多糖对 DPPH 自由基清除能力测定

自由基进入人体夺去细胞蛋白分子的电子,使蛋白

表 4 2 种方法的效果比较

Table 4 Comparison of two methods

不同方法 Different method	液料比 Ratio of liquid-solid /(mL · g ⁻¹)	微波功率 Microwave power /提取温度 Temperature	提取时间 Microwave time	提取次数 Times of extraction /次	提取率 Polysaccharide yield /%
微波辅助法	20 : 1	480 W	4 min	3	6.41
热水浸提法	20 : 1	50 ℃	3.5 h	3	5.24

质支链发生烷基化,形成畸变的分子而致病致癌^[10]。目前,体外检测抗氧化剂清除自由基方法中以 DPPH 自由基最为常见,抗氧化性能用清除率来表示,清除率越大,抗氧化性能越强。图 5 表明,随着多糖浓度的增加,2 种提取方式所得多糖对 DPPH 自由基清除率出现先增大后趋于稳定的趋势。在多糖浓度 0~2.0 g · L⁻¹ 时,二者的清除率相当,而且都基本接近 99%。

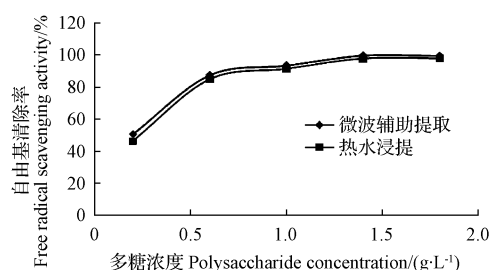


图 5 多汁乳菇多糖对 DPPH 自由基清除能力

Fig. 5 DPPH radical-scavenging activities of polysaccharides from *Lactarius volemus* Fr.

3 结论

采用微波辅助技术提取多汁乳菇中的多糖,在单因

素试验的基础上,通过正交实验法优化多糖提取工艺,最佳提取工艺为液料比 20 : 1 mL · g⁻¹,微波功率 480 W,提取时间 4 min,提取 3 次。在此条件下多糖提取率达 6.41%,高于热水浸提法的 5.24%。该方法能高效、快速的将多汁乳菇中的多糖溶出。

多汁乳菇多糖对 DPPH 自由基的清除作用研究表明,该多糖具有一定的抗氧化能力,作为一种新的、天然的抗氧化剂具有良好的开发前景。

参考文献

- [1] 朱培欣,梅余霞,梁运祥.一种虫草多糖的体外免疫学活性[J].食品科技,2013,38(9):25-28.
- [2] 王君巧,聂少平,余强,等.黑灵芝多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J].食品科学,2012,33(23):274-277.
- [3] NIE S P,ZHANG H,LI W J,et al. Current development of polysaccharides from Ganoderma: Isolation, structure and bioactivities[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 1(1): 10-20.
- [4] ZHU L N, LUO X, TANG Q J, et al. Isolation, purification, and immunological activities of low-molecular-weight polysaccharide from the lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher basidiomycetes)[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2013, 15(4): 407-414.
- [5] 刘佳,高敏,殷忠.贵州野生多汁乳菇氨基酸成分及致小鼠突变性实验[J].预防医学情报杂志,2007,23(2):230-232.
- [6] AHMET C, ZLEM F, ERTU R S. Nutritional composition of some wild edible mushrooms[J]. Turkish Journal of Biochemistry, 2009, 34(1): 25-31.
- [7] 胡先运,王传明,江家志,等.多汁乳菇的研究及应用[J].北方园艺,2014(18):157-160.
- [8] 王心诗,邵丽梅,吴素蕊,等.响应面法优化水提铜色牛肝菌多糖工艺[J].中国食用菌,2015,34(1):60-64.
- [9] 张斌,刘莹,王益,等.金针菇菌渣中多糖的微波辅助提取工艺及其抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2015,27(1):120-125.
- [10] 陈景藻.现代物理治疗学[M].北京:人民军医出版社,2001:186-195.

Microwave-assisted Extraction and Antioxidant Activity of Polysaccharides From *Lactarius volemus* Fr.

ZHANG Shuihua, JIANG Yonggang, ZHAO Hongyan

(Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Qujing Normal College, Qujing, Yunnan 655011)

Abstract: Taking *Lactarius volemus* Fr. as the raw material, the effects of extraction conditions such as ratio of liquid-solid, microwave time, microwave power and time of extraction were investigated by one-factor tests and orthogonal test, and the extraction polysaccharides analyzed with DPPH · test. The results showed that the microwave power affected the yield markedly, the second was ratio of liquid-solid, and microwave time had the least influence; the optimum conditions were determined as follows: ratio of liquid-solid of 20 : 1 mL · g⁻¹, microwave power of 480 W, microwave time of 4 min and times of extraction of 3 times. Under the condition, the yield was up to 6.41%. Polysaccharides exhibited antioxidant effects in 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH ·) radical scavenging assay. And it showed that the extraction polysaccharides which had some oxidation resistance.

Keywords: *Lactarius volemus* Fr.; polysaccharides; microwave-assisted; DPPH free radical scavenging