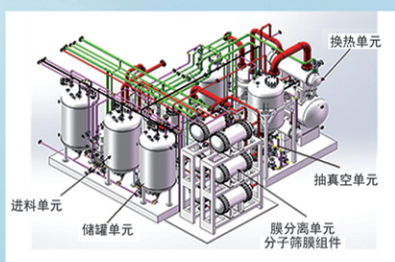




浙江汇甬新材料有限公司

微波合成第二代脱水膜

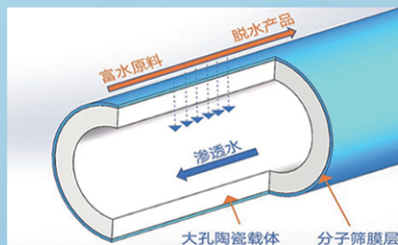


国家自然科学基金二等奖 成果转化

IChemE全球 创新产品冠军

微波分子筛膜 脱水性能遥遥领先

共沸体系、热敏体系、含水有机物脱水精制换代技术



收率高、能耗低、连续脱水、无需再生

在如下领域的有机物脱水精制已有工业化应用

锂电池电解液溶剂及NMP生产、回收
BDO产业链、煤化工、石油化工精细化学品
制药行业、溶媒回收、燃料乙醇、超纯溶剂

广泛适用于醇类、醚类、酯类、酮类、苯系物、卤代烃的脱水精制



网址: www.hymater.com

固定电话: 0574-87648996

电话: 13396592011

地址: 浙江省宁波市江北高新园区庆丰路联东U谷国际港56号楼

大球盖菇多糖的酶辅助离子液体提取、 结构表征及生物活性

王俊龙¹, 蔺永刚^{1*}, 时文盼¹, 庞娟侠¹,
李文文², 努尔买买提^{2*}

(1. 伊犁师范大学 新疆生物质资源清洁转化与高值化利用重点实验室, 新疆 伊宁 835000; 2. 伊犁师范大学 生物科学与技术学院, 新疆 伊宁 835000)

摘要: 通过单因素和响应面法优化了酶辅助离子液体对大球盖菇粗多糖 (SRP) 的提取工艺, 纯化后得到相对分子质量均一的大球盖菇多糖 (SRP-I)。通过 UV-Vis、FTIR、GC-MS、XRD、SEM、EDS、NMR 表征和刚果红实验、TG、部分酸水解、Smith 降解测试, 探究了 SRP-I 的结构和性质, 评价了 SRP-I 的体外抗氧化和降糖能力。结果表明, 在提取时间 106 min、提取温度 51 °C、1-十四烷基-3-甲基咪唑溴盐质量浓度 4.3 g/L、纤维素酶添加量 (以样品质量计, 下同) 为 10.4% 的最佳提取工艺条件下, SRP 的提取率为 32.54%±0.12%; SRP-I 是 1 种具有三螺旋构象的 α -D-吡喃构型的中性多糖, 表面平整光滑, 无定形和晶体共存, 其在 550 °C 时残炭率为 26.34%; SRP-I 重均相对分子质量为 24.321 kDa, 主要由葡萄糖 (53.31%, 摩尔分数, 下同)、半乳糖 (43.32%) 和岩藻糖 (3.37%) 组成, 其中, 岩藻糖主要存在于侧链上, 葡萄糖和半乳糖较均匀分布在主链和侧链上, 主链是以 [$\rightarrow$ 3]-GlcP($\rightarrow$ 1) 和 [$\rightarrow$ 6]-GalP($\rightarrow$ 1) 结构组成, 同时存在 [$\rightarrow$ 3,6]-GlcP($\rightarrow$ 1) 支链结构; 质量浓度为 2.500 g/L SRP-I 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基、2,2-联氮-双(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基、羟基自由基的清除率分别为 82.54%、51.62%、51.57%, 对应的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.127、2.438、2.446 g/L, 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制率分别为 61.2% 和 71.4%, IC₅₀ 分别为 0.970 和 0.240 g/L。

关键词: 大球盖菇; 多糖; 结构表征; 抗氧化活性; 降糖活性; 食品化学品

中图分类号: R932; TS201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 02-0388-14

Enzyme-assisted ionic liquid extraction, structure characterization and biological activity of polysaccharides from *Stropharia rugosoannulata*

WANG Junlong¹, LIN Yonggang^{1*}, SHI Wenpan¹, PANG Juanxia¹, LI Wenwen²,
NUER Maimaiti^{2*}

(1. Xinjiang Key Laboratory of Clean Conversion and High Value Utilization of Biomass Resources, Yili Normal University, Yining 835000, Xinjiang, China; 2. College of Biological Science and Technology, Yili Normal University, Yining 835000, Xinjiang, China)

Abstract: *Stropharia rugosoannulata* polysaccharide (SRP-I) with uniform relative molecular mass was obtained from enzyme-assisted ionic liquid extraction of *Stropharia rugosoannulata* after purification, with the process optimized by single factor experiments and response surface analysis, and evaluated via UV-Vis, FTIR, GC-MS, XRD, SEM, EDS, and NMR characterization, Congo Red, TG, partial acid hydrolysis, Smith degradation tests for structure and property analyses. The *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activities of SRP-I were further analyzed. The results showed that under the optimal extraction process of extraction time 106 min, extraction temperature 51 °C, 1-tetradecyl-3-methylimidazolium bromide salt

收稿日期: 2024-03-02; 定用日期: 2024-04-07; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240178

基金项目: 2023 年伊犁自治州应用技术创新驱动专项项目 (YYD2023A11); 伊犁科技计划项目 (2022D01C455、YZ2022BO40); 伊犁师范大学科研创新团队项目 (CXZK2021003)

作者简介: 王俊龙 (1992—), 男, 讲师, E-mail: 974881461@qq.com。联系人: 蔺永刚 (1985—), 男, 实验师, E-mail: 869294906@qq.com; 努尔买买提 (1971—), 男, 博士, 副教授, E-mail: nuermaiti@yili.edu.cn

mass concentration 4.3 g/L, cellulase addition (based on the mass of sample, the same below) 10.4%, the extraction rate of SRP- I reached $32.54\% \pm 0.12\%$. SRP- I was a α -D-pyran neutral polysaccharide with triple helical conformation, flat and smooth surface, amorphous and crystals coexistence, and a residual carbon rate of 26.34% at 550 °C. SRP- I having a weight-average relative molecular mass of 24.321 kDa was mainly composed of glucose (53.31%, mole fraction, the same below), galactose (43.32%) and fucose (3.37%), with fucose mainly present in the side chain, while glucose and galactose more homogeneously distributed in the main chains and side chains. The main chains were mainly in the form of $[\rightarrow 3]\text{-GlcP}(1\rightarrow)$ and $[\rightarrow 6]\text{-Galp}(1\rightarrow)$ structures, while the branched chains were in the form of $[\rightarrow 3,6]\text{-GlcP}(1\rightarrow)$. At SRP- I mass concentration of 2.500 g/L, the scavenging rates of 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine radicals, 2,2-diazo-di(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid) diamine salt radicals and hydroxyl radicals were up to 82.54%, 51.62% and 51.57%, the corresponding median inhibitory concentration (IC_{50}) were 0.127, 2.438 and 2.446 g/L, the inhibition rates of α -amylase and α -glucosidase were 61.2% and 71.4%, and the IC_{50} were 0.970 and 0.240 g/L, respectively.

Key words: *Stropharia rugosoannulata*; polysaccharides; structure characterization; antioxidant activity; hypoglycemic activity; food chemicals

多糖是一类天然有机高分子化合物,是由多个单糖或其衍生物聚合而成的生物大分子化合物,一般是由 100 个以上甚至几千个单糖通过糖苷键连接而成^[1]。SANTI 等^[2]研究表明,天然多糖可通过调节功能失调的大脑神经元来缓解抑郁症。此外,天然多糖在抗肿瘤、调节机体免疫、抗衰老等方面显示出良好的生物活性^[3],如香菇多糖^[4]、猪苓多糖^[5]在临床上已作为肿瘤辅助治疗药物使用,因此,对天然多糖的研究越来越受到人们的重视。

大球盖菇(*Stropharia rugosoannulata*)又名皱环球盖菇,是已被国际蘑菇市场和联合国粮农组织推荐在发展中国家种植的十大蘑菇之一^[6]。大球盖菇具有独特风味、高营养价值和显著的保健作用,并且富含人体所需的蛋白质、维生素、脂肪酸和各种微量元素。此外,大球盖菇还含有多糖、酚类、黄酮和生物碱等天然活性成分^[7]。现代药理学研究^[8]表明,大球盖菇在预防冠心病、消化不良、神经衰弱、高血糖等多种疾病具有潜在的应用价值。王峰等^[9]研究发现,大球盖菇多糖可以增加四氯化碳和 D-半乳糖诱导的心脏损伤小鼠的抗氧化酶活性,并帮助修复受损器官。蒋琳^[10]研究发现,大球盖菇多糖在质量浓度 2.5~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内能显著促进 B 淋巴细胞分泌 IgA、IgG、IgD 抗体,提高机体的免疫力。邵华^[11]研究发现,大球盖菇多糖能有效保护高强度运动模型大鼠脾脏健康,维持 T 淋巴细胞分泌,从而缓解疲劳。

近年来,离子液体作为一种新型绿色溶剂被广泛应用在生物大分子的提取中。酶作为一类天然的生物催化剂,可通过降解植物细胞壁来帮助多糖释放。然而,传统酶辅助提取多糖法易受到酶活性、温度、pH 等因素的影响,同时酶的回收利用较为困难。离子液体可提供良好的 pH 环境来保护酶的活

性,同时具有优异的溶解性和稳定性^[1]。

本文拟采用酶辅助离子液体提取大球盖菇多糖,并对提取工艺进行优化,对除蛋白和小分子纯化后的相对分子质量(简称分子量)均一多糖的单糖组成、相对分子质量、理化性质、单糖连接方式进行测定,考察其体外抗氧化活性及降糖活性,以期为大球盖菇的开发利用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

大球盖菇(*Stropharia rugosoannulata*),新疆察布查尔锡伯自治县农牧业发展有限公司食用菌栽培基地提供,经伊犁师范大学植物生态重点实验室、天然产物化学与应用重点实验室张维教授、南光明教授共同鉴定为球盖菇属,球盖菇科蕈菌。

无水乙醇、石油醚、苯酚、 H_2O_2 、浓硫酸(质量分数 98%)、氯化钠、氢氧化钠、正丁醇、三氯甲烷、三氟乙酸、甲醇、1-十四烷基-3-甲基咪唑溴盐(EADS),分析纯,北京索莱宝生物科技有限公司;鼠李糖(Rha)、岩藻糖(Fuc)、阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS⁺)、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)、四丁基铵(TYHS)、四乙基铵(TYLM)、1-丁基-3-甲基咪唑氯盐(BMIMCl)、1-乙基-3-甲基咪唑溴盐(EMDC)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)、1-烷基-3-甲基咪唑四硼酸盐(MSDS)、天冬蛋白酶、纤维素酶、木瓜蛋白酶、果胶酶、巯基蛋白酶、赤藓醇,分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;DEAE-52 纤维

素柱、Sephadex G-100 凝胶柱, 英国 Whatman 公司。

XH-2008 D 型电脑智能温控低温超声波合成萃取仪, 北京翔鹤科技发展有限公司; UV-2550 型紫外-可见分光光度计 (UV-Vis), 日本 Shimadzu 公司; 7500 F 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本 JEOL; Cary 630 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR), 安捷伦科技 (中国) 有限公司; PL-GPC50 型高效液相凝胶渗透色谱仪, 美国 Waters 公司; Spectra Max M5 型多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; JHD 型氮吹仪, 上海极恒实业有限公司; HS-TGA-102 型热重分析仪 (TGA), 上海和晟仪器有限公司; AVANCE III HD 600 MHz 型全数字化超导核磁共振波谱仪 (NMR), 德国 Bruker 公司。

1.2 方法

1.2.1 大球盖菇的预处理

首先将自然风干至恒重的大球盖菇, 经粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 用石油醚于索氏提取器中脱脂 24 h [料液比(mg : mL)为 4 : 1]; 然后用体积分数 95% 的乙醇水溶液于索氏提取器提取 24 h, 以除去小分子和色素成分; 最后将过滤后的残渣自然阴干, 即得预处理 (脱脂、除去小分子和色素成分) 后的大球盖菇粉末。

1.2.2 大球盖菇粗多糖的提取

称取预处理后的大球盖菇粉末 5 g, 用智能温控低温超声波合成萃取仪在功率为 400 W, 提取时间为 106 min, 液料比 (mL : g, 下同) 为 50 : 1, 提取温度为 51 °C, EADS 质量浓度为 4.3 g/L, 纤维素酶添加量 (以样品质量计, 下同) 为 10.4% 的条件下进行大球盖菇粗多糖的提取, 提取结束后, 经离心 (4000 r/min) 处理 8 min, 得到 160 mL 上清液, 移取 1 mL 上清液用蒸馏水定容至 25 mL 容量瓶中, 备用, 记为 SRP。

1.2.3 标准曲线绘制及提取率计算

采用苯酚-硫酸法绘制多糖溶液的标准曲线^[12]。首先配制质量浓度为 0.2 g/L 的葡萄糖标准溶液, 分别量取 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2 mL 葡萄糖标准溶液置于 10 mL 试管中, 用蒸馏水补至 1 mL, 然后缓慢加入 1 mL 质量分数 6% 的苯酚溶液, 摇匀, 在冰水浴中缓慢加入 5 mL 浓硫酸, 待冷却后摇匀, 于沸水浴中反应 10 min, 冷却至室温后, 用蒸馏水定容至 10 mL。以蒸馏水为空白, 用紫外-可见分光光度计测定溶液在 490 nm 处的吸光度。以葡萄糖溶液的质量浓度 (g/L) 为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 经拟合后得到回归方程 $y=0.8342x+0.2306$ ($R^2=0.9924$)。

用待测 SRP 溶液代替葡萄糖标准溶液按照上述步骤进行前处理, 将测定的 SRP 溶液吸光度带入回归方程得到 SRP 质量浓度。根据公式 (1) 计算 SRP

的提取率。

$$\text{提取率}/\% = \rho \times V \times 160/m \times 100 \quad (1)$$

式中: ρ 为 SRP 质量浓度, g/L; V 为待测液体积, 0.025 L; m 为大球盖菇粉末质量, 5 g。

1.2.4 SRP 分离纯化

根据响应面优化后的最佳条件提取 SRP, 将上清液旋蒸浓缩至原体积的 30%, 用 4 倍体积的无水乙醇沉淀, 于 4 °C 保存 24 h 后, 经离心 (4000 r/min, 5 min), 收集沉淀用蒸馏水复溶, 将复溶后的溶液和 Seva 试剂 (氯仿与异丙醇体积比 4 : 1 的混合溶剂) 按体积比 4 : 1 混合在分液漏斗中剧烈振荡 20 min, 静置 12 h 后, 取上层溶液重复上述操作, 直至分液漏斗下层溶液透明, 收集分液漏斗上层溶液, 旋蒸浓缩, 冷冻干燥 (-70 °C, 8.0 Pa, 24 h) 得到除去蛋白后的淡黄色棉絮状大球盖菇多糖。

首先, 将除去蛋白后的 5 g 大球盖菇多糖用超纯水配成质量浓度为 10 g/L 的水溶液后, 过滤, 上样至 DEAE-52 纤维素柱 (内径 37 mm×260 mm), 以 1 mL/min 的流速分别用 2 倍柱体积的超纯水和浓度为 0.2、0.4、0.6 mol/L 的氯化钠洗脱, 自动收集器收集洗脱液, 每管 20 mL, 采用苯酚-硫酸法^[4]用紫外-可见分光光度计测定溶液在 490 nm 处的吸光度并绘制洗脱曲线。重复多次洗脱步骤, 合并同一洗脱液的糖溶液在透析袋 (截留分子量 3500 Da) 中透析 48 h 后, 旋蒸浓缩、冷冻干燥 (-70 °C, 48 h) 后得粗纯化大球盖菇多糖。然后, 通过 Sephadex G-100 凝胶柱 (内径 16 mm×800 mm) 进一步纯化, 以 0.4 mL/min 的流速用 3 倍柱体积的超纯水洗脱, 自动收集器收集洗脱液, 每管 10 mL, 采用苯酚-硫酸比色法用紫外-可见分光光度计测定 490 nm 处的吸光度, 收集合并同一多糖组分, 冷冻干燥 (-70 °C, 48 h) 后得到分子量均一的白色棉絮状大球盖菇多糖 (SRP-I), 产量 864 mg, 用于多糖结构鉴定。

1.2.5 部分酸水解实验

称取 200 mg 的 SRP-I 样品, 用 20 mL 浓度为 0.01 mol/L 的三氟乙酸于 100 °C 水解 2 h, 透析 (截留分子量 3500 Da) 48 h 后, 将透析袋外部液体减压浓缩、冷冻干燥 (-70 °C, 24 h) 得到的样品标记为 0.01 mol/L 袋外样品; 将透析袋内液体继续干燥 (-70 °C, 24 h), 用 20 mL 浓度为 0.03 mol/L 三氟乙酸同上处理, 所得样品标记为 0.03 mol/L 袋外样品; 将透析袋内液体继续冷冻干燥 (-70 °C, 24 h), 用 20 mL 浓度为 0.05 mol/L 的三氟乙酸同上处理, 得到的袋内外样品分别标记为 0.05 mol/L 袋外和 0.05 mol/L 袋内部分多糖。通过 GC 分析水解后样品的单糖组成。

1.2.6 Smith 降解实验

称取 20 mg 的 SRP-I 样品, 用 20 mL 浓度为

0.015 mol/L 的高碘酸钠溶解, 避光反应 7 d 后, 加入 2 mL 乙二醇终止反应。将混合物透析(截留分子量 3500 Da) 48 h 后, 将透析袋内部液体浓缩至约 5 mL, 随后加入 50 mg 硼氢化钠, 还原反应 4 h。待反应结束后, 用体积分数 36% 的醋酸中和混合物, 透析 48 h, 将透析袋内液体冷冻干燥(-70 °C, 24 h), 得到 Smith 降解产物。经 GC 分析并通过与甘油和赤藓醇比较, 确定其降解成分。

1.2.7 甲基化反应

参考文献[13]进行 SRP- I 甲基化反应。GC-MS 条件为: HP-5 MS 色谱柱(30 m×250 μm×0.25 μm); 进样口 230 °C; 程序升温, 140 °C 保持 2 min, 以 3 °C/min 速率升至 230 °C, 保持 2 min; EI 源电离模式; 离子源温度 220 °C, 电子能量 70 eV。

1.3 结构表征与性能测试

1.3.1 结构表征

UV-Vis 测试: 配制质量浓度为 1.0 g/L 的 SRP- I 水溶液, 扫描波长范围 200~400 nm。FTIR 测试: 波数范围 4000~400 cm⁻¹。三维螺旋构象测试: 采用刚果红实验进行检测^[14], 具体步骤为: 移取 1 mL 质量浓度 3 g/L 的 SRP- I 水溶液, 依次加入 1 mL 浓度 0.2 mmol/L 的刚果红溶液、3 mL 不同浓度(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L) 的 NaOH 溶液, 混匀后, 在暗室反应 10 min, 用紫外-可见分光光度计在 400~600 nm 内扫描, 记录最大吸收波长(λ_{max}), 同时以刚果红溶液为对照。以 NaOH 浓度为横坐标, 溶液的最大吸收波长为纵坐标, 绘制工作曲线。XRD 测试: 扫描范围 5°~100°, 扫描速率 6 (°)/min。SEM 测试: 使用导电胶带将少量 SRP- I 样品固定在样品台上, 用离子溅射仪喷金后, 在加速电压为 10.0 kV, 放大 200、1000、5000 倍下观察样品微观结构。TG 测试: 取 10 mg 的 SRP- I 样品置于铂坩埚, 以 N₂ 作保护气, 升温速率 10 °C/min, 测温范围 35~550 °C, 采集 TG、DTG 数据。NMR 测试: 移取 10 mg 的 SRP- I, 以 D₂O 为溶剂加入核磁管中, 于 400 MHz 核磁共振波谱仪测定, 扫描次数 20 次, 无空扫, 脉冲角度 30°, 弛豫延迟时间 1.0 s, 探针温度 60 °C。

1.3.2 SRP- I 组成的测定

SRP- I 蛋白质含量采用牛血清(BCA)试剂法进行测定^[12], 糖醛酸含量采用四硼酸钠硫酸法进行测定^[12]。通过高效液相凝胶渗透色谱仪(HAGPC)对 SRP- I 相对分子质量进行分析^[15]。单糖衍生物制备方法参照文献[16]。GC 条件: Vondacap df 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 升温程序 150 °C 保留 2 min, 以 5 °C/min 升至 250 °C, 保持 5 min; 载气(He)流速 4 mL/min, 压力 8.7 kPa, 进样量 2 μL; 分流比 40:1。

1.4 SRP- I 体外抗氧化、降糖能力测定

1.4.1 测试液的配制

配制质量浓度 1×10⁻² g/L 的 DPPH-甲醇溶液, 配制质量浓度 0.08、0.32、1.25、2.50、5.00 g/L 的 SRP- I 溶液, 备用。配制磷酸盐(PBS)缓冲液: 将 45 mL 浓度 0.1 mol/L 磷酸二氢钠水溶液、55 mL 浓度 0.1 mol/L 磷酸氢二钠水溶液均匀混合至 200 mL 容量瓶, 并用蒸馏水定容得到 PBS 溶液。分别配制对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷溶液(0.5 mmol/L, PNPg)、碳酸钠溶液(0.1 mol/L)、与 SRP- I 质量浓度(0.080、0.320、1.250、2.500、5.000 g/L)相同的 V_C 溶液和阿卡波糖(Acarbose)溶液。

1.4.2 DPPH 自由基清除能力的测定

分别移取 300 μL 不同质量浓度 SRP- I 水溶液和等体积的 DPPH-甲醇溶液, 混匀后置无光环境中反应 30 min, 以 V_C 为阳性对照, 以甲醇为空白, 用酶标仪在 517 nm 处测定溶液的吸光度^[17]。每次实验平行 3 次。根据公式(2)计算 SRP- I 对 DPPH 自由基的清除率。

DPPH 自由基清除率/% = $[1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100$ (2)
式中: A_i 为 DPPH-甲醇溶液+SRP-I 溶液的吸光度;
 A_j 为 SRP- I 溶液+甲醇的吸光度;
 A_0 为 DPPH-甲醇溶液+甲醇的吸光度。

1.4.3 羟基自由基清除能力的测定

分别移取 70 μL 不同质量浓度 SRP- I 溶液、60 μL 浓度 6 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液、5 μL 体积分数 0.1% 的 H₂O₂ 溶液均匀混合后, 室温下反应 30 min 后, 以 V_C 为阳性对照, 蒸馏水为空白, 用酶标仪在 510 nm 处测定溶液的吸光度^[17]。每次实验平行 3 次。根据公式(3)计算羟基自由基清除率。

羟基自由基清除率/% = $[1 - (A'_i - A'_j)/A'_0] \times 100$ (3)
式中: A'_i 为 H₂O₂ 溶液+SRP-I 溶液的吸光度;
 A'_j 为 SRP- I 溶液+蒸馏水的吸光度;
 A'_0 为 H₂O₂ 溶液+蒸馏水的吸光度。

1.4.4 ABTS⁺自由基清除能力的测定

分别移取 150 μL 不同质量浓度 SRP- I 溶液, 加入 150 μL 的 ABTS⁺溶液(用酶标仪在 734 nm 处调节吸光度为 0.76~0.78)混合, 避光反应 15 min 后, 以 V_C 为阳性对照, 蒸馏水为空白, 在 730 nm 处测定溶液的吸光度^[17]。每次实验平行 3 次。根据公式(4)计算 ABTS⁺自由基清除率。

ABTS⁺自由基清除率/% = $[1 - (a - a')/a''] \times 100$ (4)
式中: a 为 SRP- I 溶液+ABTS⁺溶液的吸光度;
 a' 为 SRP- I 溶液+蒸馏水的吸光度;
 a'' 为 ABTS⁺溶液+蒸馏水的吸光度。

1.4.5 Fe²⁺还原能力的测定

分别移取 4.5 mL 不同质量浓度 SRP- I 溶液,

分别加入 2.5 mL 的 PBS、质量分数 1% 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液, 均匀混合后, 于 50 °C 水浴锅反应 20 min; 然后加入 1 mL 体积分数 10% 的三氟乙酸后, 离心 (3000 r/min, 10 min); 移取 1 mL 上清液与 0.6 mL 蒸馏水和 0.4 mL 的 $FeCl_3$ 溶液充分混匀, 室温反应 10 min 后, 以 V_C 为阳性对照, 蒸馏水为空白, 在 700 nm 处测定溶液的吸光度^[17]。每次实验平行 3 次。

1.4.6 α -淀粉酶活性抑制能力的测定

分别移取 300 μ L 不同质量浓度 SRP-I 溶液, 与等体积的 α -淀粉酶溶液混匀后, 得到质量浓度分别为 0.040、0.160、0.625、1.250、2.500 g/L 的 SRP-I 溶液, 于 37 °C 水浴反应 5 min; 加入与 SPR-I 等体积的质量分数 1% 的淀粉 PBS 溶液, 于 37 °C 水浴反应 20 min; 最后加入 0.5 mL 质量分数 0.63% 的 3,5-二硝基水杨酸溶液 (DNS), 沸水浴 10 min。冷却至室温后, 以蒸馏水为空白, 阿卡波糖为对照, 用酶标仪在 415 nm 处测定溶液的吸光度^[18]。每次实验平行 3 次。根据公式 (5) 计算 α -淀粉酶抑制率。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率}/\% = [1 - (A_3 - A_4) / (A_1 - A_2)] \times 100 \quad (5)$$

式中: A_1 为蒸馏水+ α -淀粉酶溶液+DNS 溶液的吸光度; A_2 为蒸馏水+PBS+DNS 溶液的吸光度; A_3 为 SRP-I 溶液+ α -淀粉酶溶液+DNS 溶液的吸光度; A_4 为 SRP-I 溶液+PBS+DNS 溶液的吸光度。

1.4.7 α -葡萄糖苷酶活性抑制能力的测定

分别移取 500 μ L 不同质量浓度 SRP-I 溶液, 加入等体积 α -葡萄糖苷酶溶液, 得到质量浓度分别为 0.040、0.160、0.625、1.250、2.500 g/L 的 SRP-I 溶液, 于 37 °C 水浴反应 20 min; 加入等体积的 PNPg 溶液并在 37 °C 避光反应 20 min 后, 加入 4 mL 碳酸钠溶液和 1.5 mL 的 PBS (pH=6.8), 沸水浴反应 5 min。冷却至室温, 用酶标仪在 400 nm 处测定溶液的吸光度^[18], 以阿卡波糖为对照, 每次实验平行 3 次。根据公式 (6) 计算 α -葡萄糖苷酶抑制率。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}/\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100 \quad (6)$$

式中: A_1 为 SRP-I 溶液+ α -葡萄糖苷酶溶液的吸光度; A_2 为 PBS+SRP-I 溶液的吸光度; A_0 为 α -葡萄糖苷酶溶液+PBS 的吸光度。

1.5 单因素实验

1.5.1 离子液体、生物酶对提取率的影响

分别称取一定量的 TYHS、TYLM、BMIMCl、EMDC、EDTA-2Na、EADS、MSDS, 加蒸馏水配制成质量浓度 5 g/L 离子液体水溶液, 以蒸馏水为空白对照, 按照 1.2.2 节步骤, 不加入酶进行多糖提取实验, 考察不同离子液体对 SRP 提取率的影响; 分别称取一定量的天冬蛋白酶、纤维素酶、木瓜蛋白酶、果胶酶、巯基蛋白酶, 以蒸馏水为空白对照,

按照 1.2.2 节步骤, 不加入离子液体进行多糖提取实验, 考察不同酶对大球盖菇多糖提取率的影响。

1.5.2 单因素实验

分别考察提取温度 (20、30、40、50、60、70、80 °C)、提取时间 (40、60、80、100、120、140、160 min)、酶解时间 (30、50、70、90、110、130、150 min)、EADS 质量浓度 (1、2、3、4、5、6、7 g/L)、酶添加量 (以样品质量计, 下同) (2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%) 和液料比 (20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1) 对 SRP 提取率的影响。

在单因素实验中, 按照上述考察顺序, 首先以提取温度为变量, 在提取时间 130 min, 酶解时间 90 min, EADS 质量浓度 4 g/L, 酶添加量 8%, 液料比 40:1 的条件下进行单因素实验, 实验结束后, 选择最佳提取温度进行提取时间的考察, 直至单因素实验结束。每个实验重复 3 次。

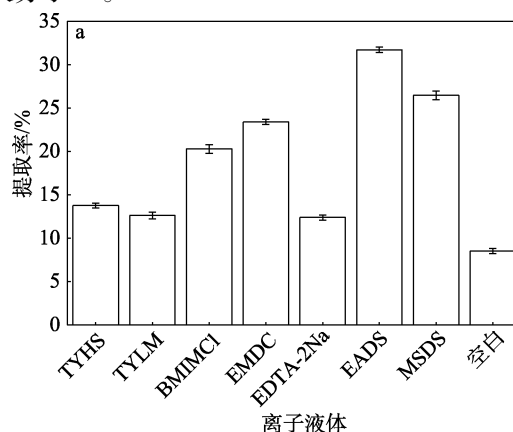
1.6 响应面实验

根据单因素实验结果, 以提取时间 (A)、提取温度 (B)、EADS 质量浓度 (C)、酶添加量 (D) 作为自变量, 以大球盖菇多糖提取率为评价指标, 对 4 个因素分别设置 3 个水平, 用 “-1、0、1” 表示, 提取时间 (80、100、120 min)、提取温度 (40、50、60 °C)、EADS 质量浓度 (3、4、5 g/L)、酶添加量 (8%、10%、12%) 根据单因素实验结果中心点取值。

2 结果与讨论

2.1 离子液体、酶对大球盖菇多糖提取率的影响

图 1 为单一离子液体 (TYHS、TYLM、BMIMCl、EMDC、EDTA-2Na、EADS、MSDS) 或单一酶 (天冬蛋白酶、纤维素酶、木瓜蛋白酶、果胶酶、巯基蛋白酶) 的 SRP 提取率。可以看出, 7 种离子液体中, EADS 对 SRP 提取率最高 (图 1a), 这是因为, EADS 含有较多的氢键供体和受体, 可以形成深共融结构, 因此具有优异的溶解性, 能够溶解多种生物大分子^[18]。



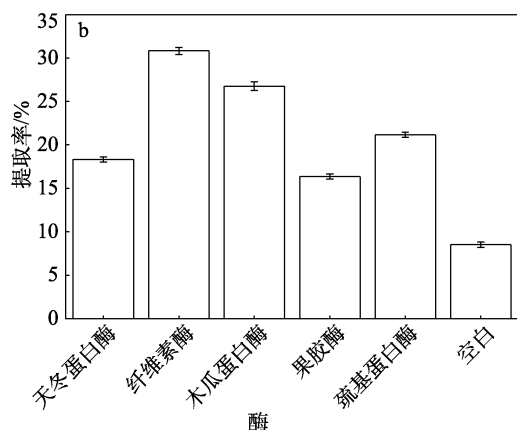


图1 单一离子液体(a)和单一酶(b)对SRP提取率的影响

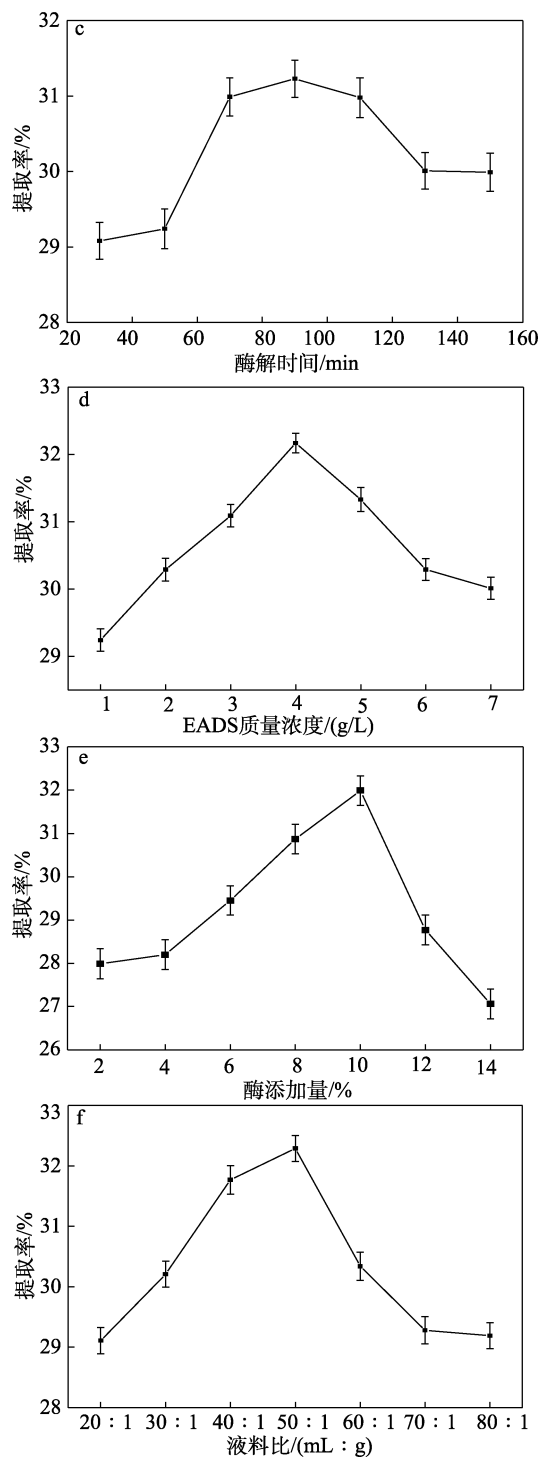
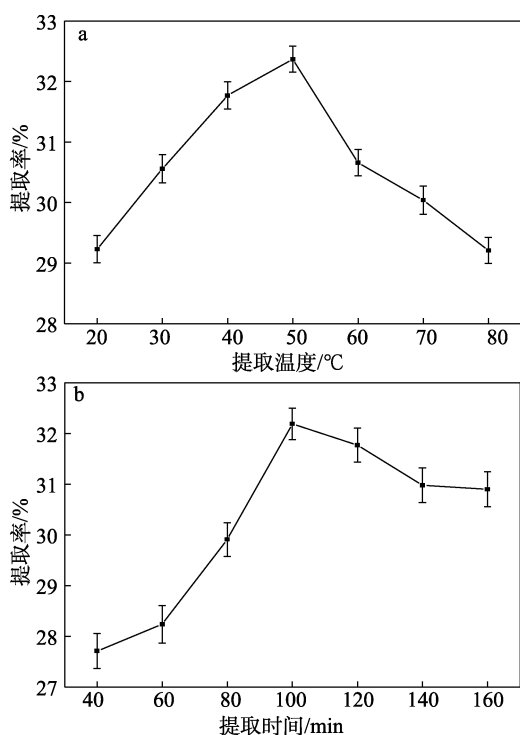
Fig. 1 Effects of single ionic liquid (a) and single enzyme (b) on extraction rate of SRP

5种酶中,纤维素酶对SRP提取率最高(图1b),这是因为,纤维素酶能够直接作用于纤维素,将其分解为较小的纤维素单体或寡聚体,从而促进多糖释放^[19]。因此,后续的单因素实验、响应面实验采用EADS和纤维素酶用于超声辅助提取的工艺优化中。

2.2 单因素实验结果

图2为影响SRP提取的单因素实验结果。

从图2a可以看出,在考察的温度(20~80℃)范围内,随着温度的升高,SRP提取率呈先增大后减小的趋势。当提取温度为50℃,提取率最高,为32.37%±0.21%。这可能是因为,温度过高时多糖结构遭到破坏并发生水解,或高温导致部分纤维素酶失活^[19]。



a—提取温度; b—提取时间; c—酶解时间; d—EADS 质量浓度; e—酶添加量; f—液料比

图2 不同因素对SRP提取率的影响

Fig. 2 Effects of different factors on extraction rate of SRP

从图2b可以看出,在考察的提取时间(40~160 min)范围内,随着提取时间的延长,SRP提取率呈先增大后减小的趋势。当提取时间为100 min时,提取率最高,为32.19%±0.30%。这可能是因为,超声波空化作用可破坏植物细胞壁,延长提取时间,超声波在高温高频率下会破坏多糖结构^[20]。

从图 2c 可以看出,在考察的酶解时间(30~150 min)范围内,随着酶解时间的延长,SRP 提取率呈先增大后减小的趋势。当酶解时间为 90 min 时,提取率最高,为 31.23%±0.24%。这可能是因为,酶解时间过长,酶催化活性会降低^[21]。

从图 2d 可以看出,在考察的 EADS 质量浓度(1~7 g/L)范围内,随着 EADS 质量浓度的增加,SRP 提取率呈先增大后减小的趋势。当 EADS 质量浓度为 4 g/L 时,提取率最高,为 32.17%±0.14%。这可能是因为,EADS 具有较低的表面张力,能渗透到细胞壁内部,促进细胞壁成分的溶解和裂解^[20],但 EADS 质量浓度过高会增加溶液体系的黏度,导致 EADS 难以透过大球盖菇细胞壁^[21]。

从图 2e 可以看出,在考察的酶添加量(2%~14%)范围内,随着酶添加量的增加,SRP 提取率呈先增大后减小的趋势。当酶添加量为 10%时,提取率最高,为 31.99%±0.34%。这可能是因为,随着酶添加量的增加,酶与底物的接触面积增大,加快了大球盖菇细胞壁的溶解,有利于多糖溶出,但酶添加量达到饱和时,底物完全被酶分子包裹会造成酶的水解^[21]。

从图 2f 可以看出,在考察的液料比(20:1~80:1)范围内,随着液料比的增加,SRP 提取率呈先增大后减小的趋势。当液料比为 50:1 时,提取率最高,为 32.29%±0.21%。这可能是因为,增大液料比会扩大酶和大球盖菇粉末的接触面积,使细胞内多糖更容易被提取,但液料比过大时,单位体积的酶含量降低^[20],反而减缓了大球盖菇细胞壁的溶解,不利于多糖溶出。

2.3 响应面优化实验结果

2.3.1 响应面实验的设计及结果

表 1 为响应面实验设计及结果。采用 Design-Expert 8.06 软件对表 1 数据进行二项式拟合,并对模型进行方差分析,得到二项式拟合方程为:

$$Y=32.40+0.14A+0.21B+0.19C+0.29D-1.06AB+0.71AC+0.54AD+0.53BC-0.25BD+1.69CD-0.98A^2-1.55B^2-1.50C^2-1.94D^2 \quad (P<0.0001, R^2=0.96)$$

2.3.2 模型拟合与方差分析

通常模型的 F 值、 P 值可以用于检验回归方程各因素的显著性。 $P<0.05$ 说明建立的响应面模型成功^[17]。表 2 为方差分析结果。

从表 2 可以看出, F 值为 25.14, $P<0.0001$,说明该模型建立成功,并且模型具有统计学意义;失拟项 F 值为 0.54,回归方程的 R^2 为 0.96,表明预测值与实测值误差较小;回归方程变异系数(CV)为 1.42,表明模型具有较好可靠性;此外,回归方程的信噪比为 17.14,表明用于响应模型的信号较为充分^[8]。

表 1 响应面实验设计及结果

Table 1 Experimental design and results for response surface analysis

序号	编码值				提取率/%
	A	B	C	D	
1	0	0	-1	1	27.66
2	0	1	-1	0	28.76
3	0	-1	-1	0	29.35
4	0	0	1	1	31.58
5	0	0	0	0	32.32
6	0	0	-1	-1	30.02
7	0	0	1	0	30.42
8	0	0	0	0	32.49
9	0	1	1	0	30.56
10	0	-1	0	-1	28.17
11	1	-1	0	0	31.26
12	-1	-1	0	0	28.44
13	0	-1	0	1	28.74
14	0	-1	1	0	29.05
15	0	0	0	0	32.32
16	0	0	1	-1	27.16
17	0	0	0	0	32.33
18	1	1	0	0	29.32
19	-1	0	0	-1	29.92
20	1	0	-1	0	29.33
21	0	1	-1	0	28.88
22	-1	1	0	0	30.72
23	0	0	0	0	32.89
24	0	1	0	-1	29.31
25	1	0	0	1	30.11
26	1	0	0	-1	28.37
27	-1	0	0	1	29.49
28	-1	0	-1	0	30.17
29	-1	0	1	0	28.97

回归模型下,二次项(A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2)对 SRP 提取率具有极显著影响($P<0.01$),交互作用项(AB 、 CD)对 SRP 提取率具有极显著影响($P<0.01$),一次项(D)、 AC 、 AD 、 BC 对 SRP 提取率具有显著影响($P<0.05$)。在所选优化的因子实验范围内,比较 4 个因子的 F 值,可得各因素对 SRP 提取率的影响从大到小顺序为: $D>B>C>A$ 。

2.3.3 响应面分析

采用 Design-Expert 8.06 软件绘制 SRP 提取率、提取时间、提取温度、EADS 质量浓度、酶添加量之间的三维曲面图,见图 3。

表 2 方差分析结果
Table 2 Results of variance analysis

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	63.37	14	4.55	25.14	<0.0001	**
A 提取时间	0.1857	1	0.1857	1.03	0.3282	○
B 提取温度	0.5225	1	0.5225	2.89	0.1113	○
C EADS 质量浓度	0.4086	1	0.4086	2.26	0.1551	○
D 酶添加量	1.04	1	1.04	5.77	0.0308	*
AB	4.46	1	4.46	24.66	0.0002	**
AC	1.27	1	1.27	7.01	0.0191	*
AD	1.18	1	1.18	6.53	0.0229	*
BC	1.10	1	1.10	6.10	0.0270	*
BD	0.2465	1	0.2465	1.36	0.2635	○
CD	11.51	1	11.51	63.60	<0.0001	**
A ²	5.75	1	5.75	31.77	<0.0001	**
B ²	15.67	1	15.67	86.65	<0.0001	**
C ²	13.72	1	13.72	75.88	<0.0001	**
D ²	24.68	1	24.68	136.45	<0.0001	**
残差	2.53	14	0.1809			
失拟项	2.29	10	0.2288	0.54	0.1078	
纯误差	0.2448	4	0.0612			
总变异	66.20	28				

注: “**”表示差异极显著 ($P<0.01$); “*”表示差异显著 ($P<0.05$); “○”表示差异不显著 ($P>0.05$)。

从图 3a、b 可以看出, 提取时间 (A) 和提取温度 (B) 对 SRP 提取率回归方程的线性和二次项均有显著影响; 从等高线图椭圆形状来看, 提取时间和提取温度的交互作用对 SRP 提取率影响大于 EDTA 质量浓度 (C) 和提取时间 (A) 的交互作用。

从图 3b、c 可以看出, 提取时间 (A) 和 EADS 质量浓度 (C)、酶添加量 (D) 对 SRP 提取率回归方程的线性和二次项均有显著影响, 但交互作用不显著。

从图 3d~f 可以看出, EADS 质量浓度 (C)、酶添加量为 (D)、提取温度 (B) 的两两交互作用对 SRP 提取率影响为 $CD>BC>BD$, 这与表 2 数据相吻合。

综上, 各因素交互作用对 SRP 提取率影响顺序为: $CD>AB>AC>AD>BC>BD$ 。

由响应面优化实验得到的最佳提取条件为: 提取时间 105.7 min, 提取温度 50.24 °C, EADS 质量浓度 4.23 g/L, 酶添加量 10.4%。

2.3.4 工艺验证结果

根据 Design-Expert 8.06 软件分析得到的优化条件, 并基于实验的可操作性, 对优化工艺进行微调: 提取时间为 106 min, 提取温度为 51 °C, EADS 质量浓度为 4.3 g/L, 酶添加量为 10.4%, 在此条件下平行 3 次实验, SRP 提取率为 $32.54\%\pm0.12\%$, 与预测值 (32.47%) 接近, 表明响应面预测结果可信。

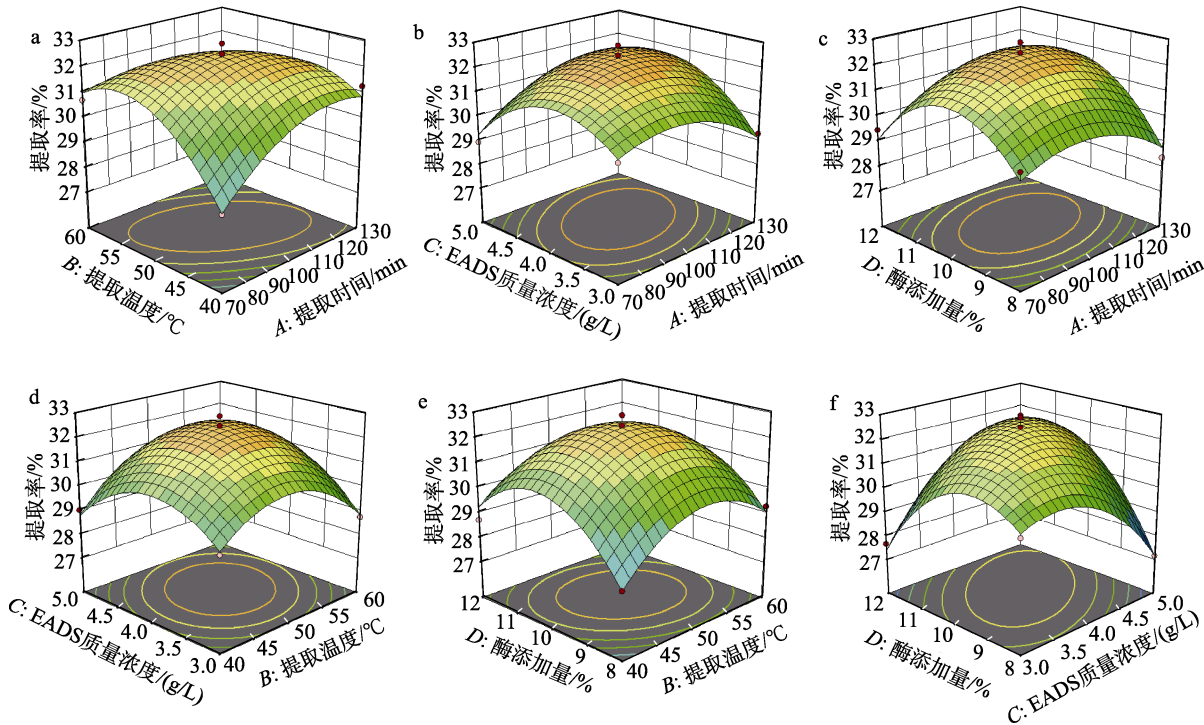


图 3 提取参数对 SRP 提取率的响应曲面
Fig. 3 Response surfaces of extraction parameters on extraction rate of SRP

2.4 大球盖菇多糖理化性质及化学组成分析

2.4.1 SRP 分离纯化结果

图 4 为 SRP 经 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 凝胶柱的纯化洗脱曲线。从图 4 可以看出, SRP 经 DEAE-52 纤维素柱分离后, 依次得到 3 个组分 (图 4a), 得率分别为 17.3%、2.6%、2.1%。其中水洗组分得率最高, 因此对该组分进行进一步纯化; SRP 通过 Sephadex G-100 凝胶柱纯化后, 收集 20~40 管馏分, 得到单一洗脱峰 (图 4b)。

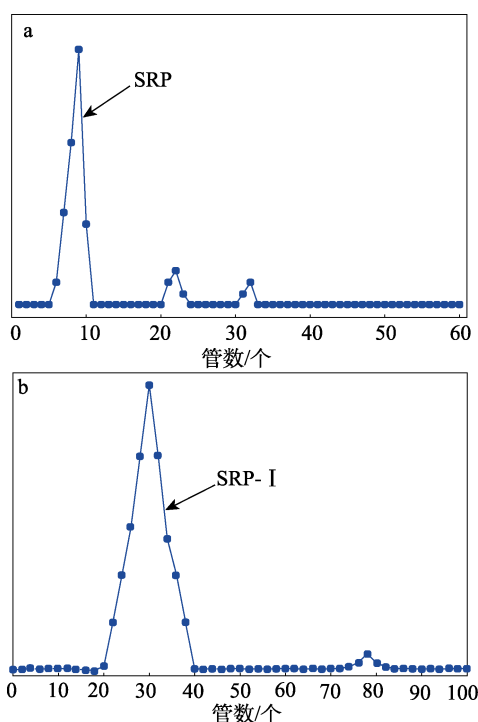


图 4 DEAE-52 纤维素柱 (a) 和 Sephadex G-100 凝胶柱 (b) 的纯化洗脱曲线

Fig. 4 Purification elution curves of DEAE-52 cellulose column (a) and Sephadex G-100 gel column (b)

2.4.2 SRP- I 的组成分析

图 5 为 SRP- I 的 HPGPC 曲线和单糖组成图。

从图 5 可以看出, SRP- I 的 HPGPC 曲线为一个尖锐的单峰 (图 5a), 证明其为分子量均一多糖。

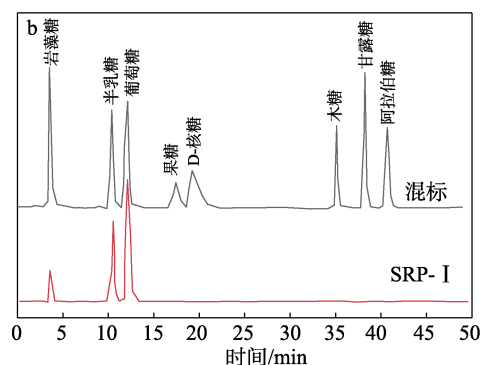
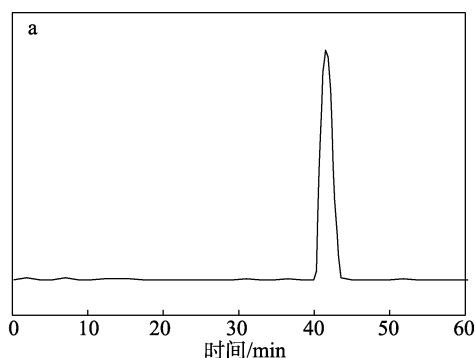


图 5 SRP- I 的 HPGPC 曲线 (a) 和单糖组成图 (b)
Fig. 5 HPGPC curve (a) and monosaccharide composition diagram (b) of SRP- I

根据标准曲线 $\lg M_w = -0.2345t + 12.934$ 及 SRP- I 的出峰时间可知, SRP- I 的重均分子量 (M_w) 为 24.321 kDa。SRP- I 主要是由葡萄糖、半乳糖和岩藻糖 3 种单糖组成 (图 5b), 其物质的量之比为 53.31 : 43.32 : 3.37。单糖组分中含有微量蛋白质 (质量分数 $0.08\% \pm 0.03\%$), 未检测到糖醛酸, 表明 SRP- I 是一种纯度较高的中性多糖。

2.4.3 SRP- I 的 UV-Vis 吸收光谱与 FTIR 分析

图 6 为 SRP- I 的 UV-Vis 吸收光谱与 FTIR 谱图。

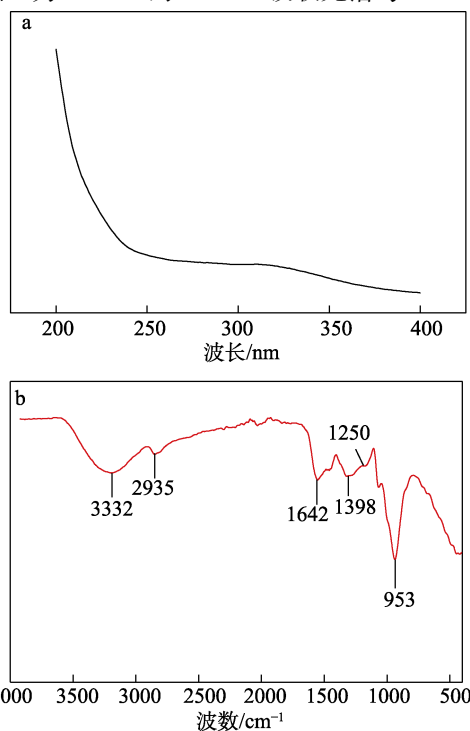


图 6 SRP- I 的 UV-Vis 吸收光谱 (a) 及 FTIR 谱图 (b)
Fig. 6 UV-Vis spectrum (a) and FTIR spectrum (b) of SRP- I

从图 6 可以看出, SRP- I 在 280 nm 处无蛋白质最大吸收波长 (图 6a), 这一结果与蛋白质含量检测结果相符合 (图 5b)。SRP- I 在 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 内有明显的吸收峰 (图 6b), 其中 3332 cm^{-1} 处峰对应于 SRP-

I 中 O—H 键的伸缩振动, 并且是以分子间的氢键形式存在; 2935 cm^{-1} 处较弱吸收峰是 C—H 键的伸缩振动; 1642 cm^{-1} 处峰是 C=O 键的伸缩振动; 1398 和 1250 cm^{-1} 处较弱吸收峰分别是 C—H 键的弯曲振动和 C—O 键的伸缩振动; 953 cm^{-1} 处强峰说明 SRP-I 具有 α -D-吡喃糖环结构, 并且在 1742 cm^{-1} 处未检测到吸收峰, 表明 SRP-I 无糖醛酸, 是一种中性多糖^[22], 这与单糖组成分析及 UV-Vis 检测结果一致。

2.4.4 刚果红实验结果及 XRD 分析

氢键是维持多糖螺旋结构的主要分子间作用力, 在低浓度 NaOH 中, 具有螺旋形状多糖的刚果红复合物最大吸收波长会发生红移, 并随着 NaOH 浓度的增大, 最大吸收波长降低^[17]。图 7 为 SRP-I 的刚果红实验结果和 XRD 谱图。

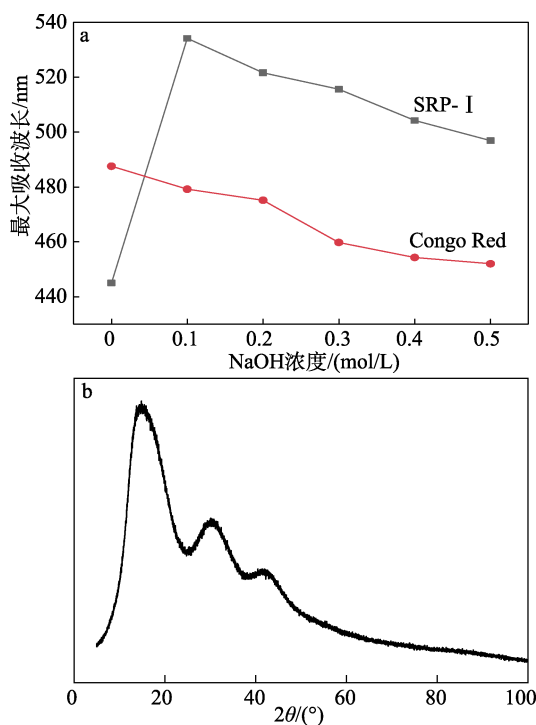


图 7 SRP-I 的刚果红实验结果 (a) 和 XRD 谱图 (b)
Fig. 7 Congo Red staining (a) and XRD pattern (b) of SRP-I

从图 7 可以看出, SRP-I 的最大吸收波长随 NaOH 浓度的增加先增大后下降(图 7a), 表明 SRP-I 具有被高浓度 NaOH 破坏的三螺旋结构^[23]。在 SRP-I 的 XRD 谱图(图 7b)中, 在 $2\theta=19.00^\circ$ 处出现一个较大的衍射峰, 为多糖特征衍射峰; 在 $2\theta=30.28^\circ$ 、 40.78° 处出现较宽的弥散形衍射峰, 表明 SRP-I 中存在部分结晶现象, 但结晶度较低, 是以一种无定形和晶体共存结构存在。通常具有一定结晶度的多糖均有拉伸强度, 可用于制备食品中的可食性薄膜, 而无定形多糖具有较好的溶解性, 可用于药品微胶囊, 进而提高其生物利用度^[24]。

2.4.5 SEM 分析

图 8 为 SRP-I 的 SEM 图。

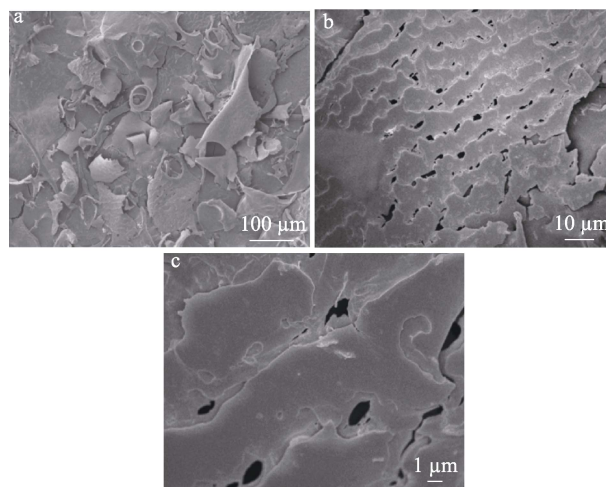


图 8 SRP-I 在放大不同倍数下的 SEM 图

Fig. 8 SEM images of SRP-I at different magnifications

从图 8 可以看出, SRP-I 表面平整光滑, 结构分散, 分子间的组织结构无定形, 破碎程度较明显(图 8a)。可以明显观察到, SRP-I 具有大小不均一的孔隙且孔径较大(图 8b、c), 可能是由于在冷冻干燥过程中, 游离水快速蒸发。较小的孔径可能是大分子间官能团相互排斥引起的, 同时这些孔隙也是多糖具有持水性和持油性的结构基础^[25]。

2.4.6 TG 分析

图 9 为 SRP-I 的 TG 测试结果。从图 9 可以看出, SRP-I 热分解第一阶段主要集中在 $36.0\sim62.6^\circ\text{C}$, 此阶段质量损失率为 13.20% (0.495 mg) 是由 SRP-I 中游离水、结合水的失去所致; 第二阶段主要集中在 $250.0\sim550.0^\circ\text{C}$, SRP-I 在 315.0°C 失重速率较快, 该阶段质量损失率为 60.46% (2.27 mg), 可能是高温导致 SRP-I 中碳链和氢键的断裂。 550.0°C 时, SRP-I 的残炭率为 26.34% (0.988 mg), 表明 SRP-I 热稳定性较好, 但熔点不固定, 热熔性呈现不规律性。

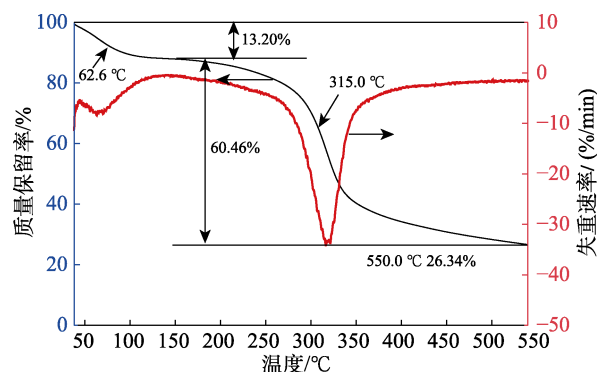


图 9 SRP-I 的 TG、DTG 曲线

Fig. 9 TG, DTG curves of SRP-I

2.4.7 部分酸水解实验分析

部分酸水解实验是用于分析多糖骨架及支链的单糖组成的一种方法。通常采用逐级酸水解的方法,将水解部分和未水解部分分别进行单糖 GC 分析,得到支链及主链的单糖组成。图 10 为 SRP- I 的部分酸水解 GC 图。

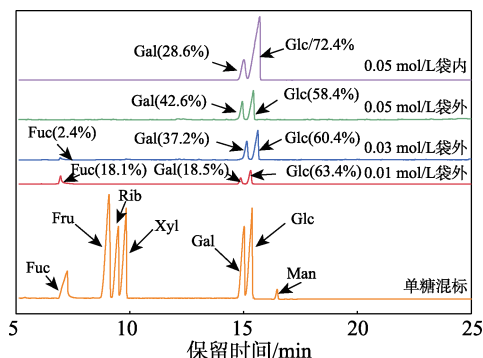


图 10 SRP- I 的部分酸水解 GC 谱图

Fig. 10 GC spectra of partial hydrolysis analysis of SRP- I

从图 10 可以看出,当三氟乙酸浓度为 0.01、0.03 mol/L 时,透析袋外溶液中岩藻糖 (Fuc)、葡萄糖 (Glc) 和半乳糖 (Gal) 均存在,且比例变化较大;当三氟乙酸浓度为 0.05 mol/L 时,透析袋内外溶液中均无岩藻糖,并且透析袋外部溶液与袋内溶液相比,葡萄糖质量分数从 58.4% 增加至 72.4%,半乳糖质量分数减小。由此推断,岩藻糖主要存在于侧链中,而葡萄糖和半乳糖较均匀地分布在主链和侧链上^[26]。

2.4.8 Smith 降解实验分析

Smith 降解实验是将多糖经高碘酸氧化后再经还原生成稳定的羟基化合物 (即降解产物),降解产物经乙酰化反应后通过 GC 分析,得到未被氧化的

单糖和 Smith 降解产物 (甘油和赤藓醇等) 的定量数据。图 11 为 SRP- I 的 Smith 降解 GC 图。

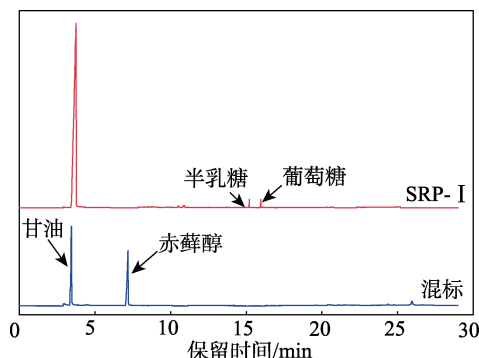


图 11 SRP- I 的 Smith 降解 GC 谱图

Fig. 11 GC spectrum of Smith degradation of SRP- I

从图 11 可以看出,SRP- I 的 Smith 降解产物主要为甘油,表明 SRP- I 均一多糖主要可能是以 1→6、1→2、1→2,6 连接^[13];另外,还检测到少量的葡萄糖和半乳糖,表明还含有未被高碘酸氧化的糖苷键,可能以 1→3、1→3,6、1→3 连接^[27]。

2.4.9 甲基化实验分析

甲基化实验是分析多糖糖苷键类型的主要方法,在甲基化实验结果中,乙酰基团的位置即为单糖的连接位置,甲基基团的位置则为无单糖连接。表 4 为 SRP- I 的甲基化 GC-MS 分析结果。

从表 4 可以看出,SRP- I 共有 5 种单糖的连接方式,主要是以[→3]-Glc(p)和[→6]-Gal(p)主链结构组成,同时存在[→3,6]-Glc(p)的支链结构^[28];另外,还检测到少量的 T-岩藻糖、T-葡萄糖,这可能是来源于 SRP- I 末端非还原端的岩藻糖和葡萄糖。这与单糖分析、部分酸水解分析和 Smith 降解分析结果一致。

表 4 SRP- I 的甲基化 GC-MS 分析结果

Table 4 GC-MS analysis results of SRP- I methylation

糖残基	连接方式	质谱碎片, m/z	摩尔分数/%	保留时间/min
1,5-二-O-乙酰基-6-脱氧-2,3,4-三-O-甲基菲醇	T-Fuc(p)	175,131,86,72,59	1.38	6.308
1,5-二-O-乙酰基-2,3,4,6-四-O-甲基葡萄糖	T-Glc(p)	205,162,129,71,59	14.23	10.322
1,3,5-三-O-乙酰基-2,4,6-三-O-甲基葡萄糖	1,3-Glc(p)	277,234,118,87,59	39.27	13.745
1,5,6-三-O-乙酰基-2,3,4-三-O-甲基半乳糖	1,6-Gal(p)	233,189,118,102,87	35.48	17.224
1,3,5,6-四-O-乙酰基-2,4-二-O-甲基葡萄糖	1,3,6-Glc(p)	305,189,118,101,87	9.64	19.027

注:连接方式中(p)代表醇羟基。

2.4.10 NMR 分析

图 12 为 SRP- I 的 ¹H NMR 谱图和 ¹³C NMR 谱图。

从图 12 可以看出,SRP- I 多糖的氢谱和碳谱均出现了多糖的特征信号峰。在 ¹H NMR 谱图中,δ 4.76 处峰为 D₂O; δ 5.29、5.14、5.09、5.05 和 4.91 处

有 5 种异头氢,表明 SRP- I 可能主要含有 5 个单糖残基,且 5 种异头氢质子信号均大于 δ 4.8。由此推断,SRP- I 是由 α-糖苷键组成的^[26],此结果与 FTIR 谱图结果一致;δ 3.0~4.3 处峰均为多糖的典型特征信号。在 ¹³C NMR 谱图中,δ 101.66、100.63、

99.87、97.84、97.67 处有 5 个异头碳信号峰,表明 SRP-I 多糖不含呋喃糖环^[29]。

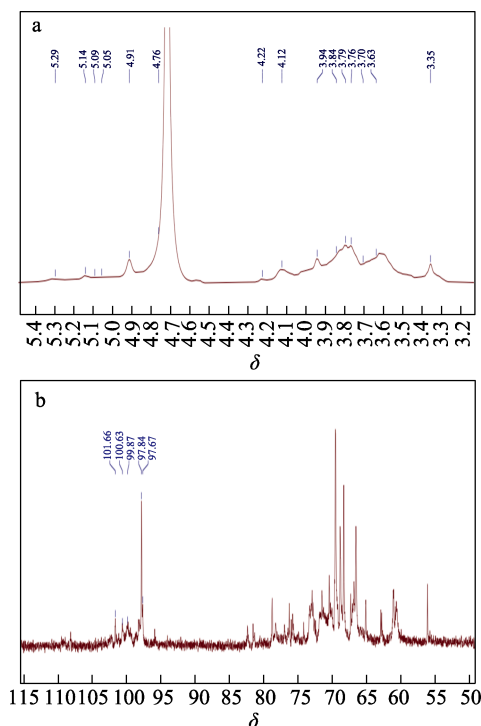


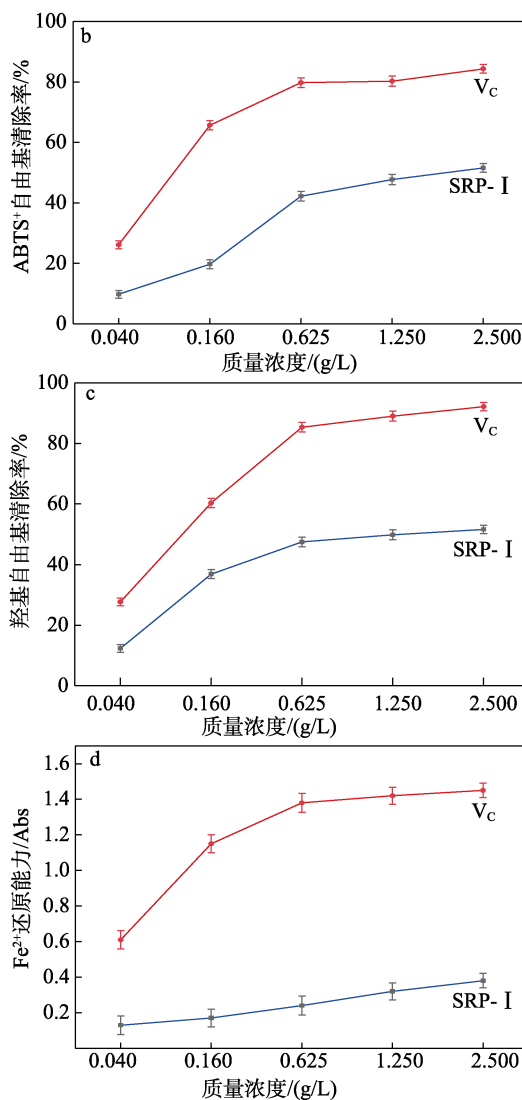
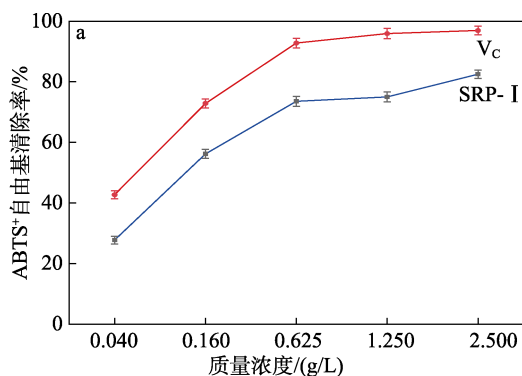
图 12 SRP-I 的 ^1H NMR (a) 和 ^{13}C NMR (b) 谱图
Fig. 12 ^1H NMR (a) and ^{13}C NMR (b) spectra of SRP-I

2.5 SRP-I 生物活性分析

2.5.1 SRP-I 体外抗氧化能力

活性氧自由基能够攻击其他分子形成新的自由基,造成体内大分子损伤,是多种疾病引发的主要原因。多糖大分子含有一定的酚羟基,具有一定供氢能力,从而清除体内产生的氧自由基,从而发挥抗氧化活性^[30]。图 13 为 SRP-I 体外抗氧化能力测试结果。

从图 13 可以看出,在质量浓度为 0.040~2.500 g/L 范围内,SRP-I 对 DPPH 自由基清除率(图 13a)、ABTS⁺自由基清除率(图 13b)、羟基自由基清除率(图 13c)和 Fe^{2+} 还原能力(图 13d)均呈现一定剂量依赖性,总体上表现出一定的体外抗氧化能力,但是其能力均弱于阳性对照 V_C 。



a—DPPH 自由基清除率; b—ABTS⁺自由基清除率; c—羟基自由基清除率; d— Fe^{2+} 还原能力

图 13 SRP-I 体外抗氧化能力

Fig. 13 *In vitro* antioxidant capacity of SRP-I

当 SRP-I 质量浓度为 2.500 g/L 时,其对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、羟基自由基清除率分别为 82.54%、51.62%、51.57%,其半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.127、2.438、2.446 g/L,存在相对较弱的 Fe^{2+} 还原能力。

2.5.2 SRP-I 体外降糖能力

糖尿病患者一般因为代谢障碍而出现血糖浓度异常,预防和治疗这类疾病的有效方法之一是延缓多糖在消化道内的分解速率。正常进食后,食物中的碳水化合物先经 α -淀粉酶作用生成麦芽糖等,随后和蔗糖一起通过蔗糖酶等糖苷酶水解作用生成葡萄糖等,最终被肠壁吸收而被机体利用。通过降低 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性可以抑制碳水化合物分解为葡萄糖等,延缓吸收速率,从而改善餐后血糖水平^[31]。图 14 为 SRP-I 体外降糖能力测试结果。

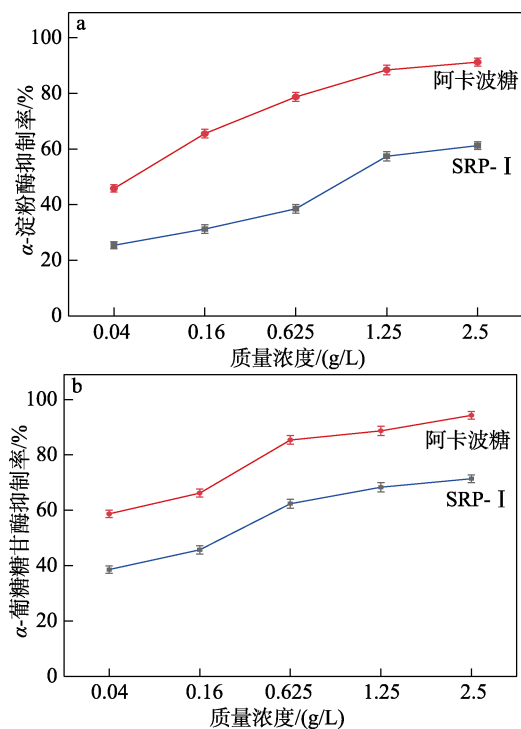
a— α -淀粉酶抑制率；b— α -葡萄糖苷酶抑制率

图 14 SRP-I 体外降糖能力

Fig. 14 *In vitro* hypoglycemic capacity of SRP-I

从图 14 可以看出,在质量浓度 0.040~2.500 g/L 范围内,SRP-I 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率均呈现一定剂量依赖性,总体上表现出一定的体外降糖能力,但其能力均低于阳性对照阿卡波糖。当 SRP-I 质量浓度为 2.500 g/L 时,其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为 61.2% 和 71.4%, IC_{50} 分别为 0.970 和 0.240 g/L。

3 结论

(1) 采用纤维素酶辅助离子液体 (EADS) 提取 SRP,经单因素、响应面实验优化的最佳提取工艺为:提取时间 106 min,提取温度 51 $^{\circ}\text{C}$,EADS 质量浓度 4.3 g/L,纤维素酶添加量 10.4%,在此条件下 SRP 提取率为 32.54% $\pm$ 0.12%。

(2) SRP 经纯化后,得到重均分子量 24.321 kDa,具有三螺旋构象的 α -D-吡喃构型的中性多糖 SRP-I,其表面平整光滑,有孔隙,无定形和晶体结构共存。

(3) SRP-I 主要由葡萄糖 (摩尔分数 53.31%)、半乳糖 (摩尔分数 43.32%) 和岩藻糖 (摩尔分数 3.37%) 组成。其中,岩藻糖主要存在于 SRP-I 侧链,而葡萄糖和半乳糖较均匀地分布在 SRP-I 主链和侧链。主链是以 $[\rightarrow 3]\text{-Glc}(1\rightarrow)$ 和 $[\rightarrow 6]\text{-Gal}(1\rightarrow)$ 的结构组成,同时还存在 $[\rightarrow 3,6]\text{-Glc}(1\rightarrow)$ 的支链结构。

(4) SRP-I 热稳定性较好,在 550 $^{\circ}\text{C}$ 时残炭率为 26.34%,但熔点不固定,热熔性呈现不规律性。

(5) SRP-I 具有一定的抗氧化能力和体外降糖能力。质量浓度为 2.500 g/L 的 SRP-I 对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、羟基自由基清除率分别为 82.54%、51.62%、51.57%,其 IC_{50} 分别为 0.127、2.438、2.446 g/L;质量浓度 2.500 g/L 的 SRP-I 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为 61.2%、71.4%, IC_{50} 分别为 0.970 和 0.240 g/L。

参考文献:

- [1] XIAO F (肖芳), CHEN T (陈涛), WU Z H (伍振煌), *et al.* Research progress on extraction technology, biological function and animal production of plant polysaccharides[J]. Feed Research (饲料研究), 2022, 45(14): 125-128.
- [2] SANTI M, AGUIRRE E, NEGRO M, *et al.* Prenylated flavonoids from Dalea genus as xanthine oxidase inhibitors: *In vitro* bioactivity evaluation and molecular docking studies[J]. Results in Chemistry, 2023, 32(6): 282-294.
- [3] SONG T L (宋添力), TANG L (唐浪), WANG Y M (王一民), *et al.* Effect of *Panax japonicus* polysaccharide on acute liver injury rats via PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(41): 2472-2479, 2534.
- [4] LIU W L (刘文立), MO H Y (莫海云). Bletilla Striata polysaccharide inhibits tumor growth in colon cancer CT26 tumor-bearing mice by regulating immunity[J]. Chinese Journal of Immunology (中国免疫学杂志), 2021, 37(8): 941-945.
- [5] HUANG Q (黄青), LI L Y (李丽媛), LIU Q Q (刘晴晴), *et al.* Advances in immunoregulation effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and/or *Polyporus umbellatus* polysaccharide[J]. Food Science (食品科学), 2021, 41(17): 275-282.
- [6] DU M H (杜敏华), WANG X L (王小立), SU H (苏海飞), *et al.* Optimization of extraction process by using ultrasound-assisted methodology and antioxidant activity of polysaccharide from *Stropharia rugosoannulata*[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2013, 34(16): 18-22.
- [7] LUO Q (骆庆), GUO T (郭涛), SUN Z X (孙召新), *et al.* Biological basis and bioactive components of *Stropharia rugosoannulata* and its application[J]. Microbiology China (微生物学通报), 2023, 50(6): 2709-2720.
- [8] GUO Y L, ABUDUAINI G, YANG C, *et al.* Isolation, purification, and structural elucidation of *Stropharia rugosoannulata* polysaccharides with hypolipidemic effect[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9(1): 109-125.
- [9] WANG F (王峰), WANG X W (王晓伟), TAO M X (陶明熿), *et al.* Effect of *Stropharia rugoso-annulata* extract (SRE) on activities and isozyme profiles of antioxidant enzymes in mice with carbon tetrachloride-induced acute liver injury[J]. Food Science (食品科学), 2010, 31(7): 263-268.
- [10] JIANG L (蒋琳). The research on preparation, structural identification and biological activity of polysaccharide from *Stropharia rugosoannulata* and polysaccharide from *Tricholoma lascivum* (Fr.) gillet (TLG-1)[D]. Nanchong: China West Normal University (西华师范大学), 2019.
- [11] SHAO H (邵华). Extraction of polysaccharide from *Stropharia rugoso-annulata* and its effect on sports fatigue recovery[J]. Edible Fungi of China (中国食用菌), 2022, 39(7): 68-71.
- [12] FENG X T, GAO Y, QIN Y T, *et al.* Triphase dynamic extraction system involved with ionic liquid and deep eutectic solvent for various bioactive constituents from Tartary buckwheat simultaneously [J]. Food Chemistry, 2023, 4(5): 134-142.
- [13] XIU W Y, WANG X, YU S Y, *et al.* Structural characterization, in

- in vitro* digestion property, and biological activity of sweet corn cob polysaccharide iron(III) complexes[J]. *Molecules*, 2023, 2(8): 298-235.
- [14] MA Y Q, XIU W Y, WANG X, *et al.* Structural characterization and *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from sweet corn cob[J]. *Journal of Cereal Science*, 2022, 10(8): 103-115.
- [15] LI J C, CHEN Z X, SHI H M, *et al.* Ultrasound-assisted extraction and properties of polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 9(3): 106-125.
- [16] LEONG Y K, YANG F C, CHANG J S, *et al.* Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 25(1): 117-124.
- [17] TANG Y Y, HE X M, LIU G M, *et al.* Effects of different extraction methods on the structural, antioxidant and hypoglycemic properties of red pitaya stem polysaccharide[J]. *Food Chemistry*, 2023, 4(5): 134-142.
- [18] TIAN S Y, HAO C C, XU G K, *et al.* Optimization conditions for extracting polysaccharide from *Angelica sinensis* and its antioxidant activities[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2017, 25(4): 766-775.
- [19] YE D Y, JIANG Z B, ZHENG F C, *et al.* Optimized extraction of polysaccharides from *Grateloupia livida* (Harv.) Yamada and biological activities[J]. *Molecules*, 2015, 20: 16817-16832.
- [20] DONG Z, ZHANG M M, LI H X, *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi root[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 1556-1564.
- [21] LI W W (李文文), LIN Y G (蔺永刚), BIAN P (边鹏), *et al.* Extraction, physicochemical property and bioactivity of polysaccharides from *Conioselinum vaginatum*[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2024, 41(9): 1966-1977, 2081.
- [22] ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, NUERXIATI R, *et al.* Structure and biological activity of polysaccharides from *Nitraria sibirica* pall fruit[J]. *Food Bioscience*, 2021, 40: 100903.
- [23] GONG P X, WU Y C, LIU Y, *et al.* Structure and hypoglycemic effect of a neutral polysaccharide isolated from sea cucumber *Stichopus japonicus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 2(16): 14-23.
- [24] CHEN C (陈婵), HUANG J (黄靖), DING L (丁玲). Study on ultrasonic wave assisted extraction of flavonoids from *Stropharia*[J]. *Food Research and Development (食品研究与开发)*, 2015, 36(24): 116-119.
- [25] HU Y B, WANG S Q, SHI Z H, *et al.* Purification, characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from okara[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46: e16411.
- [26] NUERXIATI R, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (Salep)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 14(1): 431-443.
- [27] ZHAO X Y, LI J Y, LIU Y Q, *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of a water soluble polysaccharide isolated from *Botrychium ternatum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 17(1): 136-142.
- [28] ABUDUWAILI A, NUERXIATI R, MUTAILIFU P, *et al.* Isolation, structural modification, characterization, and bioactivity of polysaccharides from *Folium Isatidis*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 17(6): 114-123.
- [29] HIMABINDU B, LATHA D, RAJINI K, *et al.* Microstructural parameters from X-ray peak profile analysis by Williamson-Hall models: A review[J]. *Food Chemistry*, 2021, 47: 4891-4896.
- [30] CHENG S, HE F, FU L Y, *et al.* Polysaccharide from rubescens: Extraction, optimization, characterization and antioxidant activities [J]. *RSC Advances*, 2021, 11(31): 18974-18983.
- [31] LUO Y, FANG Q, LAI Y, *et al.* Polysaccharides from the leaves of *Polygonatum sibiricum* Red. regulate the gut microbiota and affect the production of short-chain fatty acids in mice[J]. *AMB Express*, 2022, 12(1): 1-10.

(上接第 369 页)

- [14] ZHOU W W, ZHOU Y S, WEI Q, *et al.* Gallium modified HUSY zeolite as an effective Co-support for NiMo hydrodesulfurization catalyst and the catalyst's high isomerization selectivity[J]. *Chemistry*, 2017, 23(39): 9369-9382.
- [15] ZHU Z G, MA H K, LIAO W P, *et al.* Insight into tri-coordinated aluminum dependent catalytic properties of dealuminated Y zeolites in oxidative desulfurization[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2021, 288: 120022.
- [16] LUO Q, ZHOU Q, LIN Y, *et al.* Fast and deep oxidative desulfurization of dibenzothiophene with catalysts of MoO₃-TiO₂@MCM-22 featuring adjustable Lewis and Brønsted acid sites[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2019, 9(21): 6166-6179.
- [17] WINOTO H P, FIKRI Z A, HA J M, *et al.* Heteropolyacid supported on Zr-beta zeolite as an active catalyst for one-pot transformation of furfural to γ -valerolactone[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2019, 241: 588-597.
- [18] SANG S Y, LIU Z M, TIAN P, *et al.* Synthesis of small crystals zeolite NaY[J]. *Materials Letters*, 2006, 60(9/10): 1131-1133.
- [19] HELD A, KOWALSKA-KUŚ J, JANISZEWSKA E, *et al.* Epoxidation of propane with oxygen and/or nitrous oxide over silica-supported vanadium oxide[J]. *Journal of Catalysis*, 2021, 404: 231-243.
- [20] FAN X L, WANG F M, ZHAI Y, *et al.* Citric acid and temperature programming assisted synthesized vanadium silicate-I for oxidative desulfurization of dibenzothiophene[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2024, 366: 112925.
- [21] SEBASTIAN J, ZHENG M Y, LI X S, *et al.* Catalytic conversion of glucose to small polyols over a binary catalyst of vanadium modified beta zeolite and Ru/C[J]. *Journal of Energy Chemistry*, 2019, 34: 88-95.
- [22] CHEN W L (陈维林), WANG E B (王恩波). *Polyoxometalate chemistry*[M]. Beijing: Science Press (科学出版社), 2013.
- [23] CHEN L, REN J T, YUAN Z Y. Increasing the utilization of SiBeta support to anchor dual active sites of transition metal and heteropolyacids for efficient oxidative desulfurization of fuel[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2022, 305: 121044.
- [24] ZHU W S, WU P W, YANG L, *et al.* Pyridinium-based temperature-responsive magnetic ionic liquid for oxidative desulfurization of fuels[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 229: 250-256.
- [25] GÓMEZ-PARICIO A, SANTIAGO-PORTILLO A, NAVALÓN S, *et al.* MIL-101 promotes the efficient aerobic oxidative desulfurization of dibenzothiophenes[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(2): 508-515.
- [26] CHEN L, REN J T, YUAN Z Y. Identifying the dominant effect of electron-feeding on molybdenum phosphonates to decipher the activity origin for oxidative desulfurization of fuel[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 450: 138330.
- [27] SU T, CHI M Y, CHANG H Y, *et al.* Enhanced oxidative desulfurization of fuel in ionic liquid by TiO₂ quantum dots catalysts modified with Anderson-type polyoxometalate[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2022, 632: 127821.