

北虫草多糖提取工艺优化及抗氧化作用研究

元玲刚¹,常明昌²,刘靖宇²,刘勇男¹

(¹山西农业大学园艺学院,山西太谷 030801;²山西农业大学食品科学与工程学院,山西太谷 030801)

摘要:为了研究北虫草多糖的最佳提取工艺以及抗氧化功能,以北虫草(*Cordyceps militaris*)子实体为试验材料,通过正交 $L_9(3^4)$ 试验探讨提取北虫草多糖的最佳工艺,并对北虫草多糖总还原力、DPPH清除能力、抑菌能力等进行了测定。结果表明,超声波辅助热水浸提法提取北虫草多糖的最佳工艺参数为:超声功率 105 W、超声时间 40 min、料水比 1:25、热水浸提时间 40 min、热水浸提温度 70℃,在此条件下的多糖得率为 2.6602%。当北虫草浓度为 2.4 mg/mL 时,还原力最高;0.45 mg/mL 时,DPPH 清除能力最强。

关键词:北虫草;多糖;超声波;正交试验

中图分类号:S646.1+5

文献标志码:A

论文编号:casb14110175

Study on Extraction and Antioxidation of *Cordyceps* Polysaccharide

Yuan Linggang¹, Chang Mingchang², Liu Jingyu², Liu Yongnan¹

(¹College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801;

²College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801)

Abstract: In order to study the best extraction technology of *Cordyceps* polysaccharide of *Cordyceps militaris* and its antioxidant function, orthogonal testing [$L_9(3^4)$] was used to optimize extraction condition for extracting polysaccharide from fruiting body of *Cordyceps militaris*. Total reducing power, scavenging activity of DPPH and antibacterial capacity of *Cordyceps* polysaccharide were measured. The results showed that the optimal parameters of ultrasound-assisted hot water extracting *Cordyceps* polysaccharide were ultrasonic power of 105 W, ultrasonic time of 40 minutes, liquid-solid ratio of 1:25, hot water extraction time of 40 minutes, hot water extraction temperature at 70℃. Yield of polysaccharide was 2.6602% under the optimized condition. Reducing power was the highest when the concentration of *Cordyceps militaris* was 2.4 mg/mL. DPPH scavenging power was the strongest when the concentration of *Cordyceps militaris* was 0.45 mg/mL.

Key words: *Cordyceps militaris*; polysaccharide; ultrasound; orthogonal test

0 引言

随着中国传统医药在世界的流行,虫草属真菌越来越受到人们的关注。早在1964年,中国著名药用真菌冬虫夏草就已被正式列入中国药典^[1]。北虫草隶属于真菌门,子囊菌纲,肉座菌目,麦角菌科,虫草属,被认为是一种与冬虫夏草具有相同有效成分和药理作用

的虫生真菌^[2]。由于北虫草对肝、肾功能具有明显的抗肿瘤作用和免疫调节作用,其所含的相关活性物质已成为目前真菌学研究的热点之一^[3]。近年来,北虫草中新的有效生理活性物质成分不断被发现,如虫草素、多糖、抗菌和抗肿瘤的腺苷衍生物等,但目前的研究结果表明多糖是其中最为重要的一种活性物质^[4],

基金项目:山西省煤基重点科技攻关项目“设施食用菌高效碳循环研究与示范”(FT20140301);山西省科技攻关项目“山西省北冬虫夏草营养与栽培的研究开发”(20090311047)。

第一作者简介:元玲刚,男,1990年出生,山西临汾人,在读研究生,主要研究方向食用菌栽培育种。通信地址:030801 山西省晋中市太谷县山西农业大学, E-mail: 564326796@qq.com。

通讯作者:常明昌,男,1964年出生,山西大同人,教授,学士,主要研究食用菌栽培育种。通信地址:030801 山西省晋中市太谷县山西农业大学, Tel: 0354-6288088, E-mail: liujingyu80@126.com。

收稿日期 2014-11-30, **修回日期** 2015-02-12。

其中的虫草素、虫草酸等的生物活性远不及虫草多糖^[5]。此外虫草多糖具有显著增强机体免疫功能的功效^[6]。

笔者对超声波辅助热水浸提法提取北虫草多糖的不同影响因素进行系统研究,建立北虫草多糖提取的最佳工艺条件,并对提取的北虫草多糖进行了体外抗氧化研究,以期工业化生产虫草附属产品提供科学依据和理论基础,也为该资源的深入开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

北虫草子实体干品由山西农业大学食用菌中心提供。

1.2 试剂与仪器设备

1.2.1 试剂 葡萄糖、浓硫酸、氯仿均为分析纯(天津市德恩化学试剂有限公司),三氯乙酸、抗坏血酸、铁氰化钾(天津市天力化学试剂有限公司),苯酚(西安化学试剂厂)、考马斯亮蓝 G-250(生工生物工程有限公司)、DPPH(Aldrich 公司)、牛血清蛋白(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2.2 仪器 BS210S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)、TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、722E 可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、KS 多用调速振荡器(北京科伟永兴仪器有限公司)、JY92-2D 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)

1.3 试验方法

1.3.1 超声波辅助热水浸提提取北虫草粗多糖 北虫草子实体烘干至恒重→粉碎过 60 目筛→配置料水比(每组试验单位为 1 g)→超声波预处理→热水浸提→离心(4000 r/min, 20 min)→上清加入 3 倍体积 95%乙醇,4℃醇沉 24 h→离心(3500 r/min, 20 min),取沉淀→烘干得粗多糖干品→配置成 1%的粗多糖溶液→sevage 法去蛋白质→加 1%(w/v)活性炭粉,pH 4.0、40℃条件下振荡脱色 40 min,离心,去沉淀,得到多糖溶液

1.3.2 多糖含量测定 多糖含量测定采用苯酚-硫酸法,计算见式(1)。

$$\text{多糖得率} = \frac{0.9 \times P \times V}{W} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中: P 为提取液中多糖含量,单位为 g/L; V 为提取液总体积,单位为 L; W 为菌丝体干重,单位为 g。

1.3.3 北虫草多糖提取单因素试验 选定料水比为 1:30,超声波时间 35 min,80℃热水浸提 30 min,超声功率 105 W 为基础条件,分别改变单因素条件超声功率 75、90、105、130 W;超声波时间 20、30、40、50 min;

料水比 1:20、1:30、1:40、1:50;热水浸提温度 60、70、80、90℃;热水浸提时间 20、30、40、50 min 对北虫草多糖得率的影响。

1.3.4 北虫草多糖提取的正交试验 在超声波辅助热水浸提单因素试验基础上,选择超声波功率和超声时间的最优条件作为预处理,选择料水比、热水浸提温度、热水浸提时间 3 个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计。

表 1 正交试验设计

水平	料水比	热水浸提温度/℃	热水浸提时间/min
1	1:25	65	35
2	1:30	70	40
3	1:35	75	45

1.4 北虫草多糖体外抗氧化活性的研究

1.4.1 北虫草多糖还原能力测定 参考严奉伟等^[7]报道的方法,具体操作方法如下:将 1 mL 样品,2.5 mL 2.5 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.6)和 2.5 mL 1% $K_3Fe(CN)_6$ 于试管中混匀,在 50℃的水浴锅中放置 20 min,冷却并加入 2.5 mL 10%三氯乙酸,用玻璃棒搅拌使其混匀,离心(3500 r/min, 10 min),取上清液 2.5 mL 于试管中,往试管中加入 0.5 mL 0.1% $FeCl_3$,摇匀,再往试管中加入 2.5 mL 的蒸馏水混匀,以蒸馏水调零,波长 700 nm 测定吸光值。用蒸馏水作为无还原能力的对照,Vc 用同样的方法作为还原能力的对照,试验重复 3 次。

1.4.2 北虫草多糖 DPPH 自由基清除能力测定 参考 Sun 等^[8]的方法,具体操作方法如下:将 2 mL 样品和 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液混合均匀,室温避光反应 30 min,在 517 nm 处测其吸光值(A_1);2 mL 样品与 2 mL 无水乙醇混合均匀,室温避光反应 30 min,在 517 nm 处测其吸光值(A_2);2 mL 0.2 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液与 2 mL 无水乙醇混合均匀,室温避光反应 30 min,在 517 nm 处测其吸光值(A_0),作为参比。Vc 用同样的方法作为 DPPH 自由基清除的对照,用蒸馏水作为空白对照。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 提取条件对北虫草多糖提取率的影响

从图 1~4 可以看出,北虫草多糖的得率随超声波功率、超声时间、热水浸提时间和热水浸提温度的变化呈现先增加后降低的趋势,增加到一峰值开始下降,据图确定最佳条件为超声功率为 105 W、超声时间 40 min、热水浸提时间 40 min,热水浸提温度 70℃。超声波空穴作用产生的剪切力较强,超声波功率过大,超

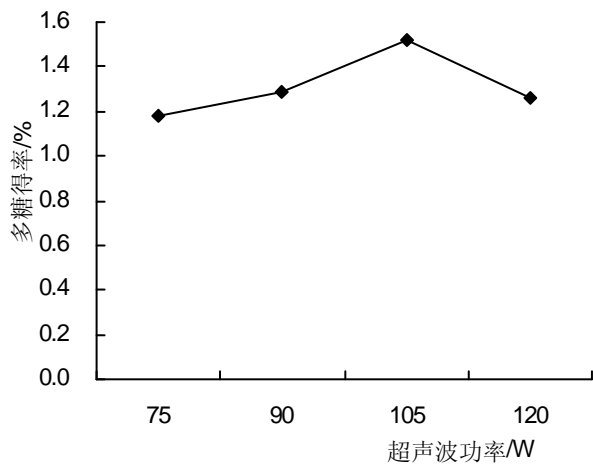


图1 超声波功率对多糖得率影响

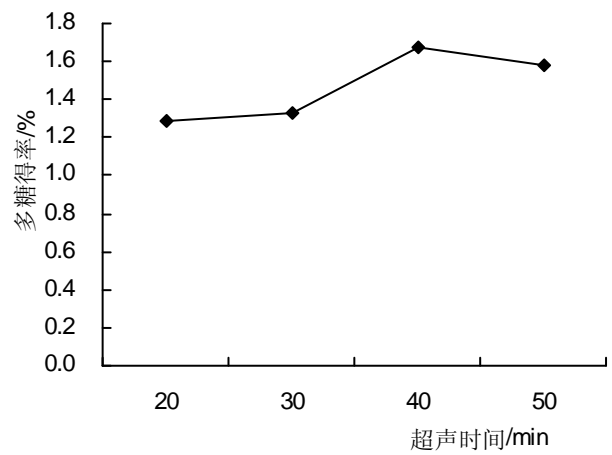


图2 超声时间对北虫草多糖得率的影响

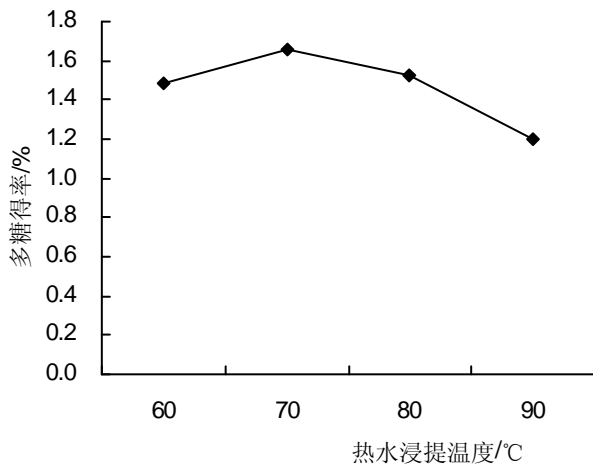


图3 热水浸提温度对北虫草多糖得率的影响

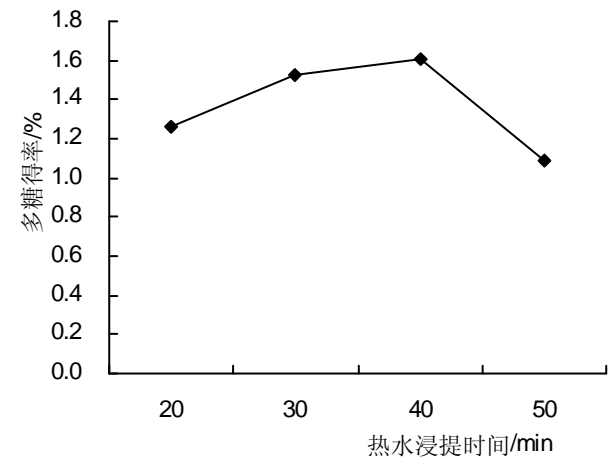


图4 热水浸提时间对北虫草多糖得率的影响

声时间过长,会使多糖结构遭到破坏,细胞破碎严重,其他杂质也会溶出,使多糖得率有所下降^[9]。超声功率过小或者超声时间不够使得细胞不能充分破碎,多糖溶出受阻,从而影响多糖得率。超声波的空化作用使北虫草多糖溶出速度加快,若热水浸提温度过高、时间过长时,会造成多糖的水解,其他成分的水解影响多糖纯化效果,从而影响其得率^[10]。

由图5可知,料水比从1:20到1:30北虫草多糖得率在增加,从1:30到1:40得率下降,1:40之后多糖得率略有回升,且其增速明显减慢。一般理论认为,较低的料液比使北虫草干粉颗粒周围多糖的浓度降低,从而有利于细胞内多糖溶解扩散于溶剂中,但过低的料液比使得在之后多糖提取浓缩步骤中会产生一定损失且增大能耗^[11]。因此从经济和成本方面考虑选择料水比为1:30较为合理。

2.2 超声波辅助热水浸提北虫草多糖正交试验结果

在单因素试验基础上,选择超声波功率和超声时

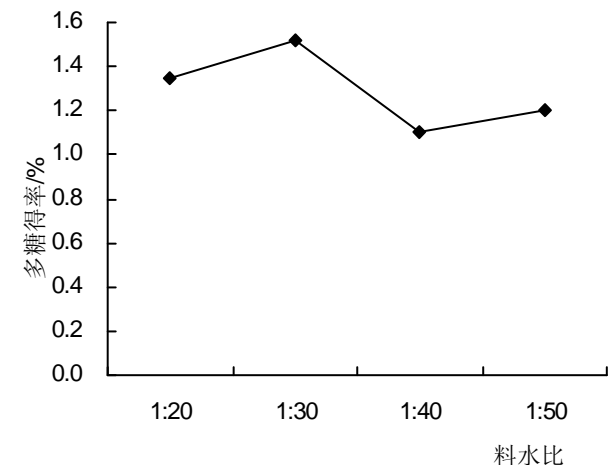


图5 料水比对北虫草多糖得率的影响

间的最优条件即 105 W, 40 min 作为预处理,进行料水比、热水浸提温度、热水浸提时间 3 个因素的正交试验。如表 2 所示,3 个因素的极差 R 值均大于可以代表试验误差的空列的极差 R 值,因此三者超声波辅助

热水浸提北虫草多糖工艺中对于多糖得率发挥有重要影响。通过正交试验极差分析,在此工艺中影响北虫草多糖得率的各因素主次顺序为 $A>C>B$,其最优组合是 $A_1B_2C_2$ 即料水比为1:25,热水浸提时间和温度分别为40 min和70℃,此最优水平组合与正交试验组中得到的最优组合(试验号为2)是一致的,因此最优组合得以确定。

2.3 北虫草多糖抗氧化活性分析

2.3.1 北虫草多糖还原能力的测定结果及分析 试验结果(图6)表明:北虫草多糖还原能力随着浓度的增大呈增加趋势,且在1.8~2.1 mg/mL浓度间上升的趋势最为明显。虽然北虫草多糖还原性不如同等浓度下稀释了20倍的Vc,但随着北虫草多糖浓度的增大,其还原能力越来越接近同等浓度下稀释20倍的Vc。在北虫

表2 超声波辅助热水浸提北虫草多糖正交试验结果

试验号	A因素	B因素	C因素	空列(D)	多糖得率/%
1	1	1	1	1	1.633928244
2	1	2	2	2	2.660213740
3	1	3	3	3	1.854333069
4	2	1	2	3	1.850632061
5	2	2	3	1	1.432934351
6	2	3	1	2	1.308871756
7	3	1	3	2	0.6442992366
8	3	2	1	3	0.6510656489
9	3	3	2	1	0.7635664122
K_1	6.148475053	4.128859542	3.593865649	3.830429007	
K_2	4.592438168	4.744213740	5.274412213	4.613384733	
K_3	2.058931298	3.926771237	3.931566657	4.356030779	
k_1	2.049491684	1.376286514	1.197955216	1.276809669	
k_2	1.530812723	1.581404580	1.758137404	1.537794911	
k_3	0.686310432	1.308923746	1.310522219	1.452010260	
R	1.363181252	0.272480834	0.560182188	0.260985242	

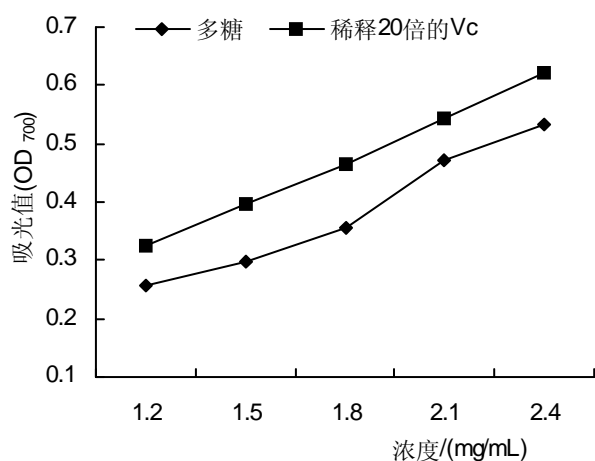


图6 不同浓度北虫草多糖还原力

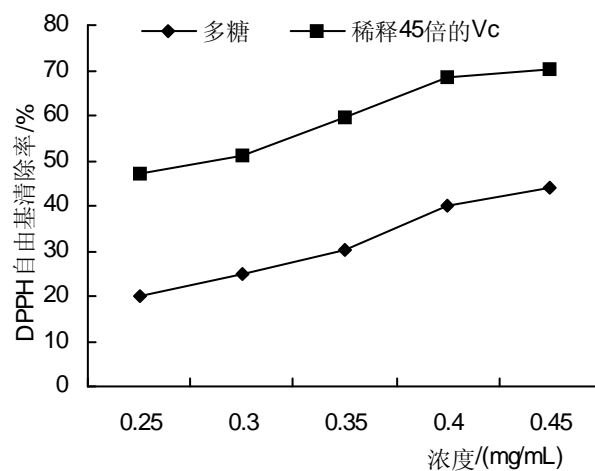


图7 不同浓度的北虫草多糖对DPPH自由基清除作用

草多糖浓度为2.4 mg/mL时,与稀释20倍Vc吸光值之比最高为85.41%。

2.3.2 北虫草多糖DPPH自由基清除能力的测定与分析 如图7所示北虫草多糖DPPH自由基清除能力随

着浓度的增大呈上升趋势,且在不同浓度之间上升趋势不同。虽然北虫草多糖DPPH自由基清除能力不如同等浓度下稀释了45倍的Vc,但随着北虫草多糖浓度的增大,DPPH自由基清除能力越来越接近同等浓度

下稀释45倍的Vc,在北虫草多糖浓度为0.45 mg/mL时,其与稀释45倍Vc的DPPH自由基清除率之比最高为65.96%。

3 结论

经单因素和正交试验得出,在超声功率105 W和超声时间40 min的超声波预处理辅助下,热水浸提的最佳工艺参数为:料水比1:25,热水浸提温度70℃,热水浸提时间40 min,此时北虫草多糖得率最高为2.6602%。由此看来,此工艺运用于提取北虫草多糖具有缩短热水浸提时间,降低浸提温度,提高提取效率,并减少能耗等优点。

还原能力和DPPH自由基清除率是反映物质抗氧化活性的2个方面。通过对北虫草多糖还原能力和DPPH自由基清除率的测定结果表明:该多糖具有抗氧化能力,在一定浓度区间内随其浓度的增大,抗氧化能力也随之增大。

4 讨论

真菌多糖与其他外源性抗氧化剂相比具有低毒、安全、来源广等特点,已成为国内外学者研究的热点。北虫草多糖作为真菌多糖的一种,因其较好的抗氧化活性逐渐被人们所认可^[12]。提取北虫草多糖的方法主要有超声波法、酶法、热水法、微波法等^[13],翁梁^[14]的研究结果表明热水浸提法的提取率最高,超声波提取法的提取时间最短,且超声波提取对北虫草多糖抗氧化性以及其他活性的影响相对较小。高峰等^[15]认为超声波提取北虫草多糖可以大大缩短提取时间、降低能耗、提高有效成分的收率,而且避免了热效应引起的有效成分结构变化、损失以及生理活性的降低。笔者通过采用热水浸提,超声波辅助打破细胞壁的方法提取北虫草多糖,探索出一种经济有效的北虫草多糖提取工艺。该方法具有省时省力,节俭成本,提取率高于传统热水浸提和超声波提取的优点。

张杰等^[16]研究了北虫草多糖的提取工艺及抗氧化性,最佳超声波时间为40 min,且北虫草多糖有较强的羟基自由基清除能力和DPPH清除能力,显示出较强的抗氧化性,结果与笔者的一致。自由基是人体组织中许多生化反应的中间代谢物^[17]。在正常情况下,人体内的自由基总是处于不断产生和不断消除的动态平衡中,但如果自由基产生过多或消除过少,就会造成对组织的伤害,从而导致各种疾病的发生和加速机体的衰老^[18]。北虫草多糖具有较强的清除自由基的能力,可将其开发为一类新型的生物免疫调节剂应用于治疗和预防疾病^[19]。

参考文献

- [1] Zheng H C, Cai S Q. Medicinal botany and pharmacognosy[M]. Beijing: People's Medical Publishing House,2004:166-167.
- [2] Gai G Z, Jin S J, Wang B, et al. The efficacy of *Cordyceps militaris* capsules in treatment of chronic bronchitis in comparison with Jinshuibao capsules[J]. Chinese Journal of New Drugs,2004(13): 169-171.
- [3] Paterson R R M. Cordyceps- A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory[J]. Phytochemistry, 2008,69 (7):1469-1495.
- [4] Yoshikawa N, Nakamura K, Yamaguchi Y, et al. Antitumour activity of cordycepin in mice[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology,2005,31(Z2):S51-S53.
- [5] Rao Y K, Fang S H, Wu W S, et al. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation[J]. Journal of Ethnopharmacology,2010,131(2):363-367.
- [6] Cho H J, Cho J Y, Rhee M H, et al. Cordycepin (3' - deoxyadenosine) inhibits human platelet aggregation in a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent manner[J]. Eur J Pharmacol,2007, 558(1-3):43-51.
- [7] 严奉伟,罗祖友,吴季勤,等. 莱籽多糖抗氧化作用与机理研究[J]. 中国农业科学,2005,38(1):157-162.
- [8] Sun T, Ho C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts[J]. Food Chemistry,2005,90(4):743-749.
- [9] 胡斌杰,陈金锋,王官南. 超声波法与传统热水法提取灵芝多糖比较研究[J]. 食品工业科技,2007(2):190-192.
- [10] 董媛,朱靖宇,王虎义,等. 响应面法优化蛹虫草菌丝体多糖超声波提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(4):880-883.
- [11] 秦秀丽,李凤林. 超声波法提取蛹虫草多糖的工艺研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(5):378-380.
- [12] 秦俊哲,陈明,陈合,等. 食药真菌多糖的研究现状与展望[J]. 中国食用菌,2013,23(2):5-9.
- [13] 阿燕. 真菌胞内多糖提取方法的研究进展[J]. 微生物学杂志,2011, 31(5):83-86.
- [14] 翁梁. 不同提取方法对蛹虫草多糖抗氧化性的影响[J]. 食品科技, 2008,33(21):180-187.
- [15] 高峰,张守勤,于亚莉,等. 超高压技术提取北虫草多糖的工艺研究 [J]. 食品科技,2013,38(5):207-210.
- [16] 张杰,孙源等. 超声提取蛹虫草多糖及其抗氧化活性分析[J]. 食品科技,2013,38(6):203-206.
- [17] 孟兆丽,朱凯,冯云,等. 蛹虫草多糖抑菌及抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(9):31-36.
- [18] Frankel E N, Meyer A S. Review:the problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2000,80(13):1925-1941.
- [19] 曲瑾瑜,任大明,等. 蛹虫草多糖的化学修饰及体外抗氧化能力[J]. 食品科学,2011,32(15):58-61.