

毛薯多糖提取分离工艺优化及抗氧化活性研究

黎善铭¹, 桂海霞², 梅朋飞², 刘鸿艳³, 陈世坚², 吴文婧^{2*}

1. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228; 2. 海南大学生命科学学院, 海南海口 570228; 3. 上海市农业生物基因中心, 上海 201106

摘要: 毛薯是海南的传统杂粮, 富含植物多糖。本研究以毛薯块茎粉末为材料探究毛薯多糖的提取工艺和抗氧化活性。采用热水提取法分别进行单因素和三因素三水平 $L_9(3^3)$ 正交实验, 优化毛薯多糖提取工艺。毛薯粗多糖溶液经 Sveag 法除蛋白、透析、DEAE-52 纤维素柱和 SephadexG-100 凝胶柱层析分离纯化得到毛薯精多糖。采用 DPPH 法、羟自由基法、超氧阴离子法和还原法检测毛薯多糖的抗氧化活性。结果表明: 热水提取法最佳工艺条件为温度 70 °C、料液比 1 : 15、提取时间 3 h, 毛薯多糖提取率为 1.94%; 毛薯多糖经过多次分离纯化后, 得到纯度均一的中性多糖; 毛薯精多糖 DPPH 自由基清除能力较弱, 1~5 mg/mL 的清除率保持在 10% 左右, 且随着多糖浓度的升高, 清除能力逐渐下降; 毛薯精多糖羟自由基活性随着多糖浓度的升高, 活性逐渐增加, 在 5 mg/mL 时清除率最高达到 34.74%; 毛薯精多糖超氧阴离子自由基活性随着多糖浓度的升高, 活性逐渐降低, 在 1 mg/mL 时清除率最高达 67.35%; 毛薯精多糖还原能力较弱, 1~5 mg/mL 的还原力最高为 0.17。该研究优化了毛薯多糖的提取工艺, 毛薯多糖具有一定的抗氧化活性, 为后续毛薯功能性产品的开发和药物功能机理的研究奠定基础。

关键词: 毛薯; 多糖; 热水提取法; 工艺优化; 抗氧化活性

中图分类号: Q539 文献标识码: A

Extraction, Isolation, Process optimization and Anti-oxidant Activity of Polysaccharides from *Dioscorea esculenta*

LI Shanming¹, GUI Haixia², MEI Pengfei², LIU Hongyan³, CHEN Shijian², WU Wenqiang^{2*}

1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. School of Life Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 3. Shanghai Agrobiological Gene Center, Shanghai 201106, China

Abstract: *Dioscorea esculenta* (Lour.) brukill is a traditional miscellaneous grain in Hainan, and it is rich in polysaccharides. This study investigated the extraction process and anti-oxidant activity of the polysaccharides from *D. esculenta* by using the *D. esculenta* tuber powder as the raw material. The hot water extraction was used to optimize the extraction process of polysaccharides from *D. esculenta* by single factor experiments and three-factor and three-level $L_9(3^3)$ orthogonal tests. The crude polysaccharides from *D. esculenta* were purified by the Sveag method, dialysis, DEAE-52 cellulose column and SephadexG-100 gel column chromatography. The anti-oxidant activity of polysaccharide from *D. esculenta* was detected by DPPH method, hydroxyl radical method, superoxide anion method and reduction method. The optimal extraction method of the hot water extraction included temperature 70 °C, solid-liquid ratio 1 : 15, and extraction time 3 h. The polysaccharides extraction rate of *D. esculenta* was 1.94%. After multiple separation and purification, neutral polysaccharides with uniform purity were obtained. The experiments of anti-oxidant activity of polysaccharides from *D. esculenta* showed that the DPPH radical scavenging capacity of polysaccharide from *D. esculenta* was weak. The polysaccharide from *D. esculenta* and scavenging rate of 1–5 mg/mL was maintained at about 10%, and with the increase of polysaccharide concentration, the scavenging capacity gradually decreased. The hydroxyl radi-

收稿日期 2023-03-20; 修回日期 2023-05-12

基金项目 农业部物种资源保护财政专项(热带作物)(No. 151821301354051702); 上海市农作物种质资源共享服务平台(No. 18DZ2293700); 海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(No. 2019RC116)。

作者简介 黎善铭(1996—), 男, 硕士, 研究方向: 薯蓣属热带资源保护及利用。*通信作者(Corresponding author): 吴文婧(WU Wenqiang), E-mail: 990818@hainanu.edu.cn。

cal activity increased with the increase of polysaccharide concentration, and the scavenging rate reached 34.74% at 5 mg/mL. The superoxide anion free radical activity decreased gradually with the increase of polysaccharide concentration, and the scavenging rate reached 67.35% at 1 mg/mL. The reduction capacity of polysaccharides was weak, and the reduction capacity of 1–5 mg/mL remained 0.17. In this study, the extraction process of polysaccharides from *D. esculenta* was optimized, and it had certain antioxidant activity. It would lay the foundation for the functional product development and the mechanism research of drug function of *D. esculenta*.

Keywords: *Dioscorea esculenta*; polysaccharides; hot water extraction; process optimization; anti-oxidant activity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.09.018

毛薯 (*Dioscorea esculenta*) 又名甜薯、甘薯、小山药、蔓眉 (黎语) 等, 为薯蓣科薯蓣属藤本植物。毛薯营养价值丰富, 口感粉香微甜, 具有健脾止泻, 益肺滋肾, 解毒敛疮的功效^[1]。毛薯抗旱耐肥、少病虫害且长势强, 是很好的耐旱作物^[2], 其全生育期很少施用农药, 是健康的绿色食品, 主要种植在海南、广东南部和广西南部, 不耐低温。

研究发现, 多种植物多糖具有清除自由基、增强抗氧化酶活性、抑制脂质过氧化、保护生物膜、延缓衰老的作用^[3]。植物多糖还具有降血糖、免疫调节和抗肿瘤等生物活性^[4-6]。毛薯富含植物多糖, 且具有一定的药用价值。国外研究表明, 毛薯具有抗氧化活性, 调节胃肠道功能。其乙醇提取物具有一定的生物活性, 和阿霉素联合使用能对抗乳腺癌细胞的发育周期^[7]。长期食用毛薯能诱导肌肉性类固醇激素水平的增加, 从而有助于降低 2 型糖尿病的胰岛素抵抗^[8]。

植物多糖提取的方法有热水提取法、超声波提法、酶水解法、醇沉法、微波提取和碱提法等^[9-10]。不同提取方法获得的多糖提取率有差异, 各有优缺点。何娇等^[11]采用 3,5-二硝基水杨酸测定了毛薯干粉总还原糖含量, 高达 71.08%。黎丹等^[12]收集了 80 份毛薯种质, 采用醇沉法提取毛薯 Ds96 粗多糖, 其提取率为 12.34%, 研究还表明毛薯营养品质不低于河南铁棍山药。热水提取法提取成分完全, 有利于后续从活性物质中精制多糖^[13]。

目前, 国内外尚未见对毛薯药用成分的研究分析, 也未见对毛薯多糖开展药用价值的研究报道。为了研究毛薯多糖的功能以及进一步开发利用, 迫切需要优化毛薯多糖提取工艺并获得较好活性的精制多糖。本研究拟采用热水提取法提取毛薯多糖, 以温度、料液比、提取时间为影响因素, 优化毛薯多糖提取的最佳工艺。经过进一步

分离纯化后, 采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 法、羟自由基法、超氧阴离子法和还原法检测毛薯多糖抗氧化还原活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 毛薯 Ds96 (广西博白) 来自海南大学薯蓣种质资源圃, 铁棍山药来自河南焦作。

5% 苯酚水溶液, 购自雷根生物试剂有限公司; 浓硫酸, 购自广州化学试剂厂; 标准葡萄糖、Vc 溶液, 购自上海源叶生物科技有限公司; DPPH, 购自麦克林有限公司; 二乙氨基乙基纤维素 52 (DEAE-52 纤维素)、葡聚糖凝胶 G-100 (Sephadex G-100 葡聚糖), 购自西宝生物科技有限公司; 水杨酸、铁氰化钾、邻苯三酚、三氯乙酸等, 均购自西陇化工有限公司。

1.1.2 仪器与设备 PL403 电子天平, 购自梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; UV-1899PC 紫外可见分光光度计, 购自翱艺仪器 (上海) 有限公司; DHG-9013A 鼓风干燥箱, 购自上海恒一科学仪器有限公司; HWS-26 电热恒温水浴锅, 购自上海恒一科学仪器有限公司; LC-RE-52AA 旋转蒸发仪, 购自 EYELA 公司; SCIENTZ-12N 冷冻干燥机, 购自宁波新芝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖标准曲线绘制 准确称取 105 °C 烘干至恒重的标准葡萄糖 25 mg 定容于 250 mL 容量瓶中, 配制成 1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。分别吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 的标准葡萄糖溶液于洁净试管中, 用水补足至 1 mL, 加入 5% 苯酚水溶液 1 mL 及浓硫酸 5 mL, 震荡均匀, 静置 25 min, 于 490 nm 处检测吸光度值, 以蒸馏水为空白对照, 以葡萄糖浓

度为横坐标(x),以吸光度值为纵坐标(y),绘制葡萄糖标准曲线,计算回归方程。

1.2.2 实验材料处理 将资源圃中采挖的新鲜毛薯和山药块茎洗净后削皮,切成2 mm左右的薄片。于105 °C高温杀青20 min,抑制酶促氧化,于60 °C条件下烘干至恒重,粉碎机粉碎成粉末,过100目筛,干燥密封保存。

1.2.3 毛薯多糖热水提取法单因素实验 称取干燥至恒重的毛薯块茎粉末100~500 mg,溶于5 mL的蒸馏水中,在一定温度的水浴中浸提,取出后以5000 r/min离心15 min,取20 μ L上清液稀释至5 mL,取1 mL进行多糖含量测定。对温度、料液比、提取时间进行单因素实验,实验重复3次。温度设置的处理水平为40、50、60、70、80 °C;料液比设置的处理水平为1:10、1:15、1:20、1:25、1:30;提取时间设置的处理水平为1、2、3、4、5 h。

1.2.4 毛薯多糖提取正交实验设计 在单因素研究的基础上进行正交实验设计,以提取温度(A)、料液比(B)、提取时间(C)为影响因素,以毛薯多糖吸光度值为评价指标,设计三因素三水平 $L_9(3^3)$ 正交实验表,确定毛薯多糖的最佳提取工艺。根据毛薯多糖正交优化实验结果,再进行3次平行实验,以验证最佳工艺的提取条件。

1.2.5 毛薯粗多糖的分离纯化 (1) Sevag法脱蛋白。取一定量的粗多糖溶液,向其中加入1/5体积的正丁醇-氯仿混合液(其体积比为1:4),磁力搅拌器高速搅拌30 min后,以8000 r/min离心20 min,取上清,避免吸取中间蛋白层,重复2次。

(2) 透析。毛薯多糖经Sevag法脱蛋白后,须旋蒸去除氯仿,将脱蛋白后的毛薯多糖溶液倒入透析袋中,倒入2/3的位置后将透析袋的另一端用夹子夹住,将透析袋放入装有蒸馏水的容器中,水要没过整个透析袋。多糖溶液于蒸馏水中透析72 h,中间隔断换水,以除去单糖、低聚糖和盐等小分子杂质。

(3) DEAE-52 纤维素柱层析(4.5 cm \times 65 cm)。将经过脱蛋白、透析后的毛薯多糖溶液浓缩至20 mL,上DEAE-52纤维素柱进行分级纯化,先以20 mL蒸馏水洗脱,然后以0.1~0.5 mol/L NaCl溶液进行线性洗脱,流速为2 mL/min,每2 min收集1管,于490 nm处以苯酚-硫酸法测定吸光度,绘制洗脱曲线,横坐标(x)为接收管数,纵坐标(y)为吸光度。

(4) SephadexG-100 凝胶柱层析(4.5 cm \times 65 cm)。经DEAE-52纤维素柱纯化后的毛薯多糖溶液浓缩至50 mL。加20 mL毛薯多糖浓缩液到预先用0.1 mol/L NaCl溶液平衡的Sephadex G-100凝胶柱上,用0.1 mol/L NaCl溶液进行洗脱,流速为1 mL/min,每5 min收集1管。在490 nm处以苯酚-硫酸法测定吸光度,绘制洗脱曲线,横坐标(x)为接收管数,纵坐标(y)为吸光度。

(5) 紫外吸收光谱法。将凝胶柱层析后的毛薯多糖溶液的浓度调整为1 mg/mL后,于200~600 nm范围内进行全波长扫描,观察在260、280 nm波长附近是否有特征吸收峰。

1.2.6 毛薯多糖抗氧化还原活性研究 以Vc溶液作为阳性对照,以山药全粉多糖作为阴性对照,测定毛薯精多糖、毛薯表皮多糖、毛薯全粉多糖的DPPH自由基清除能力、羟自由基(\cdot OH)清除作用、超氧阴离子(\cdot O $^{2-}$)的清除作用和还原能力并进行比较。

(1) DPPH自由基清除能力测定。准确称取4 mg DPPH,用无水乙醇溶解定容到100 mL的棕色容量瓶中,制得0.1 mmol/L DPPH自由基溶液。移取浓度分别为1、2、3、4、5 mg/mL毛薯精多糖、山药全粉多糖、毛薯表皮多糖、毛薯全粉多糖、Vc溶液2~10 mL的离心管中,并分别加2 mL DPPH溶液,混匀30 min后于517 nm测定吸光度值 A_i ;用无水乙醇代替DPPH自由基溶液测定吸光度值 A_j ,空白对照用无水乙醇代替样品溶液测定吸光度值 A_0 ,以上各离心管均做3组平行试验。按下述公式计算多糖对DPPH自由基的清除率:

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

(2) 羟自由基(\cdot OH)清除作用。分别配置不同浓度的毛薯精多糖、山药全粉多糖、毛薯表皮多糖、毛薯全粉多糖、Vc溶液,加入2 mL浓度分别为1、2、3、4、5 mg/mL的样品溶液,然后分别加入2 mL的FeSO $_4$ (9 mmol/L)和H $_2$ O $_2$ 溶液(9 mmol/L)混匀后静置10 min,再加入2 mL的水杨酸(9 mmol/L)混匀,静置30 min于510 nm测定吸光度值 A_i 。用蒸馏水代替水杨酸测定吸光度值 A_j ,空白对照用蒸馏水代替样品溶液测定吸光度值 A_0 ,按下述公式计算多糖溶液对羟自由基的清除率:

$$\text{羟自由基清除率}=1-[(A_i-A_j)/A_0]\times 100\%$$

(3) 超氧阴离子(\cdot O $^{2-}$)的清除作用。分别配置不同浓度的毛薯精多糖、山药全粉多糖、毛

薯表皮多糖、毛薯全粉多糖、Vc 溶液,加入 2 mL 浓度为 1、2、3、4、5 mg/mL 的样品溶液于 10 mL 离心管中,再分别加入 4.5 mL 的 Tris-HCl 缓冲液(1 mol/L, pH 8.2),于 50 °C 水浴 30 min,加入 1 mL 邻苯三酚(2 mmol/L)反应 10 min,于 325 nm 处测定吸光度值 A_i ,用蒸馏水代替邻苯三酚测定吸光度值 A_j ,空白对照用蒸馏水代替样品溶液测定吸光度值 A_0 ,按下述公式计算多糖溶液对超氧阴离子的清除率:

$$\text{超氧阴离子清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

(4) 还原能力测定。分别配置不同浓度的毛薯精多糖、山药全粉多糖、毛薯表皮多糖、毛薯全粉多糖、Vc 溶液,移取浓度分别为 1、2、3、4、5 mg/mL 1 mL 的样品溶液分别置于 10 mL 离心管中,依次加入 2.5 mL 的磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 7.4)、2.5 mL 铁氰化钾(1% wt),摇匀后置于 50 °C 水浴中 30 min,流水冷却,再加入 2.5 mL 的三氯乙酸溶液(10% wt)摇匀,5000 r/min 离心 10 min。移取 2.5 mL 上清液于另一 10 mL 离心管中,依次加入 2.5 mL 去离子水、0.5 mL 三氯化铁溶液(0.1% wt)摇匀,静置 10 min 于 700 nm 处测定样品的吸光度值。吸光度值越高,表明其还原能力越强。

1.2.7 多糖提取率计算方法 参照高英春^[14]的计算方法。

$$\text{多糖提取率} = \frac{f \times C \times V \times D}{W \times 1000} \times 100\%$$

式中, f : 换算因子 0.9; C : 测得样品的葡萄糖浓度(mg/mL); V : 测定液总量(mL); D : 稀释倍数; W : 样品质量(g)。

1.3 数据处理

运用 SPSS 20.0 软件进行差异显著性分析,正交实验采用方差分析,组内比较采用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

以葡萄糖浓度(mg/mL)为 x 轴,以吸光度值为 y 轴,建立葡萄糖标准曲线,得到回归方程 $y = 0.9746x + 0.0065$, $R^2 = 0.9996$,在葡萄糖浓度 0~1 mg/mL 范围内,线性关系良好。

2.2 毛薯多糖热水提取法的实验结果

2.2.1 单因素实验 控制其他条件不变的前提下,分别对温度、料液比和提取时间进行热水提取法单因素实验。由图 1 可知,当温度在 40~70 °C

区间时,随着温度的升高,多糖提取率逐渐升高,当温度达到 70 °C 时,多糖提取率最高,为 1.29%;当温度达到 80 °C 时,多糖提取率骤然降低,毛薯粉发生热凝固,无法成为混悬液,多糖无法析出。当料液比在 1:10~1:30 区间时,1:10 处理获得的多糖提取率最高,为 2.38%;随着料液比的增加,多糖提取率逐渐降低。当时间在 1~5 h 区间时,2 h 处理获得的多糖提取率最高,为 3.29%。

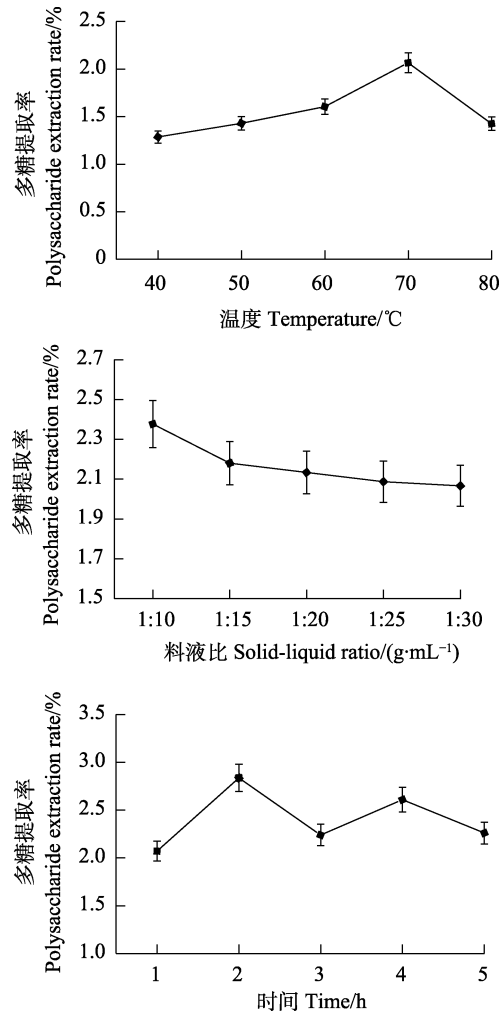


图 1 热水提取法不同因素对毛薯多糖提取率的影响
Fig. 1 Effect of different factors of hot water extraction on the extraction rate of polysaccharides from *D. esculenta*

2.2.2 正交实验 根据毛薯多糖热水提取法单因素实验结果,设置了三因素三水平 $L_9(3^3)$ 正交实验的处理,其具体设计方案见表 1。由表 2 可知,毛薯多糖的提取率最高达 1.94%,最佳提取工艺条件为 $A_3B_2C_3$,即温度为 70 °C,料液比为 1:15,时间为 3 h。在极差分析中,温度、料液比和时间的 R 值分别为 0.52、0.07、0.20,温度的 R 值最大,影响毛薯多糖提取的因素依次为温度>时间>

料液比。方差分析结果表明，温度对热水提取毛薯多糖的影响差异显著 ($P < 0.05$)，料液比和时间的的影响均未达到差异显著性水平 ($P > 0.05$)。

表 1 热水提取法正交实验因素水平

Tab. 1 Factor and level of orthogonal test of hot water extraction

水平 Level	因素 Factor		
	温度 A Temperature A/°C	料液比 B Solid-liquid ratio B/(g·mL ⁻¹)	时间 C Time C/h
1	50	1 : 10	1
2	60	1 : 15	2
3	70	1 : 20	3

表 2 热水提取法正交实验结果表

Tab. 2 Result of orthogonal test of hot water extraction

编号 No.	温度 A Temperature A/°C	料液比 B Solid-liquid ratio B/(g·mL ⁻¹)	时间 C Time C/h	多糖提取率 Polysaccharide extraction rate/%
1	1	1	1	1.33
2	1	2	2	1.27
3	1	3	3	1.49
4	2	1	3	1.79
5	2	2	1	1.52
6	2	3	2	1.51
7	3	1	2	1.83
8	3	2	3	1.94
9	3	3	1	1.89
K ₁	1.36	1.65	1.58	
K ₂	1.61	1.58	1.54	
K ₃	1.88	1.63	1.74	
R	0.52	0.07	0.20	
P	0.012	0.365	0.067	

2.2.3 毛薯多糖提取工艺验证 对毛薯多糖优化工艺进行验证，3 次平行实验多糖提取率分别为 1.97%、1.91%、1.93%，平均值为 1.94%，相对标准偏差为 1.60%，所建立的毛薯多糖优化提取工艺稳定可行。

2.3 毛薯粗多糖的分离纯化

2.3.1 DEAE-52 纤维素柱层析 通过 DEAE-52 纤维素柱，经苯酚-硫酸法检测得到 1 个峰形明显的洗脱峰，并无其他峰，表明毛薯多糖是一种中性多糖 (图 2)。收集 30~60 管的毛薯多糖洗脱液，采用旋转蒸发器浓缩，通过冷冻干燥器进行冻干，获得纯化的毛薯多糖，可用于后续实验。

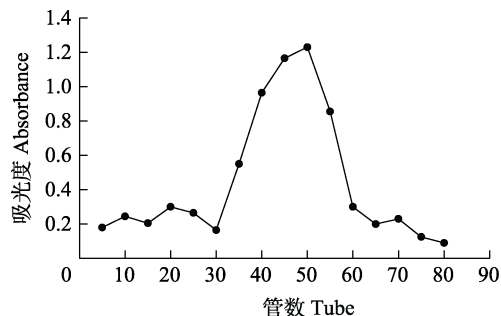


图 2 毛薯多糖 DEAE-52 纤维素柱色谱分析洗脱曲线
Fig. 2 Elution curve of DEAE-52 cellulose column chromatography analysis of polysaccharide from *D. esculenta*

2.3.2 SephadexG-100 葡聚糖凝胶柱层析 通过 SephadexG-100 葡聚糖凝胶柱层析柱，经苯酚-硫酸法检测得到 1 个均一的洗脱峰，且峰形基本对称，表明纯化后获得的毛薯多糖纯度均一 (图 3)。收集 38~70 管的毛薯多糖洗脱液，采用旋转蒸发器浓缩，通过冷冻干燥器进行冻干，获得毛薯精多糖。

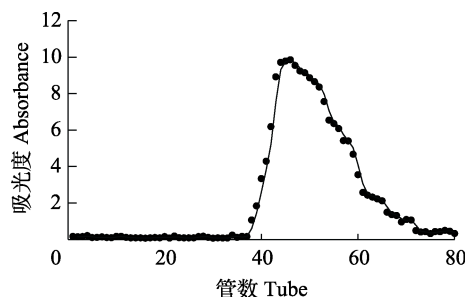


图 3 毛薯多糖 SephadexG-100 葡聚糖凝胶柱色谱分析洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of SephadexG-100 gel column chromatography analysis of polysaccharide from *D. esculenta*

2.3.3 紫外全波长扫描 1 mg/mL 的毛薯精多糖溶液在 180~600 nm 紫外扫描显示为末端吸收，在 260 nm 和 280 nm 处无明显的紫外吸收，曲线平滑，表明毛薯精多糖中无蛋白、核酸及多肽等杂质 (图 4)。

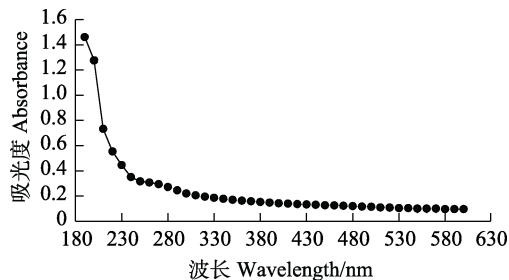


图 4 毛薯多糖紫外全波长吸收光谱

Fig. 4 UV full-wavelength absorption spectrum of polysaccharides from *D. esculenta*

2.4 毛薯多糖抗氧化还原活性结果

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 由图 5 可知, Vc 浓度为 1~5 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率基本维持在 90% 以上, 山药全粉多糖清除率为 30%~50%, 且有浓度梯度效应。毛薯表皮多糖的清除能力强于山药全粉多糖、毛薯全粉多糖和毛薯精多糖, 清除率为 40%~70%。而毛薯全粉多糖和毛薯精多糖的清除能力较弱, 清除率在 10% 左右。毛薯精多糖清除率最高为 15.33%, 清除率随浓度的升高逐渐下降。毛薯表皮多糖的 DPPH 清除能力高于山药全粉多糖、毛薯全粉多糖和毛薯精多糖。

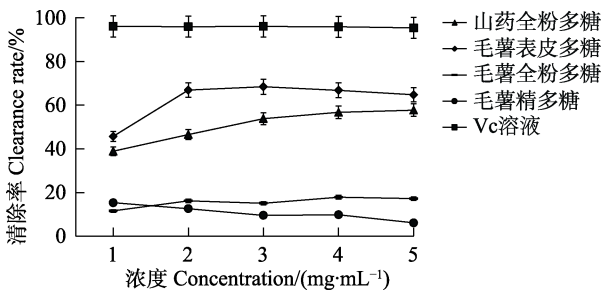


图 5 DPPH 自由基清除能力

Fig. 5 DPPH free radical scavenging capacity diagram

2.4.2 羟自由基清除能力 由图 6 可知, Vc 浓度为 1~5 mg/mL 时, 清除能力随着浓度的升高而升高, 清除率最高可达到 99.01%。山药全粉多糖、毛薯表皮多糖、毛薯全粉多糖和毛薯精多糖均具有浓度梯度效应, 在浓度为 5 mg/mL 时, 清除率均最高, 分别为 48.08%、44.66%、33.06%和 34.74%。毛薯表皮多糖和山药全粉多糖的羟自由基的清除能力高于毛薯全粉多糖和毛薯精多糖。

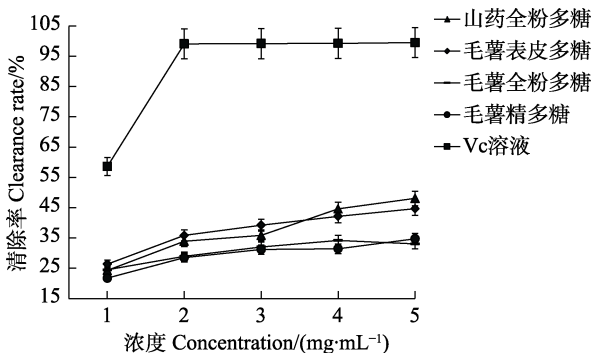


图 6 羟自由基清除能力

Fig. 6 Hydroxyl radical scavenging capacity diagram

2.4.3 超氧阴离子自由基清除能力 由图 7 可知, Vc 的超氧阴离子清除能力较高, 清除率基本

维持在 80% 以上。毛薯精多糖在 1 mg/mL 时, 清除率为 67.35%。山药全粉多糖、毛薯表皮多糖、毛薯全粉多糖和毛薯精多糖的清除能力随着多糖浓度的升高而逐渐降低, 山药全粉多糖在 5 mg/mL 时, 清除率低至 4.12%。毛薯表皮多糖的清除能力降低速率仅次于山药全粉多糖, 在 5 mg/mL 时, 清除率为 18.97%, 而毛薯全粉多糖和毛薯精多糖的清除能力降低速率较缓, 在 5 mg/mL 时, 清除率分别为 57.20%和 48.53%。毛薯全粉多糖的超氧阴离子清除能力高于毛薯精多糖、毛薯表皮多糖和山药全粉多糖。

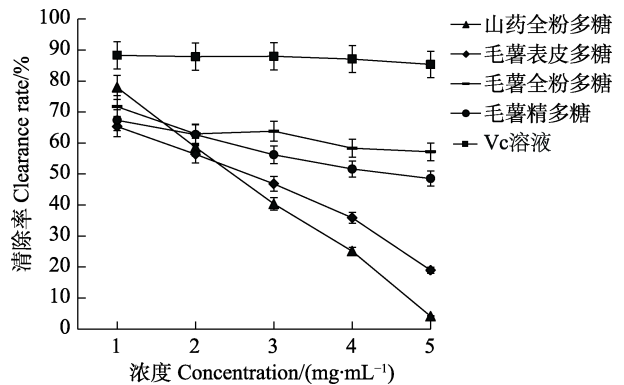


图 7 超氧阴离子清除能力

Fig. 7 Superoxide anion scavenging capacity diagram

2.4.4 还原能力 由图 8 可知, Vc 浓度为 1~5 mg/mL 时, 还原力基本维持在 2.5 以上。在浓度为 1~5 mg/mL 时, 山药全粉多糖和毛薯表皮多糖的还原能力随着多糖浓度的升高而增强, 具有梯度浓度效应, 在 5 mg/mL 时还原力分别为 0.98 和 0.77。而毛薯全粉多糖和毛薯精多糖的还原能力较弱, 还原力为 0.1~0.2; 毛薯精多糖浓度为 1~5 mg/mL 时, 还原能力最高为 0.17。山药全粉多糖的还原能力高于毛薯表皮多糖、毛薯全粉多糖和毛薯精多糖。

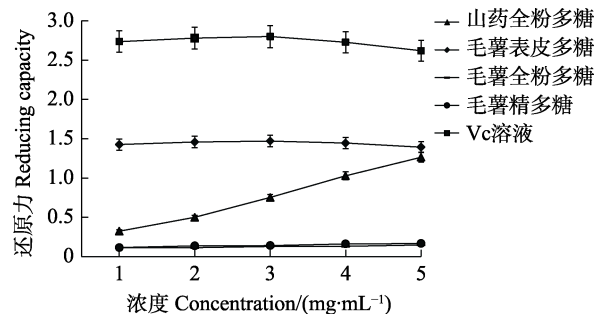


图 8 不同浓度多糖还原能力

Fig. 8 Reducing capacity diagram of different concentrations of polysaccharide

3 讨论

3.1 毛薯多糖的提取工艺优化

本研究采用热水提取法对毛薯多糖提取工艺进行优化。根据单因素和正交实验的结果表明,热水提取法提取毛薯多糖的提取率最高为1.94%,其最佳工艺条件为:温度70℃,料液比1:15,提取时间3h。目前尚未见毛薯多糖提取工艺优化的报道,黎丹等^[12]采用醇沉法获得的毛薯粗多糖提取率高达12.34%,表明毛薯中不少种质多糖的含量不低于铁棍山药。在薯蓣科薯蓣属近缘物种多糖提取的研究中,孙峰^[15]采用热水提取法在料液比1:9、温度50℃、提取时间2.5h和75%乙醇沉淀的处理时,鲜山药多糖的提取率为0.2449%。王珊珊^[16]采用水提醇沉法提取铁棍山药多糖,在料液比1:9、温度71℃、提取时间2.3h和pH为7.16时,其多糖提取率为9.57%。邓寒霜^[17]采用热水提取法提取穿山龙薯蓣多糖,在料液比1:25、温度95℃和提取时间106min的处理时,其多糖提取率为2.115%。温度过高、过碱会影响多糖的抗氧化活性^[18]。智文莉^[19]采用超声-微波法在料液比1:10、提取时间360s和功率380W时,铁棍山药多糖提取率仅为1.39%。可见,不同的提取方法获得的提取率不同,醇沉法的提取率普遍高于热水提取法,这与醇沉法多次离心收集有关。与薯蓣属其他近缘物种相比,经本研究条件优化后获得的毛薯多糖提取率较好,可用于后续开发。

3.2 毛薯多糖的抗氧化活性

通过对经分离纯化得到的纯度均一中性多糖的毛薯多糖进一步研究发现,毛薯精多糖DPPH法、羟自由基法、超氧阴离子法和还原法的抗氧化活性分别为15.33%、34.74%、67.35%和0.17。毛薯多糖抗氧化活性尚未见报道,有学者对薯蓣属其他物种开展了多糖的氧化还原功能研究。陈树俊等^[20]比较不同浓度的佛手山药中性多糖的抗氧化活性中发现,在浓度为2.0mg/mL时,其DPPH自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的清除率分别为35.6%、38.3%和31.9%。毛薯精多糖的超氧阴离子清除率优于佛手山药多糖。单承莺等^[21]采用毛胶薯蓣(*D. subcalva*)多糖检测双氧水、超氧阴离子自由基、羟基自由基的清除活力,结果表明毛胶薯蓣具有体外抗氧化活性,抗氧化活性大小和浓度与毛薯多糖的羟自由基和

超氧阴离子具有量效关系。王珊珊^[16]提取铁棍山药多糖进行抗氧化活性检测,结果表明以常用抗氧化剂VE为阳性对照,在300μg/mL时,其DPPH、羟自由基和超氧阴离子的清除率分别为81%、88%和68%。而本研究提取的铁棍山药全粉多糖的最高清除率分别为57.75%、48.08%和77.96%,其抗氧化活性的差异可能是由于提取条件中pH的不同而导致,也可能是多糖的单糖组成有差异。本研究结果表明铁棍山药全粉水提多糖抗氧化还原活性数值均优于经过分离纯化后的毛薯精多糖。

毛薯精多糖和毛薯全粉多糖的抗氧化还原活性基本一致,而毛薯表皮多糖的抗氧化还原活性除了羟自由基清除活性外,均比毛薯精多糖清除率高,可能是毛薯表皮提取物未纯化彻底,表皮中可能含有单宁、植酸和其他一些抗氧化活性物质^[22]。毛薯精多糖在多次除杂和纯化后可能丢失了某些活性物质,或者毛薯的抗氧化还原活性物质存在于表皮中,有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] 何娇,黄广民.毛薯粉浆酶法水解的响应面法优化及其动力学研究[J].食品科学,2012,33(16):77-83.
HE J, HUANG G M. Optimization and kinetics of enzymatic hydrolysis of *Dioscorea esculenta* (Lour) burkill tubers[J]. Food Science, 2012, 33(16): 77-83. (in Chinese)
- [2] 王菲能,汪飞杰,王天云.海南岛大薯毛薯等资源考察初报[J].作物品种资源,1991(2):8.
WANG F N, WANG F J, WANG T Y. Preliminary report on the investigation of resources such as sweet potato and crude potato in Hainan Island[J]. China Seed Industry, 1991(2): 8. (in Chinese)
- [3] 赵芷芊,王敏,张志清.植物多糖的提取及抗氧化功效的研究进展[J].食品工业科技,2018,39(13):337-342.
ZHAO Z Q, WANG M, ZHANG Z Q. Research progress of antioxidation efficacy and extraction of plant polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(13): 337-342. (in Chinese)
- [4] 刘苏伟,张骆琪,高素霞,文艺,鲁传涛,刘红彦.不同品种山药多糖含量及体外抗氧化活性研究[J].中华中医药杂志,2019,34(12):5938-5941.
LIU S W, ZHANG L Q, GAO S X, WEN Y, LU C T, LIU H Y. Study on polysaccharide content and antioxidant activity *in vitro* of different varieties of *Dioscoreae rhizoma*[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(12): 5938-5941. (in Chinese)
- [5] 段伟萍,李新蕊,司明东,李可昕,温子帅,马东来.山药

- 多糖提取工艺的响应面法优化及其功能活性分析[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(7): 118-123.
- DUAN W P, LI X R, SI M D, LI K X, WEN Z S, MA D L. Optimization of extraction technology for Chinese yam polysaccharides by response surface method and its hypoglycemic and antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2020, 41(7): 118-123. (in Chinese)
- [6] 石亿心, 于莲, 翟美芳, 苏瑾, 孙维彤, 李守君, 马淑霞. 纳米山药多糖对 4 种肿瘤细胞的作用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(8): 967-971.
- SHI Y X, YU L, ZHAI M F, SU J, SUN W T, LI S J, MA S X. Effect of nano Chinese yam polysaccharide on 4 kinds of tumor cells[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2016, 33(8): 967-971. (in Chinese)
- [7] SOETOKO D F, SUMARNO. Anticancer effect and cell cycle analysis of ethanolic extract of gembili (*Dioscorea esculantaa* L. burkill) on T47D breast cancer cell line[C]. Surakarta: Muhammadiyah University Press, 2012, 22: 7-11.
- [8] SATO K, FUJITA S, IEMITSU M. *Dioscorea esculenta*-induced increase in muscle sex steroid hormones is associated with enhanced insulin sensitivity in a type 2 diabetes rat model[J]. The FASEB Journal, 2017, 31(2): 793-801.
- [9] ZHAO C C, LI X A, MIAO J, JING S S, LI X J, HUANG L Q, GAO W Y. The effect of different extraction techniques on property and bioactivity of polysaccharides from *Dioscorea hemsleyi*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102: 847-856.
- [10] 崔守富, 邵家威, 郝征红, 王春云, 赵德川, 岳凤丽. 超声波-微波联合提取绿芦笋中水溶性粗多糖的工艺优化[J]. 食品工业, 2020, 41(5): 72-76.
- CUI S F, SHAO J W, HAO Z H, WANG C Y, ZHAO D C, YUE F L. Process optimization of ultrasonic-microwave combined extraction of water-soluble crude polysaccharides from green *Asparagus*[J]. The Food Industry, 2020, 41(5): 72-76. (in Chinese)
- [11] 何娇, 黄广民. 海南毛薯干粉中总还原糖含量的测定[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012, 30(5): 56-61.
- HE J, HUANG G M. Determination of total reducing saccharide in Hainan *Dioscorea esculenta* (Lour.) brukill[J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2012, 30(5): 56-61. (in Chinese)
- [12] 黎丹, 吴文婧, 黄东益, 谢俊, 赵景梅, 黄小龙, 许云. 毛薯的营养成分分析和聚类分析[J]. 热带作物学报, 2018, 39(3): 575-580.
- LI D, WU W Q, HUANG D Y, XIE J, ZHAO J M, HUANG X L, XU Y. Nutrition composition and clustering analysis of *Dioscorea esculenta* (Lour) brukill[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(3): 575-580. (in Chinese)
- [13] CHEN Z Y, YIN C M, FAN X Z, MA K, YAO F, ZHOU R R, SHI D F, CHENG W, GAO H. Characterization of physicochemical and biological properties of *Schizophyllum commune* polysaccharide extracted with different methods[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 156: 1425-1434.
- [14] 高英春. 山药多糖的提取分离及活性初步研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2009.
- GAO Y C. Extraction, separation and preliminary study on activity of yam polysaccharide[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2009. (in Chinese)
- [15] 孙锋. 鲜山药的生物活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- SUN F. Study on biological activity of fresh yam[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2005. (in Chinese)
- [16] 王珊珊. 铁棍山药多糖的提取、纯化及体外抗氧化活性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- WANG S S. Extraction, purification and antioxidant activity of polysaccharide from *Dioscorea opposita* thunb[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [17] 邓寒霜. 穿山龙多糖提取、纯化工艺及其体外抗氧化活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2015.
- DENG H S. Study on extraction and purification of polysaccharide from *Dioscorea nipponica* makino and its antioxidant activity *in vitro*[D]. Xi'an: Northwest University, 2015. (in Chinese)
- [18] 陈建双, 李佳欣, 杨洋, 杨雪. 山药水提物提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(6): 155-159.
- CHEN J S, LI J X, YANG Y, YANG X. Optimization of water extract process from yam and its antioxidant activity analysis[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(6): 155-159. (in Chinese)
- [19] 智文莉. 铁棍山药多糖的提取、分离、纯化及抗氧化活性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2017.
- ZHI W L. Study on extraction, separation, purification and antioxidant activity of polysaccharide from *Dioscorea opposita* thunb[D]. Zhengzhou: He'nan University of Technology, 2017. (in Chinese)
- [20] 陈树俊, 李佳益, 王翠连, 张君梅, 李乐, 石玥. 黄梨渣多糖的提取、分离纯化和结构鉴定[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 278-286.
- CHEN S J, LI J Y, WANG C L, ZHANG J M, LI L, SHI Y. Extraction, purification and structural characterization of polysaccharides from pear pomace[J]. Food Science, 2018, 39(20): 278-286. (in Chinese)
- [21] 单承莺, 任红荣, 何海玲, 张卫明. 毛胶薯蕷多糖的体外抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(12): 86-89.
- SHAN C Y, REN H R, HE H L, ZHANG W M. Study on antioxidant effective of polysaccharides from *dioscorea subcalva* prain et Burk[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(12): 86-89. (in Chinese)
- [22] POLYCARP D, AFOAKWA E, BUDU A, OTOO E. Characterization of chemical composition and anti-nutritional factors in seven species within the Ghanaian yam (*Dioscorea*) germplasm[J]. International Food Research Journal, 2012, 19: 985-992.