

DOI: 10.3969/j.issn.1671-024x.2024.02.010

## 银耳多糖的纯化及其生物活性

侯彦辉<sup>1,2</sup>, 李喜阁<sup>1,2</sup>, 张凤仪<sup>1,2</sup>, 姜朝鲜<sup>1,2</sup>, 张佳玮<sup>1,2</sup>

(1. 天津工业大学 材料科学与工程学院, 天津 300387; 2. 天津工业大学 省部共建分离膜与膜过程国家重点实验室, 天津 300387)

**摘要:** 为了得到纯度更高的银耳多糖(TFPS), 采用 AB-8 大孔树脂吸附法、酶法、三氯乙酸(TCA)法、D-葡萄糖 $\delta$ -内脂(GDL)法和聚酰胺法对粗制银耳多糖(CTFPS)进行纯化即脱蛋白处理。以多糖损失率和蛋白质脱除率为依据选取脱蛋白效果最佳的方法, 并通过单因素实验优化银耳多糖脱蛋白工艺条件。利用红外和 SEM 对脱蛋白前后的银耳多糖进行结构分析, 并结合抗氧化活性和吸湿保湿性能测试, 对脱蛋白前后的银耳多糖进行生物活性对比。结果表明: AB-8 大孔树脂吸附法的脱蛋白效果最佳, 最优工艺条件为 CTFPS 水溶液质量浓度 5 mg/mL、AB-8 大孔树脂用量 100 mg/mL、吸附时间 5 h、吸附温度 20 °C; 在此条件下, 蛋白质脱除率为 82.47%, 多糖损失率为 18.24%, 且银耳多糖脱蛋白纯化后的抗氧化活性和吸湿保湿性能均优于未脱蛋白银耳多糖。

**关键词:** 银耳多糖(TFPS); 脱蛋白; 结构分析; 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1511-024X(2024)02-0060-08

### Purification and biological activity of *Tremella fuciformis* polysaccharides

HOU Yanhui<sup>1,2</sup>, LI Xige<sup>1,2</sup>, ZHANG Fengyi<sup>1,2</sup>, JIANG Chaoxian<sup>1,2</sup>, ZHANG Jiawei<sup>1,2</sup>

(1. School of Material Science and Engineering, Tiangong University, Tianjin 300387, China; 2. State Key Laboratory of Separation Membranes and Membrane Processes, Tiangong University, Tianjin 300387, China)

**Abstract:** In order to obtain a purer *Tremella fuciformis* polysaccharide (TFPS), the crude *Tremella fuciformis* polysaccharide (CTFPS) is purified with AB-8 macroporous resin method, enzymatic method, trichloroacetic acid (TCA) method, and glucono- $\delta$ -lactone (GDL) method, respectively. Based on the loss rate of polysaccharide and removal rate of protein, the method with the best deproteinization effect was selected from five different deproteinization methods, and the process conditions for deproteinization of TFPS were optimized through single factor experiments. The structure of TFPS before and after deproteinization was analyzed using IR and SEM. Meanwhile, the bioactivity of TFPS before and after deproteinization was compared through the antioxidant activity and moisture absorption and moisturizing property tests. The results showed that adsorption method with AB-8 macroporous resin was the best for protein removal, and the optimal process conditions were aqueous concentration of CTFPS of 5 mg/mL, dosage of AB-8 macroporous resin of 100 mg/mL, adsorption time of 5 h, and adsorption temperature of 20 °C. Under these conditions, the removal rate of protein was 82.47% and the loss rate of polysaccharide was 18.24%. Moreover, the antioxidant activity, moisture-absorbing and moisturizing properties of TFPS after deproteinization were stronger than those without deproteinization.

**Key words:** *Tremella fuciformis* polysaccharide(TFPS); deproteinization; structural analysis; antioxidant activity

银耳是担子菌门真菌的子实体, 既是一种具有经济价值的食用菌, 又是中医学中久负盛名的良药<sup>[1]</sup>。银耳子实体中的主要活性成分是银耳多糖 (*Tremella fuciformis* polysaccharide, TFPS)<sup>[2-3]</sup>。相关研究表明, 银

耳多糖具有抗肿瘤、抗氧化、保湿、降血脂和抗炎抑菌等功能, 可应用在药品、化妆品和食品等多个领域<sup>[4-8]</sup>。常用的 TFPS 提取方法是水提醇沉法<sup>[9]</sup>。

水提醇沉法制得的粗制银耳多糖 (CTFPS) 中含

收稿日期: 2022-12-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51873223)

通信作者: 侯彦辉(1977—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为植物提取、烃催化聚合和有机光电功能材料。E-mail: houyh1977@163.com

有很多的杂质,包括色素、蛋白质和少量的无机盐,而蛋白质的存在可能会影响多糖的生物活性。因此,为了得到更高纯度的银耳多糖,需要对CTFPS进行纯化处理,即脱蛋白处理。常见的蛋白质脱除方法有Sevage法、酶法、盐酸法、盐析法、聚酰胺法、大孔树脂吸附法和三氯乙酸(TCA)法等<sup>[10-11]</sup>。其中,盐酸法和TCA法蛋白质脱除的效率最高<sup>[12]</sup>,但是多糖的保留率也低;而Sevage法不适用于食品工业加工。

蛋白质脱除方法的不同会导致多糖的糖含量、得率和活性的不同。目前,大多数学者都聚焦于银耳多糖的提取优化,并对CTFPS进行抗氧化测试及药理学研究,对有关脱除蛋白前后对银耳多糖活性的研究较少。本研究对CTFPS进行不同的脱蛋白处理,以多糖损失率和蛋白质脱除率为指标找出最佳脱蛋白方法,对该方法进行工艺优化,并比较银耳多糖脱蛋白前后的抗氧化活性和吸湿保湿性能。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料与仪器

材料:银耳子实体,市售福建古田银耳;无水乙醇,山东博城化学有限公司产品;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),上海麦克林生化科技有限公司产品;苯酚,天津市永大化学试剂有限公司产品;硫酸、氢氧化钠,天津市风船化学试剂科技有限公司产品;刚果红、TCA、考马斯亮蓝G250、牛血清白蛋白、D-葡萄糖酸 $\delta$ -内酯(GDL),上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品。以上试剂均为分析纯。

仪器:HJ-3型数显恒温磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限公司产品;TU-1810型紫外-可见分光光度计(UV),上海美谱达仪器有限公司产品;Nicolet-iS50型傅里叶红外光谱仪(FI-IR),德国ThermoFisher公司产品;SU3500型扫描电子显微(SEM),日本Hitachi公司产品。

### 1.2 CTFPS提取工艺

取3g银耳子实体粉碎,过200目筛,以质量浓度1/60 g/mL,湿法均质打浆4 min,在90℃下水提7 h,之后用200目滤袋抽滤20 min,滤渣后再次水提2 h,合并两次滤液。滤液浓缩后,以4倍体积的95%(体积分数)乙醇沉淀12 h。将醇沉溶液在8000 r/min下离心3 min,去除上清液,沉淀复溶于10 mL水中,冻干12 h后得到CTFPS粉末。

### 1.3 CTFPS脱蛋白工艺

配制质量浓度5 mg/mL的CTFPS水溶液,采用不

同工艺进行蛋白质脱除。

(1) AB-8大孔树脂吸附法(AB-8吸附法)<sup>[13]</sup>。AB-8大孔树脂在使用前需要进行预处理,除去合成过程中的部分杂质和致孔剂。预处理过程为:先用乙醇浸泡6 h,抽滤后洗至无醇味,用1 mol/L的HCl溶液浸泡2 h,抽滤后用1 mol/L的NaOH溶液浸泡2 h,抽滤后用蒸馏水洗至pH中性,用蒸馏水浸泡保存至4℃冰箱中备用。将预处理后的AB-8大孔树脂进行抽滤,称取2 g湿重的大孔树脂加入20 mL CTFPS水溶液中,封口,于30℃水浴锅中静态吸附3 h,抽滤后冻干得到脱蛋白银耳多糖。探究CTFPS水溶液质量浓度、AB-8大孔树脂用量、吸附时间、吸附温度对蛋白质脱除率的影响,平行试验3组,取其平均值,以获得AB-8吸附法脱蛋白得到纯化多糖TFPS的优化工艺。

(2) 酶法<sup>[14]</sup>。取CTFPS水溶液20 mL,加入20 mg/mL木瓜蛋白酶(活力值为6万U/g),50℃水浴锅中酶解1 h后,升高温度至90℃灭酶10 min,冷却至室温。在8000 r/min下离心5 min,除去沉淀后冻干得到脱蛋白银耳多糖。

(3) TCA法<sup>[15]</sup>。取CTFPS水溶液20 mL,用质量分数为10%的TCA溶液将其pH值调至3.0,于4℃下放置12 h,抽滤除去沉淀后冻干得到脱蛋白银耳多糖。

(4) GDL法<sup>[16]</sup>。取CTFPS水溶液20 mL,加入质量分数为2%的GDL溶液,使GDL的最终质量分数达到0.5%,45℃水浴锅中反应2 h后,在8000 r/min下离心5 min,除去沉淀后冻干得到脱蛋白银耳多糖。

(5) 聚酰胺法<sup>[17]</sup>。选用60~100目的聚酰胺粉,使用前进行预处理。预处理过程为:先用乙醇浸泡6 h,抽滤后洗至无醇味,用1 mol/L的HCl溶液浸泡2 h,抽滤后用1 mol/L的NaOH溶液浸泡2 h,抽滤后用蒸馏水洗至pH中性,60℃烘箱中烘干备用。取CTFPS水溶液20 mL,加入已处理好的聚酰胺2 g,30℃水浴锅中静态吸附3 h,抽滤后冻干得到脱蛋白银耳多糖。

### 1.4 性能测定与结构表征

#### 1.4.1 不同工艺的脱蛋白效果分析

不同工艺的脱蛋白效果通过多糖损失率和蛋白质脱除率来评价。

(1) 多糖损失率的测定:银耳多糖的总糖含量按照苯酚-硫酸法进行测试<sup>[18]</sup>。以无水葡萄糖为标准品,标准曲线为: $Y=9.4952X+0.0099$ , $R^2=0.992$ ,适用范围为0~0.1 mg/mL。按照式(1)计算多糖损失率:

$$W_1 = \frac{\rho_2 - \rho_1}{\rho_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $W_1$  为多糖损失率(%);  $\rho_1$  为脱蛋白前溶液中的多糖含量;  $\rho_2$  为脱蛋白后溶液中的多糖含量。

(2) 蛋白质脱除率的测定: 银耳多糖的蛋白质含量按照考马斯亮蓝法进行测试<sup>[19]</sup>。以牛血清白蛋白为标准品, 标准曲线为:  $Y = 0.514 6X + 0.012 8, R^2 = 0.997$ , 适用范围为 0.1~0.9 mg/mL。按照式(2)计算蛋白脱除率:

$$W_2 = \frac{\rho_3 - \rho_4}{\rho_3} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $W_2$  为蛋白质脱除率(%);  $\rho_3$  为脱蛋白前溶液中的蛋白质含量;  $\rho_4$  为脱蛋白后溶液中的蛋白质含量。

#### 1.4.2 样品的结构表征

(1) FT-IR 测试<sup>[20]</sup>: 取 5 mg 多糖样品, 用 100 mg KBr 压片, 使用红外光谱仪通过红外检查 CTFPS 和 TFPS 的官能团, 波长范围为 4 000~600  $\text{cm}^{-1}$ 。

(2) SEM 测试<sup>[21]</sup>: 使用导电胶将 CTFPS 和 TFPS 连接到样品台上, 然后喷涂薄金层。将喷金样品置于 SEM 中, 在 100 倍放大倍数下观察 2 个多糖样品的形态。

#### 1.4.3 体外抗氧化性测定

将 CTFPS 和 TFPS 样品分别配制为 2 mg/mL 的溶液, 并稀释为 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 mg/mL 的样品待测液。

(1) 还原力: 参考文献[22], 取不同浓度的样品待测液 1 mL, 分别加入 0.2 mol/L pH 值为 6.6 的磷酸盐缓冲液 2.5 mL 及质量分数为 1% 的铁氰化钾溶液 2.5 mL, 混匀; 于 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中反应 20 min 后, 加入 2.5 mL 质量分数为 10% 的 TCA 溶液, 于 4 000 r/min 离心 10 min; 取上清液 2.5 mL, 加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 质量分数为 0.1% 的  $\text{FeCl}_3$  溶液混匀, 静置 10 min; 于 700 nm 波长处测定吸光度  $A_x$ , 以蒸馏水代替  $\text{FeCl}_3$  溶液作为空白调零  $A_0$ 。通过式(3)计算还原力  $A_1$ , 该值越高说明样品的还原性越高:

$$A_1 = A_x - A_0 \quad (3)$$

(2) DPPH 自由基清除能力: 参考文献[23], 取不同浓度的样品待测液 3 mL, 加入 1 mL DPPH(0.1 mmol/mL) 的无水乙醇溶液充分混匀震荡, 室温下避光反应 1 h, 取上清液于 517 nm 处测定吸光度, 记为  $A_s$ ; 用等体积的无水乙醇代替样品待测液测定吸光度, 记为  $A_b$ ; 用等体积的无水乙醇代替 DPPH 溶液测定吸光度, 记为  $A_c$ 。通过式(4)计算 DPPH 清除活性  $A_2$ :

$$A_2 = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_b}\right) \times 100\% \quad (4)$$

(3) 羟基自由基清除能力: 参考文献[24], 取不同浓度的样品待测液 1 mL, 分别加入 1 mL 的 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、9 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  溶液、8.8 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液混匀, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下水浴锅中反应 1 h, 冷却至

室温后于 510 nm 处测定吸光度  $A_i$ ; 用蒸馏水代替多糖溶液, 在相同条件下测定空白对照组吸光度  $A_d$ ; 测本底吸光度  $A_j$ 。通过式(5)计算羟基自由基清除活性  $A_3$ :

$$A_3 = \frac{A_d - (A_i - A_j)}{A_d} \times 100\% \quad (5)$$

#### 1.4.4 吸湿保湿性能测定

以 CTFPS、TFPS 和丙三醇为样品, 比较 3 组样品的吸湿保湿性能。

(1) 吸湿性能测定<sup>[25]</sup>: 将饱和碳酸钠溶液、硫酸铵溶液分别置于 2 个干燥器中, 在室温下预饱和 12 h, 形成相对湿度分别为 43% 和 81% 的环境。准确称取 5 种样品各 0.1 g 于培养皿中, 放置在干燥器中, 于 1、3、6、12、24、36、48 h 取出称其质量, 通过式(6)计算吸湿率  $M_1$ :

$$M_1 = \frac{m_a - m_b}{m_c} \times 100\% \quad (6)$$

式中:  $m_a$  为特定时间总质量(g);  $m_b$  为初始总质量(g);  $m_c$  为样品初始质量(g)。

(2) 保湿性能测定<sup>[9]</sup>: 将干燥变色硅胶于室温下放置在干燥器中预干燥 12 h, 形成相对湿度为 0 的环境。准确称取 5 种样品各 0.1 g 于培养皿中, 并分别加入 0.5 g 水, 之后将培养皿放置在干燥器中, 于 1、3、6、12、24、36、48 h 取出称其质量, 通过式(7)计算保湿率  $M_2$ :

$$M_2 = \frac{m_a}{m_c} \times 100\% \quad (7)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 CTFPS 脱蛋白方法比较

选用不同方法对银耳粗多糖进行蛋白脱除, 经过不同脱蛋白工艺得到的蛋白质脱除率和多糖损失率如图 1 所示。

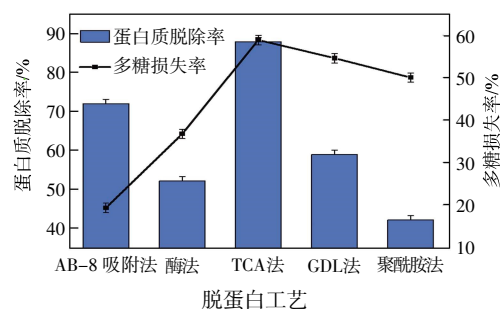


图 1 不同工艺下所得蛋白质脱除率和多糖损失率

Fig.1 Removal rate of proteins and loss rate of polysaccharide under different deproteinization method

由图 1 可以看出: TCA 法的蛋白质脱除效果最好, 多糖的损失也最高, AB-8 吸附法对蛋白质脱除效

果次之。按照蛋白质脱除效果对脱蛋白方法进行排序:TCA法>AB-8吸附法>GDL法>酶法>聚酰胺法,蛋白质脱除率分别为:87.85%、71.9%、58.88%、52.07%、42%。按照多糖损失率大小对脱蛋白方法进行排序:TCA法>GDL法>聚酰胺法>酶法>AB-8吸附法。多糖损失率分别为:58.85%、54.56%、50%、36.73%、19.3%。综上所述,虽然AB-8吸附法对蛋白质脱除效果比TCA法稍差,但是此方法多糖损失最少。综合来看,AB-8吸附法对CTFPS脱蛋白效果最好,操作简单,且AB-8大孔树脂再生处理简便,使用周期长,适合在工业生产中使用。

## 2.2 AB-8 吸附法脱蛋白工艺优化

### 2.2.1 CTFPS 水溶液质量浓度的影响

选取CTFPS水溶液质量浓度分别为1、2、5、10 mg/mL,在固定AB-8大孔树脂用量100 mg/mL、吸附温度30℃、吸附时间为3 h的条件下,考察AB-8吸附法的脱蛋白效果,结果如图2所示。

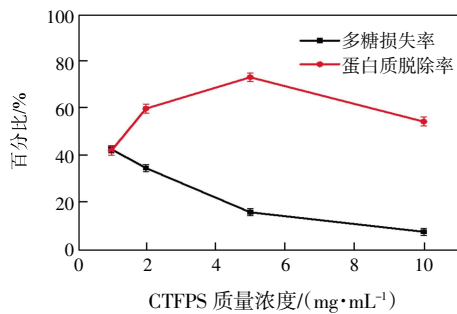


图2 CTFPS水溶液浓度对蛋白质吸附效果的影响

Fig.2 Effect of concentration of CTFPS aqueous solution on protein adsorption

由图2可以看出,随着CTFPS水溶液浓度的升高,蛋白质脱除率的趋势呈现先上升后下降,而多糖损失率随着浓度的升高而降低。在质量浓度为5 mg/mL时,蛋白质脱除率达到最高值72.97%,多糖损失率为15.42%。在CTFPS水溶液为低浓度时,大孔树脂对多糖和蛋白质都有较强的吸附能力,这是由于浓度较低时多糖分子和蛋白质分子有较多的机会在大孔树脂内部接触。而CTFPS水溶液质量浓度大于5 mg/mL时,多糖和蛋白质的浓度均升高,二者的分子扩散运动受到限制,大孔树脂对二者的吸附能力也降低。故CTFPS水溶液最佳质量浓度为5 mg/mL。

### 2.2.2 AB-8 大孔树脂用量的影响

选取AB-8大孔树脂用量分别为50、100、150、200、250 mg/mL,在固定CTFPS水溶液质量浓度为5 mg/mL、吸附温度为30℃、吸附时间为3 h的条件下,考察AB-8吸附法的脱蛋白效果,结果如图3所示。

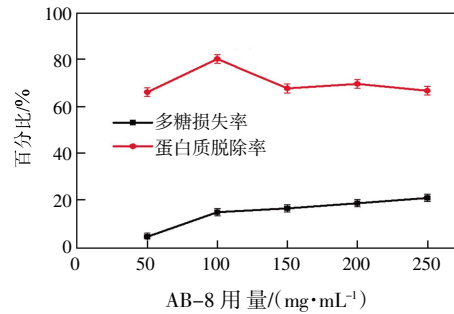


图3 AB-8大孔树脂用量对蛋白质吸附效果的影响

Fig.3 Effect of dosage of AB-8 macroporous resin on protein adsorption

由图3可以明显看出,随着AB-8大孔树脂用量的增加,蛋白质脱除率先上升后平缓,而多糖损失率呈现上升趋势。在AB-8大孔树脂用量达到100 mg/mL时,蛋白质脱除率达到最大值80.26%,多糖损失率为14.79%。这可能是由于在AB-8大孔树脂用量达到100 mg/mL时,树脂的吸附与解析达到平衡,随着大孔树脂用量的增加,多糖分子和蛋白质分子有较多的机会在大孔树脂内部接触,大孔树脂对多糖的吸附能力增加,多糖的损失率增大,而蛋白质脱除率反而减小。故AB-8大孔树脂最佳用量为100 mg/mL。

### 2.2.3 吸附时间对蛋白质吸附效果的影响

选取吸附时间分别为2、3、4、5、6 h,在固定CTFPS水溶液质量浓度5 mg/mL、AB-8大孔树脂用量100 mg/mL、吸附温度20℃的条件下,考察AB-8吸附法的脱蛋白效果,结果如图4所示。

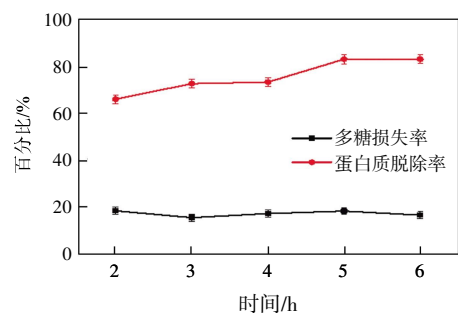


图4 吸附时间对蛋白质吸附效果的影响

Fig.4 Effect of adsorption time on protein adsorption

由图4可以看出,随着吸附时间的增加,蛋白质脱除率呈现逐渐上升的趋势,而多糖损失率的变化较为平缓。吸附时间达到5 h时,蛋白质脱除率达到最高值82.47%,多糖损失率为18.24%。随着吸附时间的增加,多糖分子和蛋白质分子有较多的机会在大孔树脂内部接触,在吸附时间为5 h时,吸附与解析达到平衡,在吸附时间大于5 h时,蛋白质脱除率不再增加。故最佳吸附时间为5 h。

### 2.2.4 反应温度对蛋白质吸附效果的影响

选取吸附温度分别为 20、30、40、50 °C，在固定 CTFPS 水溶液质量浓度 5 mg/mL、AB-8 大孔树脂用量 100 mg/mL、吸附时间为 2 h 的条件下，考察 AB-8 吸附法的脱蛋白效果，结果如图 5 所示。

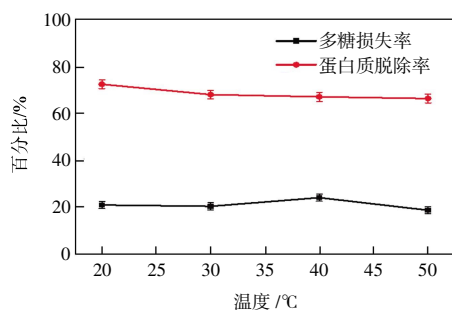


图 5 反应温度对蛋白质吸附效果的影响

Fig.5 Effect of reaction temperature on protein adsorption

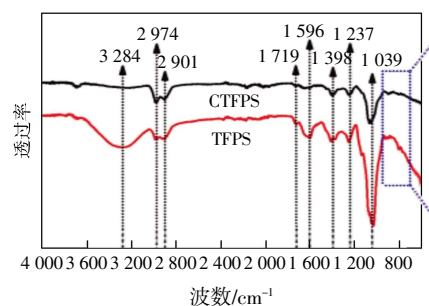
由图 5 可以明显看出，随着反应温度的升高，蛋白质脱除率呈现缓慢下降的趋势，而多糖损失率随反应温度的升高先缓慢升高再下降。在反应温度 20 °C 时，蛋白质脱除率为 72.49%，多糖损失率为 20.8%。这可能是由于升高温度，多糖分子的扩散增加，大孔树脂对多糖的吸附能力增加，多糖的损失率增大，蛋白质脱除率反而减小。故最佳反应温度为 20 °C。

## 2.3 结构表征

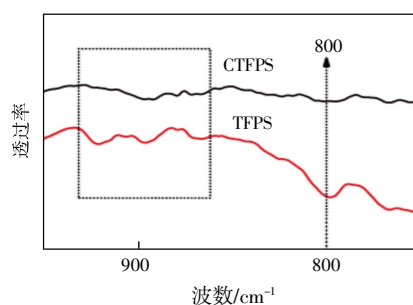
### 2.3.1 FTIR 分析

由于银耳多糖中的官能团具有高度的红外吸收特性，本文对 CTFPS 和 TFPS 分别进行了红外吸收表征，如图 6 所示。

由图 6 可知，波数 3 284  $\text{cm}^{-1}$  附近的宽峰是由糖分子中的 O—H 拉伸振动引起的，表明多糖中存在分子间或分子内氢键<sup>[26]</sup>；波数 2 974 和 2 901  $\text{cm}^{-1}$  处的特征峰代表甲基或亚甲基的 C—H 伸缩振动<sup>[27]</sup>；波数 1 398  $\text{cm}^{-1}$  处的特征峰显示羧基的 C—H 伸缩振动和 C—H 的可变角度振动。通过与张力凡<sup>[9]</sup>和张黎君<sup>[28]</sup>的研究结果对比发现，由波数 3 284、2 974、1 398  $\text{cm}^{-1}$  处附近的特征峰可判断出 CTFPS 和 TFPS 均为多糖类物质。此外，波数 1 596 和 1 719  $\text{cm}^{-1}$  附近的特征峰为 COO—的 C=O 不对称拉伸振动和对称拉伸振动，表明多糖中存在糖醛酸。而波数 1 237  $\text{cm}^{-1}$  处的特征峰表明 S=O 的收缩振动，表明多糖含有硫酸根<sup>[29]</sup>。1 039  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰对应于由吡喃糖环的 C—O—H 和 C—O—C 形成的拉伸振动的吸收峰。947 和 844  $\text{cm}^{-1}$  之间的吸收峰可能代表 2 个多糖中存在  $\beta$ -糖苷键<sup>[30]</sup>；800  $\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰证明了  $\alpha$ -D-甘露糖的存在<sup>[31]</sup>。因此，CTFPS 和 TFPS 均具有  $\alpha$  型和  $\beta$  型糖苷键。



(a) 整体



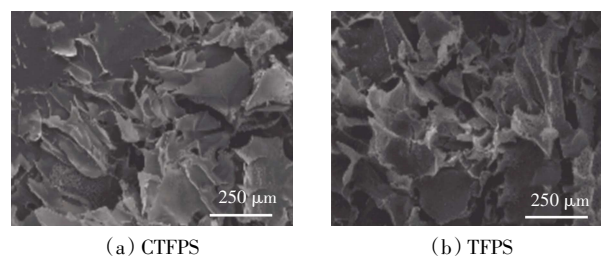
(b) 局部

图 6 脱蛋白前后的 FTIR 谱图

Fig.6 FTIR spectrum before and after deproteinization

### 2.3.2 SEM 分析

通过 SEM 研究了 CTFPS 和 TFPS 的微观结构，如图 7 所示。



(a) CTFPS

(b) TFPS

图 7 脱蛋白前后的 SEM

Fig.7 SEM before and after deproteinization

由图 7 可以看出，CTFPS 和 TFPS 呈现为片状堆积的无定形固体，表面有许多不规则排列的孔洞，结构较为疏松。

## 2.4 抗氧化性能分析

### 2.4.1 还原能力

银耳多糖可以将  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  中的  $\text{Fe}^{3+}$  还原为  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  中的  $\text{Fe}^{2+}$ ，并且  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  进一步与  $\text{FeCl}_3$  反应形成  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ，该物质在 700 nm 处具有最大吸光度<sup>[32]</sup>。因此，对于 TFPS- $\text{Fe}^{3+}$  反应溶液，通常在 700 nm 处测量吸光度。吸光度越高，说明银耳多糖的还原能力越强。脱蛋白前后银耳多糖的还原力结果如图 8 所示。

由图 8 可以看出，CTFPS 和 TFPS 均有明显的还

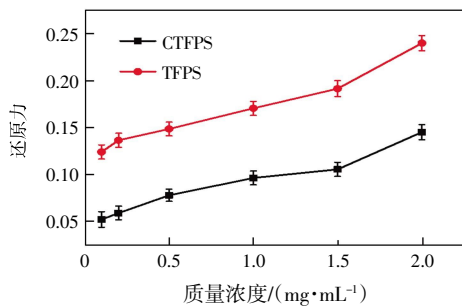


图 8 CTFPS 和 TFPS 的还原力

Fig.8 Reducing power of CTFPS and TFPS

原力,在一定浓度范围内还原力与多糖浓度呈现量效关系,还原力随着浓度的升高而增大,且脱蛋白后的 TFPS 的还原能力明显强于未脱蛋白的 CTFPS。

#### 2.4.2 DPPH 自由基清除

无水乙醇溶液的最大吸收波长为 517 nm,多糖可以清除 DPPH·并降低 DPPH·的吸光度,由此评估银耳多糖对 DPPH·自由基的清除率<sup>[33]</sup>。脱蛋白前后的银耳多糖对 DPPH·自由基的清除能力结果如图 9 所示。

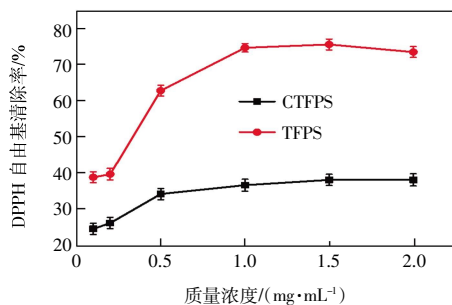


图 9 CTFPS 和 TFPS 的 DPPH 自由基清除能力

Fig.9 Scavenging ability of CTFPS and TFPS on DPPH free radicals

由图 9 可知,CTFPS 和 TFPS 均有明显的 DPPH 自由基清除能力,其 DPPH·清除能力随着多糖浓度的增加而增加,且脱蛋白后 TFPS 的 DPPH·清除能力明显强于未脱蛋白的 CTFPS。在 0.1~2 mg/mL 质量浓度范围内,TFPS 和 CTFPS 的 DPPH·清除能力均在 1.5 mg/mL 达到最高值,DPPH·清除率分别为 75.54% 和 37.99%。

#### 2.4.3 羟基自由基清除能力

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 Fe<sup>2+</sup> 产生羟基自由基,可以与水杨酸反应生成 2,3-二羟基苯甲酸和 2,5-二羟基苯甲酸,形成的 2 种酸在 510 nm 处具有最大吸收波长。当多糖清除羟基自由基时,510 nm 处的吸光度应降低,由此可以评估银耳多糖的羟基自由基清除能力<sup>[34]</sup>。脱蛋白前后银耳多糖的羟基自由基清除能力如图 10 所示。

由图 10 可以看出,CTFPS 和 TFPS 均有明显的羟

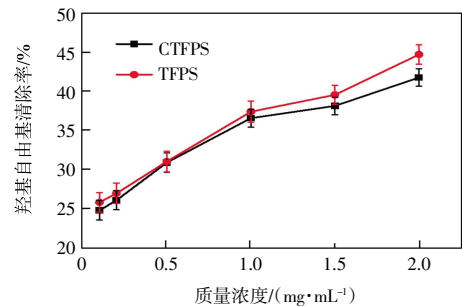


图 10 CTFPS 和 TFPS 的羟基自由基清除能力

Fig.10 Scavenging ability of CTFPS and TFPS on hydroxyl radical

基自由基清除能力,其羟基自由基清除能力随着多糖浓度的增加而增加。质量浓度在 0.5 mg/mL 时,CTFPS 和 TFPS 的羟基自由基清除率相同;随着浓度的增加,TFPS 的羟基自由基清除能力逐渐强于 CTFPS。在 0.1~2 mg/mL 质量浓度范围内,CTFPS 和 TFPS 的羟基自由基清除能力均在 2 mg/mL 达到最高值,羟基自由基清除率分别为 44.72% 和 41.78%。

#### 2.5 吸湿保湿性能分析

##### 2.5.1 吸湿性能

对 CTFPS 和 TFPS 的吸湿性能进行测定,并与丙三醇进行比较,结果如图 11 和图 12 所示。

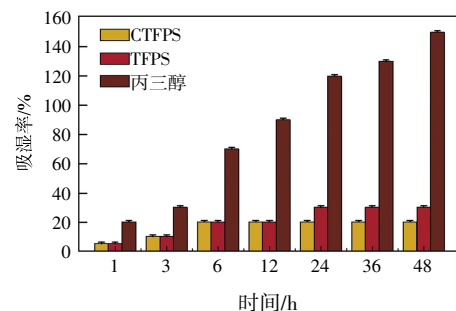


图 11 3 个不同样品在相对湿度 43% 时的吸湿率

Fig.11 Moisture absorption rate of three different samples at relative humidity of 43%

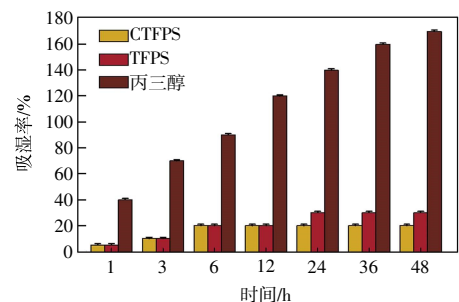


图 12 3 个不同样品在相对湿度 81% 时的吸湿率

Fig.12 Moisture absorption rate of three different samples at relative humidity of 81%

由图 11 和图 12 可以看出,在相对湿度 43% 和 81% 的环境下,3 个样品的吸湿率在最初的 24 h 内显著增加,且在 24 h 左右吸湿效果几乎达到饱和。丙三醇的吸湿效果最好,TFPS 的吸湿效果次之,CTFPS 的最差。同时,在相对湿度 81% 的环境下吸湿率高于相对湿度 43%。在相对湿度 81% 的环境下,3 个样品的吸湿率大小顺序为丙三醇 > TFPS > CTFPS,吸湿时间为 48 h 时,吸湿率分别为 170%、40% 和 30%。

### 2.5.2 保湿性能

丙三醇、CTFPS 和 TFPS 的保湿效果如图 13 所示。

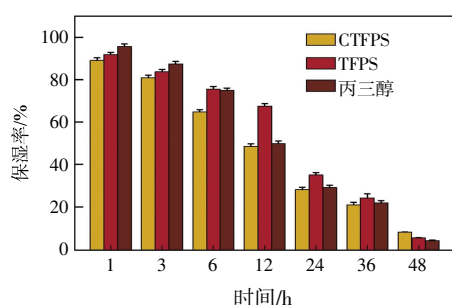


图 13 3 个不同样品在相对湿度为 0 时的保湿率

Fig.13 Moisture retention of three different samples at relative humidity of 0

由图 13 可以看出,在相对湿度为 0 的环境下,3 个样品的水分含量快速降低,随着时间的增加,其保湿效果不断减小。在 3 h 内,丙三醇的保湿率高于其它 2 个样品,在 3 h 后,TFPS 的保湿效果优于丙三醇,且 CTFPS 的保湿效果与丙三醇相差甚微,说明 CTFPS 和 TFPS 都具有显著的保湿效果。在 48 h 时,3 个样品的保湿效果为 CTFPS > TFPS > 丙三醇,其保湿率分别为 8.11%、5.41% 和 4.17%。

## 3 结 论

为了得到更高纯度的银耳多糖,对 CTFPS 进行纯化处理。研究结果表明:

(1) 以多糖损失率和蛋白质脱除率为依据,对比 AB-8 吸附法、酶法、TCA 法、GDL 法和聚酰胺法对 CTFPS 的脱蛋白效果发现,AB-8 吸附法的脱蛋白效果最佳。

(2) 通过单因素实验优化工艺条件,得出最优工艺条件为:CTFPS 水溶液质量浓度 5 mg/mL,AB-8 大孔树脂用量 100 mg/mL,吸附时间 5 h,吸附温度 20 ℃。在最优条件下,蛋白质脱除率为 82.47%,多糖损失率为 18.24%。

(3) 比较脱蛋白后的 TFPS 与 CTFPS 的红外特征峰

和 SEM 谱图发现,脱蛋白工艺不会破坏多糖的结构。

(4) TFPS 的抗氧化活性和吸湿保湿性能强于 CTFPS。而且,AB-8 大孔吸附树脂再生简便,使用周期长,操作简单,更适用于银耳多糖的工业化生产。

### 参考文献:

- [1] LIN B B, HUANG G L. Extraction, isolation, purification, derivatization, bioactivity, structure-activity relationship, and application of polysaccharides from white jellyfungus[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(6): 1359-1379.
- [2] 张黎君. 银耳多糖的功能及应用研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2022(10): 148-150.  
ZHANG L J. Research progress on function and application of *tremella fuciformis* polysaccharide[J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(10): 148-150(in Chinese).
- [3] FU H, YOU S Q, ZHAO D, et al. *Tremella fuciformis* polysaccharides inhibit UVA-induced photodamage of human dermal fibroblast cells by activating up-regulating Nrf2/Keap1 pathways[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2021, 20(12): 4052-4059.
- [4] DENG C, SUN Y Y, FU H T, et al. Antioxidant and immunostimulatory activities of polysaccharides extracted from *Tremella aurantialba mycelia*[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(5): 4857-4864.
- [5] 安星亮, 赵永亮, 王欢, 等. 银耳多糖提取工艺的响应面法优化及抗氧化和保湿性研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(15): 123-130.  
AN X L, ZHAO Y L, WANG H, et al. Optimization of extraction process for *tremella fuciformis* polysaccharides by response surface methodology and its antioxidant and moisturizing properties[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(15): 123-130(in Chinese).
- [6] KHAN T J, XU X F, XIE X L, et al. *Tremella fuciformis* crude polysaccharides attenuates steatosis and suppresses inflammation in diet-induced NAFLD mice[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2022, 44(3): 1224-1234.
- [7] QIN L L, SU G, WU C, et al. Effects of *Tremella fuciformis* extract on growth performance, biochemical and immunological parameters of weaned piglets challenged with lipopolysaccharide[J]. *Animal Production Science*, 2022, 62(5): 462-469.
- [8] MAX A, YANG M, HE Y, et al. A review on the production, structure, bioactivities and applications of *Tremella* polysaccharides[J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2021, 35: 205873842110005.
- [9] 张力凡, 陈洁, 许飞, 等. 古田银耳粗多糖热水提取工艺正交优化及功能活性研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(6): 48-56.  
ZHANG L F, CHEN J, XU F, et al. Orthogonal optimization of

- hot water extraction process of Gutian *Tremella fuciformis* crude polysaccharide and its functional activity[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2021, 42(6): 48-56(in Chinese).
- [10] 薛蔚. 银耳多糖提取纯化技术及功能性质探究[J]. 南方农业, 2020, 14(21): 141-142.  
XUE W. Extraction and purification technology and functional properties of *tremella polysaccharide* [J]. South China Agriculture, 2020, 14(21): 141-142(in Chinese).
- [11] 高磊, 张帆, 王毅飞, 等. 银耳多糖研究进展[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(24): 13-16, 19.  
GAO L, ZHANG F, WANG Y F, et al. Research advances of *Tremella fuciformis* polysaccharides[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(24): 13-16, 19(in Chinese).
- [12] 李洁, 陈琳, 刘海棠, 等. 银条菜粗多糖脱蛋白的方法研究[J]. 天津科技大学学报, 2022, 37(1): 18-22, 27.  
LI J, CHEN L, LIU H T, et al. Study of deproteinization method of crude polysaccharides from *stachys floridana* schuttl. ex Benth [J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2022, 37(1): 18-22, 27(in Chinese).
- [13] 杨彬. 银耳发酵条件优化、胞外多糖分离纯化及其体外抗氧化研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2020.  
YANG B. Study on the optimization of *tremella fuciformis* fermentation conditions, separation and purification of extracellular polysaccharides and its antioxidant activity in vitro [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2020 (in Chinese).
- [14] 李蕊. 银耳多糖的提取纯化及其对溃疡性结肠炎小鼠保护作用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.  
LI R. Study on extraction and purification of *tremella* polysaccharide and its protective effect on ulcerative colitis in mice[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020(in Chinese).
- [15] 穆娜, 李凤伟, 柳晓晨, 等. 苜蓿多糖脱蛋白工艺及其对鼠李糖乳杆菌增殖作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(3): 99-105.  
MU N, LI F W, LIU X C, et al. Alfalfa polysaccharides deproteinization and its effect on the proliferation of *Lactobacillus rhamnosus* [J]. China Food Additives, 2022, 33(3): 99-105 (in Chinese).
- [16] 王思婷, 薛蕊, 李欣怡, 等. 干贝多糖的蛋白质脱除方式对抗氧化活性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(8): 62-69.  
WANG S T, XUE R, LI X Y, et al. Effect of deproteinization methods of polysaccharide from dried adductor muscle on antioxidant activities[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(8): 62-69(in Chinese).
- [17] 王奕文. 聚酰胺法纯化富硒甘薯多糖及理化性质的研究[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2020.  
WANG Y W. Polyamide-based purification of polysaccharides from selenium-enriched potato and its physical and chemical properties[D]. Shenyang: Liaoning University, 2020(in Chinese).
- [18] FAN M H, ZHU J X, QIAN Y L, et al. Effect of purity of tea polysaccharides on its antioxidant and hypoglycemic activities[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(8): e13277.
- [19] 聂昌宏, 郑欣, 阿依居来克·卡得尔, 等. 考马斯亮蓝法检测不同乳中乳清蛋白含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(5): 1138-1142.  
NIE C H, ZHENG X, AYIJULAIKE KaDeEr, et al. Determination of whey protein content in different kinds of milk by coomassie brilliant blue method[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(5): 1138-1142(in Chinese).
- [20] SU Y, LI L. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115407.
- [21] MA S, ZHANG H C, XU J X. Characterization, antioxidant and anti-inflammation capacities of fermented *Flammulina velutipes* polyphenols[J]. Molecules, 2021, 26(20): 6205.
- [22] ZHOU S Y, HUANG G L, HUANG H L. Extraction, derivatization and antioxidant activities of onion polysaccharide[J]. Food Chemistry, 2022, 388: 133000.
- [23] GU J Y, ZHANG H H, WEN C T, et al. Purification, characterization, antioxidant and immunological activity of polysaccharide from *sagittaria sagittifolia* L[J]. Food Research International, 2020, 136: 109345.
- [24] ZHU Z P, CHEN J A, CHEN Y, et al. Extraction, structural characterization and antioxidant activity of turmeric polysaccharides[J]. LWT, 2022, 154: 112805.
- [25] YUAN H J, DONG L, ZHANG Z Y, et al. Production, structure, and bioactivity of polysaccharide isolated from *Tremella fuciformis* [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(4): 1010-1017.
- [26] CHEN F, HUANG S Y, HUANG G L. Preparation, activity, and antioxidant mechanism of rice bran polysaccharide[J]. Food & Function, 2021, 12(2): 834-839.
- [27] JI X L, YAN Y Z, HOU C Y, et al. Structural characterization of a galacturonic acid-rich polysaccharide from *Ziziphus jujuba* cv. Muzao[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 844-852.
- [28] 张黎君. 银耳多糖的提取工艺及其在口红中的应用研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2020.  
ZHANG L J. Extraction process of *tremella fuciformis* polysaccharides and its application in lipstick[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2020 (in Chinese).
- [29] CHEN S H, HUANG H L, HUANG G L. Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 1047-1053.

- tion[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(8): 2540-2548 (in Chinese).
- [15] 姚力, 信欣, 鲁航, 等. 连续流态下以实际低基质生活污水培养好氧颗粒污泥及其脱氮性能[J]. 环境科学, 2015, 36(7): 2626-2632.  
YAO L, XIN X, LU H, et al. Cultivation of aerobic granular sludge with real low concentration domestic wastewater and its denitrification performances under the continuous flow[J]. Environmental Science, 2015, 36(7): 2626-2632 (in Chinese).
- [16] 李晶, 孙炜, 刘莉莹, 等. 气相分子吸收光谱法测定水中亚硝酸盐氮的样品保存时间分析[J]. 中国资源综合利用, 2022, 40(11): 11-17.  
LI J, SUN W, LIU L Y, et al. Analysis of sample storage time for determination of nitrite nitrogen in water by gas-phase molecular absorption spectrometry[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2022, 40(11): 11-17 (in Chinese).
- [17] 张喆. 固定化材料的制备及其在景观水体生态修复的应用[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2021.  
ZHANG Z. Preparation of immobilized materials and their application in ecological restoration of landscape water[D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2021 (in Chinese).
- [18] 孟婷, 杨宏. 高效反硝化菌和包埋填料性能及微生物群落分析[J]. 环境科学, 2017, 38(8): 3339-3346.  
MENG T, YANG H. Analysis of high-efficiency denitrifying bacteria and embedding filler performance and microflora[J]. Environmental Science, 2017, 38(8): 3339-3346 (in Chinese).
- [19] 张焕杰. 固定化反硝化细菌在人工湿地系统中处理低污染水性能研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2016.  
ZHANG H J. Study on the performance of immobilized denitrifying bacteria in constructed wetland for slightly-polluted water treatment[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2016 (in Chinese).
- [20] 尹子君, 李秀芬, 任月萍. 多孔淀粉固定化堆肥用微生物菌剂的制备条件优化及其堆肥效果验证[J]. 环境工程学报, 2021, 15(10): 3334-3344.  
YIN Z J, LI X F, REN Y P. Preparation optimization and performance validation of microbial agent for porous starch immobilized compost [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(10): 3334-3344 (in Chinese).
- [21] ZHANG K, WU X L, LUO H B, et al. Biochemical pathways and enhanced degradation of dioctyl phthalate (DEHP) by sodium alginate immobilization in MBR system[J]. Water Science and Technology, 2021, 83(3): 664-677.

#### 本文引文格式:

- 许世超, 祖彤彤, 郝梦琛, 等. 小麦淀粉生物基水凝胶合成及其辅助  $\text{NO}_2^-$ -N 的去除 [J]. 天津工业大学学报, 2024, 43(2): 68-74.  
XU S C, ZU T T, HAO M C, et al. Synthesis of wheat starch bio-based hydrogel and its assisted removal for  $\text{NO}_2^-$ -N [J]. Journal of Tiangong University, 2024, 43(2): 68-74 (in Chinese).

(上接第 67 页)

- [30] LIU Y, HU C S, FENG X, et al. Isolation, characterization and antioxidant of polysaccharides from *Stropharia rugosoannulata* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 883-889.
- [31] LAN X Y, WANG Y H, DENG S, et al. Physicochemical and rheological properties of *Tremella fuciformis* polysaccharide fractions by ethanol precipitation [J]. CyTA—Journal of Food, 2021, 19(1): 645-655.
- [32] ZHOUSY, HUANG G L, CHENG Y. Extraction, structural analysis, derivatization and antioxidant activity of polysaccharide from Chinese yam [J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130089.
- [33] ZHOUSY, HUANG G L. Extraction, derivatization, and antioxidant activity of *morinda citrifolia* polysaccharide [J]. Chemical Biology & Drug Design, 2022, 99(4): 603-608.
- [34] MENG Q R, CHEN Z H, CHEN F, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Hemerocallis citrina* and the antioxidant activity study [J]. Journal of Food Science, 2021, 86(7): 3082-3096.

#### 本文引文格式:

- 侯彦辉, 李喜阁, 张凤仪, 等. 银耳多糖的纯化及其生物活性 [J]. 天津工业大学学报, 2024, 43(2): 60-67, 74.  
HOU Y H, LI X G, ZHANG F Y, et al. Purification and biological activity of *Tremella fuciformis* polysaccharides [J]. Journal of Tiangong University, 2024, 43(2): 60-67, 74 (in Chinese).