

# 猴头菇多糖的纯化工艺

肖丽霞<sup>1</sup>, 于洪涛<sup>1</sup>, 胡晓松<sup>2</sup>, 马超<sup>3</sup>, 葛邦国<sup>3</sup>, 吴茂玉<sup>3,\*</sup>

(1. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100087; 3. 中华全国供销合作总社济南果品研究院, 山东 济南 250014)

**摘要:** 对猴头菇子实体多糖进行纯化研究。采用树脂吸附法对猴头菇多糖脱色并利用超滤法进行分级除杂。结果表明: 猴头菇多糖适宜采用HD-3树脂进行脱色; 静态脱色工艺为pH4.5、每100mL添加树脂量15.0g、脱色2.5h, 脱色率和多糖得率分别达到84.9%和83.2%; 动态脱色工艺控制流速为5BV/h时, 脱色率和多糖得率都较高, 平均达83.9%和82.3%; 最佳超滤工艺为选择截留分子质量为10kD和100kD的两种膜对猴头菇多糖进行超滤, 超滤温度45℃、压力0.16MPa、溶液pH7~9。此工艺适合工业化生产的需要, 得到的猴头菇多糖纯度达74.2%。

**关键词:** 猴头菇; 多糖; 树脂脱色; 超滤

## Purification of Polysaccharides from *Hericium erinaceus* Fruit Bodies

XIAO Li-xia<sup>1</sup>, YU Hong-tao<sup>1</sup>, HU Xiao-song<sup>2</sup>, MA Chao<sup>3</sup>, GE Bang-guo<sup>3</sup>, WU Mao-yu<sup>3,\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;  
2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100087, China;  
3. Jinan Fruit Research Institute, All China Federation of Supply & Marketing Co-operatives, Jinan 250014, China)

**Abstract:** Polysaccharide purification from the fruit bodies of *Hericium erinaceus* was studied. Crude polysaccharides were extracted from the fruit bodies of *Hericium erinaceus* by hot water extraction, decolorized by resin adsorption, and ultrafiltrated for the removal of impurities and fractionation. HD-3 resin was found to be the best resin for polysaccharide decolorization among 6 ones under investigation. A decolorization rate of 84.9% and a polysaccharide recovery of 83.2% were obtained after 2.5 h of static decolorization at pH 4.5 and a resin dosage of 1.50 g/100 mL of polysaccharide solution. A flow rate of 5 BV/h for dynamic decolorization resulted in higher decolorization rate and polysaccharide recovery, averaging at 83.9% and 82.3%, respectively. The best ultrafiltration results were obtained by using ultrafiltration membranes with molecular weight cutoff (MSCO) of 10 kD and 100 kD respectively and setting the temperature, pressure and sample solution pH as 45 °C, 0.16 MPa and 7-9, respectively. A polysaccharide purity of 74.2% was achieved after purification under these conditions. The optimized process could meet the requirements of industrial production.

**Key words:** *Hericium erinaceus*; polysaccharide; decolorization by resin adsorption; ultrafiltration

中图分类号: Q539; TS244.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0186-05

猴头菇(*Hericium erinaceus*)是一种珍贵的食用兼药用菌, 富含多种营养成分<sup>[1]</sup>。有“山珍猴头, 海味燕窝”的美称, 在古代被作为贡品<sup>[2]</sup>。猴头菇多糖是猴头菇中重要的生物活性物质, 兼具提高免疫力<sup>[3-5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6-8]</sup>、保护并修复胃黏膜<sup>[9-11]</sup>、降血糖<sup>[12-13]</sup>、抗突变<sup>[14-16]</sup>等作用, 可广泛应用于医药及功能食品, 具有广阔的市场前景。猴头菇在胃病方面的治疗作用已被应用于多种医药品中, 如猴头菇菌片、胃乐宁、胃乐新和猴头浸膏等。

有研究表明<sup>[17]</sup>, 多糖的纯度能影响其生物活性, 制得高纯度的猴头菇多糖是将其应用于医药领域不可或缺的步骤, 但目前对于猴头菇多糖的纯化研究多采用有机溶剂沉淀法, 操作复杂且不适用于工业化的生产。本研究即采用树脂吸附和超滤的方法对猴头菇多糖的纯化工艺进行研究, 以期适应大规模的生产需要。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

收稿日期: 2011-09-20

作者简介: 肖丽霞(1966—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为农产品贮藏加工。E-mail: lxxiao@yzu.edu.cn

\* 通信作者: 吴茂玉(1972—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为果蔬加工。E-mail: wmy-72@tom.com

鲜猴头菇子实体产自济南。小牛血清蛋白(分析纯)海今迈生物科技有限公司;重蒸苯酚(分析纯)北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖(分析纯)上海化学试剂分装厂;硫酸(分析纯)广东省东红化工厂;DA201-B、DA201-C树脂江苏苏青水处理工程集团有限公司;AB-8树脂沧州宝恩吸附材料科技有限公司;XAD-4树脂北京康农兴牧科技发展中心;HD-3、D296、D392树脂美国罗门哈斯公司。

## 1.2 仪器与设备

752型紫外-可见分光光度计上海精密科学仪器有限公司;pH计上海昕瑞仪器仪表有限公司;层析柱杭州凯弗克斯实验室设备有限公司;恒流泵燕山仪表总厂;8400型超滤杯、10、100、200kD超滤膜上海摩速科学器材有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 猴头菇多糖纯化工艺流程

猴头菇→粉碎→胶体磨磨细→热水浸提→离心得粗多糖溶液→树脂脱色→超滤

### 1.3.2 多糖的检测

采用苯酚-硫酸法<sup>[18]</sup>检测。精确称取105℃干燥至质量恒定的无水葡萄糖0.1g,溶解定容于1000mL容量瓶中配成质量浓度为0.100mg/mL的葡萄糖标准溶液,分别精确量取0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL葡萄糖标准溶液并加蒸馏水至总体积为1.0mL,然后各加质量分数5%苯酚溶液(先配制质量分数75%的苯酚溶液,低温放置,现用现配)1.0mL、硫酸5.0mL,迅速摇匀在室温反应30min,以加蒸馏水的试管为空白,于波长490nm处测定吸光度。将测得值以葡萄糖溶液中葡萄糖含量( $\mu\text{g}$ )为横坐标,以吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 0.0118x + 0.0325 (R^2 = 0.9995)$ 。

### 1.3.3 蛋白检测

采用考马斯亮蓝法。取小牛血清蛋白配制成0.05mg/mL标准溶液,分别精确量取0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mL加入比色管中补水至0.5mL,加入3mL考马斯亮蓝溶液,混匀,5min后以加蒸馏水的试管为空白,595nm测定吸光度,绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 0.0133x + 0.0287 (R^2 = 0.9995)$ 。

### 1.3.4 脱色率测定

以蒸馏水为空白,将多糖溶液进行全波长检测,选择吸光度最高处为测定波长,将样液置于测定波长测定。

$$\text{脱色率} / \% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

式中: $A_0$ 为脱色前吸光度; $A$ 为脱色后吸光度。

### 1.3.5 粗多糖溶液的制备

猴头菇子实体经破碎后,加入7倍质量热水,65℃

浸提2h,3000r/min离心15min,得粗多糖溶液。

### 1.3.6 树脂脱色

#### 1.3.6.1 静态吸附

取20mL粗多糖溶液,加入一定质量的湿树脂,调节一定的pH值,恒温水浴振荡一定时间,测定并计算溶液的脱色率和多糖得率。

#### 1.3.6.2 动态吸附

将处理过的树脂装柱,用蒸馏水平衡一定时间后,按照一定流速进行脱色,收集洗脱液,测定并计算脱色率和多糖得率。

### 1.3.7 超滤

取100mL脱色后的多糖溶液,置于超滤装置中,在不同的膜和不同的压力、温度、pH值条件下进行超滤,测定并计算多糖截留率及膜通量。

## 2 结果与分析

### 2.1 猴头菇多糖的脱色

#### 2.1.1 树脂种类的确定

将猴头菇粗多糖溶液中加入树脂2.0g,常温脱色3h,结果见表1。树脂对大分子物质的吸附主要以两种方式进行:①树脂上的离子与吸附物质的离子交换将其吸附;②相似相吸,依靠次级键(疏水作用力、范德华力等)对物质进行吸附。弱极性的大孔吸附树脂DA201-B、DA201-C的脱色率分别为36.47%和48.94%,而多糖保留率分别为91.25%、83.52%。脱色率越高,多糖保留率就越低,说明树脂在吸附色素的同时,也吸附了多糖。AB-8和HD-3属于非极性大孔树脂,它们对猴头菇多糖都有较高的脱色率,说明猴头菇多糖中的色素主要为非极性物质。HD-3树脂脱色时,脱色率和多糖得率均较高,本实验拟对HD-3树脂做进一步研究。

表1 不同种类树脂对猴头菇多糖的脱色效果  
Table 1 Effect of resin type on the decolorization of *Hericium erinaceus* polysaccharides

树脂种类	AB-8	D296	D392	HD-3	DA201-B	DA201-C
多糖得率/%	85.69	92.57	84.34	80.23	91.25	83.52
脱色率/%	41.32	32.21	54.85	78.54	36.47	48.94

### 2.1.2 静态脱色

#### 2.1.2.1 脱色时间的确定

将猴头菇粗多糖溶液中加入HD-3树脂2.0g,常温下摇床脱色,结果见图1。树脂吸附存在吸附-解吸平衡,由图1可知,在初始阶段,吸附速率远大于解吸速率,脱色率增大而多糖得率迅速降低;随着吸附与解吸达到动态平衡,脱色率和多糖得率变化趋缓。由图1可以看出,2.5h以后脱色率升高比较缓慢,而多糖得率下降依然比较快。

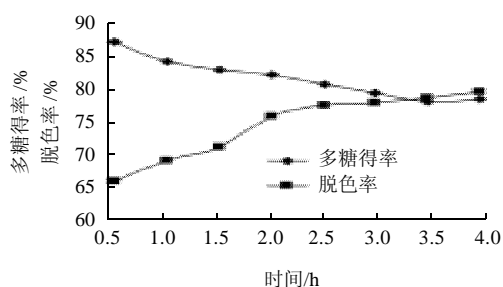


图1 脱色时间对猴头菇多糖脱色效果的影响

Fig.1 Effect of decolorization time on the decolorization of *H. erinaceus* polysaccharides

## 2.1.2.2 树脂用量的确定

将猴头菇粗多糖溶液中加入一定量 HD-3 树脂, 常温脱色 2.5h, 结果见图 2。树脂用量增多, 其总吸附量也变大。由图 2 可知, 随着树脂用量的增多, 脱色率增大而多糖得率减小, 用量达到 2.5g 后脱色率基本不再升高, 而多糖得率仍呈下降趋势。

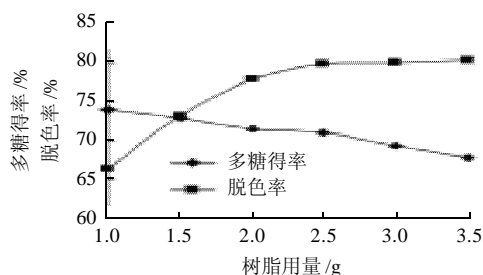


图2 树脂用量对猴头菇多糖脱色效果的影响

Fig.2 Effect of resin dosage on the decolorization of *H. erinaceus* polysaccharides

## 2.1.2.3 脱色 pH 值的确定

将猴头菇粗多糖溶液中加入 2.5g HD-3 树脂, 调节到一定 pH 值, 常温脱色 2.5h, 结果见图 3。pH 值会影响溶液中分子的带电情况, 从而影响它们与树脂作用力的大小, 合适的 pH 值能促使树脂吸附更多的色素并且减少多糖的损失。由图 3 可知, 当 pH 值为 4.5 时, 多糖得率和脱色率均较高, 分别达到 84.3% 和 84.1%。

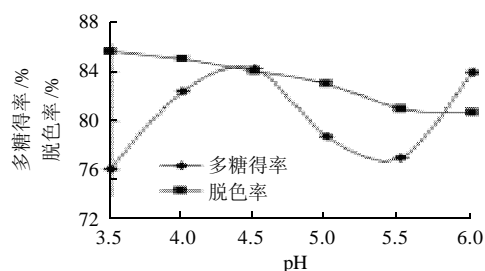


图3 pH 值对猴头菇多糖脱色效果的影响

Fig.3 Effect of sample solution pH on the decolorization of *H. erinaceus* polysaccharides

## 2.1.2.4 正交试验

根据单因素试验结果, 选择脱色时间(A)、树脂用量(B)、pH 值(C)3 个主要影响因素, 每个因素设 3 个水平的正交试验方案, 以多糖得率和脱色率为考察指标, 根据  $L_9(3^4)$  正交表进行正交试验。结果如表 2。

表2 猴头菇多糖的 HD-3 树脂脱色正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal array design and experimental results for optimizing the decolorization of *Hericium erinaceus* polysaccharides with HD-3 resin

试验号	A 脱色时间/h	B 树脂用量/(g/100mL)	C pH	多糖得率/%	脱色率/%
1	1(2.5)	1(10.0)	1(4.0)	85.3	82.4
2	1	2(12.5)	2(4.5)	86.4	83.7
3	1	3(15.0)	3(5.0)	76.8	83.4
4	2(3.0)	1	2	78.5	84.0
5	2	2	3	76.7	84.7
6	2	3	1	78.7	85.1
7	3(3.5)	1	3	74.6	81.2
8	3	2	1	76.8	85.9
9	3	3	2	78.6	86.5
多	$K_1$	248.5	238.4	240.8	
糖	$K_2$	227.4	239.9	243.5	
得	$K_3$	230.3	234.1	238.1	
率	$R$	11.1	5.8	5.4	
脱	$K_1$	249.5	247.6	253.4	
色	$K_2$	253.8	254.3	254.2	
率	$K_3$	253.6	255.0	249.3	
	$R$	4.3	5.7	3.9	

由表 2 可知, 根据极差值, 各因素对多糖得率的影响程度依次为  $A > B > C$ , 即在试验所选水平范围内, 脱色时间对多糖得率的影响最大, 而树脂用量和 pH 值分别次之, 且差别不大。以多糖得率为指标可以确定各因素最佳组合为  $A_1B_2C_2$ 。各因素对脱色率的影响程度依次为  $B > A > C$ , 即在试验所选水平范围内, 树脂用量对脱色率的影响最大, 而脱色时间和 pH 值分别次之。以脱色率为指标可以确定各因素最佳组合为  $A_2B_3C_2$ 。综合考虑多糖得率和脱色率两个指标, 确定最佳因素组合  $A_1B_3C_2$ , 即 pH4.5、每 100mL 添加树脂量为 15.0g、脱色 2.5h。经验证, 此时脱色率和多糖得率分别达到 84.9% 和 83.2%, 与试验中其他组合相比处于较高水平。HD-3 树脂在猴头菇多糖的静态脱色中能起到良好的脱色效果, 为了将其运用到高效的工业化生产中, 进一步研究其动态脱色工艺。

## 2.1.3 动态脱色效果

调节猴头菇粗多糖溶液 pH 值为 4.5 后, 不同流速下脱色, 结果见图 4。从图 4 可知, 当流速为 5BV/h 时脱色率和多糖得率均较高, 平均达 83.9% 和 82.3%。HD-3 树脂是大孔树脂, 能依靠疏水作用力对大分子蛋白进

行吸附,经测定,HD-3树脂在吸附色素的同时也吸附多糖溶液中大量蛋白质,蛋白脱除率达67.7%。

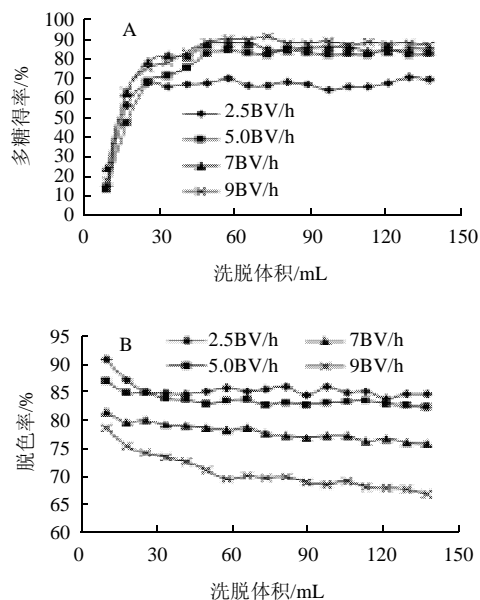


图4 流速对猴头菇多糖得率(A)和多糖脱色率(B)的影响  
Fig.4 Effect of sample loading flow rate on the decolorization of *H. erinaceus* polysaccharides

## 2.2 猴头菇多糖的超滤工艺研究

### 2.2.1 超滤膜的选择

采用不同截留分子质量的膜进行超滤实验,在常温、0.1MPa压力条件下对猴头菇多糖溶液超滤100min,结果见表3。由表3可知,猴头菇多糖分子质量大于100kD的占11.6%,含量并不高。为了在对多糖进行分级的时候能够较好地去除大分子杂质,所以选择100kD的超滤膜进行超滤。而采用10kD的膜超滤时,不仅能截留96.7%的多糖,而且能够进一步去除小分子物质。先采用100kD膜进行超滤,然后将滤出液用10kD的膜超滤,能得到大部分的多糖,又能除去杂分子物质,是可行的方案。

表3 不同超滤膜对猴头菇多糖的超滤效果

Table 3 Effect of ultrafiltration membranes with different MSCO on the retention rate of *Hericum erinaceus* polysaccharides

截留分子质量/kD	10	100	200
多糖截留率/%	96.7	11.6	3.2

### 2.2.2 超滤条件的优化

#### 2.2.2.1 温度对超滤膜通量的影响

在0.1MPa压力、不同温度条件下采用两种膜对猴

头菇多糖超滤100min,结果见图5。图5表明,随着温度的升高,两种膜的膜通量都有大幅的增高。这是因为,温度升高,料液黏度下降,溶液扩散系数和传质系数均增大,因而会降低膜表面的浓差极化致使膜通量增大。在温度达到45℃以后,两种膜的膜通量不再显著增高,所以45℃是合适的超滤温度。

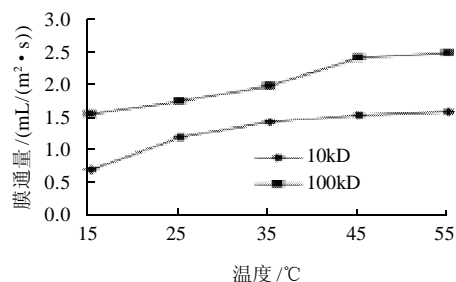


图5 温度对猴头菇多糖超滤膜通量的影响  
Fig.5 Effect of temperature on the permeate flux of *H. erinaceus* polysaccharides

#### 2.2.2.2 压力对超滤膜通量的影响

在45℃、不同压力条件下采用两种膜对猴头菇多糖超滤100min,结果见图6。由图6可知,压力对两种膜的膜通量都有较大的影响,其中10kD膜的膜通量增高4倍以上。在压力达到0.16MPa以后,两种膜的膜通量增加变缓,考虑到能量消耗,确定0.16MPa作为适宜的压力。

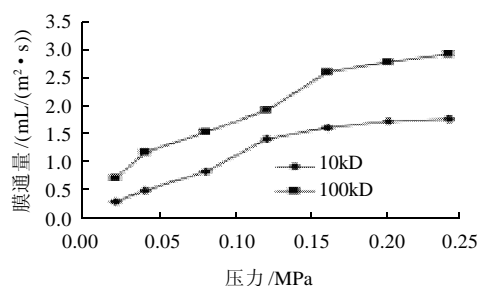


图6 压力对猴头菇多糖超滤膜通量的影响  
Fig.6 Effect of pressure on the permeate flux of *H. erinaceus* polysaccharides

#### 2.2.2.3 pH值对超滤膜通量的影响

选择100kD超滤膜,在45℃、0.16MPa压力条件下对不同pH值的多糖溶液超滤100min,结果见图7。由图7可知,pH5时的膜通量最低。pH值在7~9之间时,膜通量较高且变化不大,是适宜的pH值范围。

选择截留分子质量为10kD和100kD的两种膜,在超滤温度45℃、压力0.16MPa、溶液pH7时,对猴头菇多糖进行超滤分级,得到的多糖纯度为74.2%。

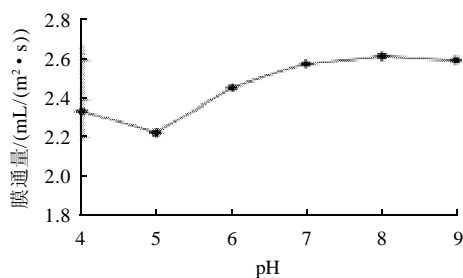


图7 pH值对猴头菇多糖超滤膜通量的影响

Fig.7 Effect of pH on the permeate flux of *H. erinaceus* polysaccharides

### 3 结 论

通过研究表明: HD-3 为适宜的脱色树脂; 超滤工艺中, 先采用 100kD 膜进行超滤, 然后将滤出液用 10kD 的膜超滤, 能得到大部分的纯化多糖。树脂静态脱色工艺为 pH4.5、每 100mL 添加树脂量为 15.0g、脱色 2.5h, 此条件下脱色率和多糖得率分别达到 84.9% 和 83.2%。动态脱色工艺为流速 5BV/h 时, 脱色率和多糖得率都较高, 平均达 83.9% 和 82.3%。最佳超滤工艺为超滤温度为 45℃、压力 0.16MPa、溶液 pH7~9, 得到的猴头菇多糖纯度达 74.2%。采用的树脂脱色和超滤工艺均在常温下进行, 条件温和, 超滤分级过程中无相变, 对多糖的生理活性破坏较小。整个工艺流程简单、方便, 制得的多糖纯度较高, 能适合大规模生产的需要。

### 参考文献:

- [1] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [2] 陈士瑜, 陈蕙. 猴头轶话[J]. 中国食用菌, 1985(4): 40.

- [3] BYUNG K Y, JUN B P, CHI H S. Hypolipidemic effect of an ex o-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericeum erinaceum*[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2003, 67(6): 1292-1298.
- [4] KIM D M, PYUN C W, KO H. G.isolation of antimicrobial sub-stances from *Hericeum erinaceum*[J]. Mycobiology, 2000, 28: 33-38.
- [5] 崔玉海. 猴头菌多糖的分离纯化及活性探讨[J]. 黑龙江医药科学, 2004, 27(4): 18-21.
- [6] 聂继盛, 祝寿芬. 猴头多糖抗肿瘤及对免疫功能的影响[J]. 山西医药杂志, 2003, 32(2): 107-109.
- [7] WANG J C, HU S H, SU C H, et al. Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericeum* spp[J]. Medical Sciences, 2001, 17(9): 461-467.
- [8] MIZUNOT, TETSUYA W, HITOSHI L, et al. Antitumor acitve polysaceharides isolated from the fruiting body of *Hericeum erinaceum*, an edible and medical mushroom called yamabushitake or houtou[J]. Biosci Biochem, 1992, 56(2): 347-348..
- [9] 戴一扬, 程家欣, 余传定, 等. 复方猴头冲剂与雷尼替丁治疗 68 例消化性溃疡疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 1995(5): 32-33.
- [10] 于成功, 徐肇敏, 祝其凯, 等. 猴头菌对实验大鼠胃粘膜保护作用的研究[J]. 胃肠医学, 1999(4): 93-96.
- [11] 唐选训. 联用黄连素、维酶素、猴头菌治疗慢性萎缩性胃炎观察[J]. 广西医学, 1995(4): 355-357.
- [12] WANG J C, HU S H, WANG J T, et al. Hypoglycemic effect of extract of *Hericeum erinaceus*[J]. Science of Food and Agriculture, 2005, 85(4): 641-646.
- [13] 李小定, 荣建华, 吴谋成. 真菌多糖生物活性研究进展[J]. 食用菌学报, 2002, 9(4): 50-58.
- [14] 殷关英, 申建和, 陈琼华. 猴头菇多糖和蛋白多糖的抗凝血和降血脂作用[J]. 生化药物杂志, 1991, 57(3): 36-38.
- [15] 聂继盛, 祝寿芬. 猴头多糖遗传毒性评价及抗突变实验研究[J]. 山西医科大学学报, 2003, 34(1): 33-34.
- [16] 刘曙晨, 张慧娟, 骆传环, 等. 猴头菇多糖的抗辐射作用实验研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 19(5): 328-329.
- [17] 张劲松, 樊华, 李玉祥, 等. 几种药用真菌粗提物对多种人体肿瘤细胞株增殖的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(2): 27-31.
- [18] 宋玉良, 陈建真. 灰树花中多糖含量的测定[J]. 浙江中医学院学报, 2000, 24(6): 67-68.