

深层发酵羊肚菌多糖的提取、 分离及纯化研究

贾建会 吕晓莲 樊利青 北京市食品研究所 100076 T32 A

摘 要 以深层发酵产生的羊肚菌菌丝体和发酵液为主要原料提取羊肚菌多糖,对影响多糖提取率的几个因素分别进行了对比实验,并对多糖进行了纯化及组分测定。

关键词 深层发酵、羊肚菌、多糖、菌丝体、发酵液

Abstract We have gotten Morchella polysaccharide by submerged fermentation, the main material is from Morchella mycelia and fermented liquid. We have made comparative experiments among elements which influence extract rate and purified polysaccharide analysed components of polysaccharide.

Key words Submerged-fermentation Morchella Polysaccharide Mycelia Fermented-liquid

羊肚菌为子囊菌亚门 (*Ascomycotina*) 中最著名的食用菌,属马鞍菌科 (*Helvellaceae*) 羊肚菌属 (*Morchella*)^[1], 在我国的许多地区都有发现的报道。羊肚菌作为著名的食药两用菌,具有极高的营养价值和药用价值,羊肚菌多糖是其中的有效成分之一^[2]。目前研究较多的真菌多糖有:香菇多糖、灵芝多糖、银耳多糖、猴头菇多糖和茯苓多糖等,而有关羊肚菌多糖研究的报道则很少。由于羊肚菌还不能完全进行人工栽培,所以利用野生子实体来提取羊肚菌多

糖不但成本极高,而且原料来源有限,但羊肚菌多糖可以通过深层发酵来培养产生。深层发酵技术具有菌丝体增殖快、生产周期短、产量大等优点,以深层发酵羊肚菌菌丝体和发酵液为主要原料提取羊肚菌多糖可以明显降低成本,提高生产效率。本文就是以深层发酵的羊肚菌菌丝体和发酵液为主要原料对羊肚菌多糖的提取工艺进行了研究,并对多糖进行了纯化测定。

参考文献

- 1 胡嘉鹏. 日式米果的制作与技术 (上、下). 食品工业, 1995 (6): 28~29, 1996 (1): 44~46.
- 2 吕季璋. 米果的加工制作技术. 粮食与食品工业, 1996 (4): 16~33.
- 3 李庆龙. 米果生产与发展研究. 粮食与饲料工业, 2000 (5): 45~47.
- 4 湖北省科学技术委员会编. 早稻品质改良科技产业工程湖北分项目 1999 年度工作总结资料汇编. 1999.
- 5 柯惠玲等. 谷物品质分析. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1989.
- 6 张守文等. 黑龙江省大米糊化特性的研究. 黑龙江商学院学报 (自然科学版), 1996, 12 (4): 1~6.
- 7 R.I. 惠斯特勒等. 王锥文译. 淀粉的化学与工艺学. 北京: 中国食品出版社, 1987.
- 8 李浪等. 淀粉科学与技术. 郑州: 河南科学技术出版社, 1994.
- 9 吴加根. 谷物与大豆食品工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- 10 金时俊. 食品添加剂-现状、生产、性能、应用. 上海: 华东化工学院出版社, 1992.
- 11 吴雪辉等. 复合磷酸盐对面条改良作用的研究. 粮食与饲料工业, 1998 (12): 43~44.
- 12 林家莲等. 添加剂对大米吸水性及米饭品质影响的研究. 中国粮油学报, 2000, 15 (2): 16~19.
- 13 刘钟栋. 食品添加剂原理及应用技术 (第二版). 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- 14 阮文海等. 某些食品辅料对大米淀粉糊化的影响. 淀粉与淀粉糖, 1997 (4): 14~16.

1 材料与提取方法

1.1 供试材料

羊肚菌菌种 (*Ascomycetes Morchella esculenta* (L.) Pers.), 购自中科院微生物所。

1.2 试剂及主要设备

正丁醇、三氯醋酸、氯仿、95%乙醇等 (均为分析纯)

透析袋 (截留分子量 8000~10000)

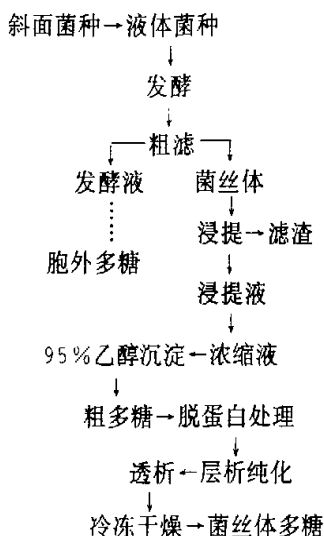
DEAE-Sephadex A-25 和 Sephadex G-200 均为 Pharmacia 公司产品; LABOROTA4000 旋转蒸发器德国 Heidolph; GT-2E 真空冷冻干燥机, 德国产; UV-200 紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; 电热恒温水浴锅, 大连医疗器械厂; FA2004 电子天平, 上海天平仪器厂; DF-D 电泳仪, 北京东方仪器厂

1.3 培养基

斜面种子培养基: 马铃薯 20 g、 K_2HPO_4 0.1 g、 $MgSO_4$ 0.1 g、酵母膏 0.5 g、葡萄糖 2 g、琼脂 2 g, 加水至 100ml。

液体发酵培养基: 6°Bx 麦芽汁 300ml, 30 g 大豆浸提汁 500ml, 葡萄糖 20 g, 混合后加水至 1000ml, 折光为 4°Bx (不足时加葡萄糖补足), pH6.5~6.7。

1.4 发酵羊肚菌多糖的提取、纯化工艺流程



胞外多糖的提取纯化方法同菌丝体浸提液

1.5 粗多糖的提取方法

1.5.1 发酵羊肚菌胞外多糖的提取

羊肚菌菌种接种液体发酵培养基, 摇床培养至菌丝充满培养基 (约需 72h), 过滤。发酵液浓缩至糖度折光为 5 左右, 置透析袋中, 流水透析 40~48h, 透析后折光约为 3.5, 用 3 倍 95% 的乙醇沉淀^[3], 离心分出沉淀物, 沉淀物用无水乙醇洗涤 2 次, 真空冷冻干燥即得发酵液胞外粗多糖。

1.5.2 菌丝体多糖的提取

发酵液过滤产生的菌丝体由蒸馏水洗涤 2 次, 60℃干燥, 得干菌丝体, 每升发酵液得干菌丝体约 22 g, 将干菌丝体粉碎, 加定量热水浸提, 浸提液合并后浓缩, 至糖度折光约为 5 左右, 置透析袋, 流水透析, 以后同 1.5.1。

1.6 粗多糖的纯化

粗多糖经 Sevag 法和三氯醋酸法脱蛋白^[4], 再经过 DEAE-Sephadex A-25 柱层析纯化^[5]。

1.7 多糖的纯度测定

纯度测定采用 Sephadex G-200 凝胶层析^[6] 和醋酸纤维膜电泳^[7]。

1.8 多糖的测定

多糖的总糖含量以苯酚-硫酸法测定^[8]。

2 结果与讨论

2.1 胞外多糖的提取

将发酵液按 1.5.1 的方法提取粗多糖, 每 1000ml 发酵液可得胞外粗多糖 970mg。经测定, 其多糖含量为 72.4%。

2.2 菌丝体多糖提取的最佳工艺条件的确定

利用多糖溶于水或酸、碱溶液而不溶于醇、醚、丙酮等有机溶剂的特点提取多糖, 但由于多糖在酸、碱中易降解^[6], 所以本文利用热水浸提法提取菌丝体中的水溶性羊肚菌多糖, 影响多糖提取率的因素主要有浸提温度、浸提时间、浸提比 (干菌丝与加水量的比例) 等^[8,9], 现针对这些因素对羊肚菌多糖的提取条件进行研究。

2.2.1 浸提温度对菌丝体多糖提取的影响

温度是多糖提取的关键因素之一, 分别设定提取温度为 50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、95℃, 浸提时间 120min, 浸提比为 1:30, 测定提取液中多糖的含量, 结果见图 1。

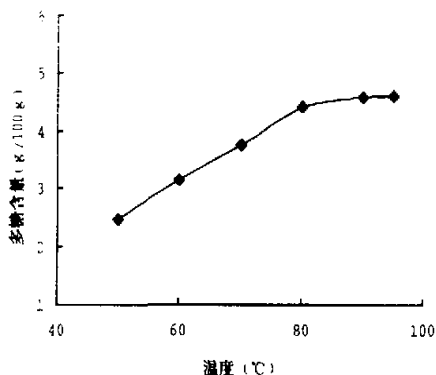


图1 温度对多糖提取的影响

从图1可以看出, 浸提温度对多糖得率的影响很大, 50~80℃之间多糖浸出率上升很快, 80℃~95℃增幅趋于平缓, 因此确定采用90℃作为浸提温度。

2.2.2 浸提时间对多糖提取的影响

设定浸提时间为60min、90min、120min、150min、180min, 浸提温度90℃, 浸提比1:30, 分别测定不

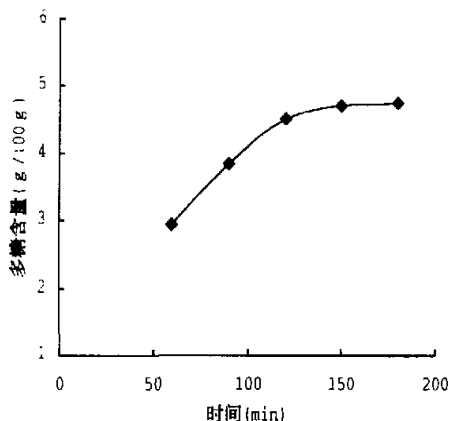


图2 时间对多糖提取的影响

同时间浸出多糖的含量, 结果如图2。

从图2中可以看出, 浸提时间也是影响多糖得率的一个主要因素, 随着浸提时间的延长, 多糖的浸出量也逐渐增多, 到150min后增幅趋缓, 到180min时只略有增多, 故可采用浸提时间为150min。

2.2.3 浸提比对多糖提取的影响

设定浸提比分别为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60, 浸提温度90℃, 浸提时间150min, 测定不同浸提比条件下多糖含量, 结果如图3

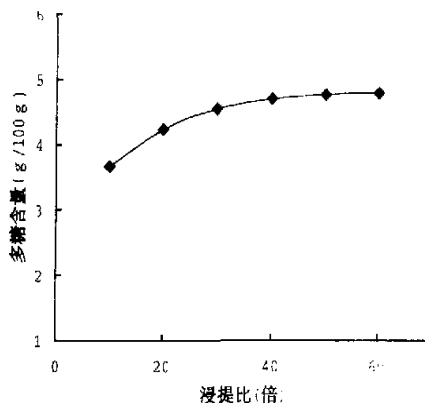


图3 浸提比对多糖提取的影响

从图3中可以看出, 浸提比从1:10到1:30多糖浸出量升幅较快, 以后趋缓, 虽然1:60时多糖浸出量比1:40时略多, 但考虑到浓缩工作量, 故浸提比确定为1:40。

2.2.4 浸提次数对多糖得率的影响

称取20g粉碎菌丝体, 按1:40的比例加入去离子水, 90℃浸提150min, 离心, 上清液浓缩至250ml左右, 测其多糖含量, 沉淀按上述条件再重复提取2次 (共提取3次), 测其多糖含量, 结果如表1

表1 浸提次数对多糖得率的影响

浸提次数	多糖含量 mg	提取率%
1	946.28	89.35
2	90.76	8.57
3	22.03	2.08

从表1中可以看出, 多糖第一次浸提的提取率就能达到89%, 前2次合计提取率达97%以上, 粗多糖得率为5.18 g/100g, 所以本实验确定浸提次数为2次。

综合以上实验结果, 并从经济效益方面考虑, 菌丝体水溶性多糖的提取工艺确定为浸提温度为90℃、浸提时间为150min、浸提比为1:40, 浸提次数为2次, 浸提液浓缩至折光为5左右, 透析40~48h, 加入3倍95%乙醇沉淀, 沉淀物加入少许去离子水溶解, 然后真空冷冻干燥即得粗多糖。按每升发酵液得干菌丝体22g计算, 可得菌丝体粗多糖约1.14g, 粗多糖得率约为5.18 g/100g干菌丝体。

2.3 粗多糖的纯化

由于用乙醇沉淀多糖的同时也会沉淀出一些蛋白质,所以需去除粗多糖中的蛋白质。将粗多糖溶于适量蒸馏水中制成多糖液(糖度折光约为5),加入等量5%三氯醋酸正丁醇溶液,置分液漏斗中振荡分离,分出下层糖液层,重复数次,然后按1:1的比例加入氯仿正丁醇溶液(5:1),置分液漏斗中振荡分离,分出上层糖液层,重复数次,流水透析40~48h除掉小分子物质,浓缩,冷冻干燥,得脱蛋白粗多糖。

称取2g脱蛋白粗多糖溶于40ml 0.1mol/L NaCl溶液中,用DEAE-Sephadex A-25层析柱层析处理,然后梯度洗脱¹⁰,流速控制在1.0ml/min,分部收集,每管8ml,同时用苯酚-硫酸法跟踪检测,得单一峰。根据检测结果合并含糖部分,透析40~48h,浓缩至折光5左右,真空冷冻干燥,得灰白色粉末,收率约为68%。

2.4 纯度鉴定

2.4.1 多糖的醋酸纤维膜电泳

0.025mol/L(pH9.3)硼砂缓冲液,电压250V,醋酸纤维膜2cm×8cm大小,电泳30~40min,甲苯胺蓝染色,漂洗液采用90%乙醇。电泳结果为单一色斑,说明该多糖为均一组分。

2.4.2 葡聚糖凝胶层析

取纯多糖10mg溶于0.8ml 0.1mol/L NaCl溶液中,然后上SephadexG-200层析柱,用0.1mol/L NaCl溶液洗脱,按每管3ml分部收集,控制流速为0.1ml/min,用苯酚-硫酸法检测,以洗脱体积(ml)为横坐标,以吸光值为纵坐标,画出曲线,可以发现出现单一的对称峰,如图4,也说明该多糖为均一组分,纯度很高。

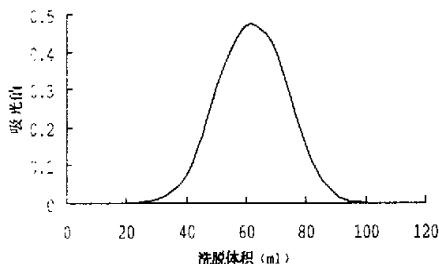


图4 多糖的 Sephadex G-200 柱层析

2.4.3 柱层析后的纯多糖为淡灰白色粉末状,经液相色谱分析,胞外多糖的多糖含量为96.62%,蛋白质含量2.53%,菌丝体多糖的多糖含量95.54%,蛋

白含量3.32%。紫外光谱在260nm处无吸收峰,但280nm处有吸收峰,红外光谱测定结果在1643cm⁻¹有肽链羰基的吸收峰,说明此多糖含有蛋白质。羊肚菌多糖为蛋白-多糖复合物。

2.5 多糖中单糖组份的测定

称取多糖纯品20mg,溶于5ml 2%的H₂SO₄,100℃封管水解8~10h,切开封管,用BaCO₃中和,离心,上清液浓缩处理¹¹,用高压液相色谱分析,结果表明羊肚菌菌丝体多糖和发酵液胞外多糖均由葡萄糖、甘露糖、果糖三种单糖和海藻糖组成,为杂多糖。设定葡萄糖的摩尔数为1.00,其摩尔比分别为:

	葡萄糖	甘露糖	果糖	海藻糖
菌丝体多糖	1.00	1.10	0.43	0.15
胞外多糖	1.00	0.66	0.42	0.03

3 结论

3.1 采用热水浸提菌丝体中的多糖,并确定羊肚菌多糖的提取最佳条件为:浸提温度90℃,浸提时间150min,加水比1:40,浸提次数2次,浸提液浓缩至折光为5左右,透析40~48h,加入3倍95%乙醇沉淀,沉淀物加入少许去离子水溶解,然后真空冷冻干燥即得粗多糖。

3.2 采用Sevag法除蛋白,并用柱层析法对粗多糖进行纯化处理,多糖的纯度达到98%以上。

3.3 羊肚菌多糖由葡萄糖、甘露糖、果糖三种单糖和海藻糖组成,为杂多糖。

3.4 液相色谱、红外和紫外光谱均证明羊肚菌多糖中含有蛋白质,为蛋白-多糖复合物。

今后还将对羊肚菌多糖的结构和生物活性等做进一步详细的研究。

参考文献:

- 黄健屏主编.食用菌栽培学.湖南科学技术出版社,1993.143
- 宋淑敏等.EF-11营养液的研制及其保健作用的试验研究.食品科学,1996,17(7):52~57.
- 曹培让等.金针菇子实体多糖的分离、纯化和分析.生物化学和生物物理学报,1989,21(2):152~156.
- Miyazaki.T.Nishijima.M.Carbohydr. Res.,1982,109:290~299.
- 孙志贤主编.现代生物化学理论与研究技术.军事医学科学出版社,1996.
- 张惟杰.复合多糖生化研究技术.上海科技出版社,1987.6~7,110,211~215.

中草药解酒保健饮料的研究

张会香 刘邻渭 西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西·杨凌 712100

T527 A

摘 要 介绍了以枳椇子、葛根等中草药为主要原料, 研制开发出一种纯天然解酒保健饮料, 优选出饮料的最佳配方, 并对饮料的解酒功能进行了动物实验。

关键词 解酒 保健饮料 功能试验

Abstract The processing technology for both herbal medicinal and edible antialcoholism functional drink with *Hovenia dulcis* Thunb and *Pueraria lobata* (Willd) chwi as the main raw materials was introduced in the paper. Selecting the optimum recipe and making animal experiments for antialcoholism function of drink were reported in the experiment.

Key words Antialcoholism Functional drink Functional experiment

枳椇子为鼠李植物北枳椇 *Hovenias dulcis* Thunb 的种子, 性味甘味酸、平, 无毒, 有清热利尿, 解酒毒之功效, 主治酒病、烦热、口渴、呕吐、二便不利等症^[1]。现代研究表明, 枳椇属植物含皂苷、黄酮、生物碱等成分, 其主要活性成分为达玛烷型三萜皂苷, 有抗脂质过氧化、保肝、解酒毒及抑制中枢神经等多方面的药理作用^[2]。

葛根为豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd) chwi 或甘葛藤 (又名粉葛) *P. thomsonii* Benth 的干燥根。该药始载于《神农本草经》, 味甘、辛、凉, 具有解肌退热、生津、透疹、除烦止渴、升阳止泻等功效。葛根

不但营养丰富, 而且含有大豆甙元, 葛根素等异黄酮类药效成分, 属卫生部批准的药食两用天然植物^[3, 4]。近代药理研究证明, 葛根总黄酮具有降低心肌耗氧量, 增加冠脉、脑血管血流量, 明显缓解心绞痛, 抗心律失常作用^[5]。葛花为野葛的花, 性味甘凉, 用于解酒、醒酒、厌食、呕吐等。葛花解醒汤为汉方中醒酒的代表方剂, 用于酒精中毒、食欲不振等症^[6]。

本试验采用枳椇子、葛根等中草药开发研制出一种复合型纯天然解酒保健饮料, 并对其解酒功能进行动物实验, 报道如下。

7 李建武. 生物化学实验原理和方法. 北京大学出版社, 1997. 75

8 林宇野, 扬红. 食品与发酵工业. 1995 (1): 13~17.

9 吴可, 于宙. 金针菇子实体多糖分离最佳工艺研究. 食品发酵与工业. 1998. 24(4): 5~7.

10 夏尔宁等. 黑木耳多糖的分离、纯化和鉴定. 生物化学和

生物物理学报, 1988. 20(6): 614~617.

11 刘美琴等. 香菇菌丝体多糖的分离鉴定与免疫功能研究. 生物化学和生物物理学报. 1999. 31(1): 46~50.