

# 猫棒束孢真菌多糖提取工艺研究

杨喜花,任连生\*,赵莉莉,白喜花

(山西省肿瘤医院比较医学部,山西太原 030013)

**摘要:**为优化猫棒束孢真菌多糖提取工艺,采用液体发酵法培养猫棒束孢菌丝体,采用水溶醇沉法提取猫棒束孢真菌多糖,采用苯酚-硫酸比色法测定多糖含量,通过单因素实验和  $L_9(3^3)$  正交实验,确定猫棒束孢真菌多糖的最佳提取工艺条件为:水料比 6:1,提取液浓缩至原料重量的 2 倍,加入浓缩液 4 倍的无水乙醇,在此条件下多糖的提取率为 16.24%。

**关键词:**猫棒束孢,多糖,提取工艺

## Extraction technology of polysaccharide from *Isaria felina*

YANG Xi-hua, REN Lian-sheng\*, ZHAO Li-li, BAI Xi-hua

(Department of Comparative Medicine, Shanxi Cancer Institute, Taiyuan 030013, China)

**Abstract:** *Isaria felina* was a new strain of *Cordyceps sinensis* that had been separated from the fructification of natural *Cordyceps sinensis*. The purpose of this article was to study the optimum extraction technology of polysaccharide from *Isaria felina*. The method of liquid fermentation was used to culture *Isaria felina*, the method of water extraction and alcohol precipitate was used to isolate polysaccharide from the mycelium of *Isaria felina*, and the method of phenol-sulfuric acid was used to determine the content of polysaccharide. Through the single factor and orthogonal test, result showed that the optimum extraction conditions were as follows: the ratio of water and mycelium powder was 6:1, the extract was concentrated to twice the weight of mycelium powder and the ethanol ratio was four times the volume of the concentrated extract. Under this condition, the extraction rate of polysaccharides was 16.24%.

**Key words:** *Isaria felina*; polysaccharide; extraction technology

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)11-0248-03

真菌多糖是从真菌菌丝体及其发酵液中分离出的代谢产物,是一类由 10 个以上的单糖以糖苷键连接而成的天然高分子多聚物。真菌多糖能够控制细胞分裂分化,具有很强烈的抗肿瘤抗病毒抗炎抗突变抗凝血抗衰老抗辐射,健胃护肝降血脂降血糖抗血栓,提高免疫力等多种生物活性,被开发成多种药物和功能性食品添加剂<sup>[1-5]</sup>。猫棒束孢是从天然冬虫夏草子实体中经菌种分离后培养得到的一株真菌,经中国科学院微生物研究所郭英兰教授鉴定为 *Isaria felina* (DC.: Fr.) Fr., 是一种新的冬虫夏草菌种,已被中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏(保藏号:CGMCC NO.0706)。前期研究表明,猫棒束孢真菌多糖具有很好的保护肾脏的作用,本文主要研究猫棒束孢真菌多糖的提取工艺,以期猫棒束孢真菌多糖的研究开发提供科学的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

猫棒束孢菌种 由山西省肿瘤医院动物室保

存;浓硫酸(分析纯) 太原化肥厂化学试剂厂;苯酚(分析纯) 天津市神泰化学试剂有限公司;葡萄糖(分析纯) 合肥亿成实验仪器有限公司;无水乙醇(分析纯) 天津市福晨化学试剂厂。

LIBROR AEG-220 电子天平 日本岛津公司;不锈钢电热恒温水浴锅 北京市医疗设备厂;KDC-2044 低速冷冻离心机 科大创新股份有限公司;DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海飞越实验仪器有限公司;721 紫外可见分光光度计 上海第三分析仪器厂。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 猫棒束孢真菌培养方法** 将 500mL 培养基(蛋白胨 0.6%, 酵母膏 1.2%, 蔗糖 2.4%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%) 装于 3000mL 三角瓶中,牛皮纸封口,125℃ 高压灭菌 40min,冷却至室温,接入菌种,置于 180r/min 摇床上,于 23~27℃ 条件下旋转发酵培养 72h,收集发酵液,将发酵液于 2000r/min 离心 5min,收集菌丝体,将菌丝体于 80℃ 烘干后粉碎,过 100 目筛。

**1.2.2 多糖提取方法** 采用水溶醇沉法提取猫棒束孢真菌多糖。在猫棒束孢菌丝粉中加入一定量的蒸馏水,沸水浴提取,离心取上清液,再重复提取 2 次,合并三次提取的上清液,将上清液浓缩后加入适量无水乙醇,用力振荡,沉淀过夜,将沉淀于 80℃ 干燥,

收稿日期:2012-11-02 \* 通讯联系人

作者简介:杨喜花(1980-),女,在读博士,讲师,研究方向:真菌多糖。

基金项目:山西省实验动物专项资金项目(2012K05)。

得猫棒束孢真菌多糖。

**1.2.2.1 单因素实验 水料比的确定:**精确称取猫棒束孢菌丝粉 5.000g 四份,放入锥形瓶中,分别加入蒸馏水 15、20、25、30mL,放入恒温水浴锅中沸水浴提取三次,提取时间分别为 60、30、30min, 3000r/min 离心,合并三次提取的上清液,将上清液浓缩至菌丝粉重量的 2 倍,加入浓缩液 3 倍体积的无水乙醇,沉淀过夜。将沉淀于 80℃ 烘干后称重,测定多糖提取率。**浓缩倍数的确定:**精确称取猫棒束孢菌丝粉 5.000g 四份,分别放入四个锥形瓶中,加入蒸馏水 20mL,放入恒温水浴锅中沸水浴提取三次,提取时间分别为 60、30、30min, 3000r/min 离心,合并三次提取的上清液,分别浓缩至菌丝粉重量的 2、3、4、5 倍,加入浓缩液 3 倍体积的无水乙醇,沉淀过夜。将沉淀于 80℃ 烘干后称重,测定多糖提取率。**无水乙醇加入量的确定:**精确称取猫棒束孢菌丝粉 5.000g 四份,分别放入四个锥形瓶中,加入蒸馏水 20mL,放入恒温水浴锅中沸水浴提取三次,提取时间分别为 60、30、30min, 3000r/min 离心,合并三次提取的上清液,浓缩至菌丝粉重量的 2 倍,分别加入浓缩液体积 2、3、4、5 倍的无水乙醇,沉淀过夜。将沉淀于 80℃ 烘干后称重,测定多糖提取率。

**1.2.2.2 正交实验 设计  $L_9(3^3)$  三因素三水平正交实验,实验因素与水平表,见表 1。**

表 1 正交实验因素与水平表

Table 1 The factors and levels of the orthogonal test

水平	因素		
	A 水料比	B 浓缩比 (倍)	C 无水乙醇比 (倍)
1	4:1	2	2
2	5:1	3	3
3	6:1	4	4

**1.2.3 葡萄糖标准曲线的制作** 精密称取干燥至恒温的葡萄糖 1.000g,于 50mL 容量瓶中,定容,摇匀。再从容量瓶中精确吸取 2.5mL 葡萄糖溶液于另一 50mL 容量瓶中,定容,摇匀,静置备用。

分别精确吸取葡萄糖溶液 0、0.04、0.08、0.16、0.32、0.64mL 于 6 只具塞试管中,分别加蒸馏水至 2mL,加 5% 苯酚溶液 1mL、浓硫酸 5mL,摇匀,冷却,静置 30min。于 490nm 测吸光度,以蒸馏水为空白对照。以吸光度为纵坐标,葡萄糖含量为横坐标,绘制标准曲线,求得回归方程为  $A = 0.004X - 0.04$ ,  $r = 0.9987$  ( $A$  为吸光度,  $X$  为葡萄糖含量,单位: g/mL)。

**1.2.4 测定方法 硫酸-苯酚法<sup>[6]</sup>:**硫酸-苯酚法是测定多糖的常用方法。其多糖类成分在硫酸作用下,先水解成单糖,并迅速脱水生成糖和苯酚缩合成有色化合物,用分光光度法于适当波长处进行测定。

取一定量的多糖,溶解,定容至 50mL,配成多糖溶液。取一定体积多糖溶液,加蒸馏水至 2mL,加 5% 苯酚溶液 1mL、浓硫酸 5mL,摇匀,放置冷却到室温,于 490nm 测其吸光度,以蒸馏水做空白对照。再根据葡萄糖标准曲线计算多糖的提取率。

多糖提取率 (%) =  $X \times$  稀释倍数  $\times$  溶液体积

(mL)/猫棒束孢菌丝粉质量(g)  $\times 100$

式中,  $X$  为在吸光度  $A$  下根据回归方程计算所得的值。

## 2 结果与分析

### 2.1 水料比对猫棒束孢真菌多糖提取率的影响

水料比对猫棒束孢真菌多糖提取率的影响见图 1。由图 1 可见,在一定范围内,随着水料比的增加,多糖提取率不断增加,但多糖提取率增加幅度越来越小,当水料比为 6:1 时,提取率为 15.61%,当水料比为 7:1 时,猫棒束孢真菌多糖提取率最高,为 15.72%。由于水料比太大不利于后期浓缩处理,因此提取时水料比应适当,我们选择最佳水料比为 6:1。

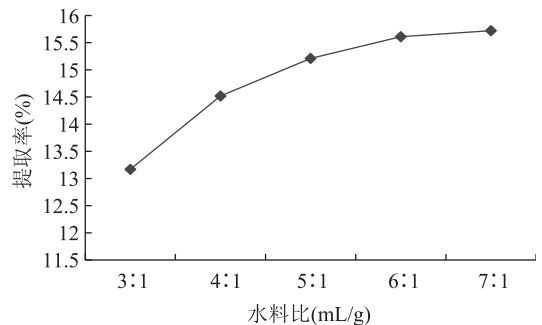


图 1 水料比对提取率的影响

Fig.1 Effect of ratio of water to material on yield of polysaccharides

### 2.2 浓缩倍数对猫棒束孢真菌多糖提取率的影响

浓缩倍数对猫棒束孢真菌多糖提取率的影响见图 2。由图 2 可见,随浓缩倍数的增大,猫棒束孢真菌多糖提取率逐渐下降,当浓缩倍数为 2 倍时,猫棒束孢真菌多糖提取率最高,为 15.57%。这是由于浓缩倍数越小,多糖成分越集中,当加入无水乙醇时越容易聚集,越有利于沉淀;而且浓缩倍数越高,醇沉时需要的无水乙醇越多,因此浓缩倍数为 2 倍时较佳。

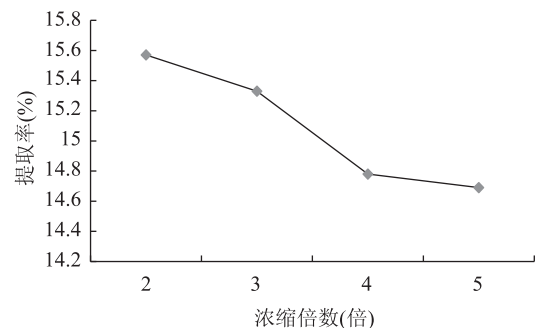


图 2 上清液浓缩倍数对粗多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of supernatant concentration on yield of polysaccharides

### 2.3 无水乙醇加入量对猫棒束孢真菌多糖提取率的影响

无水乙醇加入量对猫棒束孢真菌多糖提取率的影响见图 3。由图 3 可见,猫棒束孢真菌多糖的提取率随无水乙醇加入量的增加而增加;当无水乙醇加入量达到浓缩液体积 4 倍时,多糖提取率为 16.17%,

之后多糖提取率增加变缓;当无水乙醇加入量为浓缩液体积的5倍时,猫棒束孢真菌多糖提取率最高,为16.21%,因此选择乙醇加入量为浓缩液体积的4倍。这是由于较高的乙醇比能提高多糖提取率,但乙醇比过高会导致部分多糖分子与醇溶蛋白结合,从而溶于乙醇中不被沉淀。

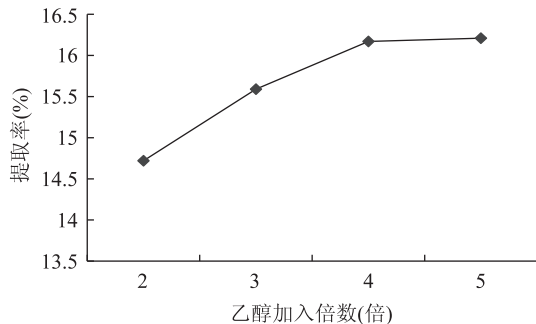


图3 乙醇加入倍数对提取率的影响

Fig.3 Effect of absolute ethyl alcohol addition on yield of polysaccharides

## 2.4 正交实验结果

正交实验结果见表2。由表2可见,根据极差分析结果可知: $R_A > R_C > R_B$ ,即影响多糖提取的主次顺序为:水料比(A) > 无水乙醇比(C) > 浓缩比(B),最佳工艺提取条件为 $A_3B_1C_3$ ,即水料比为6:1,提取液浓缩至原料重量的2倍,并加入浓缩液4倍无水乙醇。

为了验证上述结果的准确性,重复最佳组合 $A_3B_1C_3$ 实验,多糖得率为16.24%,与正交实验结果基本吻合,因此可以证明优化实验具有合理性。

## 3 结论

本实验采用硫酸-苯酚法对猫棒束孢真菌多糖的含量进行了测定,由单因素实验及正交实验结果可知,猫棒束孢真菌多糖最佳提取工艺条件为:水料比为6:1,提取液浓缩至原料重量的2倍,并加入浓缩液4倍无水乙醇,其提取率最高。该条件下多糖得率达16.24%。猫棒束孢真菌多糖提取工艺条件的优化为进一步研究其生物学功能奠定了基础。

(上接第247页)

- [9]江洪波,雷挺.桑叶叶蛋白提取工艺的研究[J].农产品加工学刊,2007(12):19-21.
- [10]刘静,荣永海,王志滨,等.罗汉果有效成分的连续提取与分离[J].中药材,2010,33(4):629.
- [11]Gunawan E R, Basri M A, Basyaruddin A R M, et al. Study on response surface methodology of lipase catalyzed synthesis of plam-based wax ester [J]. Enzyme Microb Technol, 2005, 37(1):739.
- [12]胡纱纱,汪一红,陈娟娟,等.响应面法优化黄连木多糖酸提取工艺的研究[J].食品工程,2009(1):104-108.
- [13]邹鲤岭,李昌盛.响应面法优化米糠蛋白提取工艺[J].粮食与饲料工业,2008(10):22-23.
- [14]张帅,张培宜,冯翠萍.板栗蛋白质的提取及多肽的制备[J].山西农业大学学报,2011,31(1):73-76.

表2  $L_9(3^3)$  正交实验实验结果

Table 2 The result of the orthogonal test

实验号	A	B	C	提取率(%)
1	1	1	1	12.88
2	1	2	2	13.69
3	1	3	3	13.58
4	2	1	3	15.79
5	2	2	2	15.84
6	2	3	1	13.21
7	3	1	3	16.24
8	3	2	1	14.27
9	3	3	2	14.96
$K_1$	40.15	44.91	40.36	
$K_2$	44.48	43.80	44.44	
$K_3$	45.47	41.75	45.66	
$k_1$	13.38	14.97	13.45	
$k_2$	14.95	14.60	14.81	
$k_3$	15.16	13.92	15.22	
R	1.78	1.05	1.77	

## 参考文献

- [1] Hikino H, Konno C, Mirin Y, et al. Isolation and Hypoglycemic Activity of Ganoderans A and B, Glycans of Ganoderma lucidum Fruit Bodies I [J]. Planta Med, 1985, 51(4):339-340.
- [2] 胡晶, 吴宏. 当归多糖对小鼠外周血造血干细胞动员作用的研究[J]. 中草药, 2006, 37(12):1835-1838.
- [3] Jiang J H, Slivova V, Harvey K, et al. Ganoderma lucidum suppress growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF- $\kappa$ B signaling [J]. Nutr Cancer, 2004, 49(2):209-216.
- [4] 邓宇, 窦晓兵, 史亦谦, 等. 黄芪多糖定向诱导脐血来源树突状细胞及其对T细胞增殖作用的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(6):539-544.
- [5] 赵睿, 高永翔. 黄芪多糖的免疫调节作用研究进展[J]. 中医临床研究, 2012, 4(5):4-6.
- [6] 高丽君, 王汉忠, 崔健华, 等. 苯酚-硫酸法测定白首乌中多糖含量[J]. 山东农业大学学报, 2004, 35(2):295-297.
- [7] 李洪波, 雷挺. 桑叶叶蛋白提取工艺的研究[J]. 农产品加工学刊, 2007(12):19-21.
- [8] 刘静, 荣永海, 王志滨, 等. 罗汉果有效成分的连续提取与分离[J]. 中药材, 2010, 33(4):629.
- [9] Gunawan E R, Basri M A, Basyaruddin A R M, et al. Study on response surface methodology of lipase catalyzed synthesis of plam-based wax ester [J]. Enzyme Microb Technol, 2005, 37(1):739.
- [10] 胡纱纱, 汪一红, 陈娟娟, 等. 响应面法优化黄连木多糖酸提取工艺的研究[J]. 食品工程, 2009(1):104-108.
- [11] 邹鲤岭, 李昌盛. 响应面法优化米糠蛋白提取工艺[J]. 粮食与饲料工业, 2008(10):22-23.
- [12] 张帅, 张培宜, 冯翠萍. 板栗蛋白质的提取及多肽的制备[J]. 山西农业大学学报, 2011, 31(1):73-76.
- [13] 无锡轻工学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1993.
- [14] 邓红, 田芸芸, 田子卿, 等. 响应曲面法优化文冠果种仁蛋白的碱溶酸沉提取工艺[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8):197-200.
- [15] 朱兴一, 顾艳芝, 谢捷, 等. 闪式提取红茶中茶黄素的工艺研究[J]. 食品科技, 2012, 37(8):189-192.
- [16] 张鸣镛, 王章存. 响应面分析法优化玉米胚芽蛋白的提取工艺研究[J]. 农产品加工, 2008, 142(7):174-177.
- [17] ABD EL-AAL M H, HAMZA M A. Invitro digestibility, physico-chemical and functional properties of apricot kernel Proteins [J]. Food Chemistry, 1986(19):197-211.
- [18] 刘廷彦. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物, 2007, 5(6):401-407.