

姬松茸胞内多糖提取工艺的研究^①

邹 祥^{1,2}, 胡昌华¹, 章克昌²

1. 西南师范大学 现代生物医药研究所, 重庆 400715;

2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 发酵技术国家工程研究中心, 江苏 无锡 214036

摘要: 采用单因子试验和正交试验组合优化, 对姬松茸菌丝体胞内多糖提取工艺进行了研究, 单因子试验表明姬松茸胞内多糖提取工艺为: 组织捣碎、水提、提取 3 次, 正交试验优化组合结果为温度 90 ℃, 时间 4 h, 料水比 1:25, 在此最佳提取工艺条件下, 姬松茸胞内多糖提取得率为 $(2.1 \pm 0.1) \text{ mg/g}$ 湿菌体(含水量 87%), 具有一定的实际生产意义。

关键词: 姬松茸; 胞内多糖; 提取

中图分类号: Q819

文献标识码: A

姬松茸(*Agaricus blazei* Murill), 又名巴西蘑菇, 是一种珍稀食药食用菌, 近年来国内外研究发现姬松茸子实体中含有丰富的抗肿瘤活性多糖^[1]、抑制肿瘤血管生成药物成分麦角甾醇等^[2]活性成分, 具有广阔的开发价值和空间。深层培养技术是目前药用真菌实现产业化的主要方式, 它可以克服传统的固体栽培存在生产周期长、产量低、难以实现工业化等缺点, 通过深层培养技术生产的真菌多糖主要有胞外多糖和菌丝体胞内多糖。胞内多糖也是多糖类有效活性成分之一^[3]。影响真菌菌丝体胞内多糖提取得率的因素很多^[4], 如菌体破碎方法(超声波、机械法等)、提取溶剂的选择、提取温度、提取时间等, 必须通过大量实验进行探索才能确定最佳工艺参数, 而有关姬松茸多糖多从子实体中提取^[5,6], 从深层培养姬松茸菌丝体中提取活性多糖报道较少, 因此有必要对胞内多糖的提取工艺进行研究。本文主要以姬松茸胞内多糖得率为考察指标, 对影响深层培养姬松茸菌丝体胞内多糖提取收率的一些关键因素进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 姬松茸(*Agaricus blazei* Murill AB-2)

由江南大学生物资源实验室筛选保存。

1.1.2 主要仪器

RE-52CS 旋转蒸发器(上海本玻仪器有限公司); LXJ-II 型离心沉淀机(上海医用分析仪器厂); 高速组织捣碎机(江苏江阴科研器械厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 姬松茸菌丝体胞内多糖提取工艺流程

将通过深层培养获得的同一批次的姬松茸菌丝体用蒸馏水冲洗干净后, 称取一定量的湿菌丝体, 按一定的料水比加入自来水, 用组织捣碎机将菌丝球捣碎, 按照设计的工艺参数进行热水浴加热浸提, 提取若干次, 提取液离心沉淀, 上清液合并, 蒸发浓缩后按比例加入 95% 的乙醇, 到乙醇浓度 60%, 冰箱静置过夜, 离心, 沉淀用蒸馏水溶解并定容到 25 mL, 然后用苯酚-硫酸法^[7]测多糖含量。

① 收稿日期: 2003-09-18

作者简介: 邹 祥(1976-), 男, 湖北仙桃人, 讲师, 主要从事生物药物过程工程的研究和教学工作。

通讯作者: 章克昌, 教授, 博士生导师。

1.2.2 胞内多糖得率的计算

$$\text{胞内多糖得率} = \text{多糖质量} / \text{湿菌体质量} (\text{mg/g})$$

2 结果与分析

2.1 预处理方式对胞内多糖得率的影响

对菌丝体胞内多糖提取预处理常见有组织捣碎机捣碎、超声波破碎等形式,组织捣碎机是利用高速旋转的刀片将菌丝球打碎并与水形成悬浊液,以缩短固体或细胞内部溶质分子向其表面扩散的距离,但不能破碎细胞壁.而超声波破碎是在组织捣碎之后继续对菌体的细胞壁进行破坏,更易于细胞壁物质的溶解,从而使目标产物更好地溶出.本实验条件为:料水比值 1:30,温度 90 ℃,提取 2 次,时间均为 4 h,选择无预处理、组织捣碎、超声波破碎 3 种预处理方式.结果表明(图 1),组织捣碎和超声波破碎对胞内多糖得率影响近乎相同,但均优于无预处理方式,考虑到提取成本及能耗,本实验选择以组织捣碎为宜.

2.2 提取次数对胞内多糖得率的影响

在料水比值为 1:10 和 1:35 的实验条件下,考察提取次数对多糖得率的影响.实验结果表明(图 2),提取次数直接影响胞内多糖的得率,第 4 次提取,粗多糖得率已处于较低水平,而过度增加提取次数,反而会使后续操作的压力增大、生产效率下降,因此提取次数以 3 次为宜.

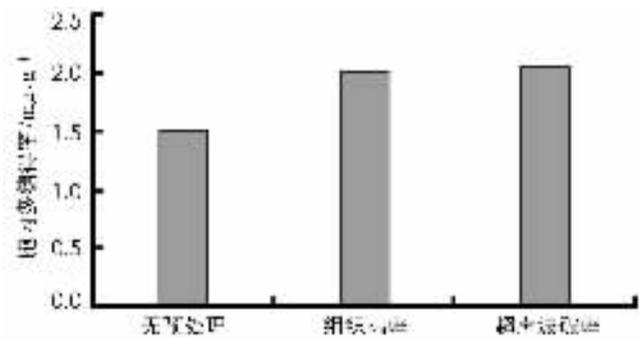


图 1 预处理方式对胞内多糖得率的影响

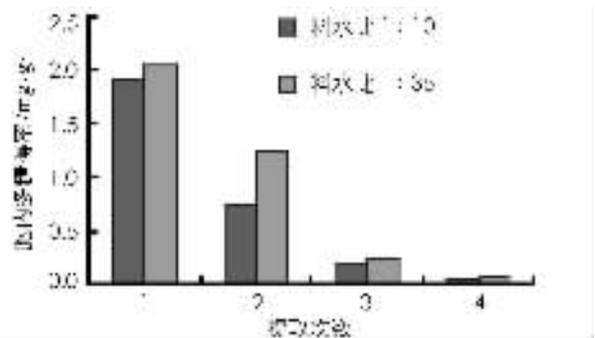


图 2 提取次数对胞内多糖得率的影响

Fig.1 Effect of Pretreatment Mode on the Yield of IPS

Fig.2 Effect of Extracting Times on the Yield of IPS

2.3 提取剂对胞内多糖得率的影响

提取剂的不同对体系中多糖的溶解度有显著的影响,本实验选择自来水、NaOH、草酸铵为提取剂,实验结果表明(图 3),用 0.1 mol/L NaOH 提取姬松茸胞内多糖,效果明显优于用水提取的胞内多糖,但提取液颜色偏深,给下一步精制带来困难,据已有的报道^[6],草酸铵提取姬松茸子实体多糖,效果与水提法相近,本实验结果表明,采用不同浓度的草酸铵能提高粗多糖的得率,但存在多糖中夹杂部分草酸铵的缺点,考虑到本课题研究目标限于水溶性多糖,以水为提取剂最为经济可行,因此,本实验仍选择自来水为提取剂.

2.4 提取温度对胞内多糖得率的影响

温度直接影响物质在水中的溶解度,对多糖得率有显著的影响,本实验选择不同温度为考察指标,结果表明(图 4).提取温度在 70 ℃至 100 ℃之间,随着温度的增加多糖得率增加显著,温度对多糖提取得率影响较大,考虑到能耗及维护多糖的结构稳定性,提取温度应控制在 90 ℃左右为宜.

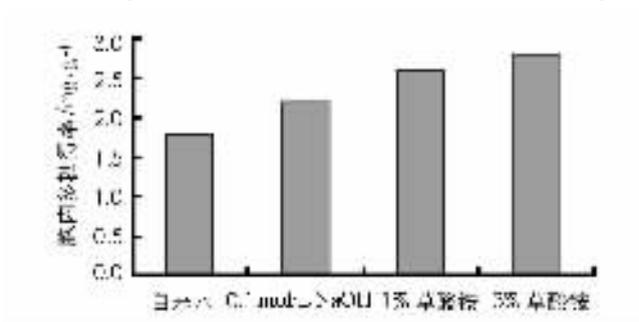


图 3 提取剂对胞内粗多糖得率的影响

Fig.3 Effect of Impregnant on the Yield of IPS

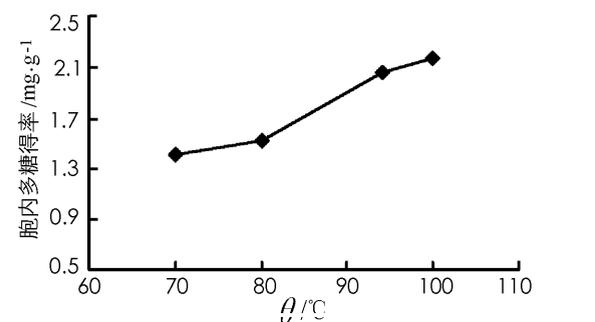


图 4 热水温度对粗多糖得率的影响

Fig.4 Effect of Hot Water Temperature on the Yield of IPS

2.5 提取时间对胞内多糖得率的影响

在 94 °C 条件下，提取 2 次，以 1:25 的料水比研究提取时间对多糖得率的影响规律，由图 5 可见，在时间低于 3 h 时，得率随提取时间的延长增加很快，超过 3 h 后则增加缓慢。这表明，产物溶解于水有个过程，时间过短，产物溶解不充分，但时间过长，又易引起产物结构的破坏和生物活性的丧失，并使生产效率降低。综合以上方面考虑，提取时间以 3~4 h 为好。

2.6 料水比对胞内多糖得率的影响

限于多糖、糖蛋白、蛋白质等生物大分子物质的溶解度，浸取过程的用水量是限制多糖得率的重要因素，从图 6 可以看出，改变不同的料水比，在同一条件下，提取 2 次，随着料水比的增加，胞内多糖得率在 1:30 达到峰值，因此，选择料水比 1:30 较为适宜。

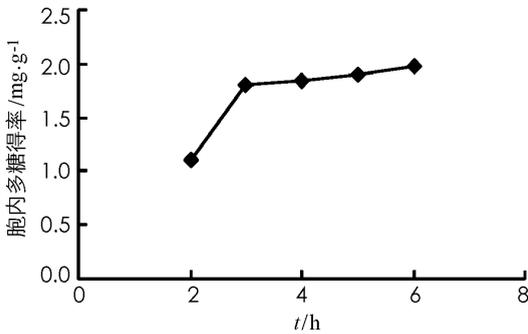


图 5 提取时间对胞内多糖得率的影响

Fig.5 Effect of Extracting Time on the Yield of IPS

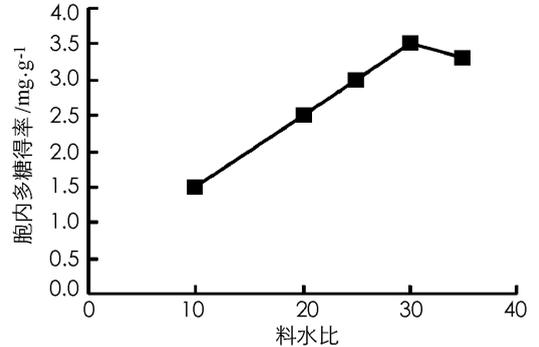


图 6 料水比对胞内多糖得率的影响

Fig.6 Effect of Adding Water Ratio on the Yield of IPS

2.7 胞内多糖热水提取工艺的正交试验

根据以上各单因素试验结果，确定温度、时间、料水比为热水浸取过程中影响胞内多糖得率最显著的 3 个因素，选取 3 因素的较优水平，按 L₉(3⁴) 正交表设计试验，因素水平表如表 1、表 2 所示。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 The Factors and Levels of Orthogonal Test

水 平	因 子		
	A 温度/°C	B 时间/h	C 料水比 v/w
1	80	2	25
2	90	3	30
3	100	4	35

表 2 正交试验结果

Table 2 Result Analysis of Orthogonal Experiment

试 验	A 温度/°C	B 时间/h	C 料水比	胞内多糖得率/mg·g ⁻¹
1	I(80)	I(2)	I(25)	1.29
2	1	Ⅱ(3)	Ⅰ(30)	1.75
3	1	Ⅲ(4)	Ⅲ(35)	1.6
4	Ⅱ(90)	1	2	1.28
5	2	2	3	1.66
6	2	3	1	2.13
7	Ⅲ(100)	1	3	1.61
8	3	2	1	1.66
9	3	3	2	1.64
k1	1.55	1.39	1.69	
k2	1.69	1.69	1.56	
k3	1.63	1.79	1.62	
r 值	0.14	0.40	0.13	

以胞内多糖得率为考察指标,由极差分析以及图7的试验因素指标趋势可见,3个因素的主次顺序为 $B > A > C$,最优组合为 A2B3C1,即最佳提取工艺条件为:温度 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$,时间 4 h,料水比 1:25,在此最优条件下重复 3 次试验,得到姬松茸最终胞内多糖提取得率(2.1 ± 0.1)mg/g 湿菌体(含水量 87%)。

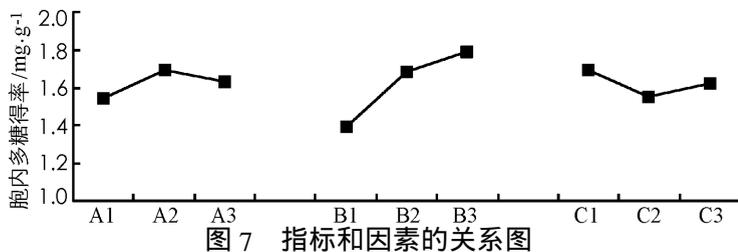


图7 指标和因素的关系图

Fig.7 Relation between Figures and Factors

3 讨 论

提取工艺的选择是生物工业产业化的重要环节,直接影响最终产品收率和产业化前景,本文对姬松茸胞内多糖提取工艺的研究,旨在探索一条工业化可行的提取路线,为姬松茸产业化作前期准备,研究结果表明姬松茸菌丝体胞内多糖提取工艺为:水提、组织捣碎、提取 3 次、温度 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、时间 4 h、料水比 1:25,在此最适提取工艺条件下,菌丝体提取液颜色较浅,进一步分离纯化无需脱色处理,符合工业化工艺要求,菌丝体胞内多糖提取得率为(2.1 ± 0.1)mg/g 湿菌体(含水量 87%),而且正交试验数据是 1 次提取的结果,在多次提取的情况下,姬松茸胞内多糖的产量还会进一步提高,因此本研究具有一定的实际生产意义.在实际工业化提取多糖工艺时,对提取液浓缩、提取工段的优化组合、提取溶剂的重复利用率等需全盘考虑,从而为实际生产寻求最佳工艺化参数。

参考文献:

- [1] 黄年来. 姬松茸及药效[J]. 江苏食用菌, 1994, (3): 29-31.
- [2] Takeshi T, Mizuno T, Komuto M, et al. Isolation of an Antitumor Compound From *Agaricus blazei* Murill and its Mechanism of Action [J]. J Nutr, 2001, 131(5): 1409-1413.
- [3] 刘志诚,于守洋. 营养与食品卫生学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 1991, 37-38.
- [4] 贾薇,郭倩,周昌艳. 姬松茸多糖提取方法初探[J]. 食用菌学报, 2001, (1): 43-45.
- [5] 杨梅. 姬松茸多糖提取方法的研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 1998, 14(1): 85-89.
- [6] 沈爱英,谷文英. 姬松茸子实体水溶性多糖提取工艺的研究[J]. 中国食用菌, 2001, 2(1): 15-18.
- [7] 张惟杰. 复合多糖生化技术[M]. 上海:上海科技出版社, 1987. 21.

Studies on Extracting Process of Intracellular Polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill

ZOU Xiang^{1,2}, HU Chang-Hua¹, ZHANG Ke-Chang²

1. Institute of Modern Biopharmaceuticals, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China;

2. The key Laboratory of Industry Biotechnology Under Ministry of Education, Engineering Research Center of Fermentation Technology, Southern Yangtze University, Wuxi Jiangshu 214036, China

Abstract: Extracting process of intracellular polysaccharide (IPS) from *Agaricus blazei* Murill was investigated, using the methods of single factors test and orthogonal design test. The results showed that the optimal extracting process was organizing mashing, water extraction, extraction three times by single factors test and temperature $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, extraction time 4 h, ratio of mycelium and water 1:25 by orthogonal design test. Under the optimal extracting conditions, extracting yield of IPS from *Agaricus blazei* Murill was (2.1 ± 0.1)mg/g damp mycelium (containing water concentration 87%).

Key words: *Agaricus blazei* Murill; intracellular polysaccharide; extract