

猪苓发酵菌丝胞内多糖提取工艺研究

周元¹, 梁宗锁^{1,2}

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省中药指纹图谱与天然产物研究中心, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】优化猪苓发酵菌丝胞内多糖的提取工艺,以提高猪苓胞内多糖浸提的得率。【方法】通过单因素试验、正交试验和对比试验确定猪苓发酵菌丝胞内多糖的浸提方法、辅助浸提方法和除蛋白方法。【结果】与水浸提相比,弱碱性溶剂浸提猪苓菌丝胞内多糖的效果更好,具体工艺参数为:按料液比1:40添加40倍体积pH=11的NaOH,90℃浸提4次,每次60min;酶解辅助法和超声波辅助法可有效提高猪苓发酵菌丝胞内多糖的浸提得率,其中酶解辅助浸提的效果更好,其最佳工艺参数为:复合酶配比为 $m(\text{纤维素酶}):m(\text{果胶酶})=1:1$,复合酶用量为10mg/g,酶解80min;蛋白酶和Sevag配合的除蛋白方法,是去除猪苓胞内蛋白的最佳方法。【结论】猪苓发酵菌丝胞内多糖的最适提取工艺流程为:猪苓菌丝干粉—添加10mg/g复合酶[$m(\text{纤维素酶}):m(\text{果胶酶})=1:1$]和40倍体积蒸馏水—50℃酶解80min—NaOH溶液调pH=11,90℃浸提4次,每次60min—浸提液合并、浓缩—HCl溶液调pH=6.5—蛋白酶酶解1h—85℃酶灭活—Sevag除蛋白至无蛋白检出—浓缩—醇沉—干燥。

【关键词】猪苓;胞内多糖;提取工艺;辅助浸提;蛋白酶

【中图分类号】S567.3+9.092

【文献标识码】A

【文章编号】1671-9387(2008)06-0219-09

Extraction methods of polysaccharides from the fermentation mycelium of *Polyporus umbellatus*

ZHOU Yuan¹, LIANG Zong-suo^{1,2}

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Research Center in TCM Fingerprint & NP Library, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to maximize the yield of intracellular polysaccharides (IPS) extracted from *Polyporus umbellatus*. 【Method】The solvent extraction, assistant treatments and the methods of protein removing were studied by single-factor tests, orthogonal experiments and comparison tests. 【Result】The results indicated that the optimal extraction conditions of IPS were pH=11 solvent, temperature of 90℃, 4 times extraction, and 60 min each time respectively. And the extraction rates of IPS were enhanced by enzyme treatment and ultrasonic-assisted treatment before hot-water extraction, and the optimal conditions of enzyme treatment were $m(\text{Cellulase}):m(\text{Pectinase})=1:1$, enzyme dosage of 10 mg/g, and time of 80 min. Furthermore, this study also indicated that the protein of crude polysaccharide which was treated with proteinase was easy to be removed by Sevag method. 【Conclusion】The most suitable extraction process of polysaccharides from *Polyporus umbellatus* was gained from this study, that is 10 mg/g compound enzyme [$m(\text{Cellulase}):m(\text{Pectinase})=1:1$] treated dry mycelium for 80 min in 40 (m/V) distilled water, temperature at 50℃; then adjusted pH to 11 with NaOH, extracted at 90℃ for 4 times, 60

* [收稿日期] 2008-03-14

[基金项目] 教育部新世纪优秀人才支持计划项目;西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目

[作者简介] 周元(1979—),女,新疆哈密人,在读博士,主要从事药用真菌发酵技术研究。

[通讯作者] 梁宗锁(1965—),男,陕西扶风人,教授,博士生导师,主要从事中草药规范化栽培理论与技术研究。

E-mail: liangzs@ms.iswc.ac.cn

min each time; then adjusted pH to 6.5 with HCl, proteinase treated for 1 h, inactivated enzyme at 85 °C, removed protein with the method of Sevag; finally, after concentrated and alcohol deposit, polysaccharide of *P. umbellatus* could be gained.

Key words: *Polyporus umbellatus*; intracellular polysaccharides (IPS); extraction process; assisted extraction; proteinase

猪苓 (*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr.) 是一种真菌类中药材, 属于无褶菌目 (*Aphyllorphorales*) 多孔菌科 (*Pohyporaceae*) 多孔菌属 (*Polyporus*)^[1], 具有利尿渗湿之功效, 其主要药效成分为猪苓多糖。现代医学研究认为, 猪苓多糖具有解毒利水渗湿、抑制肿瘤、增强免疫力、保护肝脏、抗衰老、抗辐射等功效^[2-3]。研究表明, 猪苓多糖是由 β -1 $\rightarrow$ 3, β -1 $\rightarrow$ 4 和 β -1 $\rightarrow$ 6 葡萄糖苷键缩合而成的葡聚糖, 平均分子质量为 10 000~70 000^[4]。

目前, 提取猪苓菌核胞内多糖的常用方法是热水煎煮法^[5-6], 但是在对其他各类植物源多糖提取工艺的研究中, 发现在弱碱性条件下能更有效地浸出胞内多糖^[7]。近年来, 随着多糖浸提新技术的发展, 研究者还发现, 超声波^[7-10]、微波^[11-12]、酶解^[7, 13]等辅助处理技术, 也能卓有成效地促进植物细胞内多糖的浸出; 同时, 在对多糖去除蛋白技术的研究中, 蛋白酶酶解去除蛋白技术^[14], 因其高效、环保、温和等特点而受到研究者的广泛关注, 逐渐取代了传统的 Sevag 法^[15]和 TCA^[16]法。

利用液体发酵技术生产猪苓菌丝, 是一种较新的研究成果, 有关以猪苓菌丝干粉为材料的多糖提取工艺研究尚比较少, 目前所能获得的报道也仅局限于水浸提工艺参数的研究^[17]和超声波辅助提取技术的研究^[8], 关于各种浸提工艺参数的交互作用和酶解浸提技术、除蛋白技术的研究还鲜有报道。本研究拟对猪苓发酵菌丝胞内多糖的提取工艺进行改良, 探讨浸提过程中各种工艺参数对多糖得率的交互作用, 酶解、超声波和微波处理对多糖得率的影响, 以及蛋白酶除蛋白技术与传统技术的区别, 以期获得猪苓发酵菌丝胞内多糖的最佳提取工艺, 为猪苓发酵生产的下游技术研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试猪苓 猪苓原种引自东北食(药)用真菌研究所。PDA 培养基斜面于 25 °C 活化 7 d 后, 转接入 PDA 平板培养基, 25 °C 培养 10 d, 将菌落边缘新生菌丝接入猪苓发酵种子培养基(玉米粉 30

g/L, 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 1 g/L, 酵母膏 0.5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, pH 自然), 于 25 °C 摇瓶培养 10 d, 作为猪苓液体培养的种子液。将种子液以体积分数 10% 的接种量接入摇瓶, 按体积分数 40% 的装液量于 160 r/min、25 °C 发酵培养 20 d (发酵培养基与种子培养基配方相同)。

猪苓发酵培养产物经 4 000 r/min 离心 30 min, 所得沉淀即为猪苓发酵菌丝体。菌丝体经蒸馏水反复冲洗, 于 60 °C 烘干至恒重, 粉碎即可得到猪苓营养菌丝干粉。

1.1.2 仪器与试剂 主要仪器有: 岛津 AUW220 分析天平, 尤尼柯 UV-2802H 紫外可见分光光度计, 宁波新芝 SB25-12DT 超声波清洗机, LG WP700 机械型微波炉, 上海安亭 TDL-40B 台式离心机, 上海精宏 DKB-501A 型超级恒温水槽。

主要试剂有: 1:1000 纤维素酶, 上海蓝季生物科技有限公司; 果胶酶, 科邦生物分装; 中性蛋白酶, 北京奥博星生物技术有限公司。其他试剂均为试验分析纯。

1.2 猪苓发酵菌丝胞内多糖的检测

取猪苓菌丝干粉加入适量浸提溶剂, 恒温水浴反复浸提, 浸提液经过滤、浓缩即得粗多糖提取液, 再经过除蛋白、醇沉、干燥即可得到多糖纯品。可溶性总糖含量的测定采用苯酚-硫酸法^[18], 在 490 nm 处测吸光度, 计算总糖含量; 还原糖含量的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[19], 在 540 nm 处测吸光度, 计算还原糖含量, 二者均以葡萄糖为标准参照。由于浸提液中不含淀粉, 因此多糖含量近似等于可溶性总糖含量与还原糖含量之差。总糖得率和多糖得率按下式计算:

总糖得率/% = (总糖含量 $\times$ 提取液体积/菌丝干粉质量) $\times$ 100%;

多糖得率/% = (多糖含量 $\times$ 提取液体积/菌丝干粉质量) $\times$ 100%。

1.3 猪苓发酵菌丝胞内多糖浸提方法的比较

1.3.1 水浸提工艺参数的优化 为获得猪苓菌丝胞内多糖水浸提的最佳工艺参数, 采用 $L_9(3^4)$ 正交

试验,研究不同浸提温度、浸提时间、料液比和浸提次数对胞内多糖得率的影响,试验方案如表 1 所示。

表 1 猪苓发酵菌丝胞内多糖水浸提工艺参数优化的 L₉(3⁴)正交试验设计

Table 1 L₉(3⁴) orthogonal design of polysaccharides extracted from fermentation mycelium in *P. umbellate* using distilled water solvent

水平 Level	因素 Factor			
	A 浸提温度/℃ Temperature	B 浸提时间/min Extraction time	C 料液比 Ratio of solid to solvent	D 浸提次数 Times
1	80	30	1 : 20	1
2	90	60	1 : 30	2
3	100	90	1 : 40	3

1.3.2 碱浸提工艺参数的确定 采用单因素试验,确定碱浸提时的溶剂 pH 值、浸提温度、料液比、浸提次数和浸提时间。

(1) pH 值。分别用 pH 为 10,11,12,13,14 的 NaOH 溶液浸提猪苓发酵菌丝干粉,料液比为 1 : 30,于 80 ℃浸提 3 次,每次 60 min,确定浸提的最佳 pH。

(2) 浸提温度。用 pH 为 12 的 NaOH 溶液浸提猪苓发酵菌丝干粉,按 1 : 30 的料液比,分别在 50,60,70,80,90 ℃的浸提温度下反复浸提 3 次,每次 60 min,确定浸提的最佳温度。

(3) 料液比。用 pH 为 12 的 NaOH 溶液浸提猪苓发酵菌丝干粉,分别按 1 : 8,1 : 10,1 : 20,1 : 30,1 : 40 的料液比于 80 ℃浸提 3 次,每次 60 min,

确定浸提的最佳料液比。

(4) 浸提次数。用 pH 为 12 的 NaOH 溶液浸提猪苓发酵菌丝干粉,按 1 : 30 的料液比于 80 ℃分别浸提 1,2,3,4 次,每次 60 min,确定最佳的浸提次数。

(5) 浸提时间。用 pH 为 12 的 NaOH 溶液浸提猪苓发酵菌丝干粉,按 1 : 30 的料液比,于 80 ℃分别浸提 3 次,每次分别浸提 30,60,90,120 min,确定浸提的最佳时间。

1.3.3 碱浸提工艺参数的优化 为获得猪苓菌丝胞内多糖碱浸提的最佳工艺参数,采用 L₉(3⁴)正交试验研究不同浸提温度、pH 值、料液比和浸提次数,在每次浸提 60 min 时对猪苓胞内多糖得率的影响,试验方案如表 2 所示。

表 2 猪苓发酵菌丝胞内多糖碱浸提工艺参数优化的 L₉(3⁴)正交试验设计

Table 2 L₉(3⁴) orthogonal design of polysaccharides extracted from fermentation mycelium in *P. umbellate* using alkali solvent

水平 Level	因素 Factor			
	A 浸提温度/℃ Temperature	B pH	C 料液比 Ratio of solid to solvent	D 浸提次数 Times
1	70	10	1 : 20	2
2	80	11	1 : 30	3
3	90	12	1 : 40	4

1.3.4 水浸提和碱浸提效果的比较 在最优工艺条件下浸提猪苓菌丝的胞内多糖,比较水浸提和碱浸提时多糖得率的差异。

1.4 猪苓发酵菌丝胞内多糖辅助浸提方法的比较

1.4.1 酶解辅助提取 (1)酶解时间的确定。由于纤维素酶和果胶酶具有相似的反应条件,因此本试验将二者混合作为复合酶使用。将不同配比的复合酶按一定用量混入猪苓菌丝干粉中,加 30 倍体积的蒸馏水浸泡,调 pH 至 5.0,于 50 ℃保温酶解;其后 85 ℃酶灭活 10 min,调 pH 至 7.0,100 ℃热水浸提 3 次,每次 60 min,检测可溶性总糖和多糖的得率。用配比为 $m(\text{纤维素酶}) : m(\text{果胶酶}) = 1 : 1$ 的复合酶以 10 mg/g 用量,对猪苓菌丝干粉分别酶解处理 30,50,70,90,110 min,通过单因素试验确定酶解处

理的最佳作用时间。

(2)酶解工艺参数的优化。在上述研究的基础上,将纤维素酶和果胶酶按不同比例混合,以不同用量加入到猪苓菌丝干粉中,酶解反应 60~80 min,采用 L₉(3⁴)正交试验对酶解工艺参数进行优化,其方案如表 3 所示。

1.4.2 超声波和微波辅助提取 (1)超声辅助提取。将猪苓发酵干菌丝浸于 30 倍体积的蒸馏水中,采用 40 W 的超声功率分别处理 10,12,14,16,18 和 20 min,然后于 100 ℃蒸馏水中浸提 3 次,每次 60 min,测定可溶性总糖和多糖的得率。(2)微波辅助提取。将猪苓发酵干菌丝浸于 30 倍体积的蒸馏水中,采用 100 W 的微波功率分别处理 0,5,10,20,30,40 和 50 min,然后于 100 ℃蒸馏水中浸提 3 次,

每次 60 min,测定可溶性总糖和多糖的得率。

表 3 猪苓发酵菌丝胞内多糖酶解浸提工艺参数优化的 L₉(3⁴)正交试验设计

Table 3 L₉(3⁴)orthogonal design of enzyme treatment conditions of the IPS extraction technology

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	<i>m</i> (纤维素酶) : <i>m</i> (果胶酶) <i>m</i> (Cellulase) : <i>m</i> (Pectinase)	复合酶用量/(mg · g ⁻¹) Enzyme dosage	酶作用时间/min Time	空列 Blank
1	1 : 1	5	60	1
2	2 : 1	10	70	2
3	3 : 1	15	80	3

1.5 猪苓发酵菌丝多糖浸提液中蛋白去除方法的比较

1.5.1 Sevag 法^[20] 将三氯甲烷和正丁醇以 V(三氯甲烷) : V(正丁醇) = 4 : 1 的量加入到粗多糖浸提液中,充分摇匀,静置,待两相界面稳定后,排出下部蛋白质黏液,反复多次,至不再出现白色黏液止。按下式计算蛋白去除率和多糖损失率:

蛋白去除率/% = (处理前蛋白含量 - 处理后蛋白含量) / 处理前蛋白含量 × 100%;

多糖损失率/% = (处理前多糖含量 - 处理后多糖含量) / 处理前多糖含量 × 100%。

1.5.2 蛋白酶法^[21] 将猪苓发酵菌丝粗多糖提取液的 pH 调至 6.5,添加 5 g/L 的中性蛋白酶,于 50

℃ 酶解 1 h,85 ℃ 酶灭活 10 min,过滤去沉淀。

1.5.3 蛋白酶和 Sevag 配合法^[22] 用蛋白酶酶解多糖提取液,过滤后再用 Sevag 法脱除蛋白,至无沉淀产生。

1.5.4 三氯乙酸法(TCA 法)^[23] 向粗多糖浸提液中加入体积分数 10% 的 TCA,调节其 pH 至 3,放置过夜,离心去沉淀。

2 结果与分析

2.1 猪苓发酵菌丝胞内多糖最适浸提方法的比较

2.1.1 水浸提工艺参数的优化 用 L₉(3⁴)正交试验对猪苓发酵菌丝胞内多糖的水浸提工艺参数进行优化,其结果见表 4。

表 4 猪苓发酵菌丝胞内多糖水浸提工艺参数优化的正交试验结果

Table 4 Results and analysis of polysaccharides extracted from fermentation mycelium in *P. umbellate* using distilled water solvent

编号 No.		A 浸提温度/℃ Temperature	B 浸提时间/min Extraction time	C 料液比 Ratio of solid to solvent	D 浸提次数 Times	总糖得率/% Extraction rate of total sugar	多糖得率/% Extraction rate of polysaccharide
1		1	1	1	1	21.86	5.51
2		1	2	2	2	51.88	17.19
3		1	3	3	3	57.76	18.92
4		2	1	2	3	55.05	18.04
5		2	2	3	1	46.01	18.89
6		2	3	1	2	52.83	20.54
7		3	1	3	2	48.43	18.26
8		3	2	1	3	52.96	22.09
9		3	3	2	1	47.05	20.84
总糖得率 Extraction rate of total sugar	<i>k</i> ' ₁	43.83	41.78	42.55	38.31		
	<i>k</i> ' ₂	51.30	50.29	51.33	51.05		
	<i>k</i> ' ₃	49.48	52.55	50.74	55.26		
	<i>R</i> '	7.47	10.77	8.78	16.95		
多糖得率 Extraction rate of polysaccharide	<i>k</i> ₁	13.29	13.94	16.05	15.08		
	<i>k</i> ₂	19.16	19.39	18.69	18.66		
	<i>k</i> ₃	20.40	19.52	18.11	19.10		
	<i>R</i>	7.10	5.58	2.64	4.02		

由表 4 可见,猪苓发酵干菌丝多糖水浸提的最佳工艺条件为 A₃B₃C₂D₃,即在 100 ℃ 的浸提温度条件下,每次浸提 90 min,料液比为 1 : 30,浸提 3 次。对猪苓发酵菌丝可溶性总糖得率和多糖得率进行比较可知,各工艺参数对猪苓发酵菌丝可溶性总糖得

率的影响均比较大,影响大小依次表现为“浸提次数 > 浸提时间 > 料液比 > 浸提温度”;各参数对猪苓发酵菌丝多糖得率的影响均不明显,相对而言,以浸提温度的影响较大,说明较高的浸提温度有利于猪苓菌丝胞内多糖的浸出。综上所述,用水浸提猪苓菌

丝多糖时,增加浸提次数、延长浸提时间、加大溶剂用量均有利于菌丝中还原糖的浸出,但对多糖浸提效果的影响不大,尤其是浸提 90 min 与浸提 60 min 的多糖得率较为接近。因此,水浸提猪苓发酵菌丝多糖的理想条件是料液比为 1 : 30,100 ℃ 浸提 3 次,每次 60 min。

2.1.2 碱浸提参数范围的确定 采用单因素试验,研究猪苓发酵菌丝胞内多糖在不同 pH、浸提温度、料液比、浸提次数和浸提时间下可溶性总糖和多糖的得率。

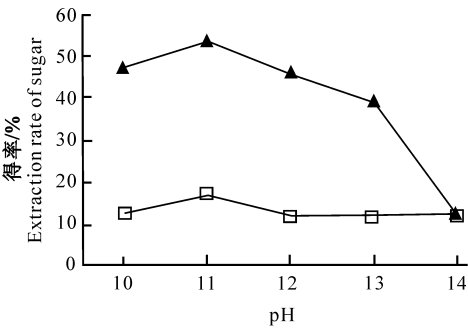


图 1 溶剂 pH 对猪苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖得率的影响

—▲—, 可溶性总糖; —□—, 多糖

Fig. 1 Effect of pH on extraction rate of *P. umbellate* total sugar and polysaccharides

—▲—, Total sugar; —□—, Polysaccharide

(3)料液比。由图 3 可见,随浸提溶剂量的增加,可溶性总糖和多糖的得率也相应提高,考虑到多糖提取液的浓缩和醇沉过程,认为猪苓多糖碱浸提的最适宜料液比为 1 : 20~1 : 40。

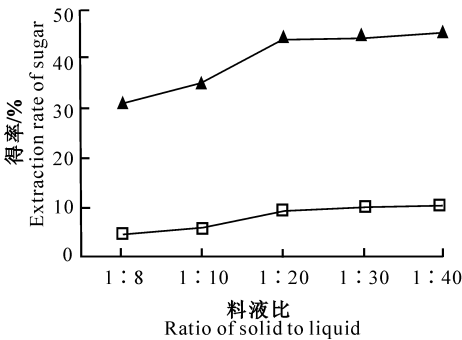


图 3 料液比对猪苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖得率的影响

—▲—, 可溶性总糖; —□—, 多糖

Fig. 3 Effect of ratio of solid to liquid on extraction rate of *P. umbellate* total sugar and polysaccharides

—▲—, Total sugar; —□—, Polysaccharide

(5)浸提时间。由图 5 可见,延长浸提时间对猪

(1)pH 值。由图 1 可见,可溶性总糖和多糖的浸提得率均随溶剂 pH 的升高先增大后降低,在 pH=11 时二者均达到最大值,分别为 53.89% 和 16.54%。因此认为,最适于猪苓菌丝胞内多糖碱浸提的 pH 在 11 左右。

(2)浸提温度。由图 2 可见,浸提温度在 70 ℃ 以下时,对可溶性总糖和多糖得率的影响不大,而在 80 ℃ 时二者的得率均达到最大,其后又呈下降趋势。因此认为,猪苓发酵菌丝胞内多糖碱浸提的最适温度为 80 ℃ 左右。

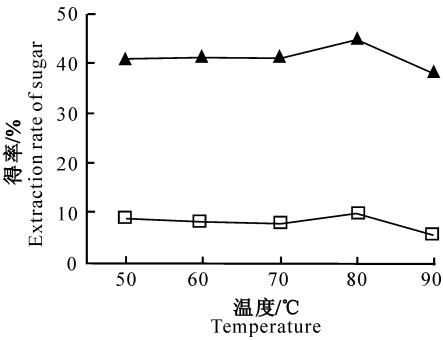


图 2 浸提温度对猪苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖得率的影响

—▲—, 可溶性总糖; —□—, 多糖

Fig. 2 Effect of temperature on extraction rate of *P. umbellate* total sugar and polysaccharides

—▲—, Total sugar; —□—, Polysaccharide

(4)浸提次数。由图 4 可见,增加浸提次数可以有效提高可溶性总糖和多糖的得率,考虑到后续操作过程,认为猪苓多糖碱浸提的最适宜次数为 2~4 次。

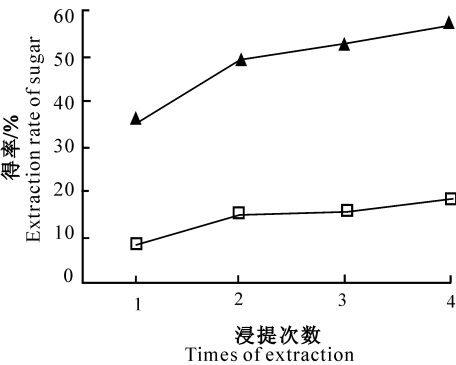


图 4 浸提次数猪苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖得率的影响

—▲—, 可溶性总糖; —□—, 多糖

Fig. 4 Effect of frequency on extraction rate of *P. umbellate* total sugar and polysaccharides

—▲—, Total sugar; —□—, Polysaccharide

苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖得率的影响均不

明显。因此认为,猪苓多糖浸提的时间为 30~60 min。

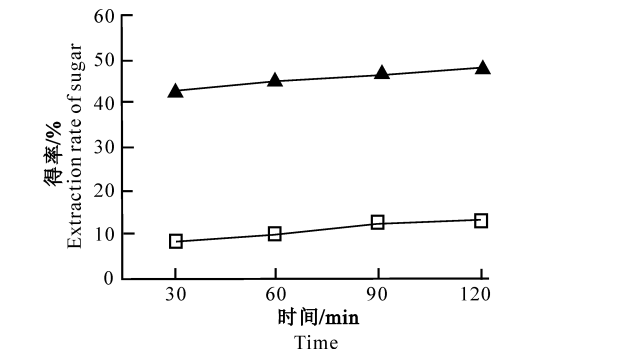


图 5 浸提时间对猪苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖得率的影响
—▲—,可溶性总糖;—□—,多糖

Fig. 5 Effect of duration on extraction rate of *P. umbellate* total sugar and polysaccharides
—▲—, Total sugar; —□—, Polysaccharide

表 5 猪苓发酵菌丝胞内多糖碱浸提工艺参数优化的正交试验结果

Table 5 Results and analysis of polysaccharides extracted from fermentation mycelium in <i>P. umbellate</i> using alkali solvent							
编号 No.		A 浸提温度/℃ Temperature	B pH	C 料液比 Ratio of solid to solvent	D 浸提次数 Times	总糖得率/% Extraction rate of total sugar	多糖得率/% Extraction rate of polysaccharide
1		1	1	1	1	38.58	15.30
2		1	2	2	2	53.97	21.77
3		1	3	3	3	60.29	27.13
4		2	1	2	3	61.80	27.77
5		2	2	3	1	57.25	27.75
6		2	3	1	2	48.14	20.59
7		3	1	3	2	57.43	24.03
8		3	2	1	3	65.53	31.66
9		3	3	2	1	54.42	26.05
总糖得率 Extraction rate of total sugar	k'_1	50.95	52.60	50.75	50.09		
	k'_2	55.73	58.92	56.73	53.19		
	k'_3	59.13	54.28	58.32	62.54		
	R'	8.18	6.31	7.58	12.45		
多糖得率 Extraction rate of polysaccharide	k_1	21.40	22.37	22.51	23.03		
	k_2	25.37	27.06	25.19	22.12		
	k_3	27.25	24.59	26.30	28.85		
	R	5.85	4.69	3.79	6.73		

2.1.4 碱浸提和水浸提多糖得率的比较 对经过优化的浸提工艺进行比较,水浸提的工艺参数分别为:料液比为 1:30,于 100℃浸提 3 次,每次浸提 60 min,在此条件下,猪苓菌丝可溶性总糖的得率为 58.71%,胞内多糖的得率为 22.32%;碱浸提的工艺参数为:以 pH=11 的 NaOH 为浸提溶剂,料液比为 1:40,于 90℃浸提 4 次,每次浸提 60 min,在此条件下,猪苓菌丝可溶性总糖的得率为 61.53%,胞内多糖的得率为 26.31%。由此可见,与水浸提

综上所述,用弱碱性溶剂浸提猪苓胞内多糖时,最适提取温度在 80℃左右,料液比为 1:20~1:40,浸提次数为 2~4 次,浸提时间的影响不大,故选用和水浸提相同的时间,即 60 min。

2.1.3 碱浸提参数的优化 根据单因素试验结果,用 $L_9(3^4)$ 正交试验对弱碱溶剂浸提猪苓胞内多糖的工艺参数进行优化,其结果见表 5。

由表 5 可以看出,各浸提工艺参数对可溶性总糖得率的影响大于多糖,其中作用最显著的是浸提次数,其次为浸提温度。此外,溶剂量的提高有利于可溶性总糖得率的增加,而适当的 pH 更有利于多糖得率的提高,各参数对多糖得率的影响大小依次表现为“浸提次数>浸提温度>溶剂 pH>料液比”。因此,弱碱溶液浸提猪苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖的最佳工艺参数均为 $A_3B_2C_3D_3$,即浸提温度为 90℃,溶剂 pH=11,料液比为 1:40,浸提次数为 4 次。

相比,用弱碱性溶剂浸提猪苓菌丝干粉可明显提高胞内多糖的得率。

2.2 猪苓发酵菌丝胞内多糖辅助浸提方法的比较

2.2.1 酶解辅助浸提法 在进行猪苓发酵菌丝多糖的水浸提之前,首先对猪苓发酵菌丝用 10 mg/g 配比为 $m(\text{纤维素酶}):m(\text{果胶酶})=1:1$ 的复合酶分别酶解处理 30,50,70,90,110 min,其可溶性总糖和多糖得率的变化如图 6 所示。由图 6 可见,酶解处理 30~50 min 时,其对可溶性总糖和多糖得率

的影响不大;但酶解 50~70 min 时,可溶性总糖和多糖的得率迅速提高;此后再延长酶解处理时间,其对可溶性总糖和多糖得率的提高没有显著影响。因此认为酶解处理以 70 min 左右为宜。

在上述研究的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对酶解工艺参数进行了优化,其结果如表 6 所示。

由表 6 可见,酶解辅助浸提工艺参数中,复合酶用量对可溶性总糖和多糖得率的影响最为显著,其用量以 10 mg/g 为宜,偏高和偏低均不利于多糖的浸出;而酶作用时间和复合酶配比的影响均不显著。因此可以认为,酶解辅助浸提多糖的最优工艺为 $A_1B_2C_3$,即复合酶配比为 $m(\text{纤维素酶}):m(\text{果胶酶})=1:1$,复合酶用量为 10 mg/g,酶解作用时间为 80 min。

表 6 猪苓发酵菌丝胞内多糖酶解辅助浸提工艺参数优化的试验结果

Table 6 Results and analysis of polysaccharides extracted from fermentation mycelium in *P. umbellata* with enzyme treatment

编号 No.	A $m(\text{纤维素酶}):m(\text{果胶酶})$ $m(\text{Cellulase}):m(\text{Pectinase})$		B 复合酶用量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Enzyme dosage		C 酶作用时间/min Time	D 空列 Blank	总糖得率/% Extraction rate of total sugar	多糖得率/% Extraction rate of polysaccharide
1	1		1		1		58.47	23.54
2	1		2		2		60.05	25.72
3	1		3		3		61.69	26.39
4	2		1		2		58.56	24.25
5	2		2		3		62.49	27.60
6	2		3		1		56.31	20.92
7	3		1		3		53.66	20.06
8	3		2		1		62.85	25.47
9	3		3		2		57.90	23.97
总糖得率 Extraction rate of total sugar	k'_1	60.07	56.90	59.21	60.62			
	k'_2	60.12	62.80	58.84	56.67			
	k'_3	58.14	58.63	60.28	61.03			
	R'	1.98	5.90	1.44	4.36			
多糖得率 Extraction rate of polysaccharide	k_1	25.22	22.62	23.31	25.04			
	k_2	24.26	26.26	24.65	22.23			
	k_3	23.17	23.76	24.68	25.37			
	R	2.05	3.65	1.37	3.14			

2.2.2 超声波和微波辅助浸提法 将猪苓发酵菌丝按 $m(\text{猪苓发酵菌丝干粉}):V(\text{蒸馏水})=1:30$ 浸泡,分别在 40 W 超声波功率下处理 10,12,14,16,18 和 20 min,或在 100 W 微波功率下处理 0,5,10,20,30,40 和 50 min,然后用 100 ℃蒸馏水浸提 3 次,每次 60 min,其可溶性总糖和多糖的得率随处理时间的变化规律如图 7 所示。

由图 7 可以看出,超声波处理对猪苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖的浸出效果有明显的促进作用,随处理时间的延长,可溶性总糖和多糖的得率均呈上升趋势,相比较而言,14 min 左右的超声波处

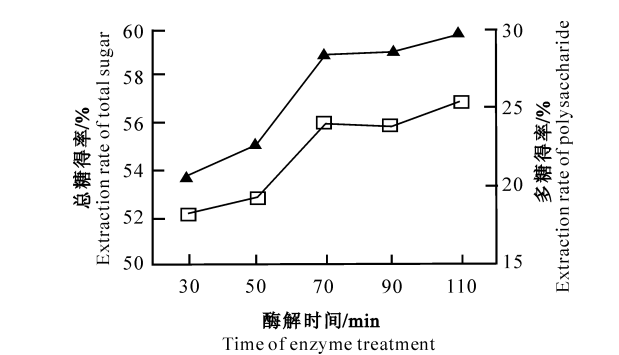


图 6 酶解处理时间对猪苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖得率的影响
—▲—,可溶性总糖;—□—,多糖

Fig.6 Effect of enzyme treatment duration on extraction rate of *P. umbellata* total sugar and polysaccharide
—▲—, Total sugar; —□—, Polysaccharide

理即可以获得较为理想的多糖得率。相反,随着微波处理时间的增加,可溶性总糖和多糖的得率逐渐下降,甚至低于未处理样品,因此认为微波处理并不适于猪苓多糖的提取。

2.3 猪苓发酵菌丝胞内多糖浸液蛋白去除方法的比较

分别用 Sevag 法、蛋白酶法、蛋白酶和 Sevag 配合法以及 TCA(三氯乙酸)法,去除上述试验获得的猪苓胞内多糖粗品中的蛋白质成分,以多糖粗品为对照,比较蛋白的去除率和多糖的损失率。经过各种除蛋白方法的处理后,多糖得率和剩余可溶性蛋

白的含量如图 8 所示。

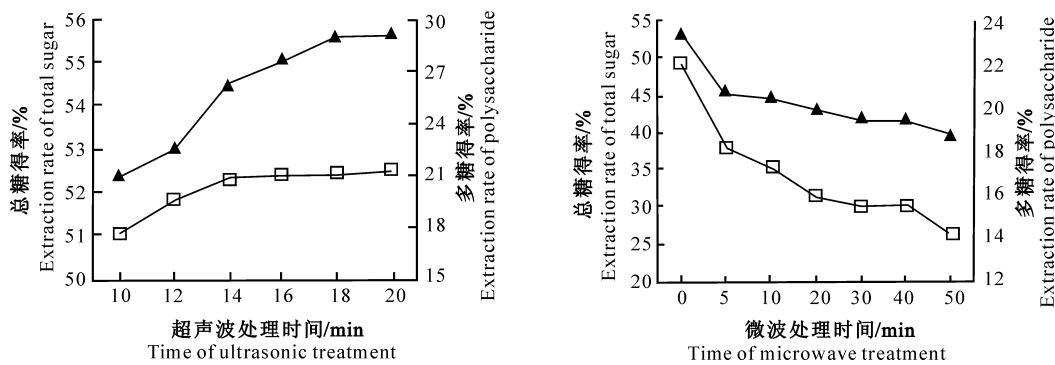


图 7 超声波和微波处理时间对猪苓发酵菌丝胞内可溶性总糖和多糖得率的影响

Fig. 7 Effect of ultrasonic and microwave treatment time on total sugar and polysaccharide extraction rate
—▲—.可溶性总糖;—□—.多糖
—▲—. Total sugar; —□—. Polysaccharide

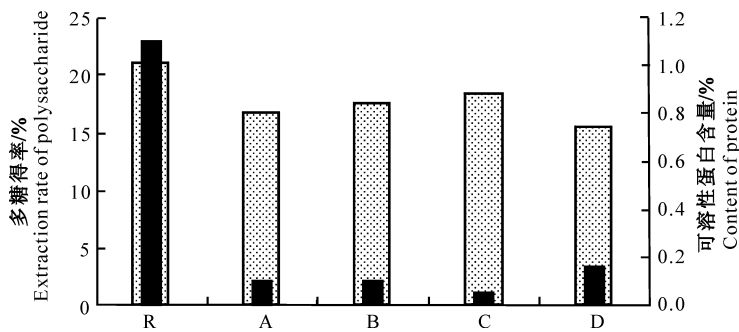


图 8 不同去除蛋白方法对猪苓多糖得率和残余蛋白含量的影响

R. 对照; A. Sevag 法; B. 蛋白酶法; C. 蛋白酶和 Sevag 配合法; D. TCA 法
■. 多糖; ■. 可溶性蛋白
Fig. 8 Effect of different protein removing methods on the contents of polysaccharide and protein
R. Control; A. Sevag; B. Proteinase; C. Proteinase+Sevag; D. TCA
■. Polysaccharide; ■. 可溶性蛋白

由图 8 可知, 4 种去除蛋白方法的效果从优到差依次为 C>A>B>D, 对多糖的损耗从小到大依次为 C<B<A<D, 因此去除蛋白效果最好且猪苓胞内多糖损失最少的除蛋白方法是蛋白酶和 Sevag 配合法, 即先用蛋白酶酶解粗多糖内的蛋白成分, 再经过 2 次 Sevag 处理即可除去猪苓粗多糖内 94.6% 以上的蛋白质, 而多糖的损失率不足 13.1%。该方法既温和有效, 又符合环保的要求, 是一种值得推广的除蛋白技术。

3 讨论和结论

前人往往是在某一特定条件下比较水浸提和其他溶剂浸提的差异, 这种方法并不能客观反映浸提溶剂的优缺点。本研究首先确定在蒸馏水和弱碱环境中浸提猪苓发酵菌丝胞内多糖的最优工艺, 再比较两种优化工艺下猪苓多糖的得率。结果表明, 对

工艺参数的优化可有效提高猪苓发酵菌丝胞内多糖的浸提得率, 而且弱碱性环境更有利于猪苓发酵菌丝胞内多糖的浸提。

本研究在对 3 种辅助浸提方法的比较试验中发现, 微波处理对猪苓发酵菌丝胞内多糖得率的提高没有影响, 这可能是因为微波处理引起浸提液局部高温从而导致多糖降解所致, 其具体原因还有待进一步研究, 因此暂不提倡采用微波处理辅助猪苓多糖的浸提。复合酶酶解和超声波处理对猪苓发酵菌丝胞内多糖的浸出效果均有明显的促进作用, 这可能是因为纤维素酶和果胶酶的酶解作用, 以及超声波的空化作用, 均能破坏猪苓菌丝的细胞壁结构, 使胞内多糖得以有效释放, 从而获得较为理想的浸提效果。陈德育等^[8]认为, 猪苓干菌丝经过 600 W 的超声波破壁 8 min 后, 可有效提高多糖的浸出效果, 这一结果与本研究基本相同。但本研究通过初试验

发现,功率为 40 W 的超声波处理 10~20 min 效果较好,进一步试验证明,14 min 超声处理的效果最佳。超声波强度对猪苓多糖提取的影响机理尚不十分清楚,还有待在今后的研究和实践中进一步探索。通过酶解处理,猪苓胞内多糖的得率可达 27.60% 以上,比超声波处理的效果更佳,因此认为酶解处理辅助浸提是猪苓菌丝胞内多糖浸提的最适工艺技术。

通过对 4 种除蛋白方法的比较,本研究认为 Sevag 法是一种较为理想的除蛋白方法,但一般需要 5~8 次重复才能有效地去除粗多糖中的蛋白质,费时较多且易于在重复操作过程中损失较多的多糖成分。但在经过蛋白酶酶解后,仅需要 2~3 次 Sevag 处理,即可除去糖液中 94.6% 以上的蛋白成分,该方法可在有效去除粗多糖中蛋白成分的同时,降低多糖成分的损失,适用于猪苓胞内多糖的提取。

本研究认为,猪苓发酵菌丝胞内多糖提取的最优工艺流程应为:猪苓菌丝干粉—添加 10 mg/g 用量的复合酶[$m(\text{纤维素酶}):m(\text{果胶酶})=1:1$]和 40 倍体积的蒸馏水—50 °C 酶解 80 min—NaOH 溶液调 pH=11,90 °C 浸提 4 次,每次 60 min—浸提液合并、浓缩—HCl 溶液调 pH=6.5—蛋白酶酶解 1 h—85 °C 酶灭活—Sevag 除蛋白至无蛋白检出一浓缩—醇沉—干燥。

[参考文献]

[1] 许广波,傅伟杰,赵旭奎.我国猪苓研究的进展[J].菌物研究,2003,1(1):58-61.
Xu G B,Fu W J,Zhao X K. Advances in studies on *Polyporus umbellatus* in China [J]. Journal of Fungal Research,2003,1(1):58-61. (in Chinese)

[2] 陈汝盛,厉将斌.猪苓冬葵水提物的抗肿瘤药效[J].中国中药杂志,2004,29(5):481-482.
Chen R S,Li J B. Anticancer effect of *Polyporus umbellatus* morel water extract [J]. China Journal of Chinese Materia Medica,2004,29(5):481-482. (in Chinese)

[3] 杜肖娜,王润田,刘殿武,等.中药猪苓多糖抑瘤作用机理的初探[J].中华微生物学和免疫学杂志.2001,21(3):296-297.
Du X N,Wang R T,Liu D W, et al. Effect of Chinese *Polyporus umbellatus* polysaccharides on the anti-tumor mechanism [J]. China Journal of Microbiology Immunology,2001,21(3):296-297. (in Chinese)

[4] 苗明三,李振国.现代实用中药质量控制技术[M].北京:人民卫生出版社,2000:369-382.
Miao M S,Li Z G. Quality control techniques of modern Chinese traditional medicine [M]. Beijing:People's Medical Publishing House,2000:369-382. (in Chinese)

[5] 刘小平,徐述明.猪苓多糖的提取及硫酸酯化研究[J].中药材,2007,30(2):160-163.
Liu X P,Xu S M. The extraction and sulfation of polysaccharide from *Polyporus umbellatus* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2007,30(2):160-163. (in Chinese)

[6] 王贵发,马力,徐楚鸿,等.猪苓多糖的提取与含量测定[J].医药导报,2006,25(4):346.
Wang G F, Ma L, Xu C H, et al. Extraction and content determine of polysaccharide from *Polyporus umbellatus* [J]. Herald of Medicine,2006,25(4):346. (in Chinese)

[7] 林增祥,付永前,曾宪贤.离子束诱变阿魏菇胞内多糖提取工艺研究[J].食品科技,2006(12):77-79.
Lin Z X,Fu Y Q,Zen X X. Extraction of polysaccharide from *Pleurotus ferulae* lenziby low energy ions in plantation [J]. Food Science and Technology,2006(12):77-79. (in Chinese)

[8] 陈德育,田广文,李学俊,等.超声波提取猪苓菌丝多糖工艺优化[J].食用菌,2006(6):60-62.
Chen D Y,Tian G W,Li X J, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Polyporus umbellatus* [J]. Edible Fungi,2006(6):60-62. (in Chinese)

[9] Hromádková Z,Ebringerová A,Valachovič P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.) [J]. Ultrasonics Sonochemistry,2002,9:37-44.

[10] Li J W,Ding S D,Ding X L. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. *jinsixiaozao* [J]. Journal of Food Engineering,2007,20:176-183.

[11] 聂金媛,吴成岩,吴世容,等.微波辅助提取茯苓中茯苓多糖的研究[J].中草药,2004,35(12):1346-1348.
Nie J Y,Wu C Y,Wu S R, et al. Microwave-assistant extraction of water-soluble pachyman from *Poria cocos* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2004,35(12):1346-1348. (in Chinese)

[12] 樊黎生,张声华,吴小刚.微波辅助提取黑木耳多糖的研究[J].食品与发酵工业,2005,31(10):142-148.
Fan L S,Zhang S H,Wu X G. Studies on the microwave-assisted extraction method of Polysaccharides from *Auricularia auricul* [J]. Food and Fermentation Industries,2005,31(10):142-148. (in Chinese)

[13] 张立娟,于国萍.细胞壁酶在黑木耳多糖提取中作用条件的研究[J].食用菌,2005(3):8-10.
Zhan L J,Yu G P. Effect of broken kernel enzyme on the extraction of polysaccharide from *Auricularia auricular* [J]. Edible Fungi,2005(3):8-10. (in Chinese)

[14] 葛玉,段玉峰,刘俊花,等.酸浆果多糖不同提取工艺研究[J].食品科学,2006,27(8):178-183.
Ge Y,Duan Y F,Liu J H, et al. Study on difference extraction technology of polysaccharide from *Physalis alpepengi* var. *francheti* fruit [J]. Food Science,2006,27(8):178-183. (in Chinese)