

喜树果渣多糖的微波提取工艺研究

刘展眉^{1,2}, 方岩雄¹, 崔英德²

(1 广东工业大学 轻工化工学院, 广东 广州 510006; 2 仲恺农业技术学院 化学与化工系, 广东 广州 510225)

摘要:应用均匀设计法及一系列单因素选择试验优化了喜树多糖的微波提取工艺条件, 比较了蒸煮回流法和微波提取法提取喜树多糖的效率. 喜树多糖的微波提取优化条件是: 固液比为 0.1 (1:10), NaOH 浓度 $1.55 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 微波功率 284 W, 微波作用时间 9.2 min. 采取 2 次浸泡, 2 次微波处理方式, 提取液的浓缩比为 5, 乙醇加入量为 30 mL, 沉淀放置 48 h.

关键词:喜树果渣; 多糖; 微波提取法; 均匀设计法

中图分类号: S789

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)03-0122-03

Technology of Extracting Polysaccharides in Fructus Remnant of *Camptotheca acuminata* with Microwave

· 71 ·

LIU Zhan-mei^{1,2}, FANG Yan-xiong¹, CUI Ying-de²

(1 Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2 Department of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The extracting of extracting polysaccharides in fructus remnant of *Camptotheca acuminata* between the traditional method and microwave was compared, and the condition of extracting polysaccharides in fructus remnant of *C. acuminata* with microwave was optimized, by single factor experiment. The optimal conditions of extracting polysaccharides were 1:10 ratio of material to the liquid, $1.55 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, and 9.2 min microwave irradiation (284 W) for 2 times, the concentrated scale is 5, 30 mL ethanol was added, and polysaccharide deposited for 48 h.

Key words: fructus remnant of *Camptotheca auminata*; polysaccharides; extract with microwave; uniform experimental design

多糖作为药物始于 1943 年, 但作为广谱免疫促进剂而引起人们极大兴趣是在 20 世纪 60 年代以后, 越来越多的研究证明: 多糖不但能治疗机体免疫系统受到严重损伤的癌症, 还能治疗如风湿病、慢性病毒性肝炎等多种免疫缺损疾病和某些耐药细菌或病毒引起的慢性疾病, 有的还能诱导干扰素的产生^[1]. 多糖作为药物其细胞毒极小, 在治疗肿瘤时, 它不象一般化疗药物直接杀死生长着的肿瘤细胞, 而是促进细胞和体液免疫反应, 如激活巨噬细胞或 T-淋巴细胞和 α -细胞, 或加强抗体生成及激活补体等, 以达到抑制和消灭肿瘤细胞的效果, 对正常细

胞影响很小. 王学利^[2]报道了喜树叶、枝水溶性糖类提取和测定的结果. 笔者在研究提取喜树果中喜树碱的过程中, 同时考虑对喜树果进行综合利用研究, 用提取过喜树碱的喜树果渣进行多糖的提取, 并引入微波技术及均匀设计法, 提高提取效率.

1 材料与方法

1.1 材料与设备

提取喜树碱后的喜树 *Camptotheca auminata* 果渣, 浓硫酸、葡萄糖、氢氧化钠、草酸铵、乙醇 ($w = 95\%$), 752 型分光光度计, 微波提取仪, LIX 型离心机.

收稿日期: 2006-03-27

作者简介: 刘展眉 (1963—) 女, 副教授, 在职博士研究生, E-mail: liuzhanm@21cn.com

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2KB01202S)

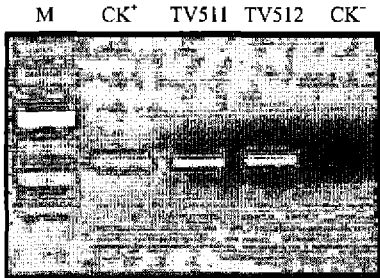
表 1 渗透压稳定剂对原生质体得率和再生的影响¹⁾
Tab. 1 Effects of osmotic stabilizers on the yield and regeneration of protoplasts

稳渗剂 osmotic stabilizers	c(稳渗剂 osmotic stabilizers) /(mol · L ⁻¹)	原生质体得率 protoplast yield/(mL ⁻¹)	原生质体再生率 plating efficiency/%
甘露醇 mannitol	0.6	8.92 × 10 ⁷	4.37
山梨醇 sorbitol	0.6	0	0.98
蔗糖 sucrose	0.6	0	0
MgSO ₄	0.6	7.5 × 10 ⁶	0
KCl	0.6	2.7 × 10 ⁷	0
NaCl	0.6	0	0

1) 溶壁酶质量浓度为 15 mg · mL⁻¹, 作用温度为 34 ℃, 酶作用时间为 3 h

2.5 假定转化子的鉴定

潮霉素抗性试验表明, Hyg B 对 V51 的最低抑制质量浓度为 50 μg/mL. 把假定转化子转接于含 50 μg/mL Hyg B 筛选培养基上继续筛选 8 d, 菌落能够在抗性平板上继续生长. 随机提取 2 个假定转化子的基因组 DNA, 对其进行 *hpt* 基因片段的扩增, 扩增结果如图 2 所示: 所选的假定转化子, 均扩增出与 *hpt* 基因片段大小一致的目的条带, 而阴性对照未扩增出相似条带. 由此结果初步证实潮霉素抗性基因整合到转基因草菇基因组中.



M: DNA marker III; CK⁺: 质粒 pAN7 - 1; TV511、TV512 为转化子; CK⁻: V51
M: DNA marker III; CK⁺: plasmid pAN7 - 1; TV511、TV512: transgenic lines; CK⁻: V51

图 2 假定转化子的 PCR 鉴定

Fig. 2 The PCR detection of the supposed transformants

3 讨论与结论

用酶法破壁制取原生质体, 酶液浓度、酶解温度、酶解时间是影响原生质体得率的重要因素. 酶的浓度过高, 易造成原生质体不稳定而变形, 产量下降, 不经济; 浓度太低, 破壁困难, 则原生质体产量不足. 酶解温度过高或过低都会降低溶壁酶的作用. 酶解时间短, 原生质体释放量低, 酶解时间过长, 原生质体数量下降. 主要原因可能是酶继续作用于膜系统使膜破裂所致^[6]. 液体静置培养菌丝生长较快且成絮状, 菌丝与酶的接触充分, 因而原生质体的制备率较高.

渗透压稳定剂作为溶壁酶的作用环境和原生质体的存在环境, 对原生质体的释放与再生有重要的影响. 本试验证明, 用 0.6 mol/L 甘露醇作稳渗剂得到了最高的原生质体得率和再生率. MgSO₄ 和 KCl 有较好的原生质体得率, 但其再生率为 0. 推测可能是盐离子改变了草菇细胞膜的通透性, 对细胞造成了某种损害^[7]. 双层平板培养法不会带来机械损伤, 有利于原生质体的再生, 但操作比较繁琐; 单层平板直接涂布法会带来机械损伤; 预培养法兼备二者的优点, 因此采用预培养法效果比较好.

参考文献:

[1] BURNS C, GREGORY K E, KIRBY M, et al. Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42:191-199.
[2] HIRANO T, SATO T, YAEGASHI K. Efficient transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* with a vector using a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter to hygromycin B resistance [J]. Molecular and General Genetics, 2000, 263:1047-1052.
[3] VAN DE RHEE M D, GRAA P M A, HURZING H J, et al. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance [J]. Molecular and General Genetics, 1996, 250:252-258.
[4] 孙丽, 许伟宏, 蔡华清, 等. PEG 介导下香菇的转化 [J]. 植物学报, 2001, 43(10):1089-1092.
[5] JIAN J H, BUSWELL J A, PEBERDY J F. Transformation of the edible fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea* [J]. Mycological Research, 1998, 102(7): 876-880.
[6] LIU Wen, ZHU Wen-miao. Production and regeneration of *Trichosporon cutaneum* protoplast [J]. Process Biochemistry, 2000, 35:659-664.
[7] LALITHAKUMARI D. Protoplast: A biotechnological tool for plant pathological studies [J]. Indian Phytopathol, 1996, 49:199-212.

【责任编辑 李晓卉】

于 50 mL PDSA 中, 34 ℃、150 r/min 振荡培养 3 d.

1.3 原生质体的制备

取培养好的菌丝, 过滤后用无菌水和稳渗剂各冲洗 3 次, 用无菌滤纸吸干后放入酶液中, 50 r/min 振荡酶解; 酶解后过滤除去残留菌丝, 离心收集原生质体, 用稳渗剂洗涤 2 次后, 用稳渗剂制成悬浮液, 然后用血球计数板计数. 每个处理设 3 个重复.

1.4 原生质体再生

将制备好的原生质体按以下几种方式接种:

(1) 预培养法: 用液体再生培养基将原生质体悬浮液稀释到 10^6 mL^{-1} , 30 ℃ 预培养 16 h 后, 取 0.1 mL 涂布于再生培养基上, 34 ℃ 培养 8 d.

(2) 单层平板直接涂布法: 将原生质体悬浮液稀释到 10^6 mL^{-1} 左右, 取 0.1 mL 直接涂布于再生培养基上, 34 ℃ 培养 8 d.

(3) 双层平板培养法: 先在培养皿中倒一层再生培养基, 待冷凝后, 将 0.1 mL 的原生质体悬浮液 (10^6 mL^{-1}) 与预热的半固体再生培养基在 50 ℃ 混匀, 倾注于固体再生培养基平板上, 34 ℃ 培养 8 d.

同时, 将原生质体用无菌水进行低渗处理作为原生质体再生对照, 然后按同样的方法涂于再生培养基上, 34 ℃ 培养 8 d, 观察再生情况. 以上每个处理设 3 个重复.

再生率 = (再生培养基上长出的菌落数 - 低渗处理后再生培养基上长出的菌落数) / 涂布原生质体

数 $\times 100\%$.

1.5 PEG 法转化草菇原生质体

草菇菌丝接种于含不同浓度 Hyg B 的固体培养基上, 确定 Hyg B 对草菇菌丝的最低抑制浓度. 草菇原生质体依据 Jian 等^[5]的方法进行转化, 转化后涂布于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的筛选培养基上.

1.6 草菇假定转化子的筛选与鉴定

将转化板上长出的假定转化子转接于 Hyg B 为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上, 培养 8 d 后观察其生长情况. 挑选在抗性板上生长良好的假定转化子, 提取其基因组 DNA, 进行 PCR 鉴定. 检测 *hpt* 基因的引物序列为: 上游 5'-AGC GTC TCC GAC CTG ATG-3'; 下游 5'-CGA CGG ACG CAC TGA CGG-3'.

2 结果与分析

2.1 酶的浓度、酶解温度、酶解时间对原生质体得率的影响

由图 1 (以 0.6 mol/L 的甘露醇作渗透压稳定剂) 可以看出: 溶壁酶的质量浓度以 15 mg/mL 最为适宜, 低于或高于 15 mg/mL, 原生质体得率均降低; 草菇原生质体分离的最适酶解温度为 34 ℃, 高于或低于 34 ℃, 原生质体得率均下降; 随着时间的延长, 原生质体得率不断提高, 3 h 的原生质体得率最高, 3 h 以后原生质体得率逐步下降.

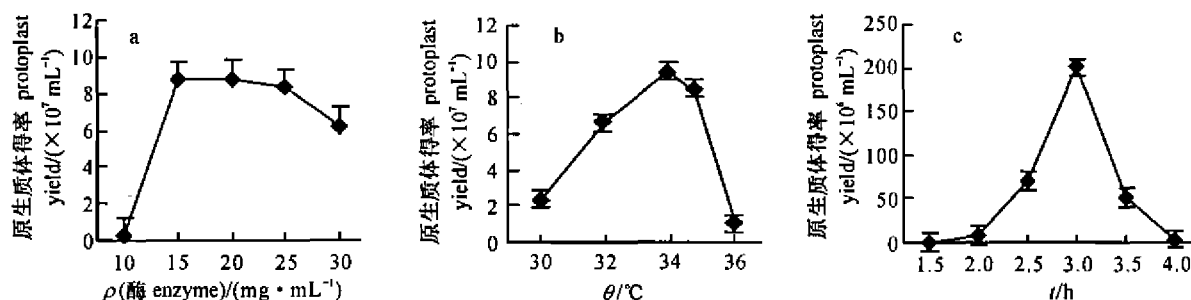


图 1 酶的质量浓度、酶解温度和酶解时间对原生质体得率的影响

Fig. 1 Effects of mass concentration of enzyme, enzymatic incubation temperature and time on the release of protoplasts

2.2 菌丝培养方式对原生质体得率的影响

试验采用 3 种不同培养方式培养的菌丝制备原生质体 (以 0.6 mol/L 的甘露醇作渗透压稳定剂, 酶质量浓度为 15 mg/mL, 酶作用温度为 34 ℃, 酶作用时间为 3 h), 研究培养方式对原生质体形成的影响. 结果表明, 液体静置培养的菌丝制备的原生质体得率最高, 达到 $1.04 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. 固体平板培养的菌丝的原生质体得率次之, 液体摇瓶培养菌丝的原生质体得率最低.

2.3 渗透压稳定剂对原生质体得率和再生的影响

由表 1 可见: 以 0.6 mol/L 的甘露醇作渗透压稳

定剂 (简称稳渗剂), 原生质体的得率和再生率最高; 氯化钾和硫酸镁作为稳渗剂时, 其原生质体得率在 10^7 mL^{-1} 左右, 但再生率为 0; 山梨醇作稳渗剂有一定的再生率, 但原生质体的得率为 0; 蔗糖、氯化钠均不适合作草菇原生质体的稳渗剂.

2.4 接种方式对原生质体再生的影响

本试验分别采用预培养法、直接涂抹法和双层培养法进行试验. 结果表明, 不同的接种方式对原生质体的再生有很大影响, 采用单层平板直接涂布法与双层平板培养法所得的原生质体的再生率均低于预培养法, 故预培养法为最佳的原生质体接种方式.