

广东虫草多糖的提取及含量测定

闫文娟^{1,2}, 李泰辉², 唐芳勇³, 郑必胜³, 姜子德¹

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070;

3 华南理工大学 轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要:采用正交试验方法优化了广东虫草多糖的提取工艺. 利用优化的提取工艺对广东虫草子实体、子实体采收后的大米培养基、液体发酵菌丝体以及发酵液4种样品的多糖进行提取, 并采用苯酚-硫酸法测定了多糖含量. 结果表明, 广东虫草多糖的最佳提取工艺为: 提取温度90℃、提取时间3h、提取次数3次、乙醇体积分数100%. 子实体、大米培养基、广东虫草菌丝体及发酵液的多糖含量有所差异, 分别为: 6.92%、5.40%、6.15%和3.42%.

关键词:广东虫草; 多糖; 含量测定; 苯酚-硫酸法

中图分类号: S482.39

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)04-0053-04

Extraction and Contents Determination of Polysaccharide in *Cordyceps guangdongensis*

YAN Wen-juan^{1,2}, LI Tai-hui², TANG Fang-yong³, ZHENG Bi-sheng³, JIANG Zi-de¹

(1 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China;

3 College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To get the maximum polysaccharide extraction rate of *Cordyceps guangdongensis*, the extracting procedures of polysaccharide were optimized by direct cross experiment. The contents were determined by phenol-sulfuric acid method. The contents of polysaccharide extracted from mycelium, fruitbody, rice medium and submerged fermented liquid of *C. guangdongensis* were 6.15%, 6.92%, 5.40%, 3.42%, respectively. The optimal extracting conditions of polysaccharide of *C. guangdongensis* were at 90℃, submerged three times with 100% ethanol for 3 h.

Key words: *Cordyceps guangdongensis*; polysaccharide; content analysis; phenol-sulfuric acid method

虫草属 *Cordyceps* 属于子囊菌门 Ascomycota 肉座菌目 Hypocreales 麦角菌科 Clavicipitaceae, 广泛分布于世界各地^[1]. 药理作用、有效成分等众多研究显示: 不少种类的虫草属真菌都具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、增强人体免疫功能等多种生理活性, 而多种生理功能又归因于虫草属真菌含有的多种化学成

分, 如虫草素、虫草酸、虫草多糖等, 其中虫草多糖因具有抗肿瘤、抗氧化及免疫增强等广泛的药理作用而倍受关注^[2]. 目前, 多糖的提取主要是通过不同温度的水、稀碱溶液进行提取. 多糖的检测目前尚无统一的方法, 文献报道多糖的检测方法可分为两大类. 一类是直接测定多糖本身, 如高效液相色谱法和酶

收稿日期: 2008-12-08

作者简介: 闫文娟(1983—), 女, 博士研究生; 通讯作者: 李泰辉(1959—), 男, 教授, 博士; E-mail: mycolab@263.net; 姜子德(1962—), 男, 教授, 博士; E-mail: zdjiang@scau.edu.cn

基金项目: 粤港关键领域重点突破招标项目(2007168604); 广州市科技计划项目(2007Z3-E0511); 广东省基金团队项目(E05202480)

法;另一类是利用斐林法、苯酚-硫酸法、硫酸-蒽酮法等测定多糖^[3].前者需昂贵的仪器、多糖纯品和特定的酶,且操作繁琐,在应用中受到限制;后者方法简单、快速.

广东虫草 *Cordyceps guangdongensis* T. H. Li, Q. Y. Lin & B. Song 是广东地区独有的虫草新品种^[4],广东省微生物研究所初步研究结果显示,该虫草子座形态与冬虫夏草相似,虫草酸、虫草素含量较高,急性毒理试验显示无毒性(待另文发表).本文对广东虫草多糖的提取工艺进行了初步优化,利用改进的苯酚-硫酸法^[5]定量测定和比较了广东虫草不同来源所得多糖的含量,为今后对广东虫草多糖的进一步开发奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

广东虫草子实体、广东虫草子实体采收后的大米培养基(内含菌丝)、液体发酵菌丝体和发酵液,均由广东省微生物研究所真菌资源研究组提供.

葡萄糖标准品、苯酚、浓硫酸、氢氧化钠、碳酸氢钠、乙二胺四乙酸钠、无水乙醇、丙酮和乙醚,均为分析纯,购于环凯生物科技有限公司.

核酸蛋白分析仪 DU[®] 640(Beckman), DHZ-DA 恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂),超净工作台(苏净集团安泰产), Model J-6B 高速冷冻离心机(Beckman).

1.2 方 法

1.2.1 正交试验优化广东虫草多糖的提取工艺
粗多糖的提取路线:参照董彩虹^[6]的方法.将广东虫草子实体、发酵菌丝体及大米培养基进行干燥、研磨成粉末状.取3份干燥的粉末各10g,加入50mL无水乙醇进行脱脂.脱脂后挥发干燥的粉末加200mL蒸馏水于70~90℃水浴回流提取1~3h,抽滤后得滤液和滤渣,收集滤液,浓缩,边搅拌边加入3倍体积无水乙醇,置4℃冰箱沉淀过夜,5000r/min离心30min,沉淀分别以乙醚、丙酮、无水乙醇进行脱水干燥,所得产物即为广东虫草子实体、发酵菌丝体及大米培养基粗多糖.

广东虫草发酵液浓缩至原体积的1/5后,用3倍体积无水乙醇于4℃冰箱沉淀过夜,5000r/min离心30min,沉淀分别以乙醚、丙酮、无水乙醇进行脱水干燥,所得产物即为发酵液粗多糖.

为获得从广东虫草中提取活性多糖的最佳试验条件,得到最大提取率,本试验随机选用广东虫草大米培养基为材料,通过正交试验优化分离条件,选取

的因素及条件见表1.

表1 热水回流提取工艺正交试验表头设计

Tab.1 The factors and levels of extraction technics

水平	提取温度	提取时间	提取次数	φ (乙醇)
	(A)/℃	(B)/h	(C)	(D)/%
1	90	3	3	100
2	80	2	2	95
3	70	1	1	75

1.2.2 粗多糖的纯化 采用 Sevag 法^[6]脱蛋白.取粗多糖加蒸馏水,磁力搅拌并加热使其溶解,之后与 Sevag 试剂[V(氯仿):V(正丁醇)=4:1]按体积比5:1混合,装入分液漏斗中剧烈振荡,静置30min,上清液按上述步骤重复几次,直至两相间无明显的蛋白层.

将脱蛋白后所得多糖溶液在50℃、pH8.0时加入1/5体积的体积分数为30%的H₂O₂溶液,氧化脱色至糖溶液由棕色变为浅黄色.

将透析袋剪成适当长度小段,在2000mL的20g/L碳酸氢钠和1mmol/L EDTA(pH8.0)中将透析袋煮沸10min,用蒸馏水彻底清洗透析袋,之后在1mmol/L EDTA(pH8.0)中将透析袋煮沸10min.冷却后存放于4℃冰箱保存备用.

从冰箱中取出处理过的透析袋,用蒸馏水彻底清洗,之后装入脱色后的多糖溶液,用专用透析夹夹紧,置于蒸馏水中透析24h,每3h换水1次.之后将透析后的溶液加3倍体积无水乙醇在4℃冰箱沉淀过夜,离心,沉淀干燥得精多糖.

1.2.3 葡萄糖标准曲线绘制 称取精制苯酚5.0g,加水溶解并定容至100mL,混匀,得50g/L的苯酚溶液,置冰箱中保存.

精密称取干燥至恒质量的分析纯葡萄糖50mg,用蒸馏水溶解定容至500mL,即得葡萄糖标准液,置冰箱中备用.

分别精密吸取葡萄糖标准液0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00mL于6支有盖试管中,依次加入1.00、0.80、0.60、0.40、0.20、0mL去离子水,并各加入50g/L苯酚溶液1.5mL,浓硫酸7.0mL,摇匀后反应30min,然后用去离子水定容至10mL,冷却后在488nm波长下,以蒸馏水为空白对照测定 $D_{488\text{nm}}$.以 $D_{488\text{nm}}$ 为纵坐标,葡萄糖标准液质量浓度为横坐标绘制标准曲线.

1.2.4 多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸法^[7-8].精密称取干燥至恒质量的4种广东虫草精制多糖各5mg,置于100mL容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,摇匀.取样品液1.0mL,蒸馏水补充至2.0mL,加入

50 g/L的苯酚 1.0 mL,浓硫酸 5.0 mL,迅速振荡摇匀,于室温下显色 20 min,测定 $D_{488\text{ nm}}$,平行测定 3 次.并根据标准曲线的回归方程计算出供试液中的葡萄糖含量,按下式计算换算因子(f): $f = m / (C \times D)$,式中, m 为称取的虫草多糖质量(mg), C 为多糖液中葡萄糖的质量浓度(mg/mL), D 为多糖的稀释倍数.

取所配多糖样品液 2.0 mL,按 1.2.3 方法测定 $D_{488\text{ nm}}$,平行测定 3 次.根据标准曲线的回归方程计算出 C ,并按下式计算样品中多糖质量分数,多糖质量分数 = $C \times D \times f / M \times 100\%$,式中, M 为称取的广东虫草样品质量(mg).

1.2.5 精密度、稳定性及回收率试验 随机取子实体精制多糖样品液 2.0 mL,按 1.2.3 方法测定 $D_{488\text{ nm}}$,平行测定 6 次.

随机取菌丝体精制多糖样品液 2.0 mL,按 1.2.3 方法测定 $D_{488\text{ nm}}$ 在 20、30、40、50、60、90、120 min 后的变化.

回收率试验采用加样回收法^[6].取菌丝体精制多糖样品液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1.0 mL,用蒸馏水分别稀释至 2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,吸取稀释后的多糖溶液各 1.0 mL,再分别加入标准葡萄糖溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL,然后用蒸馏水补充至 2.0 mL,按照 1.2.3 法进行显色并测定 $D_{488\text{ nm}}$,根据葡萄糖的检出量,计算其回收率,回收率 = (试验测定值 - 样品所含被测成分量) / 加入纯品量 $\times 100\%$.

2 结果与分析

2.1 广东虫草活性多糖提取工艺的优化和提取结果

由表 2 得知,不同条件下多糖的提取率相差较大.从极差分析得出,多糖提取率的影响因素依次为提取温度 > 提取次数 > 提取时间 > 乙醇浓度,最佳组合为 A1B1C1D1,即在 90 $^{\circ}\text{C}$,提取 3 h,提取 3 次,乙醇体积分数 100% 时,多糖得率最高,为 10.41%.

2.2 葡萄糖标准曲线

由图 1 可知,葡萄糖质量浓度在 18 ~ 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,葡萄糖的质量浓度(x)与光密度(y)之间呈现良好的线性关系,符合郎伯 - 比尔定律.将样品的 $D_{488\text{ nm}}$ 代入方程即可求得相应的葡萄糖质量浓度.

2.3 多糖含量的测定结果

平行测定 3 次质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 4 种虫草多糖的 $D_{488\text{ nm}}$,并根据相应公式计算得出,广东虫草菌丝体、子实体、大米培养基及发酵液多糖在测定过程中的换算因子(f)分别为 2.391、2.109、1.115 和 1.308.

表 2 广东虫草活性多糖提取结果

Tab.2 The results of polysaccharide extraction

编号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	10.41
2	1	2	2	2	10.21
3	1	3	3	3	6.84
4	2	1	2	3	7.82
5	2	2	3	1	5.59
6	2	3	1	2	7.36
7	3	1	3	2	2.52
8	3	2	1	3	3.08
9	3	3	2	1	1.39
T1	27.46	20.75	20.85	17.39	
T2	20.77	18.88	19.42	20.09	
T3	06.99	15.59	14.95	17.74	
t1	9.15	6.92	6.95	5.80	
t2	6.92	6.29	6.47	6.70	
t3	2.33	5.20	4.98	5.91	
R	6.82	1.72	1.97	0.90	

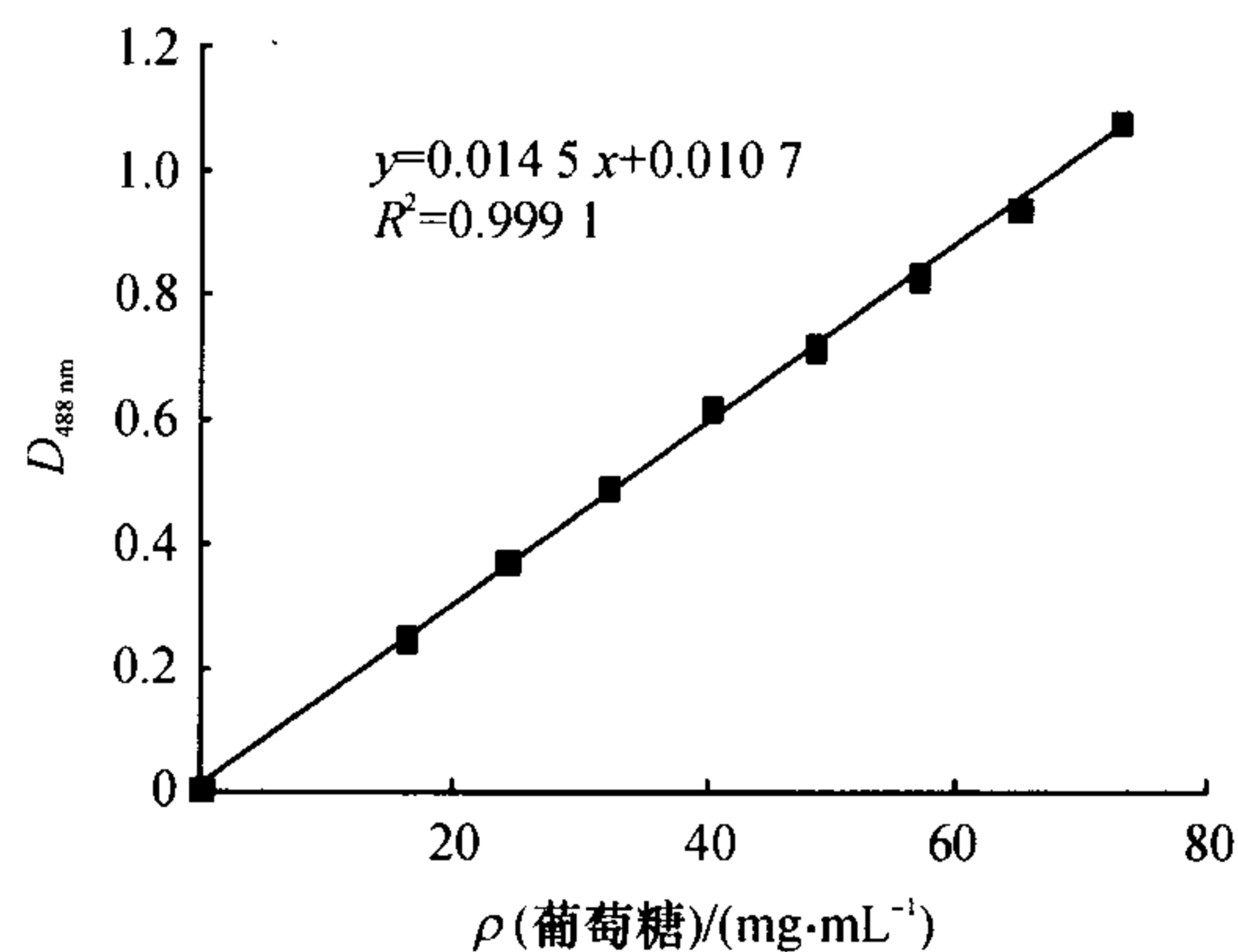


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

平行测定 3 次 4 种虫草多糖的 $D_{488\text{ nm}}$,并根据相应公式计算得出,广东虫草菌丝体、子实体、大米培养基及发酵液 4 种精多糖的质量分数分别为 6.15%、6.92%、5.40% 和 3.42%.

2.4 精密度、稳定性及回收率试验结果

精密度试验结果表明,连续 6 次测定子实体精多糖所得 $D_{488\text{ nm}}$ 分别为 0.434 8、0.465 7、0.468 7、0.513 0、0.513 6 和 0.523 0,平均为 0.4864,相对标准偏差为 0.59% ($n = 6$),小于 2%,表明本试验的精密度较好.

稳定性试验结果表明,虫草多糖溶液在显色后的 20、30、40、50、60、90 和 120 min 内 $D_{488\text{ nm}}$ 变化不大,即在此段时间范围内的稳定性良好.

由表3可知,6次试验的平均回收率为98.57%,标准偏差为1.12% ($n=6$),回收率在95%~105%之间,表明本试验的测定方法是可靠、可行的。

表3 回收率试验结果

Tab.3 The result of recovery rate

编号	与多糖量相当的葡萄糖量/ μg	加入葡萄糖量/ μg	试验测得量/ μg	回收率/%
1	22.42	10	32.26	98.40
2	17.94	20	37.35	97.05
3	14.95	30	44.41	98.20
4	11.21	40	51.35	100.35
5	8.97	50	57.76	97.58
6	7.47	60	67.09	99.36
平均			98.75	98.57

3 讨论与结论

虫草多糖的提取一般采用热水直接浸提脱脂后的虫草残渣,然后用乙醇沉淀得到虫草粗多糖。为获得从广东虫草中提取活性多糖的最佳试验条件,得到其最大提取率,本试验采用正交试验方法进行 $L_9(3^4)$ 试验。与娄红等^[9]在蛹虫草多糖提取上所采用的正交试验方法相比,本试验加入了提取时间对多糖提取率的影响,结果表明,提取时间的长短也会影响提取率,但其并非主要影响因素。试验条件下广东虫草多糖的最佳提取条件为:90℃水浴回流3h,重复提取3次,用无水乙醇进行沉淀。由于A1B2C2D2与A1B1C1D1这2种组合在多糖得率的高低方面相差不大,分别为10.21%和10.41%,实际生产中后者付出的能耗则相对较大。因此,考虑到成本等经济问题,大规模生产中选择A1B2C2D2进行提取,即提取温度90℃,提取2h,提取2次,乙醇体积分数为95%。

通过对广东虫草4种样品多糖的提取及含量测定,结果表明:广东虫草4种样品多糖含量有所差异,且由高到低依次为:子实体>液体发酵菌丝体>子实体采收后的大米培养基>发酵液,这与来永斌等^[10]在测定蛹虫草多糖含量时的结果不完全一致,可能是由于种间差异或培养过程中营养成分不同所致。

另外在多糖提取过程中,蛋白质和色素的存在

会对含量测定造成一定影响,所以本试验在多糖含量测定之前利用Sevag法去除了蛋白质,用氧化脱色法去除色素。此外,苯酚-硫酸法测定多糖含量虽然方便迅速,但在测定过程中,由于苯酚极易氧化,故要避免光或迅速操作,以尽量减小误差。

根据本试验结果,在开发利用广东虫草多糖时,应有针对性地利用子实体,由于菌丝体与子实体多糖含量差异不大,故也可用液体深层发酵菌丝提取多糖。另外广东虫草米饭培养基中也可能含有部分虫草多糖,但由于其中混有的米饭可能会对虫草多糖的纯度有一定影响,在后续试验中应尽量减少这些因素,以提高其利用率,这样既可以节省资源,避免栽培料的浪费,又可以实现工厂化大规模生产,缩短生产周期,为广东虫草多糖作为安全有效的免疫调节剂提供充足的资源。

参考文献:

- [1] KIRK P M, CANNON P F, DAVID J C, et al. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi[M]. 9th ed. Wallingford: CAB International, 2001
- [2] 刘霞, 谢建新, 李艳. 多糖的药理作用研究[J]. 农垦医学, 2004, 26(1): 36-39.
- [3] 张惟杰. 糖类复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.
- [4] LIN Q Y, LI T H, SONG B. *Cordyceps guangdongensis* sp. nov. from China[J]. Mycotaxon, 2008, 103: 371-376.
- [5] 郑必胜, 唐芳勇, 闫文娟, 等. 苯酚-硫酸法测定广东虫草菌丝体多糖含量的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2008(8): 17-21.
- [6] 董彩虹. 冬虫夏草的深层培养及代谢产物研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006.
- [7] 鲁晓岩. 硫酸-苯酚法测定北冬虫夏草多糖含量[J]. 食品工业科技, 2002, 23(4): 69-70.
- [8] 薛阳, 张沙艳, 李峰. 苯酚-硫酸法测定蛹虫草中多糖含量[J]. 中国实用医药杂志, 2007, 2(15): 87-89.
- [9] 娄红, 金莉莉, 王洋洋, 等. 蛹虫草大米培养基中活性多糖的提取及免疫调节功能研究[J]. 特产研究, 2006, 4: 46-48.
- [10] 来永斌, 王琦, 孙月. 蛹虫草多糖含量的测定及分析[J]. 中成药, 2001, 23(7): 517-518.

【责任编辑 周志红】