

文章编号 :1009-038X(2002)02-0144-04

姬松茸多糖提取条件及其沉淀特性

王六生, 谷文英

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要 :研究了不同的提取温度、提取时间和加水比,对姬松茸液体发酵菌丝体和固体栽培子实体粗多糖提取率的影响。采用二元二次回归的分析方法得姬松茸菌丝体和子实体的最佳提取条件为:菌丝体为 10 倍加水量于 90 ℃ 提取 3.3 h;子实体为 10 倍加水量于 90 ℃ 提取 3.4 h。提取率可以分别达到 1.376% 和 1.640%。在此基础上,比较了乙醇质量分数和提取液 pH 对姬松茸子实体和菌丝体多糖沉淀特性的影响。

关键词 :姬松茸;子实体;菌丝体;多糖

中图分类号:Q 538

文献标识码:A

Studies on the Extracting and Precipitating of the Polysaccharides from *Agaricus blazei*

WANG Liu-sheng, GU Wen-ying

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : The effects of temperature, time and water ratio on the polysaccharides recovery were investigated. With regression analysis, the optimum extracting conditions were as followings: $R/W = 1/10$, $T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 3.3$ hours (mycelium as raw materials). However, for fruiting body as raw materials, the best conditions were: $R/W = 1/10$, $T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 3.4$ hours. The extract ratios were 1.376% and 1.640%, respectively. The effects of alcohol concentration and solution pH on the precipitating property of the polysaccharides from mycelia and fruiting bodies of *Agaricus blazei* were also investigated.

Key words : *Agaricus blazei* Murill; the fruiting body; mycelium; polysaccharides

姬松茸又称巴西蘑菇,学名为 *Agaricus blazei* murill。在分类上隶属担子菌纲伞菌目蘑菇科蘑菇属。姬松茸子实体和菌丝体水提物中经证实含有多种免疫增强的活性成分。姬松茸多糖作为其中最主要的抗肿瘤成分,具有比其他食用菌多糖更大的抑瘤率^[1~3]。作者比较了子实体和菌丝体提取条件和多糖得率方面的差异,并对多糖的乙醇沉淀特性进行了比较。

1 材料与方法

1.1 原料

姬松茸子实体,市售;姬松茸菌丝体为本实验室保留菌种经深层发酵所得。

1.2 仪器和试剂

752 紫外分光光度计;80-2B 型台式离心机;95% 工业乙醇、硫酸、苯酚为国产分析纯试剂。

收稿日期 2001-11-07; 修订日期 2001-12-27。

作者简介:王六生(1977-),男,安徽怀宁人,粮食、油脂与植物蛋白工程硕士研究生。

万方数据

1.3 多糖提取方法

姬松茸干子实体和干菌丝体(60 ℃ 烘干)经粉碎过 60 目筛 ,称取 0.5 g 样品 ,加水 10~30 倍 ,于 70~90 ℃ 水浴中提取 2~4 h ,3 000 r/min 离心 10 min ,取上清液调 pH 值至 6.0(除 pH 值实验部分外)加入 2 倍体积 95% 工业乙醇得沉淀多糖 ,苯酚-硫酸法测定多糖含量^[4]。

多糖提取率 = 多糖质量 / 样品质量

2 结果与分析

2.1 不同提取剂对多糖得率的影响

分别采用蒸馏水、0.5 mol/L 的 NaOH、0.5 mol/L 的 (NH₄)₂C₂O₄ 作为提取剂 ,于 90 ℃ ,10 倍的加水量提取 3 h ,酶提法为先加 10 倍的蒸馏水提取 1 h ,再加 2% 的木瓜蛋白酶于 60 ℃ 保温 1 h ,90 ℃ 灭酶后继续提取 2 h ,结果见表 1。

表 1 不同提取剂对多糖得率的影响

Tab.1 The effects of different extracting media on the recovery of polysaccharides

提取剂	子实体多糖提取率/%	菌丝体多糖提取率/%
蒸馏水	1.59	1.38
1 mol/L 的 (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	1.95	1.77
0.5 mol/L 的 NaOH	2.13	1.97
加酶提取	1.7	1.49

从表 1 可见 ,热水能将大部分多糖提取出来。盐和碱都有助于多糖的溶出 ,这可能是因为它们能破坏细胞壁的结构 ,从而使得胞壁多糖和胞内多糖得到更多的释放。加木瓜蛋白酶能稍微增加提取率 ,可能是由于蛋白酶能使包含在蛋白质中的多糖得到更有效的释放。

2.2 水提实验条件的确定

根据 Box-Benhnken 的中心组合设计原理^[5] ,作了三因素三水平的响应面分析实验 ,共有 15 个实验点 ,其中 3 个为中心实验 ,用以估计误差。以提取温度、提取时间、加水比为自变量 ,以多糖提取率为响应值 ,实验因素及水平选取见表 2。

表 2 因素与水平取值表

Tab.2 Factors and levels

因素/水平	提取温度/℃	提取时间/h	加水比
-1	70	2	1:10
0	80	3	1:20
1	90	4	1:30

根据表 2 对实验因素和水平的设计 ,得每次实验的菌丝体和子实体的提取率 ,见表 3。采用回归方程 $y = A + Bx_1 + Cx_2 + Dx_3 + Ex_1x_1 + Fx_2x_2 + Gx_3x_3 + Hx_1x_2 + Ix_1x_3 + Jx_2x_3$,表 3 数据用 SPSS 统计分析软件进行非线性回归^[6] ,对所得到的两个回归方程进行数学分析(见表 4) ,可以得到菌丝体和子实体提取的最佳条件。

表 3 提取实验结果

Tab.3 The results of extracting experiments

实验号	提取温度 x_1	提取时间 x_2	加水比 x_3	(菌丝体提取率 y)×100	(子实体提取率 y)×100
1	-1	-1	0	0.969	1.10
2	-1	0	-1	0.931	1.04
3	-1	0	1	0.998	1.11
4	-1	1	0	0.894	1.41
5	0	-1	-1	1.070	1.32
6	0	-1	1	1.132	1.33
7	0	1	-1	1.171	1.35
8	0	1	1	1.147	1.44
9	1	-1	0	1.300	1.51
10	1	0	-1	1.369	1.65
11	1	0	1	1.339	1.68
12	1	1	0	1.324	1.54
13	0	0	0	1.190	1.36
14	0	0	0	1.222	1.39
15	0	0	0	1.246	1.42

用 SPSS 做二次非线性回归分析 ,得拟合的方程 ,分别为 :

菌丝体 $y = -3.148 + 0.07134x_1 + 0.234x_2 + 0.03715x_3 - 0.000342x_1^2 - 0.0634x_2^2 - 0.000259x_3^2 + 0.002475x_1x_2 - 0.000243x_1x_3 - 0.00215x_2x_3$

子实体 $y = -2.992 + 0.07525x_1 + 0.135x_2 + 0.01075x_3 - 0.000325x_1^2 - 0.0675x_2^2 + 0.000375x_3^2 + 0.003x_1x_3 - 0.00035x_1x_3 + 0.002x_2x_3$

表 4 回归模型的数学分析

Tab.4 The mathematic analysis of regression equations

响应值变量	菌丝体	子实体
温度/℃	90	90
提取时间/h	3.3	3.4
加水比(质量分数)	15.8	30
计算提取率最大值/%	1.384	1.663

表 5 回归方程的方差分析

Tab.5 The derivation analysis of regression equations

方差来源	自由度	菌丝体提取方差分析			子实体提取方差分析		
		平方和	F 值	显著性	平方和	F 值	显著性
回归	9	0.324	35.225	* *	0.559	29.589	* *
残差	5	0.005105			0.0105		
总离差	14	0.329	0.5695				
线性相关系数(R 值)			0.992			0.991	

注 : $f_{0.01}(9,5)=10.2$

2.4 乙醇质量分数对多糖得率的影响

乙醇的质量分数对多糖的得率有一定的影响 ,主要取决于多糖的相对分子质量的大小和分子的形状 .一般来说 ,多糖的相对分子质量越大 ,被沉淀下来所需的乙醇质量分数越小^[4] . 本实验选择 30 % 60 % 90 % 的乙醇对水提液进行分步沉淀 ,检测子实体和菌丝体水溶性多糖的分布情况 ,结果见表 6 . 可以看出 ,子实体不但总水提多糖较多 ,而且所含的高相对分子质量多糖和中相对分子质量多糖的相对得率也较菌丝体的大 .

2.5 pH 值对多糖得率的影响

多糖有酸性、中性及碱性之分^[4] ,提取液的 pH 值直接影响到带电状态 ,也就影响到它们的溶解度 . 在不同的 pH 值下 ,乙醇沉淀多糖得率也有所不

同 . 另外 ,考虑到过强的酸碱度有可能影响到多糖结构的稳定性 ,故在 pH 4.0~8.0 内做多糖的沉淀实验 ,见表 7 .

2.3 最佳工艺条件的确定

根据两个回归模型和数学分析结果 ,菌丝体和子实体的提取条件略有差异 ,主要是加水量不同 ,但如果子实体提取条件中采用 10 倍的加水量(3.4 h,90 ℃) ,提取得率也可以达到 1.640 % ,与 30 倍的加水量时的得率 1.663 % 相差无几 ;菌丝体若采用 10 倍的加水量(3.3 h,90 ℃)提取率可以达到 1.376 % ,与最大值 1.38 % 接近 . 这说明在 10~30 倍的加水量范围内 ,加水量对提取率的影响甚微 . 但是 ,若再减少加水量就不能使原料处于完全浸湿状态 . 考虑到减轻浓缩等后处理工艺的负担 ,在实际提取工艺中采取以下条件 :菌丝体为 10 倍加水量于 90 ℃ 提取 3.3 h ;子实体为 10 倍加水量提取 3.4 h .

同 . 另外 ,考虑到过强的酸碱度有可能影响到多糖结构的稳定性 ,故在 pH 4.0~8.0 内做多糖的沉淀实验 ,见表 7 .

表 6 乙醇质量分数对多糖得率的影响

Tab.6 The effects of ethanol concentration on the recovery of polysaccharides

乙醇质量 分数/%	子实体		菌丝体	
	多糖得率 /%	相对得率 /%	多糖得率 /%	相对得率 /%
30	0.0516	2.65	0.0355	2.29
60	1.352	69.50	1.002	64.67
90	0.5416	27.84	0.512	33.04
三部分 总得率	1.945	100	1.55	100

表 7 pH 值对多糖沉淀性质的影响

Tab.7 The effects of pH on the recovery of polysaccharides

pH 值	子实体提取率/%	菌丝体提取率/%
4.0	0.152	0.133
5.0	0.147	0.131
6.0	0.140	0.128
7.0	0.137	均未发现有多糖沉淀
8.0	0.148	

pH 值对子实体和菌丝体在多糖沉淀特性方面 有较大的不同 ,子实体在 pH 4.0~8.0 内沉淀下来 的多糖相当 ,说明子实体含有相当的酸性、中性及 碱性多糖。但菌丝体当 pH 值大于 7.0 时几乎没有 发现多糖沉淀下来 ,即在碱性时 ,菌丝体多糖表面 带大量的电荷 ,造成相互排斥而不能沉淀 ,这说明 菌丝体主要是酸性多糖。

3 讨 论

1) 高等真菌多糖主要是细胞壁多糖 ,多糖组分 主要存在于其形成的小纤维网状结构交织的基质 中^[4]。无论子实体还是菌丝体 ,取得其中的多糖必 须破坏其细胞壁结构。用热水提取能够达到这种效

果 ,加入盐及碱后能增强这种效果。一般是用热水 提取后 ,再用盐提取 ,最后用不同浓度的碱提取。既 能提高多糖的提取率又能对多糖实现初步分级分 离。

2) 根据以上的试验结果 ,子实体和菌丝体的提 取条件接近。从两个回归方程可以看出 ,对提取率 影响最大的是温度 ,加水比的增大对提高提取率效 果不明显。这可能与姬松茸子实体和菌丝体的持水 率较低 ,复水所用的水分较少有关。

3) 从多糖提取实验条件及其结果可以看出 ,温 度对多糖的提取率影响较大 ,参考有关文献 ,当热 水的温度提高到 100 ℃ 时(4 倍乙醇沉淀) ,菌丝体 多糖的提取率可以提高到 2.1%^[7] ,比作者采用的 90 ℃ 的提取率 1.5% 增加 40%。子实体的提取率达 到 2.07%(10 倍加水量 ,100 ℃ 提取 5 h ,4 倍乙醇 沉淀) ,比作者提取率 1.9% 增加 10%。因而是是否提 高多糖的提取温度 ,以及提高温度对多糖的结构和 生物活性的影响 ,均有待于进一步的研究和证实。

4) 从子实体和菌丝体的沉淀特性实验看 ,两种 多糖的性质有所不同 ,特别是它们的电荷性质有较 大的差异。在实际提取工艺中 ,子实体和菌丝体的 水提液可以先将 pH 值调至 5.0 ,再采用 2 倍体积 95% 乙醇进行沉淀。

参考文献：

[1] TAKASHI MIZUO , TOSHIRIKO HAGIWARA , TAKUJI NAKAMURA , *et al.* Antitumor activity and some properties of water-souble polysaccharides from “ Himematsutake ” , the fruiting body of *Agricus blazei* muril[J]. *Agric Bilo Chem* ,1990 ,54 (11) 2889 – 2896.

[2] MASASHI MIZUNO , KEN ICHIRO MINATO , HITOSHI ITO *et al.* Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agricus blazei* muril[J]. *Biochemistry and Molecular Biology International* ,1999 ,47(4) :707 – 714.

[3] 黄年来。巴西蘑菇值得研究推广[J]。中国食用菌 ,1994 ,13(1) :11 – 13.

[4] 张惟杰主编。复合多糖研究技术[M]。上海 :上海科学出版社 ,1987.

[5] 杨梅。姬松茸提取方法的研究[J]。福建大学学报(自然科学版) ,1998 ,14(1) 85 – 89.

[6] 苏金明编。统计软件 SPSS for Windows 实用指南[M]。北京 :电子工业出版社 ,2000.

[7] HITOSHITO , KEISHIRO SHIMURA , HIROKO ITOH. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex(ATOM) prepared from *Agricus blazei* (Iwade Strain 101) “ Himematutake ” and its Machanism in Tumor-Bearing Mice[J]. *Anticacer Research* ,1997 ,17 :277 – 284.

(责任编辑 :李春丽)