

荷叶离褶伞可溶性多糖提取工艺研究

张芬琴,李彩霞,李鹏,崔玮,张勇
(河西学院生命科学与工程系,甘肃张掖 734000)

摘要:对荷叶离褶伞(*Lyophyllum decastes* Sing)可溶性多糖的提取工艺进行了研究,通过正交设计和方差分析确定了多糖的最佳提取条件。结果表明:时间和温度对荷叶离褶伞多糖的提取影响较大,其最佳工艺为温度 85℃、pH9.0、料液比 1:15、提取时间 1.5h,用苯酚-硫酸法测定最佳提取工艺条件下固形物中多糖含量为 65.52%。

关键词:荷叶离褶伞,可溶性多糖,提取工艺

Study on extraction technology of soluble polysaccharides from *Lyophyllum decastes* Sing

ZHANG Fen-qin, LI Cai-xia, LI Peng, CUI Wei, ZHANG Yong

(Department of Life Science and Engineering, Hexi University, Zhangye 734000, China)

Abstract: The effects of temperature, solid-liquid ratio, time and pH on the polysaccharides of *Lyophyllum decastes* were investigated. The optimum extractive condition of polysaccharides was determined through orthogonal experiment design and variance analysis. The experimental results indicated that the reaction time and temperature significantly affected the extraction percent of the soluble polysaccharides, the optimum extraction conditions were temperature 85℃, pH9.0, solid-liquid ratio 1:15 and extraction time 1.5h. Under these condition, the extraction percent of soluble polysaccharides was 65.52% in solid.

Key words: *Lyophyllum decastes* Sing; soluble polysaccharides; extraction technology

中图分类号:TS201.3

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2010)05-0224-03

荷叶离褶伞(*Lyophyllum decastes* Sing)属于担子菌纲、伞菌目、口蘑科离褶伞属(*Lyophyllum*),是一种十分珍贵的野生食用真菌,口感脆滑、味道鲜美,以鲜食为主,但干制后营养和口感不变,它的子实体可以作为一种传统的药物。目前,对于荷叶离褶伞研究报道较少,Yuuichi Ukawa等从荷叶离褶伞子实体的热水提取物中分离出 11 种多糖,并且可以抑制肿瘤的生长^[1];Toshihiro MIURA等报道,荷叶离褶伞水提取物可以降低胰岛素依赖型小白鼠的血糖浓度^[2],魏生龙等^[3]对荷叶离褶伞的生物学特征进行了研究,程继红等对荷叶离褶伞工厂化栽培首次进行了研究^[4],此前未见荷叶离褶伞多糖提取工艺方面的研究报道。本文采用正交设计法对荷叶离褶伞多糖提取工艺进行研究,为制定科学、经济的荷叶离褶伞多糖制备工艺提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

荷叶离褶伞 2003 年 7 月采自甘肃省张掖市肃南县东柳沟,挑选无虫害、生长良好植株,并洗掉泥

土,60℃烘干粉碎备用;95%乙醇、乙醚、丙酮、浓硫酸、苯酚(重蒸酚)、HCl、NaOH 均为国产分析纯。

7230G 型分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;电热恒温水浴锅 上海沪南科学仪器厂;电子天平(0.01mg/200g)mettler Toledo 公司;PHs-2c 精密酸度计 上海大普仪器有限公司;离心机 北京医用离心机厂。

1.2 实验方法

1.2.1 荷叶离褶伞多糖的浸提条件 原料脱脂:称取一定量的样品,加入 10 倍量的乙醚回流脱脂两次,每次 2h,减压过滤,滤液回收乙醚,滤渣挥发乙醚备用。脱脂后的原料采用热水浸提,过滤后滤液备用。

1.2.2 乙醇沉淀倍数的确定 取 6 支试管,分别加入 1.2.1 制备的多糖提取液 1mL,然后加入 1.5、2、2.5、3、3.5、4 倍预冷的 95% 的乙醇,用封口膜封试管口,放入冰箱过夜。次日离心,沉淀用蒸馏水溶解,并测定多糖的含量,根据糖的含量确定乙醇沉淀倍数。

1.2.3 正交实验 影响多糖提取的主要因素有温度、pH、固液比、时间,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验^[5-6]优化最佳提取条件,正交实验因素与水平见表 1。

1.3 多糖含量的测定^[7]

1.3.1 葡萄糖标准曲线的制备 精密称取 105℃干燥恒重的葡萄糖 100mg,溶解定容于 100mL 的容量

收稿日期:2009-06-11

作者简介:张芬琴(1963-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物化学。

基金项目:甘肃省教育厅资助项目(0609-08);西部资源环境化学重点实验室科研项目(XZ0603);甘肃省教育厅项目(038B-01)。

表1 L₉(3⁴)正交实验因素与水平

水平	因素			
	A 温度 (°C)	B pH	C 固液比	D 时间 (h)
1	75	5	1:10	0.5
2	85	7	1:15	1.0
3	95	9	1:20	1.5

瓶中,摇匀。取10mL溶液于100mL容量瓶中定容至刻度,摇匀,此溶液含葡萄糖0.1mg/mL,置于冰箱备用。精密吸取葡萄糖标准溶液0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00mL,分别置于具塞试管中,用蒸馏水补充至2.00mL,加入6%的苯酚1mL,迅速滴加5.00mL浓H₂SO₄。另以1mL蒸馏水做同上操作,作为空白液,于沸水浴中15min。取出,冷却至室温。15min后于490nm处测定吸光度值,计算得回归方程为:Y = 0.1602374A - 0.00088, r = 0.9994, Y为葡萄糖的含量(mg), A为吸光度, r为相关系数,实验表明,葡萄糖浓度在5~100μg时,吸光度呈良好的线性关系。

1.3.2 样品多糖含量测定 将浓缩一定体积的多糖提取液,加入3倍量的95%乙醇,置于冰箱过夜,在3500r/min条件下离心10min,得荷叶离褶伞粗多糖,用乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚反复洗涤沉淀,然后用热水溶解后定容于100mL容量瓶中,精确吸取10mL置于事先恒重的称量瓶中,放置于40℃真空干燥器中烘至恒重,称其固形物含量。然后将固形物溶解并定容于10mL容量瓶中。按标准曲线法测定吸光度,根据回归方程计算多糖含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = \frac{C \times V}{W \times V_s \times 1000} \times 100\%$$

式中:C为供试液中标准曲线中查得葡萄糖的含量(mg); V为样品液的总体积(mL); W为供试品的重量(mg); V_s为样品测定液的体积(mL)。

方差分析采用SPSS12统计软件分析。

2 结果与分析

2.1 乙醇沉淀倍数对多糖含量的影响

乙醇沉淀多糖主要取决于多糖的浓度和多糖的类别,化学组成和分子量。选择不同乙醇沉淀倍数进行实验,结果见图1,随着乙醇沉淀倍数的增加,多糖的含量也在增加,乙醇沉淀倍数为3倍时多糖含量最高,在3.5倍时多糖含量下降,因此在以下实验中以3倍乙醇沉淀多糖,然后测定多糖的含量。

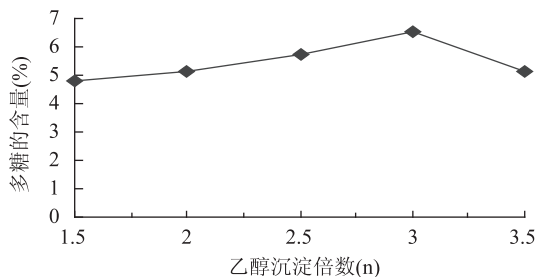


图1 乙醇沉淀倍数对多糖含量的影响

2.2 正交实验设计

以浸提温度、pH、固液比、时间作为研究对象,按L₉(3⁴)正交设计,以固形物中多糖含量作为考察指标,结果见表2。

表2 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	固形物得率 (g)	固形物中多糖含量 (%)
1	1	1	3	2	0.110	42.90
2	2	1	1	1	0.088	50.82
3	3	1	2	3	0.100	58.73
4	1	2	2	1	0.095	50.01
5	2	2	3	3	0.083	61.67
6	3	2	1	2	0.105	45.55
7	1	3	1	3	0.075	65.27
8	2	3	2	2	0.095	59.12
9	3	3	3	1	0.100	44.63
K ₁	158.18	152.45	161.65	145.46		
K ₂	171.61	157.24	167.86	147.58		
K ₃	148.91	169.02	149.20	185.67		
k ₁	52.73	50.82	53.88	48.49		
k ₂	57.20	52.41	55.95	49.19		
k ₃	49.64	56.34	49.73	61.89		
R	7.57	5.52	6.22	13.40		

从实验结果看出,固液比越大、温度越高,提取液中固形物含量较高,但多糖含量不高,说明固液比增大时除多糖溶出外其他可溶性杂质也溶出,温度较高对多糖具有降解作用。从表2可以看出,四因素对荷叶离褶伞多糖提取率影响的大小依次为:提取时间、温度、固液比、pH,其中提取时间的长短对多糖含量的影响最大,其次是温度、固液比,pH影响最小。

方差分析表明:各因素间差异不显著。综合表2和表3,多糖提取的最佳组合为A₂B₃C₂D₃,即温度为85℃、pH9.0、料液比1:15、提取时间1.5h,用苯酚-硫酸法测定最佳提取工艺时固形物中多糖含量为65.52%。

表3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	显著性
温度	86.843	2	43.422	1.791	0.358
时间	341.434	2	170.717	7.041	0.124
固液比	60.182	2	30.091	1.241	0.446
误差(pH)	48.491	2	24.245		
总变异	536.95	8			

3 结论

3.1 粗多糖的乙醇沉淀倍数采用三倍量的95%乙醇,4℃静置12h以上,沉淀比较完全。

3.2 在乙醇沉淀倍数为3倍时,通过正交设计和方差分析确定荷叶离褶伞多糖最佳提取工艺为:提取温度85℃,pH9.0,料液比1:15,提取时间1.5h。在此条件下,固形物中多糖含量为65.52%。

3.3 本文首次报导了荷叶离褶伞多糖的醇沉水提取工艺。该工艺操作简单,成本较低,得率较高,可据此进行大规模生产。关于荷叶离褶伞多糖的化学结构组成和药理活性还有待进一步研究。

参考文献

[1] Yuuichi Ukawa, Hitoshi Ito, Makoto Hisamatsu. Antitumor effects of (1→3)-β-D-glucan and (1→6)-β-D-glucan (下转第350页)

的研究价值。

2.4 牛磺酸、羟脯氨酸含量

氨基酸测定中,牛磺酸和羟脯氨酸的含量也进行了测定。海参肠和呼吸树中含有牛磺酸,其含量分别为 2303.46、678.31mg/100g(干重),而海参体壁中未测得含有牛磺酸。另外,羟脯氨酸测定结果显示,海参肠和呼吸树中均未含有羟脯氨酸,而体壁中羟脯氨酸含量非常丰富,为 7257.16mg/100g(干重)。

2.5 脂肪酸组分分析

海参中脂肪酸种类比较丰富,测定结果见表 4。海参体壁中共鉴定出 18 种脂肪酸,占气相色谱总峰面积 77%,其余成分未确认。定量分析表明,海参体壁脂肪酸中饱和脂肪酸(SFA)占 22.8%,不饱和脂肪酸(USFA)占 54.2%,其中单不饱和脂肪酸(MUFA)占 37.3%,多不饱和脂肪酸(PUFA)占 16.9%。海参肠中共鉴定出 14 种脂肪酸,占气相色谱总峰面积的 83.8%,其余成分未确定。海参肠中 SFA 占 13.8%,USFA 占 70%,其中 MUFA 占 33.3%,PUFA 占 36.7%。海参呼吸树中共鉴定出 16 种脂肪酸,占气

表 4 仿刺参不同部位脂肪酸组成(g/100g,脂肪)

脂肪酸	体壁	参肠	呼吸树
C _{14:0}	2.4	—	1.5
C _{14:1}	1.6	—	—
C _{16:0}	9.5	5.8	9.6
C _{16:1}	22.5	16.1	14.2
C _{17:0}	0.8	—	1.5
C _{17:1}	1.0	1.4	—
C _{18:0}	8.9	6.7	9.0
C _{18:1}	3.8	4.3	3.1
C _{18:2}	1.4	1.2	1.6
C _{18:3}	1.4	—	1.1
C _{20:0}	1.2	1.3	1.6
C _{20:1}	5.2	4.6	6.0
C _{20:2}	0.6	1.2	1.1
C _{20:4}	2.4	4.3	4.9
C _{20:5}	9.4	24.4	18.5
C _{22:1}	1.3	1.6	1.6
C _{22:5}	1.7	5.6	2.4
C _{24:1}	1.9	5.3	2.9
SFA	22.8	13.8	23.2
MUFA	37.3	33.3	27.8
PUFA	16.9	36.7	29.6

注:SFA = 饱和脂肪酸;MUFA = 单不饱和脂肪酸;PUFA = 不饱和脂肪酸;“—”未检出。

(上接第 225 页)

purified from newly cultivated mushroom, *Hatakeshimeji* (*Lyophyllum decastes* Sing.) [J]. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90(1): 98-104.

[2] Toshihiro Miura, Mizue Kubo, Yasushi Itoh, et al. Antidiabetic Activity of *Lyophyllum decastes* in Genetically Type 2 Diabetic Mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(9): 1234-1237.

[3] 魏生龙,王治江,于海萍,等. 荷叶离褶伞生物学特性研究 [J]. *菌物学报*, 2006, 25(1): 101-108.

相色谱总峰面积的 80.6%,其余成分未确定。海参肠中 SFA 占 23.2%,USFA 占 57.4%,其中 MUFA 占 27.8%,PUFA 占 29.6%。

通过对脂肪酸组成的分析,发现海参肠中不饱和脂肪酸含量高于海参体壁、呼吸树,其中海参肠多不饱和脂肪酸二十碳五烯酸(EPA)含量高达 24.4%,明显高于海参体壁的 9.4%和呼吸树的 18.5%;另外,海参肠所含的二十二碳五烯酸为 5.6%,略高于海参体壁的 1.7%和呼吸树的 2.4%。测定中并未检测到海参体壁、肠、呼吸树中存在二十二碳六烯酸(DHA)的存在。

3 结论

海参体壁的营养价值已被公认,而对于参肠、呼吸树的营养价值认识不足。本研究通过对体壁、肠、呼吸树等部位常量营养测定、多糖和皂苷的测定、氨基酸和脂肪酸组成的测定,综合评价了参肠、呼吸树的营养价值。经过分析,发现参肠、呼吸树蛋白含量均高于体壁,氨基酸的 EAA/TAA, EAA/NEAA 指标更接近 FAO/WHO 的理想模式,且第一限制性氨基酸赖氨酸含量也远远高于体壁。参肠和呼吸树中均含有丰富的牛磺酸,在体壁中确未检测到。海参多糖在参肠和呼吸树中含量较少,但皂苷含量却高于体壁,海参皂苷具有抗真菌、抗肿瘤、抗胆碱等多种活性。脂肪酸组分的分析表明参肠、呼吸树中 EPA 的含量均高于体壁。许多研究证明,EPA 具有降血压、促进平滑肌收缩、扩张血管、阻碍血小板凝集和防止动脉硬化、防治老年性痴呆等功能。因此经综合评价分析,海参肠、呼吸树可作为开发功能食品的新原料,具有较高的营养保健价值。

参考文献

- [1] 廖玉麟. 中国动物志(第 1 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 61.
- [2] 沈明, 陈建伟. 糙海参多糖纯化工艺优选及其产物的药理活性比较 [J]. *中国海洋药物*, 2003(1): 1-3.
- [3] 唐孝礼, 丘鹏新, 黎明涛, 等. 黑海参酸性粘多糖的分离纯化 [J]. *中草药*, 1999, 22(5): 223-225.
- [4] 王晓华, 李玲, 易杨华, 等. 花刺参中两个新的三萜皂苷 [J]. *中国天然药物*, 2006, 4(3): 176-180.
- [5] 袁文鹏, 丛日山, 杨秀霞, 等. 水溶性海参皂苷的分离纯化及其抗真菌活性研究 [J]. *山东大学学报*, 2007, 42(5): 69-73.
- [6] 郑建仙. 功能性食品 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 185-186.

[4] 程继红, 郑慧芬, 贲伟东, 等. 荷叶离褶伞工厂化栽培 [J]. *食用菌学报*, 2008, 15(2): 20-22.

[5] 姜同川. 正交实验设计 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1985: 110.

[6] 孙锋, 谷文英, 丁霄霖. 山药粗多糖的提取工艺 [J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(3): 79-83.

[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.