

虫草发酵液胞外多糖的醇沉工艺优选

陈丽华¹, 张清华¹, 管咏梅^{1*}, 程磊¹, 李钰¹, 朱卫丰¹, 杨明², 吴德智¹

(1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西济民可信金水宝制药有限公司, 南昌 330096)

[摘要] 目的: 优选冬虫夏草发酵液中胞外多糖的醇沉工艺参数。方法: 采用苯酚-硫酸法测定胞外多糖含量, 检测波长489.4 nm。以胞外多糖质量为指标, 通过正交试验考察乙醇用量、醇沉温度和时间对发酵液中胞外多糖的水提醇沉工艺的影响。结果: 最佳醇沉工艺参数为加4倍量95%乙醇于20℃醇沉7.5 h; 胞外多糖质量0.671 g, 纯度69.32%。结论: 发酵液中胞外多糖含量较高, 可加以充分利用; 优化的虫草胞外多糖发酵液醇沉工艺稳定可行。

[关键词] 虫草发酵液; 胞外多糖; 苯酚-硫酸比色法; 金水宝

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0020-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014180020

Optimization of Alcohol Precipitation Process for Extra-cellular Polysaccharides from Fermentative Fluid of Cordyceps

CHEN Li-hua¹, ZHANG Qing-hua¹, GUAN Yong-mei^{1*}, CHENG Lei¹, LI Yu¹,
ZHU Wei-feng, YANG Ming², WU De-zhi¹

(1. Key Laboratory for Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

2. Jiangxi Jiming Kexin Jinshuibao Co. Ltd, Nanchang 330096, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize alcohol precipitation process of extra-cellular polysaccharides in fermentative fluid of Cordyceps. **Method:** Phenol-sulfuric acid was adopted to determine the content of extra-cellular polysaccharides with detection wavelength at 489.4 nm. Taking the content of extra-cellular polysaccharides as index, orthogonal test was adopted to optimize alcohol precipitation process with ethanol amount, alcohol precipitation temperature and time as factors. **Result:** Optimum alcohol precipitation process parameters were as follows: alcohol precipitation for 7.5 h with 4 times the amount of 95% ethanol at 20℃; the content of extra-cellular polysaccharides was 0.671 g with purity of 69.32%. **Conclusion:** The content of extra-cellular polysaccharides in fermentative fluid of Cordyceps is high and can be utilized sufficiently. This optimized alcohol precipitation is reasonable and practical for industrial production of Jinshuibao capsules.

[Key words] fermentative fluid of Cordyceps; extra-cellular polysaccharides; phenol-sulfuric acid method; Jinshuibao preparations

金水宝是从新鲜冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 中分离的虫草菌——蝙蝠蛾拟青霉

经液体深层发酵培养、过滤、干燥、粉碎制成的中药制剂, 具有补益肺肾、秘精益气的功用。发酵液是虫

[收稿日期] 20140121(002)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09201-201-30); 江西省落地计划项目(赣财教指[2013]71号); 江西中医药大学研究生创新专项资金立项项目(JZYC12A01); 江西省研究生创新专项资金立项项目(YC2013-S238)

[第一作者] 陈丽华, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: chllly98@163.com

[通讯作者] * 管咏梅, 博士, 副教授, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: guanym2008@163.com

草菌粉发酵过程中的滤液,含有胞外多糖、腺苷等成分,具有提高免疫力、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤等药理作用^[1-3]。但发酵液一般被当作废弃液直接排掉,造成了资源的极大浪费,而且还会污染环境。故本实验以虫草发酵液为研究对象,建立发酵液中胞外多糖的含量测定方法^[4-8],并通过正交试验考察乙醇用量、醇沉温度及时间对该成分提取工艺的影响,为虫草发酵液的开发再利用提供参考。

1 材料

UV-2550型紫外分光光度计(日本岛津),BSA2202S型1/10万电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),FreeZone 6L型真空冷冻干燥机(美国Labconco公司)。虫草发酵液(江西济民可信药业有限公司,批号11010060),*D*-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号110833-200904),水为自制双蒸水,试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 胞外多糖的含量测定

2.1.1 对照品溶液配制 精密称取干燥至恒重的*D*-无水葡萄糖对照品适量,置于10 mL量瓶中,加水溶解并定容至刻度,得母液;精密移取该母液0.45 mL置10 mL量瓶中,加水稀释至刻度,即得47.025 mg·L⁻¹对照品溶液。

2.1.2 检测波长的选择 精密量取对照品溶液2 mL于具塞试管中,加入4%苯酚溶液0.7 mL,摇匀,加入浓硫酸5 mL,摇匀,放置10 min,置60 ℃水浴中保温20 min,取出后迅速冷却至室温,同时以水为空白对照,于200~700 nm扫描,结果发现最大吸收波长489.4 nm。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取粗多糖约12.5 mg,置于25 mL量瓶中,加水溶解并定容至刻度,移液枪移取1 mL于10 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,即得。

2.1.4 标准曲线绘制 精密吸取葡萄糖母液0.2, 0.3, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50 mL,分别置于10 mL量瓶中,加水稀释至刻度,得系列对照品溶液。精密移取系列对照品溶液2 mL至25 mL具塞玻璃试管中,加入4%苯酚溶液1.0 mL,缓缓加入浓硫酸5.0 mL,置于沸水浴中20 min后取出室温放置,同时量取水2 mL作为空白于489.4 nm处测定吸光度(*A*),以*A*为纵坐标,质量浓度(*C*)为横坐标,得回归方程 $A = 1.6026C - 0.0016$ ($r = 0.9999$),线性范围0.021~0.052 g·L⁻¹。

2.1.5 精密度试验 取供试品溶液,按2.1.4项下

方法显色,于489.4 nm处重复测定6次*A*,计算RSD 1.5%。

2.1.6 重复性试验 取发酵浓缩液5份,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,按2.1.4项下方法显色,于489.4 nm处测定*A*,计算RSD 2.55%,表明该方法重复性符合要求。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在制备后10, 20, 30, 60, 120, 180, 240 min于489.4 nm处测定*A*,计算RSD 1.9%,表明供试品溶液在4 h内基本稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知胞外多糖含量的粗多糖5份,各精密加入105 ℃干燥至恒重的无水葡萄糖对照品适量,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,按2.1.4项下方法显色,于489.4 nm处测定*A*,计算平均加样回收率99.46%,RSD 2.38%。

2.2 醇沉工艺优化^[9-13] 以纯多糖质量为指标,选择醇沉温度、醇沉时间、乙醇用量为考察因素,取浓缩至一定质量浓度的虫草菌粉发酵液900 mL,等分为9份,按L₉(3⁴)正交设计进行醇沉,离心(4 000 r·min⁻¹, 15 min,下同),取沉淀,加水100 mL使溶解,加入4倍量95%乙醇,剧烈搅拌后离心,取沉淀,重复3次;将该沉淀复溶于100 mL水中,加入等量sevage试剂(三氯甲烷-正丁醇4:1),剧烈搅拌30 min,于4 ℃冰箱中静置过夜;吸取静置后的上层溶液,弃去下层变性蛋白溶液和sevage试剂,加入等体积sevage试剂,剧烈搅拌后静置2 h,吸取上层溶液,重复4次;将除蛋白后的胞外多糖溶液稀释至100 mL,加入4倍量95%乙醇,剧烈搅拌后离心,取沉淀烘干,得粗多糖样品。精密称取粗多糖约0.1 g,置于100 mL量瓶中,加水溶解并定容,精密量取1 mL于25 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;精密移取2 mL置具塞玻璃试管中,按2.1.2项下方法处理。因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

表1 冬虫夏草发酵液中胞外多糖醇沉工艺正交试验因素水平

水平	A 醇沉温度/℃	B 醇沉时间/h	C 乙醇用量/倍
1	4	5	2
2	20	7.5	3
3	30	10	4

由直观分析可知,影响虫草多糖醇沉的因素主次顺序为C>B>A。方差分析表明C因素对胞外多糖醇沉工艺的影响显著,其他因素则无显著性影

表 2 冬虫夏草发酵液中胞外多糖醇沉工艺
正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D (空白)	粗多糖 /g	胞外多糖 /g
1	1	1	1	1	0.311	0.124
2	1	2	2	2	0.363	0.130
3	1	3	3	3	0.529	0.261
4	2	1	2	3	0.421	0.194
5	2	2	3	1	0.965	0.673
6	2	3	1	2	0.320	0.096
7	3	1	3	2	0.871	0.608
8	3	2	2	3	0.424	0.169
9	3	3	1	1	0.313	0.105
K_1	0.174	0.309	0.108	0.301		
K_2	0.321	0.324	0.165	0.276		
K_3	0.277	0.154	0.513	0.208		
R	0.147	0.170	0.405	0.093		

表 3 胞外多糖质量方差分析

方差来源	SS	F	P
A	0.038	2.714	>0.05
B	0.043	3.768	>0.05
C	0.285	20.357	<0.05
D(误差)	0.014		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

响,确定最佳方案 $A_2B_2C_3$,即醇沉温度 20℃,醇沉时间 7.5 h,乙醇用量 4 倍。

2.3 验证试验 取与正交试验同批次的发酵液 3 份,每份 100 mL,按优选的工艺醇沉,结果粗多糖平均质量 0.968 g(RSD 0.86%),胞外多糖质量 0.671 g,纯度 69.32%,说明该工艺重复性较好。

3 讨论

多糖类成分的提取常采用溶剂浸提法,选择热水、酸、碱、乙醇等作为提取溶剂,本文研究对象为发酵液,故直接将发酵液浓缩,加乙醇进行精制。由于得不到虫草胞外多糖对照品,故选择葡萄糖作为对照成分,利用苯酚-硫酸法显色,由于苯酚极易氧化,因此在测定时要避光或操作迅速。

采用醇沉法纯化虫草发酵液中胞外多糖,预试

验发现当溶液中乙醇体积分数达 79% 时,虫草胞外多糖醇沉效果最好。由于蛋白质对胞外多糖的含量测定存在一定影响,故在测定胞外多糖前应去除蛋白质,目前去除蛋白质的方法包括盐析法、等电点沉淀法、加热变性法、有机溶剂变性萃取法、膜过滤、聚酰胺(PA)脱蛋白法等,本文采用 sewage 法,和其他几种方法比较,该方法具有操作简单、省时等优势。

[参考文献]

- [1] 程维蓉,段丽红,郑必胜. 冬虫夏草及其多糖的研究与应用进展[J]. 现代食品科技,2006,22(4):284.
- [2] 朱印酒,段双全,欧珠朗杰. 冬虫夏草的研究进展[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2009,18(2):27.
- [3] Wang B J, Won S, Yu Z R, et al. Free radical scavenging and apoptotic effects of *Cordyceps sinensis* fractionated by supercritical carbon dioxide [J]. Food Chem Toxicol, 2005,43(4):543.
- [4] 阮培春. 人工虫草菌丝多糖含量测定[J]. 保定师范专科学校学报,2005,18(4):65.
- [5] 马成坚,顾亚萍,芦青. 百令胶囊中虫草多糖的提取和含量测定[J]. 浙江中医学院学报,2004,28(4):81.
- [6] 刘鹏,程显好,刘亚丽,等. 虫草菌丝体多糖的提取方法[J]. 食品与发酵工业,2007,33(3):141.
- [7] 王瑞华,杨昕,李高,等. 人工蛹虫草子实体多糖的提取与含量测定[J]. 医药导报,2007,26(8):843.
- [8] 徐增龙,张如松. 冬虫夏草菌丝体发酵液中多糖的分离纯化与含量测定[J]. 浙江中医药大学学报,2007,31(3):376.
- [9] 杨荣玲,陈卫东,吴晓玉,等. 巴西虫草胞外多糖提取工艺的优化[J]. 食品科学,2007,28(7):91.
- [10] 秦秀丽,李凤林. 超声波法提取蛹虫草多糖的工艺研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(5):376.
- [11] 韦会平,叶小利,张华英,等. 从废弃蛹虫草大米培养基中高效提取纯化虫草素工艺条件研究[J]. 菌物学报,2009,28(2):220.
- [12] 罗长才,缪静,余晓斌. 冬虫夏草多糖提取工艺的优化[J]. 中草药,2002,33(12):1086.
- [13] 肖建辉,陈代雄,刘金伟,等. 江西虫草发酵液脱色及其多糖提取分离的优化工艺[J]. 微生物学通报,2006,33(3):24.

[责任编辑 刘德文]