

巴西蘑菇多糖冲剂制备工艺研究*

唐小俊¹, 何焕清², 池建伟¹, 张雁¹, 魏振承¹, 张瑞芬¹

(1. 广东省农业科学院农业生物技术研究所, 农业部功能食品重点开放实验室, 广州 510610;

2. 广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州 510640)

摘要: 采用正交试验法优化了微波辅助提取巴西蘑菇多糖的条件, 研究了多糖冲剂制备工艺, 并用苯酚-硫酸法对巴西蘑菇多糖冲剂中多糖含量进行了测定。结果表明, 以水为溶剂, 巴西蘑菇多糖最佳提取条件为: 提取时间30min, 微波功率为80% (全功率为800w), 液料比为20:1。巴西蘑菇多糖冲剂配方为: 巴西蘑菇粗多糖: 可溶性淀粉: 甜蜜素=1: 4: 0.04, 冲剂中多糖含量为7.624%。

关键词: 巴西蘑菇; 多糖; 微波辅助提取

中图分类号: S646 **文献标识码:** A

文章编号: 1003- (8310) 2006 (04) - 0053- 04

巴西蘑菇 (*Agaricus Blazei* Murill)^[1]原产于巴西、秘鲁等地^[2], 其子实体内含有丰富的营养物质和生物活性物质如多糖、核酸、甾醇类等^[3,4], 在抗肿瘤、抗病毒、降血糖及提高机体免疫力等方面效果显著, 深受食品和医药学界的重视^[2,5]。研究表明, 巴西蘑菇的主要生理功能与其含有的多糖密切相关, 其所含的抗肿瘤物质主要为活性多糖体, 抑

瘤率高达99%^[6]。其活性多糖还具有提高机体免疫力、抗病毒、抗凝血、降血脂、降低胆固醇等作用^[7]。

我国于1992年从日本引进该菌种, 并对其生态学特性、栽培方法、营养成分分析等方面进行了一定的研究^[8]。而在加工方面, 以制成干菇为主, 深加工产品很少。本研究通过微波技术辅助提取巴西蘑菇多糖并对多糖冲剂的制备工艺进行研究, 可以为更好地开发利用这一珍稀食、药用菌资源提供一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

巴西蘑菇由广东省农业科学院蔬菜研究所提供, 烘干后粉碎, 过200目筛后备用。

DEAE- Cellulose- 52 (DE- 52) 购自Whatman公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自Sigma公司; 其它试剂均为国产分析纯; Galanz WD800B型微波

广东省农业攻关项目, 项目编号: 2004B20101004

需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] 曹素芳, 吴法先, 李学锋. 提高食用菌中硒含量的研究[J]. 中国食用菌, 1992, 11(5): 10-12.
- [2] 尚德静, 王关林. 四种食用菌富硒能力的比较研究[J]. 食用菌学报, 1999, 6(3): 17-20.
- [3] 于克学, 贾乐, 王汉忠. 冬虫夏草深层发酵富硒初步研究[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(4): 3-5.
- [4] 梁英, 杨宏志. 黑木耳富硒栽培研究[J]. 食用菌学报, 2000, 7(4): 34-37.
- [5] 王尚荣. 白灵菇富硒栽培技术研究[J]. 食用菌学报, 2003, 10(4): 43-46.
- [6] 梁英, 高彦斌, 陈丽红等. 香菇富硒栽培的研究[J]. 食用菌, 2000, 1: 5-7.
- [7] 黄渊泽, 王光灿等. 富硒食用菌中的硒含量[J]. 云南大学学报(自科版), 1997, 19(4): 341-343.
- [8] 江晓路, 孙月. 蛹虫草活性成分的测定[J]. 食用菌学报, 1999, 6(1): 47-50.
- [9] 林树钱, 余美兰. 人工虫草的研究和开发现状[J]. 中国食用菌, 1997, 16(1): 5-7.
- [10] 王新风. 富硒食用菌栽培技术[J]. 中国食用菌, 2002, 21(3): 13-14.

Preliminary Research on Se- Accumulation Cultivation Technology of *Cordyceps militaris*

LING Hong-Tong¹, ZENG Zhen- Ji¹, SONG Bin², LIN Qun-Ying³, LI Tai- hui²

(1. Meizhou Institute of Microbiology in Guangdong, Meizhou 514071; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collections and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070; 3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Science of Na₂SeO₃, Guangzhou 510650)

Abstract: The effect of different selenium concentration of Na₂SeO₃ on the growth and the yield of mycelia and fruitbodies was studied. The experimental results showed that the content of se- component in the fruitbodies would be obviously promoted when Na₂SeO₃ was added to the media, but the growth and development of mycelia and fruitbodies were procrastinated and restrained to a certain extent.

Key words: *Cordyceps militaris*; Selenium- accumulation; Cultivation

炉; UV-1700分光光度计; N-1000型旋转蒸发器; TDL-5型离心机; DZF=6050型真空干燥箱; HH-4型数显恒温水浴锅。

1.2 多糖提取

1.2.1 多糖微波辅助提取工艺

巴西蘑菇粉 加入蒸馏水 搅拌混匀 调pH
微波处理 过滤 离心去渣 (5 000rpm, 15min)
真空浓缩 乙醇沉析 静置12h 离心 (5 000rpm, 15min) 沉淀用适量80%乙醇洗涤两遍 真空干燥 巴西蘑菇粗多糖。

称取10g粉碎好的巴西蘑菇, 置于1 000mL烧杯中, 加入一定量的蒸馏水并混匀, 调pH至7.0, 按各种设定条件 (提取时间、微波功率、液料比) 进行微波提取。微波提取过程为间歇微波处理, 每次2min, 中间停1min, 补加损失的水分使提取液体积保持相对恒定。处理后将提取液过滤, 按同样条件重复提取1次, 合并提取液, 用旋转蒸发器浓缩到1/4体积, 加入终浓度体积分数为80%的乙醇, 静置12h, 离心收集沉淀, 用无水乙醇沉淀, 真空干燥得巴西蘑菇粗多糖。

1.2.2 多糖提取条件正交设计

为了优化巴西蘑菇多糖的提取条件, 选取提取时间、微波功率、液料比作为考察因素, 以巴西蘑菇纯多糖得率作为考核指标, 每个因素拟定3个水平 (见表1), 选用L9 (34) 正交表^[9], 处理组合见表2。

1.2.3 多糖的纯化

表1 正交试验因素水平表

| 水平 | 因素 | | |
|----|-------------|-----------|----------|
| | A 提取时间(min) | B 微波功率(%) | C 液料比(倍) |
| 1 | 20 | 40 | 15 |
| 2 | 30 | 60 | 20 |
| 3 | 40 | 80 | 25 |

巴西蘑菇粗多糖依次用石油醚、丙酮回流脱脂, 挥干溶剂后, 溶于蒸馏水中, 90 加热至彻底溶解, 制成含粗多糖5%的溶液, Seveage法脱蛋白^[10], 然后用蒸馏水透析72h, 透析液减压浓缩后, 加入4倍体积的无水乙醇, 置冰箱12h, 离心分离 (5 000rpm, 10min) 沉淀, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚各洗两次, 真空干燥至恒重, 得巴西蘑菇多糖粗品。

取500mg多糖粗品, 溶于pH7.4的Tris- 盐酸缓冲液中, 上平衡好的DEAE- Cellulose- 52离子交换柱 (2.6x50cm), 以0~2mol/L NaCl梯度洗脱, 流速为0.2mL/min, 2mL/管收集, 用苯酚- 硫酸法^[11]检测糖, 分步收集体并洗脱峰, 减压浓缩, 对蒸馏水透析48h, 真空干燥得纯多糖。

1.3 多糖冲剂制备

1.3.1 配方 巴西蘑菇粗多糖: 可溶性淀粉: 甜蜜素 =1: 4: 0.04。

1.3.2制法 取巴西蘑菇粗多糖等辅料分别粉碎成细粉, 过20目筛, 然后将多糖、可溶性淀粉、甜蜜素按1: 4: 0.04的比例均匀混合搅匀, 用75%乙醇制成软材, 用10目筛制粒, 55 干燥, 得浅黄色颗粒, 分装。

1.3.3 质量控制 性状: 本品为浅黄色颗粒, 其水溶液澄清透亮, 味甜, 口感舒适。鉴别: 取本品加适量蒸馏水溶解, 加入4倍体积的无水乙醇, 静置后取沉淀, 挥去溶剂后依本法再处理2次。最后所得沉淀用80%乙醇洗涤两次, 挥去溶剂, 加适量蒸馏水溶解。取溶液液1mL, 加10% - 萘酚试液3滴, 沿试管壁加浓硫酸1mL, 有紫色环出现; 或加斐林试液1mL煮沸1min, 生成红棕色沉淀。检查: 水溶液pH6.5~7.5。卫生学: 应符合中国药典规定。溶化性: 取冲剂一包加热水100~150mL搅拌, 1~2min内全部溶化。用法、用量与规格: 每日3次, 每次一包加温开水约150mL冲服。每包20g内含巴西蘑菇多糖1.52g。

1.4 多糖冲剂中多糖含量测定

1.4.1 标准曲线的制备^[11] 精密称取105 干燥至恒重的葡萄糖标准品20mg, 置于500mL容量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 配成0.04mg/mL的标准溶液。然后精密移取标准溶液0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8mL, 置于带塞试管中, 各以蒸馏水补充至2.0mL, 然后加入6%重蒸苯酚1.0mL及浓硫酸5.0mL, 静止10min, 摇匀, 室温放置20min后于490nm测光密度, 以2.0mL水按同样显色操作作为空白, 以吸光度 (A) 对葡萄糖浓度 (C) 作回归处理, 得回归方程:

$$A=0.0628C-0.0249, r=0.9991$$

1.4.2 样品溶液的制备与测定 准确称取巴西蘑菇多糖冲剂5g, 加蒸馏水100mL充分溶解, 加入4倍体积的无水乙醇, 置冰箱12hr, 离心分离 (5 000rpm, 15min) 沉淀。沉淀加蒸馏水100mL充分溶解后依法再处理2次。最后所得沉淀用80%乙醇洗涤两次, 80 下真空干燥, 用适量蒸馏水溶解并转移至500mL容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 摇匀备用。

测定时精密吸取样品液0.05mL于带塞试管中, 加蒸馏水至2mL, 按测定标准曲线的方法测其吸光度 (A), 由回归方程计算样品液中多糖的含量 (C, 以葡萄糖计)。并由以下公式计算出多糖冲剂中多糖的含量:

$$\text{冲剂中多糖含量 (\%)} = CD/W \times 103 \times 100$$

式中C—样品液中葡萄糖浓度 ($\mu\text{g/mL}$); D—多糖的稀释因素; W—供试样品的重量 (mg)。

1.4.3 加样回收率测定

精密称取2.5g巴西蘑菇多糖冲剂, 加入巴西蘑菇纯多糖100mg, 按照1.4.2样品溶液的制备与测定方法操作, 测定吸光度 (A), 并根据1.4.2所得巴西

表2 正交试验结果

| 试验号称 | A | B | C | 产 率(%) | | | |
|--------------------|-------|-------|-------|--------|------|------|-------|
| | | | | I | II | III | 合计 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 5.32 | 5.55 | 5.04 | 15.91 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 6.18 | 6.42 | 6.18 | 18.78 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 5.83 | 6.22 | 6.05 | 18.10 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 5.91 | 6.94 | 7.43 | 20.28 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 7.40 | 7.30 | 7.52 | 22.22 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 6.28 | 7.21 | 7.95 | 21.44 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 6.73 | 6.46 | 6.29 | 19.48 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 6.26 | 6.63 | 6.95 | 19.84 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 7.32 | 7.13 | 7.15 | 21.60 |
| K ₁ | 52.79 | 55.67 | 57.19 | | | | |
| K ₂ | 63.94 | 60.84 | 60.66 | | | | |
| K ₃ | 60.92 | 61.14 | 59.80 | | | | |
| k _{1(平均)} | 17.60 | 18.56 | 19.06 | | | | |
| K _{2(平均)} | 21.31 | 20.28 | 20.22 | | | | |
| K _{3(平均)} | 20.31 | 20.38 | 19.93 | | | | |
| R | 3.72 | 1.82 | 1.16 | | | | |

表3 正交设计方差分析

| 误差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | 显著性 |
|------|------|-------|------|-------|---------------|
| A | 7.39 | 2 | 3.70 | 16.13 | $\rho < 0.01$ |
| B | 2.10 | 2 | 1.05 | 4.59 | $\rho < 0.05$ |
| C | 0.73 | 2 | 0.36 | 1.58 | |
| 误差 | | 4.12 | 18 | 0.23 | |
| 总和 | | 14.32 | 26 | | |

表4 巴西蘑菇中多糖含量测定

| 样品号 | 吸光度 A ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 对应的葡萄糖浓度 (mg) | 样品液多糖总量 (%) | 样品多糖含量 (%) | 样品多糖含量平均 (%) | RSD |
|-----|--------------------------------------|------------------|----------------|---------------|-----------------|-------|
| 1 | 0.281 | 4.871 | 389.682 | 7.794 | | |
| 2 | 0.276 | 4.791 | 383.312 | 7.666 | 7.624 | 2.552 |
| 3 | 0.266 | 4.632 | 370.573 | 7.411 | | |

表5 多糖回收率试验

| 取样量(g) | 原含量(mg) | 加样量(mg) | 测定量(mg) | 回收率(%) | 平均回收率(%) | RSD(%) |
|--------|---------|---------|---------|--------|----------|--------|
| 2.5018 | 190.737 | 100.3 | 287.501 | 98.785 | | |
| 2.5025 | 190.791 | 100.2 | 279.430 | 96.027 | 97.637 | 1.470 |
| 2.5008 | 190.661 | 100.1 | 285.237 | 98.100 | | |

蘑菇多糖冲剂中多糖含量的结果, 计算回收率。

2 结果

2.1 多糖提取正交实验结果

不同提取时间、微波功率、液料比对巴西蘑菇多糖得率影响的正交试验结果如表2所示。对上述实验数据进行方差分析, 结果如表3所示。

正交试验方差分析结果表明(表3), 提取时间、

微波功率、液料比在巴西蘑菇多糖提取中影响不同, 其中提取时间的影响最大, 达到了极显著水平, 微波功率的影响达到了显著水平, 而液料比的影响最小。

由于极差的大小可以反应各因素对指标影响的程度, 根据表2的正交试验极差分析, 可以判断出影响巴西蘑菇多糖提取诸因素的主次关系依次为提

取时间 (A) > 微波功率 (B) > 液料比 (C)。

从正交试验结果可知, 因素A以第2水平最好, 因素B以第3水平为最好, 因素C以第2水平为最好, 最佳组合为A2B3C2, 即提取时间为30min, 微波功率为全功率的80%, 液料比为20: 1。

按正交试验得到的最佳提取条件试验三次, 巴西蘑菇多糖得率分别是8.28%, 8.76%, 8.55%, 平均值为8.53%。

2.2 多糖冲剂中多糖含量测定

结果见表4, 本实验测得巴西蘑菇多糖冲剂中多糖含量为7.624%, RSD为2.552, 说明本测定误差较少。

2.3 回收率

结果见表5, 本试验提取的回收率值大于95%, RSD为1.47, 表明本试验的测定方法是可靠的。

3 讨论

目前微波技术应用于天然产物的提取是一个新的应用领域, 有关的应用报道虽然还不多, 但已有的结果表明微波辅助提取法比传统水提法相比具有提高产率、缩短提取时间、节约能耗等优点^[12], 因此微波辅助提取法是一种高效的多糖提取方法。本研究采用微波辅助提取技术对巴西蘑菇多糖进行提取制备, 相对于传统的水提法是一种改进, 因为传统水提法耗能多, 生产周期长, 成本也高。

巴西蘑菇多糖冲剂研制过程中使用的多糖为粗多糖, 其含量还可以根据配方要求进一步加大, 因为巴西蘑菇粗多糖水溶性很好。巴西蘑菇粗多糖生产步骤简单, 不需要复杂的技术, 完全适合工业化生产。而巴西蘑菇纯多糖水溶性差, 不适合做冲剂, 而且生产步骤复杂, 生产成本也增加。

巴西蘑菇多糖冲剂为无糖型冲剂, 它以多糖为功能成分, 以可溶性淀粉为稀释剂, 以甜蜜素为甜

味剂。甜蜜素具有高甜度、低热能、无毒性以及无副作用等特点, 且热量仅为蔗糖的1/1000, 甜度为蔗糖的40倍。因此本品完全适合糖尿病患者使用。

[参考文献]

- [1] 江枝和, 朱丹, 杨佩玉. 姬松茸的栽培技术[J]. 食用菌学报, 1999, 6(1):33-38.
- [2] TAKASHI MIZUMO. Agaricus blazei Murill: medicinal and dietary effects[J]. Food Reviews International, 1995, 11(1):167-172.
- [3] 郑晓冬, Mehenmeder.A.M.A li. 姬松茸多糖提取工艺的优化[J]. 农业工程学报, 2000, 16(4):132-134.
- [4] 杨梅, 林琳, 张其昌. 姬松茸菌丝深层培养及氨基酸分析研究[J]. 中国食用菌, 1997, 16(3):41-43.
- [5] 黄年来. 中国食用菌产业的现状和展望[J]. 中国食用菌, 1998, 17(5):3-4.
- [6] N.Gottschlich, V.kasche. Purification of monoclonal antibodies by simulated moving bed chromatography[J]. J.Chromatogr.A, 1997, 765:201-206.
- [7] 黄年来. 姬松茸及药效 [J]. 江苏食用菌, 1994, 15(3):29-31.
- [8] 史刚荣. 姬松茸研究的现状与展望[J]. 江苏食用菌, 1995, 16(3):22-23.
- [9] 徐吉民. 正交法在医药科研中的应用[M]. 中国医药科技出版社, 1987.
- [10] 刘成梅, 万茵, 涂宗财等. 百合多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1):89-90.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1998, 11-12.
- [12] 龚盛昭, 杨卓如. 微波辅助提取黄芪多糖的工艺研究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2004, 32(8):93-96.
- [13] 范志刚, 李玉莲, 杨莉斌等. 微波技术对槐花中芸香甙浸出量影响的研究[J]. 解放军药科学学报, 2000, 16(1):36-38.

Research on the Preparation of Agaricus blazei Murill Polysaccharide Granules

TANG Xiao-jun¹, HE Huan-qing², CHI Jian-wei¹, ZHANG Yan¹,
WEI Zhen-cheng¹, ZHANG Rui-fen¹

(1. Agro-biotech Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510610, China 2. Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The conditions of polysaccharides extraction from Agaricus blazei Murill by microwave-assisted extraction method were studied by orthogonal design, the preparation of Agaricus blazei Murill polysaccharide granules was also studied, and the contents of polysaccharides in Agaricus blazei Murill polysaccharide granules were measured by phenol-sulphate acid method. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: 30min, 80% microwave power (full power is 800W), 20:1 (water / dry weight). The Agaricus blazei Murill polysaccharide granules formula was as follows: the ratio of Agaricus blazei Murill polysaccharides, soluble starch, sodium cyclamate was 1:4:0.04, and Agaricus blazei Murill polysaccharide granules content was 7.624 %.

Key words: Agaricus blazei Murill; Polysaccharide; Microwave-assisted extraction