

雷蘑深层发酵胞外多糖含量测定方法的确定

王永斌^{a,c} 王允祥^{①a,b}

^a(蚌埠学院食品科学与工程系 安徽省蚌埠市胜利东路 801 号 233000)

^b(浙江林学院食品与药学院 浙江省临安市 311300)

^c(南京农业大学食品科技学院 南京市 210095)

摘要 从雷蘑(*Clitocybe Gigantea*) AS 5. 105 深层发酵的滤液中分离得到胞外多糖(CGP), 用苯酚-硫酸分光光度法在室温下测定胞外多糖含量, 测定波长 490nm, 在 5. 00—40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内吸光度与被测物含量呈良好的线性关系, 相关系数 $r=0.9957$, 方法的回收率在 97. 8%—104. 6% 之间。测定结果表明, 雷蘑在出发培养基深层发酵过程中合成了胞外多糖, 含量为 0. 54 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词 雷蘑, 胞外多糖, 苯酚-硫酸分光光度法, 合成。

中图分类号: TQ920. 1; O657. 32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2006)03-0454-04

1 前言

雷蘑(*Clitocybe Gigantea*) 别名大白桩蘑、青腿子。白色, 菌肉肥厚, 味道鲜美。子实体大, 可药用, 治小儿麻疹, 伤风感冒, 烦躁不安, 能产杯伞素(Clitocybin), 有抗肺结核的作用。

以往的真菌活性多糖多由子实体萃取得到, 来源十分有限, 真菌深层发酵生产的菌丝体及滤液中同样含有抗肿瘤活性成分, 主要成分为抗肿瘤多糖及其蛋白复合物^[1-3]。但国内外目前对雷蘑(*Clitocybe Gigantea*) AS 5. 105 的研究仍属空白。

对于多糖的检测, 目前尚无一个统一的方法。多糖的检测方法一般可分为两大类, 一类是直接测定多糖本身, 如高效液相色谱法和酶法。另一类是利用 DNS 法^[4-6]、斐林法、苯酚-硫酸法、硫酸-恩酮法^[7-9]等^[10]。前者需昂贵的仪器、多糖纯品和特定的酶, 操作步骤繁琐, 在应用中受到限制。后者测定时方法干扰较大, 受影响因素多, 而且以上测定方法要求在工艺中或样品前处理中通过透析或过凝胶柱等方法除去单糖、寡糖及小分子物质的前提下或在质量标准中增加单糖检查项, 不得检出单糖的情况下才可行。但这些方法简单、快速, 无需多糖纯品和高级仪器, 适合目前国内的实验条件, 因而被广泛采用。

苯酚-硫酸法是测定多糖含量较为经典有效的方法之一, 但在报道^[11-14]中却因多糖来源、处理方法的不同而对反应温度的控制、试剂中苯酚及硫酸用量不尽相同。为了进一步确定适合测定雷蘑深层发酵胞外多糖含量的实验条件, 本研究采用对发酵醪减压过滤、Sevag 法除蛋白、蒸馏水透析定容后, 以葡萄糖作为对照, 用苯酚-硫酸法测定胞外多糖含量。

① 联系人, 电话: (0552) 3388905; E-mail: wyx@zjfc.edu.cn

作者简介: 王永斌(1969—), 男, 安徽省蚌埠市人, 讲师, 硕士研究生, 从事食品微生物与生物技术方面研究。

收稿日期: 2005-12-12; 接受日期: 2005-12-23

2 材料和方法

2.1 供试材料

2.1.1 菌种

雷蘑(*Clitocybe Gigantea*) AS 5. 105(中科院微生物菌种保藏中心)。

722分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

2.1.2 培养基

斜面种子培养基(综合马铃薯培养基^[15]): 马铃薯 200g、葡萄糖 20g、V_{B1} 1mg、MgSO₄·1. 5g、KH₂PO₄ 3g、琼脂 18g。

液体培养基: 蔗糖 20g、葡萄糖 5g、酵母膏 2g、KH₂PO₄ 3g、MgSO₄·1. 5g、V_{B1} 1mg、蒸馏水 1000mL。

2.1.3 菌种培养及接种

取斜面试管菌种点种于培养皿中, 25℃培养 12d 后, 用∅8mm 无菌打孔器从平板上打孔取块(即菌丝蝶), 分别接种于盛有 100mL 发酵培养基的 500mL 三角瓶中, 接种量为 50mL 发酵液 1 块。在摇床上振荡培养 25℃, 140rpm。

2.1.4 菌丝干重与胞外多糖的提取及含量测定

于实验第 9d 终止发酵, 对发酵醪减压过滤, 得菌丝体和滤液。将菌丝体 80℃干燥至恒重称量, 以菌丝干重(DCW)表示, mg·mL⁻¹发酵醪计。

取滤液 10mL, 采用 Sevag 法脱蛋白至两相界面无膜出现为止(大约 10 次), 取 2mL 该脱蛋白液自来水流水透析 2d, 蒸馏水透析 2d 后, 取出透析液定容至 50mL, 采用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 以 μg·mL⁻¹发酵醪计。

3 结果与分析

3.1 葡萄糖校准曲线的制作

3.1.1 葡萄糖对照品贮备液的配制

精密称取 105℃干燥至恒重的分析纯葡萄糖标准品 100mg, 溶解并定容 100mL, 则其浓度为 1mg·mL⁻¹。

3.1.2 样品贮备液的配制

取 2mL 脱蛋白液透析后定容至 50mL。

3.1.3 苯酚液的配制

称取化学纯苯酚 100g, 置于烧瓶中, 加入 0.1g 铝片、0.05g 碳酸氢钠, 加热蒸馏, 收集 180—182℃馏分。称取重蒸苯酚 10g, 加入蒸馏水 190g 溶解, 置于棕色瓶中备用。

3.1.4 实验条件的选择

检测波长的确定: 取葡萄糖对照品溶液和样品溶液, 分别经苯酚-硫酸试剂显色后, 作全波长扫描测定, 结果葡萄糖和样品透析液经显色后, 均在 490nm 波长处有最大吸收峰。因此选定 490nm 为检测波长。

苯酚及硫酸用量选择: 通过改变苯酚和硫酸用量寻找合适的比例, 保持较高的硫酸浓度, 确保多糖的水解和糠醛反应的完全, 使成色反应进行并形成线性梯度。通过实验, 确定了加入浓硫酸的

体积和总体积之比为5:7为宜,可使反应在室温进行。

3.1.5 校准曲线制备

精密吸取葡萄糖标准贮备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 均定容 100 mL, 分别取 1.0 mL, 各加入苯酚液 1.0 mL, 迅速滴加浓硫酸 5.0 mL (硫酸占总体积 71.4%), 另以 1.0 mL 水同上操作, 作为空白液。20 min 后, 于波长 490 nm 处测其吸光度, 分别为 0.079、0.167、0.246、0.351、0.476, 得回归方程为: $A = 0.0978C - 0.0296$, $r = 0.9957$ 。式中: A 为吸光度, C 为葡萄糖浓度。

3.1.6 精密度试验

精密吸取同一样品溶液 1.0 mL, 重复测定吸光度 6 次, 结果 $RSD = 2.8\%$ ($n = 6$)。

3.1.7 稳定性试验

精密吸取样品 1.0 mL, 按上述方法操作, 每隔 30 min 测定 1 次, 共测定 6 次, 结果见表 1。

从表 1 中结果可以看出, 用苯酚-硫酸法进行胞外多糖的含量分析, 以吸光度定量, 结果相对标准偏差较小, 实验重复性好, 所得实验结果可靠。

3.2 多糖含量测定

3.2.1 样品含量测定

精密吸取样品液 1.0 mL, 下同 3.1.5, 经测量换算得样品中多糖含量为 $0.54 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2.2 加样回收率测定

精密吸取 0.5 mL 样品液, 6 份, 分别加入浓度不同的葡萄糖对照品溶液 0.5 mL, 按样品测定方法测定吸光度, 测得平均回收率为 100.2%, 结果见表 2。

表 2 回收率实验

序号	样品量(μg)	加样量(μg)	测得量(μg)	回收量(μg)	回收率(%)
1	10.5	5.00	15.73	5.23	104.6
2	10.5	10.00	20.38	9.88	98.8
3	10.5	15.00	25.17	14.67	97.8
4	10.5	20.00	30.32	19.82	99.1
5	10.5	25.00	35.93	25.43	101.4
平均					100.2

表 2 结果表明, 以葡萄糖标准品为对照品, 苯酚-硫酸法进行胞外多糖的含量分析, 加样回收率为 100.2%, 所以本方法的准确度较高。

4 结论

通过苯酚-硫酸法显色实验验证了雷蘑(*Clitocybe Gigantea*) AS 5.105 深层发酵合成了胞外多糖。通过对比确定了苯酚-硫酸法检测雷蘑胞外多糖含量的最佳条件: 浓硫酸的体积和总体积之比为 5:7; 快速滴加浓硫酸放热, 可使反应在室温进行; 放置 30 min 后吸光度稳定。经测定, 在出发液体培养基中, 雷蘑胞外多糖含量为 $0.54 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 这个结果也将被后续优化实验所证实。

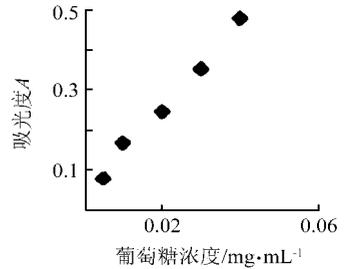


图 1 浓度-吸光度散点图

表 1 稳定性实验结果

序号	吸光度	平均值	标准偏差	相对标准偏差(%)
1	0.185			
2	0.187			
3	0.180			
4	0.179	0.182	0.00004	2.2
5	0.178			
6	0.186			

此方法可很好的用于胞外粗多糖含量的测定, 因为液体发酵得到的多糖颜色较淡, 经脱蛋白、透析后, 实际上也是对多糖进行了初步的纯化和脱色处理。

参考文献

- [1] 肖建辉, 蒋依辉, 梁宗琦等. 食药两用真菌多糖研究进展[J]. 生命的化学, 2002, 22(2): 148—151.
- [2] Ohmori T, Tamura K, Wakaiki A *et al.* Dissociation of a Glucan Fraction (CO-1) from Protein-Bound Polysaccharide of Cordyceps Ophioglossoides and Analysis of Its Antitumor Effect[J]. *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, 36: 4512—4518.
- [3] Mizuno T. Bioactive Substances in Hericium Erinaceus (Bull.: Fr.) Pers. (Yamabushitake), and Its Medicinal Utilization[J]. *Int. J. Med. Mushrooms*, 1999, 1: 105—119.
- [4] 吴逊, 蒲朝文, 封雷. 3, 5-二硝基水杨酸快速测定食品还原糖[J]. 预防医学情报杂志, 2002, (1): 92.
- [5] 陈齐英, 孙雪奇, 徐晓霞. 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定亮菌口服液中的多糖含量[J]. 华西药学杂志, 2000, (3): 193—194.
- [6] 尹银嘉, 魏士超, 马宝瑕. 3, 5-二硝基水杨酸法测定二味康口服液中的多糖含量[J]. 中国医院药学杂志, 2003, (7): 414—416.
- [7] 魏晓明, 符红, 万幼平. 硫酸蒽酮比色法测定鹿龟酒中多糖的含量[J]. 中成药, 2000, (5): 380—382.
- [8] 黄梦娴, 李毅. 蒽酮-硫酸法测定山珍血脉康口服液中的多糖含量. 广西医科大学学报, 2001, (4): 506—507.
- [9] 李绍平, 黄赵刚, 张平等. 蒽酮-硫酸法测定亮菌糖浆中多糖的含量[J]. 中草药, 2002, (03): 233—235.
- [10] 张唯杰. 糖类复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 6.
- [11] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, (09): 550—553.
- [12] 王忠民, 王跃进, 周鹏. 苯酚-硫酸法测定葡萄糖含量[J]. 新疆农业大学学报, 2004, (2): 87—90.
- [13] 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, (04): 69—70.
- [14] 高丽君, 王汉忠, 崔建华等. 苯酚-硫酸法测定白首乌中多糖含量[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2004, (02): 295—297.
- [15] 周宇光. 菌种目录[M]. 第三版. 北京: 中国农业科技出版社, 1997. 231.

Determination of Extracellular Polysaccharide from Submerged Fermentation Broth of *Clitocybe Gigantea*

WANG Yong-Bin^{a,c} WANG Yun-Xiang^{a,b}

a(Department of Food Science, Bengbu College, Bengbu, Anhui 233000, P. R. China)

b(College of Food and Pharmacy, Zhejiang Forestry University, Lin'an, Zhejiang 3113000, P. R. China)

c(College of Food Science and Technology, Nanjiang Agricultural University, Nanjing 210095, P. R. China)

Abstract An extracellular polysaccharide, CGP, was extracted from submerged fermentation broth of *Clitocybe Gigantea*, and determined at room temperature by phenol-sulfuric acid spectrophotometry at 490nm. The linear range is 5.00—40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9957$) with recovery of 97.8%—104.6%. The extracellular polysaccharide of *Clitocybe Gigantea* was synthesized in the process by the initial liquid culture medium, and detected as 0.54 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Key words *Clitocybe Gigantea*, Extracellular Polysaccharide, Phenol-Sulfuric Acid Spectrophotometry, Synthesis.

关于赠送作者样刊的通知

各有关作者:

从 2006 年第 1 期起, 本刊赠送作者发表自己论文的当期刊物(样刊), 均按篇赠送 2 本样刊, 用普通印刷品邮寄给作者联系人, 遗失不补。若作者另有需要, 请在发表之日起 2 个月之内汇款购买, 逾期不再办理。

特此通知

光谱实验室编辑部

汇款购买地址: 北京市 81 信箱 66 分箱 刘建林, 邮编: 100095