

冠突散囊菌胞外多糖提取工艺研究

龚淑俐, 邓放明, 周向荣

(湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 冠突散囊菌是茯砖茶生产过程中形成茯砖茶独特品质的优势菌。从茯砖茶中分离纯化出冠突散囊菌,进行液体深层发酵,并对其产生的胞外多糖提取条件进行了正交试验。试验结果表明,本次试验中最优的多糖提取条件为:冠突散囊菌液体发酵液浓缩至原体积的 1/4,乙醇浓度 95%,乙醇沉淀时间 10 h。

关键词: 冠突散囊菌; 茯砖茶; 液体发酵; 胞外多糖

中图分类号: TS272.5*5; **文献标识码:** B; **文章篇号:** 1673-9078(2007)02-0048-03

Extraction Techniques of Extracellular Polysaccharide of *Eurotium cristatum*

GONG Shu-li, DENG Fang-ming, ZHOU Xian-rong

(College of Food Science and Technology, HNAU, Changsha 410128, China)

Abstract: The *Eurotium cristatum* is the dominant germ in the production of Fuzhuan brick tea, contributing to the special quality of the tea. In this research, the *Eurotium cristatum* was separated from the Fuzhuan brick tea for submerged fermentation. Then the extracellular polysaccharides were separated after a 5-day liquid deep fermentation of the *Eurotium cristatum*. The results showed that the optimal ratio of condensed volume of fermentative liquor to the original, ethanol concentration and deposition time were 1:4, 95% and 10 h, respectively.

Key words: *Eurotium cristatum*; Fuzhuan brick tea; liquid fermentation; extracellular polysaccharide

茯砖茶是紧压黑茶的一种,具调理人体肠胃消化功能和减肥降脂功能。目前对茯砖茶及冠突散囊菌的研究仅限于菌种鉴定与形态观察、生长条件、安全研究、茯砖茶发花前后一些成分变化及茯砖茶基本保健功能的研究^[1-5],而对冠突散囊菌的生理特性,功能特性及与茯砖茶品质形成的关系及其机理的研究尚少。

本试验试图对茯砖茶发酵的优势菌——冠突散囊菌进行深层发酵产多糖的研究,对影响冠突散囊菌多糖提取率的主要工艺参数进行了优化,从而开发出冠突散囊菌活性多糖提取的有效手段,为工业生产上的应用提供理论依据,并可为后续研究其生理特性、功能特性以及与茯砖茶品质形成的关系及其机理提供一些基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

供试原料:茯砖茶,由益阳茶厂提供
冠突散囊菌:由益阳产茯砖茶为原料,再通过分离纯化得到。

试剂:酵母膏,葡萄糖,无水乙醇,丙酮,乙醚,

收稿日期:2006-08-11

作者简介:龚淑俐,硕士研究生,研究方向为食品资源开发与利用

通讯作者:邓放明教授

二次蒸馏水, NaHCO₃, NaOH, NaCl, 浓硫酸, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄ 均为国产分析纯。

1.2 主要仪器和设备

HP-920超净工作台; YX-280B蒸气灭菌锅; HWS-250恒温恒湿培养箱; 722-S型分光光度计; 电子天平; PHS-3C型精密PH计; 电热恒温水浴锅; 摇床; 离心机; 旋转蒸发器。

1.3 方法

1.3.1 原料制备

冠突散囊菌的分离纯化→试管培养→孢子悬液的制备→液体深层发酵→过滤→发酵液

1.3.2 提取工艺

发酵液→浓缩→醇析→真空冷冻干燥→胞外多糖粗品

1.3.3 粗多糖提取量的测定

用称量法得粗多糖提取量(取四位有效数字)。

1.3.4 总糖的测定(苯酚-硫酸法)

测定原理:多糖在浓硫酸作用下水解成单糖,并迅速脱水生成糠醛衍生物,随后与苯酚结合生成有色化合物。从而可以利用分光光度计测定其吸光度,并利用标准曲线定量测定样品中的多糖含量^[6,7]。

1.3.5 标准曲线的建立

苯酚(纯苯酚为针状无色结晶),水浴加热后溶解,蒸馏收集 182 °C 的馏分; 80% 苯酚: 80 g 苯酚加 20 g

水使之溶解,可置冰箱中避光长期保存;5%苯酚:临用前以80%苯酚配制。葡萄糖标准溶液:取适量葡萄糖(分析纯)于烘箱(105℃)内烘干至恒重,精确称取20.0g,加蒸馏水溶解,定容至100mL,得到浓度为0.2mg/mL的葡萄糖标准溶液。配制0、20、40、60、80、100mg/L的葡萄糖标准液,取1mL,加1mL 5%苯酚水溶液,再加入5mL浓硫酸。10min后,25℃水浴20min,以水为空白490nm测吸光值,以吸光值A为纵坐标,葡萄糖含量为横坐标绘制标准曲线,并进行回归处理。葡萄糖为对照品的标准曲线见图1。

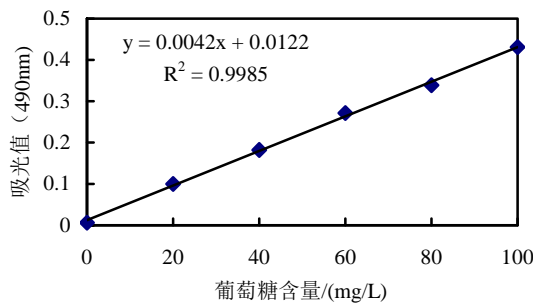


图1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 The standard curve of monosaccharide

1.3.6 冠突散囊菌液态培养胞外多糖正交试验

已有的资料表明,影响多糖提取的主要因素有:浓缩体积、醇沉时间、乙醇浓度等。本研究选择发酵液浓缩比例、醇沉时间、乙醇浓度为试验因素,各取三水平,以冠突散囊菌胞外多糖粗品提取量为观察指标,按照L₉(3⁴)正交表实施试验,见表1。

表1 正交试验因素和水平表

	A.浓缩比例	B.乙醇浓度/%	C.醇沉时间/h
1	1/5	95	5
2	1/4	85	10
3	1/3	75	15

其中,试验因素贡献率计算公式为:

$$\beta = \frac{s_j - \frac{S_e}{f_e} f_j}{s} \times 100\% \quad [8]$$

其中,S为总平方和,S_j和f_j分别为试验因素的偏差平方和自由度。S_e和f_e为误差的偏差平方和自由度。

1.3.7 数理分析方法

The SAS System for Windows 9.0(简体中文)。

2 结果与分析

2.1 多糖含量测定结果

苯酚-硫酸法测粗多糖中总糖含量的数据见表2。

表2 总糖含量测定数据

样品/mg	定容体积/mL	取样体积/mL	吸光度/nm
10.38	100	1	0.282 0.283

经计算,冠突散囊菌经液体发酵后,提取的粗多糖中总糖含量为62.2%。

2.2 胞外多糖最佳提取工艺

以冠突散囊菌液体发酵液为原料,采用真空浓缩、乙醇醇析沉淀的方法提取多糖,以胞外多糖提取量为考核指标,进行正交试验,试验安排及结果见表3。

表3 L₉(3⁴)正交试验设计与结果

Table 3 L₉(3⁴)Orthogonal table design and results of experiments

试验号	A.浓缩比例	B.乙醇浓度/%	C.醇沉时间/h	胞外多糖提取量/(μg/mL)	
				1	2
1	1(1/5)	1(95)	1(5)	182.4	178.8
2	1	2(85)	2(10)	185.3	182.1
3	1	3(75)	3(15)	178.2	181.4
4	2(1/4)	1	2	215.9	221.3
5	2	2	3	208.6	212.4
6	2	3	1	200.9	196.7
7	3(1/3)	1	3	162.4	156.8
8	3	2	1	146.7	152.9
9	3	3	2	162.4	159.0

对表3进行方差分析和显著性检验,结果见表4。

表4 L₉(3⁴)正交试验方差分析表

Table 4 analysis of Orthogonal table L₉(3⁴)

变异来源	自由度	平方和	均方	F Value	Pr > F
A浓缩比例	2	8310.951111	4155.475556	380.67	<.0001
B乙醇浓度	2	138.084444	69.042222	6.32	0.0148
C醇沉时间	2	387.231111	193.615556	17.74	0.0004
模型Model	6	8836.266667	1472.711111	134.91	<.0001
误差Error	11	120.077778	10.916162		
Corrected Total	17	8956.344444			

通过表4可以看出,试验考查因素浓缩比例、乙醇浓度、醇沉时间均达到了显著性水平,试验因素贡献率β(A)=92.55%;β(B)=1.30%;β(C)=4.08%;β(E)=2.07%。其中A为影响试验的主要因素,虽然C因素达到了极显著水平,但对试验结果影响不大,多糖粗品提取率的实验因素的主次顺序为:A(浓缩比例)、C(醇沉时间)、B(乙醇浓度)。

2.2.1 冠突散囊菌液体发酵液浓缩比例与多糖提取量的关系

表5 浓缩比例 (A) 多重比较 (LSD) 法结果

Table 5 The results of multiple comparisons of average level from

A(LSD)				
浓缩比例 A	多糖平均含 量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	处理 数	显著性水平	
			Alpha 0.05	Alpha 0.01
A ₂ (1/4)	209.300	6	a	A
A ₁ (1/5)	181.367	6	b	B
A ₃ (1/3)	156.700	6	c	C

从表5可见,冠突散囊菌液体发酵液浓缩比例大小为影响测冠突散囊菌胞外多糖的提取量的主要因素。发酵液浓缩比例为1:4时,其胞外多糖的提取量最高,达209.300 $\mu\text{g}/\text{mL}$,发酵液浓缩比例为1:5和1:3时,胞外多糖提取量分别为181.367 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和156.700 $\mu\text{g}/\text{mL}$,均低于浓缩比例为1:4时的提取量,可见发酵液浓缩比例直接影响到多糖的提取量,浓缩比例过小,由于多糖浓度低,要使多糖完全沉淀下来所需时间长,因此,在本试验时间内多糖提取率底;浓缩比例太大,浓缩的时间比较长,在加热浓缩过程中,多糖的结构组分会被破坏,影响胞外多糖的提取量。

2.2.2 醇沉时间与冠突散囊菌液体发酵液多糖提取量的关系

表6 醇沉时间 (C) 多重比较 (LSD) 法结果

Table 6 The results of multiple comparisons of average level from C(LSD)

C(LSD)				
醇沉时间(h) C	多糖平均含 量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	处理 数	显著性水平	
			Alpha 0.05	Alpha 0.01
C ₂ (10)	187.667	6	a	A
C ₃ (15)	183.300	6	b	A
C ₁ (5)	176.400	6	c	B

乙醇沉淀时间对冠突散囊菌液体发酵液胞外多糖提取量影响较大。表6知在所设定的3个浸提时间中,以10h最好,胞外多糖的提取量最高,达187.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$,乙醇沉淀时间为5h和15h时,胞外多糖提取量分别为178.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和183.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,均低于乙醇沉淀时间为10h时的提取量。

2.2.3 乙醇浓度与冠突散囊菌液体发酵液多糖提取量的关系

根据资料报道,多糖在乙醇浓度达到47%以上时就开始出现沉淀现象^[9,10],随着乙醇浓度不断提高,多糖沉淀随之加快,从表7可得知,乙醇浓度对冠突散囊菌液体发酵液胞外多糖提取量的影响随浓度不同而不同,各水平间的有显著性的区别;乙醇浓度95%时冠突散囊菌液体发酵液多糖提取量最高,达186.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表7 乙醇浓度 (B) 多重比较 (LSD) 法结果

Table 7 The results of multiple comparisons of average

level from B(LSD)				
乙醇浓度/% B	平均 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	处理 数	显著性水平	
			Alpha 0.05	Alpha 0.01
B ₁ (95)	186.267	6	a	A
B ₂ (85)	181.333	6	b	AB
B ₃ (75)	179.767	6	c	B

3 结论

3.1 通过采用苯酚-硫酸法测定冠突散囊菌胞外多糖的提取量,从精密度,稳定性和回收率方面对此方法进行了考察,结果表明,此方法是测定冠突散囊菌胞外多糖的较为理想的方法。

3.2 影响多糖粗品提取率的实验因素的主次顺序为:A(浓缩比例)、C(醇沉时间)、B(乙醇浓度)。多重比较表明,每个因素各水平对多糖粗品提取率的影响程度在置信区间95%的范围内分别为: B₁>B₃>B₂, C₂>C₃>C₁, A₂>A₁>A₃。因此,对于多糖粗品提取率的最优水平搭配为 B₁C₂A₂,即冠突散囊菌液体发酵液胞外多糖提取的较优工艺条件为浓缩比例为原液体的1/4,醇沉时间为10h,多糖沉淀时乙醇浓度为95%。

参考文献

- [1] 刘作易.一种决定茯砖茶品质的重要真菌-“金花”菌的研究进展[J].贵州茶叶,1993,(2):33-35.
- [2] 温琼英.茯砖茶中主要微生物的研究[J].茶叶通讯,1986,(4):19-21.
- [3] 王志刚,童哲,程苏云,等.茯砖茶中霉菌的产毒性研究II冠突散囊菌的菌体毒性测定[J].茶叶科学,1994,14(1):69.
- [4] 王增盛,施兆鹏,刘仲华,等.论茯砖茶品质风味形成机理[J].茶叶科学,1991,11(增刊):49-55.
- [5] 杨抚林.冠突散囊菌液体发酵机理及其代谢产物促消化酶的研究.湖南农业大学硕士学位论文,2005,6:1-20.
- [6] 邓键.苯酚-硫酸法测定茯苓中多糖含量[J].衡阳医学院学报,1993,21(3):277-278.
- [7] 钱和,张添,刘长虹.改进苯酚-硫酸法测定芦荟多糖含量[J].江苏食品与发酵,2002,(2):3-6.
- [8] 任露泉.试验优化设计与分析(第三版)[M].北京:高等教育出版社,2003.8
- [9] 白寿宁.枸杞多糖提取及分离纯化技术探讨[J].食品工业,2000,(3):9-11.
- [10] 段穗芳,郑宗坤.超滤提纯香菇子实体中的香菇多糖[J].深圳大学学报,1999,16(4):67-69