

江西虫草发酵液脱色及其多糖提取分离的优化工艺*

肖建辉¹ 陈代雄¹ 刘金伟¹ 刘祖林¹ 万卫红¹ 梁宗琦²

(遵义医学院附属医院 贵州省细胞工程重点实验室 遵义 563003)¹

(贵州大学真菌资源研究所 贵阳 550025)²

摘要: 通过单因素和正交试验法, 优化了江西虫草发酵液脱色的工艺条件。即在提取多糖前, 调节发酵液 pH 值至 5, 活性炭用量为 3g/100mL, 在 25℃ 恒温条件下吸附 5min 后, 发酵液脱色率可达到 89.6%, 发酵液多糖的耗损率仅为 10.7%。在此基础上, 采用正交试验法, 对发酵液多糖提取工艺进行了优化。利用优化后的工艺, 即经脱色和去蛋白后发酵液滤液浓缩至其总体积的 1/7, 加入乙醇, 终浓度为 80%, 醇析 16h, 发酵液多糖的得率可达到 0.38g/L。

关键词: 江西虫草, 发酵液, 胞外多糖, 活性炭, 脱色, 提取, 优化

中图分类号: Q539, Q939.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0024-07

Optimization of Technique Conditions for Decolorization and Extract of Exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis**

XIAO Jian-Hui¹ CHEN Dai-Xiong¹ LIU Jin-Wei¹ LIU Zu-Lin¹

WAN Wei-Hong¹ LIANG Zong-Qi²

(Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003)¹

(Institute of Fungi Resource, Guizhou University, Guiyang 550025)²

Abstract: The technique conditions of decolorization of fermentation broth were successively optimized using single factor assay and orthogonal layout method in *Cordyceps jiangxiensis*. The optimal condition of decolorization was investigated to be 3g/100mL active carbon, 5 min absorption time, pH5 of fermented broth and 25℃ absorption temperature. Under the optimal condition, the maximum decolorization rate of fermented broth reached 89.6%, simultaneously 10.7% consuming rate of exopolysaccharide was minimum. Subsequently, the extract condition of exopolysaccharide of *C. jiangxiensis* was further optimized by orthogonal layout design. The maximum exopolysaccharide production was 0.38 g/L under the optimal condition, i. e. firstly fermented filtrate decolorized and deproteinized was concentrated to 1/7 of its total volume, secondly concentration broth was mixed with four times its volume of absolute ethanol and stirred vigorously, lastly precipitation of exopolysaccharide proceeded at 4℃ for 16 hrs and the exopolysaccharide collected by centrifugation and dryness.

Key words: *Cordyceps jiangxiensis*, Fermentation broth, Exopolysaccharide, Active carbon, Decolorization, Extract, Optimization

虫草多糖是虫草中主要生物活性物质之一, 具有免疫调节、降血糖、降血脂、抗

* 贵州省科技与社会发展“十五”攻关项目 (No. 黔科合 2004NGY038)

贵州省科学技术基金 (No. 黔科合 J (2005) 2076 号)

其他作者: 章 涛¹

通讯作者 Tel: 0852-8608603, Fax: 0852-8638630, E-mail: mycoxiao@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-07-14, 修回日期: 2005-08-15

肿瘤、抗衰老等多种生物活性^[1-3]。基于此,虫草多糖的研究成了虫草类资源开发利用的一个主要方向。

江西虫草 (*Cordyceps jiangxiensis*) 俗称草木王, 是种大型虫草, 主要分布在我国江西和福建境内, 在民间有悠久的药用史^[4,5]。2000 年我们初次采集到该虫草, 经鉴定系虫草属一新种, 并命名为江西虫草 (*C. jiangxiensis* Z. Q. Liang, A. Y. Liu & Y. C. Jiang sp. Nov.)^[5], 明确了其分类地位。随后, 其难培养的问题得到了有效解决^[6]。药理作用预实验观察到其发酵液多糖有抑瘤活性, 为此, 优化了其发酵液多糖的发酵工艺条件^[7]。

真菌胞外多糖发酵生产过程中, 发酵液富含色素、游离蛋白等副产物。因此脱色是发酵液多糖提取分离过程中一个重要操作单元。真菌多糖的脱色常用氧化法和吸附法。前者仅对一些有色基团氧化, 并不能去除色素, 而后者通过吸附作用去除色素。活性炭由于具有巨大表面积、吸附能力强、成本低、且不影响目标产物的理化特性及生物活性等优势, 广受人们青睐。本研究拟对江西虫草发酵液多糖 (exopolysaccharide of *Cordyceps jiangxiensis*, EPCJ) 提取分离。通过优化脱色和提取分离工艺条件, 尽量减少多糖在脱色过程中的耗损, 提高发酵液的脱色率和多糖的得率, 为其开发利用提供实验依据。就这方面的研究, 尚未见类似报道。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

江西虫草 JXPJ 0109 菌株保存在贵州大学真菌资源研究室, 菌株保藏培养基、种子培养基和发酵培养基见文献[9]。

1.2 主要试剂与仪器

葡萄糖、重蒸酚、浓硫酸、3,5-二硝基水杨酸、无水乙醇、氯仿、正丁醇、活性炭(粉炭)等均均为国产分析纯或化学纯, 0.45 μm 微孔滤膜 (Millipore, USA), R-201 旋转减压浓缩仪 (Büchi, Switzerland), 超纯水制备系统 (Millipore, France), 全波长 SAFIRE 荧光酶标仪 (Tecan, Austria), 3310 pH 仪 (Jenway, UK), 5804R 高速冷冻离心机 (Eppendorf, Germany), OSI200 恒温水浴振荡器 (Grant, England)。

1.3 多糖提取分离工艺流程

江西虫草发酵液 $\rightarrow$ 6 层滤纸过滤, 浓缩 $\rightarrow$ 滤液脱色 $\rightarrow$ Sevag 法去除游离蛋白 $\rightarrow$ 对流水和蒸馏水各透析 24h $\rightarrow$ 滤液减压至一定体积 $\rightarrow$ 20 $^{\circ}\text{C}$, 400 $\times$ g 离心 20min $\rightarrow$ 微孔滤膜过滤 $\rightarrow$ 一定浓度乙醇析一定时间 $\rightarrow$ 20 $^{\circ}\text{C}$, 400 $\times$ g 离心 20min $\rightarrow$ 沉淀物用 75% 乙醇洗涤至 3 次 $\rightarrow$ 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 $\rightarrow$ 粗多糖

1.4 单因素影响试验

选取发酵液脱色过程的假定影响参数进行单因素试验, 若非特定说明, 则按如下方法测定, 即摇瓶装液量 100mL, 加入一定量活性炭, 调节 pH 值至 7, 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴, 120r/min 的转速振荡 30 min, 再进行脱色率和多糖测定。

1.4.1 活性炭用量对发酵液脱色率及 EPCJ 的影响: 活性炭用量设定 1、5、10、15、20g 等 5 个等级。

1.4.2 吸附时间对发酵液脱色率及 EPCJ 的影响: 根据上述结果确定的活性炭用量, 设定 5、10、20、40、60min 等 5 个吸附时间。

1.4.3 酸碱度对发酵液脱色率及 EPCJ 的影响: 根据上述结果确定的活性炭用量和吸附时间, 调节发酵液的初始 pH 为 3、5、7、8、10 共 5 个等级。

1.4.4 吸附温度对发酵液脱色率及 EPCJ 的影响: 根据上述确定结果确定的活性炭用量、吸附时间和 pH 值, 设定 25、45、60、80、95℃ 等 5 个吸附温度。

1.5 正交试验^[8]

根据单因素试验结果, 通过 $L_9 (3^4)$ 正交试验进一步优化江西虫草发酵液脱色的工艺条件。此外, 选取 EPCJ 提取分离过程中浓缩比、乙醇终浓度和醇析时间等假定影响因子进行 $L_9 (3^4)$ 正交试验, 优化分离提取条件。

1.6 脱色率测定

用全波长荧光酶标仪在可见光波谱区对发酵液进行扫描。根据扫描结果, 选择灵敏度、重复性好的 380nm 波长作为脱色率实验的测定波长。脱色率的计算公式如下:

$$\text{脱色率}(\%) = \frac{A_{380} - A'_{380}}{A_{380}} \times 100\%$$

A_{380} ——发酵液脱色前在波长 380nm 处的吸光度; A'_{380} ——发酵液脱色后在波长 380nm 处的吸光度。

1.7 多糖耗损率的测定

以波长 490nm 作为多糖耗损实验的测定波长。计算公式如下:

$$\text{耗损率}(\%) = \frac{A_{490} - A'_{490}}{A_{490}} \times 100\%$$

A_{490} ——发酵液脱色前在波长 490nm 处的吸光度; A'_{490} ——发酵液脱色后在波长 490nm 处的吸光度。

1.8 多糖含量的测定

总糖和还原糖分别采用苯酚-硫酸法测定、3, 5-二硝基水杨酸法测定, 均以葡萄糖标准品制作标准曲线。

1.8.1 标准曲线制作: 根据文献分别制作苯酚-硫酸法中葡萄糖标准曲线^[9]和 3, 5-二硝基水杨酸法的葡萄糖标准曲线^[10], 并建立标准曲线的回归方程。

1.8.2 发酵液及 EPCJ 中多糖含量的测定: 直接吸取发酵液以及 0.2mg/mL 粗多糖溶液 0.2mL, 加超纯水至 2mL, 再按上述苯酚-硫酸法及 3, 5-二硝基水杨酸法标准曲线制备中的方法测定吸光度 A , 并根据各自回归方程分别计算总糖和还原糖含量。多糖的含量为总糖和还原糖的差值。

2 结果与分析

2.1 活性炭用量和吸附时间对发酵液脱色率及 EPCJ 的影响

在本实验设定的活性炭用量范围内, 随着活性炭用量增加, 活性炭吸附面积不断增大, 发酵液的脱色率呈上升趋势, 用量在 5g/100mL 时, 脱色率接近 80%。但其用量超过 5g/100mL 时, 脱色率变化已不明显 (图 1)。这可能是所用活性炭的总吸附量已经高于发酵液中色素量。由于一些色素与天然多糖等大分子物质混杂或结合在一起, 因此, 采用活性炭对发酵液吸附脱色, EPCJ 也因活性炭的吸附作用而耗损。正如图 1 所示, EPCJ 随活性炭用量增加, 其消耗率也相应增加。尤其是在 5 ~ 10g/100mL 的范围内, 变化显著。为了获得较高的脱色效果并减少活性炭对 EPCJ 的吸附, 活性炭用量

选择 5g/100mL 为宜。此外，吸附时间也是影响活性炭脱色的一个主要因素（图 1）。在 5~60min 的吸附时间范围内，发酵液脱色率逐步平缓递增，变化幅度甚小，但 EPCJ 的耗损率在吸附作用 10min 内随吸附时间的增大变化明显，吸附 10min 后，耗损率没有明显增加，这可能主要是活性炭逐步达到了一个吸附饱和状态，即活性炭的吸附与解吸达到一个物质平衡。据此，活性炭吸附时间以 5min 左右较好。

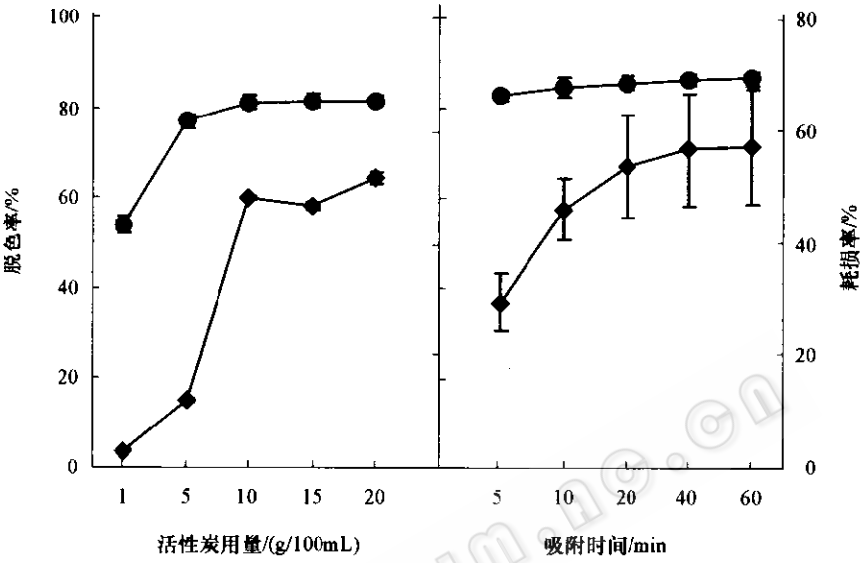


图 1 活性炭用量和吸附时间对江西虫草发酵液脱色效果及 EPCJ 的影响

● 发酵液脱色率，◆ EPCJ 耗损率

2.2 酸碱度和吸附温度对发酵液脱色率及 EPCJ 的影响

发酵液酸碱度在 pH 3~10 范围内，随 pH 值上升，活性炭对发酵液色素的吸附能力缓慢下降。活性炭作用 pH 为 3 和 pH 为 10 的发酵液，其脱色率相差十余个百分点（图 2）。然而，活性炭对 EPCJ 的吸附却不因脱色率的下降而降低。在 pH3 时，EPCJ 耗损率为 30.4%，pH 5 时为 22.6%，然后随着 pH 上升，EPCJ 耗损率率逐步增大，pH

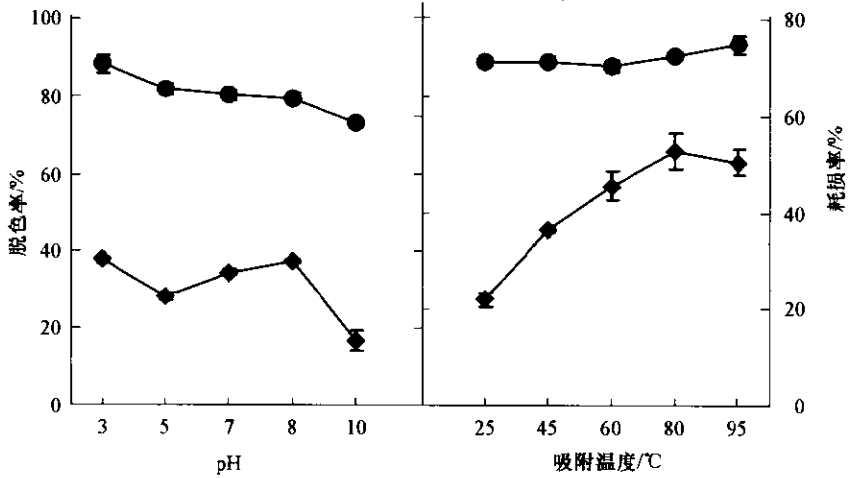


图 2 酸碱度和吸附温度对江西虫草发酵液脱色效果及 EPCJ 的影响

● 发酵液脱色率，◆ EPCJ 耗损率

8 时为 29.9%，在 pH10 时又直线下降到 13.5%。综合发酵液酸碱度对活性炭脱色及吸附 EPCJ 的双重影响，选择发酵液的酸碱度为 pH 5 左右。图 2 还表明，吸附温度在不同程度上影响活性炭脱色，从 25℃ 到 95℃，脱色率在一个小的变化幅度范围内平缓上升，但 EPCJ 的耗损率变化明显，在 25℃ ~ 80℃ 范围内直线上升，高于 80℃ 则略有下降。这可能是随温度升高，发酵液多糖的理化特性发生变化，粘度下降而更易进入活性炭内部孔隙，并很快达到平衡。另一方面，温度的继续升高加快分子的热运动，活性炭的吸附和解吸是一个可逆的物理过程，因此温度过高，EPCJ 的耗损率略有下降。为避免较高的温度破坏多糖的特性影响其生物活性和使活性炭耗损更多的 EPCJ，选择 25℃ 左右的吸附温度。

2.3 多因素对发酵液脱色率及 EPCJ 的影响

根据活性炭吸附脱色单因素实验结果确定的条件，利用 $L_9(3^4)$ 正交试验进一步优化各影响因素的水平，确定最佳脱色条件以及影响脱色过程和 EPCJ 耗损的各因素的主次关系。实验结果见表 1 和表 2。表 1 结果表明，正交列表中第 5 号实验 (A2B2C3D1) 的发酵液脱色率最高，达到 88.2%，EPCJ 耗损较大，其吸光度为 0.1773 (耗损率 20.8%)。第 4 号实验 (A2B1C2D3) EPCJ 耗损最小 (12.2%)，但其脱色率却是最差的。综合看，2 号实验 (A1B2C2D2) 结果较为理想，即发酵液 pH 值调至 5，活性炭用量为 2g/100mL，在 25℃ 条件下吸附 5min。表 1 中的直观分析结果表明，涉及到活性炭脱色各因素主次顺序为 $B > C > A > D$ ，各因素脱色的最佳水平分别为 A3B3C3D1，而与脱色后 EPCJ 耗损少的各因素主次顺序为 $B > D > A > C$ ，耗损最小的条件是 A1B1C1D2。此外表 2 的方差分析也表明了各因素这种主次关系。表 2 还进一步表明了 B 因素 (吸附时间) 与脱色和 EPCJ 耗损均有显著的相关性，A 因素 (活性炭用量)、C 因素 (发酵液 pH) 与脱色显著相关，C 因素与 EPCJ 的耗损相关性非常低。权衡正交实验分析结果，在后续实验中发酵液 pH 值调至 5，活性炭用量为 3g/100mL，在 25℃ 条件下吸附 5min 后，发酵液脱色率达到 89.6%，发酵液中 EPCJ 的耗损率为 10.7%。

表 1 江西虫草发酵液脱色 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表

实验号	A	B	C	D	发酵液 脱色率 (%)	发酵液脱色后多糖	
	活性炭用量 (g/100mL)	吸附时间 (min)	pH	吸附温度 (℃)		吸光度 (OD_{490nm})	耗损率 (%)
1	1 (2)	1 (3)	1 (4)	1 (15)	79.2	0.1891	15.6
2	1	2 (5)	2 (5)	2 (25)	81.6	0.1906	14.9
3	1	3 (7)	3 (6)	3 (30)	87.4	0.1755	21.7
4	2 (3)	1	2	3	76.3	0.1968	12.2
5	2	2	3	1	88.2	0.1773	20.8
6	2	3	1	2	83.4	0.1806	19.4
7	3 (4)	1	3	2	82.9	0.1870	16.5
8	3	2	1	3	86.6	0.1794	20.0
9	3	3	2	1	88.1	0.1550	30.8

续表 1

	发酵液脱色率 (%)				发酵液脱色后多糖吸光度 (OD_{490nm})			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K1	744.5	715.2	747.6	766.6	1.6654	1.7187	1.6474	1.5641
K2	743.6	769.2	738.0	743.5	1.6641	1.6418	1.6272	1.6747
K3	773.0	776.7	775.5	751.0	1.5645	1.5335	1.6194	1.6552
$R_{\text{偏差}}$	29.4	61.5	37.5	23.1	0.1009	0.1852	0.028	0.1106
$Level_{\text{max}}$	3	3	3	1	1	1	1	2

表 2 江西虫草发酵液脱色 $L_9(3^4)$ 正交试验结果方差分析

方差来源	发酵液脱色率				发酵液脱色后多糖吸光度			
	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值
A	62.1	2	31.05	9.35 *	0.00075	2	0.00038	4.75
B	250.1	2	125.05	37.67 *	0.00193	2	0.00097	12.13 *
C	84.3	2	42.15	12.70 *	0.00005	2	0.00003	0.38
D	30.8	2	15.40	4.64	0.00078	2	0.00039	4.87
误差	59.7	18	3.32		0.00135	18	0.00008	

* $F > F_{0.01}$ 有显著统计学意义

2.4 EPCJ 提取工艺的正交试验结果

发酵液经脱色、去游离粗蛋白后，EPCJ 的提取可能相关的影响因素主要是滤液浓缩比、用于醇析的乙醇终浓度以及醇析时间。为此，通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计，优化其提取工艺条件。结果如表 3 所示，EPCJ 提取采用正交列表 9 号实验条件即 a3b3c1 时，可获得最大得率 0.32g/L，其次是 6 号实验 (a2b3c2) 的得率 0.3g/L。直观分析表明与 EPCJ 提取相关的 3 个因素主次顺序是 $b > a > c$ ，各因素的最佳水平分别是 a3b3c2。表 4 的方差分析进一步表明这 3 个因素的主次关系，并且均与 EPCJ 提取呈显著相关。在后续实验中，采用 a3b3c2 工艺条件，即滤液浓缩至其总体积的 1/7，加入乙醇，使其终浓度为 80%，醇析 16h，EPCJ 的得率高达 0.38g/L。

表 3 EPCJ 分离提取的 $L_9(3^4)$ 正交试验

实验号	A 浓缩比	b 乙醇浓度 (%)	a × b	c 醇析时间 (h)	EPCJ 得率 (g/L)
1	1 (3:1)	1 (50)	1	1 (8)	0.08
2	1	2 (70)	2	2 (16)	0.24
3	1	3 (80)	3	3 (24)	0.27
4	2 (5:1)	1	2	3	0.09
5	2	2	3	1	0.22
6	2	3	1	2	0.30
7	3 (7:1)	1	3	2	0.23
8	3	2	1	3	0.25
9	3	3	2	1	0.32
K1	1.16	0.78	1.23	1.21	
K2	1.20	1.39	1.28	1.51	
K3	1.57	1.76	1.42	1.21	
$R_{\text{偏差}}$	0.41	0.98	0.19	0.30	
$Level_{\text{max}}$	3	3	3	2	

表 4 EPCJ 分离提取的 L₉ (3⁴) 正交试验方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值
a	0.017	2	0.0085	42.50 *
b	0.082	2	0.041	205.00 *
a × b	0.003	2	0.0015	7.50
c	0.01	2	0.005	25.00 *
误差	0.002	9	0.0002	

* $F > F_{0.01}$ 有显著统计学意义

2.5 多糖含量的测定

在多糖含量测定实验中，我们分别测定了江西虫草发酵液和 EPCJ 的多糖含量。根据所指定的标准曲线，计算江西虫草发酵液的多糖含量是 0.43%，而 EPCJ 多糖含量高达 95.2%。由此看来，采用本研究的最佳 EPCJ 提取工艺条件（0.38g/L 得率），还是有近 16 个百分点的多糖耗损。这可能主要涉及到 3 方面的耗损，即脱色过程中的活性炭的吸附耗损，脱色后去蛋白和透析过程中小分子多糖流失，此外，还有少部分滞留在醇析后的滤液中。

3 讨论

近 10 余年来，虫草多糖，由于其免疫调节、抗肿瘤、降血糖等广泛的生物活性受到人们的普遍关注^[1]。包括虫草多糖在内的一些生物来源多糖，去除与多糖混杂在一起的色素杂质是生化分离纯化过程中的一个重要环节。目前常用的去色素方法主要有氧化法、吸附法、层析法等等。从经济和规模化生产的角度出发，本研究采用活性炭吸附法。活性炭属于非极性吸附剂，在溶液中更适合吸附非极性或极性较小的物质。本着尽可能使发酵液脱色和尽量减低多糖耗损两个目标，在 EPCJ 提取分离前，通过单因素试验和多因素正交试验，优化活性炭脱色工艺，取得了良好的效果。当然，活性炭脱色易产生粉尘，这个现象在实验中也观察到，但结合到去蛋白环节，连同游离粗蛋白一并去除，这比提取粗多糖后，再脱色素要减少一个实验环节，同时也减少多糖耗损。

在发酵液脱色工艺优化的基础上，进一步采用正交试验设计优化了 EPCJ 提取分离的工艺。通常生物来源的多糖一般是先提取再脱色、去蛋白分离多糖。本研究提取 EPCJ 采用先脱色、去蛋白再醇析提取多糖的工艺流程，这样获得的 EPCJ 杂质少，多糖含量高。尽管我们在多糖含量测定中计算到有近十余个百分点的多糖耗损，但这其中涉及到许多无法避免的原因。在后续实验中，我们证实这个提取分离工艺流程比常规的工艺流程所致的多糖耗损要少得多。

参 考 文 献

[1] 肖建辉, 梁宗琦, 刘爱英. 药学报, 2002, 37 (7): 589 ~ 592.
[2] Xiao J H, Chen D X, Xiao Y, et al. Proc Biochem, 2004, 39 (12): 2241 ~ 2247.
[3] 李连德, 樊美珍, 李增智. 微生物学通报, 2000, 27 (6): 427 ~ 429.
[4] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 (上册). 北京: 人民卫生出版社, 1975. 712.
[5] Liang Z Q, Liu A Y, Jiang Y C. Mycosystema, 2001, 20 (3): 306 ~ 309.
[6] 肖建辉, 刘金伟, 刘祖林, 等. 食用菌学报, 2004, 11 (1): 26 ~ 31.
[7] Xiao J H, Chen D X, Liu J W, et al. J Appl Microbiol, 2004, 96 (5): 1105 ~ 1116.
[8] 中国科学院数学所数理统计组. 正交实验法. 北京: 人民教育出版社, 1975.
[9] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Anal Chem, 1956, 28 (3): 350 ~ 356.
[10] 胡锡阶, 肖建辉, 肖 瑜, 等. 遵义医学院学报, 2005, 28 (1): 9 ~ 11.