

# 血红铆钉菇多糖的优化提取研究

王晨瑜, 张雪松, 王战勇, 张 晶

(辽宁石油化工大学 化学化工与环境学部, 辽宁 抚顺 113001)

**摘 要:**采用热水浸提法提取血红铆钉菇子实体多糖,并采用单因素试验和正交实验相结合的方法,研究了提取次数、提取温度、提取时间、料液比对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响。结果表明:提取血红铆钉菇多糖的最佳工艺条件为:提取温度 100℃、料液比 1:16、提取时间 2 h,浸提 3 次,血红铆钉菇子实体多糖的产率可达 $(7.64 \pm 0.15)\%$ 。

**关键词:**血红铆钉菇;多糖;优化;提取

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0155-03

血红铆钉菇(*Gomphidius rutilus*)属担子菌亚门层菌纲伞菌目铆钉菇科铆钉菇属真菌,俗称松树伞、松蘑等,夏、秋季群生或散生于松林内地上,为菌根性食用菌,可与油松、樟子松等树木形成菌根,既能促进树木生长,又是无公害的山珍佳肴<sup>[1-2]</sup>。血红铆钉菇主要分布于我国的黑龙江、吉林、辽宁、河北、西藏、广东等地<sup>[3]</sup>。铆钉菇内的多糖类物质还可抗肉瘤。Van Hees 等<sup>[4]</sup>认为菌根血红铆钉菇子实体多糖有较强的分泌柠檬酸、甲酸、丙二酸和草酸的能力,可能对生物修复有较好的效果。已有研究发现从真菌中提取的多糖具有非常重要与特殊的生理活性。食药真菌多糖具有抗肿瘤、抗病毒、抗辐射、抗氧化、降血脂、影响免疫调节活性、护肝排毒、促进核酸和蛋白质生物合成等多种功效<sup>[5-7]</sup>。近年来,食药真菌多糖的应用正由单独应用向多糖与多糖、细胞因子、肿瘤杀伤效应细胞、放疗、化疗的联合应用方向深入发展<sup>[8-9]</sup>。现对血红铆钉菇子实体多糖的提取条件进行了优化研究,以期获得血红铆钉菇多糖的最高提取率,为从血红铆钉菇进一步深入提取多糖等活性物质提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

血红铆钉菇(*G. rutilus*)购买于抚顺当地农贸市场。试验药品:三氯甲烷、正丁醇、乙醇、苯酚、硫酸、葡萄糖,均为国产分析纯试剂。Sevag 试剂(三氯甲烷:

正丁醇 4:1 比例混合)。试验仪器:LD5-2A 低速离心机(北京医用离心机厂);ALC-1100.2 电子天平(德国赛多利斯股份公司);VIS-7220 可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);DHG-9146A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);ALC-210.4 电子分析天平(德国赛多利斯股份公司);A11 basic 分析研磨机(德国 IKA 公司)。

### 1.2 试验方法

称取 1 000 g 干燥的血红铆钉菇,粉碎后用 80%乙醇(v/v)80℃回流脱脂 6 h,去除有色物质、单糖、低聚糖和小分子物质,4 000 r/min 离心 20 min,回收沉淀,60℃真空干燥后待用。取预处理血红铆钉菇样品 20 g,与水在设定条件下浸提后,4 000 r/min 离心 15 min,收集浸提液,加 3 倍体积无水乙醇沉淀过夜后,4 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀再使用无水乙醇洗涤 3 次,无水乙醇洗 1 次,充分干燥后即得到血红铆钉菇粗多糖。采用 Sevag 试剂(三氯甲烷和正丁醇,体积比 4:1 混合)脱除蛋白。采用苯酚-硫酸法测定其水溶性多糖含量<sup>[10]</sup>。

**1.2.1 单因素试验** 提取次数对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响:称取 20 g 预处理血红铆钉菇样品,80℃水浴,按照料液比 1:20 加入蒸馏水,提取时间 3 h,研究提取次数对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响。提取温度对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响:称取 20 g 预处理血红铆钉菇样品,提取次数为 3 次,提取时间 3 h,料液比 1:20,研究不同的提取温度对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响。提取时间对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响:称取 20 g 预处理血红铆钉菇样品,按照提取次数为 3 次,提取温度为 80℃,料液比为 1:20,研究不同的提取时间对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响。料液比对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响:称取 20 g 预处理血红铆钉菇样品,按照提取

**第一作者简介:**王晨瑜(1986-),女,山东滨州人,在读硕士,研究方向为生物化工。

**责任作者:**张晶(1966-),女,山东莒县人,本科,教授,研究方向为生物活性物质开发。E-mail:66zj@163.com。

**基金项目:**抚顺市科研资助项目(FSKJHT201135)。

**收稿日期:**2012-10-22

次数为3次,提取温度为80℃,提取时间为2.5 h,研究不同的料液比对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响。

1.2.2 正交实验 结合单因素试验结果,设计4因素3水平 $L_9(3^4)$ 进行正交实验设计,因素及水平见表1。

表1 正交实验因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A	B	C	D
	提取次数/次	提取温度/℃	提取时间/h	料液比
1	2	80	2.0	1:14
2	3	90	2.5	1:16
3	4	100	3.0	1:18

## 2 结果与分析

### 2.1 提取次数对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响

由图1可知,提取3次已经能够把绝大部分的多糖提取出来。在随后提取的几次中,多糖提取率的增加幅度已经非常微小。在实际操作中还要结合生产效率和经济效益二方面综合考虑。因此,根据该试验提取次数对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响结果及其它因素的综合考虑,以3次为最佳提取次数。此时,血红铆钉菇子实体多糖的提取率达到临界值( $6.37 \pm 0.14\%$ )。

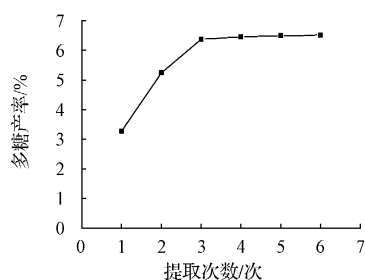


图1 提取次数对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of different times of extraction on the extraction yield of polysaccharides from *G. rutilus*

### 2.2 提取温度对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响

由图2可以看出,在40~60℃范围内随着温度的升高,血红铆钉菇子实体多糖的提取率几乎呈直线增加,在60~70℃范围内提取率又陡然上升,在70~80℃范围内血红铆钉菇子实体多糖的提取率增加缓慢,当温度超过80℃在90~100℃范围内时,血红铆钉菇子实体多糖的提取率几乎不变。该试验证明,100℃时,血红铆钉菇子实体多糖的提取效率最高。据日本蓑和田博士的专利记载,高温热水浸提,会破坏降血糖多糖的有效成分<sup>[11]</sup>。由于温度升高对提取效率的影响不再十分显著,增加的提取效率不足以抵消操作费用的增长,不符合经济的原则,从节能的角度考虑,若应用到工业实际生产中一般选择略低于100℃的提取温度。

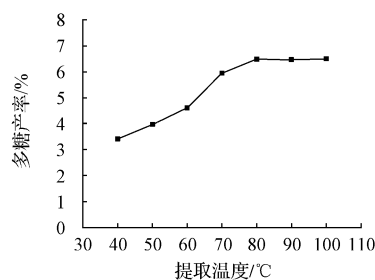


图2 提取温度对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of different extraction temperature on the extraction yield of polysaccharides from *G. rutilus*

### 2.3 提取时间对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响

由图3可知,血红铆钉菇子实体多糖提取率随着提取时间的增加先是迅速提高,当提取时间到2.5 h时达到峰值( $6.53 \pm 0.19\%$ ),而提取时间在2.5~4.0 h的范围内时,血红铆钉菇子实体多糖的提取率呈下降趋势。一般来讲,多糖提取率与提取时间呈正相关,但是当扩散达到平衡后,延长时间不起作用。同时因为延长提取时间还会增加能源的消耗,增加操作费用,从节省时间、节约能耗、提高效率的角度考虑,确定提取时间为2.5 h为最优的提取时间。

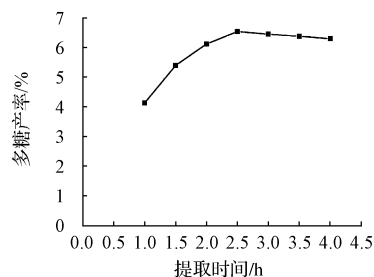


图3 提取时间对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of different extraction time on the extraction yield of polysaccharides from *G. rutilus*

### 2.4 料液比对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响

由图4可知,血红铆钉菇子实体多糖的提取率随料液比的增大而提高,当料液比为1:16时,多糖的提取率达到峰值( $6.61 \pm 0.11\%$ ),当料液比超过1:16时,血红

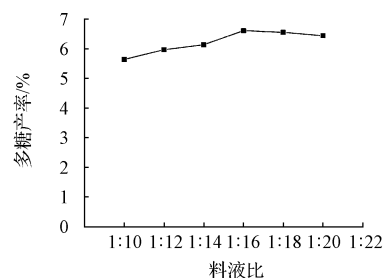


图4 料液比对血红铆钉菇子实体多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of different ratio of water to raw material on the extraction yield of polysaccharides from *G. rutilus*

铆钉菇子实体多糖的提取率开始缓慢的下降。故选择料液比为 1:16 作为血红铆钉菇子实体多糖最优的提取料液比。

单因素试验表明,提取时间在 2~3 h,提取温度在 80~100℃,提取次数在 2~4 次,料液比在 1:14~1:18 范围内时,血红铆钉菇子实体多糖的提取率可以达到较高值,具体条件的优化还要进一步结合正交实验。

### 2.5 正交实验结果

直观分析以及方差分析分别见表 2、3。其中, $K_n$ 表示以  $n$  水平试验的结果的均值。 $R$  表示因素极差,即  $K_1'$ 、 $K_2'$ 、 $K_3'$  中最大值与最小值之差。由表 2 可知,最佳提取条件应选取  $A_3B_3C_1D_2$ ,即提取次数为 3 次,提取温度为 100℃,提取时间为 2 h,料液比为 1:16。根据表

表 2 正交实验直观分析

Table 2 The intuitionistic analysis of orthogonal experiment

实验 编号	A 提取次数/次	B 提取温度/℃	C 提取时间/h	D 液料比	多糖产率/%
1	1	1	1	1	5.24±0.14
2	1	2	2	2	5.64±0.18
3	1	3	3	3	5.72±0.21
4	2	1	2	3	6.24±0.19
5	2	2	3	1	6.79±0.22
6	2	3	1	2	7.22±0.34
7	3	1	3	2	6.76±0.26
8	3	2	1	3	6.94±0.19
9	3	3	2	1	7.03±0.29
$K_1'$	5.533	6.080	6.467	6.353	
$K_2'$	6.750	6.457	6.303	6.540	
$K_3'$	6.910	6.657	6.423	6.300	
$R$	1.377	0.577	0.164	0.240	

表 3 正交实验方差分析

Table 3 The variance analysis of orthogonal experiment

因素	平方和(SS)	自由度(DF)	方差(F)	F 临界值
提取次数 A	3.401	2	3.357	
提取温度 B	0.514	2	0.507	4.460
提取时间 C	0.043	2	0.042	
料液比 D	0.095	2	0.094	
误差	4.05	8		

中极差值的大小,排列出影响试验因素的主次顺序: $A$ (提取次数) $>B$ (提取温度) $>D$ (料液比) $>C$ (提取时间)。通过表 3 的方差分析再次证明,提取次数对结果的影响最大,提取温度次之,其它影响因素与之相比影响较小。

### 3 结论

通过正交实验分析可知,水提醇沉法提取铆钉菇多糖的最佳提取应选取  $A_3B_3C_1D_2$ ,即提取次数为 3 次,提取温度为 100℃,提取时间为 2 h,料液比为 1:16。以此优化条件进行验证性试验,得到血红铆钉菇子实体多糖提取率可达(7.64±0.15)%。

### 参考文献

- [1] 梁庆书,赵瑞兴.辽宁省菌根性食用、药用菌资源[J].国土与自然资源研究,2003(3):86-88.
- [2] 江洁,兰黎雪,宋红梅.铆钉菇菌丝体液体培养条件及产胞外多糖的研究[J].安徽农业科学,2008,36(20):8543-8545.
- [3] 李天芝,李莉,周健树,等.紫外诱变对血红铆钉菇菌丝纤维素酶活性影响[J].中国食用菌,2009,28(3):50-52.
- [4] Van Hees P A W, Jones D L, Jentschke G, et al. Organic acid concentrations in soil solution: effects of young coniferous trees and ectomycorrhizal fungi[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37: 771-776.
- [5] 郝瑞芳,景浩.真菌多糖的研究进展[J].中国食物与营养,2008(4):19-22.
- [6] 秦俊哲,陈明,陈合,等.食药用真菌多糖的研究现状与展望[J].中国食用菌,2004,23(2):6-9.
- [7] 李小定,荣建华,吴谋成.真菌多糖生物活性研究进展[J].食用菌学报,2002,9(4):50-58.
- [8] 苏富琴,崔红霞,刘吉成.复合多糖降低环林酰胺诱导的小鼠骨髓微核率的研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2004,25(2):130-131.
- [9] Cheng J J, Lin C Y, Lur H S, et al. Properties and biological functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus, *Fomitopsis pinicola*[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(8): 829-834.
- [10] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,2003:11-12.
- [11] 傅博强,谢明勇,周鹏.茶叶多糖的提取纯化、组成及药理作用研究进展[J].南昌大学学报,2001,25(4):358-364.

## Study on Optimization Extraction of Polysaccharide from *Gomphidius rutilus*

WANG Chen-yu, ZHANG Xue-song, WANG Zhan-yong, ZHANG Jing

(College of Chemical Engineering and Environment, Liaoning Shihua University, Fushun, Liaoning 113001)

**Abstract:** The polysaccharides from *Gomphidius rutilus* was extracted with hot water extraction method. The effect of extraction times, extraction temperature, extraction time and ratio of water to raw material on optimization extraction of polysaccharide were studied by single factor experiment and orthogonal experiment. The results showed that the best extraction conditions were chosen as: times of extraction was 3, temperature of extraction 100℃, time of extraction 2 h and ratio of water to raw material 1:16. Under the optimize conditions, the eventually yield of polysaccharides from *Gomphidius rutilus* reached (7.64±0.15)%.

**Key words:** *Gomphidius rutilus*; polysaccharides; optimization; extraction