

# 细脚虫草多糖液体发酵及分离纯化工艺研究

## Separation and purification of polysaccharides from liquid fermentation product by *Cordyceps tenuipes*

王小爱<sup>1,2</sup> 梁建东<sup>1,2</sup> 高小娇<sup>1</sup>

WANG Xiao-ai<sup>1,2</sup> LIANG Jian-dong<sup>1,2</sup> GAO Xiao-jiao<sup>1</sup>

蔡远俊<sup>1</sup> 秦宇蒙<sup>1</sup> 田维毅<sup>1,2</sup>

CAI Yuan-jun<sup>1</sup> QIN Yu-meng<sup>1</sup> TIAN Wei-yi<sup>1,2</sup>

(1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学菌物药研究中心, 贵州 贵阳 550025)

(1. College of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou, Guiyang 550025, China; 2. Center for Mycomedicine Research, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou, Guiyang 550025, China)

**摘要:**用 Box-Behnken 中心组合试验设计和单因素试验对虫草多糖发酵工艺、水提醇沉工艺及脱蛋白工艺进行优化。结果表明:细脚虫草最佳发酵工艺条件为葡萄糖 33.3 g/L、蛋白胨 29.2 g/L、接种量 3.9%。胞外多糖最佳提取工艺条件为浓缩,加 3 倍乙醇,pH 为 6.0,沉淀 24 h;胞内多糖最佳提取工艺条件为浸提比( $m_{\text{菌丝}} : V_{\text{水}}$ ) 1 : 40 (g/mL),提取时间 90 min,浸提次数 2 次,浸提温度 80 °C。多糖纯化中 Sevage 法脱蛋白的最佳工艺为氯仿与正丁醇配比( $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{正丁醇}}$ ) 4 : 1,Sevage 试剂与发酵液配比( $V_{\text{Sevage试剂}} : V_{\text{发酵液}}$ ) 1 : 2,振荡时间 15 min、脱蛋白次数 3 次。优化后胞外多糖产量提高了 37.89%,胞内多糖产量提高了 24.59%,纯化后蛋白脱除率在 75% 以上。

**关键词:**虫草;多糖;液体发酵;水提醇沉;Sevage 法

**Abstract:** Using Box-Behnken central combination test design and single factor test were used to optimize the fermentation process of cordyceps polysaccharide, water extraction and alcohol precipitation process and deproteinization process. The results showed that the optimum fermentation conditions of *Cordyceps tenuipes*

were glucose 33.3 g/L, peptone 29.2 g/L, inoculation amount 3.9%. The optimum extraction conditions of Exopolysaccharides were concentration, 3 times ethanol, pH 6.0 and precipitation for 24 h. The optimum extraction conditions were 1 : 40 (g/mL), extraction time 90 min, extraction times 2 times, and extraction temperature 80 °C. In the purification of polysaccharides, the optimum deproteinization techniques of Sevage were as follows: the volume ratio of chloroform to n-butanol was 4 : 1, the volume ratio of Sevage reagent to fermentation broth was 1 : 2, the shaking time was 15 min, and the deproteinization times was 3 times. After optimization, the yield of extracellular polysaccharide increased by 37.89%, that of intracellular polysaccharide increased by 24.59%, and the protein removal rate was more than 75% after purification.

**Keywords:** *Cordyceps*; polysaccharides; liquid fermentation; supernatants of alcohol extracting-water precipitation; sevage method

**基金项目:**贵州省千层次人才项目(编号:2014);贵州中医药大学校级科研项目(编号:贵中医科学院内[2014]28号);贵州省科技基金项目(编号:黔科合基础[2018]1014);贵州省普通高等学校工程研究中心建设项目(编号:黔教合 KY 字[2015]337);贵州省科技创新人才团队项目(编号:黔科合平台人才[2020]5010);贵州省大学生创新创业训练计划项目(编号:贵中医大创合字[2015]34号)

**作者简介:**王小爱,女,贵州中医药大学在读硕士研究生。

**通信作者:**梁建东(1977—),男,贵州中医药大学副教授,博士。  
E-mail: cordyceps@yeah.net

**收稿日期:**2020-03-21

细脚虫草 [*Cordyceps tenuipes* (Peck) Kepler, B. Shrestha & Spatafora] 为虫草菌科虫草菌属,其同物异名包括高雄山虫草 (*Cordyceps takaomontana*)、细脚棒束孢 (*Isaria tenuipes*)、细脚拟青霉 (*Paecilomyces tenuipes*)<sup>[1]</sup>,在日本和韩国已被开发成保健食品<sup>[2]</sup>。多糖是细脚虫草的主要生物活性成分之一<sup>[3]</sup>,具有抗肿瘤、抗抑郁、抗氧化、调节免疫等生物活性<sup>[4]</sup>。根据其存在位置可分为胞内多糖(从菌丝体或子实体中获取)和胞外多糖(从发酵液中获取)<sup>[5]</sup>。目前,国内外对于细脚虫草多糖化学结构、抗肿瘤及免疫调节作用等已有相关报道<sup>[6-9]</sup>,但

对细脚虫草多糖提取工艺优化方面报道较少,有学者<sup>[10]</sup>利用神经网络—遗传算法优化细脚拟青霉胞内多糖超声提取工艺,但多糖提取效率较低,最高仅有 2.37%。而虫草多糖常用的提取方法有水提醇沉法、超声波辅助提取法和微波提取法等<sup>[11-12]</sup>,其中最常用的方法为水提醇沉法,具有操作简单、成本低、对多糖的破坏性较小等优点。

研究拟采用水提醇沉法提取细脚虫草多糖,对虫草多糖的发酵工艺、水提醇沉工艺及脱蛋白工艺进行优化,以期对细脚虫草有效成分的研究及开发提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌种

细脚虫草:课题组分离自野外采集的标本,经鉴定后保藏在贵州中医药大学菌物药研究中心,菌种号 A1721。

#### 1.1.2 试剂

葡萄糖:分析纯,国家标准物质网;

硫酸:分析纯,重庆川动化工集团有限公司;

苯酚:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

考马斯亮蓝:分析纯,北京索莱宝科技有限公司;

牛血清蛋白:分析纯,上海优宁维生物科技股份有限公司。

#### 1.1.3 培养基

菌种活化培养基:土豆 200 g,葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,琼脂 20 g,纯水 1 000 mL;

种子培养基:土豆 200 g,葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,纯水 1 000 mL;

发酵产多糖培养基:土豆 200 g,葡萄糖 33.3 g,蛋白胨 29.2 g,FeSO<sub>4</sub> 1.5 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g,纯水 1 000 mL,pH 6.0。

### 1.2 多糖培养及分离纯化

1.2.1 种子液培养 取 PDA 斜面保藏菌种,PDA 平板 25 °C 活化培养 4 d,以 1 mL 枪头打孔,取 5 个菌饼至 100 mL 种子培养基,25 °C、200 r/min 培养 4 d。

1.2.2 发酵产多糖培养 将种子液按 2% 接种量接入发酵产多糖培养基中,在 25 °C、200 r/min 恒温摇床中培养 7 d。

1.2.3 多糖分离 采用水提醇沉法<sup>[13-14]</sup>。发酵液在 4 000 r/min 下离心 15 min,离心后所得的菌丝体,干燥保存;上清液在 4 °C 保存。将上清液浓缩,加入 3 倍体积的无水乙醇,于 4 °C 醇沉 24 h,所得沉淀物为胞外粗多糖;干燥的菌丝以料液比( $m_{\text{菌丝}} : V_{\text{水}}$ )为 1 : 30 (g/mL),在 70 °C 下水浴 60 min,浸提 2 次。过滤,将滤液浓缩,加约 3 倍体积的无水乙醇,于 4 °C 醇沉 24 h,所得沉淀物即为胞内粗多糖。

1.2.4 脱蛋白 采用 Sevage 法<sup>[13-14]</sup>。分别量取发酵液

和菌丝体浸提液 30 mL 于 2 个 250 mL 锥形瓶中。氯仿—正丁醇(预先配制成  $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{正丁醇}} = 4 : 1$  的混合液)溶液 10 mL,置于锥形瓶中,振摇 15 min,4 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,取上清液。再加入其体积约 1/2 的氯仿—正丁醇溶液,重复上述步骤两次。

### 1.3 工艺优化

#### 1.3.1 发酵条件优化

(1) 无机盐离子:取 5 组种子培养基,分别加入 0.15% 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>、KCl、CaCl<sub>2</sub> 及 MgSO<sub>4</sub> 发酵培养,其他条件同 1.2.1,考察其对胞内外多糖含量的影响,确定液体发酵的最佳离子种类。

(2) 维生素:取 4 组种子培养基,分别添加 0.1 g/L 的维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、复合维生素 B、维生素 C 发酵培养,其他条件同 1.2.1,考察其对胞内外多糖含量的影响,确定液体发酵的最佳维生素种类。

(3) Plackett-Burman(PB) 试验设计:综合单因素试验考察的结果,对细脚虫草发酵的温度、转速、接种量、pH 等 8 个试验因素进行显著性分析,每个因素设计高、低两种水平(1, -1),选择虫草多糖含量(OD 值)为考察指标确定影响多糖产量的显著因素。

(4) 最陡爬坡试验:根据 PB 设计的结果,由各因素效应值的大小确定变化的步长。按一定的梯度增加或者减少各因素的水平值,检测发酵液中多糖含量 OD 值为响应值,含量最高组的水平值即为响应面分析的中心组。

(5) Box-Behnken 试验设计:以 PB 设计筛选出的 3 个显著因素作为试验因素,最陡爬坡试验筛选出的浓度作为中心点,进行三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计<sup>[15]</sup>。

#### 1.3.2 胞外多糖提取条件优化

(1) 浓缩倍数:将细脚虫草发酵液离心后,在上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇,pH 7.0,4 °C 沉淀 24 h,考察浓缩倍数(1,2,3,4,5)对胞外多糖提取率的影响。

(2) 沉淀乙醇倍数:将细脚虫草发酵液离心后,将上清液浓缩,pH 7.0,4 °C 沉淀 24 h,考察沉淀乙醇倍数(1,2,3,4,5)对胞外多糖提取率的影响。

(3) 沉淀时间:将细脚虫草发酵液离心后,将上清液浓缩,加入 3 倍无水乙醇,pH 7.0,4 °C 沉淀,考察沉淀时间(6,12,18,24,30 h)对胞外多糖提取率的影响。

(4) 沉淀 pH:将细脚虫草发酵液离心后,将上清液浓缩,加入 3 倍无水乙醇,4 °C 沉淀 24 h,考察沉淀 pH(4.0,5.0,6.0,7.0,8.0)对胞外多糖提取率的影响。

#### 1.3.3 胞内多糖提取条件优化

(1) 浸提比:70 °C 水浴 60 min,浸提 2 次,过滤,将滤液浓缩,加 3 倍无水乙醇,4 °C 醇沉 24 h,考察浸提比 [ $m_{\text{菌丝}} : V_{\text{水}}$  分别为 1 : 20,1 : 30,1 : 40,1 : 50,1 : 60 (g/mL)]对胞内多糖提取率的影响。

(2) 浸提时间:70 ℃ 水浴按浸提比( $m_{\text{菌丝}} : V_{\text{水}}$ )为 1 : 40 (g/mL)浸提 2 次,将滤液浓缩,加 3 倍无水乙醇,4 ℃ 醇沉 24 h,考察浸提时间(30,60,90,120,150 min)对胞内多糖提取率的影响。

(3) 浸提温度:浸提比( $m_{\text{菌丝}} : V_{\text{水}}$ )为 1 : 40 (g/mL)下水浴 90 min,浸提 2 次,将滤液浓缩,加 3 倍无水乙醇,4 ℃ 醇沉 24 h,考察浸提温度(60,70,80,90,100 ℃)对胞内多糖提取率的影响。

(4) 浸提次数:在 70 ℃ 下按浸提比( $m_{\text{菌丝}} : V_{\text{水}}$ )为 1 : 40 (g/mL)水浴 90 min,将滤液浓缩,加 3 倍无水乙醇,4 ℃ 醇沉 24 h,考察浸提次数(1,2,3,4,5)对胞内多糖提取率的影响。

### 1.3.4 脱蛋白条件优化

(1) Sevage 试剂与发酵液配比:取适量多糖溶液,加入 Sevage 试剂(氯仿与正丁醇的混合液, $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{正丁醇}} = 4 : 1$ ),振摇 15 min,4 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,取上清液,重复操作 3 次,考察 Sevage 试剂与发酵液配比( $V_{\text{Sevage试剂}} : V_{\text{发酵液}}$  分别为 1 : 4,1 : 3,1 : 2,1 : 1,2 : 1)对多糖蛋白脱除率的影响。

(2) 氯仿与正丁醇配比:在 Sevage 试剂与发酵液( $V_{\text{Sevage试剂}} : V_{\text{发酵液}}$ )为 1 : 2,振摇 15 min,4 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,取上清液,重复操作 3 次,考察氯仿与正丁醇配比( $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{正丁醇}}$  分别为 2 : 1,3 : 1,4 : 1,5 : 1,6 : 1)对多糖蛋白脱除率的影响。

(3) 振摇时间:在 Sevage 试剂与发酵液( $V_{\text{Sevage试剂}} : V_{\text{发酵液}}$ )为 1 : 2,氯仿与正丁醇配比( $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{正丁醇}}$ )为 4 : 1,4 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,取上清液,重复操作 3 次,考察振摇时间(5,10,15,20,25 min)对多糖蛋白脱除率的影响。

(4) 脱蛋白次数:在 Sevage 试剂与发酵液( $V_{\text{Sevage试剂}} : V_{\text{发酵液}}$ )为 1 : 2,氯仿与正丁醇配比( $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{正丁醇}}$ )为 4 : 1,振摇 15 min,4 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,取上清液,考察脱蛋白次数(1,2,3,4,5)对多糖蛋白脱除率的影响。

### 1.4 测定方法

1.4.1 多糖含量测定 采用苯酚硫酸法<sup>[16]</sup>。葡萄糖标准品绘制标准曲线,求得回归方程为  $Y = 7.74X + 0.0146$ ,  $R^2 = 0.9992$ 。结果表明,葡萄糖标准品浓度在 0.02 ~ 0.10 mg/mL 范围内线性关系良好。

1.4.2 蛋白含量测定 采用考马斯亮蓝比色法<sup>[17]</sup>。牛血清蛋白标准品绘制标准曲线,求得回归方程为  $Y =$

$4.86X + 0.0742$ ,  $R^2 = 0.9983$ 。结果表明,牛血清蛋白标准品浓度在 0.02 ~ 0.10 mg/mL 范围内线性关系良好。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵条件优化

2.1.1 无机盐离子筛选 由图 1 可知,添加无机盐试验组的多糖含量均有不同程度的增加,其中添加  $\text{FeSO}_4$  的胞内外多糖含量相对较高。因此,发酵多糖时培养基组分加入  $\text{FeSO}_4$ 。

2.1.2 维生素种类筛选 由图 2 可知,选取不同的维生素为生长因子发酵多糖,多糖含量无明显变化。因此,后续试验不添加维生素。

2.1.3 PB 试验 对细脚虫草发酵的温度、转速、接种量、pH 等 8 个试验因素的水平取值见表 1,试验结果见表 2,显著性分析见表 3。

由表 3 可知,接种量、葡萄糖、蛋白胨的效应显著。因此,确定接种量、葡萄糖、蛋白胨是影响多糖产量的显著因素。

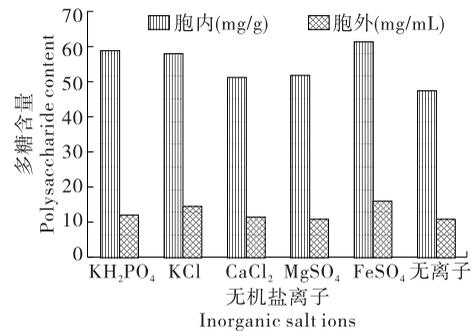


图 1 无机盐离子对细脚虫草产多糖的影响  
Figure 1 Effects of inorganic salt ions on polysaccharide production of *Cordyceps tenuipes*

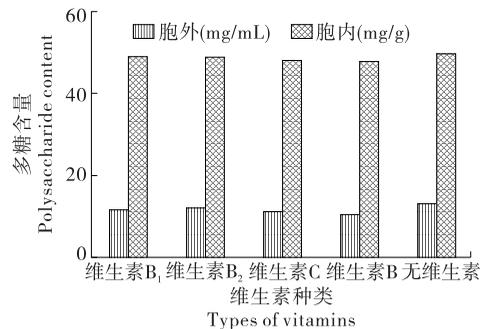


图 2 维生素对细脚虫草产多糖的影响  
Figure 2 Effects of vitamin on polysaccharide production of *Cordyceps tenuipes*

表 1 PB 试验设计

Table 1 Plackett-Burman test design

水平	温度/℃	转速/(r · min <sup>-1</sup> )	接种量/%	pH	装液量/mL	$\text{FeSO}_4$ /%	葡萄糖/g	蛋白胨/g	空白
1	30	250	3	8	70	0.25	30	20	1
-1	25	200	2	6	60	0.15	20	10	-1

表 2 PB 试验结果

Table 2 Plackett-Burman test results

水平	温度/℃	转速/(r·min <sup>-1</sup> )	接种量/%	pH	装液量/mL	FeSO <sub>4</sub> /%	葡萄糖/g	蛋白胨/g	空白	OD 值
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.561
2	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.624
3	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	-1	0.657
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	0.565
5	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	0.658
6	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.646
7	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	0.534
8	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	0.629
9	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0.528
10	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	0.587
11	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	0.545
12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	0.579

2.1.4 最陡爬坡试验 根据 PB 试验结果,设计显著因素的步长,试验设计及结果见表 4。由表 4 可知,2 号试验所对应的多糖产量最大,因此以 2 号试验的条件为响应面试验因素水平的中心点,设计 Box-Behnken 试验。

2.1.5 Box-Behnken 试验 Box-Behnken 试验设计见表 5,

表 3 PB 试验显著性分析<sup>†</sup>

Table 3 Significance analysis of Plackett-Burman test

因素	F 值	Pr>F	显著性
温度	30.15	0.791 2	
转速	27.18	0.523 6	
接种量	307.75	0.020 8	*
pH	3.11	0.078 4	
装液量	243.37	0.074 5	
FeSO <sub>4</sub>	1.87	0.050 7	
葡萄糖	8.26	0.032 5	*
蛋白胨	92.43	0.018 6	*

† \* 为显著(P<0.05)。

表 4 最陡爬坡试验设计与结果<sup>†</sup>

Table 4 Experimental design and results of steepest climb (n=3)

试验编号	接种量/%	葡萄糖添加量/(g·L <sup>-1</sup> )	蛋白胨添加量/(g·L <sup>-1</sup> )	OD 值
1	3.0	30	20	0.547±0.070
2	3.6	35	27	0.665±0.002**
3	4.2	40	34	0.660±0.001**
4	4.8	45	41	0.643±0.005**
5	5.4	50	48	0.592±0.004**

† 与 1 号试验组相比, \*\* 为极显著(P<0.01)。

试验结果见表 6。运用 Design-Expert 8.0.5 软件对表 6 的试验结果进行回归分析,得到多元回归拟合方程:

$$Y=0.663+0.011X_1+1.500E-003X_2-4.125E-$$

表 5 Box-Behnken 试验设计

Table 5 Box-Behnken experimental design

水平	X <sub>1</sub> 接种量/%	X <sub>2</sub> 葡萄糖/(g·L <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> 蛋白胨/(g·L <sup>-1</sup> )
-1	3.0	30	20
0	3.6	35	27
1	4.2	40	34

表 6 Box-Behnken 试验结果

Table 6 Box-Behnken test results

试验编号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	OD 值
1	1	0	-1	0.626
2	0	0	0	0.664
3	-1	0	1	0.597
4	0	1	1	0.621
5	0	0	0	0.661
6	1	1	0	0.633
7	0	-1	1	0.607
8	0	1	-1	0.630
9	1	1	1	0.632
10	-1	0	0	0.618
11	0	-1	-1	0.626
12	-1	-1	-1	0.608
13	0	0	0	0.665
14	-1	0	0	0.630
15	1	0	0	0.651

$$003X_3 - 7.500E - 003X_1 X_2 + 4.250E - 003X_1 X_3 + 2.500E - 003X_2 X_3 - 0.0178X_1^2 - 0.013X_2^2 - 0.030X_3^2 \quad (1)$$

对其进行方差分析,结果见表 7。

通常,回归数学模型的决定系数大于 0.9 则认为该模型的预测值和实际值高度相关。细脚虫草液体发酵产多糖中心组合试验得到的二次多元回归方程的决定系数  $R^2=0.9702$ ,即表明 97.02%的产多糖变化可用该二次多元方程解释,拟合性非常好,校正决定系数  $R_{adj}^2=0.9165$  也提示该模型相关性非常高,拟合性好。通常,模型的精密密度 >4 证明该模型较好,试验模型的精密密度为 13.584,因此该模型合理可靠。变异系数(CV)是描述试验的可信度及精确度,CV 值越低试验的可靠性越高,试验的变异系数为 0.96%,说明试验结果可信。

通过数据分析得出,细脚虫草的最佳产多糖条件为培养温度 25℃,黑暗,摇床转速 200 r/min,葡萄糖添加量 33.3 g/L,蛋白胨添加量 29.2 g/L,接种量 3.9%, $FeSO_4$  添加量 1.5 g, $KH_2PO_4$  添加量 1.5 g,pH 6.0,培养时间 7 d。此条件下胞外多糖产量为 13.74 mg/mL,较优化前的胞外多糖产量(9.87 mg/mL)提高了 28.16%;胞内多糖产量为 63.48 mg/g,较优化前的胞内多糖产量(56.29 mg/g)提高了 11.33%。

## 2.2 提取工艺优化

2.2.1 胞外多糖提取工艺优化 由图 3 可知,多糖沉淀随醇浓度升高而增多,醇沉时间越长多糖得率越高。确定胞外多糖提取工艺条件为:浓缩、加 3 倍乙醇,沉淀 24 h,pH 6.0。在此条件下,胞外多糖产量为 15.89 mg/mL,较优

化前的胞外多糖产量(13.74 mg/mL)提高了 13.53%。

2.2.2 胞内多糖提取工艺优化 由图 4 可知,浸提比( $m_{菌丝} : V_{水}$ )为 1 : 40 (g/mL)时多糖提取率最大,在一定范围内增加浸提液的体积可以增大与浸提物的接触面积,提高水溶性多糖的溶出量;浸提 90 min 时多糖提取率最大,提取初期,多糖能够随时间增长不断浸出,但时间过长多糖浸出量很难增加,甚至使多糖降解;浸提温度为 80℃时多糖提取率最大,多糖的溶解度在一定范围内随温度的升高而增大,由于多糖的热不稳定性当温度继续升高可能会分解多糖得率反而下降;浸提初期浸出量比较高,在反复浸提时菌丝内多糖的含量较少。确定胞内提取多糖条件为浸提比( $m_{菌丝} : V_{水}$ )1 : 40 (g/mL),提取时间 90 min,浸提温度 80℃,浸提次数 2 次。在此条件下,胞内多糖产量为 74.65 mg/g,较优化前的胞内多糖产量(63.48 mg/g)提高了 14.96%。

## 2.3 Sevage 法纯化多糖工艺优化

### 2.3.1 Sevage 试剂与发酵液配比对脱蛋白效果的影响

由图 5 可知,蛋白脱除率和多糖损失率随着 Sevage 试剂加入量的增加均呈不同程度的递增趋势,在 Sevage 试剂与发酵液配比( $V_{Sevage试剂} : V_{发酵液}$ )在 1 : 2 后蛋白质脱除率及多糖损失率趋于平衡。因此,确定 Sevage 试剂与发酵液配比( $V_{Sevage试剂} : V_{发酵液}$ )为 1 : 2。

2.3.2 氯仿与正丁醇配比对脱蛋白效果的影响 由图 6 可知,蛋白脱除率随氯仿用量上升而增大,氯仿与正丁醇配比( $V_{氯仿} : V_{正丁醇}$ )在 4 : 1 后蛋白质脱除率及多糖损失率趋于平衡。氯仿是引起蛋白变性的主要原因,蛋白脱除率随氯仿加入量增高而升高;正丁醇会使多糖溶解,加

表 7 回归方程方差分析<sup>†</sup>

Table 7 Regression equation variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
模型	5.948E-003	9	6.609E-004	18.07	0.002 7	* *
X <sub>1</sub>	9.901E-004	1	9.901E-004	27.06	0.003 5	* *
X <sub>2</sub>	1.800E-005	1	1.800E-005	0.49	0.514 3	
X <sub>3</sub>	1.361E-004	1	1.361E-004	3.72	0.111 6	
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	2.250E-004	1	2.250E-004	6.15	0.055 8	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	7.225E-005	1	7.225E-005	1.97	0.218 9	
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2.500E-005	1	2.500E-005	0.68	0.446 1	
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1.169E-003	1	1.169E-003	31.95	0.002 4	* *
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	5.808E-004	1	5.808E-004	15.88	0.010 5	*
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	3.277E-003	1	3.277E-003	89.58	0.000 2	* *
残差项	1.829E-004	5	3.658E-005			
失拟项	1.743E-004	3	5.808E-005	13.40	0.070 2	
误差	8.667E-006	2	4.333E-006			
校正的总计	6.131E-003	14				

<sup>†</sup>  $R^2=0.9702, R_{adj}^2=0.9165$ ; \* 为显著( $P<0.05$ ), \* \* 为极显著( $P<0.01$ )。

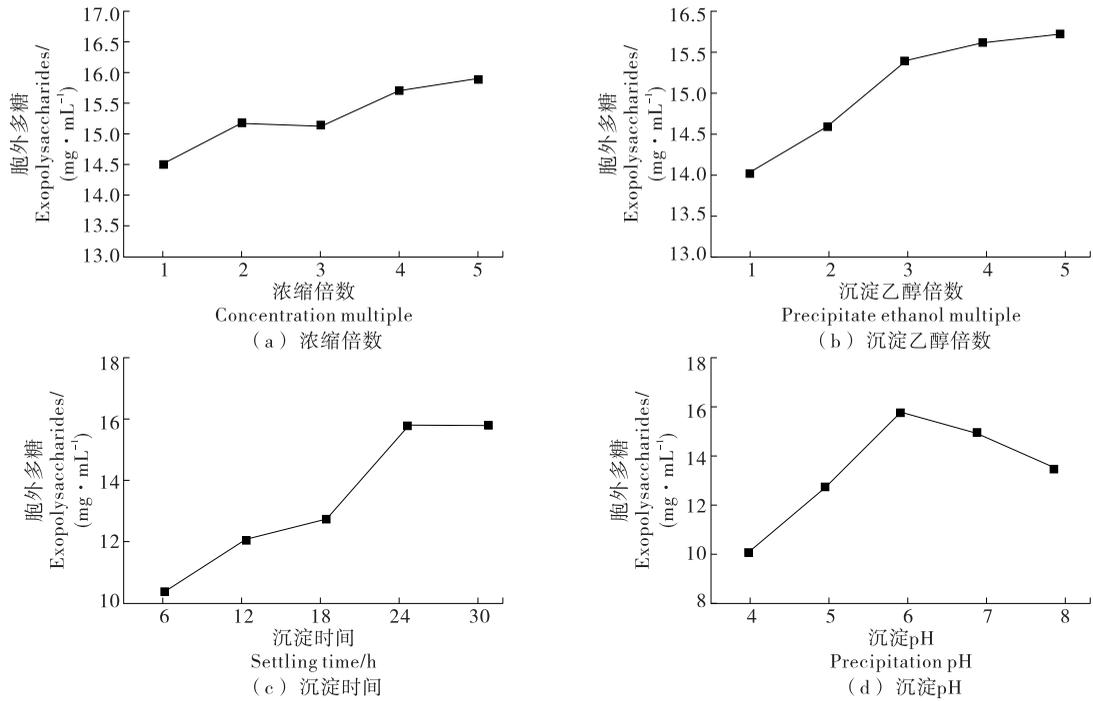


图3 不同因素对胞外多糖提取率的影响  
Figure 3 Effects of different factors on extracellular polysaccharide extraction rate

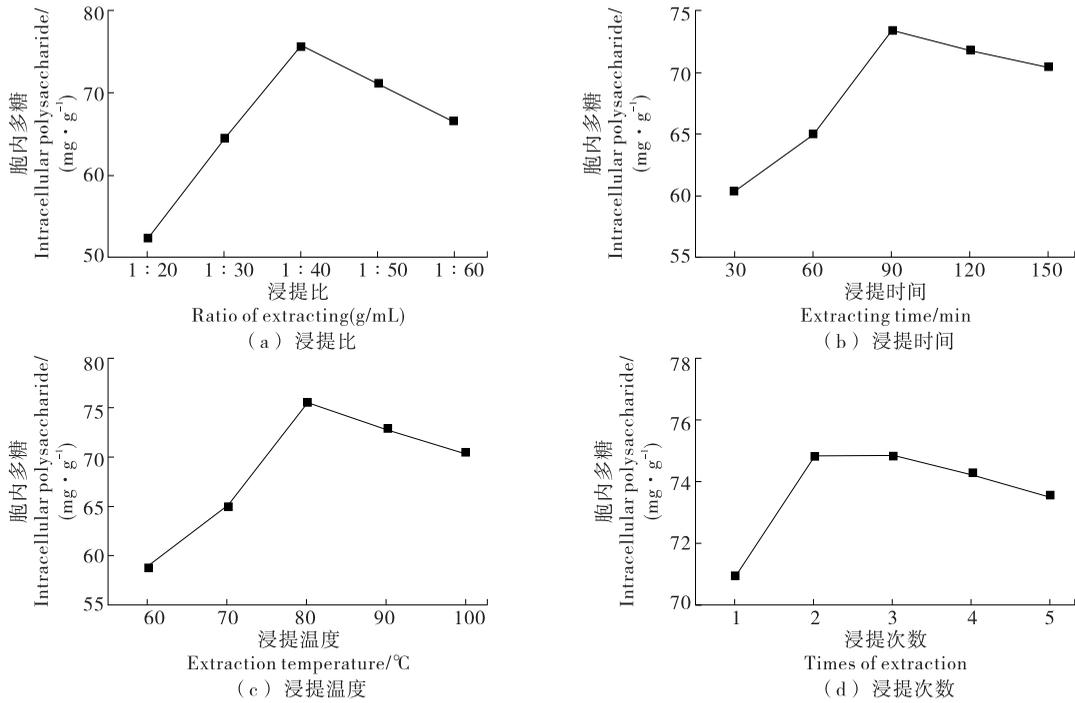


图4 不同因素对胞内多糖提取率的影响  
Figure 4 Effects of different factors on extraction rate of intracellular polysaccharide

入量越少,糖损失率越低。因此,确定氯仿与正丁醇配比 ( $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{正丁醇}}$ ) 为 4 : 1。

2.3.3 振摇时间对脱蛋白效果的影响 由图 7 可知,随着振摇时间的增加,脱蛋白率呈上升趋势,振摇时间越长,多糖溶液与 *Sevage* 试剂充分接触,使蛋白脱除率升

高,在 15 min 时达到最大值,之后基本不变。因此,确定振摇时间为 15 min。

2.3.4 脱蛋白次数对脱蛋白效果的影响 由图 8 可知,随着脱蛋白次数增加,脱蛋白率呈上升趋势,多糖溶液在脱蛋白初期蛋白脱除率比较高,在反复脱除时多糖内蛋

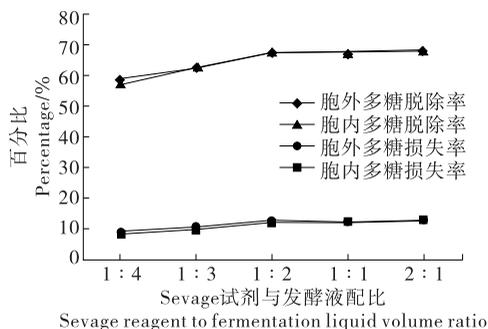


图 5 Sewage 试剂与发酵液配比对脱蛋白效果的影响

Figure 5 Effect of Sewage reagent and fermentation liquid volume ratio dosage on deproteinization

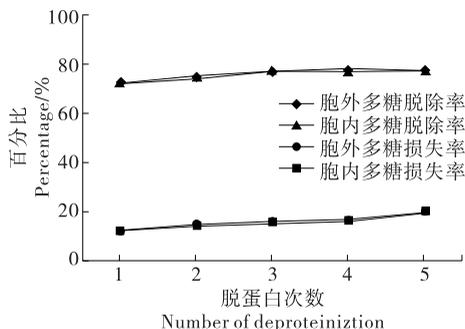


图 8 脱蛋白次数对脱蛋白效果的影响

Figure 8 Effects of deproteinization times on deproteinization

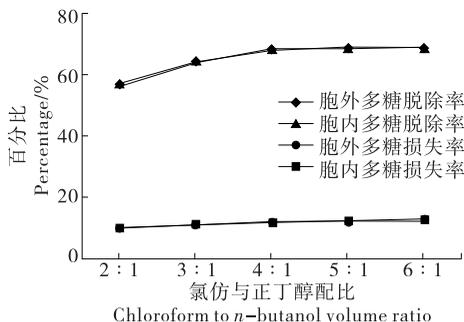


图 6 氯仿与正丁醇比对脱蛋白效果的影响

Figure 6 Effects of chloroform and n-butanol volume ratio on deproteinization

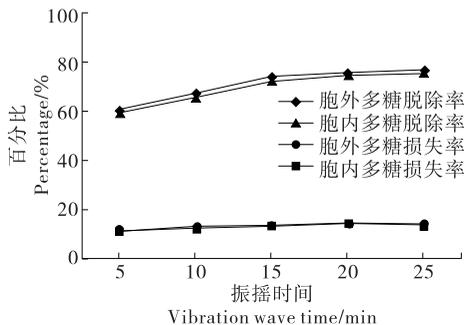


图 7 振摇时间对脱蛋白效果的影响

Figure 7 Effects of shaking time on deproteinization

白含量减少,在第 3 次后基本趋于平衡。因此,确定脱蛋白次数为 3 次。

### 3 结论

采用单因素及响应面试验对细脚虫草多糖发酵提取及用 Sewage 法纯化多糖条件进行优化。通过优化发酵条件及提取条件后,胞外多糖得率提高了 37.89%,胞内多糖得率提高了 24.59%。Sewage 法胞内外多糖蛋白的脱除率均高于 75%,具有良好的去杂纯化效果且多糖损失较小。后期可采用超声辅助提取、微波提取等方法进一步减少提取时间,提高提取效率;可以考虑用玉米粉、黄

豆粉代替蛋白胨,以降低原料成本。此外,Sewage 法脱蛋白虽具有较好的效果,但存在安全隐患,后续可以寻求酶法、吸附法等脱蛋白工艺。

### 参考文献

[1] KEPLER R M, LUANGSA-ARD J J, HYWEL-JONES N L. A phylogenetic-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*)[J]. IMA Fungus, 2017, 8(2): 335-353.

[2] TAKANO F, YAHAGI R, TAKADA S. The liquid culture filtrates of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (= *Isaria japonica* Yasuda) and *Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson (= *Isaria sinclairii* (Berk.) Llund) regulate Th1 and Th2 cytokine response in murine Peyer's patch cells in vitro and ex vivo[J]. International Immunopharmacology, 2005, 5: 903-916.

[3] 韩燕峰, 梁建东, 邹晓, 等. 高雄山虫草无性型研究进展[J]. 食用菌学报, 2011, 18(4): 89-94.

[4] 梁建东, 韩燕峰, 田维毅, 等. 高雄山虫草的生物活性成分及药理作用研究进展[J]. 食用菌学报, 2018, 25(1): 113-119.

[5] 杨建鑫, 李向阳. 冬虫夏草活性成分虫草多糖的研究进展[J]. 中药材, 2019(4): 935-940.

[6] 刘春刚. 细脚拟青霉菌丝体水提物对氧化应激诱发疾病的药效学研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017: 1-124.

[7] LEE S H, HWANG H S, YUN J W. Production of polysaccharides by submerged mycelial culture of entomopathogenic fungus *Cordyceps takaomontana* and their apoptotic effects on human neuroblastoma cells [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2009, 26(4): 1 075-1 083.

[8] SHIN K H, LIM S S, LEE S, et al. Anti-tumour and immuno-stimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps spp* [J]. Phytotherapy Research, 2010, 17(7): 830-833.

[9] 陆榕, 孙立崧, 王仲孚, 等. 细脚拟青霉多糖 I 的化学结构[J]. 中草药, 2001(10): 4-6.

(下转第 216 页)

- [53] 肖玉娟, 傅奇, 何少贵, 等. 蓝圆鲈多肽亚铁螯合物制备及其抗氧化性[J]. 食品工业, 2020, 41(2): 126-129.
- [54] CANABADY-ROCHELLE L L, SELMECZI K, COLLIN S, et al. SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties[J]. Food Chemistry, 2018, 239: 478-485.
- [55] 孔维宝, 杨树玲, 霍焕燃, 等. 油橄榄叶提取物的抑菌活性研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(2): 95-100.
- [56] 孙秀秀. 大豆碱性多肽对大肠杆菌的抑菌机制及应用研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2016: 42-43.
- [57] 李敏晶, 孙蔷薇, 王旭燃, 等. 多棘海盘车多肽的抑菌活性研究[J]. 应用化工, 2017, 46(10): 2 073-2 076.
- [58] 张囡. 香菇柄多肽的制备、分离及其生物活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2019: 3-5.
- [59] 吕诗文, 叶芳, 吴国辉, 等. 苦瓜抑菌作用的研究进展[J]. 农产品加工, 2020(1): 84-86.
- [60] 徐海花, 牛钟相, 秦爱建, 等. 细菌耐药性研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2010, 41(1): 156-160.
- [61] 郑晨, 何晓静, 菅凌燕. 细菌耐药性及特殊使用级抗菌药物使用情况分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(14): 1 700-1 702.
- [62] LIN Hui-min, DENG Shang-gui, HUANG Sai-bo. Antioxidant activities of ferrous-chelating peptides isolated from five types of low-value fish protein hydrolysates[J]. Journal of Food Biochemistry, 2015, 38(6): 627-633.
- [63] FANG Zheng, XU Liang-zong, LIN Yan-lan, et al. The preservative potential of Octopus scraps peptides-Zinc chelate against *Staphylococcus aureus*: Its fabrication, antibacterial activity and action mode[J]. Food Control, 2018, 98: 24-33.
- [64] 杨玉蓉, 李安平, 钟政昌, 等. 桃仁多肽螯合亚铁的抑菌活性及结构表征[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 57-62.
- [65] 潘天齐, 何荣海, 徐军, 等. 菜籽多肽增强免疫力作用的研究[J]. 现代医学, 2016, 44(11): 1 605-1 608.
- [66] YUAN Biao, ZHAO Cong, CHENG Chen, et al. A peptide-Fe(II) complex from *Griifola frondosa* protein hydrolysates and its immunomodulatory activity[J]. Food Bioscience, 2019, 32: 100549.
- [67] 谈森焱. 小球藻酶解多肽的制备及其增强免疫力的功能研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2018: 7-9.
- [68] HUANG Sai-bo, LIN Hui-min, DENG Shang-gui. Study of anti-fatigue effect in rats of ferrous chelates including hairtail protein hydrolysates[J]. Nutrients, 2015, 7(12): 9 860-9 871.

(上接第 157 页)

- [18] 朱秀清, 王子玥, 李美莹, 等. 热处理对汉麻乳稳定性的影响及蛋白结构表征[J/OL]. 食品科学. (2020-04-28) [2020-07-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200428.0858.005.html>.
- [19] 寇明钰. 花椒籽蛋白质分离提取及功能性质的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006: 4-9.
- [20] 王震, 乔天磊, 霍乃蕊, 等. 植物叶蛋白提取方法及研究进展[J]. 山西农业科学, 2016, 44(1): 126-130.
- [21] 贾峰, 刘效谦, 王震磊, 等. 小麦粉蛋白质溶解性差异的韦恩分类研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2017, 38(1): 1-4, 11.
- [22] 宋鹏. 大豆蛋白质组成对其提取率的影响[D]. 郑州: 河南工业大学, 2011: 5-7.
- [23] 肖连冬, 程爽, 李杰. 大豆分离蛋白起泡性和乳化性影响因素的研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(4): 83-86.
- [24] 上官新晨, 陈锦屏, 蒋艳, 等. 籽粒苋蛋白质功能特性的理论研究 II: 籽粒苋蛋白质发泡性的理论研究[J]. 中国粮油学报, 2003(2): 40-42.
- [25] 迟玉杰, 赵英, 毋引子. 鸡蛋蛋清液起泡性的研究[J]. 中国家禽, 2017, 39(3): 1-5.
- [26] 赵维高, 刘文营, 黄丽燕, 等. 食品加工中蛋白质起泡性的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2012(11): 69-72.
- [27] 王雪, 郭兴凤. 蛋白质乳化性研究进展[J]. 粮食加工, 2017, 42(1): 39-43.
- [28] 邓塔, 李军生, 阎柳媚, 等. 大豆蛋白乳化性的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 90-93.
- [29] 徐丽兰, 赵燕, 徐明生, 等. 食盐诱导的蛋黄凝聚行为研究进展[J]. 中国食品学报, 2019, 19(3): 317-325.

(上接第 164 页)

- [10] 李钰, 李雅雅, 王鑫玥, 等. 神经网络一遗传算法优化细菌拟青霉多糖超声提取工艺[J]. 吉林医药学院学报, 2019, 40(1): 15-17.
- [11] 郭新铭, 赖志荣. 天然冬虫夏草多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(15): 32-34.
- [12] 查昱, 张宗豪, 李秀璋, 等. PB 试验结合 BBD 响应面法优化冬虫夏草菌菌丝体多糖的提取工艺[J]. 中国食用菌, 2020, 39(6): 25-31.
- [13] 王斌, 连宾. 食药真菌多糖的研究与应用[J]. 食品与机械, 2005(6): 96-100.
- [14] 杜景东, 田凤娟, 陈培雄, 等. 云雾绿茶多糖提取方法的优化及 Seville 法除蛋白的工艺研究[J]. 中南药学, 2015, 13(12): 1 281-1 283.
- [15] LEE H G, JO Y, AMEER K. Optimization of green extraction methods for cinnamic acid and cinnamaldehyde from Cinnamon (*Cinnamomum cassia*) by response surface methodology[J]. Pubmed, 2018, 27(6): 1 607-1 617.
- [16] 池源, 王丽波. 苯酚-硫酸法测定南瓜籽多糖含量的条件优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 89-92.
- [17] 柳荫, 吴凤智, 陈龙, 等. 考马斯亮蓝法测定核桃水溶性蛋白含量的研究[J]. 中国酿造, 2013, 32(12): 131-133.