

摘要

本论文旨在通过小白鼠试验给出红曲多糖的毒理特征和对提高机体免疫力的作用。并通过 UV 诱变红曲霉筛选红曲多糖的高产菌株,优化其液体发酵条件。研究了影响红曲多糖提取率和纯化程度的主要因素。通过一系列试验,初步给出了红曲多糖的理化性质、分子量、结构、以及组成成分等。

首先对红曲霉斜面培养基进行了研究,通过试验确定了麦芽汁糖化工艺,确定了斜面培养基:麦芽汁糖度 6-8.5 波美度, pH6-7, 2% 琼脂。

正常灌胃红曲多糖 21 天后,称量小鼠体重,并将肝、脾、肾、心、肺分别称重,计算脏器指数。结果可以看出,红曲多糖能增加肝脏质量,增加脾脏质量,而高浓度又降低脾质量,对其他各个器官无明显的不良影响。而且从 SGPT 含量来看,红曲多糖能显著降低其含量,而对血糖含量和 SGOT 含量影响不明显。结论是红曲多糖对小鼠无明显的毒害作用。

通过 DTH 试验,小鼠经灌胃红曲多糖后,其足跖肿胀度与对照组差异明显,说明红曲多糖能提高小鼠细胞免疫功能。在三氯甲烷致中毒试验中,和对照组相比,试验组 SGPT 含量有所降低说明红曲多糖有保肝护肝作用。碳粒廓清试验,给小鼠灌胃红曲多糖,能使廓清速率大幅增加表明红曲多糖可提高腹腔巨噬细胞吞噬能力,促使小鼠外周血 E-玫瑰环形成,增加体内淋巴细胞转化率,使非特异性免疫加强。游泳试验和耐缺氧能力试验似乎说明红曲多糖在提高机体耐疲劳能力和缺氧条件下生活能力方面作用不大,有待进一步研究。

利用紫外线对出发菌株红曲霉 AS 3.4701 进行诱变处理,经过初筛确定了最佳诱变剂量: 254 nm, 2.0 min。再经过复筛获得了一株最佳突变株 ZH-100,该突变株经连续三次传代,结果红曲粗多糖的产量分别是 4.26g/L, 4.69g/L, 4.10g/L, 平均 4.35g/L。证明该菌株具有稳定的遗传性,比出发菌株提高产量 286%。

通过三组试验,包括:(1)发酵条件优化的正交试验;(2)无机元素的含量确定的平行试验;(3)优化的发酵条件验证试验。得出结论:红曲霉在经过斜面培养后,以大米浆为基础培养物(固形物 10%),加入 NaNO_3 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, KH_2PO_4 0.25%, 温度 35℃, 220r/min 摇床培养 96 小时,再经 4000r/min 离心 5min, 24 小时醇沉,电热鼓风干燥等操作,产多糖量 5.53g/L,高出初始条件 27%。

通过正交试验优化得最佳提取条件为:浸提温度 90℃;浸提料液比 1:3;浸提时间 30min。红曲多糖的产量为 6.66 g/L,高出初始条件 20%。

利用苯酚-硫酸法测得红曲粗多糖中总糖含量为 78%;利用 3,5-二硝基水杨酸法测定还

原糖含量为 12.5%；则多糖含量 65.5%。利用考马斯亮蓝法测定可溶蛋白含量为 5.2%。

通过试验确定了红曲粗多糖的纯化工艺，Sevag 法除杂蛋白，透析带除盐及小分子物质，Sephadex G-200 柱层析，收集峰值的糖，冷冻干燥得红曲多糖纯品。

纸层析上只有一个海蓝色斑点，表明红曲多糖是单一纯物质。确定了展开剂为正丁醇-乙醇-水 (12: 3: 5)。Sephadex G-200 柱层析呈单洗脱峰表明多糖组分均一。

通过一系列生化试验，红曲多糖粗品为浅红色粉末，纯品为白色粉末，较易溶于水，水溶液粘稠，pH6 左右，无色无味，1% 的红曲多糖水溶液粘度 460mPa.s，与碘试剂不呈蓝色。苯酚-硫酸反应呈桔红色，蒽酮试剂反应呈蓝绿色，比旋光度 $[\alpha]^{20}_D = 1.66$ 。不溶于高浓度乙醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂。

本试验采用双向薄层层析方法，红曲多糖经 2mol/L 硫酸水解，展开剂氯仿：甲醇：水 = 16: 9: 2，对红曲多糖的组分进行了测定，基本确定了红曲多糖中含有甘露糖、葡萄糖、半乳糖。

采用 Sephadex G-200 进行凝胶过滤层析，上样量 5mg/1ml, 0.1mol/L NaCl 溶液洗脱，利用已知分子量的葡聚糖做标准曲线，测定红曲多糖分子量为 31.6 万。

红外光谱 IR 分析：将 2mg 红曲多糖纯品与 200mg 纯 KBr 研细混合均匀在油压机上压成透明薄片，在 TJ270-30 红外分光光度计上 IR 分析，扫描范围 4000-400cm⁻¹，得出红曲多糖是 β -吡喃型多糖。

通过该研究，证明了红曲多糖对生物有机体没有毒害作用，对提高机体免疫力有明显效果。通过结构和组成研究，证明了红曲多糖是由甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成的杂多糖，具有 β -吡喃构型，进一步佐证了红曲多糖具有提高机体免疫力的作用。因而通过大量的诱变筛选得一株高产多糖的优势菌株，并优化了液体发酵条件，优化了提取条件，纯化条件。可以指导生产，并可以后续开发几种保健食品和饮料，以提高亚健康人群的免疫水平。

关键词：红曲多糖 紫外诱变 免疫作用 G-200 层析 双向层析 红外光谱

Abstract

This paper is aim to give out the toxicological characteristics and the effect on improving immunity by mice experiment. Screening the high yield strain of polysaccharides by UV mutation method, at the same time ,we optimized the liquid ferment condition, studied the main factors of extraction rate and the degree of purification of polysaccharides. Under series of experiments, the physicochemical characteristics, molecular weight, molecular structure and composition of polysaccharides have been given.

Above all we studied the bevel culture medium , found the wort saccharifying technology , and the bevel culture medium is: the sugar degree of wort is 6-8.5 Baume, pH 6-7, agar 2%.

After 21 days we weighed the avoirdupois of mice normally poured stomach by polysaccharides, and weighed the liver, spleen , kidney, heart, lung and recorded the index of the organs respectively. The result shows that the experiment the lower concentration polysaccharides can increase the liver quality, spleen quality, but high concentration polysaccharides could reduce the spleen quality and there is no bad effect on the other organs. Seen from the content of SGPT, polysaccharides could lower the content of SGPT obviously, but no apparent effect on the content of blood-sugar and SGOT. The conclusion is that polysaccharides has no apparent toxic effect on the mice.

Through the DTH experiment, after pouring the polysaccharides into stomach the mice's feet swollen degree has obvious changes compared with the reference team. The experiment illuminated that polysaccharides could improve the mice cellular immunity. In the experiment of chloroform fine poisoning ,Compared with reference team the SGPT content of the experimented team has been lowered which illustrated polysaccharides can protect liver. In the experiment of carbon granule clearance rate , polysaccharides can improve abdominal cavity macrophage phagocytize ability, prompt the formation of periphery blood E- rose loop, increase the transformation rate of vivo lymphocyte and strengthen nonspecific immunity by pouring polysaccharides. By the swimming experiment and resistance to hypoxia experiment, we knew that the effect of polysaccharides is not apparent on improving resistance to hypoxia capability and viability at anoxic condition , which needs us study in furtherstep.

ZH-100 is the variant strain of *Monascus* AS 3.4701 through Ultra-violet mutations radiation treatments, the optimal mutation dose is 254nm, 2.0min. After ZH-100 has been cultured 3 generations, the yield of polysaccharides is 4.26g/L, 4.69g/L, 4.10g/L, and the average is 4.35g/L. This result proved that ZH-100 have steady transmissibility and it is higher 286% than *Monascus* sp.3.4071.

Still another three experiments. 1. The orthogonal experiment on fermentation condition. 2. parallel experiment on the inorganic element. 3. Test of the optimal experiment condition. Conclusion can be drawn that: rice plasm as the culture medium (solid 10%), NaNO_3 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, K_2HPO_4 0.25%, temperature 35℃, 4000r/min, time 96h. The yield of polysaccharides is 5.53 g/L higher 27% than the initial.

By the orthogonal experiment the optimal extraction condition is : temperature is 90℃; the rate of material to liquor is 1:3; time is 30 min. The yield of polysaccharides is 6.66 g/L higher 20% than the initial.

The total sugar content is 78%, measured through carbolic acid- sulfuric acid method. Reducing sugar content is 12.5%, measured by 3,5 dinitrosalicylic acid , polysaccharides content is 65.5%. the specimen soluble protein content is 5.2%, measured by Coomassie brilliant blue methods.

The purification technology of *Monascus* raw polysaccharides has been testified by experiment. we got rid of sundry protein with Sevage method, took out of salt and small molecular substance with dialyses, separated polysaccharides with Sephadex G - 200 column chromatography. At last, we got the pure polysaccharides through collecting and evaporating separated polysaccharides.

There was only one aquamarine spot on paper chromatography. Result shows that the polysaccharides we collected is a pure substance. And confirm that the developer is normal butyl alcohol-ethanol-water (12: 3: 5). Sephadex G-200 column chromatography had a single eluting peak that demonstrated the polysaccharide was homogeneity.

Through a chain of biochemical experiment, we drew the conclusion that polysaccharides crude product is a light red powder, virgin is a kind of white powder and easy to dissolve in water. The water solution was thickness, pH was about 6. That is of achromatism and insipidity. the

viscosity of polysaccharides water solution (1 %) was 460mPa.s, can not submit blue reacted with iodine reagent. The reaction of H_2SO_4 -Phenol and polysaccharides shows nacarat; the reaction of Anthracene-ketone reagent shows cyan; specific rotatory power $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = 1.66$. It is cannot be dissolved into high concentration ethanol, aether, acetone, hexyl acetate etc.

The essay adopts the method of two-way thin layer chromatography. Polysaccharides was hydrolyzed by 2mol / L vitriol, developer chloroform: methanol: water = 16: 9: 2. By measuring polysaccharides components, we knew that polysaccharides contains mannitol, glucose and galactose.

Processed gel filtration chromatography by Sephadex G-200, we got the volume on the chromatography is 5mg/1ml, 0.1mol/LNaCl elution solution. The standard curve is drawn, according to the given molecular weight. The molecular weight of polysaccharides is 316KD.

Infra-red spectra analysis: Porphyryze 200mg pure KBr and 2mg pure polysaccharides, blend uniformity and pressure by oil press into transperence flake. IR analysed by TJ270 - 30 infrared spectrophotometer, scanned area 4000 - 400 cm^{-1} , we drew the conclusion that polysaccharides was β - pyranoid form polysaccharide.

Generally speaking, these experiments illustrates that polysaccharides had no toxic effect on biology organism, but it could improve the immunity of body greatly. By structure and compose studying, we know that polysaccharides is a kind of heteroglycan which is composed with mannitol, glucose and galactose. Polysaccharides is β - pyrane configuration which proves the conclusion of improving immunity of body. The predominance strain of high-yielding polysaccharide has been screened through substantive mutation. Then we optimized the liquid fermentation condition, abstraction condition and purification condition. And the theory could instruct production and exploit kinds of health food and beverage, which aims at improve the immunity level of sub- health crowd.

Keywords: Monascus polysaccharides ; ultraviolet mutation ; immunization;

G-200 chromatography; two-way chromatography; infra-red spectrum

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得吉林农业大学或其他教育机构的学位证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 张建峰

签字日期： 2005 年 5 月 2 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解吉林农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即吉林农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权吉林农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名： 张建峰

导师签名： 陈 光

签字日期： 2005 年 5 月 2 日

签字日期： 2005 年 5 月 10 日

学位论文作者毕业后去向：吉林农业大学生物技术学院

工作单位：吉林农业大学生物技术学院

电话：4532886-8005

通讯地址：吉林农业大学生物技术学院

邮编：130118

第一部分 前言

1 多糖的定义与结构

糖类化合物是自然界中分布最广、数量最多的有机化合物，从最简单的细菌到高等植物和高等动物都含有各种糖类。糖是多羟基的醛或酮及其缩聚物和衍生物。单糖是最简单的糖，不能被水解为更小的糖单位（重要的单糖见图 1）。多糖是由多个单糖基以糖苷键相连而成的高聚物，一般是 20 个以上的单糖聚合而成。多糖完全水解时，糖苷键断裂而变为寡糖、二糖，最后变为单糖。根据来源不同，自然界中有植物多糖、动物多糖和微生物多糖。^[1]

多糖没有还原性和变旋现象，无甜味，大多数多糖不易溶于水，有的与水形成胶体溶液。多糖的结构因其分子量很大很复杂。如果多糖中完全是由相同的单糖组成的称为同多糖，由不同的单糖组成的则称为杂多糖。如果按多糖分子中是否有支链，则可分为直链多糖和支链多糖。支链的丰度和性质对 β -(1 \rightarrow 3) 葡聚糖的免疫活性也有较大影响。支链分支度较高的 β -(1 \rightarrow 3) 葡聚糖生物活性较强。如果糖类化合物中还含有非糖物质，则称为复合多糖，例如糖脂、糖蛋白等。^[1]

当糖分子形成环状结构时，C-1 便成为不对称碳原子，可有 α 型和 β 型两种异构体形成（见图 2）。而多糖的分子构型对其免疫调节活性及抗肿瘤活性起着至关重要的作用，其活性成分的结构前提是在多糖骨架链上占优势交替的 β -(1 \rightarrow 3) 糖苷键。单糖的 α 或 β 构型是决定糖苷键定向及空间构象的关键因素之一。由 β 型葡萄糖组成的 β -(1 \rightarrow 3) 葡聚糖有利于卷曲成螺旋结构，具有较高的免疫活性及抗肿瘤活性；而由 α 型葡萄糖组成的 α -(1 \rightarrow 3) 葡聚糖形成的是具有一种带状的单链构象，沿着纤维轴伸展而不是呈螺旋状，所以没有生物活性或生物活性很低。另一方面，主链结构同是 β -(1 \rightarrow 3) 又有 β -(1 \rightarrow 6) 侧链的葡聚糖，有些具有强的活性，而有些却无活性。长期研究发现，具有抗肿瘤活性的多糖大多是由 β -(1 \rightarrow 3) 键连接的 D 葡聚糖。^[2]

糖分子形成半缩醛环状结构时 C-1 和 C-5 通过氧原子形成一个含氧六元环，与吡喃的结构相似，所以具有这样的环状结构的称吡喃糖。环状结构单糖中五元氧环称呋喃环。这种结构上的不同也与其功能性多糖的生物活性密切相关。^[1]（见图 2 和 3）

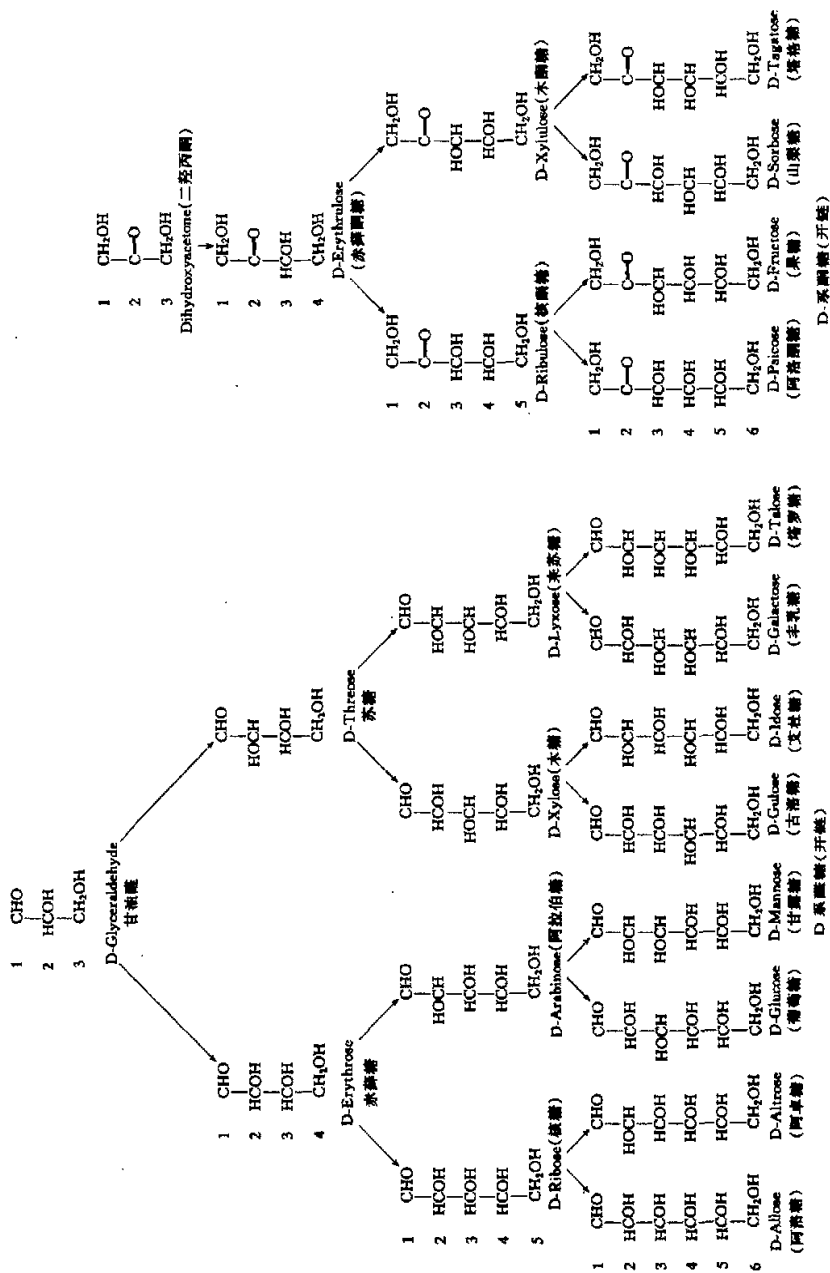


图 1 重要的单糖结构

Fig 1 The structure of the important monosaccharides

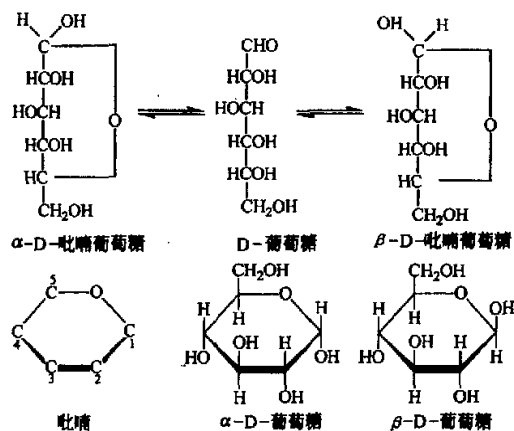


图 2 糖的立体构型 I

Fig 2 the three-dimensional conformation I of glucide

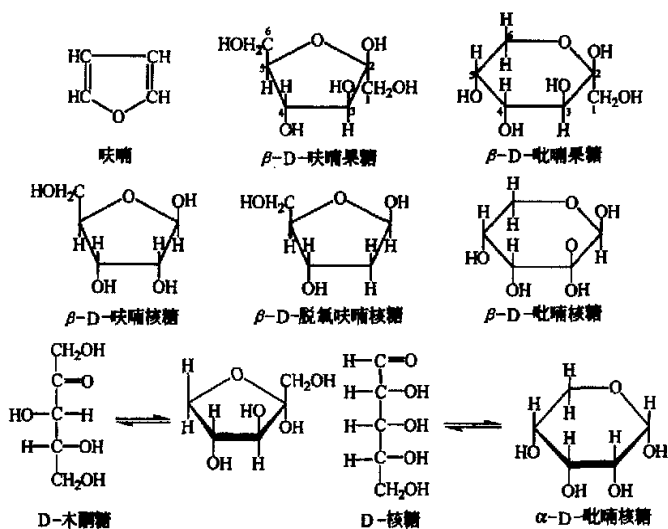


图 3 糖的立体构型 II

Fig 3 the three-dimensional conformation II of glucide

2 真菌多糖的概述

真菌多糖存在于菌丝、子实体及其发酵液中,是由 20 个以上的单糖以糖苷键连接而成的高分子多聚物,具有复杂的生物活性和功能。其中,最主要的就是免疫调节活性。^[3]目前,真菌多糖已广泛应用于免疫性缺陷疾病、自身免疫病和肿瘤等疾病的临床治疗及医药领域的其他用途,如制备医药材料、药物缓释剂、血浆代用品等^[2]。

近年来,真菌多糖及其复合物的研究引起越来越多的关注,已成为分子生物学、医学、食品科学等领域的研究热点之一。目前,研究比较多的有香菇多糖、银耳多糖、云芝多糖、灵芝多糖、茯苓多糖、裂褶菌多糖、猪苓多糖、猴头菌多糖、金针菇多糖、黑木耳多糖、核盘菌多糖、灰树花多糖、冬虫夏草多糖等^[2]。

例如香菇多糖的主链为 β -(1 \rightarrow 3) D 葡聚糖,具有 β -(1 \rightarrow 3) 支链和 β -(1 \rightarrow 6) 支链。香菇多糖是一种免疫激活剂,能激活巨噬细胞和淋巴细胞,提高巨噬细胞的趋化性和淋巴细胞对 Yac-1 细胞和 P-815 细胞的毒性反应水平,促进小鼠腹腔巨噬细胞释放 TNF,拮抗 BBN 对小鼠的致癌作用,促进 IL-1、克隆刺激因子(CSF)和白细胞介素 3(IL-3)的产生,并因此促进淋巴细胞成熟、分化和增殖^[4]。香菇多糖可增加胸腺细胞对帮助因子(helperfactor)的敏感性,促进这些细胞向 T 细胞的分化,也可刺激正常人或癌症患者对外周淋巴细胞增生,从而提高宿主抑制肿瘤生长的能力^[5],激活巨噬细胞,能选择性提高小鼠腹腔巨噬细胞的活性,并使其绝对数量增长^[6]。香菇多糖对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制率可达 70%~100%,有 90%的小鼠肿瘤完全消退,还能抑制化学致癌剂 3-甲苄醌的致癌作用^[6]。

又如茯苓多糖对细胞免疫偏低者有很强的促进细胞免疫作用^[7],能明显增强脾 T 淋巴细胞对 Con A 刺激的增殖反应,同时提高小鼠外周 T 淋巴细胞 a-ANAE 阳性率^[8,9],且能调整 T 细胞亚群的比值,增强机体免疫功能,改善机体状态,增强抗感染能力,还能激活 B 淋巴细胞,增强其活性。茯苓多糖对小鼠 S₁₈₀ 和 EAC 瘤株有明显抑制作用,能明显抑制小鼠腹水型肉瘤、人慢性骨髓性白血病 K₅₆₂ 细胞增殖,对 S₁₈₀ 细胞膜磷脂酰肌醇(PI)转换有明显抑制作用;能显著改变其磷脂的脂肪酸组成,降低花生四烯酸的含量;且能使肿瘤细胞膜唾液酸(SA)升高^[10]。茯苓多糖还能增强巨噬细胞识别功能,提高巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数,并能通过增强肿瘤坏死因子(TNF)基因的转录而增加巨噬细胞释放 TNF,并增强 TNF 的活性。

总之,真菌多糖作为一类重要的生物活性物质,是目前公认的有较高疗效的免疫增强剂,国内外学者对真菌多糖的制备、结构、合成、药理学、临床学等方面做了很多工作,其多方面的生物活性已经得到开发和应用,云芝多糖、猪苓多糖、香菇多糖、裂褶菌多糖、

茯苓多糖等多种真菌制剂已取得了较好的临床效果。^[11]

3 红曲多糖的概述

红曲是我国药食同源的典型代表,其药用价值在《本草纲目》《兽医草本》中都有记载,具有杀菌、防腐、解毒、消食、活血、健脾等功效。近年来的研究还发现,红曲具有降血压、降血脂和降胆固醇、增强肌体免疫力的作用。

但是,关于红曲的生理功能及其有效活性成分,却一直不清楚。直到1979年日本远藤章教授从红色红曲霉(*Monascus ruber*)中分离出一种命名为摩那可林K(Monacolin K)^[12]的生理活性物质,引起了全世界科学家对红曲霉,红曲米的关注。

九十年代出现了全世界范围的功能性多糖的研究热潮,1998年南京大学生物系田军等发现了红曲的另一个生物活性成分红曲多糖,并对其理化性质做了研究^[13]。2002年武汉工业学院陈运中研究了红曲色素、多糖与核酸的联合制备^[12]。同年无锡轻工大学的诸葛健等人优化了红曲霉发酵产胞外多糖的工艺,以麦芽糖为碳源、蛋白胨为氮源,多糖提取量达到3.24g/L^[14]。目前国内期刊可检索的有关红曲多糖的文章仅有三篇,尚未见外文报道。

4 本论文的研究目的和意义

综上所述真菌多糖具有许多重要的生物功能,各国学者从各种真菌体内及发酵液中提取了大量活性多糖,发现多糖具有促进机体免疫力、抗菌、抗病毒、抗寄生虫、抗肿瘤、抗辐射以及改善动物生产性能等一系列作用。但是红曲多糖的毒理、药理、动物免疫试验未见报道,本研究准备做小白鼠试验以添补这项空白。

第二点,红曲多糖的结构及组成研究只有一篇文章论述,而且作者认为数据不够准确,有些内容经多次试验证明难以实现,所以作者准备对其结构和组成、分子量等内容进行深入研究。

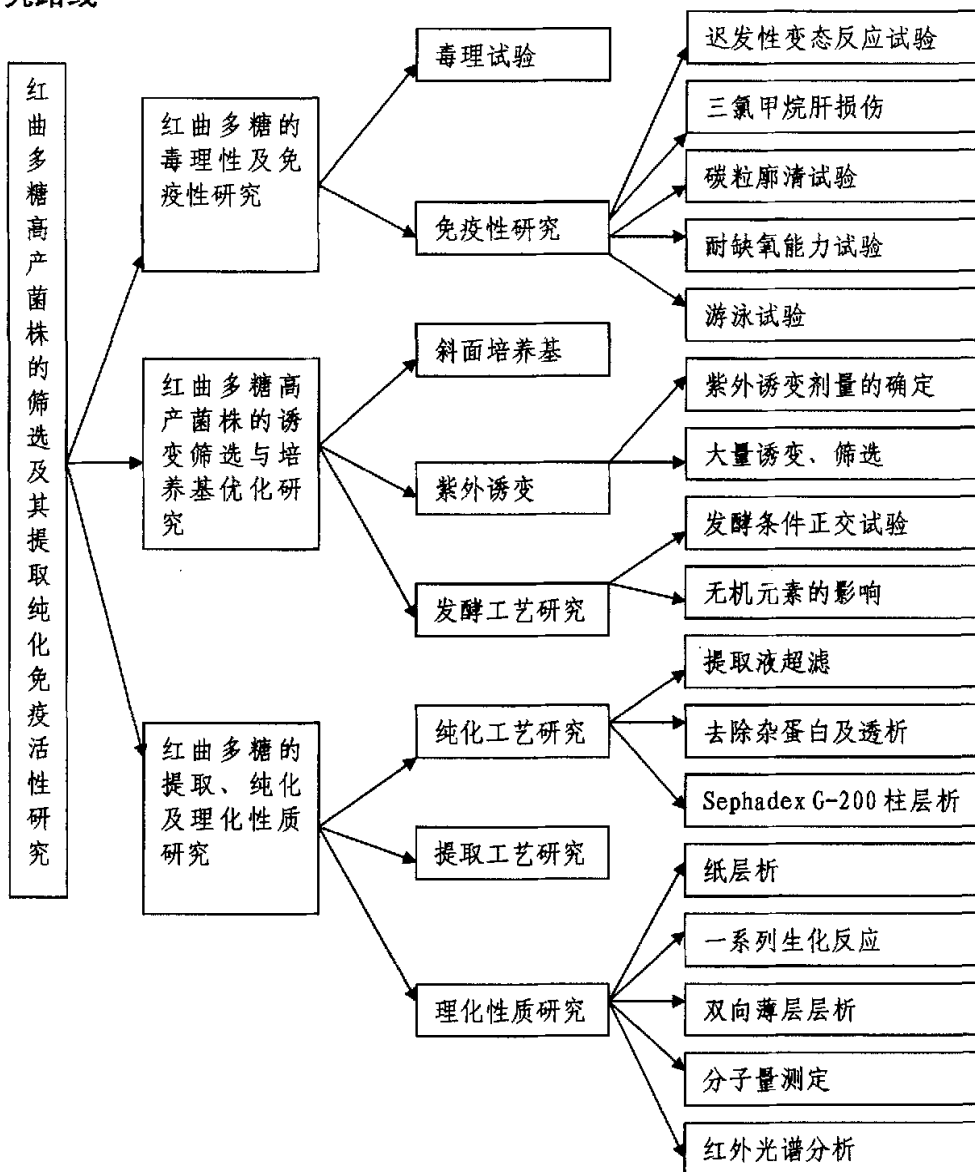
第三点,红曲多糖的分离、提取、纯化工艺未见报道,作者准备优化提取工艺,尽最大可能提高红曲多糖的收率。

第四点,红曲多糖的产率低是限制其应用的最大问题,所以作者利用紫外线对红曲霉孢子进行诱变,筛选红曲多糖的高产菌株,并以大米浆为基础培养物对选育的菌株进行发酵工艺优化。

最后,“苏丹红1号”风波引起了全世界对食用红色素的恐慌,但红曲红色素则是历史悠久的食用红色素,当苏丹红风波平息以后将会带来红曲红色素的生产高峰,红曲多糖也可以作为红曲红色素的副产物进行联合生产。

第二部分 研究内容

研究路线



1 红曲多糖的毒理性及免疫性研究

1.1 引言

多糖类物质广泛存在于动物、植物、微生物中，是构成生命有机体的主要组成部分，并在控制细胞分裂分化，调节细胞生长和衰老以及维持生命有机体正常代谢方面具有重要作用。近年来，又发现多糖类物质具有广泛的生物活性，大都具有扶正固本的功能，被称为生物应答调节剂。

多糖类物质主要是通过非特异性途径提高机体对抗原或微生物特异性反应的物质。主要用来治疗免疫性缺陷疾病和临床治疗引起的免疫功能下降等疾病。

红曲多糖是培养红曲霉菌制红曲色素的副产物，提高原料的利用率就必须解决红曲多糖的利用问题。红曲的生理，药理作用的研究已受到国内外众多学者的极大重视，现代医学研究表明，红曲及其制品有固本培元，助食化积，清污排毒，强身健体之功，能有效降低血脂、胆固醇等脂肪代谢产物，减轻血管压力，有增强生命活力延年益寿之功效。作为红曲培养的重要副产物——红曲多糖，在红曲生理药理作用中扮演着什么样的角色，日益成为科研工作者关注的焦点。^[15]

本试验就是利用红曲培养过程中产生的副产物——红曲多糖进行免疫活性方面的探讨，以其达到既开发一种有用的功能性食品又可提高工业生产利用率减少资源浪费之目的。生物有机体是一个复杂的统一的整体，牵一发而动全身，在尚不明白红曲多糖到底有哪些具体的功能，有没有毒副作用的情况下，本试验首先进行了毒理试验。

毒理试验主要是给小鼠不同剂量的红曲多糖，三周后测量体重，肝、脾、肾、心、肺等脏器的重量，计算脏器指数，同时测量了 SGOT、SGPT 含量。与对照组进行比较，判断红曲多糖对小鼠的影响。

机体对抗原物质的免疫应答是由免疫系统各种免疫细胞（包括巨噬细胞，T 细胞和 B 细胞等）相互协调，共同完成的。其中 T 细胞免疫功能与机体的抗病毒、抗肿瘤等多种功能有关。DTH 是反映 T 细胞功能的指标，主要是测量小鼠足跖肿胀度。吞噬细胞包括血中的中性粒细胞、单核细胞和组织中的巨噬细胞。吞噬细胞在免疫反应中起重要作用，采用小鼠碳粒廓清试验检验。^[16]本研究还通过化学物质对小鼠造成肝损伤，检验红曲多糖的保肝护肝作用。通过小鼠游泳试验和耐缺氧能力试验检验红曲多糖对提高机体抗疲劳方面的作用。^[17]

毒理试验和免疫试验研究的意义在于，只有明确了红曲多糖对机体没有毒害作用，并且能明显提高机体的免疫能力，后续的研究才有意义，如通过紫外诱变筛选红曲多糖的高

产菌株,对获得的高产菌株进行发酵条件优化试验,红曲多糖的提取条件优化试验,纯化条件试验,以及红曲多糖的理化性质研究,结构组成研究等。

1.2 材料与方法^[18]

1.2.1 试验动物

体重为 20 克的雄性昆明种小白鼠 80 只,吉林大学试验动物中心提供。

1.2.2 主要仪器

722 分光光度计 超级恒温水浴锅 分析天平 微量注射器 恒温培养箱 灌胃针

1.2.3 主要药品

红曲多糖(本试验室制备)用生理盐水配置 标准牛血清蛋白 DL-丙氨酸
 α -酮戊二酸 DL-天冬氨酸 丙酮酸钠 邻甲苯胺 三氯甲烷 二硝基氯苯

1.2.4 试验动物分组进行毒理试验

雄性小鼠 30 只随机分为三组,对照组灌服生理盐水 0.4ml,低剂量组灌胃红曲多糖溶液 100mg/kg. d,高剂量组灌胃红曲多糖溶液 300mg/kg. d。

灌胃三周,末次给药 24h 后,称体重(称体重前四小时禁食不禁水),眼球取血后脱臼处死,解剖重要脏器,称重,计算脏器指数。取血清测血糖,SGOT 含量,SGPT 含量。^[19,20]

脏器指数计算:脏器重量与体重的比值。

测血清血糖:邻甲苯胺法测血糖,葡萄糖在热醋酸溶液中脱水后与邻甲苯胺缩合,生成蓝绿色醛亚胺,邻甲苯胺对葡萄糖特异性高,而且不用去除蛋白质,邻甲苯胺试剂只与醛糖作用,对于其他还原性物质都不反应。此法优于 Folin-Wu 氏法。^[21]

SGOT 含量:(血清中谷草转氨酶)以丙氨酸和 α -酮戊二酸为底物经血清谷草转氨酶作用生成谷氨酸及丙酮酸,丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼作用生成 2,4-二硝基苯腙,此物在碱性条件下呈棕红色,根据棕红色深浅与同样处理的丙酮酸标准液进行比较即可计算出酶含量。^[22]

SGPT 含量:(血清中谷丙转氨酶)以丙氨酸和 α -酮戊二酸为底物经血清谷丙转氨酶作用生成谷氨酸及丙酮酸,丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼作用生成 2,4-二硝基苯腙,此物在碱性条件下呈棕红色,根据棕红色深浅与同样处理的丙酮酸标准液进行比较即可计算出酶含量。^[22]

1.2.5 迟发性变态反应(DTH 试验)^{[17][23]}

小鼠 10 只,随机分为两组,空白组灌胃生理盐水 0.4ml,试验组灌胃多糖 0.4ml。

一周后给小鼠皮下注射 1.25%二硝基氯苯丙酮溶液,腹部皮下注射 0.02 ml 致敏,24h 后,右足皮下注射 0.25%二硝基氯苯丙酮溶液 0.2ml,左足对照注射相同体积的丙酮。24h 后将小鼠脱臼处死,从脚踝处剪下四足,以重量差为肿胀度,统计处理。

1.2.6 三氯甲烷肝损伤^[19]

小鼠 10 只,随机分为两组,空白组灌胃生理盐水 0.4ml,试验组灌胃多糖 0.4ml。

喂养一周后,末次给药 1h 后尾静脉注射 0.13%三氯甲烷 0.1ml/10g 致中毒,24h 后取血清 0.05ml 测 SGPT 活性,取血后脱臼处死小鼠,解剖重要脏器,计算脏器指数。

1.2.7 碳粒廓清试验^{[24][25]}

小鼠 10 只,随机分为两组,空白组灌胃生理盐水 0.4ml,试验组灌胃多糖 0.4ml。

喂养七天后,末次给药 5h 后,尾部静脉注射 20%印度墨汁 0.1ml/kg,注射后 10min(t_1)和 30min(t_2)后分别眼部取血 20 μ l 加到 0.1%Na₂CO₃溶液 2ml 中,用分光光度计在 652nm 处测光密度。廓清指数 $K = (\lg A_1 - \lg A_2) / (t_2 - t_1)$ 。

1.2.8 耐缺氧能力试验^[26]

小鼠 10 只,随机分为两组,空白组灌胃生理盐水 0.4ml,试验组灌胃多糖 0.4ml。

喂养七天后,末次给药 7 小时后称重,放入装有碱石灰的 300ml 密闭锥形瓶中,记录小鼠存活时间 t 。

1.2.9 游泳试验^[26]

小鼠 10 只,随机分为两组,空白组灌胃生理盐水 0.4ml,试验组灌胃多糖 0.4ml。

喂养七天后,末次给药 6 小时后称重,配以体重 5%的负荷,放入水深 25cm,水温 25℃的水中,进行游泳试验,以身体完全没入水中 5s 不浮起,无法完成翻正反射为准。

1.3 结果与讨论

(本试验数据均采用 Excel 中 AVERAGE 和 AVEDEV 函数统计处理)

1.3.1 红曲多糖对小鼠体重的影响

表 1 红曲多糖对小鼠体重的影响

Table 1 Effect of Monascus polysaccharides on the avoirdupois of mice

	剂量	动物数	试验前体重/g	试验后体重/g
对照组	生理盐水	10	20	37.01 \pm 5.2560
低剂量组	100mg/kg. d	10	20	34.54 \pm 3.0992
高剂量组	300mg/kg. d	10	20	36.45 \pm 5.9296

表 1 显示灌胃红曲多糖的小鼠与对照组的体重没有显著性差异,表明红曲多糖对小鼠的体重没有不良影响。

1.3.2 红曲多糖对小鼠肝肾及脏器指数的影响

表 2 红曲多糖对小鼠肝肾及脏器指数的影响

Table 2 Effect of Monascus polysaccharides on the liver, kidney and organs index of mice

	剂量	动物数	肝重/g	肝指数	肾重/g	肾指数
对照组	生理盐水	10	1.86 ± 0.2600	0.0507 ± 0.0041	0.4940 ± 0.0648	0.0134 ± 0.0007
低剂量组	100mg/kg. d	10	1.88 ± 0.2536	0.0543 ± 0.0047	0.4260 ± 0.0512	0.0123 ± 0.004
高剂量组	300mg/kg. d	10	1.98 ± 0.3656	0.0543 ± 0.00399	0.4620 ± 0.0464	0.0148 ± 0.0008

表 2 数据显示,试验组小鼠的肝重有所增加,众所周知这表明红曲多糖对增强小鼠非特异性免疫有作用,对肝脏没有毒害作用。肾脏重量稍有降低,但肾指数没有明显变化,表明红曲多糖对小鼠肾脏没有毒害作用。

1.3.3 红曲多糖对心肺脾及其脏器指数影响

表 3 红曲多糖对心肺脾及其脏器指数影响

Table 3 Effect of Monascus polysaccharides on the heart, lung, spleen and organs index of mice

	剂量	动物数	心重/g	心指数	肺重/g	肺指数	脾重/g	脾指数
对照组	生理盐水	10	0.19 ± 0.0248	0.0054 ± 0.0006	0.2580 ± 0.0192	0.0073 ± 0.0016	0.1580 ± 0.0184	0.0044 ± 0.0006
低剂量组	100mg/kg. d	10	0.18 ± 0.0240	0.0052 ± 0.0006	0.2920 ± 0.0556	0.0084 ± 0.0015	0.2320 ± 0.0184	0.0066 ± 0.0013
高剂量组	300mg/kg. d	10	0.22 ± 0.0320	0.0060 ± 0.0014	0.2726 ± 0.031	0.0077 ± 0.0024	0.2060 ± 0.008	0.0055 ± 0.00128

表 3 数据显示, 试验组小鼠的心肺重量及心肺脏体指数没有显著差异, 说明红曲多糖对小鼠心肺没有毒害作用。低剂量试验组脾重量有所增加, 而高剂量组又有所回落, 因为脾脏是免疫器官, 重量增加说明对免疫功能有所帮助, 高剂量稍有回落也比对照组多, 没有不良影响。

1.3.4 红曲多糖对小鼠 SGPT, SGOT, 血糖, 和总蛋白含量的影响

表 4 红曲多糖对小鼠 SGPT, SGOT, 血糖, 和总蛋白含量的影响

Table 4 Effect of Monascus polysaccharides on the content of SGPT,SGOT, blood sugar ,and total protein of mice

	剂量	动物数	SGPT 含量 U/L	SGOT 含量 U/L	血糖 mmol/l
对照组	生理盐水	10	26.6±4.5	40.6±9.8	6.56±1.86
低剂量组	100mg/kg. d	10	20.5±4.6	42.56±6.5	6.86±1.04
高剂量组	300mg/kg. d	10	21.2±3.2	35.36±8.7	6.01±1.32

表 4 数据显示, 试验组的血糖含量和 SGOT 含量与试验组没有明显不同, 说明红曲多糖对小鼠没有不良影响。试验组的 SGPT 含量明显低于对照组, 说明红曲多糖对肝脏似乎有保护作用。后续将通过三氯甲烷肝损伤试验加以验证。

1.3.5 迟发性变态反应 (DTH 试验) 结果

表 5 迟发性变态反应 (DTH 试验) 结果

Table 5 The experiment of DTH

	剂量	动物数		左/g	右/g
对照组	生理盐水	5	前/g	0.1336±0.1314	0.2510±0.0252
			后/g	0.5272±0.0463	0.6003±0.0662
试验组	300mg/kg. d	5	前/g	0.1216±0.1192	0.2819±0.0126
			后/g	0.4541±0.00984	0.7372±0.0881

从表 5 可看出, 经灌胃给予红曲多糖 7 天后, 小鼠足跖肿胀度明显增加, 差异显著。说明红曲多糖对二硝基氯苯所致小鼠的迟发型超敏反应有显著的抑制作用。

1.3.6 三氯甲烷肝损伤试验结果

表 6 三氯甲烷肝损伤试验结果

Table 6 The liver damage of chloroform

	剂量	动物数	SGPT U/L	肝重 /g	脏体指数
对照组	生理盐水	5	14.62±3.98	1.91±2.31	0.0521±0.0042
试验组	300mg/kg. d	5	11.42±3.36	1.86±2.45	0.0534±0.0045

从表 6 可以看出, 试验组的小鼠 SGPT 含量明显低于对照组, 肝脏指数稍高于对照组, 说明红曲多糖对三氯甲烷造成的急性肝损伤有一定的抵抗作用。

1.3.7 碳粒廓清试验结果

表 7 碳粒廓清试验结果

Table 7 The experiment of carbon granules clearance rate

	剂量	动物数	廓清指数 K
对照组	生理盐水	5	0.005966±0.003278
试验组	300mg/kg. d	5	0.007126±0.001641

从表 7 可以看出, 试验组的碳粒廓清指数明显高于对照组, 说明红曲多糖能显著提高小鼠的碳粒廓清速率, 提高机体的巨噬细胞吞噬能力。

1.3.8 耐缺氧能力试验结果

表 8 耐缺氧能力试验结果

Table 8 The experiment of resistance to hypoxia

	剂量	动物数	存活时间/min
对照组	生理盐水	5	20.22±2.053
试验组	300mg/kg. d	5	18.82±2.156

从表 8 可以看出, 在无氧条件下试验组的存活时间稍短于对照组, 表明红曲多糖对增强小鼠耐缺氧能力无明显效果。

1.3.9 游泳试验结果

表 9 游泳试验结果

Table 9 The experiment of exhausting swimming of mice

	剂量	动物数	游泳时间/min
对照组	生理盐水	5	34.43±3.625
试验组	300mg/kg. d	5	33.19±4.513

从表 9 可以看出, 试验组的游泳时间与对照组没用显著差别, 说明红曲多糖对增强小鼠耐疲劳能力无明显效果。

1.3.10 毒理试验结果分析

分析表 1—4 数据, 正常灌胃红曲多糖 21 天后, 称量小鼠体重, 并对其肝、脾、肾、心、肺分别称重, 计算脏体系数。结果可以看出, 红曲多糖能增加肝脏质量, 增加脾脏质量, 而高浓度又降低脾质量, 这两个器官是免疫器官, 增重不仅表明红曲多糖没有毒害而且有利于免疫能力的提高。从数据看红曲多糖对其他各个器官无明显的不良影响。

而且从 SGPT 含量来看, 红曲多糖能显著降低其含量, 而对血糖含量和 SGOT 含量影响不明显。结论是红曲多糖对小鼠无明显的毒害作用。但是本试验中可看到脾指数有明显增加, 在高浓度时反而有降低趋势。对肝脏有使之增大的趋势, 具体原因尚不清楚。而且 SGPT 含量能有所下降是否暗示着红曲多糖有可能在肝病预防方面有所作为呢。众所周知, 作为肝脏健康状况的晴雨表 SGPT 所代表的分量。如果想进一步研究, 可用其他方法进行探讨。总而言之, 在毒理试验中尚未发现红曲多糖对机体的有害作用, 因此本试验继续进行了免疫活性方面的探讨。

1.3.11 免疫试验结果分析

分析表 5—9 数据, 生物有机体是一个复杂的统一的整体, 牵一发而动全身, 机体对抗原物质的免疫应答, 是由免疫系统各种免疫细胞 (包括巨噬细胞, T 细胞和 B 细胞等) 相互协调, 共同完成的。其中 T 细胞免疫功能与机体的抗病毒、抗肿瘤等多种功能有关, DTH 是反映 T 细胞功能的指标。本试验中, 小鼠经灌胃红曲多糖后, 其足跖肿胀度与对照组差异明显, 说明红曲多糖能提高小鼠细胞免疫功能。

在三氯甲烷致中毒试验中,和对照组相比,试验组 SGPT 含量有所降低说明红曲多糖有保肝护肝作用。原因是 SGPT 广泛存在于肝脏中,当肝脏发生病变时,细胞膜破裂,GPT 大量释放入血,导致血清中该酶活性升高,正由于红曲多糖的保肝护肝作用,才使试验组中 SGPT 含量比对照组有所降低。

给小鼠灌胃红曲多糖,能使廓清速率大幅增加表明红曲多糖可提高腹腔巨噬细胞吞噬能力,促使小鼠外周血 E-玫瑰环形成,增加体内淋巴细胞转化率,使非特异性免疫加强,由于巨噬细胞又是特异性的免疫性的诱导细胞和效应细胞,它的功能也直接影响着特异性免疫强弱。

游泳试验和耐缺氧能力试验似乎说明红曲多糖在提高机体耐疲劳能力和缺氧条件下生活能力方面作用不大,有待进一步研究。

1.4 毒理及免疫试验小结

通过毒理试验,雄性小鼠 30 只随机分为三组,对照组灌服生理盐水 0.4ml/d,低剂量组灌胃红曲多糖溶液 100mg/kg. d,高剂量组灌胃红曲多糖溶液 300mg/kg. d。表 1—4 数据显示,正常灌胃红曲多糖 21 天后,称量小鼠体重,并对其肝、脾、肾、心、肺分别称重,计算脏体系数。从数据看红曲多糖对各个器官无明显的不良影响。在毒理试验中尚未发现红曲多糖对机体的有害作用。

动物免疫试验,表 5 迟发性变态反应数据显示,小鼠经灌胃红曲多糖后,其足跖肿胀度与对照组差异明显,说明红曲多糖能提高小鼠细胞免疫功能。表 6 三氯甲烷致中毒试验数据显示,和对照组相比,试验组 SGPT 含量有所降低说明红曲多糖有保肝护肝作用。表 7 碳粒廓清试验数据显示,给小鼠灌胃红曲多糖,能使廓清速率大幅增加表明红曲多糖可提高腹腔巨噬细胞吞噬能力,使非特异性免疫加强。表 8 和表 9 游泳试验和耐缺氧能力试验数据显示,似乎红曲多糖在提高机体耐疲劳能力和缺氧条件下生活能力方面作用不大,有待进一步研究。

综上所述,红曲多糖作为一种大有潜力的功能性多糖具有许多适合人类需要的功能,有很大的开发利用价值,而且开发它还能消化大量的工业培养红曲霉菌副产物,提高了资源利用率,减少环境的污染和资源的浪费,是一个一举多得造福人类的事情!

2 红曲多糖高产菌株的诱变筛选与培养基优化研究

2.1 引言

红曲多糖毒理试验表明,红曲多糖对小鼠体重、肝、脾、肾、心、肺没有明显不良影响,即红曲多糖对机体的没有毒害作用。红曲多糖动物免疫试验,说明红曲多糖能提高小鼠细胞免疫功能,提高腹腔巨噬细胞吞噬能力使非特异性免疫加强,并且具有保肝护肝作用。因而红曲多糖作为一种大有潜力的功能性多糖具有许多适合人类需要的功能,有很大的开发利用价值,而且开发它还能消化大量的工业培养红曲霉菌副产物,提高了资源利用率,减少环境的污染和资源的浪费。

但是红曲多糖产量很低,仍然是一个严峻的问题,本研究利用 UV 诱变处理红曲霉 AS 3.4701,期望能够得到多糖高产菌株,解决产量低的难题,为人类的健康做点贡献。紫外线诱变是工业生产中最常用的诱变方法之一^[27]。其诱变效应主要是由于它引起 DNA 的改变(DNA 链或 H 键的断裂,胞嘧啶的水合作用,胸腺嘧啶二聚体的形成等),阻碍 DNA 的复制或引起碱基排列次序的变化,从而引起基因突变。^[28]

然后需要做突变菌株的遗传稳定性检验试验。并且为了使该菌株发挥更大的作用,对摇瓶培养基进行优化。影响霉菌生长、发酵的主要因素有 C 源、N 源、无机盐含量等。针对这几个主要因素进行摇瓶培养基的优化。众所周知,红曲米是以大米为原料的,因而我选择以大米浆为基础培养基,这样的选择使红曲多糖的生产成本降低,同时有可能有较高的产量。

由于菌种的贮存和使用受其斜面培养基的影响较大,所以为使用的菌种选择合适的培养基非常关键。本研究菌种是从北京微生物研究中心购入的红曲霉菌种,红色红曲霉 AS 3.4701。按菌种培养基配方配制的培养基培养,长势不好,菌落稀松。按传统霉菌培养基配方马铃薯葡萄糖培养基培养^[29],生长情况也不好。因而有必要花时间探索红曲霉斜面培养基配方。所以我们先进行了斜面培养基的研究试验。

2.2 材料方法

2.2.1 菌种及来源

Monascus AS 3.4701 (中国科学院微生物所)

2.2.2 各级菌种培养基配方

斜面试管培养基

试验室制备的麦芽汁 6~8.5 波美度, 琼脂 1.5~2%, PH 近中性。

固体培养基

试验室制备的麦芽汁 6~8.5 波美度, 琼脂 2~3%, PH 近中性

液体发酵培养基

大米浆 (固形物 10%), NaNO_3 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, KH_2PO_4 0.25%, PH 自然。

以上培养基灭菌条件: 121℃, 0.1MPa, 30min

2.2.3 主要仪器设备

超净工作台、常速离心机, 紫外灯、红灯、高压灭菌锅、电子天平、恒温培养箱、旋转蒸发仪、水浴锅、电热鼓风干燥箱等、回转式恒温调速摇床柜

2.2.4 斜面培养基的研制

普通大麦浸泡 24h, 置木质或草制管内, 上面盖一层湿布, 温度在 20℃左右, 每天冲水 1~2 次至芽长为大麦本身一倍即可, 然后风干, 捣碎即得大麦粉。每公斤大麦粉加水四公斤, 45℃水浴 30min (搅拌), 7min 升温至 63℃保温 30min, 5min 升温至 70℃, 补加 70℃蒸馏水 500ml, 保温 30min, 以碘液检验不变色为止, 然后 5min 升温至 75℃, 保温 15min^[30]。取下糖化醪以纱布过滤, 滤液装瓶加棉塞 121℃ 30min 灭菌, 热过滤 (滤纸), 得滤液冷却至室温用波美计测糖度, 用蒸馏水调整波美度 6~8.5 之间, 以稀碱调 pH6~7, 加 2%琼脂, 121℃ 30min 灭菌, 摆斜面。

2.2.5 深层发酵菌种的驯化筛选

2.2.5.1 划线培养

取活化两次后的斜面菌种 AS 3.4701, 接种于麦芽汁平板培养基上, 33℃倒置培养 4d, 备用。

2.2.5.2 诱变前孢子悬液的制备^{[34][32]}

平板菌株培养 4d 后, 用无菌生理盐水洗下平板红曲霉孢子, 倒入已灭菌的装有 20~30 颗直径为 4~5mm 的玻璃珠的三角瓶中, 放入摇床中 220r/min 振荡 1h, 孢子分散即可, 用 4 层无菌镜头纸过滤除去菌丝, 制成孢子悬浮液, 稀释至浓度为 10^6 个/ml, 备用。

2.2.5.3 孢子悬浮液计数方法^[33]

显微镜直接计数法: 用血球计数板在显微镜下直接计数, 先将盖玻片盖于血球计数器中央, 用胶头吸管吸取稀释后的菌液少许, 滴一小滴于盖玻片的边缘, 使菌液自行渗入计数室内 (注意不得产生气泡), 静止约 5min。放于显微镜下观察, 格线上的菌只计呈直角的两条边, 25 个中方格中计四角和中央的五个中方格的菌总数 A。

$$1\text{ml总菌数}=\frac{A}{5}\times 25\times 10^4\times B$$

其中 B—稀释倍数

2.2.5.4 紫外诱变^[34]

取制备好的菌液 8ml, 加入到 9cm 的带磁棒的培养皿内, 共准备 7 份, 将培养皿置于 254nm, 15W 紫外灯下, 打开皿盖, 磁力搅拌下进行紫外线照射。照射时间分别为 1min, 1.5min、2.0min、2.5min、3.0min、3.5min 和 4min。在红灯下将诱变后的菌液取 0.5ml 稀释至 10^{-3} 和 10^{-4} 浓度。并将各个时间段的 10^{-3} 和 10^{-4} 浓度的菌液取 0.5ml 涂布于平板培养基上, 33℃ 恒温培养箱中避光倒置培养 48h, 各皿进行了菌落计数, 统计后确定最佳诱变剂量。

2.2.5.5 大量诱变、筛选

在确定后的最佳诱变条件下进行大量的诱变试验, 获得了较优良的菌株 106 株, 然后以每株 10 个摇瓶相同的培养条件下培养, 比较多糖产量, 最后获得一株最优菌株。

2.2.5.6 摇瓶发酵培养^[14]

从上述平板上挑取与出发菌株相比, 菌落直径大, 周边呈稠厚状者为生长与产多糖性能较优良的纯种的菌落^[36], 一部分用于接种斜面培养基, 另一部分接种于装有 50ml 培养基的 250ml 摇瓶中, 进行初筛。

培养条件: 恒温摇床 33℃, 96h, 转速 220r/min。

2.2.5.7 醇沉法获得粗多糖

取上述发酵液, 采用热水浸提法^[36], 加热水至 150ml, 100℃ 水浴中浸提 20min, 提出胞外红曲多糖, 4 层纱布过滤弃菌体, 上清液 4000r/min 离心, 取上清 65℃ 旋转蒸发浓缩至 20ml, 加入 4 倍体积的 95% 的乙醇, 放入冰箱内静置 24h, 4000r/min 离心, 取沉淀并放置于烘箱内 (60℃), 干燥 24h 后称取粗多糖的质量^[37]。

2.2.5.8 筛选试验的工艺流程图^[12]

菌种→划线平板培养→孢子悬液制备→紫外线诱变处理→平板培养→选单菌落→

{ 斜面培养
摇瓶发酵培养→热水浸提→过滤→离心取上清→旋转蒸发→醇沉→离心→取沉淀→干燥→称量红曲粗多糖。

2.2.6 菌种深层发酵工艺的研究^{[38][39]}

2.2.6.1 培养方法

所用菌种为紫外诱变筛选得到的优良菌株。液体培养基用 250ml 三角瓶装入瓶子体积 50ml, 用纱布棉垫封口, 用 $1.030 \times 10^5 \text{Pa}$ 高压灭菌 30min, 每支斜面菌种接液体培养基三角瓶 10 个。接种后, 将液体发酵培养基三角瓶置于旋转式摇床上, 转速 220r/min。

为确定其培养条件, 进一步优化试验, 分别选取温度为 A 因素, NaNO_3 含量为 B 因素, 培养时间 C 因素, 各取三个水平, 以菌体生物量和胞外多糖产量为指标进行 $L_9(3^4)$ 正交试验^[37]。

2.2.6.2 无机元素的影响

无机元素有促进菌体生长及多糖合成的作用, 经大量试验证明磷酸盐和 Mg^{2+} 为红曲霉生长的必需矿质元素, 不同无机元素的加入对发酵液的 pH 值等内环境都有可能改变, 为考察其协同作用, 确定其合适用量进一步优化培养基组成, 降低生产成本, 分别选用 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为二因素 (其它条件为正交试验中的最优组合) 做平行试验, 每个组合做样品 10 个然后取平均值^[40]。

2.2.6.3 发酵优化条件检验

在 250ml 的三角瓶中加入优化组合的培养基 50ml, 在转速 220r/min 的旋转式摇床上培养, 测多糖产量, 检验正交试验的优化组合是不是和预期的结果一致, 试验共做五组。

2.2.6.4 生物量的测定

经摇床培养的菌体用八层纱布过滤后, 得到的菌体在 80°C 下烘干 12h, 称量至恒重, 即为红曲霉的生物量。清液待下一步提取多糖^[44]。

2.2.6.5 多糖醇沉

利用多糖溶于水或酸、碱、盐溶液而不溶于醇、醚、丙酮等有机溶剂的特点, 进行醇沉。将培养后的发酵液经离心去杂浓缩后倒入大型容器时除沉淀物, 此时浓缩液的准确数量为浓缩后的数量减去除弃沉淀的数量, 醇沉一般用普通酒精即可^[41]。醇沉操作时, 将应加入的酒精缓慢注入浓缩液中, 并随加随搅至完全混合均匀, 当混合液中酒精浓度为 75% 时, 多糖成絮状物缓慢沉下, 放入冰箱, 醇沉 24h, 为了使混合液中酒精浓度达到 75% 原酒精加入量计算式:

$$[\text{酒精加入量} = 75 \times \text{浓缩液数量 (ml)} / (\text{该酒精浓度分子数} - 75)]$$

2.2.6.6 离心、干燥^[44]

经醇沉得多糖物质完全下沉至容器底部, 可适当抽取上清液减少分离数量, 但注意不要将多糖抽出, 然后进行离心分离, 转速 4000r/min, 5 分钟停机, 然后将多糖膏状物置入洁净搪瓷或玻璃器皿中 60°C 电热鼓风干燥 12h。

2.2.6.7 试验路线

菌种→斜面培养→摇瓶培养→热水浸提→离心除杂→上清液→减压浓缩→醇沉→离心→沉淀→鼓风干燥→红曲粗多糖^[12]

2.3 结果与讨论

2.3.1 红曲霉斜面培养基试验结果

传统的霉菌培养基马铃薯葡萄糖培养基用于培养红曲霉，菌株生长不好，生长速度缓慢，菌落形状不均匀。麦芽汁培养基按菌种配方的方法糖化有困难，后改用上述方法，是按啤酒厂大麦芽糖化工艺进行的，糖化效果较好。分析是 63℃ 时 β -淀粉酶活性较高，70℃ 时 α -淀粉酶活性最高，75℃ 糖化酶休止。^[30]

另外，斜面制作过程中注意 pH6-7，不能过低，含糖量不能过高（波美度 6-8.5），否则会引起斜面不凝或凝结不好，导致无法接菌。

2.3.2 紫外诱变试验结果

2.3.2.1 不同时间剂量紫外线对红曲霉 AS 3.4701 菌株进行诱变处理

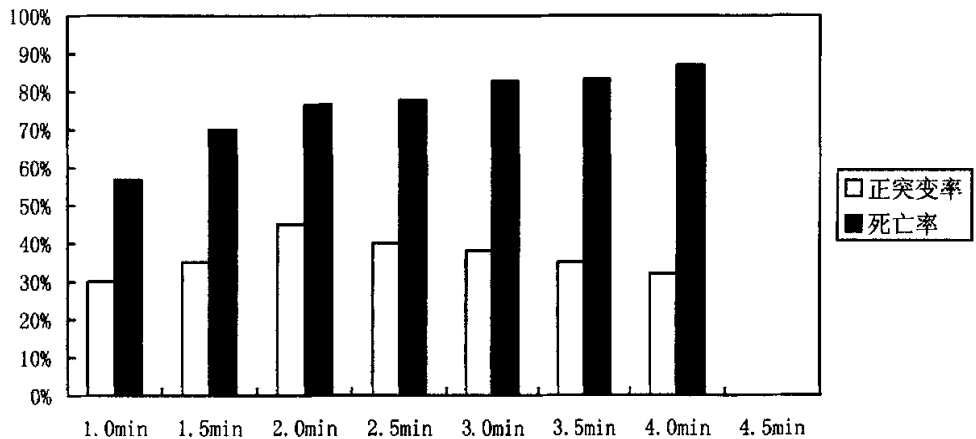


图 4 (n=10)

图 4 诱变时间对致死率和正突变率的影响

Fig.4. Effect of mutation time on dead rate and positive mutation rate

图 4 表明紫外线处理红曲霉，随着时间的延长，死亡率逐渐提高，而正突变率是先升后减，在 2min 时最高。

2.3.2.2 紫外线最佳诱变剂量的确定

由图 4 可知,紫外线的照射时间与菌株的致死率、正突变率存在着一定的剂量效应关系,随着照射时间的延长,致死率会逐渐提高,正突变率也会有相应的变化,为了提高孢子的诱变率,所以选择采用相对较高的致死率,如图 2.0 min 处,诱变率高,致死率也相对高,所以确定 2.0min 为最佳的诱变剂量。

2.3.2.3 菌株遗传稳定性的确定

在最佳诱变剂量的条件下,进行大量诱变,最终获得了一株最优突变株。对该突变株进行连续传代(3 次),进行摇瓶发酵试验,每次以 10 个摇瓶为单位取平均,结果红曲粗多糖的产量分别是 4.26g/L, 4.69g/L, 4.10g/L。从数据中可看出该菌株具有比较稳定的遗传性。将该菌株命名为 ZH-100。

2.3.2.4 试验分析

紫外线诱变是工业生产中最常用的诱变方法之一。从紫外线诱变选育突变株到摇瓶培养,提多糖,整个试验有很多需要注意的问题,由于粗多糖的产量可以直接反映出该菌株产多糖的性能,所以试验的过程中应充分考虑到各种影响因素,减少误差,以保证所得结果的准确性和可靠性。

菌种培养的温度

由于温度往往影响菌株的生长状态,引起代谢流变化,通过试验优化工艺条件确定最适宜温度 33℃。

培养基组成

无机盐有促进菌体生长及多糖合成的作用,通过试验证明磷酸盐、镁离子对红曲霉的生长为必需因子。为了提高菌种的生产能力,所以选择最佳的碳、氮、无机盐的比例。选择大米浆培养基不仅价廉质优,而且比较适合于红曲霉的生长。

摇瓶培养时间

通过试验,得出在培养时间 96h 左右,菌种产多糖的量最多。在低于 96h 时,多糖产量还没有达到最大值,如果高于 96h,会由于菌体消耗多糖而出现产量下降的现象。因而最佳培养时间为 96h。

试验操作

在操作的过程中,尤其紫外线诱变时,要保证不染菌,在接摇瓶时,接菌量应尽量多,以增加接上的机率,减少误差。

2.3.3 深层发酵培养基优化结果

2.3.3.1 正交试验结果

分别选取温度为 A 因素，NaNO₃ 含量为 B 因素，培养时间 C 因素，各取三个水平，以菌体生物量和胞外多糖产量为指标进行 L₉(3⁴) 正交试验，见表 10

表 10 正交试验方案设计

Table.10. The scheme of L ₉ (3 ⁴) orthogonal experimental table					
试验号 Number of experiment	温度(℃) Temperature	NaNO ₃ 含量 (g/100ml) NaNO ₃ content	培养时间 (h) Time	空白 Blank	多糖产量(g/L) polysaccharid es yield
1	30.0	0.10	96	0	4.714
2	30.0	0.15	102	0	4.812
3	30.0	0.20	108	0	4.430
4	32.5	0.10	102	0	5.184
5	32.5	0.15	108	0	5.140
6	32.5	0.20	96	0	5.036
7	35.0	0.10	108	0	5.310
8	35.0	0.15	96	0	5.526
9	35.0	0.20	102	0	5.140
K1	13.956	15.208	15.276	14.994	T=45.292
K2	15.360	15.478	15.136	15.158	$\bar{y}=5.032$
K3	15.976	14.606	14.880	15.140	
K1	4.652	5.069	5.092	4.998	
K2	5.120	5.159	5.045	5.053	
K3	5.325	4.869	4.960	5.047	
R(极差)range	0.673	0.290	0.132	0.055	
主次sequence	A>B>C				
最优组合 optimum	A ₃ B ₂ C ₁				

由正交表可以看出，按影响因素的极差分析 A>B>C。对于 A 因素（温度）K₃ 值最大可选 35℃；B 因素（NaNO₃ 含量）K₂ 值最大可选 0.15%；C 因素（培养时间）K₁ 最大可选 96 h，即 A₃B₂C₁，即最终优化结果：培养温度 35℃，NaNO₃ 含量 0.15%，培养时间 96 h。

2.3.3.2 方差分析结果^[37]

表 11 正交试验的方差分析

Table.11. The analysis of variance on L₉ (3⁴) orthogonal experimental table

方差来源 Variance source	平方和Q Sum of squares	自由度f Degree of freedom	均方和V Sum of mean square	Fe值 Fe value	显著性 Significance
A	0.714564	2	0.357282	132.5011	**
B	0.132854	2	0.066427	24.63507	*
C	0.026884	2	0.013442	4.985001	不显著
误差 (error)	0.005393	2	0.002696		
总和 (resultant)	0.879694	8			

临界值 $F_{0.05}(2, 2)=19.00$, $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

**表示非常显著, *表示比较显著

通过方差分析, 进一步证明了温度为第一影响因素, NaNO_3 含量为第二影响因素, 培养时间为第三影响因素。

2.3.3.3 无机元素的影响试验结果

对照两种因子对红曲霉的影响程度, 表 12 结果表明, 最适含量为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, KH_2PO_4 0.25%。

表 12 无机元素对多糖产量的影响

Table.12.Effect of inorganic element on polysaccharides yield

KH_2PO_4 含量(g/100ml) KH_2PO_4 content		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 含量(g/100ml) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ content		
		0.1	0.15	0.2
0.2		5.24	5.38	5.31
0.25		5.42	5.55	5.29
0.3		5.45	5.51	5.33

2.3.3.4 发酵优化条件检验

在 250ml 的三角瓶中加入优化组合的培养基 50ml, 在 35℃, 转速 220r/min 的旋转式摇床上培养测多糖产量, 表 13 表明最终优化后平均多糖产量达到 5.53g/L, 比初始条件高出 27%

表 13 多糖的发酵条件检验试验

Tab.13 The proof-tests of the fermentation conditions for polysaccharides

平行标号 Number of experiment	生物量 g/100ml Biomass	多糖产量 g/L Polysaccharides yield
1	1.812	5.50
2	1.796	5.48
3	1.833	5.61
4	1.825	5.59
5	1.803	5.47
平均 average	1.814	5.53

2.4 紫外诱变和发酵条件优化试验小结

通过试验确定的麦芽汁糖化工艺: 每公斤大麦粉加水四公斤, 45℃水浴 30min(搅拌), 7min 升温至 63℃保温 30min, 5min 升温至 70℃, 补加 70℃蒸馏水 500ml, 保温 30min, 以碘液检验不变色为止, 然后 5min 升温至 75℃, 保温 15min^[30]。确定的斜面培养基: 试验室制备的麦芽汁 6~8.5 波美度, 琼脂 1.5~2%, PH 近中性。

紫外线对红曲霉 AS 3.4701 菌株进行诱变处理, 由图 4 数据确定最佳诱变剂量: 254nm, 2.0min。再经过复筛获得了一株最佳突变株 ZH-100, 该突变株经连续三次传代, 结果红曲粗多糖的产量分别是 4.26g/L, 4.69g/L, 4.10g/L, 平均 4.35g/L。证明该菌株具有稳定的遗传性, 比出发菌株提高产量 286%, 可见在多糖高产菌株的筛选中紫外线诱变是一种比较有效的方法。

通过三组试验, 包括: (1) 发酵条件优化的正交试验, (2) 无机元素的含量确定的平行试验, 对红曲霉的产多糖的结果分析, 得出优化组合; (3) 优化的发酵条件检验试验, 得出结论: 红曲霉在经过斜面培养后, 以大米浆为基础培养物(固形物10%), 加入NaNO₃ 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.15%, KH₂PO₄ 0.25%, 温度35℃, 220r/min摇床培养96小时, 再经4000r/min离心5min, 24小时醇沉, 电热鼓风干燥等操作, 多糖产量达到5.53g/L, 高出初始条件27%。

3 红曲多糖的提取、纯化及理化性质研究

3.1 引言

我们利用紫外线对红色红曲霉 AS 3.4701 进行诱变筛选,得到一株优势菌 ZH-100,红曲多糖的产量较高。然后又从 C 源、N 源、无机盐含量等条件入手对得到的菌株进行发酵条件优化。进一步提高了多糖的产率。通过红曲多糖的毒理试验证明了红曲多糖对生物有机体没有毒害作用。通过动物免疫试验,证明了红曲多糖能有效的提高机体免疫能力,并得出了红曲多糖具有保肝护肝的能力。

为了确保发酵产生的红曲多糖极大量的被提取出来,我们将以影响多糖提取率的主要因素为研究对象优化提取工艺。主要是从料液比、提取温度、浸提时间等因素采用正交分析法展开研究。^[42]

红曲多糖是红曲霉发酵液中最重要生理活性物质之一,它具有广泛的药理活性,田军等研究表明红曲多糖分子中存在大量的 1→3 位糖苷键和少量 1→6, 1→2 位糖苷键^[13]。但红曲多糖的结构至今尚未完全探明和确定。而且多糖的结构与性质、功能等的研究中,能分离出均一的多糖非常重要。可是提取的粗多糖水溶液大多是胶体溶液,黏度大且不稳定,其所含组分的分子量差异悬殊,不同分子量的组分之间理化性质又很接近,制备出均一的多糖有不少困难,同一原料用不同的提取液所得的多糖的成分是不同的,且杂质、提取液黏度、成本等也都是提取时考虑的因素之一,因而其分离、纯化的方法目前并未成型。作者的研究主要以提高红曲多糖的提取率和产品的纯度、又不损害其结构为目的,对多糖浓缩及纯化方法等方面进行了探讨。

功能性多糖是目前世界研究的热点之一,目前已经发现的功能性多糖具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、增强免疫等多方面功能^[14]。功能性多糖生物活性的研究表明,真菌多糖的化学结构对其生物活性起着至关重要的作用,包括分子构型、分子量、支链、支链基团、主链等。

其中分子构型是其免疫调节活性及抗肿瘤活性的结构前提,主要取决于多糖骨架上交替的 β -(1→3) 糖苷键,而 α 构型的糖苷键则没有此功能^[2],研究表明,功能性多糖的抗肿瘤活性与分子量大小有关,分子量大于 16KD 时才有抗肿瘤活性^[43]。

支链的丰度和性质对 β -(1→3)-葡聚糖的免疫活性也有较大影响,支链分支度较高的 β -(1→3)-葡聚糖生物活性较强。另外,多糖的结构研究表明,葡聚糖主链上的 β -(1→3) 和支链上的 β -(1→6) 为具有生物活性所必需的条件,而且只有在 C₆ 是被 D-葡

萄糖基和 D-阿拉伯糖等基团所取代时多糖才具有很强的抗肿瘤活性^[44,45]。

红曲多糖的结构和理化性质的研究目前只有田军等做过，作者从几个侧面进行研究，已期给出较为可信的结论。

3.2 材料与方法

3.2.1 红曲多糖的提取工艺

菌种→斜面培养→摇瓶培养→热水浸提→离心除杂→上清液→减压浓缩→醇沉→离心→沉淀→鼓风干燥→红曲粗多糖^[12]

3.2.2 摇瓶培养工艺

红曲霉在经过斜面培养后，以大米浆为基础培养物（固形物 10%），加入 NaNO_3 0.15%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%， KH_2PO_4 0.25%，温度 35℃，220r/min 摇床培养 96 小时。

3.2.3 醇沉操作

醇沉一般用普通酒精即可^[41]。醇沉操作时，将应加入的酒精缓慢注入浓缩液中，并随加随搅至完全混合均匀，当混合液中酒精浓度为 75% 时，多糖成絮状物缓慢沉下，放入冰箱，醇沉 24h，为了使混合液中酒精浓度达到 75% 原酒精加入量计算式：

$$[\text{酒精加入量} = 75 \times \text{浓缩液数量 (ml)} / (\text{该酒精浓度分子数} - 75)]$$

3.2.4 提取条件优化的正交试验因素选择^[46]

在单因素试验的基础上，选定 3 因素 3 水平做正交试验，浸提温度 70℃，80℃，90℃；浸提时间 10min，20min，30min；浸提料液比 1:1，1:2，1:3。

3.2.5 多糖含量的测定

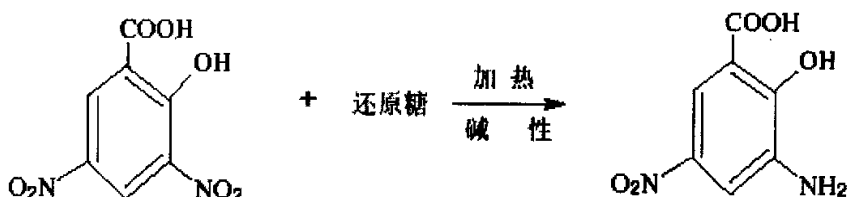
以硫酸-苯酚法测定多糖的含量，以葡萄糖为标准。

可溶性总糖含量：苯酚-硫酸法测定^[41]，配 100 $\mu\text{g/ml}$ 葡萄糖溶液分别取空白、0.2ml、0.4ml...2.0ml 放入试管以蒸馏水定容至 2ml。然后按样品：5% 苯酚：浓硫酸=1：0.5：2.5，加入 5% 苯酚及浓硫酸，沸水浴 10min，490nm 用 722 分光光度计测 OD 值，绘制标准曲线，取收集的粗红曲多糖 10mg 溶于 100ml 蒸馏水中，弃去不溶物，取 2ml 按上述方法测 OD 值。利用标准曲线计算浓度。

还原糖含量：3,5-二硝基水杨酸法测定^[41]。

还原糖在碱性条件下加热被氧化成糖酸及其它产物，3,5-二硝基水杨酸则被还原为棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸。在一定范围内，还原糖的量与棕红色物质颜色的深浅成正比关系，利用分光光度计，在 540nm 波长下测定光密度值，查对标准曲线并计算，便可求

出样品中还原糖和总糖的含量。由于多糖水解为单糖时，每断裂一个糖苷键需加入一分子水，所以在计算多糖含量时应乘以 0.9。



3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂: 将 6.3g DNS 和 262mL 2M NaOH 溶液，加到 500mL 含有 185g 酒石酸钾钠的热水溶液中，再加 5g 结晶酚和 5g 亚硫酸钠，搅拌溶解，冷却后加蒸馏水定容至 1000mL，贮于棕色瓶中备用。

按样品液: DNS 试剂=2ml: 1.5ml，将各管摇匀，在沸水浴中准确加热 5min，取出，冷却至室温，用蒸馏水定容至 20mL，加塞后颠倒混匀，在分光光度计上进行比色。调波长 540nm，用 0 号管调零点，测出各号管的光密度值。以光密度值为纵坐标，葡萄糖含量 (mg) 为横坐标，在坐标纸上绘出标准曲线。

多糖量=总糖量-还原糖量

3.2.6 可溶性蛋白含量的测定

考马斯亮蓝法^[22]

考马斯亮蓝试剂: 考马斯亮蓝 G-250 100mg 溶于 50ml 95%乙醇中，加入 100ml 85%磷酸，用蒸馏水稀释至 1000ml，滤纸过滤。最终试剂中含有 0.01% (W/V) 考马斯亮蓝 G-250，4.7% (W/V) 乙醇，8.5% (W/V) 磷酸。

标准蛋白质溶液: 结晶牛血清蛋白，预先经微量凯氏定氮法测定蛋白质含量，根据其纯度用 0.15mol/L NaCl 配制成 0.1mg/ml 蛋白质溶液。

标准曲线: 取 0.1mg/ml 标准蛋白质溶液 0ml、0.01ml、0.02ml、...0.1ml 用 0.15mol/L NaCl 溶液定容至 0.1ml，加 5ml 考马斯亮蓝试剂，摇匀，1h 内 595nm 处测紫外吸收。

测定样品蛋白质浓度: 取合适的未知样品晶体，使其测定值在标准曲线范围内，本试验配制成 1mg/ml 样品液。根据测定的 A_{595} 值，在标准曲线上查出其相当于标准蛋白的量，从而计算出未知样品蛋白质浓度。

3.2.7 提取液超滤^[47]

将提取液通过布氏漏斗抽滤,弃沉淀,将滤液用超滤膜进行超滤浓缩,在截留分子量 3000 的外压型超滤膜上以 0.05-0.1KPa 的压力下,平均流速 600ml/h 进行超滤,反复进行后得少量浓缩液和大量超滤液,浓缩液加入 4 倍体积 95%乙醇,放入冰箱中醇沉 24h,4000rpm 离心 5min,取沉淀。

3.2.8 杂蛋白的去除

将醇沉后的沉淀用 Sevag 法去除杂蛋白:将粗多糖样品溶于热水,加入 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇=5:1)振荡,蛋白质与氯仿-正丁醇生成凝胶,用分液漏斗分取脱去蛋白质,反复操作几次,直至正丁醇氯仿层不浑浊为止。

3.2.9 透析脱盐及小分子杂质

将除杂蛋白后的溶液装入截留分子量 8000-15000 的透析带中,流水透析 24h,蒸馏水透析 24h(换水三次),然后 4 倍体积 95%乙醇沉淀 24h 后收集沉淀,真空干燥得红曲粗多糖。

3.2.10 DEAE-纤维素柱层析

DEAE-纤维素的处理:市售 DEAE-纤维素——去离子水浸泡过夜——浮选法除去过细部分——重复 3-5 次——0.5mol/LNaOH 溶液浸泡 2h——蒸馏水洗至中性——0.5mol/LHCl 溶液浸泡 0.5h——蒸馏水洗至中性——悬浮于蒸馏水中,备用。

装柱:将处理好的 DEAE-纤维素装于玻璃柱中。

层析条件:依次用去离子水、0.1mol/LNaHCO₃、0.1mol/LNaOH 溶液洗脱,洗脱速度为 20ml/h,每管 4ml 分部收集,硫酸-苯酚法和 280nmUV 吸收法测定糖和蛋白质。

3.2.11 Sephadex G-200 柱层析

Sephadex G-200 溶胀,浸洗,装柱。用 0.1mol/LNaCl 溶液平衡 48h,恒流泵控制流速 0.5ml/min,装柱体积 2cm×100cm,上样量 50mg/3ml,用同一离子强度的洗脱液洗脱,每管 5ml 分部收集,硫酸-苯酚法测定多糖分布。收集峰值部分,浓缩,透析,醇沉,冷冻干燥,得纯红曲多糖。

3.2.12 纸层析^[13]

取新华一号滤纸(20cm×3cm),距端点 2cm 处中部点样,展开剂为正丁醇-乙醇-水(12:3:5)饱和 2h,室温下展开 2h,距前沿 1.5cm 时,取出吹干,用 0.5%甲苯胺兰乙醇液染色,立即用 95%乙醇漂洗至背景褪色,干燥。

田军等用的展开剂正丁醇-浓氨水-水(60:40:5),方法同上。

3.2.13 双向薄层层析

3.2.13.1 红曲多糖水解

取红曲多糖纯品 20mg, 加入 2mol/L H_2SO_4 3ml, 封管, 100℃水解 10h, $BaCO_3$ 中和, 上清液作组分分析。

3.2.13.2 层析试剂^[48]

薄层层析硅胶 G (60 型): 中国青岛海洋化工集团公司出品

甲酸: 北京益利精细化学品有限公司

无水乙醇: 天津市大茂化学试剂厂

D-甘露糖: 中国医药公司

葡萄糖: 北京化工

L-阿拉伯糖: 上海化学试剂站分装厂

木糖: 中国医药上海化学试剂公司

D-半乳糖: 上海试剂厂

苯酚: 天津市福晨化学试剂厂

浓氨水: 哈尔滨化工化学试剂厂

正丁醇: 长春市化学试剂厂

甲醇: 北京化工厂

其他药品: 碳酸钡, 浓硫酸, 磷酸二氢钠

3.2.13.3 层析制板

硅胶 G (60): 0.1mol/l 磷酸二氢钠溶液=5g: 10ml。用磁力搅拌均匀成糊状, 均匀铺在玻璃板上 (尽量薄一些), 放于阴凉处阴干 5h 以上, 放入 105℃烘箱烤 1h (活化), 然后关掉电源让其自然冷却至室温。

3.2.13.4 配单糖溶液

取各种单糖配成水溶液, 0.1g/ml 少量。

3.2.13.5 显色剂

苯酚 3g, 浓硫酸 5ml 放入 95ml 无水乙醇中, 以喷壶装上, 喷成雾状。

3.2.13.6 层析液的研究

目前关于真菌多糖的相关研究以单向薄层层析报道居绝大部分。于是我们首先以单向层析做试验, 分别在各种展开液中单向层析。结果表明其检测效果不是很理想。这主要是

由于拖尾现象严重,层析结果呈现条状,无法区分成分,再加上单向薄层层析本身具有局限性。所以本次试验改用双向薄层层析法进行研究并对展开剂种类进行研究^[49-56]。

种类一:正丁醇:甲酸:水=2:3:1 为一、二向展开剂

种类二:正丁醇:浓氨水:水=60:40:5 为一、二向展开剂

种类三:氯仿:甲醇:水=16:9:2 为一、二向展开剂

分别在三种展开剂中做双向薄层层析,再显色。对三种展开剂的展开效果加以比较,选择最佳的展开剂。

3.2.13.7 层析展开

将展开剂按比例混合加入层析缸,展开剂的量以淹没薄板 8-10mm 为宜。当展层剂爬到距平板上沿 2cm 左右取出。纵向展开结束后,取出薄板放置一段时间,使展开剂自然挥发,进行横向展开。用喷壶将显色液均匀喷在薄板上,将喷了显色剂的平板放入 100℃ 烘箱 10-15min。

3.2.14 分子量测定^[48]

Sephadex G-200 溶胀,浸洗,装柱。用 0.1mol/LNaCl 溶液平衡 48h,恒流泵控制流速 0.5ml/min,装柱体积 2cm×100cm,上样量 5mg/1ml,用同一离子强度的洗脱液洗脱,每管 5ml 分部收集。

分别将蓝色葡聚糖、黄色重铬酸钾、分子量 1 万、8 万、15.3 万、46.1 万、50 万葡聚糖依次上样,硫酸-苯酚法测定峰值,绘制标准曲线。再将红曲多糖上样,找到峰值,从标准曲线上查得分子量。

3.2.15 红外光谱分析^[57]

红外光谱又称为分子振动转动光谱,也是一种分子吸收光谱。当样品受到频率连续变化的红外光照射时,分子吸收了某些频率的辐射,并由其振动或转动运动引起偶极距的净变化,产生分子振动和转动的能级从基态到激发态的跃迁,相应于这些吸收区域的透射光强度减弱,记录红外光的百分透射比与波数或波长关系的曲线,就得到了红外光谱。因此红外吸收带的波长位置与吸收谱带的强度,反映了分子结构上的特点,可以用来鉴定未知物的结构组成或确定其化学集团,而吸收谱带的吸收强度与分子组成或化学集团的含量有关,可用于定量分析和纯度鉴定。由于红外光谱分析特征性强,气体、液体、固体样品都

可测定,具有用量少、分析速度快、不破坏样品的特点,因此,红外光谱法不仅能进行定性与定量分析,而且从分子的特征吸收可以鉴定化合物和分子结构^[57]。

采用固体试样压片法制样:将 2mg 红曲多糖纯品与 200mg 纯 KBr 研细混合均匀,置于模具中,用 $(5-10) \times 10^7 \text{Pa}$ 压力在油压机上压成透明薄片,即可用于测定。试样与 KBr 都应经干燥处理,研磨到粒度小于 $2 \mu\text{m}$,以免散射光影响。

在 TJ270-30 红外分光光度计上 IR 分析,扫描范围 $4000-400 \text{cm}^{-1}$ 。

3.2.16 蒽酮反应

取 8 只标号的试管,分别加入 1ml 蒽酮溶液(10-蒽酮-9, 10-二氢蒽),再将红曲多糖溶液分别滴加到各试管内,混匀,观察颜色变化。

3.2.17 溶液粘度

取红曲多糖纯品配 1% 的红曲多糖溶液,用 NDJ-1 型旋转粘度计测量。

3.2.18 碘液反应

取 8 只标号的试管,分别加入 1ml 碘液,将 1% 的红曲多糖溶液分别滴加到各试管内,混匀,观察颜色变化。

3.2.19 比旋光度的测定

当偏振光经过旋光性物质时,其偏振光的平面将被旋转,产生旋光现象。此时偏振光平面旋转的角度称为旋光度。在一定温度(通常用 t 表示,可为 20°C 或 25°C)、一定波长光线(黄色钠光可用 D 表示,波长 λ 为 589.3nm)下,偏振光透过每毫升含 1g 旋光物质,其厚度为 1dm 溶液时的旋光度,叫做比旋光度(或称旋光率、旋光系数)。

测量物质旋光度的仪器称为旋光仪。溶液的旋光度与溶液中所含物质的旋光能力、溶液性质、溶液浓度、样品管长度及温度等均有关系。当其它条件固定时,旋光度 α 与反应物浓度 C 呈线形关系。

物质的旋光能力用比旋光度来度量,比旋光度用下式表示:

$$[\alpha]_D^{20} = \alpha \cdot 100 / L \cdot C_A$$

式中 $[\alpha]_D^{20}$ 右上角的“20”表示试验时温度为 20°C , D 是指用钠灯光源 D 线的波长(即 589nm), α 为测得的旋光度($^\circ$), L 为样品管长度(dm), C_A 为浓度($\text{g}/100 \text{ml}$)。

利用 WZZ-1 型自动指示旋光仪(上海浦东物理光学仪器厂),测红曲多糖溶液的比旋光度。

3.3 结果与讨论

3.3.1 提取条件优化正交试验结果

表 14 正交试验方案设计

Table.14. The scheme of L₉ (3⁴) orthogonal experimental table

试验号 Number of experiment	温度(℃) Temperature	时间(min) Time	料液比	空白 Blank	多糖产量(g/L) polysaccharid es yield
1	70	10	1:1	0	4.213
2	70	20	1:2	0	4.381
3	70	30	1:3	0	5.760
4	80	10	1:2	0	5.230
5	80	20	1:3	0	5.980
6	80	30	1:1	0	5.693
7	90	10	1:3	0	6.653
8	90	20	1:1	0	6.136
9	90	30	1:2	0	6.379
K1	14.354	16.096	16.042	16.572	T=50.425
K2	16.903	16.497	15.990	16.727	$\bar{y}=5.603$
K3	19.168	17.832	18.393	17.126	
K1	4.785	5.365	5.347	5.524	
K2	5.634	5.499	5.330	5.576	
K3	6.389	5.944	6.131	5.709	
R(极差)range	1.604	0.579	0.801	0.185	
主次sequence	A>C>B				
最优组合	A ₃ C ₃ B ₃				
optimum					

通过正交结果分析,最优提取条件为浸提温度 90℃, 浸提料液比 1: 3, 浸提时间 30min。其中浸提时间的影响较弱。

3.3.2 方差分析结果^[37]

表 15 正交试验的方差分析

Table.15. The analysis of variance on L₉ (3⁴) orthogonal experimental table

方差来源 Variance source	平方和Q Sum of squares	自由度f Degree of freedom	均方和V Sum of mean square	Fe值 Fe value	显著性 Significance
A	3.866914	2	1.933457	71.00437	*
B	0.550747	2	0.275373	10.11283	不显著
C	1.256035	2	0.628017	23.06334	*
误差 (error)	0.05446	2	0.02723		
总和 (resultant)	5.728156	8			

临界值 $F_{0.05}(2, 2)=19.00$, $F_{0.01}(2, 2)=99.00$, *表示比较显著

方差分析结果表明，浸提温度和浸提料液比是试验控制的关键因素，必须按优化的方案进行，浸提时间为不显著因素，在试验紧张的情况时可以考虑采用 10min 或 20min。

3.3.3 提取优化条件检验

在 250ml 的三角瓶中加入培养基 50ml，在 35℃，转速 220r/min 的旋转式摇床上培养，采用优化的提取条件进行多糖提取，结果见 16。

表 16 多糖的提取条件检验试验

Table 16 The proof-tests of the extraction conditions for polysaccharides

试验批次	1	2	3	4	5	平均
多糖提取量 g/L	6.70	6.51	6.63	6.75	6.72	6.66

试验得红曲多糖的提取量上升到 6.66g/L，比培养基优化后的提取量高出 20% 。

3.3.4 提取条件优化结果

通过正交试验优化得最佳提取条件为：浸提温度 90℃，浸提料液比 1：3，浸提时间 30min。通过方差分析，浸提温度和料液比对多糖提取量影响显著，而浸提时间的影响较弱，可以适当缩短提取时间。提取条件的优化组合后多糖提取量达 6.66g/L，比优化培养基后多糖的产量提高 20%。

3.3.5 多糖含量测定结果

表 17 葡萄糖标准曲线制作

Table 17 the standard curve of glucose

管 号	100μg/mL 葡萄糖标 准液 (mL)	蒸馏水 (mL)	5%苯酚 (mL)	浓硫酸 (mL)	葡萄糖含量 (mg)	光密度值 (OD _{490nm})
0	0	2.0	1	5	0	0
1	0.2	1.8	1	5	0.02	0.095
2	0.4	1.6	1	5	0.04	0.241
3	0.6	1.4	1	5	0.06	0.349
4	0.8	1.2	1	5	0.08	0.491
5	1.0	1.0	1	5	0.10	0.556
6	1.2	0.8	1	5	0.12	0.676
7	1.4	0.6	1	5	0.14	0.802
8	1.6	0.4	1	5	0.16	0.912
9	1.8	0.2	1	5	0.18	1.024
10	2.0	0	1	5	0.20	1.189

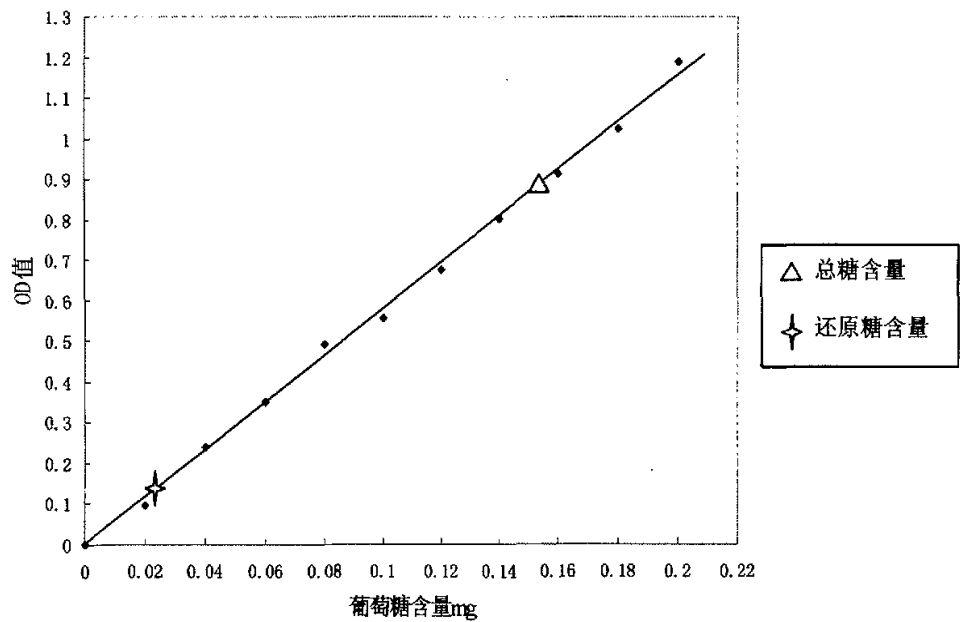


图 5 葡萄糖标准曲线

Fig 5 the standard curve of glucose

$$\text{测得总糖含量} = \frac{0.156 \times \frac{1}{2} \text{mg/ml}}{0.1 \text{mg/ml}} = 78\%$$

$$\text{测得还原糖含量} = \frac{0.025 \times \frac{1}{2} \text{mg/ml}}{0.1 \text{mg/ml}} = 12.5\%$$

$$\text{则多糖含量} = 78\% - 12.5\% = 65.5\%$$

3.3.6 可溶性蛋白的测定结果

表 18 蛋白质含量标准曲线的制定

Table 18 The method of standard curve of protein content

项目	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
标准蛋白 ml	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10
蒸馏水 ml	0.10	0.09	0.08	0.07	0.06	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0
G250 溶液 ml	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
蛋白含量 mg	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
OD _{595nm}	0	0.05	0.10	0.16	0.202	0.247	0.306	0.366	0.405	0.455	0.50

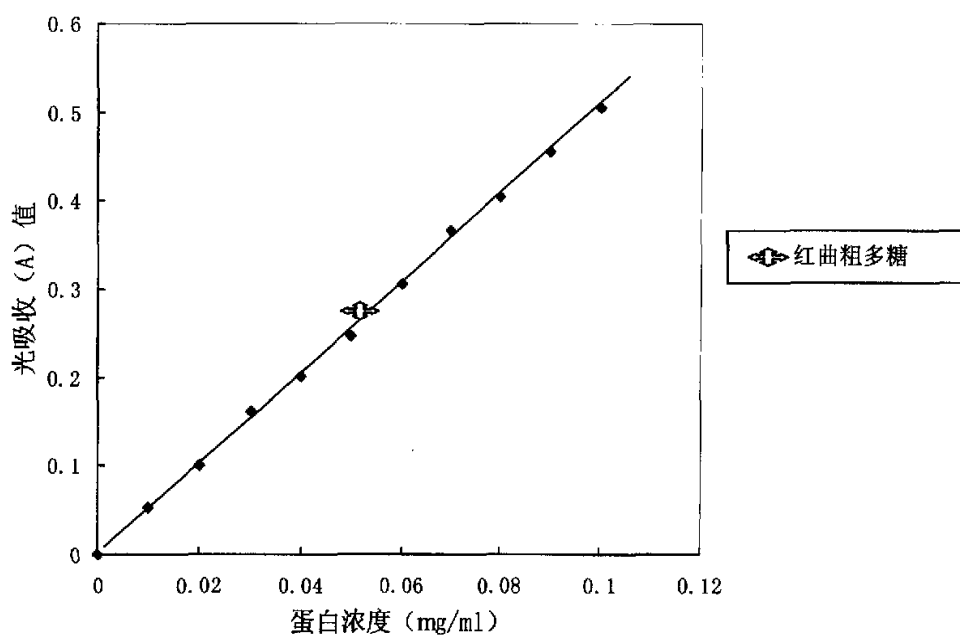


图 6 蛋白质含量标准曲线

Fig.6 The standard curve of protein content

$$\text{测定红曲粗多糖中可溶性蛋白的含量} = \frac{0.052\text{mg/ml}}{1\text{mg/ml}} = 5.2\%$$

3.3.7 超滤过程对多糖提取率的影响

在多糖化学研究中能分离出均一的多糖是非常重要的。多糖提取液一般都是浓度小、体积大,因此在多糖分离前首先要进行浓缩,但通常的浓缩方法都是在加热情况下进行的,应用超滤法则完全可以在室温下达到快速大量地浓缩多糖溶液,收率高且极少破坏。但外源压力迫使小分子量溶质透过薄膜,而大分子被截留于膜表面,出现“浓差极化”现象。引起流速下降,同时影响到膜的透过选择性,超滤浓缩过程中多糖损失高达40%左右,但是超滤一段时间后进行反洗,则会使“浓差极化”减到最低限度,同时堆积的多糖可进行大量回收。稀溶液比浓溶液流率高得多,在超滤过程中适当向浓缩液中补充一定量水分可使分离纯化效果更佳。

3.3.8 除蛋白方法对多糖提取率的影响

与多糖一起沉淀下来的蛋白质对多糖测定值及纯度产生很大的影响。一般采用Sevage法除去杂蛋白质,蛋白质总去除率可达到92%,但同时多糖损失率也很高。因此利用这个方法除蛋白的时候次数不易太多,以免多糖损失过多。多糖中残余的极少量的蛋白可以在柱层析中除掉。

3.3.9 柱层析对红曲多糖纯化的影响

用DEAE纤维素柱层析洗脱多糖,呈单一洗脱峰且只有蒸馏水洗脱时出现,证明红曲多糖是单一纯组分,而且是水溶性的。

用Sephadex G-200凝胶柱层析进行制备时应充分考虑装柱的最大负荷,即极限负荷,加样体积越小,多糖的纯化效果越好。随着制备时样品量的加大,易造成分辨率下降,使收集的多糖中可能出现杂质,而使纯度不够。

3.3.10 红曲多糖的溶解性分析

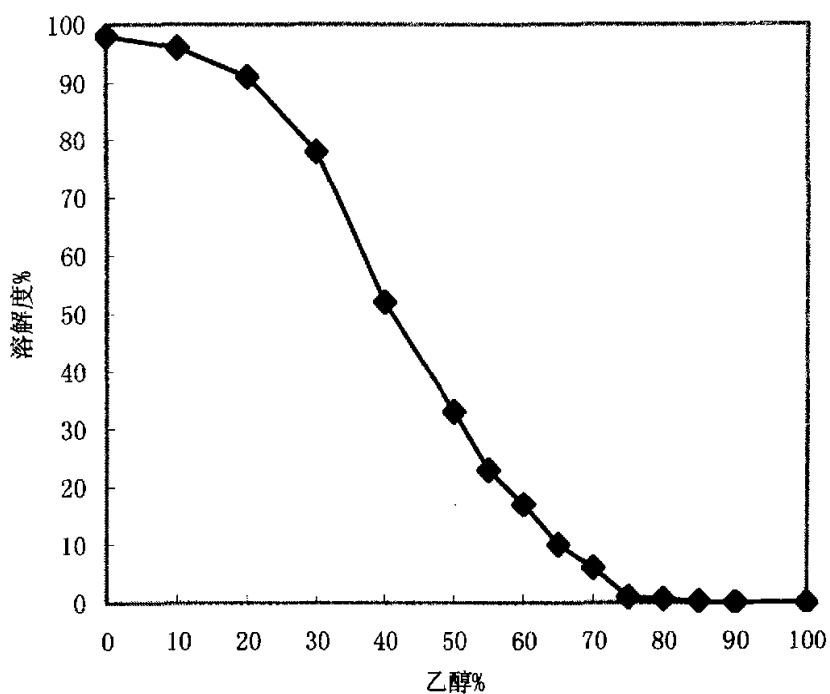


图 7 红曲多糖在醇类水溶液中的溶解度曲线

Fig 7 the solubility curve of *Monascus* polysaccharides

上图表明，红曲多糖在水中有较高的溶解性，但是在醇类中，特别是在高浓度的乙醇中溶解度很低，说明用醇沉淀仍是分离该多糖的较好方法。

3.3.11 多糖纯度的鉴定结果

纸层析上只有一个海蓝色斑点，表明红曲多糖是单一纯物质。

新华一号滤纸（20cm×3cm）层析过程中，先用田军等用的展开剂正丁醇-浓氨水-水

(60: 40:5), 无法显出斑点。分析原因层析操作展开剂的极性应该与样品的极性相同或相近, 田军用的是碱性展开剂, 而红曲多糖溶液 pH6。后来改用展开剂为正丁醇-乙醇-水 (12: 3: 5), 展开成功。

Sephadex G-200 柱层析呈单洗脱峰表明多糖组分均一。

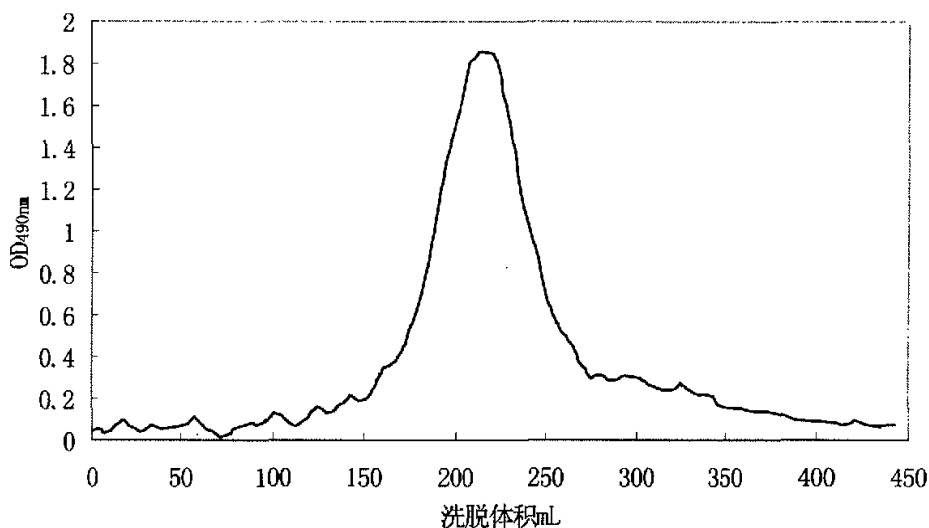


图 8 红曲多糖过 G-200 柱的洗脱曲线

Fig8 Elution Curve of Monascus polysaccharide by Sephadex G-200 Gel Filtration

3.3.12 多糖的物理性质

红曲多糖粗品为浅红色粉末, 纯品为白色粉末, 较易溶于水, 水溶液粘稠, pH6 左右, 无色无味, 1% 的红曲多糖水溶液粘度 460mPa. s, 与碘试剂不呈蓝色。苯酚-硫酸反应呈桔红色, 蒽酮试剂反应呈蓝绿色, 比旋光度 $[\alpha]_D^{20}=1.66$ 。不溶于高浓度乙醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂。

3.3.13 多糖的单糖组成分析结果

双向薄层层析中第一种展开剂层析显色后, 呈现出层析速度慢, 分离效果差的特点。第二种展开剂层析显色后, 呈现出跑带拖尾, 呈长条状, 分离效果比较差。第三种展开剂层析显色后, 基本可以区分出成分, 效果最佳。分析原因得到以下结论: 样品的酸碱度决

定选用展开剂的种类。若样品组分具有酸碱性，可将展开剂的 PH 值做适当的调整，以增加展开剂的分辨率，使组分在薄层上展层后，斑点圆而集中，避免拖尾。因为种类二呈碱性，种类三呈酸性，而红曲多糖水解液呈酸性，又由于种类一的酸性过高，故而本试验采用种类三为最佳展开剂。

本试验采用双向薄层层析方法，对红曲多糖的组分进行了测定，基本确定了红曲多糖中含有甘露糖、葡萄糖、半乳糖。

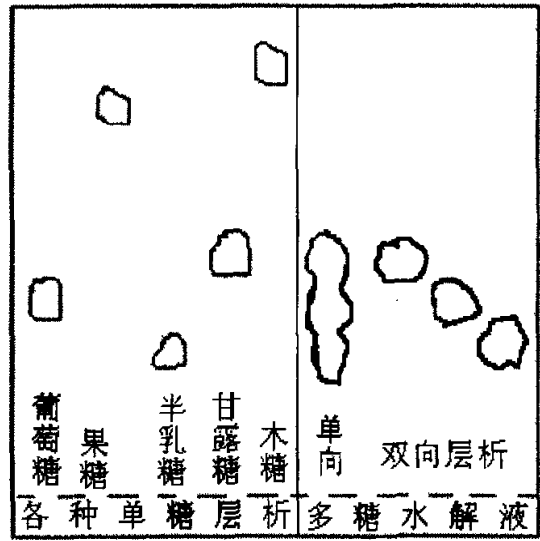


图 9 多糖水解液的薄层层析图谱

Fig9 Thin-layer Chromatography of polysaccharides hydrolysate

3.3.14 多糖的分子量确定结果

采用Sephadex G-200进行凝胶过滤层析测定分子量，根据有效分配系数Kav值进行计算，以标准分子量葡聚糖的logM与其Kav值作图。但用凝胶过滤法所测得的分子量是近似分子量，误差往往在10%左右，对于线性分子的误差可能还大于此值。^[22]

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

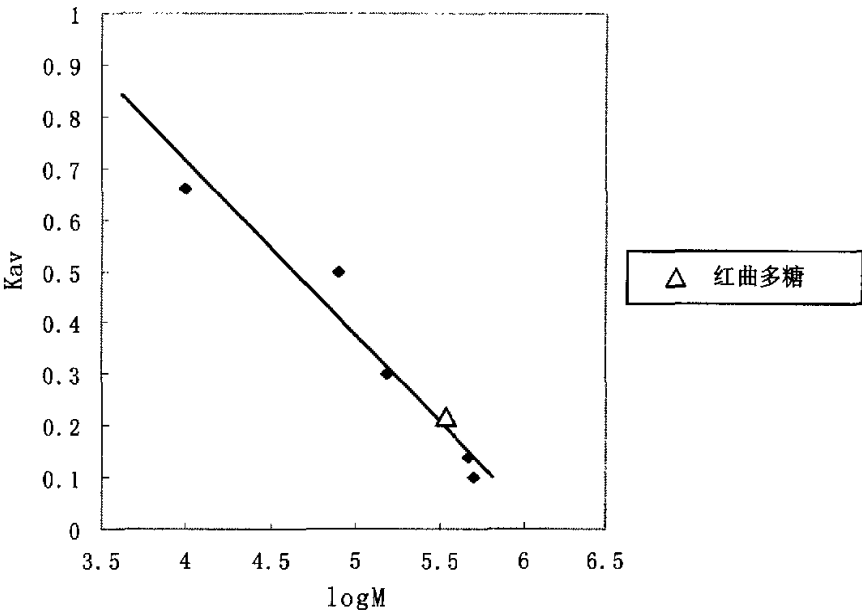


图 10 G-200 层析标准曲线
Fig10 The standard curve of G-200 chromatogram

由上图得红曲多糖的分子量约 31.6 万。

3.3.15 多糖的光谱分析结果^[56]

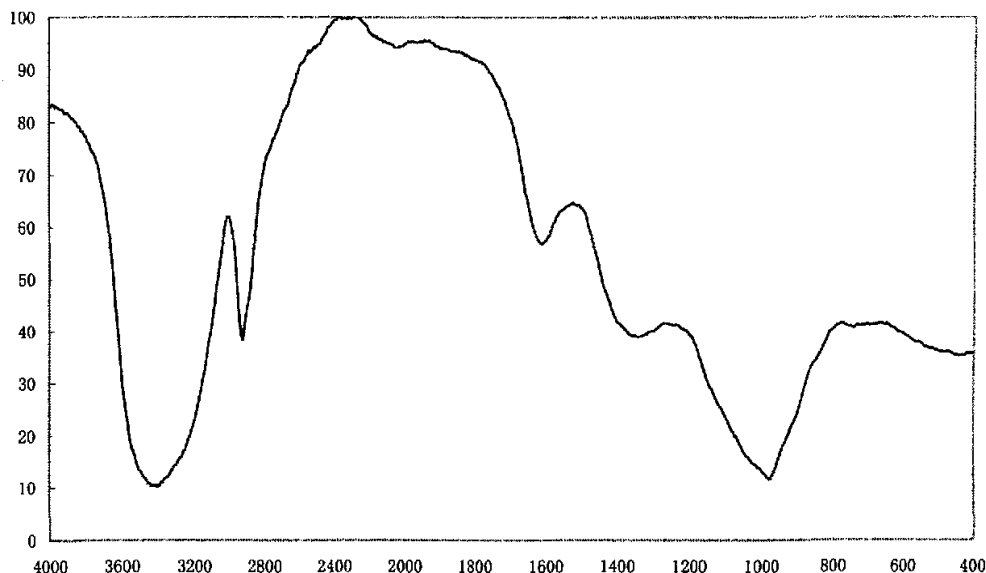


图 11 红曲多糖红外光谱图

Fig11 The IR spectrogram of Monascus polysaccharides

由上图, 3408cm^{-1} 左右有一个宽峰是 O-H 伸缩振动, 2924cm^{-1} 有一窄峰是糖类 C-H 伸缩振动, 这两组峰是糖类的特征吸收峰。 1612cm^{-1} 吸收峰是 β -糖苷键的特征吸收。 1342cm^{-1} 吸收峰是 C-H 变角振动。 980cm^{-1} 吸收峰是吡喃糖环的特征吸收。由此得, 被测物是 β -吡喃型多糖。

3.4 提取纯化及理化性质研究小结

通过正交试验优化得最佳提取条件为: 浸提温度 90°C , 浸提料液比 1: 3, 浸提时间 30min。通过方差分析, 浸提温度和料液比对多糖提取量影响显著, 而浸提时间的影响较弱, 可以适当缩短提取时间。提取条件的优化组合后多糖提取量达 6.66g/L , 比优化培养基后多糖的产量提高 20%。

利用苯酚-硫酸法测得红曲粗多糖中总糖含量为 78%; 利用 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖含量为 12.5%; 则多糖含量 65.5%。利用考马斯亮蓝法测定可溶蛋白含量为 5.2%。

通过试验确定了红曲粗多糖的纯化工艺, Sevag 法除杂蛋白, 透析带除盐及小分子物质, Sephadex G-200 柱层析, 收集峰值的糖, 冷冻干燥得红曲多糖纯品。

纸层析上只有一个海蓝色斑点, 表明红曲多糖是单一纯物质。确定了展开剂为正丁醇-乙醇-水 (12: 3: 5)。Sephadex G-200 柱层析呈单洗脱峰表明多糖组分均一。

通过一系列生化试验, 红曲多糖粗品为浅红色粉末, 纯品为白色粉末, 较易溶于水, 水溶液粘稠, pH6 左右, 无色无味, 1% 的红曲多糖水溶液粘度 460mPa. s, 与碘试剂不呈蓝色。苯酚-硫酸反应呈桔红色, 蒽酮试剂反应呈蓝绿色, 比旋光度 $[\alpha]^{20}_D = 1.66$ 。不溶于高浓度乙醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂。

本试验采用双向薄层层析方法, 红曲多糖经 2mol/L 硫酸水解, 展开剂氯仿: 甲醇: 水 = 16: 9: 2, 对红曲多糖的组分进行了测定, 基本确定了红曲多糖中含有甘露糖、葡萄糖、半乳糖。

采用 Sephadex G-200 进行凝胶过滤层析, 上样量 5mg/1ml, 0.1mol/L NaCl 溶液洗脱, 利用已知分子量的葡聚糖做标准曲线, 测定红曲多糖分子量为 31.6 万。

红外光谱 IR 分析: 将 2mg 红曲多糖纯品与 200mg 纯 KBr 研细混合均匀在油压机上压成透明薄片, 在 TJ270-30 红外分光光度计上 IR 分析, 扫描范围 $4000-400\text{cm}^{-1}$, 得出红曲多糖是 β -吡喃型多糖。

第三部分 结 论

1 试验结果

(1) 以红曲霉 AS 3.4701 为出发株, 经紫外线诱变获得了一株最佳突变株 ZH-100, 该突变株经传代试验证明具有稳定的遗传性, 红曲多糖产量平均高达 4.35g/L, 比出发菌株提高产量 286%。并确定了其斜面培养基: 麦芽汁糖度 6-8.5 波美度, pH6-7, 2% 琼脂。(首次报道)

(2) 通过对 ZH-100 发酵条件优化试验的研究, 确定了其培养基组成及发酵条件, 即以大米浆为基础培养物(固形物 10%), 加入 NaNO_3 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, KH_2PO_4 0.25%, pH 自然, 温度 35℃, 220r/min 摇床培养 96 小时。多糖产量 5.53g/L, 高出初始条件 27%。

(3) 通过正交试验优化最佳提取条件为: 浸提温度 90℃; 浸提料液比 1:3; 浸提时间 30min。红曲多糖的产量为 6.66 g/L, 高出初始条件 20%。最佳纯化工艺为: Sevag 法除杂蛋白, 透析带除盐及小分子物质, Sephadex G-200 柱层析, 得红曲多糖纯品。(首次报道)

(4) 红曲多糖的理化性质分析表明: 红曲多糖粗品为浅红色粉末, 纯品为白色粉末, 较易溶于水, 水溶液粘稠, pH6 左右, 无色无味, 1% 的红曲多糖水溶液粘度 460mPa.s, 与碘试剂不呈蓝色。苯酚-硫酸反应呈桔红色, 蒽酮试剂反应呈蓝绿色, 比旋光度 $[\alpha]^{20}_D = 1.66$ 。不溶于高浓度乙醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂。

(5) 本试验所得红曲粗多糖中总糖含量为 78%, 还原糖含量为 12.5%, 则多糖含量 65.5%, 可溶蛋白含量为 5.2%。

(6) 纸层析上只有一个海蓝色斑点, Sephadex G-200 柱层析呈单洗脱峰, 表明红曲多糖组分均一; 经红外光谱 IR 分析, 得出红曲多糖属于 β -吡喃型多糖; 采用双向薄层层析方法, 基本确定了红曲多糖中含有甘露糖、葡萄糖、半乳糖; Sephadex G-200 凝胶层析测定红曲多糖分子量为 31.6 万。

(7) 毒理试验证明红曲多糖对小鼠无明显的毒害作用; 三氯甲烷致中毒试验说明红曲多糖有保肝护肝作用。(首次报道)

(8) 通过 DTH 和碳粒廓清试验证明红曲多糖能提高小鼠细胞免疫功能; 游泳试验和耐缺氧能力试验说明红曲多糖在提高机体耐疲劳能力和缺氧条件下生活能力方面作用不大。(首次报道)

2 试验的不足和后续的研究方向

本研究欠缺液相色谱、气相色谱、圆二色光谱、隧道扫描等较高科技仪器的支持, 后续将做这几项测定, 另外后续准备研究开发几种保健食品及饮品。

参 考 文 献

- [1] 于自然、黄熙泰等, 现代生物化学[M], 化学工业出版社, 2001.9 第一版, 193-201
- [2] 李艳辉、王琦, 真菌多糖的生物活性与构效关系研究评介[J], 吉林农业大学学报, 2002、24 (2), 70-74
- [3] 陈洪亮、张家祥、李德发等, 多糖的免疫调节作用及应用[J], 饲料与博览, 2002(7), 27-29
- [4] Kurashige S, Akuzawa Y, Endo F. Effects of Lentinan edodes, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak, and activities of macrophage and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N' butanolnitrosoamine [J]. *Immunopharmacol*, 1997, 19(2): 175-183.
- [5] Facher J, Able G, Jusupova A, et al. Potentiation nonspecific host defense by polysaccharides like lentinan: possible mechanisms [J]. *Int J Immunotherapy*, 1989. 11(5): 167.
- [6] 田庚元、冯宇澄、林 颖, 植物多糖的研究进展[J], 中国中药杂志, 1995. 20(7):441.
- [7] 吕苏成、曹玛莉、曹巧莉, 茯苓多糖对肺癌患者细胞免疫功能及临床疗效的观察[J], 上海免疫学杂志, 1994、14(2):109
- [8] 林晓明、冯建英、龙 珠等, 银耳、茯苓对小鼠免疫调节效应的观察[J], 免疫学杂志, 1995、11(1):65
- [9] 林晓明、冯建英、龙 珠等, 银耳、茯苓、绞股蓝对小鼠免疫功能和清除自由基的作用[J], 北京医科大学学报, 1995、27(6):455
- [10] 吴 波、梁 谋、佟 丽等, 茯苓多糖抗肿瘤作用与机理的试验研究[J], 中国药理学通报, 1994、10(4):30.
- [11] 芮海云、吴国荣、陆长梅, 多糖类生物活性的研究在医药领域的应用[J], 淮阴师范学院学报(自然科学版), 2002、1 (3), 77-79
- [12] 陈运中, 红曲色素、多糖与核酸的联合制备的研究[J], 中国酿造, 2002、1, 26-27
- [13] 田军、李兆兰、沈晓云等, 红曲多糖的化学结构分析[J], 南京中医药大学学报, 1998. 7, 14 (4), 217-218

- [14] 赵振锋、方惠英、诸葛健, 红曲霉发酵产胞外多糖工艺的优化[J], 无锡轻工大学学报, 2002、21 (3), 289-291, 295
- [15] 沈士秀, 红曲的研究、生产及应用[J], 食品工业科技, 2001、22 (1), 85-87
- [16] 袁学千、王淑梅、高权国, 刺五加多糖增强小鼠免疫功能的实验研究[J], 中医药学报, 2004、32 (4), 48-49
- [17] 于善谦、王洪海、朱乃硕等, 免疫学导论[M], 高等教育出版社, 1999.7 第一版, 93-118, 183-212, 232-236
- [18] 吴思泗, 实验动物设施设计探讨[J], 实验动物科学与管理, 1995、12 (2), 14-25
- [19] 金药芳、梁惠珍、曹翠玉等, 甘蔗多糖的免疫活性[J], 中国药理学报, 1981、2 (4), 269-275
- [20] 于敏、沈业寿、梅一德等, 蜜环菌菌索多糖的免疫增强作用研究[J], 生物学杂志, 2001.18 (4), 16-18
- [21] 张雯、瞿伟菁、张晓玲等, 金耳菌丝体多糖降血压作用研究[J], 营养学报, 2004. 26 (4), 300-303
- [22] 李建武主编, 生物化学试验原理和方法[M], 北京大学出版社, 1994.9 第一版, 47-57, 174-177, 313-317
- [23] 邓淑文、肖碧玉、马龙等, 巴旦杏仁浸出液对小鼠免疫功能的影响[J], 营养学报, 1998、20 (2), 234-235
- [24] 徐月清、曹志然、李立萍等, 灵芝对小鼠免疫功能调节作用的研究[J], 实验动物科学与管理, 1999.16 (1), 18-20
- [25] 张劲松、李君安, 虫草洋参胶囊对小鼠免疫功能影响的研究[J], 实验动物科学与管理, 2000. 17 (1), 25-26. 29
- [26] 史亚丽、辛晓林、杨立红等, 香菇多糖对力竭小鼠抗疲劳及保肝作用研究[J], 吉林农业大学学报, 2004, 26 (3), 301-304
- [27] 王敏、路福平, 四环素生产菌诱变育种与发酵性能的研究[J], 中国抗生素杂志, 2000, 25 (2): 97
- [28] 杨汝德主编, 现代工业微生物学[M], 华南理工大学出版社 2002, 207-209
- [29] 中国普通微生物菌种保藏中心, 菌种保藏目录[M], 中国农业出版社, 1997 第三版, 231
- [30] 顾国贤, 酿造酒工艺学[M], 中国轻工业出版社, 1996、12 第二版, 110-167
- [31] 王玮萍、吴思方, 红曲霉红色素高产菌株的诱变选育[J], 中国酿造, 2003; (3): 26-28
- [32] 魏培连、周立平, 高产降胆固醇活性物质的红曲霉菌种选育研究[J], 氨基酸和生物资源, 2002,

- 24 (3): 18-22
- [33] 陈声明、刘丽丽, 微生物学研究法[M], 北京, 中国农业科技出版, 1996, 101-109
- [34] 邢维玲、周希贵, 多粘菌素 E 高产菌株的选育[J], 中国抗生素杂志, 2002, 27 (6) 326-327
- [35] 李卫旗、何国庆, ^{60}Co -r 射线诱变选育热凝胶多糖高产菌株的研究[J], 核农学报, 2003, (715): 343-346
- [36] 叶竹秋、林跃鑫, 巴西蘑菇多糖提取方法的研究[J], 食用菌, 2000, 22 (6) 7-9
- [37] 孙东平、潘峰, 灵芝菌发酸培养基的优化及灵芝胞外多糖的分离纯化[J], 中草药, 2000; 31 (12), 29-32
- [38] 高嘉安、郭东、王德辉等, 产 Monacolin K 红曲霉菌的筛选及发酵条件的研究[J], 吉林农业大学学报, 1997, 19 (3), 85-90
- [39] 李平作、徐柔、章克昌, 灵芝胞外多糖深层发酵培养基的优化[J], 无锡轻工业大学学报, 1998, 17 (4), 26-30
- [40] EVELEIGH D E. Handbook of Microbiology [M]. New York : Academic Press, 1978, 84-102
- [41] 张惟杰, 糖复合物生化研究技术[M], 浙江大学出版社, 1999 第二版, 96-101
- [42] 刘建华、张志军, 灵芝多糖提取与应用现状[J], 保鲜与加工, 2003, 3 (3), 9-10
- [43] Sasaki T, Tankasuka N, Chihara G , et al. Antitumor activity of degraded products of Lentinan: its correlation with molecular weight[J]. Gann, 1976, 67 (2): 191-195.
- [44] 鞠海、张建民、魏锋等, 天然多糖的分离、纯化和结构鉴定[J] 国外医药·植物药分册, 2000, 15 (3): 107-113.
- [45] 王森、丁萧霖, 葡聚糖生物活性与结构的关系[J], 无锡轻工大学学报, 1997. 16 (2): 90-94
- [46] 尹源明、何国庆、郑晓冬等, 大麦中活性多糖提取的研究[J], 中国粮油学报, 2002. 17 (1), 43-45
- [47] 陈灵、罗九甫, 利用中空纤维超滤分离和浓缩灵芝多糖[J], 上海交通大学学报, 1996, 30 (11), 114-117
- [48] 叶姜瑜、谈锋, 紫芝多糖的纯化及组分分析[J], 西南师范大学学报(自然科学版), 2002. 27 (6), 945-949
- [49] 胡晓清、陈福生、邢淑婕, 红曲中桔霉素的薄层层析分析[J], 食品科学, 2003. (5). 126-129
- [50] 尹靖先、邓晓鸿、车晓彦等, 苍耳子的薄层层析鉴别研究[J], 华西药学杂志, 2005. (1), 67-69
- [51] 李森, 用高效薄层层析法测定盐酸托哌酮[J], 国外医学, 药学分册, 1999. (5). 25-29

- [52] 张新利, 九牛造苯提取物的薄层层析[J], 宝鸡文理学院学报(自然科学报), 2004. (2). 132-133
- [53] 李铭刚、Groth Ingrid、李一青等, 薄层层析指导下的嗜碱放线菌菌株 YIMGQ-14 次生代谢产物研究[J], 微生物学报, 2003. (4). 33-35
- [54] 程秀民、任健、高彦慧, 西洋参薄层鉴别方法的改进[J], 中草药, 2003. (8). 665-666
- [55] 刘响、蔡庆海, 三氯蔗糖中间体的薄层层析分析[J], 河北化工, 2003. (4). 57
- [56] 于东梅, 用薄层层析法测定洋素馨中香油含量[J], 佳木斯大学学报, 自然科学版, 2002. (3). 43-44
- [57] 北京大学化学系, 仪器分析教程[M], 北京大学出版社, 1997. 5 第一版, 53-81
- [58] 杜巍、袁静、李元瑞, 灰树花菌丝体多糖 G.F.-1 的分离纯化及其理化特性的研究[J], 基础研究, 2003. 24 (3), 35-39

致 谢

本研究及学位论文是在我尊敬的导师陈光教授的亲切关怀和悉心指导下完成的。陈光教授严肃的科学态度、严谨的治学精神，精益求精的工作作风，诲人不倦的师道品格，耐心细致的言传身教深深地感染和激励着我。

在整个研究和论文撰写的过程中，应感谢吉林农业大学生物技术学院提供的试验场所和试验条件，感谢生物工程办公室的全体同仁的热心帮助，感谢生化教研室宋慧教授、柴晓杰、崔喜艳等老师和试验员的帮助，感谢生物技术教研室老师和试验员的帮助，感谢院办的帮助，特别感谢陈淑洁和刘丽两位试验员的全力帮助。感谢吉林农业大学研究生处沈广汇老师对我学习过程中的支持与帮助。

在整个研究和论文撰写的过程中，还得到了王刚、高俊鹏、薛健、王永志、徐亚维等同学的倾力相帮。感谢生物技术学院的一些本科同学的帮助。在此一并表示万分敬意和衷心感谢。

最后，由衷地希望在未来的日子里，各位导师和朋友们一如既往在各方面给予我更多的指教，以期取得新的进步和成绩来回报大家。