

3 讨论

3.1 生物防治西洋参真菌病害应用前景

在目前西洋参的种植中,许多病害的控制仍然以使用化学农药为主。虽然杀菌剂对许多西洋参真菌病害能产生直接的理想效果,但有效的化学农药在整个生态系统中经常发生负作用,甚至有害于西洋参生长环境。

近年来,回归大自然的世界性潮流为西洋参的发展提供了前所未有的机遇和挑战。随着人们保健及环保意识的增强,农药对西洋参的污染日益引起多方关注。西洋参是人们用以防病治病的特殊商品,一旦被农药污染,将可能对人体产生潜在威胁,尤其是疾病状态的人体,往往解毒功能较差,比健康人更易受损;加之中药汤剂的临床用量常较大,有的还需长期服用,确有必要控制其污染。

3.2 试验结果讨论

本试验筛选出的拮抗菌对西洋参的真菌病害均有较强的抑制作用。同时田间防治试验证明,筛选出的拮抗菌对西洋参的真菌病害也有较好的防治效果,经 PDA 平板拮抗试验表明,该菌对西洋参的真菌病害的抑制力均在 90 以上。田间试

验结果表明该菌对西洋参的病害具有一定的防治效果,使四年生西洋参的平均发病率降低了 54.2%。同时,从处理组的西洋参的有效成分的测定结果看出,该拮抗菌并没有使西洋参的有效成分降低,从而保证了拮抗菌使用的安全性。

3.3 试验存在的不足

由于 2004 年气候原因造成西洋参病害大发生,因此,发病率较往年偏高。生防菌的抑菌机制主要是营养基质的竞争。本试验分离筛选得到的拮抗菌对西洋参真菌病害的抑制作用机制之一是营养物质的竞争,是否还包含有其它机制,有待今后研究。

参考文献:

- [1]王静慧,吴文良.北京怀柔西洋参产业发展战略研究[J].西北农林科技大学学报,2003,31(4):28-33.
- [2]王铁生.科技为本促进我国西洋参产业持续发展[J].人参研究,2000,12(1):2-9.
- [3]丁万隆,程惠珍,陈君.应用木霉制剂防治几种药用植物病害的研究[J].中国中药杂志,2003,28(1):24-27.
- [4]产祝龙,丁克坚,檀根甲,等.哈茨木霉对水稻恶苗病菌的拮抗作用[J].植物保护,2003,29(3):35-40.

枸杞多糖提取工艺的研究

龚涛,任大明,王楠

(沈阳农业大学生物科学技术学院生物工程重点实验室,辽宁 沈阳 110161)

摘要:采用热水浸提法从枸杞干果中提取枸杞多糖,经正交实验确定浸提时间、温度、料水比最优值分别为:5h、100℃、1:40;微波预处理超过 25min 时,多糖得率达 15.91%;醇沉时当醇沉时间为 4h、乙醇加入量为 4 倍时有利于枸杞多糖提取。

关键词:枸杞;枸杞多糖;提取

中图分类号:Q539 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2005)06-0078-03

Study on Distillation Technics of *Lycium barbarum* Polysaccharide

GONG Tao, REN Da-ming, WANG Nan

(College of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: *Lycium barbarum* polysaccharide were extracted by the methods of water extracting, and the optimum extraction technology was determined by orthogonal experiments. The optimum parameters to extract were as follows: the extracting time 5h, temperature 100℃, ratio of water to material 1:40; With microwave-assisted extraction for over 25 minutes, the extraction percent will reach 15.91%; Extraction concentrated to proper volume was precipitated with 4 times volume of 95% ethanol for 4 hours.

Key words: *Lycium barbarum*; *Lycium barbarum* polysaccharide; extracting

枸杞系落叶灌木,果实枸杞子味甘,性平,有滋肾补髓,养肝明目和祛风的作用,为一传统滋补中药。近几十年来,许多学者对枸杞进行了深入的研究,发现它在调节免疫、抗衰老、抗肿瘤、降低血脂和血糖等方面表现出广阔的应用前景^[1-3],同时对枸杞子的化学成分及其药理也进行了大量的研究^[4,5],发现枸杞子含有丰富的氨基酸、无机盐、微量元素和维生素。大量研究表明,枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharide, LBP)是其主要的保健功能因子,目前提取枸杞多糖多采用热水浸提与水醇沉法,但对影响 LBP 提取的各因素的最优值研究甚少。本文首次对 LBP 的提取工艺进行了较系统的研究,确定了 LBP 提取的最佳工艺;并初次采用微波加热和超声波两种方法对枸杞子进行预处理,探讨了两种方法对多糖得率的影响。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 枸杞子:宁夏中宁县产品。

1.1.2 仪器与试剂:721 型分光光度计;HH-6 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);LD4-2A 型离心机(北京医用离心机厂);格兰仕 WD900SL23-2 型微波炉;101-1 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研

究所)。

1.2 方法

原料经有机溶剂除脂后,用热水浸提法提取 LBP,研究浸提时间、温度、料水比、浸提次数以及微波、超声波两种预处理方法对多糖的率的影响;同时研究醇沉时间和醇沉时乙醇加入量对多糖的率的影响。

1.2.1 多糖含量测定

用硫酸-苯酚法^[6]测多糖含量:

枸杞多糖含量% = $3.17C \times D/W$, 式中 C 为测定的枸杞多糖样品用标准回归方程计算出的以葡萄糖为测定结果的含量;D 为枸杞多糖的稀释因素,在上述操作中 D = 1;3.17 为国家有关部门实验确定的葡萄糖换算成枸杞多糖的换算系数^[7]。

1.2.3 浸提时间选择实验

在确定料水比为 1:30,浸提温度为 70℃ 不变的条件下,浸提一次,比较不同浸提时间对 LBP 的率的影响。

1.2.4 浸提温度选择实验

料水比为 1:30,浸提时间由上一时间确定,分别在 70℃、80℃、90℃、100℃ 条件下浸提 1 次。

1.2.5 料水比选择实验

在上述实验确定的浸提时间和温度下,选择料水比分别为 1:20、1:30、1:40、1:50,各浸提 1 次,根据其多糖得率选择合适的料水比。

1.2.6 正交试验^[8]

根据上述单因素试验确定的条件范围,通过正交试验,得出最佳浸提条件。

收稿日期:2005-05-28;修回日期:2005-10-28

作者简介:龚涛(1980-),男,在读硕士,研究方向:生物制药与微生物工程, E-mail: gong13@163.com; * 通讯作者:任大明(1959-),男,博士,副教授,硕士生导师,系主任,从事微生物及酶工程研究。

1.2.7 浸提次数的选择试验

根据上述试验所得最佳浸提条件,研究多糖浸提次数对多糖得率影响,分别浸提1-5次。

1.2.8 与处理方法的研究

热水浸提前,分别用微波加热和超声波两种方法进行预处理,比较两种方法对多糖得率的影响。

1.2.9 醇沉时间的确定

将浓缩后待醇沉的粗体液分成四等分,加3倍量95%的乙醇,在同一条件下,按拟定时间醇沉,离心分离,用蒸馏水回溶后,测定多糖得率。

1.2.10 醇沉时乙醇加入量的确定

将浓缩后待醇沉的粗体液平均分成四等分,加不同倍数95%的乙醇,在同一条件下醇沉后离心分离,蒸馏水回溶后测多糖得率。

2 结果与分析

2.1 苯酚-硫酸法测定多糖含量的标准曲线

按照本实验方法,所得标准曲线回归方程为: $y = 6.9787x - 0.0075$, $r = 0.998$ 。

2.2 单因素选择试验

2.2.1 不同浸提时间对LBP得率的影响

由表1可见,随着浸提时间的延长,多糖得率逐渐增大。4h后,多糖得率增幅不大,考虑到成本,浸提时间不宜超过5h。

表1 浸提时间对多糖得率的影响

时间 Time(h)	1	2	3	4	5	6
得率 Extraction percent (%)	3.65	4.54	4.93	6.03	6.27	6.29

2.2.2 不同浸提温度对LBP得率的影响

由表2可见,随温度升高,多糖得率逐渐增大。当温度达到100℃时,多糖得率达到10.68%,增幅较大。考虑到成本及温度过高对多糖活性的影响,浸提温度不宜过高。

表2 浸提温度对多糖得率的影响

温度 Temperature(℃)	70	80	90	100
得率 Extraction percent (%)	6.67	7.23	7.74	10.68

2.2.3 不同料水比对多糖得率的影响

由表3可见,料水比达到1:40后,多糖得率增幅不大,考虑到水量过大会给后续工艺中浓缩带来极大困难,使能量消耗增大,故料水比以1:40左右为宜。

表3 料水比对多糖得率的影响

料水比 Material - water ratio	1:20	1:30	1:40	1:50
得率 Extraction percent (%)	9.81	10.68	11.56	11.97

2.3 正交实验结果

根据以上单因素实验结果,确定因素水平范围如下:料水比(A)分别为:1:30、1:40、1:50;温度(B)分别为:90℃、95℃、100℃;时间(C)分别为:3h、4h、5h。正交实验结果如表4所示。

从正交实验的R值可以看出:浸提温度(B)对得率的影响最大,其次是浸提时间(C)和料水比(A)。根据正交实验所得最佳工艺条件为A₂B₃C₃,即料水比140,浸提温度100℃,浸提时间5h。

2.4 浸提次数的确定

第一次提取采用上述最佳工艺条件,后几次均采用料水比1:30,浸提温度100℃,浸提时间5h的工艺,结果如表5所示。经计算已知通过第一次提取已得到总多糖的84.5%,前两次累计达92.6%,建议工业化生产时可提取2次。

2.5 预处理方法的研究

从表6可知,微波处理对枸杞多糖得率的影响远大于超声波,随着微波处理时间的延长,多糖得率逐渐增大,当微波

处理25min时,多糖得率达到15.91%;而超声波处理20min达到最好效果,之后随着处理时间的延长多糖得率呈下降趋势。

表4 正交实验及结果分析

序号 No	A 料液比(g/ml) Material - water ratio	B 温度(℃) Temperature	C 时间(h) Time	得率(%) Extraction percent
1	1(1:30)	1(90)	1(3)	10.26
2	1	2(95)	2(4)	10.45
3	1	3(100)	3(5)	12.62
4	2(1:40)	1	2	5.20
5	2	2	3	9.50
6	2	3	1	11.99
7	3(1:50)	1	3	10.32
8	3	2	1	11.93
9	3	3	2	10.37
K ₁	33.33	25.78	34.15	
K ₂	26.69	31.88	26.02	
K ₃	32.62	34.98	32.44	
k ₁	11.11	8.59	11.39	
k ₂	8.90	10.63	8.67	
k ₃	10.87	11.66	10.81	
R	2.21	3.07	2.72	

表5 提取次数对多糖得率的影响

提取次数 Times of extraction	1	2	3	4	5
单次多糖得率(%) Extraction percent per time	11.56	1.12	0.74	0.38	0.14
累计多糖得率(%) Total extraction percent	11.56	12.68	13.42	13.80	13.94

表6 预处理对多糖得率的影响

微波处理 microwae treatment	处理时 间(min)	水提 对照	仅微波 处理 10min	微波 5min + 水提	微波 10min + 水提	微波 15min + 水提	微波 20min + 水提	微波 25min + 水提
得率(%)	11.6	9.81	11.64	12.30	12.91	14.73	15.91	
超声波处 理 ultrasonic treatment	处理时 间(min)	水提 对照	仅超声 波处理 10min	超声 波 水提	超声 波 水提	超声 波 水提	超声 波 水提	
得率(%)	11.6	8.74	11.04	13.27	13.04	12.60		

2.6 醇沉条件的确定

从图1可以看出,当醇沉4h时可达到最佳效果,之后随着时间的延长,多糖得率下降;图2说明,开始乙醇量的增加有利于多糖的沉降,当达到最佳效果乙醇为4倍后溶剂总量的增加会导致多糖的溶解。

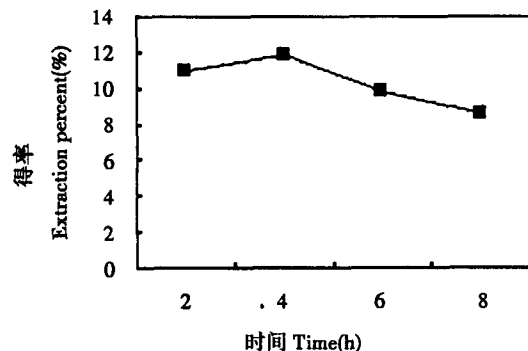


图1 醇沉时间对多糖得率的影响

Fig.1 Effect of precipitation on the extraction percent of polysaccharide

3 讨论

3.1 通过单因素及正交实验,确定了热水浸提法提取枸杞多

糖的最佳工艺,一定程度上节省了成本,使多糖得率提高了一倍,达到12%。当微波预处理时,多糖得率最高可达到15.91%。

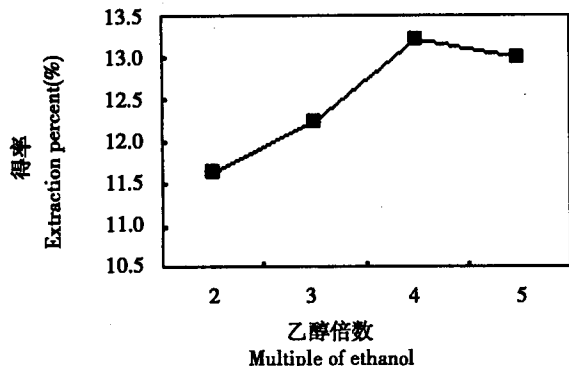


图2 乙醇倍数对多糖得率的影响

Fig.2 Effect of multiple of ethanol on the extraction percent of polysaccharide

3.21 超声波预处理对枸杞多糖得率的影响远不如微波明显;在用微波处理时,处理时间不宜过长,否则容易使提取液中的水分迅速蒸发,反而不利于多糖提取;超声波处理虽不能显著

提高多糖得率,但其产生的强烈振动、高加速度、强烈的空化效应及搅拌作用,可以加速多糖的溶解,缩短提取时间。

3.3 醇沉时间过长、醇沉时乙醇加入量过大,都会降低多糖得率,可能部分多糖被溶解或结构发生改变。

参考文献:

- [1] 罗琼, 阎俊, 李谨玮, 等. 枸杞多糖纯品与粗品免疫活性的比较[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(4): 292-294.
- [2] 王汉中, 张民, 等. 枸杞多糖延缓衰老的作用[J]. 营养学报, 2002, 24(2): 189-192.
- [3] 曹广文, 杨文国, 杜平, 等. 枸杞多糖联合 LAK/IL-2 疗法对 75 例晚期肿瘤的疗效观察[J]. 中华肿瘤杂志, 1994, 16(6): 48-431.
- [4] 何进, 张声华. 枸杞多糖的分离纯化及组成研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(12): 716-720.
- [5] 王建华, 汪建民, 李林, 等. 枸杞多糖 LBP2a 的分离、纯化与结构特征[J]. 食品科学, 2002, 23(6): 44-48.
- [6] Mokejly J F, et al. Microheterogeneity of the carbohydrate group of *Aspergillus oryzae* α -amylase[J]. Arch. Biochem. Biophys, 1969, (132): 99.
- [7] 袁振林. 枸杞多糖的提取及含量和分子量分布的测定[J]. 广东化工, 2003, (3): 43-45.
- [8] 李春喜, 王志和, 王文林. 生物统计学[M]. 第2版. 科学出版社, 2002. 149-153.

专题综述

REVIEW ARTICLES

乙烯生物合成基因工程在果蔬保鲜中的应用

张华峰^{1,2}, 张宾³, 陈天华³, 张晓宁³

(1. 中国科学院武汉植物所, 湖北 武汉 430074; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 河北科技大学, 河北 石家庄 050018)

摘要: 水果和蔬菜的成熟、衰老与乙烯密切相关。乙烯生物合成过程受到多种因素的综合调控。通过基因工程调节乙烯生物合成相关酶的含量或活性以阻断或减少果蔬中乙烯的产生, 从而延缓果蔬成熟或衰老, 是果蔬保鲜最重要的策略之一。多种果蔬 ACC 合成酶、ACC 氧化酶与微生物 ACC 脱氨酶、SAM 水解酶的基因已被克隆; 采用基因工程调控这些酶基因在果蔬中的表达, 可能延长果蔬的贮藏保鲜时间。乙烯生物合成基因工程在果蔬保鲜中具有良好的应用前景, 少数耐贮藏转基因果蔬已经实现商品化生产。

关键词: 乙烯生物合成; 果蔬保鲜; 基因工程; ACC 合成酶; ACC 氧化酶; ACC 脱氨酶; SAM 水解酶; 基因

中图分类号: Q945.6*6 文献标识码: A 文章编号: 1004-311X(2005)06-0080-04

Application of Genetic Engineering on Ethylene Biosynthesis to Fruits and Vegetables Storage

ZHANG Hua - Feng^{1,2}, ZHANG Bin³, CHEN Tian - Hua³, ZHANG Xiao - Ning³

(1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 3. Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

Abstract: Regulation of the enzymes' genes express in fruits and vegetables, which encoding enzymes related to ethylene biosynthesis, may prolong their shelf life.

Key words: ethylene biosynthesis; fruits and vegetables storage; genetic engineering; ACC synthase; ACC oxidase; SAM deaminase; SAMase; gene

水果和蔬菜的贮藏保鲜,一直是食品工业的重要研究课题。当前广泛采用的气调贮藏或保鲜剂调节等方法存在着保鲜时间有限、有害物质残留或成本较高等问题。由于果蔬的成熟与衰老同植物内源激素乙烯密切相关,因此从理论上讲,利用遗传工程控制乙烯生物合成,对于延缓果蔬成熟与衰老具有很高的可行性。目前,基于乙烯生物合成控制与多聚半乳糖醛酸酶(PG)调节的基因工程已经成为果蔬保鲜研究的两个重要研究方向。本文拟对乙烯生物合成基因工程在果蔬保鲜中的应用做简要介绍。

1 乙烯生物合成与调控过程

乙烯生物合成过程亦称 Yang 循环^[1],受到植物内源因素、环境以及胁迫因子的综合调控(图1)。目前,基因工程主要通

过调节乙烯生物合成相关酶的含量或活性来阻断或减少果蔬中乙烯的产生,最终达到延缓果蔬成熟与衰老的目的。乙烯生物合成的基因工程调控主要包括2个策略:1)抑制乙烯合成关键酶(如 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶)的基因表达;2)过量表达降解乙烯合成前体的酶(如 ACC 脱氨酶和 SAM 水解酶)基因。

2 乙烯生物合成基因工程与果蔬保鲜

2.1 ACC 合成酶基因与果蔬保鲜

ACC 合成酶以磷酸吡哆醛为辅基,是高等植物乙烯合成的关键酶之一。控制 ACC 合成酶基因的表达,可以显著影响乙烯的生成速率,有利于果蔬的采后保鲜。2.1.1 ACC 合成酶基因克隆

在植物中,ACC 合成酶以单体、二聚体或者三聚体形式存在,其中单聚体形式活性最强^[2]。ACC 合成酶基因是一个多基因家族。从拟南芥中克隆出了2个 ACC 合成酶基因: ACS1 和 ACS3。其中,ACS1 编码的多肽缺失 Ile204 与 Ser205 之间的高度保守三肽: Thr - Asn - Pro,使之不能在大肠杆菌中表现出 ACC 合成酶活性; ACS3 则为一个假基因(Liang X, et al., 1995)。

收稿日期: 2005-03-14; 修回日期: 2005-09-05

作者简介: 张华峰(1975-),男,博士研究生,讲师,从事生物化学与分子生物学研究,曾在《Acta Botanica Sinica》等发表论文数篇,其中4篇为SCI收录, E-mail: hfzhang@hebust.edu.cn 或 isaacsau@sohu.com, Tel: 027-87510834(0)。