

# 裂褶菌发酵液化学成分分析及其抗缺氧效果研究

郝利民<sup>1,4</sup>, 邢新会<sup>1</sup>, 张延坤<sup>2</sup>, 李政<sup>3</sup>, 穆军<sup>4</sup>, 吴天一<sup>5</sup>

(1. 清华大学化学工程系, 北京 100084 2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050

3. 北京化工大学, 北京 100029 4. 总后勤部军需装备研究所, 北京 100010

5. 青海高原医学研究院, 青海 西宁 810012)

**摘要:** 本实验对裂褶菌发酵液的抗缺氧作用进行了研究。研究表明, 裂褶菌发酵液具有显著的抗缺氧效果( $p < 0.01$ )。对其化学成分的定性和定量分析结果显示, 裂褶菌发酵液中总糖含量为 13.3%, 其主要成分葡萄糖的含量为 10.08%, 其次为麦芽糖以及微量的果糖与乳糖。总酸含量为 1.38%, 其主要成分乳酸的含量为 0.96%, 其次为酒石酸以及微量的柠檬酸和苹果酸等有机酸成分。蛋白质含量为 2.98%; 发酵液中 14 种游离氨基酸的总含量为 320.7mg/100ml; 总氨基酸含量为 641.0mg/100ml, 蛋白水解液中含 16 种氨基酸, 包括 7 种人体必需氨基酸。裂褶菌发酵液中还含有酚性物和微量油脂等化学物质, 不含皂甙类、黄酮类和生物碱类物质。发酵液用乙醇进行提取, 其乙醇提取物和乙醇不溶物均具有抗缺氧功能( $p < 0.01$ ), 而乙醇提取物的抗缺氧效果明显高于原发酵液( $p < 0.05$ )。初步判断, 裂褶菌发酵液中的抗缺氧有效成分为一类具有一定极性的醇溶性代谢物质。

**关键词:** 裂褶菌发酵液; 化学成分; 分析; 抗缺氧

## Study on Analysis of Chemical Components in *Schizophyllum commune* Fermentation Broth and Its Anti-anoxia Effect

HAO Li-min<sup>1,4</sup>, XING Xin-hui<sup>1</sup>, ZHANG Yan-kun<sup>2</sup>, LI Zheng<sup>3</sup>, MU Jun<sup>4</sup>, WU Tian-yi<sup>5</sup>

(1. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084 2. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medicine Science, Tianjin 300050, China 3. Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China 4. Quartermaster Institute, General Logistics Department, People's Liberation Army, Beijing 100010, China 5. Qinghai High Altitude Medical Institute, Xining 810012, China)

**Abstract:** The hermetic experiment indicated that the anti-anoxia effect of *Schizophyllum commune* fermentation broth (SCFB) was significant ( $p < 0.01$ ). The analysis of the chemical components in the broth revealed that the total saccharides of SCFB is 13.3% (glucose 10.08%, maltose 3.34% and trace fructose and lactose), the total acidity is 1.38% (lactic acid 0.96%, tartaric acid 0.42%, trace amounts of citric acid and malic acid), and protein is 2.98%. The content of the 14 kinds of free amino acid in SCFB is 320.7mg/100ml and the total content of the 16 kinds of amino acid is 641.0mg/100ml including 7 kinds of essential amino acids. Phenolic matter and fat are also identified in SCFB, but there is no saponin, flavonoid or alkaloid present. The extraction and deposition by ethanol of SCFB are also capable of significantly resisting anoxia ( $p < 0.01$ ). Compared with SCFB, the ethanol extract show more stronger anti-anoxia effect. ( $p < 0.05$ ). It is concluded that the efficient components of SCFB with anti-anoxia function might be a kind of polar substance capable of dissolving better in ethanol.

**Key words** *Schizophyllum commune* fermentation broth; chemical components; analysis; anti-anoxia

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0320-04

我国西南边境地处高原, 平均海拔 4000 多米, 其中海拔 3000 米以上的地区占国土总面积的 1/6。高原总体特点是地形复杂、高寒缺氧、气候恶劣、风沙多、紫外线强。高原的特殊自然地理环境对部队官兵的身体

健康和战斗力影响很大, 其中缺氧的威胁最大。急进高原部队因急性缺氧极易发生急性高原反应, 其高原病发病率可高达 30%~90%, 治疗不及时死亡率可达 1%~5%, 造成部队作战时非战斗减员, 严重影响部队战斗

收稿日期: 2007-06-26

基金项目: 总后军需物资油料部资助项目

作者简介: 郝利民(1969-), 男, 博士后, 主要从事抗缺氧和抗疲劳功能食品研究。

力;常驻高原部队因长期缺氧而造成的能量代谢受阻,不仅会引起人体记忆力减退、思维迟缓,还会发生脱发、脱甲及体能下降等现象,对战士的身体健康极为不利。缺氧所引起的人体能量代谢障碍是人体在高原环境下多种生理或病理性反应的最直接和最根本的原因。

在剧烈运动过时,人体会出现摄氧量小于运动需氧量的情况,造成体内临时性缺氧,发生“氧亏”。“氧亏”引起机体乳酸积累导致机体能量代谢受阻是人体运动性疲劳的一个重要原因。因此,“抗缺氧”也是竞技体育非常关注和亟待解决的重要课题。特别是在我国备战2008年奥运会临近之时,这一课题的研究更显迫切。另外,随着我国西部开发战略的实施与推进,在高原工作和生活的人逐年增加,“抗缺氧”问题成为社会广泛关注的议题。本研究旨在通过寻求有效的“抗缺氧食品”来强化人体在缺氧时的能量代谢,增进官兵身体健康,保障部队战斗力。

采用青稞籽实体为培养基原料,接种筛选出来的裂褶菌,经数天发酵制备出了具有显著抗缺氧和抗疲劳作用功能性发酵液。本实验就裂褶菌发酵液的化学成分及其抗缺氧效果进行分析与评价研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

裂褶菌发酵液 总后勤部军需装备研究所与清华大学联合研制;新华I号层析滤纸 杭州新华纸业有限公司;乙醇、苦味酸、溴酚蓝、硫酸、氢氧化钠、碘化铋钾、茚三酮、明胶、对硝基苯胺、苯胺等均为国产分析纯级化学试剂。

昆明种小白鼠(二级,雄性,体重为22~26g) 军事医学科学院实验动物中心。

日立L-8800型氨基酸自动分析仪;日立635型高效液相色谱仪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 裂褶菌发酵液化学成分的定性分析<sup>[1]</sup>

##### 1.2.1.1 样品制备

取发酵液50ml,滤纸滤过作为待检试样I;取原发酵液100ml,浓缩至黏稠状,加入50ml乙醇室温浸泡提取2h,滤纸滤过作为待检试样II。

##### 1.2.1.2 纸层析法

将待检试样分别点样于划定的层析滤纸区域内,于密闭容器内用正丁醇:甲酸:水(4:1:5, V/V, 上层)作展开剂上行展开后,待溶剂挥发尽,喷显色剂,在特定条件下显色分析。

##### 1.2.1.3 试管显色法

取待检试样适量于试管中,加入特异显色剂,在特定条件下显色分析。

#### 1.2.2 裂褶菌发酵液理化指标测定

参照2000年版国家药典(第一部)<sup>[2]</sup>;糖、酸类含量测定采用高效液相色谱法;氨基酸组成采用氨基酸自动分析仪。

#### 1.2.3 裂褶菌发酵液有效成分提取分离工艺<sup>[3]</sup>

取适量发酵液,浓缩至粘稠状,于80℃烘干、粉碎。加五倍量无水乙醇,于室温下浸泡2h,离心分离,收集上清液。沉淀物同法重复提取四次,合并提取液,回收溶剂并浓缩,于80℃干燥、粉碎,制得供试样品。将醇沉淀物80℃干燥、粉碎,作为供试样品。

#### 1.2.4 常压密闭抗缺氧实验<sup>[4]</sup>

称取2.0g供试样品,用10.0ml双蒸水溶解后,置于冰箱贮存备用,使用时摇匀即可。

选体重为22~26g健康雄性小白鼠,饲养适应3d后按体重随机分组,每组20只。腹腔注射0.2ml药液,给药40min后,置125ml广口瓶中以橡胶塞密闭进行密闭缺氧实验,观察记录动物死亡时间。同时,以相同条件设裂褶菌发酵液和蒸馏水三个对照组。统计实验组与对照组动物存活时间及存活时间增加率。

#### 1.2.5 统计分析

数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )描述,采用Excel2003统计软件进行单因素方差分析,  $p < 0.05$  为差异显著性。

## 2 结果与分析

表1 裂褶菌发酵液化学成分分析

Table 1 Analysis of chemical components in *Schizophyllum commune* fermentation broth

| 化学成分   | 纸层析法 | 试管显色法 | 化学成分    | 纸层析法 | 试管显色法 |
|--------|------|-------|---------|------|-------|
| 氨基酸与多肽 | +    | +     | 皂甙      | —    | —     |
| 蛋白质    | +    | +     | 萜醌及其甙   | —    | —     |
| 生物碱    | +    | +     | 强心甙     | —    | —     |
| 还原糖    | +    | +     | 黄酮      | —    | —     |
| 总糖类    | +    | +     | 鞣质      | —    | —     |
| 有机酸    | +    | +     | 植物甾醇    | —    | —     |
| 酚性物    | +    | +     | 三萜类     | —    | —     |
| 油脂     | +    | +     | 香豆精、内酯类 | —    | —     |

注:“+”表示呈阳性;“—”表示呈阴性。

表2 裂褶菌发酵液理化指标测定(g/100ml)

Table 2 Chemical and physical parameters in *Schizophyllum commune* fermentation broth (g/100ml)

| 样品  | 粗蛋白  | 还原糖   | 总糖    | 酸度(以柠檬酸计) | 水分    | 灰分   | pH 值 |
|-----|------|-------|-------|-----------|-------|------|------|
| 发酵液 | 2.98 | 11.70 | 13.30 | 0.8       | 79.87 | 0.81 | 4.3  |

表5 裂褶菌发酵液分离物的抗缺氧实验结果

Table 5 Anti-anoxia testing results of extracts from *Schizophyllum commune* fermentation broth

| 组别      | 动物数(只) | 剂量(mg/只) | 存活时间( $\bar{x} \pm s$ , min)  | 存活增加时间(min) | 存活时间增加率(%) |
|---------|--------|----------|-------------------------------|-------------|------------|
| 蒸馏水对照组  | 20     | 40       | 12.0 $\pm$ 1.5                |             |            |
| 裂褶菌发酵液组 | 20     | 40       | 14.3 $\pm$ 2.4 <sup>aa</sup>  | 2.3         | 19.2       |
| 乙醇提取物组  | 20     | 40       | 15.7 $\pm$ 1.8 <sup>aab</sup> | 3.7         | 30.8       |
| 乙醇不溶物组  | 20     | 40       | 13.7 $\pm$ 1.9 <sup>aa</sup>  | 1.7         | 14.2       |

注: <sup>a</sup>  $p < 0.05$ , 与蒸馏水对照组比较具有显著性差异; <sup>aa</sup>  $p < 0.01$ , 与蒸馏水对照组比较具有极显著性差异; <sup>b</sup>  $p < 0.05$ , 与裂褶菌发酵液组比较具有显著性差异; <sup>bb</sup>  $p < 0.01$ , 与裂褶菌发酵液组比较具有极显著性差异。

2.1 裂褶菌发酵液化学成分分析结果

鉴别裂褶菌发酵液化学成分的纸层析法和试管显色法实验结果见表1。

由表1 结果可知, 裂褶菌发酵液中可能含有氨基酸、多肽、蛋白质、还原糖、多糖、有机酸、酚性物、油脂及生物碱等成分; 而不含皂甙类、蒽醌及其甙、强心甙、黄酮、鞣质、植物甾醇、三帖类、香豆精及内酯类等物质。

2.2 裂褶菌发酵液理化指标的测定

裂褶菌发酵液理化指标测定结果见表2。

由表2 结果可知, 裂褶菌发酵液中, 各测定成分按含量高低排序分别为: 糖类、蛋白质、有机酸; 其中, 糖类的主要成分为还原糖, 约占总糖含量的88%。

2.3 裂褶菌发酵液中糖类、酸类、氨基酸类成分的定量测定

裂褶菌发酵液理化指标测定结果表明, 其富含糖类、蛋白质和有机酸。为了进一步了解该发酵液各相关成分组成特点, 对其中的糖类、酸类和氨基酸类的组成进行了进一步的定量测定, 测定结果见表3 和表4。

表3 裂褶菌发酵液糖与酸类成分含量测定结果

Table 3 Content of sugar and acid in *Schizophyllum commune* fermentation broth

| 成分  | 含量(%)   | 成分  | 含量(%)  |
|-----|---------|-----|--------|
| 葡萄糖 | 10.08   | 乳酸  | 0.96   |
| 麦芽糖 | 3.34    | 酒石酸 | 0.42   |
| 乳糖  | <0.0005 | 柠檬酸 | <0.003 |
| 果糖  | <0.0005 | 苹果酸 | <0.001 |

由表3 结果可知, 在裂褶菌发酵液的糖类组成中, 以葡萄糖含量为最高, 其含量为10.08%, 其次为麦芽糖3.34%; 另外, 发酵液中还含有微量果糖和乳糖; 在有机酸类物质中, 乳酸含量最高, 其含量为0.96%, 其次为酒石酸以及微量柠檬酸和苹果酸。

由表4 结果可知, 裂褶菌发酵液中含有14 种游离氨基酸, 其中包括7 种人体必需氨基酸, 其游离氨基

表4 裂褶菌发酵液中氨基酸组成(mg/100ml)

Table 4 Composition of amino acid in *Schizophyllum commune* fermentation broth (mg/100ml)

| 氨基酸类型 | 游离氨基酸 | 总氨基酸  |
|-------|-------|-------|
| 天门冬氨酸 | 4.6   | 36.9  |
| 苏氨酸   | 13.5  | 26.7  |
| 丝氨酸   | 15.8  | 18.9  |
| 谷氨酸   | 20.1  | 123.7 |
| 甘氨酸   | 9.8   | 30.3  |
| 丙氨酸   | 80.2  | 106.0 |
| 胱氨酸   | 6.3   | 13.9  |
| 缬氨酸   | 43.2  | 50.9  |
| 蛋氨酸   | 0     | 22.0  |
| 异亮氨酸  | 13.9  | 24.9  |
| 亮氨酸   | 26.5  | 41.6  |
| 酪氨酸   | 21.3  | 33.3  |
| 苯丙氨酸  | 38.6  | 48.4  |
| 赖氨酸   | 11.2  | 26.9  |
| 组氨酸   | 15.9  | 26.2  |
| 色氨酸   | 0     | 0     |
| 精氨酸   | 0     | 10.5  |
| 脯氨酸   | 0     | 0     |
| 总量    | 320.7 | 641.0 |

酸总量为320.7mg/100ml; 发酵液不含蛋氨酸、精氨酸、脯氨酸和色氨酸。将发酵液中的蛋白质经水解处理, 测定其氨基酸组成, 结果发现蛋白水解物中含有16 种氨基酸, 其中7 种为人体必需氨基酸, 其氨基酸总量为641.0mg/100ml, 蛋白水解物不含脯氨酸和色氨酸。

2.4 裂褶菌发酵液分离物耐缺氧动物实验结果

常压耐缺氧实验是抗缺氧保健食品功能评价的经典实验方法之一<sup>[5]</sup>。采用蒸馏水组作为对照, 裂褶菌发酵液组、裂褶菌发酵液乙醇提取物组(乙醇提取物组)及其乙醇不溶物组(乙醇不溶物组)的常压密闭耐缺氧实验结果见表5。

由表5 可知, 裂褶菌发酵液组的密闭缺氧存活时间(14.3 $\pm$ 2.4)min, 裂褶菌发酵液乙醇不溶物组的密闭缺氧存活时间(13.7 $\pm$ 1.9)min, 裂褶菌发酵液乙醇提取物组的密闭缺氧存活时间(15.7 $\pm$ 1.8)min, 与蒸馏水对照组的密

密闭缺氧存活时间( $12.0 \pm 1.5$ )min相比,均具有极显著性差异( $p < 0.01$ ),三组动物存活时间分别延长了19.2%、30.8%、14.2%。这显示,上述三种物质的抗缺氧效果均非常显著。

### 3 讨 论

抗缺氧措施包括习服适应与体育锻炼、抗缺氧药物和抗缺氧功能食品(含营养措施)等方面。习服锻炼可在一定程度上增强机体对高原的适应能力,但其受到时间、地点等诸多客观条件的限制。因此,国内外学者一直致力于抗缺氧药物和抗缺氧功能食品的研究。抗缺氧类药物包括西药和中药两大类,西药类有:乙酰唑胺、尼莫地平、地塞米松等;由于副作用较大,其使用受限。例如:长期使用乙酰唑胺可引起四肢麻木和多尿,对磺胺类药物过敏者禁用<sup>[6]</sup>;在地塞米松的使用过程中,突然停药会引起疾病复发和忧郁等症状,长期使用还会引起内分泌失调、向中性肥胖、骨质疏松等并发症。中药类有:人参、红景天、党参、沙棘、异叶青兰、大戈达、黄芪、灵芝、枸杞等中药(或藏药)的单方或复方<sup>[7]</sup>;由于中药资源分布局限,资源趋紧,特别是近年来随着我国经济的发展,多种传统中/藏药材的资源优势逐渐消失,中药材资源价格日趋昂贵,使其推广与使用受限。抗缺氧功能食品主要是从营养与能量角度入手解决问题,其措施温和、安全,接受性好。本研究采用裂褶菌发酵液为主要原料研制的抗缺氧食品在抗缺氧效果、食用安全性、原料来源以及生产成本等方面与传统中药相比更具有比较优势,因此具有广阔的研究与应用前景。

据文献报道,抗缺氧功效成分的种类较多。许多植物或动物来源中药材中的多糖类<sup>[8]</sup>、皂甙类、黄酮类<sup>[9]</sup>、氨基酸类等均具有抗缺氧功能<sup>[10]</sup>。微生物发酵的代谢产物通常包括糖类、蛋白质、多肽、氨基酸、有机酸等成分。另外,微生物也是多糖、黄酮等多种生理活性物质的重要来源<sup>[10]</sup>。

在定性鉴别实验中发现,裂褶菌发酵液试样与多种生物碱鉴别试剂均呈阳性反应,但通过进一步验证实验发现,柠檬酸、酒石酸等有机酸对生物碱试剂也呈阳性反应;将试样中的有机酸分离去除后,鉴别实验均呈阴性反应,因此可以认为裂褶菌发酵物中不含生物碱成分。结合纸层析法和试管显色法定性分析结果可以认为,裂褶菌发酵液中含有氨基酸、多肽、蛋白质;还原糖、多糖;有机酸、酚性物和油脂等化学成分;不含生物碱、黄酮、皂甙类、蒽醌及其甙、强心甙、鞣质、植物甾醇、三帖类、香豆精及内酯类等成分。

常压密闭耐缺氧研究实验结果显示,裂褶菌发酵液、裂褶菌发酵液乙醇不溶物及其乙醇提取物均具有非常显著的抗缺氧效果。其中,裂褶菌发酵液乙醇不溶物组密闭缺氧存活时间( $13.7 \pm 1.9$ )min与原发酵液组

密闭缺氧存活时间( $14.3 \pm 2.4$ )min相比无显著性差异( $p > 0.05$ );而裂褶菌发酵液乙醇提取物组密闭缺氧存活时间( $15.7 \pm 1.8$ )min显著高于原发酵液组密闭缺氧存活时间( $14.3 \pm 2.4$ )min( $p < 0.05$ ),其存活时间比原发酵液组延长11.6%。本研究是对裂褶菌发酵液中混合成分(包括发酵液、醇溶物和醇不溶物)进行的抗缺氧研究,在这些混合成分中含有可能具有抗缺氧功能的氨基酸类和多糖类化学物质,其抗缺氧功能可能为这些成分的综合作用结果。而裂褶菌发酵液各组分抗缺氧功能的作用方式和作用机理有待进一步深入研究。

### 4 结 论

裂褶菌发酵液中含有氨基酸、多肽、蛋白质、单糖、还原糖与多糖类、有机酸、酚性物和油脂等化学成分;不含生物碱、黄酮、皂甙类、蒽醌及其甙、强心甙、鞣质、植物甾醇、三帖类、香豆精及内酯类等成分。发酵液总糖含量达13.3%;其中葡萄糖含量最高,为10.08%;其次为麦芽糖以及微量果糖和乳糖。酸类物质中乳酸最高,为0.96%;其次为酒石酸以及微量柠檬酸和苹果酸等有机酸成分。发酵液中蛋白质含量为2.98%;含有14种游离氨基酸,游离氨基酸总含量为320.7mg/100ml;总氨基酸含量为641.0mg/100ml;发酵液蛋白水解物中含有16种氨基酸,其中7种为人体必需氨基酸。

裂褶菌发酵液、裂褶菌发酵液乙醇提取物和乙醇不溶物均具有非常显著的抗缺氧功能( $p < 0.01$ );其中,裂褶菌发酵液乙醇提取物的抗缺氧效果显著优于原发酵液( $p < 0.05$ )。因此,初步判断裂褶菌发酵液中的抗缺氧有效成分为一类具有一定极性的醇溶性化学物质。

### 参考文献:

- [1] 孟宪纾,陈发奎,李卫民,等.中成药分析[M].北京:人民卫生出版社,1998:65-124.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:化学工业出版社,2000:附录36-56.
- [3] 吴寿金,赵泰,秦永祺,等.现代中草药成分化学[M].北京:中国医药科技出版社,2002:20-42.
- [4] 王丽云,徐德洲.复方红景天对动物缺氧功能的研究[J].中华医学研究杂志,2004,4(7):645-647.
- [5] 于守洋,崔洪斌.中国保健食品的进展[M].北京:人民卫生出版社,2001:937-939.
- [6] BERNHARD W N, MILLER L. Acetazolamide plus low dose dexamethasone is better than acetazolamide alone to ameliorate symptoms of acute mountain sickness[J]. Aviat Space Environ Med, 1998, 69: 883-886.
- [7] 陈亚东,曹秀兰,田常有,等.高山红景天对小鼠耐缺氧、抗疲劳及耐低温作用的影响[J].中国中医药科技,2002,3(9):157-158.
- [8] 高雁,王淑珍,吴畏,等. L-S功能饮料对机体耐缺氧、抗疲劳功能的研究[J].上海师范大学学报:自然科学版,2001,30(1):63-66.
- [9] 董立巍,王万银,岳义田,等.马齿苋总黄酮抗小鼠缺氧作用及其机制研究[J].中西医结合学报,2005,6(3):450-454.
- [10] 郝利民.抗缺氧高能野战食品研究[D].天津:天津科技大学,2005.