

果见表 3。

表 3 保存期间双歧杆菌活菌数和 SOD 剩余活性(4~6℃)

	时间(天)						
	0	5	10	15	20	25	30
pH	4.30	4.20	4.15	4.12	4.10	4.10	4.06
双歧杆菌活菌数 LgN/ml	8.51	7.12	6.81	6.44	6.11	5.85	5.64
SOD 剩余活性%	100	93	87	82	78	75	72

由表 3 看出,采用分别单一发酵再混合的工艺,在 4~6℃ 下存放过程中,随着存放天数的增加,pH 缓慢下降,双歧杆菌慢慢死亡,SOD 活力也在缓慢降低,这是由于乳酸菌在低温下仍不断产酸,造成 pH 下降对双歧杆菌存活和 SOD 保存活性不利。因此,生产出的 SOD 双歧杆菌治菌酸奶应尽快销售,以保证产品有较高的双歧杆菌活菌数和 SOD 活性。SOD 双歧杆菌酸奶在 4~6℃ 条件下存放 20 天,双歧杆菌数仍在 $10^6/\text{ml}$ 以上,SOD 剩余活性仍在 70% 以上。

3 结论

3.1 双歧杆菌经耐氧驯化,添加生长促进剂后可在牛乳中良好地生长和发酵。双歧杆菌单一

发酵时,8h 是较理想的发酵终点,这时双歧杆菌活菌数达到最大值。双歧杆菌单一发酵时,7~8h 开始凝乳。

3.2 双歧杆菌和酸奶菌分别单一发酵,然后按 1:2 的比例混合,可使双歧杆菌酸奶有较好的风味,同时也有比混合发酵较高的活双歧杆菌数。

3.3 发酵结束后添加 SOD 到酸奶中,可使 SOD 保持较高的活性。

3.4 SOD 双歧杆菌酸奶在冷藏过程中(4~6℃),有 pH 逐渐下降,双歧杆菌逐渐死亡,SOD 活力下降的趋势。冷藏 20 天后,产品双歧杆菌活菌数仍在 $10^6/\text{ml}$ 以上,SOD 剩余活性仍在 70% 以上。

参考文献

- 1 孟昭赫等. 乳酸菌与人体健康,人民卫生出版社,北京,1993,85~92.
- 2 金世琳,双歧杆菌在乳制品生产中的应用,食品与发酵工业,1983,(3).
- 3 袁勤生. SOD 在医药、食品和日用化学工业上的应用,中国生化药物杂志,1994,15(4).
- 4 傅晓超等. 保健食品——BB 乳的研究,食品与发酵工业,1990(4).

灵芝孢子酶法破壁的研究

蒋家新 赵澎湃 王新辉

杭州商学院 310035

摘 要 选择复合酶在 10% 酒精浓度下水解 6 天,孢子的破壁率达 49%;75% 酒精浸泡 3 天后用复合酶水解 4 天,孢子破壁率达 52%。

关键词 灵芝孢子 破壁率

1 前言

灵芝属于低等植物中的真菌门、担子菌纲、多孔菌目、多孔菌科、灵芝亚科、灵芝属。灵芝孢

子中含精氨酸、色氨酸、天门冬氨酸等 13 种氨基酸,并含有甘露醇、葡萄糖、 α 、 α -海藻糖、 α 、 β -海藻糖和 β 、 β -海藻糖,还含有高分子糖、有机锗及一些未知的活性物质。结合灵芝子实体

的成分,呈现出神奇的药理功能。资料表明^[1,2],灵芝具有显著的镇痛、镇静、安定;镇咳、祛痰、平喘;强心、防治肝炎,防癌抗肿瘤、抗放射等作用,还能提高机体非特异性免疫能力,增强机体的抗病能力。近期研究还表明^[3,4],灵芝具有协调人体新陈代谢,增强人体自然美,保持青春活力等药效。目前,灵芝在医药保健品、食品等行业广为应用。我国市场上已有灵芝酒、灵芝饮料等商品,它们多以灵芝子实体的浸出物作为原料。日本等国家已采用灵芝孢子制备高级保健口服液,而我国鲜有类似产品^[3]。分析其原因,主要是因为灵芝孢子的壁十分坚实,耐酸、耐碱、耐机械力、而要有效地提取灵芝孢子的成分必须先行破壁,但破壁技术仍是一个大难题,国外多用高压气流法破壁,其设备一次性投资大且易损坏,对于我国资金不雄厚的厂家不太合适。

灵芝在我国分布很广,目前我国已具备了灵芝工业化生产的技术,资源比较丰富^[1,2]。研究开发灵芝孢子资源成了一项既有经济效益又有社会意义的工作。鉴此,笔者对常规条件下灵芝孢子破壁方法作了一些探索,整理成文,抛砖引玉。

2 材料与方法

2.1 材料

灵芝孢子:浙江某市实用菌研究中心

复合酶 I:无锡酶制剂厂。(其中主要含纤维素酶、果胶酶)

复合酶 II:无锡酶制剂厂(其中主要含蛋白酶等)

复合酶 I:复合酶 II=1:5

2.2 仪器

分析天平 TG328B;湘仪天平仪器厂。

恒温水浴锅 H·H·S11-2;上海医疗器械五厂。

电子搅拌器 GS-12;上海医械专机厂

生物显微镜 2XG₁;上海光学仪器厂

多功能 OLYMPUS 显微镜;日本

2.3 方法

2.3.1 酶法破壁 I

①工艺流程

酒精、水 复合酶 I 复合酶 II
↓ ↓ ↓
孢子粉→研磨→孢子液→水解 I $\xrightarrow{2\text{天}}$ 水解 II

小试可用手工研磨,中试或批量生产用胶体磨效果更佳。下同。

水解过程中每隔一定时间取样,进行显微镜观察,显微摄影和测定破壁率。

②工艺条件

a 孢子浓度为 0.5%(W/W)

b 复合酶总用量为孢子重量的 5%~25%(W/W);

c 酒精浓度:实验号 A、B、C、D 分别为 0、10、20、30%(V/V);

2.3.2 酶法破壁 II

①工艺流程

酒精 酒精水 复合酶 I 复合酶 II
↓ ↓ ↓ ↓
孢子粉→研磨→浸泡→孢子液→水解 I → 水解 II

小试可用手工研磨。

水解过程中定期取样,进行显微镜观察和测定破壁率。

②工艺条件

a:实验号 E、F、G 酒精浓度分别为 95、75、50%(V/V);浸泡时间 3 天、浸泡温度 25~30℃;

b:孢子浓度为 0.5%(W/W);

c:孢子液的酒精浓度为 10%(V/V);

d:复合酶总用量为孢子重的 5%~25%(W/W);

2.3.3 破壁率的测定

血球计数板计数^[5]。

破壁率(%)=(1-A/B)×100%

式中:A——样品五大格的完整孢子数。

B——原孢子液五大格的完整孢子数。

2.3.4 孢子形态观察

①显微镜观察

定期取样、制片、镜检。

②显微摄影

定期取样、制片、摄影。

3 结果与讨论

灵芝孢子呈卵圆形、棕色,约 $8\sim 12\times 5\sim 7\mu\text{m}$ 大小。细胞壁由内外两层组成,外孢壁是一层透明的膜状物,内孢壁呈棕色,显著加厚,表面布以无数小疣^[1]。细胞壁主要成分为S-葡聚糖,其余为蛋白质、甾多聚糖混合物。非水溶性多聚糖微纤丝及壳质、几丁质等构成牢固坚实的骨架,具有胶合作用的配糖甾则填充于其空隙间^[6]。参考有关花粉酶法破壁^[7,8]、香菇有效成分抽提工艺^[9]及真菌原生质体的制备^[6],根据灵芝孢子壁的结构,笔者选择了复合酶来进行破壁,并结合乙醇抽提法^[1],拟添加一定浓度的酒精来强化酶法破壁效果。

按酶法破壁1,每隔1天取样观察,测定破壁率,结果如表1所示。

表1 不同处理条件的破壁率

实验号	酒精浓度 (%)	水解时间(天)							
		0	1	2	3	4	5	6	
A	0	10	29	34	37	40	42	43	
B	10	10	34	40	42	44	46	49	
C	20	1	28	34	37	40	43	44	
D	30	10	26	33	36	37	38	39	

每隔一定时间取样显微镜观察,发现加复合酶1水解1天则有部分孢子变形凹陷;水解2天则有些孢子变圆;水解4天后,孢子在流动、碰撞、挤压等情况下会变形。随着水解时间的延长,孢子的透明度增加。

定期取样显微摄影结果分别如图1、图2、图3、图4、图5所示。



图1 灵芝孢子(水解前)

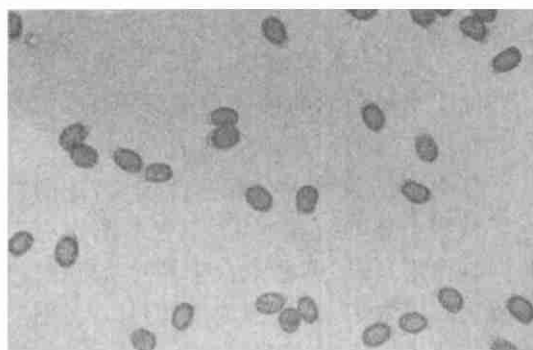


图2 B号水解2天时的灵芝孢子

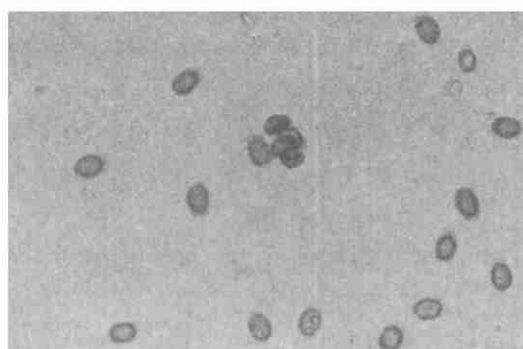


图3 B号水解6天时的灵芝孢子

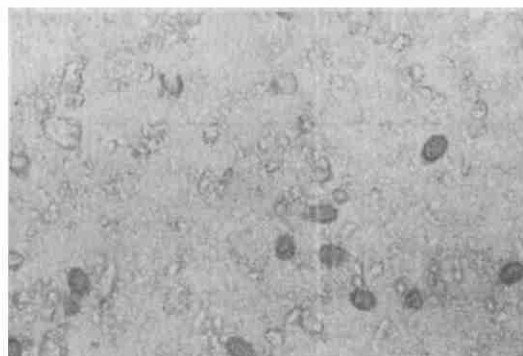


图4 研磨B号水解6天样液的灵芝孢子及其碎片



图5 盖玻片轻压B号水解6天样液的灵芝孢子及碎片

表 1、显微镜观察和显微摄影结果(图 1、2、3、4、5)表明,酶法水解破壁 I 有一定的破壁效果。未加酶水解前的研磨破壁率只有 10%,实验号 B 水解 6 天时研磨破壁率达 49%。

灵芝孢子细胞壁含有醇溶性物质,故酒精对孢子壁有一定的破坏作用^[12],但对酶也有一定的抑制作用,所以酒精浓度不超过 20%时可提高酶法破壁效果,而酒精浓度超过 30%则会降低破壁效果。

酶的化学本质是蛋白质,蛋白酶对其它酶的活力有一定的抑制作用。由表 1 可见,刚开始时破壁率提高得相对较快,而随水解时间的延长破壁率相对上升得较慢。这是因为酶活力在一定水解条件下,随时间的延长而降低,同时后加入的以蛋白酶为主的复合酶 II 对复合酶 I 的活力也有一定的抑制作用。

图 4、图 5 表明酶法破壁工艺与物理作用相结合可明显提高破壁率。

目前灵芝加工工艺中多采用较高浓度的酒精来萃取其中的生物活性物质,结合酶法破壁 I,拟定了酶法壁 II 的实验方案,实验结果如表 2 所示。

表 2

实验号	浸泡用酒精		水解时间(天)				
	浓度(%)	0	1	2	3	4	
E	95	17	36	43	45	49	
F	75	16	35	40	50	52	
G	50	14	36	41	46	51	

由于高浓度酒精对孢子壁有破坏作用,而且对孢子内的原生质有萃取作用^[12]。由表 2 可见,孢子经高浓度酒精浸泡后可缩短酶水解时间,提高破壁率。用 75%酒精浸泡孢子 3 天后,再经酶法破壁 4 天,其破壁率可达 52%。

综合实验结果表明,酶法破壁 II 优于酶法

破壁 I。方法 II 的破壁时间短、破壁率高,且对抑制杂菌的污染也有一定的作用。

4 小结

4.1 酶法破壁时,添加酒精有助于提高破壁率,但酒精浓度大于 30%时会降低破壁效果。

4.2 酶法破壁时,分次添加酶可提高破壁效果。

4.3 酶法破壁工艺与物理作用相结合,可明显提高破壁率。

参考文献

- 1 陆文樑等. 灵芝, 科学出版社(第二版), 北京, 1985.
- 2 刘波, 中国药用真菌, 山西人民出版社, 太原, 1978.
- 3 马永春, 灵芝使你健康长寿, 中国食用菌, 1987, 10 (6): 40.
- 4 刘无垢, 美容圣品话灵芝, 中国食用菌, 1987, 10 (6): 40.
- 5 韩文瑜等, 病原细菌检验技术, 吉林科学出版社, 长春, 1992.
- 6 杨新美, 真菌原生质体的制备, 中国食用菌, 1987, 2: 4.
- 7 石憬林, 花粉精的制作方法, 食品工业科技, 1987, 2: 54.
- 8 罗心玲等, 花粉破壁和营养素提取研究, 武汉食品科技, 1989, 1: 1.
- 9 梁琼华等, 香菇有效成分抽提工艺的初步探讨, 广州食品科技, 1986, 3: 11.
- 10 一岛英治, 酵素。ライフサイエンスとバイオテクノロジーの基礎, 东海大学出版会, 东京, 1984.
- 11 一岛英治, 食品工业と酵素, 朝仓书店, 东京, 1983.
- 12 周东坡等, 微生物原生质体的融合, 黑龙江科技出版社, 哈尔滨, 1990.