

灵芝多糖肽的制备

刘政, 闫晗, 王丽威, 王前领

(辽宁工程技术大学理学院, 辽宁阜新 123000)

摘要:以肽得率为判优指标,研究了添加前处理措施及低浓度碱液为提取液的灵芝多糖肽提取工艺。结果表明:石油醚脱脂预处理后,约能提高得率36.4%,灵芝多糖肽的最佳提取工艺条件为:温度100℃,料液比1:30,提取液为0.5%碳酸钠溶液,提取时间为2.0 h,提取率为2.07%。这4个影响因素按从主到次的顺序排列依次是:温度>料液比>碱性盐溶液浓度>提取时间。

关键词:灵芝;多糖肽;得率

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)10-0142-03

灵芝的大量研究始于1937年,20世纪70年代初开始大量人工栽培灵芝,在随后的30年间中国、日本、韩国、美国等国的科学家们对灵芝进行了广泛的研究^[1]。灵芝多肽事实上是多糖与蛋白质复合体,因此又称多糖肽,其含糖量根据分子量不同而不同,约14.3%~40.6%,且其中往往耦合金属离子如硒、锗等^[2]。已有研究表明,灵芝多肽组分与多糖等其它成分混合后生理活性往往产生巨大变化,其抑瘤能力、抗羟基自由基活性超过单纯多糖或多肽^[3-4]。临床试验证明,它对机体的免疫指标都有改善作用,能明显地提高生活质量,延长癌症病人的存活期^[5]。因此,基于灵芝多肽产品极高的经济效益和社会效益,关于灵芝多肽的研究正逐渐成为热点。

1 材料与方 法

1.1 材 料

灵芝子实体由阜新市百发生物技术有限公司提供。供试药品为氢氧化钠、无水乙醇、甲基红、硫酸钾、硫酸铜、硼酸、盐酸、浓硫酸、甲醛、丙酮、石油醚、乙酸、碳酸钠、乙醚。试验用仪器有电子分析天平、电子恒温不锈钢水浴锅、KDH-08A定氮仪、电热恒温鼓风干燥箱、粉碎机、高速冷冻离心机、PHS-2型精密酸度计、循环水式多用真空泵。

1.2 方 法

1.2.1 干燥灵芝粉的制备 灵芝子实体→粉碎

机粉碎→110℃烘箱干燥至恒重→干燥灵芝粉。

1.2.2 灵芝多糖肽提取工艺流程 干燥灵芝粉→脱脂预处理→提取液提取→冷却→乙酸中和溶液→纱布过滤→离心→上清液水浴加热浓缩→乙醇沉淀→离心分离→溶解沉淀→醇沉→丙酮洗涤沉淀→乙醚洗涤沉淀→复溶→灵芝多糖肽溶液。

1.2.3 单因素提取试验 (1) 温度对多糖肽提取率的影响:分别在70、80、90、100℃温度下提取灵芝干粉中的多糖肽,计算其提取率。(2) 料液比对多糖肽提取率的影响:在相同的提取条件下对料液比为1:10、1:20、1:30、1:40进行提取比较,根据多糖肽提取率来确定最佳的料液比。(3) 碳酸钠溶液浓度对多糖肽提取率的影响:在相同的提取条件下按碳酸钠溶液浓度为0.1%、0.3%、0.5%、0.7%进行提取比较,根据多糖肽提取率来确定最佳的碳酸钠溶液浓度。(4) 提取时间对多糖肽提取率的影响:在相同的提取条件下以提取时间为1、2、3、4 h进行提取比较,根据多糖肽提取率来确定最佳提取时间。(5) 正交试验:根据单因素试验结果,以提取温度(A)、料液比(B)、碳酸钠溶液浓度(C)、提取时间(D)为考察因素,以灵芝多糖肽提取率为考察指标,选取L₉(3⁴)正交表进行灵芝多糖肽碳酸钠溶液提取的正交试验,并进行极差分析,以确定最佳提取条件(见表1)。

1.3 指标测定

1.3.1 多糖肽提取率的计算

$$Y/\% = \frac{A \times V}{B \times M} \times 100$$

其中Y为多糖肽提取率/%;A为每份干燥灵芝粉提取得到的多糖肽溶液中氮的含量/%;B为每份干燥灵芝粉中氮的含量/%;V为定容后多糖肽溶液的体积/mL;M为每份干燥灵芝粉的

收稿日期:2010-05-27

基金项目:辽宁省教育厅科研基金资助项目(20060391)

第一作者简介:刘政(1977-),男,吉林省敦化市人,硕士,讲师,从事活性肽制备、微生物冶金研究。E-mail:liuzheng-workbag@163.com。

重量/g。

1.3.2 总氮的测定 灵芝总氮测定采用凯氏定氮法^[6]。

2 结果与分析

2.1 脱脂对多糖肽提取率的影响

试验表明,经脱脂后干燥灵芝粉多糖肽提取率提高 36.4%,这是因为干燥灵芝粉脱去脂肪后,蛋白质和肽的疏水部分不再与灵芝粉中的脂肪作用,使其亲水基团更易与溶剂水分子结合,从而使浸提液中蛋白质和肽的含量大幅增加,从而提高了多糖肽的得率(见图 1)。因此在单因素试验和正交试验前,都对干燥灵芝粉进行了脱脂预处理。

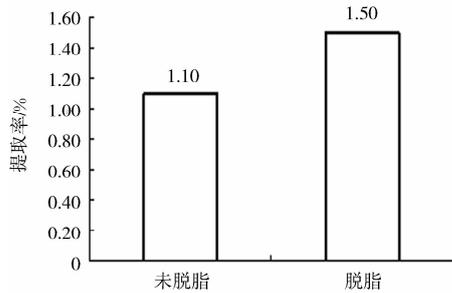


图 1 脱脂预处理对提取率的影响

2.2 碳酸钠溶液对多糖肽提取率的影响

试验表明,适当浓度碳酸钠溶液对提高多糖肽提取率有显著影响,可使提取率大大提高(见图 2),在该预试验中提取率提高了 35.7%,这是因为碱性盐可破坏灵芝纤维组织,并能影响蛋白质水化层和荷电层,促使多糖肽从组织中透出。

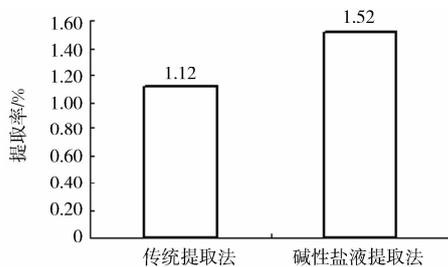


图 2 碳酸钠溶液对提取率的影响

2.3 单因素试验结果

2.3.1 温度对多糖肽提取率的影响 由图 3 可以看出,多糖肽的提取率随着温度的升高而增大,试验以得率为衡量指标,故提取温度以 100℃为宜。一般而言,提取温度和提取率呈正相关,但高提取温度对提取设备的要求较高,提取成本也相应增加,需要结合其它条件综合考虑提取温度。选定 85、93、100℃作正交试验温度单因素的三个

水平。

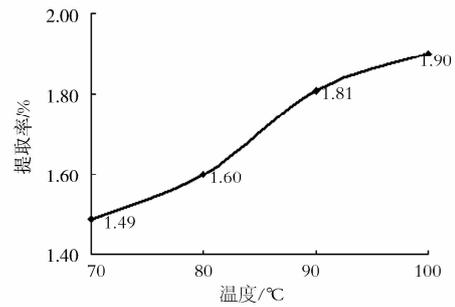


图 3 温度对提取率的影响

2.3.2 料液比对多糖肽提取率的影响 由图 4 可知,随着料液比的降低,会增加灵芝多糖肽的溶出量,因而多糖肽的提取率也随之提高,当达到一定比例后,多糖的提取率趋于平缓,综合考虑浸提效率和下一阶段的蒸发浓缩效率,选择 1:30(W/V)为最佳料液比。从中选出 1:20、1:25、1:30 作为正交试验料液比单因素的三水平。

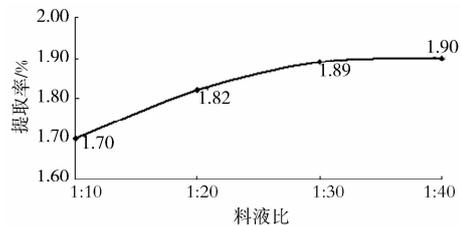


图 4 料液比对提取率的影响

2.3.3 碳酸钠溶液浓度对多糖肽提取率的影响

从图 5 可看出,低浓度时,随碳酸钠溶液浓度提高,多糖肽提取率逐渐增加,这是因为碱性盐可破坏灵芝纤维组织,且某些部位有成盐效应,这些都促使多糖肽从组织中透出。但浓度再增高时多糖肽提取率有所降低,这是因为高浓度碳酸钠溶液能促使蛋白聚糖链断裂,并且由于荷电量的增加,破坏了蛋白质周围的水化层,从而使糖肽成分减少。因此取 0.5%为最佳碳酸钠溶液浓度,并取 0.4%、0.5%、0.6%为正交试验碳酸钠溶液浓度单因素的三水平。

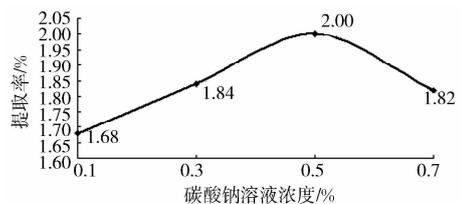


图 5 碳酸钠溶液浓度对提取率的影响

2.3.4 提取时间对多糖肽提取率的影响 从图 6 可看出,多糖肽提取率随提取时间延长而提高,

这是因为时间的增加可以促进多糖肽的溶解,但2 h以后曲线增加趋势逐渐变缓,所以从经济角度考虑,提取时间2 h最为适宜,对残渣可以再进行1次或2次浸提以使多糖肽充分溶出。选择2.0、2.5、3.0 h作为正交试验提取时间单因素的三水平。

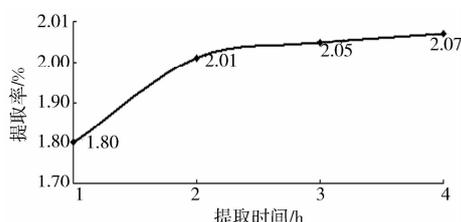


图6 提取时间对提取率的影响

表1 正交试验结果分析

试验号	因素				提取率/%
	提取温度(A)/℃	料液比(B)W/V	碳酸钠溶液浓度(C)/%	提取时间(D)/h	
1	85	1:20	0.40	2.0	1.60
2	85	1:25	0.50	2.5	1.73
3	85	1:30	0.60	3.0	1.76
4	93	1:20	0.50	3.0	1.84
5	93	1:25	0.60	2.0	1.85
6	93	1:30	0.40	2.5	1.91
7	100	1:20	0.60	2.5	1.90
8	100	1:25	0.40	3.0	1.94
9	100	1:30	0.50	2.0	2.07
K1	5.09	5.34	5.45	5.52	
K2	5.60	5.52	5.64	5.54	
K3	5.91	5.74	5.51	5.54	
R	0.27	0.13	0.06	0.01	

2.4 热水提取正交试验结果

4个因素中对提取率影响 A>B>C>D,可见温度对提取率影响最大,料液比和碱性盐溶液

浓度次之,提取时间影响最小,得出提取工艺最佳组合为 A₃B₃C₂D₃,即温度为 100℃,料液比为 1:30,碳酸钠溶液浓度为 0.5%,时间为 3 h。此组合并未出现在正交试验设计表的 9 种组合中,理应进行验证试验,但是,由极差值看出,提取时间(D)因素为不重要因素,从成本和效率的角度,可选择 A₃B₃C₂D₁组合,即温度为 100℃,料液比为 1:25,碳酸钠溶液浓度为 0.5%,时间为 2 h。

3 结论

试验结果表明,在灵芝多糖肽的提取中,石油醚脱脂预处理后,约能提高多糖肽的得率 36.4%,因此提取前的脱脂处理是必要的。在灵芝多糖肽的提取中,相对于传统的热热水提取法,低浓度碱液提取法能大大提高提取率。根据正交试验的结果,灵芝多糖肽的最佳提取工艺条件为:温度 100℃,料液比 1:30,提取液为 0.5%碳酸钠溶液,提取时间为 2.0 h,提取率为 2.07%。这 4 个影响因素按从主到次的顺序排列依次是:温度>料液比>碱性盐溶液浓度>提取时间。

参考文献:

[1] 李开木,陈休强,何修金.灵芝营养成分测试分析初报[J].营养学报,1994,16(1):95-98.
 [2] 赵镭.灵芝生物富硒及富硒灵芝硒蛋白的分离纯化和抗氧化性研究[D].北京:中国农业大学,2004.
 [3] 何慧,谢笔钧,吕玉华,等.发酵灵芝粉中肽类化合物的分离及其生物活性研究[J].华中农业大学学报,1997,16(5):416-421.
 [4] 何慧,孙颖,谢笔钧.灵芝中抑制羟基自由基活性成分及其提取条件研究[J].食用菌学报,2003,10(4):7-10.
 [5] 赵东旭,王利波,杨新林,等.灵芝子实体抗肿瘤成分提取的研究[J].北京理工大学学报,1999,19(6):782-786.
 [6] 戚雁飞.灵芝中灵芝多糖的含量测定研究[J].中国中药杂志,2006,31(5):852-853.

Preparation of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides Peptide

LIU Zheng, YAN Han, WANG Li-wei, WANG Qian-ling

(Science College of Liaoning Technical University, Fuxin, Liaoning 123000)

Abstract: Taking peptide yield as index, the extraction process of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide with the extraction adding pre-treatment measures and the low concentration of alkali was studied. The results showed that; after petroleum ether degreasing pretreatment, polysaccharide peptide yield could be increased 36.4%, the best extraction conditions of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide were: temperature 100℃, liquid ratio 1:30, 0.5% sodium carbonate solution, extraction time 2 h, extraction rate 2.07%. The order from the primary to the inferior by the order was: temperature> liquid ratio> alkaline salt concentration> extraction time.

Key words: *Ganoderma lucidum*; polysaccharide peptide; yield