



猴头菇有机锗的提取工艺优化及其抗氧化作用

张奕婷¹, 李 婷², 于 波¹, 张文韬¹

(1. 大庆师范学院 生物工程学院, 黑龙江 大庆 163712; 2. 海南大学 热带农林学院, 海南 海口 570228)

摘要:为进一步开发利用猴头菇,以有机锗提取率为指标,对猴头菇中有机锗提取影响较大的5个因素:NaOH浓度、乙醇浓度、超声时间、浸提时间和浸提温度进行了优化。结果表明:较优提取工艺条件为,NaOH浓度 $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,乙醇浓度95%,超声时间15 min,浸提时间120 min,浸提温度 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,在此条件下,有机锗提取率为 $25.34\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在有机锗多糖浓度为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除率达38%,证明其具有较好的体外抗氧化能力。

关键词:猴头菇;有机锗;提取工艺;抗氧化性

猴头菇(*Hericium erinaceus*),又名猴头菌,属猴头菌科(HERICIACEAE)、猴头菌属(*HETICIUM*)^[1],因外形酷似猴头而得名,是一种食药两用真菌。猴头菇含有丰富的多糖、蛋白质和脂肪,具有抗氧化、抗衰老、增强免疫力、抗肿瘤、抗溃疡、降血糖降血脂等多方面的药理作用^[2]。有机锗具有抗癌、免疫调节及清除自由基等多重医疗保健作用^[3-5]。本试验采用苯芴酮分光光度法^[6]对猴头菇中有机锗的提取工艺进行优化,同时对提取得到的有机锗多糖体外抗氧化活性进行研究,以期为猴头菇进一步的开发和利用提供科学数据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

猴头菇菌干购自大庆市让胡路区庆客隆超市;所用药品均为国产分析纯;UV725N紫外可见分光光度计(上海科学精密仪器厂)、ZD-B酸度计(上海天达仪器有限公司)、KQ3200E超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 有机锗苯芴酮显色法 有机锗标准溶液。原液A:准确称取0.1 g锗粉于25 mL 25% NH_4OH 溶液中,加4 mL 30% H_2O_2 溶液后水浴加热至锗粉溶解后,加热蒸发至近干,再加入7 mL浓度为 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液,加热溶解后

酸化,用蒸馏水定容至100 mL制成原液A。

标准液B:取1 mL原液A,用蒸馏水定容至100 mL制得标准液B。

有机锗标准曲线(图1)、含量测定与提取率计算^[7]。

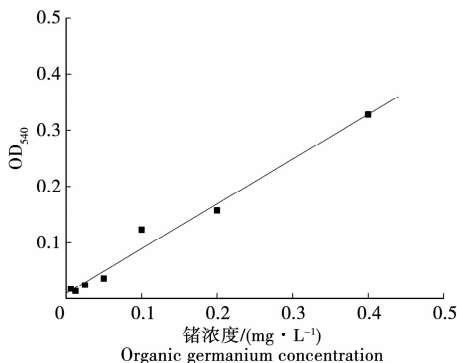


图1 有机锗浓度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of organic germanium concentration

1.2.2 有机锗提取基本流程 原料清洗→烘干→粉碎→称重1 g→料液比1:30→超声→浸提→离心($3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,15 min,取上清)→4倍乙醇醇沉($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置过夜)→离心($3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,15 min取沉淀)→seavage法去蛋白→干燥→称重→苯芴酮显色法测OD值→计算有机锗提取率。

1.2.3 单因素试验设计 在前期预试验基础上,选择醇浓度80%,NaOH浓度 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,超声时间9 min, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴90 min为基本试验参数。

NaOH浓度。其它参数不变,研究NaOH浓度(0、20、40、60、80、 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)对猴头菇有机锗提取率的影响。

乙醇浓度。其它参数不变,研究乙醇浓

收稿日期:2018-07-23

基金项目:2016年黑龙江省大学生创新创业训练资助项目(201610235035)。

第一作者简介:张奕婷(1983-),女,硕士,讲师,从事发酵及生物工程下游技术研究。E-mail:Andromada@163.com。

度(70%、75%、80%、85%、90%、95%)对猴头菇有机锗提取率的影响。

超声时间。其它参数不变,研究超声时间(3、6、9、12、15、18 min)对猴头菇有机锗提取率的影响。

浸提时间。其它参数不变,研究浸提时间(30、60、90、120、150、180 min)对猴头菇有机锗提取率的影响。

浸提温度。其它参数不变,研究浸提温度(40、50、60、70、80、90 ℃)对猴头菇有机锗提取率的影响。

1.2.4 正交试验方案 根据单因素试验结果,选择适当水平进行 $L_{16}(4^5)$ 正交试验方案设计。

1.2.5 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力测定 参考张强^[8]的方法并稍作修改,本试验通过 Fenton 反应生成羟基自由基($\cdot\text{OH}$)。将有机锗多糖用双蒸水配成质量浓度为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。在比色管中依次加入 $9\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ FeSO}_4\cdot$ 溶液 1 mL , $9\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸溶液 1 mL , $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的有机锗多糖溶液 1 mL , 最后加入 $8.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$ 1 mL 后摇匀, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热 30 min 后取出,测定吸光度。以蒸馏水为参比。

羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除率计算公式为:
清除率 $E(\%) = [A_0 - (Ax - Ax_0)] / A_0 \times 100$

式中: A_0 为不加有机锗多糖溶液的吸光度;
 Ax 为加入有机锗多糖溶液后的吸光度; Ax_0 为无显色剂时有机锗多糖的本底吸收值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验对有机锗提取率的影响

2.1.1 NaOH 浓度 由图 2 可知,猴头菇有机锗提取率随着 NaOH 浓度的升高呈先增大再减小的趋势,在 NaOH 浓度达到 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时提取率达到峰值后逐渐降低。

2.1.2 乙醇浓度 由图 3 可知,猴头菇有机锗提取率随着乙醇浓度的升高逐渐升高,在乙醇浓度为 90% 时提取率达到峰值后逐渐降低。

2.1.3 超声时间 由图 4 可知,猴头菇有机锗提取率随超声时间的增加逐渐升高,在 12 min 时提取率达到峰值后逐渐降低。

2.1.4 浸提时间 由图 5 可知,猴头菇有机锗提取率随浸提时间的增加逐渐升高,在 120 min 时提取率达到峰值后迅速下降。

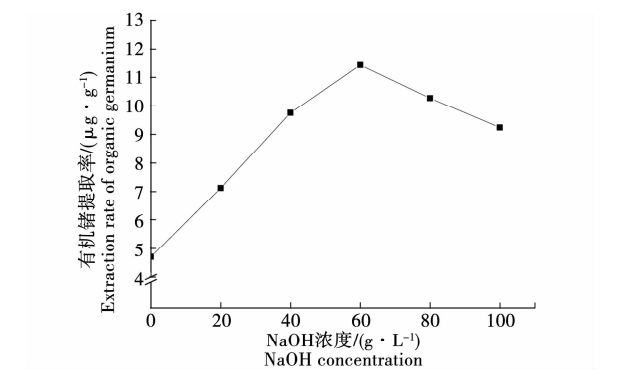


图 2 NaOH 浓度对有机锗提取率的影响
Fig. 2 Effects of NaOH concentration on extraction rate of organic germanium

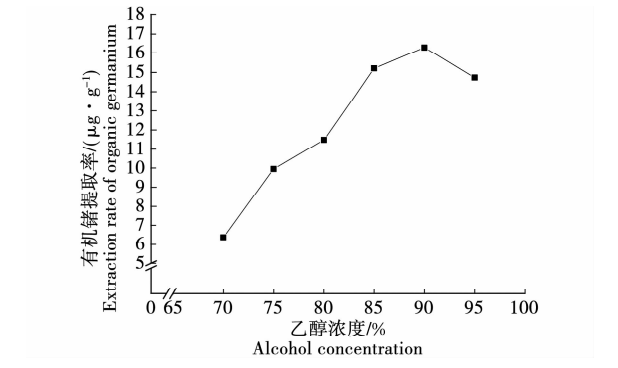


图 3 乙醇浓度对有机锗提取率的影响
Fig. 3 Effects of alcohol concentration on extraction rate of organic germanium

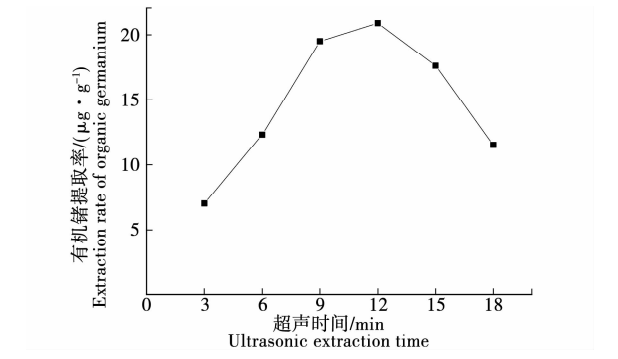


图 4 超声时间对有机锗提取率的影响
Fig. 4 Effects of ultrasonic time on extraction rate of organic germanium

2.1.5 浸提温度 由图 6 可知,猴头菇有机锗提取率随浸提温度的增加逐渐升高,在 $90\text{ }^\circ\text{C}$ 时达到峰值后逐渐降低。

2.2 正交试验结果与分析

在单因素试验的基础上,选取 NaOH 浓度、乙醇浓度、超声时间、浸提时间和浸提温度为因素,每个因素选取 4 个水平(表 1),以有机锗提取率为指标,按照 $L_{16}(4^5)$ 正交设计进行试验,确定最佳工艺参数组合。

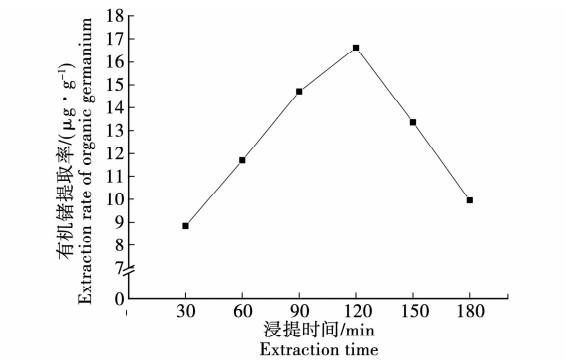


图5 浸提时间对有机锗提取率的影响
Fig.5 Effects of extraction time on extraction rate of organic germanium

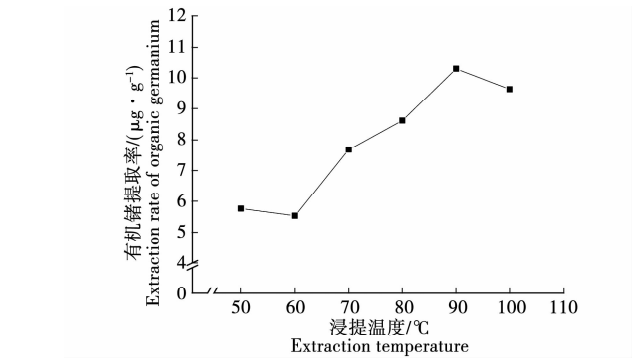


图6 浸提温度对有机锗提取率的影响
Fig.6 Effects of extraction temperature on extraction rate of organic germanium

表 1 五因素四水平试验设计
Table 1 Five factors and four levels experimental design

水平 Levels	A NaOH 浓度/(g·L ⁻¹) NaOH concentration	B 乙醇浓度/% Alcohol concentration	C 超声时间/min Ultrasonic time	D 浸提时间/min Extraction time	E 浸提温度/°C Extraction temperature
1	20	80	6	60	70
2	40	85	9	90	80
3	60	90	12	120	90
4	80	95	15	150	100

表 2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal test results

编号 No.	因素 Factors					有机锗提取率/(μg·g ⁻¹) Extraction rate of organic germanium
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	2.25
2	1	2	2	2	2	1.20
3	1	3	3	3	3	2.08
4	1	4	4	4	4	3.07
5	2	1	2	3	4	18.19
6	2	2	3	4	3	7.89
7	2	3	4	1	2	17.97
8	2	4	1	2	1	15.73
9	3	1	3	4	2	18.25
10	3	2	4	3	1	25.25
11	3	3	1	2	4	14.84
12	3	4	2	1	3	20.47
13	4	1	4	2	3	20.25
14	4	2	3	1	4	23.11
15	4	3	2	4	1	22.60
16	4	4	1	3	2	21.36
k ₁	2.150	14.735	11.585	15.905	16.458	
k ₂	14.900	14.363	15.615	13.005	14.650	
k ₃	19.703	14.327	14.793	16.720	12.672	
k ₄	21.830	15.157	16.590	12.953	14.803	
R	19.680	0.830	5.005	3.767	3.786	
F	517.213* [*]	1.000	31.267* [*]	25.368 [*]	15.957 [*]	F _{0.01} =29.500 F _{0.05} =9.280

由表2可知,以有机锗提取率为指标,最优提取工艺为 $A_4B_4C_4D_3E_1$,即NaOH浓度 $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,乙醇浓度95%,超声时间15 min,浸提时间120 min,浸提温度为 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。各因素对有机锗提取率的影响程度依次是NaOH浓度>超声时间>浸提温度>浸提时间>乙醇浓度。

方差分析得出NaOH浓度和超声时间对有机锗提取率影响极显著,浸提时间和浸提温度对有机锗提取率影响显著。

2.3 验证性试验

在最优提取工艺条件下进行验证试验3次,测得有机锗平均提取率为 $25.34\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,结果表明,此提取工艺重复性好、稳定可靠。

2.4 抗氧化活性

按照1.2.5测定方法,以验证性试验所得有机锗多糖进行羟自由基清除率测定。试验结果表明,在有机锗多糖浓度为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率达38%,表现出良好的抗氧化活性。

3 结论

本试验研究了猴头菇有机锗的提取工艺,在单因素试验基础上,通过 $L_{16}(4^5)$ 正交设计试验,得到最优提取工艺:NaOH浓度 $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,乙醇浓

度95%,超声时间15 min,浸提时间120 min、浸提温度为 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在此条件下,有机锗提取率为 $25.34\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,猴头菇含锗多糖的羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率为38%,具有良好的抗氧化活性,可作为一种良好的生物活性物质进行开发利用。

参考文献:

[1] 刁治民,杨秀玲,韩彦艳. 蕈菌工程学[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社,2011:345.

[2] 纪伟,唐宁,赵端,等. 猴头菇的药理作用及栽培与应用[J]. 基因组学与应用生物学,2016,35(5):1252-1257.

[3] 郑海鹏. 有机锗的生理功能及在食品中的应用[J]. 微量元素与健康研究,2011,28(4):65-67.

[4] Nakamura T, Saito M, Aso H. Effects of a lactobacilli, oligosaccharide and organic germanium intake on the immune responses of mice[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan,2012,76(2):375-377.

[5] 王菊凤,杨道德,李鹄鸣. 蛹虫草富锗胞外多糖对大鼠长期毒性研究[J]. 中国药理学通报,2014,30(9):1329-1330.

[6] 严和平,张寓,张举成,等. 云南普洱茶中锗的测定条件及含量研究[J]. 食品工业科技,2010,31(9):343-345.

[7] 张奕婷,张文韬,鲁明杰,等. 超声波辅助提取姬松茸有机锗的工艺研究[J]. 安徽农学通报,2018,24(17):15-17,37.

[8] 张强,张黎明. 阿魏酸茯苓多糖的抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2011(9):1077-1080.

Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activity of Organic Germanium from *Hericum erinaceus*

ZHANG Yi-ting¹, LI Ting², YU Bo¹, ZHANG Wen-tao¹

(1. Institute of Biological Engineering, Daqing Normal College, Daqing 163712, China; 2. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to further develop and utilize *Hericum erinaceus*, the extraction rate of organic germanium was used as the index in this experiment. Five factors affecting the extraction of organic germanium from *Hericum erinaceus* were optimized, including NaOH concentration, ethanol concentration, ultrasonic time, extraction time and temperature. The results showed that the optimum extraction conditions were NaOH concentration of $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ethanol concentration of 95%, ultrasound time of 15 min, extraction time of 120 min and extraction temperature of $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Under these conditions, the extraction rate of organic germanium was $25.34\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. When the concentration of organic germanium polysaccharide was $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the scavenging rate of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) reached 38%, which proved that it had good antioxidant activity *in vitro*.

Keywords: *Hericum erinaceus*; organic germanium; extraction process; antioxidant activity