CO_2超临界萃取深层发酵灵芝真菌菌丝体中麦角固醇的研究

刘国杰
（衡水学院，河北衡水 053000）

摘要：采用CO_2超临界萃取深层发酵灵芝真菌菌丝体中麦角固醇的含量，在单因素实验基础上，$L_9(3^4)$正交实验优化萃取条件，结果表明，萃取压力、萃取温度的作用效果显著，CO_2流量影响不显著，三因素的适宜组合为：$A_2B_3C_3$即：萃取压力 20 MPa、萃取温度 50 ℃、CO_2流量 2.5 L/min，试验验证此组合条件下麦角固醇的萃取量为 1.1362 mg/g，高于正交试验组合。

关键词： 超临界萃取；麦角固醇；灵芝
文章篇号：1673-9078(2013)6-1346-1348

Supercritical Fluid Extraction of Ergosterol from Fermented *Ganoderma lucidum*

LIU Guo-jie
(Heng shui College, Heng shui 053000, China)

Abstract: Supercritical fluid extraction conditions of ergosterol from *Ganoderma lucidum* after fermentation were optimization by orthogonal test on the basis of single factor experiment. The results showed that the extraction pressure and temperature were significant factors and the optimization conditions were as follows: extraction pressure20 MPa, extraction temperature 50 ℃, and CO_2 flow rate 2.5 L/min, under which the content of ergosterol reached 1.1362 mg/g.

Key words: Supercritical fluid extraction; Ergosterol; *Ganoderma lucidum*

灵芝隶属于担子菌纲、多孔菌目多空菌科、药用价值较高的名贵真菌，具有消炎、利尿、健胃、防止动脉硬化、抗肿瘤、抗衰老、提高免疫力之功效[1]，研究表明，灵芝真菌中有多糖、三萜、灵芝酸、麦角固醇等多种功能性物质，麦角固醇在灵芝中的含量较高、一般可达到0.2%以上，一般麦角固醇在灵芝中的含量可达到紫外线照射下，麦角固醇可转化为VD_2前体，是生产黄体酮、氢化可的松、VD_2等的主要原料，市场需求较大[2~3]。

利用深层发酵法生产灵芝真菌菌丝体具有省时、省力、环保、易于控制等特点[4~5]。超临界CO_2流体萃取是利用超临界流体的溶解能力与其密度的关系，即利用压力和温度对超临界流体溶解能力的影响而进行的。在超临界状态下，将超临界流体与待分离的物质接触，使其有选择性地把极性大小、沸点高低和分子量大小的成分依次萃取出来，具有省时、省力、环保、分离效果好的特点[6]。本研究在深层发酵灵芝真菌的基础上，采用CO_2超临界萃取灵芝真菌菌丝体中的麦角固醇含量，对萃取条件进行优化研究。

收稿日期：2013-01-22

作者简介：刘国杰(1969-)，男，主要从事农学、园艺、微生物等方面的研究

1 材料与方法

1.1 材料

灵芝真菌（Ganoderma Lucidum）（本实验室保藏），麦角甾醇标准品（购于国家标准物质网纯度≥98.5%）。

1.2 主要仪器

高效液相色谱，Agilent1100，美国；旋蒸仪，型号：EV311莱伯泰科有限公司；电子天平，上海田宫称重制造有限公司；10 L发酵罐，中国丽 上海高机生物有限公司；分光光度计，UV-250，日本岛津；HA221-40(50)25型超临界萃取仪，江苏南通华安超临界萃取有限公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱测定条件[7~9]

色谱柱，安捷伦C18色谱柱（200 mm×4.6 mm，5 μm），流动相甲醇（色谱级）流速1.2 mL/min，检测波长待定，柱温30 ℃，进样量10 μL，测定波长282 nm。

1.3.2 麦角甾醇标准品处理

精确称取麦角甾醇标准品10 mg，置于50 mL容量瓶中，无水乙醇定容，摇匀既得。

1.3.3 麦角固醇标准曲线制备及线性范围考察

准确称取一定量的麦角甾醇标准品，转入50 mL容量瓶中，无水乙醇定容，待用，以此为基液，分别配置成0.04 mg/mL、0.08 mg/mL、0.12 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL，此5份标准液在上述色谱条件下进样测定，以峰面积为纵坐标，以麦角甾醇浓度为横坐标进行回归，得到线性回归方程为y=28685x-382.61（R=0.9998），该回归方程在20~500 μg的范围内，线性关系良好。

1.3.4 灵芝真菌深层培养条件[1]

1.3.4.1 培养基

斜面培养基：马铃薯200.0 g/L、葡萄糖20.0 g/L、$MgSO_4·7H_2O$1.5 g/L，$KH_2PO_4$3.0 g/L、VB_1 0.01 g/L、琼脂20.0 g/L、20%的土豆汁配制。

种子培养基：葡萄糖30.0 g/L、黄豆粉10.0 g/L、酵母膏1.0 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L、KH_2PO_4 1.0 g/L、VB_1 0.01 g/L、pH 6.0，蒸馏水配制。

发酵培养基：碳源为葡萄糖3.6%、氮源为蛋白胨0.4%、pH 6.0、酵母膏0.2%、KH_2PO_4 0.1%、$MgSO_4·7H_2O$ 0.05%、VB_1 0.005%。

1.3.4.2 培养方法

种子液的培养：从28 ℃培养6 d的斜面上用接种钩切1 cm^2带培养基的菌体转入装有150 mL种子培养基的500 mL三角瓶中，28 ℃、150 r/min培养3 d。

发酵培养：将种子以10%的接种量，接入装有70%的10 L发酵罐中，转速100 r/min，通气量2.5 L/min，28 ℃培养6 d。

1.3.5 灵芝发酵样品处理方法

取一定量灵芝发酵液，3000 r/min离心10 min，弃上清液，水洗菌体、再离心，至上清液不带发酵液颜色为止，收集菌体，在60 ℃恒温烘箱中烘干至恒重，在干燥器中冷却至常温，称量，捣碎后，精确称量1 g样品于500 mL三角瓶中，添加20 mL甲醇溶液，超临界萃取，待静止后取上清液，0.45 μm滤膜过滤后,量取体积，4 ℃保藏待用。

1.3.6 CO_2超临界萃取方法

灵芝真菌深层发酵120 h时间后，离心将菌体与发酵液分离，取菌体，在60 ℃恒温烘箱中烘干至恒重，在干燥器中冷却至常温，称量，捣碎后，过筛，取100 g实验样品装入反应釜中，打开CO_2气体，同时调节萃取釜、分离釜I、分离釜II温度达设定温度，然后加压至设定压力，调节CO_2流量，使超临界CO_2流体在设定的压力、温度下进行萃取循环，当达到试验设定的萃取时间后，从分离釜I和分离釜出料口接收萃取液，合并分离釜I和分离釜II萃取液，定容至500 mL，即得灵芝真菌深层发酵菌体超临界CO_2萃取液样品，备用。

2 结果与讨论

2.1 萃取压力对灵芝真菌麦角固醇萃取量的影响

CO_2超临界萃取过程中，气体密度的变化会直接影响萃取的效果，萃取压力是影响气体密度的重要因素，萃取压力的变化会显著提高物质的溶解能力，因此，变化萃取压力会影响灵芝真菌麦角固醇萃取量。实验过程中，控制萃取温度为30 ℃、萃取时间1 h，CO_2流量1.0 L/min，分别设定萃取压力为5、10、15、20、25、30 MPa，萃取结果如图1所示。

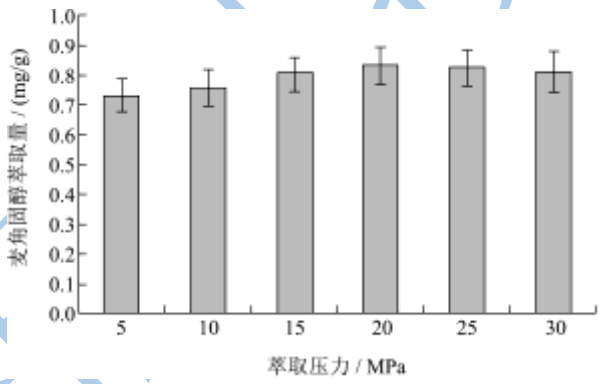


图 1 萃取压力对灵芝真菌麦角固醇萃取量的影响

Fig.1 Effect of the extraction pressure on ergosterol

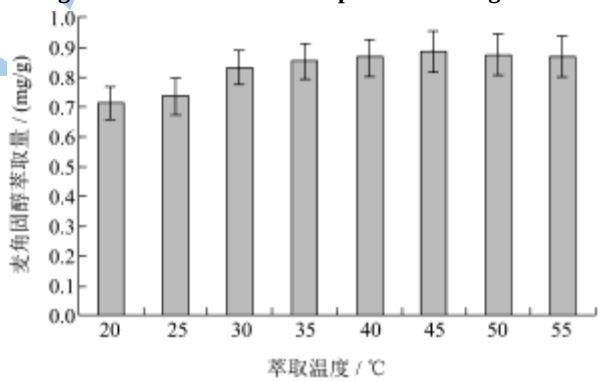


图 2 萃取温度对灵芝真菌麦角固醇萃取量的影响

Fig.2 Effect of the extraction temperature on ergosterol

如图1所示，CO_2超临界萃取过程中，萃取压力对灵芝真菌中麦角固醇的萃取量有一定的影响，萃取压力较小不利于麦角固醇的萃取，随萃取压力的增加，麦角固醇的萃取量不断增大，当萃取压力为20 MPa时，麦角固醇萃取量达到最大，之后随萃取压力的增大，麦角固醇的萃取量反而出现降低的趋势，表明萃取压力为20 MPa为适宜的萃取压力。

2.2 萃取温度对灵芝真菌麦角固醇萃取量的影响

CO_2超临界萃取过程中，萃取温度对萃取效果的影响较大，一定的萃取压力下，升高温度，被萃取物

挥发性增大，分子热运动增快，溶剂的溶解速率增加，提高了萃取效果。实验过程中，控制萃取压力为20 MPa，萃取时间1 h，CO_2流量1.0 L/min，分别设定萃取温度为20、25、30、35、40、45、50、55 ℃，萃取结果如图2所示。

如图2所示，萃取过程中，不同的萃取温度对麦角固醇的萃取量影响不同，温度为45 ℃时，麦角固醇的萃取量最大，因此，适宜于深层灵芝真菌发酵菌体中麦角固醇的萃取温度为45 ℃。

2.3 CO_2流量对灵芝真菌麦角固醇萃取量的影响

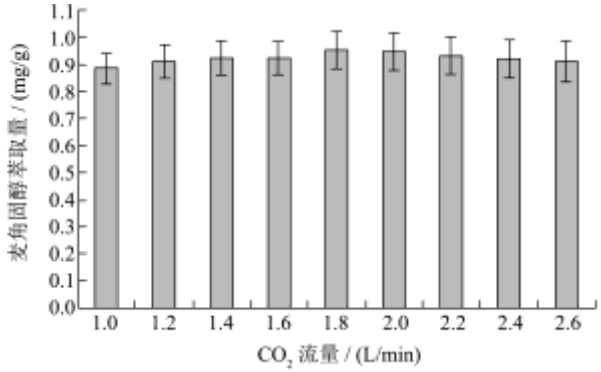


图 3 CO_2流量对灵芝真菌麦角固醇萃取量的影响

Fig.3 Effect of CO_2 velocity on ergosterol

在超临界萃取过程中，萃取压力为 20 MPa，萃取温度 45 ℃，萃取时间 1 h，进行试验，研究 CO_2流量对麦角固醇萃取量的影响，结果如图 3 所示。

由图 3 可知，随萃取过程中 CO_2 流量的增加，麦角固醇的萃取量不断增大，当 CO_2 流量为 1.8 L/min 时，麦角固醇萃取率达到最大，之后随 CO_2流量的增加，萃取量反而降低，因此，CO_2流量为 1.8 L/min 为适宜流量。

2.4 正交实验设计优化 CO_2超临界萃取工艺条件

2.4.1 CO_2超临界萃取正交实验设计

表 1 正交实验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test for optimization

水平	因素			
	A (萃取压力/MPa)	B (萃取温度/℃)	C [CO_2流量/(L/min)]	D (误差)
1	15	40	1.5	1
2	20	45	2	2
3	25	50	2.5	3

CO_2 超临界萃取深层灵芝真菌中麦角固醇正交实验设计因素水平设计如表 1 所示。

2.4.2 CO_2超临界萃取正交实验结果分析

由单因素实验研究可知，萃取压力、萃取温度、CO_2流量对灵芝真菌菌丝体中麦角固醇萃取量都有不同程度的影响，且影响的原因各不相同，在单因素试验研究的基础上，设计了 $L_9(3^4)$正交试验，优化组合萃取条件，结果如表 2、3 所示。

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Fermentation condition result of orthogonal test

水平	因素				麦角甾醇萃取量/(mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.70
2	1	2	2	2	0.75
3	1	3	3	3	0.88
4	2	1	2	3	0.93
5	2	2	3	1	0.99
6	2	3	1	2	0.96
7	3	1	3	2	0.84
8	3	2	1	3	0.87
9	3	3	2	1	0.86
K_1	0.78	0.82	0.85	0.86	
K_2	0.96	0.88	0.85	0.85	
K_3	0.86	0.90	0.91	0.90	
R	0.18	0.08	0.06	0.04	

表 3 正交试验各因素显著性分析

Table 3 Significant analysis of the orthogonal test results

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	0.036	2	36	19	*
B	0.027	2	27	19	*
C	0.003	2	3	19	
D	0.001	2	1	19	
误差	0	2			

由表 2、3 可知，优化组合萃取条件下，萃取压力、萃取温度的作用效果显著，CO_2 流量影响不显著，三因素的适宜组合为：$A_2B_3C_3$ 即：萃取压力 20 MPa、萃取温度 50 ℃、CO_2流量 2.5 L/min，试验验证此组合条件下麦角固醇的萃取量为 1.1362 mg/g，高于正交试验组合。

3 结论

CO_2 超临界萃取灵芝真菌菌丝体中麦角固醇的过程中，单因素实验研究表明，萃取压力、萃取温度、CO_2流量对麦角固醇的萃取量都有不同程度的影响，L_93^4 正交实验优化萃取条件，结果表明，萃取压力、萃取温度的作用效果显著，CO_2 流量影响不显著，三因素的适宜组合为：$A_2B_3C_3$ 即：萃取压力 20 MPa、萃取温度 50 ℃、CO_2流量 2.5 L/min，试验验证此组合条件下麦角固醇的萃取量为 1.1362 mg/g，高于正交试验组合。

参考文献

[1] 洪震.食用药用真菌技术及发酵生[M].北京:中国农业科技出版社,1992

[2] 张萱.灵芝活性成分的提取工艺及抗肿瘤成分的研究[D].天津:天津大学,2006,36-45

[3] Yasuharu Y, Masami Y, Kiyoshi S. Antitumer Promoting Effect of an Active Component of Polyporus Ergosterol and Related Compounds on Rat Urinary Bladder Carcinogenesis in a Short-Term Test with Concanavalin A [J]. Biol. Pharm. Bull, 2000, 23(11): 1298

[4] 姚松君,黄生权,陈壮耀,等.超声辅助提取灵芝三萜的工艺研究[J].现代食品科技,2009,25(10):1220-1223

[5] 孙金旭, 朱会霞, 王敏, 等. 灵芝真菌液体发酵培养基优化研究[J].现代食品科技,2007,23(12):51-53

[6] 朱会霞,孙金旭.灵芝真菌摇瓶发酵条件优化研究[J].中国酿造,2008,198(21):30-33

[7] 张景伟.超临界CO_2萃取山茱萸中有效成分的工艺研究[D].郑州:郑州大学,2005

[8] 邓玉清,王纪,虞龙.微生物麦角甾醇的研究进展[J].微生物学杂志, 2001,21(3):45

[9] 张方英,方保梅,张静.灵芝制品中麦角甾醇的检测方法[J].江苏农学院学报,1997,19:22

现代食品科技