

超声提取灵芝多糖的工艺研究

翟旭峰¹, 胡明华¹, 冯梦莹², 刘钧发², 游丽君²

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510623) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 采用响应曲面分析法对超声波提取灵芝多糖的工艺条件进行优化, 优化后的工艺为: 超声功率 320 W, 提取温度 70 °C, 提取时间 34 min, 其多糖得率为 2.78%, 氧自由基吸收能力 (ORAC 值) 为 1956 $\mu\text{mol Trolox/g}$, 与理论预测值无显著性差异。因此, 采用响应面分析法优化灵芝多糖超声提取工艺, 具有较好的可行性。在最佳条件下, 制备的灵芝多糖分子量组成为 18150 Da (20.07%) 和 6484 Da (79.93%), 大大低于传统水提灵芝多糖的分子量。

关键词: 灵芝; 多糖; 得率; 抗氧化活性; 分子量

文章编号: 1673-9078(2012)12-1704-1708

Optimization of Ultrasonic Extraction of *Ganoderma lucidum*

Polysaccharides by Response Surface Methodology

ZHAI Xu-feng¹, HU Ming-hua¹, FENG Meng-ying², LIU Jun-fa², YOU Li-jun²

(1. Infinitus (China) Company Ltd, Guangzhou 510623, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The response surface methodology was used to optimize the ultrasonic extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. Design expert analysis indicated that the optimal processing conditions were: ultrasonic power 320 W, temperature 70 °C and extraction time 34 min, respectively. The extraction yield and the ORAC value of polysaccharide were 2.78% and 1956 $\mu\text{mol Trolox/g}$, respectively, which had no significant differences with the predicted values, indicating that the response surface methodology was a reasonable method to optimize the extraction conditions of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. The molecular weights distribution of the polysaccharides under the optimal conditions were 18150 Da (20.07%) and 6484 Da (79.93%), much less than those of the polysaccharides prepared by traditional water extraction.

Key words: *Ganoderma lucidum*; polysaccharides; extraction yield; antioxidant activity; molecular weight distribution.

灵芝 (*Ganoderma Lucidum*) 属多孔菌科灵芝属真菌^[1]。医学研究表明, 灵芝在治疗肝、肾病、高血脂、神经衰弱、心血管疾病以及肿瘤等方面都有良好的临床疗效^[2]。灵芝多糖是灵芝中具有生物活性的主要功能成分之一, 具有提高免疫力、抗肿瘤、降血脂等功效^[3,4]。它的高效提取和生理活性方面的研究是目前科研工作者的研究热点。

提取灵芝多糖的常用方法是传统的热水浸提法, 但该法耗时长、效率低、提取物中多糖含量相对较低, 活性不高^[5]。因此提高灵芝多糖得率并增强其活性是提高灵芝产品效益和质量的关键。近年来, 人们采用超声波技术提取植物、真菌中的活性物质取得了很好

收稿日期: 2012-08-20

基金项目: 广东省部产学研项目 (2010A090200041); 广东省科技计划项目 (2011B030500004); 国家自然科学基金 (31101222); 企业横向项目“灵芝多糖构效关系及工艺研究”资助

通讯作者: 游丽君 (1982-), 女, 博士, 硕士生导师, 方向为食品生物技术

的效果。超声波产生的强烈的振动、较高的加速度、强烈的空化效应、搅拌作用等, 能加速有效成分进入溶剂, 另外超声波的次级效应, 如机械振动、乳化、扩散、击碎、化学效应等也能加速有效成分的扩散释放^[6-8]。

因此, 本研究采用响应面分析法, 以灵芝多糖的得率和抗氧化活性 (氧自由基吸收值, ORAC) 为指标, 优化超声提取灵芝多糖的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

灵芝, 由无限极 (中国) 有限公司提供; Trolox, FL 及 APPH 购于 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器与设备

高速冷冻离心机 (GL-21M) 长沙湘仪离心机有限公司; 荧光酶标仪 Varioskan Flash 美国 Thermo 公司; 紫外可见分光光度计 UV-2100 广州市广一科学仪器

有限公司; THZ-82A 水浴恒温振荡器 常州澳华仪器有限公司; Breeze 高效凝胶渗透色谱仪 美国 waters 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料预处理

先将灵芝粉碎,得到的灵芝粉末再按料液比 1:6 (m/V)的比例加入 95%乙醇,保持微沸状态回流 3 h。然后用滤布过滤,除去色素及其他一些醇溶性杂质,挥发干乙醇,得到的灵芝粉备用。

1.3.2 响应面优化超声法提取灵芝多糖

灵芝粉→加入蒸馏水→超声提取→Sevage 法除蛋白^[9]→离心 (4800 r/min, 20 min) →上清液用 80%乙醇、4℃条件下,醇沉 12h→所得沉淀用蒸馏水复溶→灵芝多糖溶液

根据 central composite 实验设计原理,在前期单因素实验结果的基础上,选取 (A) 超声功率 (320~640 W)、(B) 提取温度 (50~70℃)、(C) 提取时间 (20~60 min) 这三个对多糖得率和活性影响较大的因素,采用三因素三水平的响应面分析法,对灵芝多糖的提取工艺条件进行优化。每个自变量的低、中、高水平分别以 -1、0、1 编码,以灵芝多糖的得率 (Y₁) 和氧自由基吸收能力 (ORAC 值) (Y₂) 作为响应值,其具体实验方案和实验结果见表 1。

1.3.3 多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法^[10],并以葡萄糖为标准品作标准曲线。

1.3.4 多糖得率的计算

多糖得率 (%) = 溶液中多糖含量 (g) / 原料总重量 (g) × 100%

1.3.5 氧自由基清除能力(ORAC)

ORAC 的方法主要参考 Aguirre 等人^[11],并略作修改。在 96 孔板中加入 40 μL 荧光素 (FL, 3.5 nmol/L) 和 20 μL 的多糖样品 (0.1~0.2 mg/mL), 在 37℃ 下预热 15 min。然后快速加入 140 μL 的 AAPH 自由基 (12.8 mmol/L), 振荡后运行程序。在 37℃ 下以激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm 进行测定, 每 2 min 测定一次荧光值 f_i, 初始读数记为 f₀, 而样品的荧光值曲线的面积 (AUC) = 1 + f₁/f₀ + f₂/f₀ + f₃/f₀ + ... + f_n/f₀, 净面积 (Net AUC) = AUC - AUC_{空白}, Net AUC 值与 Trolox 浓度 Trolox (0~100 μmol/L) 作标准曲线。根据标准曲线计算得到的灵芝多糖 ORAC 值用 μmol Trolox/g 表示。

1.3.6 超声法和水提法制备灵芝多糖的分子量比较

(1) 超声法制备的灵芝多糖: 在响应面优化后的最佳工艺条件下制备超声灵芝多糖。

(2) 水提法制备的灵芝多糖: 灵芝粉末, 加入 25 倍蒸馏水, 用电热套加热保持微沸, 提取 2 h, 所

得多糖经过除蛋白、离心, 醇沉后, 所得沉淀用蒸馏水复溶, 得水提灵芝多糖。

对比超声法和水提法所得灵芝多糖的分子量组成差异。采用凝胶渗透色谱 (GPC) 测定分子量, 参考金鑫等^[12]的色谱条件进行分析。进样量 20 μL, 流动相为 0.02 mol/L 的磷酸二氢钾溶液, 流速为 0.6 mL/min, 柱温 35℃, 检测器为 2414 型示差折光检测器。相对分子质量分别为 5200、11600、23800、48600、148000、273000、410000、668000、1400000 Da 的葡聚糖标准品作标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 响应面法优化灵芝多糖提取工艺

2.1.1 多糖得率优化

表 1 灵芝多糖提取响应面分析方案及结果

Table 1 Design and results of response surface methodology of *Ganoderma lucidum* polysaccharides

序号	A (功率 /W)	B (温度 /℃)	C (时间 /min)	Y ₁ (得率 /%)	Y ₂ [ORAC (μmol Trolox/g)]
1	480	50	40	1.10	2283.4
2	640	50	40	1.32	1142.4
3	640	70	60	4.21	430
4	480	50	40	1.01	2242.4
5	480	50	20	0.91	2241.4
6	640	70	20	1.70	635.8
7	480	50	40	1.13	2322.2
8	480	30	40	1.85	789.8
9	480	70	40	1.12	2284.6
10	480	50	40	3.69	505.8
11	640	30	60	2.69	351.2
12	320	30	60	1.33	1267
13	640	30	20	1.98	584.6
14	320	70	60	3.14	475.4
15	320	50	40	1.36	3687
16	480	50	40	1.02	2253.4
17	320	30	20	0.83	2766
18	480	50	40	1.15	2306.8
19	480	50	60	1.31	1298.4
20	320	70	20	1.90	2314.8

根据实验结果建立的数学模型为:

$$\text{多糖得率} (\%) Y_1 = 5.92 + 4.73 \times 10^{-3} \times A - 0.32 \times B + 0.015 \times C - 6.41 \times 10^{-5} \times A \times B + 5.78 \times 10^{-5} \times A \times C + 7.94 \times 10^{-4} \times B \times C - 1.83 \times 10^{-6} \times A^2 + 3.46 \times 10^{-3} \times B^2 - 6.92 \times 10^{-4} \times C^2$$

式中: A-超声功率 (W); B-提取温度 (℃); C-提取时间 (min)。

表 2 灵芝多糖得率回归分析结果

Table 2 Variance analysis of the regression equation for the extraction yield of polysaccharides

项目	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F	显著性
模型	16.31	9	1.81	13.83	0.0002	*
A	1.12	1	1.12	8.52	0.0153	*
B	3.55	1	3.55	27.12	0.0004	*
C	2.87	1	2.87	21.93	0.0009	*
AB	0.34	1	0.34	2.57	0.1402	
AC	0.27	1	0.27	2.09	0.1788	
BC	0.81	1	0.81	6.16	0.0325	*
A ²	6.03E-003	1	6.03E-003	0.046	0.8345	
B ²	5.26	1	5.26	40.17	<0.0001	**
C ²	0.21	1	0.21	1.61	0.2334	
残差	1.31	10				
失拟项	0.98	5	0.20	3.15	0.1171	
净误差	0.017	5	3.50E-003			
总离差	17.62	19				

注：A-超声功率；B-提取温度；C-提取时间

当“Prob>F”值小于 0.05 即表示该项指标对模型影响显著，从表 2 分析结果可知，整个模型的“Prob>F”值为 0.0002，而失拟项“Prob>F”值大于 0.05，表明该二次方程模型高度显著。超声提取温度的平方高度显著，提取温度、提取时间、超声功率、功率与时间的交互作用显著。在所选取的各因素水平范围内，按照对多糖得率的影响从大到小排序为：提取温度>提取时间>超声功率。

2.1.2 因素间相互作用

经模型回归分析得知，模型能够很好地表达了各因素与响应值之间的变化关系。由于各因素对多糖得率的影响程度及趋势不同，需要综合评价各变量与响应之间、变量与变量之间的关系。

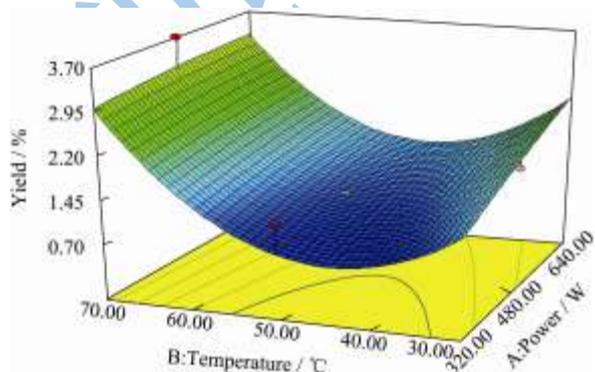


图 1 超声功率与提取温度 (AB) 对灵芝多糖得率的影响
Fig.1 The effects of ultrasonic power and temperature on the extraction yield

2.1.2.1 超声功率与提取温度 (AB) 之间的交互作用

当提取时间为 40 min 时，超声功率和提取温度对多糖得率的影响如图 1 所示。当提取温度较低时，多糖得率随着超声功率的升高而提高，这可能是由于随着超声功率的升高，“空化现象”、“机械振动”以及“热效应”等特性越发显著，加快原料细胞壁的破碎，使溶液温度快速上升，加快多糖的溶出；当提取温度较高时，多糖得率随超声功率的升高变化不大，说明在高温条件下，超声功率对得率的影响已不占主导地位。当超声功率较低时，多糖得率随温度上升先稍有降低后急速升高，超声功率较高时也呈现这种趋势，说明高温有助于多糖溶出，这可能与多糖溶解度在高温下较高有关。所以保持一定的超声功率，较高的温度有利于灵芝多糖的提取。

2.1.2.2 超声功率与提取时间 (AC) 之间的交互作用

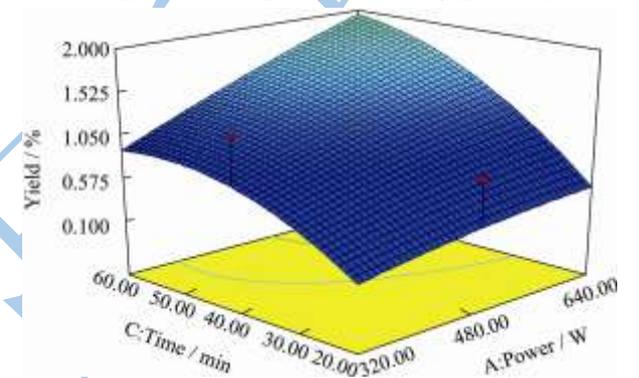


图 2 超声功率与提取时间 (AC) 对灵芝多糖得率的影响
Fig.2 The effects of ultrasonic power and time on the extraction yield

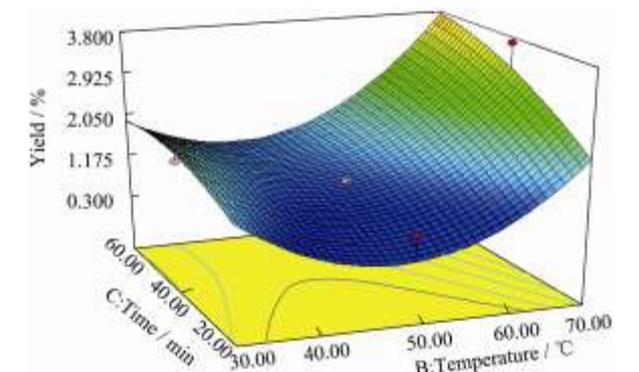


图 3 提取温度与提取时间 (BC) 对灵芝多糖得率的影响
Fig.3 The effects of temperature and time on the extraction yield

当提取温度为 50 ℃时，超声功率和提取时间对多糖得率的影响如图 2 所示。当提取时间较短时，多糖得率随功率增大提高较缓慢，且多糖得率在提取时间较短时均较低，可能由于超声时间过短，还不足以很好地破碎细胞，超声所产生的“热效应”也不够明显，不利于多糖的溶出；当提取时间较长时，多糖得

率随功率增大提高较快,说明超声对细胞的破碎作用能够很好地发挥。当超声功率一定时,多糖得率随提取时间的增加而提高,说明随着时间的延长,多糖充分溶出,但多糖得率在提高到一定程度后趋于平缓,这可能因为得率接近极限。所以较高的功率和较长的提取时间有利于灵芝多糖的提取,但考虑到能耗,多糖结构的变化以及多糖的纯度,也不宜选用过高的功率和提取时间。

2.1.2.3 提取温度与提取时间(BC)之间的交互作用

当超声功率为480 W时,提取温度和提取时间对多糖得率的影响如图3所示。当提取温度一定时,多糖得率随时间增加而提高,最后趋于平缓;当提取时间一定时,多糖得率随温度升高先稍有降低后急速升高。所以较高的温度和较长的提取时间有利于灵芝多糖的提取。

2.1.3 多糖氧自由基吸收能力(ORAC)值优化

表3 多糖氧自由基吸收能力回归分析结果

Table 3 Variance analysis of the regression equation for the

ORAC values of polysaccharides

项目	平方和	自由度	均方	F值	Prob>F	显著性
模型	1.68E+007	9	1.87E+006	17.90	<0.0001	**
A	5.43E+006	1	5.43E+006	52.02	<0.0001	**
B	1.95E+005	1	1.95E+005	1.87	0.2014	
C	2.23E+006	1	2.23E+006	21.36	0.0009	*
AB	2.36E+005	1	2.36E+005	2.26	0.1638	
AC	1.05E+006	1	1.05E+006	10.07	0.0099	*
BC	12230.48	1	12230.48	0.12	0.7391	
A ²	5.23E+005	1	5.23E+005	5.02	0.0490	*
B ²	4.87E+006	1	4.87E+006	46.68	<0.0001	**
C ²	1.20E+005	1	1.20E+005	1.15	0.3093	
残差	1.04E+006	10	1.04E+006			
失拟项	1.04E+004	5	2.01E+003	224.51	0.1036	
净误差	4625.81	5	925.16			
总离差	1.79E+007	19				

注: A-超声功率; B-提取温度; C-提取时间

数学模型的建立

根据实验结果建立的数学模型为:

$$\text{多糖 ORAC 值}(\mu\text{mol Trolox/g}) Y_2 = 3704.11 - 28.17A + 303.86B - 31.35 \times C + 0.054AB + 0.113AC - 0.098BC + 0.017A^2 - 3.33B^2 - 0.52C^2$$

式中: A-超声功率(W); B-提取温度(°C); C-提取时间(min)。

从表3分析结果可知,整体模型的“Prob>F”值<0.0001,而失拟项“Prob>F”值大于0.05,表明该

二次方程模型高度显著。超声功率高度显著,提取时间显著,提取温度不显著。在所选取的各因素水平范围内,按照对结果的影响因素从大到小排序为:超声功率>提取时间>提取温度。

2.1.4 因素间相互作用

2.1.4.1 超声功率与提取温度(AB)之间的交互作用

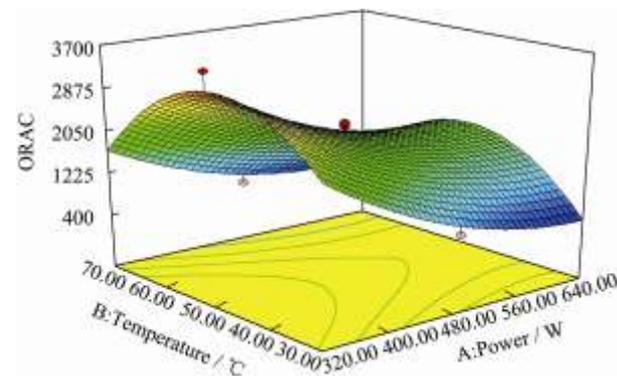


图4 超声功率与提取温度(AB)对多糖ORAC值的影响

Fig4 The effects of ultrasonic power and temperature on the ORAC values of polysaccharides

当提取时间为40 min时,超声功率和提取温度对多糖ORAC值的影响如图4所示。当超声功率一定时,多糖ORAC值随温度升高先增大后减小。当提取温度一定时,多糖ORAC值随功率增大而减小,这可能因为超声使得多糖降解而活性降低。

2.1.4.2 超声功率与提取时间(AC)之间的交互作用

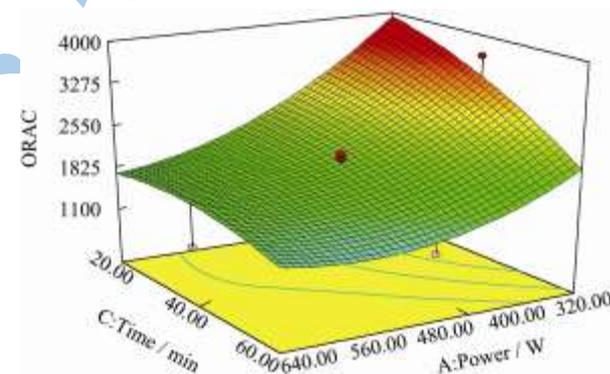


图5 超声功率与提取时间(AC)对多糖ORAC值的影响

Fig.5 The effects of ultrasonic power and time on the ORAC values of polysaccharides

当提取温度为50 °C时,超声功率和提取时间对多糖得率的影响如图5所示。当提取时间一定时,多糖ORAC值随功率增大而减小。当提取功率较低时,多糖ORAC值随提取时间延长而减小,可能是多糖降解的缘故;当提取功率较高时,多糖ORAC值随时间变化不大,并且ORAC值均较低,说明此时提取时间对多糖活性的影响已不占主导地位,过高的功率使得多糖活性显著降低。

2.1.4.3 提取温度与提取时间(BC)之间的交互作用

当超声功率为 480 W 时,提取温度和提取时间对多糖得率的影响如图 6 所示。当提取温度一定时,多糖 ORAC 值随提取时间延长而减小。当提取时间一定时,多糖 ORAC 值随提取温度的升高先增大后减小。

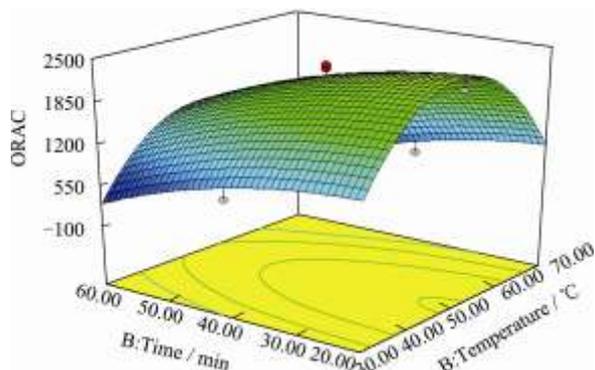


图 6 提取温度与提取时间 (BC) 对多糖 ORAC 值的影响

Fig.6 The effects of temperature and time on the ORAC values of polysaccharides

一般认为,多糖的分子量和化学结构与多糖的活性之间有着密切的联系。超声处理对多糖活性的影响可能与其对多糖的分子量和结构的改变有关。研究表明,超声波可通过断裂糖苷键将多糖降解到一定分子量,并可改变多糖的构象,从而影响多糖活性。

2.1.5 最优提取条件的确定

经过以上对回归模型响应面的三维立体图分析,我们可以看到,各因素对多糖得率和活性的影响是复杂的,在求取最优条件时,响应面分析法能够全面考虑各因素的正向和负向影响,进行综合评价。当要求多糖得率和 ORAC 值均较高时,由响应面预测模型得出的最优提取条件为:超声功率 320 W,提取温度 69.90 °C,提取时间 33.21 min,此时多糖得率达到 2.74%,ORAC 值达到 1978 $\mu\text{mol Trolox/g}$ 。

为了验证预测模型的正确性和适用性,需对响应面回归模型预测的最优条件进行验证,以预测值能否在可接受水平内与实验值相符为判断标准。即:根据最优条件重复实验三次,得到实验值的 95% 置信区间,如果预测值落在这个区间内即表示实验值与预测值相符。考虑到实际操作可行性,将灵芝多糖提取最佳工艺条件修正为:超声功率 320 W,提取温度 70 °C,提取时间 34 min。采用修正条件进行实验,得出灵芝多糖得率为 2.78%,ORAC 值为 1956 $\mu\text{mol Trolox/g}$,与理论预测值无显著性差异。因此,采用响应面分析法优化灵芝多糖超声提取工艺,具有较好的可行性。

2.2 超声法和水提法所得灵芝多糖的分子量组成差异

由图 3a 可知,超声法灵芝多糖主要含有两个组分,其中组分一的平均分子量 M_p 为 18150 Da,组分

二的平均分子量 M_p 为 6484 Da。经 BreezeGPC 软件处理,得出组分一所占比例为 20.07%,组分二所占比例为 79.93%。由图 3b 可知,水提法灵芝多糖主要含三个组分,其中组分一平均分子量为 598720 Da,含量为 48.72%,组分二平均分子量为 18604 Da,含量为 20.91%,组分三平均分子量为 6723 Da,含量为 30.37%。由此可知,采用超声法提取灵芝多糖,可大大降低多糖分子量。

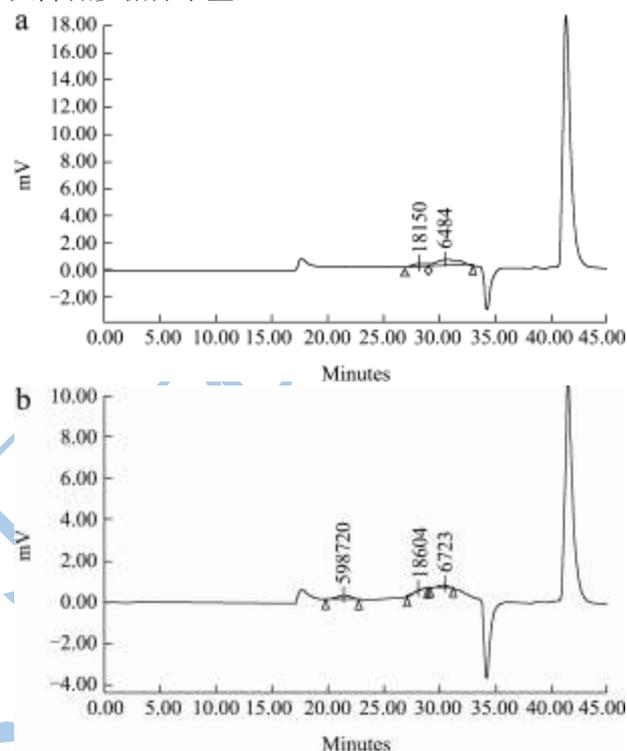


图 7 超声法 (a) 和水提法 (b) 所得灵芝多糖的分子量分布
Fig.7 The molecular weight distributions of polysaccharides prepared by ultrasonic extraction (a) and hot water extraction (b)

3 结论

本研究采用响应曲面对超声波提取灵芝多糖的工艺条件进行优化,优化后的工艺为:超声功率 320 W,提取温度 70 °C,提取时间 34 min,其多糖得率为 2.78%,氧自由基吸收能力 (ORAC 值) 为 1956 $\mu\text{mol Trolox/g}$,与理论预测值无显著性差异。因此,采用响应面分析法优化灵芝多糖超声提取工艺,具有较好的可行性。在最佳条件下,制备的灵芝多糖分子量组成为 18150 Da (20.07%) 和 6484 Da (79.93%),大大低于传统水提灵芝多糖的分子量。

参考文献

[1] 王立泽.食用菌栽培[M].合肥:安徽科学技术出版社,1993
[2] 郑汉臣.药用植物学[M].北京:人民卫生出版社,1999

- [3] 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
- [4] 邱赛红,仇萍,黄宇明,等.灵芝的药理研究概况[J].湖南中医药导报,1999,5(10):19-21
- [5] Shen A Y, Gu W Y. Study on extraction of fruit bodies of *Agaricus blazei* Murill polysaccharide by compound enzymes [J].*Edible Fungi*, 2001, 3(2): 27-35
- [6] 李金忠,马海乐,吴沿友.山药多糖的超声辅助提取技术研究[J].食品研究与开发,2005,4:72-75
- [7] Lin W T, Nian B Y, Wang Z M. Study on ultrasound fortified extracted polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill and mechanism [J]. Baoji University Arts and Science, 2004, 3 (24): 192-194
- [8] 彭川丛,孔静,游丽君,等.超声辅助热水浸提香菇多糖响应面优化工艺及其抗氧化活性的研究[J].现代食品科技,2011, 27(4):452-456
- [9] Sevag M, Lackman D, Smolens J. The isolation of components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1938, 124: 425-528
- [10] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1994
- [11] Aguirre M, Isaacs M, Matsuhira B, et al. Characterization of a neutral polysaccharide with antioxidant capacity from red wine [J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(9): 1095-1101
- [12] 金鑫,向莹,陈健.不同产地金针菇多糖的分子量和单糖组成比较研究[J].食品科技,2012,37(5):175-179