

# 超声波提取灵芝菌丝体中灵芝酸的研究

熊曼萍<sup>1</sup>, 伍晓春<sup>1</sup>, 邹盛勤<sup>1</sup>, 张爱民<sup>2</sup>

(1. 宜春学院, 化学与生物工程学院, 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西宜春 336000;  
2. 江西省食品发酵研究所, 江西宜春 336000)

**摘要:**目的:利用超声波对灵芝菌丝体中灵芝酸的提取工艺进行研究。方法:以单位灵芝菌丝体中灵芝酸的提取量为指标,采用单因素分析和正交实验,对影响灵芝菌丝体中灵芝酸提取的乙醇浓度、超声波浸提时间、浸提 pH 和料液比四个因素进行研究。结果:乙醇浓度 100%, 超声波浸提时间 90min, pH2.5, 加 12 倍量乙醇浸提为最佳工艺条件,所提取灵芝酸含量达 46.7mg · g<sup>-1</sup>。结论:采用超声波提取技术可以较大幅度提高灵芝酸的提取得率,大大缩短提取时间。

**关键词:**灵芝酸, 提取, 灵芝菌丝体

## Study on ganoderma acid extracted from *Ganoderma lucidum* by ultrasound

XIONG Man-ping<sup>1</sup>, WU Xiao-chun<sup>1</sup>, ZOU Sheng-qin<sup>1</sup>, ZHANG Ai-min<sup>2</sup>

(1. Yichun University, College of Chemistry and Bioengineering,  
Key Laboratory of Jiangxi Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun 336000, China;  
2. Food and Fermentation Graduate School, Yichun 336000, China)

**Abstract:** Objective: The extraction process of ganoderma acid from *Ganoderma lucidum* mycelia by ultrasound was studied. Methods: Unit *Ganoderma lucidum* mycelia of ganoderma acid as the indicator, using single-factor analysis and orthogonal experiment, the effects of ethanol concentration, ultrasonic extraction time, extraction pH and solid-liquid ratio on ganoderma acid from *Ganoderma lucidum* mycelia was studied. Results: The optimum extraction conditions were 100% ethanol concentration, ultrasonic extraction time 90min, pH2.5, plus 12 times the amount of ethanol, content of ganoderma acid was up to 46.7mg · g<sup>-1</sup>. Conclusion: Extraction using ultrasonic technology can greatly improve the extraction yield of *Ganoderma lucidum* comparing with conventional method, and shorten the extraction time.

**Key words:** ganoderma acid; extraction; *Ganoderma lucidum* mycelium

中图分类号: TS201.1      文献标识码: B      文章编号: 1002-0306(2010)09-0265-03

灵芝(*Ganoderma lucidum*), 俗称灵芝草, 古称瑞草, 为担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌<sup>[1]</sup>。灵芝酸活性物质是灵芝的主要活性成分之一, 是目前最有开发前途的保健食品和药品新资源之一, 也是保健食品功能因子的研究热点。上世纪 50 年代以来, 由于人工栽培灵芝子实体的成功, 灵芝的开发应用日益广泛。但是, 人工栽培周期长(2~3 个月以上), 生产力低下, 又受季节限制, 从而影响了灵芝三萜的开发生产。采用液体深层发酵法培养灵芝, 周期短(10~12d), 成本低, 产量大, 大大提高了灵芝三萜的生产能力<sup>[2-3]</sup>。菌丝体灵芝酸存在于灵芝菌丝体细胞壁内, 提取过程中不易溶出, 故常规溶剂法得率低、耗时长。为了充分提取灵芝菌丝体内的灵芝三

萜活性物质, 我们在传统溶剂法的基础上, 施加超声波处理, 利用超声波的空化作用、热效应、机械作用加速细胞壁的破碎, 促进胞内灵芝酸活性物质的溶出, 提高提取得率, 缩短提取时间。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

灵芝菌丝体 由江西百神集团提供; 熊果酸标准品 中国医学科学院医药生物技术研究所; 冰醋酸、高氯酸、无水乙醇等化学试剂 均为分析纯。

UV-2000 紫外分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司; 超声波仪 杭州振科机电设备有限公司; pH S-3C 精密 pH 计 大连中汇达科学仪器有限公司; 202-A 型数控电热恒温干燥箱 上海阳光实验仪器有限公司。

#### 1.2 实验方法

以灵芝酸得率为评价指标, 在乙醇浓度、超声波浸提时间、浸提 pH、料液比各单因素实验的基础上, 利用正交实验得出超声波提取灵芝菌丝体中灵芝酸

收稿日期: 2009-07-17

作者简介: 熊曼萍(1963-), 女, 副教授, 研究方向: 农副产品加工及天然活性成分的研究开发。

基金项目: 宜春市 2008 年度科技基金资助项目。

的最佳工艺条件(超声波功率为 100W)。

灵芝酸的测定方法<sup>[4-5]</sup>:选用熊果酸为对照品,5%香草醛—冰醋酸和高氯酸为显色剂,以分光光度法测定灵芝酸的含量。

本研究采用 4 因素 3 水平正交实验表对灵芝酸的提取工艺进一步优化,见表 1。

表 1 正交实验因素水平表

| 水平 | 因素         |                 |      |       |
|----|------------|-----------------|------|-------|
|    | A 乙醇浓度 (%) | B 超声波浸提时间 (min) | C pH | D 料液比 |
| 1  | 90         | 90              | 1.5  | 1:8   |
| 2  | 95         | 100             | 2.0  | 1:10  |
| 3  | 100        | 120             | 2.5  | 1:12  |

## 2 结果与讨论

### 2.1 超声波浸提时间对灵芝酸提取的影响

准确称取 5 份各 2g 灵芝菌丝体粉末,按料液比 1:10 分别加入 20mL 95% 乙醇,在 pH2 条件下分别浸提 30、60、90、100、120min。由图 1 可知,超声波浸提时间在 60~100min 之间时,灵芝酸的提取率随着超声波浸提时间的增加而升高;但是大于 100min 时,其提取率随着超声波浸提时间的增加而呈下降趋势。因此,较适宜的超声波提取时间为 100min。

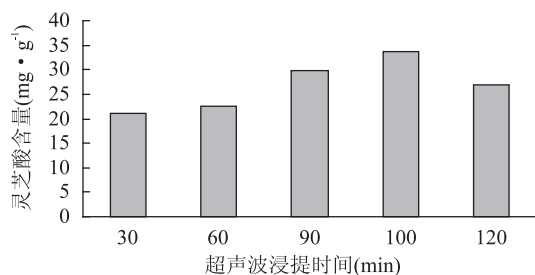


图 1 超声波浸提时间对灵芝酸提取的影响

### 2.2 乙醇浓度对灵芝酸提取的影响

准确称取 5 份 2g 灵芝菌丝体粉末,按料液比 1:10 分别加入 20mL 60%、80%、90%、95%、100% 浓度的乙醇,在 pH2 条件下超声波浸提 100min。由图 2 可知,乙醇浓度在 60%~80% 之间时,灵芝酸的提取率随着乙醇浓度的升高增加非常缓慢;而当乙醇浓度在 90%~100% 之间时,灵芝酸的提取率随着乙醇浓度的升高而迅速升高。这是由于灵芝酸是醇溶性物质,乙醇浓度越大,灵芝酸的溶解度也越大,因而当乙醇浓度为 100% 时,其灵芝酸的提取率最大。但在生产中考虑到成本的问题,乙醇浓度在 95%~100% 之间为宜。

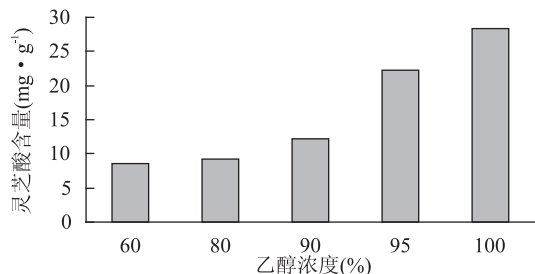


图 2 乙醇浓度对灵芝酸提取的影响

### 2.3 浸提 pH 对灵芝酸提取的影响

准确称取 5 份 2g 灵芝菌丝体粉末,按料液比 1:10 分别加入 20mL 95% 乙醇,分别在 pH 为 1.5、2、

2.5、3、3.5 下超声浸提 100min。由图 3 可知,在 pH2 时,灵芝酸的提取率最高。因此最适宜的 pH 应为 2。

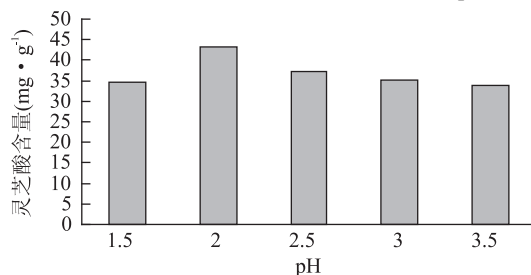


图 3 浸提 pH 对灵芝酸提取的影响

### 2.4 料液比对灵芝酸提取的影响

准确称取 5 份 2g 灵芝菌丝体粉末,按料液比 1:5、1:6、1:8、1:10、1:12 分别加入 10、12、16、20、22mL 95% 乙醇,在 pH2 条件下超声波浸提 100min,结果见图 4。由图 4 可知,灵芝酸的提取率随着料液比的提高而增大,当达到 1:12 时,继续提高料液比,其灵芝酸的提取率增加缓慢,考虑到生产成本和原料利用率,适宜的料液比在 1:8~1:12 之间为好。

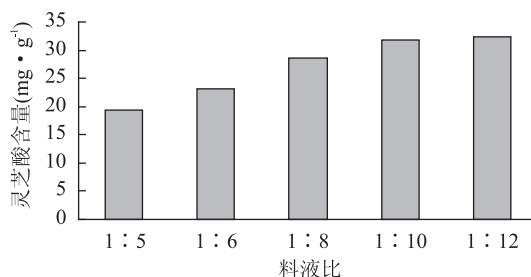


图 4 料液比对灵芝酸萃取的影响

### 2.5 正交实验

正交实验结果见表 2,比较 4 个因素的极差 R 可知: $R_C > R_D > R_A > R_B$ ,即 pH 对灵芝酸的提取率影响最大,其次是料液比,第三是乙醇浓度,最后是超声波浸提时间。从正交实验结果得各因素最佳水平为: $A_3B_1C_3D_3$ ,即乙醇浓度 100%,超声波浸提时间 90min,pH2.5,料液比 1:12。

表 2 正交实验结果

| 实验号   | A     | B     | C     | D     | 灵芝酸的含量 (mg·g <sup>-1</sup> ) |
|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|
| 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 16.5                         |
| 2     | 1     | 2     | 2     | 2     | 24.7                         |
| 3     | 1     | 3     | 3     | 3     | 32.3                         |
| 4     | 2     | 1     | 2     | 3     | 39.5                         |
| 5     | 2     | 2     | 3     | 1     | 30.2                         |
| 6     | 2     | 3     | 1     | 2     | 20.4                         |
| 7     | 3     | 1     | 3     | 2     | 45.3                         |
| 8     | 3     | 2     | 1     | 3     | 34.8                         |
| 9     | 3     | 3     | 2     | 1     | 26.5                         |
| $K_1$ | 73.8  | 101.3 | 71.7  | 73.2  |                              |
| $K_2$ | 90.1  | 89.7  | 90.7  | 90.4  |                              |
| $K_3$ | 106.6 | 79.2  | 107.8 | 106.6 |                              |
| $k_1$ | 24.5  | 33.8  | 23.9  | 24.4  |                              |
| $k_2$ | 30.0  | 29.9  | 30.2  | 30.1  |                              |
| $k_3$ | 35.5  | 26.2  | 35.9  | 35.5  |                              |
| R     | 11.0  | 7.6   | 12.0  | 11.1  |                              |

(下转第 269 页)

表1 实验因素水平表

| 水平 | 因素          |              |             |      |
|----|-------------|--------------|-------------|------|
|    | A 时间<br>(h) | B 加酶量<br>(%) | C 温度<br>(℃) | D pH |
| 1  | 12          | 0.1          | 40          | 6.5  |
| 2  | 14          | 0.2          | 45          | 7.0  |
| 3  | 16          | 0.3          | 50          | 7.5  |

由表2的极差分析可知,影响因素的显著性由大到小依次为:B、A、D、C,即加酶量、酶解时间、酶解pH、温度。优化的理论最佳提取工艺为:A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>,即酶解时间14h,加酶量0.2%,酶解温度45℃,酶解pH6.5,此条件下可得到理论上的提取率最大值。但正交表中不存在此种搭配方案,按照影响因素的影

表2 正交实验结果

| 实验号            | A              | B              | C              | D              | 提取率<br>(%) |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 62.6       |
| 2              | 1              | 2              | 2              | 2              | 66.7       |
| 3              | 1              | 3              | 3              | 3              | 64.4       |
| 4              | 2              | 1              | 2              | 3              | 64.8       |
| 5              | 2              | 2              | 3              | 1              | 68.9       |
| 6              | 2              | 3              | 1              | 2              | 67.7       |
| 7              | 3              | 1              | 3              | 2              | 63.6       |
| 8              | 3              | 2              | 1              | 3              | 65.7       |
| 9              | 3              | 3              | 2              | 1              | 67.1       |
| k <sub>1</sub> | 64.567         | 63.667         | 65.333         | 66.200         |            |
| k <sub>2</sub> | 67.133         | 67.100         | 66.200         | 66.000         |            |
| k <sub>3</sub> | 65.467         | 66.400         | 65.633         | 64.967         |            |
| R              | 2.566          | 3.433          | 0.867          | 1.233          |            |
| 优化方案           | A <sub>2</sub> | B <sub>2</sub> | C <sub>2</sub> | D <sub>1</sub> |            |

(上接第266页)

## 2.6 验证实验

准确称取3份2g灵芝菌丝体粉末,按各因素最佳水平A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即乙醇浓度100%,超声波时间90min,pH2.5,料液比1:12的条件下进行灵芝酸的最佳浸提验证实验。实验结果见表3,其实验中灵芝酸含量的平均值为46.7mg·g<sup>-1</sup>,与正交实验结果一致。

表3 验证实验

| 实验号                        | 1    | 2    | 3    | 平均值  |
|----------------------------|------|------|------|------|
| 灵芝酸含量(mg·g <sup>-1</sup> ) | 46.9 | 47.3 | 45.9 | 46.7 |

## 2.7 常规提取法与超声波提取法的比较

准确称取2份2g灵芝菌丝体粉末,按料液比1:12分别加入100%的乙醇,在pH2.5的条件下分别超声波浸提1.5h及常规溶剂浸提24h。由表4可知,在最佳浸提条件下利用超声提取方法可以大幅度提高灵芝酸的得率,比常规方法提高56.39%;同时还可以大大缩短提取时间,达22.5h之多。

表4 超声波提取法与常规水提取法的比较

| 提取方法   | 料液比  | 提取时间<br>(h) | 乙醇浓度<br>(%) | 灵芝酸含量<br>(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|--------|------|-------------|-------------|--------------------------------|
| 超声波提取  | 1:12 | 1.5         | 100         | 46.6                           |
| 常规溶剂提取 | 1:12 | 24          | 100         | 29.8                           |

响大小顺序,与最佳方案较接近的是5号实验。将这两个组合进行对比实验,最佳条件组合的提取率可达69.3%,大于5号实验,所以最终确定最佳提取工艺条件为由极差所得的A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>。

## 3 结论

本实验采用纤维素酶来降解青稞米籽粒细胞壁,对青稞籽粒进行蛋白质的提取,得到最佳提取条件为:料水比1:5,酶解时间14h,加酶量0.2%,酶解温度45℃,酶解pH6.5。此条件下青稞蛋白提取率为69.3%。

## 参考文献

- [1] 谢宗万.本草纲目药物彩色图鉴[M].第一版.北京:人民卫生出版社,2001:221.
- [2] 臧靖巍,阚建全,陈宗道.青稞的成分研究及应用状况[J].中国食品添加剂,2004(4):43-46.
- [3] 连喜军,张平平,罗庆丰.西藏青稞β-葡聚糖提取研究[J].粮食与油脂,2006(1):27-28.
- [4] 范恒君.酶法水解植物蛋白[J].南宁职业技术学院学报,2000,5(3):57-61.
- [5] 曾凡枝,田丽萍,薛琳,等.纤维素酶在苜蓿叶蛋白提取中的应用[J].湖北农业科学,2008(7):830-832.
- [6] Puchongkavarin H, Varavinit S, Bergthaller W. Comparative study of pilot scale rice starch production by an alkaline and an enzymatic process[J].Starch/Stärke,2005,57:134-144.
- [7] Claus C, Andersen Erik, Tina S J, et al. Xylanases in wheat separation[J].Starch/Stärke,1997,49:5-12.
- [8] 刘林,黄伟,车科,等.水酶法提取茶叶籽蛋白工艺研究[J].江苏食品与发酵,2008(3):1-4.

## 3 结论

3.1 在正交实验所选择的因素水平下,浸提pH是影响灵芝菌丝体中灵芝酸提取率的主要因素,其次是料液比和乙醇浓度,超声波浸提时间影响最小;最优条件为乙醇浓度100%,提取时间90min,pH2.5,料液比1:12,此条件下灵芝酸含量达46.7mg·g<sup>-1</sup>。

3.2 采用超声波提取技术可以较大幅度地提高灵芝菌丝体中灵芝酸的提取得率,大大缩短提取时间。

## 参考文献

- [1] 王燕,张晓,赵宝华.灵芝菌的生物效用和开发利用[J].生命科学,2007,34(5):22-23.
- [2] 钱竹,章克昌.灵芝酸的液体发酵及其分离纯化的研究[D].江南大学,2006.
- [3] 陈志杰,顾振新.灵芝主要活性物质及液体深层发酵技术研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(3):186-188.
- [4] 江绍琳,江绍玫,曾令聪.分光光度法快速测定灵芝中总三萜含量[J].江西农业大学学报,2006,12(6):634-638.
- [5] 程星焯,石钺.灵芝活性成分的提取与检测[J].食品研究与开发,2007,12(5):170-173.