

文章编号:1673-1689(2005)03-0098-03

灵芝菌丝体碱提水溶性多糖工艺条件及 对羟自由基的清除作用

张珏, 张志才, 王玉红, 章克昌

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 通过单因素实验对影响碱提灵芝菌丝体多糖的各种因素进行了研究, 确定提取条件为: 提取温度 65 ℃, 提取时间 4 h, 碱料(体积: 质量)比 4: 1, 碱液浓度 0.5 mol/L. 在此条件下提取并对所得水溶性多糖的抗氧化作用进行了初步研究, 表明其对羟自由基有较好的清除能力, 在一定范围内清除率与糖的质量浓度呈正相关.

关键词: 灵芝; 多糖; 碱提; 羟自由基

中图分类号: Q 539

文献标识码: A

Studies on Water Soluble Polysaccharides from the Mycelia of *Ganoderma lucidum* by Alkaline Extraction

ZHANG Jue, ZHANG Zhi-cai, WANG Yu-hong, ZHANG Ke-chang

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The factors influencing on alkaline extraction of polysaccharides from the mycelia of *Ganoderma lucidum* was studied. The optimum conditions were: extractoin temperature: 65 ℃, extraction time 4 hr, the ratio of material to NaOH 1: 4, the concentration of NaOH 0.5 mol/L. The alkaline extracted product, water soluble polysaccharides, exhibited obvious scavenging effects for hydroxyl free radicals (HFR) and had positive correlation with initial sugar concentration.

Key words: *Ganoderma lucidum*; polysaccharides; alkaline extraction; hydroxyl free radicals (HFR)

灵芝 (*Ganoderma lucidum* leys. ex Fr, Karst), 是传统的扶正固本、滋补强壮的名贵食药真菌之一, 历代医书均将之列为“药中上品”, 长期服用可治病养身, 延年益寿. 目前灵芝的野生资源稀缺, 灵芝产品的生产、研究多从子实体中提取. 人工栽培的方法周期长 (2~3 个月以上)、占地面积大、受季节和原料等诸多因素的限制, 运用深层

培养技术获得灵芝菌丝体需约 2 周时间, 可大大降低生产成本. 研究表明, 灵芝菌丝体多糖具有与其子实体多糖相似的生物活性, 已有多种葡聚糖、杂多糖及多糖-蛋白质复合物被分离出来, 并显示明显的抗肿瘤活性, 因此灵芝菌丝体多糖的研究日趋引人关注^[1].

传统提取菌丝体多糖多采用水提法, 剩余物一

收稿日期: 2004-10-19; 修回日期: 2005-03-04.

作者简介: 张珏 (1969-), 女, 江苏无锡人, 发酵工程博士研究生.

般按废弃物处理。药用真菌均含有不同类型的多糖,用一种方法很难将其完全提取出来,用不同提取剂对灵芝菌丝体进行浸提,既可使灵芝菌丝体多糖获得初步分级,又能提高多糖得率。本实验研究了从灵芝发酵菌丝体水提后的残渣中碱提多糖的工艺条件及碱提水溶性多糖对羟自由基的清除作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌种采用本实验室保藏的灵芝菌种。30℃,150 r/min液体深层二级培养共11 d;3 000 r/min,15 min离心,取菌丝体即得灵芝菌丝。

1.2 方 法

1.2.1 碱提粗多糖的提取与分离 以去除水提水溶性多糖的菌丝体残渣为材料,其方法^[2~5]为:

灵芝发酵菌丝体残渣(水提液无苯酚硫酸反应)→碱液浸提,离心→上清液→冰醋酸中和,离心→分别取[沉淀→洗涤干燥→得碱提碱溶性多糖(GAP2)]和[上清液→4倍醇沉,离心→沉淀→洗涤,干燥→得碱提水溶性多糖(GAP1)]。

1.2.2 分析方法 总糖测定:苯酚-硫酸法^[6];还原糖测定:DNS法^[7];蛋白质含量测定:考马斯亮兰法^[8];多糖含量测定:采用总糖减去还原糖来定量;羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率的测定:采用Fenton反应体系^[9]。

$$\text{多糖得率}(\text{mg/g}) = \text{粗多糖干重} / \text{菌丝体干重}$$

2 结果与讨论

在灵芝多糖碱提过程中,影响提取液中多糖含量的因素很多。经初步实验,选定提取温度、提取时间、料液比、碱液质量浓度作为主要影响因素,以所得多糖量为指标,单因素实验进行条件筛选。

2.1 温度的影响

每次取菌丝体残渣15 g(湿重),在料碱(体积:质量)比为1:4、0.5 mol/L NaOH碱溶液、浸提时间4 h的条件下,分别在4,25,45,65,85℃浸提一次,根据多糖得率,确定最佳碱提温度,结果见图1。

由图1可知,碱提温度对提取工艺有很大的影响。在较低温度下碱提多糖的得率增加缓慢,45~65℃多糖得率迅速增加,超过65℃又呈下降趋势。在温度较低时物系的传质过程缓慢,多糖得率变化不大,提取温度高传质速率大,多糖得率增大,但温度过高易引起多糖结构的破坏和生物活性丧失,因

此本实验提取温度选择65℃。

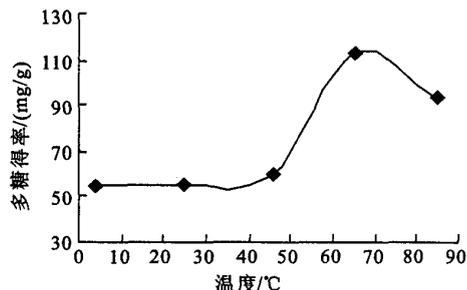


图1 温度对碱提的影响

Fig. 1 Effects of temperature on alkaline extraction

2.2 碱提时间的选择

取菌丝体残渣15 g(湿重),在料碱(体积:质量)比为1:4、0.5 mol/L NaOH碱溶液、浸提温度65℃的条件下,分别在2,3,4,5 h浸提一次,根据多糖得率,确定最佳碱提时间,结果见图2。

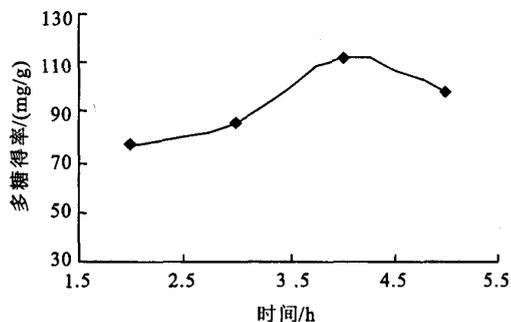


图2 时间对碱提的影响

Fig. 2 Effects of time on alkaline extraction

由图2可知,随着提取过程进行,多糖含量逐渐增加,超过4 h反而下降,碱提时间过长,部分多糖会被氧化、降解,因此确定提取时间为4 h。

2.3 料液比对提取过程的影响

取菌丝体残渣15 g(湿重),在0.5 mol/L NaOH碱溶液、浸提温度65℃、浸提4 h的条件下,以料碱(体积:质量)比1:2,1:3,1:4,1:5分别浸提一次,根据多糖得率,确定最佳料液比,结果见图3。

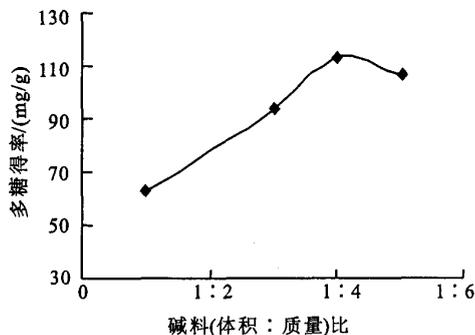


图3 碱料比对碱提的影响

Fig. 3 Effects of alkaline volume on alkaline extraction

由图3可知,料液比是影响浸提的另一重要因素,在料碱(体积:质量)比为1:4时,碱提多糖的得率最大,因此确定1:4为碱提的最佳料碱比。

2.4 碱液浓度的影响

取菌丝体残渣15g(湿重),在料碱(体积:质量)比1:4、浸提温度65℃、浸提4h的条件下,以0.1,0.25,0.5,1.0 mol/L NaOH溶液,分别浸提一次,根据多糖得率,确定最佳料液比,结果见图4。

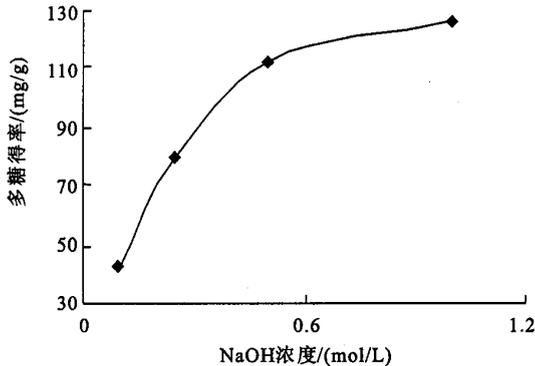


图4 NaOH浓度对碱提的影响

Fig. 4 Effects of alkaline concentration on alkaline extraction

从图4可以看出,碱溶液浓度对灵芝菌丝体多糖的提取影响较大,由于碱溶液具有溶解菌丝体细胞膜的作用,可促进多糖的释放,因此多糖得率随碱溶液浓度的增加而增加,但增加幅度却随之逐渐降低。过高的碱溶液浓度易引起糖结构的变化和破坏,甚至使其中六碳环裂解,进而引起多糖活性的丧失。综合考虑,确定碱溶液浓度0.5 mol/L进行实验。

2.5 碱提灵芝菌丝体水溶性多糖对羟自由基的清除作用

通过单因素实验,确定了碱提灵芝菌丝体多糖的最佳工艺为:提取温度65℃,提取时间4h,料碱(体积:质量)比1:4,碱溶液浓度0.5 mol/L。取30g菌丝渣按1.2.1方法提取、分离,分别得碱提水溶性多糖(GAP1)0.6125g,菌丝干重得率为93.52 mg/g,碱提碱溶性多糖(GAP2)0.1424g,菌丝干重得率为21.74 mg/g,其中GAP1的得率是GAP2的4.3倍。对GAP1清除羟自由基的活性进行初步研究,结果见表1。

表1 碱提灵芝菌丝体水溶性多糖对羟自由基的清除作用
Tab. 1 HFR scavenging effects of water soluble *Ganoderma* polysaccharides from mycelia by alkaline extraction

多糖质量浓度/ (mg/mL)	羟自由基 清除率/%
0.142	31.5
0.427	72.2
0.711	79.6
0.996	80.6
1.280	82.2

从表1可看出,碱提灵芝菌丝体水溶性多糖对羟自由基的清除率随糖溶液质量浓度的增加而增加,在低糖质量浓度时清除率增幅明显,从0.142~0.427 mg/mL,清除率增加了56.4%,糖质量浓度大于0.427 mg/mL,清除率增幅趋缓。碱提灵芝菌丝体水溶性多糖对羟自由基有较好的清除能力,在一定范围内清除率与其糖的质量浓度呈正相关。

碱提灵芝菌丝体水溶性多糖的理化性质、单糖组成、抗肿瘤活性等的研究工作正在进一步开展之中。

参考文献:

- [1] Yang F, Liao C. The influence of environmental conditions on polysaccharides formation by *Ganoderma lucidum* in submerged fermentations[J]. *Process Biochemistry*, 1998, 33(5): 547-553.
- [2] 梁峙, 嵇春华. 灵芝深层发酵液的分离纯化与应用[J]. *广州食品工业科技*, 2000, 37(1): 68-71.
- [3] 李平, 王燕辉, 马润宇. 碱提山茱萸多糖的理化性质及抗氧化活性研究[J]. *中草药*, 2003, 34(11): 973-976.
- [4] 耿慧, 梁忠岩, 史军花, 等. 碱提猴头发酵菌丝体多糖的分离、纯化及初步研究[J]. *特产研究*, 2003, (1): 4-6.
- [5] 白日霞, 陈华君. 碱提水溶针裂蹄多糖R1的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 1995, 7(3): 41-45.
- [6] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科技出版社, 1994.
- [7] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [8] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [9] Cao G, Sofie E, Prior R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships[J]. *Free Rad Biol and Med*, 1997, 22(5): 749-760.

(责任编辑: 杨勇)