

文章编号:1674-2869(2011)01-0025-03

茯苓菌核多糖分离技术研究

张 凯¹, 李茂凡¹, 胡国元^{1*}, 严张微¹, 李友国²

(1. 武汉工程大学化工与制药学院 绿色化工过程省部共建教育部重点实验室,
湖北省新型反应器与绿色工艺重点实验室, 湖北 武汉 430074;
2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘 要:采用单因素试验、正交试验对热水浸提法、微波法、酶法分离茯苓菌核多糖的工艺进行探讨. 结果表明:热水浸提法的最佳工艺条件为:料水比 1:30 (g/mL), 浸提温度 70 ℃, 浸提时间 2 h, 浸提 2 次;微波法最佳提取工艺条件为:料水比 1:30 (g/mL), 功率 296 W, 时间 4 min;酶法最佳提取工艺条件为:木瓜蛋白酶 0.5%, 初始 pH 6, 温度 60 ℃, 时间 2 h. 酶法的多糖提取率最高. 采用集成提取工艺的茯苓多糖提取率大幅度提高, 酶法与微波组合法的多糖提取率最高. 考虑到多糖得率、提取时间、提取成本等因素的影响, 最优的集成提取方式为酶法与微波组合法.

关键词:茯苓;菌核多糖;热水浸提法;微波法;酶法

中图分类号:TQ028 **文献标识码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1674-2869.2011.01.007

0 引 言

茯苓(*Poria cocos*)是我国传统的药用真菌. 茯苓的主要成分是 β -茯苓聚糖. 从茯苓中提取制备的茯苓多糖或茯苓异多糖具有促进细胞分裂、补体激活、抗诱变、抗肿瘤、增强免疫等生物活性. 为此,从茯苓菌核中提取茯苓多糖的技术研究具有重要的应用价值.

目前,文献报道的分离茯苓菌核多糖的方法有热水浸提法、稀碱浸提法、酶法、微波、超声波辅助提取法等^[1-5]. 热水浸提法的浸提时间长且提取率较低,稀碱浸提法的浸提步骤繁琐反应剧烈,极易破坏茯苓多糖生物活性. 酶法简化了多糖提取工艺,提取率大幅提高,但提取成本增加. 微波法提取时间明显缩短,既节能又高效,超声波提取法无需加热,可缩短提取时间,有较高的提取率,但微波法和超声波提取法有设备要求. 如何能将这此方法有效地结合起来,将其集成创新,提出适宜规模化生产的茯苓多糖提取技术,进一步提高茯苓多糖的提取率是具有现实意义的.

1 实验部分

1.1 材料、试剂和仪器

茯苓块,湖北罗田产,市场购买. 将茯苓块置

60 ℃烘烤 2~3 h,粉碎过孔径 0.15 mm 筛,收集粉末于棕色瓶中避光保存备用.

纤维素酶,上海伯奥生物科技有限公司,酶活大于 $15 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$;木瓜蛋白酶, Sigma 公司, $800 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$;葡萄糖、柠檬酸、柠檬酸钠、苯酚、浓硫酸等均为国产分析纯试剂.

BL-220H 岛津电子天平,岛津国际贸易(上海)有限公司;722E 可见光光度计,天津市普瑞斯仪器有限公司;DK-S24 型电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;SHB-III A 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;WP800 TL23-K3 微波炉, Galanz;BCD-182B 海尔电冰箱.

1.2 方法

1.2.1 多糖分离 **a. 热水浸提法.**据文献[2-3]得到两组不同热水浸提工艺条件:第一组为料水比 1:30、温度 70 ℃、热水浸提 2 h,浸提两次,第二组为料水比 1:70、温度 100 ℃、热水浸提 2.5 h,提取两次. 本文重复了这两组提取工艺,结果表明两组工艺条件的提取率相近,为此选取耗能少的第一组单因子试验结果来进行 $L_9(3^3)$ 正交试验,热水浸提法正交试验因素与水平见表 1.

收稿日期:2010-10-03

基金项目:湖北省新型反应器与绿色工艺重点实验室开放基金(RGCT200901)

作者简介:张凯(1985-),男,湖北武汉人,硕士研究生. 研究方向:应用化学.

指导老师:胡国元,教授,博士. 研究方向:食、药用真菌代谢产物. *通信联系人

表 1 热水浸提法正交试验 $L_9(3^3)$ 因素与水平

Table 1 Factors and Levels of orthogonal tests of hot water extraction method

水平	因素		
	A(料水比)/(g/mL)	B(浸提时间)/h	C(浸提温度)/℃
1	1:20	1.5	60
2	1:30	2.0	70
3	1:40	2.5	80

b. 微波法. 采用文献[4]及热水浸提实验结果, 进行 $L_9(3^3)$ 正交试验, 考察料水比、功率, 微波处理时间对多糖提取效果的影响. 微波法正交试验因素与水平见表 2.

表 2 微波的正交试验 $L_9(3^3)$ 因素与水平

Table 2 Factors and Levels of orthogonal tests of microwave method

水平	因素		
	A(料水比)/(g/mL)	B(浸提时间)/min	C(功率)/W
1	1:20	4	136
2	1:30	5	296
3	1:40	6	320

c. 酶法. 单酶法^[5]采用 0.5% 的木瓜蛋白酶, 最适宜 pH 为 6, 60℃ 提取 2 h. 复合酶法^[6]采用木瓜蛋白酶与纤维素酶一起作用, 其用量之比为 2:1, 其中木瓜蛋白酶质量分数为 0.3%, 纤维素酶质量分数为 0.15%, 最适宜 pH 为 4.5, 45℃ 提取 4 h. 分别称取 1 g 茯苓粉经酶法处理后, 抽滤, 测定滤液中多糖的含量.

d. 热水浸提法、微波与酶法两两集成提取. 首先用优化的热水浸提法进行提取, 水提完成后, 抽滤, 滤渣用优化的微波条件进行提取, 最后抽滤, 合并两次得到滤液, 进行多糖含量的测定. 然后通过调整提取顺序, 测定其他 5 个组合集成提取液的多糖含量.

e. 热水浸提法、微波与酶法集成提取. 首先用优化的热水浸提法进行提取, 水提完成后, 抽滤, 滤渣用优化的微波条件进行提取, 抽滤, 滤渣用优化的酶法进行提取, 最后抽滤, 合并三次得到滤液, 进行多糖含量的测定. 然后通过调整提取顺序, 测定其他 5 个组合集成提取液的多糖含量.

1.2.2 多糖的测定 多糖含量的测定采用苯酚—硫酸法^[7].

2 结果与讨论

2.1 热水浸提法的正交试验

热水浸提法正交试验结果与分析见表 3.

表 3 正交试验结果与分析

Tablet 3 Results and analysis of orthogonal design tests

试验号	因素			多糖含量/ (mg · g ⁻¹)
	A	B	C	
1	1	1	1	4.07
2	1	2	2	9.8
3	1	3	3	6.8
4	2	1	2	12.5
5	2	2	3	8.9
6	2	3	1	12
7	3	1	3	6.2
8	3	2	1	9.2
9	3	3	2	7.3
K ₁	6.89	7.59	8.42	
K ₂	11.13	9.3	9.87	
K ₃	7.57	8.7	7.3	
R	4.24	1.71	2.57	

由表 3 可知, 影响多糖含量的主次顺序是 A>C>B, 即料水比>浸提温度>浸提时间. 根据各水平下 K₁、K₂、K₃ 确定各因素的最优水平组合为 A₂B₂C₂, 由此可见, 料水比对多糖含量影响最大, 其次为浸提温度和浸提时间. 综合考虑, 采用热水浸提法进行多糖提取的最佳工艺条件为料水比 1:30, 浸提温度 70℃, 浸提时间 2 h, 浸提 2 次. 本研究热水浸提法的多糖提取率高于文献[2-3]报道的结果.

2.2 微波法的正交试验

微波法的正交试验结果与分析见表 4.

表 4 微波的正交试验结果与分析

Tablet 4 Results and analysis of orthogonal design tests of microwave method

试验号	因素			多糖质量含量/ (mg · g ⁻¹)
	A	B	C	
1	1	1	1	8.981
2	1	2	2	9.116
3	1	3	3	5.091
4	2	1	2	6.420
5	2	2	3	7.213
6	2	3	1	10.590
7	3	1	3	9.787
8	3	2	1	7.047
9	3	3	2	6.842
K ₁	7.729	8.396	7.679	
K ₂	8.074	7.792	9.831	
K ₃	7.892	7.508	6.186	
R	0.345	0.888	3.645	

* 表中数据均为 3 次重复试验的平均值.

由表 4 可知, 影响多糖含量的主次顺序是 C>B>A, 即提取功率>浸提时间>料水比. 根据各水平下 K₁、K₁、K₂ 确定各因素的最优水平组合为 A₂B₁C₂, 由此可见, 功率对多糖含量影响最大, 其

次为浸提时间和料水比。综合考虑,采用微波进行多糖提取的最佳工艺条件为料水比 1:30,浸提时间 4 min,提取功率为 296 W。经实验验证,微波最佳组合多糖提取量为 11.436 mg·g⁻¹符合正交实验结果。本研究微波法处理的多糖提取率远低于文献[4-5]报道的结果,分析可能与所用微波仪器不同以及参数设置不同有关。

2.3 酶法提取多糖试验

采用单酶法和复合酶法提取多糖试验结果分

表 5 两种方法集成提取茯苓多糖试验结果

Table 5 Results of two methods integrated extraction tests of polysaccharides of *Poria cocos*

	A+B	A+C	B+A	B+C	C+A	C+B
多糖/(mg·g ⁻¹)	148.91	16.466	249.619	254.737	18.321	252.649

注: * 表中数据均为 3 次重复试验的平均值。A 代表热水浸提法,B 代表单酶法,C 代表微波法。

表 6 三种方法集成提取茯苓多糖试验结果

Table 6 Results of three methods integrated extraction tests of polysaccharides of *Poria cocos*

	A+B+C	A+C+B	B+A+C	B+C+A	C+A+B	C+B+A
多糖/(mg·g ⁻¹)	155.29	179.858	253.341	256.368	208.637	257.449

注: * 表中数据均为 3 次重复试验的平均值。A 代表热水浸提法,B 代表单酶法,C 代表微波法。

由表 5 可知,以酶法+微波法的多糖提取率最高,微波+酶法的多糖提取率稍低,酶法与微波法两个组合的多糖提取率均高于单酶法。其他组合的多糖提取率均低于单酶法。本研究热水浸提法与酶法的多糖提取率高于文献[8]报道的结果。本研究酶法与微波法的多糖提取率也高于文献[5]报道的结果。

由表 6 可知,以微波法+酶法+热水浸提法的多糖提取率最高,酶法+微波法+热水浸提法的多糖提取率与微波法+酶法+热水浸提法的多糖提取率接近,这两个组合的多糖提取率比酶法与微波法两个组合的多糖提取率略高。

3 结 语

综合考虑多糖提取效率、提取时间和提取成本等因素的影响,集成提取茯苓多糖的最佳工艺条件为酶法+微波法。该工艺提取条件温和提取方式简单,提取时间较短,多糖提取效率较高。

在茯苓菌核多糖的分离工艺试验中,酶法与微波法集成的先后顺序对茯苓多糖提取率的影响不是太大。而酶法与微波法同热水浸提法集成工艺的茯苓多糖提取率与酶法与微波法集成工艺的茯苓多糖提取率相比增加幅度不大,说明酶法与微波法集成工艺可以有效提取茯苓菌核多糖。另

别为 237.537 mg·g⁻¹和 200.175 mg·g⁻¹。酶法提取多糖的效率很高,比微波法和热水浸提法都要高出不少,是提取茯苓多糖效率比较高的一种方法。综合考虑酶量和节能,酶法进行多糖提取的最佳工艺条件采用单酶法。

2.4 集成提取多糖试验

集成提取多糖试验结果见表 5 和表 6。

外,本研究主要针对茯苓菌核多糖的集成工艺进行了研究,而多糖分离方法对多糖的结构和生物活性的影响需继续深入探讨。

参考文献:

[1] 王永江,吴学谦,毛建卫,等. 茯苓多糖的提取及羧甲基化工艺研究进展[J]. 农产品加工,2008(10): 58-60.

[2] 丁诚实. 分光光度法测定茯苓活性成分的含量[J]. 食品工程,2008(4):26-28.

[3] 王博,孙润广,张静. 超声波强化提取对茯苓水溶性多糖结构影响的研究[J]. 应用声学,2009,28(3): 195-202.

[4] 杜玲玲,张春椿,熊耀康. 微波法提取茯苓多糖的工艺研究[J]. 中国药业,2009,18(1):37-38.

[5] 张晓娟,胡选萍,冯自立,等. 微波辅助酶法提取茯苓中茯苓多糖的工艺研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(28):13794-13796.

[6] 龚世伟,游慧珍,胡国元,等. 酶法水解香菇工艺的研究[J]. 武汉工程大学学报,2009,31(9):20-22.

[7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州:浙江大学出版社,1999:11-12.

[8] 陈莉,郁建平. 茯苓多糖提取工艺的优化[J]. 食品科学,2007,28(5):136-139.

(下转第 31 页)