

超声波辅助提取樟芝菌丝体活性物质的工艺研究

Study on ultrasonic wave-assisted extraction of active substances from *Antrodia camphorata*

郭丹钊¹ 郑威¹ 马海乐^{1,2} 彭瑛¹ 刘任糠¹ 刘贝¹

GUO Dan-zhao¹ ZHENG Wei¹ MA Hai-le^{1,2} PENG Ying¹ LIU Ren-kang¹ LIU Bei¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学农产品加工工程研究院, 江苏 镇江 212013)

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China;

2. Institute of Agro-production Processing Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

摘要:探索超声波辅助樟芝菌丝体活性物质的最佳提取工艺,为樟芝活性成分进一步深入研究提供依据。通过设置固液比、超声波功率、提取温度及提取时间 4 个因素,优化樟芝菌丝主要活性物质多糖和三萜化合物的提取工艺,获得超声波辅助提取的最佳条件。结果表明:樟芝菌丝多糖最佳提取条件为:固液比 1:30($m:V$)、超声功率 120 W、提取时间 35 min、提取温度 55 °C,该条件下菌丝多糖提取量为 26.319 mg/g;樟芝菌丝三萜化合物最佳提取条件为:固液比 1:30($m:V$)、超声功率 210 W、提取温度 50 °C、提取时间 25 min,该条件下菌丝总三萜提取量为 38.624 mg/g。

关键词:樟芝;菌丝体;超声波;多糖;三萜化合物

Abstract: Ultrasonic wave-assisted extraction of *Antrodia camphorata*'s mycelium was studied. Four test factors of solid-to-liquid ratio, ultrasonic power, extraction temperature and extraction time were studied in extraction of polysaccharide and triterpenoids from *Antrodia camphorata*. Ultraviolet-visible spectrophotometer was used as determining method. The results showed that the extraction quantity of polysaccharide was 26.319 mg/g with 120 W ultrasonic power lasting for 35 min, under 55 °C with the solid-to-liquid ratio of 1:30 ($m:V$). The extraction quantity of triterpenoids was 38.624 mg/g under the optimal extraction condition which involves solid-to-liquid ratio of 1:30 ($m:V$), ultrasonic power of 210 W, extraction temperature of 50 °C, extraction time of 25 min.

Keywords: *Antrodia camphorata*; mycelium; ultrasonic wave; intracellular polysaccharides; triterpenoids

樟芝(*Antrodia camphorata*),又称牛樟芝、牛樟菇,属多

孔菌科、薄孔菌属,仅寄生于中国台湾山区(海拔 450~2 000 m)特有的国宝级树种——牛樟树上。目前,由于受到宿主资源、地域、气候等限制,樟芝自然产量十分稀少。樟芝子实体营养丰富,且因其具有显著的抗氧化、抗肿瘤、降血压、保肝等多种功效而受到广泛关注,成为研究开发热点^[1-2],其中,樟芝所含有的多糖和三萜类化合物被认为是樟芝的主要功效成分^[3]。超声波辅助提取技术是近些年来发展起来的一种新型分离提取技术,具有快速、经济、安全、高效等特点,被广泛用于食品领域^[4-6],具有极大的优越性。目前樟芝活性成分的超声波辅助提取主要集中于子实体为材料^[7-8],以及针对菌丝中的醇提混合物或单一成分^[9-10],而关于樟芝菌丝体中多个活性成分的超声辅助提取方面的研究较缺乏。

本研究着眼于樟芝的两种主要功能性成分——多糖和三萜化合物,以樟芝菌丝为原料,设置超声功率、固液比、提取温度和提取时间 4 个因素,综合探索樟芝菌丝多糖和三萜化合物等代表性功效成分的超声波辅助提取条件,为超声波辅助提取樟芝菌丝的活性成分提供参考,并为樟芝活性成分的深入研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

樟芝菌丝粉:樟芝(ATCC200183)经液体发酵,所得菌丝球冷冻干燥并粉碎,即得樟芝菌丝粉;

浓硫酸、苯酚、乙醇、冰醋酸、香草醛、高氯酸、齐墩果酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 试验仪器

超声波清洗仪:KQ-300DE 型,昆山市超声仪器有限公司;

台式低速自动平衡离心机:L-500 型,湖南湘仪离心机仪

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301544);江苏大学高级专业
人才科研启动基金(编号:12JDG078)

作者简介:郭丹钊(1978—),女,江苏大学副教授,博士。

E-mail: guodanzhao@ujs.edu.cn

收稿日期:2015-10-05

器有限公司;

台式高速冷冻离心机:L-1850R型,湖南湘仪离心机仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-1801型,北京瑞利分析仪器有限公司;

恒温水浴锅:DK-8D型,上海精宏实验设备有限公司。

1.2 樟芝多糖的提取与测定

1.2.1 樟芝多糖的提取 称取樟芝菌丝粉 0.1 g,加入一定体积的水并进行超声辅助提取,提取结束后离心(5 000 r/min, 10 min),取上清液,加入等体积的无水乙醇沉淀 12~16 h,再次离心(5 000 r/min, 10 min),取其沉淀即得樟芝菌丝粗多糖,加入 20 mL 蒸馏水溶解后得粗多糖溶液。

1.2.2 多糖的测定

(1) 待测液制备:取粗多糖溶液 0.5 mL 于试管中,加蒸馏水至 2 mL,待测。

(2) 样品测定:采用苯酚-硫酸法进行多糖含量的测定^[11],测定波长为 490 nm。

1.2.3 樟芝多糖提取的单因素试验

(1) 超声功率:在固液比 1:40($m:V$),提取温度 60 °C,提取时间 30 min 的条件下,设置超声功率分别为 0, 120, 180, 240, 300 W,考查超声功率对多糖提取量的影响。

(2) 固液比:设置固液比分别为 1:20, 1:40, 1:60, 1:80($m:V$),于超声功率 120 W、温度 60 °C 条件下提取 30 min,考查固液比对多糖提取量的影响。

(3) 提取温度:设置提取温度分别为 40, 50, 60, 70 °C,其余参数分别是固液比 1:40($m:V$),超声功率 120 W,时间 30 min,考查提取温度对多糖提取量的影响。

(4) 提取时间:在固液比 1:40($m:V$),提取温度 50 °C,超声功率 120 W 的条件下,分别提取 10, 20, 30, 40, 50 min,以多糖提取量为指标考查提取时间的影响。

1.2.4 正交优化设计试验 采用 $L_9(3^4)$ 进行 4 因素 3 水平的正交设计试验,以多糖提取量为指标,综合考查多因素的交互作用对多糖提取量的影响。

1.3 樟芝总三萜的提取与测定

1.3.1 樟芝总三萜的提取 称取樟芝菌丝粉 0.1 g,加入一定体积的 80% 乙醇并进行超声处理,处理结束后离心(5 000 r/min, 10 min),取上清液 200 μ L 于试管中,60 °C 下烘干,待测。

1.3.2 总三萜的测定 采用香草醛-高氯酸法测定总三萜化合物含量^[12],测定波长为 548 nm。

1.3.3 樟芝总三萜提取的单因素试验

(1) 固液比:在超声功率 240 W,提取时间 30 min,提取温度 50 °C 的条件下,设置固液比分别为 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, 1:120($m:V$),测定三萜化合物的提取量。

(2) 超声功率:在固液比 1:40($m:V$),提取时间 30 min,提取温度为 50 °C 的条件下,设置超声功率分别为 0, 120, 180, 240, 300 W,测定三萜化合物的提取量。

(3) 提取温度:在固液比 1:40($m:V$),超声功率 180 W,提取时间为 20 min 的条件下,设置提取温度分别为

30, 40, 50, 60, 70 °C,测定三萜化合物的提取量。

(4) 提取时间:在固液比 1:40($m:V$),超声功率 180 W,提取温度 50 °C 的条件下,设置提取时间分别为 10, 20, 30, 40, 50 min,测定三萜化合物的提取量。

1.3.4 正交优化设计试验 根据单因素试验结果,以三萜化合物提取量为指标,采用 $L_9(3^4)$ 进行 4 因素 3 水平的正交设计试验,综合考查多因素的交互作用对三萜化合物提取量的影响。

2 结果与分析

2.1 多糖的提取条件优化

2.1.1 超声功率的影响 由图 1 可知,经过超声波处理的菌丝多糖提取量要高于对照组,表明超声波处理有利于樟芝菌丝体多糖的提取。同时,随着超声功率的增大,菌丝多糖提取量先增大后减小,当功率高于 240 W 时提取量逐渐趋于平稳。说明超声波功率过大可能会引起樟芝菌丝多糖高分子结构的破坏。而在 120 W 和 180 W 时没有显著差异。因此,功率选择 120 W。

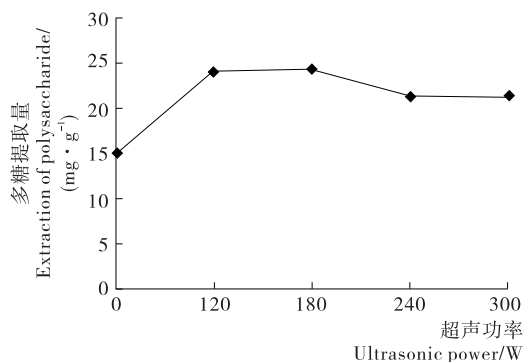


图 1 超声功率的影响

Figure 1 The result of the influence of ultrasonic power

2.1.2 固液比的影响 由图 2 可知,当固液比为 1:40($m:V$),菌丝多糖的提取量最大,进一步增加溶剂量,多糖的提取量反而逐渐下降,推测可能是过多的提取溶剂导致多糖在后续醇沉过程中沉淀不充分而造成一定的损失,另外,由于溶剂过量会增加后期处理的难度。因此,选择 1:40($m:V$)为适宜的固液比。

2.1.3 提取温度的影响 温度对多糖的提取量有一定影响,

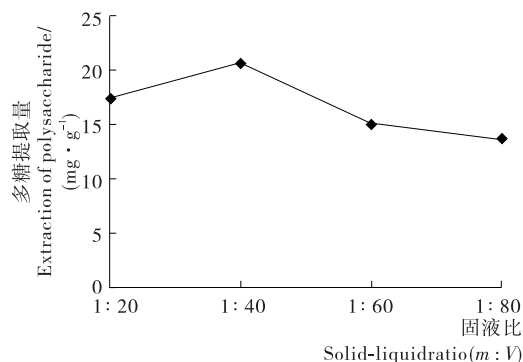


图 2 固液比的影响

Figure 2 The result of the influence of solid-liquid ratio

温度过高可能对多糖的结构存在一定影响,从而导致提取量的减少。由图 3 可知,50 °C 时多糖的提取量要高于其它温度,并且随着温度的不断升高多糖的提取量有所下降并趋于平稳。因此,选择 50 °C 为适宜的提取温度。

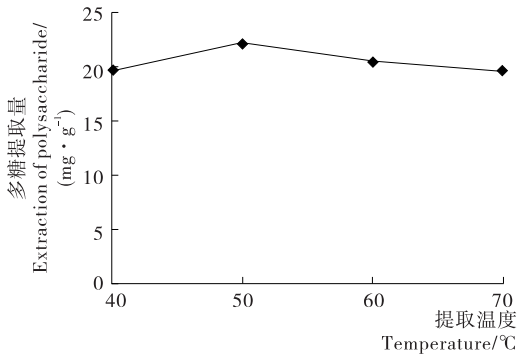


图 3 提取温度的影响

Figure 3 The result of the influence of extraction temperature

2.1.4 提取时间的影响 提取过程中采用超声波辅助有助于胞内多糖释放至胞外。由图 4 可知,提取时间的长短对多糖最终的提取量影响较大。多糖提取量随提取时间的延长呈先增加后降低的趋势,提取 30 min 时可获得最大的多糖提取量。因此,提取时间控制在 30 min。

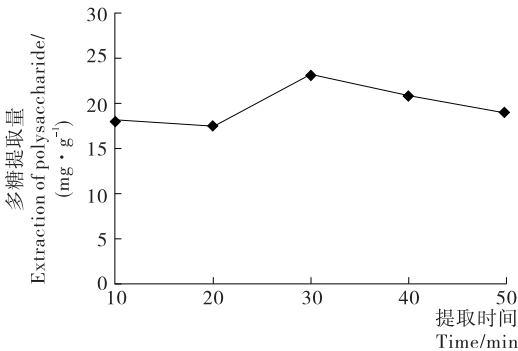


图 4 提取时间的影响

Figure 4 The result of the influence of extraction time

2.1.5 正交试验结果 表 1 为各因素及水平的设置,表 2 为正交试验结果。

由表 2 可知,固液比对樟芝菌丝多糖提取的影响最大,接下来依次是提取温度、提取时间和超声功率,当固液比 1 : 30($m : V$)、超声功率 120 W、提取时间 35 min、提取温度 55 °C (即 $A_1 B_1 C_3 D_3$ 组合)时,芝菌丝多糖提取量达 26.319 mg/g,尽管略低于 $A_1 B_3 C_3 D_3$ 的结果,但从降低功率消耗的角度考虑,

表 1 各因素的正交试验设计

Table 1 The design of factors and levels

水平	A 固液比 ($m : V$)	B 超声功 率/W	C 提取温 度/°C	D 提取时 间/min
1	1 : 30	120	45	25
2	1 : 40	150	50	30
3	1 : 50	180	55	35

选择 $A_1 B_1 C_3 D_3$ 为最优组合。为验证提取条件,利用优化所得的因素和水平组合(即 $A_1 B_1 C_3 D_3$)进行多次樟芝菌丝多糖的提取,测得多糖提取量均在 26 mg/g 左右(表 3),批次之间的 RSD 仅为 1.72%。

表 2 正交试验结果

Table 2 The result of the influence of multiple factors on polysaccharide extraction

编号	A	B	C	D	提取量/(mg · g ⁻¹)
1	1	1	1	1	22.035
2	1	2	2	2	22.196
3	1	3	3	3	26.552
4	2	1	2	3	19.461
5	2	2	3	1	18.972
6	2	3	1	2	18.032
7	3	1	3	2	21.353
8	3	2	1	3	19.647
9	3	3	2	1	15.996
k_1	23.594	20.950	19.905	19.001	
k_2	18.822	20.272	19.218	20.527	
k_3	18.999	20.193	22.292	21.887	
R	4.772	0.757	3.074	2.886	

表 3 菌丝多糖提取优化条件的验证

Table 3 The confirmatory study on optimal condition of extraction of polysaccharide

实验批次	提取量/(mg · g ⁻¹)	相对标准偏差 RSD/%
1	25.855	1.72
2	26.608	
3	26.232	
4	25.863	
5	26.027	
6	25.264	

2.2 三萜化合物的提取条件优化

2.2.1 固液比的影响 由图 5 可知,固液比对于提取量的影响比较显著,随着提取溶剂用量的增加,樟芝菌丝三萜化合物的提取量不断降低,结合溶剂成本考虑,后续单因素试验选择固液比为 1 : 40($m : V$)。

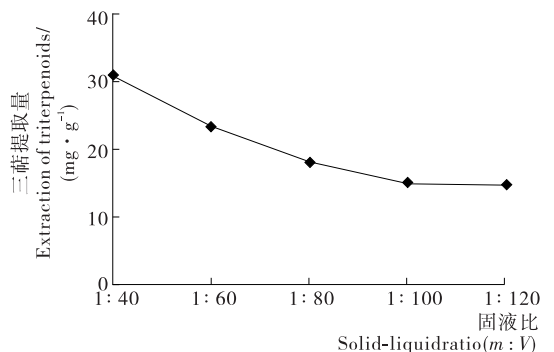


图 5 固液比的影响

Figure 5 The result of the influence of solid-liquid ratio

2.2.2 超声功率的影响 由图6可知,与对照相比,超声波处理有利于樟芝菌丝三萜化合物的提取,适当提高功率可增加三萜化合物的提取量,该现象与多种天然化合物的超声波辅助提取结果一致^[4-6]。根据试验结果,且为避免超声功率进一步增大可能对三萜化合物结构产生的影响,选择超声功率180 W作为较优条件。

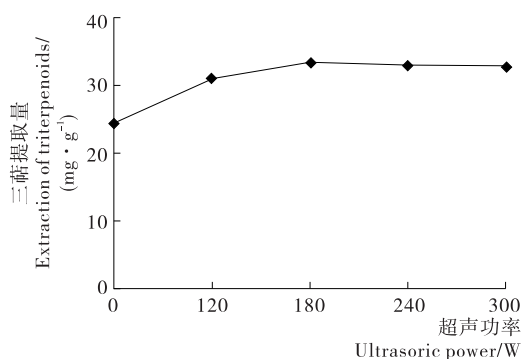


图6 功率的影响

Figure 6 The result of the influence of ultrasonic power

2.2.3 提取温度的影响 由图7可知,随提取温度的提高,樟芝菌丝体三萜化合物提取量有一定程度的增加,当高于50 °C,升温则不再促进三萜化合物的提取。因此,结合能耗成本考虑,提取温度选择50 °C。

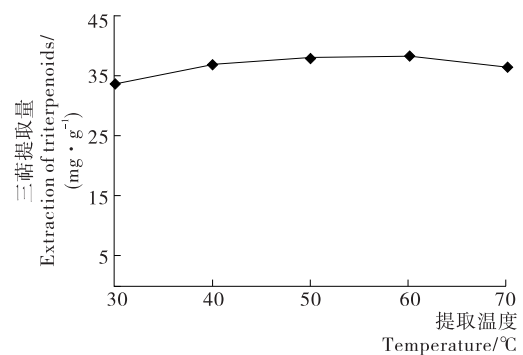


图7 提取温度的影响

Figure 7 The result of the influence of temperature

2.2.4 提取时间的影响 由图8可知,超声波处理时间从10 min延长至20 min时,三萜化合物的提取量有一定程度增加,之后则趋于平稳,可见提取20 min后,再继续延长超声时间对三萜化合物的提取意义不大,最终选择20 min作为适宜的提取时间。

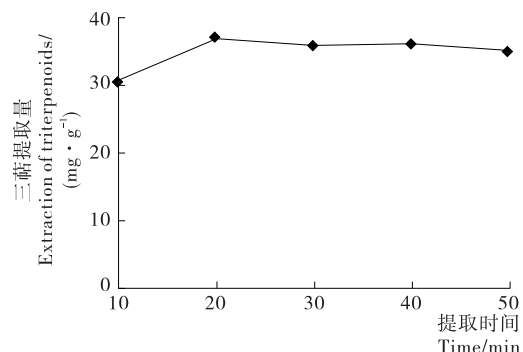


图8 提取时间的影响

Figure 8 The result of the influence of extraction time

2.2.5 正交试验结果 表4为各因素及水平的设置,表5为正交试验结果。

由表5可知,固液比对樟芝菌丝三萜类化合物提取的影响最大,接下来依次为提取时间、超声功率和提取温度。根据研究数据得出最佳组合的条件为:固液比1:30($m:V$)、超声功率210 W、提取温度50 °C、提取时间25 min,在该优化条件下,樟芝菌丝三萜化合物提取量为38.624 mg/g。为验证最优提取条件,采用优化得出的最优组合(即 $A_1B_2C_3D_3$)进行多次樟芝菌丝总三萜的提取并计算其提取量,结果见表6,6批次结果的RSD为2.42%。因此,选择最佳条件 $A_1B_2C_3D_3$ 进行三萜化合物的提取。

表4 各因素的正交试验设计

Table 4 The design of factors and levels

水平	A 固液比 ($m:V$)	B 提取温 度/°C	C 超声功 率/W	D 提取时 间/min
1	1:30	45	150	15
2	1:40	50	180	20
3	1:50	55	210	25

表5 正交试验结果

Table 5 The result of the influence of multiple factors on triterpenoids extraction

编号	A	B	C	D	提取量/(mg · g ⁻¹)
1	1	1	1	1	31.015
2	1	2	2	2	29.371
3	1	3	3	3	37.558
4	2	1	2	3	30.005
5	2	2	3	1	29.703
6	2	3	1	2	21.931
7	3	1	3	2	19.152
8	3	2	1	3	27.092
9	3	3	2	1	22.339
k_1	32.648	26.724	26.679	27.686	
k_2	27.213	28.722	27.238	23.485	
k_3	22.861	27.276	28.804	31.552	
R	9.787	1.998	2.125	8.067	

表6 菌丝三萜化合物提取优化条件的验证

Table 6 The confirmatory study on optimal condition of extraction of triterpenoids

实验批次	提取量/(mg · g ⁻¹)	相对标准偏差 RSD/%
1	38.008	
2	37.583	
3	36.358	
4	37.207	2.42
5	35.995	
6	38.247	

随着温度升高,还原糖有逐渐增加的趋势,由于还原糖会与蛋白质发生美拉德反应,结合图3中L值进行分析可知还原糖含量高低与甘薯粉色泽具有一定关系;甘薯粉中淀粉含量随着温度升高而增加,且各试验组间存在显著差异,该试验结果与李新华等^[4]报道的甘薯熟制全粉淀粉含量随着真空干燥温度升高而增加的结果相一致。

3 结论

研究表明,热风干燥温度对甘薯粉色泽、复水性、粒径、黏度和淀粉含量有显著影响($P < 0.05$),对甘薯粉的堆积密度及还原糖含量影响不显著。随着干燥温度升高,干燥时间缩短,失水速率相应增大;甘薯粉色泽随着温度升高呈现加深趋势,黏度及淀粉含量也有所增加;干燥温度为75℃时,干燥时间较80℃长100 min,甘薯粉粒径最大,黏度最小,还原糖与淀粉含量最少,不具有良好的加工品质;而干燥温度为90℃时,干燥时间较80℃缩短20 min,甘薯粉具有较大堆积密度,适合制成压片产品^[17],但复水性较差。

综上所述,从节能角度考虑,选用80℃的热风干燥温度制备甘薯粉所需时间较短,制得的甘薯粉具有良好色泽、较小粒径和较强复水性等良好的品质特性,适用于固体饮料、方便面等食品的加工,以增进营养价值,改善产品风味。该甘薯粉制备工艺简单易操作,且成本低,在工业生产中具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Kim J M, Park S J, Lee C S, et al. Functional properties of different Korean sweet potato varieties[J]. Food Science and Biotechnology, 2011, 20(6): 1 501-1 507.
- [2] 夏延斌, 梁美凤. 甘薯在食品工业中的研究进展[J]. 农产品加工, 2008(4): 58-61.
- [3] 周洁, 孔晓玲. 自然干燥与热风干燥对甘薯粉丝质量的影响[J]. 包装与食品机械, 2011, 29(6): 14-16.

(上接第161页)

3 结论

超声波辅助提取工艺可提高樟芝菌丝体粗多糖和总三萜的提取量,其提取樟芝菌丝粗多糖的最佳工艺条件为:固液比1:30($m:V$),超声功率120 W,提取时间35 min,提取温度55℃,该条件下菌丝多糖提取量可达26.319 mg/g;提取樟芝菌丝总三萜的最佳工艺条件为:固液比1:30($m:V$),超声功率210 W,提取温度50℃和提取时间25 min,该条件下菌丝总三萜提取量为38.624 mg/g。

本试验研究结果显示出超声波技术在樟芝菌丝体活性成分提取中的重要作用,为其在珍稀食用菌活性成分提取等方面的应用提供了参考。此外,超声波辅助提取对于活性成分的组成及结构的影响还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 胡鸥, 连张飞, 张君逸, 等. 樟芝的药用保健价值及开发应用[J]. 亚热带植物科学, 2006, 35(4): 75-78.
- [2] 陆震鸣, 陶文沂, 许泓瑜, 等. 樟芝菌粉三萜类化合物含量的测定[J]. 中成药, 2008, 30(3): 402-405.
- [3] Song Tuzz-ying, Yen Gow-chin. Antioxidant properties of *Ant-*

- [4] 李新华, 宋秀洁. 真空干燥法制备甘薯全粉[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 122-125.
- [5] 郭婷, 何新益, 邓放明. 冻融甘薯热风干燥特性与动力学研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 8-11.
- [6] 毕金峰, 陈芹芹, 刘璇, 等. 国内外果蔬粉加工技术与产业现状及展望[J]. 中国食品学报, 2013, 13(3): 8-14.
- [7] 宋玲霞, 陈义伦, 马超, 等. 干燥方式对枣粉物理特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(12): 89-93.
- [8] 朱香燕, 张珺, 何义雁, 等. 热风与远红外干燥温度对苦瓜全粉品质的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(7): 265-269.
- [9] 宋振, 木泰华, 孙红男, 等. 不同干燥方法对甘薯茎叶粉物化特性的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(5): 255-261.
- [10] 陈瑞娟, 毕金峰, 陈芹芹, 等. 干燥方式对胡萝卜超微粉中挥发性风味物质的影响[J]. 中国食品学报, 2015, 15(1): 250-256.
- [11] 林华. 甘薯全粉制粉工艺及其应用于面包的特性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2009: 12-15.
- [12] 郭婷. 冻融对甘薯变温压差膨化干燥品质影响及机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014: 30-32.
- [13] Kim S H, Choi Y J, Lee H, et al. Physicochemical properties of jujube powder from air, vacuum, and freeze drying and their correlations[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2012, 55(2): 271-279.
- [14] Zhang Li-hua, Xu Huai-de, Li Shun-feng. Effects of micronization on properties of *Chaenomeles sinensis* (Thouin) koehne fruit powder[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10(4): 633-637.
- [15] 大连轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工出版社, 2009: 75-78.
- [16] 沈晓萍, 王蒙蒙, 卢晓黎. 熟化甘薯热风干燥特性及数学模型研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 119-126.
- [17] Costa F O, Pais A A C C, Sousa J J S. Analysis of formulation effects in the dissolution of ibuprofen pellets[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2004, 270(1): 9-19.

rodia camphorate in submerged culture[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(11): 3 322-3 327.

- [4] 杨国伟, 危晴, 刘卉辛, 等. 超声波辅助提取锁阳多糖的工艺研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 141-144.
- [5] 蒋劭博, 王强, 李建贵, 等. 响应面法优化红枣中环磷酸腺苷(cAMP)超声提取工艺[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 114-120.
- [6] 刘全德, 唐仕荣, 宋慧, 等. 芦荟蒽醌类化合物的超声提取及其抗氧化性研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 68-71.
- [7] 王光磊, 王瑾, 王宫. 樟芝总多糖提取方法的研究和筛选[J]. 海峡药学, 2014, 26(11): 105-107.
- [8] 王光磊, 洪华炜, 王宫. 几种提取技术在樟芝总三萜提取中的应用和比较[J]. 海峡药学, 2014, 26(8): 31-33.
- [9] 刘华, 贾薇, 张劲松. 樟芝菌丝体的不同提取方法及其抗肿瘤活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(12): 171-175.
- [10] 庄梦敏, 王小董, 胡丰林. 樟芝菌丝中自由基清除剂的醇提工艺研究[J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40(3): 506-509.
- [11] 郭金龙, 陈有君, 孙国琴, 等. 苯酚-硫酸法测定杏鲍菇多糖方法的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 555-558.
- [12] 陆震鸣, 陶文沂, 许泓瑜, 等. 乙醇提取樟芝菌粉三萜类化合物的动力学研究[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 21-24.