

第3届全国博士后生命科学学术论坛(中国博士后科学基金会, 中国农业大学, 2005年)

4种提取法对富硒灵芝主要功效成分的提取效果

赵镭^{1,2} 高海燕³ 张美莉⁴ 吴继红¹ 胡小松¹

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 浙江雨田集团, 浙江 平阳 325401;
3. 北京大学 深圳研究生院, 广东 深圳 518055; 4. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018)

摘要 对富硒灵芝子实体采用水提、碱提、醇提和酶提进行的主要功效成分提取和分析试验表明, 4种提取法对总糖、硒及蛋白质的提取率依次为碱提法 > 酶提法 > 水提法 > 醇提法, 差异显著 ($P < 0.05$), 但4种提取法均不影响灵芝蛋白氨基酸的分布 ($t > t_{0.01}$)。相比而言, 酶提法是比较理想的提取富硒灵芝主要功效成分的方法。

关键词 富硒灵芝子实体; 提取方法; 主要功效成分

中图分类号 Q 5-3; Q 949.329.7

文章编号 1007-4333(2006)01-0001-05

文献标识码 A

Effect of different methods on the extracting of main nutritional components from Se-enriched Ganoderma lucidum

Zhao Lei^{1,2}, Gao Haiyan³, Zhang Meili⁴, Wu Jihong¹, Hu Xiaosong¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2. YUTIAN Group, Zhejiang Pingyang 325401, China; 3. Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055, China;
4. College of Food and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract Data reported here show that the nutritional composition of different extracts from Se-enriched Ganoderma lucidum was definitely different due to different extracting methods ($P < 0.05$). The extracting rate of saccharide, selenium and protein was in the order of alkaline extracting > enzyme extracting > water extracting > alcohol extracting. All extracting methods studied did not affect the distribution of amino acids of the protein in Se-enriched G. lucidum. Enzyme extracting is comparably a good method for preparing the extracts from Se-enriched G. lucidum.

Key words Se-enriched Ganoderma lucidum; extracting methods; main composition

灵芝的生物活性成分十分丰富, 目前已分离到150余种化合物, 有多糖类、核苷类、呋喃类、生物碱类、氨基酸蛋白质类、三萜类、油脂类、甾醇类、有机锗、矿物质元素^[1,2]。因为野生和栽培的灵芝子实体高度木质化, 主要由纤维素、半纤维素和木素组成, 而且存在着木素与碳水化合物的结合层及植物纤维素超分子的结晶束结构, 使灵芝子实体结构致密, 需要有适合的提取方法才能将大多数营养成分有效提出^[3]; 而且灵芝的主要营养成分溶解特性不同, 不同溶剂提取可能会因为得到的相应粗提物中成分构成等方面的差异而造成粗提物的功效活性不

同^[4-5], 例如: 灵芝多糖是水溶性的, 三萜类化合物是醇溶性的, 灵芝蛋白则既有水溶性、醇溶性的, 还有碱溶性和盐溶性的^[6-8]。

水提法、醇提法、碱提法和酶提法是目前灵芝和其他生物活性材料提取过程中通常采用的方法。有少数研究比较了水提法、碱提法和协同酶法(酶法与其他处理手段相结合)等不同提取方法对普通灵芝提取物总固形物、灵芝多糖和氨基酸含量的影响^[3,9], 但有关富硒灵芝提取物的研究尚未见有报道。我们的研究发现, 在富硒灵芝子实体中硒主要与灵芝蛋白结合, 硒与灵芝蛋白之间存在抗氧化协

收稿日期: 2005-12-16

基金项目: 国家博士后基金资助项目(2005037399); 浙江省博士后科研项目择优资助项目(2004-bshr-017)

作者简介: 赵镭, 博士后, 主要从事天然产物的开发利用研究, E-mail: sunnylei@126.com; 胡小松, 教授, 博士生导师, 主要从事生物活性成分的开发利用与农产品贮藏与深加工研究, E-mail: huxiaos@hotmail.com

同作用,并能增强灵芝多糖的清除自由基活性能力,因此粗提物中硒和蛋白质的含量等指标直接影响了富硒灵芝提取物的生物活性^[10~11]。与研究普通灵芝提取物不同,富硒灵芝提取物的研究要求有更多的检测指标进行综合评价和比较。本文首次系统比较了4种不同提取方法对富硒灵芝粗提物中主要功效成分——多糖、蛋白和硒的含量、总量和提取率以及氨基酸分布的影响,旨在为下一步研究富硒灵芝提取物抗氧化及抗辐射等功效提供依据。

1 试验材料与方法

1.1 仪器和试剂

KN-01 凯氏定氮仪(日本 Mitsubishi 公司);LG-10 冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);UV 762 紫外/可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);TGL-16G-A 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);Beckman 121MB 型氨基酸分析仪(德国 Beckman 公司);Prodigy 全谱直读 ICP 发射光谱仪(美国 Leeman 公司);HH-S11-4 电子恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂);氢氧化钠、乙醇等均为国产分析纯;木瓜蛋白酶(酶活 70~90 万 U/g)购自广州酶制品厂;纤维素酶(酶活 >1 500 万 U/g)购自上海丽珠东风生物技术有限公司;葡萄糖标样购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1) 水提法及富硒灵芝水提物的制备。100 g 富硒灵芝样品置于球形管回流提取装置中,加水 1 000 mL,沸水浴浸提 3 h,减压过滤;滤渣加水 500 mL,沸水浴回流提取 1 h,减压过滤;合并 2 次水提液,真空旋转蒸发器在水温 75 ℃ 减压浓缩至 50 mL,真空冷冻干燥得富硒灵芝水提物,备用^[12]。

2) 碱提法及富硒灵芝碱提物的制备。100 g 富硒灵芝样品置于球形管回流提取装置中,加 1 mol/L NaOH 1 000 mL,60 ℃ 水浴浸提 3 h,减压过滤;滤渣加 1 mol/L NaOH 500 mL,60 ℃ 水浴回流提取 1 h,减压过滤;合并 2 次碱提液,用 HCl 调节 pH 同上述水提液的 pH,真空旋转蒸发器在水温 60 ℃ 下减压浓缩至 50 mL,真空冷冻干燥得富硒灵芝碱提物,备用^[3]。

3) 醇提法及富硒灵芝醇提物的制备。100 g 富硒灵芝样品加 1 000 mL 75%乙醇,室温下搅拌提取 3 h,减压过滤;滤渣加 75%乙醇 500 mL,室温下搅

拌提取 1 h,减压过滤;合并 2 次醇提液,真空旋转蒸发器在水温 60 ℃ 下减压浓缩至 50 mL,真空冷冻干燥得富硒灵芝醇提物,备用^[5]。

4) 酶提法及富硒灵芝酶提物的制备。100 g 富硒灵芝样品,加水 1 000 mL,加纤维素酶和木瓜蛋白酶各 0.2%(质量分数),pH 5.5,45 ℃ 水浴中浸提 2 h,85 ℃,10 min 灭酶,减压过滤;滤渣用热水淋洗 2 次,合并滤液,真空旋转蒸发器在水温 60 ℃ 下减压浓缩至 50 mL,真空冷冻干燥得富硒灵芝酶提物,备用^[13]。

5) 硒测定用 HGAFS(氢化物原子荧光法)^[14]。

6) 总糖测定用苯酚硫酸法^[15]。

7) 总蛋白质测定用凯氏定氮法(CB-2905)。

8) 氨基酸分析。6 mol/L HCl 溶液,110 ℃ 水解 22 h,氨基酸分析仪测定。

2 结果与分析

2.1 4种提取方法下富硒灵芝粗提物中总糖的含量及提取率

由表 1 可见,不同提取方法得到的相应粗提物中总糖的含量、提取的总糖量及总糖提取率之间存在显著差异($P < 0.05$)。碱提法、酶提法、水提法和醇提法对富硒灵芝子实体中总糖的提取率分别为 166%、90.5%、46.7%和 24.4%。因为碱和纤维素酶都可以水解灵芝子实体中的纤维素生成纤维二糖和葡萄糖等产物^[3],因此这 2 种方法提取的总糖量接近甚至超过了原来灵芝子实体中的总糖量。水提法中热水中加热回流提取只能使细胞质皱缩^[16],细胞壁没有溃烂,糖只有从细胞壁内渗出的可能,因此提取率较碱提法和酶提法偏低。此外,表 1 结果还表明灵芝子实体中能溶解于热水的总糖约占 50%,而能溶解于醇的总糖不到 25%。

2.2 4种提取方法下富硒灵芝粗提物中硒的含量及提取率

由表 2 可见,不同提取方法得到的相应粗提物中硒的含量、提取的硒的总量及硒的提取率之间存在显著差异($P < 0.05$)。4 种提取方法对富硒灵芝子实体中硒的提取率依次为碱提法(56.8%)>酶提法(24.1%)>水提法(17.6%)>醇提法(4.85%)。因为富硒灵芝碱提物和水提物中总硒量较高,分别为 21.2 和 6.56 μg,而醇提物中只有 1.81 μg,因此该结果也表明硒主要存在于灵芝子实体的碱溶性部分和水溶性部分。我们以前的研究结果显示,在

表 1 富硒灵芝 4 种粗提物总糖的含量及提取率

Table 1 Saccharide content and extraction rate of different extracts from Se-enriched *Ganoderma lucidum*

测定项目	富硒灵芝	富硒灵芝粗提物			
		水提物	碱提物	醇提物	酶提物
总糖含量/ %	2.74 ±0.02	16.9 ±0.2 a	4.41 ±0.05 b	28.0 ±0.2 c	22.4 ±0.4 d
总糖量/ g	2.74 ±0.02	1.28 ±0.02 a	4.56 ±0.06 b	0.668 ±0.004 c	2.48 ±0.04 d
总糖提取率/ %		46.7 ±0.4 a	166 ±1 b	24.4 ±0.0 c	90.5 ±0.8 d

注: $n=3$; $P<0.05$

表 2 富硒灵芝 4 种粗提物硒的含量及提取率

Table 2 Se content and extraction rate of different extracts from Se-enriched *Ganoderma lucidum*

测定项目	富硒灵芝	富硒灵芝粗提物			
		水提物	碱提物	醇提物	酶提物
硒含量/ ($\mu\text{g}/\text{g}$)	37.3 ±0.7	86.2 ±0.4 a	20.4 ±0.1 b	70.2 ±1.0 c	81.2 ±0.7 d
硒总量/ μg	37.3 ±0.7	6.56 ±0.02 a	21.2 ±0.0 b	1.81 ±0.26 c	8.98 ±0.08 d
硒提取率/ %		17.6 ±0.1 a	56.8 ±0.3 b	4.85 ±0.03 c	24.1 ±0.0 d

注: $n=3$; $P<0.05$

富硒灵芝子实体中硒主要与碱性蛋白和水溶性蛋白结合,碱性蛋白和水溶性蛋白结合的硒量为灵芝子实体总硒量的 42.8%~48.5%,此外,多糖也能结合 11.2%~18.0%的硒^[10],这 3 部分结合的硒总量可达 54.0%~66.5%,这与本文碱提可获得 56.8%的硒提取率一致。

2.3 4 种提取方法下富硒灵芝粗提物中蛋白质的含量及提取率

不同提取方法蛋白质的提取率及获得的粗提物中蛋白质的总量(图 1)之间存在显著差异($P<0.05$)。碱提法、酶提法、水提法和醇提法对蛋白质的提取率仍然依次为碱提法>酶提法>水提法>醇

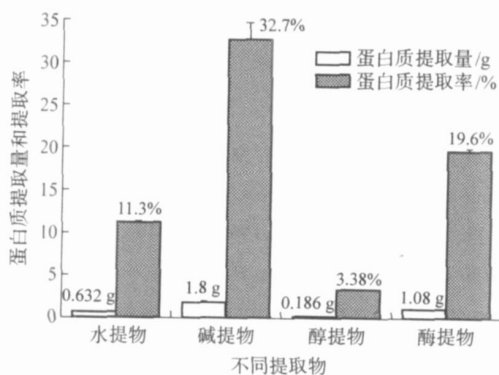


图 1 蛋白质的总量和提取率

Fig. 1 Extracting rate and total amount of protein using different extracting methods

提法。

2.4 4 种提取方法下富硒灵芝粗提物中氨基酸的分布

对富硒灵芝水提物、碱提物、醇提物及酶提物试样进行氨基酸组成分析和 Student-t 检验的结果表明(表 3、4):富硒灵芝不同粗提物中氨基酸的含量 y 与富硒灵芝子实体中氨基酸的含量 x 间遵从 $y = ax$ 关系式,其中 $y_{\text{水}} = 1.362 x_{\text{CK}}$; $y_{\text{碱}} = 0.367 1 x_{\text{CK}}$; $y_{\text{醇}} = 1.554 1 x_{\text{CK}}$; $y_{\text{酶}} = 1.617 4 x_{\text{CK}}$,说明经过水提、醇提和酶提后,富硒灵芝粗提物中各氨基酸含量比子实体按 a 倍率变化,但氨基酸的分布并不改变。

3 结 论

1) 水提、碱提、醇提及酶提 4 种提取方法对富硒灵芝粗提物中总糖、硒及蛋白质的含量和总量影响差异显著($P<0.05$),对富硒灵芝子实体总糖、硒及蛋白质的提取率依次为碱提法>酶提法>水提法>醇提法。

2) 4 种提取方法均不改变富硒灵芝蛋白氨基酸的分布($t > t_{0.01}$)。

3) 采用酶提法和碱提法对富硒灵芝子实体进行主要功效成分的提取均能获得较高的蛋白质、硒及总糖提取率,但相比而言,酶提法提取条件温和,

表3 富硒灵芝4种粗提物中氨基酸构成的比较

Table 3 Amino acid content of different extracts from Se-enriched *Ganoderma lucidum* (Se-GL)

氨基酸	富硒灵芝	富硒灵芝粗提物			
		水提物	碱提物	醇提物	酶解粗提物
天门冬氨酸 Asp	0.828	0.828	0.170	0.399	1.49
苏氨酸 Thr	0.666	0.533	0.077 2	0.432	1.09
丝氨酸 Ser	0.950	0.202	0.204	3.62	3.59
谷氨酸 Glu	0.549	0.538	0.168	0.398	1.12
脯氨酸 Pra	0.224	0.216	0.063 2	0.175	0.398
甘氨酸 Gly	0.374	0.785	0.077 5	0.695	1.18
丙氨酸 Ala	0.527	0.386	0.052 8	0.333	1.09
胱氨酸 Cys	0.483	0.420	0.102	0.385	1.04
缬氨酸 Val	0.816	1.13	0.262	1.15	1.28
蛋氨酸 Meth	0.224	0.646	0.186	0.854	1.44
异亮氨酸 Iso	0.276	0.223	0.0619	0.274	0.126
亮氨酸 Leu	0.603	0.485	0.162	0.396	1.26
酪氨酸 Tyr	0.578	0.111	0.025 1	0.101	0.228
苯丙氨酸 Phen	0.178	0.350	0.055 8	0.290	0.341
赖氨酸 Lys	1.92	3.62	1.05	3.29	1.45
组氨酸 His	1.34	2.34	0.536	2.48	2.31
精氨酸 Arg	0.704	0.616	0.198	0.340	1.72

表4 Student-t 检验结果

Table 4 Results of student-t test

测样	$x_i y_i$	x_i^2	y_i^2	a_i	Q	$Q/(n-2)$	Sa	t
富硒灵芝		10.533 3						
水提物	14.343 0		23.361 6	1.362	3.831 1	0.255 4	0.155 7	8.745 > $t_{0.01}$
碱提物	3.866 7		1.694 0	0.367 1	0.274 5	0.018 30	0.041 68	8.807 > $t_{0.01}$
醇提物	16.369 6		16.369 6	1.554 1	8.409 8	0.560 7	0.230 7	6.736 > $t_{0.01}$
酶提物	17.036 6		17.036 6	1.617 4	9.696 8	0.646 5	0.247 7	6.529 > $t_{0.01}$

Note: y is the amino acid content of Se-GL except cystine while x is the amino acid content of GL except cysteine. On the hypothesis that $y = ax$, $a = \frac{x_i y_i}{x_i^2}$, $Q = \frac{y_i^2 - a^2 x_i^2}{x_i y_i}$, $Sa = Q/(n-2)$, and $t = a/Sa$

在实际生产中对设备的影响小。因此酶提法是一种较理想的提取法。

参 考 文 献

- [1] Kohda H, Tokumoto W, Sakamoto K, et al. The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr) [J]. *Karst Chem Pharm Bull*, 1985, 33 (4): 1367
- [2] 何来英. 灵芝的研究及进展——(综述) [J]. *中国食品卫生杂志*, 1997, 9 (2): 32~35
- [3] 于淑娟, 高大维, 李国基. 超声波酶法提取灵芝多糖的机理研究 [J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 1998, 26(2): 123~127
- [4] Lin J M, Lin C C, Chen M F, et al. Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma neo-japonicum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 1995, 47 (1): 33~41
- [5] Yen G C, Wu J Y. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae* [J]. *Food Chemistry*, 1999, 65: 375~379
- [6] 郑建仙. 功能性食品(第2卷) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 593
- [7] 钱秀萍, 杨庆尧, 宋如景. 灵芝三萜类化合物的提取 [J]. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 1997, 26 (1):

- 62~64
- [8] 赵镭. 灵芝生物富硒及富硒灵芝硒蛋白的分离纯化和抗氧化性研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [9] 高大维, 于淑娟, 闵亚光. 冷冻预处理提取灵芝营养成分[J]. 食品与发酵工业, 1996, 23(2): 47~52
- [10] Zhao L, Zha G H, Zhao Z D, et al. Selenium distribution in a se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(12): 3954~3959
- [11] Zhao L, Zha G H, Hui B D, et al. Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of protein extracts from a selenium-enriched mushroom species of the *Ganoderma* genus [J]. Journal of Food Science, 2004, 69(3): 183~187
- [12] 朱培根, 陈体强, 曾辉, 等. 原木灵芝提取浓缩工艺研究初报[J]. 食品工业科技, 1996, 1: 20~23
- [13] 何慧, 谢笔钧, 孙颀, 等. 发酵灵芝粉水提物清除自由基活性及酶解水提法的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2000, 27(6): 11~15
- [14] 徐新春, 吴惠铃, 刘佑波. 各种栽培因子下培养的灵芝无机元素含量比较测定[J]. 广东微量元素科学, 2000, 7(2): 64
- [15] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colometric method for determination of sugars and related substances [J]. Annual Chem, 1956, 28 (3): 350~356
- [16] 大连轻工业学院, 齐齐哈尔轻工业学院. 甜菜制糖工艺学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1982