

六种灵芝子实体多糖含量的对比分析

班立桐¹, 杨红澎¹, 郑志广¹, 确生²

(1. 天津农学院 农学系, 天津 300384 2. 青海师范大学 民族师范学院化学系 青海 西宁 810008)

摘 要:采用超声波辅助热水提取法研究了 6 种灵芝子实体多糖的含量。结果表明:4 号九
龙山灵芝子实体多糖含量最高;正交实验所得灵芝子实体多糖最佳超声提取条件为:提取温度
70℃,提取时间 35 min、料液比 1 :40。在精密度试验中,*RSD* 在 0.21%~0.61%之间,表明精密
度较好;在稳定性试验中,*RSD* 在 0.70%~4.63%之间,表明在 0~8 h 之间的稳定性较好。

关键词:灵芝子实体;多糖;苯酚—硫酸比色法;超声提取

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2010)24—0195—03

灵芝(*Ganoderma lucidum*)属真菌门担子菌亚门层
菌纲非褶菌目灵芝科灵芝属食药两用真菌,又叫灵芝
草、木灵芝、红芝、赤芝、万年蕈和灵芝仙草等。在我国
作为药物应用已有悠久的历史,具有抗肿瘤、降低血液
中胆固醇含量、炎症等药效,对治疗神经衰弱、冠心病、
高血压、肺炎等病症也有显著的疗效。《本草纲目》记
载,灵芝能“治胸中结,溢心气”,“入心生血,助心充脉”,
“安神”,“保神”,“益肺气”,“益脾气”,“益精气”,“补肝
气”等,对全身五脏之气均有补益作用^[1-2]。灵芝多糖
(Polysaccharide)是灵芝的主要有效成分之一,具有多种
药理学活性^[3]。传统的灵芝多糖提取工艺复杂,浸提剂
用量大、收率低、成本高。近年来人们开始采用超声波
技术提取植物多糖。研究表明,利用超声波产生的强烈
振动、高的加速度、强烈的空化效应、搅拌作用等,可加
速有效成分进入溶剂,从而有利于多糖的提取。该研究
采用超声波辅助热水法提取灵芝子实体多糖,分别对 6
种灵芝菌株的子实体进行了提取测定,确定出了多糖含
量较高的灵芝菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料及仪器

6 种灵芝子实体样品来自天津农学院食用菌研
发中心栽培试验场,原始菌株来源见表 1。所用仪器为 754
紫外—分光光度计,水浴锅,电子天平,离心机,超声波
细胞粉碎机。试验试剂为葡萄糖、苯酚、硫酸(均为分析
纯)。

1.2 试验方法

1.2.1 灵芝子实体多糖检测方法 该研究采用苯酚—
硫酸法检测灵芝子实体多糖。

1.2.2 苯酚显色液配制方法 在电子天平上准确称取
5 g 苯酚,用 100 mL 的容量瓶定容配成 5%的苯酚溶液
(溶剂为蒸馏水)。

表 1		原始菌株来源
编号	原始菌株名称	来源
1	G8	武汉市周玉麟食用菌研究所
2	G9	武汉市周玉麟食用菌研究所
3	日本赤灵芝	北京吉蕈园科技有限公司
4	九龙山灵芝	天津蓟县九龙山风景区采集分离
5	韩国灵芝	北京吉蕈园科技有限公司
6	赤芝	江苏高邮市科学食用菌研究所

1.2.3 显色温度的确定 分别吸取一定量的标准葡萄
糖溶液样品,分别置于 4 支比色管中。加水至 2 mL,再
加 1 mL 5%苯酚和 5 mL 硫酸,摇匀后分别于 0、25、50、
75、100℃,显色 20 min,冷却后测吸光度。

1.2.4 标准曲线的制作 在电子天平上准确称取葡萄
糖 0.05 g,用 50 mL 的容量瓶定容配成 1.0 mg/mL 的葡
萄糖溶液。并分别稀释成 0.0、0.01、0.02、0.03、0.04、
0.05、0.06、0.07 mg/mL 浓度梯度的葡萄糖作为基准物。
每种浓度的葡萄糖溶液取 2 mL 分别加入 1 mL 5%苯酚
和 5 mL 硫酸混匀,然后于 25℃水中加热 20 min,流水冷
却后于 754 型分光光度计 485 nm 处测光密度值。以葡
萄糖浓度为纵坐标,光密度值为横坐标作标准曲线。

1.2.5 灵芝子实体多糖提取方法 该研究在总结各种
提取技术的基础上^[4-5],采用超声波辅助热水提取技术
提取灵芝子实体中的多糖。准确称取灵芝子实体粉末
(60 目)1 g 放入 50 mL 的离心管中,按一定料液比向离
心管中加入蒸馏水,在恒温水浴锅中加热 5 min,然后放
入超声波细胞粉碎机中超声提取。为了在超声波处理
过程中维持料液的温度,所以每隔 5 min 对料液进行 1
次加热。该试验采用二级提取,合并 2 次上清液,用于
多糖测定。

1.2.6 灵芝子实体多糖提取条件的优化 用正交实验

第一作者简介:班立桐(1972-),男,天津人,副教授,现主要从事食
用菌教学与科研工作。
收稿日期:2010—10—20

对提取因素: 超声时间、超声功率、料液比、超声温度进行优化。选用 $L_{16}4^4$ 正交表。

表 2 正交实验的因素和水平

水平	A/ 超声 功率/ W	B/ 超声 温度/ °C	C/ 超声 时间/ min	D/ 料液比
1	50	30	5	1 : 10
2	100	50	15	1 : 20
3	150	70	25	1 : 30
4	200	90	35	1 : 40

1.2.7 6 种灵芝子实体中多糖含量的测定 用正交实验最佳提取条件, 对已有的 6 种灵芝菌株的子实体多糖含量进行提取和测定。取 2 mL 离心得到的上清液, 稀释 20 倍。再取稀释液 1 mL 加入 5% 苯酚 1 mL、浓硫酸 5 mL, 然后振荡混匀, 在最佳温度水浴中显色 20 min, 冷却至室温, 此时溶液颜色为淡黄色。在 754 型分光光度计 485 nm 处测光密度值。多糖含量=

$$\frac{\text{上清液总体积} \times \text{稀释液体积} \times \text{稀释倍数} \times \text{多糖浓度}}{\text{样品重量} / \text{mg}} \times 100\%。$$

1.2.8 精密度试验 取 6 种菌株的灵芝子实体样品稀释液 1 mL、加 5% 苯酚溶液 1 mL、浓硫酸 5 mL, 然后振荡混匀, 显色 20 min 后冷却至室温, 连续进样 5 次测定吸光度, 并计算每种样品的相对标准偏差(RSD)。

1.2.9 稳定性试验 精密吸取 6 种菌株的灵芝子实体多糖样品溶液 1 mL 显色后, 每隔 2 h 测定吸光度, 连续测定 8 h。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线结果

将表 3 所测数据以吸光度对葡萄糖浓度求线性回归方程, 得标准曲线回归方程为 $y = 10.662x (R^2 = 0.9992)$ 。试验表明, 葡萄糖在 0 ~ 0.07 mg/mL 范围内呈现良好的线性关系。

表 3 葡萄糖标准曲线

样品号	0	1	2	3	4	5	6
葡萄糖浓度 / mg · mL ⁻¹	0	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07
吸光度/ A	0	0.224	0.329	0.418	0.527	0.638	0.750

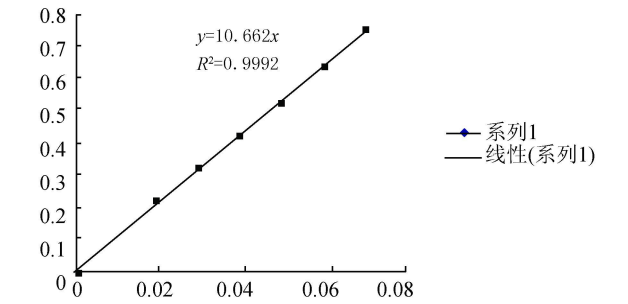


图 1 葡萄糖标准曲线

2.2 超声波提取灵芝子实体多糖正交实验结果

影响灵芝子实体多糖提取率的因素较多, 有温度、料液比、提取时间等诸多因素, 针对这些因素对灵芝多糖设计正交实验进行超声波提取, 将超声功率、温度、料液比、提取时间这 4 个影响较显著的因素设计成 4 因素 4 水平正交实验方案, 确定提取的优选条件, 见表 3 和表 4。从表 4 中 K 值可以看出不同因素水平对提取率都有明显的影响, 但料液比是影响多糖提取率最显著的因素, 其次是提取温度和提取时间。由表 4 可知, 该试验中超声波提取灵芝多糖的最佳条件是 $A_3B_3C_4D_4$, 即超声功率 150 W、提取温度 70 °C、超声提取时间 35 min、料液比 1 : 40。

表 4 正交实验方案与结果

序号	A / W	B / °C	C / min	D / mL	溶液 / mL	吸光度 / A	多糖含量 / %
1	50	30	5	1 : 10	2.8	0.708	0.370
2	50	50	15	1 : 20	12	0.317	0.713
3	50	70	25	1 : 30	22.6	0.293	1.238
4	50	90	35	1 : 40	32.4	0.233	1.417
5	100	30	15	1 : 30	21.8	0.147	0.599
6	100	50	5	1 : 40	32.6	0.143	0.872
7	100	70	35	1 : 10	2.8	1.117	0.586
8	100	90	25	1 : 20	12.6	0.468	1.105
9	150	30	25	1 : 40	32.6	0.169	1.029
10	150	50	35	1 : 30	22.8	0.298	1.269
11	150	70	5	1 : 20	11.9	0.412	0.913
12	150	90	15	1 : 10	2.8	1.157	0.605
13	200	30	35	1 : 20	12.8	0.348	0.833
14	200	50	25	1 : 10	2.8	0.875	0.459
15	200	70	15	1 : 40	32.4	0.246	1.490
16	200	90	5	1 : 30	22.2	0.242	1.005
k_1	0.935	0.708	0.79	0.505			
k_2	0.790	0.828	0.852	0.891			
k_3	0.954	1.057	0.958	1.028			
k_4	0.947	1.033	1.026	1.202			
R	0.164	0.349	0.236	0.697			
优水平	A_3	B_3	C_4	D_4			
主次因素	$D_4B_3C_4A_3$						
最优组合	$A_3B_3C_4D_4$						

2.3 不同灵芝菌株子实体多糖含量测定结果

通过测定, 发现 4 号菌株子实体的多糖含量最高, 为 2.3%; 2 号多糖含量最低, 为 1.2% (表 5)。

表 5 不同灵芝菌株在相同条件下的多糖含量

条件	灵芝菌株					
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号
超声温度/ °C	70	70	70	70	70	70
超声时间/ min	35	35	35	35	35	35
超声功率/ W	150	150	150	150	150	150
吸光度/ A	0.213	0.206	0.224	0.390	0.321	0.216
多糖浓度/ mg · mL ⁻¹	0.02	0.0193	0.021	0.0366	0.0301	0.0203
多糖含量/ %	1.272	1.238	1.346	2.346	1.915	1.293

2.4 精密度试验

由表 6 可知, 该方法简便、准确、稳定、灵敏度高, 精密度 RSD 在 0.21% ~ 0.61%。

表 6 不同灵芝在相同条件下的精密度试验测定结果

灵芝菌株	测定次数					RSD/ %
	1	2	3	4	5	
1 号	0.211	0.213	0.210	0.212	0.210	0.61
2 号	0.205	0.203	0.204	0.202	0.204	0.54
3 号	0.223	0.222	0.224	0.223	0.225	0.49
4 号	0.391	0.390	0.389	0.390	0.391	0.21
5 号	0.322	0.323	0.323	0.322	0.324	0.25
6 号	0.205	0.204	0.206	0.205	0.204	0.41

2.5 稳定性试验

由表 7 可知, 该方法提取的灵芝多糖溶液显色后, 在 0~8 h 之内稳定, RSD 在 0.70%~4.63%之间。

表 7 在相同条件下的稳定性试验测定结果

菌株	0	2 h	4 h	6 h	8 h	RSD/ %
1 号	0.191	0.189	0.197	0.193	0.196	1.73
2 号	0.177	0.169	0.166	0.165	0.169	2.78
3 号	0.187	0.202	0.197	0.193	0.204	3.50
4 号	0.216	0.219	0.215	0.217	0.216	0.70
5 号	0.238	0.238	0.232	0.235	0.234	1.11
6 号	0.196	0.203	0.196	0.184	0.182	4.63

3 结论

根据显色温度的测定, 在 0、25、50、75、100℃温度下吸光度分别为: 0.548、0.665、0.584、0.484、0.443, 说明在 25℃条件下显色可以达到最大的吸光度, 所以测多糖含

量时显色温度以 25℃为最佳。
用葡萄糖做标准品和用葡聚糖做标准品测定食品中的粗多糖含量时, 前者测的结果稍偏高, 大约高4.6%, 但葡聚糖标准品的价格昂贵且在国内难于买到, 故该研究用葡萄糖来代替葡聚糖做标准品。

该研究采用了超声波辅助热水提取灵芝子实体多糖, 从试验结果可以看出, 该方法精密度、稳定性良好, 可在较低的温度下得到灵芝子实体多糖。同时, 利用该方法, 对 6 种灵芝菌株的子实体进行了多糖的提取和含量测定, 得知 4 号九龙山灵芝菌株子实体中多糖含量最高。

参考文献

[1] 郑汉臣. 药用植物学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社 1999: 124-130.
[2] 林志彬. 灵芝抗肿瘤活性和免疫调节作用的研究进展[J]. 北京大学学报 2002 34(5):493-498.
[3] 刘美琴 李建中, 孔繁祚. 灵芝多糖研究进展[J]. 微生物学报 1998 25(3): 173-174.
[4] 张志军 李淑芳, 刘建华. 灵芝多糖提取-水浸提条件的研究[J]. 天津农学院学报 2005, 12(1): 12-15.
[5] 徐凌川, 张华, 许昌盛 等. 超声波提取灵芝多糖的最佳工艺探讨[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(6): 471-472.

Contrastive Analysis on Content of Polysaccharide
from Six *Ganoderma lucidum*

BAN Li-tong¹, YANG Hong-peng¹, ZHENG Zhi-guang¹, QUE Sheng²

(1. Department of Agriculture Tianjin Agricultural College, Tianjin 30084; 2. Department of Chemistry, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008)

Abstract: Hot water extraction method assisted by ultrasonic was applied to extract *Ganoderma lucidum* polysaccharide from *Ganoderma Lucidum* in this paper. The results showed that the content of polysaccharide that was No. 4 *Ganoderma Lucidum* from Jiulongshan was the highest. The optimal extraction conditions were determined as follows: time of ultrasonic extraction 35 min, temperature of extraction 70℃ and solid-liquid ratio 1 : 40. In the precision experiment, RSD value was 0.21%~0.61%, showing that the precision was better. In the stability experiment, RSD value was 0.70%~4.63%, showing that the stability was better in 0~8 h.

Key words: *Ganoderma Lucidum*; polysaccharide; phenol-sulfuric acid assay; ultrasonic extraction