

# CO<sub>2</sub> 超临界法萃取深层发酵灵芝真菌胞内灵芝酸的研究

朱会霞

(衡水学院, 衡水 河北 053000)

**摘 要:**以灵芝真菌为试材,在单因素试验基础上,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验研究了 CO<sub>2</sub> 超临界萃取灵芝真菌菌丝体中灵芝酸的最佳工艺条件。结果表明:萃取压力对灵芝酸提取量影响显著,而萃取温度、CO<sub>2</sub> 流量影响不显著,3 个因素的适宜组合为萃取压力 30 MPa、萃取温度 30℃、CO<sub>2</sub> 流量 1.6 L/min,经试验验证,该条件下,灵芝酸萃取量为 (23.93±1.85) mg/g,表明此条件较为适宜于灵芝中灵芝酸的提取。

**关键词:**超临界;萃取;灵芝酸

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)21-0158-03

灵芝酸是近些年在灵芝中发现的一种重要的药理活性化合物,具有强烈的药理活性,可止痛、镇静、抑制组胺释放、消炎、抗过敏,还具有解毒、保肝、抑制肿瘤细胞生长等功效,另外,这类物质可健胃。不同种类灵芝酸的药理作用各有偏重,如灵芝酸 A、B、C 和 D 能够抑制小鼠肌肉细胞组胺的释放,灵芝酸 F 能强烈抑制血管紧张素酶的活性,赤芝孢子酸 A 有降转氨酶的作用,可用于防治肝炎<sup>[1-3]</sup>。

超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取是利用超临界流体的溶解能

力与其密度的关系,即利用压力和温度对超临界流体溶解能力的影响进行。在超临界状态下,将超临界流体与待分离的物质接触,使其有选择性地把极性大小、沸点高低和分子量大小的成分依次萃取出来,具有省时、省力、环保、分离效果好的特点<sup>[4]</sup>。

该试验研究采用深层液体发酵培养灵芝真菌,发酵结束后,取湿菌体,对超临界法萃取灵芝真菌中灵芝酸的工艺条件进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试灵芝真菌(*Ganoderma lucidum*)为该实验室保藏品种。

**作者简介:**朱会霞(1977-),女,河北景县人,博士,副教授,现主要从事发酵工程与食品等研究工作。E-mail:wztg8268@163.com.

**收稿日期:**2013-07-24

水时采用 1% 的石灰水上清液。及时清理残柄、死菇及其它废料,不留隐患。栽培结束后采用烧碱水、石灰水喷刷或硫磺点燃熏蒸等方法及时对温室大棚消毒灭菌。

平菇栽培过程中一旦发生大纽扣菇,就应立即将发病菌袋搬出温室大棚,进行深埋或烧毁处理,这样可有效防止病害的进一步蔓延。

## 参考文献

- [1] 罗信昌,王家清,王汝才.食用菌病虫害杂菌及防治[M].北京:农业出版社,1992.
- [2] 王东昌,郭立忠,金静,等.平菇病害大纽扣菇的防治研究[J].莱阳农学院学报,2001(2):144-146.

## Occurrence and Prevention of *Hypocrea pertata* in the Process of *Pleurotus ostreatus* Cultivation

ZHAO Zhi-shun, PANG Zhen-ru

(Fushun School of Special Agriculture, Fushun, Liaoning 113123)

**Abstract:** On the basis of an introduction of the symptom, occurrence regular of *Hypocrea pertata*, it pointed out the prevention methods, including choosing disease-resistance varieties, strengthening ventilation, dropping temperature and humidity, sterilizing the environment, so it could effectively inhibit the cocurrence and spread of *Hypocrea pertata*.

**Key words:** *Hypocrea pertata*; *Pleurotus ostreatus*; parasitic fungi; occurrence; prevention

高效液相色谱(Agilent1100 美国);旋蒸仪(型号:EV311 莱伯泰科有限公司);电子天平(上海田宫称重制造有限公司);10 L 发酵罐(中国丽上海高机生物有限公司);分光光度计 UV-250(日本岛津);HA221-40(50)25 型超临界萃取仪(江苏南通华安超临界萃取有限公司)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 灵芝真菌深层培养条件 灵芝真菌培养条件见文献资料[5]。

1.2.2 灵芝发酵样品处理方法 取一定量灵芝发酵液,3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,水洗菌体再离心,至上清液不带发酵液颜色为止,收集菌体,在 60℃ 恒温烘箱中烘干至恒重,在干燥器中冷却至常温,称量,捣碎后,精确称量 1 g 样品于 500 mL 三角瓶中,添加 20 mL 甲醇溶液,超临界萃取,待静止后取上清液,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,量取体积,4℃ 保藏待用。

1.2.3  $\text{CO}_2$  超临界萃取方法 灵芝真菌深层发酵 120 h 后,离心将菌体与发酵液分离,取菌体,在 60℃ 恒温烘箱中烘干至恒重,在干燥器中冷却至常温,称量,捣碎后,过筛,取 100 g 试验样品装入反应釜中,打开  $\text{CO}_2$  气体,同时调节萃取釜、分离釜 I、分离釜 II 温度达设定温度,然后加压至设定压力,调节  $\text{CO}_2$  流量,使超临界  $\text{CO}_2$  流体在设定的压力、温度下进行萃取循环,当达到试验设定的萃取时间后,从分离釜 I 和分离釜 II 出口口接收萃取液,合并分离釜 I 和分离釜 II 萃取液,定容至 500 mL,即得灵芝真菌深层发酵菌体超临界  $\text{CO}_2$  萃取液样品,备用。

1.2.4 灵芝酸的提取纯化 发酵液经过滤后,用水饱和和正丁醇提取 3 次,合并正丁醇提取液,然后减压浓缩至干,残渣即为粗灵芝酸。粗灵芝酸,以  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:9,5:95,3:97)分段洗脱,以薄层层析检测洗脱液,经硅胶柱多次层析纯化即得[6]。

1.2.5 灵芝酸的测定方法 高效液相色谱法测定灵芝酸,色谱条件为:色谱柱为 250 mm $\times$ 4.6 mm CART 250-4RPC<sub>18</sub>,检测器为紫外检测器,检测波长 245 nm,流动相蒸馏水:乙腈为 95:5,流速 1 mL/min,柱温为室温[6]。

1.2.6 单因素试验 萃取压力对灵芝真菌灵芝酸萃取量的影响:控制萃取温度为 20℃、萃取时间 1 h, $\text{CO}_2$  流量 1.0 L/min,分别设定萃取压力为 10、20、30、40、50、60 MPa。萃取温度对灵芝真菌麦角固醇萃取量的影响:超临界萃取压力设定为 30 MPa,萃取时间 1 h, $\text{CO}_2$  流量 1.0 L/min,分别设定萃取温度为 10、20、30、40、50、60℃。 $\text{CO}_2$  流量对灵芝真菌麦角固醇萃取量的影响:设定萃取过程中萃取压力 30 MPa,温度 30℃,时间 1 h,设定  $\text{CO}_2$  流量分别为 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 L/min。

1.2.7 正交实验 在单因素试验的基础上,设计了  $L_9(3^4)$  正交实验,以优化组合萃取条件,正交实验因素水平见表 1。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 萃取压力/MPa	B 萃取温度/℃	C $\text{CO}_2$ 流量/L $\cdot$ min $^{-1}$	D 误差
1	20	20	1.2	1
2	30	30	1.4	2
3	40	40	1.6	3

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

2.1.1 萃取压力对灵芝真菌灵芝酸萃取量的影响 从图 1 可以看出,萃取中,萃取压力对灵芝中灵芝酸萃取量有一定的影响,较小的萃取压力不利于灵芝酸的萃取,随萃取压力的增加,灵芝酸的萃取量增大,萃取压力 30 MPa 时,灵芝酸萃取量最大,之后,随萃取压力的增大灵芝酸萃取量呈现逐渐降低的趋势,说明萃取压力 30 MPa 为适宜压力。

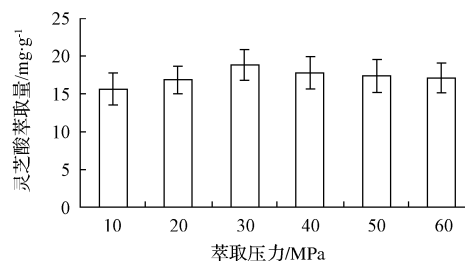


图 1 萃取压力对灵芝真菌灵芝酸萃取量的影响

Fig. 1 The effect of the extraction pressure on ganoderic acids extraction

2.1.2 萃取温度对灵芝真菌灵芝酸萃取量的影响 从图 2 可以看出,超临界萃取中,温度对灵芝真菌中灵芝酸的萃取量影响较大,萃取温度为 30℃ 时,灵芝酸的萃取量最大,表明适宜于深层发酵灵芝真菌菌体中灵芝酸的萃取温度为 30℃。

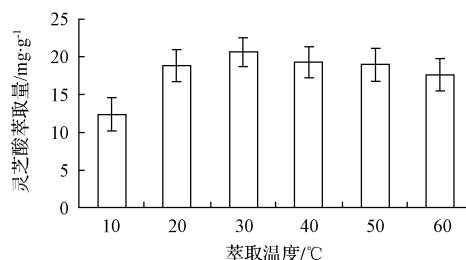


图 2 萃取温度对灵芝真菌灵芝酸萃取量的影响

Fig. 2 The effect of the extraction temperature on ganoderic acids extraction

2.1.3  $\text{CO}_2$  流量对灵芝真菌灵芝酸萃取量的影响 从图 3 可以看出,不同  $\text{CO}_2$  流量,灵芝酸的萃取量不同,当  $\text{CO}_2$  流量较低时,灵芝酸萃取量随  $\text{CO}_2$  流量的增加而增

大,当  $\text{CO}_2$  流量为 1.4 L/min 时,灵芝酸的萃取量达到最大,之后随  $\text{CO}_2$  流量的增加,萃取量反而降低,因此,  $\text{CO}_2$  流量为 1.4 L/min 时最适宜。

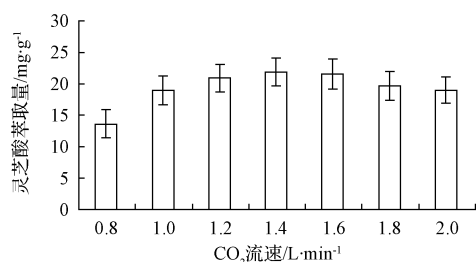


图3  $\text{CO}_2$  流量对灵芝真菌麦角固醇萃取量的影响

Fig. 3 The effect of  $\text{CO}_2$  velocity on ganoderic acids extraction

## 2.2 正交实验结果

由表 2,3 可知,优化组合萃取条件下,萃取压力的作用效果显著,而萃取温度、 $\text{CO}_2$  流量影响不显著,3 个

表 2 正交实验结果

Table 2 Fermentation condition result of orthogonal test

水平	因素				Y 灵芝酸萃取量/mg·g <sup>-1</sup>
	A 萃取压力/MPa	B 萃取温度/℃	C $\text{CO}_2$ 流量/L·min <sup>-1</sup>	D 误差	
1	1	1	1	1	17.17
2	1	2	2	2	18.50
3	1	3	3	3	19.96
4	2	1	2	3	22.38
5	2	2	3	1	23.92
6	2	3	1	2	22.50
7	3	1	3	2	21.24
8	3	2	1	3	20.88
9	3	3	2	1	19.33
$K_1$	18.543	20.263	20.183	20.140	
$K_2$	22.933	21.100	20.070	20.747	
$K_3$	20.483	20.597	21.707	21.073	
R	4.390	0.837	1.637	0.933	

表 3 正交实验各因素显著性分析

Table 3 Significant analysis on orthogonal test factors

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	29.038	2	24.098	6.940	*
B	1.064	2	0.883	6.940	
C	5.012	2	4.159	6.940	
D	1.346	2	1.117	6.940	
误差	2.41	4			

因素的适宜组合为  $A_2B_2C_3$ ,即萃取压力 30 MPa、萃取温度 30℃、 $\text{CO}_2$  流量 1.6 L/min,经再次验证,该条件下,灵芝酸萃取量为  $(23.93 \pm 1.85)$  mg/g,表明此条件较适宜灵芝中灵芝酸的提取。

## 3 结论

该试验结果表明,萃取压力、萃取温度、 $\text{CO}_2$  流量对灵芝酸的萃取量都有不同程度的影响,其中,萃取压力的作用效果显著,而萃取温度、 $\text{CO}_2$  流量影响不显著,3 个因素的适宜组合为  $A_2B_2C_3$  即萃取压力 30 MPa、萃取温度 30℃、 $\text{CO}_2$  流量 1.6 L/min,经再次试验验证,该条件下,灵芝酸萃取量为  $(23.93 \pm 1.85)$  mg/g,表明此条件较为适宜灵芝中灵芝酸的提取。

## 参考文献

- [1] 刘媛,丁重阳,章克昌,等. 10 种中药对灵芝液体发酵的影响[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(2):123-126.
- [2] 王玉红,丁重阳,章克昌. 苦荞对灵芝发酵生产灵芝酸的影响[J]. 食品与发酵工业,2004,29(9):95-98.
- [3] 王晓玲,刘昭廷. 灵芝菌丝体中灵芝酸的体外抑菌作用[J]. 食品科技,2008(10):184-186.
- [4] 张景伟. 超临界  $\text{CO}_2$  萃取山茱萸中有效成分的工艺研究[D]. 郑州: 郑州大学,2005.
- [5] 孙金旭. 灵芝紫外诱变育种研究[J]. 中国酿造,2009(8):63-66.
- [6] 娜娜,聂少平,陈奕. 灵芝氯仿提取物的 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(5):589-593.
- [7] 凌庆枝,王林,魏兆军,等. pH 值控制灵芝发酵产生灵芝酸的研究[J]. 中国酿造,2009,204(3):117-120.

# Study on the Optimization of Ganoderic Acids from *Ganoderma lucidum* After Fermentation by Supercritical Fluid Extraction Method

ZHU Hui-xia

(Hengshui College, Hengshui, Hebei 053000)

**Abstract:** Taking *Ganoderma lucidum* as material, the optimization of Ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* after fermentation were studied by supercritical fluid extraction method. On the basis of single factor experiment,  $L_9(3^4)$  orthogonal was used to optimize the extraction conditions. The results showed that the extraction pressure was significant factors, while extraction temperature and  $\text{CO}_2$  velocity had no significant effect on the yield of ganoderic acids. The optimization conditions was as follows: 30 MPa extraction pressure, extraction temperature 30℃,  $\text{CO}_2$  flow 1.6 L/min, the content of Ganoderic acids reached  $(23.93 \pm 1.85)$  mg/g under the conditions, so the optimization conditions was suitable for the Supercritical fluid extraction of Ganoderic acids from *Ganoderma Lucidum* after fermentation.

**Key words:** supercritical fluid extraction; extraction; ganoderic acids