

桦褐孔菌发酵液中三萜化合物和多糖的微波辅助双水相萃取

刘琳¹, 宋丽敏^{2*}

1 (青岛农业大学 生命科学学院, 山东省应用真菌重点实验室, 山东 青岛 266109)

2 (青岛农业大学 农学与植物保护学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘要 采用微波辅助乙醇/ K_2CO_3 双水相提取技术实现一步操作提取分离桦褐孔菌发酵液中的三萜化合物和多糖。通过考察分配系数和回收率, 探讨三萜化合物和多糖在体系中的分配行为。获得三萜化合物和多糖的最佳微波提取条件为: 最佳相组成中 K_2CO_3 的质量分数为 25%, 乙醇的质量分数为 24%; 固液比为 1:50; 微波功率为 540 W; 微波时间为 120 s。此条件下, 三萜化合物的提取率为 $(99.22 \pm 0.68)\%$, 多糖的提取率为 $(98.34 \pm 0.83)\%$, 蛋白去除率为 $(94.67 \pm 0.74)\%$, 菌丝体去除率为 100%。该方法操作简单, 三萜化合物和多糖提取率高、分离效果好, 同时去除了菌丝体和蛋白, 更加有利于产品的后续纯化。

关键词 乙醇/ K_2CO_3 双水相; 桦褐孔菌; 三萜化合物; 多糖; 微波辅助提取

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)又名白桦茸、斜纤孔菌、桦癌孔菌, 隶属于锈革孔菌目(Hymenochaetales)、锈革孔菌科(Hymenochaetaceae), 是一种非常珍贵的食药两用真菌^[1]。早在16世纪, 在俄罗斯、波兰等欧洲国家, 桦褐孔菌就被广泛地应用于治疗癌症、结核病等疑难杂症^[2]。桦褐孔菌中含有200多种化学成分^[3], 其中主要营养成分多糖和三萜化合物具有降血糖、血脂, 抗病毒、肿瘤, 抗氧化、衰老, 抗炎, 抗凝血和免疫调节等功效^[4-8]。液体发酵产物桦褐孔菌菌丝体含有丰富的人体必需氨基酸, 具有较高的营养价值^[9]。目前, 在美国和日本, 桦褐孔菌的应用研究已成为热点。开发研制桦褐孔菌系列保健和医药食品, 使其为人类防病、治病发挥作用, 具有美好的前景^[10]。

桦褐孔菌中营养成分的传统提取方法有煎煮法、回流提取法、索氏提取法和浸渍法等, 这些方法存在周期长、工序多、损失大、提取率低等缺点。近年来, 超声、微波、高压脉冲电场^[11-13]等技术被应用于多糖和三萜化合物的提取。然而, 目前通过提取同时获得多糖和三萜化合物的报道较少。胡涛等^[14]依次用水和异丙醇作为萃取剂, 采用超声辅助提取桦褐孔菌子实体中的多糖和三萜化合物。该方法虽缩短了提取

时间, 但耗时且操作步骤繁琐。

微波辅助双水相萃取技术省时、高效, 同时具备微波辅助提取和双水相萃取的优点, 已被应用于多种天然产物活性成分的提取分离。王辉等^[15]利用微波辅助乙醇/ $(NH_4)_2SO_4$ 双水相提取技术, 同时实现了虎杖(*Polygonum cuspidatum*)中3种活性成分(白藜芦醇、白藜芦醇苷和大黄素)的有效提取。笔者以乙醇/ $(NH_4)_2SO_4$ 双水相体系为提取剂, 对盾叶薯蓣中的皂苷成分进行微波辅助提取, 总皂苷提取率为95.1%^[16]。FU^[17]通过微波辅助乙醇/ K_2HPO_4 双水相提取, 同时获得降香黄檀叶子(*Dalbergia odorifera* T. Chen leaves)中的染料木黄酮(genistein)和鹰嘴豆芽素A(biochanin A), 提取率分别为1.034 mg/g和2.023 mg/g。ZHANG^[18]以乙醇/ KH_2PO_4 体系为提取剂, 通过微波辅助提取, 同时实现了木豆根(Pigeon pea roots)中芹菜黄素(apigenin)和染料木黄酮(genistein)的提取。本研究采用微波辅助乙醇/ K_2CO_3 双水相提取技术对桦褐孔菌发酵培养物中的多糖和三萜化合物进行提取, 将固液分离和产物的提取、分离整合为一步操作, 同时实现多糖和三萜化合物的提取分离。

1 材料与方法

1.1 材料

桦褐孔菌保藏于青岛农业大学山东省应用真菌重点实验室, 白桦脂醇购于Sigma, 其他化学试剂均为分析纯。

第一作者: 博士研究生, 讲师(宋丽敏博士为通讯作者, E-mail: liminsongen@yahoo.com)。

基金项目: 青岛农业大学高层次人才科研基金(6631112308, 6631115038)

收稿日期: 2015-10-13 改回日期: 2015-12-28

1.2 仪器

752 紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 恒温水浴锅, 龙口市先科仪器有限公司; 电子天平, 奥豪斯国际贸易有限公司; LRH-250A 生化培养箱, 广东省医疗器械厂; 高速冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific; 美的 MM721NH1-PW 微波炉, 美的微波炉电器; 恒温振荡器, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 桦褐孔菌发酵及提取液的制备

种子培养基: 葡萄糖 2% , 蛋白胨 0.5% , KH_2PO_4 0.3% , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15% , 麸皮 0.5% , 250 mL 三角瓶中装液量 50 mL。

发酵培养基: 葡萄糖 2% , 麸皮 3.0% , KH_2PO_4 0.3% , 蛋白胨 0.8% , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15% , 250 mL 三角瓶中装液量 50 mL。

发酵培养方法: 将保藏于 4 °C 冰箱、PDA 斜面上的菌种转接于 PDA 平板培养基, 28 °C 活化培养 7 d。活化的平板菌种用打孔器接种 4 个菌饼到种子培养基中, 28 °C 培养 5 d, 接种于发酵培养基, 接种量的体积分数为 8% , 28 °C 培养 8 d, 获得桦褐孔菌发酵培养物。

多糖提取液的制备: 发酵结束后, 将装有发酵培养物的锥形瓶置于 540 W 微波下, 加热提取 2 min, 合并各瓶提取物, 1 776 × g 离心 5 min, 去沉淀, 上清即为提取液, 4 °C 冰箱保藏备用。提取液中多糖浓度为 0.79 mg/mL。

三萜粗提物的制备: 发酵结束后, 1 776 × g 离心 5 min, 弃上清液, 菌丝体沉淀加入适量异丙醇, 加热回流提取 6 h, 过滤, 收集滤液, 减压蒸发去除溶剂后, 60 °C 干燥至恒重, 保存于干燥器中备用。粗提物中三萜化合物质量百分含量为 84.2%。

1.4 双水相体系的确定

向多糖提取液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2CO_3 、 Na_2CO_3 和 K_2HPO_4 4 种无机盐, 再分别加入乙醇、丙醇和异丙醇 3 种有机溶剂, 配制液体总质量为 8 g 的双水相体系, 体系中盐质量分数为 20% , 醇质量分数为 25% , 其余为质量分数为 55% 的多糖提取液, 然后在每个体系中加入约 4 mg 的三萜粗提物, 用漩涡混匀仪充分混合后, 室温静置 10 min, 分别吸取上、下相, 检测多糖和总三萜化合物的含量, 计算三萜化合物在上相中的回收率 ($R_{\text{三萜化合物}}$, 公式 2), 多糖在下相中的回收率 ($R_{\text{多糖}}$, 公式 1)。

$$R_{\text{多糖}}/\% = \frac{C_{\text{多糖下相}} \times V_{\text{下相}}}{C_{\text{多糖上相}} \times V_{\text{上相}} + C_{\text{多糖下相}} \times V_{\text{下相}}} \times 100 \quad (1)$$

$$R_{\text{三萜化合物}}/\% = \frac{C_{\text{三萜上相}} \times V_{\text{上相}}}{C_{\text{三萜上相}} \times V_{\text{上相}} + C_{\text{三萜下相}} \times V_{\text{下相}}} \times 100 \quad (2)$$

式中: $R_{\text{多糖}}$, 多糖在下相的回收率, %; $C_{\text{多糖上相}}$ 和 $C_{\text{多糖下相}}$, 分别为多糖在上、下相的质量浓度, mg/mL; $C_{\text{三萜上相}}$ 和 $C_{\text{三萜下相}}$, 分别为三萜化合物在上、下相的浓度, mg/mL; $V_{\text{上相}}$ 和 $V_{\text{下相}}$, 分别是上、下相的体积, mL。

1.5 乙醇/ K_2CO_3 双水相体系相图的绘制

采用浊度法^[19] 绘制乙醇/ K_2CO_3 双水相体系相图。首先称取一定量的 K_2CO_3 (m_1) 和 4.02 mg 三萜粗提物, 混合后加入一定量多糖提取液 (m_2) 溶解, 然后逐滴加入乙醇 (m_3), 直至混合溶液恰好出现浑浊。各组成质量分数 (y) 计算公式如下:

$$y_{\text{醇}} = \frac{m_3}{m_1 + m_2 + m_3} \quad (3)$$

$$y_{\text{盐}} = \frac{m_1}{m_1 + m_2 + m_3} \quad (4)$$

1.6 乙醇/ K_2CO_3 体系中多糖和三萜化合物的分配行为

将多糖提取液、乙醇和 K_2CO_3 配制成液体总质量为 10 g 的双水相体系 (体系中加入 5 mg 的三萜粗提物) 根据乙醇/ K_2CO_3 相图, 分别固定体系中 K_2CO_3 的质量分数为 15%、20% 和 25% , 在固定 K_2CO_3 含量下, 改变双水相体系中的乙醇质量分数, 考察双水相体系中乙醇含量对多糖和三萜化合物分配系数 (K , 公式 5 和 6) 和回收率 (R , 公式 1 和 2) 的影响。体系中乙醇初始含量为相图中的固定盐浓度下成相点的乙醇含量, 乙醇终含量为该盐浓度下盐析点的乙醇含量。

$$K_{\text{多糖}} = \frac{C_{\text{多糖下相}}}{C_{\text{多糖上相}}} \quad (5)$$

$$K_{\text{三萜化合物}} = \frac{C_{\text{三萜上相}}}{C_{\text{三萜下相}}} \quad (6)$$

式中: $C_{\text{多糖上相}}$ 和 $C_{\text{多糖下相}}$, 分别为多糖在上、下相的质量浓度, mg/mL; $C_{\text{三萜上相}}$ 和 $C_{\text{三萜下相}}$, 分别为三萜化合物在上、下相的质量浓度, mg/mL。

1.7 微波辅助乙醇/ K_2CO_3 提取多糖和三萜化合物

1.7.1 相组成的确定

发酵结束后, 向 250 mL 锥形瓶的发酵培养物中加入乙醇、 K_2CO_3 和水, 配制液体总质量为 80 g 的双水相体系, 540 W 微波提取 120 s, 静置 30 min, 吸取上、下相检测三萜化合物和多糖的含量, 计算提取率。

1.7.2 固液比的确定

发酵结束后,将 250 mL 锥形瓶的发酵培养物中加入乙醇、 K_2CO_3 和水,配制成固液比为 1:30,1:40,1:50 和 1:60 (g:g) 的双水相体系,充分混匀,微波提取后检测多糖和三萜化合物含量,方法同 1.7.1。固体物料质量以发酵培养物中菌丝体干重计算,液体质量为体系中乙醇、 K_2CO_3 、水和发酵液的总质量。

1.7.3 微波功率和时间的确定

发酵结束后,向 250 mL 锥形瓶中加入乙醇、 K_2CO_3 和水配制成含 $\omega(K_2CO_3) = 25\%$ 、 $\omega(\text{乙醇}) = 24\%$ 的双水相体系,固液比为 1:50 (g:g)。将混合物分别在 120、230、380、540 和 720 W 下进行微波辅助提取,每个操作功率下,提取 30~150 s,考察微波提取功率和时间对多糖和三萜化合物提取率的影响。

1.8 分析方法

1.8.1 多糖含量测定

采用苯酚硫酸法^[20]。50 mL 浓硫酸与 10 mL 水充分混合后,冷却至室温,加入 0.6 g 苯酚晶体搅拌使其溶解配成显色液。将上、下相萃取液稀释后,取 1 mL 样品加入 5 mL 显色液,摇匀后沸水浴 30 min,迅速冷水冷却至室温后 490 nm 检测多糖含量。

1.8.2 三萜含量测定

以白桦脂醇为标准品,采用香草醛-冰醋酸-高氯

$$\text{菌丝体去除率} = \frac{\text{发酵培养物中菌丝体干重} - \text{上相中菌丝体干重} - \text{下相中菌丝体干重}}{\text{发酵培养物中菌丝体干重}} \times 100 \quad (7)$$

1.8.5 蛋白质去除率的测定

采用考马斯亮蓝法^[22]测定蛋白含量。发酵结束后,发酵培养物经 540 W 微波作用 5 min,冷却至室

$$\text{蛋白质去除率} = \frac{\text{发酵培养物中蛋白质含量} - \text{上相中蛋白质含量} - \text{下相中蛋白质含量}}{\text{发酵培养物中蛋白质含量}} \times 100 \quad (8)$$

1.8.6 统计学分析

实验数据为 3 次平行试验结果,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Excel 2003 分析数据,数据比较采用单因素方差分析 F 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,同组数据图中标注字母相差顺序表示差异显著程度。

2 结果与讨论

2.1 双水相体系的确定

考察不同盐、醇组成的双水相体系中多糖和三萜化合物的分离情况(表 1)。各体系中,多糖主要分配在下相,三萜化合物则富集在含有机溶剂较多的上相。这是由于多糖分子极性较大,水溶性好,而桦褐孔菌三萜化合物主要为四环三萜和五环三萜,其在乙醇等有机溶剂的稀溶液中溶解性较好^[23]。郑维发

酸法检测三萜化合物的含量^[21]。取 0.2 mL 上相萃取液于试管中,蒸干后加入 0.3 mL 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 1 mL 高氯酸,摇匀后置于 60 °C 水浴锅 45 min,然后冰水浴冷却至室温再加入 5 mL 无水乙酸,充分摇匀后在 548 nm 下测吸光值。取 0.4 mL 下相萃取液,加入 2 倍体积甲醇除盐后,取 0.5 mL 于试管中蒸干,测定三萜化合物含量,方法同上相萃取液。

1.8.3 多糖和三萜化合物的提取率

三萜化合物提取率为上相中三萜化合物的质量占总三萜质量的百分比;多糖提取率为下相中多糖的质量占总多糖质量的百分比。

总多糖和总三萜的索氏提取:将 250 mL 锥形瓶的发酵培养物转移至索氏提取器中,100 °C 回流提取 6 h,获得总多糖和水溶三萜。发酵结束后,1776 × g 离心 10 min 分离上清,收集菌丝体转移入索氏提取器,加入 50 mL 异丙醇,90 °C 回流提取 6 h,获得醇溶三萜。总三萜质量为醇溶三萜和水溶三萜的总质量。

1.8.4 菌丝体去除率

发酵结束后,1776 × g 离心 10 min,收集沉淀,60 °C 干燥至恒重,称重,即为发酵液中菌丝体含量。双水相萃取分离后,分别吸取双水相体系中的上、下相液体,获得菌丝体干重,方法同上。

温后,检测发酵培养物中的蛋白质含量。双水相萃取分离后,分别吸取上、下相液体,检测蛋白质含量。

等^[24]利用异丙醇/(NH_4)₂SO₄体系对桦褐孔菌三萜进行超声辅助提取,三萜化合物富集在异丙醇层。4 种无机盐中, Na_2CO_3 对三萜化合物的分离效果最差;除乙醇/(NH_4)₂SO₄体系外,各体系中多糖的回收率均超过 80%;乙醇/ K_2CO_3 体系对多糖和三萜化合物的分离效果最好,其回收率分别为(99.35 ± 0.39)% 和(98.86 ± 0.13)%。异丙醇是桦褐孔菌三萜化合物的常用提取剂,其提取效果优于乙醇和丙醇^[25]。然而,在双水相体系中,物质的分配不仅取决于其在溶剂中的溶解性,还与醇或盐的种类、相对分子质量、离子强度和 pH 等因素有关^[26]。虽然丙醇/ K_2CO_3 体系中,多糖和三萜化合物的回收率与乙醇/ K_2CO_3 相比,相差不大,考虑到乙醇沸点低、易回收,确定乙醇/ K_2CO_3 为分离多糖和三萜化合物的双水相体系。

表1 不同双水相体系中多糖和三萜化合物的回收率

Table 1 Recoveries of polysaccharides and triterpenoids in different aqueous two-phase systems

回收率(R) / %		(NH ₄) ₂ SO ₄	K ₂ CO ₃	Na ₂ CO ₃	K ₂ HPO ₄
乙醇	三萜化合物	86.46 ± 0.33	98.86 ± 0.13	65.38 ± 0.33	92.30 ± 0.47
	多糖	60.54 ± 0.29	99.35 ± 0.39	80.57 ± 0.51	85.93 ± 0.53
丙醇	三萜化合物	92.60 ± 0.46	97.77 ± 0.15	61.28 ± 0.37	96.75 ± 0.27
	多糖	100 ± 0.00	99.80 ± 0.18	92.93 ± 0.38	94.53 ± 0.41
异丙醇	三萜化合物	94.65 ± 0.45	48.57 ± 0.19	74.58 ± 0.26	85.03 ± 0.34
	多糖	100 ± 0.00	91.24 ± 0.43	95.28 ± 0.50	95.67 ± 0.28

2.2 乙醇/K₂CO₃相图

相图(图1)中曲线上方为成相区,在此区域,上相为乙醇富集相,下相为盐富集相。双水相体系中,乙醇含量过高,则相比($V_{上相}:V_{下相}$)大,下相体积小影响水溶性物质的富集;K₂CO₃含量过高,则相比小,上相体积过小不仅影响物质的分配,而且增加了回收无机盐的成本。根据相图和相比,固定双水相体系中K₂CO₃质量分数分别为20%、25%和30%,考察体系中乙醇和K₂CO₃含量变化对多糖和三萜化合物分配的影响。

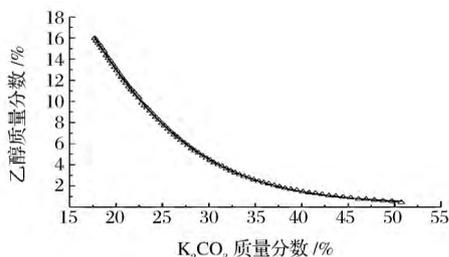
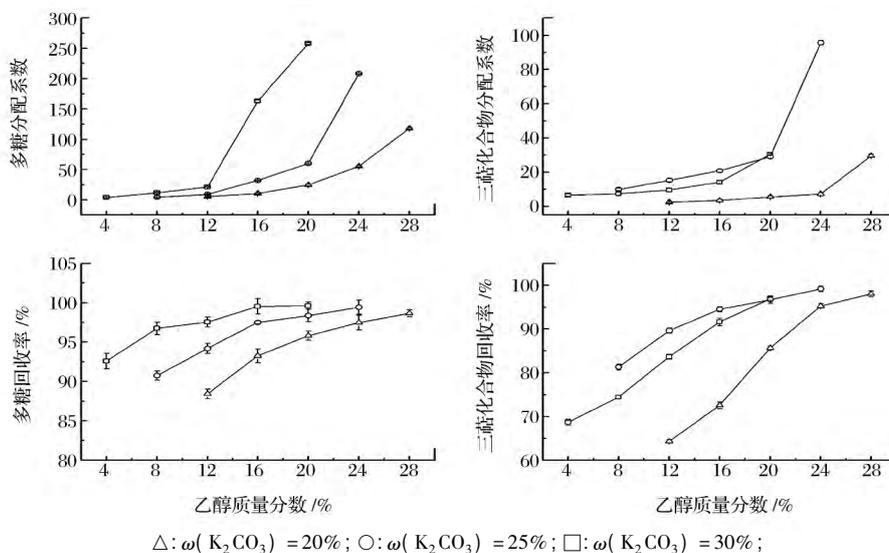


图1 乙醇/K₂CO₃双水相体系的相图

Fig.1 Phase diagram of ethanol/ K₂CO₃

2.3 三萜化合物和多糖在乙醇/K₂CO₃体系中的分配行为

在双水相体系中,盐醇含量的变化引起溶液极性的改变,从而影响溶质的分配。在乙醇/K₂CO₃体系中,高盐或高醇均利于多糖在下相的富集(图2)。固定K₂CO₃含量,随着乙醇含量的增加,多糖的回收率逐渐增加。乙醇的增加,迫使上相水进入下相,导致上相溶液极性降低,下相溶剂极性增大,多糖转移至下相。固定乙醇含量,K₂CO₃含量的增加需要更多水分子参与盐溶解,上相水迁移到下相,上相溶液的极性减小,多糖转移入下相。桦褐孔菌三萜化合物种类繁多,各种成分极性不同,当体系中上、下相溶液的极性变化时,各种三萜成分的分配情况相应改变。固定乙醇含量,当K₂CO₃质量分数由20%增加至25%时,三萜化合物的回收率增加,继续增加K₂CO₃质量分数至30%,三萜化合物的回收率反而下降。三萜化合物在低浓度乙醇中溶解性好,但大量盐迫使上相与乙醇互溶的水分子转移至下相,造成上相中乙醇浓度过高,反而不利于三萜化合物的富集。在固定盐浓度



△: $\omega(K_2CO_3) = 20\%$; ○: $\omega(K_2CO_3) = 25\%$; □: $\omega(K_2CO_3) = 30\%$;

图2 多糖和三萜化合物在乙醇/K₂CO₃体系中的分配行为

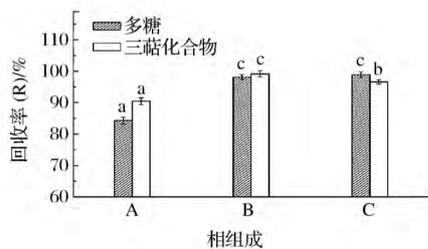
Fig.2 Partition behaviors of polysaccharides and triterpenoids in the system of ethanol/ K₂CO₃

下随着乙醇含量的增加,三萜化合物的回收率逐渐增加。

2.4 微波辅助乙醇/ K_2CO_3 提取

2.4.1 相组成对多糖和三萜化合物提取率的影响

根据分配行为,筛选出多糖和三萜化合物分离效果好的3个体系进行微波辅助提取,考察相组成对提取率的影响。结果表明(图3),当盐含量由20%(w/w)增加至25%(w/w)时,多糖的提取率由(84.28 ± 1.09)%显著增加至(98.17 ± 0.76)%,这是因为,无机盐能够吸收大量的微波能^[16],盐含量越高,提取剂吸收热量越多,分子运动加剧有利于多糖的溶出和溶解。盐含量由25%(w/w)增加至30%(w/w),多糖提取率几乎没有变化,说明多糖已被提取完全。随着盐含量的增加,三萜化合物的提取率先增加后减少。这是因为,起初盐含量增加,分子热运动加剧,促进了菌丝体细胞的裂解和三萜化合物的溶出,继续增加盐浓度,溶剂受热剧烈,高温导致三萜化合物的结构破坏^[3]。当体系相组成为 K_2CO_3 25%(w/w)和乙醇24%(w/w)时,多糖和三萜化合物的综合提取效果最好,因此,确定其为微波辅助提取的最佳相组成。



A: $\omega(K_2CO_3) = 20\%$ $\omega(\text{乙醇}) = 28\%$;

B: $\omega(K_2CO_3) = 25\%$ $\omega(\text{乙醇}) = 24\%$;

C: $\omega(K_2CO_3) = 30\%$ $\omega(\text{乙醇}) = 20\%$

图3 相组成对多糖和三萜化合物提取率的影响

Fig. 3 Effect of phase composition on the yields of polysaccharides and triterpenoids

2.4.2 固液比对多糖和三萜化合物提取率的影响

随着体系中液体质量的增加,多糖的提取率逐渐增加并趋于稳定(图4)。当固液比由1:30变化到1:50时,多糖的提取率由(81.35 ± 1.02)%增加至(97.93 ± 0.75)%,继续增加液体质量至固液比1:60,多糖的提取率没有显著改变。这是由于桦褐孔菌发酵培养物中多糖含量较高,体系中液体含量较少时,多糖组分不能溶解完全,而当固液比为1:50时,多糖组分能够充分溶解。发酵培养物中三萜化合物含量较低,其提取率在固液比为1:30时达到(98.64

± 0.69)%且随液体质量的增加,提取率变化不大。因此,确定1:50为最佳固液比。

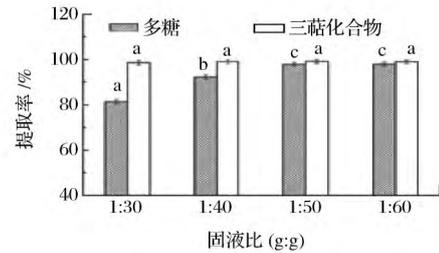


图4 固液比对多糖和三萜化合物提取率的影响

Fig. 4 Effect of the ratio of solid to liquid on the yields of polysaccharides and triterpenoids

2.4.3 微波功率、微波时间对多糖和三萜化合物提取率的影响

如图5和图6所示,当功率低于380 W时,由于有限时间内物料受热不完全,多糖和三萜化合物的提取效果均不理想。在固定功率下,随着提取时间的延长,提取剂温度上升,细胞壁更容易被破坏,有利于有效成分溶出^[27]。当微波功率为540 W时,在120 s多糖(98.34 ± 0.83)%和三萜化合物(99.22 ± 0.68)%的提取率最高,继续延长提取时间至150 s,提取率变化不显著,这表明活性成分已完全溶出。然而,当微波功率为720 W时,在90 s获得最大的多糖和三萜化合物提取率,进一步延长提取时间,提取率反而降低。这是由于:一方面,高功率下,溶剂吸收大量微波能而受热剧烈,导致三萜类组分结构被破坏;另一方面,高热导致溶剂挥发,夹带部分活性成分。三萜组分富集在上相(有机溶剂),提取率降低显著。因在540 W,120 s和720 W,90 s获得的最大提取率相差不大($P > 0.05$),考虑节能,确定微波提取的最佳条件为540 W,120 s。

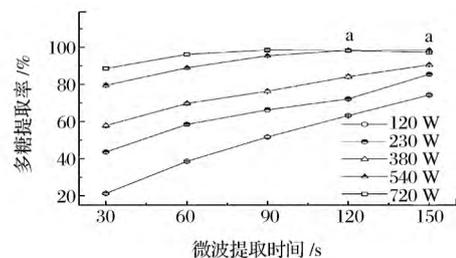


图5 微波提取时间和功率对多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of microwave time and power on the yields of polysaccharides

2.4.4 菌丝体和蛋白质的去除率

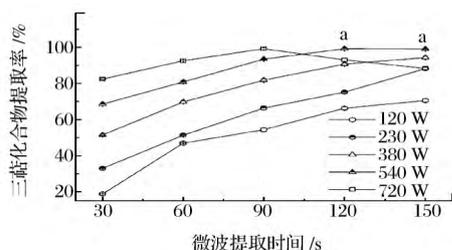


图6 微波提取时间和功率对三萜化合物提取率的影响

Fig. 6 Effect of microwave time and power on the yields of triterpenoids

短链醇/无机盐双水相体系已被广泛的应用于蛋白质的分离纯化^[28]。在乙醇/ K_2CO_3 体系中,大量蛋白质和菌丝体形成沉淀层分配在上、下相的界面,微波辅助提取后,提取液中菌丝体的去除率为100%,蛋白质去除率为 $(94.67 \pm 0.74)\%$ 。

3 结论

利用乙醇/ K_2CO_3 双水相体系对桦褐孔菌发酵培养物中的多糖和三萜化合物进行萃取分离。三萜化合物富集在上相,多糖主要分配在下相,菌丝体和蛋白质形成沉淀层分配在两相界面。最适微波辅助提取条件为:最佳相组成中, K_2CO_3 和乙醇的质量分数分别为20%和25%,固液比为1:50,微波功率540 W,微波时间120 s。此时,多糖提取率达到 $(98.34 \pm 0.83)\%$,三萜化合物提取率达到 $(99.22 \pm 0.68)\%$ 。该方法能够同步有效地分离桦褐孔菌发酵培养物中的多糖和三萜化合物,且其蛋白质和菌丝体的去除效果好,具有一定的工业应用前景。

参 考 文 献

[1] 戴玉成,李玉. 中国六种重要药用真菌名称的说明[J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 515-518.
 [2] ZHENG Wei-fa, ZHANG Mei-mei, ZHAO Yan-xia, et al. Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus* [J]. Bioresource Technol, 100(3): 1327-1337.
 [3] 戚月婷, 玄光善. 桦褐孔菌总三萜提取工艺的研究[J]. 应用化工, 2015, 44(5): 924-932.
 [4] HU Tao, LIU Ping, NI Yuan-ying, et al. Isolation, purification and effects of hypoglycemic functional polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. Afr J Biotechnol, 2014, 11(30): 7738-7743.
 [5] DIAO Bao-zhong, JIN Wei-rong, YU Xue-jing. Protective effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* on strepto-

zotocin-induced diabetic symptoms and their potential mechanisms in rats [J]. Evid-based Compl Alt Medicine, 2014, 2014(2014): 1-5.
 [6] MA Li-shuai, CHEN Hai-xia, ZHU Wen-chai, et al. Effect of different drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides extracted from mushroom *Inonotus obliquus* [J]. Food Res Int, 2013, 50(2): 633-640.
 [7] MA Li-shuai, CHEN Hai-xia, DONG Peng, et al. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus* [J]. Food Chem, 2013, 139(1-4): 503-508.
 [8] CHEN Yi-rong, HUANG You-ru, CUI Zhu-mei, et al. Purification, characterization and biological activity of a novel polysaccharide from *Inonotus obliquus* [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 79: 587-594.
 [9] 回晶, 郭立雄, 张冬梅, 等. 桦褐孔菌菌丝体与子实体蛋白质营养价值评价[J]. 食用菌学报, 2009, 15(4): 67-69.
 [10] 班立桐, 韦东胜, 王悦. 三种稀有真菌的营养价值及开发前景[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(9): 182-184.
 [11] CHEN Yi-yong, GU Xiao-hong, HUANG Sheng-quan, et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities [J]. Int J Biol Macromol, 2010, 46(4): 429-435.
 [12] FU Ling-ling, CHEN Hai-xia, DONG Peng, et al. Effects of ultrasonic treatment on the physicochemical properties and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from mushroom *Inonotus obliquus* [J]. J Food Sci, 2010, 75(4): C322-C327.
 [13] 殷涌光, 崔彦如, 王婷. 高压脉冲电场提取桦褐孔菌多糖的试验[J]. 农业机械学报, 2008, 39(2): 89-92.
 [14] 胡涛, 解洛香, 徐乐, 等. 超声波辅助提取桦褐孔菌子实体中的多糖和三萜[J]. 食品科技, 2012, 37(2): 213-217.
 [15] WANG Hui, DONG Yue-sheng, XIU Zhi-long. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of piceid, resveratrol and emodin from *Polygonum cuspidatum* by ethanol/ammonium sulphate systems [J]. Biotechnol Lett, 2008, 30(12): 2079-2084.
 [16] 刘琳, 董悦生, 修志龙. 微波辅助双水相提取盾叶薯蓣中的皂苷成分[J]. 过程工程学报, 2009, 9(6): 1147-1152.
 [17] MA Fei-yue, GU Cheng-bo, Li Chun-ying, et al. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of isoflavonoids from *Dalbergia odorifera* T. Chen leaves [J]. Sep

- Purif Technol 2013 ,115: 136 – 144.
- [18] ZHANG Dong-yang ,ZU Yuan-gang ,FU Yu-jie ,et al. Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity [J]. Sep Purif Technol 2013 ,102: 26 – 33.
- [19] 杨善升 ,陆文聪 ,包伯荣. 双水相萃取技术及应用 [J]. 化学工程师 2004 ,103(4) : 37 – 38.
- [20] 徐光域 ,颜军 ,郭晓强 ,等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用 [J]. 食品科学 2005 26(8) : 342 – 346.
- [21] FAN Jie-ping ,HE Chao-hong. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method [J]. J Pharmaceut Biomed ,2006 ,41 (3) : 950 – 956.
- [22] SEDMAK J J ,GROSSBERG S E. A rapid ,sensitive ,and versatile assay for protein using *Coomassie brilliant blue* G250 [J]. Anal Biochem ,1977 ,79(1) : 544 – 552.
- [23] 向超. 液体深层发酵培养的桦褐孔菌三萜化合物的生物合成研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学 2011: 13.
- [24] 赵艳霞 ,刘峰 ,魏娟娟 ,等. 双水相超声法提取桦褐孔菌三萜 [J]. 菌物学报 2014 ,33(1) : 129 – 137.
- [25] 潘春丽 ,查勇 ,张鑫 ,等. 桦褐孔菌三萜化合物提取工艺的优选 [J]. 生物加工过程 2008 6(4) : 36 – 39.
- [26] 王志华 ,马会民 ,马泉莉 ,等. 双水相萃取体系的研究 [J]. 应用化学 2001 3(3) : 173 – 175.
- [27] QU Xue-jin ,FU Yu-jie ,LUO Meng ,et al. Acidic pH based microwave-assisted aqueous extraction of seed oil from yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) [J]. Ind Crop Prod 2013 ,43: 420 – 426.
- [28] LOUWRIER A. Model phase separations of proteins using aqueous/ethanol components [J]. Biotechnol Tech ,1998 ,12(5) : 363 – 165.

Microwave-assisted aqueous two-phase system extraction of triterpenoids and polysaccharides in *Inonotus obliquus* fermentation broth

LIU Lin¹ , SONG Li-min^{2*}

1 (Shandong Province Key Laboratory of Applied Mycology , College of Life Sciences , Qingdao Agricultural University , Qingdao 266109 , China)

2 (The Key Laboratory of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province , College of Agronomy and Plant Protection , Qingdao Agricultural University , Qingdao 266109 , China)

ABSTRACT Microwave-assisted aqueous two-phase extraction technology was applied to the extraction and separation of the triterpenoids and polysaccharides in the fermentation broth of *Inonotus obliquus*. The system of ethanol/ K_2CO_3 was selected , and the distribution behaviors of the triterpenoids and polysaccharides were studied by investigating partition coefficient and recovery rate. Taking ethanol/ K_2CO_3 as extract reagent , microwave assisted extraction was optimized. The optimal extraction conditions were as follows: the phase composition was K_2CO_3 and ethanol with mass fraction of 25% and 24% respectively , the ratio of solid to liquid was 1: 50 , microwave power was 540 W , microwave time was 120 s. Herein the yields of triterpenoids and polysaccharides were (99. 22 ± 0. 68) % and (98. 34 ± 0. 83) % , respectively. The removal ratio of protein and mycelia were (94. 67 ± 0. 74) % and 100% , respectively. The extraction and separation of the triterpenoids and polysaccharides were integrated into one step using this method to realize the removal of protein and mycelia simultaneously. This was beneficial to the following purification operation.

Key words aqueous two-phase system of ethanol/ K_2CO_3 ; *Inonotus obliquus*; triterpenoid; polysaccharide; microwave-assisted extraction