

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102219866 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 19

(21) 申请号 201110161167. 2

(22) 申请日 2011. 06. 15

(71) 申请人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市下城区朝晖六区
潮王路 18 号

(72) 发明人 邵平 姜慧燕 林炳谊 孙培龙

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

代理人 黄美娟 王兵

(51) Int. Cl.

C08B 37/00 (2006. 01)

C12S 3/02 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种从灵芝子实体中提取分离灵芝多糖的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种从灵芝子实体中提取分离灵芝多糖的方法:灵芝子实体粉用复合酶进行酶解提取得酶解液,所得酶解液经切向流过滤膜浓缩分离得超滤截留液、所得超滤截留液通过径向流色谱用纯水洗脱分离纯化得多糖洗脱液、所得多糖洗脱液减压浓缩、干燥制得灵芝多糖;所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶质量比 1 : 2 ~ 4 : 1 的混合。本发明建立了一套从原料到产品的灵芝子实体多糖生产工艺,该工艺环保、快速、高效,并且适用于大规模生产,可大幅度降低精制灵芝多糖的工艺成本。

1. 一种从灵芝子实体中提取分离灵芝多糖的方法,其特征在于所述方法为:灵芝子实体粉用复合酶进行酶解提取得酶解液,所得酶解液经切向流过滤膜浓缩分离得超滤截留液、所得超滤截留液通过径向流色谱用纯水洗脱分离纯化得多糖洗脱液、所得多糖洗脱液减压浓缩、干燥制得灵芝多糖;所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶质量比 1 : 2 ~ 4 : 1 的混合。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述灵芝子实体粉用复合酶进行酶解提取按如下步骤进行:拣选破碎后过 100 目筛网的灵芝子实体,得灵芝子实体粉末,加入质量为灵芝子实体粉末 10 ~ 30 倍的水中,调 pH 值为 4.5-7,加入复合酶,搅拌下进行酶解提取,酶解条件为:酶解温度为 40℃ -65℃,酶解时间为 1h-3h,复合酶的加入量为灵芝子实体粉末质量的 1% -5%,所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶质量比 1 : 2 ~ 4 : 1 的混合;酶解提取结束后离心分离,取上清液即得酶解液;所述木瓜蛋白酶的酶活单位为 80-100 万 U/g,所述纤维素酶的酶活单位为 5-10 万 U/g。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述酶解液经切向流过滤膜浓缩分离按如下步骤进行:酶解液进入切向流过滤系统,选用截留分子量为 10 万道尔顿-100 万道尔顿的超滤膜,压力为 0 ~ 30psi,室温,酶解液的体积流量为 125-700mL/min,浓缩倍数为 10-20 倍,得超滤截留液。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述超滤截留液通过径向流色谱用纯水洗脱分离纯化按如下步骤进行:超滤截留液加入径向流色谱柱中采用弱碱性阴离子交换树脂填充径向流色谱柱,用纯水洗脱,分离纯化得多糖洗脱液。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述方法包括以下步骤:

(1) 拣选破碎后过 100 目筛网的灵芝子实体,得灵芝子实体粉末,加入质量为灵芝子实体粉末 10 ~ 30 倍的水中,调 pH 值为 4.5-7,加入复合酶,搅拌下进行酶解提取,酶解条件为:酶解温度为 40℃ -65℃,酶解时间为 1h-3h,复合酶的加入量为灵芝子实体粉末质量的 1% -5%,所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶质量比 1 : 2 ~ 4 : 1 的混合;酶解提取结束后离心分离,取上清液即得酶解液;所述木瓜蛋白酶的酶活单位为 80-100 万 U/g,所述纤维素酶的酶活单位为 5-10 万 U/g;

(2) 步骤 (1) 得到的酶解液进入切向流过滤系统,选用截留分子量为 10 万道尔顿-100 万道尔顿的超滤膜,压力为 0 ~ 30psi,室温,酶解液的体积流量为 125-700mL/min,浓缩倍数为 10-20 倍,得超滤截留液;

(3) 步骤 (2) 得到的超滤截留液加入径向流色谱柱中进行分离纯化,得多糖洗脱液;采用弱碱性阴离子交换树脂填充径向流色谱柱,用纯水洗脱,上样量为 30-120mL,上样流速为 1mL/min-10mL/min,纯水洗脱流速为 20mL/min-70mL/min;所述弱碱性阴离子交换树脂为 A103S 阴离子树脂、A100 阴离子树脂或 A105 阴离子树脂;

(4) 步骤 (3) 所得多糖洗脱液在 40 ~ 90℃ 范围内浓缩 5-15 倍,所得浓缩液经冷冻干燥制得灵芝多糖。

一种从灵芝子实体中提取分离灵芝多糖的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种从灵芝子实体中提取分离灵芝多糖的方法。

背景技术

[0002] 现代药理学与临床实践证实灵芝多糖是灵芝扶正固本、滋补强壮、延年益寿的主要成份。灵芝多糖具有刺激宿主非特异抗性、免疫特异反应以及抑制移植肿瘤生理活性等特性,能提高机体免疫力,耐缺氧能力,市场需求越来越大。

[0003] 传统的灵芝多糖提取方法是:灵芝子实体粉碎-水提/酸碱提取-酒精沉淀-烘干,其易于大规模生产,但得到的多糖杂质多,有效成分含量低,技术含量很低,尤其是酸碱提取法虽能提高提取率,但对设备要求高并易破坏多糖结构,同时还会造成环境污染;灵芝多糖的脱色方法以活性炭吸附以及氧化脱色为主,但这两种方法多糖损失率比较大;脱除灵芝粗多糖蛋白质大多使用 Savag 法,而该方法不仅使用大量有机溶剂,存在较大毒性,而且操作复杂,成本较高,不适合规模化。

[0004] 对于现代生物技术产品,分离是生物工程产品生产中的基本技术环节,分离成本可占产品总成本的 70%~90%。在灵芝多糖的分离纯化环节,采用离子树脂来处理灵芝粗多糖能够进行有效分离纯化,但由于离子柱为轴向柱,在规模化放大生产中具有比较大的困难。径向流色谱法(Radial Flow Chromatography, RFC)是近十年来发展起来的一种新型的色谱分离分析技术,与轴向色谱相比,具有操作压力低、流速高、线性放大容易及处理量大等突出优势。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种分离纯化灵芝子实体多糖的方法,它具有环保、高效、易于规模化生产的优点。本发明不仅在制备过程中最大限度的保留了灵芝多糖的活性,未使用任何有机溶剂,而且可以实现灵芝多糖快速、高效的规模化制备。

[0006] 本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种从灵芝子实体中提取分离灵芝多糖的方法,所述方法为:灵芝子实体粉用复合酶进行酶解提取得酶解液,所得酶解液经切向流过滤膜浓缩分离得超滤截留液、所得超滤截留液通过径向流色谱用纯水洗脱分离纯化得多糖洗脱液、所得多糖洗脱液减压浓缩、干燥制得灵芝多糖;所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶质量比 1:2~4:1 的混合。

[0008] 所述灵芝子实体粉用复合酶进行酶解提取可按如下步骤进行:拣选破碎后过 100 目筛网的灵芝子实体,得灵芝子实体粉末,加入质量为灵芝子实体粉末 10~30 倍的水中,调 pH 值为 4.5~7,加入复合酶,搅拌下进行酶解提取,酶解条件为:酶解温度为 40℃~65℃,酶解时间为 1h~3h,复合酶的加入量为灵芝子实体粉末质量的 1%~5%,所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶质量比 1:2~4:1 的混合;酶解提取结束后离心分离,取上清液即得酶解液;所述木瓜蛋白酶的酶活单位为 80~100 万 U/g,所述纤维素酶的酶活单位为 5~10 万 U/g。

[0009] 所述离心分离通常在 4000rpm 转速下离心 10 ~ 15 分钟。

[0010] 所述调 pH 值通常用碱性溶液,如氢氧化钠溶液、饱和氢氧化钙溶液等。

[0011] 所用复合酶中的木瓜蛋白酶或纤维素酶均可采用市购商品酶,木瓜蛋白酶的作用是水解杂蛋白,纤维素酶的作用是解离细胞壁,便于多糖溶出。

[0012] 所述酶解液经切向流过滤膜浓缩分离按如下步骤进行:酶解液进入切向流过滤系统,选用截留分子量为 10 万道尔顿-100 万道尔顿的超滤膜,压力为 0 ~ 30psi,室温,酶解液的体积流量为 125-700mL/min,浓缩倍数为 10-20 倍,得超滤截留液。通过切向流过滤,可去除酶解液中大量蛋白质,同时脱除酶解液中的游离色素。

[0013] 所述切向流过滤系统是常用的分离纯化大分子生物活性物质的过滤系统,与常规过滤方式不同,待过滤液体的流向与滤膜切向平行,是制药工艺中已经被广泛采用的一种过滤操作方式。所使用的系统均可商购获得,本领域人员公知其使用方法。本发明实施例中采用的切向流过滤系统是 Congent M,美国密理博公司。

[0014] 所述超滤截留液通过径向流色谱用纯水洗脱分离纯化按如下步骤进行:超滤截留液加入径向流色谱柱中,采用弱碱性阴离子交换树脂填充径向流色谱柱,用纯水洗脱,分离纯化得多糖洗脱液。超滤截留液通过径向流色谱后脱除绝大部分蛋白质以及色素。

[0015] 所述径向流色谱与专利申请 200810163568 一种径向流色谱脱除粗多糖中蛋白质的方法采用的是相同的方法,径向流色谱分离方法采用径向流动特殊设计,与传统的轴向色谱相比,该方法具有流速高、操作压力低、线性放大容易及样品处理量大等突出优势,所使用的径向流色谱柱可通过商购获得,使用方法也是公知的。

[0016] 进一步,本发明所述方法优选按以下步骤进行:

[0017] (1) 拣选破碎后过 100 目筛网的灵芝子实体,得灵芝子实体粉末,加入质量为灵芝子实体粉末 10 ~ 30 倍的水中,调 pH 值为 4.5-7,加入复合酶,搅拌下进行酶解提取,酶解条件为:酶解温度为 40℃-65℃,酶解时间为 1h-3h,复合酶的加入量为灵芝子实体粉末质量的 1%-5%,所述复合酶为木瓜蛋白酶和纤维素酶质量比 1 : 2 ~ 4 : 1 的混合;酶解提取结束后离心分离,取上清液即得酶解液;所述木瓜蛋白酶的酶活单位为 80-100 万 U/g,所述纤维素酶的酶活单位为 5-10 万 U/g;

[0018] (2) 步骤 (1) 得到的酶解液进入切向流过滤系统,选用截留分子量为 10 万道尔顿-100 万道尔顿的超滤膜,压力为 0 ~ 30psi,室温,酶解液的体积流量为 125-700mL/min,浓缩倍数为 10-20 倍,得超滤截留液;所得超滤截留液的浓度通常为 2mg/mL-12mg/mL;

[0019] (3) 步骤 (2) 得到的超滤截留液加入径向流色谱柱中进行分离纯化,得多糖洗脱液;采用弱碱性阴离子交换树脂填充径向流色谱柱,用纯水洗脱,上样量为 30-120mL,上样流速为 1mL/min-10mL/min,纯水洗脱流速为 20mL/min-70mL/min;所述弱碱性阴离子交换树脂为 A103S 阴离子树脂、A100 阴离子树脂或 A105 阴离子树脂;

[0020] (4) 步骤 (3) 所得多糖洗脱液在 40 ~ 90℃ 范围内浓缩 5-15 倍,所得浓缩液冷冻干燥制得灵芝多糖。

[0021] 本发明的优点是:

[0022] 1、建立了一套从原料到产品的灵芝子实体多糖生产工艺,该工艺具有环保、快速、高效的特点,并且适用于大规模生产,可大幅度降低精制灵芝多糖的工艺成本。

[0023] 2、彻底摆脱了传统灵芝多糖的生产工艺,并不涉及醇沉、有机溶剂脱蛋白、单元脱

色等高耗能、耗材料的过程,在降低成本的同时快速高效地制备灵芝多糖。

[0024] 3、采用复合酶解法提取灵芝子实体多糖,一方面通过降解植物细胞壁使有效成分更易提取从而达到提高提取率或降低溶剂消耗量的目的;另一方面可以针对其中的大多数杂质(淀粉、果胶、蛋白质等)选择性降解,以更利于后续分离纯化的进行;同传统水提法以及超声、微波等提取方法相比,能够大幅度地提高多糖得率,同时提取工艺条件温和,节能降耗。

[0025] 4、采用切向流过滤膜浓缩酶解液具有不损害活性、分离效率高、能耗低、设备简单、可连续生产、无污染等优点;能够在对灵芝子实体多糖进行浓缩纯化的同时筛选不同分子量的多糖,富集有活性的多糖;采用切向流过滤浓缩酶解液所需时间仅为旋转蒸发的1/6。

[0026] 5、采用径向流色谱对膜截留液进行分离纯化可以极大地提高产量和速度,也能够确保灵芝多糖的活性;同时由于径向流色谱具有线性放大的特性,可通过小试建立色谱条件,直接进行放大生产。

附图说明

[0027] 图1从灵芝子实体中提取分离灵芝多糖的工艺流程图

[0028] 图2不同方法提取灵芝子多糖得率比较图

具体实施方式

[0029] 下面以具体实施例来对本发明做进一步说明,但本发明的保护范围不限于此。

[0030] 实施例1:

[0031] (1) 复合酶解提取灵芝子实体多糖:拣选破碎后过100目筛网的灵芝子实体,取50.0g灵芝子实体粉末,加入1000g的水中,用饱和氢氧化钙溶液调节溶液pH至6.8,加入1.5g复合酶,复合酶为木瓜蛋白酶(上海蓝季科技发展有限公司,100万U/g)与纤维素酶(张家港金源生物化工有限公司,8万U/g)质量比2:1的混合,放置于55℃恒温水浴锅,进行匀速搅拌2h,4000rpm离心10分钟,取上清液即得酶解液;

[0032] (2) 切向流超滤膜浓缩酶解液:酶解液进入切向流过滤系统(Congent M,美国密理博公司),选取分子量为100万道尔顿的超滤膜,酶解液体积流速为500mL/min,室温25℃,压力为23-26psi,浓缩至17倍,得超滤截留液;

[0033] (3) 径向流色谱分离纯化截留液:超滤截留液加入径向流色谱柱中,径向流色谱柱型号为Superflo-250Column,填料为弱碱性阴离子A103S,进样量为100mL,进样流速为2mL/min,用纯水洗脱,洗脱流速为50mL/min,得多糖洗脱液;

[0034] (4) 减压浓缩多糖洗脱液,在50℃下浓缩8倍,所得浓缩液冷冻干燥得灵芝多糖产品0.88g,其中多糖含量为85%,总糖含量98%。

[0035] 酶解得率为3.10%,制备所得灵芝多糖洗脱液中多糖含量为80.7%,蛋白含量为0.76%,与酶解液相比计算得到蛋白脱除率为99.24%。多糖洗脱液与超滤截留液相比,径向流过程中的多糖回收率为89.52%。

[0036] 对步骤(1)所得酶解液,步骤(2)所得超滤截留液,步骤(3)所得多糖洗脱液分别用苯酚硫酸法检测总糖含量、DNS法测定还原糖含量、Folin-酚法测定蛋白含量,所得数据

如下表 1。

[0037] 表 1 不同工艺阶段灵芝多糖的比较

		总糖含量		
		/ %	多糖含量 / %	蛋白含量 / %
[0038]	酶解液（冻干）	71.82	40.81	22.33
	超滤截留液	85.34	65.92	10.11
	多糖洗脱液	96.67	80.76	0.76

[0039] 实施例 2：

[0040] （1）复合酶解提取灵芝子实体多糖：拣选破碎后过 100 目筛网的灵芝子实体，取 50.0g 灵芝子实体粉末，加入 500g 的水中，用饱和氢氧化钙溶液调节溶液 pH 至 6.0，加入 1.2g 复合酶，复合酶为木瓜蛋白酶（上海蓝季科技发展有限公司，100 万 U/g）与纤维素酶（张家港金源生物化工有限公司，8 万 U/g）质量比 1：1 的混合，放置于 40℃恒温水浴锅，进行匀速搅拌 1h，4000rpm 离心 12 分钟，取上清液即得酶解液；

[0041] （2）切向流超滤膜浓缩酶解液：酶解液进入切向流过滤系统，选取分子量为 10 万道尔顿的超滤膜，酶解液体积流速为 700mL/min，室温 25℃，压力为 28psi，浓缩至 10 倍，得超滤截留液；

[0042] （3）径向流色谱分离纯化截留液：超滤截留液加入径向流色谱柱中，径向流色谱柱型号为 Superflo-250Column，填料为弱碱性阴离子 A103S，进样量为 120mL，进样流速为 5mL/min，用纯水洗脱，洗脱流速为 40mL/min，得多糖洗脱液；

[0043] （4）减压浓缩多糖洗脱液，在 55℃下浓缩 10 倍，所得浓缩液冷冻干燥得灵芝多糖产品 0.91g，其中多糖含量为 82%，总糖含量 96%。

[0044] 酶解得率为 3.02%，制备所得灵芝多糖洗脱液中多糖含量为 78.1%，蛋白含量为 0.62%。

[0045] 实施例 3

[0046] （1）复合酶解提取灵芝子实体多糖：拣选破碎后过 100 目筛网的灵芝子实体，取 50.0g 灵芝子实体粉末，加入 1500g 的水中，用饱和氢氧化钙溶液调节溶液 pH 至 4.5，加入 0.5g 复合酶，复合酶为木瓜蛋白酶（上海蓝季科技发展有限公司，100 万 U/g）与纤维素酶（张家港金源生物化工有限公司，8 万 U/g）质量比 4：1 的混合，放置于 65℃恒温水浴锅，进行匀速搅拌 3h，4000rpm 离心 12 分钟，取上清液即得酶解液；

[0047] （2）切向流超滤膜浓缩酶解液：酶解液进入切向流过滤系统，选取分子量为 30 万道尔顿的超滤膜，酶解液体积流速为 400mL/min，室温 25℃，压力为 26psi，浓缩至 20 倍，得超滤截留液；

[0048] （3）径向流色谱分离纯化截留液：超滤截留液加入径向流色谱柱中，径向流色谱柱型号为 Superflo-250Column，填料为弱碱性阴离子 A103S，进样量为 50mL，进样流速为 1mL/min，用纯水洗脱，洗脱流速为 70mL/min，得多糖洗脱液；

[0049] （4）减压浓缩多糖洗脱液，在 60 摄氏度下浓缩 15 倍，所得浓缩液冷冻干燥得灵芝

多糖产品 1.2g,其中多糖含量为 83%,总糖含量 96%。

[0050] 酶解得率为 2.85%,制备所得灵芝多糖洗脱液中的多糖含量为 72.1%,蛋白含量为 2.8%。

[0051] 比较例 1:沸水回流提取多糖方法:称取 20g 过 100 目筛网的灵芝子实体粉末,按料液比 1 : 20 加入 400mL 蒸馏水,沸水回流提取 1.5h,所得提取液 380mL,检测其多糖得率 2.07%,见图 2。

[0052] 比较例 2:超声提取多糖方法:称取 20g 过 100 目筛网的灵芝子实体粉末,按料液比 1 : 20 加入 400mL 蒸馏水,超声功率为 800W,脉冲 8s,提取 1h,所得提取液 385mL,检测其多糖得率为 2.61%,见图 2。

[0053] 比较例 3:微波提取多糖方法:称取 20g 过 100 目筛网的灵芝子实体粉末,按料液比 1 : 20 加入 400mL 蒸馏水,微波功率为 800W,提取温度为 90℃,提取 1.5h,所得提取液 375mL,检测其多糖得率为 2.54%,见图 2。

[0054] 比较例 4:木瓜蛋白酶提取方法:称取 20g 过 100 目筛网的灵芝子实体粉末,按料液比 1 : 20 加入 400mL 蒸馏水,加酶量为 3%,酶解温度为 55℃,酶解时间为 1.5h, pH 为 5.7,所得酶解液 390mL,检测其多糖得率为 2.05%,见图 2。

[0055] 比较例 5:纤维素酶提取方法:称取 20g 过 100 目筛网的灵芝子实体粉末,按料液比 1 : 20 加入 400mL 蒸馏水,加酶量为 3%,酶解温度为 55℃,酶解时间为 1.5h, pH 为 4.8,所得酶解液 380mL,检测其多糖得率为 1.88%,见图 2。

[0056] 比较例 6:复合酶解法:称取 20g 过 100 目筛网的灵芝子实体粉末,按料液比 1 : 20 加入 400mL 蒸馏水,加入复合酶,加酶量为 3%,复合酶中木瓜蛋白酶:纤维素酶=2 : 1(质量比),酶解温度为 55℃,酶解时间为 1.5h, pH 为 6.8,所得酶解液 380mL,检测其多糖得率为 3.15%,见图 2。

[0057] 比较例 7(径向流色谱)

[0058] 按照实施例 1 的步骤 (1) 操作得到酶解液,

[0059] 将所得酶解液进行径向流色谱分离纯化,条件为:酶解液加入径向流色谱柱中,径向流色谱柱型号为 Superflo-250Column,填料为弱碱性阴离子 A103S,进样量为 100mL,进样流速为 2mL/min,用纯水洗脱,洗脱流速为 50mL/min,得多糖洗脱液;蛋白脱除率为 80.59%,多糖回收率为 89.21%,见表 2。

[0060] 比较例 8

[0061] Sevag 法脱蛋白

[0062] Sevag 试剂:氯仿-正丁醇配制成体积比为 4 : 1 的混合液;

[0063] 按照实施例 1 的步骤 (1)、(2) 操作得到超滤截留液,取 50mL 超滤截留液与 Sevag 试剂以体积比 3 : 1 混合,分液漏斗中充分振荡 30min,静置 3h,取上层多糖溶液测定蛋白质和多糖含量,计算其蛋白脱除率和多糖回收率,如表 2 所示。

[0064] 表 2 不同方法脱除灵芝多糖蛋白质试验结果对比

	方法	蛋白脱除率	多糖回收率
[0065]	实施例1（切向流耦合径向流）	99.24%	89.52%
	比较例7：径向流色谱	80.59%	89.21%
	比较例8：化学方法 (Sevag法)	42.40%	58.68%

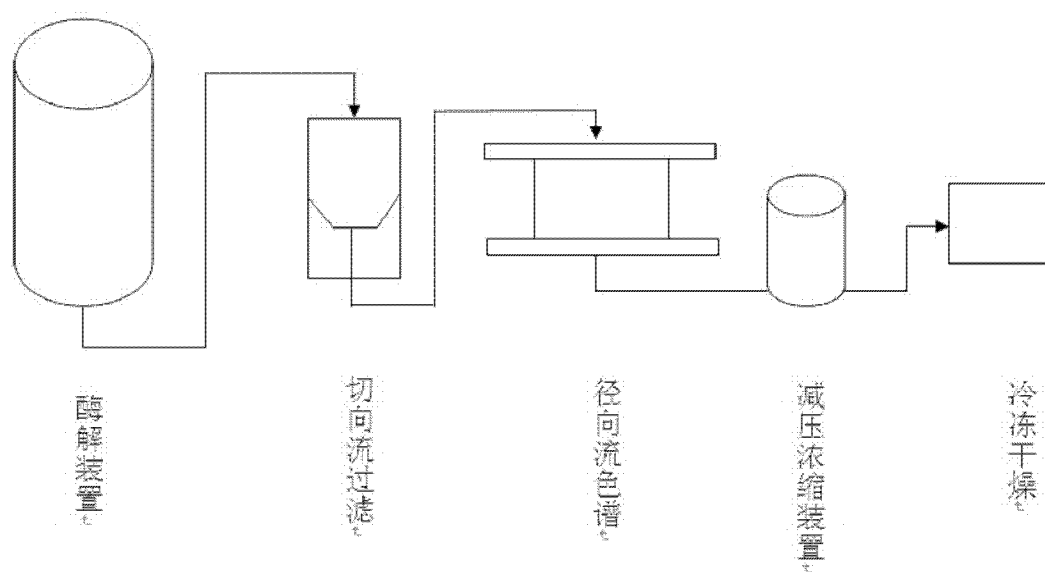


图 1

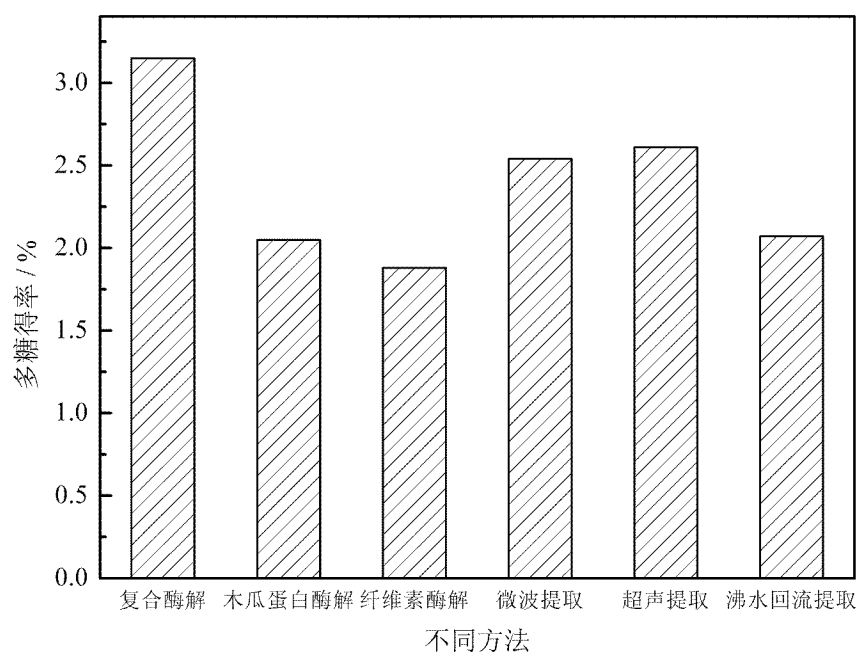


图 2