



(21) 申请号 201910495656.8

(22) 申请日 2019.06.10

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110272932 A

(43) 申请公布日 2019.09.24

(73) 专利权人 开平健之源保健食品有限公司  
地址 529328 广东省江门市开平水口镇三元路138号

(72) 发明人 许克勇 周健平 周敬豪 谭毅峰  
胡燕燕 许为民

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205  
专利代理师 黄琳娟

(51) Int. Cl.  
C12P 21/06 (2006.01)  
C07K 1/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107007634 A, 2017.08.04

CN 101081239 A, 2007.12.05

CN 101108196 A, 2008.01.23

US 2018125879 A1, 2018.05.10

CN 106834403 A, 2017.06.13

刘政等. 灵芝多糖肽的制备.《黑龙江农业科学》.2010, (第10期), 第138页1.2.2灵芝多糖肽提取工艺流程.

周亚杰等.“灵芝孢子粉多糖研究进展”.《中草药》.2018, 第49卷(第21期), 第5206页2.5超声波协同纤维素酶提取法和第5206页2.6超微粉碎技术.

熊先锋等.“超声波酶法提取水溶性灵芝多糖的研究”.《山东轻工业学院学报》.2012, 第26卷(第2期), 第20页1.1.2主要试剂、1.2.1超声波酶法提取灵芝多糖的工艺路线、第20页1.2.5酶提取工艺条件的优化和表1.

审查员 杨莽嘉

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法。本发明的灵芝孢子粉多糖肽的制备方法包括对灵芝孢子粉进行破壁处理、采用超临界二氧化碳进行萃取、对脱脂破壁灵芝孢子粉进行酶解、对酶解液进行提取过滤以及浓缩、干燥、粉碎过筛工序。本发明的工序更简便,绿色安全,便于工业化生产;处理时间缩短,防止处理时间过长灵芝功效成分变性失活;酶解使用的酶不会破坏糖肽结构、容易过滤;未使用有机溶剂,能够避免有机溶剂残留问题。另外,通过本发明的方法,糖肽得率能达到9.50%,样品的灵芝孢子粉多糖肽含量为36.11%。

1. 一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 破壁:对灵芝孢子粉进行低温物理破壁处理,使破壁率达到95%以上;

(2) 脱脂:将破壁后的灵芝孢子粉放入超临界二氧化碳萃取装置中进行萃取,然后进行两次分离,收集油脂和脱脂破壁灵芝孢子粉;

(3) 酶解:将脱脂破壁灵芝孢子粉与纯净水混合,加碱溶液调节pH至7.0-8.5,然后加入酶进行酶解;

(4) 提取过滤:搅拌条件下将酶解液升温至90-100℃并保温1-2h,得到提取液,然后分离,收集澄清滤液;

(5) 浓缩:将滤液浓缩至固形物含量35-55%的浸膏;

(6) 干燥:真空干燥浸膏;

(7) 粉碎过筛:粉碎后过60-80目筛网,得到灵芝孢子粉多糖肽粉末;

其中,所述低温物理破壁采用振动式超微粉碎机进行,破壁温度为3-5℃,破壁时间为25-35min;

所述萃取装置的泵频为25-30Hz,超临界二氧化碳的流量 $\geq 120\text{L/h}$ ,萃取压力为18-25MPa,萃取温度为40-50℃,萃取时间为4-5小时;

所述两次分离的一级分离压力为8-10MPa,分离温度为40-50℃;二级分离压力为5-6MPa,分离温度为28-35℃;

所述酶为纤维素酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶中的一种或多种;所述酶的加入量为脱脂破壁灵芝孢子粉重量的0.1-2%,所述酶解的温度为40-55℃,酶解的时间为4-6h;

所述酶解期间进行超声处理,超声处理的频率为20-40KHz,时间为4-6h;

步骤(4)中得到提取液后,通过板框过滤机过滤,滤液回流至澄清后再收集或使用离心机在4000rpm-6000rpm转速将提取液中的渣料和液体分离,收集澄清滤液;

所述浓缩采用双效真空节能浓缩设备进行;双效真空节能浓缩设备的一效真空度为-0.06Mpa,温度为70-80℃;二效真空度为-0.08MPa,温度为50-60℃。

2. 根据权利要求1所述的灵芝孢子粉多糖肽的制备方法,其特征在于,所述碱溶液为氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙和氨水中的一种。

## 一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法。

### 背景技术

[0002] 灵芝是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌,作为传统药食用珍稀中药已有悠久历史。孢子粉是灵芝子实体发育成熟后,不断从菌管中弹射出的孢子,生物学上称为担孢子,集中起来后呈粉末状,称为灵芝孢子粉。孢子粉汇集了灵芝的精华部分,具有比灵芝更丰富的三萜、多糖、腺嘌呤核苷、蛋白质、酶类、硒元素等成分。大量的研究表明,灵芝孢子粉具有增强机体免疫力、抑制肿瘤、降血糖、降血脂、护肝、抗病毒、抗辐射等多种药理作用。灵芝孢子具有双壁结构,被坚硬的几丁质纤维素包围,质地坚硬,耐酸碱,阻碍了人体对其有效成分的吸收利用。为了充分利用灵芝孢子粉内的有效成分,必需对孢子粉进行破壁,以便于对其有效成分的利用。

[0003] 灵芝的多种药理活性大多都和灵芝多糖肽有重大关系。灵芝多糖肽是一种糖蛋白,是多糖与蛋白质的结合体,由双糖的重复单元组成,一般含有很高比例的多糖。目前的研究表明,灵芝多糖肽有广泛的药理活性,能改善人体的免疫力,提高机体的耐缺氧能力,消除体内自由基,抑制肿瘤细胞生成,抗辐射,提高肝脏、骨髓、血液合成DNA、RNA和蛋白质能力,起到延缓衰老、延长寿命的保健功效。另外,灵芝多糖肽还具有激活人体内非特异性抗体、增强免疫特异反应、抑制移植肿瘤生理活性等功效。灵芝多糖肽对心血管疾病、气喘、过敏、神经衰弱、胃热等有显著的效果,还具有降血压、降血脂、解血瘀、改善血液循环、美白肌肤等作用。

[0004] 目前,灵芝多糖肽主要以灵芝菌丝体、灵芝子实体为原料,通过水提、碱提、醇提等提取处理获得灵芝提取液,再通过精滤、超滤、反渗透等膜过滤处理,然后与阴阳离子树脂柱、凝胶柱、中压柱、反相柱等柱层析方法中的一种或多种组合,或不装柱仅以柱中的树脂、硅胶、凝胶等填料组合,对灵芝提取液进行纯化处理。这些方法通过反复的、不同原理的膜过滤、柱层析达到分离纯化灵芝多糖肽的目的,得到纯度较高的产品,性质一般较稳定。然而,这些过程的损耗大、设备一次性投入大、设备清洗维护费用高且耗时、生产时间长、生产成本高,在提取过程需要使用大量有机溶剂,导致产物可能存在溶剂残留,给产品食用安全方面带来隐患。另外,现有的灵芝多糖肽提取纯化还存在提取效率低、提取成本高、产品质量较低、有效成分含量较低、稳定性差等问题。例如,现有的提取方法通过多重分离纯化工序,最后得到高纯度灵芝多糖肽,但生产工序繁杂,需要应用众多高精深的分离纯化设备,投入大、成本高,难以实现工业化生产,产品亦难普及推广应用。

[0005] CN201610221431.X公开了一种灵芝子实体和灵芝孢子综合提取利用生产方法。该方法对灵芝孢子进行超临界萃取后需要降压分离,表明超临界萃取时参数设置不合理,导致孢子粉中灵芝孢子油未能充分萃取出来;将灵芝子实体与萃余物混合进行水体,而灵芝子实体木质化程度高、结构复杂,多糖一般与纤维素、木质素通过物理或化学键结合在一起,采用水提的方法很难将多糖提取出来,需经过多次回流提取;进行乙醇沉淀,由于小分

子多糖溶于乙醇,因此醇沉会损耗部分活性多糖,且醇沉物使用丙酮洗涤,存在有机溶剂残留问题。实际上,该方法存在明显的缺陷,如生产时间长、生产成本低、生产工序繁杂、提取效率低、产物存在残留溶剂等。

[0006] CN200610097229.7公开了一种灵芝孢子多糖的精制工艺,采用温浸法水提取,提取工序耗时较长,需经过多次提取,合并提取液后需静置较长时间再进行过滤浓缩;采用醇沉步骤,由于小分子多糖溶于乙醇,因此醇沉会损耗部分活性多糖;精制过程包括脱色、sevag法脱蛋白、透析、醇沉、洗涤,操作繁琐,需要使用大量有机溶剂(如sevag法脱蛋白,加入等体积的氯仿-正丁醇(4:1),醇沉后沉淀使用无水乙醇和丙酮洗涤3次),存在有机溶剂残留问题。另外,通过精制后虽多糖得率和多糖含量提高,但灵芝孢子多糖精制品的多糖含量以无水葡萄糖计算,未能证明其为小分子多糖肽。

[0007] CN201610853239.2公开了灵芝孢子粉糖肽提取物的制备方法,依次包括浓醇提取、稀醇提取、合并浓醇提取液与稀醇提取液的乙醚脱脂、除杂脱色、树脂纯化步骤,并优选对经浓醇提取、稀醇提取后残留的灵芝孢子粉药渣进一步进行包括水提取、醇沉淀和精制步骤的处理。该方法在提取过程使用大量醇,需进行多次提取回流,使用乙醚脱脂、氯仿-正丁醇(4:1)进行纯化精制,产品容易残留有机溶剂,工序繁复,生产时间长,生产成本较高,难以于实现工业化。

## 发明内容

[0008] 针对现有技术的问题,本发明提供了一种灵芝孢子粉多糖肽的提取方法。本发明以脱脂孢子粉为原料,通过可行的、适于工业化的方法来获得性质稳定的灵芝多糖肽,将脱脂孢子粉变废为宝,解决了现有技术中灵芝多糖肽提取效率低、提取成本高以及最终产品中灵芝多糖肽功效成分失活、含量低的问题,提高了灵芝孢子粉的有效利用率,对促进灵芝产业的发展起着巨大的推动作用。

[0009] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0010] 一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 破壁:对灵芝孢子粉进行低温物理破壁处理,使破壁率达到95%以上;

[0012] (2) 脱脂:将破壁后的灵芝孢子粉放入超临界二氧化碳萃取装置中进行萃取,然后进行两次分离,收集油脂和脱脂破壁灵芝孢子粉;

[0013] (3) 酶解:将脱脂破壁灵芝孢子粉与纯净水混合,加碱溶液调节pH至5-10,然后加入酶进行酶解;

[0014] (4) 提取过滤:搅拌条件下将酶解液升温至90-100℃并保温1-2h,得到提取液,然后分离,收集澄清滤液;

[0015] (5) 浓缩:滤液浓缩至固形物含量35-55%的浸膏;

[0016] (6) 干燥:真空干燥浸膏;

[0017] (7) 粉碎过筛:粉碎后过60-80目筛网,得到灵芝孢子粉多糖肽粉末。

[0018] 在本发明优选的实施例中,所述低温物理破壁采用振动式超微粉碎机进行。具体地,将灵芝孢子粉装入振动式超微粉碎机中,打开冷却水开关,待冷却水温恒定至3-5℃后开始破壁,破壁时间为25-35min,使破壁率达到95%以上。

[0019] 在本发明优选的实施例中,所述萃取装置的泵频为25-30Hz,超临界二氧化碳的流

量 $\geq 120\text{L/h}$ , 萃取压力为 $18\text{-}25\text{MPa}$ , 萃取温度为 $40\text{-}50\text{^\circ C}$ , 萃取时间为 $4\text{-}5\text{h}$ 。更优选地, 超临界二氧化碳的流量为 $120\text{-}160\text{L/h}$ 。

[0020] 在本发明优选的实施例中进行了两次分离, 其中一级分离压力为 $8\text{-}10\text{MPa}$ , 分离温度为 $40\text{-}50\text{^\circ C}$ ; 二级分离压力为 $5\text{-}6\text{MPa}$ , 分离温度为 $28\text{-}35\text{^\circ C}$ 。

[0021] 在本发明优选的实施例中, 所述碱溶液的浓度为 $2\text{-}3\text{mol/L}$ , 所述碱溶液为氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙和氨水中的一种。

[0022] 在本发明优选的实施例中, 加碱溶液调节 $\text{pH}$ 至 $7.0\text{-}8.5$ 。

[0023] 在本发明优选的实施例中, 所述酶为纤维素酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶中的一种或多种; 所述酶的加入量为脱脂破壁灵芝孢子粉重量的 $0.1\text{-}2\%$ 。

[0024] 在本发明优选的实施例中, 酶解的温度为 $40\text{-}55\text{^\circ C}$ , 酶解的时间为 $2\text{-}12\text{h}$ 。更优选地, 酶解的时间为 $4\text{-}10\text{h}$ 。

[0025] 在本发明优选的实施例中, 在酶解期间进行超声处理, 超声处理的频率为 $20\text{-}40\text{KHz}$ , 时间为 $4\text{-}6\text{h}$ 。

[0026] 在本发明优选的实施例中, 浓缩采用双效真空节能浓缩设备进行, 双效真空节能浓缩设备的一效真空度为 $-0.06\text{Mpa}$ , 温度为 $70\text{-}80\text{^\circ C}$ ; 二效真空度为 $-0.08\text{MPa}$ , 温度为 $50\text{-}60\text{^\circ C}$ 。

[0027] 在本发明优选的实施例中, 真空干燥的温度为 $60\text{-}70\text{^\circ C}$ , 压力为 $-0.07$ 至 $-0.098\text{MPa}$ 。

[0028] 本发明的有益效果:

[0029] 本发明采用脱脂破壁灵芝孢子粉为原料, 通过破壁、脱脂、酶解、提取、浓缩、干燥、粉碎、过筛工序获得灵芝孢子粉多糖肽, 整个方法操作简单, 条件温和, 生产成本低, 提取效率高, 可工业化生产, 无需使用有机溶剂, 能有效地将脱脂孢子粉中功能成分提取出来, 将其转化为附加值高的灵芝孢子粉多糖肽, 变废为宝, 极大地扩展了脱脂孢子粉的再利用。

[0030] 相比于现有技术的方法, 本发明不需使用反渗透、纳滤、超滤、微滤等精细过滤方法进行纯化处理, 节省设备投入及使用维护的费用; 工序更简便, 绿色安全, 便于工业化生产; 处理时间缩短, 防止处理时间过长灵芝功效成分变性失活; 酶解使用的酶不会破坏糖肽结构、容易过滤; 未使用有机溶剂, 能够避免有机溶剂残留问题。另外, 脱脂孢子粉直接水提, 糖肽得率仅为 $0.21\%$ , 样品的灵芝孢子粉多糖肽含量仅为 $1.95\%$ ; 而通过本发明的方法, 糖肽得率能达到 $9.50\%$ , 样品的灵芝孢子粉多糖肽含量为 $36.11\%$ 。

## 具体实施方式

[0031] 下面结合实施例对本发明作进一步说明。

[0032] 实施例1

[0033] 一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法, 包括以下步骤:

[0034] (1) 破壁: 将 $100\text{kg}$ 灵芝孢子粉装入振动式超微粉碎机中, 打开冷却水开关, 待冷却水温恒定至 $3\text{-}5\text{^\circ C}$ 后, 破壁 $30\text{min}$ , 使破壁率达到 $95\%$ 以上;

[0035] (2) 脱脂: 将破壁后的灵芝孢子粉放入超临界二氧化碳萃取釜中, 通入超临界二氧化碳流体, 其流量为 $120\text{L/h}$ , 在泵频 $27.5\text{Hz}$ 、萃取压力 $21\text{MPa}$ 、温度 $45\text{^\circ C}$ 的条件下萃取 $4\text{h}$ , 然

后在一级分离压力9MPa、温度45℃和二级分离压力5.5MPa、温度31℃条件下进行分离,收集油脂和脱脂破壁灵芝孢子粉;

[0036] (3) 酶解:将50kg脱脂破壁灵芝孢子粉和500kg纯净水混合,搅拌条件下加入2mol/L氢氧化钠溶液,调节pH至7.2,然后加入0.5kg的纤维素酶和0.25kg的复合蛋白酶进行酶解,酶解期间保持搅拌并通过加入2mol/L氢氧化钠维持溶液pH $7.2\pm 0.1$ ,在48℃温度下酶解4h;

[0037] (4) 提取分离:搅拌条件下将酶解液升温至95℃并保温2h,得到提取液,然后使用离心机在5000rpm转速将提取液中的渣料和液体分离,收集澄清滤液;

[0038] (5) 浓缩:澄清滤液经双效真空节能浓缩设备浓缩,一效真空度-0.06MPa、温度70℃,二效真空度-0.08MPa、温度50℃,浓缩成固形物含量45%的浸膏;

[0039] (6) 干燥:在温度65℃及压力-0.084MPa条件下真空干燥浸膏12h;

[0040] (7) 粉碎过筛:粉碎后过80目筛网,得到灵芝孢子粉多糖肽粉末。

[0041] 实施例2

[0042] 一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法,包括以下步骤:

[0043] (1) 破壁:将100kg灵芝孢子粉装入振动式超微粉碎机中,打开冷却水开关,待冷却水温恒定至3-5℃后,破壁30min,使破壁率达到95%以上;

[0044] (2) 脱脂:将破壁后的灵芝孢子粉放入超临界二氧化碳萃取釜中,通入超临界二氧化碳流体,其流量为140L/h,在泵频25Hz、萃取压力18MPa、温度50℃的条件下萃取5h,然后在一级分离压力8MPa、温度50℃和二级分离压力5MPa、温度35℃条件下进行分离,收集油脂和脱脂破壁灵芝孢子粉;

[0045] (3) 酶解:将50kg脱脂破壁灵芝孢子粉和300kg纯净水混合,搅拌条件下加入2.5mol/L氢氧化钾溶液,调节pH至8.5,然后加入0.25kg的纤维素酶和0.325kg的碱性蛋白酶进行酶解,酶解期间保持搅拌并通过加入2.5mol/L氢氧化钾维持溶液pH $8.5\pm 0.1$ ,超声条件下在42℃温度下酶解4h;

[0046] (4) 提取分离:搅拌条件下将酶解液升温至95℃并保温2h,得到提取液,然后通过板框过滤机过滤,滤液回流至澄清后再收集;

[0047] (5) 浓缩:澄清滤液经双效真空节能浓缩设备浓缩,一效真空度-0.06MPa、温度70℃,二效真空度-0.08MPa、温度50℃,浓缩成固形物含量55%的浸膏;

[0048] (6) 干燥:在温度70℃及压力-0.07MPa条件下真空干燥浸膏10h;

[0049] (7) 粉碎过筛:粉碎后过60目筛网,得到灵芝孢子粉多糖肽粉末。

[0050] 实施例3

[0051] 一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法,包括以下步骤:

[0052] (1) 破壁:将100kg灵芝孢子粉装入振动式超微粉碎机中,打开冷却水开关,待冷却水温恒定至3-5℃后,破壁30min,使破壁率达到95%以上;

[0053] (2) 脱脂:将破壁后的灵芝孢子粉放入超临界二氧化碳萃取釜中,通入超临界二氧化碳流体,其流量为160L/h,在泵频30Hz、萃取压力25MPa、温度40℃的条件下萃取4h,然后在一级分离压力10MPa、温度40℃和二级分离压力6MPa、温度28℃条件下进行分离,收集油脂和脱脂破壁灵芝孢子粉;

[0054] (3) 酶解:将50kg脱脂破壁灵芝孢子粉和250kg纯净水混合,搅拌条件下加入

3.0mol/L氢氧化钠溶液,调节pH至7.5,然后加入0.3kg的中性蛋白酶进行酶解,酶解期间保持搅拌并通过加入3.0mol/L氢氧化钠维持溶液pH $7.5\pm 0.1$ ,超声条件下在53℃温度下酶解4h;

[0055] (4) 提取分离:搅拌条件下将酶解液升温至95℃并保温2h,得到提取液,然后使用离心机在4000rpm转速将提取液中的渣料和液体分离,收集澄清滤液;

[0056] (5) 浓缩:澄清滤液经双效真空节能浓缩设备浓缩,一效真空度-0.06MPa、温度70℃,二效真空度-0.08MPa、温度50℃,浓缩成固形物含量40%的浸膏;

[0057] (6) 干燥:在温度60℃及压力-0.098MPa条件下真空干燥浸膏8h;

[0058] (7) 粉碎过筛:粉碎后过60目筛网,得到灵芝孢子粉多糖肽粉末。

[0059] 实施例4

[0060] 一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法,包括以下步骤:

[0061] (1) 破壁:将100kg灵芝孢子粉装入振动式超微粉碎机中,打开冷却水开关,待冷却水温恒定至3-5℃后,破壁30min,使破壁率达到95%以上;

[0062] (2) 脱脂:将破壁后的灵芝孢子粉放入超临界二氧化碳萃取釜中,通入超临界二氧化碳流体,其流量为160L/h,在泵频30Hz、萃取压力25MPa、温度40℃的条件下萃取4h,然后在一级分离压力10MPa、温度40℃和二级分离压力6MPa、温度28℃条件下进行分离,收集油脂和脱脂破壁灵芝孢子粉;

[0063] (3) 酶解:将50kg脱脂破壁灵芝孢子粉和330kg纯净水混合,搅拌条件下加入2.5mol/L氢氧化钠溶液,调节pH至7.0,然后加入0.3kg的纤维素酶和0.3kg的复合蛋白酶进行酶解,酶解期间保持搅拌并通过加入2.5mol/L氢氧化钠维持溶液pH $7.0\pm 0.1$ ,超声条件下在48℃温度下酶解6h;

[0064] (4) 提取分离:搅拌条件下将酶解液升温至95℃并保温2h,得到提取液,然后使用离心机在5000rpm转速将提取液中的渣料和液体分离,收集澄清滤液;

[0065] (5) 浓缩:澄清滤液经双效真空节能浓缩设备浓缩,一效真空度-0.06MPa、温度70℃,二效真空度-0.08MPa、温度50℃,浓缩成固形物含量45%的浸膏;

[0066] (6) 干燥:在温度60℃及压力-0.098MPa条件下真空干燥浸膏10h;

[0067] (7) 粉碎过筛:粉碎后过80目筛网,得到灵芝孢子粉多糖肽粉末。

[0068] 实施例5

[0069] 一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法,包括以下步骤:

[0070] (1) 破壁:将100kg灵芝孢子粉装入振动式超微粉碎机中,打开冷却水开关,待冷却水温恒定至3-5℃后,破壁30min,使破壁率达到95%以上;

[0071] (2) 脱脂:将破壁后的灵芝孢子粉放入超临界二氧化碳萃取釜中,通入超临界二氧化碳流体,其流量为140L/h,在泵频25Hz、萃取压力18MPa、温度50℃的条件下萃取5h,然后在一级分离压力8MPa、温度50℃和二级分离压力5MPa、温度35℃条件下进行分离,收集油脂和脱脂破壁灵芝孢子粉;

[0072] (3) 酶解:将50kg脱脂破壁灵芝孢子粉和290kg纯净水混合,搅拌条件下加入2.5mol/L氢氧化钾溶液,调节pH至7.8,然后加入0.5kg的复合蛋白酶进行酶解,酶解期间保持搅拌并通过加入2.5mol/L氢氧化钾维持溶液pH $7.8\pm 0.1$ ,超声条件下在53℃温度下酶解4h;

[0073] (4) 提取分离: 搅拌条件下将酶解液升温至95℃并保温2h, 得到提取液, 然后使用离心机在6000rpm转速将提取液中的渣料和液体分离, 收集澄清滤液;

[0074] (5) 浓缩: 澄清滤液经双效真空节能浓缩设备浓缩, 一效真空度-0.06MPa、温度70℃, 二效真空度-0.08MPa、温度50℃, 浓缩成固形物含量35%的浸膏;

[0075] (6) 干燥: 在温度60℃及压力-0.098MPa条件下真空干燥浸膏10h;

[0076] (7) 粉碎过筛: 粉碎后过80目筛网, 得到灵芝孢子粉多糖肽粉末。

[0077] 实施例6

[0078] 一种灵芝孢子粉多糖肽的制备方法, 包括以下步骤:

[0079] (1) 破壁: 将100kg灵芝孢子粉装入振动式超微粉碎机中, 打开冷却水开关, 待冷却水温恒定至3-5℃后, 破壁30min, 使破壁率达到95%以上;

[0080] (2) 脱脂: 将破壁后的灵芝孢子粉放入超临界二氧化碳萃取釜中, 通入超临界二氧化碳流体, 其流量为120L/h, 在泵频27.5Hz、萃取压力21MPa、温度45℃的条件下萃取4h, 然后在一级分离压力9MPa、温度45℃和二级分离压力5.5MPa、温度31℃条件下进行分离, 收集油脂和脱脂破壁灵芝孢子粉;

[0081] (3) 提取分离: 将脱脂破壁灵芝孢子粉在95℃水提2h, 得到提取液, 然后使用离心机在5000rpm转速将提取液中的渣料和液体分离, 收集澄清滤液;

[0082] (4) 浓缩: 澄清滤液经双效真空节能浓缩设备浓缩, 一效真空度-0.06MPa、温度70℃, 二效真空度-0.08MPa、温度50℃, 浓缩成固形物含量45%的浸膏;

[0083] (5) 干燥: 在温度65℃及压力-0.084MPa条件下真空干燥浸膏12h;

[0084] (6) 粉碎过筛: 粉碎后过80目筛网, 得到灵芝孢子粉多糖肽粉末。

[0085] 试验例灵芝多糖肽含量检测

[0086] 灵芝多糖肽含量检测采用高效凝胶色谱法进行, 采用Waters1525型高效液相色谱; Waters2487紫外检测器; 色谱柱TSK-GEL G4000PWXL 7.5×300mm; 流动相: 超纯水; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 35℃; 进样量10μL; 检测波长λ=280nm。

[0087] 标准曲线绘制

[0088] 准确称取干燥的多糖肽对照品10.0mg (纯度≥98%, 国家菌草工程技术中心), 于10mL容量瓶中用水溶解并定容, 得浓度1.0mg/mL的多糖肽对照品储备液; 分别移取多糖肽对照品储备液适量, 用水稀释定容至2mL, 值得浓度分别为100、200、300、400、500μg/mL的标准工作液, 以对照品浓度(μg/mL)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

[0089] 样品溶液配制

[0090] 分别称取实施例1-6制备的灵芝多糖肽粉末50mg, 加水溶解并定容至5.0mL; 过滤, 取滤液1mL, 加入3.0mL无水乙醇并混匀。于10000rpm离心10min, 沉淀用水溶解定容至5.0mL, 过0.22μm滤膜, 得到样品滤液备用。

[0091] 色谱分析

[0092] 取10μL样品溶液注入色谱仪中运行10min, 以多糖肽对照品浓度(μg/ml)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 使用该曲线计算样品中灵芝多糖肽浓度。

[0093] 通过以下公式计算灵芝多糖肽含量, 结果列在表1中。

[0094] 灵芝多糖肽含量 (%) = 
$$\frac{\text{试样浓度} (\mu\text{g/mL}) \times 5 \times 5}{\text{样品重} (\text{mg}) \times 1000} \times 100$$

[0095] 表1实施例1-6制备的灵芝多糖肽粉末中灵芝多糖肽含量

[0096]

编号	多糖肽得率,%	样品多糖肽含量,%
实施例1	9.24	35.75
实施例2	8.76	31.61
实施例3	9.01	32.33
实施例4	9.50	36.11
实施例5	8.97	34.23
实施例6	0.21	1.95

[0097] 由表1可知,本发明制备的灵芝多糖肽,糖肽得率在8.76%-9.50%,其中灵芝多糖肽含量为31.61%-36.11%,糖肽得率和含量指标明显好于单纯水提制备灵芝孢子粉得到的多糖肽。