

响应面法优化鸡枞菌多糖的提取工艺

陈耀华, 陈健

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 利用响应面分析法优化鸡枞菌多糖提取工艺。以鸡枞菌多糖提取率为指标, 考察浸提温度、时间、液固比、提取次数对鸡枞菌多糖提取的影响, 然后根据中心组合 (Box-Behnken) 原理采用三水平三因素的分析法, 依据回归确定各工艺条件的影响因素, 以鸡枞菌多糖提取率为响应面和等高线, 分析各个因素的显著性和交互作用, 优化得到鸡枞菌多糖的最佳工艺条件为提取温度 87 °C、提取时间 2.9 h、水料比 31:1 (mL/g), 多糖最大提取率达 16.88%。

关键词: 鸡枞菌; 多糖; 响应面分析法; 提取工艺

文章编号: 1673-9078(2012)5-541-544

Optimization of Extraction Conditions for Polysaccharides from *Collybia albuminosa* via Response Surface Methodology

CHEN Yao-hua, CHEN Jian

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The extraction technology of polysaccharides from *Collybia albuminosa* was optimized via response surface methodology (RSM). Using extraction rate of polysaccharide from *Collybia albuminosa* as the indicator, effects of extraction temperature, time, water-material ratio and extraction times on the extraction rate of polysaccharide were investigated. Based on single factor studies, a three-variable, three-level Box-Behnken experimental design and response surface methodology were used to obtain the optimized extraction conditions of polysaccharides. The optimum conditions of extraction technology of polysaccharide from *Collybia albuminosa* were extraction temperature of 87 °C, extraction time of 2.9 h and water-material ratio of 31:1 (mL/g), under which the extraction rate of polysaccharide was up to 16.88%.

Key words: *Collybia albuminosa*; polysaccharide; response surface methodology; extraction technology

鸡枞菌 (*Collybia albuminosa*), 又名蚁枞、鸡丝菇等, 属担子菌纲, 伞菌目, 口蘑科, 蚁巢伞属, 营养丰富。鸡枞菌多糖含量也很高^[1], 而多糖具有抗肿瘤、抗氧化、降血脂和增强机体免疫力的作用, 也有报道鸡枞菌多糖具有降血脂作用^[2], 然而目前对其多糖相关研究报道还是较少, 尤其是其结构和药理活性的报道更是鲜见。本文以多糖得率为考察指标, 进行单因素实验, 在此基础上根据 Box-Behnken 原理采用三水平三因素的分析法, 分析确定水提醇沉法提取鸡枞菌多糖的最佳工艺条件, 以期能为其多糖提取与进一步研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

鸡枞菌子实体 (购于福建省古田县吉发食用菌有限公司, 云南产); 葡萄糖 (sigma 公司); 95%乙醇, 蒸馏水, 浓硫酸, 苯酚均为国产分析纯; DNS 试剂,

收稿日期: 2012-02-20

5%苯酚溶液, 自己配制。

打粉机, 精密电子天平, 数显水浴锅, KDC-40 低速离心机 (科大创新股份有限公司), SHZ-D(III) 循环水式真空泵 (巩义市英峪予华仪器厂), 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂), 722 可见分光光度计。

1.2 试验方法

1.2.1 提取方法

鸡枞菌子实体→粉碎过 20 目筛→称样 (2.0000g)→热水浸提→离心取上清液→过滤→定容→苯酚硫酸测其吸光度

1.2.2 多糖含量测定方法

总糖含量采用苯酚硫酸法测定^[3], 还原糖含量采用 3,5-二硝基水杨酸法测定^[4]。

多糖含量=总糖含量-还原糖含量

多糖得率(%)= $\frac{\text{多糖质量}}{\text{子实体原料质量}} \times 100\%$

1.2.3 苯酚硫酸法葡萄糖标准曲线的绘制

精密称取约 105 °C 干燥至恒重的无水葡萄糖标准品 100.0 mg, 置 500 mL 容量瓶中加水溶解并稀释

至刻度, 摇匀, 得对照品溶液备用。取该溶液分别稀释成 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/mL 的 7 个不同浓度的对照品溶液。精密吸取上述溶液各 2.0 mL 置 25 mL 的具塞比色试管中, 加入苯酚 1.0 mL 混匀, 再迅速加入浓硫酸 5.0 mL 混匀冷却到室温, 以蒸馏水同法操作为空白, 照分光光度法在 490nm 处测定吸收度。以葡萄糖的微克数为横坐标, 490 nm 处得吸光值为纵坐标绘图, 得标准曲线。

1.2.4 3,5-二硝基水杨酸法还原糖标准曲线的绘制

葡萄糖标准溶液: 准确称取预先在 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖 0.1000 g, 用纯水溶解并定容至 100 mL, 此溶液 1 mL 相当于 1 mg 葡萄糖标准溶液。于 8 支 25 mL 比色管内加入葡萄糖标准溶液 0.00、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 各补加纯水至 2 mL, 加入 DNS 试剂 2 mL 摇匀, 置沸水浴中加热煮沸 7 min, 取出流水冷却, 定容至 25 mL, 摇匀, 于 540 nm 波长下, 以 1 cm 比色杯, 用零管调零, 测定出各管溶液的吸光度值。以葡萄糖含量为横坐标, 各管吸光度值为纵标绘制标准曲线图。

1.2.5 Box-Benhnken 中心组合实验设计^[5,6]

对多糖提取率的影响因素很多, 根据文献及单因素实验结果, 采用 Box-Benhnken 的中心组合试验设计, 采用三因素三水平的响应面分析法, 依据回归分析确定各工艺条件的影响因子, 以多糖提取率为响应值作响应面与等值线图, 分析优化最佳提取条件。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果及分析

2.1.1 提取温度对多糖提取率的影响

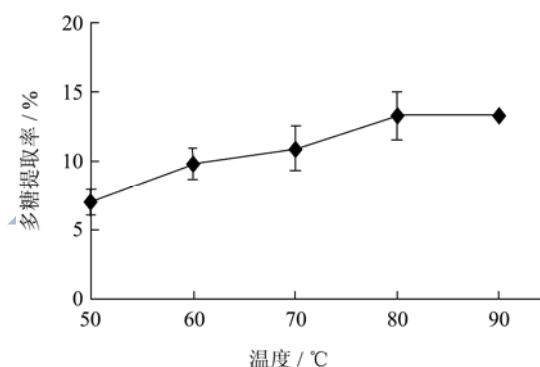


图 1 提取温度对糖提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction temperature on extraction rate of polysaccharide

称取鸡枞菌粉 2.0000 g, 以 20:1 的液固比加入蒸馏水, 分别于不同水浴温度 (50、60、70、80、90 °C) 浸提 3 h。混合物 4000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 上清液抽滤, 测多糖提取率, 重复三次, 取平均值。

结果如图 1。

由图 1 可以看出, 多糖提取率虽随温度上升逐渐增加, 但当温度达到 80 °C 增加速率减缓, 由于温度升高, 分子运动速度加快, 易于多糖在水中溶出。但温度过高有可能造成多糖水解^[7]。故提取多糖时可将温度设置 80 °C 或者 90 °C。

2.1.2 液固比对多糖提取率的影响

准确称取 2.0000 g 鸡枞菌粉, 添加不同比率 (10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1) 添加蒸馏水, 80 °C 提取浸提 2 h, 混合液 4000 r/min 离心, 过滤, 检测多糖得率, 结果如图 2。

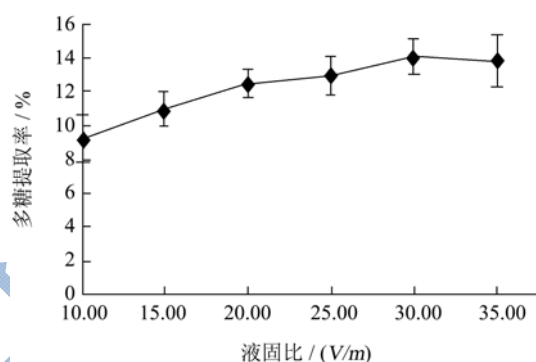


图 2 液固比对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of water-material ratio on extraction rate of polysaccharide

由图 2 可知, 随着液固比得增加多糖提取率增加, 当水料比达到 30:1 时提取率达到最大, 此后, 随液固比的增加, 提取率开始下降, 其原因可能是加水量过大, 料液浓缩困难, 增加了后续工艺的难度, 且料液浓缩时间延长会破坏多糖结构, 致使多糖损失率增加^[8]。故液固比控制在 30:1 为最佳。

2.1.3 提取时间对多糖提取率的影响

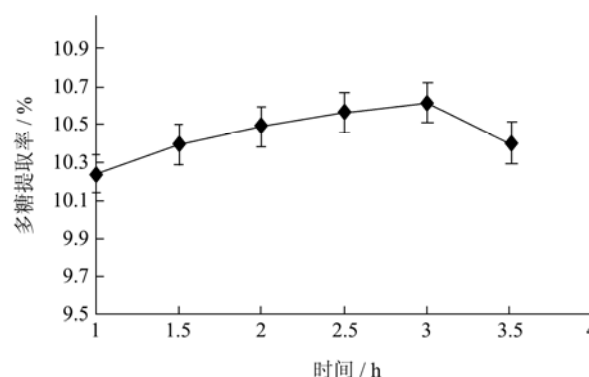


图 3 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on extraction rate of polysaccharide

准确称取 2.000 g 鸡枞菌粉, 以 30:1 的液固比加入蒸馏水, 于 80 °C 下分别浸提 1、1.5、2、2.5、3、3.5 h, 混合液 4000 r/min 离心, 过滤, 检测多糖得率,

结果如图3。

由图3可知,随着时间的增加,鸡枞菌多糖提取率增加,当达到3h时提取率最大,此后随着时间的增加,提取率开始下降。可能由于长时间浸提引起多糖结构的变化和破坏^[9],因此时间控制在3h左右为宜。

2.1.4 提取次数

准确称取2.0000g鸡枞菌粉,添加60mL蒸馏水,80℃水浴浸提3h,混合物4000r/min离心15min,收集上清液并抽滤,测其多糖含量,增加提取次数(1、2、3次),考察提取次数对多糖总量的影响,结果如图4。

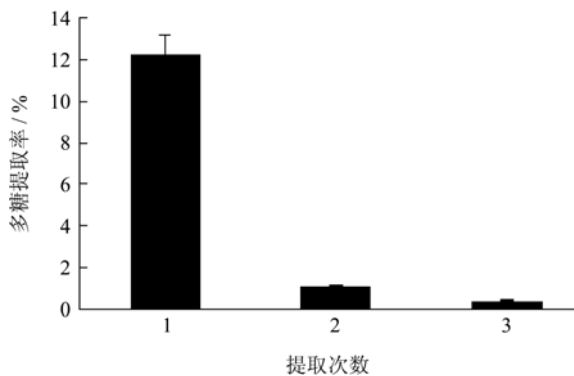


图4 提取次数对多糖含量的影响

Fig.4 Effect of extraction times on extraction rate of polysaccharide

由图4可知,在提取一次后,残渣中多糖含量明显降低,数据显示第二次提取多糖得率只有1.01%,第三次只有0.39%,从节能省耗、减少操作工序以及缩短生产周期考虑^[10],提取一次即可。

2.2 响应面分析法优化工艺

2.2.1 多糖提取试验方案和因素水平

根据Box-Behnken中心组合试验设计原理,综合单因素试验结果,选取提取温度、水料比、提取时间三个影响因素,采用三因素三水平响应面分析法进行实验设计,见表1。

表1 响应面试验因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
A(温度/℃)	70	80	90
B(时间/h)	2.5	3	3.5
C[液固比/(mL·g ⁻¹)]	25	30	35

注: A=(a-80)/10, B=(b-3)/0.5, C=(c-30)/5, A、B、C为编码值, a、b、c为真实值。

2.2.2 响应面分析方案及结果

对鸡枞菌多糖提取工艺进行响应面分析,具体方

案及结果见表2。

表2 响应面实验设计及数据处理

试验号	A	B	C	提取率/%
1	-1	1	0	15.34
2	-1	0	1	15.87
3	-1	-1	0	15.57
4	-1	0	-1	15.41
5	0	-1	1	16.21
6	0	1	1	15.74
7	0	1	-1	14.72
8	0	-1	-1	16.14
9	1	0	-1	16.41
10	1	1	0	15.87
11	1	0	1	16.77
12	1	-1	0	16.53
13	0	0	0	16.93
14	0	0	0	16.75
15	0	0	0	16.88

15个试验点分两类: 1~12是析因点, 自变量取值在因素所构成的三维顶点; 13~15是中心点, 为区域的中心点, 中心试验重复3次, 用以估计试验误差。得到的回归方程: 多糖提取率=16.87+0.42A-0.35B+0.24C-0.11AB-0.025AC+0.24BC-0.31A²-0.73B²-0.44C²

表3 提取回归分析结果

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	p值
Model	9	6.91	0.77	30.74	<0.0001
A	1	1.44	1.44	57.51	0.0001
B	1	0.97	0.97	38.68	0.0004
C	1	0.46	0.46	18.26	0.0037
AB	1	0.046	0.046	1.85	0.2159
AC	1	0.0025	0.0025	0.10	0.7609
BC	1	0.23	0.23	9.03	0.0198
A ²	1	0.41	0.41	16.51	0.0048
B ²	1	2.22	2.22	88.73	<0.0001
C ²	1	0.81	0.81	32.34	0.0007
总和	16	7.09			

R²=0.9753, R²_{adj}=0.9436

结合表3, 回归方程中各自变量对多糖提取率(响应值)影响的显著性由F值检验来判定, 概率p值越小则变量的显著程度越高。当P值小于0.05时, 即表示该项指标显著, 当p值小于0.01时, 即表示该项指标极显著, 由表3可以看出, 各因素中一次项A、B、C对多糖提取率影响是极显著的, 二次项A²、B²、C²

对多糖提取率影响也是极显著的, 交互项 BC 对其影响是显著的, 各具体试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系。由表 3 可知, 回归整体模型是极显著的 ($P < 0.001$), 其相关系数 $R^2 = 6.91/7.09 = 0.9753$, 说明通过二次回归得到的多糖提取率与实验拟合较好, 可靠性高。同时, 由 F 值的大小可以推断, 在所选择的试验范围内, 3 个因素对多糖提取率影响的排序为提取温度(A)>提取时间(B)>液料比(C)。

2.2.3 因素间的交互影响

根据响应面分析方案及结果, 利用 Design-Expert 软件作不同因素的响应面分析图^[11]。

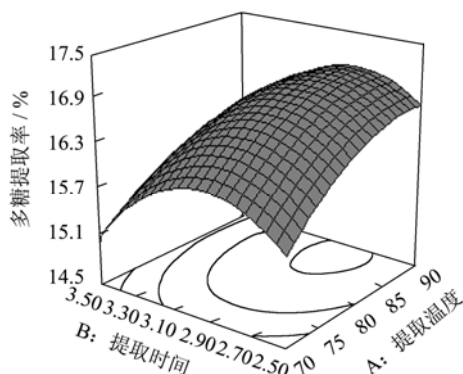


图5 浸提温度 (A) 和提取时间 (B) 对鸡枞菌多糖得率的影响

Fig.5 Response surface plot of polysaccharide yield as a function of extraction temperature and extraction time

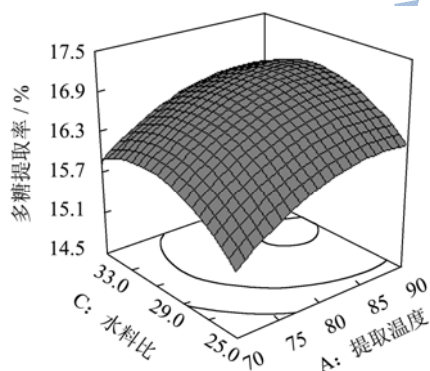


图6 浸提温度 (A) 和水料比 (C) 对鸡枞菌多糖得率的影响

Fig.6 Response surface plot of polysaccharide yield as a function of extraction temperature and water-material ratio

通过对回归方程求导和各响应面的等值线图进行分析计算, 得到粗多糖的最佳提取工艺参数为提取温度 87.29 °C、提取时间 2.87 h、水料比 30.9:1(mL/g), 在此条件下, 鸡枞菌多糖的提取率为 16.93%。考虑实际操作性, 将优化参数修正为提取温度 87 °C、提取时间 2.9 h、水料比 31:1 (mL/g)。

在修正的最佳工艺参数下, 按照 1.2.1 同样操作提取鸡枞菌多糖, 平行试验 3 组。结果测定多糖提取率分别为 16.91%、16.86%和 16.75%, RSD 为 0.48%。总体来看, 验证试验结果与模型预测的结果比较接近,

偏差较小, 表明试验拟合较好, 实验误差较小。因此此方法可考虑作为优化和预测各因素与提取率之间的关系。

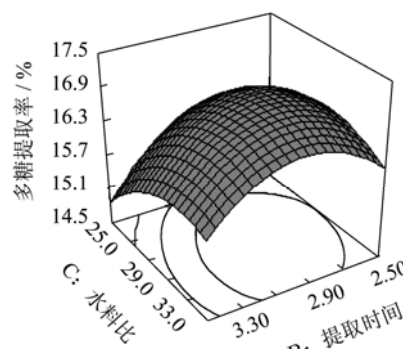


图7 浸提时间 (B) 和水料比 (C) 对鸡枞菌多糖得率的影响

Fig.7 Response surface plot of polysaccharide yield as a function of extraction time and water-material ratio

3 结论

本研究在单因素实验基础上, 根据中心组合 (Box-Benhnken) 试验设计原理, 应用三因素三水平响应面分析方法优化提取温度、浸提时间和水料比对鸡枞菌多糖水提工艺条件。结果表明, 鸡枞菌多糖浸提的最佳工艺条件为 87 °C、浸提时间 2.9 h、水料比为 31:1, 此条件下提取可达 16.88%。通过实验验证, 此回归模型预测各因素与提取率之间的关系比较可靠。

参考文献

[1] Jouquet P, Bottinelli N, Lata J C, et al. Role of the fungus-growing termite *Pseudacanthotermes spingeri* (Isoptera, Macrotermitinae) in the dynamic of clay and soil organic matter content. An experimental analysis [J]. *Geoderma*, 2007, 139: 127-133

[2] 谭晓红,方秀梅.云南产鸡枞菌多糖含量测定[J].*张家口医学院学报*,2004,21(1):2-3

[3] 吴海婴,陈光明,吴世木,等.高脂血症小鼠模型腹腔注射鸡枞菌多糖的研究[J].*检验医学与临床*,2009,6(11):862-863

[4] Dubois M. Colorimetric method for determination of sugar and related substances [J]. *Anal. Chemistry*, 1956, 28: 350

[5] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987

[6] 费荣昌.实验设计与数据处理[M].无锡:江南大学出版社, 2001

[7] SHI X Q, CHANG K C, SCHWARZ J G, et al. Optimizing pectin extraction from sunflower heads by alkaline washing [J]. *Bioresour. Technology*, 1996, 58(3): 291-297

- [8] 戴喜木,熊子文,罗丽萍.响应面法优化野艾蒿多糖的超声波提取及其抗氧化性研究[J].食品科学,2011,32(8):93-95
- [9] 朱影,旺梅,马荣池.雪灵芝水溶性多糖提取工艺优化及其数学模型的建立[J].世界科技研究与发展,2008,30(3):249-252
- [10] 李炳辉,陈玲,李晓玺.超声强化响应面法优化知母多糖的提取工艺[J].现代食品科技,2011,27(4):432-437
- [11] 李瑞,吴红棉,范秀萍.响应面法优化翡翠贻贝糖胺聚糖提取工艺的研究[J].现代食品科技,2010,26(2):175-179

现代食品科技