

响应面法优化酵母多糖的提取工艺

王 慧^{1,2}, 程富胜³, 罗永江³, 董鹏程³, 张 霞^{1,*}

(1.甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2.甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 3.中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所-农业部兽用药物创制重点实验室, 甘肃省新兽药工程重点实验室, 甘肃 兰州 730050)

摘 要: 为提高酵母多糖提取率, 对其提取过程进行优化。在单因素试验的基础上, 利用中心组合试验设计原理, 以高压时间、超声功率和超声时间为试验因素, 以多糖提取率为响应值, 采用3因素3水平的响应面分析法建立数学模型, 获得最佳提取工艺。通过二次回归模型响应面分析得出酵母多糖提取的最佳工艺条件为高压时间35min、超声功率510W、超声时间26min; 在此条件下, 多糖提取率的预测值为29.82%, 验证值为29.84%。证明采用响应面法对酵母多糖提取条件进行优化, 方法可行, 可用于实际操作与实验预测。

关键词: 酵母多糖; 响应面法; 提取; 优化

Optimization of Polysaccharide Extraction from Yeast by Response Surface Methodology

WANG Hui^{1,2}, CHENG Fu-sheng³, LUO Yong-jiang³, DONG Peng-cheng³, ZHANG Xia^{1,*}

(1. College of Life Sciences and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Discovery, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of New Animal Drug Project, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract : Response surface methodology was used to optimize polysaccharide extraction from yeast to enhance polysaccharide yield. Polysaccharide yield was investigated with respect to high pressure treatment time, ultrasonic power and ultrasonic treatment time. A quadratic regression model was established based on a three-variable, three-level Box-Behnken design. The optimum conditions of high pressure treatment time, ultrasonic power and ultrasonic treatment time were found to be 35 min, 510 W and 26 min, respectively. Under these conditions, the predicted value of polysaccharide yield was 29.82%, whereas the actual value was 29.84%. Thus, the optimized extraction procedure is feasible for practical operation and experimental prediction.

Key words : yeast polysaccharide; response surface methodology; extraction; optimization

中图分类号: Q81

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)24-0092-05

微生物多糖是目前生物发酵工程和生物医药领域的研究热点之一^[1]。现代科学研究表明, 绝大多数真菌多糖都具有一定的生物学活性, 其生理活性物质既可存在于子实体中, 也可存在于培养菌丝体和发酵液中^[2]。酵母(yeast)是一类与人类生产生活密切相关的真核微生物, 在其细胞膜的外面包裹着一层厚度为100~400nm的细胞壁^[3], 酵母细胞壁干质量的近75%为多糖^[4], 其中50~60%为 β -D-葡聚糖^[5]。酵母多糖在抗炎、抗诱变、抗氧化、抗肿瘤、促生长、免疫促进等方面发挥着重要的生物活性作用^[6-9], 是一种很有发展前景的饲料添加剂和具有抗生素兼益生素双重作用的免疫促进剂。但由于酵母细胞壁独特的结构, 使其破壁不易, 给相关科研工作的开展带来不少的

困难。目前, 酵母多糖有效成分提取的方法较多, 如研磨法、冻融法、高压均质法、超声波法、碱溶法、常规水提法、索氏提取法等^[10-11], 这些传统方法存在着提取温度高、时间长、能耗大、活性受损、提取率低等不足。对于将冻融法、高压均质法、超声波法、碱溶法综合为一体的提取方法目前还未见报道。响应面法(response surface methodology, RSM)利用合理的试验设计并通过试验得到一定的数据, 采用多元二次回归的方法, 将多因子试验中因子指标的相互关系用多项式近似拟合, 通过对函数响应面和等高线的分析, 能够精确地研究各因子与响应值之间的关系, 以最经济的方式、较少的试验次数和时间对所选试验参数进行全面的分析和研究, 已

收稿日期: 2011-11-29

基金项目: 甘肃省科技支撑项目(0708NKCA082; 090NKCA070); 甘肃省农业生物技术项目(GNSW-2007-12; GNSW-2010-07)

作者简介: 王慧(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为动物生理学及药物免疫学。E-mail: wang_hui_1011@163.com

*通信作者: 张霞(1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为动物生理药理学。E-mail: zhxcfs@126.com

越来越多地应用于各种生物化工处理过程的优化^[12-14]。本实验在冻融、碱溶的基础上,用响应面法对酵母多糖提取过程中的高压时间、超声功率、超声时间进行优化,旨在选择一条适宜的工艺路线,寻求最佳工艺条件,制备胞壁多糖,为酵母多糖的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酵母粉由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所-农业部兽用药物创制重点实验室和甘肃省新兽药工程重点实验室自主研发。

D-葡萄糖、D-甘露糖标准品 上海源叶生物科技有限公司;硅胶G 青岛海洋化工厂。其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

JY92-II DN型超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司;JSM-6510A高真空分析型扫描电镜、自动离子溅射仪 日本JEOL公司;MQ-M03A高压灭菌消毒锅 广州市华南医疗设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酵母多糖提取工艺^[15]

工艺流程:酵母粉用蒸馏水溶解(比例为1:3)→高压(103.4kPa, 15~55min)→冻融(-40℃冷冻2h,再置于100℃水中骤然升温使其融化,反复3次)→超声波破碎(功率300~700W,时间15~55min、工作次数150次)→扫描电镜观察破壁效果→碱溶(3% KOH溶液、温度100℃、时间1.5h)→中和(醋酸中和至pH6~7)→沉淀(以95%乙醇作沉淀剂,沉淀12h,乙醇溶液与上清液的体积比为2:1)→洗涤(丙酮洗涤2次,乙醚洗涤1次)→烘干(30℃干燥24h)。粗多糖干物质与酵母粉质量比即为提取率。

1.3.2 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察酵母细胞破壁效果

参照文献[16]对依次经过高压、反复冻融、超声波处理后的酵母细胞样品进行电子扫描显微拍照。将样品固定于样品台,经离子溅射仪上真空干燥、喷金后,于扫描电子显微镜上观察、拍摄取图。电镜工作电压为10kV。

1.3.3 单因素试验

分别研究高压(103.4kPa)、时间、超声波功率和超声处理时间对多糖提取率的影响。

1.3.4 响应面法优化提取工艺

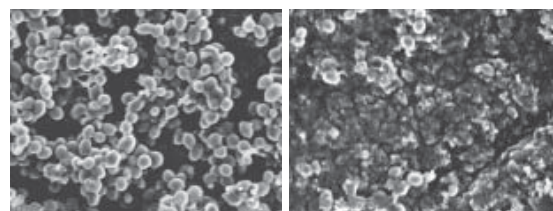
在单因素试验的基础上,借助Design-Expert 8.05b软件,运用Box-Behnken试验设计原理,以多糖提取率为响应值,通过响应曲面分析进行提取条件的优化。

2 结果与分析

2.1 酵母细胞破壁效果观察

为了观察依次经过高压(103.4kPa, 30min)、冻融

(-40℃冷冻2h,再置于100℃水中骤然升温使其融化,反复3次)、超声波处理(功率500W,时间25min,工作次数150次)的酵母细胞的破壁效果,对破壁前后的酵母细胞进行扫描电镜拍照(图1):新鲜酵母细胞呈现椭圆形。经过高压、反复冻融、超声波破壁处理后,酵母细胞的内容物流出,细胞壁被打破成小的碎片。在图1b视野中很少有完整酵母细胞的存在,只能看到碎片状酵母细胞壁,由此证明酵母细胞破壁效果良好。



a.破壁前 b.破壁后
图1 酵母细胞破壁前后的电镜相片

Fig.1 Scanning electron micrographs of yeast cells before and after cell wall disruption

2.2 单因素试验

2.2.1 高压时间对酵母多糖提取率的影响

高压时间对酵母多糖提取率的影响如图2所示。在超声波功率450W、处理时间20min、工作次数150次的条件下,高压(103.4kPa)时间对多糖提取率影响不是很显著,提取率随高压时间的增加而升高,35min时达到最大值;然后随高压时间增加其含量稍有下降,原因可能是高压时间过长,随着温度的升高,多糖容易分解的缘故,高温可能对多糖的结构与活性有一定的破坏作用。综合考虑,高压时间以25~45min为宜。

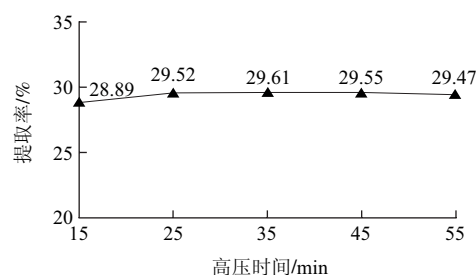


图2 高压时间对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of high pressure treatment time on polysaccharide yield

2.2.2 超声波功率对酵母多糖提取率的影响

不同超声波功率对酵母多糖提取率的影响见图3,在高压25min,超声处理时间20min、工作次数150次条件下,超声波功率在300~400W之间时,提取率增加较快,在功率400~500W时,提取率趋于平缓;当超声波功率在500~700W之间时,提取率下降。考虑到过大的功率加重超声波设备的负担,可能会破坏多糖活性物质结构,因此选择超声波功率400~600W为宜。

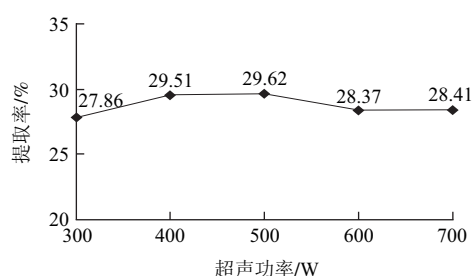


图3 超声功率对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic power on polysaccharide yield

2.2.3 超声处理时间对酵母多糖提取率的影响

不同超声处理时间对酵母多糖提取率的影响如图4所示。在超声功率450W、工作次数150次,高压(103.4kPa)25min条件下,随着超声处理时间的延长,在15~25min变化幅度较大,多糖提取率不断增加,在25min时达到最大,之后趋于平缓。因此选择15~35min作为酵母多糖提取的超声处理时间。

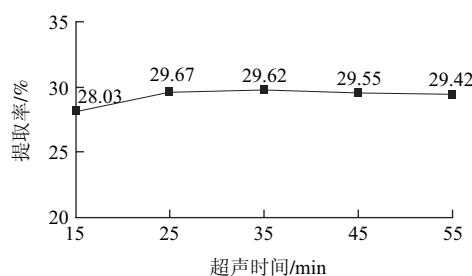


图4 超声时间对多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic treatment time on polysaccharide yield

2.3 响应面优化提取工艺条件

2.3.1 响应面分析因素水平的选择

根据Box-Behnken试验设计原理,综合单因素试验结果,以高压时间(X_1)、超声功率(X_2)、超声时间(X_3)为自变量,采用3因素3水平的响应面分析方法,试验因素与水平设计见表1。

表1 响应面分析参数水平

Table 1 Variables and their coded levels used in response surface analysis

水平	因素		
	X_1 高压时间/min	X_2 超声功率/W	X_3 超声时间/min
1	25	400	15
0	35	500	25
-1	45	600	35

2.3.2 响应面试验设计与结果

试验设计及结果见表2。将表2试验数据用Design-Expert软件进行多元回归分析,得到多糖提取率与各因素变量的二次方程模型为: $Y = 29.80 + 0.0025X_1 + 0.2X_2 + 0.08X_3 - 0.025X_1X_2 + 0.00001X_1X_3 - 0.12X_2X_3 - 0.14X_1^2 - 0.71X_2^2 - 0.3X_3^2$ 。

表2 Box-Behnken试验设计及和结果

Table 2 Box-Behnken design and results for response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	多糖提取率/%
1	0	1	1	28.89
2	-1	0	-1	29.29
3	0	1	-1	28.98
4	0	0	0	29.83
5	1	0	-1	29.27
6	1	-1	0	28.74
7	1	0	1	29.44
8	-1	-1	0	28.66
9	0	0	0	29.80
10	1	1	0	29.19
11	-1	0	1	29.46
12	0	-1	1	28.85
13	0	-1	-1	28.46
14	-1	1	0	29.21
15	0	0	0	29.77

运用软件对模型进行方差分析,结果如表3所示。拟合模型检验极显著($P < 0.001$),模型中的 X_2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 Y 的影响极显著($P < 0.001$), X_3 、 X_2X_3 、 X_1^2 对 Y 的影响高度显著($P < 0.01$),其他项系数均不显著($P > 0.05$),这表明试验因子对响应值不是简单的线性关系。此模型的决定系数 $R^2 = 0.9913$,说明响应值的变化有99.13%来源于所选变量,该方程与实际情况拟合良好,实验误差小,能够正确反映多糖提取率与高压时间、超声功率和超声时间之间的关系。失拟检验 $P = 0.0521 > 0.05$,说明本实验无其他显著影响因素。响应值的变异系数(CV)为0.22%,较低,说明试验稳定性好,试验操作是可信的,可以用该模型来分析和预测酵母多糖的提取工艺结果^[17-18]。在所选的各因素水平范围内,对结果影响的大小顺序为超声功率>超声时间>高压时间。

表3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F值	P值
X_1	0.00005	1	0.00005	0.013	0.9140
X_2	0.30	1	0.30	76.24	<0.0001
X_3	0.051	1	0.051	12.83	0.0089
X_1X_2	0.0025	1	0.0025	0.63	0.4546
X_1X_3	0.000	1	0.000	0.000	1.0000
X_2X_3	0.058	1	0.058	14.44	0.0067
X_1^2	0.084	1	0.084	20.98	0.0025
X_2^2	2.13	1	2.13	533.46	<0.0001
X_3^2	0.37	1	0.37	92.46	<0.0001
模型	3.18	9	0.35	88.49	<0.0001
参差	0.028	7	0.00399		
失拟项	0.026	3	0.00855	5.86	0.0521
纯误差	0.00228	4	0.00057		
总离差	3.21	16			
$R^2 = 0.9913$	$R^2_{Adj} = 0.9801$	CV = 0.22%	$R_{SN} = 28.939$		

2.3.3 响应面分析

图形能够提供一种形象的观测响应值和试验参数水平关系的方法。为了观察某两个因素及其交互作用同时对多糖提取率的影响,将回归方程中的任两因素保留,其它因素固定为零水平,获得某两个因素及其交互作用对提取率影响的一元二次方程,就可以得到一组动态的响应曲面及其等值线图,从而确定因素的最佳水平范围,等值线的形状反映出交互效应的强弱趋势。分别固定变量超声时间(C)、超声功率(B)和高压时间(A)在零点,依次得到其他3个变量的响应面和等值线图(图5~7),由图5~7的等值线图可以看出,超声功率对多糖提取率的影响最为显著,表现为曲面较陡,其次是超声时间,影响作用最小的因素是高压时间,表现为曲面比较平滑。从响应面的最高点和等值线可以看出,在所选的范围内存在极值,即是响应面的最高点。

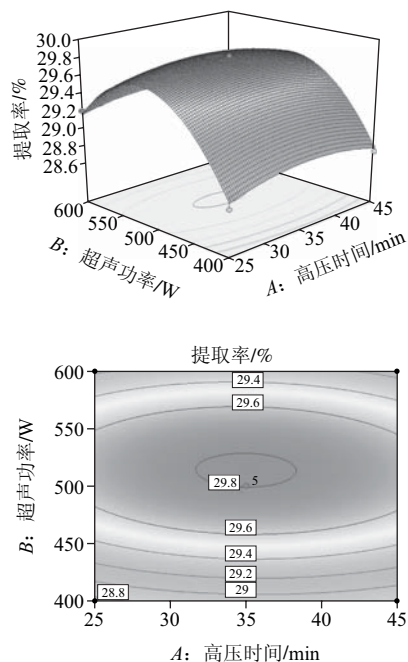


图5 高压时间和超声功率对多糖提取率影响的响应面和等高图
Fig.5 Response surface and contour plots showing the effects of high pressure treatment time and ultrasonic power on polysaccharide yield

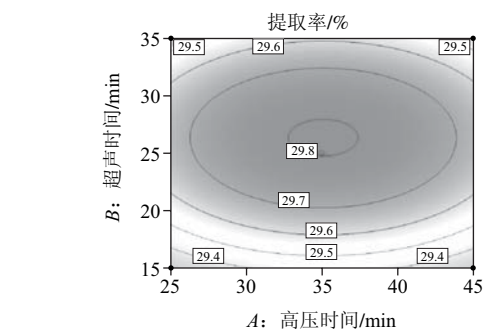
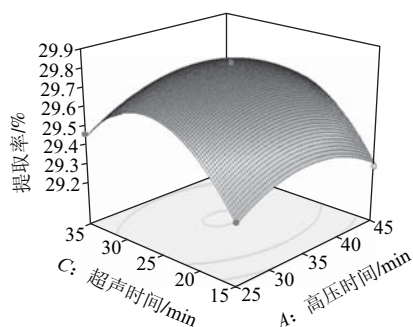


图6 高压时间和超声时间对多糖提取率影响的响应面和等高图

Fig.6 Response surface and contour plots showing the effects of high pressure treatment time and ultrasonic treatment time on polysaccharide yield

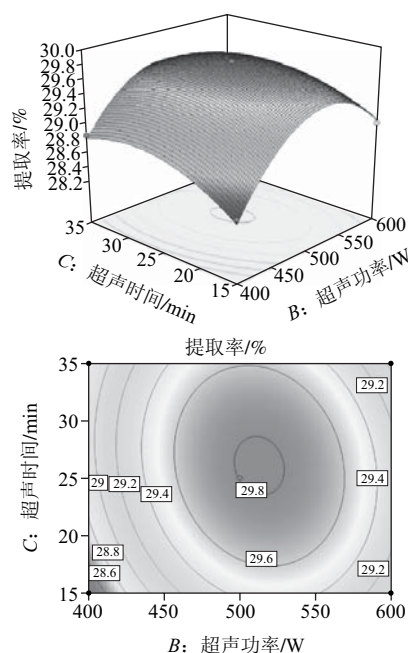


图7 超声功率和超声时间对多糖提取率影响的响应面和等高图

Fig.7 Response surface and contour plots showing the effects of ultrasonic power and ultrasonic treatment time on polysaccharide yield

2.3.4 最佳提取条件的确定和验证实验

由响应面的规范分析可知,酵母多糖的最大估计提取率为29.82%,与之对应的最佳工艺条件为高压时间34.98min、超声功率512.74W、超声时间26.10min。为实际操作方便,确定提取的最优工艺为:高压时间35min、超声功率510W、超声时间26min。采用上述优化条件,进行3次平行试验,得到多糖的平均提取率为29.84%,与理论值相比,其相对误差约为0.067%,与预测的理论值相接近,验证了该模型的有效性。因此,响应面法对酵母多糖提取条件的优化是可行的,回归方程能够比较真实地反映各筛选因素对酵母多糖提取率的影响,具有实际应用价值。

利用碱溶、高压均质、数理统计等方法提取酵母多

糖已有一些报道。黄国荣等^[19]采用高压均质法、碱溶法提取酵母多糖,多糖提取率分别为3.03%、4.38%;刘焱新等^[15]用碱溶、煮沸方法提取啤酒酵母多糖,多糖的提取率为10%;吴小刚等^[20]通过正交试验对酵母破壁和碱溶条件进行优化,多糖提取率为19.4%。本实验对酵母多糖提取过程参数利用响应面优化后,多糖提取率进一步提高。

3 结 论

通过单因素试验,确定了各因素对酵母多糖提取率的影响规律。应用响应面分析法(RSM)对各因素的最佳水平范围及其交互作用进行研究和探讨,建立了酵母多糖提取工艺的二次多项式数学模型,得到最佳提取工艺参数:高压(103.4kPa)时间35min、超声功率510W、超声时间26min,在该条件下多糖提取率为29.84%,与模型预测值吻合;所建立模型合理可靠,拟合程度良好,可为进一步的试验研究提供参考。

参考文献:

- [1] XU Wentao, ZHANG Fangtang, LUO Yunbo, et al. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*[J]. Carbohydr Res, 2009, 344(2): 217-222.
- [2] WASSER S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60(3): 258-274.
- [3] FREIMUND S, SAUTER M, KAPPELI O, et al. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Carbohydr Polym, 2003, 54(2): 159-171.
- [4] KOGAN G, KOCHER A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection[J]. Livestock Sci, 2007, 109(1/3): 161-165.
- [5] BOHN J A, BEMILLER J N. (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships[J]. Carbohydr Polym, 1995, 89(1): 3-14.
- [6] KOGAN G, STASKO A, BAUEROVA K, et al. Antioxidant properties of yeast (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis[J]. Carbohydr Polym, 2005, 61(1): 18-28.
- [7] KHALIKOVA T A, ZHANAEVA S Y, KOROLENKO T A, et al. Regulation of activity of cathepsins B, L, and D in murine lymphosarcoma model at a combined treatment with cyclophosphamide and yeast polysaccharide[J]. Cancer Lett, 2005, 223(1): 77-83.
- [8] KOGAN G, PAJITINKA M, BABINCOVA M, et al. Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: can they fight cancer[J]. Neoplasma, 2008, 55(5): 387-393.
- [9] 王元秀, 张桂香, 李峰, 等. 酵母多糖的提取及其对雏鸡免疫器官发育的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 225-259.
- [10] WILLIAMS D L, PRETUS H A, MCNAMEE R B, et al. Development of a water-soluble, sulfated (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Carbohydr Res, 1992, 235: 247-257.
- [11] WANG Yajun, Yao Shanjiang, WU Tianxing. Combination of induced autolysis and sodium hypochlorite oxidation for the production of *Saccharomyces cerevisiae* (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan[J]. World J Microb Biot, 2003, 19(9): 947-952.
- [12] SILVA E M, ROGEZ H, LARONDELLE Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology[J]. Sep Purif Technol, 2007, 55(3): 381-387.
- [13] OIJKAAS L P, WILKINSON E C, TRAMPER J, et al. Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 64(1): 92-100.
- [14] FU Caili, SHI Huan, LI Quanhong. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein[J]. Food Chem, 2005, 92(4): 701-706.
- [15] 刘焱新, 陈宗道, 王光慈. 啤酒酵母胞壁多糖提取工艺研究[J]. 重庆大学学报, 1994, 17(6): 43-48.
- [16] WALTHER P, MULLE M. Double-layer coating for field-emission cryo-scanning electron microscopy-present state and applications[J]. Scanning, 1997, 19(5): 343-348.
- [17] MURALIDHAR R V, CHIRUMAMILA R R, MARCHANT R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources[J]. Biochem Eng J, 2001, 9(1): 17-23.
- [18] 崔庆新, 刘军海, 黄宝旭, 等. 响应面分析法优化党参多糖提取工艺[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 816-820.
- [19] 黄国荣, 朱俊东, 糜漫天, 等. 啤酒酵母多糖提取工艺的研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(6): 封2-01.
- [20] 吴小刚, 吴周和, 吴传茂. 啤酒酵母多糖提取工艺条件的研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(9): 27-29.