

响应面分析方法在鸡腿菇多糖提取中的应用

余杰, 崔鹏举, 卓健勇, 陈美珍

(汕头大学理学院生物学系, 广东 汕头 515063)

摘要: 针对鸡腿菇子实体多糖的提取, 本实验以提取温度、提取时间, 水料比和提取次数作为影响鸡腿菇子实体多糖提取率的因素, 通过单因素试验选取因素与水平, 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 在单因素试验的基础上采用三因素三水平响应面分析法, 依据回归分析确定各工艺条件的主要影响因素, 以多糖提取为响应值作响应面和等值线图。结果表明, 鸡腿菇子实体多糖水浸提的最佳工艺条件为: 提取温度 94.5℃, 提取时间 3.4h、水料比 15.5:1, 提取次数 2 次, 鸡腿菇子实体多糖的提取率达到 6.16%, 较优化前最大值提高了 7.13%。

关键词: 鸡腿菇多糖; 提取; 响应面分析; Box-Behnken 中心组合试验

Application of Response Surface Methodology to Optimization of Polysaccharide Extraction Technology from *Coprinus comatus*

YU Jie, CUI Peng-ju, ZHUO Jian-yong, CHEN Mei-zhen

(Department of Biology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: Effects of extraction temperature, extraction time, ratio of water to material and extraction times on extraction rate of polysaccharide from *Coprinus comatus* were investigated respectively in single-factor tests, and then other three key factors except extraction times were optimized through response surface methodology with three factors and three levels based on the principle of Box-Behnken design. The results showed that the optimum extraction temperature, time, ratio of water to material and times are 94.5 °C, 3.4 h, 15.5:1 and 2, respectively. Under the above conditions, the extraction rate of polysaccharide from *Coprinus comatus* reaches 6.16%, which is improved by 7.13% through optimization.

Key words: *Coprinus comatus* polysaccharide; extraction; response surface methodology; Box-Behnken design

中图分类号: S646.19

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0093-05

鸡腿菇(*Coprinus comatus*)学名毛头鬼伞, 又名鸡腿菇, 属真菌门、担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、鬼伞科、鬼伞属。因其形如鸡腿、味似鸡丝而得名, 是近年来人工开发生产的一种具有商业潜力的珍稀食用菌新品^[1], 被世界卫生组织及联合国粮农组织确定为集“天然、营养、保健”三种功能于一体的 16 种珍稀食用菌之一, 并被推荐进行大力推广^[2]。鸡腿菇不仅色香味形俱佳, 营养丰富, 而且其多糖具有益胃、清神、治痔、降血糖等功效^[3]。民间用其治疗糖尿病。药理实验证明, 鸡腿菇还有提高机体免疫功能、抑制肿瘤生长、改善血液循环等效果。

鸡腿菇多糖具有提高机体免疫力活性、抑制肿瘤生长及调节血糖的作用, 为当今所面临的癌症及糖尿病治疗提供了一种可供研究的、并有可能开发成药品或保健品的新原料, 因此越来越多的受到国内外各界的高度重视, 被视为极具开发潜力和应用前景的食用菌。但目前的研究主要集中在对鸡腿菇多糖的药用价值的研究和

鸡腿菇多糖发酵培养条件的研究方面^[4-8]。

响应面方法(response surface methodology, RSM)因能通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数、解决多变量问题而被广泛应用。目前, 未见该方法在鸡腿菇子实体多糖提取上的报道。本研究运用 Minitab 软件和 RSM 对影响鸡腿菇子实体多糖提取的因素进行考察和评价, 以确定最优的提取条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡腿菇子实体粉末、鸡腿菇子实体购于福建, 烘箱中 50℃烘干, 粉碎后保存于 4℃冰箱。

苯酚(分析纯) 天津大茂实验仪器厂; 95% 乙醇(分析纯) 汕头市西陇化工有限公司; 硫酸(分析纯) 广州市东红化工厂; 实验用水均为蒸馏水。

1.2 仪器与设备

快速混匀器 常州国华电器有限公司; 电热鼓风干

收稿日期: 2008-06-11

作者简介: 余杰(1955-), 男, 副教授, 学士, 主要从事天然活性物质研究。E-mail: jyu@stu.edu.cn

燥箱 上海一恒科技有限公司;UV-2100分光光度计 尤尼柯仪器有限公司;DK-S22 型电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 子实体多糖提取

称取鸡腿菇子实体干粉 1.00g, 按一定的料水比加入蒸馏水, 在恒温水浴锅里以一定的温度浸提一定的时间, 7000r/min 离心 10min, 提取数次后, 取上清液, 浓缩到原体积的 2/5~3/5, 加入三倍体积 95% 乙醇, 充分搅拌, 4℃过夜, 7000r/min 离心, 收集醇沉物。

1.3.2 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法^[9]。准确称取标准葡萄糖 20mg 于 500ml 容量瓶中加水至刻度, 分别吸取 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 和 1.8ml, 各以水补至 2.0ml, 然后加入 6% 苯酚 1.0ml 及浓硫酸 5.0ml, 静置 10min, 摇匀, 室温放置 20min 后于波长 490nm 处测光密度。以 2.0ml 水按同样显色操作为空白, 横坐标为多糖含量(μg), 纵坐标为光密度, 得标准曲线回归方程为: $y=0.008x$, $R^2=0.9982$ (y 表示光密度, x 表示多糖含量)。

样品含量测定: 醇沉物烘干复溶至 20ml, 稀释 30 倍后, 吸取样品液 1.0ml, 按上述步骤操作测光密度, 代入标准曲线回归方程计算多糖含量。

$$\text{多糖提取率}(\%) = \frac{\text{多糖含量}}{\text{子实体原料重量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 热水提取鸡腿菇子实体多糖的单因素影响

2.1.1 提取时间对鸡腿菇多糖提取率的影响

称取鸡腿菇子实体干粉 1.00g, 提取时间设为 1、2、3、4、5h, 在 80℃、水料比为 1:20 条件下浸提 1 次, 结果见图 1。

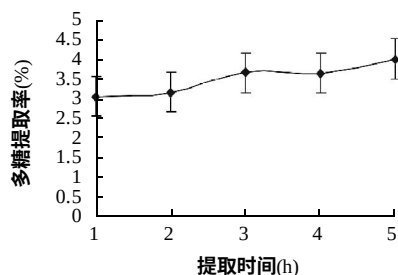


图1 提取时间对提取率的影响

Fig.1 Effects of extraction time on extraction rate of polysaccharide

由图 1 可知, 随着提取时间的延长, 多糖浸出率也逐渐增多, 提取时间为 3h 时, 提取率基本上达到最大值。

2.1.2 水料比对鸡腿菇子实体多糖提取率的影响

称取鸡腿菇子实体干粉 1.00g, 分别按水料比 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1, 在 80℃、3h 条件下浸提 1 次, 结果见图 2。

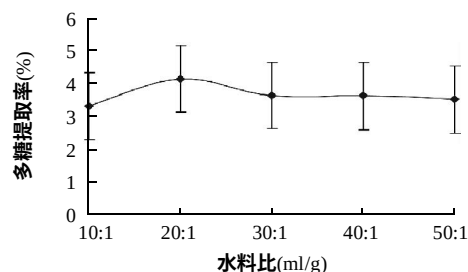


图2 水料比对提取率的影响

Fig.2 Effects of ratio of water to material on extraction rate of polysaccharide

由图 2 可知, 随着水料比的增加, 多糖提取率随之增加, 但达到 20:1 时提取率最高。一般来说, 水料比越高提取率也较高。但是水料比增加, 给后来的蒸发浓缩工序增加困难, 而且成本增加。在保证提取效果的同时, 尽量减少水用量和降低蒸发浓缩的负荷, 因此水料比以控制在 20:1 为宜。

2.1.3 提取温度对鸡腿菇子实体多糖提取率的影响

称取鸡腿菇子实体干粉 1.00g, 提取温度设为 60、70、80、90、100℃, 在水料比为 20:1、提取时间 3h 的条件下浸提 1 次, 结果见图 3。

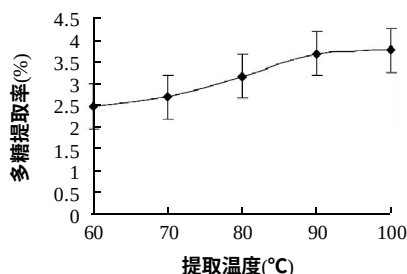


图3 提取温度对提取率的影响

Fig.3 Effects of extraction temperature on extraction rate of polysaccharide

由图 3 可知, 随着温度的提高, 多糖得率增加较为显著, 当温度达到 90℃ 时与 100℃ 基本平行, 达到最大值, 故提取温度以 90℃ 为宜。

2.1.4 提取次数对鸡腿菇子实体多糖提取率的影响

称取鸡腿菇子实体干粉 1.00g, 提取次数设为 1、2、3、4、5 次, 在水料比为 20:1、提取温度 90℃、提取时间 3h 的条件下进行提取, 结果见图 4。

由图 4 可知, 提取 1 次提取率为 4.46%, 提取 2 次累计达 5.31%, 相对 1 次提取的结果较为显著, 但提取 3 次累计得率为 5.5%, 与提取 2 次二者之间无显著差异, 如果过度增加提取次数, 会使生产效率下降, 考虑到经济核算, 选择提取 2 次为宜。

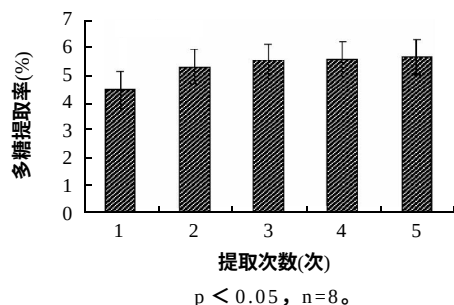


图4 提取次数对提取率的影响

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

2.2 响应面分析法优化鸡腿菇子实体多糖提取工艺条件

2.2.1 分析因素的选取以及分析方案

表1 试验因素水平及编码

Table 1 Levels and factors of *Coprinus comatus* polysaccharide extraction test

自变量	代码		编码水平		
	真实值	编码值	-1	0	1
温度(°C)	X ₁	x ₁	85	90	95
时间(h)	X ₂	x ₂	2.5	3.0	3.5
水料比(ml/g)	X ₃	x ₃	15:1	20:1	25:1

注：表中各自变量编码值与真实值之间的关系分别为： $x_1=(X_1-90)/5$ ， $x_2=(X_2-3)/0.5$ ， $x_3=(X_3-20)/5$ 。

表2 Box-Behnken 设计方案及鸡腿菇子实体多糖得率的试验值

Table 2 Experimental values of extraction rate of *Coprinus comatus* polysaccharide based on Box-Behnken design

标准序	运行序	区组	X ₁ 温度	X ₂ 时间	X ₃ 水料比	试验提取率(%)
2	1	1	1	-1	0	5.52
9	2	1	0	-1	-1	4.69
12	3	1	0	1	1	5.30
6	4	1	1	0	-1	5.84
3	5	1	-1	1	0	4.8
1	6	1	-1	-1	0	4.76
5	7	1	-1	0	-1	4.26
4	8	1	1	1	0	6.84
8	9	1	1	0	1	6.86
15	10	1	0	0	0	5.93
14	11	1	0	0	0	5.78
11	12	1	0	-1	1	6.15
10	13	1	0	1	-1	6.68
13	14	1	0	0	0	5.78
7	15	1	-1	0	1	5.35

本实验采用 Box-Behnken 设计对提取温度、时间和水料比作进一步优化。Box-Behnken 是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法。本实验综合单因素试验结果，选取提取温度、时间和水料比对鸡腿菇子实体多糖提取影响的三个因素，分别以 X₁、X₂ 和 X₃ 代表，每一个自变量的低、中、高试验水平分别以 -1、0、1 进行编码(表 1)，根据相应的试验表进行试验后，对数据进行二次回归拟合，得到包括一次项、二次项、交互项

的二次方程，分析各因素的主效应和交互效应，最后在 一定水平范围内求取最佳值，试验方案及结果见表 2。

2.2.2 模型方程的建立与显著性检验

利用 Minitab 15 统计软件，通过表 2 中鸡腿菇子实体多糖得率实验数据进行多元回归拟合，获得鸡腿菇子实体多糖得率对编码自变量提取温度、时间和水料比的二次多项回归。

2.2.3 响应面分析方案及结果

根据实验结果建立的数学模型为：

$$Y = 5.82625 + 0.73594X_1 + 0.31125X_2 + 0.27188X_3 - 0.23516X_1^2 - 0.10953X_2^2 - 0.01203X_3^2 + 0.31969X_1X_2 - 0.01781X_1X_3 - 0.71156X_2X_3$$

式中：Y 为多糖提取率，g/g；X₁ 为提取温度℃；X₂ 为提取时间，h；X₃ 为水料比，ml/g。

表3 方差分析表

Table 3 Variance analysis of regression equation

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	prob>F
回归	9	8.37036	0.93004	8.5	0.015
线性	3	5.69917	1.89972	17.36	0.004
平方	3	0.23583	0.07861	0.72	0.582
交互作用	3	2.43535	0.81178	7.42	0.027
残差误差	5	0.54708	0.10942		
失拟	3	0.53245	0.17748	24.26	0.004
纯误差	2	0.01463	0.00732		

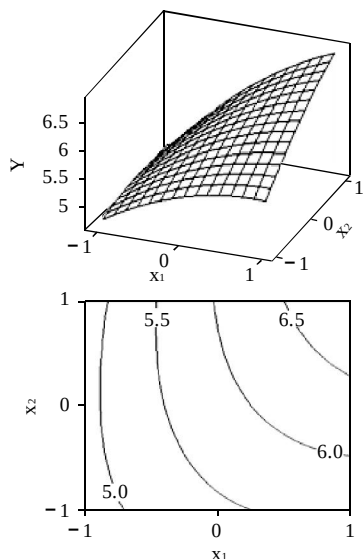
表 3 的方差分析表明，该回归方程显著(p=0.015)。R²=93.87%，表明响应值多糖提取率(Y)实际值与预测值之间具有较好的拟合度，因此该模型可用于预测响应值多糖提取率(Y)的实际情况。由回归方程系数显著性检验(表 4)可知，因素 X₁ 对多糖提取率(Y)线性效应高度显著，因素 X₃ 对多糖提取率(Y)较显著，而因素 X₂ 对多糖提取率(Y)线性效应不显著；因素 X₁²、X₂² 和 X₃² 对多糖提取率(Y)曲面效应不显著；因素 X₁X₂、X₁X₃ 对多糖提取率(Y)交互效应不显著，和 X₂X₃ 对多糖提取率(Y)交互效应高度显著，因此各具体试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系。

表4 回归方程系数显著性检验

Table 4 Regression coefficients and their significance of regression equation

项	系数	系数标准误	T 值	p 值
常量	5.82625	0.1910	30.508	0.000
X ₁	0.73594	0.1169	6.293	0.001
X ₂	0.31125	0.1169	2.661	0.045
X ₃	0.27188	0.1169	2.325	0.068
X ₁ ²	-0.23516	0.1721	-1.366	0.230
X ₂ ²	-0.10953	0.1721	-0.636	0.553
X ₃ ²	-0.01203	0.1721	-0.070	0.947
X ₁ X ₂	0.31969	0.1654	1.933	0.111
X ₁ X ₃	-0.01781	0.1654	-0.108	0.918
X ₂ X ₃	-0.71156	0.1654	-4.302	0.008

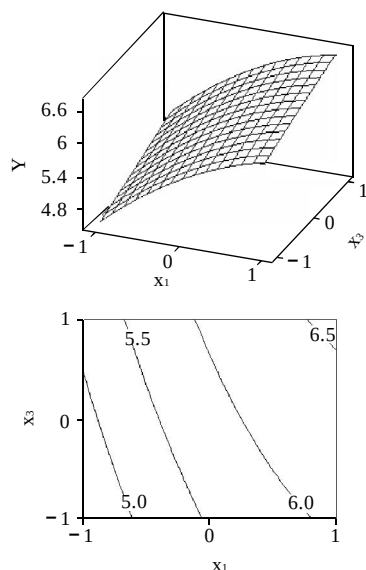
根据回归分析结果(表4),作出响应曲面图和等值线图。从图5~7中可以看出拟合曲面有最大值,对拟合方程求偏导,可以得到模型的最大值,即当提取温度为94.5℃,提取时间3.4h,水料比为15.5:1时,提取2次,其理论提取率达到6.99%。



固定因素: $x_3=0$ 。

图5 $Y=f(x_1, x_2)$ 的响应面与等值线

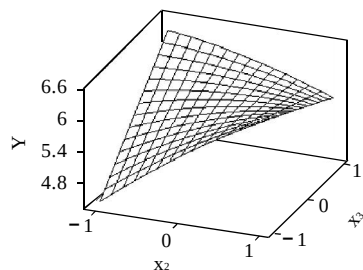
Fig.5 Response surface plot and contour plot of $Y=f(x_1, x_2)$



固定因素: $x_2=0$ 。

图6 $Y=f(x_1, x_3)$ 的响应面与等值线

Fig.6 Response surface plot and contour plot of $Y=f(x_1, x_3)$



固定因素: $x_1=0$ 。

图7 $Y=f(x_2, x_3)$ 的响应面与等值线

Fig.7 Response surface plot and contour plot of $Y=f(x_2, x_3)$

2.3 验证实验

表5 验证实验结果

Table 5 Results of verification experiments

实验号	1	2	3	平均值
提取率(%)	5.93	6.24	6.31	6.16

在上述优化的提取条件下(即当提取温度为94.5℃,提取时间3.4h,水料比为15.5:1时,提取2次)进行三组平行实验,所得结果如表5所示。回归方程所得的预测值6.99%与验证实验的平均值6.16%的误差为11.87%,在误差允许范围内(20%)说明回归方程能较真实地反映各筛选因素对多糖提取率的影响,证明应用响应面法在提高鸡腿菇子实体多糖提取率回归模型较可靠。

3 结论

利用Minitab15软件,通过响应面试验(Box-Behnken)方法对鸡腿菇子实体多糖提取进行优化,并利用统计学方法对该模型进行了显著性检验,优化了内在因素水平,探讨了各因素间的交互作用,并对试验结果进行数学模拟和预测,从而以最经济的方式高效、准确地得到优化条件。优化后得到的最佳提取温度为94.5℃,提取时间3.4h,水料比为15.5:1时,提取2次,在该条件下多糖提取率达到6.16%,比优化前最高提取率5.75%高7.13%。

参考文献:

- [1] 李素春, 何生根. 一种极具开发价值的珍稀菇——鸡腿菇[J]. 广东农业科学, 1999(2): 25-26.
- [2] 何文. 鸡腿菇营养价值高开发前景广阔[J]. 资源开发与利用, 2000(4): 11-12.
- [3] 辛晓林, 蔡颖娜, 高娟. 秸秆珍稀菇——鸡腿菇的研究现状及展望[J]. 当代生态农业, 2003, (1): 10-11.
- [4] 余杰, 崔鹏举, 陈美珍, 等. 鸡腿菇多糖的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(20): 84-86.
- [5] 李师鹏, 安利国, 张红梅. 鸡腿菇多糖对昆明小鼠血清溶菌酶活性影响的研究[J]. 中国食用菌, 2001, 20(4): 36-37.
- [6] 邢福国, 王海霞, 韩春超, 等. 鸡腿菇多糖免疫功能的初步研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 139-141.
- [7] 李师鹏, 苏蕾. 鸡腿菇多糖的提取及其免疫活性抗肿瘤活性的研究[J]. 中国商办工业, 2000(1): 44-45.
- [8] 崔昱, 张好建, 安利国. 鸡腿菇多糖对肿瘤生长的抑制作用[J]. 世界华人消化志, 2002, 10(3): 287-290.
- [9] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 11-12; 329-337.