

# 响应曲面法优化灰树花水溶性多糖提取工艺的研究

崔凤杰<sup>1,2</sup>, 许泓瑜<sup>2</sup>, 舒畅<sup>2</sup>, 许正宏<sup>2</sup>, 陶文沂<sup>1,2,\*</sup>

(1. 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036

2. 江南大学生物工程学院生物制药研究室, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 在单因素试验的基础上, 利用响应曲面法对灰树花多糖提取工艺参数进行优化研究。响应面分析结果表明, 提取温度、提取时间以及水料比与响应值灰树花多糖得率存在显著的相关性, 通过典型性分析得到优化灰树花多糖提取条件: 提取温度为 89.7℃; 时间 2.48h; 以及水料比 31.1:1, 提取两次, 在此条件下灰树花多糖提取得理论值达到 10.62%, 验证试验条件下实际最大多糖得率为 (10.13 ± 0.7)%。

**关键词:** 灰树花多糖; 响应曲面法; Box-Behnken 设计; 优化

Optimization of Processing Parameters for Extraction of Soluble *Grifola frondosa* Polysaccharides  
by Response Surface Methodology

CUI Feng-jie<sup>1,2</sup>, XU Hong-yu<sup>2</sup>, SHU Chang<sup>2</sup>, XU Zheng-hong<sup>2</sup>, TAO Wen-yi<sup>1,2,\*</sup>

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Laboratory of Biopharmaceutics, School of Biotechnology, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

收稿日期 2005-06-24

\*通讯作者

基金项目: 江苏省无锡市自然科学基金资助项目(CK030002)

作者简介: 崔凤杰(1980-), 男, 博士研究生, 研究方向为生物制药。

筛对甲醇的吸附达到了饱和, 另一方面反映出从 30min 到 60min 甲醇发生了从分子筛上的解吸, 并于 60min 后达到吸附与解吸的动态平衡。在动态吸附状态下, 由于后续溶液的不断冲刷, 解吸作用应该比静态时更加活跃, 因此导致了本文进行的动态吸附比静态吸附对甲醇的去除率低的结果。这种解吸规律及其与被吸附分子的初始浓度的关系值得进一步研究。

## 参考文献:

- [1] D Hang, C T Leem, E E Wooda, et al. Production of alcohol from apple [J]. Pomace Applied And Environmental Microbiology, 1981, 42, (8): 1128-1129.
- [2] M N Ngadi, I R Correia. Solid state ethanol fermentation of apple pomace as affected by moisture and bioreactor mixing speed[J]. Journal of Food Science, 1992, 57(3): 667-670.
- [3] 孙俊良, 赵瑞香, 李刚, 等. 苹果白兰地生产技术[J]. 食品工业, 2002, (4): 16-17.
- [4] 马艳萍, 马惠玲, 陈长友, 等. 苹果渣固态酒精发酵工艺的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然版), 2004, (11): 81-84.
- [5] 马惠玲, 李嘉瑞, 马艳萍, 等. 苹果渣蒸馏酒挥发性成分的气质分析[J]. 中国食品学报, 2005, (1): 68-71.
- [6] 张文标, 王伟龙. 高纯度竹醋生产[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(1): 46-50.
- [7] 王维德. 浓度对传质系数的影响及多元物质传质[J]. 化工学报, 2003, 54(5): 601-605.
- [8] 夏玉宇. 化验员手册[M]. 化学工业出版社, 1999. 91-92.
- [9] 王君高. 正确理解挥发系数与精馏系数[J]. 酿酒科技, 1998, 87(3): 52-54.
- [10] 王君高. 对甲醇在酒精蒸馏过程中的动态的剖析[J]. 酿酒科技, 1996, 77(5): 46-47.
- [11] 许开天. 论甲醇在酒精蒸馏过程中的动态(上)[J]. 酿酒科技, 1995, (5): 22-24.
- [12] 许开天. 论甲醇在酒精蒸馏过程中的动态(下)[J]. 酿酒科技, 1996, (1): 40-42.
- [13] 陶红, 高延耀, 余亮, 等. 微孔分子筛的合成及其去除水中氨氮的实验研究[J]. 环境污染治理技术与设备, 2004, (3): 48-50.

**Abstract:** In this work, based on the results of one-factor-at-a-time-technique method, a three-level Box-Behnken factorial design was employed combining with response surface methodology (RSM) to optimize the extraction conditions for the yield of *Grifola frondosa* polysaccharides (GFPS). A mathematical model was then developed to show the significant effect of each factor and their interactions on the yield of GFPS. Canonical analysis was used to estimated that a maximal yield of polysaccharides (10.62%) could be obtained when the extraction conditions of temperature, time and ratio of water to material were set at 89.7°C, 2.48h and 31.1:1, respectively with two-time extraction. These predicted values were also verified by validation experiments.

**Key words** *Grifola frondosa* polysaccharides (GFPS); response surface methodology; Box-Behnken design; optimization  
中图分类号: 0629.12 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2006)04-0142-06

灰树花(*Grifola frondosa*)又名栗子蘑,贝叶多孔菌,莲花菌,日本称舞茸,其香味浓郁,质地脆嫩,营养价值高,在民间有悠久的食用历史<sup>[1]</sup>。1709年,日本贝原益轩的《大和本草》中就记载了灰树花(称为舞茸)。其药用作用最早记载于日本坂然的《菌谱》中,“味甘、平、无毒,可治痔疮”。

近年来国内外研究发现,灰树花子实体和菌丝体中含有丰富的抗肿瘤多糖<sup>[2]</sup>,具有广阔的开发价值和应用空间。影响真菌胞内多糖提取率的因素很多,如提取溶剂的选择、提取温度、提取时间及料液比等,必须经过大量试验进行探索提取的最佳工艺,而大多数提取工艺的优化采用的为正交试验方案等<sup>[3,4]</sup>,响应曲面法(RSM)优化多糖提取工艺的研究报道较少<sup>[5]</sup>。

响应曲面法(RSM)是统计设计试验技术的合成<sup>[6]</sup>,采用合理的试验设计,能以最经济的方式,用很少的试验数量和时间对实验进行全面研究,科学的提供局部与整体的关系,从而取得明显的、有目的的结论,并以回归方法作为函数估算工具,将多因子试验中,因子与试验结果的相互关系,用多项式近似把因子与试验结果的关系函数化。Box及其合作者与20世纪50年代完善了响应面方法学<sup>[7]</sup>,已经广泛应用在诸多工艺过程优化控制等领域<sup>[8,9]</sup>。RSM虽广泛用于众多过程优化控制,但关于灰树花多糖提取工艺条件的优化还不曾见有报道,本文主要采用RSM法,以灰树花胞内多糖得率为考察指标,对影响灰树花菌丝体胞内多糖提取得率的一些关键因素进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 灰树花菌丝体(*Grifola frondosa* GF9801) 江南大学生物制药实验室发酵制备。

### 1.1.2 仪器设备

红外水分测试仪(Sartorius MA50) 德国;高速离心机(HITACHI CR22G) 日本;SIGMA高速离心机;真空

浓缩仪(BUCHI Rotavapor R-200) 瑞士;冷冻干燥仪(EZ585Q) FTS System. Inc,美国。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 灰树花菌丝体胞内多糖提取工艺流程

将深层发酵培养的同批次灰树花菌丝体用去离子水冲洗干净后,取定量湿菌体测定单位体积湿菌体中菌体干重。称取一定量的湿菌体,按一定的料水比加入去离子水,用组织粉碎机匀浆菌丝体,按设计的工艺参数进行热水浴加热浸提,取上清液,真空浓缩后按比例加入95%乙醇,剧烈搅拌,4°C过夜,12000r/min离心,收集醇沉物,加水复溶,冷冻干燥,测定其重量。

#### 1.2.2 胞内多糖得率的计算

$$\text{胞内多糖得率} = \frac{\text{多糖重量(g)}}{\text{菌丝体干重(g)}} \times 100\%$$

### 1.3 试验设计

#### 1.3.1 单因素影响试验

主要考察提取温度、水料比、提取时间以及提取次数等因素对多糖得率的影响。

#### 1.3.2 响应曲面法试验设计

因此选择因素时主要选择单因素试验中对响应值(多糖得率)有显著影响的因素。采用SAS(SAS Package, Version 8.01)对实验数据进行回归分析。每一自变量的低、中、高实验水平分别以-1、0、1进行编码,该模型通过最小二乘法拟合二次多项方程可以表达为:

$$Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j$$

其中Y为响应值(灰树花多糖得率), $A_0$ 、 $A_i$ 、 $A_{ii}$ 、 $A_{ij}$ 为方程系数, $X_i$ 、 $X_j$ ( $i \neq j$ )为自变量编码值。多项式模型方程拟合的性质由确定系数 $R^2$ 表达,其统计学上的显著性由F值检验;采用SAS典型性分析预测灰树花胞内多糖得率的最佳提取条件以及最大值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 热水提取灰树花菌丝体胞内多糖的单因素影响

### 2.1.1 提取温度对胞内多糖得率的影响

固定水料比为 20:1, 提取时间 2h, 提取一次, 温度设定在 70~100℃ 之间研究温度对胞内多糖得率的影响。温度直接影响物质在水中的溶解度, 因此对多糖的得率会有比较显著的影响。本实验选择不同的提取温度, 结果如图 1 所示, 随着温度的提高多糖得率增加显著, 但温度过高多糖得率稍微下降, 可能时高温条件下部分多糖水解的结果, 这也大多数多糖提取工艺研究结果一致。

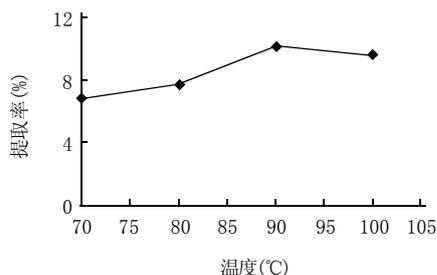


图1 提取温度对胞内多糖得率的影响

Fig.1 Effect of temperature on GFPS yield

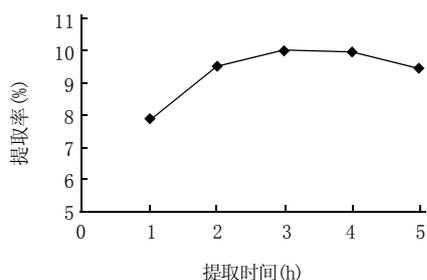


图2 提取时间对胞内多糖得率的影响

Fig.2 Effect of extraction period on GFPS yield

### 2.1.2 提取时间对胞内多糖得率的影响

在温度为 90℃、水料比 20:1 条件下, 考察提取时间对胞内多糖提取率的影响, 结果如图 2 所示。由图 2 可见, 在时间低于 3h 多糖得率提高比较明显, 以后增加趋于平缓。这表明, 目的产物浸出过程与时间密切相关, 时间过短, 产物溶解不充分, 但时间过长, 又会引起产物结构的变化进而使得率降低。

### 2.1.3 水料比对胞内多糖得率的影响

由于多糖等生物大分子物质的溶解度不高, 因此, 浸提过程中用水量是限制多糖得率的重要因素。在固定温度 90℃、提取时间 2h, 提取一次的条件下, 改变不同的料水比, 发现料水比的增加对提高胞内多糖得率有明显的效果, 在料水比为 30:1 时得率基本上达到最大值。

### 2.1.4 提取次数对胞内多糖得率的影响

在水料比为 30:1, 提取温度 90℃、提取时间为 2h 的条件下考察提取次数对多糖得率的影响, 实验结果如图 4 示, 第一次提取得率为 7.93%, 复提之后两次累计

达 10.8%, 相对一次提取的结果比较显著, 但提取三次累计的得率仅为 11.15%, 二者之间并无显著差异。如果过度增加提取次数, 会使得生产效率下降, 考虑到经济核算, 因此考虑提取两次为宜。

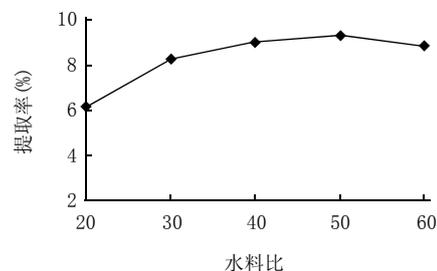
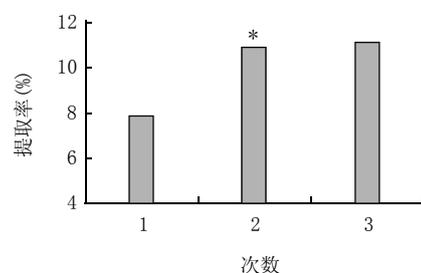


图3 水料比对胞内多糖得率的影响

Fig.3 Effect of ratio of water to material on GFPS yield



(\* 与提取一次相比较  $p < 0.05$ )

图4 提取次数对胞内多糖得率的影响

Fig.4 Effect of extraction times on GFPS yield

## 2.2 响应曲面法优化灰树花菌丝体多糖提取工艺条件

### 2.2.1 响应曲面法分析因素的选取以及分析方案

根据 Box-Behnken 的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、提取时间和水料比对灰树花多糖浸提影响因素的三个因素, 分别以  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  代表, 每一个自变量的低、中、高实验水平分别以 -1、0、1 进行编码(表 1)。且编码值与真实值之间的关系符合下列方程  $X_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$ ; 式中  $i$  为自变量的编码值,  $X_i$  为自变量的实际试验水平值,  $X_0$  为实验水平中心点的实际值,  $\Delta X_i$  为单变量增量, 以灰树花多糖得率为响应值( $Y$ ), 试验方案及结果见表 2。

### 2.2.2 试验结果分析

表1 试验因素水平及编码

Table 1 Variables and experimental design levels for response surface

因素	代码	编码水平		
		-1	0	1
温度(°C)	$X_1$	70	80	90
时间(h)	$X_2$	1	2	3
水料比(ml/g)	$X_3$	20	30	40

表2 Box-Behnken 设计方案及灰树花多糖得率的测定值  
Table 2 Box-Behnken design matrix and the responses of the dependent variables of GFPS yield

试验号	编码水平			多糖得率 (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	-1	-1	0	6.51
2	-1	1	0	8.28
3	1	-1	0	9.06
4	1	1	0	10.18
5	0	-1	-1	7.05
6	0	-1	1	8.35
7	0	1	-1	7.9
8	0	1	1	9.71
9	-1	0	-1	5.16
10	1	0	-1	9.87
11	-1	0	1	7.48
12	1	0	1	9.91
13	0	0	0	9.56
14	0	0	0	9.81
15	0	0	0	9.72

表3 回归方程各项的方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model for optimization of the yield of *Grifola frondosa* polysaccharides

方差来源	平方和	自由度	均差	F 值	p 值
一次项	25.24	3	-68.15	0.0002**	
二次项	5.31	3	-	14.34	0.0069*
交互项	1.40	3	-	3.78	0.0932
回归	31.95	9	-	28.76	0.0009**
残差					
总残差	0.62	5	0.12	-	-

R<sup>2</sup>=0.9810, Adj. R<sup>2</sup>=0.9008

Note: \*\*Significant at 1% level; \*Significant at 5% level.

表2 为不同试验条件下所测定的灰树花多糖得率, 利用SAS(SAS package, version 8.01)软件对表2中多糖提取得率试验数据进行多元回归拟合; 表3为回归分析结果, 回归方差分析显著性检验表明, 该模型回归显著。并且该模型的R<sup>2</sup>=0.9810说明, 该模型与实际实验拟合较好, 自变量与响应值之间线性关系显著, 可以用于灰树花多糖热水浸提实验的理论预测。

回归方程各项的方差分析结果还表明方程的一次项、二次项的影响都是高度显著的, 并且交互项中X<sub>1</sub>与X<sub>3</sub>项显著, 因此各个具体实验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。

各因素经回归拟合后, 选择对响应值显著的各项, 得到灰树花多糖热水浸提得率对编码自变量(提取温度、时间和水料比)的二次多项回归方程为:

$$Y=9.70+1.54X_1+0.55X_2+0.69X_3-0.76X_1^2-0.58X_1X_3-0.60X_2^2-0.84X_3^2$$

根据回归分析结果(表4), 作出相应曲面图和等高

表4 回归系数取值及分析结果

Table 4 Results of regression analysis of a full second-order polynomial model for optimization of the yield of *Grifola frondosa* polysaccharides

项目	系数估测值	p 值	t-检测
常数项	9.70	<0.0001**	47.81
A <sub>1</sub>	1.54	0.0006**	12.42
A <sub>2</sub>	0.55	0.0068**	4.43
A <sub>3</sub>	0.69	0.0026**	5.54
A <sub>12</sub>	-0.76	0.0088**	-4.17
A <sub>13</sub>	0.012	0.9460	0.07
A <sub>23</sub>	-0.58	0.0218*	-3.29
A <sub>22</sub>	-0.60	0.0216*	-3.29
A <sub>33</sub>	0.13	0.5005	0.73
A <sub>33</sub>	-0.84	0.0058*	-4.61

Note: \*\*Significant at 1% level; \*Significant at 5% level.

线图, 如图5~10所示。从图上可以看出, 提取温度、时间对灰树花多糖提取得率的影响最大, 随着温度和时间增加, 多糖得率也随之增加, 这说明二者对多糖提取得率是正相关性; 水料比对多糖得率也有很大的影响, 但随着水料比的增加, 多糖得率却降低。

为了进一步确证最佳点的值, 采用SAS软件的Rsreg语句对试验模型进行典型性分析, 以获得最大灰树花多糖提取得率时的各提取条件, 经典型性分析得, 在X<sub>1</sub>=0.974, X<sub>2</sub>=0.478, X<sub>3</sub>=0.110, 即灰树花多糖提取最佳条件为: 提取温度89.7℃; 时间2.48h; 水料比31.1:1, 在此条件下, 灰树花多糖提取得理论值达到10.62%。

### 2.2.3 回归模型的试验验证

提取次数为两次, 按照最佳提取条件进行试验验证, 最终灰树花多糖得率为(10.13 ± 0.7)%。试验值与模型的理论值相差4.61%, 可见该模型可以较好的反映

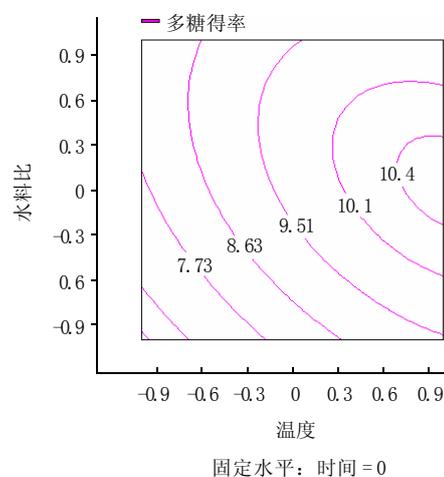


图5 温度与水料比对灰树花多糖得率影响等高线图

Fig.5 Contour plot of the combined effects of temperature and ratio of water to material on the yield of GFPS

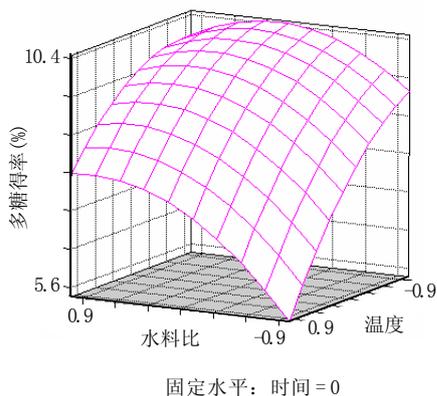


图6 温度与水料比对灰树花多糖得率影响的响应面图  
Fig.6 Surface plot of the combined effects of temperature and ratio of water to material on the yield of GFPS

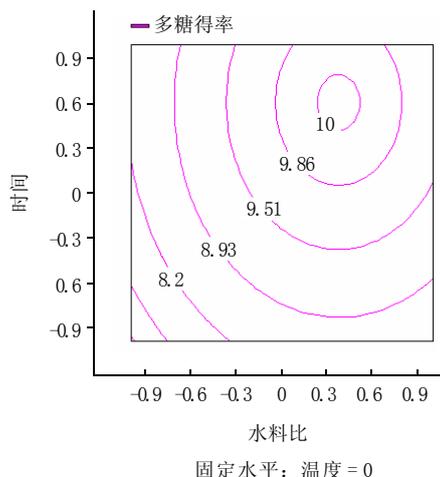


图9 时间与水料比对灰树花多糖得率影响等高线图  
Fig.9 Contour plot of the combined effects of extraction period and ratio of water to material on the yield of GFPS

出灰树花多糖提取的条件。从而也证明了响应曲面法在多糖提取条件参数的可行性。

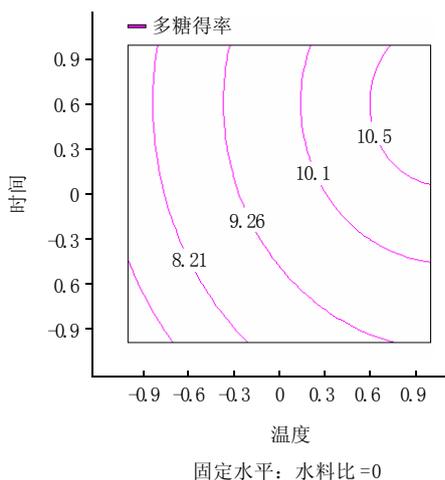


图7 温度与时间对灰树花多糖得率影响等高线图  
Fig.7 Contour plot of the combined effects of temperature and period on the yield of GFPS

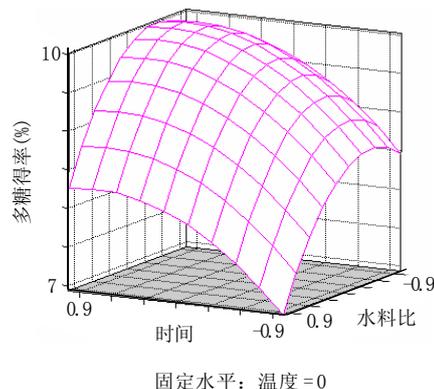


图10 时间与水料比对灰树花多糖得率影响等高线图  
Fig.10 Surface plot of the combined effects of extraction period and ratio of water to material on the yield of GFPS

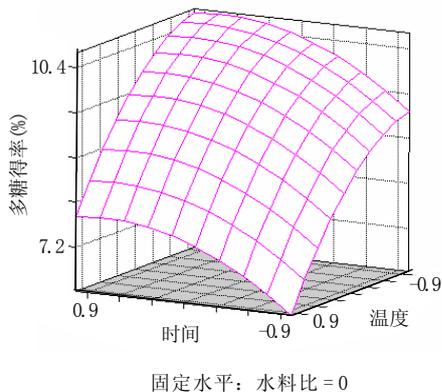


图8 温度与时间对灰树花多糖得率影响响应面图  
Fig.8 Surface plot of the combined effects of temperature and period on the yield of GFPS

### 3 结论

本研究将响应曲面法运用到灰树花多糖的提取工艺上, 取得了比较令人满意的结果。经过优化后的灰树花热水提取多糖的最佳条件为: 提取温度 89.7 °C; 时间 2.48h; 水料比 31.1:1, 提取两次, 在此条件下灰树花多糖提取得理论值达到 10.62%。

### 参考文献:

- [1] Andrea T B, Judith S S, Robert M H, et al. Mushrooms, tumors, and immunity[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1999, 221: 281-293.
- [2] Hishida I, Nanba H, Kuroda H. Anti-tumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (maitake) [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1998, 36: 1819-27.
- [3] 孙培龙, 杨开, 赵培城, 等. 姬松茸子实体多糖提取方法的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 71-76.
- [4] 高丽君, 王汉忠, 崔建华, 等. 白首乌可溶性多糖提取工艺研究[J].

# 十味中草药提取液的体外抗菌活性研究

李京晶, 籍保平\*, 李 博, 周 峰, 赵 磊  
(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘 要:** 本文选用黄连、黄柏、黄芩、连翘、厚朴、甘草、艾叶、川芎、金银花及五味子十味中草药水提液, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、啤酒酵母、黄曲霉及绿色木霉这六种菌进行了体外抗菌试验。目的是通过对抗菌效果的比较, 筛选出抗菌活性好的中草药及有效的提取方法。实验结果表明这十味中草药提取液对六种供试菌有不同程度的抗菌效果, 其抗细菌活性比抗真菌活性强, 其中黄连、黄柏和黄芩提取液的总抗菌活性最强; 结果还表明70%乙醇水溶液比水提取药液的抗菌活性要强。

**关键词:** 中草药; 提取液; 抗菌活性; 体外抗菌

## *In vitro* Antimicrobial Activity Study on 10 Extracts of Chinese Herb Medicines

LI Jing-jing, JI Bao-ping\*, LI Bo, ZHOU Feng, ZHAO Lei  
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Extracts of 10 selected Chinese herb medicines (*Rhizoma Coptidis*, *Cortex Phellodendri*, *Radix Scutellariae*, *Fructus Forsythiae*, *Cortex Magnoliae officinalis*, *Radix Glycythizae*, *Folium Artemisiae Argyi*, *Ligustici Chuanxiong Rhizoma*, *Flos Lonicerae*, *Fructus Schisandrae*) were tested *in vitro* against six different microorganisms [bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and mold (*Aspergillus flavus* and *Trichoderma viride*). The aim was to compare the antimicrobial effects of plant extracts so as to find the efficient method of extraction. The results showed that the 10 plant extracts have certain antimicrobial efficacy, and their antibacterial activity is better than their antifungal activity. The extracts of *Rhizoma Coptidis*, *Cortex Phellodendri* and *Radix Scutellariae* exhibit the best antimicrobial activity; whereas the antimicrobial activity of the 70% aqueous methanol extracts is better than by the water extracts.

**Key words** Chinese herb medicines extract; antimicrobial activity; *in vitro*

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)04-0147-04

食品的腐败变质主要是由有害微生物所致<sup>[1]</sup>。目前食品防腐保鲜采用的主要是化学合成试剂, 如苯甲酸、山梨酸及其盐类等, 但有研究表明有些化学合成的食品防腐剂具有致癌、致畸, 致突变等毒副作用<sup>[2]</sup>。随着消费者对食品质量的日益重视, 寻求能够替代化学防腐剂的天然

食品防腐剂, 成为了食品科学研究和应用的一个热点<sup>[3]</sup>, 对天然植物的抗菌活性的研究也取得了一些进展<sup>[4]</sup>。本实验选取了常用于临床抗菌的十味植物源中草药<sup>[5]</sup>, 并以六株食品中常见污染菌为供试菌, 进行体外抗菌试验, 从而为天然植物防腐剂开发和应用提供理论。

收稿日期 2005-10-31

\*通讯作者

作者简介: 李京晶(1977-), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能食品。

食品科学, 2004, 25(10): 178-180.

[5] 李亚娜, 林永成, 余志刚. 响应面分析法优化羊栖菜多糖的提取工艺[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2004, 32(11): 28-32.

[6] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002. 135-142.

[7] Box G P, Behnken D W. Some new three level design for the study of quantitative variables[J]. Technometrics, 1960, (2): 456-475.

[8] Fabio M, Antonio M M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle[J]. International Journal of Food Science and Technology, 1996, 31: 419-426.

[9] Chandrika L P, Fereidoon S. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2005, 93(1): 47-56.