

响应面法优化猪肚菇多糖的提取工艺

杨润亚, 杨树德, 董洪新, 袁如月
(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 在单因素试验基础上, 采用响应面分析法优化猪肚菇子实体中水溶性多糖的超声提取工艺。结果表明, 在提取温度 72℃、料液比 1:44、浸提时间 57min 的最佳提取工艺条件下, 响应面拟和所得方程对猪肚菇多糖的最大提取率预测值 78.22mg/g, 实测值 75.79mg/g, 实测结果与预测值符合良好。

关键词: 猪肚菇; 超声提取; 多糖; 响应面分析

Optimization for Ultrasonic-assisted Extraction of Polysaccharides from *Panus giganteus* Fruiting Bodies via Response Surface Analysis

YANG Run-ya, YANG Shu-de, DONG Hong-xin, YUAN Ru-yue
(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from the fruiting bodies of *Panus giganteus* was optimized by response surface analysis based on one-factor-at-a-time experiments. Under the optimal conditions: 72 °C extraction temperature, 1:44 material-to-water ratio and 57 min ultrasonic treatment time, the maximum extraction yield of polysaccharides was predicted to be 78.22 mg/g and observed to be 75.79 mg/g. Therefore, there was a good accordance between the predicted and observed values.

Key words: *Panus giganteus*; ultrasonic-assisted extraction; polysaccharide; response surface analysis

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)14-0029-05

食用菌是人类实践活动中最早认识和利用的一类菌物, 具有种类繁多、世代短、生物量大、易培养、分布广和营养成分丰富等特点。食用菌多糖具有抗病毒、抗肿瘤、抗辐射、抗溃疡、抗衰老、增强免疫力、降血脂、降血糖等生理活性, 是新药和功能食品开发的重要原料, 目前已成为农学、医学、食品科学等领域的研究热点之一^[1-3]。

猪肚菇是国内近年来新开发的一种珍稀食用菌, 其营养丰富, 口感风味独特, 有猪肚般的滑腻, 因此而得商品名“猪肚菇”。菌柄去掉表皮后食用有似竹笋般的清脆, 故市场上将去皮的菌柄称为“笋菇”。在新发表的《中国食用菌名录》中, 猪肚菇学名为大革耳[*Panus giganteus* (Berk.) Corner], 猪肚菇的分类地位隶属于担子菌门(Basidiomycota)、担子菌纲(Basidiomycetes)、多孔菌目(Polyporales)、多孔菌科(Polyporaceae)、革耳属(*Panus*)^[4]。目前, 国内外对猪肚菇的研究主要集中在营养价值、生物学特性及栽培技术等方面^[4], 而对猪肚菇多糖方面的研究报导则相对较少^[5-7]。

响应面法是利用合理的试验设计及试验数据, 采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数, 解决多变量问题的一种试验设计方法^[8-9]。随着计算机的发展, 它已被广泛用于农业、生物、食品、化学、制造等领域, 进行活性物质提取或目标过程的优化^[10-14], 但在猪肚菇多糖的提取工艺研究方面尚未见报道。本实验以猪肚菇子实体为材料, 利用超声波辅助提取技术提取猪肚菇多糖, 在单因素试验基础上, 采用响应面分析法对猪肚菇多糖的提取工艺进行优化, 以确定猪肚菇多糖超声提取的最佳工艺参数, 为猪肚菇的深层开发利用提供理论和实践依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

猪肚菇子实体: 由鲁东大学食用菌研究所提供。置于烘箱里 50℃ 烘干, 粉碎后称取 80g, 按照料液比为 1:30 加入 80% 的乙醇, 放入超声波清洗器中提取 1h(功

收稿日期: 2010-09-20

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2010NY003); 鲁东大学食药真菌创新团队资助项目(08CXB003)

作者简介: 杨润亚(1974—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为生物农药和菌物生态学。E-mail: yry74@163.com

率 80%、温度 70℃), 之后抽滤, 除去滤液, 重复两次。将滤渣置于烘箱里 50℃ 烘干备用。

无水乙醇、蒽酮、浓硫酸、葡萄糖(均为分析纯)。

1.2 仪器与设备

7200 紫外-可见分光光度计 尤尼克(上海)仪器有限公司; DHG-9143BS-III 型数显电热恒温鼓风干燥箱 上海新苗医疗器械制造有限公司; FA1604 型电子天平 上海天平仪器厂; KQ-500B 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; SHB-IV 双 A 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; XA-1 型高速万能粉碎机 江苏姜堰市银河实验仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 葡萄糖标准曲线的制作

准确称取葡萄糖 10mg, 加蒸馏水定容至 100mL 容量瓶中。取 7 支试管, 分别加入上述葡萄糖溶液 0.0、0.1、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5mL, 并分别加蒸馏水补充至 2.0mL。加入 0.2% 的蒽酮-硫酸试剂(称取蒽酮 0.2g, 加浓硫酸定容至 100mL 容量瓶中即得, 现用现配) 4.0mL, 摇匀后沸水浴 10min, 冷却至室温, 用分光光度计测定 620nm 波长处相应的吸光度。以测得的吸光度为横坐标、葡萄糖的质量浓度/(mg/mL)为纵坐标, 绘制葡萄糖标准曲线。所得数据经回归处理, 得到标准曲线回归方程为 $y=0.2471x+0.0009$, $R^2=0.9963$, 其中, y 为被测样品中葡萄糖的质量浓度、 x 为吸光度。

1.3.2 样品多糖含量的测定

称取 1.0g 猪肚菇子实体粉末于锥形瓶中, 于不同条件下进行超声波辅助提取, 抽滤后将滤液用蒸馏水定容至 50mL, 准确吸取 0.1mL, 用蒸馏水补充至 2.0mL, 再分别加入 0.2% 的蒽酮-硫酸试剂 4.0mL, 摇匀后沸水浴 10min, 冷却至室温, 用分光光度计在波长 620nm 处测定相应的吸光度, 根据标准曲线回归方程, 由吸光度求出提取液中多糖的质量浓度, 并按照下列公式计算各处理的多糖提取率。

$$\text{多糖提取率}/(\text{mg/g}) = \frac{\text{求出的多糖质量浓度} \times \text{定容体积}}{\text{测定的体积} \times 1}$$

1.3.3 单因素试验

以水为提取溶剂, 考察提取温度(35、45、55、65、75℃)、料液比(1:20、1:30、1:40、1:50、1:60)、提取时间(20、30、50、80、100min)以及超声功率(60%、70%、80%、90%、100% 即 300、350、400、450、500W)对多糖提取率的影响。每处理做 3 个重复。

1.3.4 响应面试验

在单因素试验基础上, 选取超声温度、料液比、超声时间 3 个因素为自变量, 以单因素试验得出的各最

佳条件为中心点, 以猪肚菇子实体中多糖提取率为响应值, 采用 Design Expert 软件设计 3 因素 3 水平响应面分析试验方案, 按照试验方案进行试验, 试验结果采用 Design Expert 7.0 软件进行数据处理和分析, 优化猪肚菇子实体多糖超声提取的工艺参数, 确定最佳试验方案。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取温度对多糖提取率的影响

在超声功率 400W(80%)、超声时间 30min、料液比 1:40 的条件下, 分别选取超声温度为 35、45、55、65、75℃ 进行超声提取试验, 测定并计算各处理的多糖提取率, 结果如图 1 所示。

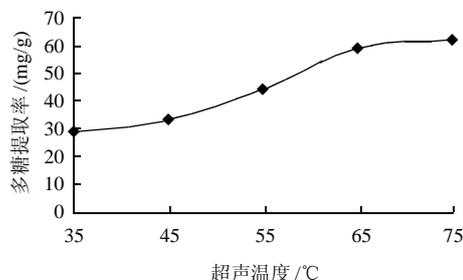


图 1 超声温度对多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic temperature on extraction yield of polysaccharides

由图 1 可知, 随着超声温度的升高, 多糖提取率逐渐增大, 但在 65~75℃ 范围内的提取率变化不大。因此最佳提取温度选为 70℃。

2.1.2 提取时间对多糖提取率的影响

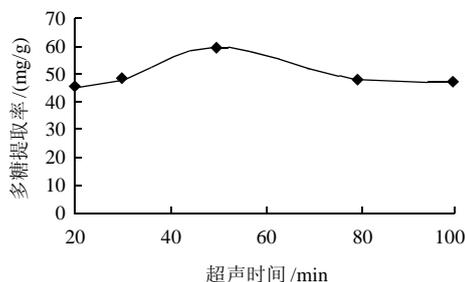


图 2 超声时间对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic treatment time on extraction yield of polysaccharides

在超声功率 400W(80%)、超声温度 75℃、料液比 1:40 的条件下, 分别选取超声时间为 20、30、50、80、100min 进行超声提取试验, 测定并计算各处理的多糖提取率, 结果如图 2 所示。由图 2 可知: 随着超声提取

时间的延长, 多糖提取率先增大后减小, 在 50min 时提取率最大。因此, 猪肚菇多糖提取的最佳提取时间为 50min。

2.1.3 料液比对多糖提取率的影响

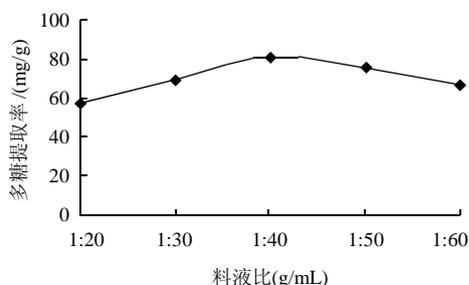


图3 料液比对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of liquid-to-solid ratio on extraction yield of polysaccharides

在超声功率 400W(80%)、超声温度 75℃、超声时间 30min 的条件下, 分别选取料液比 1:20、1:30、1:40、1:50 和 1:60 进行超声提取试验, 测定并计算各处理的多糖提取率, 结果如图 3 所示。由图 3 可知: 随着料液比的变化, 多糖提取率先增大后减小, 料液比为 1:40 时提取率最大。因此, 猪肚菇多糖提取的最佳料液比为 1:40。

2.1.4 超声功率对多糖提取率的影响

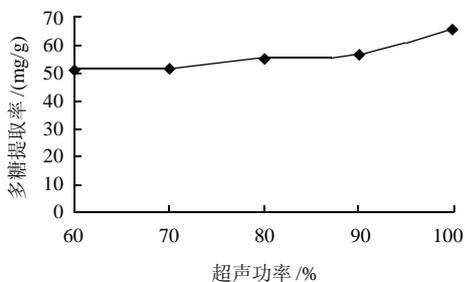


图4 超声功率对多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic power on extraction yield of polysaccharides

在超声温度 75℃、超声时间 30min、料液比 1:40 条件下, 分别选取超声功率 60%(300W)、70%(350W)、80%(400W)、90%(450W)、100%(500W), 进行超声提取试验, 测定并计算各处理的多糖提取率, 结果如图 4 所示。可知, 随着超声功率的升高, 多糖提取率逐渐增大, 100%(500W)时提取率最大, 因此, 猪肚菇多糖的最佳提取功率为 100%(500W)。

2.2 响应面试验结果

2.2.1 试验结果及方差分析

在单因素试验基础上, 确定出响应面试验方案的因

素水平表(表 1)。按照响应面试验方案进行试验, 试验结果见表 2。

表1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and their coded levels in the response surface analysis

编号	X ₁ 超声温度/℃	X ₂ 料液比(g/mL)	X ₃ 超声时间/min
-1	60	1:30	30
0	70	1:40	50
1	80	1:50	70

表2 猪肚菇多糖超声提取的响应面试验结果

Table 2 The experimental design and results for response surface analysis

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	多糖提取率/(mg/g)
1	-1	1	-1	58.33
2	-1	-1	-1	47.21
3	-1	0	0	70.28
4	-1	1	1	66.98
5	-1	-1	1	52.98
6	0	0	-1	61.63
7	0	1	0	74.81
8	0	0	0	72.34
9	0	0	0	80.57
10	0	0	0	77.69
11	0	-1	0	64.10
12	0	0	1	78.10
13	1	1	-1	61.22
14	1	-1	-1	56.69
15	1	0	0	71.92
16	1	1	1	68.63
17	1	-1	1	59.57

对表 2 数据采用 Design Expert 7.0 软件进行处理和分析, 获得猪肚菇多糖提取率对超声提取温度、料液比、提取时间的二次多元回归方程:

$$Y(\text{多糖提取率}) = 76.36 + 2.22X_1 + 4.94X_2 + 4.12X_3 - 1.44X_1X_2 - 0.51X_1X_3 + 0.93X_2X_3 - 4.87X_1^2 - 6.52X_2^2 - 6.11X_3^2$$

表 3 为该模型及其各回归系数的方差分析, 由表 3 可知, 此模型 P 值小于 0.01(P=0.0016), 表明该响应回归模型达到了极显著水平, 说明该模型是有意义的。该模型的 R²=0.9407, R²_{Adj}=0.8645, 变异系数为 5.27, 说明该模型拟合程度比较好, 试验误差小, 该模型能解释 86.45% 响应值的变化。该模型失拟项的 P 值为 0.7352, 说明其影响不显著, 即失拟项与纯误差没有显著差异, 则说明实验操作可信, 可以用回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析和预测。且该模型中各因素对猪肚菇多糖提取率影响的程度分别为: X₂、X₃ 影响极显著, X₂²、X₃² 影响显著, X₁、X₁X₂、X₁X₃、X₂X₃ 影响不显著。

表3 回归系数及显著性检验

Table 3 The regression coefficient and significance of each term in the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	1344.546	9	149.394	12.34081	0.0016**
X_1	49.45731	1	49.45731	4.085461	0.0830
X_2	244.2336	1	244.2336	20.17512	0.0028**
X_3	169.6067	1	169.6067	14.0105	0.0072**
X_1X_2	16.62146	1	16.62146	1.373029	0.2796
X_1X_3	2.120084	1	2.120084	0.175131	0.6881
X_2X_3	6.869071	1	6.869071	0.567425	0.4759
X_1^2	63.60589	1	63.60589	5.254216	0.0556
X_2^2	113.8863	1	113.8863	9.407668	0.0181*
X_3^2	99.95292	1	99.95292	8.256692	0.0239*
残差	84.73981	7	12.10569		
失拟项	49.80082	5	9.960165	0.570146	0.7352
纯误差	34.93898	2	17.46949		
总离差	1429.286	16			

注: $R^2=0.9407$, $R^2_{Adj}=0.8645$, $CV=5.27\%$; *. $P < 0.05$, 差异显著; **. $P < 0.01$, 差异极显著^[15-16]。

2.2.2 响应面分析

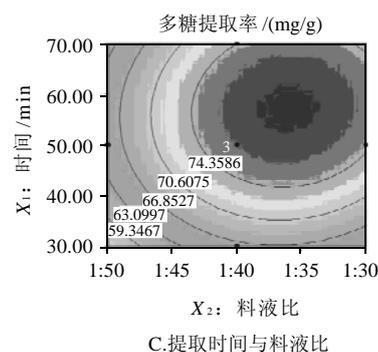
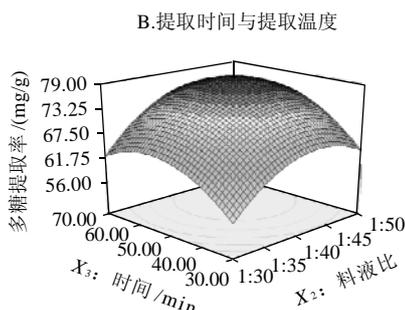
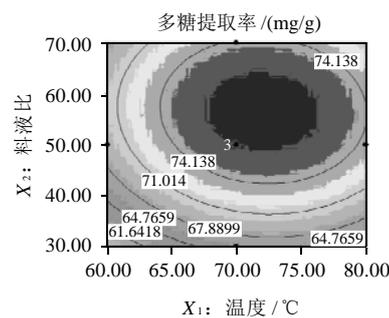
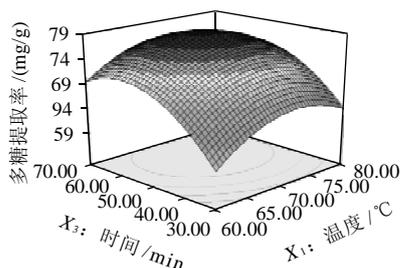
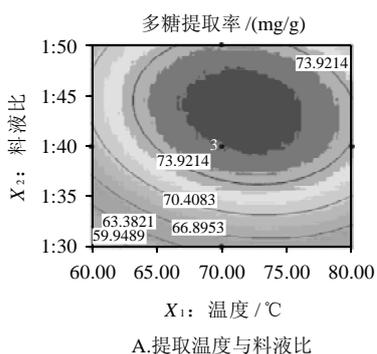
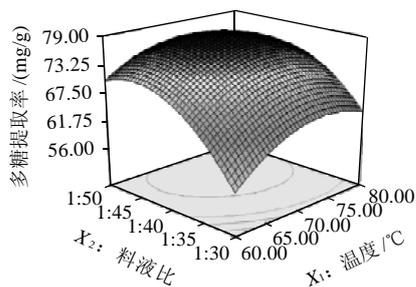


图5 各两因素交互作用对猪肚菇多糖提取率影响的响应曲面和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots showing the interactive effects of temperature, ultrasonic treatment time and liquid-to-solid ratio on extraction yield of polysaccharides

由图5A可知, 温度和料液比的交互作用显著, 且温度轴向等高线变化密集, 料液比轴向等高线变化相对稀疏, 故料液比对响应值峰值的影响较温度影响大。由图5B可知, 温度 and 时间的交互作用显著, 且温度轴向等高线变化密集, 时间轴向等高线变化相对稀疏, 故时间对响应值峰值的影响较温度影响大。由图5C可知, 料液比和时间的等高线形状趋于圆形, 表明二者的交互作用不大。

通过软件分析可以得到, 当 $X_1=0.152$ 、 $X_2=0.387$ 、 $X_3=0.360$ 时, 猪肚菇子实体多糖提取率有一个预测的最大值 78.22mg/g。进行编码代换后, 即得到超声波提取猪肚菇子实体多糖的最佳条件是温度 71.52 °C、料液比 1:44、时间 57.19min。

采用上述最优提取条件进行验证实验(考虑到实际操

作的情况,将多糖最佳提取条件修正为超声时间57min、超声温度72℃、料液比1:44),实际测得的多糖得率为75.79mg/g,与模型预测值的误差为3.1%。因此本试验采用响应曲面法优化得到的超声波提取条件参数基本准确可靠,在实际应用中具有一定的参考价值。

3 结 论

通过单因素和响应曲面试验,对猪肚菇子实体中多糖的超声提取工艺条件进行优化分析,得到超声提取猪肚菇子实体多糖的最佳工艺条件为温度72℃、料液比1:44、时间57min,在此条件下多糖得率为75.79mg/g。

研究结果可为猪肚菇多糖的工业化生产提供一定的理论参考,但对猪肚菇多糖的生物活性、化学结构及其深层开发利用还有待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] 熊绍员,刘成梅,涂宗财,等.食用菌多糖的研究进展[J].食品科技,2002(4):18-20.
- [2] 李金灿,陆辉,张相日,等.食用菌多糖特性与保健作用研究新进展[J].中国食用菌,2005,24(6):7-11.
- [3] ZHANG Huina, HE Jinghua, LAN Yuan, et al. *In vitro* and *in vivo* protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan induced pancreatic islets damage[J]. Life Sciences, 2003, 73(18): 2307-2312.
- [4] 董洪新,蔡德华,李玉.猪肚菇的研究现状及展望[J].中国食用菌,2010,29(3):3-6.
- [5] 唐青,郁建平.猪肚菇水溶性多糖提取工艺的研究[J].食品科学,2008,29(2):180-183.
- [6] 杨学敏,陈仪男.微波辅助技术优化猪肚菇多糖提取工艺[J].漳州师范学院学报:自然科学版,2009(4):75-80.
- [7] LEE G W, KIM H Y, HUR H, et al. Antitumor and immune-potentiating activity against mouse sarcoma 180 by crude polysaccharides from fruiting body of *Lentinus giganteus*[J]. The Korean Journal of Mycology, 2008, 36(1): 75-83.
- [8] 慕运动.响应面方法及其在食品工业中的应用[J].郑州工程学报,2001(3):91-94.
- [9] BEZERRA M A, SANTELLI R E, OLIVEIRA E P, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. Talanta, 2008, 76(5): 965-977.
- [10] 董艳红,李姝婧,郑惠华,等.响应曲面优化超声波提取灵芝多糖工艺研究[J].食品科学,2009,30(6):98-101.
- [11] FAN Gongjian, HAN Yonbin, GU Zhenxin, et al. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM)[J]. Food Science and Technology, 2008, 41(1): 155-160.
- [12] 童洋,肖国民,潘晓梅.响应面法优化螺旋藻中叶绿素的超声提取工艺[J].化工学报,2009,60(11):2813-2819.
- [13] 毕春慧,沈莲清.响应面分析法优化雷丸多糖提取工艺的研究[J].食品科技,2010,35(8):217-221.
- [14] 王明艳,张小杰,王涛,等.响应面法优化香椿叶多糖的提取条件[J].食品科学,2010,31(4):25-29.
- [15] 潘春梅,王辉,任敏.纤维素酶液体发酵工艺条件的响应面分析优化[J].环境科学与技术,2008,31(8):120-123.
- [16] YANG Bin, LIU Xuan, GAO Yanxiang. Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from *Gardenia (Gardenia jasminoides Ellis)* fruits with response surface methodology[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10(3): 610-615.