

文章编号: 1004-4353(2016)02-0143-04

响应面法优化榆黄蘑中多糖的提取工艺

衣铭慧, 袁海恋, 施溯筠*
(延边大学 药学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 实验以榆黄蘑为原料,用多糖提取率作为衡量提取工艺的指标,通过单因素实验分别探讨了料液比、提取温度、提取时间对榆黄蘑多糖提取率的影响,并采用蒽酮-硫酸法测定了糖的含量.利用 Box-Benhnken 中心组合设计原理和响应面分析法探讨榆黄蘑多糖的最佳热提工艺,结果表明最佳热提工艺的参数为:料液比为 1 : 50,提取温度为 90 ℃,提取时间为 40 min. 最佳热提工艺条件下的榆黄蘑多糖提取率为 8.39%.

关键词: 响应面法; 榆黄蘑; 多糖; 提取

中图分类号: TS201.1 **文献标识码:** A

Optimization of extraction processes polysaccharides from *Pleurotus citrinopileatus* by response surface method

YI Minghui, YUAN Hailian, SHI Suyun*
(College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: The extraction rate of polysaccharide which is from *Pleurotus citrinopileatus* was the measure as a standard. The content of polysaccharide was determined by anthrone sulfuric acid method. The material liquid ration, the extraction temperature, and extraction time was discussed via single factor experiment to study the influence on the extraction rate. The design principle of the Box-Benhnken and response surface analysis method were performed to find the optimal conditions of heat extraction process. The results showed that the optimum extraction process for thermal parameters: solid-liquid ratio is 1 : 50, the extraction temperature is 90 ℃, extraction time is 40 min. The content of *Pleurotus citrinopileatus* polysaccharide is 8.39%.

Keywords: response surface method; *Pleurotus citrinopileatus*; polysaccharide; extraction

榆黄蘑(*Pleurotus citrinopileatus* Sing)是药食两用真菌,主要分布于中国、东南亚、欧洲、北美洲等地^[1]. 研究^[2-3]表明,榆黄蘑干燥子实体富含人体必需的氨基酸和微量元素,脂类成分较低. 各种动物实验和临床实验研究^[4-6]表明,榆黄蘑多糖具有抗肿瘤、增强免疫力、降血脂、降血糖、抗衰老、平喘等药用活性. 近年来,响应面法(RSM)^[7]逐渐被用于各种生物化工处理过程,例如吴雪艳等^[8]采用响应面法优化了竹荪菌托多糖提取工艺,为竹荪菌托多糖提取分离提供了更经济、更便捷的技术

方法. 本试验以榆黄蘑为研究对象,通过单因素实验和 Box-Behnken 中心组合设计原理以及响应面分析法对其提取工艺进行优化,探讨料液比、提取温度、提取时间 3 个因素的交互作用对榆黄蘑多糖提取率的影响,为榆黄蘑多糖功能活性的深入研究及其在食品、药品领域的应用提供理论依据.

1 试药与仪器

榆黄蘑购自吉林省延吉市西市场;蒽酮、浓硫酸、无水乙醇、丙酮、乙醚均为分析纯.

UV-2201 型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司生产;D2F-6090 真空烘箱,上海精宏实验设备有限公司生产;HH-6 型数显恒温水浴锅,金坛市科技仪器有限公司生产;FA-2004 电子天平,上海良平仪器仪表有限公司生产;Z-36HK 高速台式离心机,天津市医疗器械厂生产。

2 方法与结果

2.1 多糖提取

取榆黄蘑 2 g 研磨至粉末,过 60 目筛,浸泡过夜。按一定料液比、提取温度、提取时间,水浴提取多糖;提取液经 4 层纱布过滤后,合并滤液,3 500 r/min 离心 15 min,上清液浓缩至原来体积的 1/3,然后加入约 3 倍体积的 80% 乙醇溶液进行醇沉;4 ℃ 条件下静置 12 h,3 000 r/min 离心 15 min,沉淀物依次经无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,真空干燥得多糖粗品,待测。

2.2 多糖含量测定

榆黄蘑多糖含量测定采用蒽酮-硫酸法^[9],用葡萄糖标准品于 620 nm 处检测吸光度值。多糖提取率/% = $\frac{C \times V}{\text{供样用粗多糖质量}} \times 100$,其中 C 为经过标准曲线算得的葡萄糖的浓度,V 为定容体积。

如图 1 所示,以葡萄糖浓度(X)为横坐标,吸光度(Y)为纵坐标,制定标准曲线。所得标准曲线回归方程为: $Y = 0.030\ 7X + 0.003\ 3$,相关系数 $R^2 = 0.999\ 6$,说明标准品葡萄糖在 0~25 μg/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系。

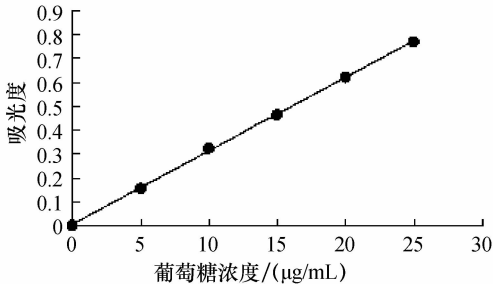


图 1 葡萄糖标准曲线

2.3 单因素实验

2.3.1 料液比对多糖提取率的影响 如图 2 所示:料液比低于 1 : 50 时,多糖提取率随着料液比的增加逐渐增高;当料液比为 1 : 50 时,提取率最大,为 7.84%;之后,随着料液比的升高,多糖提取

率反而降低。这可能是因为榆黄蘑多糖几乎被全部溶出后,过多加入的溶剂增大了其他成分的溶出量,从而导致多糖提取率有所降低。因此本文选取料液比为 1 : 50。

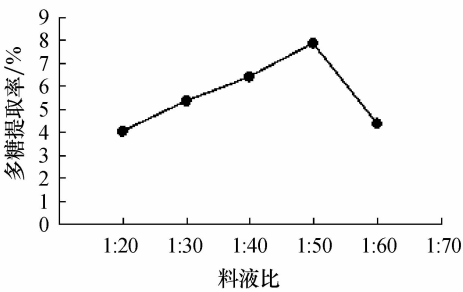


图 2 料液比对多糖提取率的影响

2.3.2 提取温度对多糖提取率的影响 如图 3 所示:当提取温度低于 90 ℃ 时,多糖提取率随着温度的升高逐渐增高;当温度为 90 ℃ 时,榆黄蘑的多糖提取率达到最高,为 7.96%;之后,随着温度的升高,多糖提取率反而降低。因此本文选择提取温度为 90 ℃。

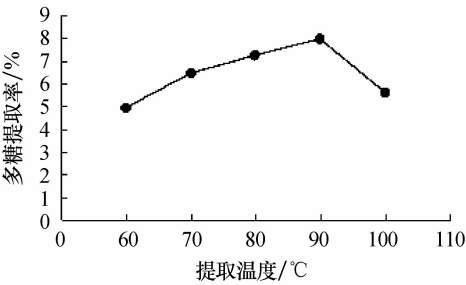


图 3 提取温度对多糖提取率的影响

2.3.3 提取时间对多糖提取率的影响 如图 4 所示:当提取时间低于 40 min 时,多糖提取率随着提取时间的增加逐渐增高;当提取时间为 40 min 时,多糖提取率达到最大值,为 7.89%;当提取时间高于 40 min 时,多糖提取率呈现下降趋势。因此本文选取提取时间为 40 min。

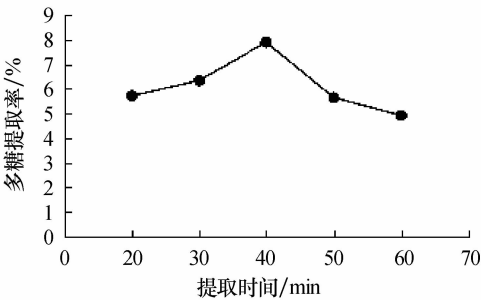


图 4 提取时间对多糖提取率的影响

2.4 响应面法优化榆黄蘑多糖的提取

2.4.1 响应面实验 在单因素试验时,依次改变料液比、提取温度、提取时间,并确定 3 因素 3 水平的最佳参数进行响应面分析,实验设计中的编码及水平见表 1.

表 1 响应面分析因素及水平

因素	水平		
	-1	0	1
A(料液比)	1:40	1:50	1:60
B(提取温度/℃)	80	90	100
C(提取时间/min)	30	40	50

2.4.2 响应面实验设计及结果 选取料液比(A)、提取温度(B)、提取时间(C) 3 个因素作为自变量,多糖提取率作为响应值,采用响应面分析方法,对工艺参数进行优化,实验设计及结果见表 2.

表 2 响应面实验设计及结果

试验号	A	B	C	多糖提取率/%
1	0	-1	-1	6.02
2	0	0	0	8.06
3	0	0	0	8.13
4	0	0	0	8.21
5	-1	0	-1	4.48
6	1	0	1	5.31
7	0	-1	1	5.62
8	0	0	0	8.29
9	1	1	0	6.03
10	1	0	-1	6.48
11	-1	-1	0	6.11
12	0	1	1	5.06
13	0	0	0	8.37
14	-1	0	1	4.36
15	-1	1	0	4.94
16	1	-1	0	7.25
17	0	1	-1	4.71

2.4.3 建立拟合模型与显著性检验 对表 2 的数据进行处理,得到表 3 回归方程方差分析表,然后利用软件 Design-Expert 8.0.6 进行非线性回归的二次多项式拟合,得到预测模型如下:

$$Y=8.21+0.65A-0.53B-0.17C-0.013AB-0.26AC+0.19BC-1.16A^2-0.97B^2-1.89C^2.$$

回归方差分析显著性检验表明,所得模型回归显著($P<0.0001$),说明该模型有意义.失拟项不显著,说明模型模拟数据与试验值的差异较小.

另外,该模型的总决定系数 $R^2=0.9896$,调整决定系数 $R^2_{Adj}=0.9763$,说明该模型的拟合程度良好,实验误差小.上述分析表明该回归模型拟合性较好,可用于对榆黄蘑中多糖提取率的分析及预测^[10].

表 3 回归方程模型方差分析表

因素	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
回归模型	33.54	9	3.73	74.17	<0.0001**
A	3.35	1	3.35	66.76	<0.0001**
B	2.27	1	2.27	45.15	0.0003*
C	0.22	1	0.22	4.47	0.0724
AB	0.000625	1	0.000625	0.012	0.9143
AC	0.28	1	0.28	5.49	0.0517
BC	0.14	1	0.14	2.80	0.1382
A ²	5.69	1	5.69	113.21	<0.0001**
B ²	3.94	1	3.94	78.41	<0.0001**
C ²	15.08	1	15.08	300.08	<0.0001**
残差	0.35	7	0.050		
失拟项	0.29	3	0.097	6.37	0.0528
纯误差	0.061	4	0.015		
总变异	33.89	16			

注: * 表示差异显著, $P<0.05$; ** 表示差异极显著, $P<0.001$.

从表 3 可知:A 料液比的 $P<0.0001$,达到极显著水平;B 提取温度的 $P=0.0003$ 和 C 提取时间的 $P=0.0724$,有统计显著性.各因素对多糖提取率的影响顺序是:A 料液比>B 提取温度>C 提取时间.根据回归方程,二次项中 AB、AC、BC 3 项的 P 值均大于 0.05,说明因素之间的交互作用不显著,表明各实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系.在二次项中, A^2 、 B^2 、 C^2 的 P 值均小于 0.0001,达到极显著水平.

2.4.4 响应面分析 图 5—图 7 为各个因子交互作用的响应面图和等高线分析图.考察所拟合的响应曲面的形状,可分析料液比、提取温度、提取时间对榆黄蘑多糖提取率的影响.等高线的形状反映交互效应的强弱大小,等高线趋于圆形表示 2 个因素之间交互作用不显著,趋于椭圆形则相反.从图 5—图 7 响应面的最高点和等高线可以看出,在所选的范围内存在极值,该极值点既是响应面的最高点,同时也是等高线最小椭圆的中心点.

3 结论

本实验选择了料液比、提取温度、提取时间 3 个因素研究了其对榆黄蘑多糖提取率的影响. 通过 Box-Behnken 中心组合设计原理以及响应面分析法确定了最佳提取工艺条件:料液比为 1 : 50, 提取温度为 90 ℃,提取时间为 40 min. 得到因素的主效应关系为料液比>提取温度>提取时间,最佳提取率为 8.39%. 经检验表明,该模型合理可靠,能较好地预测和提高榆黄蘑中多糖的提取率.

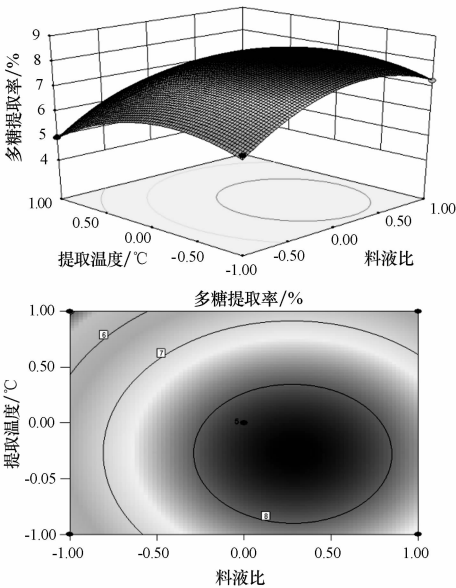


图 5 料液比和提取温度的相互影响及等高线分析图

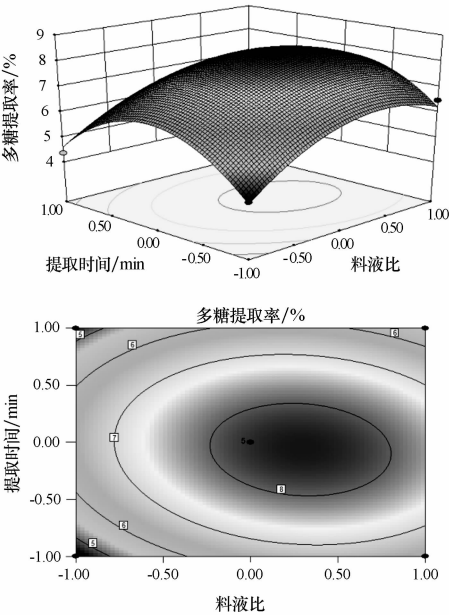


图 6 料液比和提取时间的相互影响及等高线分析图

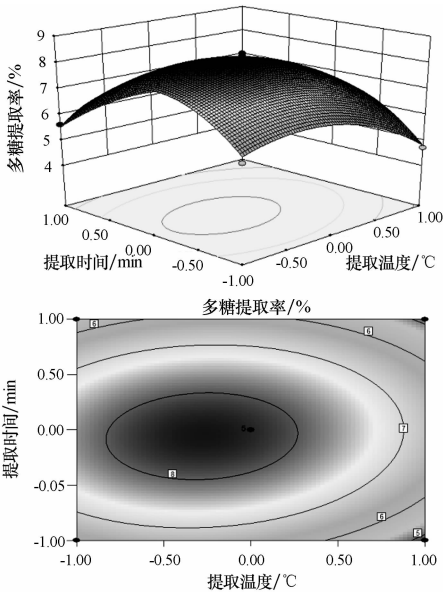


图 7 提取温度和提取时间的相互影响及等高线分析图

参考文献:

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第 1 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:578.

[2] 郭娟,赵晶,孙佳明,等. 超滤对榆黄蘑中多糖含量和蛋白质含量的影响[J]. 中国民族医药杂志,2010, 16(6):37-40.

[3] 杨芳,吕玲玲,施溯筠. 榆黄蘑可溶性蛋白的提取及其对羟自由基的清除作用[J]. 延边大学学报(自然科学版),2012,38(2):142-145.

[4] Wang J C, Hu S H, Liang Z C, et al. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in sub-merged culture and its antitumor effect[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005,67(6):759-766.

[5] Wang J C, Hu S H, Su C H, et al. Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericium* spp. [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2001,17(9):461-467.

[6] 施溯筠,李秀国. 榆黄蘑饮料抑制肿瘤和拮抗环磷酰胺毒副作用的研究[J]. 食品工业科技,2010,31 (8):332-333.

[7] 锥欣怡,陈晓辉,毕开顺,等. 响应面法优化鹿衔草总黄酮的酶联半仿生法提取工艺[J]. 中国实验方剂学,2013,19(12):19-21.

[8] 吴雪艳,罗鹏,叶建方,等. 响应面法优化竹荪菌托多糖的提取工艺[J]. 南方农业学报,2015,46(3): 480-485.

[9] 易剑平,毕雅静,宋秀荣,等. 蒽酮-硫酸法测定枸杞子多糖质量分数的研究[J]. 北京工业大学学报, 2005,31(6):641-646.

[10] 范晓良,李行诺,楚楚,等. 响应面法优化加压溶剂萃取香菇多糖工艺研究[J]. 中国食品学报,2012, 12(2):98-103.