

响应面法优化双孢菇菇柄多糖的提取工艺研究

王 鸿 磊, 王 红 艳, 丁 强, 邹 继 华

(中国农业大学 烟台研究院, 山东 烟台 264670)

摘 要: 在单因素基础上, 选择水料比、提取温度和提取时间为自变量, 多糖提取率为响应值, 根据 Box-Behnken 试验设计原理利用响应面法对双孢菇菇柄多糖的超声波法提取工艺进行优化研究。结果表明: 超声波法提取双孢菇菇柄多糖的最佳工艺为: 水料比 44.94 : 1、提取温度 30.53 ℃、提取时间 30.58 min, 在此条件下理论最大提取率为 20.15%。经过 3 次平行验证试验, 证明该模型合理可靠, 能够较好的预测超声波法提取双孢菇菇柄多糖得率。

关键词: 响应面法; 双孢菇; 多糖

中图分类号: S 646.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)22-0163-04

食用菌多糖因具有多种生物活性功能而成为国内外学者竞相进行研究和开发的热点^[1], 它作为一种具有特殊功能的天然绿色保健产品, 不仅品种丰富、来源广泛, 同时也是食用菌深加工的高附加值产品, 具有十分广阔的开发前景。近年来国内外学者已对香菇、银耳、冬虫夏草、灵芝、黑木耳、羊肚菌、蜜环菌等多种食用菌进行了多糖的提取纯化、分离鉴定及功能性等研究^[2], 但国内对双孢菇多糖方面的研究报道较少^[3-5]。

双孢菇 (*Agaricus bisporus*) 属伞菌目蘑菇科蘑菇属大型真菌, 具有较高的营养价值和药用价值, 享有“素中之王”的美称, 是我国目前出口量最大、创汇最高的一种食用真菌^[4]。然而, 在双孢菇加工过程中大量的菇柄作为废弃物被丢弃, 既污染环境又造成了资源的浪费。因此, 合理开发和利用双孢菇菇柄具有重要的现实意义。现采用响应曲面法对超声波辅助提取双孢菇菇柄多糖的条件进行优化研究, 以确定最佳的提取工艺, 为双孢菇菇柄多糖产品的开发提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

双孢菇菇柄: 取自山东久发食用菌有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂: 浓硫酸、苯酚、葡萄糖、石油醚均为国产分析纯。

主要仪器: 超低温冰箱、冻干机、震动微粉机 (SQ W-6D1)、超声波清洗器 (KQ3200DE)、752 型紫外可见分光光度计、电子天平 (FA1104N)。

1.3 试验方法

1.3.1 菇柄的预处理 将新鲜的菇柄洗净、切片, 放入 -80 ℃超低温冰箱中预冻 24 h, 用冻干机冷冻干燥后, 在低温震动微粉机中处理 1 min, 即得干燥的菇柄粉, 精确称取一定量菇柄粉在 56 ℃下用石油醚脱脂 6 h, 干燥后测定脱脂后样品重量, 计算得率。

1.3.2 菇柄多糖提取工艺 称取菇柄粉, 加一定量蒸馏水, 超声波处理一定时间后抽滤, 沉淀用蒸馏水洗涤 2 次, 合并滤液, 定容于 250 mL 容量瓶中, 取 0.1 mL 粗多糖溶液, 利用苯酚—硫酸法测定粗多糖含量。

1.3.3 双孢菇多糖提取的单因素分析 设定超声温度 40 ℃, 超声时间 30 min, 分别选择水料比 (mL : g) 为 10 : 1、20 : 1、40 : 1、60 : 1、80 : 1 进行多糖提取, 苯酚硫酸法测定多糖得率, 以确定最佳的水料比。设定超声时间为 30 min, 水料比为 40 : 1, 分别选择提取温度为 10、20、30、40、50 ℃进行多糖提取, 苯酚硫酸法测定多糖得率, 以确定最佳的提取温度。设定水料比 40 : 1, 超声温度 30 ℃, 分别选择超声时间为 10、20、30、40、50 min 进行多糖提取, 苯酚硫酸法测定多糖得率, 以确定最佳的提取时间。

1.3.4 响应面法优化双孢菇菇柄多糖的提取工艺 通过单因素试验确定双孢菇菇柄多糖的最佳提取温度、提取时间、水料比, 根据 Box-Behnken 试验设计原理, 以上述 3 个因素作为自变量, 以双孢菇菇柄多糖提取率为响应值, 设计三因素三水平的响应面分析试验, 对多糖提取条件进行优化。试验共设计 17 个试验点, 其中 12 个

第一作者简介: 王鸿磊 (1977-), 男, 山东莱州人, 硕士, 讲师, 研究方向为应用微生物。

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2007BAD89B09-10); 国家公益性行业 (农业) 科研专项资助项目 (200803033-A0903)。

收稿日期: 2010-08-23

分析因子, 5 个中心点。利用统计分析软件 Design-Expert 7.1.6 程序进行试验设计和数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 最佳水料比 由图 1 可知, 随着水料比的增加, 多糖提取率逐渐增加, 取当水料比大于 40 : 1 时, 随着水料比的增加多糖提取率增加不明显。这说明水料比越大多糖溶出越多, 浸提越完全, 当多糖几乎完全溶解时, 再增大水料比对多糖的提取已没有显著影响, 因此双孢菇柄多糖提取的最佳水料比以 40 : 1 为宜。

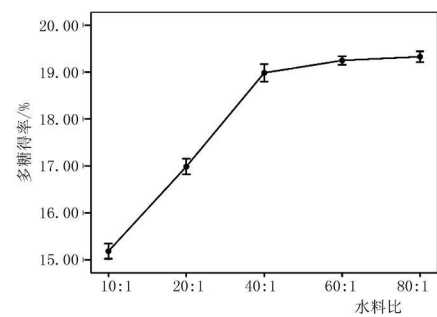


图 1 水料比对双孢菇柄多糖提取率的影响

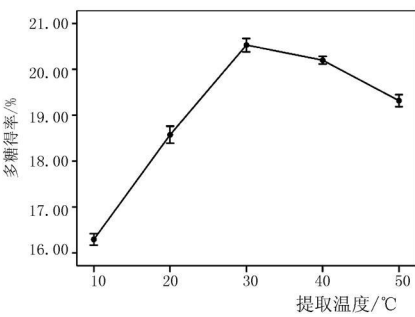


图 2 提取温度对双孢菇柄多糖提取率的影响

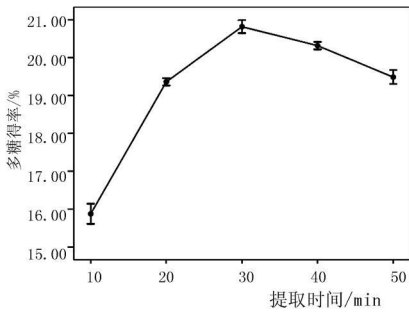


图 3 提取时间对双孢菇柄多糖提取率的影响

因素	Box-Behnken 设计因子和水平		
	水平		
	-1	0	1
水料比/ mL · g ⁻¹	30 : 1	40 : 1	50 : 1
提取时间/ min	20	30	40
提取温度/ °C	20	30	40

表 2 试验设计和结果				
Run	A ₁ 温度/ °C	B ₁ 时间/ min	C ₁ 水料比	得率/ %
1	30	30	40 : 1	20.0
2	20	20	40 : 1	14.5
3	40	30	30 : 1	17.8
4	30	30	40 : 1	19.5
5	20	30	30 : 1	16.3
6	30	30	40 : 1	19.9
7	30	40	50 : 1	18.1
8	30	20	50 : 1	18.2
9	30	40	30 : 1	17.2
10	30	30	40 : 1	20.2
11	40	30	50 : 1	17.7
12	40	40	40 : 1	16.9
13	20	30	50 : 1	18.1
14	40	20	40 : 1	16.4
15	30	20	30 : 1	16.2
16	30	30	40 : 1	20.3
17	20	40	40 : 1	16.2

2.1.3 最佳提取时间 由图 3 可知, 随着提取时间的延长, 多糖提取率同样呈现先上升后下降的趋势, 在超声波处理 30 min 达到最大提取率, 30 min 之后由于超声时

2.1.2 最佳提取温度 由图 2 可知, 随着提取温度的升高, 多糖提取率呈现先上升后下降的趋势, 在 30 °C 之前提取率随温度升高而增加, 超过 30 °C 后随温度升高而降低。这是由于超声的作用随着温度的升高而发生变化, 随着提取温度的上升, 提取液的表面张力和黏度降低, 蒸气压增加, 易于产生空化作用, 使得细胞破碎程度增大, 促进细胞的多糖物质向外扩散, 因此多糖提取率提高较快。但随温度进一步升高, 气泡中的蒸气压增大, 空化强度降低, 导致提取率下降, 故最佳提取温度定为 30 °C。

间过长, 多糖链断裂导致提取率逐渐降低, 因此最佳提取时间定为 30 min。

2.2 响应面法优化双孢菇柄多糖的提取工艺

根据单因素试验得到中心点为水料比 40 : 1, 提取时间 30 min, 提取温度 30 °C。响应面法优化各个因素及水平见表 1。响应面试验设计和结果见表 2。

表 3 回归方程方差分析					
source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F
Model	44.78	9	4.98	32.84	< 0.0001 **
A- 温度	1.71	1	1.71	11.30	0.0121 *
B- 时间	1.20	1	1.20	7.93	0.0259 *
C- 水料比	2.65	1	2.65	17.46	0.0041 **
AB	0.36	1	0.36	2.38	0.1671
AC	0.90	1	0.90	5.96	0.0447 *
BC	0.30	1	0.30	2.00	0.2005
A ₂	16.26	1	16.26	107.31	< 0.0001 **
B ₂	17.10	1	17.10	112.84	< 0.0001 **
C ₂	1.23	1	1.23	8.10	0.0248 *
Residual	1.06	7	0.15		
Lack of Fit	0.67	3	0.22	2.31	0.2179
Pure Error	0.39	4	0.097		
Cor Total	45.84	16			

注: **表示 $P < 0.01$; *表示 $P < 0.05$ 。

利用 Design Expert 7.1.6 软件对表 2 数据进行多元回归分析, 得到回归方程: 得率 = - 41.03000 + 1.50525A + 1.44775B + 0.71450C - 0.00300AB -

0.00475AC—0.00275BC—0.01965A₂—0.02015B₂—0.00540C₂。此模型的方差分析见表3。由表3可知,模型P值小于0.0001,说明二次回归模型是显著的,拟合不足P值为0.2179差异不显著,相关系数R²=0.9769,说明二次回归模型能够较好的反应响应值的变化,模型与实际试验拟合程度好。

水料比、温度和时间的二次项对多糖得率的影响达到极显著水平(P<0.01),温度、提取时间、温度与水料比的交互作用以及水料比的二次项对多糖得率的影响达到显著水平(P<0.05),各因素对双孢菇菇柄多糖得率的影响顺序是:A₂、B₂>C>A>C₂>B>AC。

根据回归方程在考察的区域内对以上3个因素绘制响应面图及等高线图(图4~6),各图表示水料比、提取温度、提取时间3个因素中1个因素取零点时其余2个因素对双孢菇菇柄多糖得率的影响。

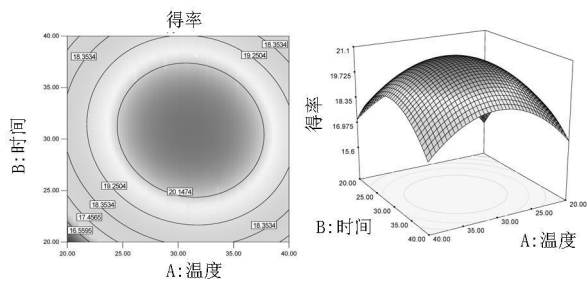


图4 提取时间和提取温度对双孢菇菇柄多糖得率影响的等高线和响应面

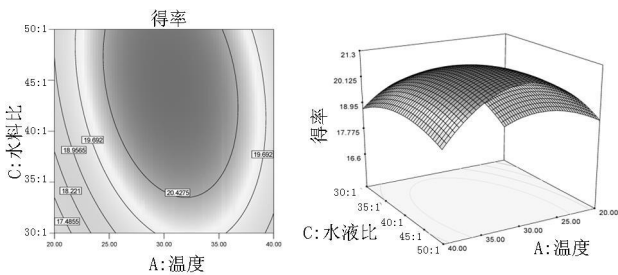


图5 水料比和提取温度对双孢菇菇柄多糖得率影响的等高线和响应面

由图4~6可知,3个响应面均为开口向下的凸形曲面,说明响应值(双孢菇菇柄多糖提取率)存在极高值。3个响应曲面的等高线中心均位于-1~1之间,说明提取的最优条件存在于所设计的因素水平范围之内。对回归方程求解得到双孢菇菇柄多糖最佳的提取条件为:

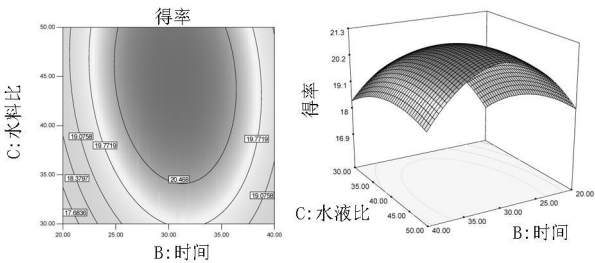


图6 提取时间和水料比对双孢菇菇柄多糖得率影响的等高线和响应面

水料比44.94:1、提取温度30.53℃、提取时间30.58min,提取率20.15%。

为验证响应面法所得模型的准确性,取水料比45:1、提取温度31℃、提取时间30.6min,对模型进行检验,共进行3次平行验证试验,3次平行试验的多糖提取率分别为19.97%、19.68%、19.53%,平均提取率为19.73%,与理论预测值相比相对误差为2.10%,可见该模型能较好地模拟和预测双孢菇菇柄多糖提取率。

3 结论

该研究根据Box-Behnken试验设计原理和响应面分析方法,利用Design Expert 7.1.6软件进行试验设计和统计分析,得到了双孢菇菇柄多糖提取率与水料比、提取时间和超声温度的回归模型,对方程进行求解得到双孢菇菇柄多糖超声波法提取的最佳条件为:水料比44.94:1、提取温度30.53℃、提取时间30.58min,提取率20.15%。经3次平行试验验证了该模型是合理可靠的,能够较好地预测超声波法提取双孢菇菇柄多糖的得率。此外,该研究中对双孢菇菇柄进行了超微粉碎和脱脂处理,有效地增加了双孢菇菇柄多糖的提取率。一方面是由于超微粉碎菇柄粉的比表面积,增大了菇柄粉与水的接触面积,另一方面脱脂处理可破坏细胞膜等脂质成分,增大了多糖与水的接触机会,有利于多糖的溶出。

参考文献

[1] 孙运凤. 食用菌多糖的药理作用及应用前景[J]. 社区医学杂志 2006, 4(1): 29-31.

[2] 熊绍员, 刘成梅, 涂宗财, 等. 食用菌多糖的研究进展[J]. 江西食品工业, 2002(4): 18-20.

[3] 武金鑫, 张贺迎, 杨睿, 等. 双孢蘑菇子实体多糖的提取及单糖组成[J]. 中国食用菌, 2003, 22(1): 31-32.

[4] 徐朝晖, 姜世明, 付培武. 双孢蘑菇子实体多糖的提取及其对癌细胞的抑制[J]. 中国食用菌, 1997, 6(4): 5-7.

[5] 熊泽, 邵伟, 黄艺. 双孢蘑菇多糖提取工艺优化研究[J]. 三峡大学学报(自然科学版), 2007, 29(4): 367-370.

铅对大球盖菇抗氧化系统的影响

陈 莉

(运城学院 生命科学系, 山西 运城 044000)

摘 要: 通过液体培养基培养研究了不同浓度铅(Pb)(0、50、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$)对大球盖菇抗氧化系统的影响。结果表明:随着Pb浓度的增加,脯氨酸、可溶性总糖含量先略微升高后逐渐下降;在试验浓度范围内,大球盖菇菌体过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性呈现先上升后下降的变化趋势,并都在Pb浓度为150 $\mu\text{mol/L}$ 达到峰值;而200~300 $\mu\text{mol/L}$ 的Pb则显著抑制POD和CAT酶活性的表达。

关键词: 大球盖菇; 铅; 抗氧化系统

中图分类号: S 646.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)22-0166-03

大球盖菇(*Stropharia rugoso-annulata*)是联合国粮农组织向发展中国家推荐的人工种植的食用菌之一,也是国际菇类贸易市场十大品种之一。其口感柔和清香、脆嫩可口,营养价值很高,且其碳水化合物中的微量元素硒和锌有较强的富集和转化作用,食用其可增强人们对这2种微量元素的吸收^[1-3]。

随着人类社会的不断发展,环境污染问题日益严重,无论是“污染生态学”,还是“环境保护生态学”都把重金属做为优先污染物进行研究^[3],其中铅(Pb)、铬(Cr)、镉(Cd)又是污染较为严重的3种重金属,它们主要造成土壤污染和水体污染^[4]。前人做了不少关于铅、铬、镉

等对植物形态、生理生化效应及植物对其污染耐性机制等方面研究工作,主要以农作物和蔬菜为研究对象,而关于其对食用真菌影响的报道较少,该试验研究了不同浓度铅对大球盖菇抗氧化系统的影响。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌种引自河南省青丰县食用菌技术推广中心所用化学试剂均为分析纯。

PDA培养基(20%土豆浸汁1 000 mL,蔗糖20 g,蛋白胨2 g,磷酸二氢钾2 g,硫酸镁1.5 g,pH自然)分装于300 mL锥形瓶,每瓶50 mL,高压灭菌。分别向PDA液体培养基中加入100 mmol/L乙酸铅母液,使培养基中Pb浓度分别为0、50、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$,将菌种接种后25~28℃恒温摇床培养7 d,振荡频率为120 r/min。

作者简介:陈莉(1980-),女,山西运城人,硕士,讲师,研究方向为生物技术。

收稿日期:2010-08-15

Study on Optimization of Extraction of Polysaccharide from the Root of *Agaricus bisporus* Stipe Using Response Surface Method

WANG Hong-lei, WANG Hong-yan, DING Qiang, ZOU Ji-hua

(Yantai Academy of China Agricultural University, Yantai Shandong 264670)

Abstract: By water to material ratio, extraction temperature and extraction time as independent variables, the extraction rate of polysaccharide as response value, based on the single factor, according to Box-Behnken experimental design using response surface method on the ultrasonic extraction process of *Agaricus bisporus* Stipe of the polysaccharide were studied. The results showed that the optimum conditions was the extraction temperature of 30.53℃, extraction time of 30.58 min, the ratio of water to material of 44.94:1, then the maximum extraction rate of the polysaccharides was 20.15%. After 3 times the parallel validation experiments showed that the model was reasonable and reliable, can nicely forecasts ultrasonic extraction of polysaccharides yield of *Agaricus bisporus* Stipe.

Key words: response surface method; *Agaricus bisporus*; polysaccharide