

香菇中多酚类物质提取工艺的优化研究

贺伟强, 巢新冬, 白 杰

(嘉兴职业技术学院, 浙江 嘉兴 314036)

摘 要:以香菇子实体为原料,采用 Plackett-Burman 设计对影响香菇多酚提取效率的 8 个因素进行筛选,并通过 Box-Behnken 设计及响应面分析法确定了影响多酚类提取因素的最佳条件。结果表明:影响香菇多酚提取的 3 个主要因素为:乙醇浓度、液料比和提取温度;最佳提取条件为:香菇过 160 目筛,以 81% 的乙醇作溶剂,液料比为 34:1 mL/g,先超声处理 15 min,在 85℃ 的水浴中提取 45 min,提取 3 次。根据最优试验条件对模型进行验证,得到香菇子实体的多酚提取量为 186.50 mg/100gFW,实际值与预测值的误差为 3.24%。

关键词:香菇;多酚;响应面分析法;优化

中图分类号:S 646.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)18-0125-04

香菇(*Lentinus edodes*)是中国特产之一,在食用菌中具有举足轻重的地位,其产量在世界人工栽培食用菌中占第 2 位,是我国栽培量最大的食用菌^[1]。香菇具有非常丰富的营养和药用价值,现代研究表明,香菇多糖具有抑制肿瘤、提高免疫功能、抗病毒和抗氧化等药理活性,且无任何毒副作用^[2-4],目前对香菇多糖的研究比较多,很多香菇多糖产品已经上市,然而对其活性成分如多酚等没有较深入的研究。多酚是一类具有多酚羟基化合物的总称,具有消除自由基、抗氧化、抗衰老、抗癌防癌和预防心脑血管疾病等多种生理和药理活性功效^[5-8]。因此香菇多酚可以开发成为安全、高效的天然抗氧化剂来代替合成抗氧化剂。

Plackett-Burman 设计法和响应面分析法是 20 世纪中后叶发展起来的优化试验条件统计学方法^[9],其中 Plackett-Burman 设计是一种经济而有效的筛选试验设计,能用较少的试验数据推算出目标值的优化条件,优化效率高^[10],是常用的优选主要影响因素的试验设计方法^[11-12],在微生物发酵方面已有广泛应用^[13-14],主要用于培养基等的优化和活性物质的提取优化。该试验利用 Plackett-Burman 试验设计筛选影响香菇子实体多酚提取的主要因素,然后利用 Box-Behnken 试验设计及响应面分析法进行回归,优化提取工艺,获得多酚提取的较佳因素组合和响应值的最优值,以期对深度开发香菇的潜在价值提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试香菇为浙江丽水产,购于杭州某农贸市场。Folin-酚试剂和五倍子酸购于 Sigma 公司,其它试剂购于华东医药有限公司。

仪器:KQ-100B 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司);UV-1700 型紫外分光光度计(日本岛津产品);JA2003 型电子天平(上海精科仪器有限公司);真空旋转蒸发仪(江苏华利达试验设备有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制作 用 5 mL 乙醇溶解 0.2000 g 五倍子酸,定容至 50 mL,分别移取 0、0.5、1.0、1.5、2.5、5.0 mL 到 50 mL 容量瓶中,用水定容。从上述不同质量浓度的标准溶液中分别移取 1 mL 加入 1 mL 的福林酚试剂,剧烈震荡 2 min 后加入 3 mL 2% NaCO₃,室温放置 2 h,在 760 nm 波长处测定吸光度。将所测数据进行线性回归,得标准曲线方程: $Y = 1.7765X + 0.2690$ ($R^2 = 0.9952$)。

1.2.2 香菇多酚含量的测定 香菇先进行冷冻干燥,粉碎过 160 目筛得香菇粉备用。样品中的总酚含量用福林-酚试剂进行测定,以五倍子酸(GAE)作标准对照。参照 1.2.1 方法,根据标准曲线计算各组分的总酚含量,单位为 mg/100gFW。

1.2.3 Plackett-Burman 设计 试验选用 N=12 的 Plackett-Burman 的试验设计对原料粒度(A)、提取方式(B)、提取温度(C)、提取浓度(D)、提取次数(E)、液料比(F)、提取时间(G)、提取溶剂(H)8 个因素进行考察,每个因素取高(+)、低(-)2 个水平,高水平约为低水平的 1.5 倍,响应值为香菇多酚提取量(Y),试验设计见表 1。

第一作者简介:贺伟强(1979-),男,河南郑州人,硕士,讲师,现主要从事天然活性成分的提取和分离技术等研究工作。

基金项目:嘉兴市科技计划资助项目(2012AY1058)。

收稿日期:2013-04-15

表 1 N=12 的 Plackett-Burman
试验设计与结果

试验点	A	B	C	D	E	F	G	H	多酚提取量 /mg·(100g) ⁻¹ FW
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	158.22
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	144.93
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	180.64
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	177.16
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	116.90
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	158.93
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	135.15
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	142.82
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	145.66
10	1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	183.47
11	-1	1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	145.65
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	162.41

1.2.4 Box-Behnken 设计 依据 Plackett-Burman 试验确定的因素与水平,采用 Box-Behnken 试验设计对香菇子实体多酚提取进行 3 因素 3 水平的响应面分析试验,包括 12 个析因试验和 3 个中心试验。Box-Behnken 设计每个因素取 3 个水平,以-1、0、+1 编码,对数据进行二次回归拟合,得到包括一次项、平方项和交互项的二次方程,分析各因素的主效应和交互效应,最后在在一定水平范围内求取最佳值。以香菇多酚含量(g/L)为响应变量,以提取温度、乙醇浓度和液料比为影响因子进行 Box-Behnken 响应面分析,试验设计见表 2。

表 2 响应面试验因素与水平

因素	水平		
	-1	0	+1
X ₁ 液料比/mL·g ⁻¹	20:1	30:1	40:1
X ₂ 提取温度/℃	70	80	90
X ₃ 乙醇浓度/%	50	70	90

1.3 数据分析

试验采用统计分析软件 SAS 8.0 对试验结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 试验筛选香菇多酚提取量主要影响因素

由表 3 可知,在香菇多酚提取过程中,在 $\alpha=0.05$ 的显著水平上,乙醇浓度、提取温度和液料比 3 个因素对多酚提取量影响最为显著,可考虑作为主要因素进一步做响应面试验。

表 3 Plackett-Burman 试验分析结果

因素	水平		T-检验	P> T	重要性
	-1	+1			
A 原料粒度/目	100	160	0.442392	0.688157	7
B 提取温度/℃	60	80	-1.41792	0.0251236	2
C 提取方式	震荡	超声	0.873441	0.446708	4
D 乙醇浓度/%	60%	80%	-2.05315	0.0132363	1
E 提取次数/次	2	3	0.079404	0.941712	8
F 提取时间/min	30	45	0.646573	0.563966	6
G 液料比/mL·g ⁻¹	20:1	30:1	-1.41792	0.0251236	2
H 提取溶剂	甲醇	乙醇	-0.96419	0.406077	5

2.2 Box-Behnken 试验结果分析

对液料比 A、提取温度 B 及乙醇浓度 C 做如下变换: $X_1=(A-30)/10$ 、 $X_2=(B-80)/10$ 、 $X_3=(C-70)/20$ 。以 X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量,以多酚提取量为响应值(Y),试验结果见表 4。以香菇子实体中的多酚类物质的提取量为响应值,经回归拟合后,得到回归方程: $Y=171.9667+6.9125X_1+9.2875X_2+17.5X_3-7.18333X_1^2+1.75X_1X_2-3.975X_1X_3-10.03333X_2^2+1.875X_2X_3-15.25833X_3^2$ 。

表 4 Box-Behnken 试验结果

试验号	因素			多酚提取量 /mg·(100g) ⁻¹ FW
	x_1	x_2	x_3	
1	-1	-1	0	133.43
2	-1	+1	0	154.87
3	+1	-1	0	151.22
4	+1	+1	0	179.62
5	0	-1	-1	128.46
6	0	-1	+1	152.72
7	0	+1	-1	136.90
8	0	+1	+1	168.77
9	-1	0	-1	121.49
10	+1	0	-1	135.73
11	-1	0	+1	171.38
12	+1	0	+1	169.74
13	0	0	0	172.15
14	0	0	0	173.56
15	0	0	0	170.30

由表 5 可知,上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系时,其因变量和全体自变量之间的线性关系显著($r=94.32\%$),方程 $F>F_{0.01}(9,5)=9.2196$,所以该方程是显著的,其中, X_2 、 X_3 和 X_3^2 项的影响是显著的;而 $r=94.32\%$,说明响应值的变化有 94.32%来源于所选变量,即液料比、提取温度和乙醇浓度。因此,该回归方程对试验拟合情况较好,可以较好的描述各因素与响应值之间的真实关系,回归方程的各项方差分析结果表明,一次项和二次项都有显著因素,因此各试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。所以,可以利用该回归方程确定最佳提取工艺条件。

表 5 回归分析结果

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	$Pr>F$	显著性
X ₁	1	382.2612	382.2612	6.511802	0.051152	
X ₂	1	690.0613	690.0613	11.75516	0.018664	*
X ₃	1	2 450	2 450	41.73563	0.001323	**
X ₁ ²	1	190.5421	190.5421	3.245569	0.131496	
X ₁ X ₂	1	12.25	12.25	0.208678	0.666966	
X ₁ X ₃	1	63.2025	63.2025	1.076652	0.346999	
X ₂ ²	1	371.6964	371.6964	6.331831	0.053415	
X ₂ X ₃	1	14.0625	14.0625	0.239554	0.645244	
X ₃ ²	1	859.631	859.631	14.64377	0.012289	*
模型	9	4 870.943	541.2159	9.219587	0.012415	*
误差	5	293.5142	58.70283			
总和	14	5 164.457				

注: * 为显著($P<0.05$); ** 为极显著($P<0.01$)。

响应面图形是响应值对各试验因子 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上形象的看出最佳参数和各参数之间的相互作用。乙醇浓度对香菇多酚的提取效率影响最大,温度和液料比次之。根据回归方程作出不同因子的响应面分析图,结果见图 1~3。对回归方程求一阶偏导数即得最佳值。

$$6.91 - 14.37X_1 + 1.75X_2 - 3.98X_3 = 0,$$

$$9.29 + 1.75X_1 - 20.07X_2 - 1.88X_3 = 0,$$

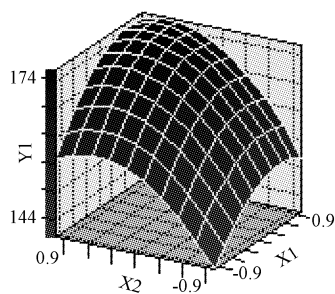


图1 $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面

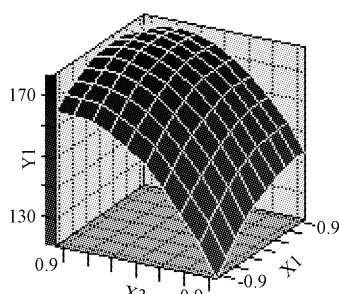


图2 $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面

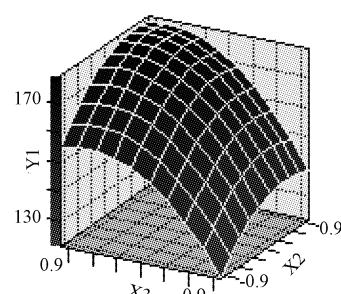


图3 $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面

2.3 回归模型验证试验

为了检验响应面法的可行性,根据最优试验条件对模型进行验证,试验重复 3 次,得到香菇子实体的多酚平均提取量为 186.50 mg/100gFW,实际值与预测值的误差为 3.24%,采用一般提取方法对香菇子实体的多酚进行提取,试验重复 3 次,提取量为 160.13 mg/100gFW。优化后的提取量提高了 16.47%,从而进一步验证了此优化工艺对于香菇子实体多酚的提取可行有效。

3 结论

该试验通过 Plackett-Burman 试验设计找出影响香菇多酚提取效率的主要因素,然后将响应面法应用于香菇多酚提取条件的优化。得出香菇多酚提取的最优试验方案为:香菇过 160 目,用 81% 的乙醇作溶剂,液料比为 34:1 mL/g,先超声处理 15 min,在 85℃ 的水浴中提取 45 min,提取 3 次。根据最优试验条件对模型进行验证,得到香菇子实体的多酚提取量为 186.50 mg/100gFW,实际值与预测值的误差为 3.24%。

参考文献

- [1] 中华人民共和国农业部农产品加工局. 中国农产品加工业发展报告[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2007:115-116.
- [2] 王艺峰,徐敏,洪群峰,等. 羧甲基化香菇多糖对壳聚糖表面的化学修饰[J]. 高分子材料科学与工程,2011,27(8):109-112.
- [3] 钟耀广,林楠,王淑琴,等. 香菇多糖的抗氧化性能与抑菌作用研究[J]. 食品科技,2007(7):141-144.
- [4] 冯燕,全吉钟,王冬旭,等. 香菇多糖抗胃癌机制研究[J]. 中国试验诊断学,2011(15):1829-1831.
- [5] Proestos C, Boziaris I S, Nychas G J E, et al. Analysis of flavonoids and

$$17.5 - 3.98X_1 + 1.88X_2 - 30.52X_3 = 0,$$

$$\text{解得 } X_1=0.3802, X_2=0.4442, X_3=0.5558.$$

代入变换公式即得液料比为 33.80:1 mL/g,温度 84.44℃,乙醇浓度 81.12%。由回归方程预测在此条件下的多酚类物质提取量的理论值为 180.64 mg/100gFW。所以香菇多酚的最优提取方案为:香菇过 160 目,用 81% 的乙醇,液料比为 34:1 mL/g,先超声处理 15 min,在 85℃ 的水浴中提取 45 min,提取 3 次。

phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity[J]. Food Chemistry, 2004, 95:664-671.

[6] Yoshimoto M, Okuno S, Yamaguchi M, et al. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple sweet potato[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2001, 65:1652-1655.

[7] Cook N C, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources[J]. Journal of Nutrition Biochemistry, 1996(7): 66-76.

[8] Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds[J]. Trends in Plant Science, 1997(2):152-159.

[9] 吕国英,张作法,潘慧娟,等. 响应面分析法优化香菇多糖发酵培养基[J]. 菌物学报,2010,29(1):106-112.

[10] Walls I, Chuyate R. Alicyclobacillus-historical perspective and preliminary characterization study[J]. Dairy Food and Environmental Sanitation, 1998, 18: 499-503.

[11] 陈召国,杨文革,胡永红,等. 响应面法优化猪硫酸软骨素的提取工艺[J]. 食品科技,2011,36(7):187-192.

[12] 谭玉柱,童婷婷,谢运飞,等. Plackett-Burman 试验设计联用星点设计效应面法优选大黄地上部位蒽醌类成分提取工艺[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(6):410-414.

[13] Balusu R, Paduru R R, Kuravi S, et al. Optimization of critical medium components using response surface methodology for ethanol production from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* SS19[J]. Process Biochemistry, 2005, 40:3025-3030.

[14] Shi L E, Ying G Q, Zhang X Y, et al. Medium optimization for 5'-phosphodiesterase production from penicillium citrinum using response surface methodology[J]. Food Technology and Biotechnology, 2007, 45:126-133.

[15] Nadia A, Soliman M M, Berekaa Y R. Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26; application of Plackett-Burman experimental design to evaluate culture requirements [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69:259-267.

臭氧处理草莓果实内部结构显微观察

李梦钗¹, 冯 薇², 葛艳蕊²

(1. 河北省林业科学研究院, 河北省林木良种工程技术研究中心, 河北 石家庄 050061; 2. 河北科技大学, 河北 石家庄 050051)

摘 要: 利用电子显微镜对臭氧处理草莓薄壁细胞超微结构变化进行观察。结果表明: 草莓经过臭氧处理后, 细胞结构比较紧密, 内部变化较对照缓慢。

关键词: 草莓果实; 臭氧处理; 结构观察

中图分类号: S 668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)18-0128-03

草莓的果实为聚合果, 多汁的浆果由花托发育而成, 果实的表皮细胞排列紧密, 比较整齐, 皮层和髓部均为薄壁细胞组成, 但果实极其鲜嫩易腐, 采后贮藏货架期短, 常温下放置 2~3 d 就开始变色、变味, 而且目前保鲜技术的应用仍不能解决草莓的腐烂问题。利用臭氧保鲜草莓, 其保鲜期内果实内部超微结构上的变化尚鲜见报道。该试验旨在利用电子显微镜对臭氧处理后草莓果实薄壁细胞超微结构变化进行观察, 并与其生理变化过程相结合, 探讨草莓适宜的保鲜方式, 以期对草莓保鲜技术的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“丰香”草莓采自石家庄市正定县, 选取全部着色并且成熟度和大小均匀、无虫害和损伤的果实,

第一作者简介: 李梦钗(1972-), 女, 硕士, 高级工程师, 现主要从事果品采后保鲜技术等研究工作。E-mail: lmclmr@126.com.

基金项目: 石家庄市科技计划资助项目(11149442A)。

收稿日期: 2013-04-10

2012 年 5 月 10 日进行试验。

1.2 试验方法

入库前对草莓进行臭氧处理, 臭氧浓度分别为 15、18、20、22、25 mg/L, 每处理 3 kg, 重复 3 次, 以不进行臭氧处理为对照, 分装在带孔聚乙烯塑料盒内(孔径 0.5 cm, 孔距 1.5 cm×2.0 cm), 为避免取样影响试验效果, 每个处理准备 6 箱待测(每箱 1 kg), 一起放置于温度为 0~-1℃, 相对湿度为 80%~90%的保鲜库内。

1.3 项目测定

从草莓果实中部切取 1 mm³ 小块, 在日立 H600 型透射电镜下观察拍照。

2 结果与分析

由图 1 可以看出, 22 mg/L 臭氧处理草莓保鲜 3 周时, 外观与内部结构没有明显变化, 内部细胞排列紧密(图 1C~D)。20 mg/L 臭氧处理草莓保鲜 3 周时, 内部结构变化不大, 但外观有失水现象(图 1E~F)。15 mg/L 与 18 mg/L 臭氧处理草莓保鲜 3 周时, 内部细胞排列疏松, 外观有失水现象(图 1G~J)。25 mg/L 臭氧处理草莓

Study on the Optimization of the Extraction Technology of Total Phenolic from *Lentinula edodes*

HE Wei-qiang, CHAO Xin-dong, BAI Jie

(Jiaxing Vocational and Technical College, Jiaxing, Zhejiang 314036)

Abstract: Taking the fruit of *Lentinus edodes* as material, Plackett-Burman design was used to evaluate the influence of related eight factors of total phenolic from *Lentinus edodes*. And the Box-Behnken design and response surface analysis were used to determine the optimal levels of the main factors. The results showed that three factors played the important roles in the medium, including ethanol concentration, temperature and solvent solid ratio. The optimal conditions were particle size less than 160 pore, 15 min for ultrasonic time, 34 : 1 mL/g for solvent solid ratio, 81% ethanol for solution, extracted at 85℃ for 45 min, extracting for 3 times. Under the optimal conditions, the yield of total phenolic reached 186.50 mg/100gFW, only 3.24% differences from the forecast by RSM.

Key words: *Lentinula edodes*; total phenolic; response surface methodology; optimization