

响应面分析法优化红托竹荪菌丝总糖超声检测工艺

龚光禄¹, 桂阳^{1,2}, 卢颖颖¹, 朱国胜^{1,2}

(1. 贵州省农作物品种资源研究所, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州 贵阳 550006)

摘要:以红托竹荪(*Dictyophora rubrovolvata*)为试材, 采用木屑培养的方法, 以木屑菌丝总糖含量为指标, 研究了液料比、振幅、超声总时间、超声波开启时间 4 个因素对红托竹荪木屑菌丝总糖含量的影响, 并通过响应面分析法获得红托竹荪木屑菌丝总糖检测最佳工艺。结果表明: 在液料比 11:1 mL·g⁻¹、振幅 41%、超声总时间 22 min、超声波开启时间 2.7 s 时, 红托竹荪菌丝总糖的得率达 1.18%。

关键词:红托竹荪; 木屑菌丝; 总糖; 检测工艺

中图分类号:S 646.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)15-0135-07

红托竹荪(*Dictyophora rubrovolvata* M. Zang et al.) 属真菌门(Eumycota)、担子菌亚门(Basidiomycotina)、腹菌纲(Gasteromycetes)、鬼笔目(Phallales)、鬼笔科(Phallaceae)、竹荪属(*Dictyophora*)真菌^[1]。该菌风味独特、营养丰富、价值高, 是食用菌中的佳品, 有“蘑菇皇后”“真菌之花”等美誉, 主要分布于贵州、云南、四川和浙江等竹林下的腐殖土上。红托竹荪子实体多糖主要由半乳糖、葡萄糖、甘露糖和木糖组成^[2], 具有较强的还原能力和抑制羟基自由基能力, 具有明显的体外抗氧化活性^[3-4], 红托竹荪菌托中多糖组分 DRVP1 对小鼠 S180 肉瘤具有一定的抑制作用^[5-6]。

红托竹荪菌丝生长缓慢、遗传稳定性差、易退化, 菌种很难传代培养^[7]。因此, 菌种生产时需每年到野外或栽培场收集大量的菌蕾进行菌种分离, 又因菌株间的遗传差异或者变异^[8], 导致生产流通的菌种较为混乱、稳定性差, 难以通过外观来鉴别菌种的优劣, 使贵州红托竹荪的产量与品质均不稳定。2013 年, 谭力等^[9]对 3 个平菇菌株进行了生长速度的测定并用苯酚硫酸法测底了菌丝体多糖含量, 可知菌丝长势快的其多糖含量也较大。近年来, 课题组对红托竹荪良种理化特征的室内评价与鉴定方面做了大量的探索, 其中菌丝多糖含量的检

测就成为了红托竹荪菌种质量标准重要指标。目前, 对于多糖的提取与测定, 主要是以子实体、纯菌丝体为供试体, 连同基质料一起进行菌丝多糖提取与检测对象的研究尚鲜见报道, 方法也主要是热水浸提醇沉淀法获得多糖^[2-5, 10]。因红托竹荪在半固体和液体培养基中的培养条件尚未摸索清楚, 在红托竹荪菌种生产中无论什么级别均采用木屑作为培养基质, 因此检测红托竹荪菌丝多糖实质上是检测木屑菌丝多糖。但是, 木屑培养中纯菌丝比例小, 且大部分已经浸染至木质部, 菌丝体不易分离。采用机械研磨法, 菌丝破碎不彻底, 使木屑菌丝多糖的提取效果差。目前超声波细胞破碎法对菌丝细胞的破碎效果较好, 且在真菌菌丝多糖提取方面得到了广泛应用^[11-12]; 响应面分析法对工艺参数的优化有较好的拟合度和较高的稳定性, 具有较强的参考价值^[13-15]。

现以红托竹荪木屑菌丝为研究对象, 水作溶剂, 超声波进行菌丝破碎, 以多糖含量作为观测值, 采用苯酚-硫酸法进行提取, 探索液料比、振幅、超声总时间、超声波开启时间 4 个因素对木屑菌丝多糖提取率的影响, 对响应面分析法进行工艺优化, 以期红托竹荪木屑菌种多糖含量的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试红托竹荪菌种由贵州省农作物品种资源研究所真菌研究室提供。

木屑培养基: 木屑 76%、麦麸 10%、玉米面 10%、黄豆粉 1.3%、石膏粉 1%、蔗糖 1%、KH₂PO₄ 0.2%、MgSO₄ 0.3%、克灵霉 0.1%、三十烷醇 0.1%、pH 自然、水分 60%(课题组在生产中总结归纳形成的常用的菌种生产培养基)。

第一作者简介:龚光禄(1985-), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向为食药菌。E-mail: gongguanglu0923@163.com

责任作者:朱国胜(1971-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为药用植物伴生菌及食药菌真菌研究。E-mail: zgsah@163.com

基金项目:贵州省农业攻关资助项目(黔科合 NY[2014]3037 号); 贵州省科研机构服务企业行动计划资助项目(黔科合服企[2014]4006 号); 贵阳市与贵州省农业科学院农业科技合作资助项目(院地农科合字[2014]3 号)。

收稿日期:2016-04-20

SCIENTZ-III D型超声波细胞破碎仪(输出功率 850 W, 宁波新芝生物科技股份有限公司);紫外可见分光光度计(华龙国际有限公司);5%重蒸酚溶液(现配现用), 99.5%浓硫酸,葡萄糖(分析纯)。

1.2 试验方法

1.2.1 木屑菌丝培养 将配制好的木屑培养基装入 200 mL 三角瓶中,轻微压实,料面距瓶口 2~3 cm,用透气封口膜密封瓶口,121 °C,0.1 MPa,灭菌 2~3 h,冷却后接入 5%的红托竹荪供试原种,24 °C,避光培养,40~50 d 菌丝长满三角瓶后,将料和菌丝一起取出室温下风干备用。

1.2.2 单因素试验 根据仪器说明书与叶敏^[4]、高擎等^[16]研究结果综合分析设计单因素试验。液料比对总糖含量的影响:在超声波振幅为 60%,超声波开启时间为 2.0 s,间歇时间 3.0 s,超声总时间 20 min,设置不同液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1 mL·g⁻¹)。振幅对总糖含量测定的影响:在液料比为 30:1 mL·g⁻¹,超声波开启时间为 2.0 s、间歇时间 3.0 s,超声总时间 20 min,设置不同振幅(40%、50%、60%、70%、80%)。超声总时间对总糖含量测定的影响:在液料比为 30:1 mL·g⁻¹,超声波振幅为 60%,超声波开启时间为 2.0 s、间歇时间 3.0 s,设置不同超声总时间(5、10、15、20、25、30、35 min)。超声波开启时间对总糖含量测定的影响:在液料比为 30:1 mL·g⁻¹,超声波振幅为 60%,超声总时间为 20 min,间歇时间为 3.0 s,设置不同超声波开启时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 s)。

1.2.3 响应面优化试验 在单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 试验原理^[13-14]。以液料比(X_1)、振幅(X_2)、超声总时间(X_3)和超声波开启时间(X_4),4 个因素为自变量,以总糖得率作为响应观测值,进行中心组合设计试验,设计 4 因素 3 水平试验(表 1),对所得数据进行处理和响应曲面分析,通过岭脊分析得到优化试验工艺参数,并进行验证。

表 1 响应面分析与水平

Table 1 Analytic factors and levels for RSA

编码值	液料比(X_1)	振幅(X_2)	超声总时间(X_3)	超声波开启时间(X_4)
Coded value	Liquid-material ratio	Amplitude	Processing time	Ultrasonic time
value	/(mL·g ⁻¹)	/%	/min	/s
-1	5:1	35	17	2.2
0	10:1	40	20	2.5
1	15:1	45	23	2.8

1.2.4 总糖浸提液的制备 超声波破碎浸提结束后,8 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液 12 000 r·min⁻¹再次离心 10 min,取上清液备用。

1.2.5 总糖含量测定 葡萄糖标准曲线制作:取 9 支刻度试管,按表 2 操作,在每支试管中,加入 1.0 mL 5%重蒸酚溶液,5.0 mL 浓硫酸,摇匀,置沸水浴中煮沸 30 min,冷

却。在 490 nm 波长下比色,以吸光度为纵坐标、葡萄糖浓度为横坐标,绘制标准曲线。总糖含量测定:准确移取浸提液 2.0 mL 于 25 mL 刻度试管中,每个样品设 3 个重复,其余操作与制作标准曲线相同。在 490 nm 波长下读取吸光度 A 值,然后,在标准曲线上查出(或用拟合方程计算出)相应的总糖浓度,计算总糖含量。总糖含量(%)=(葡萄糖浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)×提取液体积(mL)×稀释倍数)/样品质量(μg)×100。

表 2 标准曲线制作

Table 2 Constructing standard curve

试剂	管号 Identifier								
Agentia	1	2	3	4	5	6	7	8	9
80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖溶液	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Glucose solution 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}/\text{mL}$									
蒸馏水 Distilled water/mL	2.0	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2
葡萄糖浓度									
Glucose concentration/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	0	4	8	12	16	20	24	28	32

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

以吸光度为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标,得到拟合方程为 $A=0.0123c-0.0009$,其中 $R^2=0.9997$ 。

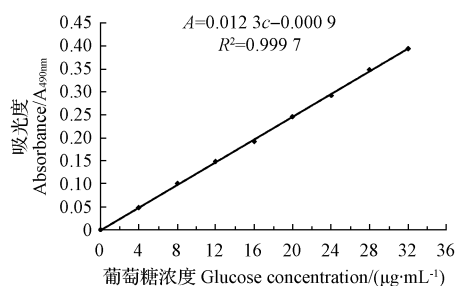


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose

2.2 单因素试验结果

2.2.1 液料比对总糖含量的影响 由图 2A 可知,红托竹荪木屑菌丝总糖含量在液料比 10:1 mL·g⁻¹时最大,为 1.204%,随着液料比的增大,红托竹荪木屑菌丝总糖含量迅速降低后趋于平缓。

2.2.2 振幅对总糖含量的影响 由图 2B 可知,红托竹荪木屑菌丝总糖含量在振幅 40%时最大为 0.377%,随着振幅的增大,红托竹荪木屑菌丝总糖含量缓慢降低后趋于平缓。

2.2.3 超声总时间对总糖含量的影响 由图 2C 可知,红托竹荪木屑菌丝总糖含量呈现先增大后减少的变化规律,在超声总时间 20 min 时达到最大为 0.217%。

2.2.4 超声波开启时间对总糖含量的影响 由图 2D 可知,红托竹荪木屑菌丝总糖含量呈现先增大后减少的变化规律,在超声波开启时间 2.5 s 时达到最大为 0.293%。

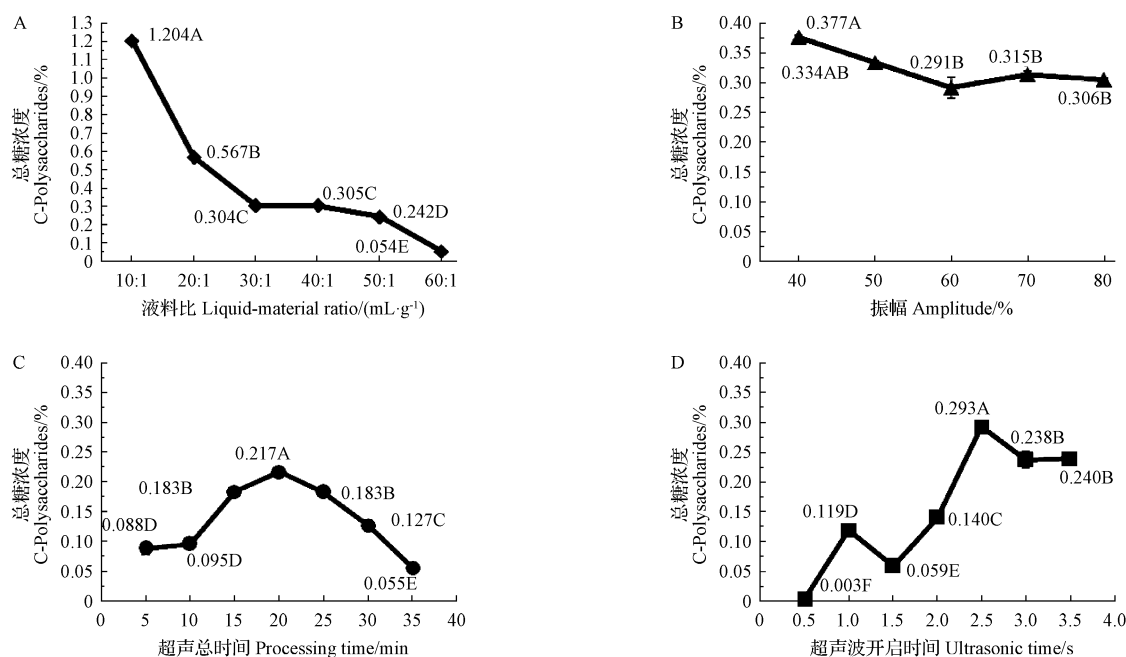


图2 液料比、振幅、超声总时间、超声波开启时间对总糖含量测定的影响

Fig. 2 Effect of Liquid-material ratio amplitude processing time and ultrasonic time on C-Polysaccharides

2.3 响应面优化试验结果

2.3.1 中心组合设计试验 根据表1中的因素水平,采

用编码值公式: $(Z_i) = \frac{X_i - \frac{1}{2} [Max(x_{ij}) + Min(x_{ij})]}{\frac{1}{2} [Max(x_{ij}) - Min(x_{ij})]}$ 进

行编码值计算,可知共有27个试验点,其中24个为分析因子(1~24),3个为中心试验点(25~27),中心点重复的目的是估计整个试验的纯误差^[17],试验结果见表3。

2.3.2 因素间的交互作用 根据表3的试验结果进行响应面分析,以总糖含量(Y_1)为响应值,对试验中的各因子两两交互作用,构建三维空间的曲面图与等高线见图3。从响应曲面图及其等高线图可以反映出各参数之间的交互影响。由图3A可以看出,在超声时间(X_3)为20 min和超声波开启时间(X_4)为2.5 s时,液料比(X_1)和振幅(X_2)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的等高线呈椭圆形,说明液料比(X_1)和振幅(X_2)的交互影响效应显著^[15]。在试验范围内,液料比(X_1)对应的响应曲面坡度比较陡,而振幅(X_2)对应的响应曲面坡度比较缓,说明液料比(X_1)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的影响比振幅(X_2)大,当液料比(X_1)低于12 : 1 mL · g⁻¹左右时,总糖含量(Y_1)随着液料比(X_1)的增大而提高,但当超过时,总糖含量(Y_1)却随液料比(X_1)的增大而降低。当振幅(X_2)逐渐增加时,总糖含量(Y_1)随之提高,当达到42%~43%时,总糖含量(Y_1)趋于稳定并有微弱降低的趋势。因此,当液料比(X_1)和振幅(X_1)分别在(12 : 1)~(13 : 1) mL · g⁻¹和42%~43%

的范围内,红托竹荪木屑菌丝总糖的含量值(Y_1)达到最大。由图3B可以看出,在振幅(X_2)为40%和超声波开

表3 响应面分析方案与试验结果

Table 3 Program and experimental results of RSA

试验号 No.	因素 Factor				总糖含量(Y_1) C-Polysaccharides/%
	X_1	X_2	X_3	X_4	
1	-1	-1	0	0	0.591
2	-1	1	0	0	0.765
3	1	-1	0	0	0.776
4	1	1	0	0	0.982
5	0	0	-1	-1	0.798
6	0	0	-1	1	1.160
7	0	0	1	-1	0.960
8	0	0	1	1	1.322
9	-1	0	0	-1	0.559
10	-1	0	0	1	0.921
11	1	0	0	-1	0.760
12	1	0	0	1	1.122
13	0	-1	-1	0	0.822
14	0	-1	1	0	0.984
15	0	1	-1	0	1.012
16	0	1	1	0	1.174
17	-1	0	-1	0	0.797
18	-1	0	1	0	0.684
19	1	0	-1	0	0.723
20	1	0	1	0	1.160
21	0	-1	0	-1	0.722
22	0	-1	0	1	1.084
23	0	1	0	-1	0.912
24	0	1	0	1	1.274
25	0	0	0	0	1.148
26	0	0	0	0	1.109
27	0	0	0	0	0.985

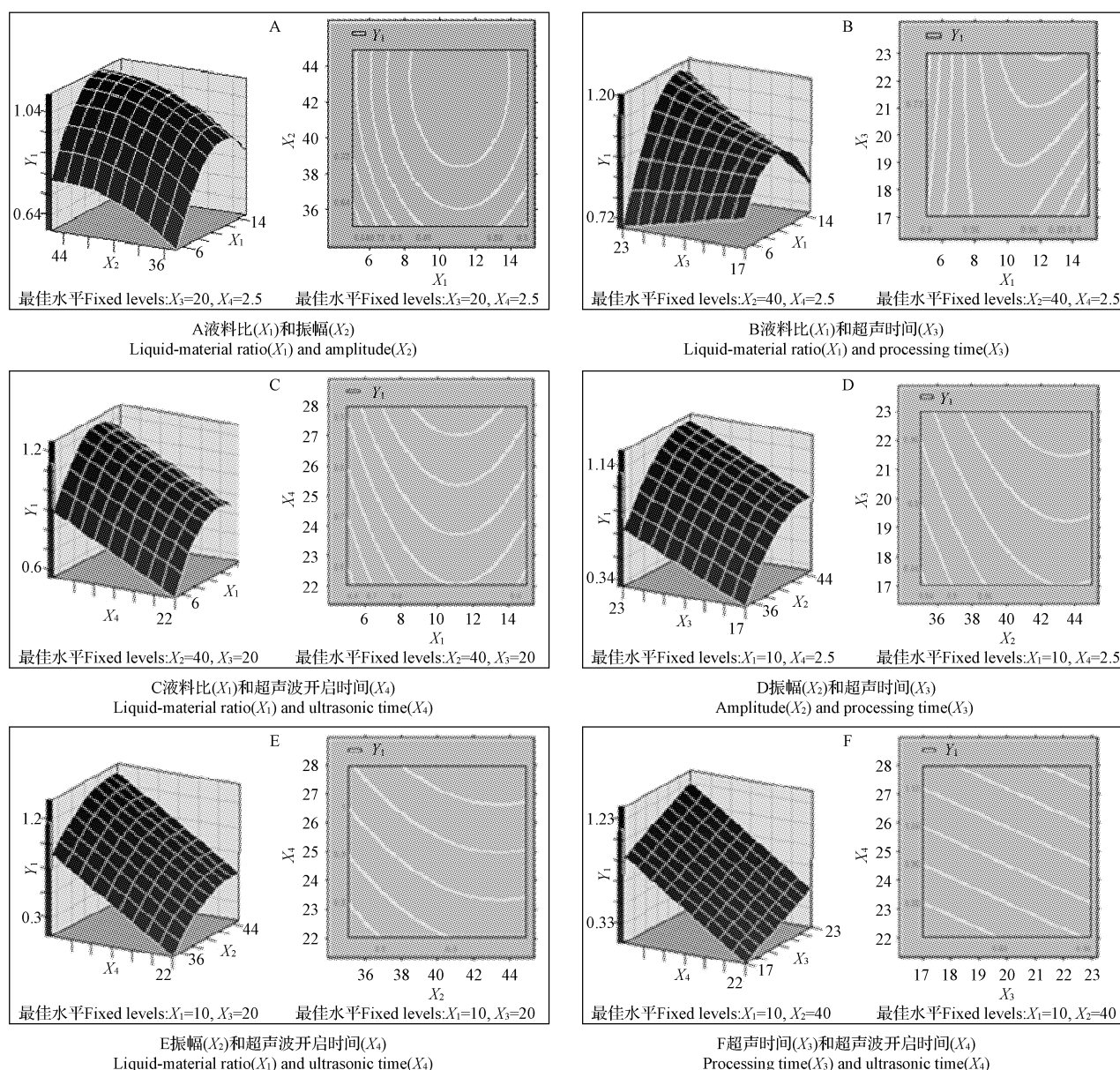


图3 响应面和等高线

Fig. 3 Response surface plot and its contour plot

启时间(X_4)为2.5 s时,液料比(X_1)和超声时间(X_3)红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的等高线呈椭圆形,说明液料比(X_1)和超声时间(X_3)的交互影响效应显著。在试验范围内,超声时间(X_3)对应的响应曲面坡度比较缓,说明超声时间(X_3)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的影响较小。随着超声时间(X_3)的延长,总糖含量(Y_1)平缓地增加,当超声时间(X_3)达到23 min时总糖含量(Y_1)达到最高。因此,当液料比(X_1)和超声时间(X_3)分别在(12:1)~(13:1) mL·g⁻¹和23 min的范围内,红托竹荪木屑菌丝总糖的含量值(Y_1)达到最大。由图3C可知,在振幅(X_2)为40%和超声时间(X_3)为20 min时,液料比(X_1)和超声波开启时间(X_4)对红托竹荪木屑

菌丝总糖含量值(Y_1)的交互等高线呈椭圆形,说明液料比(X_1)和超声波开启(X_4)的交互影响效应显著。在试验范围内,超声波开启时间(X_4)对应的响应曲面坡度比较缓,说明超声波开启时间(X_3)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的影响较小。随着超声波开启时间的延长,总糖含量(Y_1)随着增加,当超声波开启时间达到2.8 s时总糖含量(Y_1)达到最高。因此,当液料比(X_1)和超声波开启时间(X_4)分别在(12:1)~(13:1) mL·g⁻¹和2.8 s的范围内,红托竹荪木屑菌丝总糖的含量值(Y_1)达到最大。由图3D可以看出,在液料比(X_1)为10:1 mL·g⁻¹和超声波开启时间(X_4)为2.5 s时,振幅(X_2)和超声时间(X_3)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)

的交互等高线呈椭圆形,说明振幅(X_2)和超声时间(X_3)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量的交互影响效应显著。在试验范围内,振幅(X_2)对应的响应曲面坡度比较陡,而超声时间(X_3)对应的响应曲面坡度比较缓,说明振幅(X_2)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的影响比超声时间(X_3)较大。由图 3E 可知,在液料比(X_1)为 10 : 1 mL · g⁻¹ 和超声时间(X_3)为 20 min 时,振幅(X_2)和超声波开启时间(X_4)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的交互等高线呈椭圆形,说明振幅(X_2)和超声波开启时间(X_4)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量的交互影响效应显著。在试验范围内,超声波开启时间(X_4)对应的响应曲面坡度比较陡,而振幅(X_2)对应的响应曲面坡度比较缓,说明超声波开启时间(X_4)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的影响比振幅(X_2)大。图 3F 表明,在液料比(X_1)为 10 : 1 mL · g⁻¹ 和振幅(X_2)为 40% 时,超声时间(X_3)和超声波开启时间(X_4)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的交互等高线呈椭圆形,说明超声时间(X_3)和超声波开启时间(X_4)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量的交互影响效应显著。在试验范围内,超声波开启时间(X_4)对应的响应曲面坡度比较陡,而超声时间(X_3)对应的响应曲面坡度比较缓,说明超声波开启时间(X_4)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的影响比超声时间(X_3)大。综上所述,液料比(X_1)、振幅(X_2)、超声时间(X_3)和超声波开启时间(X_4)对红托竹荪木屑菌丝总糖含量值(Y_1)的两两交互影响效应均显著。且液料

比(X_1) > 超声波开启时间(X_4) > 振幅(X_2) > 超声时间(X_3)。而且,当液料比(X_1)为 12.5 : 1 mL · g⁻¹、振幅(X_2)为 42.5%、超声时间(X_3)为 23 min 和超声波开启时间(X_4)为 2.8 s 时竹荪木屑菌丝总糖提取率达到最大,其预测值为 1.422 496 527 8%。但是,由于响应面与等高线分析得到的最优方案是在试验范围内得出的结果,并不能直接得到最优的方案结果,因此还应进一步进行回归分析,建立回归模型,利用回归模型得到最优方案。

2.3.3 模型的建立与显著性检验 利用 SAS 9.2 软件进行二次线性回归拟合见表 4,可以看出回归模型极显著($P < 0.000 1$),因变量与所考察自变量之间的线性关系显著($R^2 = 0.987 004 7$),说明该模型拟合程度较好,失拟检验不显著($P > 0.05$),说明该试验所得二次回归方程高度显著,能很好地对响应值进行预测。一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及二次项 X_1^2 、 $X_1 X_3$ 、 X_2^2 表现为极显著($P < 0.000 1$),说明它们对响应值影响极大,且所考察因素对响应值影响不是简单的一次线性关系。根据参数估计,最终得到红托竹荪木屑菌丝总糖含量与液料比(X_1)、振幅(X_2)、超声时间(X_3)、超声波开启时间(X_4)的数学回归模型为 $Y_1 = 1.080 667 + 0.100 500 X_1 + 0.095 000 X_2 + 0.081 000 X_3 + 0.181 000 X_4 - 0.229 667 X_1^2 + 0.008 000 X_1 X_2 - 0.072 417 X_2^2 + 0.137 500 X_1 X_3 - 0.010 167 X_3^2 - 0.010 417 X_4^2$ 。根据表 5 因子检验结果可知,影响木屑菌丝总糖含量的因素主次顺序为液料比(X_1) > 超声波开启工作时间(X_4) > 超声时间(X_3) > 振幅(X_2),

表 4 回归统计分析

Table 4 Results of regression analysis

来源 Source	DF	SS	MS	F	t	Pr>F	显著性 Statistical significance
模型 Model	14	1.104 052 19	0.078 860 87	65.31		<0.000 1	**
X_1	1	0.121 203 00	0.121 203 00	100.38	10.019 0	<0.000 1	**
X_2	1	0.108 300 00	0.108 300 00	89.70	9.470 8	<0.000 1	**
X_3	1	0.078 732 00	0.078 732 00	65.21	8.075 1	<0.000 1	**
X_4	1	0.393 132 00	0.393 132 00	325.60	18.044 0	<0.000 1	**
X_1^2	1	0.296 994 25	0.296 994 25	245.97	-15.264 0	<0.000 1	**
$X_1 X_2$	1	0.000 256 00	0.000 256 00	0.21	0.460 5	0.653 4	
$X_1 X_3$	1	0.075 625 00	0.075 625 00	62.63	7.914 1	<0.000 1	**
$X_1 X_4$	1	0	0	0	3.195 1E-15	1.000 0	
X_2^2	1	0.028 962 34	0.028 962 34	23.99	-4.812 9	0.000 4	**
$X_2 X_3$	1	0	0	0	0	1.000 0	
$X_2 X_4$	1	0	0	0	0	1.000 0	
X_3^2	1	0.000 268 89	0.000 268 89	0.22	-0.675 7	0.512 0	
$X_3 X_4$	1	0	0	0	3.195 1E-15	1.000 0	
X_4^2	1	0.000 578 70	0.000 578 70	0.48	-0.692 3	0.501 9	
残差 Residual	12	0.014 489 00	0.001 207 42				
失拟 Lack of fit	10	0.000 000 333	3.333 333 3E-8	0.00		1.000 0	不显著
纯误差 Pure error	2	0.014 489 000	0.007 244 000				
总离差 Corrected total	26	1.118 541 190					
相关系数 R^2				$R^2 = 0.987 047$			

注: * 表示极显著($P < 0.01$),下同。

Note: * * Shows very statistical significance($P < 0.01$), the same below.

除 X_2 和 X_3 的关系相反外,其余的因素关系与 2.3.2 中进行的响应曲面分析结果基本一致。这与响应曲面对试验范围的分析,而回归分析是整个过程的分析有关。由表 6 可知,4 个特征向量的特征值有正有负,表明此二次响应面是鞍面,无极值存在,因此,不能直接从此二次响应面上找出最佳工艺参数,需要进一步作岭脊分析^[18]。

表 5 因子检验

Table 5 Factor tests

因子 Factor	DF	SS	MS	F	Pr>F	显著性(Pr<0.01) Statistical significance
X_1	5	0.478 400	0.095 680	79.24	<0.000 1	**
X_2	5	0.136 525	0.027 305	22.61	<0.000 1	**
X_3	5	0.154 908	0.030 982	25.66	<0.000 1	**
X_4	5	0.393 711	0.078 742	65.22	<0.000 1	**

表 6 典型值分析

Table 6 Representative values of the response surface experiment

特征值 Eigen Value	特征向量 Eigenvector			
	X_1	X_2	X_3	X_4
0.009 604	0.276 341	0.013 477	0.960 965	0
-0.010 417	0	0	0	1.000 000
-0.072 348	0.017 137	0.999 674	-0.018 948	0
-0.249 505	0.960 907	-0.021 705	-0.276 020	0

表 7

岭脊分析结果

Table 7

Ridge analysis of the response surface experiment

编码半径 Coded radius	预估响应值 Estimated response	标准误差 Standard error	未编码因素值 Uncoded factor values			
			X_1	X_2	X_3	X_4
0.0	1.080 667	0.020 062	0	0	0	0
0.1	1.104 505	0.019 987	0.037 614	0.038 148	0.036 303	0.076 237
0.2	1.127 784	0.019 768	0.069 315	0.073 670	0.077 207	0.154 296
0.3	1.150 627	0.019 420	0.097 232	0.106 425	0.121 695	0.233 260
0.4	1.173 114	0.018 973	0.122 694	0.136 515	0.169 156	0.312 564
0.5	1.195 303	0.018 470	0.146 545	0.164 135	0.219 208	0.391 831
0.6	1.217 237	0.017 976	0.169 342	0.189 503	0.271 603	0.470 791
0.7	1.238 948	0.017 576	0.191 460	0.212 836	0.326 169	0.549 234
0.8	1.260 465	0.017 379	0.213 163	0.234 336	0.382 784	0.626 996
0.9	1.281 810	0.017 507	0.234 639	0.254 188	0.441 359	0.703 943
1.0	1.303 004	0.018 083	0.256 025	0.272 559	0.501 822	0.779 960

表 8

对比验证试验结果

Table 8

Verified by comparing with experimental results

方法 Method	总糖含量 C-Polysaccharides(%)			
	1	2	3	平均值 Mean±SE
热水浸提法 Hot water extraction	1.124 095	1.068 525	1.122 666	1.105 095±0.018 289 9
超声波法 Ultrasonic method	1.129 099	1.163 763	1.247 029	1.179 964±0.034 994 1
预测值 Predicted value				1.183 255 196

3 讨论

超声波破碎法破碎比例较少,且浸入基质料的木屑菌丝时,破碎较为彻底,总糖得率高。但是振幅过低或

2.3.4 岭脊分析与工艺条件的确定 岭脊分析的原理是以原始设计中心点 $X_i=0(i=1,2,3,\dots)$ 为球心, r 为半径的超球面与响应面的交点(即脊点)形成的轨迹范围内找出最佳响应值,即最佳工艺条件。岭脊分析的结果是对每个坐标从编码零值点开始不断扩大,半径 r 可以由试验者自行规定,但不能超出试验范围,而一般当 $r>1.0$ 时,某个试验因素的水平会超过试验水平范围^[19]。因此,为了便于分析,该试验选取 r 在 0.0、0.1、0.2、……1.0 上计算脊点。由表 7 岭脊分析结果可知,随着编码半径 r 的增加,响应值 Y_1 也逐渐增大。当 $r=1.0$ 时,理论响应值达到最大为 1.303 004%,此时。岭脊分析结果为: $X_1=0.256 025$, $X_2=0.272 559$, $X_3=0.501 822$, $X_4=0.779 960$,利用编码公式将上述编码值转变为实际参数为液料比 11.280 125:1 mL·g⁻¹、振幅 41.362 795%、超声时间 21.505 466 min、超声波开启时间 2.733 988 s,考虑实际操作性,故选定调整后工艺参数为液料比(X_1)为 11:1 mL·g⁻¹、振幅(X_2)为 41%、超声时间(X_3)为 22 min、超声波开启时间(X_4)为 2.7 s。

2.3.5 木屑菌丝总糖含量测定工艺验证 在此岭脊分析优化的条件下,以热水浸提法^[19]为对照进行验证试验,设重复 3 次,由表 8 可知,木屑菌丝中总糖含量的平均值为 1.179 964%,与预测值 1.183 255 196%仅相差 0.003 291 196%,且高出热水浸提法 0.074 869%。

时间较短得率较低,可能与菌丝破碎程度有关;破碎时间过长或增幅过大,总糖得率与检测值反而下降,可能与破碎过度导致部分总糖结构受到机械破坏,理化性状

被改变有关。因此采用响应面岭脊分析法优化得到的工艺参数更准确可靠,效率高,有较强的实用价值^[15]。

2010年,高擎等^[16]以竹荪子实体干品为材料,采用响应面分析法确定了竹荪多糖提取的最优工艺条件中料液比1:33 mL·g⁻¹,提取率大11.717%;叶敏^[4]以红托竹荪子实体为材料,优化出多糖最佳工艺条件中料液比1:25 mL·g⁻¹,提取率为7.23%。张伟刚等^[19]通过Box-Behnken设计建立了热水浸提红托竹荪子实体多糖的二次多项式模型,并得到了优化提取工艺条件料液比1:31 mL·g⁻¹,提取次数2次,红托竹荪多糖的提取率为12.05%。以上试验中液料比和提取率均与该研究结果有显著的差异,这与供试材料有关。

该试验范围内建立的二次线性回归模型准确有效,可用来预测设定条件范围内及其周围的红托竹荪木屑菌丝总糖含量测定工艺参数,对试验拟合较好。超声波破碎法也可用于其它基质料中菌丝含量较小不宜采用研磨进行破碎的供试材料,以及其它食用菌菌株的菌丝破碎来提取和检测总糖,甚至对其它成分含量的检测与提取均具有一定的借鉴意义,但是各项工艺参数还需进一步的优化研究。

参考文献

- [1] 吴兴亮,卯晓岚,图里古尔,等.中国药用真菌[M].北京:科学出版社2013:294.
- [2] 连宾,郁建平.红托竹荪多糖的提取分离及组成研究[J].食品科学,2004,25(3):43-45.
- [3] 庄永亮,孙丽平,尚小丽.红托竹荪菌盖多糖的提取及抗氧化能力的研究[J].林产化学与工艺,2011,3(31):45-49.
- [4] 叶敏.红托竹荪多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性[J].贵州农业科学,2012,40(12):172-175.
- [5] 赵凯,王飞娟,潘薛波,等.红托竹荪菌托多糖的提取及抗肿瘤活性的初步研究[J].菌物学报,2008,27(2):289-296.
- [6] 欧阳天赞,李小定,荣建华.真菌多糖抗肿瘤及免疫调节作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2006(18):524-528.
- [7] 龚光禄,桂阳,朱国胜,等.红托竹荪培养基及培养条件优化[J].贵州农业科学,2015,43(11):74-82.
- [8] 卢颖颖,桂阳,龚光禄,等.18个贵州红托竹荪种质资源的遗传多样性[J].贵州农业科学,2014,42(7):17-20.
- [9] 谭力,温洪宇.三种平菇菌丝生长速度与多糖含量比较研究[J].黑龙江农业科学,2013(1):106-107.
- [10] 何惠.长裙竹荪菌丝体多糖的提取条件及抑菌性研究[J].贵州农业科学,2010,38(9):93-95.
- [11] 李婷,侯晓东,陈文学,等.超声波萃取技术的研究现状及展望[J].安徽农业大学,2006,34(13):3188-3190.
- [12] 彭川丛,孔静,游丽君,等.超声波辅助热水浸提香菇多糖响应面优化工艺及其抗氧化活性的研究[J].现代食品科技,2011,27(4):452-456.
- [13] WETTASINGHE M, SHAHIDI F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds[J]. Food Chemistry, 1999, 67: 399-414.
- [14] 赵春江,孙进,彭莉娟,等.响应面法优化鸡腿菇子实体蛋白酶解工艺条件[J].中国食品学报,2013,13(6):88-95.
- [15] 赵岳,杨娜,沈晓俊,等.响应面优化裂褶菌多糖酶解工艺及抑菌研究[J].菌物学报,2015,34(1):139-149.
- [16] 高擎,华洋林,赵谋明,等.响应面法优化提取竹荪多糖的工艺研究[J].现代食品科技,2010,8(26):826-829.
- [17] 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.
- [18] 张琳,樊金玲,朱文学,等.响应面法优化超声波辅助提取甘草多糖工艺[J].食品科学,2010,31(16):67-71.
- [19] 张伟刚,范巧宁,贾琳斐,等.响应曲面法优化热水浸提红托竹荪多糖的工艺研究[J].食品工业科技,2013,34(18):68-72.

Optimization of Ultrasonic Detection Process of *Dictyophora rubrovolvata* Mycelium Total Polysaccharose by Response Surface Analysis

GONG Guanglu¹, GUI Yang^{1,2}, LU Yingying¹, ZHU Guosheng^{1,2}

(1. Guizhou Provincial Institute of Crop Germplasm Resources, Guiyang, Guizhou 550006; 2. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang, Guizhou 550006)

Abstract: *Dictyophora rubrovolvata* was used as test material, by sawdust culture, Mycelium polysaccharose as test index, the effects of liquid-material ratio, amplitude, processing time and ultrasonic duration of ultrasonic on *D. rubrovolvata* sawdust mycelium polysaccharose detection rate were investigated. Based on single factor experiments, response surface analysis was used to optimize the process parameters. The results showed that under the conditions of liquid-material ratio of 11:1 mL·g⁻¹, amplitude of 41%, processing time of 22 minutes and ultrasonic duration of 2.7 seconds, the *D. rubrovolvata* sawdust mycelium polysaccharose detection rate was 1.18%.

Keywords: *Dictyophora rubrovolvata*; sawdust mycelium; total sugar; detection technology