

谢捷,于波,朱兴一,等. 响应面法优化深层培养中国被毛孢虫草多糖闪式提取工艺[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):284-286.

# 响应面法优化深层培养中国被毛孢虫草多糖闪式提取工艺

谢捷,于波,朱兴一,王平

(浙江工业大学药学院/绿色制药技术与装备教育部重点实验室,浙江杭州 310014)

**摘要:**考察了提取温度、时间、液料比等单因素对虫草多糖提取率的影响,并根据 Box - Behnken 中心组合试验设计原理,采用响应面法对闪式提取条件进行优化。结果表明,虫草多糖的最佳提取工艺条件为:提取时间 100 s,提取温度 83 ℃,液料比 25 mL/g,在此条件下多糖提取率达 5.03%,比传统热水浸提法提高了 27.02%,是较为理想的虫草多糖提取方法。

**关键词:**中国被毛孢;虫草多糖;闪式提取;响应面;苯酚-硫酸法

**中图分类号:** R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0284-03

冬虫夏草 (*Cordyceps*) 属于真菌界真菌门子囊菌亚门核菌纲肉座菌目麦角菌科,是冬虫夏草菌 [*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.] 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体。冬虫夏草(简称虫草)是传统名贵中药材和高级滋补药品,虫草中的多糖近年来被证明具有抗癌免疫调节<sup>[1]</sup>、抗氧化活性<sup>[2]</sup>、降血胆固醇<sup>[3]</sup>等作用。由于天然虫草生长对环境要求极高,人工培养极其困难,加上由于滥采导致虫草资源日益稀少,因此从 20 世纪 70 年代起,人类就开始利用现代生物发酵技术培育虫草菌丝体来代替天然虫草<sup>[4]</sup>。虫草多糖的提取工艺主要有热水浸提法<sup>[5-6]</sup>、微波辅助提取法<sup>[7]</sup>、超声辅助提取法<sup>[8]</sup>。目前应用最广泛的是热水浸提法,但该方法提取时间长、温度高、提取率低。闪式提取法是在温和条件下,利用高速剪切力和搅拌力将植物原料粉碎至细微颗粒,并在局部负压渗透作用下使有效成分迅速溶解达到平衡<sup>[9]</sup>。与传统浸提方法相比,闪式提取法具有提取时间短、温度温和、效率高、操作简便等优点<sup>[10]</sup>,目前该方法已被广泛应用在植物成分提取中<sup>[11-12]</sup>,但用于虫草多糖的提取还未见报道。本研究以中国被毛孢为原料,采用闪式提取法提取虫草多糖,并利用响应面法优化提取条件,以期为提取虫草多糖开辟新途径。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与试剂

将中国被毛孢(中美华东医药公司)在 50~55 ℃ 下烘干至恒重后粉碎过筛备用(平均粒径为 2 mm);葡萄糖标品(纯度 95% 以上,上海市阿拉丁试剂有限公司);乙醇、苯酚、浓硫酸均为分析纯;试验用水为去离子水。

收稿日期:2013-01-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:21006097,21076191)。

作者简介:谢捷(1978—),女,浙江杭州人,博士研究生,副教授,主要从事天然药物研究。E-mail: xiejie97@sohu.com。

通信作者:王平,女,博士,教授,从事天然药物研究。E-mail: wangping45@zjut.edu.cn。

### 1.2 仪器

JHBE-50A 可调闪式提取器(郑州市金星科技有限公司);DFY-500 型摇摆式粉碎机(上海市鼎广机械设备有限公司);BUCHIR-210 型旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 有限公司);3-18K 型离心机(德国 Sigma 公司);DZF 型真空干燥箱(上海市精宏试验设备有限公司);756PC 型紫外可见分光光度计(上海市光谱仪器有限公司)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 单因素试验 提取工艺流程:发酵虫草菌丝体→闪式提取→7 000 r/min→浓缩上清液→加 3 倍体积 95% 乙醇溶液沉淀→4 ℃ 静置 24 h→抽滤→沉淀物干燥→虫草多糖初产品。分别考察提取温度、液料比、提取时间对虫草多糖提取率的影响。

1.3.2 虫草多糖含量测定 采用苯酚-硫酸法测定多糖含量,虫草多糖提取率计算方法如下:

$$y = (C \times M_1) / M \times 100\%$$

式中:C 为虫草多糖含量; $M_1$  为虫草多糖初品质量;M 为虫草原料干品质量;y 为虫草多糖提取率。

1.3.3 虫草多糖的单因素试验和响应面分析 选取影响虫草多糖提取率的 3 个因素:提取时间(80、90、100、110、120 s)、液料比(15、20、25、30 mL/g)、水浴提取温度(65、75、85、95、98 ℃)进行单因素考察试验。根据单因素试验结果进行响应面分析,确定虫草多糖提取的最佳工艺条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验对虫草多糖提取率的影响

2.1.1 提取时间 由表 1 可知,在一定范围内随着提取时间的延长,虫草多糖提取率逐渐增加,当时间为 100 s 时,虫草多糖提取率达到最大值,为 3.72%,之后多糖提取率逐步下降,可能是由于多糖支链断裂而引起,故确定提取时间为 100 s。

2.1.2 提取温度 由表 2 可知,当水浴温度为 85 ℃ 时,虫草多糖提取率为 3.70%,水浴温度超过 85 ℃ 后虫草多糖提取率基本恒定,不再随温度的变化而变化,说明其有效成分已经

表1 提取时间对虫草多糖提取率的影响

提取时间(s)	提取得率(%)
80	3.14
90	3.46
100	3.72
110	3.56
120	3.51

表2 提取温度对虫草多糖提取率的影响

提取温度(℃)	提取得率(%)
65	3.41
75	3.50
85	3.70
95	3.72
98	3.71

基本被提取完毕。因此确定提取温度为85℃。

2.1.3 液料比 由表3可知,当液料比为25 mL/g时,虫草多糖提取率达到峰值,随后虫草多糖提取率急剧下降,可能是由于溶剂过量引起物料被过于稀释,刀头不能与物料充分接触,从而降低多糖提取率。故液料比选定为25 mL/g。

表3 液料比对虫草多糖提取率的影响

液料比(mL/g)	提取得率(%)
15	3.00
20	3.71
25	4.95
30	2.85

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 响应面分析因素水平 由于响应面分析法在试验设计和结果表达方面比常规方法更加优良,已被广泛应用于食品、生物工程、化工等领域<sup>[13-16]</sup>。Box - Benhnken 试验设计是一种响应面分析法,该方法试验次数相对较少、效率更高,且所有影响因素不会同时处于高水平,所有试验点都落在安全操作区域内<sup>[17]</sup>。综合单因素试验结果,选取提取时间( $X_1$ )、液料比( $X_2$ )、提取温度( $X_3$ )等3个因素为自变量,以虫草多糖得率( $Y$ )为响应值,根据 Box - Benhnken 的中心组合试验设计原理,设计3因素3水平响应面分析试验。试验因子和水平见表4。

表4 虫草多糖提取中心组合设计因素水平

水平	因素		
	$X_1$ :提取时间(s)	$X_2$ :液料比(mL/g)	$X_3$ :提取温度(℃)
-1	90	20	75
0	100	25	85
1	110	30	95

2.2.2 响应面试验结果 表5是 Box - Benhnken 设计方案及试验结果,表6是回归模型方差分析结果。由表6可见,回归模型的  $F$  值为 27.14,表明该模型高度显著,模拟效果较好;模型  $R^2$  为 0.972 1,表明模型响应值变化的 97.21% 来自所选因变量,预测值与实际值具有高度相关性;失拟项的  $P$  值为 0.401 5 > 0.05,表明该模型不同处理间的差异高度显

著,说明该试验方法准确可靠。试验采用 Design - Expert 8.0.6 Trial 软件的 ANOVA 程序,进行二次回归分析,得到二次多项回归方程: $Y = 5.00 + 0.039X_1 + 0.079X_2 - 0.18X_3 - 0.19X_1X_2 - 0.17X_1X_3 + 0.11X_2X_3 - 0.55 X_1^2 - 0.60X_2^2 - 0.37X_3^2$ 。由表6可知,影响虫草多糖得率的因素按主次顺序为: $X_3 > X_2 > X_1$ ,二次项  $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  以及交互项  $X_1X_2$ 、 $X_1X_3$  也对虫草多糖得率有显著影响,这表明响应值的变化相当复杂,各试验因素对响应值的影响不是简单线性关系。

表5 虫草多糖提取 Box - Benhnken 设计方案及试验结果

编号	因素水平			多糖得率(%)
	$X_1$ :提取时间	$X_2$ :液料比	$X_3$ :提取温度	
1	1	-1	0	3.90
2	-1	1	0	5.06
3	0	-1	-1	4.25
4	-1	-1	0	3.61
5	1	1	0	3.69
6	0	0	0	5.07
7	0	1	1	4.02
8	0	1	-1	4.16
9	0	0	0	5.03
10	0	0	0	5.05
11	0	-1	1	3.65
12	-1	0	-1	3.95
13	0	0	0	4.77
14	1	0	-1	4.53
15	1	0	1	3.87
16	0	0	0	5.06
17	-1	0	1	3.95

表6 虫草多糖提取回归模型方差分析结果

来源	自由度	平方和	均方	$F$ 值	$P$ 值
回归模型	9	4.38	0.49	27.14	0.000 1**
$X_1$	1	0.012	0.012	0.67	0.440 3
$X_2$	1	0.050	0.050	2.76	0.140 4
$X_3$	1	0.25	0.25	13.65	0.007 7**
$X_1X_2$	1	0.15	0.15	8.26	0.023 9*
$X_1X_3$	1	0.11	0.11	6.07	0.043 3*
$X_2X_3$	1	0.053	0.053	2.95	0.129 7
$X_1^2$	1	1.27	1.27	70.77	<0.000 1**
$X_2^2$	1	1.54	1.54	85.65	<0.000 1**
$X_3^2$	1	0.58	0.58	32.42	0.000 7**
残差	7	0.13	0.018		
失拟项	3	0.061	0.020	1.26	0.401 5
净误差	4	0.065	0.016		
总误差	16	4.51			

注:“\*”“\*\*”分别表示在0.05、0.01水平上显著。

2.2.3 响应面分析 为更直观地反映各因素间的交互作用对虫草多糖得率的影响,作出了响应面值  $Y$  与  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  构成的三维空间响应面图(图1)。响应面三维空间的曲面图形中曲线均较陡,说明各因素交互作用显著。通过 Design - Expert 软件求解回归方程,可得出提取虫草多糖的最佳工艺条件为:提取时间 100.67 s、液料比 25.12 mL/g、提取温度 82.54℃。

2.3 最佳工艺条件检验

对上述最优条件进行验证,同时考虑操作方便性,将提取

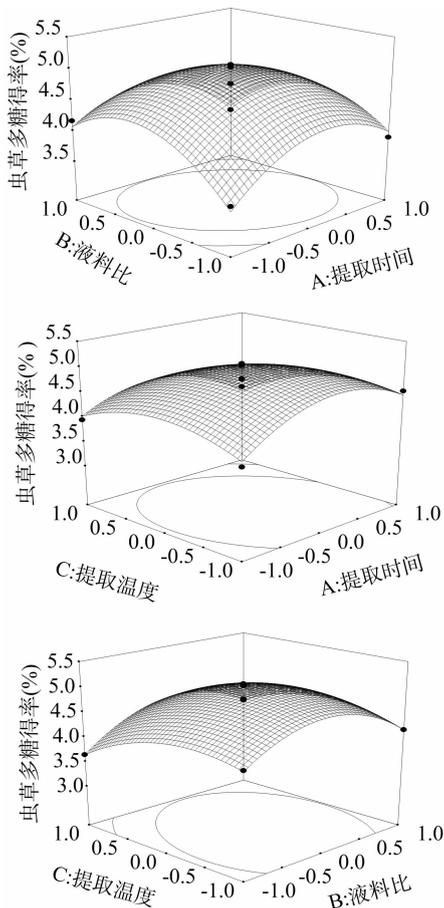


图1 各因素对虫草多糖得率影响的响应面分析

工艺参数修正为:提取时间 100 s、液料比 25 mL/g、提取温度 83 ℃,在该条件下进行 3 次平行试验,结果表明虫草多糖的平均得率为 5.03%,与预测值 5.05% 非常接近。因此,基于响应面法所得的优化提取工艺参数准确可靠,具有实用价值。

#### 2.4 不同多糖提取方法比较

对传统热水回流提取虫草多糖方法进行响应面分析,得到该方法的最佳工艺条件:液料比 23.4 mL/g、提取时间 2.5 h、提取温度 95 ℃。由表 7 可见,利用闪式提取法的虫草多糖提取率比传统热水法高 27.02%,且提取时间大大缩短。

表 7 闪式提取法与热水回流法提取虫草多糖效果比较

提取方法	温度 (℃)	提取时间 (s)	液料比 (mL/g)	提取率 (%)
闪式提取	83	100	25	5.03
热水回流提取	90	150	25	3.96

### 3 结论

闪式提取技术具有快速、高效、低温提取、适用广泛、操作方便、节能等很多优点,该技术可应用于虫草多糖的高效提取。根据响应面法优化的闪式提取虫草多糖的最佳工艺参数为:提取时间 100 s、液料比 25 mL/g、提取温度 83 ℃。在该工艺条件下比传统热水回流法提取率高 27.02%,提取时间由 150 s 缩短到 100 s,提取温度由 95 ℃ 下降到 83 ℃。该方法

简单易行,是一种高效快速提取虫草多糖的方法。

#### 参考文献:

- [1] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 60(3): 258 - 274.
- [2] Li S P, Zhao K J, Ji Z N, et al. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide - induced injury[J]. Life Sciences, 2003, 73(19): 2503 - 2513.
- [3] Kiho T, Yamane A, Hui J, et al. Polysaccharides in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS - F30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 1996, 19(2): 294 - 296.
- [4] Carilli A, Pacioni G. Growth and sporulation of *Cordyceps militaris* (Linn. ex Fr.) Link in submerged culture[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1977, 68(2): 237 - 243.
- [5] 王瑞华, 杨 昕, 涂秩平, 等. 人工蛹虫草子实体多糖的提取与含量测定[J]. 医药导报, 2007, 26(8): 843 - 845.
- [6] 潘中华, 贡成良, 钱 敏. 家蚕蛹虫草多糖的提取及纯化工艺研究[J]. 中国蚕业, 2002, 11(4): 20 - 21.
- [7] 白 霞, 尹莲花, 冯艳伟. 微波法在蛹虫草多糖提取中的应用[J]. 大连民族学院学报, 2005, 5(3): 23 - 24.
- [8] 秦秀丽, 李凤林. 超声波法提取蛹虫草多糖的工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 378 - 380.
- [9] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 401 - 407.
- [10] 吴冬梅. 闪式提取器在中药研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(7): 34 - 37.
- [11] Shi W G, Zu Y G, Zhao C J, et al. Homogenate extraction technology of camptothecine and hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* leaves[J]. Journal of Forestry Research, 2009, 20(2): 168 - 170.
- [12] Zhu X Y, Lin H M, Xie J, et al. Homogenate extraction of isoflavones from soybean meal by orthogonal design[J]. Journal of Scientific and Industrial Research, 2011, 70(6): 455 - 460.
- [13] Yuan Y, Gao Y X, Mao L K, et al. Optimisation of conditions for the preparation of  $\beta$  - carotene nanoemulsions using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2008, 107(3): 1300 - 1306.
- [14] Zhao H Z, Wang J, Lu Z X. Optimization of process parameters of the *Pholiota squarrosa* extracellular polysaccharide by Box - Behnken statistical design[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(3): 677 - 680.
- [15] Yoo S H, Song Y B, Chang P S, et al. Microencapsulation of  $\alpha$  - tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2006, 38(1): 25 - 30.
- [16] Yin G H, Dang Y L. Optimization of extraction technology of the *Lycium barbarum* polysaccharides by Box - Behnken statistical design [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(3): 603 - 610.
- [17] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 91 - 94.