

高丽萍,郑光耀,闫林林,等. 响应面法优化亚临界水提取银耳多糖工艺研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):339-342.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.100

响应面法优化亚临界水提取银耳多糖工艺研究

高丽萍¹, 郑光耀¹, 闫林林¹, 刘晓巍², 张建华², 韦朝宽¹

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所/生物质化学利用国家工程实验室/国家林业局林产化学工程重点开放性实验室,江苏南京 210042; 2. 江苏华安科研仪器有限公司,江苏海安 226600)

摘要:采用亚临界水提取技术提取银耳多糖,考察提取温度、提取时间、液料比对多糖提取得率的影响,结合响应面法优化其提取工艺,并与传统热水浸提法进行比较。结果表明,亚临界水提取银耳多糖的最佳工艺条件为提取温度 138 ℃、提取时间 30 min、液料比 30 mL/g,在该条件下银耳多糖提取得率可达 34.58%。与传统热水浸提法相比,银耳多糖的提取得率提高了 84.23%,亚临界水提取法可明显缩短银耳多糖的提取时间和提高银耳多糖的提取得率。

关键词:银耳;多糖;亚临界水提取;响应面法优化

中图分类号: TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0339-04

银耳是一种经济价值高、营养丰富的药食两用菌,具有润肺生津、滋阴养胃、补脑强心等功效。我国是银耳生产大国,但目前市场上销售的银耳品种单一,绝大部分是未经任何加工的银耳干品,在一定程度上限制了银耳的消费。银耳多糖是银耳的主要活性成分,具有提高机体免疫能力、降血糖、降血脂、抗衰老、抗溃疡、抗血栓形成、抗突变等作用,可广泛应用于功能性食品、医药保健品及日用化妆品等领域^[1-4]。银耳多糖的常用提取方法是热水浸提法,但这种传统的提取方法存在耗时长、提取率低、易造成资源浪费等问题。银耳多糖分为胞外多糖和胞壁多糖,其中胞壁多糖存在于细胞壁内部,用热水浸提很难提取完全,即使是采用稀酸提取法或稀碱提取法,又由于部分多糖易发生水解,破坏多糖的活性结构,导致多糖损失和提取率降低。亚临界水提取技术是近年来发展起来的一种新兴的提取技术,具有提取时间短、提取效率高、环境友好等技术优势,是一种很有开发潜力的绿色提取技术^[5-7]。本研究采用亚临界水提取银耳多糖,研究提取温度、提取时间、液料比对银耳多糖提取得率的影响,并结合响应面分析法优化银耳多糖的亚临界水提取工艺,提高银耳多糖的提取得率,旨在为银耳多糖的开发和利用提供依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

市购干燥的银耳子实体,经万能粉碎机粉碎后,得到过 40 目筛的银耳粉末,备用。葡萄糖标准品;苯酚、浓硫酸均为分析纯;去离子水;UV-2102 PC 型紫外-可见分光光度计;

收稿日期:2015-06-01

基金项目:江苏省产学研前瞻性联合研究项目(编号:BY2011116),江苏省林业三新工程(编号:1ysx[2014]10)。

作者简介:高丽萍(1979—),女,山西孟县人,博士研究生,助理研究员,主要从事植物资源提取分离与开发利用研究。Tel:(025)85482465;E-mail:glpwwl@163.com。

通信作者:郑光耀,副研究员,主要从事植物资源提取分离与开发利用研究。Tel:(025)85482467;E-mail:zhguaya@sina.com。

TGL-16C 型高速台式离心机。自制亚临界水萃取装置,如图 1 所示。

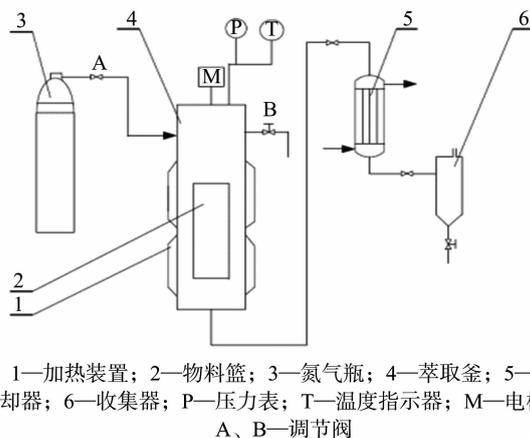


图1 亚临界水萃取装置示意图

1.2 方法

1.2.1 亚临界水提取 称取一定量的银耳粉末置于萃取罐的物料篮内,在不同提取温度、提取时间、液料比的条件下进行提取,亚临界水提液 4 000 r/min 离心 10 min,测量上清液体积,测定银耳多糖含量,计算银耳多糖得率。

1.2.2 热水回流提取 称取一定量的银耳粉末置于圆底烧瓶内,按液料比 60 mL/g 加入去离子水,在 100 ℃水浴锅回流提取 6 h,提取液在 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测定银耳多糖含量,计算银耳多糖得率。

1.2.3 多糖标准曲线制作 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液:将葡萄糖干燥至恒质量后准确称取 1.000 g,用去离子水溶解并定容至 1 L,梯度稀释至 0.1 mg/mL。分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL 葡萄糖标准溶液于 20 mL 比色管中,用去离子水补至 2.0 mL;混合均匀后分别依次加入 5% 苯酚 1.0 mL、浓硫酸 5.0 mL,摇匀;静置 10 min 放入沸水浴中反应 15 min,水浴冷却至室温,490 nm 处进行测量,以吸光度为纵坐标,葡萄糖含量为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.4 多糖测定和计算方法 参考苯酚-硫酸法^[8]测定多

糖含量:准确吸取样品液 1.0 mL,加水补充至 2.0 mL,摇匀,加入 5% 苯酚 1.0 mL,摇匀,再加 5.0 mL 浓硫酸,迅速摇匀。室温放置 5 min,在沸水浴中保温 15 min,用自来水冷却 5 min,再摇匀,于波长 490 nm 处测定吸光度。多糖得率计算公式如下:

$$\text{粗多糖得率} = \frac{C \times V_1 \times N \times 10^{-3}}{V_2 \times m} \times 100\%$$

式中: C 表示经过稀释后测定的多糖含量(μg); V_1 表示提取后得到的上清体积(mL); N 表示稀释倍数; V_2 表示用于测定的上清体积(mL); m 表示用于提取的银耳质量(mg)。

1.2.5 响应优化法试验设计 在提取温度、提取时间、液料比 3 个单因素试验基础上,根据 Box - Behnken 中心组合试验设计原理,采用三因素三水平响应面分析法,依据回归分析确定各工艺条件的影响因子,以多糖提取得率为响应值作响应面与等值线图,分析优化最佳提取条件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

根据文献报道,在亚临界水提取过程中,压力只是用来使水保持液体状态^[9],所以本试验不考虑压力对多糖得率的影响,选择 3 MPa 作为提取压力,研究提取温度、提取时间、液料比 3 个因素对银耳多糖提取得率的影响。

2.1.1 提取温度的影响 在提取时间为 20 min,液料比为 60 mL/g 的条件下,选取提取温度分别为 100、110、120、130、140、150 $^{\circ}\text{C}$,对银耳多糖进行亚临界水提取。由图 2 可知,随着提取温度的升高,多糖得率逐渐升高,100 ~ 130 $^{\circ}\text{C}$ 升高趋势明显,到达 130 $^{\circ}\text{C}$ 后再提高温度,多糖得率有下降趋势。因此,选取 130 $^{\circ}\text{C}$ 作为后续的亚临界水提取温度。

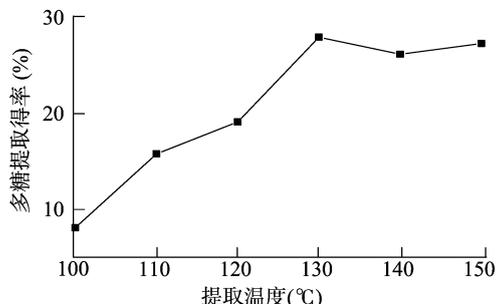


图2 提取温度对银耳多糖提取得率的影响

2.1.2 提取时间的影响 在提取温度为 130 $^{\circ}\text{C}$,液料比为 60 mL/g 条件下,选取提取时间分别为 10、20、30、40、50 min 对银耳多糖进行亚临界水提取。由图 3 可知,在 10 ~ 20 min 内,多糖得率会随着提取时间的延长而增加,继续延长提取时间,多糖得率变化并不明显。因此,选取 20 min 作为后续的亚临界水提取时间。

2.1.3 液料比的影响 在提取温度 130 $^{\circ}\text{C}$,提取时间 20 min 条件下,选择液料比为 20、30、40、50、60 mL/g 对银耳多糖进行亚临界水提取。由图 4 可知,多糖得率随液料比的增大而增加,当液料比在 20 ~ 40 mL/g 之间时,多糖得率增加较快,继续提高液料比多糖得率并没有增加。因此,选取 40 mL/g 作为后续的亚临界水提取液料比。

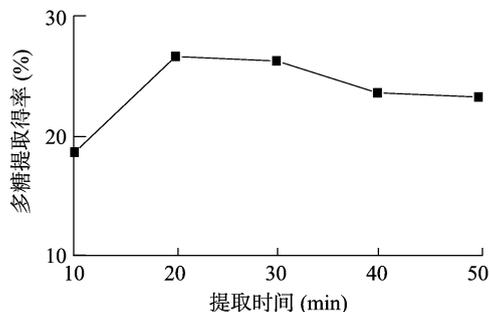


图3 提取时间对银耳多糖提取得率的影响

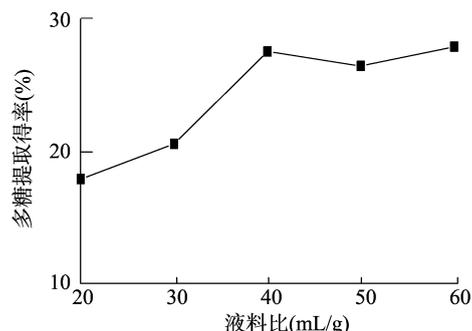


图4 液料比对银耳多糖提取得率的影响

2.2 响应面分析法优化工艺

2.2.1 多糖提取试验方案和因素水平 响应面分析法已经被广泛应用于化学化工、生物工程、食品工业等领域^[10]。根据 Box - Behnken 中心组合试验设计原理,在单因素试验基础上,选取提取温度、提取时间、液料比对银耳多糖亚临界水提取得率影响显著的 3 个因素,采用三因素三水平响应面分析方法进行试验设计(表 1)。

表 1 银耳多糖亚临界水提取响应面分析因素与水平

水平	影响因素		
	提取温度($^{\circ}\text{C}$)	提取时间(min)	液料比(mL/g)
-1	120	10	30
0	130	20	40
1	140	30	50

2.2.2 响应面分析方案及结果 对银耳多糖亚临界水提取工艺进行响应面分析,具体试验方案见表 2。

2.2.3 模型的建立及其显著性检验 运用 Design - Expert 8.0.6 软件对表 2 的试验数据进行多元回归拟合,得到银耳多糖得率(y)对提取温度(x_1)、提取时间(x_2)和液料比(x_3)的二次多项回归模型为: $y = 28.46 + 3.80x_1 + 0.19x_2 - 1.85x_3 + 0.53x_1x_2 - 2.96x_1x_3 - 2.00x_2x_3 - 4.54x_1^2 + 2.16x_2^2 - 3.35x_3^2$ 。运用 Design Expert 软件对 17 个试验点的响应值进行回归分析,得到回归分析表(表 3),对多糖提取得率有交互影响的响应面分析立体曲面图见图 4 至图 6。模型的可靠性可从方差分析及相关系数来考察。当 P 值 < 0.05 即表示该项指标显著。从表 3 可知,整体模型的 P 值是 0.000 4,可知各次试验的模型预测值与实测值比较相符。确定系数 $R^2 = 0.784 7$,表明该二次方程模型较显著,试验设计可靠。温度对银耳多糖得率影响高度显著,提取时间与液料比较不

表2 银耳多糖亚临界水提取工艺响应面分析方案及结果

序号	提取温度(°C)	提取时间(min)	液料比(mL/g)	多糖提取得率(%)
1	130.00	20.00	40.00	27.56
2	120.00	20.00	50.00	14.92
3	130.00	20.00	40.00	28.85
4	120.00	10.00	40.00	20.77
5	140.00	20.00	50.00	17.44
6	130.00	30.00	30.00	26.50
7	120.00	30.00	40.00	24.65
8	130.00	30.00	50.00	23.86
9	140.00	10.00	40.00	26.45
10	130.00	20.00	40.00	28.68
11	140.00	30.00	40.00	32.45
12	130.00	10.00	30.00	26.68
13	120.00	20.00	30.00	17.77
14	130.00	20.00	40.00	28.24
15	140.00	20.00	30.00	32.14
16	130.00	20.00	40.00	28.97
17	130.00	10.00	50.00	32.05

表3 二次回归模型的方差分析结果

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
A:温度	1	115.29	115.29	8.42	0.022 9
B:时间	1	0.29	0.29	0.021	0.889 3
C:料液比	1	27.45	27.45	2.01	0.199 6
AB	1	1.12	1.12	0.082	0.782 8
AC	1	35.11	35.11	2.56	0.153 3
BC	1	16.04	16.04	1.17	0.314 9
A ²	1	86.88	86.88	6.35	0.039 8
B ²	1	19.69	19.69	1.44	0.269 4
C ²	1	47.25	47.25	3.45	0.105 5
回归	3	95.82	13.69	95.52	0.000 4
误差项	4	1.32	0.33		
总回归	16	444.97			

显著。在所选取的各因素水平范围内,按照对结果的影响排序,其顺序为提取温度>液料比>提取时间。

2.2.4 因素间的交互影响 由图5可以看出,若液料比固定不变,提取温度与提取时间的交互作用对银耳多糖得率的影响显著,多糖得率随提取温度及提取时间的增加而呈现由低到高再降低的趋势,即多糖得率在合适的提取温度及提取时间下具有极大值,该极大值存在于响应曲面的顶部,即响应面的最高点,也是等高线最小得椭圆的中心点。

由图6可知,若提取时间固定不变,提取温度与液料比的交互作用对多糖得率的影响显著,多糖得率随提取温度及液料比的增加而呈现由低到高再降低的趋势,即多糖得率在合适的提取温度及液料比下具有极大值,该极大值存在于响应曲面的顶部,即响应面的最高点,也是等高线的最小得椭圆的中心点。

由图7可知,若提取温度固定不变,提取时间及液料比之交互作用对多糖得率的影响显著,多糖得率随提取时间及液料比的增加而呈现由低到高再降低的趋势,即多糖得率在合适的提取时间及液料比下具有极大值,该极大值存在于响应曲面顶部,即响应面的最高点,也是等高线最小得椭圆中心点。

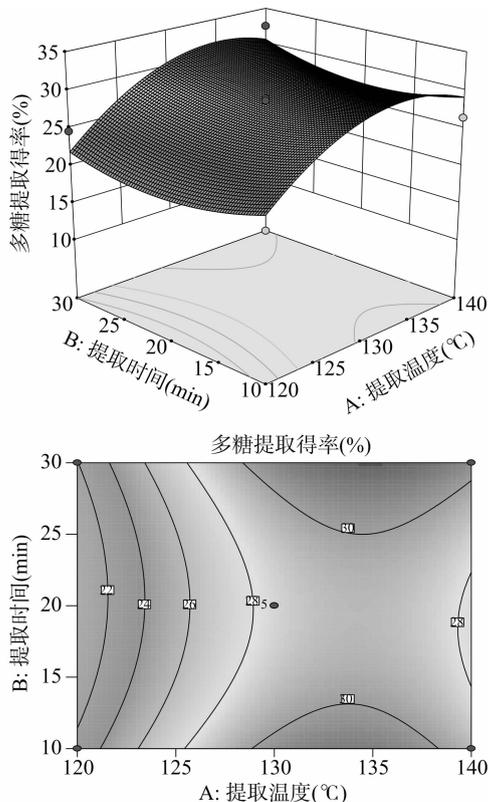


图5 提取温度及提取时间影响多糖得率的响应曲面图和等高线图

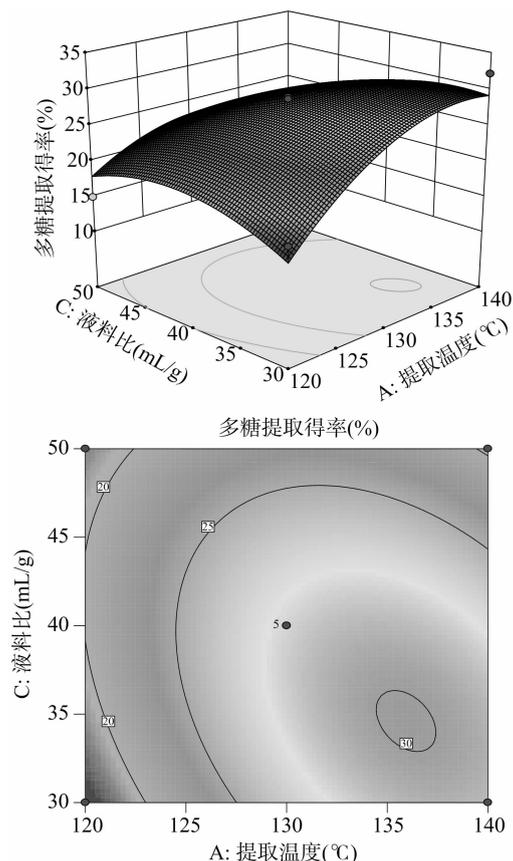


图6 亚临界水萃取提取温度及液料比影响多糖得率的响应曲面图和等高线图

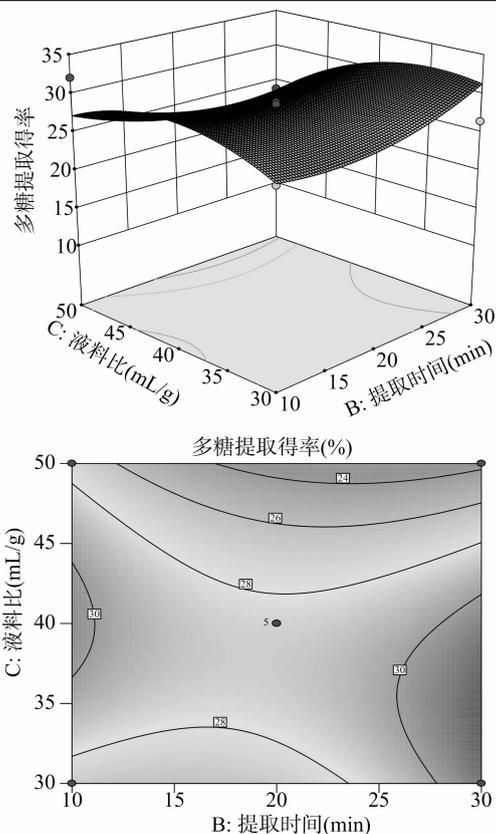


图7 亚临界水萃取提取时间及液料比影响多糖得率的响应曲面图和等高线图

提取温度与液料比对银耳多糖提取得率的交互效应最为显著,表现为曲线较陡;提取温度与提取时间对银耳多糖提取得率的交互效应次之;提取时间与液料比对银耳多糖提取率的交互效应不显著,相应表现为曲线较为平滑。

2.2.5 优化最佳组合条件 通过上述分析可知,合适的提取温度、提取时间和液料比有利于银耳多糖的提取,因此可以采用软件优化功能或者利用二次方程模型分别对参数 X_i 求导,联解求导所得的方程,即可得到最佳试验条件。本试验采用软件 Optimization 的 Numerical 优化功能,在试验因素取值范围内选择最低点为出发点,响应值选取最大值,可优化得到亚临界水萃取银耳多糖的理论最佳条件,即最佳提取温度 137.8 ℃,提取时间 30 min,液料比 30.81 mL/g,在此条件下,银耳多糖提取得率的理论预测值为 34.26%。考虑到实际操作的便利性,将银耳多糖的最佳提取条件修正为提取温度 138 ℃、提取时间 30 min、液料比 30 mL/g。

2.3 验证试验

为检验 RSM 优化法的可靠性,采用上述最优提取条件进行银耳多糖亚临界水提取试验,实际测定银耳多糖的提取得率为 34.58%,与理论预测值 34.26% 误差约 0.9% 左右,证明响应面法适用于对银耳多糖亚临界水提取工艺进行回归分析和参数优化,具有较高的实用价值。

2.4 亚临界水提取法与传统热水浸提法的比较

从表 4 可以看出,亚临界水提取法在提取温度 138 ℃、提取时间 30 min、液料比 30 mL/g 条件下,银耳多糖提取得率为

34.58%。利用传统热水浸提法^[11],在提取温度为 100 ℃、提取时间 6 h、液料比 60 mL/g 条件下,银耳多糖提取得率仅为 18.77%。由此可知,亚临界水提取法可明显降低银耳多糖的提取时间并提高银耳多糖提取得率。

表 4 亚临界水提取与传统热水浸提银耳多糖比较

提取方法	提取温度 (°C)	提取时间 (min)	液料比 (mL/g)	多糖提取得率 (%)
亚临界水提取	138	30	30	34.58
传统热水浸提	100	360	60	18.77

3 结论

采用亚临界水提取技术提取银耳多糖,通过单因素试验对该方法影响多糖提取得率的主要因素提取温度、提取时间、液料比进行了研究,并在此基础上采用三因素三水平响应面分析法进行了试验,获得亚临界水提取银耳多糖的最佳工艺条件为提取温度 138 ℃、提取时间 30 min、液料比 30 mL/g,此时银耳多糖提取得率为 34.58%。亚临界水萃取法与传统热水浸提法相比,银耳多糖的提取得率提高了 84.23%,结果证实亚临界水提取法具有提取时间短、提取效率高等优点,是一种有效的银耳多糖提取技术。

参考文献:

- [1] Baets S D, Vandamme E J. Extracellular tremella polysaccharides: structure, properties and applications [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23 (17): 1361 - 1366.
- [2] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2002, 60 (3): 258 - 274.
- [3] 黄秀锦. 银耳多糖的提取、分离、纯化及其功能性质研究[J]. *食品科学*, 2008, 29 (1): 134 - 136.
- [4] Yan Y L, Yu C H, Chen J, et al. Ultrasonic - assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83 (1): 217 - 224.
- [5] 郑光耀, 薄采颖, 张景利, 等. 亚临界水萃取技术在植物提取物领域的应用研究进展[J]. *林产化学与工业*, 2010, 30 (5): 108 - 114.
- [6] 郭娟, 丘泰球, 杨日福, 等. 亚临界水萃取技术在天然产物提取中的研究进展[J]. *现代化工*, 2007, 27 (12): 19 - 23.
- [7] Rangsrivong P, Rangkadilok N, atayavivad J, et al. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. fruits [J]. *Separation and Purification Technology*, 2009, 66 (1): 51 - 56.
- [8] 鲜乔, 张拥军, 蒋家新, 等. 胞壁溶解酶用于黑木耳破壁提取工艺的研究[J]. *中国食品学报*, 2012, 12 (3): 96 - 103.
- [9] 薄采颖, 郑光耀, 陈琰, 等. 松树皮多酚的亚临界水提取及抗氧化活性初探[J]. *林产化学与工业*, 2011, 31 (6): 73 - 77.
- [10] 张寒俊, 刘大川, 李永明. 响应面分析法在菜籽浓缩蛋白制备工艺中的应用[J]. *中国油脂*, 2004, 29 (8): 41 - 44.
- [11] 任清, 李守勉, 李丽娜, 等. 银耳多糖的提取及其美容功效研究[J]. *日用化学工业*, 2008, 38 (2): 103 - 109.