

超声波法提取茯苓菌丝体胞内多糖的研究

韩 勇

(山西药科职业学院,山西 太原 030031)

摘要:为了更好地利用茯苓菌丝体胞内多糖,对茯苓菌丝体胞内多糖的超声波法提取工艺进行了研究。在单因素试验的基础上,采用响应面法试验,优化了超声波法提取工艺。结果表明:优化的胞内多糖超声波法提取工艺条件为液料比 23:1,超声功率 100 W,提取温度 66℃,提取时间 27 min。在此条件下,多糖提取率为 2.99%。

关键词:茯苓菌丝体;胞内多糖;超声波;提取;响应面

中图分类号:S567.3⁺2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)06-0112-05

茯苓多糖具有调节机体免疫,抑制肿瘤生长等功能,已成为近年来研究较多的真菌多糖,有着广阔的开发价值和应用前景。目前,液体深层发酵技术是生产药用真菌的方法之一,通过此法生产的真菌多糖主要有菌丝体胞内多糖和胞外多糖^[1]。与传统的栽培法相比,液体深层发酵培养生产茯苓可克服地域、气候和病虫害等条件制约,周期短、产量大,易于实现工业化生产^[2-3]。

传统的多糖提取方法有热水浸提法、酶浸提法和酸碱浸提法,近年来,超声波和微波等提取技术被广泛的应用于天然产物有效成分的提取^[4]。

该试验通过超声波法提取茯苓菌丝体胞内多糖,应用响应面法试验设计对提取工艺条件进行优化,为今后茯苓菌丝体胞内多糖的研究利用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 试验用样品及仪器设备

通过 10 L 发酵罐发酵得到的茯苓菌丝体,60℃干燥至恒重,研磨粉碎,过筛。主要仪器设备有 TGL20M-II 高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司),DL-360B 智能超声波清洗器(上海之信仪器有限公司),FA1004 电子分析天平(上海恒平科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 超声波法提取多糖 精确称量茯苓菌丝体粉末 1.0 g 于烧杯中,加入一定体积的蒸馏水,按试验条件进行多糖超声波提取。提取液经离心,收集上清液,加入 3 倍体积的无水乙醇,醇沉

8 h,收集沉淀,测定粗多糖干重,计算多糖提取率。以多糖提取率为检测指标,研究液料比、超声功率、提取温度和提取时间对多糖提取效果的影响。通过单因素试验找出试验因素水平范围,采用 Box-Behnken 试验设计对超声波法提取茯苓菌丝体胞内多糖工艺条件进一步优化,运用响应面分析确定影响因素的最佳条件。

设定超声功率 90 W,提取温度 60℃,提取时间 30 min,调节液料比(mL:g)为 10:1、20:1、30:1、40:1 和 50:1,按 12.1 进行超声波法提取多糖,测定粗多糖干重,计算多糖提取率,研究不同液料比对多糖提取效果的影响。

设定液料比(mL:g)为 20:1,提取温度 60℃,提取时间 30 min,调节超声功率为 30,60,90,120,150 和 180 W,按 1.2.1 进行超声波法提取多糖,测定粗多糖干重,计算多糖提取率,考察不同超声功率对多糖提取效果的影响。

设定液料比(mL:g)为 20:1,超声功率 90 W,提取时间 30 min,调节提取温度为 40,50,60,70,80 和 90℃,按 1.2.1 进行超声波法提取多糖,测定粗多糖干重,计算多糖提取率,考察不同提取温度对多糖提取效果的影响。

设定液料比(mL:g)为 20:1,超声功率 90 W,提取温度 60℃,调节提取时间为 10,20,30,40,50 和 60 min,按 12.1 进行超声波法提取多糖,测定粗多糖干重,计算多糖提取率,考察不同提取时间对多糖提取效果的影响。

1.2.2 检测项目及方法 粗多糖干重的检测以无水乙醇洗涤经醇沉的沉淀物 2 次,60℃干燥至恒重后称重^[5]。多糖提取率公式计为,多糖提取率(%)=(粗多糖干重/菌丝体干重)×100^[6]。

收稿日期:2013-03-06

作者简介:韩勇(1978-),男,山西省太原市人,硕士,助教,从事发酵工程研究。E-mail:swxyhy@163.com。

2 结果与分析

2.1 多糖提取单因素试验

2.1.1 液料比优化试验 由表 1 可知,随着液料

比的增加,多糖提取率也随之增加,但液料比超过 20:1 以后,多糖提取率增加缓慢,考虑到多糖的后续纯化操作,确定液料比为 20:1 较为合理。

表 1 液料比对多糖提取率的影响

Table 1 Effects of liquid and solid ratio on extraction rate of polysaccharide

液料比/mL:g Liquid and solid ratio	10:1	20:1	30:1	40:1	50:1
多糖提取率/% Extraction rate of polysaccharide	2.53	2.92	2.93	2.95	2.94

2.1.2 超声功率优化试验 由表 2 可知,随着超声功率的增加,细胞结构被破坏,胞内多糖的溶出量也增加,在 90~120 W 时,多糖提取率较高,当

继续增加超声功率,多糖提取率开始下降,可能是过大的超声功率破坏了多糖结构^[7]。因此确定较适宜的超声功率为 90 W。

表 2 超声功率对多糖提取率的影响

Table 2 Effects of ultrasonic power on extraction rate of polysaccharide

超声功率/W Ultrasonic power	30	60	90	120	150	180
多糖提取率/% Extraction rate of polysaccharide	2.44	2.72	2.94	2.93	2.82	2.57

2.1.3 提取温度优化试验 由表 3 可知,随着提取温度的升高,多糖提取率明显提高,在 60~70℃ 时,多糖提取率较高,当继续提高温度,多糖

提取率有所下降。升高温度可以增加胞内多糖的溶出量,但过高的提取温度也可破坏多糖结构^[6]。因此确定较适宜的提取温度为 60℃。

表 3 提取温度对多糖提取率的影响

Table 3 Effects of extraction temperature on extraction rate of polysaccharide

提取温度/℃ Extraction temperature	40	50	60	70	80	90
多糖提取率/% Extraction rate of polysaccharide	2.67	2.83	2.92	2.93	2.87	2.75

2.1.4 提取时间优化试验 由表 4 可知,随着提取时间的延长,多糖提取率也随之增加,当提取时间超过 30 min 后,由于处理时间过长,多糖提

取率开始缓慢下降。因此确定提取时间为 30 min。

表 4 提取时间对多糖提取率的影响

Table 4 Effects of extraction time on extraction rate of polysaccharide

提取时间/min Extraction time	10	20	30	40	50	60
多糖提取率/% Extraction rate of polysaccharide	2.58	2.90	2.95	2.92	2.87	2.82

2.2 响应面优化多糖提取工艺条件

在单因素试验的基础上,以液料比、超声功率、提取温度和提取时间为自变量,多糖提取率为

响应值,对胞内多糖提取条件进行 Box-Behnken 优化试验,因素水平见表 5,试验设计及结果见表 6,方差分析见表 7。

表 5 Box-Behnken 设计因素水平

Table 5 Factors and levels of Box-Behnken design

水平 Levels	A 液料比/mL:g Liquid and solid ratio	B 超声功率/W Ultrasonic power	C 提取温度/℃ Extraction temperature	D 提取时间/min Extraction time
-1	10:1	60	50	20
0	20:1	90	60	30
1	30:1	120	70	40

表6 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 6 Box-Behnken design and results

编号 No.	液料比/mL:g Liquid and solid ratio	超声功率/W Ultrasonic power	提取温度/℃ Extraction temperature	提取时间/min Extraction time	多糖提取率/% Extraction rate of polysaccharide
1	10:1	60	60	30	2.56
2	20:1	120	50	30	2.79
3	10:1	120	60	30	2.75
4	30:1	90	50	30	2.82
5	20:1	60	60	40	2.68
6	30:1	90	70	30	2.88
7	20:1	60	70	30	2.73
8	30:1	90	60	20	2.86
9	20:1	90	50	40	2.73
10	20:1	60	60	20	2.75
11	20:1	90	60	30	2.93
12	10:1	90	60	40	2.56
13	20:1	90	60	30	2.96
14	20:1	90	60	30	2.94
15	30:1	90	60	40	2.80
16	30:1	60	60	30	2.76
17	10:1	90	50	30	2.66
18	20:1	90	60	30	2.90
19	20:1	90	50	20	2.81
20	20:1	120	70	30	2.91
21	30:1	120	60	30	2.85
22	20:1	120	60	20	2.84
23	20:1	90	70	40	2.79
24	10:1	90	60	20	2.62
25	20:1	90	70	20	2.89
26	20:1	60	50	30	2.67
27	20:1	90	60	30	2.92
28	20:1	120	60	40	2.72
29	10:1	90	70	30	2.81

表7 Box-Behnken 试验设计方差分析
Table 7 Box-Behnken design variance analysis

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	0.3199	14	0.0229	16.2671	<0.0001**
A	0.0850	1	0.0850	60.5144	<0.0001**
B	0.0420	1	0.0420	29.9042	<0.0001**
C	0.0234	1	0.0234	16.6636	0.0011**
D	0.0200	1	0.0200	14.2432	0.0021**
AB	0.0025	1	0.0025	1.7797	0.2035
AC	0.0020	1	0.0020	1.4415	0.2498
AD	0.0000	1	0.0000	0.0000	1.0000
BC	0.0009	1	0.0009	0.6407	0.4368
BD	0.0006	1	0.0006	0.4449	0.5156
CD	0.0001	1	0.0001	0.0712	0.7935
A ²	0.0767	1	0.0767	54.6091	<0.0001**
B ²	0.0633	1	0.0633	45.0278	<0.0001**

续表 7

Continuing Table 7

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
C ²	0.0097	1	0.0097	6.9335	0.0197*
D ²	0.0570	1	0.0570	40.5835	<0.0001**
残差 Residual	0.0197	14	0.0014		
失拟项 Lack of fit	0.0177	10	0.0018	3.5333	0.1176
误差项 Pure error	0.0020	4	0.0005		
总离差 Total deviation	0.3396	28			

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

运用 Design Expert 软件对表 6 数据进行二次多元回归拟合,得回归方程: $Y = 2.93 + 0.08417A + 0.05917B + 0.04417C - 0.04083D - 0.025AB - 0.0225AC + AD + 0.015BC - 0.0125BD - 0.005CD - 0.10875A^2 - 0.09875B^2 - 0.03875C^2 - 0.09375D^2$ 。

回归方程的决定系数 R^2 为 0.9421,说明回归模型的拟合程度很好,可以用来预测多糖提取率。

回归模型显著可靠 ($P < 0.0001$),而失拟项不显著 ($P > 0.05$),表明可以利用该回归方程确定最优的茯苓菌丝体胞内多糖提取工艺条件。

根据回归方程,做出不同因子的响应面分析图(见图 1)。响应面分析图直观地反映了各因素交互作用对响应值的影响。

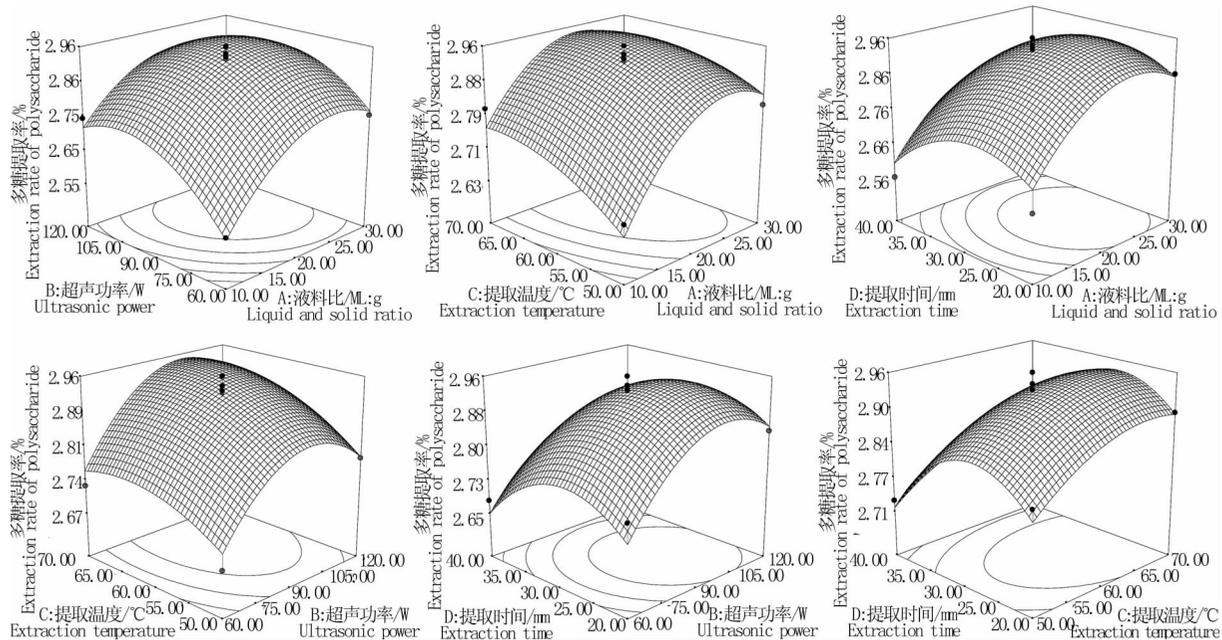


图 1 各因素交互作用的响应面

Fig. 1 The response surface of each factors interactive effect

由图 1 可知,拟合曲面有最大值,通过岭脊分析^[8],得到最大值所对应的各因素的编码值: $A = 0.2924$, $B = 0.3211$, $C = 0.5628$, $D = -0.2544$,通过 Design Expert 软件求解方程,得出多糖提取工艺优化的条件为液料比 22.92:1,超声功率 99.63 W,提取温度 65.63℃,提取时间 27.46 min。该模型预测的多糖提取率为 2.97%。考虑到实际操作,将提取工艺的最优条件修正为液料比 23:1,超声

功率 100 W,提取温度 66℃,提取时间 27 min。

2.3 回归模型试验验证

为检验优化结果的可靠性,采用修正后的最优提取条件进行多糖提取验证试验,试验重复 3 次,结果取平均值,测得多糖提取率为 2.99%,与模型预测值基本吻合,表明两者之间具有良好的拟合性,模型可较好地反映茯苓菌丝体胞内多糖提取工艺条件,优化模型可靠。

3 结论

该试验采用单因素及响应面试验法优化了茯苓菌丝胞内多糖的超声波提取工艺条件,优化后的工艺参数为液料比 23:1,超声功率 100 W,提取温度 66℃,提取时间 27 min。该工艺提取效率高,操作方便,可用于茯苓菌丝胞内多糖的提取。

参考文献:

- [1] 邹祥,胡昌华,章克昌. 姬松茸胞内多糖提取工艺的研究[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2004,29(5):891-894.
- [2] 李羿,李晨,游元元,等. 茯苓发酵罐补料液体发酵的研究[J]. 化学研究与应用,2011,23(7):847-851.
- [3] 王谦,冀宏,丁万杰,等. 茯苓的发酵研究及其动物免疫学观察[J]. 中国食用菌,2002,21(2):41-42.
- [4] 王雪冰,赵天瑞,樊建. 食用菌多糖提取技术研究概况[J]. 中国食用菌,2010,29(2):3-6.
- [5] 程红兵,韩勇,任盛,等. *Rhizobium* sp. N613 胞外多糖分离纯化及抗 S180 肉瘤的研究[J]. 中国药理学杂志,2008,43(4):268-272.
- [6] 陈德育,田广文,李学俊,等. 超声波提取猪苓菌丝多糖工艺优选[J]. 食用菌,2006(6):60-62.
- [7] 王俊颖,都风华,陈甜甜,等. 香菇多糖超声波提取工艺的研究[J]. 食品与发酵科技,2011,47(3):96-99.
- [8] 曹小红,蔡萍,李凡,等. 利用响应面法优化 *Bacillus natto* TK-1 产脂肽发酵培养基[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(4):59-65.

Study on Extraction Technology of Intracellular Polysaccharide from *Poria cocos* Mycelia by Ultrasonic Wave

HAN Yong

(Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan, Shanxi 030031)

Abstract: In order to better use intracellular polysaccharide from *Poria cocos* mycelia, the optimal extraction technology of intracellular polysaccharide from *Poria cocos* mycelia by ultrasonic wave was investigated. Based on the single factor design, the extraction technology of intracellular polysaccharide was optimized by the response surface methodology. The results showed that the optimal extraction technology were as follows: liquid and solid ratio of 23:1, ultrasonic power 100 W, extraction temperature 73℃ and extraction time 27 min. Under those conditions, the extraction rate of polysaccharide was 2.99%.

Key words: *Poria cocos* mycelia; intracellular polysaccharide; ultrasonic wave; extraction; response surface methodology

第九届全国鲜食玉米大会暨第二届全国鲜食玉米节

第九届全国鲜食玉米大会 2013 年 8 月在长春举办。大会 2005 年创办,是全国影响力较大的鲜食玉米产业交流平台。大会组委会诚邀您光临!

时间地点

时间:8月13日全天报到,8月13日晚、14~15日全天
开会地点:长春国际会展中心大饭店(长春市经济技术开发区会展大街100号)

组织机构

主办单位:全国鲜食玉米产业联盟 玉米深加工国家工程研究中心 农特网

特别协办:先正达中国 温岭雁鸣粮食机械场 阿根廷博收种子有限公司

协办单位:吉林大学农学部 吉林省制冷学会

承办单位:吉林省农特产品加工协会

十大内容

一、产业公益与品种、产品评选

二、参会代表互动联谊座谈会

交流产情、行情、供求信息发布

三、产业趋势与营销峰会

甜、糯玉米产业趋势与行情分析,鲜食玉米企业经营模式创新

四、育种栽培学术成果发布与技术交流会

鲜食玉米育种栽培学术研讨与成果发布

甜玉米、糯玉米(白糯、黄糯、花糯、黑糯、紫糯、甜加糯)、笋玉米现场品尝评价

五、产品加工技术交流会

鲜穗与速冻穗采收、储运、加工质量管控与技术交流

真空保鲜玉米技术交流与专家答疑、甜玉米罐头生产工艺技术交流

加工用品种、加工产品、设备、项目供需发布对接

速冻与脱水果蔬产情行情分析与专业咨询

六、鲜食玉米主产区经济发展研讨会

七、经销商、采购商座谈会

八、大会招待酒会

九、大型品种试种观摩

吉林市农科院集中展示国内外 260 个甜、糯、甜加糯品种,现场种子定货洽谈。

十、鲜食玉米种子、加工产品、设备展洽订货会

展洽范围:鲜食玉米种子,鲜穗,真空保鲜穗,冷冻穗及籽粒,甜玉米与笋玉米罐头、饮料,玉米汁,爆玉米,辅料与添加剂,设备与包装物,农资产品,速冻果蔬

会后长白山两日游、俄罗斯海参崴四日游

大会组委会秘书处(吉林省农特产品加工协会)

电话:0431-86931008 13844085590 传

真:87835765

大会网站: www.nongtewang.org(农特网) 邮

箱:ntcpjg@126.com