

热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖工艺研究

郑婷婷^{1,2}, 张文杰², 严亮², 龚婉莹², 王雪峰¹, 廖国周¹, 谷大海¹, 范江平^{1,*}

(1. 云南农业大学 食品科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 普洱茶研究院, 云南 普洱 665000)

摘要: 探讨热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖, 选择液料比、提取温度和提取时间进行单因素试验, 应用响应曲面法进行优化, 优化后的提取工艺条件为: 液料比 34:1 (mL/g), 提取温度 51 ℃, 提取时间 3.1 h, 多糖的提取率为 16.67%, 与预测值接近, 表明响应面优化的模型参数准确可靠。

关键词: 黄皮疣柄牛肝菌; 多糖; 热水法; 提取率; 响应曲面

Study on Extraction Technology of Polysaccharide of *Leccinum crocipodium* (Letellier.)

Watliag by Hot Water Method

ZHENG Ting-ting^{1,2}, ZHANG Wen-jie², YAN Liang², GONG Wan-ying²,

WANG Xue-feng¹, LIAO Guo-zhou¹, GU Da-hai¹, FAN Jiang-ping^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan,

China; 2. Pu'er Tea Research Institute, Pu'er 665000, Yunnan, China)

Abstract: The paper was aimed to study the extraction of polysaccharides of *Leccinum crocipodium* (Letellier.) Watliag by hot water method. Liquid-solid ratio, extraction temperature and time were selected as single factors, and the response surface method was used to optimize the process. The optimum conditions were as follows: liquid-solid ratio 34:1 (mL/g), the extraction temperature 51 ℃, the extraction time 3.1 h, the extraction rate of the polysaccharide was 16.67%, which was close to the predicted value. It showed that the model parameters of the response surface optimization were accurate and reliable.

Key words: *Leccinum crocipodium* (Letellier.) Watliag; polysaccharide; hot water method; extraction ration; response surface

引文格式:

郑婷婷, 张文杰, 严亮, 等. 热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(4): 38-42

ZHENG Tingting, ZHANG Wenjie, YAN Liang, et al. Study on Extraction Technology of Polysaccharide of *Leccinum crocipodium* (Letellier.) Watliag by Hot Water Method[J]. Food Research and Development, 2019, 40(4): 38-42

多糖(polysaccharide)是由 10 个及以上单糖通过糖苷键形成的多羟基醛酮类的高分子聚合物。多糖的来源广泛, 主要来源于高等光合植物、真菌、藻类、细菌等, 与蛋白质、脂质、核酸一起被视为生物体内重要的 4 种生物大分子物质^[1]。现代研究表明, 多糖具有抗氧化、抗辐射、降血糖、抗肿瘤、调节免疫等多种生物活

性, 由于药用真菌多糖及食用菌多糖具有显著的免疫调节作用和抗肿瘤活性, 因此可作为营养保健品及治疗药物的重要来源^[2-3]。

黄皮疣柄牛肝菌[*Leccinum crocipodium* (Letellier.) Watliag], 滇中称为黄癞头, 属真菌界(*Fungi*), 担子菌门(*Basidiomycota*), 伞菌纲(*Agaricomycetes*), 牛肝菌目(*Boletales*), 牛肝菌科(*Boletaceae*), 疣柄牛肝菌属(*Leccinellum*)。夏秋季生阔叶林下, 分布广泛, 属树木外生菌根菌^[4-5]。研究表明, 黄皮疣柄牛肝菌含有丰富的蛋白质、粗纤维、矿物质等营养成分及多酚、多糖等生物活性成分^[6]。目前对黄皮疣柄牛肝菌的研究主要

基金项目: 云南省科技计划项目(2013IB010)

作者简介: 郑婷婷(1987—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品工程。

* 通信作者: 范江平(1972—), 男(汉), 教授, 博士, 研究方向: 食品科学。

集中在营养成分的分析及多酚生物活性的研究^[7],对黄皮疣柄牛肝菌多糖的研究较少。多糖的提取方法较多,热水提取法作为多糖提取最常规的方法之一,具有设备简单,易于操作,成本低廉且对天然活性物质结构影响较小等优点。因此,本试验采用热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖,在单因素试验的基础上,采用响应曲面法进行优化,得出最佳提取工艺条件,以期对黄皮疣柄牛肝菌多糖活性的深入研究及其开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜黄皮疣柄牛肝菌:云南易门康源菌业有限公司;葡萄糖:天津市致远化学试剂有限公司;苯酚:天津市风船化学试剂科技有限公司;浓硫酸:云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HWS28 型电热恒温水浴锅:上海一恒科技有限公司;UV-2450 型紫外分光光度计:岛津仪器(苏州)有限公司;HC-3018R 高速冷冻离心机:安徽中科中佳科学仪器有限公司;FW135 型粉碎机:天津泰斯特仪器有限公司;FST-PF-UP 普利菲尔实验室超纯水机:上海富诗特仪器设备有限公司;Mettler-Toledo MS104TS 分析天平:上海徼川精密仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖

鲜菌除杂清洗一切片—冷冻干燥—打粉—过 80 目筛—备用。取 0.5 g 粉末,以去离子水为溶剂,以一定的液料比、提取温度和提取时间热水提取黄皮疣柄牛肝菌多糖。提取液经 4 000 r/min 离心 10 min,取上清,采用苯酚硫酸法测定多糖含量,计算提取率。

1.3.2 葡萄糖标准曲线绘制

配置浓度为 100 μg/mL 的葡萄糖标准溶液,分别吸取葡萄糖标准溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 于 25 mL 比色管中,分别补水至 1 mL,然后加入 5 %的苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5 mL,摇匀,沸水浴 15 min,取出后迅速冷却至室温。以去离子水作为空白对照,在 490 nm 波长下测吸光度,以葡萄糖浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $y=0.009\ 6x-0.003\ 5$, $R^2=0.999\ 8$ 。

1.3.3 黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率测定

取 1 mL 上清液定容于 100 mL 容量瓶,精确吸取 1 mL 溶液于比色管,依次加入 1 mL 5 %的苯酚溶液,

摇匀,浓硫酸 5 mL,摇匀,沸水浴 15 min,取出后迅速冷却至室温。以去离子水作为空白对照,在 490 nm 处用分光光度计测量吸光度。根据葡萄糖标准曲线方程计算多糖提取率。计算公式如下:

多糖提取率/%=[(C×V×N)×10⁻³/m]×100

式中:C 为测得的多糖溶液浓度,μg/mL;V 为多糖溶液测定体积,mL;N 为样品稀释倍数;m 为样品质量,mg。

1.3.4 热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖单因素试验

在热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖的过程中,影响多糖提取率最重要的因素为液料比、提取温度、提取时间。本试验中,考察提取温度 40、50、60、70、80 ℃;液料比 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 (mL/g);提取时间 1、2、3、4、5 h 对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率的影响。每组试验重复 3 次,结果取平均值。

1.3.5 响应面优化最佳提取工艺

响应面试验设计^[8-9]:依照单因素试验结果,通过 Design-Exert8.0.6 软件,采用 Box-henhnken 中心组合试验设计,采用三因素三水平响应面分析法测定不同参数对响应值 Y—多糖提取率(%)的影响,以确定最优提取条件。因素及水平见表 1。

表 1 响应面分析因素水平编码表
Table 1 Response surface analysis factor level coding table

水平	A 提取温度/℃	B 液料比/(mL/g)	C 提取时间/h
-1	45	20:1	2.5
0	50	30:1	3
1	55	40:1	3.5

1.3.6 数据处理

本试验设计采用 Design-Exert8.0.6 软件,图形制作采用 GraphPad Prism 5 软件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取温度对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率的影响

固定液料比为 30:1(mL/g)、提取时间 3 h,考察提取温度对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率的影响,结果见图 1。

由图 1 可知,在 40 ℃~50 ℃范围内,随着温度的升高多糖的提取率逐渐增加,当温度达到 50 ℃时,多糖的提取率最高,当温度超过 50 ℃后,多糖的提取率开始下降。这是由于黄皮疣柄牛肝菌多糖对高温较敏

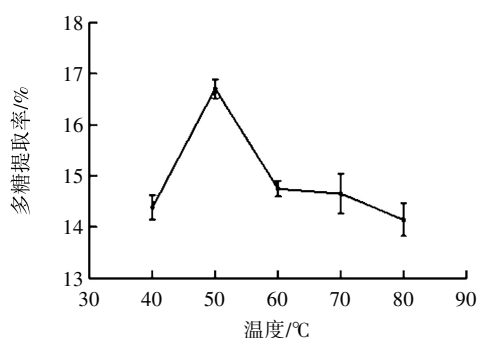


图1 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.1 The effect of extraction temperature on the extraction rate of polysaccharides

感,用较高的温度浸提破坏了多糖的结构,造成多糖提取率下降。因此,适宜的提取温度为 50 ℃左右。

2.1.2 液料比对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率的影响

液料比对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率的影响结果如图 2 所示。

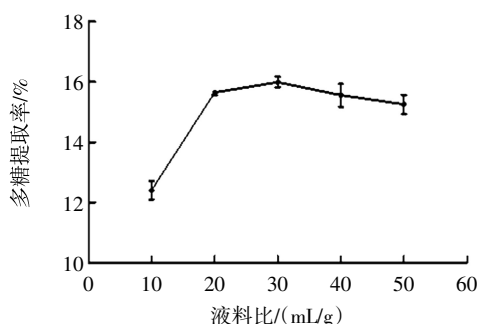


图2 液料比对多糖提取率的影响

Fig.2 The effect of liquid ratio on the extraction rate of polysaccharides

由图 2 可知,当液料比在 10:1(mL/g)至 30:1(mL/g)时,多糖提取率随液料比的升高而升高。而当液料比超过 30:1(mL/g)时多糖提取率呈下降趋势,这可能是因为溶剂少时,多糖不能充分溶出导致提取率偏低,溶剂增加有利于多糖的溶出,但是过多的溶剂会增加后续蒸发浓缩时间,造成多糖损失^[10-11],因此选择 30:1(mL/g)的液料比较为合适。

2.1.3 提取时间对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率的影响

提取时间对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率的影响结果见图 3。

由图 3 可知,在一定范围内,随着时间的延长多糖提取率表现为先增大后减小,提取时间为 3 h 时,多糖的提取率最高。这是因为短时间的提取不利于多糖的充分溶解,从而导致提取率较低,长时间的提取易使多糖降解导致提取率下降。因此,选择最适提取时间为 3 h。

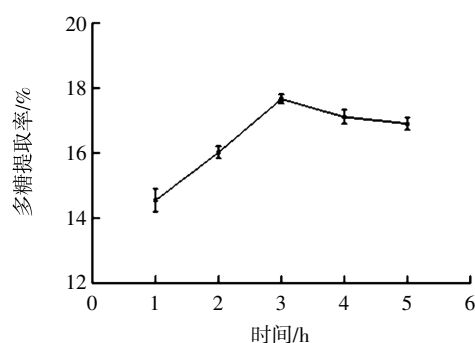


图3 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.3 The effect of extraction time on the extraction rate of polysaccharides

2.2 响应面优化黄皮疣柄牛肝菌多糖提取工艺

2.2.1 响应面试验设计与结果

运用 Design-Expert 8.0.6 软件,采用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,依据单因素试验结果,选取提取温度、液料比、提取时间 3 个对多糖提取率影响较大的因素,采用三因素三水平响应面分析法,确定最佳提取工艺。响应面试验设计与结果见表 2。

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results of response surface

试验号	A 温度	B 液料比	C 时间	多糖提取率/%
1	0	0	0	16.67
2	1	-1	0	15.54
3	-1	0	-1	15.07
4	0	0	0	16.73
5	-1	1	0	15.45
6	-1	-1	0	14.83
7	1	0	1	15.83
8	0	1	-1	16.20
9	0	1	1	16.31
10	1	1	0	16.02
11	0	-1	1	16.14
12	-1	0	1	15.17
13	0	-1	-1	14.67
14	1	0	-1	15.23
15	0	0	0	17.03

2.2.2 回归模型建立与方差分析

运用 Design-Expert 软件对表 2 中的试验结果进行多元回归拟合,建立二次多项式回归模型。获得热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖提取温度(A)、液料比(B)和提取时间(C)与多糖提取率(Y)的二次多项回归方程为:

$$Y=16.81+0.26A+0.35B+0.28C-0.035AB+0.12AC-0.34BC-0.93A^2-0.42B^2-0.56C^2$$

回归模型方差分析见表 3。

表 3 回归模型方差分析表

Table 3 The table of regression model variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
回归模型	7.14	9	0.79	16.34	0.003 4	**
A 温度	0.55	1	0.55	11.36	0.019 9	*
B 液料比	0.98	1	0.98	20.19	0.006 4	**
C 时间	0.65	1	0.65	13.39	0.014 6	*
AB	0.004 9	1	0.004 9	0.10	0.763 5	
AC	0.063	1	0.063	1.29	0.307 9	
BC	0.46	1	0.46	9.53	0.027 3	*
A ²	3.18	1	3.18	65.45	0.000 5	**
B ²	0.66	1	0.66	13.58	0.014 2	*
C ²	1.15	1	1.15	23.65	0.004 6	**
残差	0.24	5	0.049			
失拟	0.17	3	0.056	1.51	0.422 6	不显著
误差	0.074	2	0.037			
总和	7.38	14				

注:* 为显著($P<0.05$) ; ** 为差异极显著($P<0.01$)。

结合表 3,可判断回归方程中各个自变量对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率的影响。由表 3 可知,模型相关系数 $R^2=0.967\ 1$,调整决定系数 $R^2_{Adj}=0.908\ 0$,表明该模型拟合程度良好^[12]。失拟项 $P>0.05$,说明实测值与预测值之间无失拟存在,说明该数字模型具有较好的预测性,可用于分析和预测黄皮疣柄牛肝菌多糖最佳提取条件。由 F 值的大小可以判断,各因素对多糖提取率影响大小为:液料比>提取时间>提取温度。

2.2.3 响应曲面分析

响应面图形是响应值 Y 与对应的因素构成的一个三维空间在二维平面上的等高线图,响应面图形分析是将一个因素固定在零水平,对其中另外两个因素进行分析。通过响应面图形可以直观看出各因素对响应值 Y 的影响^[13-14]。各因素交互作用对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率影响的响应曲面图见图 4。

如图 4,由温度和液料比两者的交互作用可知,当温度不变时,黄皮疣柄牛肝菌多糖的提取率随着液料比的增大先上升后下降,当液料比不变时,多糖提取率随着温度的升高先上升后下降。

由时间和温度两者的交互作用可知,温度不变时,随着时间的延长,多糖提取率逐渐上升,之后表现为下降。在提取过程中过高的温度和过长的提取时间会导致多糖的降解,从而影响多糖的提取率^[15]。因此,

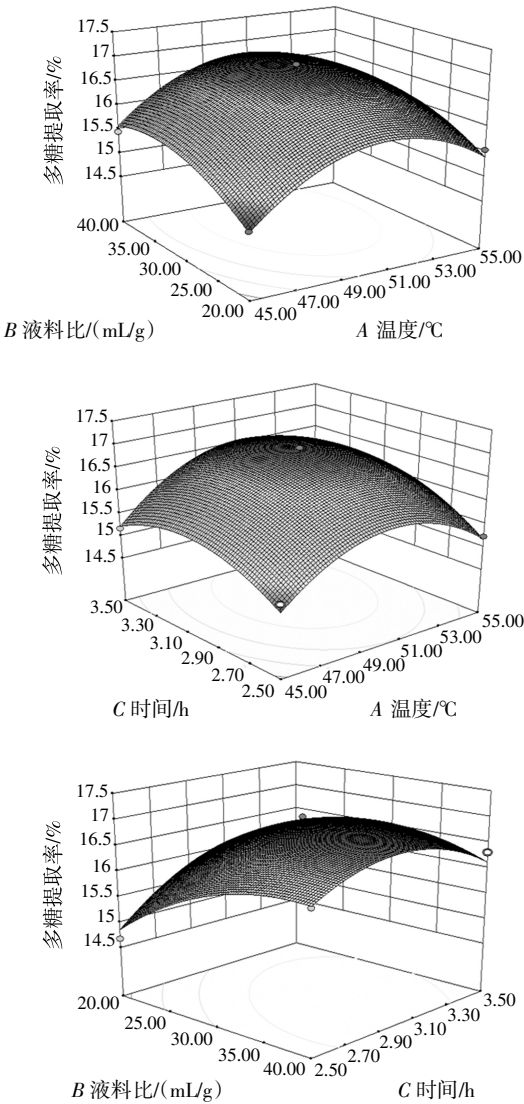


图 4 各因素交互作用对多糖提取率影响的响应曲面图

Fig.4 Response surface diagram of the effect of various factors on the extraction rate of polysaccharides

在多糖的提取过程中温度不宜过高时间不宜过长。

由液料比和提取时间的交互作用可知,时间一定时,随着液料比的增加多糖提取率表现为先上升后下降,说明适宜的液料比升温快,细胞壁易破裂使多糖溶出。而液料比增加,一定时间内多糖不能完全溶出,多糖提取率反而降低。因此,热水法提取多糖需要适宜的液料比和提取时间。

2.2.4 最优工艺参数确定

运用 Design-expert 软件分析得到最大提取率(Y)时,与其对应的黄皮疣柄牛肝菌多糖的最佳提取条件为液料比 33.41 : 1 (mL/g),提取温度 50.73 ℃、提取时间 3.08 h,此条件下多糖提取率理论值为 16.91 %。采取最佳提取条件验证试验结果,根据试验条件,优化工艺条件为液料比 34 : 1(mL/g),提取温度 51 ℃,提取

时间3.1 h,测得3次验证试验结果平均值为16.67%,与理论值接近。因此,响应面优化得到的黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率工艺参数是可行的。

3 结论

本试验以黄皮疣柄牛肝菌为原料,采用热水法提取黄皮疣柄牛肝菌多糖,考察料液比、提取温度和提取时间对黄皮疣柄牛肝菌多糖提取率的影响,在单因素试验的基础上,通过响应面优化得到热水提取法最佳工艺参数为:液料比34:1(mL/g),提取温度51℃,提取时间3.1 h。该方法操作简单,提取率高,且避免了高温提取对多糖结构的破坏,易于对后续黄皮疣柄牛肝菌多糖的分离纯化、结构鉴定及生物活性研究奠定一定的试验基础。

参考文献:

- [1] 赛福丁·阿不拉,王君敏,米克热木·沙衣布扎提.多糖及其硫酸化衍生物的抗病毒及免疫增强活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2013,25(4): 572-575,529
- [2] Lavi I, Friesem D, Geresh S, et al. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells[J]. Cancer Letters, 2006, 244(1): 61-70
- [3] 牛天增,刘娟,王永宏,等.香菇多糖提取技术的研究进展[J].食品研究与开发,2016,37(4): 212-216
- [4] 卯晓岚.中国大型真菌[M].成都:河南科学技术出版社,2000: 305-360
- [5] 黄年来.中国大型真菌原色图鉴[M].中国农业出版社,1998: 189-210
- [6] 梅文泉,董宝生,和丽忠,等.黄皮疣柄牛肝菌营养成分分析[J].中国食用菌, 2005, 24(1): 25-26
- [7] 刘秋鸣,李笑,肖俊江,等.云南产黄皮疣柄牛肝菌基本营养成分和抗氧化活性[J].食品工业科技,2018,39(16): 275-280
- [8] Wang H, Jiang H, Wang S, et al. Extraction, purification and preliminary characterization of polysaccharides from *Kadsura marmorata* fruits[J]. Carbohydr Polym, 2013, 92(2): 1901-1907
- [9] 张岚,和劲松,王雪峰,等.响应面优化复合酶法提取干巴菌多糖工艺[J].食品研究与开发, 2017, 38(20): 51-54,173
- [10] Wang JL, Zhang J, Wang XF, et al. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides with conventional method: Molecule structure and antioxidant activities evaluation[J]. Int J Biol Macromol, 2009, 45: 483-492
- [11] 冯嫣,马文婷.响应面法优化灵芝孢子粉多糖提取工艺的研究[J].食品研究与开发,2017,38(7):51-55,63
- [12] Yan YL, Yu CH, Chen J, et al. Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*[J]. Carbohydr Polym, 2011, 83: 217-224
- [13] 费荣昌.试验设计与数据处理(第四版)[M].无锡:江南大学出版社,2001: 59-63
- [14] 徐红霞.野生枝瑚菌多糖的提取、分离纯化和抗氧化性研究[D].杭州:浙江大学,2017: 15-19
- [15] 徐云飞,刘琴,宋坤,等.响应面法优化黄参多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性[J].天然产物研究与开发,2015,27(12): 2116-2123

收稿日期:2018-07-30

人民有信仰，
民族有希望，
国家有力量。