

响应曲面法优化微波辅助提取 黑灵芝孢子多糖工艺研究

黄 璞, 谢明勇*, 聂少平, 陈 奕, 李 昌, 谢建华
(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 为优化黑灵芝孢子粉多糖的微波提取工艺, 在单因素试验基础上, 选择提取温度、提取时间以及水料比为自变量, 多糖提取率为响应值, 采用中心组合设计的方法, 研究各自变量及其交互作用对多糖提取率的影响。利用 SAS 和响应面分析相结合的方法, 模拟得到二次多项式回归方程的预测模型, 并确定微波提取多糖最佳条件为: 温度 129℃、时间 27min、水料比为 31:1。在此条件下, 多糖提取率达到 2.64%。

关键词: 黑灵芝孢子粉; 微波辅助提取; 多糖; 响应面分析

Study on Microwave-assisted Extraction of Polysaccharides from Spores of *Ganoderma atrum*
with Response Surface Analysis

HUANG Pu, XIE Ming-yong*, NIE Shao-ping, CHEN Yi, LI Chang, XIE Jian-hua
(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: To optimize the microwave-assisted extraction (MAE) of polysaccharide from spores of *Ganoderma atrum* (PSGA), on the base of the single factor investigation, the extraction temperature, extraction duration and the ratio of water to material were studied with the central composite design and their interactions on the yield of polysaccharide from spores of *Ganoderma atrum* were also investigated. The predictive polynomial quadratic equations model was developed by SAS software. Optimal conditions of MAE of polysaccharides from spores of *Ganoderma atrum* can be concluded as follows: 27 min at 129℃, the ratio of solvent to material 31:1, purified water as the solvent. On these conditions, the yield of the PSGA is up to 2.64%.

Key words spores of *Ganoderma atrum*; microwave-assisted extraction; polysaccharides; response surface analysis
中图分类号: Q946.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2007)10-0200-04

灵芝(*Ganoderma lucidum*), 担子纲多孔菌科灵芝属真菌, 被我国历代民族医药视为固本扶正的“瑞草”。而灵芝孢子为灵芝的生殖细胞, 其药理作用主要有抗肿瘤, 免疫调节, 调节血脂以及对神经、心血管和呼吸系统有调节改善作用^[1]。目前市场上普遍存在的灵芝品种除了赤芝和紫芝外, 还有黑芝(*Ganoderma*

atrum), 但是有关黑芝中有效成分尤其是黑芝多糖类化合物的研究却鲜有报道。

微波辅助萃取技术(MAE)是近年来新发展起来的一种方法, 相比于传统的回流提取、索氏提取方法等, 具有选择性高、提高收率及提取物质纯度、快速高效、节能、节省溶剂、污染小、质量稳定的优点, 有利于萃

收稿日期 2007-07-23

*通讯作者

基金项目: 江西省农业科技攻关重点项目(2005); 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0540);

江西省自然科学基金资助项目(9920029); 南昌大学测试基金资助项目(2006017)

作者简介: 黄璞(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生学。

学, 2005, 30(6): 64.

③ 张成虎, 马心如. 低温双酶法液化、糖化工艺在我厂的应用[J]. 酿酒, 2002, 29(4): 108-109.

④ 李士彦. 几种酶的功能简介[J]. 生物学教学, 2006, 31(12): 65-66.

⑤ 姬艳红, 王华雯, 董青山, 等. 双酶法工艺生产酒精的探讨[J]. 河南化工, 2001(7): 20.

⑥ 张国权, 史一一, 魏益民, 等. 荞麦淀粉酶水解工艺条件研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(9): 86-92.

取对热不稳定的物质,可以避免长时间的高温引起样品的分解,特别适合于处理热敏性组分或从天然物质中提取有效成分^[2-3],已被应用于植物成分的提取^[4-6]。但是目前将微波用于灵芝孢子有效成分的提取鲜见报道。

本实验将微波辅助提取技术应用于黑灵芝孢子多糖的提取工艺研究,通过响应曲面法实验设计初步探求微波辅助提取灵芝孢子多糖的最佳工艺条件,为微波提取黑灵芝孢子多糖的工业化生产提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

黑灵芝孢子粉 江西赣州灵芝基地。

葡萄糖、蒽酮、浓硫酸、无水乙醇、丙酮、乙醚、氯仿、正丁醇,以上试剂均为分析纯。

MDS-2002A型微机控压密闭微波萃取系统 上海新仪微波化学科技有限公司; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; FA1104 电子天平 上海精天电子仪器厂; 电子恒温不锈钢水浴锅 上海宏兴机械仪器实业制造公司; 3K15冷冻离心机 美国Sigma公司; RE-52 旋转蒸发器 上海亚荣生化有限公司; ALPHA 1-2 LD冷冻干燥机 德国CHRIST公司。

1.2 黑灵芝孢子多糖的分析测定方法

1.2.1 黑灵芝孢子多糖制取工艺流程

基本工艺流程为:黑灵芝孢子粉→80%乙醇浸泡(24h)→过滤→滤渣干燥→微波提取→离心→上清液→减压浓缩至原体积的1/4→醇沉过夜→冷冻离心→得初提物→洗涤冷冻干燥→多糖粗品

1.2.2 黑灵芝多糖提取率测定

多糖含量的测定:采用蒽酮-硫酸法^[7-9]。

$$\text{多糖提取率}(\%) = \frac{\text{多糖干重}}{\text{原料质量}} \times 100$$

1.3 方法

1.3.1 单因素影响试验

以水为提取液,选用了提取率有影响的三个因素,即微波作用温度、微波作用时间、水料比。按照1.2.1方法提取黑灵芝孢子粉多糖,并计算提取率。

1.3.2 响应曲面法试验设计

响应面分析法是利用合理的设计并通过试验得到一定数据,采用多元二次回归方差拟合因素与响应值之间的函数关系通过回归方程分析寻找最佳工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法。在单因素试验结果基础上,采用中心组合试验Box-Behnken设计方案,以温度(°C)、时间(min)以及水料比(ml/g),分别用 X_1 、 X_2 、 X_3 来表示,并以+1、0、-1分别代表变量的水平,按

方程 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码,其中, x_i 为变量的编码值, X_i 为变量的真实值, X_0 为试验中心点变量的真实值, ΔX 为变量的变化步长,多糖提取率 Y 为响应值(如表1)。采用SAS对实验数据进行回归分析。由此可求出影响因素的一次效应、二次效应及其交互效应的关联方程,对微波辅助提取黑灵芝孢子粉多糖的影响因素进行更为深入的研究和条件优化,并做出响应面图,对所感兴趣的响应受多个变量影响的问题建模及分析^[10-11]。该模型通过最小二乘法拟合二次多项方程可以表达为:

$$Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

表1 中心组合试验Box-Behnken方案设计的因素和水平编码值表
Table 1 Independent variables and levels used for central composite rotatable design

自变量	编码水平(x_i)		
	-1	0	1
温度(°C) X_1	110	120	130
时间(min) X_2	20	25	30
固液比 X_3	20	30	40

2 结果与分析

2.1 单因素试验及其分析

2.1.1 温度对多糖提取率的影响

固定水料比为30:1,微波提取时间为25min,考察微波提取温度对多糖提取率的影响。

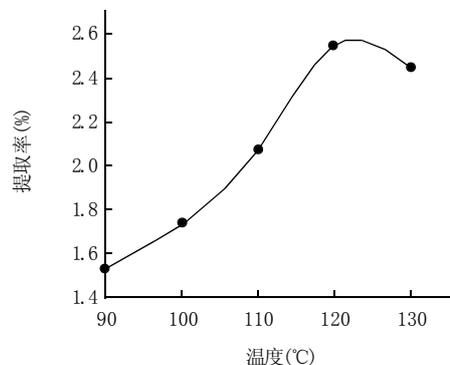


图1 提取温度对多糖提取率的影响
Fig.1 Effects of extraction temperature on PSGA yield

从图1可以看出,温度对多糖提取率有着较为显著的影响,二者呈正相关关系,但是温度过高,多糖提取率反而稍微下降,这可能是高温下部分多糖水解的结果。

2.1.2 时间对多糖提取率的影响

固定水料比为30:1,温度为120°C,提取一次,考察时间对多糖提取率的影响。

由图2可见,在时间低于25min时,提取率提高比较显著,之后有略微下降趋势。这说明,提取时间

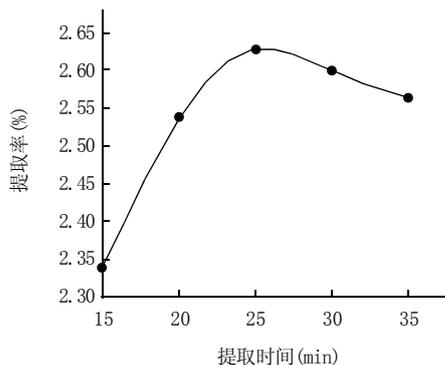


图2 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.2 Effects of extraction time on PSGA yield

对多糖提取率有着比较明显的影响, 时间过短, 多糖溶解不充分, 时间过长, 可能引起多糖的分解, 从而导致提取率下降。

2.1.3 水料比对多糖提取率的影响

固定提取温度为 120℃, 时间为 25min, 提取一次, 考察水料比对多糖提取率的影响, 得到水料比与多糖提取率关系如图 3 所示。

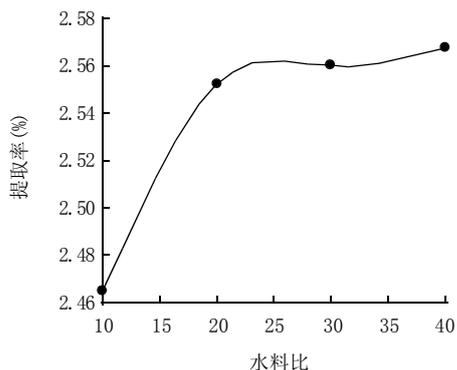


图3 水料比对多糖提取率的影响

Fig.3 Effects of ratio of water to material on PSGA yield

由图 3 可见, 水料比越大, 提取率越高, 但是当达到 20:1 后, 提取率增高不明显。

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 试验结果

如表 2 所示, 试验号 1~12 是析因试验, 试验号 13~15 是中心试验。15 个试验点分为析因和零点, 其中析因点为自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点; 零点为区域的中心点, 零点试验重复三次, 用以估计试验误差。

2.2.2 方差分析

采用 SAS RSREG 程序对所得数据进行回归分析, 回归分析结果见表 3、4。

当“Prob > F”值小于 0.05 时, 既表示该项指标

表 2 Box-Behnken 设计方案及灵芝孢子粉多糖得率

Table 2 Box-Behnken design matrix and the polysaccharide compound yield

试验号	温度(°C) X_1	时间(min) X_2	固液比 X_3	多糖得率(%)
1	110	20	30	1.68
2	110	30	30	2.13
3	130	20	30	2.34
4	130	30	30	2.63
5	120	20	20	1.82
6	120	20	40	2.16
7	120	30	20	2.04
8	120	30	40	2.51
9	110	25	20	1.33
10	130	25	20	2.55
11	110	25	40	1.93
12	130	25	40	2.56
13	120	25	30	2.47
14	120	25	30	2.53
15	120	25	30	2.51

表 3 回归方程各项的方差分析

Table 3 Analysis of variance for fitted quadratic polynomial model for optimization of yield of polysaccharide from spores of *Ganoderma atrum*

方差来源	平方和	自由度	F 值	p 值
一次项	1.60	3	38.08	0.0007
二次项	0.34	3	8.05	0.0232
交互项	0.10	3	2.33	0.1918
回归	2.03	9	16.15	0.0035
失拟项	0.07	5	16.15	0.0035

表 4 响应面分析方案与试验结果

Table 4 Result of central composite design trial

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	2.034902	9	0.2261	16.15194	0.003453
X_1	1.132513	1	1.132513	80.90338	0.000283
X_2	0.214512	1	0.214512	15.32415	0.011243
X_3	0.25205	1	0.25205	18.00571	0.008144
X_1X_1	0.112003	1	0.112003	8.001136	0.036734
X_1X_2	0.0064	1	0.0064	0.457197	0.528944
X_1X_3	0.087025	1	0.087025	6.216812	0.054935
X_2X_2	0.066464	1	0.066464	4.748001	0.081216
X_2X_3	0.004225	1	0.004225	0.301822	0.606378
X_3X_3	0.20681	1	0.20681	14.77392	0.012078

注: $R^2=0.9667$, Adjusted $R^2=0.9069$ 。

显著, 而对多糖提取率方差分析(表 3)结果表明, 对多糖提取率所建立的回归模型是极显著的($p < 0.01$)。并且该模型的 $R^2=0.9667$ 说明, 此模型与实际试验拟合较好, 试验失拟项小, 因此可用该回归方程代替试验真实点对实验结果进行分析。回归方程各项的方差分析结果还表明方程中的一次项、二次项的影响都是显著的, 其中一次项为高度显著($p > 0.01$), 因此各个具体试验因子与响应值都不是简单的线性关系。

2.2.3 拟合模型的建立

通过中心组合试验获得的试验数据如表2所示,运用SAS软件对上述结果进行整理分析,确立如下回归方程预测模型:

$$Y_1 = -41.15 + 0.52X_1 + 0.38X_2 + 0.32X_3 - 0.0017X_1X_1 - 0.0008X_1X_2 - 0.0015X_1X_3 - 0.0054X_2X_2 + 0.0007X_2X_3 - 0.0024X_3X_3 \quad (2)$$

2.2.4 响应面(RSA)分析

根据回归分析结果(表4)作出相应曲面图,结果见图4~6。

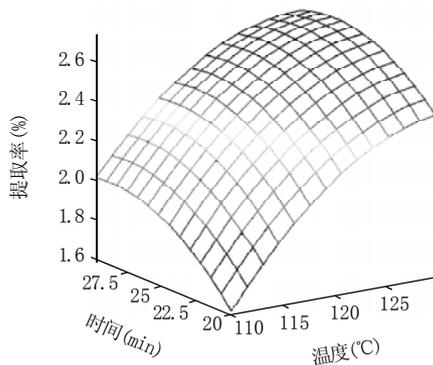


图4 Y=f(X₁,X₂)的响应面

Fig.4 Responsive surfaces of Y=f(X₁,X₂)

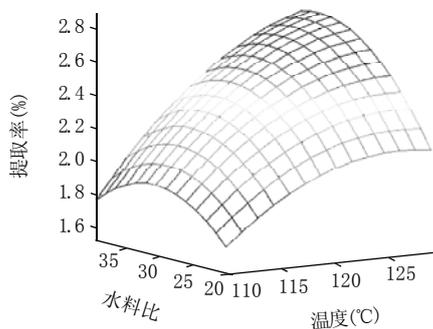


图5 Y=f(X₁,X₃)的响应面

Fig.5 Responsive surfaces of Y=f(X₁,X₃)

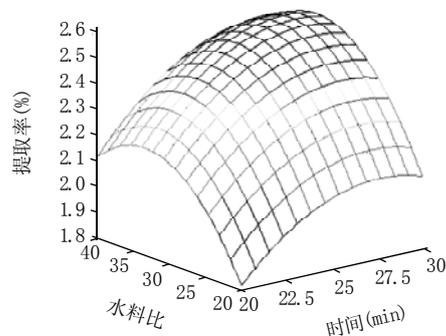


图6 Y=f(X₂,X₃)的响应面

Fig.6 Responsive surfaces of Y=f(X₂,X₃)

从图4~6可以看出,提取温度、时间对黑芝孢子多糖提取率的影响最大,随着温度和时间的增加,多糖得率也随之增加,这说明二者与多糖提取率是呈正相关关系;水料比对多糖提取率也有较大影响。

通过软件分析,得到微波提取黑芝孢子多糖的最佳条件为微波提取温度128.92℃,时间为27.18min,水料比为31.18:1。在此条件下,多糖提取率理论值可为2.73%。

为检验RSA法的可靠性,采用上述最优提取条件进行多糖的微波提取实验,同时考虑到实际操作的情况,将多糖最佳提取条件修正为提取温度为129℃、时间为27min、水料比为31:1时,实际测得的提取率为2.64%,与理论预测值比较误差在3%。因此,采用RSA法优化得到的微波提取条件参数准确可靠,具有实用价值。

3 结论

利用微波辅助萃取技术对黑芝孢子多糖的提取,具有高效率、无污染的优点,可为黑芝孢子粉工业化生产提供有益参考。最佳萃取条件为温度为129℃、时间为27min、水料比为31:1。按此工艺,黑芝多糖提取率可达2.64%。

参考文献:

- [1] 赵东旭, 杨新林, 朱鹤孙, 等. 灵芝孢子研究进展[J]. 中草药, 1999, 30(4): 305-307.
- [2] 张伟, 曾园山. 灵芝孢子的研究进展[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(6): 463-465.
- [3] GANZLER K, SZINAI I, SALGO A. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique[J]. Journal of Chromatography, 1990, 520(1): 257-262.
- [4] 谢明勇, 陈奕. 微波辅助萃取技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 105-114.
- [5] CHEN Yi, XIE Ming-yong, GONG Xiao-feng. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Genodezma atrum*[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 81(1): 162-170.
- [6] PAN X J. Microwave assisted extraction of tansinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge with analysis by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2001, 922: 371.
- [7] 聂少平, 谢明勇, 罗珍. 微波技术提取茶叶多糖的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 103-106.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1998.
- [9] 傅博强, 谢明勇, 聂少平, 等. 茶叶中多糖含量的测定[J]. 食品科学, 2001, 22(11): 69-72.
- [10] 付志红, 谢明勇, 聂少平, 等. 车前子中多糖含量的测定[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2003, 27(4): 349-352.
- [11] 李亚娜, 林永成, 余志刚. 响应面分析法优化羊栖菜多糖的提取工艺[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2004, 32(11): 28-32.