

响应面法优化黑木耳多糖的制备工艺研究

唐旋, 唐王裔, 何伟峰, 王革, 张拥军, 朱丽云, 王为民
(中国计量学院生命科学院, 浙江 杭州 310018)

摘要: 针对黑木耳细胞壁异常坚韧的特点, 探讨使其壁内多糖有效溶出的工艺方法。采用高压均质与酶法结合的工艺, 借助 Minitab 统计软件, 利用中心组合试验法对黑木耳多糖的提取工艺进行优化。结果表明, 黑木耳在均质压力 8~10 MPa 下均质 10~12 min 进行破壁预处理后, 采用 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲溶液作为溶剂, 80℃下提取 2 h, 然后冷却至 45℃, 添加纤维素酶 355 U/g, 在料液比 1:48、pH 5.0 的条件下提取 1.2 h, NaOH 调至中性后迅速提高温度至 85℃灭酶 1 h, 获得黑木耳多糖的得率达到 15.37%。

关键词: 黑木耳; 多糖; 高压均质; 纤维素酶; 中心组合试验

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-874X(2014)03-0103-05

Study on preparation technology optimization of *Auricularia auricular* polysaccharide by response surface method

TANG Xuan, TANG Wang-yi, HE Wei-feng, WANG Ge, ZHANG Yong-jun, ZHU Li-yun, WANG Wei-min
(College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The process of dissolving *Auricularia auricular* polysaccharide out effectively according to the characteristics of its leathery cell wall was studied. This experiment used the combination of high pressure homogenization and enzyme method, and optimized the extraction process of polysaccharides from *A. auricular* by using central composite design method with Minitab statistical software. The results showed that, *A. auricular* was homogenized under homogenization pressure 8~10 MPa for 10~12 min as broken pretreatment, then 0.05 mol/L sodium citrate buffer solution was used as solvent to extract for 2 h at 80℃. Cooling to 45℃, 355 U/g cellulase was added and the reaction lasted 1.2 h in the liquid ratio of 1:48 in pH 5.0. Then we adjusted pH to neutral with NaOH, and quickly raised the temperature to 85℃, stayed 1 h for enzyme inactivation. Under above conditions, *A. auricular* polysaccharides yield reached 15.37%.

Key words: *Auricularia auricular*; polysaccharide; high pressure homogenization; cellulose; central combination testing

黑木耳 *Auricularia auricular* (L. ex Hook.) 属于担子菌纲木耳目木耳科木耳属, 为我国珍贵的药用和食用胶质真菌。我国是世界上生产黑木耳的主要国家, 产量占世界黑木耳总产量的 90% 左右。明代李时珍撰写的《本草纲目》中, 记载了黑木耳的多种药用功效。现代医学研究也进一步证实了黑木耳多糖具有抗肿瘤^[1-2]、抗氧化^[3-4]、降血糖^[5]、降固醇^[6-7]、抗血栓^[8]、抗辐射^[9]、抗疲劳^[10]以及增强免疫力^[11]等生物学活性。

与其他来源的材料相比, 制备黑木耳多糖具有特殊性, 这是因为黑木耳菌丝的细胞壁异常坚韧, 其细胞

壁主要成分为几丁质(一种乙酰葡萄糖胺的多聚体)及小量的纤维素和称作葡聚糖的葡萄糖多聚体^[12]。同时, 黑木耳是一种特殊的胶质体真菌, 其碳水化合物含量很高, 随着黑木耳吸水溶胀后, 可溶性部分从组织中流出, 增加了提取体系的粘度, 给黑木耳多糖的提取制备过程增加了难度。常见黑木耳多糖的水法提取工艺, 其多糖得率低且纯度不高; 酸/碱/酸碱结合工艺虽然得率较高, 但会造成多糖成分降解且淀粉、蛋白不能完全去除。酶法由于温和且无残留, 是一种非常有前景的细胞破壁技术, 国内已有关于应用酶法提取黑木耳多糖的研究, 采用的酶主要是纤维素酶^[13-14]、蛋白酶^[13]、果胶酶^[14-15]等, 这些酶只是破坏真菌中含量不多的相应的底物, 对黑木耳没有特异性, 且破壁效果不明显。本研究将物理高压均质法与生物酶法相结合, 采用响应面法优化黑木耳多糖的提取工艺, 达到壁内多糖有效溶出的效果。

收稿日期: 2013-11-04

基金项目: 国家自然科学基金(31371765)

作者简介: 唐旋(1993-), 女, 在读本科生, E-mail: tangxuan93@126.com

通讯作者: 张拥军(1971-), 女, 博士, 教授, E-mail: yjzhang@vip.163.com

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌床木耳(新科 241)子实体购自浙江富来森食品有限公司。苯酚、硫酸、柠檬酸钠、柠檬酸、磷酸、95%乙醇、无水乙醇购自杭州米克化学仪器有限公司,纤维素酶(10 000 U/g)购自江苏锐阳生物科技有限公司。

试验仪器:AL04 型电子天平(梅特勒-托利多有限公司),JP-250A-I 型高速多功能粉碎机(上海久品工贸有限公司),T6 新世纪分光光度仪(北京普析通用有限公司),HH-2 型水浴锅(江苏省金坛市恒丰仪器制造有限公司),DL-5M 离心机(配更换转头,购自湖南星科技科学仪器有限公司),NanoGenizer 高压均质机(苏州微流纳米生物技术有限公司),搅拌机(江苏省金坛市恒丰仪器制造有限公司),DHG-9240A 型鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 黑木耳预处理 取过 125 μm 筛的黑木耳粉 10 g,按料液比 1:15(g/mL)加入 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲溶液充分溶胀后,在高压均质机均质压力 8~10 MPa 条件下均质 10~12 min,使黑木耳有效破壁。

1.2.2 黑木耳多糖的纤维素酶法提取单因素试验 取高压均质机均质后的黑木耳浆料,加入 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 50 mL,在 80℃水浴锅搅拌(120 r/min)的条件下提取 2 h,冷却至 45℃,加入纤维素酶按以下方法进行提取。

(1) 纤维素酶添加量对黑木耳多糖提取得率的影响。补加柠檬酸钠缓冲溶液使料液比达到 1:100(g/mL),调 pH 为 5.0,依次按以下添加量加入纤维素酶:200、300、400、500 U/g,然后在 45℃下提取 1.5 h,NaOH 调至中性后迅速提高温度到 85℃灭酶 1 h,8 000 r/min 离心 20 min,取上清液,1:4(V/V)95%乙醇醇沉,4℃静置过夜,离心,取沉淀,溶解定容,待测。

(2) 提取时间对黑木耳多糖提取得率的影响。在料液比 1:100(g/mL)、加酶量 300 U/g 的条件下,分别在 45℃下提取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,NaOH 调至中性后迅速提高温度到 85℃灭酶 1 h,8 000 r/min 离心 20 min,取上清液,1:4(V/V)95%乙醇醇沉,4℃静置过夜,离心,取沉淀,溶解定容,待测。

(3) 料液比对黑木耳多糖提取得率的影响。在加酶量 300 U/g,料液比分别为 1:12、1:40、1:60、1:80、1:100(g/mL)条件下提取 1.5 h,NaOH 调至中性后迅速提高温度到 85℃灭酶 1 h,8 000 r/min 离心 20 min,取上清液,1:4(V/V)95%乙醇醇沉,4℃静置过夜,离心,取沉淀,溶解定容,待测。

1.2.3 黑木耳多糖溶出量的计算 采用改进后的苯酚-硫酸法测定黑木耳多糖含量,按下式计算黑木耳多糖提取得率。

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{C \times V \times N \times 10^{-3}}{v \times M} \times 100$$

式中, C 为经过稀释后测定的多糖含量(μg), V 为提取后得到的上清液体积(mL), N 为稀释倍数, v 为用于测定的上清液体积(mL), M 为黑木耳子实体质量(mg)。

2 结果与分析

2.1 黑木耳多糖标准曲线

由图 1 黑木耳多糖标准曲线可得,多糖含量($\mu\text{g/mL}$) $= (\text{OD}_{490} + 0.0006) / 0.0218, R^2 = 0.9951$ 。

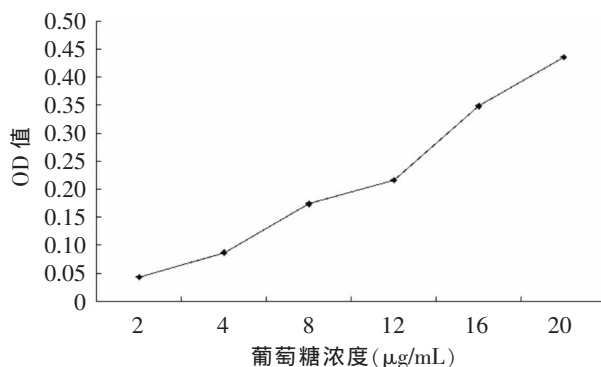


图 1 黑木耳多糖标准曲线

2.2 各单因素对黑木耳多糖提取的影响

2.2.1 纤维素酶添加量对多糖提取的影响 纤维素酶添加量对多糖提取的影响如图 2 所示。在固定料液比 1:100、温度 45℃、pH 5 的条件下酶解 1.5 h,多糖得率随着酶用量的增加而增大,当酶用量达到 400 U/g 时,黑木耳多糖的提取得率最大。再增加酶用量时,多糖得率出现下降趋势,这可能是由于底物浓度一定的情况下,酶分子达到了饱和。

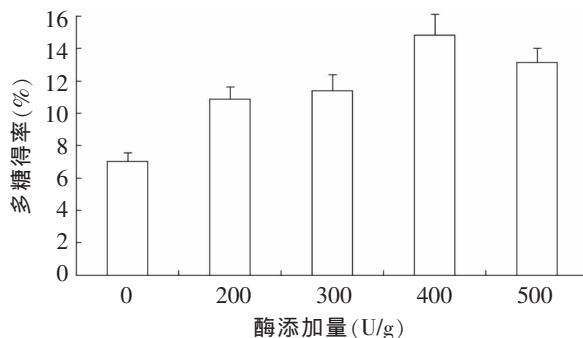


图 2 纤维素酶添加量对黑木耳多糖提取的影响

2.2.2 提取时间对黑木耳多糖提取的影响 在固定料液比 1:100、温度 45℃、pH 5.0、纤维素酶添加量 300

U/g 的条件下,提取时间对黑木耳多糖提取得率的影响如图 2 所示。0~1.5 h,随着提取时间的延长,溶液中可溶性多糖的含量逐渐增加,细胞内多糖被释放出来;提取时间超过 1.5 h 后,溶液中多糖含量呈现递减的趋势,这可能是因为随着酶解时间的延长,酶的稳定性受到影响,也可能是溶出的可溶性多糖由于酶的作用降解造成。因此,酶法提取多糖需控制酶解时间,避免造成多糖损失。

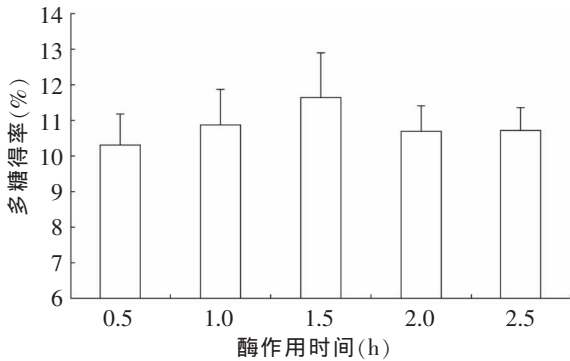


图 3 提取时间对黑木耳多糖提取的影响

2.2.3 料液比对黑木耳多糖提取的影响 在固定提取温度 45℃、提取时间 1.5 h、pH 5.0、纤维素酶添加量 300 U/g 的条件下,料液比对黑木耳多糖提取得率的影响如图 4 所示。料液比未达到 1:40 时,多糖得率随着料液比的增加而增加,料水比增加到 1:40 后,多糖得率不再继续提高,再增加溶剂剂量多糖的得率反而降低,这可能因为随着提取溶剂的增加,一定程度稀释了多糖的浓度,不利于多糖的沉淀。

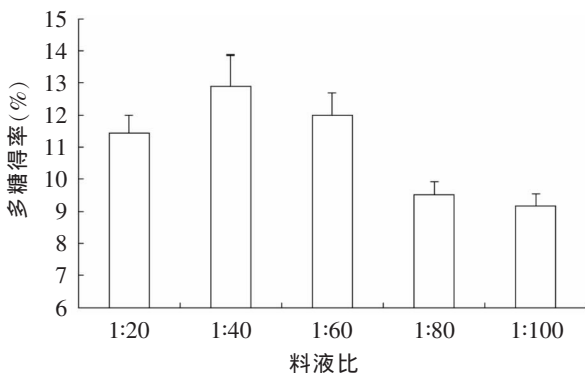


图 4 料液比对黑木耳多糖提取的影响

2.3 黑木耳多糖提取的中心组合试验设计和响应面分析

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,将纤维素酶添加量、酶作用时间和料水比 3 个因素作为试验因素,参考单因素试验结果,以多糖得率为响应值设计试验,试验因素及水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

表 1 响应面试验因素与水平

水平	酶添加量(U/g)	时间(h)	料液比
-1.68	231.82	0.66	23.18:1
-1	300	1.00	30:1
0	400	1.50	40:1
1	500	2.00	50:1
1.68	568.18	2.34	56.82:1

表 2 响应面试验方案及结果

料水比(g/mL)	酶添加量(U/g)	时间(h)	多糖得率(%)
1.682	0	0	12.75
0	0	0	14.79
0	-1.682	0	12.54
0	0	-1.682	12.97
1	-1	-1	15.17
0	0	0	15.14
-1	-1	-1	8.68
1	1	-1	13.86
1	-1	1	10.03
-1	1	1	13.17
0	1.682	0	13.68
-1	-1	1	12.57
0	0	0	15.17
0	0	0	15.11
-1.682	0	0	9.93
-1	1	-1	10.29
0	0	0	15.17
1	1	1	9.63
0	0	1.682	11.09
0	0	0	15.13

采用 Design-Expert 软件对所得试验数据进行多元回归拟合,以料液比(A)、纤维素酶添加量(B)、提取时间(C)3 个因子作为影响因素进行试验。由统计软件得到的回归方程:

$$Y=15.09+0.64 \times A+0.18 \times B-0.42 \times C-1.39 \times A^2-0.76 \times B^2-1.15 \times C^2-0.49 \times A \times B-2.02 \times A \times C-0.013 \times B \times C$$

回归方程系数分析结果见表 3。由表 3 分析可得,除单因子 B、交叉项 BC 不显著外,其他参数拟合均显著,且模型 $R^2=0.9815$,说明该数学模型的拟合效果较好。

响应面图形是响应值对各试验因子 A、B、C 构成的一个三维空间的曲面图,从响应面的三维分析图中可以找出最佳参数及各参数之间的相互作用。以 Y 轴为响应值,每次对其中两个因素做响应面图如图 5~图 7 所示。

应用 Design-Expert 软件对其进行响应面优化,得到结果:A=0.83,B=-0.45,C=-0.59。代入前述变换公式

表3 方差分析结果

参数	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
A	1	5.57	32.97	0.0002	显著
B	1	0.43	2.53	0.1426	不显著
C	1	2.43	14.39	0.0035	显著
A ²	1	27.80	164.54	<0.0001	显著
B ²	1	8.39	49.68	<0.0001	显著
C ²	1	18.89	111.82	<0.0001	显著
AB	1	1.92	11.37	0.0071	显著
AC	1	32.56	192.71	<0.0001	显著
BC	1	1.25E-3	7.398E-3	0.9332	不显著

得到最佳提取工艺为：料液比 48:1、纤维素酶添加量 355.0 U/g、提取时间 1.2 h，此时黑木耳多糖得率 $Y=15.45\%$ 。以最佳组合方案的提取条件进行验证试验重复 3 次，得到黑木耳多糖实际得率平均值为 15.37% ，近似理论值。

3 结论与讨论

黑木耳的细胞壁异常坚韧，常规提取方法很难有效破壁；且其内含较高的碳水化合物，随着黑木耳的吸水溶胀，可溶性部分从组织中流出，增加了提取体系的粘度，给黑木耳多糖的提取制备过程增加了难度。本研

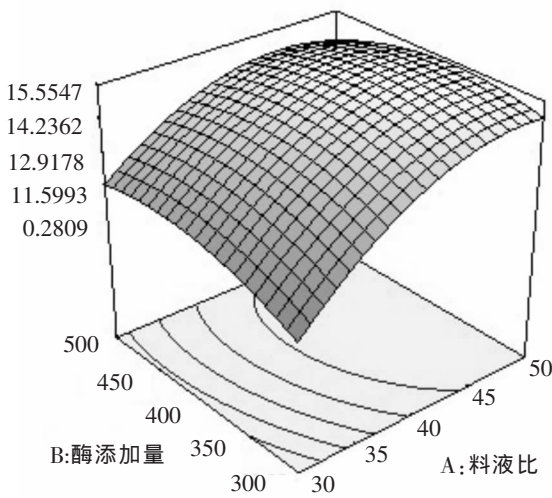


图5 料液比与纤维素酶添加量对多糖得率影响的响应面

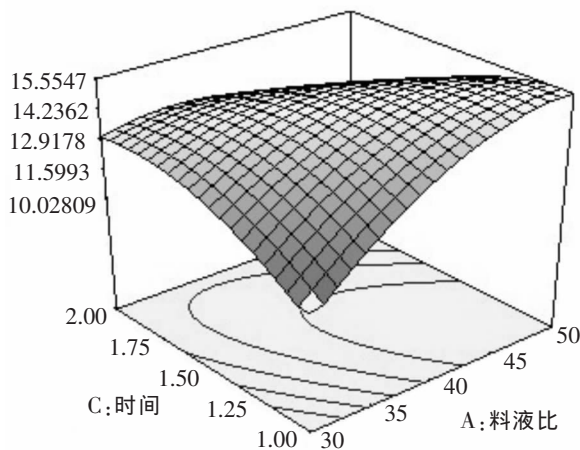
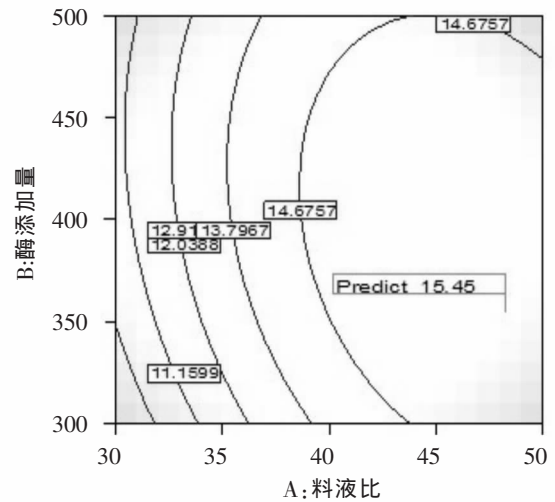
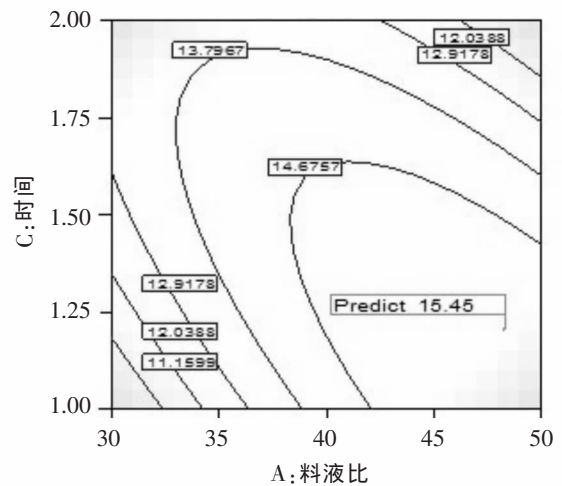


图6 料液比与提取时间对多糖得率影响的响应面



究将物理高压均质法与生物酶法相结合，从多糖提取试验条件及其结果可以看出，高压均质后，采用纤维素酶(400 U/g)法可以将黑木耳多糖的得率从 7.05% 提高至 14.81%。进一步采用响应面法优化黑木耳多糖的提取工艺，结果表明最佳提取工艺为：黑木耳粉按料液比 1:15(g/mL) 加入柠檬酸钠缓冲溶液充分溶胀后，在高压

均质机的均质压力 8~10 MPa 下均质 10~12 min，再加入柠檬酸钠缓冲溶液 50 mL，在 80℃ 水浴锅搅拌条件下提取 2 h，冷却至 45℃ 后，添加纤维素酶 355 U/g，在料液比 48:1、pH 5.0 的条件下提取 1.2 h，NaOH 调至中性后迅速提高温度到 85℃ 灭酶 1 h，此时获得黑木耳多糖得率为 15.37%。下一步将在获得黑木耳多糖提取工

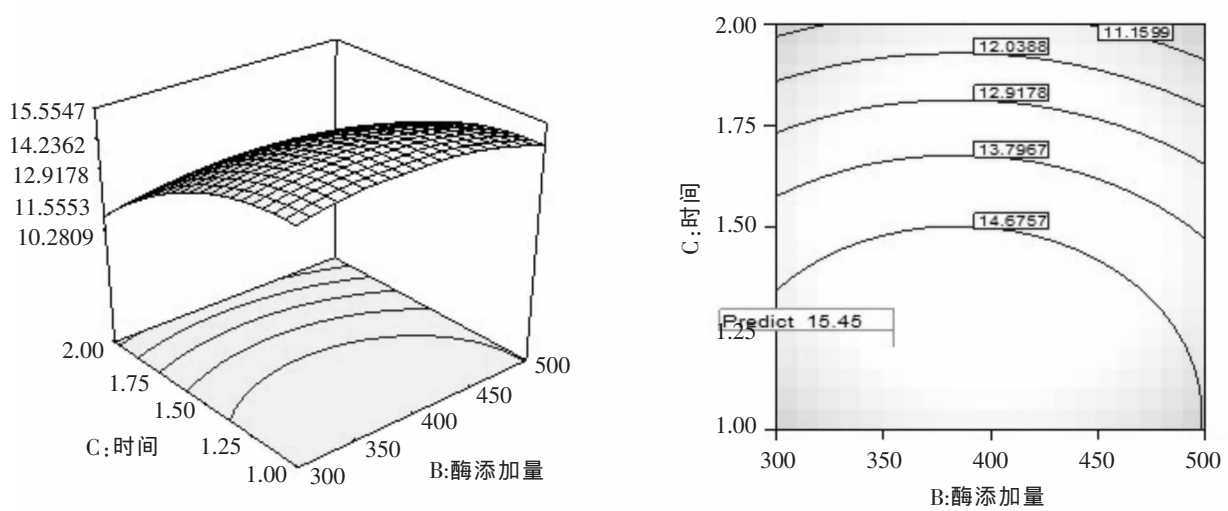


图7 纤维素酶添加量与提取时间对多糖得率影响的响应面

艺的最优化基础上,进一步研究黑木耳多糖的分子组成、分子结构以及其降血糖的功能活性与机制。

参考文献:

- [1] 黄滨南,张秀娟,邹翔,等.黑木耳多糖抗肿瘤作用的研究[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2004,20(6):648-651.
- [2] Ma Z C, Wang J G, Zhang L N, et al. Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80: 977-983.
- [3] 史亚丽,姜川,杨立红,等.黑木耳粗多糖对力竭小鼠抗氧化能力的影响[J].现代预防医学,2008,35(24):4845-4847.
- [4] 田志杰,吕世杰,姜艳霞,等.正交法提取木耳多糖及对大鼠血清超氧化物歧化酶和体外肝脏脂质过氧化的影响[J].时珍国医国药,2009,20(11):2694-2695.
- [5] 韩春然,马永强,唐娟.黑木耳多糖的提取及降血糖作用[J].食品与生物技术学报,2006,25(5):111-114.
- [6] Cheung P C K. The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricular* (Tree-ear) and *Tremella fuciformis* (White jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats[J]. Nutrition Research, 1996, 16: 1721-1725.
- [7] 杨春瑜,姜启兴,夏文水,等.黑木耳超微粉多糖相对分子量分布及降血脂功能研究[J].中国食品学报,2008,8(6):23-32.
- [8] 樊一桥,武谦虎,盛健惠.黑木耳多糖抗血栓作用的研究[J].中国生化药物杂志,2009,30(6):410-412.
- [9] 樊黎生,龚晨睿,张声华.黑木耳多糖抗辐射效应的动物实验[J].营养学报,2005,27(6):525-526.
- [10] 朱磊,王振宇.黑木耳多糖对小鼠抗疲劳作用的研究[J].营养学报,2008,30(4):430-432.
- [11] 张会新,刘洪雨,刘畅,等.黑木耳多糖对小鼠免疫功能的影响[J].动物医学进展,2009,30(7):23-25.
- [12] IE 阿喀莫著,林雅兰译.微生物学[M].北京:科学出版社2002.
- [13] 王金凤.木耳多糖提取工艺研究[J].食品科学,2004,25(6):143-146.
- [14] 张立娟,于国萍.细胞破壁酶在黑木耳多糖提取中作用条件的研究[J].食用菌,2005(3):8-10.
- [15] 姜红,孙宏鑫,李晶.酶法提取黑木耳多糖[J].食品与发酵工业,2005,31(6):131-133.

(责任编辑 刘 翀)