

超声波辅助提取红汁乳菇中酚类物质的工艺优化

Optimization of ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from *Lactarius hatsudake* Tanaka

林 海 熊国红 何建国 张啸怡
LIN Hai XIONG Guo-hong HE Jian-guo ZHANG Xiao-yi

(益阳市产商品质量监督检验研究院, 湖南 益阳 413000)
(Yiyang Research Institute of Quality Supervision & Inspection for Products and Commodity,
Yiyang, Hunan 413000, China)

摘要:为了开发红汁乳菇中酚类资源,采用超声波辅助溶剂浸提的方法,在单因素试验的基础上,以总酚含量为响应值,选择溶剂类型、溶剂浓度、料液比、超声时间、提取次数为优化条件进行工艺优化。结果表明:最佳提取条件为乙醇浓度 56%、料液比 1:25 (g/mL)、提取时间 80 min、提取 2 次。超声波辅助提取验证实验结果与优化结果误差为 1.05%,说明优化结果可靠。

关键词:红汁乳菇;多酚;超声波;提取工艺
Abstract: To develop the phenol resources in *Lactarius hatsudake* Tanaka, solvent extraction with ultrasonic assisted was used. On the basis of single factor test, the solvent, solvent concentration, liquid ratio, ultrasonic time and extraction times were selected as optimum conditions. The results showed that the optimum extraction conditions were ethanol concentration of 56%, solid-liquid ratio of 1:25 (g/mL), extraction time of 80 min, and extract two times under this condition. The result of ultrasonic assisted extraction is 1.05%, and the result is reliable.
Keywords: *Lactarius hatsudake* Tanaka; polyphenols; ultrasonic; extraction technology

红汁乳菇(*Lactarius hatsudake* Tanaka)是担子菌纲、伞菌目、红菇科、乳菇属野生食用真菌。广泛分布于中国辽宁、河北、江苏、吉林、湖南、浙江、四川、青海和台湾等省^[1-3]。由于其子实体味道鲜美且独特,富含人体所必须的维生素、氨基酸和矿物质^[4-5],深受人们的喜爱。红汁乳菇是一种外生食用菌根菌,由松树、杉树等针叶树种的根与菌根真菌形成共生体,由于生长条件的限制,其人工栽培至今未获得实

质进展,市场上所出售的都是野生菌^[6]。

目前关于红汁乳菇酚类成分及其生物活性的研究相对较少,Moro 等^[7]发现乳菇属真菌提取物具有较好的抗炎活性,能抑制炎症因子 NO 的产生,iNOS、IL-1 β 、IL6 的表达;Palacios 等^[8]研究了 8 种食用菌中酚类物质的抗氧化活性,发现乳菇属真菌松乳菇的甲醇提取物对亚油酸自氧化抑制率高达 50%;Cheung 等^[9]也通过对食用菌中多酚的研究发现多酚含量与其抗氧化活性呈正相关;已有研究^[10]证明植物中的多酚也具备抗肿瘤作用,以及抑菌消炎、抗病毒、护肝益肾等生理活性。目前尚未发现关于红汁乳菇中酚类提取工艺优化的研究报道,本研究拟对红汁乳菇中酚类提取工艺进行优化,并研究其生理活性,旨在为红汁乳菇用作保健食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红汁乳菇:购买于长沙市马王堆农贸市场;
没食子酸标准品:含量 $\geq 97.5\%$,美国 Sigma-aldrich 公司;
钨酸钠、钼酸钠、浓磷酸、浓盐酸、硫酸锂、双氧水:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;
无水乙醇、甲醇:分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司。
1.2 仪器与设备
冰箱:BCD-190E 型,伊莱克斯电器有限公司;
粉碎机:FW100 型,北京科伟永兴仪器有限公司;
可见光分光光度计:721G 型,上海仪电分析仪器有限公司;
离心机:TD4K-Z 型,东旺仪器有限公司;
超声波清洗机:KQ-300DB 型,昆山市超声仪器有限公司;

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:31601502)
作者简介:林海(1975—),男,益阳市产品质量监督检测研究院高级工程师,硕士。E-mail:linhai1975@163.com
收稿日期:2018-06-05

分析天平:SOPTOP 型,舜宇恒平仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品鉴定 在长沙市马王堆农贸市场所购买的样品,经由联川生物公司 ITS 测序,将其所测序列与美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)数据库比对后验证其为红汁乳菇。

1.3.2 红汁乳菇的处理 将采得的新鲜红汁乳菇去除泥垢后,立即放入冰柜,使其中自由水在低温下结冰,将冻住的红汁乳菇置于真空冷冻干燥机中冻干处理,待真空冷冻干燥机达到其最低真空度 6 Pa,并持续至少 2 h 后即可拿出,经粉碎机粉碎后过 80 目筛网。

1.3.3 总酚含量测定 采用 Folin-Ciocalteu 比色法^[11-13],用没食子酸作为对照,配制成一定浓度后,与 Folin-Ciocalteu 显色剂反应 2 h 后,在 760 nm 吸收波长测定其吸光值,绘制相应标准曲线,其回归方程为 $y=0.014\ 67x+0.038\ 7$, $R^2=0.999\ 7$ 。由此方程算得红汁乳菇中总酚含量。并根据此含量算得酚类物质的提取得率。

提取率得率=提取物质质量/提取原料质量。(1)

1.3.4 单因素试验设计

(1) 溶剂及其浓度:称取红汁乳菇粉末 1 g,分别加入不同浓度(30%,50%,60%,70%,80%,90%,100%)甲醇 20 mL,室温下超声提取 60 min,加入不同浓度(30%,50%,60%,70%,80%,90%,100%)乙醇 20 mL,室温下超声提取 60 min。

(2) 料液比:称取红汁乳菇粉末 1 g,加入不同量的 60%乙醇溶液(5,10,15,20,25,30 mL),室温下超声提取 60 min。

(3) 提取时间:称取红汁乳菇粉末 1 g,加入 60%乙醇溶液 20 mL,室温下超声提取不同时间(20,40,60,80,100,120 min)。

(4) 提取次数:称取红汁乳菇粉末 1 g,加入 60%乙醇溶液 20 mL,室温下超声提取 60 min,分别提取 1,2,3,4 次。

1.3.5 响应面试验 采用 Box-Behnken 设计,将总酚含量作为响应值,采用三因素三水平的设计,对提取时间、料液比、提取液浓度进行优化,由此推算出最佳条件,并验证其可靠性。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 提取溶剂的选择对提取效果影响 由图 1 可知:不同浓度的乙醇、甲醇溶液对酚类物质的提取有显著的影响,这是由于不同浓度的甲醇、乙醇溶液有不同的极性,当极性与红汁乳菇中酚类物质的极性相似时,其相应的提取得率会提高^[14]。总酚提取得率总体趋势呈现先上升后下降,这是由于一定浓度的有机溶剂能够破坏酚类与多糖和蛋白质之间的氢键和疏水作用力,使其提取量增加,而当浓度过高时导致其极性差异大反而使提取量减少^[15]。

从选用提取剂的效果可明显看出来:乙醇>甲醇,且乙醇较甲醇来说是一种廉价、无毒的溶剂,故采用乙醇作为提取液。在乙醇浓度为 50%~70%时,总酚的提取量能达到最高值,故选择乙醇浓度为 50%~70%作进一步优化。

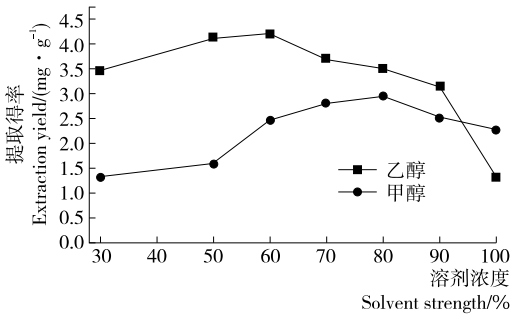


图 1 溶剂对红汁乳菇总酚提取效果的影响
Figure 1 Effects of solvents on the extraction of phenolics from Lactarius deliciosus

2.1.2 料液比对提取效果的影响 由图 2 可知:随着溶液提取体积不断的提高,酚类提取得率也不断上升,且上升趋势逐渐变缓。随着提取液增多,红汁乳菇粉末与溶剂接触更充分,且要使酚类析出到溶液而达到与低溶剂量相同的动态平衡状态需要析出更多的酚类,而料液比超过 1:20 (g/mL) 时提取得率趋于稳定,说明此时酚类物质已基本溶出。

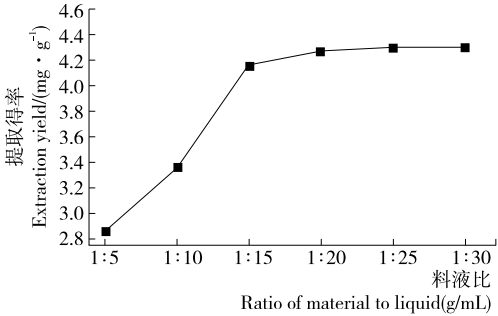


图 2 料液比对红汁乳菇总酚提取效果的影响
Figure 2 Effects of solid-liquid ratio on the extraction of phenolics from Lactarius deliciosus

2.1.3 提取时间对提取效果的影响 由图 3 可知:提取时间对红汁乳菇总酚提取效果的影响呈现出先上升后下降的趋势。在 80 min 以前提取量不断增加,而到了 100 min 以后提取量不断减少。由于物质扩散到溶液需要时间,固在 80 min 左右提取量呈现持续上升趋势,而随着时间的推移,超声提取产生热量导致提取温度不断的升高,且氧气与酚类反应的时间也相应加长,导致酚类氧化损失增多,提取得率下

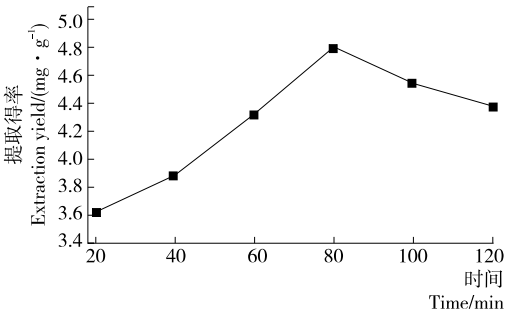


图 3 提取时间对红汁乳菇总酚提取效果的影响
Figure 3 Effects of extraction time on the extraction of phenolics from Lactarius deliciosus

降^[16]。因此提取时间应该在 80 min 左右。

2.1.4 提取次数对提取效果的影响 由图 4 可知,随着提取次数的增多,酚类提取量虽然呈现上升趋势,但提取 2 次后上升趋势不太显著。随着提取次数的增多,导致溶剂消耗量陡增,且后期浓缩更费时费力,故只需提取 2 次。

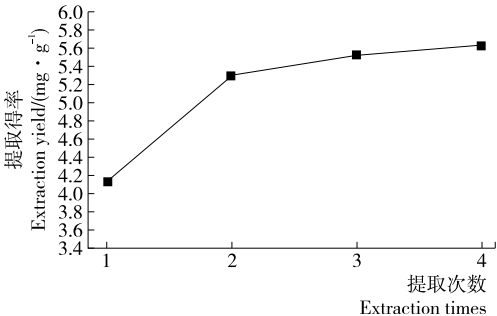


图 4 提取次数对红汁乳菇总酚提取效果的影响
Figure 4 Effects of extraction times on the extraction of phenolics from *Lactarius deliciosus*

2.2 响应面优化结果及分析

根据选取的 3 个优化因素,以总酚含量作为响应值(Y)设计的 Box-Behnken 试验。其相应的因素水平和试验设计见表 1、2。

2.2.1 二次回归方程及方差分析 采用 Design-Expert 8.0.6 Trial 对试验的 17 组数据进行回归分析并拟合,得到:

$$Y = 4.83 + 0.13A + 0.30B - 0.037C - 0.089AB + 0.037AC - 0.11BC - 0.54A^2 - 0.16B^2 - 0.20C^2.$$
 (2)

由表 3 可知,该模型 $P < 0.000\ 1$,表明该模型非常显著,是一个可靠的模型;A、B²、C²对响应值影响显著;B、A²对响应值影响极其显著;由 F 值的大小可以判断各因素对总酚提取量的影响大小依次是 B>A>C;失拟项 $P = 0.397\ 5 > 0.05$,表明模型预测值与实际误差值较小,可以采用该数学模型来推测试验结果。

2.2.2 响应面结果分析 由图 5(a)可知,在一定的范围内,当料液比一定时,多酚提取量随提取时间的延长先上升后下降;当提取时间一定时,多酚提取量随溶剂量增大而增大。

由图 6(a)可知,在一定的范围内,当料液比一定时,多酚提取量随乙醇浓度增大先上升后下降;当乙醇浓度一定时,多酚提取量随溶剂量增大而增大。

由图 7(a)可知,在一定的范围内,当乙醇浓度一定时,多酚提取量随时间延长先上升后下降;当时间一定时,多酚提取量随乙醇浓度增大先上升后下降。

2.3 优化及验证

采用 Design-Expert 8.0.6 Trial,通过设定提取总酚含量

表 1 响应面试验因素表

Table 1 Response surface test factor level tables			
序号	A 时间/min	B 料液比(g/mL)	C 浓度/%
−1	60	1 : 15	50
0	80	1 : 20	60
1	100	1 : 25	70

最大值,对超声波辅助提取多酚进行优化,得到最优条件为:乙醇浓度 56.33%、料液比 1 : 25 (g/mL)、提取时间 80.49 min、提取 2 次,总酚得率可达到4.993 65 mg/g。为便于操作,对最优工艺参数进行调整:乙醇浓度 56%、料液比 1 : 25 (g/mL)、提取时间 80 min、提取 2 次。

为了进一步验证 Design-Expert 8.0.6 Trial 软件给出的回归方程的准确性,采用上述最优条件进行 3 次验证实验,得到总酚平均得率为 5.046 38 mg/g,与所预测值误差为 1.05%,证明该方程可以有效得到最优提取条件。

表 2 响应面试验方案及结果

Table 2 Response surface test plan and results				
序号	A	B	C	Y/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	0	4.470
2	0	−1	1	4.298
3	1	−1	0	4.073
4	0	1	−1	4.862
5	−1	−1	0	3.612
6	0	1	1	4.692
7	1	0	1	4.149
8	0	−1	−1	4.032
9	0	0	0	4.721
10	0	0	0	4.817
11	0	0	0	4.898
12	1	0	−1	4.271
13	0	0	0	4.762
14	0	0	0	4.939
15	−1	0	1	3.835
16	−1	1	0	4.368
17	−1	0	−1	4.108

表 3 Box-Behnken 试验方差分析[†]

Table 3 Results of regression analysis of Box-Behnken					
来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2.543 898	9	0.282 655	30.490 930	<0.000 1
A	0.135 080	1	0.135 080	14.571 450	0.006 6
B	0.706 242	1	0.706 242	76.184 590	<0.000 1
C	0.011 245	1	0.011 245	1.213 022	0.307 2
AB	0.032 018	1	0.032 018	3.453 916	0.105 4
AC	0.005 622	1	0.005 622	0.606 511	0.461 6
BC	0.047 582	1	0.047 582	5.132 786	0.057 9
A ²	1.220 655	1	1.220 655	131.675 900	<0.000 1
B ²	0.105 646	1	0.105 646	11.396 420	0.011 8
C ²	0.105 646	1	0.105 646	11.396 420	0.011 8
残差项	0.064 891	7	0.009 270		
失拟项	0.031 658	3	0.010 553	1.270 158	0.397 5
误差	0.033 233	4	0.008 308		
总和	2.608 789	16			

[†] $R^2 = 0.975\ 1, R^2_{\text{adj}} = 0.943\ 1, R^2_{\text{Pred}} = 0.785\ 9。$

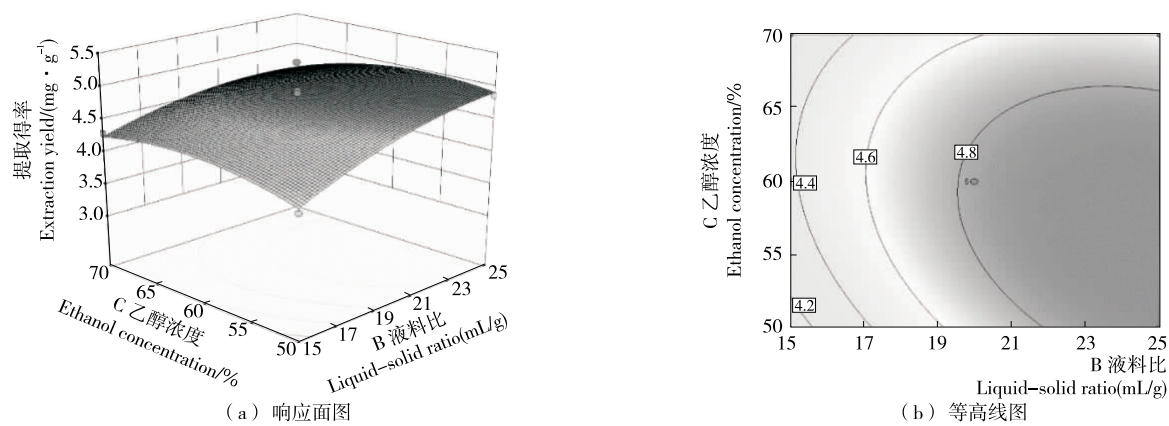


图 5 提取时间及料液比对多酚提取量的影响

Figure 5 The influence of time and solid-liquid ratio on the content of polyphenol

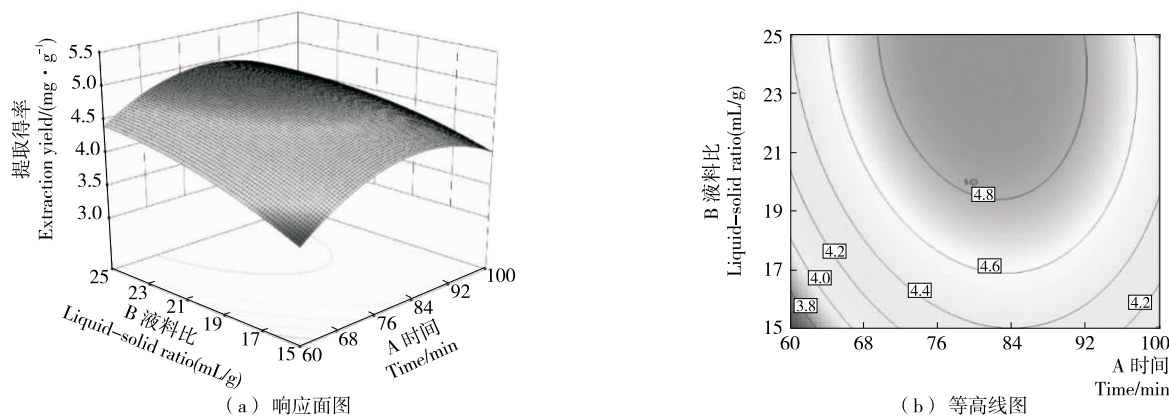


图 6 料液比及乙醇浓度对多酚提取量的影响

Figure 6 The influence of ethanol concentration and solid-liquid ratio on the content of polyphenol

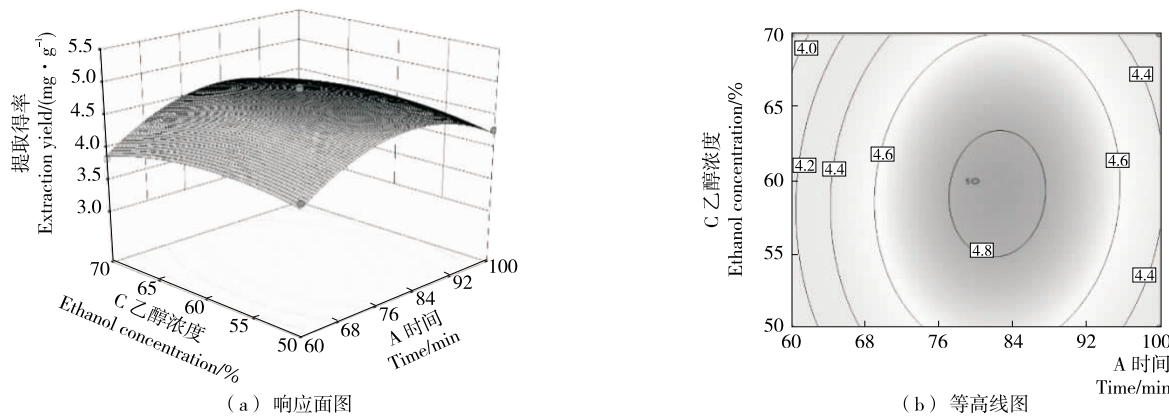


图 7 提取时间及乙醇浓度对多酚提取的影响

Figure 7 The influence of ethanol concentration and time on the content of polyphenol

3 结论

试验表明本工艺提取红汁乳菇中的多酚是一种可靠、有效的方法,具有技术可行性,该工艺可显著提高酚类物质的提取得率。根据此工艺提取的物质可较大程度地保留红汁乳菇中的酚类物质,后续将利用大孔树脂对其纯化,为探究红汁乳菇中分离得到的不同酚类物质的抗癌、抗氧化、抗炎、抑菌等生物活性提供物质基础。

参考文献

[1] 刘建成,陈先玉,李文艺. 湘西红汁乳菇的分布及生态研究[J]. 中国食用菌, 1995, 14(6): 36-37.
[2] 黄年来. 中国大型真菌原色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 217-221.
[3] 刘建成,陈先玉,李文艺. 湘西红汁乳菇的分布及生态研究[J]. 中国食用菌, 1995, 14(6): 36-39.

(下转第 215 页)

低龋齿风险的声称。

降低疾病风险声称需要最高级别的证据支持。这些证据主要是设计良好并且符合要求的人体干预试验,能显示出健康功能食品的持续功效。同时这类声称需要得到相关专家从科学显著一致性的角度共同确认通过;而且这些专家必须在健康声称评估方面接受过良好的科学训练并具备经验^[7]。

5 韩国健康功能食品管理对中国的启示

5.1 原料管理

韩国健康功能食品的原料采用名单制管理,这与中国 2015 年颁布实施的《食品安全法》中要求中国保健食品建立原料名称、用量及对应功效的原料目录不谋而合。韩国对健康功能食品的原料进行了分类,包括功能性成分、营养物、其他成分以及原材料四部分,并建立了原料目录名单。目前列入该名单的称之为通用健康功能食品的原料有 84 种,包括 28 种营养素以及人参、绿茶提取物等 56 种其他功能原料,然而中国并未对保健食品的原料进行分类管理,并且目前仅建立了以维生素和矿物质为主的营养素的原料目录一。同时韩国对于植物性功能原料的审评审批有着较为完整的评价体系,评估的重点主要集中在标准化、安全性及功效性三方面。中国若能对保健食品的原料进行分类管理,并且根据每一类原料的特点借鉴韩国评估原料的方法建立特定的管理系统,对保健食品原料纳入原料目录将起到积极的促进作用。

5.2 审批管理

韩国健康功能食品所用的原料完全符合《健康功能食品法典》中原料清单以及所规定的全部要求的产品,称为一般性健康功能食品,采用备案管理;所用原料不完全符合《健康功能食品法典》要求的,称为特定健康功能食品,采用注册管理,需要上市前审批。中国《食品安全法》同样明确提出保健食品实行注册与备案相结合的管理制度,其中使用原料纳入原料目录名单的产品实行备案管理,原料不属于原料目录的产品实行注册管理。在保健食品审评审批环节,中国与韩国没有明显的差异,不过值得注意的是韩国的审批程序采用递

进式,安全性和有效性通过评估后再对最终产品的规格标准进行审批,最后对标签和广告资料的审查,并在当地食品药品监督管理部门备案。

5.3 功能声称管理

韩国将健康功能食品的健康声称分为营养成分功能声称、其他功能声称、降低疾病风险声称三大类,并对每一类声称的定义及证据支持做出了明确的规定,有利于民众根据实际情况判断健康功能食品的功能效果。中国的功能声称的管理经历了多次的变革,每一次的变化均聚焦在具体的功能声称的增减,并未对功能声称进行分类管理。2015 年中国颁布实施的《食品安全法》规定要建立保健食品功能目录,目前仅配合原料目录一出台了补充维生素和矿质元素的功能目录一。后续功能目录的制定可借鉴韩国的管理办法分类管理,明确保健食品的功能定位,避免商家欺诈和虚假宣传。

参考文献

[1] 秦菲, 陈文, 魏涛, 等. 韩国对功能食品的管理[J]. 食品工业科技, 2009, 30(11): 283-286.

[2] 胡雅馨, 惠伯棣, 李京. 韩国的健康功能食品[J]. 中国食品添加剂, 2006(4): 113-116, 109.

[3] Ministry of Food and Drug Safety. The organization of ministry of food and drug safety[EB/OL]. (2017-01-20). <http://www.mfds.go.kr/eng/index.do? nMenuCode=9>.

[4] Ministry of Food and Drug Safety. Health Functional Food Code [EB/OL]. (2011-11-17). <http://www.mfds.go.kr/eng/eng/index.do? nMenuCode=120&page=2&mode=view&boardSeq=70011>.

[5] Ministry of Food and Drug Safety. Regulation on Approval of Functional Ingredient for Functional Food[EB/OL]. (2007-07-11). <http://www.mfds.go.kr/eng/eng/index.do? nMenuCode=120&page=2&mode=view&boardSeq=70014>.

[6] 兰洁, 王瑾, 王森, 等. 国际保健品管理的比较研究: 下[J]. 亚太传统医药, 2008(8): 5-8.

[7] KIM J Y, KIM D B, LEE H J. Regulation on health/functional food in Korea[J]. Toxicology, 2006, 221: 112-118.

(上接第 164 页)

[4] 柯丽霞. 红汁乳菇和多汁乳菇的化学成分及其开发利用前景[J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2000, 23(4): 391-393.

[5] 张光亚. 云南食用菌[M]. [出版地不详]: 云南人民出版社, 1984: 196.

[6] 杨祥开成, 黄雪星, 欧娜, 等. 红汁乳菇的组织分离及鉴定[J]. 食用菌, 2015, 37(6):13-15.

[7] MORO C, PALACIOS I, LOZANO M, et al. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages [J]. Food Chemistry, 2012, 130(2): 350-355.

[8] PALACIOS I, LOZANO M, MORO C, et al. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms [J]. Food Chemistry, 2011, 128(3): 674-648.

[9] CHEUNG L M, CHEUNG P K. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts [J]. Food Chemistry,

2003, 81(2): 249-255.

[10] 冯丽, 宋曙辉, 赵霖, 等. 植物多酚种类及其生理功能的研究进展[J]. 江西农业学报, 2007, 19(10): 105-107.

[11] 张毛莉, 罗仓学. 石榴皮中总酚含量测定方法的比较[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 383-388.

[12] 牛雪, 张军翔, 徐国前. 葡萄与葡萄酒中总酚测定方法的研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 239-242.

[13] 庄坤, 梅进, 丁熊. Folin_Ciocalteu 比色法测定大麦糟中总酚条件的优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(2): 51-54.

[14] 张艳萍, 傅晓航, 俞远志. 板栗中多酚物质的提取工艺优化[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 187-191.

[15] 李西柳, 明庞, 王俊儒, 等. 柿子渣中多酚的提取工艺及其抗氧化性研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(7): 1 475-1 480.

[16] 张晖, 钱海峰, 齐希光, 等. 紫米多酚提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 111-115.