

超声波辅助提取口蘑菌丝体多糖工艺优化

Optimization on extraction technology of *mushroom mycelium* polysaccharides by ultrasonic

薛菁¹ 吴晓彤¹ 王颖超¹ 曾陆莹¹ 刘静²

XUE Jing¹ WU Xiao-tong¹ WANG Ying-chao¹ ZENG Lu-ying¹ LIU Jing²

(1. 内蒙古大学生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古商贸职业学院食品工程系, 内蒙古 呼和浩特 010070)

(1. College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010020, China; 2. Food Engineering, Inner Mongolia Business & Trade Vocational College, Hohhot, Inner Mongolia 010070, China)

摘要:以蒙古口蘑菌丝体为原料,采用超声波技术辅助提取口蘑菌丝体多糖,以超声功率、超声时间、液料比、提取温度进行单因素试验,再通过四因素三水平的正交试验筛选出口蘑菌丝体多糖提取的最佳条件。结果表明:当超声功率为 18% (额定功率 900 W)、超声时间 20 min、液料比 40:1 (V:m)、提取温度 75 °C 时,口蘑菌丝体多糖提取率高达 13.96%。

关键词:口蘑;菌丝体;多糖;超声波;热水浸提

Abstract: Polysaccharides was extracted from *Tricholoma mongolicum* mycelium. The effect factors, including ultrasonic power, ultrasonic time, liquid-solid ratio and temperature, were optimized through orthogonal tests $L_9(3^4)$ on the basis of single factor experiment. Results showed that ultrasonic power 18% (rated power 900 W), ultrasonic time 20 min, liquid-solid ratio 40:1 and extraction temperature 75 °C. Under optimal conditions, the extraction yield of polysaccharides was 13.96%.

Keywords: mushroom; mycelium; polysaccharides; ultrasonic; hot water extraction

蒙古口蘑,是草原最好的菌类之一,菌肉嫩滑,味道鲜香,营养价值较高,且富含多糖等功能性物质^[1],具有增强免疫、抗氧化、降血糖等生理功能^{[2]1-3}。近年,放牧不加限制、草原沙化加剧、人为过度采摘,使得蒙古口蘑的数量愈发稀少^[3]。吴晓彤^[4]研究发现,从液体发酵培养的蒙古口蘑菌丝体中提取的多糖在生理活性方面都无异于子实体,因此为口蘑多糖的提取利用开辟了新方向。

目前菌丝体多糖提取普遍采用热水浸提法^[5],但由于部分多糖存在于细胞壁中,使得提取难度大,得率较低且耗时。

超声波法利用低频超声波进行提取,快速有效,且不破坏其中有效成分^[6]。本试验以蒙古口蘑菌丝体为原料,拟采用超声辅助热水浸提口蘑菌丝体多糖,以多糖提取率作为检测指标,在对超声功率、超声时间、液料比、提取温度进行单因素试验的基础上结合正交试验,优化蒙古口蘑菌丝体多糖提取的最佳工艺条件,旨在提高提取率对实际工业应用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 主要材料

1.1.1 试验原料

蒙古口蘑菌种:由内蒙古大学生命科学学院食品检测实验室提供。

1.1.2 试剂与仪器

95%乙醇、乙醚、苯酚、浓硫酸、3,5-二硝基水杨酸(DNS):分析纯,市售;

超声波细胞破碎仪: Biosafer900-91 型,赛飞中国有限公司;

水浴锅: HH-6 型,金坛市科兴仪器厂;

台式电动离心机: 80-2 型,金坛市科兴仪器厂;

紫外分光光度计: YK1105021 型,上海佑科仪器厂仪表有限公司;

分析天平: BSA224S-CW 型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 口蘑菌丝体的制备 根据任启伟^{[2]20-24}研究的蒙古口蘑液态发酵最优发酵培养基,在 pH 6.5、温度 25 °C、接种量 20 g、摇床转速 180 r/min 条件下培养 7 d 制得口蘑菌丝体培养物,在 65 °C 旋蒸,用透析袋透析 48 h 后经真空冷冻干燥在 -40 °C 冻干为粉末,于 -18 °C 冻藏,备用。

1.2.2 口蘑菌丝体多糖的提取 准确称取蒙古口蘑菌丝体粉末 0.100 0 g 于离心管中,加入蒸馏水进行超声波处理后热水浸提,离心(4 000 r/min, 30 s)取上清液,加入 3 倍体积

基金项目:内蒙古自然科学基金(编号:2013MS0524)

作者简介:薛菁(1993—),女,内蒙古大学在读本科生。

E-mail: 625303050@qq.com

通讯作者:吴晓彤

收稿日期:2015-09-28

的95%乙醇,静置过夜,再离心(4 000 r/min, 30 s),弃去上清液,将沉淀用无水乙醇洗涤2次,乙醚洗涤1次,每次洗涤均要通过离心(4 000 r/min, 30 s)去除有机溶剂,最后沉淀物即为提取物。将沉淀物定容于100 mL容量瓶内,测粗提物质量,并计算多糖提取率^[7]。

1.2.3 多糖提取率的测定 采用苯酚—硫酸法^[8]测定提取物中的总糖质量,DNS法^[9]测定还原糖质量,二者之差即为多糖粗提物质量。多糖提取率按式(1)计算:

$$h = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

h ——多糖提取率,%;

m_0 ——口蘑菌丝体粉末质量,mg;

m_1 ——口蘑菌丝体多糖粗提物质量,mg。

1.2.4 单因素试验设计

(1) 超声波功率:固定超声时间15 min、液料比50:1($V:m$)、提取温度85℃,分别在功率百分比9%,12%,15%,18%,21%(额定功率900 W)条件下,测定口蘑菌丝体多糖提取率。

(2) 超声时间:固定功率百分比15%(额定功率900 W)、液料比50:1($V:m$)、提取温度85℃,分别在超声时间10,15,20,25,30 min条件下,测定口蘑菌丝体多糖提取率。

(3) 液料比:固定超声功率百分比15%(额定功率900 W)、超声时间15 min、提取温度85℃,分别在液料比30:1,40:1,50:1,60:1($V:m$)条件下,测定口蘑菌丝体多糖提取率。

(4) 提取温度:固定超声功率百分比15%(额定功率900 W)、超声时间15 min、液料比50:1($V:m$),分别在提取温度75,85,95℃条件下,测定口蘑菌丝体多糖提取率。

1.2.5 正交试验 根据单因素试验的结果,选择超声波功率、超声时间、液料比、提取温度的最优条件作为正交试验的因素,选用标准 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行试验方案设计,以口蘑菌丝体多糖提取率为评价指标,优化提取工艺条件。

2 结果与分析

2.1 总糖的标准曲线

(1) 总糖标准曲线(图1):以总糖浓度 $X(\text{mg/mL})$ 为横坐标,吸光度 Y 为纵坐标作标准曲线,所得线性回归方程为 $Y=12.58X-0.0114$,相关性系数 $R^2=0.9992$ 。

(2) 还原糖标准曲线(图2):以还原糖浓度 $X(\text{mg/mL})$ 为横坐标,吸光度 Y 为纵坐标作标准曲线,所得线性回归方程为 $Y=0.55X-0.0034$,相关性系数 $R^2=0.9994$ 。

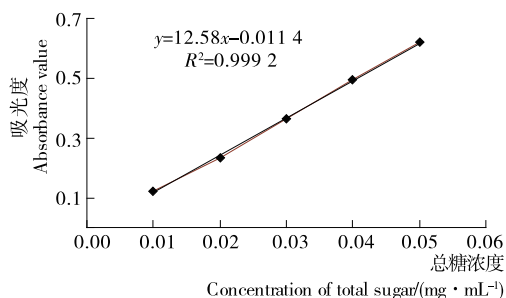


图1 总糖溶液标准曲线

Figure 1 Total sugar solution standard curve

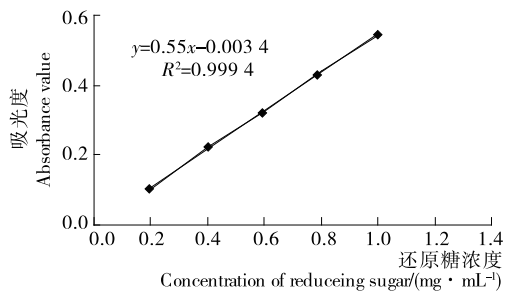


图2 还原糖溶液标准曲线

Figure 2 Reducing sugar solution standard curve

2.2 单因素试验结果分析

2.2.1 超声波功率对多糖提取率的影响 由图3可知,功率百分比先上升后下降,当超声功率百分比逐渐增大时,在9%至15%范围内口蘑菌丝体多糖提取率也增大,超声波破壁作用加强,存在于细胞壁内的多糖溶解率增加。当功率百分比超过15%时菌丝体多糖提取率反而下降,可能是由于超声波能量的强度太大,多糖的结构被破坏。因此采用功率百分比15%。

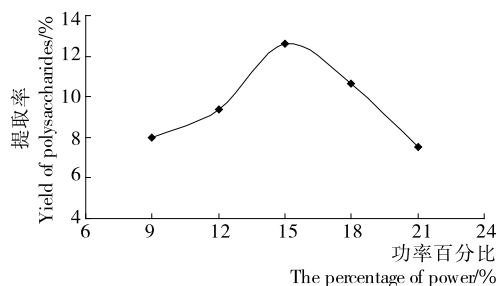


图3 超声波功率对多糖提取率的影响

Figure 3 Effects of extraction power on polysaccharides percentage

2.2.2 超声时间对多糖提取率的影响 由图4可知,10~15 min时口蘑菌丝体多糖提取率随超声时间延长而增大,超过15 min后,菌丝体多糖提取率降低,可能是非糖类的物质被溶解,影响了多糖提取率。因此超声时间采用15 min。

2.2.3 液料比对多糖提取率的影响 由图5可知,液料比在30:1~40:1($V:m$)时口蘑菌丝体多糖提取率逐渐增大,大于40:1($V:m$)时,提取率反而下降,原因可能是溶剂量的增多影响了多糖对超声波的吸收。因此液料比采用40:1($V:m$)。

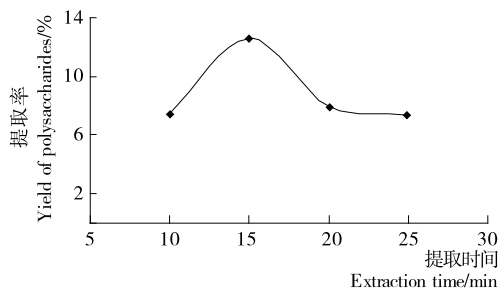


图4 超声时间对多糖提取率的影响

Figure 4 Effects of extraction time on polysaccharides percentage

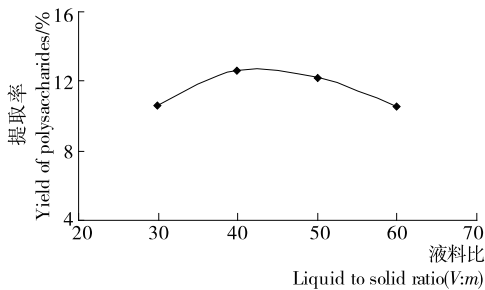


图 5 液料比对多糖提取率的影响

Figure 5 Effects of liquid-solid ratio on polysaccharides percentage

2.2.4 提取温度对多糖提取率的影响 由图 6 可知,75~85 °C 时口蘑菌丝体多糖提取率随温度的升高而增大,原因是升温后细胞内分子的运动速率增加,扩散作用增强,提取率也随之提高。当温度超过 85 °C 时菌丝体多糖提取率反而下降,可能是温度升高破坏了多糖的结构,部分多糖链在超声的作用下会降解损失,导致多糖提取率下降^[10]。因此提取温度采用 85 °C。

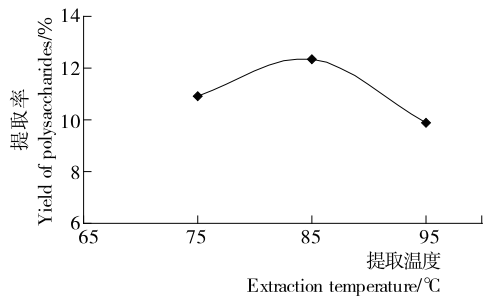


图 6 提取温度对多糖提取率的影响

Figure 6 Effects of extraction temperature on polysaccharides percentage

2.3 多糖提取正交试验设计及结果

选择单因素最佳条件设计正交试验,试验因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

由表 2、3 可知,各因素影响顺序依次为:C>D>A>B,即液料比>浸提温度>超声功率>超声时间,因素 C 即液料比对菌丝体多糖有显著性影响;口蘑菌丝体多糖提取最佳工艺为 A₃B₃C₂D₁,即超声功率为 18%,超声时间 20 min,液料比 40:1(V:m),提取温度 75 °C。在最佳工艺条件下超声波辅助提取蒙古口蘑菌丝体多糖的提取率为 13.96%。

3 结论

本试验以单因素试验为基础,结合正交试验及方差分析得到了超声波辅助热水浸提口蘑菌丝体多糖的最佳工艺条件,

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	A 超声功率/%	B 超声时间/min	C 液料比 (V:m)	D 浸提温度/°C
1	12	10	30:1	75
2	15	15	40:1	85
3	18	20	50:1	95

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	7.96
2	1	2	2	2	8.73
3	1	3	3	3	7.77
4	2	1	2	3	9.37
5	2	2	3	1	9.88
6	2	3	1	2	7.48
7	3	1	3	2	9.77
8	3	2	1	3	6.76
9	3	3	2	1	13.96
k_1	8.15	9.03	7.4	10.60	
k_2	8.91	8.46	10.69	8.66	
k_3	10.16	9.74	9.14	7.97	
R	2.01	1.28	3.29	2.63	

表 3 方差分析表[†]

Table 3 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F _{0.05} 临界值
A	6.18	2	3.09	2.18	F _{0.05} = 5.41
B	2.83	2	1.42	1.00	
C	16.22	2	8.11	5.71*	
D	11.18	2	5.59	3.94	

† “*”表示在 5%水平上显著;因 B 因素均方值最小作为误差项。

在该试验条件下提取率高达 13.96%,比范庆峰等^[1]使用的传统浸提法高出 2 倍多,极大地提高了多糖提取率。本试验得出的最佳工艺参数,在多糖产品的实际开发中有重要参考价值。

参考文献

- [1] 范庆峰,孟建宇,姚庆智. 蒙古口蘑菌丝体多糖的测定[J]. 畜牧与饲料科学, 2008(4): 21-23.
- [2] 任启伟. 蒙古口蘑液体发酵及菌丝体多糖提取的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2011.
- [3] 渠志臻,姚庆智,闫伟. 蒙古口蘑多糖提取工艺的研究[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(4): 129-132.
- [4] 吴晓彤. 蒙古口蘑分子鉴定及其菌丝体液体发酵技术与应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2014: 1-2.
- [5] Yin Xiu-lian, You Qing-hong, Su Xiao-ye. A comparison study on extraction of polysaccharides from Tricholoma matsutake by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2014 (102): 419-422
- [6] 赖红芳,黄秀香,陆俊宇. 超声波辅助提取山豆根中的黄酮和多糖工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 196-223.
- [7] 史碧波,王雪波,罗晓妙. 超声波辅助提取鸡油菌多糖的研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 152-218.
- [8] 都秀玲,梁彦. 超声波辅助萃取马齿苋多糖的工艺优化[J]. 吉林农业科技学院学报, 2015, 24(1): 23-30.
- [9] 王俊丽,聂国兴,李素贞,等. DNS 法测定还原糖含量时最适波长的确定[J]. 河南农业科学, 2010(4): 115-118.
- [10] 王超,甄润英. 海芦笋多糖超声波辅助提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 138-141.