

Pleurotus nebrodensis 子实体多糖提取工艺的研究

马淑凤², 张连富, 王利强, 刘长江¹ (1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏无锡214122; 3. 江南大学机械工程学院, 江苏无锡214122; 4. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳110161)

摘要 对 *Pleurotus nebrodensis* 子实体多糖酶法提取工艺条件中酶用量、酶解温度、酶解时间、pH 值4 因子的最优化组合问题进行了研究, 建立了具有良好预测性能的 *Pleurotus nebrodensis* 子实体多糖提取条件模型, 并对工艺条件的最优组合及双因素效应进行分析。结果表明, 当酶用量为3.06%、酶解温度44.9℃、酶解时间3.8 h、pH 值6.7 时, 多糖得率最高可达12.37%。

关键词 白灵菇子实体; 酶法提取; 多糖; 优化

中图分类号 S567.3+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)18-07521-02

Studies on the Enzymatic Extraction of the Fruiting Body Polysaccharide of *Pleurotus nebrodensis*

MA Shu-feng et al (State Key Laboratory of Food Science and Technology(Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract The influence of enzyme dosage, enzymolysis temperature, enzymolysis time and pH on the extracted rate of the Fruiting Body Polysaccharide of *Pleurotus nebrodensis* was studied in the article. A quadratic regression model of polysaccharides extraction rate about enzyme dosage, enzymolysis temperature, enzymolysis time and pH was established. The model was significantly fit well and the optimum combination was obtained. Their double factors interaction were discussed. The results showed that when the extraction parameters were controlled at enzyme dosage 3.06%, enzymolysis temperature 44.9℃, enzymolysis time 3.8 h and pH 6.7, the polysaccharides yield could be up to 12.37%. It was proved that the enzymatic method was better than classic method in *Mycelium Polysaccharide* extraction.

Key words *Pleurotus nebrodensis*; Fruiting body; Enzymatic extraction; Polysaccharides; Optimization

Pleurotus nebrodensis (俗名白灵菇) 属于真菌门担子菌纲伞菌目侧耳科侧耳属^[1], 其主要成分是几丁质 (Chitin) 和 - 葡聚糖 (-Gucan), 占干物质的80%~90%。由于这类结构复杂的葡聚糖的存在, 白灵菇细胞壁比其他非食用菌类的细胞壁厚很多, 致使其提取、分离困难, 也不易被人体吸收利用, 但这些多聚糖具有显著的抗肿瘤作用, 是白灵菇生物活性的物质基础^[2]。如何提高多糖得率是白灵菇研究中亟待解决的关键技术问题, 复合酶解法提取真菌多糖是近几年发展起来的一种新技术。此方法已在竹荪、香菇及姬松茸等食用菌的多糖提取中广泛应用, 并取得很好的效果^[3-4], 但应用于白灵菇子实体的尚未见报道。因此, 笔者在单因素试验基础上^[5], 采用复合酶解法对白灵菇子实体多糖的提取工艺进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 *Pleurotus nebrodensis* 子实体由辽宁省凤城市大业食用菌实验基地培育。复合酶系: 纤维素酶; 蜗牛酶; 溶壁酶; 中性蛋白酶。将以上4种酶依次按质量比3:2:0.5:5混合。

1.2 试验方法 酶解法提取PNFP^[6]。多糖得率计算公式为:

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{\text{提取得到多糖质量}}{\text{子实体粉干重}} \times 100$$

试验采用二次回归正交旋转组合设计方法^[7], 试验因子的水平及编码见表1。

2 结果与分析

2.1 数学模型的建立及其显著性检验 采用四因素二次回归正交旋转组合试验设计方案对复合酶法提取PNFP的工艺条件进行了优化。对试验结果进行统计分析, 得到影响多糖

得率(Y)与酶用量(X₁)、酶解温度(X₂)、酶解时间(X₃)和pH值(X₄)四因素在编码空间的多元回归模型如下:

$$Y = 11.9817 + 0.6548X_1 + 0.1896X_2 + 0.199X_3 + 0.0648X_4 - 0.3238X_1X_2 - 0.155X_1X_3 + 0.2451X_1X_4 + 0.3138X_2X_3 + 0.2218X_2X_4 - 0.2135X_3X_4 - 0.3125X_1^2 - 0.6488X_2^2 - 0.358X_3^2 - 0.4412X_4^2 \quad (1)$$

表1 二次回归正交旋转组合设计因素水平

Table 1 The factors and coded level of PNFP

X _i	酶用量 Z ₁ % Dosage	酶解温度 Z ₂ Temperature	酶解时间 Z ₃ h Time	pH 值 Z ₄
-2	1.5	35	2.5	4.5
-1	2	40	3.5	5.5
0	2.5	45	4.5	6.5
1	3	50	5.5	7.5
2	3.5	55	6.5	8.5
j	0.5	5	1	1

由表2可知, $F_{回} = 26.305 > F_{0.01}(14, 21) = 3.03$, 方程回归极显著; $F_{LF} = 1.692 < F_{0.1}(10, 11) = 2.25$, 失拟不显著, 故可用于设计范围内的预测。平方项的回归系数均极显著, 说明各因素(X)与PNFP得率(Y)之间存在明显的二次关系; 方程的交互项回归系数均在不同程度上显著, 说明各因素间存在明显交互作用, 与实际情况相符; 一次项中X₄的回归系数不显著。直接剔除不显著的项(由于设计具有正交性), 回归方程变为:

$$Y = 11.9817 + 0.6548X_1 + 0.1896X_2 + 0.199X_3 - 0.3238X_1X_2 - 0.155X_1X_3 + 0.2451X_1X_4 + 0.3138X_2X_3 + 0.2218X_2X_4 - 0.2135X_3X_4 - 0.3125X_1^2 - 0.6488X_2^2 - 0.3580X_3^2 - 0.4412X_4^2 \quad (2)$$

2.2 两因素间的交互效应分析 在回归方程(2)中, 固定任意2个因素在0水平上, 研究另2个因素间的交互效应。笔者以酶用量与酶解温度(X₁X₂)交互项为例对交互作用进行分析。

基金项目 辽宁省教育厅科学研究计划资助(05L391)。

作者简介 马淑凤(1978-), 女, 满族, 河北唐山人, 讲师, 从事食品生物技术方面的研究工作。

收稿日期 2008-04-16

当 X_3 和 X_4 固定于 0 水平时, PNEP 的回归方程如下:

$$\hat{y}_{X_1 X_2} = 11.9817 + 0.6548 X_1 + 0.1896 X_2 - 0.3238 X_1 X_2 - 0.3125 X_1^2 - 0.6488 X_2^2$$

表2 回归模型分析结果

Table 2 Analysis result of regression model

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
S.V						
X_1	1	10.29	10.29	83.762**	4.32	8.02
X_2	1	0.863	0.863	7.021*		
X_3	1	0.950	0.950	7.735*		
X_4	1	0.101	0.101	0.819		
$X_1 X_2$	1	1.677	1.677	13.653**		
$X_1 X_3$	1	0.384	0.384	4.428*		
$X_1 X_4$	1	0.961	0.961	7.824*		
$X_2 X_3$	1	1.576	1.576	12.824**		
$X_2 X_4$	1	0.787	0.787	6.407*		
$X_3 X_4$	1	0.729	0.729	5.935*		
X_1^2	1	3.125	3.125	25.433**		
X_2^2	1	13.47	13.47	109.657**		
X_3^2	1	4.101	4.101	33.382**		
X_4^2	1	6.228	6.228	50.695**		
回归Regression	14	45.245	3.232	26.305**	2.18	3.03
剩余Residual	21	2.58	0.123			
纯误差PE	11	1.017	0.092			
失拟LF	10	1.563	0.156	1.692	2.85	4.54
总变异	35	47.825	1.366			
Total variation						

注:**表示 $F > F_{0.01}$, *表示 $F > F_{0.05}$ 。

Note: ** and * stand for $F > F_{0.01}$ and $F > F_{0.05}$, respectively.

表3 酶用量 X_1 和酶解温度 X_2 对子实体多糖得率的交互作用

Table 3 Interaction of enzyme dosage X_1 and enzymolysis temperature X_2 on PNEP

		X_1 酶用量 Enzyme dosage					统计参数 Statistical parameter		
		-2	-1	0	1	2	均值	s	CV
X_2 酶解温度 Enzymolysis temperature	-2	5.15	7.39	9.01	9.99	10.36	8.38	2.14	25.54
	-1	7.94	9.85	11.14	11.81	11.85	10.52	1.65	15.73
	0	9.42	11.01	11.98	12.32	12.04	11.36	1.19	10.47
	1	9.61	10.88	11.52	11.54	10.94	10.89	0.78	7.20
	2	8.50	9.45	9.77	9.46	8.53	9.14	0.58	6.40
	统计参数 Statistical parameter	均值	8.1245	9.72	10.68	11.03	10.74		
	s	1.79	1.46	1.25	1.23	1.41			
	CV	22.11	15.03	11.70	11.18	13.16			

注: $\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n f_i y_i$; $S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n f_i (y_i - \bar{y})^2}$; $CV(\%) = S / \bar{y}$ Note: $\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n f_i y_i$; $S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n f_i (y_i - \bar{y})^2}$; $CV(\%) = S / \bar{y}$

2.3 子实体多糖提取工艺参数的优化求解及结果验证 利用牛顿迭代法规划求解, 得到在 PNEP 得率最大时的最佳工艺参数组合。由以上交互作用分析及表 4 可知, PNEP 的回归模型均存在稳定点, 稳定点为 Y 的最大估计值, 为 12.38%。同时得到 PNEP 4 个因素的最佳水平值为: 酶用量 3.06%、酶解温度 44.9、酶解时间 3.8 h、pH 值 6.7。对此

将 X_1 、 X_2 的各个水平的编码值代入这个方程, 计算各个 y 值。从表 3 可以看出, 10.36、11.85、12.32、11.54、9.77 分别表示酶用量从 -2 ~ 2 各水平下, 不同酶解温度水平对应 PNEP 得率中的最大值; 9.61、11.01、11.98、12.32、12.04 分别表示酶解温度从 -2 ~ 2 各水平下, 不同酶用量水平对应 PNEP 得率中的最大值。当酶解时间是 4.5 h、pH 6.5(皆是 0 水平)、酶用量 3%(1 水平) 和酶解温度 45 (0 水平) 时, PNEP 得率最高, 为 12.32%。还可以看出, 在酶解温度 -2、-1 水平上, 随着酶用量的增加 PNEP 得率逐渐增加; 在酶解温度后 3 个水平上, 酶用量分别为 0、1 水平时, 无论增加还是减少, 都导致 PNEP 得率降低。PNEP 得率随着酶解温度的增加是先增后减, 在酶用量的后 4 个水平上, 酶解温度在 0 水平时, 无论升高还是降低, 都导致 PNEP 得率降低。当酶用量和酶解温度均为 -2 水平时(即 1.5%, 35), PNEP 得率最低为 5.15%。

从表 3 还可以看出, 在酶解温度的不同水平下, 随着酶用量的增加, PNEP 得率改变的变异度不同, 呈先减小后增加趋势。在酶用量的不同水平下, 随着酶解温度的增加, PNEP 得率改变的变异度逐渐减小, 说明酶解温度较低时, 其改变对 PNEP 得率的影响较大。酶解温度(CV 6.4% ~ 25.54%) 对 PNEP 得率的影响较酶用量(CV 11.18% ~ 22.11%) 更为敏感。

经过优化, 最优的酶解温度范围应在 -0.4 ~ 0.1 水平(实际值 43.0 ~ 45.5); 最优的酶用量范围应在 1.0 ~ 1.3 水平(实际值 3.00% ~ 3.15%)。

表4 PNEP 提取优化值

Table 4 Optimum values of PNEP

样品 Sample	因素 Factor	X_1	X_2	X_3	X_4	估计值 Estimation value	稳定点类型 Type of stability point
PNEP	编码值 Coded value	1.11	-0.02	0.29	0.230	12.38%	最大值 Minimum value
	自然值 Nature value	3.06%	44.9	3.8 h	6.7		

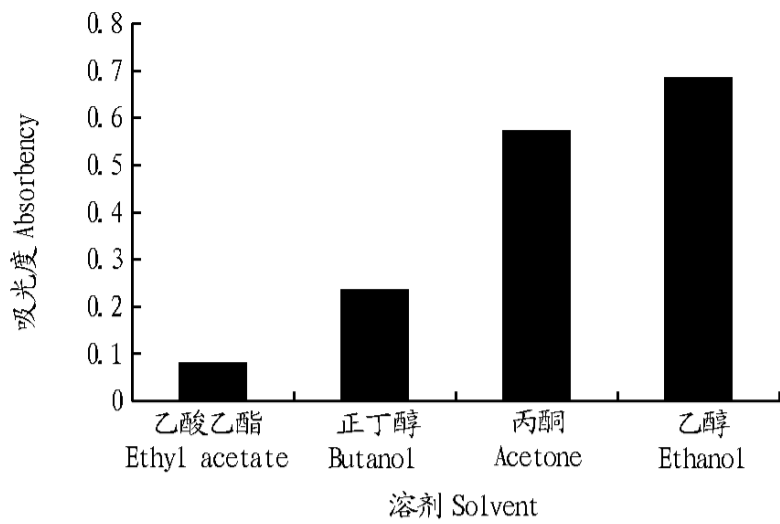


图1 不同有机溶剂对绿变色素浸提效果的影响

Fig.1 Effects of different organic solvents on the extracting effect of green pigment

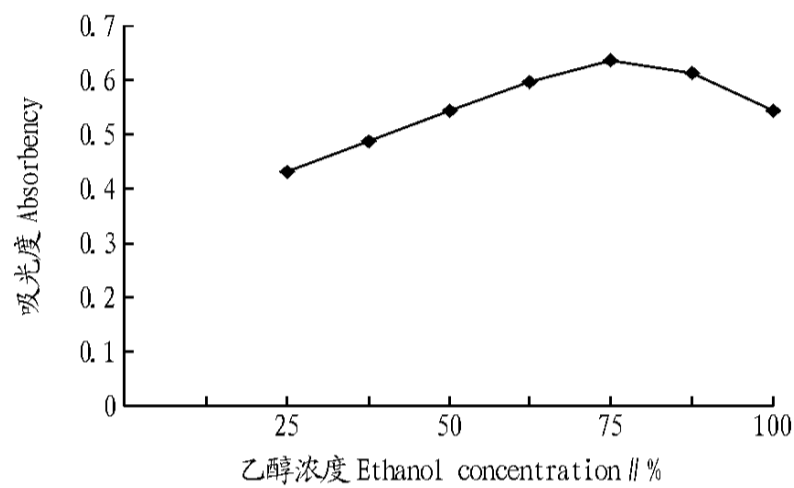


图2 不同浓度乙醇溶液对绿变色素提取效果的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of ethanol solution on the extracting effect of green pigment

中,大蒜绿变色素在乙醇中的溶解度最好,可见溶剂的极性提高,浸提效果越好。因此,采用乙醇水溶液作为浸提溶剂,以提高浸提效果。正交试验设计见表1,试验结果见表2。由表2可知,吸光度最大即效果最好的浸提条件为 $A_2B_1C_2$,即75%乙醇,料液比1:3(W/V),浸提24 h。表明料液比1:3时足以溶出绿变色素;而浸提时间过短色素溶出不充分,时间过长,色素不稳定,发生降解,导致吸光度下降^[5]。极差分析表明,在正交试验的3个因素中,对绿变色素浸提效果影

响最大的是料液比,其次分别为浸提时间、乙醇浓度。

表2 绿变色素浸提正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal test of green pigment

试验号 Test No.	A	B	C	吸光度 Absorbency
1	1	1	1	0.6831
2	1	2	2	0.6836
3	1	3	3	0.4783
4	2	1	2	0.6837
5	2	2	3	0.5918
6	2	3	1	0.5899
7	3	1	3	0.6759
8	3	2	1	0.6324
9	3	3	2	0.4568
K_1	1.845	2.043	1.905	
K_2	1.865	1.908	1.824	
K_3	1.765	1.746	1.746	
k_1	0.615	0.681	0.635	
k_2	0.622	0.636	0.608	
k_3	0.588	0.582	0.582	
R	0.034	0.099	0.053	

3 小结

据有关研究报告,将色素的乙醇提取液浓缩除去乙醇后,依次用2倍体积乙醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,检测萃取液的 A_{595nm} ,初步判定色素极性。结果表明,正丁醇-水萃取体系中,色素大量富集于正丁醇相中,认为色素属中等极性物质。所以,可参考中等极性物质的分离方法进行该色素的提取。该研究在此基础上加以改进,得到了预期的效果。最佳浸提条件是75%乙醇,料液比1:3(W/V),浸提24 h。

参考文献

- [1] 陈能煌,陈丽.大蒜的检测方法进展[J].食品技术,1998,12:16-19.
- [2] 别小妹,岳喜庆.蒜泥变绿变褐的原因及控制方法[J].饮料工业,1998,1(3):22-24.
- [3] 赵晓丹,傅达奇.腊八蒜绿变色素的分离提取[J].食品与发酵工业,2004,30(10):129-131.
- [4] 袁丽,高瑞昌.影响蒜泥绿变因素的研究[J].食品工业科技,2003,24(2):39-40.
- [5] 徐为民,刘邰洲.大蒜泥加工中发绿现象的控制研究[J].食品工业科技,2003,24(1):71-72.

(上接第7522页)

表5 PNFP 提取验证试验结果

Table 5 Results of verification test of PNFP

试验号 Test number	子实体多糖得率 %PNFP yield
1	12.37
2	12.35
3	12.38
4	12.39
5	12.35
平均值 Average value	12.37

3 结论与讨论

(1) 在酶解过程中,各因素间的交互作用均在不同程度上显著,其中 X_1 、 X_2 (酶用量与酶解温度)的交互作用最显著,酶解温度对PNFP得率的影响较酶用量更为敏感。

(2) 通过对酶解法提PNFP工艺条件的优化,得出最佳提

取工艺参数为:酶用量为3.06%、酶解温度44.9、酶解时间3.8 h、pH值6.7时,此条件下PNFP得率最高可达12.37%,比水浸提法多糖得率9.93%高^[5]。从Pleurctus nebrodensis子实体多糖得率看,酶解法优于传统的单一热水浸提法。

参考文献

- [1] 王波,唐利民,熊鹰,等.白灵侧耳(白灵菇)种质资源评价[J].菌物系统,2003,22(3):502-503.
- [2] 黄年来.中国食用菌百科[M].北京:中国农业出版社,1997:50-102.
- [3] 涂国云.酶法提取竹荪深层发酵菌丝体多糖的研究[J].中国食用菌,1998,17(1):36-38.
- [4] 沈爱英,谷文英.复合酶法提取姬松茸子实体多糖的研究[J].食用菌,2001(3):7-9.
- [5] 马淑凤.高产多糖白灵菇菌株的诱变选育及其多糖的研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2006.
- [6] 马淑凤,王利强,刘长江,等.酶法提取白灵菇深层发酵菌丝体多糖的研究[J].农业工程学报,2006,22(9):198-201.
- [7] 袁志发.试验设计与分析[M].北京:高等教育出版社,2000:372-386.