

doi:10.3969/j.issn.1001-3776.2017.04.006

超声波协同复合酶法提取桑黄多糖工艺优化

程俊文¹, 贺亮¹, 魏海龙¹, 宋吉玲², 胡传久¹, 邹景泉¹, 李海波¹, 蒋云鹤¹

(1. 浙江省林业科学研究院 浙江省森林资源生物与化学利用重点实验室, 浙江 杭州 310023;

2. 杭州市农业科学研究院, 浙江 杭州 310024)

摘要: 在单因素试验的基础上, 通过 Box-Behnken 组合设计和响应曲面分析法优化桑黄 *Inonotus sanghuang* 子实体中多糖的超声波协同复合酶法提取工艺条件。在前期预实验的基础上, 采用纤维素酶、果胶酶和蛋白酶按 2:1:1 组成复合酶对桑黄子实体进行酶解处理, 添加量为 2%, 温度 50℃, pH 6.5, 在水溶液中酶解 1 h。然后对工艺中的超声波功率、超声时间、液料比进行优化。响应面分析结果表明, 桑黄子实体中多糖的最佳提取条件为: 超声功率 360.6 W, 液料比 32.5:1, 超声时间 32.7 min, 多糖得率可得 3.31%, 与理论值 3.46% 基本吻合。

关键词: 桑黄; 多糖; 超声波; 复合酶; 响应面

中图分类号: TQ461 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3776 (2017) 04-0033-06

Ultrasonic-assisted Enzymatic Method Extraction of Polysaccharide from *Inonotus sanghuang*

CHENG Jun-wen¹, HE Liang¹, WEI Hai-long¹, SONG Ji-ling², HU Chuan-jiu¹, ZOU Jing-quan¹, LI Hai-bo¹, JIANG Yun-he¹

(1. Zhejiang Academy of Forestry, Key Laboratory of Biological and Chemical Utilization of Forest Resources, Hangzhou 310023, China; 2.

Hangzhou Academy of Agricultural Sciences of Zhejiang, Hangzhou 310024, China)

Abstract: Extraction technology of polysaccharide from *Inonotus sanghuang* was optimized by ultrasonic-assisted enzymatic method and response surface analysis. Based on the results of single factor experiment, enzymolysis of *I. sanghuang* sporocarp was carried out with 2% of complex phosphoesterase (ratio of cellulose, pectinase, protease of 2:1:1) at 50℃ under pH of 6.5 for 1 hour. Then optimization of extraction technology was implemented on ultrasonic power, ultrasound time and ratio of liquid and material. The response surface analysis demonstrated that polysaccharide yield topped 3.31% under condition as follows: ultrasonic power 360.6W, liquid/material ratio 32.5:1, ultrasound treatment time 32.7minutes, similar to theoretical value of 3.46%.

Key words: *Inonotus sanghuang*; polysaccharide; ultrasonic; compound enzyme; response surface methodology

桑黄, 中药名, 为桑黄纤孔菌 *Inonotus sanghuang* 的子实体, 属担子菌亚门 Basidiomycotina^[1] 锈革孔菌科 Hymenochaetaceae 纤孔菌属 *Inonotus*, 是一种珍贵的药用真菌。医学研究表明, 桑黄具有抗肿瘤、抗氧化、抗肝纤维化、增强免疫等药理活性^[2-4], 被国际公认为抗肿瘤效果最好的药用真菌之一。与大多数药用真菌一样, 桑黄水提物的主要活性成分是多糖, 而多糖是构成真菌细胞壁的主要成分, 与纤维素、蛋白质等紧密联结, 不

收稿日期: 2017-03-09; 修回日期: 2017-06-23

基金项目: 浙江省科技厅院所专项(2014F50018); 国家自然科学基金项目(31501815); 浙江省农业(食用菌)新品种选育项目(2016C02057-8)和杭州市科委种子种苗专项(20150932H07)的部分研究内容

作者简介: 程俊文, 硕士, 副研究员, 从事食用药用菌活性成分加工研究; E-mail: jwchengzj@163.com。通信作者: 邹景泉, 工程师, 从事森林资源研究; E-mail: 422046791@qq.com。

易分离。近年来,浙江、安徽等省桑黄人工栽培规模不断扩大,因此对桑黄多糖提取技术的研究具有重要的意义。

目前,桑黄多糖的提取方法多为传统的热水浸提法,该法操作简单,但提取时间长、提取率低。酶具有水解纤维素、原果胶和糖蛋白的作用,酶的高效性能够节约提取能源与时间,酶的专一性使得到的产物稳定,纯度、活性高^[5];超声波是一种弹性波,产生并传递强大的能量,能使物质中分子加速运动,有利于植物细胞中的有效成分转移、扩散及提取^[6]。本实验采用超声波协同复合酶法提取桑黄多糖,达到提高多糖提取率的目的。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

桑黄子实体由浙江省森林资源生物与化学利用重点实验室人工培育,菌种为桑黄纤孔菌,2015年5月采自浙江省淳安县,采用液氮法保存;蛋白酶(酶活力 $8\times 10^4\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)、果胶酶(酶活力 $9\times 10^4\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)、纤维素酶(酶活力 $2.5\times 10^4\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)均购自上海伯奥生物科技有限公司;苯酚、无水乙醇、氯仿、正丁醇均为国产分析醇,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

R-201 旋转蒸发器,上海申胜生物技术有限公司;20B 型中药粉碎机,南京邦斯特制药设备有限公司;JY92-II DN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;DKZ-2 型电热恒温振荡水槽,上海福玛实验设备有限公司;PL602-S 电子天平,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;UV-2600 紫外分光光度计,日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 桑黄子实体多糖的提取 取干燥的桑黄子实体,用20B型中药粉碎机粉碎成40目,用95%乙醇浸提12h,抽滤,取滤渣风干粉碎备用。称取1g预处理子实体粉,按液料比40:1(mL:g)加水混匀,用柠檬酸调节pH值,根据各种生物酶的最佳酶活作用条件,在前期预实验的基础上,纤维素酶、果胶酶、蛋白酶按2:1:1组成复合酶,添加量为2%,温度50℃,pH6.5,在水溶液中酶解1h,然后在一定液料比、超声功率、超声时间下利用JY92-II DN 超声波细胞粉碎机进行提取,3000 r·min⁻¹离心10 min,上清液用乙醇醇沉4 h后3000 r·min⁻¹离心5 min,沉淀溶解后测定。

1.2.2 响应面法分析实验 选择超声功率、液料比、超声时间3个因素所确定的水平范围,运用Box-Behnken中心组合试验设计原理,采用3因素3水平的响应面设计,利用Design Expert 8.05 软件对实验数据进行回归分析。自变量的试验水平分别以-1,0,1进行编码,试验因素及水平设计见表1。

表 1 响应面分析因子及水平			
Table 1 Factors and levels of response surface analysis			
因素	水平		
	-1	0	1
超声功率 X_1/W	300	350	400
液料比 $X_2/(\text{mL:g})$	20	30	40
超声时间 X_3/min	25	35	45

1.3 分析方法

1.3.1 桑黄多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸比色法^[7]。

1.3.2 多糖得率计算

多糖得率 (Y) /% = 多糖含量 × 稀释体积样品干质量 × 100

1.3.3 实验数据分析 用Design Expert 8.05 进行数据分析和处理。

2 结果与分析

2.1 响应面分析方案及结果

根据Box-Behnken中心组合试验设计原理,共有17个试验点,其中12个为析因点,5个零点试验用以估计试验误差。以多糖得率为响应值,试验方案及结果见表2。

表 2 响应面试验设计方案及试验结果
Table 2 Design and results by RSM

试验号	X_1/W	$X_2/(\text{mL:g})$	X_3/min	Y/%	
				实测值	预测值
BOX-1	0	-1	-1	1.66±0.032	1.57
BOX-2	0	0	0	3.58±0.025	3.37
BOX-3	-1	-1	0	1.81±0.021	1.75
BOX-4	1	0	1	2.62±0.019	2.47
BOX-5	0	-1	1	2.10±0.022	2.07
BOX-6	0	1	-1	2.96±0.021	2.98
BOX-7	0	0	0	3.26±0.031	3.37
BOX-8	0	1	1	1.44±0.018	1.54
BOX-9	-1	0	1	1.42±0.026	1.51
BOX-10	-1	1	0	2.45±0.022	2.27
BOX-11	0	0	0	3.42±0.032	3.37
BOX-12	1	-1	0	2.16±0.017	2.34
BOX-13	-1	0	-1	2.27±0.021	2.43
BOX-14	1	0	-1	2.58±0.018	2.49
BOX-15	1	1	0	2.64±0.024	2.70
BOX-16	0	0	0	3.28±0.030	3.37
BOX-17	0	0	0	3.31±0.022	3.37

2.2 回归模型建立及方差分析

用 Design Expert 8.05 对表 2 实验数据进行分析^[8]，获得多糖得率对超声功率、液料比和超声时间的多元二次回归方程：

$$Y = 3.37 + 0.26X_1 + 0.22X_2 - 0.24X_3 - 0.040X_1X_2 + 0.22X_1X_3 - 0.49X_2X_3 - 0.46X_1X_1 - 0.65X_2X_2 - 0.69X_3X_3$$

由表 3 可知，以多糖得率为目标函数的回归方程的回归效果达到极显著水平， P 值均 $< 0.000\ 1$ ；模型的决定系数 $R^2 = 0.971\ 5$ ，说明模型与实际实验拟合较好；校正决定系数 $\text{Adj}R^2 = 0.934\ 8$ ，说明该模型能解释 97.15% 响应值的变化；模型的失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率，表 3 中模型失拟项的 P 值为 0.166 3，大于 0.05，表明模型的失拟项不显著；根据表 3 的显著性分析结果，各因素的一次项、二次项以及 X_1X_3 、 X_2X_3 的交互项对多糖得率的影响均呈显著 ($P < 0.05$) 影响。分析表明这个模型建立的回归方程能运用于超声波协同复合酶法提取桑黄子实体多糖提取条件优化的理论预测。

表 3 回归模型方差分析
Table 3 ANOVA of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	7.69	9	0.85	26.48	0.000 1**
X_1	0.52	1	0.52	16.26	0.005 0**
X_2	0.39	1	0.39	12.01	0.010 5*
X_3	0.45	1	0.45	13.82	0.007 5**
X_1X_2	0.01	1	0.01	0.20	0.669 4
X_1X_3	0.20	1	0.20	6.22	0.041 3*
X_2X_3	0.95	1	0.95	29.54	0.001 0**
X_1X_1	0.90	1	0.90	27.92	0.001 1**
X_2X_2	1.76	1	1.76	54.55	0.000 2**
X_3X_3	1.98	1	1.98	61.51	0.000 1**
残差	0.23	7	0.03		
失拟项	0.15	3	0.05	2.88	0.166 3
纯误差	0.07	4	0.02		
总离差	7.91	16			

$R^2=0.971\ 5$; $\text{Adj}R^2=0.934\ 8$

注：*表示差异显著 ($P < 0.05$)；**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.3 响应面图形分析

分别将模型中的超声功率、液料比及超声时间的其中一个因素固定在 0 水平，得到另外两个因素的交互影

响结果，二次回归方程的响应面及其等高线如图 1，图 2，图 3 所示，各个因素及其相互间的交互作用对响应值的影响结果通过该组图可以直观地反映出来。极值条件应该在等高线的圆心处。由几组图可以看出，影响桑黄子实体多糖提取得率的最显著因素为超声功率（ X_1 ），表现为响应面变化弧度较大。超声时间（ X_3 ）和液料比（ X_2 ）响应面弧度变化平缓，说明对响应值影响相对较小。

此外，等高线的形状可反映出交互效应的强弱，椭圆形表示二因素交互作用显著，而圆形则与之相反^[9]。从图 1 至图 3 可以看出， X_2 与 X_3 ， X_1 与 X_3 之间交互作用显著。

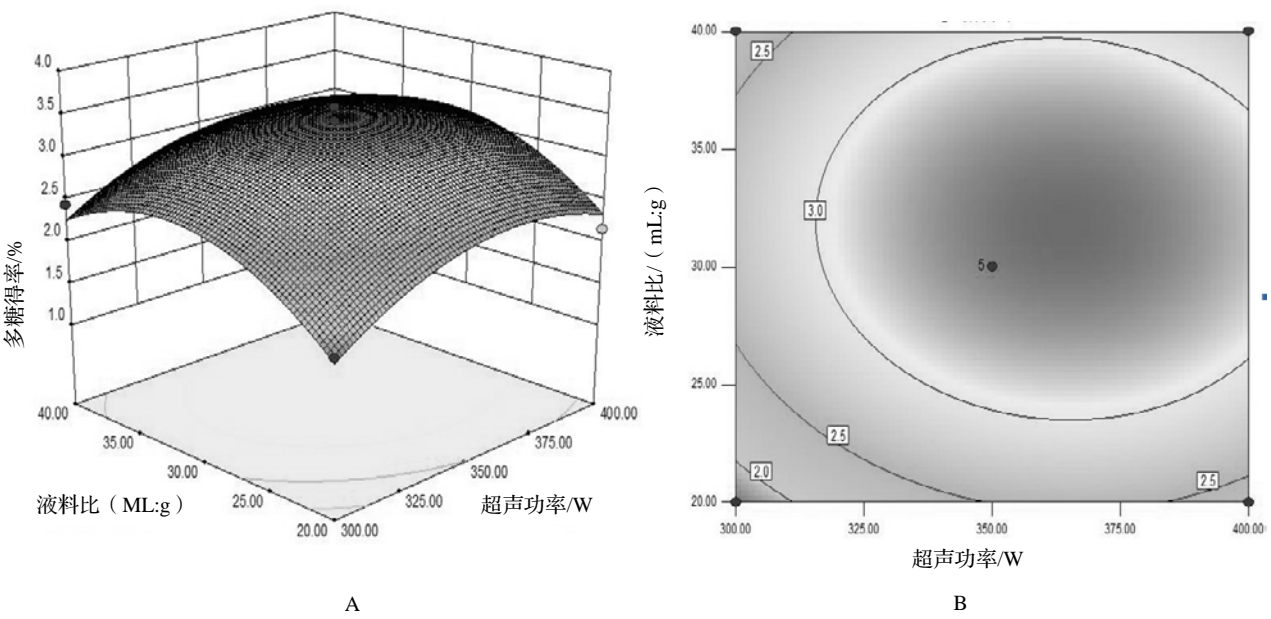


图 1 超声功率和液料比交互影响多糖得率的曲面图（A）和等高线图（B）

Figure 1 Surface diagram and contour of polysaccharide yield under interaction of ultrasonic power and liquid/ material ratio

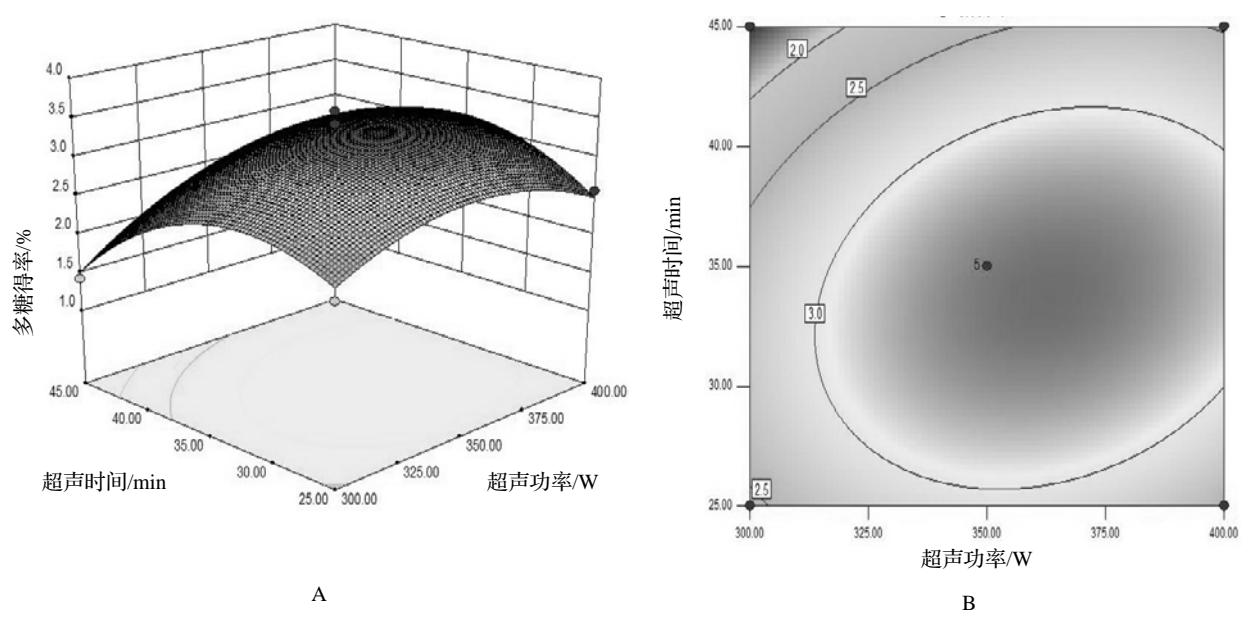


图 2 超声功率和超声时间交互影响多糖得率的曲面图（A）和等高线图（B）

Figure 2 Surface diagram and contour of polysaccharide yield under interaction of ultrasonic power and treatment time

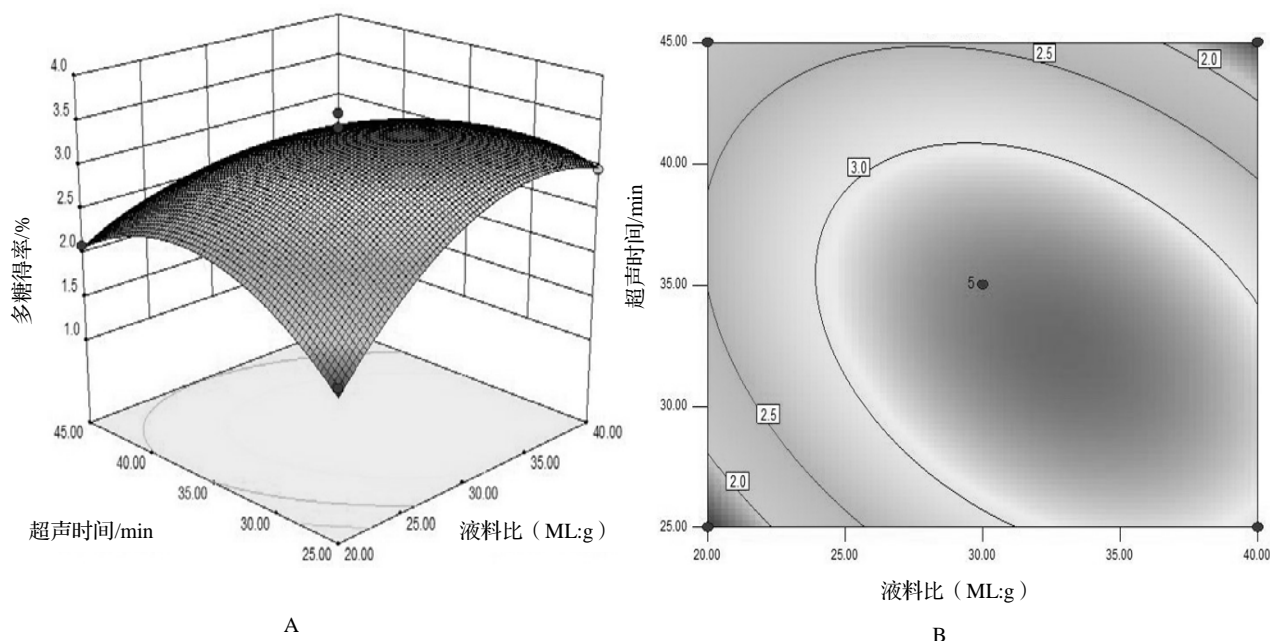


图 3 液料比和超声时间交互影响多糖得率的曲面图 (A) 和等高线图 (B)

Figure 3 Surface diagram and contour of polysaccharide yield under interaction of liquid/ material ratio and ultrasonic treatment time

2.4 验证实验

根据 Box-Behnken 试验所得的结果和二次多项回归方程, 利用 Design Expert 8.05 分析, 得到最佳提取条件为: 超声功率 360.6 W, 液料比 32.5:1, 超声时间 32.7 min, 多糖得率理论值可达 3.46%。

为检验模型预测值与实际实验值之间的相关性, 即检验响应面优化模型的可靠性, 对桑黄子实体中多糖提取得率进行实验验证。实验中超声功率、液料比和超声时间的优化值分别为 360.6 W, 32.5:1, 32.7 min, 三次平行实验, 测得多糖得率分别为 3.29%, 3.35%, 3.28%, 实际多糖得率平均值为 3.31%, 达到了回归模型预测理论值的 95.7%, 实验结果与模型符合良好, 说明该模型能较好地模拟和预测桑黄子实体多糖得率。

3 结论

本实验针对桑黄子实体组织结构木质化程度高, 传统的热水浸提法多糖得率普遍较低的情况, 通过集成运用生物酶法和超声波法, 先采用纤维素酶、果胶酶、蛋白酶按 2:1:1 组成复合酶对桑黄子实体进行酶解处理, 添加量为 2%, 温度 50℃, pH 6.5, 在水溶液中酶解 1 h。进而对工艺中超声波功率、超声时间、液料比等参数条件进行了实验设计, 根据 Box-Behnken 中心组合实验设计及三因素三水平的响应面分析, 通过二次多项回归模型进行方差分析和回归拟合, 预测了桑黄子实体多糖的最佳提取工艺条件为: 超声功率 360.6 W, 液料比 32.5:1, 超声时间 32.7 min, 多糖得率理论值可达 3.46%。验证实验中多糖得率 3.31%, 与预测值十分接近, 证明了该实验方法的稳定性。

参考文献:

- [1] 吴声华, 黄冠中, 陈愉萍, 等. 桑黄的分类及开发前景[J]. 菌物研究, 2016, 14 (4): 187–200.
- [2] Yan J K, Wang Y Y, Ma H L, *et al.* Ultrasonic effects on the degradation kinetics, preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia[J]. Carbohydr Polym, 2016, 29, 251–257.
- [3] Zhang Z F, Lu G Y, Song T T, *et al.* Comparison of the preliminary characterizations and antioxidant properties of polysaccharides obtained from *Phellinus baumii* growth on different culture substrates [J]. Carbohydr Polym, 2015, 397–399.
- [4] Kim G Y, Kim S H, Hwang S Y, *et al.* Oral administration of proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* in the prevention and treatment of

- collagen-induced arthritis in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26 (6) : 823 – 831.
- [5] 王宏伟, 崔崇土. 南瓜多糖复合酶法提取及纯化的研究[J]. 食品科学, 2007, 28 (8) : 247 – 249.
- [6] 赵玉红, 王静, 金秀明. 超声波辅助酶法提取榛子壳色素工艺条件的研究[J]. 中国调味品, 2010, 35 (4) : 110 – 114.
- [7] 徐志祥, 李刚, 李宝建. 苯酚 – 硫酸法测定灵芝多糖含量的条件研究[J]. 食用菌, 2000, 22 (3) : 6 – 7.
- [8] 张成军. 实验设计与数据处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [9] Jin Q L, Zhang Z F, Lu G Y, *et al*. Antioxidant and DNA damage protecting potentials of polysaccharide extracted from *Phellinus baumii* using a delignification method[J]. Carbohydr Polym, 2016, 152, 575 – 582.