

# 白玉菇多糖提取方法的比较和优化

郭永月,陶明煊,赵云霞,丁伶俐

(南京师范大学金陵女子学院,江苏 南京 210097)

[摘要] 优选白玉菇多糖的提取工艺.采用热水浸提法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法和碱提法 4 种方法提取白玉菇多糖,并采用响应面法优化超声波辅助提取法.热水浸提法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法和碱提法提取多糖得率分别为 2.90%、5.48%、4.86%、4.71%.超声波辅助提取法提取白玉菇多糖的得率与其他 3 种方法比较有显著差异.响应面法优化超声波辅助提取法的最优条件为:液料比 23:1,超声时间 28 min(300 W),在 92 ℃ 下热水浸提 2 h,重复 3 次,测定白玉菇多糖的得率为 6.03%.超声波辅助提取法可以显著提高白玉菇多糖得率.

[关键词] 白玉菇,多糖提取,超声波,微波,碱提,响应面

[中图分类号] R284.2 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)03-0087-06

## Comparison and Optimization Among Extraction Technologies of Polysaccharide From *Pleurotus Nebrodensis*

Guo Yongyue, Tao Mingxuan, Zhao Yunxia, Ding Lingli

(Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** The purpose of the experiment is to choose the best extraction technology of polysaccharide from *Pleurotus nebrodensis*. The *Pleurotus nebrodensis* was used as the raw material for extracting polysaccharide by means of hot water extraction, ultrasonic-assisted extraction, microwave-assisted extraction, alkali extraction. A central composite design followed by response surface analysis was carried out to optimize the ultrasonic-assisted extraction parameters. The yields of the four extraction technologies were 2.9%, 5.48%, 4.86% and 4.71%. The results of determination of polysaccharide content showed that ultrasonic-assisted extraction had significant differences in the four extraction technologies. The optimal ultrasonic-assisted extraction conditions were 28 min at ultrasonic power 300 W with a water-material ratio of 23:1 and three times repeated extractions at 92 ℃ for 2 h each time, which yielded an extraction yield of 6.03%. The ultrasonic-assisted extraction could significantly improve the yield of polysaccharide from *Pleurotus nebrodensis*.

**Key words:** *Pleurotus nebrodensis*, polysaccharides extraction, ultrasound, microwave, alkali extraction, response surface methodology

白玉菇(*Pleurotus nebrodensis*)又名白色蟹味菇、白色真姬菇、白玉覃,在日本则称之为“御菇”或“御茸”.白玉菇是真姬菇的白色品系,它的系统分类与真姬菇一样,属于担子菌门(Basidiomycota)、担子菌纲(Basidiomycetes)、伞菌目(Agaricales)、白蘑科(Tricholomataceae)、玉蕈属(*Hypsizygus*)<sup>[1]</sup>.其菇体洁白如玉,质地细腻,口感特佳.白玉菇营养丰富,高蛋白、低脂肪、富含矿物质,其多糖含量高达 7.5%,比其他药用真菌如猴头菇、猪苓等要高很多<sup>[2,3]</sup>.随着食用菌多糖在抗肿瘤、降血压、清除自由基、保肝解毒等方面显示的巨大药用价值和潜力,提取利用食用菌多糖已成为一个研究热点,目前关于白玉菇多糖的提取方法研究较少,以水提方法为主<sup>[4,5]</sup>.而白玉菇多糖主要存在于坚硬的细胞壁中,采用单纯热水浸提时间长、得率低.碱液或酸液提取法可以提高多糖提取的得率,但有可能会破坏多糖的结构.目前,较新型的多糖提取技术如微波法、超声波法可以使样品瞬时产生大量热能,使细胞破裂,细胞壁内物质更易渗出,从而提高提取效率<sup>[6-8]</sup>.

收稿日期:2012-10-19.

基金项目:江苏省高校自然科学基金基础研究项目(10KJD550003)、江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX11\_0895).

通讯联系人:陶明煊,副教授,研究方向:生物活性物质与保健功能因子. E-mail:45017@njnu.edu.cn

本实验分别采用微波、超声波技术辅助热水提取法提取白玉菇多糖,并与传统的热水浸提法、碱液提取法进行了对比. 研究 4 种不同提取方法对白玉菇多糖得率的影响,并通过响应面法确定了超声波辅助提取白玉菇多糖的最佳条件,为高效、经济地获得白玉菇多糖提供了新途径.

# 1 材料与方法

## 1.1 材料与试剂

本实验所用白玉菇购于南京市上海路菜市场.  
葡萄糖(105 ℃干燥至恒重)、苯酚、浓硫酸、氢氧化钠、95%乙醇,均为国产分析纯,购自上海久亿化学试剂有限公司南京分公司.

## 1.2 仪器与设备

FM100 高速万能粉碎机购自天津太斯特仪器有限公司;DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱购自上海精宏实验设备有限公司;HH-6 数显恒温水浴锅购自常州国华电器有限公司;RE-52A 旋转蒸发器购自上海亚荣生化仪器厂;LD5-10 低速离心机购自北京医用离心机厂;JA5003N 电子天平购自上海精密科学仪器有限公司;KQ-300B 超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司;VIP271 微波炉购自顺德惠尔浦蚬华微波制品有限公司.

## 1.3 方法

### 1.3.1 热水浸提法

新鲜的白玉菇洗净后,60 ℃低温烘干,粉碎后过 100 目筛. 精确称量 5 g,按液料比 20:1 加入蒸馏水,在 90 ℃恒温水浴中浸提 2 h,抽滤,滤渣反复提取 2 次,合并滤液. 滤液旋转蒸发浓缩至原体积的 1/4 后,加入 95%乙醇沉淀多糖,置于 4 ℃冰箱过夜,离心,取沉淀. 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤 2 次,低温干燥得白玉菇多糖<sup>[9]</sup>. 平行实验 3 次,下同.

### 1.3.2 超声波辅助提取法

精确称取白玉菇粉末 5 g,按液料比 20:1 加入蒸馏水,放入超声波清洗器中,功率 300 W,20 min,然后放入 90 ℃恒温水浴中浸提 2 h,按 1.3.1 中的方法(抽滤、浓缩、醇沉、洗涤、干燥)操作得白玉菇多糖.

### 1.3.3 微波辅助提取法

精确称取白玉菇粉末 5 g,按液料比 20:1 加入蒸馏水,放入微波炉中,功率 300 W,20 min,然后放入 90 ℃恒温水浴中浸提 2 h,按 1.3.1 中的方法(抽滤、浓缩、醇沉、洗涤、干燥)操作得白玉菇粗多糖.

### 1.3.4 碱液提取法

精确称取白玉菇粉末 5 g,按液料比 20:1 加入 0.75 mol/L NaOH 溶液,然后放入 90 ℃恒温水浴中浸提 2 h,按 1.3.1 中的方法(抽滤、浓缩、醇沉、洗涤、干燥)操作得白玉菇多糖.

### 1.3.5 多糖含量的测定

#### 1.3.5.1 标准曲线的绘制

白玉菇多糖含量测定采用苯酚-硫酸法<sup>[10]</sup>. 准确称取 105 ℃烘干至恒重的标准葡萄糖 10 mg,以蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶中并摇匀,分别取 0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1 mL 葡萄糖标准溶液,分别加蒸馏水补至 1.0 mL,加 5% 苯酚溶液 2.5 mL 混匀,迅速加入 5.0 mL 浓硫酸混匀,沸水浴 15 min. 在 490 nm 处测定吸光度. 以葡萄糖质量浓度( $x$ )为横坐标、吸光度( $A$ )为纵坐标绘制标准曲线.

#### 1.3.5.2 样品多糖浓度的测定

分别精确称取 4 种方法提取的白玉菇多糖 100 mg,以蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶中,摇匀. 吸取该溶液 10 mL 于 100 mL 容量瓶中,蒸馏水定容,摇匀,即得样品待测液.

分别吸取上述待测液 1.0 mL,按 1.3.5.1 中苯酚-硫酸法进行操作,测定样品在 490 nm 处的吸光度值. 将测定的吸光度值代入回归方程计算出样品液中的多糖浓度.

### 1.3.6 白玉菇多糖得率的计算

$$\text{白玉菇多糖得率} = \frac{\text{多糖浓度} \times \text{多糖体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{白玉菇干重}} \times 100\%.$$

4 种方法得到的多糖得率用 DPS 软件 V 9.50 分析<sup>[11]</sup>.

1.3.7 响应面法优化白玉菇多糖提取工艺

在4种方法的基础上,超声波辅助法提取多糖的得率最高,与其他3个方法比较有显著差异.应用Design Expert 7.0 软件<sup>[12]</sup>,根据Box-Beknhen 中心组合实验设计原理,以多糖得率 $Y(\%)$ 为响应值,设计三因素三水平响应面分析实验,优化白玉菇多糖的提取条件.实验因素及水平见表1.

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

得到的标准曲线回归方程为: $A=0.005\ 1x+0.012\ 4$ , $r^2=0.997\ 5$ ,表明葡萄糖浓度在20 mg/L ~ 100 mg/L 内,吸光度与葡萄糖浓度有良好的线性关系.

2.2 4种方法的多糖得率

由表2 可以看出,经超声波和微波强化热水浸提后,白玉菇多糖的得率明显提高.超声波辅助提取的多糖得率最高,与其他3 种方法相比有显著区别;微波辅助提取法提取白玉菇多糖得率也较高,但是与超声波辅助提取相比,得率没有超声波辅助提取的高,有显著差异;热水浸提的方法得率较低,但是比较温和,可以保持多糖的结构和生物活性<sup>[13]</sup>;而碱液提取的多糖虽然得率较高,但是碱液提取的多糖黏度较大,且容易破坏多糖的旋光结构,所得的提取物中成分较复杂,多糖在一定程度上易被水解,碱液提取法的实用性需要进一步研究<sup>[14]</sup>. 综上,超声波辅助提取法最适合白玉菇多糖的提取.

表 1 响应面分析因子及水平

Table 1 Factors and levels of the response surface			
水平	因素		
	超声时间 $A/\text{min}$	液料比 $B$	浸提温度 $C/^{\circ}\text{C}$
-1	10	10:1	80
0	20	20:1	90
1	30	30:1	100

表 2 4种方法提取多糖得率

Table 2 The yield of polysaccharides of four methods			
提取方法	多糖得率/(%)	5%显著水平	1%极显著水平
热水浸提	2.90±0.62	$c$	$C$
超声波辅助提取	5.48±0.78	$a$	$A$
微波辅助提取	4.86±0.34	$b$	$B$
碱液提取	4.71±0.58	$b$	$B$

注:不同字母表示差异显著.

2.3 响应面法优化白玉菇多糖提取工艺

采用响应面法优化超声波辅助提取多糖的工艺,以超声时间( $A$ )、浸提温度( $B$ )、液料比( $C$ )为自变量,多糖得率为因变量( $Y$ ),设计17 个试验组及所得结果见表3,其中5 组中心实验,12 组分析实验.

表 3 Box-Behnken Design 设计方案及响应值

Table 3 Box-Behnken design and corresponding value				
实验编号	$A$ 超声时间/min	$B$ 液料比	$C$ 浸提温度/ $^{\circ}\text{C}$	$Y$ 多糖得率/%
1	0	0	0	5.883
2	1	-1	0	4.915
3	0	1	1	5.123
4	0	0	0	5.782
5	-1	0	1	4.762
6	1	0	1	5.356
7	0	0	0	5.963
8	0	0	0	5.982
9	1	1	0	5.845
10	0	1	-1	4.045
11	-1	-1	0	4.358
12	0	-1	-1	4.057
13	0	-1	1	4.378
14	1	0	-1	4.962
15	-1	1	0	4.489
16	0	0	0	5.881
17	-1	0	-1	4.253

2.3.1 回归方程的建立及显著性分析

设计按照 Design Expert 8.0 软件中的 Box-Behnken Design 模型对多糖得率( $Y$ )进行回归分析,建立二次回归模型. 回归方程为:

$Y=5.9+0.4 * A+0.22 * B+0.29 * C+0.2 * A * B-0.029 * A * C+0.19 * B * C-0.28 * A^2-0.71 * B^2-0.78 * C^2.$  (1)

对回归方程(1)进行方差分析,见表 4. 模型的  $P<0.0001$ ,说明此模型达到了极显著水平,模型的校正相关系数  $r^2=0.9861$ ,说明模型拟合程度好,有实际应用意义. 超声时间( $P<0.0001$ )对多糖得率有极显著影响,液料比( $P=0.0017<0.05$ )和浸提温度( $P=0.0004<0.05$ )对多糖得率都有显著影响,说明这 3 个因素对白玉菇多糖得率的影响是关键性的. 模型的修正相关系数  $R^2_{Adj}=0.9682$ ,说明此模型较好地反映了超声时间、浸提温度、液料比对白玉菇多糖得率的关系. 失拟项( $P=0.0822>0.05$ )不显著,说明其他因素对此模型的干扰不显著,模型选择合适.

表 4 回归模型的方差分析  
Table 4 Variance analysis for the regression model established

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	8.220 9	9	0.913 4	55.138 2	<0.000 1
A	1.292 8	1	1.292 8	78.040 4	<0.000 1
B	0.402 3	1	0.402 3	24.284 7	0.001 7
C	0.662 4	1	0.662 4	39.985 1	0.000 4
AB	0.159 6	1	0.159 6	9.634 1	0.017 2
AC	0.003 3	1	0.003 3	0.199 6	0.668 6
BC	0.143 3	1	0.143 3	8.647 9	0.021 7
A <sup>2</sup>	0.334 7	1	0.334 8	20.208 5	0.002 8
B <sup>2</sup>	2.149 4	1	2.149 4	129.744 2	<0.000 1
C <sup>2</sup>	2.581 3	1	2.581 3	155.815 1	<0.000 1
残差	0.116 0	7	0.016 6		
失拟项	0.090 7	3	0.030 2	4.7899	0.0822
纯误差	0.025 3	4	0.006 3		
总变异	8.336 8	16			
$R^2=0.9861$	$R^2_{Adj}=0.9682$	$C.V.=2.54$			

2.3.2 响应面分析与优化

采用响应面分析得到最优工艺,其编码坐标为(0.651,0.221,-0.055),对应的实际值为(28.06,22.97,92.05),此时可以得到白玉菇多糖的理论最大得率,为 6.123%. 图 1~图 3 为通过 Design-Expert 得到的响应面分析图,每个响应面分别代表着 2 个独立变量之间的相互作用,此时第三个变量保持在 0 水平.

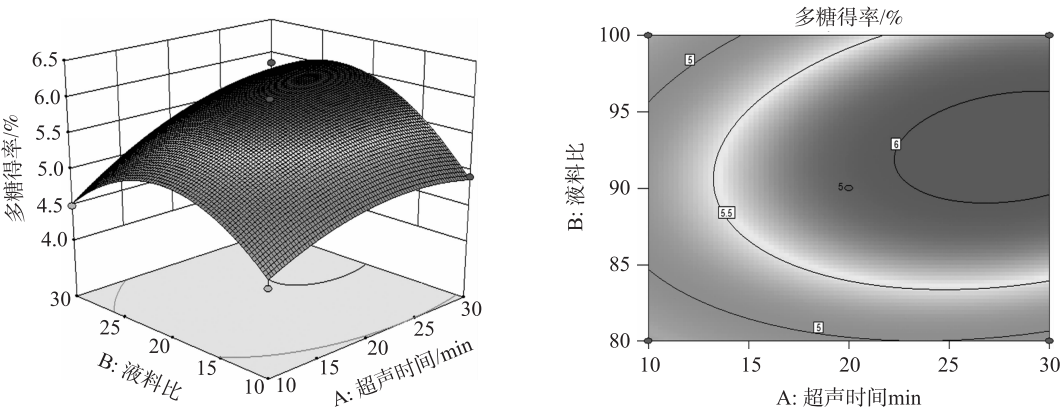


图 1 超声时间和液料比对多糖得率的交互作用  
Fig.1 Interactive effect of ultrasonic time and water-material ratio on the yield of polysaccharides

由图 1 可以看出,超声时间和液料比的交互影响曲面陡峭,说明两者交互作用显著. 随着超声时间的增加,多糖得率增加,而随着液料比的增加,多糖得率先增加,后降低. 从等高线图来看,沿超声时间轴的等高线明显多于沿液料比的,说明超声时间对多糖得率的影响比液料比的大;由图 2 可以看出,随着超声时

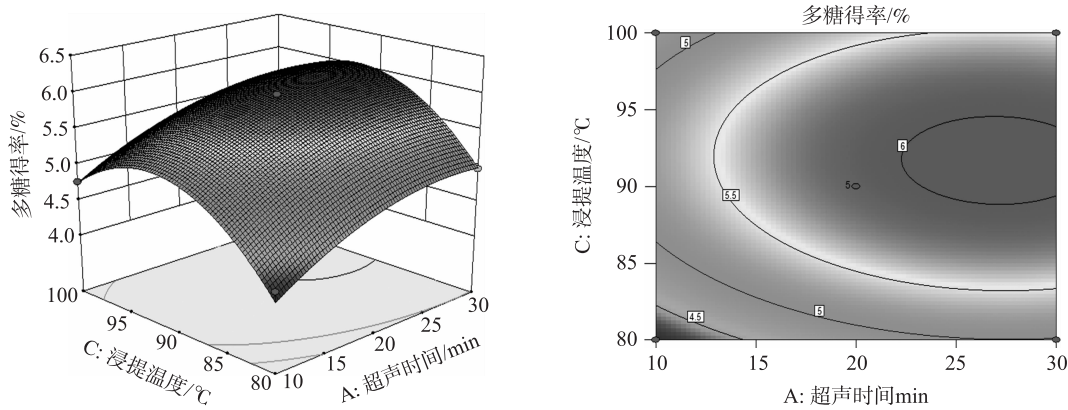


图2 超声时间和浸提温度对多糖得率的交互作用

Fig. 2 Interactive effect of ultrasonic time and extracting temperature on the yield of polysaccharides

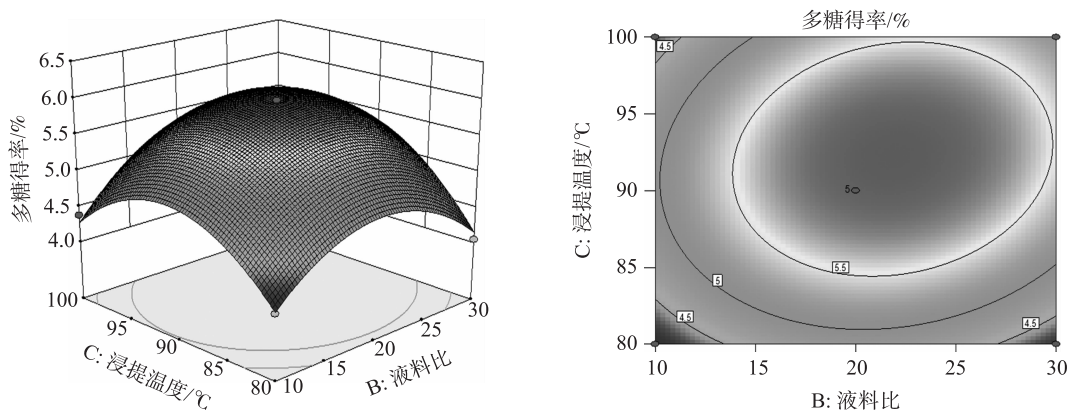


图3 液料比和浸提温度对多糖得率的交互作用

Fig. 3 Interactive effect of water-material ratio and extracting temperature on the yield of polysaccharides

间和温度的增加,多糖得率呈先上升后下降的趋势. 对应的等高线图呈椭圆形,说明两者也有交互作用;从图3可以看出,随着浸提温度和液料比的升高,多糖的得率都是先上升后下降,温度和液料比较低时,多糖得率都较低. 从等高线图上看,呈现椭圆型,等高线密集,说明两者的交互作用强烈.

2.3.3 优化与验证

为操作方便,将上述最佳条件优化为:超声时间 28 min,液料比 23:1,温度 92 ℃. 按此条件重复实验 3 次,所得多糖得率平均值为 6.03%,误差为 1.54%,实验结果与模拟方程有较高的一致性. 因此该方程充分验证了所建模型的正确性,说明响应面法适用于白玉菇多糖提取的回归分析和参数优化.

3 讨论

热水浸提法主要用于提取难溶于冷水和乙醇、易溶于热水的多糖,是最温和的方法,能够最大限度地保持多糖的结构和活性,但得率较低. 碱浸提法主要用于提取难溶于冷水、热水,可溶于碱的多糖,此类多糖主要是一些胶类,如木聚糖、半乳聚糖等,但易破坏多糖旋光结构,降低多糖分子质量,使多糖的抗肿瘤等生物活性大大降低<sup>[15]</sup>,因此,碱提法的实用性还需要考察. 微波辅助提取法是近年来新发展起来的提取方法,在微波作用下,样品短时间内便迅速生成大量的热能,促使细胞破裂,使细胞液溢出并扩散到溶剂中,有利于有效物质的渗出,但微波也有可能引起多糖结构的变化或引起生物活性的变化<sup>[16-18]</sup>. 超声波法是目前提取多糖的最快速经济的方法,超声波辐射导致植物细胞内的极性物质、尤其是水分子吸收电磁能产生大量的热量,使细胞内温度迅速上升,液态水汽化产生的压力将细胞膜和细胞壁冲破,形成微小的孔洞. 进一步加热,导致细胞内部和细胞壁水分减少,细胞收缩,表面出现裂纹. 孔洞和裂纹的存在使胞外溶剂容易进入细胞内,溶解并释放出胞内产物. 使用超声波技术可以缩短时间、降低能耗、提高收率和纯度、降低生产成本<sup>[19,20]</sup>. 但是超声时间过长,也有可能引起多糖的分解等变化,需要进一步的研究<sup>[21]</sup>.

本实验采用热水浸提法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法和碱提法提取白玉菇多糖的得率分别为 2.90%、5.48%、4.86%、4.71%。超声波辅助提取法提取白玉菇多糖的得率与其他 3 种方法比较有显著差异,超声波辅助提取法最有利于白玉菇多糖的提取。为便于操作,响应面法优化超声波辅助提取法的最优条件为:液料比 23:1、超声功率 300 W、超声时间 28 min、然后在 92 ℃下热水浸提 2 h,测定白玉菇多糖的得率为 6.03%。

# [ 参考文献 ]

- [1] 李挺,宋斌,林群英,等. 白玉菇的研究进展[J]. 贵州科学,2011,29(2):48-52.
- [2] Akira H,Seike G,Shozo Y,et al. Effects of strain and cultiration medium on the chemical composition of the taste components in fruit-body of *Hypizygyus maroreus*[J]. Food Chemistry,2004,84(2):265-270.
- [3] 王耀松,邢增涛,白冰,等. 白玉蕈营养成分的测定[J]. 西北农业学报,2006,15(5):222-224.
- [4] 周浩. 真姬菇多糖的提取和组分研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(30):14 879-14 880.
- [5] 董洪新,刘海新,徐志玲,等. 白灵菇子实体多糖提取工艺的研究[J]. 食用菌学报,2004,11(1):22-25.
- [6] 孟繁磊,陈瑞战,张敏,等. 刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2010,31(10):168-174.
- [7] Bhattacharya M,Basak T,Senagala R. A comprehensive theoretical analysis for the effect of microwave heating on the progress of a first order endothermic reaction[J]. Chemical Engineering Science,2011,66(23):5 832-5 851.
- [8] 邬方宁. 超声提取技术在现代中药中的应用[J]. 中草药,2007,38(2):315-316.
- [9] 姜华,蔡德华,张华卫. 真姬菇子实体粗多糖提取条件试验[J]. 食用菌,2007(3):55-56.
- [10] 黄德娟,徐晓辉. 生物化学实验教程[M]. 上海:华东理工大学出版社,2007:86-87.
- [11] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京:科学出版社,2002:25-109.
- [12] 刘玉芬,夏海涛,张丹妮,等. 马兰头多糖提取工艺的响应面法优化及不同部位多糖含量的测定[J]. 食品科学,2011,24(32):153-157.
- [13] 孙靖轩,王延锋,王金贺,等. 食用菌多糖提取技术研究概况[J]. 中国食用菌,2012,31(3):6-9.
- [14] 张一帆,张智,魏志艳,等. 四种方法提取灵芝粗多糖的得率比较试验[J]. 食用菌,2010(6):58-60.
- [15] 钟运翠,杨宏志,孙伟洁. 沙棘粗多糖的提取技术研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2008,20(1):74-77.
- [16] Wang J L, Zhang J, Wang X F. A comparison study on microwave asisted extraction of *Artemision sphaerocephala* polysaccharides with conventional method;Molecule structure and anxioxidant activities evaluation[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2009,45(5):483-492.
- [17] 于泐,李凤林. 微波辅助提取法提取金针菇多糖的工艺研究[J]. 吉林农业,2010(12):75-79.
- [18] 邓蓉,刘新. 微波辅助萃取在中药提取中的应用[J]. 中国医学理论与实践,2005,15(6):950-952.
- [19] 丁锐. 桑叶多糖的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(35):21 650-21 652.
- [20] 赵鹏,欧莉,张丽华,等. 超声辅助提取葛根多糖工艺研究[J]. 医学导报,2009,28(10):338-339.
- [21] Toma M,Vinatoru M,Paniwnyk L,et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction [J]. Ultrasonics Sonochemistry,2001(8):137-142.

[ 责任编辑:黄 敏 ]