

# 响应面法优化白背毛木耳子实体多糖的酶法提取工艺

黄艺宁<sup>1</sup>, 陈国平<sup>2</sup>, 柯丽娜<sup>3</sup>

(1.漳州职业技术学院, 福建 漳州 363000; 2.漳州市农业局种植业管理站, 福建 漳州 363000;  
3.漳州市农业科学研究所, 福建 漳州 363005)

**摘要:**应用响应面法优化酶法提取白背毛木耳子实体多糖的工艺条件。使用纤维素酶辅助进行白背毛木耳子实体多糖的提取,在单因素试验的基础上通过响应面设计构建了模型并确定酶用量、pH值、提取温度、提取时间等4个主要影响因素的最佳工艺参数。结果表明,最佳的工艺条件为:纤维素酶用量3 774 U/g、pH为4.9、提取温度50.2℃、提取时间135 min,在此条件下白背毛木耳子实体多糖的提取率为15.47%,与模型预测值15.52%的相对误差仅为0.323%。

**关键词:**白背毛木耳;多糖;酶提取;响应曲面法

**中图分类号:**S646.6;TS201.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2018)04-0006-05

## Optimization of Enzymatic Extraction of Polysaccharide from *Auricularia Polytricha* Using Response Surface Methodology

HUANG Yi-ning<sup>1</sup>, CHEN Guo-ping<sup>2</sup>, KE Li-na<sup>3</sup>

(1. Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou, Fujian 363000 China;  
2. Planting Management Station of Zhangzhou Agricultural Bureau, Zhangzhou, Fujian 363000 China;  
3. Zhangzhou Institute of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China)

**Abstract:** In this paper, the response surface methodology was used to optimize the enzymatic extraction of Polysaccharides from fruiting body of *Auricularia polytricha*. In order to extract the polysaccharides from fruiting body of *Auricularia polytricha* by Cellulase, the optimum process parameters of 4 main factors, such as the amount of enzyme, the pH value, the extraction temperature and the extraction time, were established on the basis of the response surface test through the single factor test. The results showed that the optimum technological conditions were as follows: the dosage of cellulase was 3 774 U/g, pH=4.9, the extraction temperature was 50.2℃, and the extraction time was 135min. Under this condition, the extraction rate of polysaccharide was 15.47%, and the relative error of the model predicted value 15.52% was only 0.323%.

**Keywords:** *Auricularia polytricha*; polysaccharide; enzyme extraction; response surface methodology

白背毛木耳是一种食药兼用的食用菌,素有“树上海蜃皮”之美称,它不仅营养丰富,且药用价值高,其多糖具有抗氧化<sup>[1]</sup>、抗肿瘤<sup>[2-3]</sup>等功能。白背毛木耳多糖的提取是其应用的基础,所以高效的提取技术是白背毛木耳研究热点之一。目前毛木耳子实体多糖提取的方法有热水浸提法、乙醇浸提法、超声波热水浸提法以及酸碱浸提法<sup>[4]</sup>,其它的方法则未见报道。酶法提取主要是通过破坏细胞壁结构后再进行提取,具有反应条件温和、选择性高的特点,且酶的专一性可以避免对底物物质的破坏<sup>[5]</sup>。目前酶法提取已经在研究和生产中被广泛

应用,使用酶法进行降解后提取能减少提取溶剂的用量、缩短提取时间以及提高提取率<sup>[6-8]</sup>。目前酶法提取作为一种高效安全的提取方式被运用于各类生物活性物质,且已经应用于多个菌类多糖的提取<sup>[9-11]</sup>,但至今未应用于白背毛木耳子实体多糖的提取。白背毛木耳子实体纤维含量高,胞内多糖不易溶出,以纤维素酶处理白背毛木耳子实体能降解毛木耳细胞壁,促进胞内的多糖溶出,能缩短提取时间和提高得率。本文通过对酶法提取工艺条件的摸索将提高多糖得率,为白背毛木耳多糖的综合利用提供理论基础。

收稿日期:2018-05-06

基金项目:福建省中青年教育科研项目(JAT171092)。

作者简介:黄艺宁(1979—),男,福建龙海人,讲师,硕士,研究方向:食品生物加工。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

白背毛木耳 43-28,由漳州市农业科学研究所提供。纤维素酶(20 000 U/g),食品级,南宁庞博生物工程有限公司;数显鼓风干燥箱 KZX -9070 MBE,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;高速多功能粉碎机 Q-250B,上海冰都电器有限公司;电子天平 BSA124S,赛多利斯科学仪器有限公司;JH 恒温水浴锅,上海佳航仪器仪表有限公司;紫外可见分光光度计 UV-1800PC-DS2,上海美谱达仪器有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 白背毛木耳多糖的提取

含水质量分数为 13%白背毛木耳粉碎过筛后,称 4 g 样品使用纤维素酶浸提,过滤,滤液用 sewage 法除蛋白,收集滤液进行多糖含量测定。

#### 1.2.2 多糖得率的计算<sup>[12]</sup>

多糖得率采用白背毛木耳干品中提取多糖总量的质量分数表示。采用苯酚-硫酸法测定总糖,采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖质量分数,具体算法如下:

$$\text{多糖得率} = \frac{0.9 \times (\text{总体质量浓度} - \text{还原糖质量浓度}) \times \text{提取液体积}}{\text{原料干质量}} \times 100\%$$

式中:0.9 为单糖折算为葡萄糖的换算系数。

#### 1.2.3 单因素分析

1、料液比对白背毛木耳子实体多糖得率的影响。在酶用量为 3 000 U/g、pH 值为 5.0、温度为 50 ℃、提取时间为 180 min 的条件下,考察料液比(g/mL)分别为 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 对白背毛木耳多糖得率的影响。

2、酶用量对白背毛木耳子实体多糖得率的影响。在料液比为 1 g:30 mL、pH 值为 5.0、温度为 50 ℃、提取时间为 180 min 的条件下,考察不同酶用量(1 000、2 000、3 000、4 000、5 000、6 000 U/g)对白背毛木耳多糖得率的影响。

3、pH 值对白背毛木耳子实体多糖得率的影响。在料液比为 1 g:30 mL、酶用量为 3 000 U/g、温度为 50 ℃、提取时间为 180 min 的条件下,考察不同 pH 值(3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)对白背毛木耳多糖得率的影响。

4、提取温度对白背毛木耳子实体多糖得率的影响。在料液比为 1 g:30 mL、酶用量为 3 000 U/g、pH 值为 5.0、提取时间为 180 min 的条件下,考察不同温度(0、45、50、55、60、65 ℃)对白背毛木耳多糖

得率的影响。

5、提取时间对白背毛木耳子实体多糖得率的影响。在料液比为 1g:30 mL、酶用量为 3 000 U/g、pH 值为 5.0、提取温度为 50 ℃的条件下,考察不同提取时间(30、60、90、120、150、180 min)对白背毛木耳多糖提取率的影响。

#### 1.2.4 响应曲面法优化酶法提取工艺

1、响应曲面法优化酶法提取工艺试验设计。在单因素试验的基础上,以酶用量、提取 pH、提取温度、提取时间 4 个因素为变量,以白背毛木耳子实体多糖的得率为响应值,采用 Box-Behnken 法对多糖的提取工艺进行优化,以达到最佳的提取效果。根据单因素试验结果制定因素组合设计编码水平,见表 1。

表 1 多糖得率 Box-Behnken 中心组合设计编码水平

编码水平	X1:酶用量/ (U·g <sup>-1</sup> )	X2:提取 pH	X3:提取温度/ ℃	X4:提取时间/ min
-1	2 000	4.5	45	90
0	3 000	5.0	50	120
1	4 000	5.5	55	150

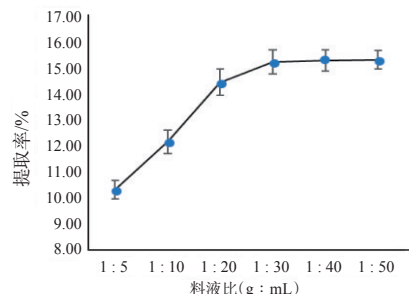
2、响应曲面法优化工艺参数验证。以优化后的最佳工艺条件进行平行提取 3 次,与模型预测值进行比较。将酶法提取工艺与微波辅助提取工艺<sup>[1]</sup>进行比较,评价该方法的优劣。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素分析

#### 2.1.1 料液比对白背毛木耳子实体多糖得率的影响

由图 1 可知,料液比大于 1 g:30 mL 时,白背毛木耳子实体多糖的得率随着提取溶剂的增加而显著增大。当料液比小于 1 g:30 mL 时,白背毛木耳子实体多糖的提取率并没有随着提取溶剂比例的增加而显著提升,这是由于在设定的条件下当料液为 1 g:30 mL 时多糖已经基本溶于溶剂中。为了减轻后续的浓缩步骤的工作量考虑,将提取时的料液比定为 1 g:30 mL。

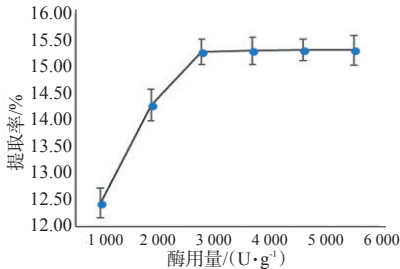


注:数据均以均数加减标准差表示,n=3。

图 1 料液比对多糖得率的影响

### 2.1.2 酶用量对白背毛木耳子实体多糖得率的影响

由图 2 可知,在设定的条件下,酶用量在小于 3 000 U/g 时,随着用量的增加得率有显著的提升。当大于 3 000 U/g 时,得率的提升不明显。这是因为在设定的条件下当酶用量达到 3 000 U/g 时已经能够使胞内的多糖完全溶出。因此,酶用量宜在 3 000 U/g。

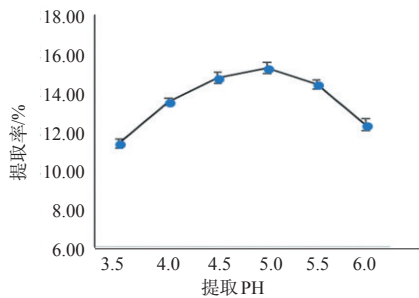


注:数据以均数加减标准差表示,n=3。

图 2 酶用量对多糖得率的影响

### 2.1.3 pH 值对白背毛木耳子实体多糖得率的影响

由图 3 可知,在设定的条件下,当 pH 值为 5.0 时得率最大。纤维素酶酶解需要适合的 pH 值,当大于或者小于最佳 pH 时得率随之减少。因此,提取时的 pH 值宜设定在 5。

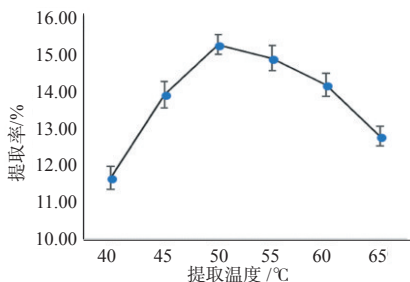


注:数据以均数加减标准差表示,n=3。

图 3 pH 值对多糖得率的影响

### 2.1.4 提取温度对白背毛木耳子实体多糖得率的影响

由图 4 可知,当提取温度低于 50 °C 时,随着温度的升高白背毛木耳子实体的得率也显著增加。而当温度超过 50 °C 时,多糖的得率随着温度的升高有所下降。这是由于过高的温度容易引起酶变性而使酶失活导致的。因此,提取温度选择在 50 °C 左右。

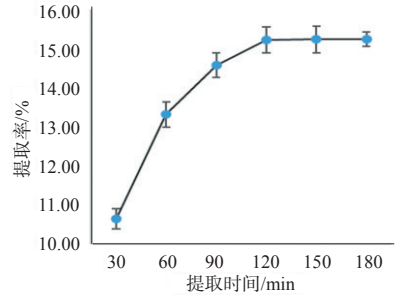


注:数据以均数加减标准差表示,n=3。

图 4 提取温度对多糖得率的影响

### 2.1.5 提取时间对白背毛木耳子实体多糖得率的影响

由图 5 可知,白背毛木耳多糖得率是随着提取时间的延长而提高。而提取时间在 30 ~ 120 min 内,提取率是随着时间的延长而显著提高。而提取时间大于 120 min 时,随着时间的延长,提取率略有提高。所以,提取时间宜选在 120 min 左右。



注:数据以均数加减标准差表示,n=3。

图 5 提取时间对多糖得率的影响

## 2.2 响应曲面法优化酶法提取工艺

### 2.2.1 响应曲面试验结果

根据试验设计,以白背毛木耳子实体多糖得率(Y)为响应值,酶用量(A)、pH(B)、提取温度(°C)、提取时间(D)为变量,经过 Design-Expert10 软件进行响应面分析,试验结果和分析如表 2、表 3 所示。

表 2 得率影响因素的 Box-Behnken 试验方案及结果

编号	酶用量/ (U·g <sup>-1</sup> )	pH	提取温度/ °C	提取时间/ min	提取率/ %
1	2 000	5.0	55	120	13.92
2	2 000	4.5	50	120	14.13
3	3 000	5.5	55	120	14.01
4	2 000	5.0	50	150	14.59
5	2 000	5.0	50	90	13.84
6	2 000	5.0	45	120	13.54
7	4 000	5.0	50	90	14.93
8	3 000	5.0	55	150	14.26
9	3 000	4.5	50	150	15.11
10	3 000	5.0	50	120	15.24
11	3 000	4.5	45	120	13.69
12	4 000	5.0	50	150	15.3
13	4 000	5.0	55	120	14.91
14	3 000	4.5	55	120	14.21
15	4 000	5.0	45	120	14.26
16	3 000	5.0	50	120	15.31
17	3 000	5.5	50	150	14.51
18	3 000	5.0	45	150	14.82
19	3 000	4.5	50	90	14.19
20	3 000	5.0	50	120	15.29
21	3 000	5.5	45	120	13.48
22	2 000	5.5	50	120	14.03

续表2

编号	酶用量/ (U·g <sup>-1</sup> )	pH	提取温度/ ℃	提取时间/ min	提取率/ %
23	4 000	5.5	50	120	14.72
24	3 000	5.0	50	120	15.16
25	3 000	5.0	50	120	15.22
26	3 000	5.0	45	90	12.96
27	3 000	5.5	50	90	13.98
28	3 000	5.0	55	90	14.11
29	4 000	4.5	50	120	14.98

表3 不同因素对多糖得率影响的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	11.30	14	0.81	56.21	< 0.000 1	**
A-酶用量	2.13	1	2.13	147.99	< 0.000 1	**
B-Ph	0.21	1	0.21	14.49	0.001 9	**
C-提取温度	0.59	1	0.59	41.37	< 0.000 1	**
D-提取时间	1.75	1	1.75	121.73	< 0.000 1	**
AB	6.40E-03	1	6.40E-03	0.45	0.515 3	
AC	0.018	1	0.018	1.27	0.278 9	
AD	0.036	1	0.036	2.51	0.135 2	
BC	2.50E-05	1	2.50E-05	1.74E-03	0.967 3	
BD	0.038	1	0.038	2.65	0.126	
CD	0.73	1	0.73	50.91	< 0.000 1	**
A <sup>2</sup>	0.40	1	0.4	27.84	0.000 1	**
B <sup>2</sup>	1.70	1	1.7	118.41	< 0.000 1	**
C <sup>2</sup>	4.92	1	4.92	342.48	< 0.000 1	**
D <sup>2</sup>	0.65	1	0.65	45.39	< 0.000 1	**
残差	0.20	14	0.014			
失拟项	0.19	10	0.019	5.3	0.061 2	
纯误差	0.014	4	3.53E-03			
总和	11.5	28				

注：“\*\*”表示极显著水平(P<0.01),“\*”表示显著水平(P<0.05)。

运用Design-Expert10软件对表2的试验结果进行拟合得到白背毛木耳子实体多糖得率影响因素的回归方程:提取率=15.24+0.42\*A-0.13\*B+0.22\*C+0.38\*D-0.040\*AB++0.068\*AC-0.095\*AD+0.00025\*BC-0.098\*BD-0.43\*CD-0.25\*A<sup>2</sup>-0.51\*B<sup>2</sup>-0.87\*C<sup>2</sup>-0.32\*D<sup>2</sup>。白背毛木耳子实体多糖得率二次多项回归模型方差分析结果见表3。

由表3的方差分析数据可知,应用Design-Expert10软件得到的数据模型是极显著(P<0.000 01),而失拟项不显著(P=0.0612>0.05),这说明本试验得到的数据模型的回归方程拟合度良好,试验结果可靠。

### 2.2.2 响应面分析

利用数据模型做的响应曲面可以反映因素或

因素之间的交互作用对白背毛木耳子实体多糖得率影响的强弱,响应曲面的陡峭程度越大,则对提取率的影响也越大。由图6可知,在响应面试验设计范围内,各个因素中酶解温度对白背毛木耳子实体多糖提取率的影响最大,提取时间的影响次之,酶用量影响第三,pH的影响均较小;交互作用中,pH值与提取温度的交互作用对白背毛木耳子实体多糖的提取率影响最大,提取时间与提取温度的交互作用的影响次之,pH值与提取时间的交互作用的影响最小,这与表3的方差分析结果一致。

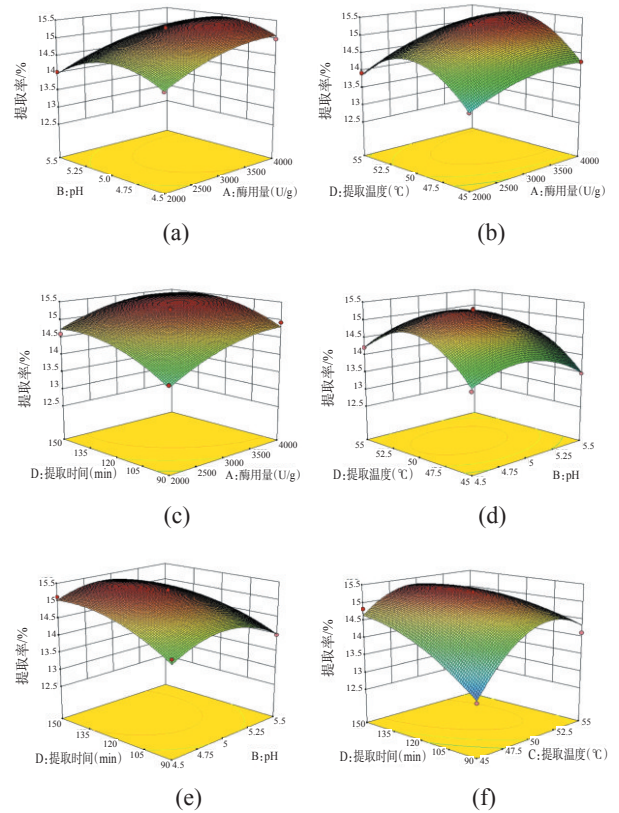


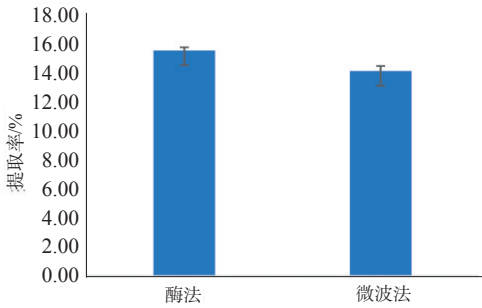
图6 基于响应曲面法不同因素对多糖提取率的影响

### 2.2.3 酶法提取白背毛木耳子实体多糖的最佳工艺

经过Design-Expert10软件分析,得到酶法提取白背毛木耳子实体多糖的最佳工艺条件为:纤维素酶3 774 U/g、pH值为4.9、提取温度50.2℃、提取时间135 min。在该工艺条件下白背毛木耳子实体多糖的理论得率为15.52%。这说明了利用Box-Behnken建立的模型是合理的。采用响应面分析得到的最佳工艺条件进行白背毛木耳子实体多糖的提取,提取率为15.47%,与模型预测的理论值15.52%仅有0.323%的误差。这说明该模型得到的结果是可靠的。

### 2.2.4 响应曲面法优化工艺参数验证

如图7所示,用得到的酶法提取的最佳工艺



注:数据以均数加减标准差表示,n=3。

图7 酶法与微波法提取多糖对比

条件进行提取的得率为 15.47%,比微波辅助提取白背毛木耳多糖<sup>[1]</sup>的得率 14.03% 要高 10.26%。这说明用酶法提取白背毛木耳子实体多糖能提高多糖的得率。

### 3 讨论与结论

通过响应面法对酶法提取白背毛木耳子实体多糖进行建模分析,优化酶法提取白背毛木耳子实体多糖的工艺提取条件。结果表明:在纤维素酶用量 3 774 U/g、提取温度 50.2 ℃、pH=4.9、提取时间 135 min 的条件下,白背毛木耳子实体多糖的得率为 15.47%,与模型预测值 15.52% 的相对误差仅为 0.323%。通过与微波辅助提取法的对比,得率提高了 10.26%。在对比的过程中,使用微波辅助法的多糖提取率与杨申明<sup>[1]</sup>的提取率有较大的差别,这可能是由于白背毛木耳品种不一样的原因。在本研究中虽然确定了用酶法提取白背毛木耳子实体多糖的最佳工艺,获得了较高的得率,但对于提取到的多糖功能还未进行验证,这需要后续进一步的深入工作。

#### 参考文献:

[1] 杨申明,王振吉,管春平等.微波辅助提取白背毛木耳多糖的工艺优化及抗氧化性研究[J].江苏农业科学,2016(8):357-359.

[2] 陈慧.白背毛木耳多糖纯化、修饰及抗肿瘤活性研究[D].徐州:中国矿业大学,2016.

[3] 张丹凤,陈国平,潘裕添,等.白背毛木耳胞内多糖抗肿瘤作用的研究[J].食用菌,2014(3):75-77.

[4] 陈诚,黄文丽,李小林,等.毛木耳多糖提取研究进展[J].食品与发酵科技,2014(4):89-92.

[5] 乔宇,游江,汪兰,等.纤维素酶法提取山药多糖的工艺优化[J].湖北农业科学,2014(20):4926-4930.

[6] 程轩轩,郭楚楚,周凤燕.响应面法优化广金钱草中总黄酮的酶法提取工艺[J].华西药学杂志,2015,30(1):70-73.

[7] 何艾,李维国,窦志浩.纤维素酶辅助提取沉香叶黄酮及其抗氧化活性测定[J].食品科技,2015,40(5):233-237.

[8] 王晓林,钟方丽,薛健飞.酶法提取刺玫果总黄酮工艺研究[J].北方园艺,2015,39(4):136-139.

[9] 凡军民,谢春芹,贾君,等.纤维素酶法提取杏鲍菇多糖工艺优化[J].食品科技,2013(3):192-196.

[10] 邹东恢,梁敏,杨勇,等.香菇多糖复合酶法提取及其脱色工艺优化[J].农业机械学报,2009(3):135-138+134.

[11] 张立娟,于国萍.黑木耳多糖酶法提取条件的优化及脱蛋白工艺的研究[J].食品工业科技,2005(5):109-111.

[12] 何传波,魏好程,熊何健,等.枇杷叶多糖酶法提取工艺优化及其离子交换层析纯化[J].食品科学,2016,37(8):45-50.

(责任编辑:曲继鹏)