

文章编号:1001-6880(2015)1-0120-07

# 金针菇菌渣中多糖的微波辅助提取工艺及其抗氧化活性研究

张斌<sup>1</sup>, 刘莹<sup>1</sup>, 王益<sup>1</sup>, 王延锋<sup>2</sup>, 黄文<sup>1\*</sup><sup>1</sup>华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070; <sup>2</sup>黑龙江省农业科学院牡丹江分院, 牡丹江 157041

**摘要:**本研究以金针菇菌渣为原料,在单因素实验的基础上,以微波时间、微波功率和料液比为变量,以金针菇菌渣中多糖得率为响应值,应用响应面分析法,确定了提取工艺的最佳参数:微波时间 115 s、微波功率 640 W、料液比 1:26。在此条件下金针菇菌渣中多糖得率为 7.53%,比热水浸提的多糖得率提高了 15.14%。提取得到的多糖具有一定还原力,且对 ABTS<sup>+</sup>自由基和羟基自由基均有一定的清除作用,其 IC<sub>50</sub> 值分别为 8.40、1.01 mg/mL 和 1.95 mg/mL,证明金针菇菌渣中多糖具有一定的抗氧化活性。

**关键词:**金针菇菌渣; 多糖; 响应面优化; 微波辅助; 抗氧化活性

中图分类号:Q539

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.025

## Microwave-assisted Extraction and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Flammulina velutipes* Residue

ZHANG Bin<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>, WANG Yan-feng<sup>2</sup>, HUANG Wen<sup>1\*</sup><sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;<sup>2</sup>Mudanjiang Branch of Heilongjiang Provincial Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang 157041, China

**Abstract:** Response surface methodology was used to optimize the microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Flammulina velutipes* residue. A regression model describing the yield of polysaccharides with respect to microwave time, microwave power and solid-to-liquid ratio was established. The optimal conditions were determined to be: microwave time of 115 s, microwave power of 640 W and solid-to-liquid ratio of 1:26 (g/mL). Under these conditions, the actual extraction yield of polysaccharide was 7.53%, which was close to the predicted value (7.65%). Antioxidant experiments of the polysaccharides *in vitro* including reducing power (IC<sub>50</sub> value of 8.40 mg/mL), ABTS radical scavenging activity (IC<sub>50</sub> value of 1.01 mg/mL), and ·OH radical scavenging activity (IC<sub>50</sub> value of 1.95 mg/mL) were evaluated. The results suggested that the polysaccharides from *F. velutipes* residue had good antioxidant activity.

**Key words:** *Flammulina velutipes* Residue; polysaccharides; response surface method; microwave-assisted; antioxidant activity

金针菇(*Flammulina velutipes*)隶属真菌门,层菌纲,伞菌目,口蘑科,金钱菌属,是一种药食两用菌。金针菇具有免疫调节和抗肿瘤等活性,被认为具有很高的药用价值,多糖为其中的一种重要活性成分。许多学者对金针菇子实体多糖和菌丝体多糖的提取工艺、结构特征和功能活性进行了研究<sup>[1]</sup>,而对金针菇菌渣中多糖的研究却很少。金针菇菌(*F. velutipes* Residue)即收获金针菇子实体后剩下的废料,其中含有一些菌丝体生长的代谢产物,多糖为其中的一种。我国是世界上食用菌生产大国<sup>[2]</sup>,目前我国产量已占有世界总产量的 70% 左右,其中金针菇

是我国栽培数量最多的食用菌之一。我国工厂化栽培金针菇近二十年,目前全国金针菇日产量在 400 吨左右,每年产生的菌渣至少有 400 万吨<sup>[3]</sup>。菌渣已成为数量十分可观的重要资源。然而,每年大量的菌渣,除少量被用作饲料和再栽培外<sup>[4]</sup>,大部分当作废料被浪费掉。鉴于此,本文采用响应面分析法优化微波辅助提取金针菇菌渣中多糖的工艺,并研究其体外抗氧化活性,旨在为金针菇菌渣的有效利用提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

金针菇菌渣来自湖北省武汉市;DPPH、ABTS 购于上海源叶生物科技有限公司;维生素 C 购于上海

琳帝化工有限公司;石油醚、苯酚、无水乙醇、浓硫酸、氯仿、无水乙醇等均购于国药集团化学试剂有限公司。

UV-2450型紫外-可见分光光度计,上海亚研电子有限公司;Avanti J-E高速冷冻离心机,美国Beckman Coulter公司;HH-6数显恒温水浴锅,上海申胜生物科技有限公司;RE-2000 A旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;D8023CSL-K4微波炉,广州格兰仕有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 金针菇菌渣多糖的制备工艺

金针菇菌渣60℃烘干后粉碎过60目筛子,用石油醚(30~60℃)脱脂后,烘干备用。称取备用的菌渣干粉5.0 g,加适量蒸馏水,在微波下作用一定

时间后,将样品于10000 rpm离心10 min,滤液适当浓缩,加入适量体积的无水乙醇,混匀,置4℃冰箱中过夜,取出后抽滤,所得沉淀用无水乙醇、氯仿、无水乙醚反复洗涤3次,冷冻干燥得到粗多糖。

### 1.2.2 菌渣多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法测定菌渣中多糖的含量<sup>[5]</sup>。根据试验所得回归方程 $y = 0.0131x + 0.0143, R^2 = 0.9985$ 计算样品多糖的含量,从而得到每个试验组菌渣中多糖得率。

$$\text{多糖得率}/\% = (\text{多糖含量 g}/\text{菌渣质量 g}) \times 100\%$$

### 1.2.3 单因素试验

单因素试验选取微波时间、微波功率和料液比三个因素,各因素选取五个水平,如表1所示。

表1 单因素实验的因素及水平

Table 1 Levels and factors for single factor experiments

| 编号<br>No. | 因素<br>Factor                    | 水平<br>Level |      |      |      |      |
|-----------|---------------------------------|-------------|------|------|------|------|
| A         | 微波时间(s)<br>Microwave Time       | 30          | 60   | 90   | 120  | 150  |
| B         | 微波功率(w)<br>Microwave Power      | 160         | 320  | 480  | 640  | 800  |
| C         | 料液比(g/mL)<br>Solid-liquid ratio | 1:15        | 1:20 | 1:25 | 1:30 | 1:35 |

### 1.2.4 响应面试验

响应面试验因素及水平见表2。

表2 响应面试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of response surface analysis

| 水平<br>Level | 因素 Factor                   |                              |                                   |
|-------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|             | A 微波时间<br>Microwave Time(s) | B 微波功率<br>Microwave Power(W) | C 料液比<br>Solid-liquid ratio(g/mL) |
| -1          | 90                          | 480                          | 1:20                              |
| 0           | 120                         | 640                          | 1:25                              |
| 1           | 150                         | 800                          | 1:30                              |

### 1.2.5 对比试验

分别采用微波辅助法与热水浸提法进行金针菇菌渣中多糖的提取试验,比较两种方法对金针菇菌渣中多糖得率的影响。

### 1.2.6 金针菇菌渣中多糖的抗氧化活性的研究

分别测定了金针菇菌渣中多糖的还原能力<sup>[6]</sup>、清除ABTS<sup>+</sup>自由基的能力<sup>[7]</sup>和清除羟自由基的能力<sup>[8]</sup>。

## 2.1 金针菇菌渣多糖提取单因素试验

### 2.1.1 微波时间对多糖得率的影响

在微波功率640 W,料液比1:30的条件下,考察不同微波时间对菌渣中多糖得率的影响,结果如图1所示。120 s之前菌渣多糖得率随着微波时间的延长不断提高,在120 s时达到最大。120 s之后,微波时间过长,样品中积蓄的能力过多,可能导致多糖的水解,从而多糖得率下降。因此选择120 s为最佳微波时间。

## 2 结果与分析

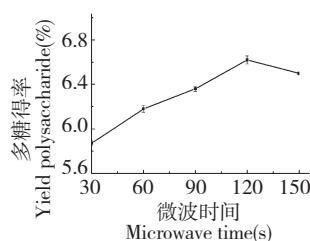


图 1 微波时间对多糖得率的影响

Fig. 1 The effect of microwave time on yield of polysaccharide

## 2.1.2 微波功率对多糖得率的影响

在微波时间 120 s, 料液比为 1:30 的条件下, 考察不同微波功率对多糖得率的影响, 结果如图 2 所示。随着微波功率的增大, 多糖得率提高, 当微波功率为 640 W 时, 多糖得率最大; 但随着微波功率的继续增大, 多糖得率反而下降。这可能是由于微波功率在一定范围内时, 随着微波功率的增大, 提取体系吸收的能量增加, 分子运动加剧, 溶出物增加, 多糖得率提高; 但微波功率过大时, 会引起体系局部高温, 破坏多糖结构, 得率下降<sup>[9]</sup>。故选择 640 W 为最佳微波功率。

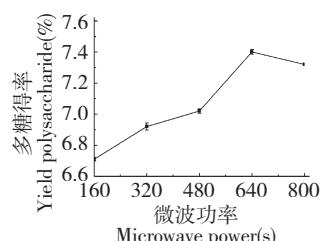


图 2 微波功率对多糖得率的影响

Fig. 2 The effect of microwave power on yield of polysaccharide

## 2.1.3 料液比对多糖得率的影响

在微波时间 120 s, 微波功率 640 W 时, 考察料液比对菌渣中多糖得率的影响, 结果如图 3 所示。随着料液比的增大, 菌渣中多糖得率逐渐提高, 料液比为 1:25 时, 多糖得率达到最大值; 料液比再增加, 多糖得率基本保持不变。这说明一定范围内的料液比的增大有利于多糖溶出, 当料液比达到一定值时, 多糖的溶出量已经达到最大限度, 此时料液比继续增大, 对多糖得率影响不大。而且过大的料液比造成能源和资源的浪费, 且不利于下一步试验的进行<sup>[10]</sup>。

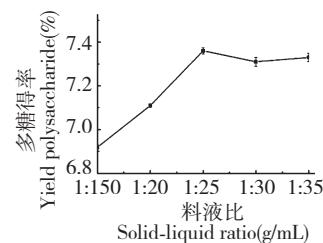


图 3 料液比对多糖得率的影响

Fig. 3 The effect of solid-to-liquid ratio on yield of polysaccharide

## 2.2 金针菇菌渣多糖提取响应面试验

## 2.2.1 响应面试验回归模型的建立与分析

在单因素的基础上, 为了进一步确定影响多糖得率的主次因素及其因素之间的交互作用。根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 设计了微波时间、微波功率和料液比的三因素三水平中心组合实验, 方案和结果如表 3 所示。

表 3 三因素三水平中心组合实验方案及结果

Table 3 Three factors and three levels of central composite experiment scheme and results

| 编号<br>No. | A 微波时间<br>Microwave<br>Time(s) | B 微波功率<br>Microwave<br>Power(W) | C 料液比<br>Solid-liquid<br>ratio(g/mL) | Y 多糖得率<br>Yield of<br>polysaccharide(%) |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1         | 0                              | 0                               | 0                                    | 7.68                                    |
| 2         | -1                             | 0                               | 1                                    | 7.27                                    |
| 3         | 0                              | 1                               | -1                                   | 6.80                                    |
| 4         | 1                              | 1                               | 0                                    | 6.84                                    |
| 5         | -1                             | 0                               | -1                                   | 7.13                                    |
| 6         | 0                              | -1                              | 1                                    | 6.51                                    |
| 7         | 0                              | 0                               | 0                                    | 7.57                                    |
| 8         | 0                              | 0                               | 0                                    | 7.61                                    |
| 9         | 1                              | 1                               | 1                                    | 7.09                                    |
| 10        | -1                             | -1                              | 0                                    | 6.41                                    |

|    |    |    |    |      |
|----|----|----|----|------|
| 11 | 1  | 0  | -1 | 7.05 |
| 12 | 0  | -1 | -1 | 6.67 |
| 13 | -1 | 1  | 0  | 7.12 |
| 14 | 1  | -1 | 0  | 6.38 |
| 15 | 0  | 0  | 0  | 7.56 |
| 16 | 0  | 1  | 1  | 7.11 |
| 17 | 0  | 0  | 0  | 7.67 |

应用软件 Design Expert 8.0 对表 3 的数据进行分析,建立了三元二次响应面回归方程:  $Y = -12.26625 + 0.085858A + 0.031700B + 0.33225C - 1.30208E-005AB - 1.66667E-004AC + 1.46875E-004BC - 3.15556E-004A^2 - 2.52539E-005B^2 - 7.96000E-003C^2$ 。

由回归模型数据分析得到,微波辅助提取菌渣

多糖的最佳工艺为微波时间 115.34 s, 微波功率 673.10 W, 料液比 1:25.88, 多糖得率的预测值为 7.65%。考虑到实际的试验操作条件,将提取工艺修正为微波时间 115 s, 微波功率 640 W, 料液比 1:26。在此条件下,试验三次取平均值得菌渣多糖得率为 7.53%,与预测值 7.65% 比较相近。

表 4 回归方程的方差分析  
Table 4 Analysis of variance for the developed regression equation

| 来源<br>Source   | 平方和<br>Sum of Squares | 自由度<br>Degree of freedom | 均方<br>Mean Square | F 值<br>F Value | P 值<br>P Value |
|----------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|----------------|----------------|
| 模型 Model       | 3.03                  | 9                        | 0.34              | 63.90          | <0.0001 **     |
| A              | 0.041                 | 1                        | 0.041             | 7.70           | 0.0275 *       |
| B              | 0.45                  | 1                        | 0.45              | 85.59          | <0.0001 **     |
| C              | 0.014                 | 1                        | 0.014             | 2.58           | 0.1521         |
| AB             | 0.016                 | 1                        | 0.016             | 2.96           | 0.1288         |
| AC             | 2.500E-003            | 1                        | 2.500E-003        | 0.47           | 0.5132         |
| BC             | 0.055                 | 1                        | 0.055             | 10.47          | 0.0143 *       |
| $A^2$          | 0.034                 | 1                        | 0.34              | 64.41          | <0.0001 **     |
| $B^2$          | 1.76                  | 1                        | 1.76              | 333.80         | <0.0001 **     |
| $C^2$          | 0.17                  | 1                        | 0.17              | 31.63          | 0.0008 **      |
| 保留值 Residual   | 0.037                 | 7                        | 5.272E-003        | -              | -              |
| 失拟 Lack of Fit | 0.025                 | 3                        | 8.208E-003        | 2.67           | 0.1829         |
| 误差 Error       | 0.012                 | 4                        | 3.070E-003        | -              | -              |
| 总和 Cor Total   | 3.07                  | 16                       | -                 | -              | -              |
| -              | $R^2 = 0.9880$        | -                        | -                 | -              | -              |

注: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

由表 4 可以看出,回归模型极显著 ( $P < 0.0001$ ),说明回归方程是可用的;失拟项仅为 0.025,而且对应的  $P = 0.1829 > 0.05$ ,说明所得方程与实际拟合中非正常误差所占比例小;  $R^2 = 0.9880$  说明预测值与实测值之间有高度的相关性。综上得,该回归方程可用于菌渣中多糖得率的优化。由 F 值可以得出,影响菌渣多糖得率的各因素的主

效关系为微波功率 (B) > 微波时间 (A) > 料液比 (C),其中微波时间 (B) 为极显著,微波功率为显著,料液比 (C) 为不显著。

## 2.2.2 因素间的交互作用分析

图 4 为由回归模型得到的响应面图形,反应了两两因素之间对多糖得率的交互影响。

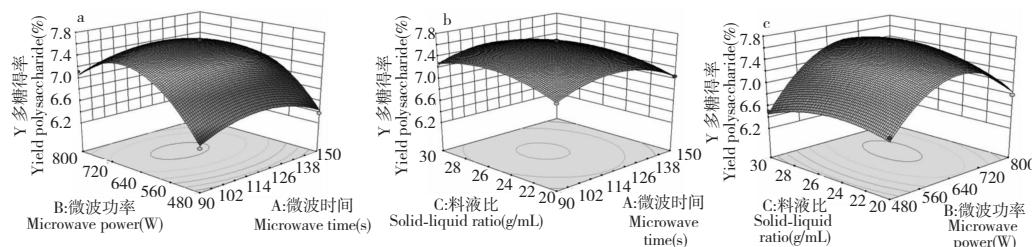


图 4 两因素交互作用对多糖得率的影响

Fig. 4 Response surface plots showing the effect of two factors on yield of polysaccharide

注:a. 微波功率和微波时间;b. 料液比和微波时间;c. 料液比和微波功率

Note;a. microwave power and time;b. solid-to-liquid ratio and microwave time;c. solid-to-liquid ratio and microwave power

由图 4a 可以看出,微波时间和微波功率的响应面坡度比较陡峭,等高线排列紧密且呈椭圆,说明微波功率和微波时间之间的交互作用明显。微波功率的等高线比微波时间的等高线密集,说明微波功率的主效大于微波时间<sup>[10]</sup>。为了避免过长的微波时间导致多糖结构破坏,选择 120 s 左右为最佳时间段。

由图 4b 可以看出,等高线排列略疏松且椭圆曲率比较小,说明料液比和微波时间之间的交互作用不明显。由于料液比对多糖得率的影响比较小,为了方便后续工作,把料液比选择在适中水平。

由图 4c 可以看出,等高线排列紧密且呈椭圆,说明料液比和微波功率之间的交互作用比较明显。微波功率的等高线明显比料液比的等高线密集,说明微波功率的主效大于料液比。在微波功率 640 W 左右和料液比约 1:25 时,多糖得率达到最大值。

综上得,微波功率的主效最明显,微波时间和料液比次之。与回归模型分析结果一致。

### 2.3 两种方法提取菌渣多糖的对比试验

微波辅助提取法和热水浸提法分别提取金针菇菌渣多糖,用苯酚-硫酸法测定菌渣中多糖含量。

微波辅助提取法参照 1.2.1 的论述。

热水浸提法<sup>[11]</sup>:料液比 1:20,浸提温度 90 °C,浸提时间 3 h。

表 5 两种方法的效果比较

Table 5 Comparison of two methods

| 提取方法<br>Extraction method       | 提取时间<br>Extraction time | 多糖得率<br>Yield of polysaccharide |
|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 微波辅助提取法<br>Microwave extraction | 115 s                   | 7.53%                           |
| 热水浸提法<br>Hot water extraction   | 3 h                     | 6.39%                           |

从表 5 可以看出,微波辅助提取法的提取时间

仅为 115 s,热水浸提法的提取时间为 3 h,前者明显比后者费时少,而且微波辅助提取法的多糖得率比热水浸提的多糖得率提高了 15.14%。微波辅助提取法的这些优点恰好可以满足即时、高效地处理每天产生的大量金针菇菌渣。

### 2.4 抗氧化能力

#### 2.4.1 还原能力测定

样品还原力通过将  $\text{Fe}^{3+}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  转变为  $\text{Fe}^{2+}$  的能力测定,吸光值越大,还原力越强,还原力大小可以间接评价样品抗氧化能力的强弱。金针菇菌渣中多糖的还原力如图 5 所示。

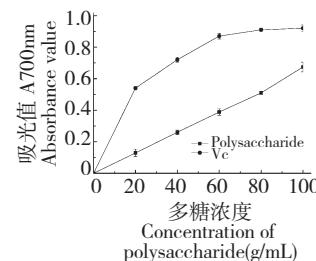


图 5 金针菇菌渣中多糖的还原力

Fig. 5 The reducing powers of polysaccharides from *F. velutipes* residue

由图 5 可知,一定浓度范围内,随着多糖浓度的增加,其还原力增强。根据拟合曲线  $y = 0.006x - 0.004$ ,  $R^2 = 0.998$ ,可以看出在一定浓度范围内,多糖浓度与还原力之间具有一定线性关系,而且得到菌渣中多糖还原力的  $IC_{50}$  值为 8.4 mg/mL。在浓度 0~10 mg/mL 范围内,菌渣多糖的还原力低于 Vc,这可能是由于多糖是大分子物质,还原性末端相对较少。

#### 2.4.2 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力测定

ABTS<sup>+</sup>自由基水溶液呈蓝绿色,在 734 nm 处有最大吸收,当遇到具有抗氧化活性的物质时则被还

原,溶液颜色变浅,吸光值降低,吸光值越小,表明样品清除 ABTS<sup>+</sup>自由基的能力越强。金针菇菌渣中多糖清除 ABTS<sup>+</sup>自由基能力如图 6 所示。

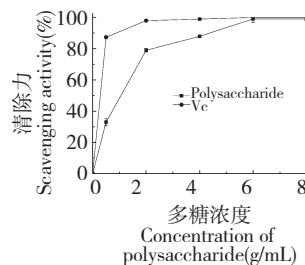


图 6 金针菇菌渣多糖的 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力

Fig. 6 ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging activities of polysaccharides from *F. velutipes* residue

由图 6 可知,多糖浓度在 0~2 mg/mL,ABTS<sup>+</sup>自由基清除率显著增大,继续增大样品浓度,清除率增加平缓。根据拟合曲线  $y = 0.242 \ln(x) + 0.540$ ,  $R^2 = 0.981$ ,计算金针菇菌渣中多糖对 ABTS<sup>+</sup>自由基的  $IC_{50}$  值为 1.01 mg/mL。在浓度 0~6 mg/mL 范围时,多糖的清除率略低于 Vc 的清除率,继续增大浓度,两者的清除率相当,而且都基本接近 100%。

#### 2.4.3 羟自由基清除能力测定

羟自由基是活性很强的自由基,可引起细胞损伤,从而导致机体衰老或癌变等。因此,生物体为防御疾病,必须清除羟自由基。金针菇菌渣中多糖清除羟基自由基能力如图 7 所示。

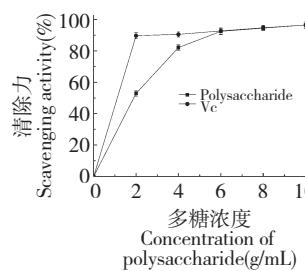


图 7 金针菇菌渣多糖的羟基自由基清除能力

Fig. 7 OH radical-scavenging activities of polysaccharides from *F. velutipes* residue

由图 7 可知,多糖浓度在 0~4 mg/mL,ABTS<sup>+</sup>自由基清除率显著增大,继续增大样品浓度,清除率趋于平缓。根据拟合曲线  $y = -0.016x^2 + 0.251x + 0.038$ ,  $R^2 = 0.985$ ,计算金针菇菌渣多糖对羟基自由基的  $IC_{50}$  值为 1.95 mg/mL。在浓度 0~4 mg/mL 时,多糖的清除率低于 Vc 的清除率,继续增大浓

度,两者的清除率相当,而且都基本接近 100%。

### 3 结论

本文采用微波辅助法提取金针菇菌渣中多糖,此方法能够高效、快速地将多糖物质溶出。而且在微波时间、微波功率和料液比三个单因素试验的基础上进行了响应面试验优化,得到提取金针菇菌渣最优的工艺参数:微波时间 115 s,微波功率 640 W,料液比 1:26。菌渣中多糖得率为 7.53%,与预测值 7.65% 接近。

本研究还对优化工艺下提取的多糖的体外抗氧化活性进行了评价,测定了此多糖的还原力、清除 ABTS<sup>+</sup>自由基和清除羟基自由基的能力,多糖对还原力、ABTS<sup>+</sup>自由基和羟基自由基的  $IC_{50}$  值分别为 8.40、1.01 mg/mL 和 1.95 mg/mL,且都具有一定得浓度依赖性。此结果表明金针菇菌渣中多糖具有一定的抗氧化能力,作为一种新的、天然的抗氧化剂具有良好的开发前景。

### 参考文献

- Zheng Y(郑义), Li C(李超), Wang NX(王乃馨). Research progress in polysaccharides from *Flammulina velutipes*. *Food Sci(食品科学)*, 2010, 31:425-428.
- Xie CQ(谢春芹), Jia J(贾君), Xie ZL(谢正林), et al. Study on cultivation of *Pleurotus geesteranus* with spent substrate of *Flammulina velutipes*. *Northern Hortic (北方园艺)*, 2012, 9:170-172.
- Huang Y(黄毅). *Flammulina velutipes* cultivation factory situation and countermeasures. *Edible Fungi (食用菌)*, 2009, 6:3-5.
- Li YF(李用芳). Reuse of mushroom residue of edible fungi. *Chin Bull Biol(生物学通报)*, 2001, 36(3):44-45.
- Wang XK(王学奎). *Principle and Technology of Plant Physiological and Biochemical Experiments (The second edition)*. Beijing: Higher Education Press(高等教育出版社), 2006. 205-208.
- Li YL(李燕凌), Zhang ZX(张志旭), Hu L(胡令). Antioxidation of polysaccharides from *Poria cocos*. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2012, 24:1126-1128.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, 1999, 26:1231-1237.

(下转第 178 页)