

酵母发酵法提高黑木耳多糖溶出率的工艺优化

郭欣^{1,2}, 郭萌^{1,2}

(1. 漳州职业技术学院 食品工程学院, 福建 漳州 363000;

2. 农产品深加工及安全福建省高校应用技术工程中心, 福建 漳州 363000)

摘要:对酵母发酵法提高黑木耳多糖溶出率进行了研究。利用 Design Expert 8.0.6.1 软件建立多元回归模拟方程,对酵母添加量、发酵温度、发酵时间和 pH 这 4 个影响黑木耳多糖溶出率的因素进行响应面优化。结果表明,酵母发酵法提高黑木耳多糖溶出率的最佳工艺条件为:酵母添加量 0.75 g/L、发酵温度 30 ℃、发酵时间 16 h、pH 6.5。在此条件下,黑木耳多糖溶出率为 17.65%,与预测值(17.74%)接近,验证了该回归模型的准确性和可靠性。

关键词:黑木耳;多糖;酵母发酵;溶出率;响应面优化

中图分类号:TS255.3

文献标志码:A

文章编号:1671-5322(2020)01-0067-07

黑木耳(*Auricularia auricular*)又称木耳,富含多种营养成分及生理功能物质^[1],具有较高的食用和药用价值。其中,存在于细胞中的黑木耳多糖是黑木耳生物活性的主要成分,具有抗氧化、抗衰老、降血糖、降血脂和增强免疫等功效^[2-4]。近年来,黑木耳功能性保健食品开发研究逐渐增多,例如黑木耳发酵饮料、黑木耳面包、黑木耳果冻、黑木耳低脂灌肠制品等^[5-6],但这些产品大多未对黑木耳进行深加工,仅是将其作为原料直接加入食品中,黑木耳多糖溶出率不高,造成了原料的浪费。目前,国内外对于提高多糖提取率的方法研究主要集中在热水浸提法^[7]、酸碱浸提法^[8-9]及酶、微波、超声等辅助提取法^[10-12]。这些提取方法存在耗时长、工艺复杂、加入化学溶剂、破坏其它营养成分等不足,不适合后续食品加工。

本文采用酵母发酵法,利用酵母菌内在酶系,促使黑木耳细胞壁纤维之间的酯键断裂而发生剥皮反应^[13-14],使更多易被人体吸收的黑木耳多糖游离释放出来。此方法成本低、易操作,黑木耳多糖溶出率高,并且原有营养成分基本保持不变,是一种相对有效,更加适合保健食品深加工的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

黑木耳:福建省龙海市安利达工贸有限公司;酵母:湖北安琪酵母有限公司。

1.2 设备与仪器

数显恒温水浴锅(JHH-4):江苏荣华仪器有限公司;紫外可见分光光度计(UV5800PC):北京普析通用仪器有限公司;pH计:上海精密仪器仪表有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵工艺流程

发酵工艺流程如图1所示。

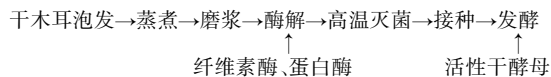


图1 发酵工艺流程图

Fig 1 Fermentation process flow cohort

1.3.2 黑木耳多糖提取及测定

参照王伟等^[15]的提取方法。发酵液离心过滤取上清液,用旋转蒸发仪浓缩。随后缓慢加入3倍体积的无水乙醇,低温静置过夜可见沉淀,即

为黑木耳粗多糖。多糖含量测定方法参照苯酚－硫酸法测定^[16]。多糖提取率(%) = 多糖质量(g)/干木耳质量(g) × 100 %

1.3.3 酵母发酵法提高黑木耳多糖溶出率单因素试验

(1)不同酵母添加量对黑木耳多糖溶出率的影响

在发酵温度 30 ℃,发酵时间 16 h,pH 6.5 的条件下,选取酵母添加量为 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 g/L 等 5 个水平,研究不同酵母添加量对黑木耳多糖溶出率的影响。

(2)不同发酵温度对黑木耳多糖溶出率影响
在酵母添加量 0.75 g/L,发酵时间 16 h, pH6.5 的条件下,选取发酵温度为 18、22、26、30、34、38 ℃ 等 6 个水平,研究不同发酵温度对黑木耳多糖溶出率的影响。

(3)不同发酵时间对黑木耳多糖溶出率影响
在酵母添加量 0.75 g/L,发酵温度 30 ℃, pH6.5 的条件下,选取发酵时间为 8、16、24、32、40 h 等 5 个水平,研究不同发酵时间对黑木耳多糖溶出率的影响。

(4)不同 pH 对黑木耳多糖溶出率的影响
在酵母添加量 0.75 g/L,发酵温度 30 ℃,发酵时间 16 h 的条件下,选取 pH 为 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5 等 5 个水平,研究不同 pH 对黑木耳多糖溶出率的影响。

1.3.4 响应面设计

在单因素试验基础上,采用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行试验设计,以酵母添加量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)和 pH 值(D)作为自变量,以黑木耳多糖溶出率为指标,优化酵母发酵法提高黑木耳多糖溶出率的工艺条件。因素及水平如表 1 所示。

表 1 响应面设计因素及水平				
Table 1 Factors and levels of response surface design				
水平	因素			
	A:酵母添加量/(g · L ⁻¹)	B:发酵温度/℃	C:发酵时间/h	D:pH
-1	0.5	26	8	5.5
0	0.75	30	16	6.5
1	1	34	24	7.5

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 不同酵母添加量对黑木耳多糖溶出率的影响

由图 2 可以看出,黑木耳多糖溶出率随着酵母添加量的增加先呈现上升趋势,发酵进程缩短;当酵母添加量达到 0.75 g/L 时,黑木耳多糖溶出率最高;之后随酵母添加量继续增大,溶出率反而下降,这可能是因为在固定的营养环境中,过多的酵母数量使得酵母之间出现互相争夺营养的现象,从而影响酵母的活性。因此,最佳酵母添加量选择为 0.75 g/L。

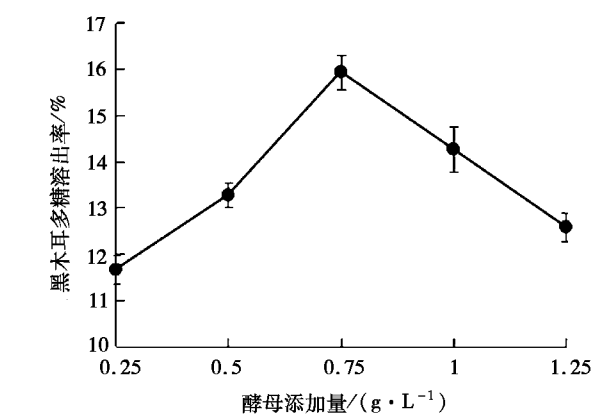


图 2 不同酵母添加量对黑木耳多糖溶出率的影响

Fig 2 Effects of different yeast addition on dissolution rate of polysaccharide from *Auricularia auricular*

2.1.2 不同发酵温度对黑木耳多糖溶出率影响

由图 3 可见,随着发酵温度的增加,黑木耳多糖溶出率呈现先上升后下降的趋势,在 30 ℃ 时出现峰值。因为酵母的最适生长温度为 30 ℃,在此温度下,酵母生长最旺盛,体内酶系活性大大增加,催化黑木耳细胞壁纤维不断裂解,使多糖更容易游离出来^[17-18]。而低温和高温都不利于酵母的生长,因此,最佳发酵温度选择为 30 ℃。

2.1.3 不同发酵时间对黑木耳多糖溶出率影响

由图 4 可见,发酵初期,黑木耳多糖溶出率有所增加,在发酵 16 h 时达到最高值 17.52%。随着发酵时间的延长,黑木耳多糖溶出率不断下降,这可能是因为在过长的发酵时间改变了溶出的多糖结构^[19],同时酵母发酵产生的 CO₂ 导致发酵液酸度降低,从而抑制酵母菌活性。因此,最佳发酵时间选择为 16 h。

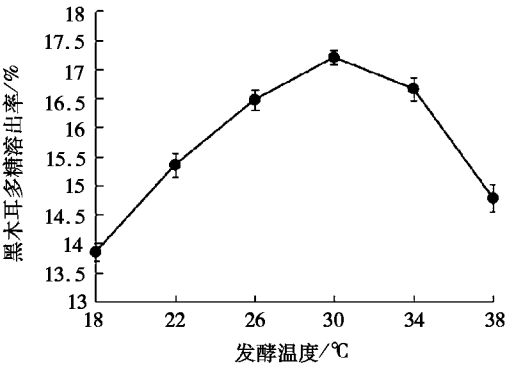


图 3 不同发酵温度对黑木耳多糖溶出率的影响
Fig 3 Effects of different fermntation temperature on dissolution rate of polysaccharide from *Auricularia auricular*

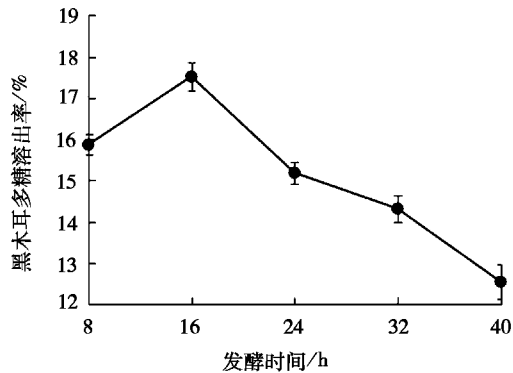


图 4 不同发酵时间对黑木耳多糖溶出率的影响
Fig 4 Effects of different fermntation time on dissolution rate of polysaccharide from *Auricularia auricular*

2.1.4 不同 pH 对黑木耳多糖溶出率的影响

由图 5 可知,发酵液 pH 在 4.5 ~ 6.5 时,黑木耳多糖溶出率逐渐上升,说明弱酸性条件有利于黑木耳多糖的溶出。当 pH 超过 6.5 时,黑木耳多糖溶出率出现快速下降的现象,说明碱性环境时会破坏黑木耳多糖的结构使其降解,进而影响黑木耳多糖的溶出率。因此,最佳 pH 选择为 6.5。

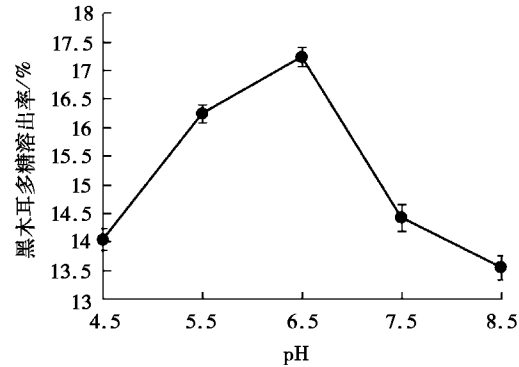


图 5 不同 pH 对黑木耳多糖溶出率的影响
Fig 5 Effects of different pH on dissolution rate of polysaccharide from *Auricularia auricular*

2.2 响应面优化试验结果

2.2.1 响应面试验结果

在上述单因素试验基础上,以酵母添加量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)和 pH(D)作为自变量,进行四因素三水平的响应面试验设计,试验结果如表 2 所示。利用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行回归分析。

表 2 响应面试验结果
Table 2 The results of response surface experiments

序号	A	B	C	D	溶出率/%
1	0	0	0	0	17.66
2	1	0	0	1	16.89
3	0	0	-1	1	14.62
4	0	0	0	0	17.16
5	0	-1	0	1	14.75
6	0	1	0	1	16.57
7	-1	1	0	0	14.88
8	1	0	-1	0	15.23
9	-1	0	-1	0	13.46
10	1	1	0	0	15.96
11	-1	0	0	-1	13.57
12	-1	-1	0	0	13.86
13	-1	0	1	0	14.88
14	1	0	1	0	16.57
15	-1	0	0	1	16.39
16	0	0	0	0	17.25
17	0	1	0	-1	14.57
18	0	0	-1	-1	11.67
19	0	0	0	0	16.98
20	0	0	1	-1	15.88
21	1	0	0	-1	15.49
22	0	1	1	0	16.05
23	0	1	-1	0	14.08
24	1	-1	0	0	16.72
25	0	0	1	1	16.37
26	0	-1	-1	0	12.24
27	0	-1	0	-1	13.52
28	0	-1	1	0	14.3
29	0	0	0	0	17.06

对表 2 中的试验数据进行多元回归模拟分析,得到以黑木耳多糖溶出率(Y)为响应值的回归方程: $Y=17.194+0.818\ 3A+0.56B+1.062\ 5C+0.907\ 5D-0.445AB-0.02AC-0.355AD-0.022\ 5BC+0.192\ 5BD-0.615CD-0.547\ 8A^2-1.347\ 8B^2-1.616\ 5C^2-0.999D^2$ 。

方差分析如表 3 所示,回归方程模型的 F 值为 18.37, $P<0.000\ 1$,表明该二次回归模型极显著。失拟项 $P=0.052\ 5>0.05$,差异不显著;相关系数 $R^2=0.978\ 6>0.9$,说明该方程模型对于黑木耳多糖溶出率的试验值与预测值拟合较好。模型的 $R^2_{Adj}=0.952\ 8$,表明 95.28% 的 Y 值分布

与 A 、 B 、 C 、 D 4 个因素有关。一次项 B 、 C 、 D 对黑木耳多糖溶出率的影响均达到极显著水平 ($P < 0.01$), 一次项 A 对黑木耳多糖溶出率的影响显著 ($P < 0.05$)。比较单因素 F 值可知, 对溶出率

效果影响主次顺序为 $C > B > D > A$, 即发酵时间 $>$ 发酵温度 $>$ pH $>$ 酵母添加量。二次项 CD 的 P 值小于 0.05, 说明 C 和 D 的交互作用显著影响黑木耳多糖溶出率。

表 3 方差分析表
Table 3 The variance analysis

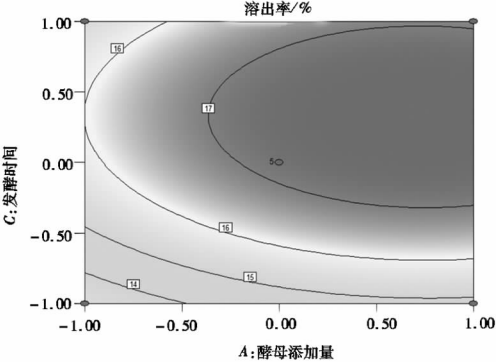
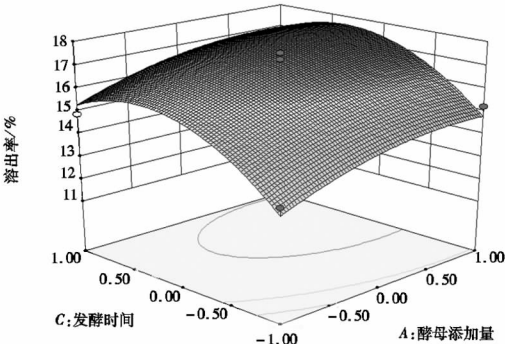
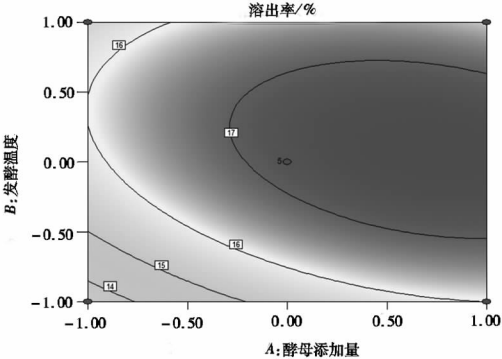
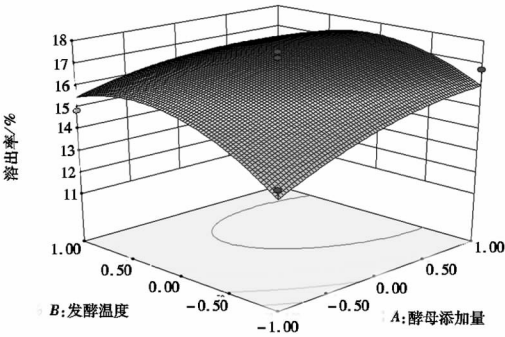
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	64.366	14	4.597	18.37	<0.000 1	**
A	3.763	1	3.763 2	15.043	0.017	*
B	9.882	1	9.882	39.502	<0.000 1	**
C	13.54	1	13.54	54.15	<0.000 1	**
D	8.036	1	8.036	32.12	<0.000 1	**
AB	0.792 1	1	0.792 1	3.166	0.096 9	
AC	1.600×10^{-3}	1	1.600×10^{-3}	6.396×10^{-3}	0.937 4	
AD	0.504 1	1	0.504 1	2.015	0.177 6	
BC	2.025×10^{-3}	1	2.025×10^{-3}	8.095×10^{-3}	0.929 6	
BD	0.148 22	1	0.148 2	0.592	0.454 2	
CD	1.512 9	1	1.512 9	6.047	0.027 5	*
A^2	1.947	1	1.946 7	7.782	0.014 5	*
B^2	11.783	1	11.783	47.106	<0.000 1	**
C^2	16.951	1	16.951	67.76	<0.000 1	**
D^2	6.474	1	6.474	25.88	0.000 2	**
残差	3.502	14	0.250 1			
失拟项	3.327	10	0.332 7	7.636 014	0.052 5	
净误差	0.174	4	0.043 5			
总和	67.86	28				

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

2.2.2 响应曲面分析

由表 3 显著性分析可知, 酵母添加量 (A)、发酵温度 (B)、发酵时间 (C) 和 pH (D) 4 个因素之

间不是简单线性关系, 而是相互交叉作用。依据上述回归方程, 绘制 4 个因素交互作用下的响应面图及等高线图, 如图 6 所示。



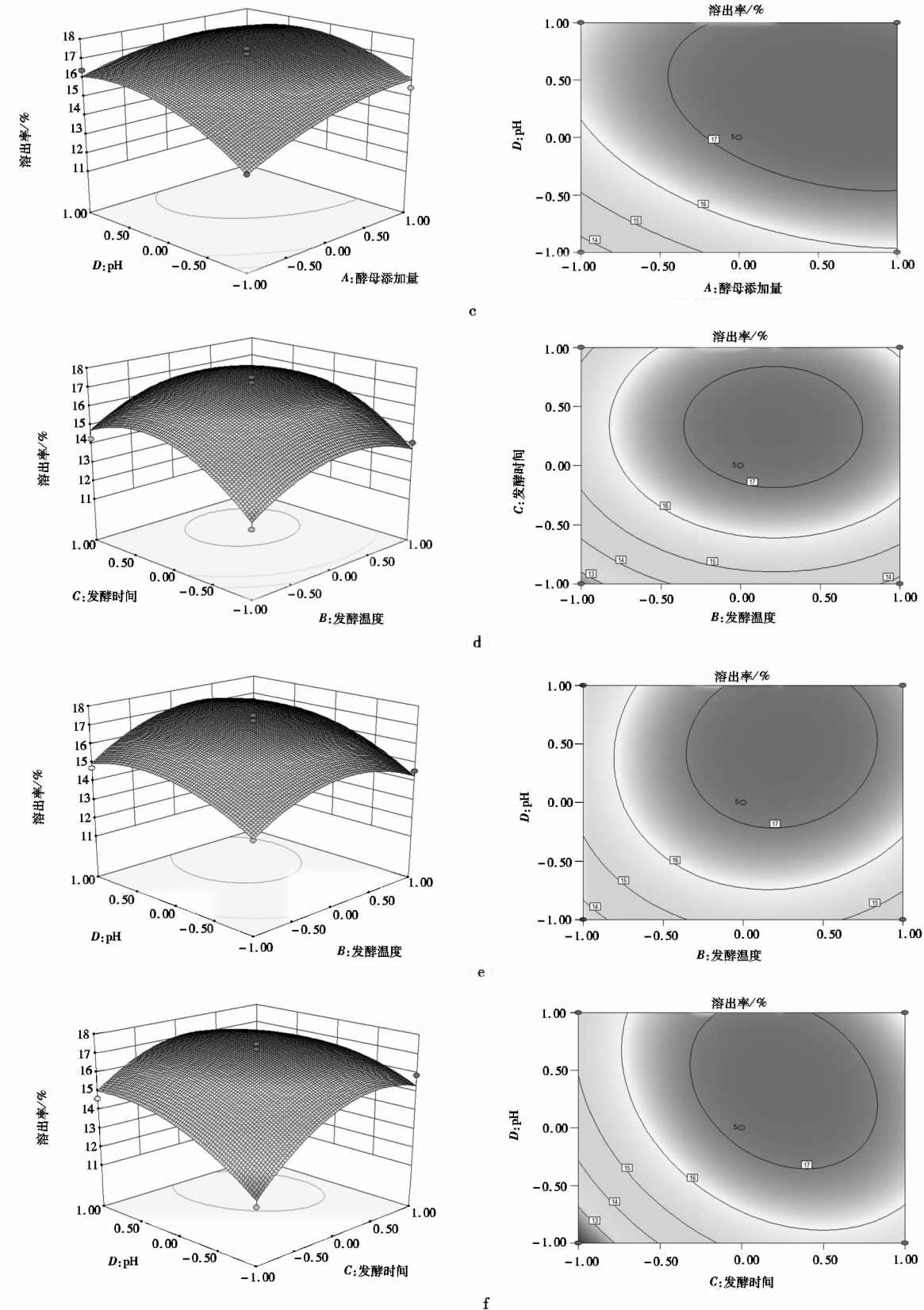


图 6 各因素交互作用对黑木耳多糖溶出率的响应面和等高图

Fig 6 Response surface and contour map of the interaction of various factors on the dissolution rate of *Auricularia auricular* polysaccharide

由图 6a 可知,沿着 B 因素(发酵温度)移动的等高线密度高于 A 因素(酵母添加量)方向。从曲面 3D 图也可以看出,沿着 B 因素方向的曲面更陡峭。这说明发酵温度对黑木耳多糖溶出率的影响大于酵母添加量。由图 6b 可知,沿着 C 因素(发酵时间)移动的等高线密度高于 A 因素(酵母添加量)方向。从曲面 3D 图也可以看出, C 因素方向响应面曲线有一定的坡度。这说明发酵时间对黑木耳多糖溶出率的影响大于酵母添加量。同理, D 因素(pH)对溶出率的影响大于 A 因素(酵母添加量), C 因素(发酵时间)对溶出率的影响大于 B 因素(发酵温度)。综合以上分析可知,4 个因素对黑木耳多糖溶出率的影响主次顺序为:发酵时间 > 发酵温度 > pH > 酵母添加量,与表 3 方差分析结果一致。

2.2.3 最优条件及验证试验

通过 Design Expert 8.0.6.1 数据分析,酵母发酵法提高黑木耳多糖溶出率的最佳工艺条件为酵母添加量 0.753 g/L、发酵温度 30.72 ℃、发酵时间 16.8 h、pH6.58,此条件下黑木耳多糖溶出率预测值为 17.74%。考虑到实际加工条件的便利性,最终将最佳工艺选择为酵母添加量 0.75 g/L、发酵温度 30 ℃、发酵时间 16 h、pH6.5。用该工艺条件进行 3 次重复试验,得到黑木耳多糖溶出率平均值为 17.65%,与预测值接近,充分验证了该回归模型的准确性和可靠性,可用于酵母发酵法提高黑木耳多糖溶出率工艺优化。

参考文献:

- [1] 熊艳,车振明. 黑木耳多糖的研究进展[J]. 食品研究与开发,2007,28(1):181-183.
- [2] YU J, SUN R L, ZHAO Z Q, et al. *Auricularia polytricha* polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014,68:67-71.
- [3] ZHAO S, RONG C B, LIU Y, et al. Extraction of a soluble polysaccharide from *Auricularia polytricha* and evaluation of its anti-hypercholesterolemic effect in rats[J]. Carbohydrate Polymers, 2015,122:39-45.
- [4] 王佰灵,谢勇,赵永恒,等. 黑木耳多糖药理作用研究进展[J]. 中国医药导报,2016,13(26):29-32.
- [5] 赵永恒,王佰灵,邱婧然,等. 黑木耳产品开发研究进展[J]. 亚太传统医药,2016,12(17):39-42.
- [6] 王倩,吴梦兰,郑硕,等. 酶解黑木耳饮料制备工艺的研究[J]. 食品研究与开发,2018,39(24):71-77.
- [7] 邓庆华,赵志宇,张中振. 黑木耳多糖的提取及其理化特性与抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(12):7380-7381,7384.
- [8] 刘海玲,杨春瑜,杨春莉,等. 碱提黑木耳多糖的工艺优化[J]. 农产品加工,2015(6):34-36.
- [9] 胡文兵,杨占威,陈慧,等. Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验设计优化超声波-酶法提取青钱柳多糖工艺及结构初探[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(4):671-679.
- [10] YIN J Y, LIN H X, LI J, et al. Structural characterization of a highly branched polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L[J]. Carbohydrate Polymers, 2012,87(4):2416-2424.
- [11] 李超,王磊,任瑶,等. 黑木耳多糖的微波提取及含量的测定[J]. 食品工业,2012,33(8):128-131.

2.3 对比研究酵母发酵法与其它提取方法对黑木耳多糖溶出率的影响

为探讨酵母发酵法的优越性,将其与其它学者研究的不同提取方法进行比较。陆雯等^[20]采用热水浸提法,在提取温度 60 ℃、料液比为 1:40、提取时间为 2.5 h 的最佳提取条件下测得黑木耳多糖提取率为 5.12%。陈祖琴等^[21]通过超声波提取法提取木耳多糖,通过对粒径、超声波功率、时间及料液比 4 个因素进行正交试验,测得黑木耳多糖提取率为 11.95%。本试验中,酵母发酵法测得黑木耳多糖提取率可达 17.65%,明显高于热水浸提法和超声波提取法,大大提高了原料的利用率,有利于降低食品企业的生产成本。

3 结论

本试验采用对黑木耳浆进行酵母发酵的方法,在原有营养成分基本保持不变的情况下,提高黑木耳多糖溶出率。利用 Design Expert 8.0.6.1 软件对该工艺中的各个影响因素进行响应面优化,建立多元回归模拟方程。通过方差及响应曲面分析得到影响黑木耳多糖溶出率的因素主次顺序为:发酵时间 > 发酵温度 > pH > 酵母添加量。通过响应面法优化提取条件,得到最佳工艺条件为酵母添加量 0.75 g/L、发酵温度 30 ℃、发酵时间 16 h、pH6.5。在此条件下,黑木耳多糖溶出率为 17.65%,与预测值(17.74%)接近,说明该回归模型的准确性和可靠性,可用于酵母发酵法提高黑木耳多糖溶出率工艺优化。

[12] 吴小燕,蔡为荣,周迎. 超声波提取黑木耳多糖及其体外抗凝血活性[J]. 食品与发酵工业,2015,41(12):219-223.

[13] 鲁青,严美婷,张超凤,等. 微生物发酵技术同步提取青钱柳多糖和黄酮的工艺研究[J/OL]. 食品与发酵工业,https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.020682.

[14] 朱双杰,向玉勇,罗侠,等. 酵母发酵法提取石耳粗多糖工艺优化[J]. 北京农学院学报,2012,27(1):65-68.

[15] 王伟,陈凡,王玉玲. 毛木耳多糖提取工艺的研究[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版),2009,22(3):121-124.

[16] 鲁晓岩. 硫酸—苯酚法测定北冬虫夏草多糖含量[J]. 食品工业科技,2002,23(4):69-70.

[17] 骆嘉原,孙凯峰,包怡红. 黑木耳多糖的酶法生物转化工艺优化及其体外降血糖性能[J/OL]. 食品工业科技. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.ts.20190613.1805.014.html.

[18] 刘平平,李萌,王昌涛,等. 仙人掌多糖发酵提取工艺优化及其抗炎功效研究[J]. 食品工业科技,2018,39(24):216-221.

[19] 曾璇竹,雷于国,胡国元,等. 富硒香菇多糖发酵工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2018,39(17):186-192.

[20] 陆雯,蔡振优,鲜乔,等. 黑木耳多糖提取工艺条件的研究[J]. 中国食品添加剂,2010(6):99-102.

[21] 陈祖琴,熊川,金鑫,等. 不同提取方法对木耳多糖提取率的影响[J]. 食品安全质量检测学报,2017,8(5):1636-1641.

Process Optimization for Improving the Dissolution Rate of *Auricularia auricula* Polysaccharide by Yeast Fermentation Method

GUO Xin^{1,2}, GUO Meng^{1,2}

(1. College of Food Engineering, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou Fujian 363000, China;
2. The Applied Technical Engineering Center of Further Processing and Safety of Agricultural Products,
Higher Education Institutions in Fujian Province, Zhangzhou Fujian 363000, China)

Abstract: The yeast fermentation method was used to improve the dissolution rate of *Auricularia auricula* polysaccharide. The Design Expert 8.0.6.1 software was used to establish the multiple regression simulation equation, and the response surface optimization was carried out for the four factors that affect the dissolution rate of *Auricularia auricula* polysaccharide: yeast addition amount, fermentation temperature, fermentation time and pH. The results showed that the best process conditions of yeast fermentation were: yeast dosage 0.75 g/L, fermentation temperature 30 ℃, fermentation time 16 h, pH 6.5. Under these conditions, the dissolution rate of *Auricularia auricula* polysaccharide was 17.65%, which was close to the predicted value (17.74%), indicating the accuracy and reliability of the regression model.

Keywords: *Auricularia auricular*; polysaccharide; yeast fermentation; dissolution; response surface optimization

(责任编辑:熊璐璐)