

## 响应面法优化人工蛹虫草子实体中虫草酸微波提取工艺

邓黎, 韩涛, 王晓虹, 皮立, 韩发\*

中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

**摘要:**为优化人工蛹虫草子实体中虫草酸的微波提取工艺,在单因素试验基础上,利用响应曲面法考察提取时间、微波功率和液固比对虫草酸提取率的影响,优化提取工艺。结果表明:人工培养蛹虫草子实体中虫草酸微波提取的优化工艺条件为:微波功率 555 W,液固比 35 mL/g,提取时间 4 min,提取 2 次,虫草酸提取率的理论值可达 84.45%。

**关键词:**蛹虫草;虫草酸;微波提取;响应曲面法

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

## Optimization of Microwave Extraction of Cordycepic Acid in Cultured *Cordyceps militaris* by Response Surface Methodology

DENG Li, HAN Tao, WANG Xiao-hong, PI Li, HAN Fa\*

Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

**Abstract:** This paper was aiming to optimize the microwave extraction of cordyceps acid from cultured *Cordyceps militaris*. On the basis of single-factor test, the effects of extraction duration, microwave power and the ratio of material to liquid on the extraction yield of cordyceps acid were investigated using response surface methodology. The results showed that the optimal conditions for the extraction of cordyceps acid were: microwave power of 555 W, the ratio material to liquid of 35 mL/g, extraction time of 4 min, with twice extraction. Under the optimal extraction conditions, the theoretical extraction rate of cordyceps acid was up to 84.45%.

**Key words:** *Cordyceps militaris*; cordycepic acid; microwave extraction; response surface methodology

蛹虫草 [*C. militaris* (L). Link] 又名北冬虫夏草。属于囊菌亚门、核菌纲、球壳目、麦角菌科、虫草属,世界上已发现虫草属真菌 350 多种,我国记录 61 种<sup>[1]</sup>。蛹虫草含有虫草素、虫草酸(甘露醇)、虫草多糖、维生素、蛋白质、超氧化物歧化酶、多种微量元素等化学成分<sup>[2,4]</sup>。

虫草酸即甘露醇,又称 D-甘露糖醇,分子式  $C_6H_{14}O_6$ ,分子量 182.17,是虫草的重要活性成分之一<sup>[5]</sup>。随着对虫草酸作用机理的认识不断深入,其临床用途越来越广泛,虫草酸已经应用于治疗颅内疾病、顽固心绞痛、消化系统疾病、肝脏疾病、泌尿系统疾病、眼科疾病、顽固性超高热以及中毒时导泻等<sup>[6,7]</sup>。由于甘露醇的化学稳定性好,具甜味又不

吸湿性,广泛用于抗癌药及维生素药片的赋形剂,也用于醒酒药和清凉剂等配方<sup>[8]</sup>,显示了虫草酸在医学领域具有广阔的应用空间。从蛹虫草中直接分离提取得到虫草酸并进一步应用于药剂、保健品等可为蛹虫草在有效活性成分方面的应用提供更广泛的空间,保证虫草酸来源的优质和可靠性。

近年来,研究人员对虫草酸的提取进行了工艺改进和优化,但是所得到的优化工艺均是在单因素或正交试验条件下获得的。响应面分析法(response surface methodology, RSM)是一种优化工艺条件的有效方法,可检查一个或多个响应变量与一系列试验变量之间的关系,确定试验因素及其交互作用在工艺过程中对指标响应值的影响,精确地表述因素和响应值之间的关系<sup>[9]</sup>。因此,将响应面分析的方法应用于人工培养蛹虫草子实体中虫草酸微波提取工艺的研究,建立得率与考察因素之间关系的数学模型,为工业化生产提供技术参数和理论依据是有必要的。

收稿日期: 2012-12-17 接受日期: 2013-05-16

基金项目: 中科院院地合作项目(Y12B031211); 科技部人员服务企业行动项目(2009GJG20004); 中科院科技支青项目(082B371211); 国家自然科学基金项目(31070475)

\* 通讯作者 E-mail: yige-wxh@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

N-1001 型旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司;KQ5200 DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;METTLER TOLEDO PL203 和 XS204 电子天平,瑞士梅特勒-托利多公司;P 70 D 17 TL-D5 微波炉,格兰仕微波炉电器有限公司;电热恒温水浴锅,布氏抽滤漏斗, Lary 300 紫外分光光度仪(美国);DHG-9070 A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司。

人工培养蛹虫草 CSM-8 菌株由西宁世峰生物科技有限公司提供。样品经微波干燥后,粉碎、过 60 目筛,加入无水乙醇脱脂。甘露醇对照品由国家标准物质研究中心提供。实验所用化学试剂均为分析纯。实验用水均为蒸馏水。

### 1.2 蛹虫草子实体中虫草酸分析测定方法

#### 1.2.1 蛹虫草子实体中虫草酸的提取及测定

用天平准确称取干燥后的子实体粉末 1.00 g,加入适量的超纯水后超声提取、离心、抽滤,浓缩后定容至 10 mL,静置,得到待测液。

比色法测定虫草酸含量。取待测溶液 1.00 mL 加入 1.00 mL 高碘酸钾溶液混匀,室温放置 10 min,加 2.00 mL 0.1% L-鼠李糖溶液以除去过多的高碘酸钾,混匀后加 4 mL 新鲜配制的 NaSH 试剂(150 g 醋酸铵 + 2.00 mL 冰醋酸 + 2.00 mL 乙酰丙酮,用蒸馏水稀释至 1000 mL),53℃ 水浴加热 15 min 使其呈色,冷却,在分光光度仪 415 nm 处,以蒸馏水作空白对照,测定吸光度值。

标准曲线:精确称取干燥至恒重的甘露醇标准品 50 mg,加蒸馏水 50 mL 配制成浓度 1 mg/mL 的虫草酸溶液,依次稀释,得系列浓度标准品溶液。按虫草酸含量测定方法操作,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制甘露醇标准曲线,得  $Y = 0.008X + 0.0203$ ,  $R^2 = 0.9995$ ,表明甘露醇在 10 ~ 50  $\mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性。

#### 1.2.2 虫草酸含量和提取率计算

虫草酸含量(%) = (被测液中虫草酸的浓度 × 待测液总体积) ÷ 称取的子实体质量

虫草酸提取率(%) = 被测液中虫草酸含量 ÷ 子实体样品中虫草酸含量(已有试验中测定得到微波干燥方法下子实体中的虫草酸含量为 6.74%)

### 1.3 方法

#### 1.3.1 单因素试验

主要考察微波时间、微波功率、液料比以及提取次数对人工蛹虫草子实体中虫草酸提取率的影响。按照 1.2.1 方法提取虫草酸,并计算提取率。

##### 1.3.1.1 微波时间对虫草酸提取率的影响

按提取基本条件,分别考察 2、3、4、5、6 min 对虫草酸提取率的影响。

##### 1.3.1.2 微波功率对虫草酸提取率的影响

按提取基本条件,分别考察微波为 200、400、500、600、700 W 对虫草酸提取率的影响。

##### 1.3.1.3 液固比对虫草酸提取率的影响

按提取基本条件,分别考察液固比 20、30、40、50 和 60 mL/g 对虫草酸提取率的影响。

##### 1.3.1.4 提取次数对虫草酸提取率的影响

按提取基本条件,分别考察提取次数为 1、2、3 次对虫草酸提取率的影响。

#### 1.3.2 响应曲面法试验

在单因素试验的基础上,选择对响应值(虫草酸提取率)有显著影响的因素,利用 Design Expert 软件对试验数据进行回归分析。每一变量的低、中、高水平分别以 -1、0、1 进行编码,模型选用二次方程  $Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2$ 。

其中  $Y$  为响应值(虫草素提取率),  $\beta_0$ 、 $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$ 、 $\beta_{12}$ 、 $\beta_{13}$ 、 $\beta_{23}$ 、 $\beta_{11}$ 、 $\beta_{22}$ 、 $\beta_{33}$  为方程系数,  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$  为自变量编码值。通过 Box-Behnken 设计和响应面分析来进一步考察提取时间、微波功率和液固比之间的相互影响,并确定微波法提取虫草酸的最佳工艺参数。

#### 1.3.3 优化工艺验证试验

按照响应曲面法确定的最佳提取工艺参数,对 100 g CSM-8 菌孢子实体粉末进行微波提取,取 500 mL 提取液浓缩成浓膏状,烘干,测定提取液中固形物和虫草酸的含量,并计算虫草酸的提取率。测定结束后将固形物重新用蒸馏水溶解并定容到 500 mL,放回到提取液中。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 提取时间对虫草酸提取率的影响

由图 1 见,在 2 ~ 4 min 内,虫草酸提取率随提取时间的延长提高比较明显,4 min 后开始下降。因此设定提取时间为 3 ~ 5 min。

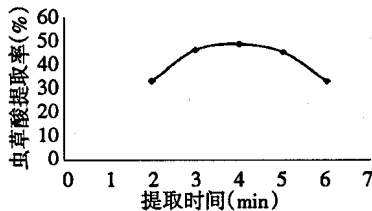


图1 提取时间对虫草酸提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction duration on cordyceps acid yield

### 2.1.2 微波功率对虫草酸提取率的影响

由图2见,在微波时间4 min内,随着功率的增加,蛹虫草多糖的提取率逐渐升高,在功率达到500 W之后,虫草酸的提取率变化不大,表明基本提取完全。因此设定微波功率为400~600 W。

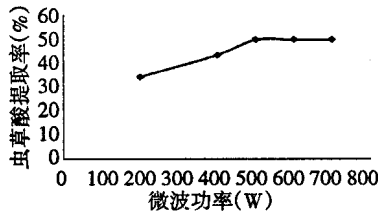


图2 微波功率对虫草酸提取率的影响

Fig. 2 Effect of microwave power on cordyceps acid yield

### 2.1.3 液固比对虫草酸提取率的影响

从图3见,随液固比的增大,虫草多糖的提取率不断升高,在液固比为20~40 mL/g时迅速升高,在50 mL/g时达到最大值,在50 mL/g以后提取率无明显增加,呈稳定趋势。因此,微波辅助提取法提取虫草多糖的液固比确定为30~50 mL/g。

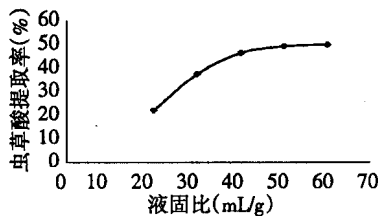


图3 液固比对虫草酸提取率的影响

Fig. 3 Effect of ratio of material to liquid on cordyceps acid yield

### 2.1.4 提取次数对虫草酸提取率的影响

在液固比50 mL/g、微波功率500 W、提取时间4 min的条件下,考察提取次数对虫草多糖提取率的影响,实验结果见图4,第一次提取率为35.92%,第二次提取后累计达48.00% (相对一次提取的结果增加比较显著),提取3次累计的提取率为48.01%,与提取2次的提取率间无差异。结合经济成

本核算考虑以提取2次为宜。

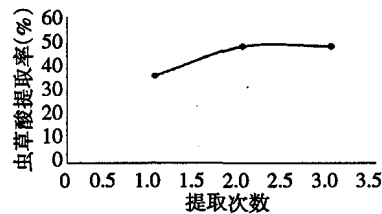


图4 提取次数对虫草酸提取率的影响

Fig. 4 Effect of times of extraction on cordyceps acid yield

## 2.2 响应曲面试验结果分析

### 2.2.1 响应曲面法分析因素的选取及分析方案

在单因素实验的基础上固定提取次数为3次,采用 Box-Behnken 设计方案,分别以微波功率、提取时间和液固比对应3个独立变量  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ ,并以-1、0、1 分别代表变量的水平。

$$X_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X}$$

对自变量进行编码(表1)。式中  $x_i$  为变量的编码值,  $X_i$  为变量的真实值,  $X_0$  为实验中心点变量的真实值,  $\Delta X$  为单变量增量,虫草酸提取率  $Y$  为响应值,实验方案及结果见表1和2。

### 2.2.2 实验结果分析

Box-Behnken 设计方案及虫草酸提取率的测定结果见表2。利用 Design Expert 软件对表2数据进行二次多元回归拟合,得到回归方程为:

$$Y = 82.12 + 21.05 x_1 + 9.38 x_2 + 3.79 x_3 + 4.20 x_1 x_2 - 5.60 x_1 x_3 - 6.89 x_2 x_3 - 19.30 x_1^2 - 16.27 x_2^2 - 10.14 x_3^2$$

对回归方程进行显著性检验及方差分析,结果见表3。由表3得出:模型的  $P < 0.0001$ ,表明模型极显著且失拟项不显著 ( $P = 0.3125 > 0.05$ ),相关系数  $R^2 = 0.9962$ ,说明模型拟合程度很好。模型的调整确定系数  $AdjR^2 = 0.9914$ ,说明该模型能解释99.14%的响应值的变化,可以用此模型对微波提取 CSM-8 菌株子实体中虫草酸提取率进行分析及预测。

模型回归方程的系数显著性检验如下:一次项 A ( $P < 0.0001$ )、B ( $P < 0.0001$ ),二次项  $A^2$  ( $P < 0.0001$ )、 $B^2$  ( $P < 0.0001$ )、 $C^2$  ( $P < 0.0001$ )均达到极显著水平,一次项 C ( $P = 0.0014 < 0.01$ )达到显著水平,表明微波功率、提取时间、液固比对虫草酸提取率有显著影响;二次项 AB ( $P = 0.0052 < 0.01$ )、AC ( $P = 0.0011 < 0.01$ )、BC ( $P = 0.0003$ )

<0.001),表明微波功率与提取时间、微波功率与液固比以及提取时间与液固比的交互作用对虫草酸提取率的影响显著。

表1 实验因素水平及编码

Table 1 Levels and codes of variable chose for Box-Behnken design

因素 Independent variables	编码 Symbols	编码水平 Coded levels		
		-1	0	1
微波功率 microwave power(W)	$x_1$	400	500	600
提取时间 extraction ime(min)	$x_2$	3	4	5
液固比 Solvent-material ratio(mL/g)	$x_3$	30	40	50

利用 Design Expert 7.0.0 软件对表 3 数据进行二次多元回归拟合,所得到的二次回归方程的响应面及其等高线见图 5.6 和 7。

由图 5 可看出,提取时间和微波功率的交互作用对虫草酸提取的影响较显著,表现为曲面较陡,响应值随微波功率的变化率大于随提取时间的变化率,说明微波功率对提取率的影响大于提取时间;液固比固定时,虫草酸提取率随微波功率的增大而升高,当微波功率达到 550 W 后,提取率增长缓慢并趋于平缓;虫草酸提取率水提取时间的延长先升高后降低,呈抛物线趋势。由图 6 可看出,微波功率和

表2 Box-Behnken 设计方案及虫草酸提取率的测定值

Table 2 Box-Behnken design and the responses of the total cordyceps acid yield

实验号 No.	微波功率 Microwave power(W)	液固比 Solvent-material ratio(mL/g)	提取时间 Extraction time(min)	虫草酸 提取率 Cordycepic acid yield(%)
1	-1	-1	0	19.79
2	1	-1	0	52.03
3	-1	1	0	32.67
4	1	1	0	81.71
5	-1	0	-1	21.39
6	1	0	-1	76.14
7	-1	0	1	40.40
8	1	0	1	72.76
9	0	-1	-1	37.03
10	0	1	-1	67.05
11	0	-1	1	58.16
12	0	1	1	60.61
13	0	0	0	83.70
14	0	0	0	82.67
15	0	0	0	81.65
16	0	0	0	83.46
17	0	0	0	79.13

表3 回归模型的方差分析

Table 3 ANOVA analysis for response surface quadratic model

方差来源 Sources of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 model	8200.56	9	911.17	206.59	<0.0001	***
A	3543.84	1	3543.84	803.49	<0.0001	***
B	703.41	1	703.41	159.48	<0.0001	***
C	114.77	1	114.77	26.02	0.0014	**

AB	70.55	1	70.55	16.00	0.0052	**
AC	125.43	1	125.43	28.44	0.0011	**
BC	190.16	1	190.16	43.12	0.0003	***
A <sup>2</sup>	1569.12	1	1569.12	355.77	<0.0001	***
B <sup>2</sup>	1114.08	1	1114.08	252.59	<0.0001	***
C <sup>2</sup>	433.30	1	433.30	98.24	<0.0001	***
残差 residuals	30.87	7	4.41			
失拟度 Lack of fit degree	17.09	3	5.70	1.65	0.3125	-
纯误差 Pure error	13.79	4	3.45			
总离差 Total Deviation	8231.43	16				

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , -  $P > 0.05$

液固比的交互作用对虫草酸提取率的影响较显著;响应值随微波功率的变化率大于液固比,说明微波功率对虫草酸提取率的影响大于液固比;虫草酸提取率随液固比的增长而缓慢增长,当液固比为 40 ~ 50 mL/g 时,虫草酸提取率基本没有变化。由图 7 可看出,液固比和提取时间的交互作用对虫草提取率的影响极显著,表现为曲面较陡;响应值随提取时

间的变化率大于液固比,说明提取时间对虫草酸提取率的影响大于液固比;虫草酸提取率随液固比和提取时间的增大而增大,并慢慢趋于平缓。

利用 Design Expert 7.0.0 软件对回归模型进行进一步的典型性分析,得到最优提取工艺条件为:微波功率 555 W,液固比 35 mL/g,提取时间 4 min,提取 2 次,虫草酸提取率的理论值可达 84.45%。

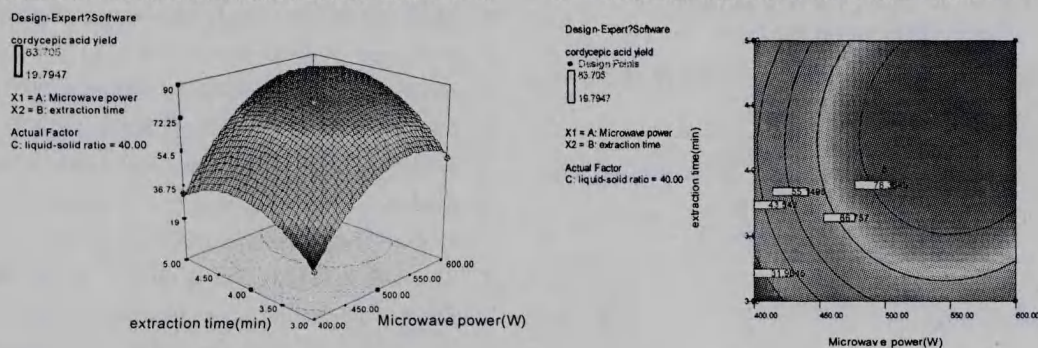


图 5 微波功率和提取时间影响虫草酸提取率的等值线与响应面

Fig. 5 Response surface plots (3-D) and contour plots (2-D) showing the effects of variables ( $X_1$ : microwave power;  $X_2$ : extraction duration) on the response  $Y$

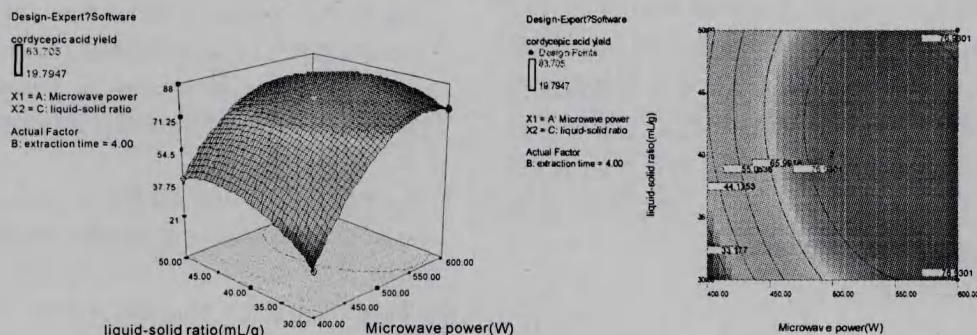


图 6 微波功率和液固比影响虫草酸提取率的等值线与响应面

Fig. 6 Response surface plots (3-D) and contour plots (2-D) showing the effects of variables ( $X_1$ : microwave power;  $X_3$ : solvent-material ratio) on the response  $Y$



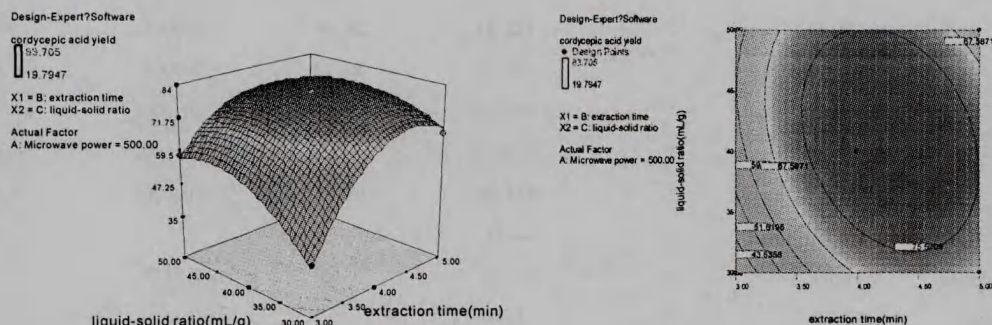


图7 提取时间和液固比影响虫草酸提取率的等值线与响应面

Fig. 7 Response surface plots (3-D) and contour plots (2-D) showing the effects of variables ( $X_2$ : extraction duration;  $X_3$ : solvent-material ratio) on the response Y

### 2.3 验证实验结果

最优工艺条件的验证实验结果如表4所示,3次重复实验的平均值为85.77%,略高于预测值, RSD = 0.67%,表明二次多项式建立的数学模型具有良好的预测性,所选工艺条件重现性好。

表4 验证实验结果( $n=3$ )

Table 4 Verification of optimal extraction conditions for the total cordycepic acid yield

实验编号 No.	CSM-8 菌株		
	虫草酸提取率 Cordycepic acid yield (%)	平均值 Average value (%)	RSD (%)
1	85.23		
2	86.37	85.77	0.67
3	85.72		

### 3 结论

本研究根据中心组合(Box-Benhnken)试验设计原理,应用响应面分析方法优化提取时间、微波功率和液固比对人工培养蛹虫草子实体中虫草酸微波提取的工艺条件。结果表明,微波提取人工培养蛹虫草子实体中虫草酸的最佳工艺条件为微波功率555 W,液固比35 mL/g,提取时间4 min,提取2次,虫草酸提取率的理论值可达84.45%。

#### 参考文献

1 Liang ZQ (梁宗琦). A corroboration of the anamorph of *Cordyceps militaris*-*Paecilomyces militaris* Liang sp. nov. *Ac-*

*ta Edulis Fungi* (食用菌学报), 2001, 8(4): 28-32.

- Wang JF (王建芳), Yang CQ (杨春清). Summary on effective constituent and pharmacological action of *Cordyceps cicadae*. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 2005, 22(5): 30-32.
- Zhang ZJ (张志军). Study on new type effective ingredients of cultured *Cordyceps militaris* SY-(12). Qingdao: Ocean University of China (中国海洋大学), MSc. 2007.
- Cai YH (蔡友华), Fan WX (范文霞), Liu XM (刘学铭), et al. Determination of cordycepic acid content in the mycelia of *Cordyceps brasiliensis* Henn by colorimetry. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2008, 25: 76-79.
- Zhu MW (朱明伟), Wen L (温鲁), Wei P (魏鹏), et al. Effect of different liquid culture media on the contents of polysaccharide and cordycepic acid in *Cordyceps militaris*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2008, 36: 573-574, 596.
- Gu ZY (顾振宇), Wu XM (吴雪美), Zhang H (张虹). Determination of cordycepin and cordycepic acid in *Cordyceps sinensis* by high-performance liquid chromatography. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2007, 7: 144-148.
- Lei BX (雷帮星), Gao HB (高海波), Shui XB (税小波), et al. Determination of mannitol in fermented mycelia of *Cordyceps gummii*. *J Fungal Res* (菌物研究), 2004, 2: 40-44.
- Sun CX (孙成秀), Liao JL (廖记录), Long XH (龙小慧), et al. New clinical uses of mannitol. *New Med* (新医学), 1996, 27: 41-42.
- Wang YF (王永菲), Wang CG (王成国). The application of response surface methodology. *J Minzu Univ China, Nat Sci Edn* (中央民族大学学报, 自科版), 2005, 14: 236-240.