

复合酶解法优化黄精多糖提取工艺

苑璐¹, 冷凯良², 周余航³, 周三^{*1}

(1. 青岛大学药学院, 山东 青岛 266021; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 采用复合酶解法优化黄精多糖提取工艺, 苯酚-浓硫酸显色法测定黄精多糖质量浓度, 以黄精多糖提取率为指标, 对复合酶种类和配比进行筛选后, 在单因素试验基础上, 考察酶解温度、pH、料液比、加酶量对提取率的影响, 并通过正交试验进行优化。结果表明, 复合酶提取优于单酶提取和普通水提。酶用量配比为纤维素酶:木瓜蛋白酶=3:7。酶解最佳条件为:pH值5.0, 酶解温度50℃, 料液比(g/mL)1:20, 加酶量1.5 g/dL, 即纤维素酶0.45 g/dL, 木瓜蛋白酶1.05 g/dL, 酶解2 h后, 沸水浸提2 h。在此工艺条件下, 黄精多糖提取率可达21.55%, 是普通水提法得率的2.75倍, 比单酶水解高出12.06%。

关键词: 黄精; 多糖; 复合酶提取; 正交试验

中图分类号: TS 244.1 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)09-0996-06

Optimization of Multi-Enzymatic Extraction Process of Polysaccharide from *Polygonatum sibiricum*

YUAN Lu¹, LENG Kailiang², ZHOU Yuhang³, ZHOU San^{*1}

(1. School of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao 266021, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: Method of multi-enzyme was used to optimize the extraction process of polysaccharide from *Polygonatum sibiricum*, phenol-sulfuric acid colorimetric method was applied to determine the content of polysaccharide, defined the polysaccharide extraction rate as the index to choose the kind and ratio of enzymes, the experimental factors were selected by single factor trials such as enzymatic hydrolysis temperature, pH, the rate of material to solvent, the amount of enzyme concentration, the important ones of which would be chosen to optimize by orthogonal test. Results showed that multi-enzyme extraction was better than extraction by single-enzyme or water. The rate of cellulose to papain was 3 to 7. The optimum enzymolysis conditions were as following: pH value of 5.0, temperature of 50℃, the rate of material to solvent was 1 to 20, the amount of enzyme concentration was 1.5%, which was 0.45% of cellulose and 1.05% of papain, 2 hour-hot water extraction after 2

收稿日期: 2015-04-09

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(2005BS08011)。

* 通信作者: 周三(1966—), 男, 山东济南人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事生药资源与植物化学方面的研究。

E-mail: zhousan@qdu.edu.cn

引用本文: 苑璐, 冷凯良, 周余航, 等. 复合酶解法优化黄精多糖提取工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(09): 996-1001.

hour-enzymatic hydrolysis. In this condition, the maximum polysaccharide rate was 21.55%, which was 2.75 times as high as water, and had 12.6% higher than that of single factor trials.

Keywords: *Polygonatum sibiricum* Red, polysaccharide, multi-enzymatic extraction, orthogonal test

黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.),为百合科一种重要的药食同源的植物,俗称鸡头黄精、老虎姜和鸡爪参等,其根茎作为大宗常用药材,收载于《中国药典》2010年版(一部)^[1]。其成分丰富,有黄精多糖、薯蓣皂苷^[2]、毛地黄糖苷、黄酮类、生物碱、醌类、木脂素等。而黄精多糖(*polygonatum sibiricum* polysaccharides, PSP)被认为是黄精最主要的功能性成分,具有抗氧化、降血糖、降血脂、预防动脉粥样硬化、保护心脑血管等重要的药理活性^[3]。传统的黄精多糖提取方式主要为热水浸提醇沉法、超声辅助提取和酸碱提取法^[4],但这些方法提取效率低、耗时长,不仅可能对多糖分子提取不完全,而且可能会破坏其结构,浪费成本。

近年来随着生物化学技术飞速发展,新的辅助多糖提取方法逐渐完善增多。其中酶法提取多糖也开始广泛应用于中草药多糖的提取。酶解辅助提取法具有反应温度低、效率高、无污染等优点,能够降低体系中的活化能,使反应在比较温和的条件下分解植物组织,加速多糖的释放或提取,其中应用较广的有纤维素酶、蛋白酶、果胶酶和相关的复合酶。由于植物细胞的细胞壁主要由纤维素组成,纤维素酶可以将其水解为葡萄糖,使其内容物更容易被溶解和提取出来,同时纤维素酶只破坏细胞壁,而细胞内部物质不含有纤维素类物质,因此不会影响其内容物的成分结构^[5]。黄精多糖分子在细胞中多以糖蛋白的形式与蛋白质分子结合,因此选用不同种类的蛋白酶将蛋白质分子水解,也可以帮助多糖分子的溶出和提取。果胶酶本质上是聚半乳糖醛酸水解酶,它能够降解细胞间的果胶质,使细胞得到更好的分离。

目前,已有酶解提取黄精多糖提取工艺研究的报道^[6-7],但均采用单一酶种辅助提取,由于不同的酶作用结合位点的不同,现多采用复合酶解,作用效率更高,而黄精多糖这方面的研究很少。作者以多糖提取率为考察指标,对复合酶种类和配比进行筛选,采用正交试验对复合酶解工艺进行优化,以

期提高黄精多糖的提取效率,为工业化生产和临床应用提供研究依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与器材

KQ-600DE 型数控超声波清洗仪:江苏昆山;旋转蒸发仪:上海爱朗;CA-1111 型冷却水循环装置:上海爱朗;TU-1810 型紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器;DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱:上海三发;AL-104 型电子天平:梅特利-托利多;DK-S22 型电热恒温水浴锅:上海精宏;SHZ-III 型循环水真空泵:上海亚荣;SHZ-82 型恒温振荡器:常州国华;FW100 型高速万能粉碎机:天津泰斯特;PHS-25 型 pH 计:上海仪电;冷冻干燥机:北京博医康;TD5A-WS 型台式低速离心机:湖南湘仪;XW-80A 旋涡混合器:上海精科。

1.2 材料与试剂

黄精材料产地为湖南,购于吉林敖东药业,经青岛大学医学院药学院鉴定为百合科黄精属黄精根茎。

葡萄糖标准品:中国药品生物制品鉴定所,批号 1539-2000001;石油醚(60~90℃沸程):国药集团;木瓜蛋白酶(酶活力 $\geq 150\ 000$ U/g):南宁庞博生物;纤维素酶(酶活力 $\geq 150\ 000$ U/g):宁夏和氏璧;果胶酶(酶活力 $\geq 50\ 000$ U/g):宁夏和氏璧;苯酚、硫酸、乙醇等化学试剂:均为分析纯,国药集团;实验用水为纯净水:娃哈哈水站购买。

1.3 方法

1.3.1 粗多糖的提取工艺 黄精粉末 60℃干燥至恒重→加入 50 mL 石油醚,40℃超声提取 30 min,脱脂,过滤,药渣挥干溶剂(复合酶水溶液 40℃活化 10 min)→加入复合酶于 50℃、pH 5.0 环境下酶解 120 min→迅速升温至 100℃,沸水浴提取 2 h→过滤,药渣采用热水洗涤 3 次→浓缩、醇沉→无水乙醇、丙酮、乙醚分别洗涤、脱蛋白→冷冻干燥,计算多糖质量浓度。

1.3.2 多糖质量浓度测定方法的确定 参照药典^[1],精密称取 105 ℃下干燥至恒质量的葡萄糖标准品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即 1.0 mg/mL 葡萄糖的对照品溶液,于 4 ℃冷藏备用。分别精密吸取 0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00 mL 对照液于试管中,加水定容至 100 mL。各取配制的标准溶液 2 mL,分别精确加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5.0 mL,5 min 沸水浴,冷却。经紫外-可见分光光度计在 400~600 nm 范围内扫描,确定多糖提取液和对照液最大吸收波长均在 490 nm 处,因此将其确定为检测波长。以试剂空白为对照,于 490 nm 处测定吸光度值 A。对照品溶液质量浓度在 0~0.10 mg/mL 范围内与吸光度呈现良好的线性关系。以吸光值 A 值为纵坐标,以相应具塞试管中葡萄糖(mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。经精密性、稳定性、重现性、回收率验证实验,结果确定苯酚-硫酸法为黄精多糖质量浓度测定的方法。回归方程为 $y=14.705x-0.0836$ ($R^2=0.9977$)。

1.3.3 黄精得率的计算方法

$$\text{黄精多糖得率} = \frac{\text{多糖质量浓度} \times \text{样品液量}}{\text{样品干质量}} \times 100\%$$

1.3.4 复合酶种类的筛选 选取纤维素酶、果胶酶和木瓜蛋白酶进行复合酶解实验,在相同的加酶量、质量配比和酶解时间的前提下,在各自的最适温度、pH 下,同时加入单酶和多种酶的方式,以多糖提取率为考察指标,探讨酶种类对酶解效率的影响。

1.3.5 复合酶用量配比试验 根据酶种筛选试验结果,使总加酶量固定为 2 500 U/g,分别按照 1:4, 3:7, 2:3, 1:1, 3:2, 7:3, 4:1 的配比,研究效果较好的两种酶制剂的酶解效果,其中 pH 为 5.0,固液比为 1:15,温度为 50 ℃。

1.3.6 复合酶解单因素实验设计 根据复合酶最佳配比结果,分别选取总加酶量、酶解时间、pH、温度、提取方式、料液比为考察因素,多糖提取率为考察指标,在单因素试验的基础上探讨最适宜酶解条件。

1.3.7 最佳复合酶配比组合酶解条件的正交试验设计 根据复合酶最佳用量配比结果,选取 pH、温度和料液比为考察因素,以多糖提取率为考察指标,按照表 1 进行三因素三水平的 L_93^3 正交试验。

表 1 复合酶提取工艺正交试验的因素与水平

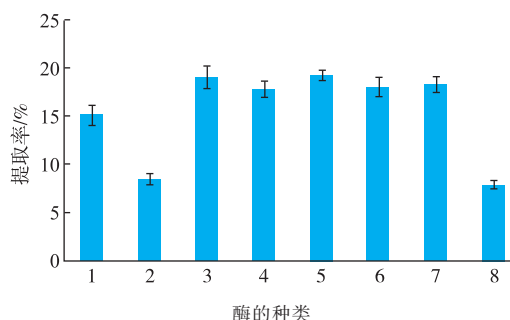
Table 1 Factors and levels of orthogonal test for composite enzyme extraction process

水平	A pH	B 温度/℃	C 料液比/(g:mL)
1	4.5	45	1:10
2	5.0	50	1:15
3	5.5	55	1:20

2 结果与分析

2.1 复合酶种类的筛选结果

由图 1 可知,采用纤维素酶和木瓜蛋白酶提取黄精多糖时,提取率与普通水提组相比,差异具有显著性,可能是由于植物根茎中多糖多是以糖蛋白形式存在,因此采用木瓜蛋白酶能够很好的将糖分子与蛋白质分离;而在提取过程中,细胞质壁往往会因为结构难以完全破坏而影响提取效果,因此纤维素酶可以有效地解决这个问题;果胶酶差异不大的原因可能在于本次所用的材料为植物根茎,胶质含量低,因而效果不明显。而木瓜蛋白酶和纤维素酶一起添加时的水解效率比单酶水解效率要高,因此在后续试验中,选用木瓜蛋白酶和纤维素酶作为研究目标进行条件优化。



1: 纤维素酶; 2: 果胶酶; 3: 木瓜蛋白酶; 4: 纤维素酶+果胶酶; 5: 纤维素酶+木瓜蛋白酶; 6: 果胶酶+木瓜蛋白酶; 7: 纤维素酶+果胶酶+木瓜蛋白酶; 8: 普通水提法。

图 1 复合酶解种类筛选结果

Fig. 1 Effects of the variety screening of compound enzyme digestion

2.2 复合酶用量配比试验结果

由图 2 可知,纤维素酶与木瓜蛋白酶酶活力比值为 3:7 时,黄精多糖的提取率最高达 20.69%,因此在后续试验中确定酶活力比值为纤维素酶:木瓜蛋白酶=3:7,即纤维素酶约为 0.50 g/dL,木瓜蛋白酶约为 1.17 g/dL,加酶方式为称取一定量的酶配成酶

溶液于 40 ℃中活化 10 min,酶解过程中分两次加入。

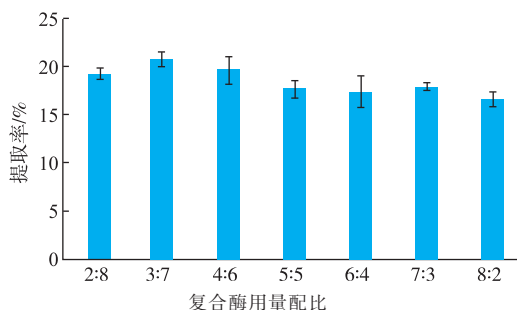


图 2 复合酶解用量配比结果

Fig. 2 Effects of the ratio on the compound enzyme

2.3 复合酶解单因素试验结果

2.3.1 加酶量 由图 3 可知,在加酶量由 0.5 g/dL 增加到 1.5 g/dL 过程中,黄精多糖的提取率随之增高;而随着加酶量的继续增加,酶解效率却出现了下降的趋势,原因可能是竞争性抑制作用使酶解效率降低。因此将总加酶量确定为 1.5 g/dL,纤维素酶:木瓜蛋白酶=3:7,即纤维素酶为 0.45 g/dL,木瓜蛋白酶为 1.05 g/dL。

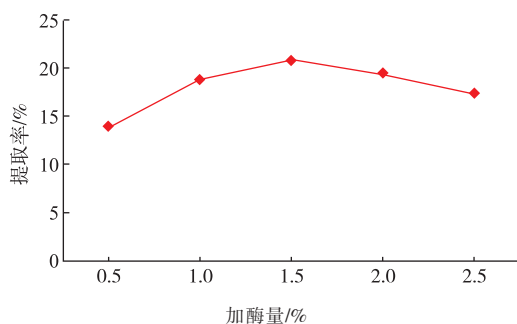


图 3 不同的加酶量对黄精多糖提取率的影响

Fig. 3 Effects of different amounts of compound enzyme on polysaccharide extraction yield

2.3.2 酶解 pH 值 由图 4 可知,pH 作为影响纤维素酶和木瓜蛋白酶的酶解效率的重要因子,在复合酶解时也有不同的影响结果。在 pH 为 5.0 时提取率达到最高,约为 19.61%,而在其他不同的 pH 变化条件下提取率均有不同程度的降低。因此在后续试验中选取 pH 为 5.0 左右进行研究。

2.3.3 酶解温度 由图 5 可知,温度为 50 ℃时复合酶的酶解效率相对其他温度较高,此时黄精多糖的提取率为 19.92%,而随着温度继续升高,会导致酶活性的丧失而使提取率逐步下降。

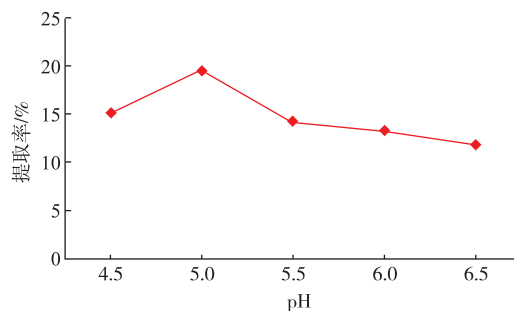


图 4 不同 pH 对黄精多糖提取率的影响

Fig. 4 Effects of pH on polysaccharide extraction yield

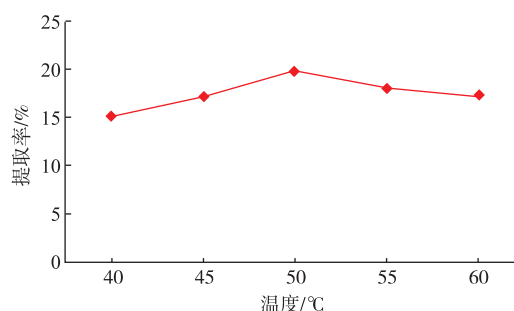


图 5 不同酶解温度对于黄精多糖提取率的影响

Fig. 5 Effects of temperature on polysaccharide extraction yield

2.3.4 料液比 由图 6 可知,随着酶解过程中料液比的增加,黄精多糖的提取率呈上升趋势,可能是由于浸提液的增多不仅可以增加纤维素酶和木瓜蛋白酶与底物的结合面积,而且会加速多糖分子的溶出,但是在 1:20 之后提取率逐渐趋于平缓,原因是酶与底物结合达到空间饱和,此时多糖分子也能够较大程度的溶出,因此将 1:20 作为中心水平进行后续试验的优化条件。

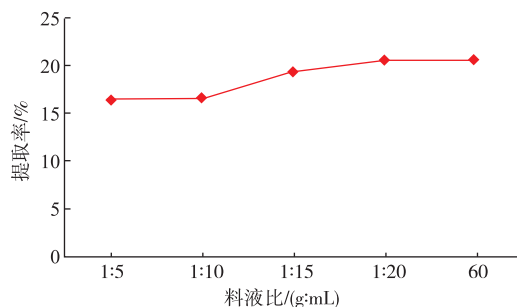


图 6 不同料液比对黄精多糖提取率的影响

Fig. 6 Effects of ratio of solid to liquid on polysaccharide extraction yield

2.4 酶解条件正交实验及方差分析结果

复合酶解正交试验及方差分析结果见表 2-3。

可以看出,各因素对于黄精多糖提取率的影响顺序为 $A > C > B$, 即 pH 值 > 料液比 > 温度; 最佳酶解条件为 $A_2B_2C_3$, 即 pH 值为 5.0, 酶解温度为 50 ℃, 料液比为 1:20。而表 3 的结果表明, $F_A > F_C > F_B$, 与极差 R 的分析结果相同; 但是三个因素对于得率的影响均不显著, 可能是因为本次试验中误差较大、自由度小, 降低了检验的灵敏度, 掩盖了考察因素的显著性。因此根据以上结果, 最终将复合酶解工艺条件最终确定为 pH 值 5.0, 酶解温度 50 ℃, 料液比 1:20, 加酶量为 1.5 g/dL, 酶解 2 h 后, 沸水浸提 2 h。

表 2 复合酶解正交试验结果

Table 2 Composite enzyme orthogonal experiment results

试验号	因素				黄精多糖提取率/%
	A	B	C	D(空列)	
1	1	1	1	1	15.22
2	1	2	2	2	17.67
3	1	3	3	3	17.32
4	2	1	2	3	18.84
5	2	2	3	1	21.09
6	2	3	1	2	17.28
7	3	1	3	2	18.09
8	3	2	1	3	18.64
9	3	3	2	1	19.96
k_1	16.74	17.38	17.05	18.76	
k_2	19.07	19.13	18.82	17.68	
k_3	18.90	18.19	18.83	18.27	
R	2.33	1.75	1.79	1.08	

2.5 验证试验

基于最优的提取条件, 实际进行三组平行测定, 取多糖提取率平均值为 21.55%, 与表 2 中最高

提取率的相对误差为 2.18%, 证明此优化工艺条件是重复可行的。

3 结 语

以提高黄精提取率为目标, 通过对单一酶和复合酶种类的筛选, 确定了以纤维素酶和木瓜蛋白酶为研究对象的提取工艺。优化后的复合酶提取法优于单酶提取和普通水提, 酶用量配比为纤维素酶:木瓜蛋白酶=3:7, 酶解最佳条件为: pH 5.0, 酶解温度 50 ℃, 料液比 1:20, 加酶量为 1.5 g/dL, 即纤维素酶为 0.45 g/dL, 木瓜蛋白酶为 1.05 g/dL, 酶解 2 h 后, 沸水浸提 2 h。在此工艺条件下, 黄精多糖提取率可达 21.55%, 是普通水提法得率的 2.75 倍, 与单酶水解率相比, RSD 为 12.06%, 与李智慧等人^[6]优化的纤维素酶提取方法相比, 提取率提高了 5.25%。但在正交条件优化酶解工艺过程中, 选取的各因素对于提取率影响不大, 可能是黄精多糖的提取已经较完全, 也说明通过考虑进一步优化酶解条件来提高黄精多糖的得率是不可行的。而有其他研究表明^[8-9], 在复合酶解过程中, 由于不同的水解酶的最适温度与最适 pH 的条件是不同的, 因此如果改变加酶的方式, 如分步加酶或同步加酶可能对提取率有不同的影响, 这个有待进一步研究。另外在酶解过程后, 醇沉步骤可能不能将灭活的酶都纯化掉, 因此如何制备更高纯度的黄精多糖也值得进一步探讨。而陈莉^[10]在探讨茯苓多糖提取工艺时认为, 酶解后热水浸提的工艺同样影响了多糖的溶出速率, 并对其进行了优化, 这或许可以为黄精多糖的提取提供思路。

表 3 正交试验方差分析结果

Table 3 Orthogonal experiment results of variance analysis

因素	SS	df	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.1}$	显著性
A	10.140 1	2	5.070 0	5.816 0	19	9	NS
B	4.604 0	2	2.302 0	2.640 7	19	9	NS
C	6.348 8	2	3.174 4	3.641 4	19	9	NS
D(误差)	1.743 5	2	0.871 7				

注: NSP>0.1

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 288.
- [2] WANG Dongmei, ZHU Wei, ZHANG Cunli, et al. Research advances in chemical constituents and biological activity of *Polygonatum sibiricum*[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2006(2): 142-145. (in Chinese)

- [3] YUAN Lu, XUE Jie, ZHOU San, et al. Optimization of extraction process of total saponins from polygonati rhizoma produced in mountain lao by response surface analysis[J]. **Food and Drug**, 2015, 17(1): 9-13. (in Chinese)
- [4] 侯双菊. 黄精多糖的提取工艺及提取液树脂法脱色的研究[D]. 安徽:合肥工业大学, 2006.
- [5] BI Yongguang, QIU Taiqiu LI Kunping, et al. Cellulase enzymatic extraction of total flavonoids of astragalus technology[J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**, 2009, 20(10): 2478-2480. (in Chinese)
- [6] 郑春艳. 九华山多花黄精皂苷和多糖的分离与纯化[D]. 安徽:安徽师范大学, 2010-05.
- [7] LI Zhihui, HUANG Shan, YU Na, et al. Optimal extraction of polysaccharides polygonatum by cellulase with central composite design-response surface methodology[J]. **Chemical Industry and Engineering**, 2011, 28(4): 44-48. (in Chinese)
- [8] ZHAO Qiancheng, TENG Zhao, WANG Qiukuan, et al. Laminaria polysaccharides extraction by compound enzymes[J]. **Journal of Shenyang Agricultural University**, 2007, 38(2): 220-223. (in Chinese)
- [9] ZHOU Yanhua, MA Meihu, CAI Zhaoxia, et al. Quadratic orthogonal rotation combination design-based optimization of enzymatic production of polypeptides from soluble eggshell membrane protein[J]. **Food Science**, 2010, 31(4): 92-97. (in Chinese)
- [10] CHEN Li, YU Jianping. Optimization of Fuling (*Poria cocos*) polysaccharides extraction technology[J]. **Food Science**, 2007, 28(5): 136-139. (in Chinese)

科技信息

美国批准“豆油产品预防心血管疾病风险”健康功能声称

2017年7月21日,美国食品药品监督管理局(FDA)批准“豆油产品预防心血管疾病风险”健康功能声称(FDA-2016-Q-0995)。该健康声称由纽约邦基(Bunge Limited)有限公司于2016年2月8日提交。

FDA称“经过对申请材料数据和相关科研数据综合评价,在保证相关用语恰当和不误导消费者情况下,有关豆油产品中不饱和脂肪酸(UFA)能够预防心血管疾病(CHD)风险的健康声称具有科学依据,可以标注。”

[信息来源]食品伙伴网. 美国批准“豆油产品预防心血管疾病风险”健康功能声称[EB/OL]. (2017-8-23). <http://news.foodmate.net/2017/08/439148.html>

美国FDA评估夏威夷果与冠心病的健康声称

食品伙伴网讯 据美国食品药品监督管理局(FDA)消息,2017年7月24日美国FDA发布消息称,夏威夷果与冠心病的健康声称已完成评估,认为食用夏威夷果与冠心病风险降低存在一定的关联。

生产企业可以宣称:“支持性而非结论性研究表明,每天食用1.5g夏威夷果作为低饱和脂肪膳食的一部分,在确保饱和脂肪或者热量摄入量不增加的前提下,可能会降低冠心病的发病风险。脂肪含量见营养信息。”

Royal Hawaiian Macadamia Nut, Inc. 提交了本次健康声称申请。

美国FDA认为,本次健康声称被科学证据所支持,然而并不符合FDA认可健康声称所要求严格意义上的“重大科学一致”标准。鉴于此,夏威夷果标签应该附带免责声明或者合理的语言,以保证该声称的科学性证据被准确传达。

[信息来源]食品伙伴网. 美国FDA评估夏威夷果与冠心病的健康声称[EB/OL]. (2017-7-28). <http://news.foodmate.net/2017/07/437813.html>