

文章编号:1673-1689(2008)06-0018-05

提取方法对柿多糖提取率及生物活性的影响

张雅利¹, 梁花香², 曹娜¹

(1. 西安交通大学 教育部生物医学信息工程重点实验室, 陕西 西安 710049; 2. 西安财经学院 医院, 陕西 西安 710061)

摘要: 分别以水、草酸(质量分数为 1.8%)、氢氧化钠(0.2 mol/L)作浸提剂, 用热水、微波(中火, 6 min)、超声波(600 W, 15 min)和反复冻融法提取柿子粗多糖, 对不同提取方法获得的多糖进行纯化、测多糖得率、观察细胞形态变化, 进行抗氧化、抗菌性比较。结果表明: 不同提取剂和提取方法对于植物细胞的形态都有不同程度的破坏, 反复冻融细胞破碎最彻底, 微波提取所得多糖含量最高。不同提取剂和提取方法获得的柿多糖在抗氧化和抗菌方面表现出较大差异, 说明提取的过程与其生物学效能密切相关。

关键词: 柿子; 多糖; 提取方法; 细胞形态; 抗氧化; 抗菌

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

Effect of Extraction Method on Yield and Bioactivities of Polysaccharide from Persimmon Fruit

ZHANG Ya-li¹, LIANG Hua-xiang², CAO Na¹

(1. Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of the Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; 2. Hospital of Xi'an University of Finance and Economics, Xi'an 71006, China)

Abstract: In the present research, in order to obtain six crude polysaccharides from persimmon fruit, detect its yield and compare by antioxidant and antibiosis activity, a process with hot water and 1.8% ethanedioic acid and 0.2mol/L NaOH and ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction and freeze thawing repeatedly assistance extraction, respectively, were developed. The residue of the persimmon fruit extracted by the different method were observed by microscope. The results showed that there is a great variation of the persimmon cell shape in different extraction medium and methods of polysaccharides, which the cell breakage by freeze thawing repeatedly is the most of significant. The polysaccharides of microwave-assisted extraction contained more yield than those of others. The antioxidant and antibiosis activity of the polysaccharides extracted with the different extraction medium and method has the significant deviation. In view of these results, the bioactivities of the water-soluble polysaccharides depended on the method that affected the profile and content of the extracts. The effects of extraction medium and method of the polysaccharides on the improvement of the bioactivities could not be negligible.

Key words: Persimmon; polysaccharide; extraction medium and method; cell shape; antioxidant; antibiosis

收稿日期: 2007-08-26.

基金项目: 国家自然科学基金项目(60178034).

作者简介: 张雅利(1972-), 女, 陕西武功人, 讲师, 在职博士研究生, 主要从事生物医学工程的研究. Email: yarlee@163.com

植物活性多糖的提取已有较多研究报道,目前常用的浸提方法主要有热水浸提、超声波辅助浸提、微波辅助浸提^[1]等。不同的提取条件除了对活性多糖的提取率有影响外,还会影响到多糖的组成、立体结构,进而影响到多糖的生物活性。作者以柿子为实验材料,研究水、酸、碱、微波、超声波以及反复冻融提取对柿子细胞形态的影响,以及不同提取方法下的多糖得率及多糖的抗氧化和体外抗菌活性变化等问题,以期筛选建立一种高效、经济的柿多糖提取方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

柿子,购于西安市场;总抗氧化能力试剂盒、抗超氧阴离子试剂盒、活性氧测定试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;其它试剂均为分析纯。

大肠杆菌(*Escheichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* Cohn),取自西安交通大学能动学院实验室;金黄色葡萄球菌(*Saphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*),取自西安交通大学医学院实验室;均采用牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2 实验仪器

美的 PJ21F-B 微波炉, BECKMAN 高速冷冻离心机, BECKMAN DW10-60E 型冷冻干燥机, BECKMAN-DU-640 型紫外可见分光光度计, 美国产 JY92-2D 超声波细胞破碎机, 显微镜等。

1.3 实验方法

1.3.1 多糖的提取、分离与纯化工艺流程 柿多糖的提取→乙醇沉淀→脱色→脱蛋白→透析→乙醇分级→柱层析纯化

1.3.2 不同提取溶剂对多糖提取量及活性的影响

取柿浆 10 g, 放入锥形瓶内, 分别加入 50 mL 超纯水、质量分数 1.8% 草酸溶液、0.2 mol/L NaOH 溶液, 在 90 °C 恒温水浴锅中浸提 4 h, 4 000 r/min 离心, 得上清液进行分离纯化, 分别制得热水浸提、酸提、碱提多糖样品。

1.3.3 不同辅助提取方法对多糖提取量及活性的影响

取柿浆 10 g, 加入 50 mL 水混匀, 分别进行以下处理: 1) 90 °C 恒温水浴锅中浸提 4 h; 2) 微波炉中以中火力采用微波辐射间断加热处理 6 min, 每次 10 s; 3) 600 W 的超声波处理, 间歇时间 2 s, 全程时间 15 min, 脉冲宽度 5 s; 4) 置于低温冰箱快速冷冻 3 h 后, 迅速取出投入沸水浴解冻, 反复进行 5 次, 然后在 90 °C 恒温水浴锅中浸提 4 h。离

得上清液进行分离纯化, 分别制得热水浸提、微波提取、超声波提取、反复冻融提取多糖样品。

1.3.4 不同提取处理后柿子细胞的观察 分别取上述不同处理得到的柿子提取液底部含有滤渣的混浊液制成显微玻片, 在显微镜下观察细胞形态并拍照记录。

1.3.5 柿子多糖含量的测定 苯酚-硫酸法^[2]。

1.3.6 抗氧化活性的测定 按照南京建成生物工程研究所检测试剂盒说明进行。

1.3.7 抗菌活性的测定 圆形纸片法^[3]。分别刮取供试菌菌苔于 5 mL 无菌水中, 振荡摇匀得菌悬液, 倒入融化并冷却至 40~45 °C 的相应培养基中, 摇匀后迅速分装于培养皿中, 待凝固后, 取已消毒过的圆形滤纸(6 mm)分别用移液枪注入多糖提取液 20 μL, 略干后贴于培养基平板上, 同时作溶剂空白对照。置恒温培养箱中 36~37 °C 培养 18~24 h 后分别观察结果, 测量抑菌圈直径(D)。以上步骤均按无菌条件操作, 每个样品设 3 个平行样, 结果取平均值。抑菌效果判断标准为: $D \leq 8$ mm 为不敏感, $8 \text{ mm} < D \leq 13 \text{ mm}$ 为低度敏感, $13 \text{ mm} < D \leq 19 \text{ mm}$ 为中度敏感, $D > 19 \text{ mm}$ 为高度敏感。

2 结果与分析

2.1 不同提取处理对柿子细胞形态的影响

不同提取处理对柿子细胞形态的影响非常显著, 具体结果见图 1-7。



图1 对照(提取前柿子细胞(×400))

Fig.1 Control

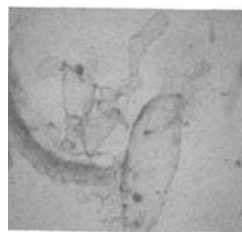


图2 水提取柿子细胞(×400)

Fig.2 Water extraction

图 3 酸提取柿子细胞($\times 400$)

Fig. 3 1.8% ethanedioic acid

图 4 碱提取柿子细胞($\times 400$)

Fig. 4 0.2 mol/L NaOH

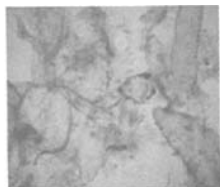
图 5 微波提取柿子细胞($\times 400$)

Fig. 5 Microwave-assisted extraction

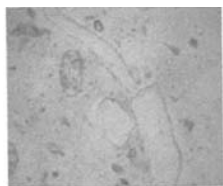
图 6 超声波提取柿子细胞($\times 400$)

Fig. 6 Ultrasound-assisted extraction

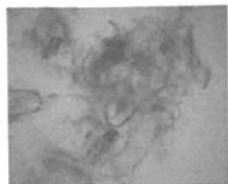
图 7 反复冻融提取柿子细胞($\times 400$)

Fig. 7 Freeze thawing repeatedly assistance extraction

原始的柿子细胞总体呈柱状,排列比较紧凑。以中性水作为提取剂,柿子细胞形状变得不规则,细胞排列不是很整齐,有部分内容物释放,但细胞壁的破坏并不是很明显,细胞混浊程度也不大;以质量分数 1.8% 的草酸溶液作为提取剂,图 3 中的

柿子细胞形状不规则,细胞壁的破损较严重,内容物释放较多,细胞的混浊程度较图 2 中的大一些,细胞排列相对整齐;以 0.2 mol/L NaOH 溶液作为提取剂,图 4 中已经看不到完整的细胞形态,内容物释放彻底,细胞的混浊程度很大,颜色也较深。结果表明,在酸性或碱性条件下细胞壁的破损都比中性条件下严重,内容物的溶出增多,但碱性条件可能引起了一些不良的反应,导致颜色加深。

采用微波辅助浸提,从图 5 可见,柿子细胞形状不规则,细胞壁的破损比一般的热直接浸提的严重,内容物释放也较多,细胞排列很不整齐;图 6 显示,超声波处理后柿子细胞形状比较规则,细胞壁的破损不很严重,但内容物释放较多,细胞的混浊程度不是很大,细胞排列比其它提取得到的整齐;采用反复冻融辅助提取,图 7 显示的柿子细胞已经没有分明的形状可辨,细胞壁的破碎相当严重,内容物基本彻底释放,细胞混浊,细胞排列很凌乱。总的来说,经过不同的提取处理以后细胞的形状多变为不规则的,细胞壁破碎程度不一,微波处理的较强,超声波处理的相对较弱。

提取试验中,6 种不同方法获得的柿多糖提取液颜色有着较大的差异,碱提液的颜色最深为暗褐色;微波提取液的颜色最浅为淡红色;水提液的颜色为粉红色;酸提液的颜色为褐色;超声波提取液相当粘稠,颜色也较深;反复冻融处理的提取液比水提液颜色稍深一些。不同提取方法得到的柿多糖提取液颜色的差异可能与柿多糖的种类和性质有关。

2.2 不同提取方法对多糖提取率的影响

从表 1 可看出,用水、酸、碱做提取液,柿多糖的得率有所差异。水溶性多糖的得率最高,酸溶性多糖的得率最低,这说明柿多糖在不同的提取液下,被释放的能力不同。用稀酸、稀碱提取时,透析前糖含量较高,透析后多糖的含量较低,这是因为稀酸、稀碱在提取过程中易使多糖中的糖苷键断裂,形成较多的单糖;碱提法中多糖物质的氧化加快,但是另一方面碱提法释放多糖物质的种类和量可能都比较多,所以在其得率上来说,碱提法高于酸提法但是低于水提法,因此浸提剂选择水。

热水对多糖提取率高于微波、超声波、反复冻融的提取率,这可能与多糖类成分在植物体内存在方式以及辅助萃取的原理有关。有效成分的溶出包括内扩散和外扩散,有效成分从细胞内克服阻力通过细胞壁为内扩散;而有效成分从细胞外到外部溶剂中的过程即外扩散。有研究者对植物生理的研究发现,多糖大多存在于植物细胞外部。由此可

知,外扩散在多糖溶出过程中起主导作用,而微波、超声波、反复冻融的作用主要在于影响细胞壁的通透性,即主要影响内扩散,较少影响多糖的溶出。并且微波作用过强、超声波功率过大时,细胞被破碎的同时,多糖的糖链都会被打断,多糖裂解后成小分子糖,可以通过透析除去,实际大分子片段多糖的得率会下降或活性受到影响。从结果可以看出,热水多糖样品的保留率最大^[4-7]。因此,在不同溶剂和辅助方法作用下,多糖分解程度大于热水提取。经过反复冻融处理后的柿浆进行水提取,得到较理想的提取率,而且反应条件温和,杂质易除去,能够保持多糖的立体结构和生物活性,不会产生不良的颜色反应,相比之下,是首选的柿多糖的提取法。但时间长,成本高。目前实验研究都处于很小规模,要用于大规模生产,还有待于进一步解决有关工程设备的放大问题。

表 1 不同提取方法对柿多糖提取率的影响

Tab.1 Effects of the different extraction medium and method on the yield of crude polysaccharides from persimmon

样品来源	提取条件	透析前糖体积分数/(μL/mL)	透析后糖体积分数/(μL/mL)	保留率/%
中性多糖	蒸馏水	9.515	4.434	46.6
酸提多糖	质量分数 1.8% 草酸	6.832	2.234	32.7
碱提多糖	0.2 mol/L NaOH	7.980	2.250	28.2
微波辅助提取	中火力、6 min	9.178	2.909	31.7
超声波辅助提取	600 W 15 min	8.941	3.093	34.6
反复冻融辅助提取	反复 5 次	8.594	3.317	38.6

2.3 不同提取方法对多糖抗氧化活性的影响

超氧自由基和羟基自由基是生物体内两种重要的自由基。羟自由基被认为是毒性很强的自由基,可介导许多病理变化,如能诱导膜系统脂质过氧化,引起各种重要酶的氧化损伤,尤其是·OH能与DNA上的胸腺嘧啶等碱基加成,生成的碱基自由基可相互结合或再通过O₂、O₂⁻等反应生成过氧化物,导致碱基破坏从而产生遗传突变^[8]。因此羟自由基的清除对于生物体具有重要意义。超氧自由基也是活性最强的自由基之一,它可以进一步产生出更多的、各种类型的、引起细胞损伤的自由基^[9-10]。根据表 2 可知,柿中性多糖对氧自由基和羟基自由基均有明显清除作用,总抗氧化活性也较高,且对羟基自由基清除作用更大,可减少甚至

避免强氧化剂对有机体的损伤,这表明,柿多糖具有一定的抗氧化能力,可以用于开发柿多糖药物与功能性食品,使之成为生物体生命活动中的能量与结构物质。柿中性多糖表现出较强的清除O₂·的作用。一般认为多糖清除活性氧的作用与其富含羟基有关,多糖分子上的还原性半缩醛羟基,可与氧化剂即活性氧自由基发生氧化还原作用。在一系列测试中,对超氧阴离子(O₂⁻·)的清除能力强,可能是柿多糖也可以自动氧化,产生新的有机自由基,使多糖本身产生的有机自由基与它清除的自由基达到平衡。在低浓度下,减少了多糖分子与自由基引发剂的反应概率^[11],从而充分发挥了柿多糖的抗氧化能力。对于·OH而言,可快速地攫取多糖碳氢链上的氢原子结合成水,而多糖的碳原子上则留下一个成单电子,成为碳自由基,进一步氧化形成过氧自由基,最后分解成对机体无害的产物^[12]。

表 2 不同提取方法对柿多糖抗氧化活性的影响

Tab.2 Effects of the different extraction medium and method on the antioxidant activity of crude polysaccharides from persimmon

样品来源	提取条件	总抗氧化能力/(U/mL)	抗超氧阴离子能力/(U/L)	抗活性氧能力/(U/ml)
中性多糖	蒸馏水	62.98	103.75	738.46
酸提多糖	质量分数 1.8% 草酸	48.83	67.87	465.19
碱提多糖	0.2 mol/L NaOH	57.14	51.76	742.63
微波辅助提取	中火力、6 min	25.00	74.31	706.13
超声波辅助提取	600 W 15 min	37.00	84.66	709.00
反复冻融辅助提取	反复 5 次	44.28	59.37	643.29

从表 2 也可看出,不同提取方式获得的柿多糖对氧自由基和羟基自由基的清除作用及总抗氧化能力也有明显的差异。在模拟人体中黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统产生O₂··的体系中,提取物的抗超氧阴离子能力由大到小顺序为水提取、超声波提取、微波提取、酸提、反复冻融辅助提取、碱提;在Fenton反应检测对羟基自由基的清除作用的体系中,提取物的抗活性氧活力由大到小顺序为碱提、水提取、超声波提取、微波提取、反复冻融辅助提取、酸提;利用测定对Fe³⁺→Fe²⁺的还原能力检测总抗氧化能力,结果表明提取物的总抗氧化能力值由大到小顺序为水提取、碱提、酸提、反复冻融辅助提取、超声波提取,微波提取。这些差异均与酸、碱、超声波、微波、反复冻融影响自由基的生成

有关。

2.4 不同提取方法对多糖抗菌性的影响

不同提取方法获得的多糖组分对供试的 5 种细菌都有抑制作用,质量浓度为 120 mg/mL 时,除中性多糖对绿脓杆菌的抑制作用较弱外,其他样品抑菌圈均大于 13 mm,属中度敏感,详见表 3。不同提取方法所获多糖对革兰氏阳性菌抑制作用由强到弱的顺序为:微波提取、超声波提取、反复冻融、碱提、酸提、水提取;不同提取方法所获多糖对革兰氏阴性菌抑制作用由强到弱的顺序为:微波提取、超声波提取、碱提、酸提、反复冻融、水提取。

表 3 不同提取方法获得多糖的抑菌圈直径

Tab.3 Effects of the different extraction medium and method on the antibiosis activity of crude polysaccharides from persimmon

细菌种类	中性多糖	酸提多糖	碱提多糖	微波辅助	超声辅助	反复冻融
金黄色葡萄球菌	14.80	15.01	15.33	16.74	15.06	16.29
表皮葡萄球菌	15.17	16.21	15.96	17.17	17.53	15.46
枯草芽孢杆菌	13.15	14.37	15.52	16.25	14.29	13.28
大肠杆菌	13.25	14.92	15.16	16.53	15.42	14.30
绿脓杆菌	10.08	13.06	13.62	14.22	13.66	13.25

对革兰氏阳性菌的抗菌活性比对革兰氏阴性菌的高,这是因为革兰氏阳性菌与阴性菌的细胞壁组成和厚薄不一样,革兰氏阴性菌细胞的壁薄,交联松散,有一层外脂膜,大分子水溶性成分较难进

入,只有小分子进入的机会较多;相对分子质量越小,越容易进入细胞壁的空隙结构内,干扰细胞的新陈代谢,达到抑菌目的。酸、碱、超声波、微波等处理时,会造成多糖成分中的侧链和糖苷键结构不同程度的降解断裂,溶出物体系中小分子物质增多,但均为水溶性的,所以抑菌作用并不强烈。而革兰氏阳性菌的细胞壁较厚,结构紧密,由肽聚糖和磷壁酸组成,小的相对分子质量水溶性柿多糖,能比较容易地渗透进去,而高相对分子质量多糖具有成膜特性,能在细胞表面形成足够致密的膜,阻止营养物质向细胞内运输而达到抑杀作用,表现出较高的抗菌活性。自由基对细菌繁殖有抑制作用,培养环境中的或细菌自己产生的活性氧会攻击细菌的生物膜等结构,从而抑制细菌的生长。在体系中加入抗氧化剂,则可以消除活性氧,细菌的生长状况可得到明显的改善。在实验中发现,随着多糖样品抗氧化能力减弱,抑菌圈直径增大越明显。

3 结 语

在柿多糖的提取中,不同提取剂和提取方法对于植物细胞的形态都有不同程度的破坏,反复冻融破碎细胞最彻底,微波提取所得多糖含量最高;不同提取剂和提取方法获得的柿多糖在抗氧化和抗菌能力上有显著差异,说明提取的过程与其生物学效能密切相关。

参考文献(References):

- [1] Hromádková Z, Ebringerová A, Valachovic P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2002,37:44.
- [2] 张维杰,糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1994:16—17.
- [3] Zheng Y I, Chen Yin-shan, Lu Hai-sheng. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China. Chin[J]. *Oceanol Limnol*, 2001,19 (4):326—331.
- [4] Kardos N, Luche J L. Sonochemistry of carbohydrate compounds[J]. *Carbohydrate Research*, 2001,332:115.
- [5] Mason T J. Advances in Sonochemistry[M]. Greenwich:Jai Press, 1991.
- [6] Tao D L, Jin Y H. An integrated hypothesis for the mechanisms of freezing injury of plants[J]. *Advances in Free Radical Life Sciences*. 2001(8):92—100.
- [7] JIN Yue-hua, TAO Da-li, DU Ying-jun. Freezing injury of plant and oxidative stress - Superoxide generation in freeze-thaw cycles of Cabbage leaf tissues[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002,13(12): 1555—1556.
- [8] 金宗濂. 保健食品的功能评价与开发[M]. 北京:中国轻工业出版社,2001:31—32.
- [9] Harman D. Role of free radical reactions in aging and disease[J]. *J Geriatr Dermatol*, 1997(5):114—127.
- [10] Maccarrone M, Catani M V, Iraci S. A survey of reactive oxygen species and their role in dermatology[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 1997(8):185—202.
- [11] 周志刚,刘思礼,刘雪娟. 极大螺旋藻多糖的分离、纯化及其抗氧化特性的研究[J]. 植物学报,1997,39 (1): 77—78. ZHOU Zhi-gang, LIU Si-li, LIU Xue-xian. Study on the isolation, purification and antioxidation properties of polysaccharides from spirulina maxima[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1997,39(1):77—78. (in Chinese)
- [12] 郭憬憬,职润,张娜,等. 关白附多糖体外抗氧化性研究[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(1):43—45. GUO Jing-jing, ZHI Run, ZHANG Na, et al. Study on the antioxidative effect of aconitum coreanum polysaccharides[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007,26(1):43—45. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平,朱明)