

微波辅助酶法提取广枣多糖的工艺优化

刘霞,廖梅香,张洁,林银顺,范小娜

(赣南医学院药学院,江西赣州 341000)

摘要:采用 Box-Behnken 中心组合实验和响应面分析法,在单因素试验基础上,以酶用量、pH、酶解温度和微波萃取时间为影响因素,多糖提取率为响应值,对微波辅助酶法提取广枣多糖的工艺进行优化。结果表明最佳工艺为:酶用量 1.2%, pH 5.5, 酶解温度 45 ℃, 微波萃取时间 8 min。按此工艺条件,广枣多糖提取率可达 42.56%。

关键词:广枣;多糖;微波辅助;酶法

中图分类号:TS 20 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2017)05-0042-05

Optimization of extraction technology for polysaccharide from fructus choerospondiatis by microwave-assisted enzymatic method

LIU Xia, LIAO Mei-xiang, ZHANG Jie, LIN Yin-shun, FAN Xiao-na

(College of Pharmacy, Gannan Medical University, Ganzhou Jiangxi 341000)

Abstract: The technology of extracting polysaccharide from fructus choerospondiatis by microwave-assisted enzymatic method was optimized by Box-Behnken central composite design and response surface analysis based on the single factor experiment with enzyme dosage, pH, enzymolysis temperature and microwave extraction time as the factors and the extraction yield of polysaccharides as the response value. The results showed that the optimal conditions of extraction were as followings: enzyme dosage 1.2%, pH 5.5, enzymolysis temperature 45 ℃, and microwave extraction time 8 min. Under the conditions, the yield of polysaccharide from fructus choerospondiatis was up to 42.56%.

Key words: fructus choerospondiatis; polysaccharide; microwave-assisted; enzymatic method

广枣为漆树科植物南酸枣 [*Choerospondias axillaris* (Roxb.) Burtt et Hill.] 的干燥成熟果实,又名五眼果、鼻涕果、酸枣、野枣子等,是蒙古族常用药材^[1]。广枣中的化学成分主要包括多糖、黄酮类、有机酸、鞣质、甾醇、香豆素、挥发油、氨基酸、酚性成分及多种无机元素等^[2]。广枣多糖是广枣中重要的生物活性物质之一,目前提取广枣多糖的方法常用的有回流法^[3-5]、微波法^[6]及超声法^[7]等,且多为正交设计,不能考察各因素交互作用对多糖提取率的影响。本研究将微波辅助酶法技术应用到广枣多糖提取中,采用 Box-Behnken 中心组合实验和

响应面分析法^[8-9]优化广枣多糖的提取工艺,以期广枣资源的综合开发应用提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

广枣药材:市售,经赣南医学院程齐来教授鉴定为漆树科植物南酸枣的干燥成熟果实。

葡萄糖对照品:北京索莱宝科技有限公司;纤维素酶($5 \times 10^4 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$):江苏锐阳生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

202A-2 电热干燥箱,上海阳光试验仪器有限公司;RE-52AA 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;SHA-C 数显水浴恒温振荡器,金坛市城东新瑞仪器厂;TDL-50B 台式离心机,上海安亭科学仪器有限公司;PB-10 酸度计,赛多利斯科学仪器有限公司;

收稿日期:2017-03-14

基金项目:江西省教育厅科技项目(GJJ160971);江西省卫生厅中医药科研基金课题(2013A097)

作者简介:刘霞,1980年出生,女,湖北人,硕士,高级实验师。

通讯作者:范小娜,1964年出生,教授,硕士。

BL-1000A型高速多功能粉碎机,浙江省永康市松青五金厂;WF-4000微波快速反应系统,上海屹尧分析仪器有限公司;UV-6100PCS型紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制^[8]

采用苯酚-硫酸法以提取液中多糖的质量浓度(X)为横坐标,吸光度值(Y)为纵坐标绘制标准曲线,所得回归方程为: $Y = 0.0828X + 0.0310$, $R^2 = 0.9997$ 。

1.2.2 广枣多糖的提取^[8]

广枣细粉的制备:将烘干的广枣粉碎后,过60目筛,密封好后置于干燥器中保存。

酶处理:准确称取一定量广枣粉末置于250 mL锥形瓶中,加入一定量纤维素酶,用盐酸调pH,按照设定程序酶法提取后,90℃灭酶20 min。

微波萃取:将酶处理溶液转入微波萃取系统中,微波萃取一定时间后,抽滤,浓缩至一定体积,得浓缩液。

醇沉:将浓缩液加入3倍体积的乙醇,摇匀,静置过夜。

干燥:将醇沉液3000 r/min离心10 min,沉淀依次用无水乙醇、丙酮和乙醚洗涤,并置于恒温干燥箱中干燥,得广枣多糖粗提物。

1.2.3 多糖提取率测定

精密称取广枣多糖粗提物适量,加蒸馏水使其溶解,并定容至50 mL容量瓶中;精密量取2.5 mL提取液,按一定比例稀释,根据1.2.1项下标准曲线的测定方法,测定其吸光度值,计算广枣粗多糖中多糖提取率。

多糖提取率/% = 样品溶液中葡萄糖质量浓度 × 样品溶液稀释倍数 × 反应液体积/粗提物重量 × 100

1.2.4 单因素试验

采用单因素试验研究酶用量、pH、酶解温度、酶解时间及微波萃取时间对广枣多糖提取效果的影响。

1.2.5 响应面试验设计

根据单因素试验结果,酶解时间对多糖提取率

影响不大,固定酶解时间为1 h。以酶用量(A)、pH(B)、酶解温度(C)及微波萃取时间(D)为自变量,以-1,0,+1代表自变量的低、中、高水平,以多糖提取率为响应值进行响应面分析。试验因素水平见表1。

表1 响应面试验因素水平

水平	因素			
	酶用量(A) /%	pH(B)	酶解温度 (C)/℃	微波萃取时间 (D)/min
-1	0.9	4.5	45	8
0	1.2	5	50	10
1	1.5	5.5	55	12

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶用量对广枣多糖提取率的影响

从图1可以看出,酶用量从0.3%~1.2%递变时,多糖提取率增幅比较明显;酶用量从1.2%~1.5%递变时,多糖提取率变化不大;酶用量在1.5%~1.8%之间时,多糖的提取率反而下降。这可能是由于酶用量比例为1.2%时,酶与底物浓度达到相对饱和状态,后续增加酶用量的比例(>1.5%),会对多糖组分产生包埋效应,反而抑制了酶解反应,不利于多糖组分的浸出^[10]。从节省成本角度出发,将最佳酶用量的比例定为1.2%。

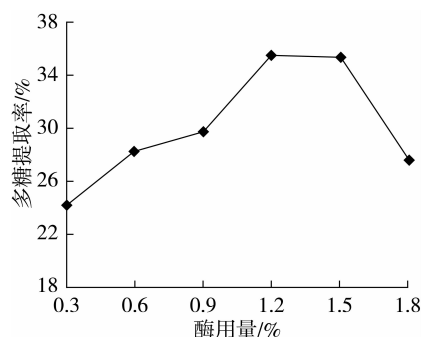


图1 酶用量对多糖提取率的影响

2.1.2 pH对广枣多糖提取率的影响

由图2可知,当pH从3.5增至5.0时,增幅最大;随后再增加pH,多糖的提取率逐渐下降。这可能是由于pH过小或过大都能使酶蛋白变性而失活^[11],从而影响多糖提取率,因此选择酶解体系pH以5.0为宜。

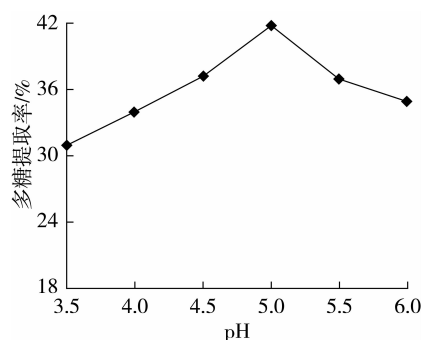


图2 pH对多糖提取率的影响

2.1.3 酶解温度对广枣多糖提取率的影响

从图3可以看出,酶解温度从40℃增加至50℃时,多糖的提取率逐步增加。当酶解温度超过50℃时,多糖提取率呈下降趋势。这是因为酶活性都有最适温度,偏离此最适温度时,温度越低或者越高时,其活性越小^[12]。因此,将最佳酶解温度定为50℃。

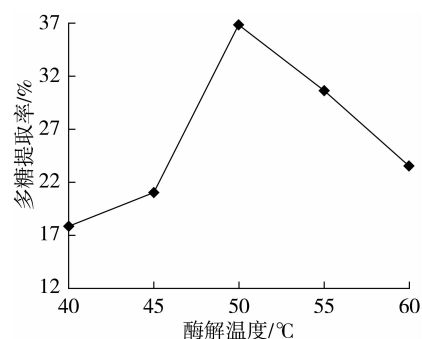


图3 酶解温度对多糖提取率的影响

2.1.4 酶解时间对广枣多糖提取率的影响

由图4可知,随着反应时间的增加,酶解反应越充分,多糖溶出速率增快,因此多糖提取率先呈上升趋势。当酶解时间达到1.0 h时,多糖已基本溶出,提取量达到最大值,而后提取效果逐步减弱。这可能是因为酶解时间过长,易造成多糖类结构被破坏^[13]。故本试验选择最佳酶解时间为1.0 h。

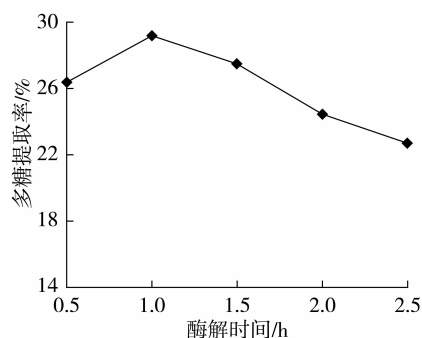


图4 酶解时间对多糖提取率的影响

2.1.5 微波萃取时间对广枣多糖提取率的影响

由图5可知,随着微波萃取时间的延长,细胞通透性逐渐增强,多糖溶出速率增快,因此多糖提取率先逐渐增加,当达到10 min时,多糖提取量达到最大值,随后多糖提取效果开始下降。这可能是因为微波时间达到10 min时,广枣中多糖已充分溶出,达到饱和,继续延长微波时间,传质阻力增加,不利于多糖的溶出,且会促进多糖分解,致使提取率下降。因此后续实验中选择微波萃取时间以10 min为宜。

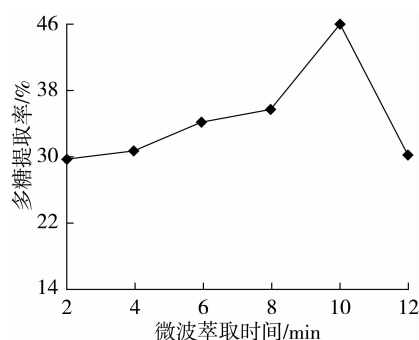


图5 微波萃取时间对多糖提取率的影响

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面试验结果及方差分析

响应面分析方案与结果见表2。应用 Design - Expert 8.0.6 软件对表2中的试验数据进行多元回归拟合,得到的拟合模型为 $Y = -235.35 - 21.10 \times A + 67.20 \times B - 0.19 \times C + 25.80 \times D + 3.82 \times A \times B + 1.38 \times A \times C - 3.33 \times A \times D + 0.30 \times B \times C - 5.09 \times B \times D + 0.21 \times C \times D - 15.08 \times A^2 - 3.28 \times B^2 - 0.06 \times C^2 - 0.36 \times D^2$ 。该模型的相关系数 $R^2 = 95.55\%$, 调整系数 $R^2_{Adj} = 91.10\%$, 均大于90%, 表明方程对试验有较好的拟合性, 试验误差小, 说明可以用该模型来拟合广枣多糖提取率的理论预测。

由方差分析结果(表3)可知,一次项A、B、C、D、交互项AC、AD、BD、CD及二次项 A^2 、 C^2 、 D^2 的P值均小于0.05,表明酶解温度、pH、微波萃取时间和酶用量对广枣多糖提取率影响显著,其中酶解温度和pH的影响都达到了极显著水平。四个因素对广枣多糖提取率影响主次(主→次)顺序为酶解温度>pH>微波萃取时间>酶用量。交互项AC、AD、BD和CD的P值均小于0.01,表明酶用量与酶解温度、酶用量与微波萃取时间、pH与微波萃取时

间、酶解温度和微波萃取时间的交互作用对多糖提取率的影响达到了非常显著的水平。

表 2 Box – behnken 中心组合试验结果

实验编号	A	B	C	D	多糖提取率/%
1	0	0	1	-1	26.97
2	0	0	-1	-1	36.69
3	-1	0	0	-1	30.09
4	-1	0	0	1	32.51
5	1	0	-1	0	32.15
6	0	1	0	1	28.42
7	0	1	0	-1	40.42
8	-1	0	-1	0	38.75
9	0	-1	0	-1	26.25
10	-1	1	0	0	33.42
11	0	0	1	1	29.24
12	0	-1	0	1	34.61
13	0	0	0	0	33.83
14	-1	0	1	0	27.54
15	0	0	0	0	34.01
16	0	1	1	0	31.05
17	1	1	0	0	33.10
18	0	0	0	0	34.70
19	1	0	0	1	28.01
20	1	0	0	-1	33.57
21	0	0	0	0	33.30
22	0	-1	1	0	28.00
23	0	-1	-1	0	33.66
24	1	0	1	0	29.22
25	0	0	0	0	34.52
26	0	1	-1	0	33.72
27	-1	-1	0	0	31.13
28	0	0	-1	1	30.70
29	1	-1	0	0	28.52

表 3 响应面方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著程度
模型	322.11	14	23.01	21.46	<0.0001	**
A	6.56	1	6.56	6.12	0.0268	*
B	26.88	1	26.88	25.07	0.0002	**
C	94.36	1	94.36	88.01	<0.0001	**
D	9.19	1	9.19	8.57	0.0110	*
AB	1.31	1	1.31	1.22	0.2874	
AC	17.14	1	17.14	15.99	0.0013	**
AD	15.92	1	15.92	14.85	0.0018	**
BC	2.24	1	2.24	2.08	0.1708	
BD	103.63	1	103.63	96.66	<0.0001	**
CD	17.06	1	17.06	15.91	0.0013	**
A ²	11.95	1	11.95	11.15	0.0049	**
B ²	4.37	1	4.37	4.08	0.0630	
C ²	12.66	1	12.66	11.81	0.0040	**
D ²	13.14	1	13.14	12.26	0.0035	**
残差	15.01	14	1.07			
失拟项	13.76	10	1.38	4.39	0.0834	不显著
纯误差	1.25	4	0.31			
总差	337.12	28				

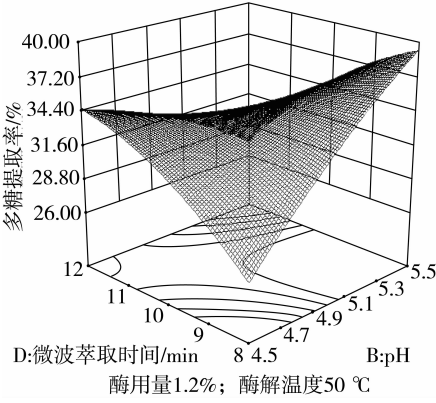
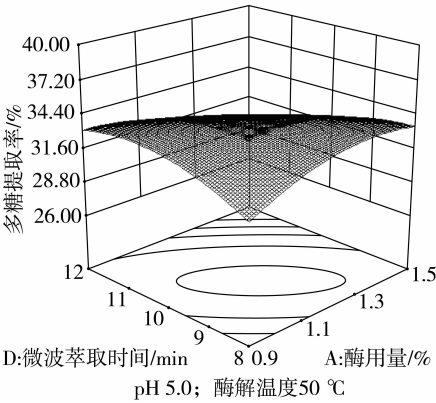
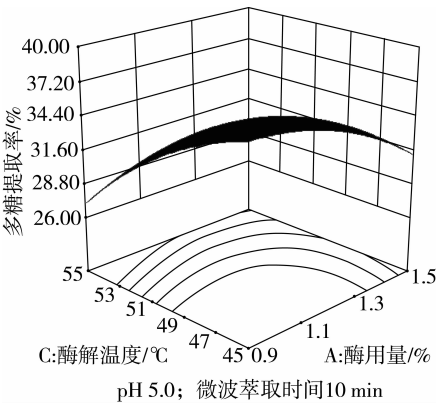
$R^2=0.955\ 5$ $R^2_{Adj}=0.911\ 0$

注: **, $P<0.01$, 差异极显著; *, $P<0.05$, 差异显著。

2.2.2 响应面交互作用分析及最佳提取工艺研究

各试验因素交互作用对广枣多糖提取率影响的 3D 分析结果见图 6。由图 6 可知,酶解温度对广枣多糖提取率影响最显著,表现为曲面较陡;pH 影响次之,表现为曲面较平滑;最后为微波萃取时间和酶用量,表现为曲面更平缓。酶用量与酶解温度、酶用量与微波萃取时间、pH 与微波萃取时间、酶解温度和微波萃取时间的交互作用对多糖提取率影响非常显著,与表 3 中交互项的 F 值及 P 值的分析结果相一致。

运用 Design – Expert 8.0.6 的响应面分析软件对所建立的模型进行参数优化,得到最佳工艺参数为:酶用量 1.2%, pH 5.5, 酶解温度 45℃, 微波萃



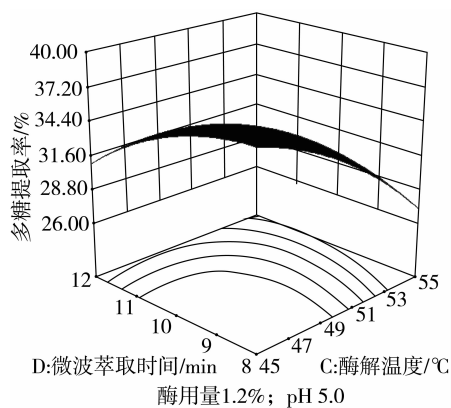


图 6 各两因素交互作用对广枣多糖提取率影响的响应面图
取时间 8 min, 在此条件下预测多糖提取率为 42.02%。为检验模型的可靠性,采用上述最佳提取条件,进行 3 次平行实验,实际提取率为 42.56%,理论提取率为 42.02%,相对误差 1.29%,说明该模型可以较好地预测广枣多糖的理论提取量。

2.3 不同提取方法的对比

由表 4 可知,相比酶法联合回流法和单技术回流法,酶法联合微波辅助法提取广枣中的多糖得率最高,对广枣细胞组织结构破坏更加明显,而且该工艺更加省时、高效、清洁、安全,表明此法提取广枣多糖的工艺具有实际应用价值。

表 4 不同提取方法提取多糖的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

序号	提取方法	提取时间	广枣多糖提取率/%
1	酶法联合微波辅助提取法	68 min	42.56 ± 0.30
2	酶法联合回流法	3 h	35.67 ± 0.18
3	回流法	6 h	30.06 ± 0.27

3 结论

根据所建立的响应面模型,以广枣中多糖的提取率最大为优化条件,得出最佳工艺参数为:酶用量

1.2%, pH 5.5, 酶解温度 45 °C, 微波萃取时间 8 min, 在该实验条件下多糖提取率预测值为 42.02%, 实际提取率为 42.56% (n = 3), 与预测值吻合, 说明该模型可以很好地预测广枣多糖的提取工艺条件。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社, 2015.

[2] 刘霞,李伟,范小娜,等. 响应面法优化广枣总黄酮的超声提取工艺研究[J]. 湖北农业科学,2015,54(9):2210-2213.

[3] 乌兰格日乐,白海泉,赵玉英,等. 利用正交实验法提取广枣多糖及测定其含量[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2007,22(3):271-273.

[4] 王玉光,阿力塔,徐秀廷. 广枣多糖的提取及多糖钙配合物的合成[J]. 光谱实验室, 2009,26(5): 1164-1167.

[5] 桂珍. 两种蒙药多糖的提取纯化及结构表征[D]. 内蒙古:内蒙古民族大学,2010.

[6] 高岐. 微波提取广枣中多糖的应用研究 [J]. 山东工业技术, 2013(7):109,127.

[7] 姚立伟. 广枣多糖提取纯化、分级及应用[D]. 内蒙古:内蒙古民族大学,2014.

[8] 刘霞,李伟,范小娜,等. 微波辅助酶法提取白花蛇舌草多糖的工艺优化[J]. 湖北农业科学,2016,55(15):3975-3979.

[9] 李伟,刘霞,邓春芳,等. 微波辅助酶法提取秦皮总香豆素的工艺研究[J]. 食品工业,2016,37(8):65-68.

[10] Puri M, Sharma D, Barrow C J. Enzyme - assisted extraction of bioactives from plants [J]. Trends in Biotechnology, 2012, 30(1): 37-44.

[11] 谭占仙. 研究 pH 值、温度对纤维素酶活力的影响[J]. 黑龙江科技信息, 2009(6):10-10.

[12] 孙盈,田永强,赵丽坤. 纤维素酶的 CMC 酶活测定条件的研究 [J]. 食品工业科技,2013, 34(2):68-71.

[13] 陈丽冰. 北虫草固体培养残基中多糖和虫草素高效提取与纯化研究[D]. 荆州:长江大学,2015. 完