

超声辅助酶解法提取仙人草多糖的工艺研究

吉惠杰, 杨艳俊, 沈启慧, 于丽颖, 张跃伟, 李长健

(吉林化工学院 化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022)

摘要:以仙人草为原料,采用超声辅助酶解法提取仙人草多糖。通过单因素法考察了单一酶种类和浓度、复合酶浓度和配比、酶解温度、酶解时间、酶解pH值对多糖提取率的影响。利用正交实验优化了超声辅助酶解法提取仙人草多糖的工艺条件。结果表明,超声波辅助酶解法提取仙人草多糖的最佳提取条件为复合酶(纤维素酶:果胶酶=1:1)浓度5%、酶解温度50℃、酶解时间2h、酶解pH值7,在此条件下仙人草多糖的提取率为6.60%。

关键词:仙人草;超声波;酶解;多糖

中图分类号:R 284.2 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2017)02-0074-04

Study on extraction process of polysaccharide from *Mesona chinensis* by ultrasonic-assisted enzymatic method

Ji Hui-jie, YANG Yan-jun, SHEN Qi-hui, YU Li-ying, ZHANG Yue-wei, LI Chang-jian

(College of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin Jilin 132022)

Abstract: Taking *Mesona chinensis* as raw material, the polysaccharides was extracted by ultrasonic assisted enzymatic method. The effects of single factors, including the variety and the concentration of signal enzyme, the concentration of complex enzymes and the ratio, enzymolysis time, enzymolysis temperature and pH on the extraction efficiency of polysaccharides were investigated, and orthogonal experiments was used to optimize the extraction process. Results showed that the optimum conditions were as follows: concentration of complex enzyme (cellulose:pectinase = 1:1) 5%, enzymolysis temperature 50℃, enzymolysis time 2 h and pH of 7. Under these conditions, the extraction efficiency of polysaccharides reached 6.60%.

Key words: *Mesona chinensis*; ultrasonic; enzymatic hydrolysis; polysaccharide

仙人草(*Mesona chinensis Benth*),为唇形科凉粉草属一年生草本植物,是一种重要的药食两用植物资源,广泛分布于我国广东、广西、福建、浙江等地^[1]。仙人草全草富含多糖、黄酮类化合物、熊果酸、齐墩果酸、微量元素、维生素等有效生物成分,具有调节和增强生理机能的作用^[2]。大量研究表明,仙人草多糖具有清除自由基、抗脂质过氧化^[3]、增强机体免疫机能^[4-5]、抑制人类肝癌细胞生长与肝纤维化^[6-7]、抗高血压^[8]、抗氧化性与抑菌效能^[9-10]等功效。

植物有效成分的提取方法有超临界流体提取^[11]、超声辅助提取法^[12]、酶提取法^[13]等。超声

波法,对植物有效成分提取具有很好的作用^[14-18]。酶解法反应条件温和,近年来已经广泛应用于天然药用植物有效成分提取^[19]。目前,对仙人草多糖提取方法的研究较少。主要的提取技术还是用碱液辅助热水提取,耗时,碱液浓度要求高,提取率低^[20]。仙人草多糖酶解法提取研究目前只限于选用纤维素酶单一种类酶,未涉及其他种类酶或复合酶提取工艺研究。本文探索利用超声波辅助酶解法提取仙人草多糖,采用正交实验对复合酶解提取仙人草多糖工艺进行优化,以期对仙人草多糖深加工的多元化、产业化提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

仙人草:购于广东省长寿蕉岭仙人草种植基地。纤维素酶,活性 $\geq 10\ 000\ \text{U/g}$;果胶酶,活性 \geq

收稿日期:2016-10-19

作者简介:吉惠杰,1973年出生,女,本科。

通讯作者:于丽颖,1967年出生,女,教授。

30 U/mg;氯仿、正丁醇、苯酚、浓硫酸、无水葡萄糖、石油醚,以上化学试剂均为分析纯;蒸馏水,自制。

XH-300UL型电脑微波超声波紫外光组合催化合成仪:北京祥鹤科技发展有限公司;EV-211型旋转蒸发器:吉林省亿盈科技有限公司;TS-200B型恒温振荡培养摇床:上海天呈仪器制造有限公司;SHB-3循环水多用真空泵:郑州杜甫仪器厂;FA2005N型电子分析天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司;TU-1950型双光束紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器责任有限公司;DRK612型高温鼓风干燥箱:山东德瑞克仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制

以多糖提取率为研究指标,无水葡萄糖为对照品,采用苯酚—硫酸法,在489 nm波长处测定吸光度。精密称取22.6 mg的葡萄糖标准品于250 mL容量瓶内,用蒸馏水定容至刻度,分别吸取对照品溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL于10 mL具塞试管中,加蒸馏水稀释至刻度,取上述葡萄糖对照品溶液各2 mL,加4%苯酚溶液1.0 mL,混匀,迅速加入浓硫酸7.0 mL摇匀,于40℃水浴中保温30 min,取出,以相应试剂为空白,进行分析,得回归方程为 $y = 0.0457x + 0.09$, $R^2 = 0.9998$,结果见图1。

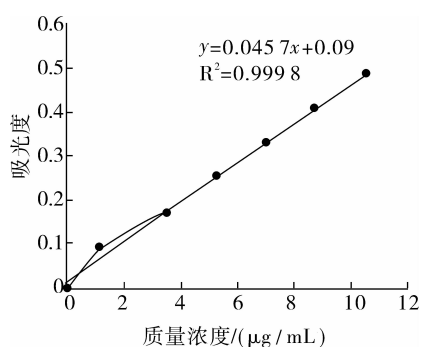


图1 葡萄糖标准曲线

1.2.2 仙人草多糖的含量测定

吸取仙人草多糖提取液适量,按1.2.1方法,采用苯酚—硫酸法测吸光度,通过线性方程计算提取液中多糖浓度,按公式(1)计算仙人草多糖提取率:

$$\text{多糖提取率} = \frac{\text{仙人草多糖质量}}{\text{仙人草质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 仙人草多糖的提取方法

仙人草干燥恒重粉碎过40目筛,准确称取仙人草粉末5.0 g,以料液比1:30 g/mL加入蒸馏水,在一定的超声波频率下进行超声处理,通过改变酶浓度、酶解温度、酶解时间、酶解pH值进行提取,抽滤

后,仙人草提取物加入石油醚脱脂,经离心收集上清液,使用旋转蒸发器浓缩至10 mL左右,用Sevage法除蛋白^[21]后,用蒸馏水定容于250 mL容量瓶中,测定吸光度,计算提取率。

1.2.4 超声辅助酶解法提取仙人草多糖单因素实验

1.2.4.1 酶种类及酶浓度的确定

准确称取5.0 g仙人草粉,设定超声频率70 W,在酶解温度50℃、酶解时间2.5 h、酶解pH 6的条件下,考察单一酶及复合酶的浓度及配比对仙人草多糖提取率的影响。所用酶分别为纤维素酶(浓度2%、3%、4%、5%),果胶酶(浓度2%、3%、4%、5%),纤维素酶:果胶酶=1:1的复合酶(浓度2%、3%、4%、5%),纤维素酶:果胶酶=2:3的复合酶(浓度2%、3%、4%、5%),纤维素酶:果胶酶=3:2的复合酶(浓度2%、3%、4%、5%)。

1.2.4.2 酶解温度对多糖提取率的影响

准确称取5.0 g仙人草粉,加入4%复合酶(纤维素酶:果胶酶=1:1),提取液pH 6,在70 W超声功率下,分别设置酶解温度为40、45、50、55℃,酶解时间2.5 h进行实验,考察酶解温度对仙人草多糖提取率的影响。

1.2.4.3 酶解时间对多糖提取率的影响

准确称取5.0 g仙人草粉,加入4%复合酶(纤维素酶:果胶酶=1:1),提取液pH 6,在70 W超声功率下,酶解温度50℃,设置酶解时间分别为1.5、2、2.5、3 h进行实验,考察酶解时间对仙人草多糖提取率的影响。

1.2.4.4 酶解pH值对多糖提取率的影响

准确称取5.0 g仙人草粉,加入4%复合酶(纤维素酶:果胶酶=1:1),酶解pH值分别为4、5、6、7,在70 W超声功率下,酶解温度50℃,酶解时间2.5 h进行实验,考察酶解pH值对仙人草多糖提取率的影响。

1.2.5 正交实验优化仙人草多糖提取工艺

在单因素实验基础上,以仙人草中多糖提取率为考察指标,选择复合酶浓度、酶解温度、酶解时间、酶解pH值为考察因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验,正交实验因素与水平设计见表1。

表1 正交实验因素水平

水平	A 复合酶浓度/%	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/h	D 酶解pH值
1	3	45	2	5
2	4	50	2.5	6
3	5	55	3	7

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 酶种类及酶浓度的确定

酶种类及酶用量对仙人草多糖提取率的影响见图2。由图2可知,单一的纤维素酶、果胶酶和复合酶在相同条件下提取仙人草多糖时,复合酶较佳,其中当纤维素酶与果胶酶1:1复合时,仙人草多糖的提取效率最高。这是由于仙人草细胞壁是由纤维素与果胶组成,可用纤维素酶与果胶酶酶解破壁溶出有效成分,故纤维素酶与果胶酶共用效果最好。当复合酶浓度达到4%时,仙人草提取率明显高于2%、3%时的提取率,继续提高酶浓度对提取率没有明显作用。综合考虑,采用纤维素酶与果胶酶1:1复合、酶浓度为4%提取仙人草多糖较佳。

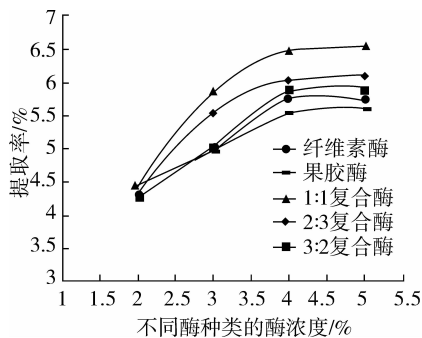


图2 酶种类及浓度对多糖提取率的影响

2.1.2 酶解温度对多糖提取率的影响

由图3可知,当酶解温度为50℃时,仙人草多糖提取率最佳,当酶解温度继续升高时,提取率下降。这是由于酶解温度过高会影响酶的活性,使酶的作用受到抑制。因此,较适酶解温度为50℃。

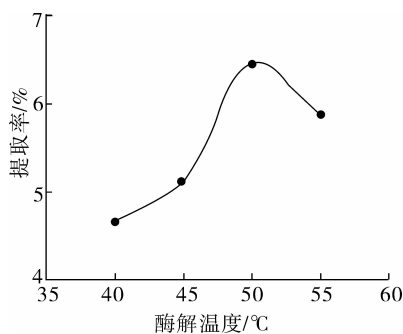


图3 酶解温度对多糖提取率的影响

2.1.3 酶解时间对多糖提取率的影响

由图4可知,当酶解时间为2.5h时,仙人草多糖的提取率达到最大值,继续延长时间则呈下降趋势。当酶解时间过多时,超声波具有较强的机械剪切作用,会使多糖结构破坏,导致多糖提取率下降。

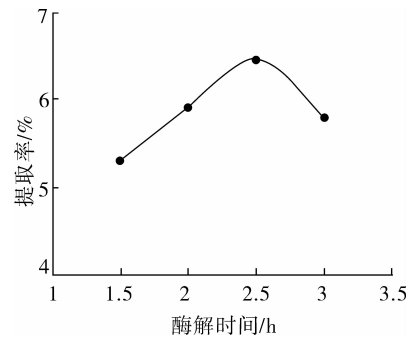


图4 酶解时间对多糖提取率的影响

2.1.4 酶解 pH 值对多糖提取率的影响

由图5可知,酶解pH值4~6时,随着pH提高仙人草多糖提取率逐渐增加,当pH值为6.0时提取率最高,继续加大pH值时仙人草多糖提取率呈下降趋势。酶解pH值为6时酶活性最大,因此确定提取仙人草多糖适宜酶解pH值为6。

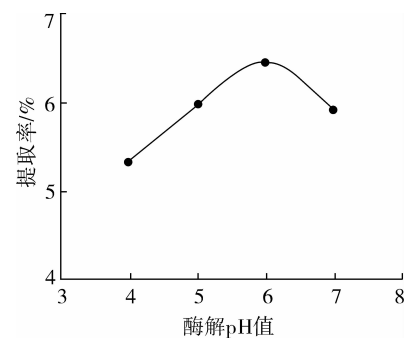


图5 酶解 pH 值对多糖提取率的影响

2.2 正交实验

正交实验设计方案与结果见表2,方差分析见表3。

表2 正交实验方案及结果

实验号	A	B	C	D	多糖提取率/%
1	1	1	1	1	5.12
2	1	2	2	2	6.02
3	1	3	3	3	5.47
4	2	1	2	3	6.12
5	2	2	3	1	6.43
6	2	3	1	2	6.02
7	3	1	3	2	6.14
8	3	2	1	3	6.57
9	3	3	2	1	6.23
K ₁	5.537	5.793	5.903	5.927	
K ₂	6.190	6.340	6.123	6.060	
K ₃	6.313	5.907	6.013	6.053	
极差	0.776	0.547	0.220	0.133	
优化方案	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	

表3 方差分析结果

差异源	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
因素A	1.045	2	2.532	4.460	**
因素B	0.499	2	1.209	4.460	*
因素C	0.073	2	0.177	4.460	
因素D	0.034	2	0.082	4.460	
误差	1.65	8			

注:显著性检验即方差齐性检验, $F_{比} > F_{0.01}(n1, n2)$ 时, ** 说明该因素水平的改变对实验结果有极显著影响; $F_{比} > F_{0.05}(n1, n2)$ 时, * 说明该因素水平的改变对实验结果有显著影响。

由表2~表3可知,各因素影响仙人草多糖提取率的主次顺序为 $A > B > C > D$, 即复合酶浓度 > 酶解温度 > 酶解时间 > 酶解 pH 值。仙人草多糖提取最佳工艺条件为:复合酶浓度 5%, 酶解温度 50℃, 酶解时间 2 h, 酶解 pH 值为 7, 在此条件下多糖的提取率为 6.57%。

2.3 最佳工艺验证实验

为进一步考察最佳工艺的稳定性及可行性,根据正交实验得出的最佳工艺条件,进行 3 次验证性实验。3 次验证实验的结果分别为 6.61%、6.65%、6.55%, 平均提取率为 6.60%, 说明此工艺条件的稳定性好,可行性强。

3 结论

通过单因素实验和 $L_9(3^4)$ 正交实验,确定了超声辅助酶解法提取仙人草多糖的最佳工艺条件为:复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:1)浓度 5%、酶解温度 50℃、酶解时间 2 h、酶解 pH 值为 7。在此最佳提取工艺条件下,多糖的平均提取率为 6.60%。

参考文献:

- [1] 林丽莎,张坤,詹岳霖,等. 仙草的化学成分和药理作用研究进展[J]. 生物科技进步,2013,3(6):448-452.
- [2] 刘素莲. 凉粉草化学成分的初步研究[J]. 中药材,1995,18(5):247-248.
- [3] 杨敏,冯磊,柯雪琴. 仙草多糖对大鼠肝匀浆脂质过氧化物的实验研究[J]. 浙江预防医学,2002,14(12):4-5.
- [4] 黄三元. 治癌中药处方 700 种[M]. 台湾:八德教育文化出版社,1986.
- [5] LAI L S, CHOU S T, CHAO W W. Studies on the antioxidative ac-

tivities of Hsian - tsao (Mesona procumbens Hemsl) leaf gum [J].

Food and Chemical Toxicology,2001,49:963-968.

- [6] SHYUMinghuan, KAO Tzuchien, YEN Gowchin. Hsian - tsao (Mesona procumbens Hemsl) prevents against rat liver fibrosis induced by CCl4 via inhibition of hepatic stellate cells activation [J]. Food and Chemical Toxicology,2008,46(12):3707-3713.
- [7] 罗燕梅,黄立红,黄妙惠,等. 仙草多糖对 HepG2 细胞酒精性损伤的保护作用[J]. 食品科技,2015,40(9):176-179.
- [8] YEHA C, THUANG W H, YEN G C. Antihypertensive effects of hsian - tsao and its active compound in spontaneously hypertensive rats [J]. Nutrition Biochemistry, 2009, 20:866-875.
- [9] 刘莹,朱东屏,徐向进,等. 仙草提取物对糖尿病大鼠的治疗作用研究[J]. 福州总医院学报,2005,12(4~5):268-269.
- [10] LIU Ming, FENG Tao. The effect of Mesona Blunes gum on the quality and staling of wheat bread [J]. Advanced Materials Research, 2014, 962-965:1258-1266.
- [11] ERKUCUKI A, AKGUN H, YESIL - CELIKTAS O. Supercritical CO₂ extraction Glycosides from Stevia rebaudiana leaves: Identification and optimization [J]. Supercritical Fluids, 2009, 51:29-35.
- [12] LIUJie, LI Jinwei, TANG Jian. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from Stevia rebaudiana Bertoni and identification of extracts [J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 88:215-221.
- [13] 刘志伟,吴和明,张晨. 酶法提取仙人草黄酮类化合物的研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2903-2904.
- [14] 唐政,陈小香,黄献珠. 混合酶法提取铁皮石斛多糖中石斛多糖的优化工艺研究[J]. 北方园艺,2014(6):132-134.
- [15] 李悦,刘阳,田晶,等. 酶辅助法提取板栗中多糖的工艺研究[J]. 粮油加工,2014(5):63-65.
- [16] 付娟娟,温文,李丹丹,等. 超声辅助纤维素酶提取甜菊糖苷[J]. 中国食品添加剂,2012,5:129-133.
- [17] 曹楠楠,陈香荣,吴艳. 苦豆子多糖的超声波提取工艺优化及理化性质研究[J]. 现代食品科技,2014,30(2):209-215.
- [18] 冯翠兰,刘福来,董华强. 酶法提取仙人草胶最佳工艺及不同产区仙草胶含量比较[J]. 广东农业科学,2009(2):65-68.
- [19] 尹怀霞,黎锡流,朱良. 从仙草中提取仙草胶的研究[J]. 现代食品科技,2006,22(3):134-135,143.
- [20] 蒋文明,李爱军,汪辉,等. 微波辅助提取仙草多糖[J]. 食品科学,2011,32(4):11-14.
- [21] 张萍,贺茂萍,殷力,等. 石榴皮多糖的 Sevage 法除蛋白工艺研究[J]. 食品科技,2013,38(12):219-222,143. 