

# 超声波复合酶法提取软紫草多糖的工艺优化

李倩<sup>1a</sup>, 田春芳<sup>1a</sup>, 刘雯霞<sup>1a,2</sup>, 廉宜君<sup>1b</sup>, 张波<sup>1a,2</sup>, 王晓琴<sup>1a,2</sup>, 陈韩英<sup>1a,2\*</sup> (1.石河子大学药学院, a.药学院, b.化学化工学院, 新疆 石河子, 832002; 2.新疆特种植物药资源省部重点实验室, 新疆 石河子, 832002)

**摘要:** 目的 研究超声波复合酶法提取软紫草多糖的最佳工艺条件。方法 采用单因素分析和正交试验, 以软紫草提取物中多糖得率和多糖含量为综合评价指标, 考察超声波复合酶法中主要因素对软紫草多糖提取效果的影响。结果 超声波提取优化工艺条件为: 超声处理时间 40 min, 料液比 1:12, 功率 160 W; 在超声波优化结果基础上, 进一步进行超声波复合酶法处理, 酶解最佳提取条件为酶解时间 40 min, 酶解温度 55 °C, pH 5.5, 纤维素酶、果胶酶、蛋白酶添加量均为 2%。结论 超声波复合酶法双重处理可显著提高软紫草多糖的提取效果。

**关键词:** 软紫草; 多糖; 超声波; 复合酶; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)06-0498-06

## Optimization of Ultrasonic Pretreatment Followed by Enzymatic Hydrolysis for Extraction Technology of Polysaccharides from *Arnebia Euchroma*

LI Qian<sup>1a</sup>, TIAN Chunfang<sup>1a</sup>, LIU Wenxia<sup>1a,2</sup>, LIAN Yijun<sup>1b</sup>, ZHANG Bo<sup>1a,2</sup>, WANG Xiaoqin<sup>1a,2</sup>, CHEN Hanying<sup>1a,2\*</sup> (1.Shihezi University, a.College of Pharmaceutical, b.School of Chemical Engineering, Shihezi 832002, China; 2.Key Laboratory of Phytomedicine Resources & Modernization of TCM, Shihezi 832002, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the optimal technological factors for extracting *Arnebia euchroma* polysaccharide with compound enzymes under ultrasonic. **METHODS** To develop an optimal procedure based on ultrasonic pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for the extraction of polysaccharides from *Arnebia euchroma*, single factor and orthogonal design methods were used to deal with the effects of crucial ultrasonic pretreatment and hydrolysis parameters on polysaccharide yield. **RESULTS** The optimal values of ultrasonic power, pretreatment time and material/liquid ratio were determined to be 160 W, 40 min and 1:12, respectively. The optimization of enzymatic hydrolysis was achieved through the combinatorial use of 2% cellulose, 2% pectinase and 2% neutral proteinase for the hydrolysis for 40 min at pH 5.5 and 55 °C. **CONCLUSION** The combination of ultrasonic pretreatment and enzymatic hydrolysis may provide a good idea for the large-scale production of polysaccharides from *Arnebia euchroma*.

**KEY WORDS:** *Arnebia euchroma*; polysaccharide; ultrasonic wave; compound enzymes; orthogonal design

新疆软紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst, 紫草科多年生草本植物, 是常用中药之一, 具有凉血、活血、解毒和透疹的功效, 主要生长在天山山脉, 为新疆特有紫草品种<sup>[1]</sup>。紫草主要成分有两类, 一类为脂溶性的蒽醌类化合物, 主要是紫草素、乙酰紫草素等 10 多种紫草素的衍生物<sup>[2]</sup>; 另一类是水溶性成分, 主要为紫草多糖, 含量在 2% 左右。目前对紫草多糖的研究较少。多糖是由单糖连接而成聚合度超过 10 以上的多聚物, 植物多糖是普遍存在于植物细胞壁及细胞中的一种成分, 目前已有上百种多糖从自然界分离提取出来。大量研究证明, 多糖具有其独特的生理活性。药理研究表明, 紫草多糖具有免疫增强功能, 有明显抑制单纯性疱疹病毒、非特异性抗炎作用<sup>[3]</sup>, 对

肿瘤细胞有一定的抑制作用<sup>[4]</sup>。

热水浸提是提取多糖最常见的方法, 较高的浸提温度能够获得较高的多糖提取率, 但却容易破坏多糖的生物活性。水提法需要的时间长, 能耗较多, 为了提高多糖的提取率, 常常采用微波、超声及酶等辅助提取方法, 以加速多糖的渗出。超声波提取能显著地提高紫草多糖的含量。近年来, 人们采用超声波技术提取紫草多糖取得了很好的效果。酶法是一种温和的方法, 不会破坏多糖的结构, 并且可以大规模用于工业化生产, 酶法提取多糖的研究起步较晚, 酶法较热水法显著地提高多糖的提取率<sup>[5]</sup>, 是获得生物活性多糖的高效方法, 但是采用超声波技术协同复合酶提取紫草多糖的报道很少, 为了验证此方法的提取效果,

基金项目: 石河子大学自然科学与技术创新重点项目(ZRXX2009ZD01-2)

作者简介: 李倩, 女, 硕士生 Tel: (0993)2057005 E-mail: liqian110023@163.com  
Tel: (0993)2057005 E-mail: hanyingchen@sina.com

\*通信作者: 陈韩英, 女, 博士, 副教授, 硕士

本试验采用正交试验设计法优化超声波协同复合酶提取紫草多糖的最佳条件, 并同超声波法的提取结果进行了系统比较, 旨在最大限度提高多糖得率, 为更好地开发利用紫草资源和紫草多糖的产业化提供参考, 同时也为紫草多糖的研究及其临床应用提供实验依据。

## 1 仪器与试剂

AR2140 电子天平(梅特勒托利多仪器有限公司); SpectrumLab 54-紫外可见分光光度计(上海棱光技术有限公司); HF-205B 超声循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司); EYELA 旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); 纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶(于北京奥博星生物技术有限责任公司); D-无水葡萄糖(上海市亿欣生物科技有限公司, 分析纯); 95%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚等其他试剂均为分析纯。软紫草采自新疆阿克苏地区, 经石河子大学药学院李鹏副教授鉴定为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst 的干燥根。

## 2 方法与结果

### 2.1 多糖标准曲线的制备

采用苯酚-硫酸法<sup>[6-7]</sup>测定多糖含量。分别精确吸取  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  葡萄糖标准溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 mL, 分别用蒸馏水补至 1.0 mL, 然后依次加入 1.0 mL 的 5% 苯酚和 5.0 mL 浓硫酸, 摇匀, 以 1.0 mL 蒸馏水做参比, 在室温下放置 30 min 后, 测定葡萄糖标准溶液在 490 nm 下的吸光度, 以吸光度对葡萄糖质量浓度进行线性回归, 得回归曲线方程为:  $A=0.0091C-0.0227$ ,  $r=0.9995$ 。线性范围为 24.5~90.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

### 2.2 样品多糖含量的测定

分别称取样品多糖 10.6 mg, 蒸馏水溶解, 于 100 mL 量瓶中定容至刻度, 摇匀, 精密吸取 2 mL 溶液于具塞试管中, 加 5% 苯酚溶液 1 mL, 再加浓硫酸 5 mL, 摇匀, 室温静置 25 min, 以蒸馏水做参比溶液, 在 490 nm 处测定吸光度, 代入回归方程计算各样品多糖含量。

### 2.3 多糖的提取

称取新疆软紫草粗粉 100.0 g, 以 1:5 的比例依次加入石油醚(沸程 60~90 °C)和 80%乙醇脱脂 3 次, 每次 30 min, 过滤。向风干的滤渣中加入一定量的蒸馏水超声提取, 合并滤液, 减压浓缩。在浓缩液中加入数倍体积的无水乙醇, 使溶液中的乙醇含量达到 80%, 边加边搅拌, 低温静置过

夜, 抽滤, 收集沉淀。沉淀的多糖以 10 mL 的蒸馏水溶解, 加入数倍体积的无水乙醇, 使溶液中的乙醇含量达到 80%, 经二次醇沉, 静置过夜, 抽滤, 依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次, 低温干燥至恒重, 计算多糖得率和多糖含量。以多糖得率和多糖含量的综合评分作为评价指标, 采用加权评分法综合评估软紫草多糖的提取工艺条件。

多糖得率(%)=粗多糖干品质量(g)/原料质量(g)×100%; 多糖含量(%)= $C \times D/M \times 100\%$

C: 根据标准曲线回归方程求得的浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); D: 稀释倍数; M: 干燥后所得粗多糖的质量(mg)。

加权评分法: 把各项与该列最大值相除再乘以 100 为该项得分, 根据浸膏得率(X)和多糖含量(Y)的作用, 确定两者的权重系数, 对两项指标进行加权求和, 通过公式  $Z=0.5X+0.5Y$  可得到综合评分(Z)。

## 2.4 超声波处理条件优化

2.4.1 超声提取时间对多糖提取率的影响 称取新疆软紫草粗粉 100.0 g, 按料液比 1:12 加蒸馏水, 在功率 160 W 条件下, 超声时间分别按 20, 30, 40, 50, 60 min 处理, 测定多糖含量及计算多糖提取率, 重复 3 次。结果见图 1。

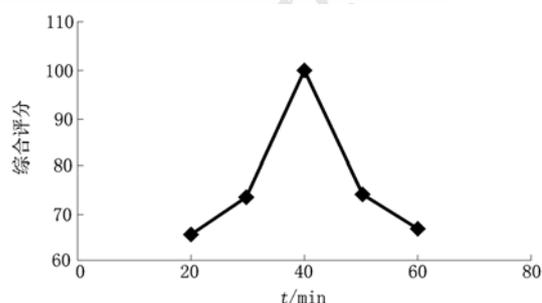


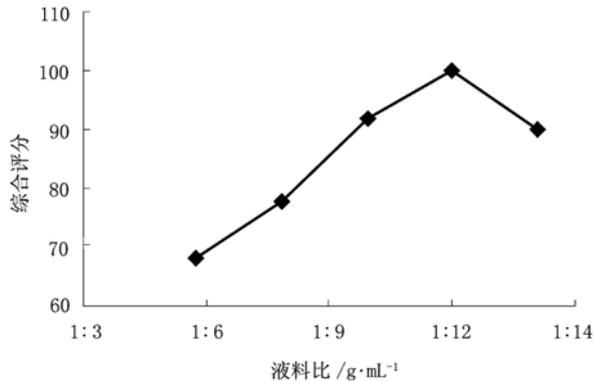
图 1 不同提取时间对多糖提取率的影响

Fig 1 Effect of ultrasound treatment time on polysaccharide yield

由结果可知, 随提取时间的延长, 多糖的提取率不断增加, 提取时间达到 40 min 以后有所下降, 40 min 时提取率已经达到 100%, 说明软紫草多糖几乎被充分提取出来。推测这可能是由于超声处理的初期, 大多数小分子寡聚糖的扩散速度要远大于多糖大分子量部分, 因此在多糖提取率并没有达到最大值。当超声处理数分钟细胞破碎程度增大后, 细胞内部的多糖物质开始向外扩散, 多糖的含量开始升高达到最大值, 但是随着超声处理时间的延长, 空化效应的作用力减小, 使得紫草颗粒表面对提取的物质吸附力增强, 从而使

得多糖提取率和多糖含量有所下降<sup>[7]</sup>。

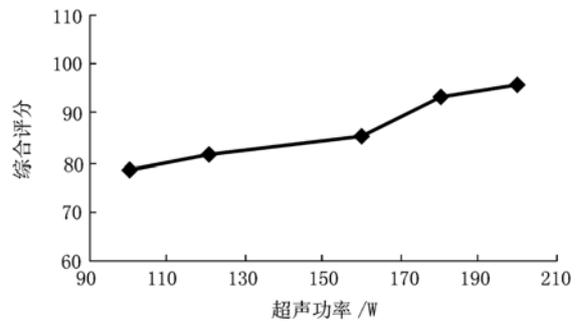
**2.4.2 料液比对多糖提取率的影响** 称取新疆软紫草粗粉 100.0 g, 在功率 160 W 条件下, 超声 40 min, 料液比分别按 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14 处理, 测定多糖含量及计算多糖提取率, 重复 3 次。结果见图 2。



**图 2** 不同液料比对多糖提取率的影响  
**Fig 2** Effect of material/liquid ratio on polysaccharide yield

由结果可知, 在一定范围内, 多糖提取量随着料液比的增大而增大, 这是由于减小料液比减弱了能量的传递效果, 细胞壁未得到充分的破碎, 多糖溶出机率减小所致。当料液比达到一定程度后开始下降。在料液比 1:12 时紫草多糖提取率最高。

**2.4.3 超声功率对多糖提取率的影响** 称取新疆软紫草粗粉 100.0 g, 超声 40 min, 料液比按 1:12, 功率分别按 100, 120, 160, 180, 200 W 处理, 测定多糖含量及计算多糖提取率, 重复 3 次。结果见图 3。



**图 3** 不同超声功率对多糖提取率的影响  
**Fig 3** Effect of ultrasonic power on polysaccharide yield

由结果可知, 随着超声功率的增大, 多糖提取率逐渐提高, 当功率为 200 W 时达到最大, 原因可能是伴随着功率的增大, 产生的冲击波、剪切力迫使细胞壁破碎, 多糖提取率增加。

## 2.5 超声波正交试验

**2.5.1 超声波正交结果** 根据单因素实验结果确定各因素的合理水平。采用正交试验  $L_9(3^4)$  对影响提取的因素: 超声时间、料液比及超声功率进行条件优化, 因素水平见表 1。正交设计结果见表 2, 根据正交实验结果进行方差分析, 结果见表 3。

**表 1** 超声波法正交因素水平表

水平	因素		
	A 提取时间/min	B 溶剂用量/倍	C 功率/W
1	30	10	160
2	40	12	180
3	50	14	200

**表 2** 超声波法正交试验结果

**Tab 2** Experimental results of orthogonal design for the optimization of ultrasonic pretreatment

试验号	因素				评价指标		综合评分
	A	B	C	D	浸膏得率/%	多糖含量/%	
1	1	1	1	1	2.66	12.67	57.01
2	1	2	2	2	3.13	10.55	56.78
3	1	3	3	3	3.80	11.23	65.09
4	2	1	2	3	2.61	14.25	60.24
5	2	2	3	1	3.34	13.71	66.47
6	2	3	1	2	4.92	14.20	83.64
7	3	1	3	2	2.89	20.75	78.65
8	3	2	1	3	3.19	21.11	82.41
9	3	3	2	1	3.43	20.28	83.03
$K_1$	78.88	95.90	23.06	06.51			
$K_2$	210.35	205.66	200.05	219.07			
$K_3$	244.09	231.76	210.21	207.74			
R	1.74	1.95	7.67	4.19			

表 3 方差分析表

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F值	显著性
A	709.01	1	354.51	22.0	>0.5
B	229.16	1	114.58	7.7	<0.5
C	88.65	1	44.32	2.7	<0.5
误差	31.96	15	2.13		

注:  $F_{0.01}(2,2)=99.0$ ;  $F_{0.05}(2,2)=19.0$

Note:  $F_{0.01}(2,2)=99.0$ ;  $F_{0.05}(2,2)=19.0$

由结果可知, 3 因素中 A 因素即提取时间对实验结果影响最大, 为多糖提取工艺的主要影响因素, 料液比 B 为次要因素, 其影响次序依次为  $A>B>C$ 。进一步的方差分析表明, 4 个因素中 A 因素对多糖含量有显著性的影响, 结果见表 3。综合考虑工艺成本, 在多糖的提取工艺中, 最佳的因素组合为, 即药材提取时间 40 min、液料比 1:14、提取功率是 160 W, 提取效果最佳。

**2.5.2 超声波正交工艺验证** 按照单因素试验和后期正交试验的研究结果, 选择最佳工艺条件进行 3 次重复试验, 操作方法同“2.3”, 结果见表 4。由结果可知, 紫草多糖平均得率和平均多糖含量分别为 4.91%和 20.75%, 该方法下提取的紫草多糖色泽为浅紫色、质量佳。

表 4 验证试验结果( $n=3$ )

Tab 4 Results of verification test( $n=3$ )

编号	药材	所得多糖	多糖	平均多糖	多糖	平均多糖
	质量/g	质量/g	得率/%	得率/%	含量/%	含量/%
1	100.000 8	4.870 2	4.87		20.77	
2	100.004 5	4.940 0	4.94	4.91	20.75	20.75
3	100.002 7	4.910 1	4.91		20.76	

## 2.6 超声波后复合酶处理条件优化

**2.6.1 酶解时间对多糖提取率的影响** 纤维素酶、果胶酶、蛋白酶组成的复合酶均在添加量 2%, 提取温度 50 °C, pH 5.5, 酶解时间 10, 20, 30, 40, 50 min 处理, 测定多糖含量及计算多糖提取率, 重复 3 次。结果见图 4。

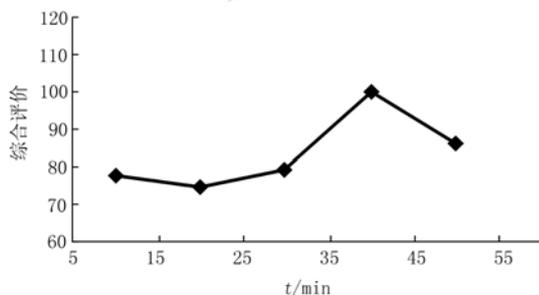


图 4 不同酶解时间对多糖提取率的影响

Fig 4 Effect of enzymatic hydrolysis time on polysaccharide yield

由结果可知, 随着酶解时间的增加多糖提取率逐渐增大, 40 min 时达到一个最大值, 当酶解时间超过 40 min 后, 酶解基本完全, 随着时间的延长, 多糖提取率提高缓慢。

**2.6.2 温度对多糖提取率的影响** 纤维素酶、果胶酶、蛋白酶组成的复合酶添加量均为 2%, 酶解时间 40 min, pH 5.5, 温度分别按 40, 45, 50, 55, 60 °C 处理, 测定多糖含量及计算多糖提取率, 重复 3 次。结果见图 5。

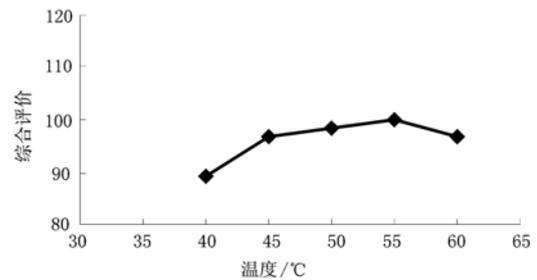


图 5 不同酶解温度对多糖提取率的影响

Fig 5 Effect of hydrolysis temperature on polysaccharide yield

由结果可知, 随温度的升高, 软紫草粗多糖提取率快速增加。提取温度 55 °C 时多糖提取率最高。若在进一步提高提取温度, 多糖提取率有可能还能进一步提高, 但过高的温度也可能会破坏多糖结构, 使其发生降解而影响生物活性, 同时增加能耗和设备的投入, 不适于实际生产。

**2.6.3 pH 值对多糖提取率的影响** 纤维素酶、果胶酶、蛋白酶组成的复合酶添加量均为 2%, 提取温度 50 °C, 酶解时间 40 min, pH 值分别按 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 处理, 测定多糖含量及计算多糖提取率, 重复 3 次。结果见图 6。

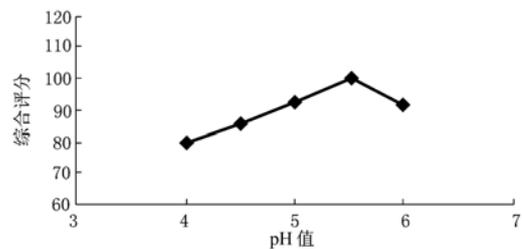


图 6 不同 pH 值对多糖提取率的影响

Fig 6 Effect of hydrolysis pH on polysaccharide yield

由结果可知, 随着 pH 值的增大多糖提取率增大, 酶解的最适 pH 值在 5.5 附近, 大于 5.5 以后多糖提取率开始下降, 由于酶对 pH 值比较敏感, pH 值的变化可以改变酶空间构象而引起酶活性的降低。

## 2.7 复合酶法正交试验

**2.7.1 复合酶法正交试验结果** 在超声波后复合

酶解单因素试验的基础上,用正交试验对影响提取的因素:酶解时间、复合酶添加量、pH 值及酶解温度进行条件优化。

根据单因素实验结果确定各因素的合理水平。采用正交试验  $L_9(3^4)$  对影响提取的因素:超声时间、料液比及超声功率进行条件优化,因素水平见表 5。正交设计结果见表 6,根据正交实验结果进行方差分析,结果见表 7。

表 6 超声波酶法正交试验结果

Tab 6 Experimental results of orthogonal design for the optimization of enzymatic hydrolysis

试验号	因 素				评价指标		综合评分
	A	B	C	D	浸膏得率/%	多糖含量/%	
1	1	1	1	1	2.43	24.10	75.63
2	1	2	2	2	2.64	20.39	72.87
3	1	3	3	3	2.56	25.65	80.24
4	2	1	2	3	2.34	24.10	74.63
5	2	2	3	1	2.81	24.88	82.45
6	2	3	1	2	2.78	29.66	90.32
7	3	1	3	2	3.45	21.89	86.9
8	3	2	1	3	2.94	26.77	89.63
9	3	3	2	1	2.65	27.78	85.34
$K_1$	228.74	237.16	255.58	243.42			
$K_2$	247.40	244.95	232.84	250.09			
$K_3$	261.87	255.90	249.59	244.50			
R	11.04	6.25	7.58	2.22			

表 7 方差分析表

Tab 7 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	183.91	2	91.95	21.52	<0.05
B	59.09	2	29.54	6.91	>0.05
C	92.62	2	46.31	10.84	>0.05
误差 e	8.54	2	4.27		

注:  $F_{0.01}(2,2)=99.0$ ,  $F_{0.05}(2,2)=19.0$

Note:  $F_{0.01}(2,2)=99.0$ ,  $F_{0.05}(2,2)=19.0$

由结果可知,3 因素中 A 因素即提取时间对实验结果影响最大,为多糖提取工艺的主要影响因素,pH 值 C 为次要因素,其影响次序依次为  $A>C>B$ 。进一步的方差分析表明,4 个因素中 A 因素对多糖提取率有显著性的影响,结果见表 7。综合考虑工艺成本,在多糖的提取工艺中,最佳的因素组合为,即药材提取温度  $45\text{ }^\circ\text{C}$ ,pH 5.5,提取时间 50 min,提取效果最佳。

2.7.2 复合酶法正交工艺验证 按照单因素试验和后期正交试验的研究结果选择最佳工艺条件进

表 5 超声波酶法正交因素水平表

Tab 5 Factors and levels in the orthogonal design for the optimization of enzymatic hydrolysis

水平	因 素		
	A 酶解时间/min	B 酶解温度/ $^\circ\text{C}$	C pH 值
1	30	45	5.0
2	40	50	5.5
3	50	55	6.0

行 3 次重复试验,操作方法同“2.3”,结果见表 8。由结果可知,紫草多糖平均得率和平均多糖含量分别为 4.46%和 29.65%,该方法下提取的紫草多糖色泽为浅紫色、质量佳。

表 8 验证试验结果( $n=3$ )

Tab 8 Results of verification test ( $n=3$ )

编号	药材质量/g	所得多糖质量/g	多糖得率/%	平均多糖得率/%	多糖含量/%	平均多糖含量/%
1	100.001 3	4.460 0	4.46		29.60	
2	100.002 4	4.450 1	4.45	4.46	29.72	29.65
3	100.000 3	4.480 3	4.48		29.63	

#### 4 讨论

本实验通过单因素试验和正交试验,确定超声波提取多糖的最佳条件为超声时间 40 min、功率 160 W、料液比 1:14;在超声波处理基础上继续进行复合酶酶解,本实验采用纤维素酶使细胞壁破裂,果胶酶对果胶质的水解,蛋白酶促进糖蛋白的分离,3 种酶相互作用,显著提高了紫草多糖的提取率,其提取最佳条件为酶解温度  $45\text{ }^\circ\text{C}$ ,pH 5.5,酶解时间

50 min。由此可见，超声波复合酶提取多糖的两个阶段对多糖提取率的影响均非常重要，是值得借鉴的一种紫草多糖提取方法。这是由于在整个超声处理过程中，超声波的空化效应虽然能增加对原料的破碎效果，增加多糖溶出率，但是它不能完全的将细胞壁破碎，而酶的加入弥补这一缺陷，对细胞壁进行进一步的酶解，多糖溶出几率越大。

## REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 320.
- [2] ZHANG Y M. A general study on sinking *Arnebia* root polysaccharide [J]. *China New Med*(中国新医药), 2004, 3(4): 54-55.
- [3] CHENG X N, NUAN H. Studies on the immunoregulation and anti-tumor activity of polysaccharide from *Arnebia* root [J]. *J Zhejiang Univ*(浙江大学学报), 2008, 35(6): 674-677.
- [4] CHEN H Y, CHEN H F, LI D F, et al. Effect of *Arnebia euchroma*(Royle) Johnston polysaccharide on mice bearing in U14 cervical cancer *in vivo* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2010, 27(12): 1061-1064.
- [5] LIU L P, ZHONG Y F. Supersonic extraction of laminaria and scavenging action to free radical [J]. *J Shaoxing Univ*(绍兴文理学院学报), 2005, 25(7): 365-367.
- [6] WANG W P, GUO S Y, LI L, et al. Assay study on content of polysaccharides in *stanuntonia chinensis* by pnenol-nulfuric acid method [J]. *Food Sci*(食品科学), 2007, 28(4): 276-278.
- [7] ZHENG J, CHANG N T, LIN Y, et al. Factors affecting extraction of *ganoderma lucidum* polysaccharide using ultrasound and ultrasound cellulase methods [J]. *Acta Edulis Fungi*(食用菌学报), 2006, 13(1): 48-52.

收稿日期：2011-09-27