

纤维素酶法提取土人參多糖的工艺研究

农小英, 黄礼德, 郭立强, 潘廷啟, 顏祖弟, 张照平, 黄锁义* (右江民族医学院, 广西 百色 533000)

摘要: 目的 优化纤维素酶法提取土人參多糖。方法 通过单因素实验和正交实验, 研究 pH 值、酶用量、酶解温度和提取时间对土人參多糖提取效果的影响。结果 纤维素酶法提取的优化工艺条件为: pH 值为 6, 每克药材酶用量为 400 U, 酶解温度 50 ℃, 提取时间 3 h。在此条件下, 土人參多糖的提取率平均为 21.16%, RSD 为 0.14%。结论 纤维素酶法提取土人參多糖效果省时高效。

关键词: 土人參; 多糖; 纤维素酶; 正交设计

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)09-0802-03

Research on the Extraction Process of Polysaccharide from *Talinum Crassifolium* Using Cellulase

NONG Xiaoying, HUANG Lide, GUO Liqiang, PAN Tingqi, YAN Zudi, ZHANG Zhaoping, HUANG Suoyi* (Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction technique for total polysaccharide from *Talinum Crassifolium*. **METHODS** The single factor experiment and the orthogonal design were conducted to investigate the influence of pH, enzyme dosage, extraction temperature and extraction time on yield of Polysaccharide from *Talinum Crassifolium*. **RESULTS** The optimum conditions of cellulase enzyme were as follows: pH 6.0, enzyme dosage 400 U·g⁻¹ enzymes drug, temperature 50 ℃, extraction time 3 h, and extraction yield was 21.16, RSD was 0.14%. **CONCLUSION** Extraction polysaccharide from *Talinum Crassifolium* by cellulase enzyme is a simple, quick and efficient method.

KEY WORDS: talinum crassifolium; polysaccharide; cellulase; orthogonal design

土人參为马齿苋科植物柞兰 *Talinum paniculatum* Gaertn. 的根, 又名参草、紫人參、土炕头、福参、申时花等, 生长于田间、路边、墙角石旁、山坡沟边等阴湿处, 分布于四川、广西、贵州、云南、江苏、安徽、浙江、福建等地。为 1 年生草本, 夏秋采收, 鲜用或刮去表皮后蒸熟晒干备用^[1]。味甘、淡、性平, 有补中益气, 养阴润肺, 消肿止痛之功效, 可用于治疗脾虚食少乏力, 泄泻, 脱肛, 肺癆咳血, 潮热, 盗汗, 自汗, 遗尿, 产后乳汁不足, 痈肿疮疖等症^[2]。

多年来对多糖的深入研究表明, 多糖在医药上是一种很好的佐剂, 多糖的糖链在分子生物学中具有决定性作用, 此外它还能控制细胞的分裂和分化、调节细胞的生长和衰老^[3]。现代医学研究表明, 多糖具有抗肿瘤、抗病毒、增强免疫力、降血脂、降血糖、解毒、抗辐射等功效^[4]。近年来, 酶技术应用于中草药致密结构, 加速药用有效成分的溶出, 提高药用有效成分的提取率^[5]。纤维素

是植物细胞壁的主要成分, 亦是胞内多糖等大分子溶出的主要屏障, 利用纤维素酶水解细胞壁, 利于胞内成分溶出^[6]。但将纤维素酶应用于提取土人參中多糖的研究鲜见报道。本研究采用纤维素酶法提取土人參多糖, 并通过单因素及正交实验研究 pH 值、酶用量、酶解温度和提取时间等工艺条件对土人參多糖提取率的影响, 以期达到提高提取率、缩短提取时间、减少能耗和有效保存土人參多糖的生物活性, 并为植物酶技术在中药有效成分的提取方面的应用提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 电子分析天平 FA1104(上海天平仪器厂); 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 植物粉碎机 FZ102(上海锐丰仪器仪表有限公司); 电热式恒温水浴锅 HHS-21-4(江苏金坛宏凯仪器厂); 80-2 离心沉淀器(江苏省金坛市医疗仪器厂); pH S-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);

基金项目: 2013 年度广西壮族自治区大学生创新训练计划立项资助项目(QJX201338); 右江民族医学院民族医药协会资助项目(20110715)

作者简介: 农小英, 女 Tel: 18776754948 E-mail: nongxiaoyingx@163.com 通信作者: 黄锁义, 男, 教授, 硕士 Tel: (0776)2850590 E-mail: huangsuoyi@163.com

SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); 722N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.1.2 试药 土人参(采于广西天等县高州山, 由右江民族医学院民族医学教研室覃道光副教授鉴定为马齿苋科植物炉兰的根); 纤维素酶(活力 40 000 U·g⁻¹)(天津利华酶制剂有限公司); 葡萄糖(广州艾欣科学仪器有限公司); 其他所用试剂均为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 纤维素酶悬浮液的制备 精密称取纤维素酶 2.5 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 酶悬浮液(100 U·mL⁻¹)封放入 4 °C 冰箱待用, 使用前摇匀后室温时取液。

1.2.2 土人参多糖待测液的制备 将干燥的土人参在植物粉碎机上粉碎, 制成土人参干粉。根据实验按需称取 1 g 土人参干粉若干份, 加缓冲溶液及不同体积的酶悬浮液, 缓冲液及酶悬浮液的总体积为 20 mL, 分别在不同 pH 值、酶用量、酶解温度和提取时间等单因素条件下进行提取实验。提取液在沸水浴中灭活酶 5.0 min, 冷却过滤, 定容, 离心, 取一定量的上清液定容, 待测。根据单因素实验结果, 以多糖提取率为实验指标, 进行 L₉(3⁴) 正交实验。

1.2.3 土人参多糖的纯化 准确称取土人参干粉 5 g, 按最优工艺提取, 得多糖粗提液。粗提液减压浓缩至 10~20 mL 后离心, 上清液加入 5 倍的无水乙醇醇沉, 置冰箱中 4 °C 过夜, 收集沉淀, 沉淀再依次用 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次, 干燥得土人参粗多糖, 沉淀物于热蒸馏水复溶, 使用 Sevage 法^[7]完全脱掉蛋白, 再用活性炭(粉末) 回流 1 h, 脱色, 过滤, 离心, 得上清液。上清液浓缩, 用无水乙醇调节滤液的醇浓度为 80%, 置冰箱中 4 °C 沉淀过夜, 抽滤收集沉淀, 沉淀再依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次, 干燥得精制多糖。

1.2.4 土人参多糖提取率的测定 本实验对多糖的测定采用硫酸-苯酚法^[8]。取待测液 0.5 mL 置于 10 mL 的试管中, 加入 5% 的苯酚溶液 1.0 mL, 混匀, 迅速加入 5.0 mL 的浓硫酸, 摇匀, 40 °C 水浴中反应 30 min, 然后置于冷水中冷却 10 min, 以葡萄糖为标样, 于波长 490 nm 处测定吸光度值。由回归方程推算出土人参多糖的质量。

1.2.5 换算因素测定 精密称取土人参精制多糖

100.00 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加少量蒸馏水溶解并稀释至刻度。精密吸取 5.0 mL, 定容至 50 mL, 按“1.2.4”项下方法测定吸光度, 按下式计算: 换算因素 $f=W/CD$, W 为多糖重量(mg), C 为多糖中葡萄糖的浓度(mg·mL⁻¹), D 为多糖的稀释因素, 测得 $f=1.507$ 。

1.2.6 多糖含量测定 精密吸取待测液, 按“1.2.4”项下方法测定吸收度。按回归方程求出待测液中葡萄糖含量。按下式计算样品中多糖含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = CDf / W \times 100\%$$

式中 C 为供试液葡萄糖浓度(mg·mL⁻¹), D 为供试液的稀释因素, f 为换算因素 W 为供试品重量(mg)。

1.2.7 标准曲线的绘制 精密称取干燥(105 °C) 至恒重的葡萄糖 50 mg, 加蒸馏水定容至 100 mL, 得标准葡萄糖溶液。取标准葡萄糖溶液 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL, 分别定容至 50 mL, 得不同浓度的稀释液。分别精密吸取上述稀释液 0.5 mL 按“1.2.4”项下方法显色, 测定吸光度值, 以吸光度值(Y)对质量浓度 X (mg·mL⁻¹)进行回归, 得回归方程为: $Y=5.915 3X-0.003 1$, $r=0.999 3$, 表明对照品葡萄糖含量在 0.010~0.100 mg·mL⁻¹ 内与对应吸光度值有良好线性关系。

1.2.8 优化工艺条件的正交实验 根据单因素实验可知, pH 值(A)、酶用量(B)、酶解温度(C)和提取时间(D)等因素都影响土人参多糖的提取效果。为确定这 4 个因素的综合影响, 以多糖提取率为指标, 按 L₉(3⁴) 正交表进行正交实验确定最佳提取工艺条件, 因素水平见表 1, 正交实验结果见表 2。由分析结果可知, 各因素对土人参多糖提取率影响的主次顺序为 A>B>C>D, 即 pH 值>酶用量>酶解温度>提取时间。方差分析表明, pH 值在酶法提取土人参多糖中有显著意义, 结果见表 3。因此, 优选出的最佳提取工艺为 A₂B₃C₂D₃, 即加酶量 4 mL, 在 50 °C、pH 值为 6 的溶液中进行提取 3 h。

表 1 正交因素水平

Tab 1 Design for factors and levels of orthogonal test L₉(3⁴)

水平	因素			
	A pH 值	B 酶用量/mL	C 酶解温度/°C	D 提取时间/h
1	5	2	40	1
2	6	3	50	2
3	7	4	60	3

表 2 L₉(3⁴)正交实验及结果

Tab 2 L₉(3⁴) results of orthogonal test

序号	A pH 值	B 酶用量/mL	C 酶解温度/℃	D 提取时间/h	多糖提 取率/%
1	1	1	1	1	16.33
2	1	2	2	2	18.98
3	1	3	3	3	18.88
4	2	1	2	3	20.71
5	2	2	3	1	21.00
6	2	3	1	2	20.43
7	3	1	3	2	18.80
8	3	2	1	3	20.08
9	3	3	2	1	21.15
K1	54.19	55.84	56.84	58.48	
K2	62.14	60.06	60.84	58.21	
K3	60.03	60.46	58.68	59.67	
R	7.95	4.62	4.00	1.19	

表 3 方差分析

Tab 3 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	SS	v	F	显著性
A	11.306 7	2	28.105 2	1)
B	4.368 1	2	10.857 8	
C	2.672 4	2	6.642 8	
D	0.402 3	2		

注: 1)P<0.05

Note: 1)P<0.05

1.2.9 验证试验 取土人参干粉 3 份, 每份 1 g, 按优选出的最佳提取工艺进行提取, 即按加酶量每克药材 400 U 酶, 在 50 ℃、pH 值为 6 的溶液中进行提取 3 h。将提取液在沸水浴中灭活酶 5.0 min, 冷却过滤, 定容, 离心取上清液适量稀释一定的倍数, 测定吸光度, 计算土人参多糖的提取率。结果按最佳提取条件进行提取, 多糖提取率平均为 21.16%, RSD 为 0.14%, 与正交试验中的 9 号试验的多糖提取率相近, 因此认为正交试验得出的结果是可靠的且工艺稳定可行。

2 讨论

通过单因素试验和正交试验, 研究了纤维素酶提取土人参多糖的提取条件, 得到纤维素酶提工艺参数: pH 值为 6, 酶用量每克药材 400 U 酶, 酶解温度 50 ℃, 提取时间 3 h。在上述提取条件下, 多糖的平均提取率达 21.16%, RSD 为 0.14%。

纤维素酶作用时间温和, 提取工艺简洁, 且不用加入有机试剂, 与传统提取工艺比较具有产品质量稳定、低消耗、低污染、省时、高效的特点。

酶工程技术是近年来用于天然植物有效成分提取的一项生物工程技术。选用恰当的酶, 可较温和地将植物组织分解, 加速有效成分的释放, 从而提高其提取率。土人参的细胞壁主要由纤维素构成, 纤维素酶可以将其水解为葡萄糖, 使其内容物更容易被提取出来。纤维素酶只是破坏土人参细胞的细胞壁, 其细胞内部物质并不含有纤维素类物质, 因此纤维素酶对其内容物的成分没有任何影响。我国分布的中草药种类繁多, 有效成分结构复杂。为了提高中草药有效成分的提取率, 并且得到质量稳定的产品、低消耗、低污染、省时、高效, 可在工业生产中充分的应用酶法提取中药有效成分。

REFERENCES

- [1] XIONG H Z, ZHANG J W, AO M H. Seedling soil ginseng drug content analysis of several trace elements [J]. Stud Trace Elements Health(微量元素与健康研究), 2008, 25(6): 57-58.
- [2] Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. Dictionary of Traditional Chinese Medicine(中药大辞典) [M]. 2nd ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2005: 108-109.
- [3] WANG W P, CHEN Y, WU G Q, et al. Optimization of crude polysaccharides extraction technology from *Coix lachrymaljoli* L [J]. J Guizhou Agri Sci(贵州农业科学), 2010, 38(2): 171-172, 176.
- [4] JIANG B, WANG Y Y, LIU C J, et al. Extraction purification and content determination of polysaccharide in ginkgo leaves [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(11): 2729-2731.
- [5] BI Y G, QIU T Q, LI K P, et al. Cellulase enzymatic extraction of total flavonoids of astragalus technology [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2009, 20(10): 2478-2480.
- [6] GUO H J, WEI D G. Study on optimization of extraction process of *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. polysaccharide and its scavenging effect on radical [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2010, 38(34): 19341-19342, 19345.
- [7] WANG J Z, AN J, LV H C. Plant amylose content determination of the methodology of the study [J]. Strait Pharm J, 2008, 20(5): 59-60.
- [8] ZHONG F X, REN H H, LI Y. Comparison of methods in determination of polysaccharide content [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(8): 1916-1917.

收稿日期: 2011-10-09