

水提法提取百合多糖优选工艺的研究

熊明郁, 牛世全* (西北师范大学生命科学学院, 甘肃兰州 730000)

摘要 [目的] 优选水提法提取百合多糖的工艺条件。[方法] 以新鲜兰州百合为原料, 采用水提法提取百合多糖, 以浸提时间、固液比、温度以及浸提次数作为因素进行单因素试验, 在单因素试验的基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优化百合水溶性多糖的提取工艺条件。[结果] 试验表明, 百合水溶性多糖的最优提取工艺条件为: 固液比 1:20 g/ml, 温度 80 °C, 浸提时间 1 h, 浸提 2 次, 此条件下百合粗多糖提取率为 0.92%。[结论] 研究可为兰州百合的研究与利用提供一定的理论依据。

关键词 百合多糖; 水法提取; 正交试验

中图分类号 S644.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)36-13047-03

Study on the Extraction Craft of the Polysaccharide from *Lilium brownii*

XIONG Ming-yu, NIU Shi-quan* (College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract [Objective] To optimize technique conditions for *Lilium brownii* polysaccharide. [Method] With fresh *Lilium brownii* as raw material, water extraction method was adopted, soaking time, solid-liquid ratio, temperature and soaking times were used as factors to conduct single factor test. On the basis of this, $L_9(3^4)$ orthogonal design was conducted to optimize extraction technique for polysaccharide from *Lilium brownii*. [Result] The optimal extraction conditions are: solid-liquid ratio 1:20 g/ml, temperature 80 °C, soaking time 1 h, the extraction rate of crude polysaccharide from *Lilium brownii* is up to 0.92%. [Conclusion] The study can provide a certain theoretical basis for research and utilization of *Lilium brownii*.

Key words *Lilium brownii* polysaccharide; Water extraction method; Orthogonal design

兰州百合 (*Lilium Brownii*) 是一种多年生鳞茎类草本植物, 是百合科百合属川百合的一个变种。百合原产亚洲东部的温带地区, 我国南北 26 个省、自治区都有它的踪迹。兰州拥有得天独厚的土壤条件和多年积累的栽培技术, 出产的百合色白、个大、味美、营养丰富, 成为全国种植百合的佼佼者。兰州市西果园乡、魏岭乡、黄峪乡以及榆中县兰山乡等都是兰州优质百合的主产区, 2008 年兰州百合的种植面积已达 0.67 万 hm^2 , 其中兰州市占 0.40 万 hm^2 , 适宜种植的甘南、临夏、定西等地合计种植 0.27 万 hm^2 。兰州百合色泽洁白如玉、肉质肥厚香甜, 营养价值极高, 又是我国唯一的甜百合, 有很高的药用、食用、保健和观赏价值, 因而备受东南沿海地区为主的消费者的喜爱。最早在 1700 多年前的《神农本草经》中发现关于百合的记载, 东汉医圣张仲景明确了百合的清热、宁心、安神之效。而后, 唐朝医学家孙思邈在《千金翼》书中叙述了百合的栽培技术。现代医学研究表明, 百合具有镇静、消炎、抗疲劳、改善呼吸功能、增强机体免疫功能^[1]等作用。百合中的百合多糖具有抗氧化活性^[2], 百合中的百合苷、秋水仙碱能抑制癌细胞的增生^[3], 它的蛋白质含量比一般蔬菜高 3~5 倍, 糖含量高 10 倍, 含有 17~19 种游离氨基酸及人体必需的多种微量元素^[4]。而在百合各种营养功效中, 起最主要作用的则为百合多糖, 20 世纪 60 年代以来, 多糖所具有的各种生理功能逐渐被人们所重视, 尤其是增强免疫力的功能被广泛认同, 并被实践于肿瘤化疗。

近年来, 我国也对多种物质多糖提取等进行了研究。多糖的种类繁多, 传统上, 水提法是研究和应用的最多的一种方法。水提法可用水浸煮提取, 也可用冷水浸提。贾薇等研

究报道了姬松茸菌丝体多糖的热水提取的方法^[5], 刘美琴等研究用热水提取香菇菌丝体多糖^[6], 其他如洋葱、香菇多糖的提取^[7-8]也多见报道, 而百合多糖的研究在近年同样逐步开展起来, 但对百合多糖的提取、脱蛋白方法以及化学结构的研究仍在摸索之中, 虽有一定的结论, 但仍需其他试验予以配合研究及提供数据。

笔者以兰州百合为原料, 系统研究水提法提取百合多糖的工艺和关键技术参数, 优选百合多糖提取工艺条件, 为兰州百合的研究与利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原材料。兰州百合, 购于北京华联超市。

1.1.2 仪器与设备。RE52-98 旋转蒸发仪, 上海荣化仪器设备有限公司; KUBOTA3740 低速离心机, 产于日本; WFJ-7200 型可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; BP2215 型电子天平; HH-4 数显恒温水浴锅, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; 101A-E 电热鼓风干燥箱, 上海市仪器有限公司; 10 ml 具塞试管, 100 ml 容量瓶, 250 ml 三角瓶, 漏斗, 滤纸, 吸管, 量筒, 烧杯等。

1.1.3 主要试剂。三氯甲烷(AR), 天津精细化工厂; 正丁醇(AR), 天津市精细化工厂; 无水乙醇(AR), 中国莱阳市双双有限公司; 浓硫酸(AR), 莱阳市双双化工有限公司; 苯酚(AR), 天津市精细化工厂; 葡萄糖(AR), 上海华兴化工研究所。

1.2 工艺流程和操作要点

1.2.1 工艺流程。鲜百合→洗净→研碎→热水浸提→冷却→过滤→低温浓缩→加入乙醇醇析→离心→复溶→Sevag 法脱蛋白→静置→离心去沉淀→百合粗多糖。

1.2.2 操作要点。①精确称取 2.000 g 百合, 洗净, 研碎, 溶于适量水中。②在不同浸提时间、固液比、温度以及浸提次

作者简介 熊明郁(1986-), 女, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学。* 通讯作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事微生物学研究。

收稿日期 2014-11-05

数下进行热水浸提。③浸提一定时间后,冷却过滤,弃去滤渣,并将滤液浓缩至原来的1:4左右。④滤液加入3倍体积的无水乙醇进行醇析,静置12 h。⑤醇析后的多糖溶液在4 000 r/min下离心15 min,将离心所得的沉淀物复溶,加入1:4体积Sevag试剂(氯仿:正丁醇=4:1)进行脱蛋白,室温下静置过夜。⑥将已脱蛋白的多糖溶液在4 000 r/min下离心15 min,弃去沉淀物,上清液定容至100 ml,于490 nm处测定吸光度。

1.3 试验设计

1.3.1 百合水溶性多糖热水浸提单因素条件的研究。多糖溶于水或酸、碱溶液而不溶于醇、醚、丙酮等有机溶剂,但多糖在酸碱中易降解,所以利用热水法提取水溶性百合多糖。据文献^[9]报道,影响热水提取多糖的因素主要有浸提时间、提取次数、固液比、浸提温度等^[10]。采用单因素试验研究浸提时间、温度、固液比及浸提次数等因素对多糖提取率的影响。

1.3.1.1 浸提温度的选择。在确定料液比为1:20 g/ml,浸提时间为2 h不变的条件下,分别在60、70、80、90℃条件下浸提1次,根据其多糖提取率确定最佳浸提温度。

1.3.1.2 固液比的选择。浸提时间仍为2 h,浸提温度由“1.3.1.1”试验确定,选择固液比分别为1:10,1:20,1:30,1:40 g/ml的条件下浸提1次,根据其多糖提取率确定最佳料液比。

1.3.1.3 浸提时间的选择。在以上试验确定的浸提温度及固液比条件下,分别在1、2、3及4 h条件下浸提1次,根据其多糖提取率确定最佳浸提时间。

1.3.1.4 浸提次数的选择。在最佳浸提时间、温度和固液比均确定后,进一步研究浸提次数对多糖提取率的影响,分别浸提1、2、3次,根据其多糖提取率确定最佳浸提次数。

1.3.2 正交试验设计^[11]。根据单因素试验确定的条件范围(表1),通过 $L_9(3^4)$ 正交试验,得出优选工艺条件。

表1 百合多糖提取 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

水平	因素		
	浸提温度(A)//℃	固液比(B)//g/ml	浸提时间(C)//h
1	60	1:20	1
2	70	1:30	2
3	80	1:40	3

1.4 多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸比色法测定百合多糖含量^[12]。

1.4.1 标准曲线的绘制^[13-14]。精确称取干燥至恒重的葡萄糖标准品10.0 mg,加适量水溶解,定容至100 ml容量瓶中,摇匀,配成浓度为0.1 mg/ml的标准葡萄糖溶液。精确吸取葡萄糖标准溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml,置10 ml容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。分别精确吸取1.0 ml置试管内,加5.0%苯酚溶液1.0 ml,浓硫酸5.0 ml,室温放置40 min,以1.0 ml蒸馏水、1.0 ml苯酚溶液、5.0 ml浓硫酸混合液按上述操作做空白,于波长490 nm处测定吸光度A,对测得的数据进行线性回归,求出回归方程。

1.4.2 样品多糖含量测定^[15-16]。取样品溶液1 ml,加入试

剂,同标准曲线制作之操作,比色测定。将所得吸光度(A)值代入回归方程,即可算出样品中多糖的含量。

$$\text{样品多糖提取率}(\%) = \frac{\text{样品多糖含量} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品干重}} \times 100\%$$

1.5 数据分析 所有试验数据均采用DPSv7.55数据处理软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 苯酚-硫酸比色法标准曲线的绘制 根据6支试管所测得的吸光度绘制出标准曲线,算出其回归方程为 $y = 11.202x$,相关系数 R^2 为0.998 2,说明这个回归方程可以用于百合多糖含量的测定。

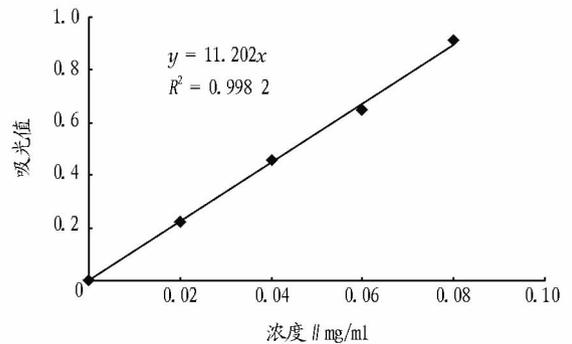
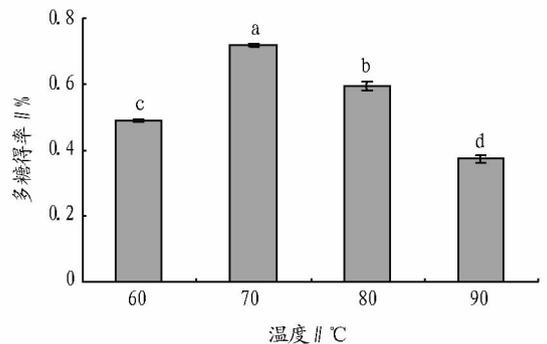


图1 葡萄糖标准曲线

2.2 单因素试验结果

2.2.1 浸提温度对百合多糖提取率的影响。由图2可知,温度为70℃时提取率最高。同时对上述不同水平多糖提取率进行方差分析,结果表明,温度70℃与60、80、90℃之间在5%水平上有显著性差异,浸提温度低,则浸提时多糖的迁移速度慢,所以效果不佳,浸提温度过高会使多糖的生物活性遭到破坏,因此选择最佳浸提温度为70℃。

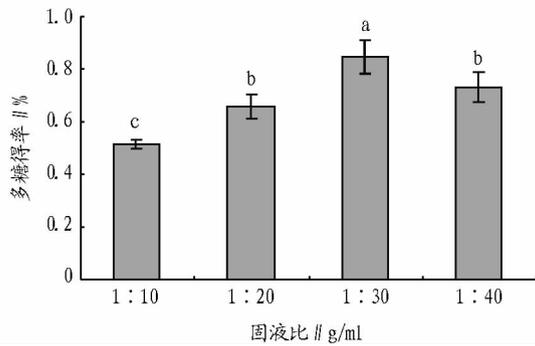


注:图中不同小写字母表示在0.05水平差异显著。

图2 不同浸提温度对百合多糖提取率的影响

2.2.2 固液比试验结果分析^[17]。由图3可知,固液比为1:30 g/ml时多糖提取率最高。同时对上述不同水平多糖提取进行方差分析,结果表明,固液比1:30 g/ml与1:10、1:20、1:40 g/ml之间在5%水平上有显著性差异,固液比1:20 g/ml与1:40 g/ml在5%水平上无显著性差异,由于浸提液在后续工序中需经浓缩,若初期加水量过大不但会使后续工序能耗增加,而且多糖在后期的浓缩过程中会产生分解,导致得率

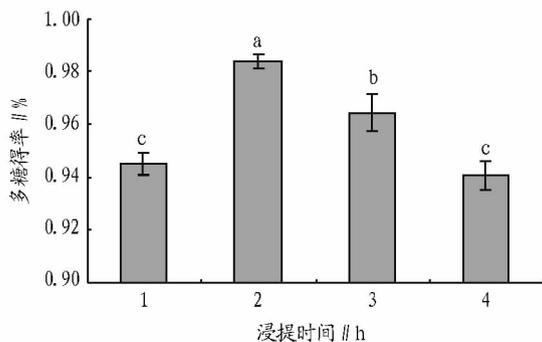
降低,因此宜选择固液比为 1:30 g/ml。



注:图中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

图 3 不同固液比对百合多糖提取率的影响

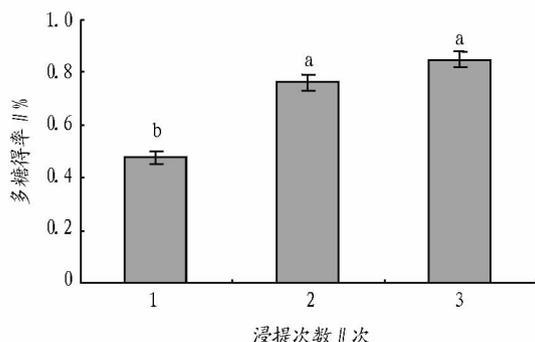
2.2.3 浸提时间结果分析。由图 4 可知,浸提时间为 2 h 时百合多糖提取率最高。同时对上述不同水平制备百合多糖进行方差分析,结果表明,浸提时间 2 h 与 1、3、4 h 之间在 5% 水平上有显著性差异,浸提时间太长则多糖会产生分解,故较好的浸提时间为 2 h。



注:图中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

图 4 不同浸提时间百合多糖提取率的影响

2.2.4 浸提次数结果分析。由图 5 可知,浸提 1 次与浸提 2 次、3 次之间差异较大,而浸提 2 次与 3 次之间无显著差异,因此以浸提 2 次为宜,以节约能耗,降低成本。



注:图中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

图 5 不同浸提次数对百合多糖提取率的影响

2.3 热水浸提优选工艺正交试验结果及分析 在单因素试验基础上,选择浸提温度、固液比、浸提时间为考察因素,以多糖提取率为考察指标,确定各正交设计因子的水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表对热水提取工艺进行研究,测定多糖含量,确定热水提取的最佳工艺参数。

表 2 热水提取百合多糖 $L_9(3^4)$ 正交试验方案及结果

试验号	因素			多糖提取率 %
	浸提温度 (A) // °C	固液比 (B) // g/ml	浸提时间 (C) // h	
1	60	1:20	1	0.525
2	60	1:30	2	0.526
3	60	1:40	3	0.488
4	70	1:20	2	0.502
5	70	1:30	3	0.463
6	70	1:40	1	0.460
7	80	1:20	3	0.750
8	80	1:30	1	0.783
9	80	1:40	2	0.395
k_1	1.539	1.777	1.768	
k_2	1.424	1.739	1.423	
k_3	1.928	1.343	1.701	
R	0.504	0.434	0.345	

由表 2 数据分析可知,对百合多糖提取率影响最大的因素是 A,即浸提温度对百合多糖提取率的影响最大;其次是 B,即固液比对百合多糖提取率影响仅次于浸提温度;对百合多糖提取率影响最小的因素是 C,即对百合多糖提取率影响最小的因素是浸提时间。对百合多糖提取率的影响因素的顺序是 $A > B > C$ 。结合 R 值可知,最佳条件为 $A_3B_1C_1$,即最佳条件为:固液比 1:20 g/ml,温度 80 °C,浸提时间 1 h 为最优工艺条件,粗多糖提取率 0.92%。

2.4 验证试验。将处理过的百合样品称取 2.000 g,依上述试验确定的最佳工艺,即按 1:20 g/ml 的固液比,在 80 °C 条件下,浸提 1 h,浸提 2 次,然后过滤,合并滤液,并浓缩。向浓缩液中加入 3 倍体积的无水乙醇,沉淀 12 h 左右,离心,收集沉淀得粗多糖。测得粗多糖的提取率是 0.92%。

3 结论

通过单因素试验结果可得到百合多糖热水提取各因素最佳条件为:温度 70 °C 时百合多糖提取率最高,浸提时间为 2 h 时百合多糖提取率最高,浸提 2 次为最宜,最佳固液比为 1:30 g/ml。

由正交试验结果可得到百合多糖热水提取的最优工艺为:温度 80 °C,浸提时间为 1 h,浸提时固液比为 1:20 g/ml,经醇沉及脱蛋白处理后得粗多糖,在此最佳工艺条件下,粗多糖提取率 0.92%。

对百合多糖提取率影响最大的因素是浸提温度,其次是固液比,影响最小的因素是浸提时间。

参考文献

- [1] 苗明三,杨林莎.百合多糖免疫兴奋作用[J].中药药理与临床,2003,1(1):15-16.
- [2] 滕利荣,孟庆繁,刘培源.酶法提取百合多糖及其体外抗氧化活性[J].吉林大学学报:自然科学版,2003(4):538-542.
- [3] 吴雪辉,黄永芳,谢治芳.百合淀粉颗粒结构与性质研究[J].食品科学,2004(2):43-45.
- [4] 肖培根,杨世林.百合[M].北京:中国中医药出版社,2001.
- [5] 贾薇,刘艳芳,张劲松,等.姬松茸菌丝体多糖提取方法初探[J].食用菌学报,2003,10(3):41-44.
- [6] 刘美琴.香菇菌丝体多糖的分离鉴定和免疫功能的研究[J].生物化学与生物物理学报,1999,31(1):46-50.

加氧酶的特性。

胡江等^[15]报道阿特拉津降解菌 *Exiguobacterium* sp. 在基础盐培养基中的最适降解温度范围为 25 ~ 30 °C; 代先祝等^[15]报道了 *Pseudomonas* sp. 在基础盐培养基中的最适降解温度区间在 37 ~ 42 °C, 该研究中所使用的降解菌 *Arthrobacter* sp. Hal 无论是在 BSM 中还是在营养贫瘠的 MgCl₂ 体系中, 20 ~ 45 °C 都具有良好的降解效果。在营养贫瘠的 MgCl₂ 体系中 45 °C、72 h 的降解率仍可达到 40%, 表明该菌株在修复营养贫瘠的地下水污染方面将具有良好的应用前景。

Strong 等^[17]把来自假单胞菌 ADP 菌株的 *atzA* 基因转入大肠杆菌, 构建了工程菌株后用灭活细胞进行了土壤修复, 56 d 内土壤中阿特拉津降解率为 52%。胡江等^[18]利用微小杆菌属 (*Exiguobacterium* sp, BTAH1) 和节杆菌属 (*Arthrobacter* sp, AG) 降解菌生长细胞修复被阿特拉津污染的土壤, 8 d 后土壤中阿特拉津的降解率分别达 96.9% 和 96.4%。该研究中 *Arthrobacter* sp. Hal 在细胞浓度达到 1 × 10⁸ 个/ml 时仅 48 h BSM 体系中的阿特拉津降解率就可达 100%, 而营养贫瘠的 MgCl₂ 溶液中降解 0.5 g/L 的阿特拉津也只需 84 h, 说明该菌株具有更强的降解能力。

在该试验选择的细胞浓度和 MgCl₂ 溶液降解体系未观察到生物量增加, 细胞基本上处于静息状态。菌株 Hal 静息细胞能降解阿特拉津和氰尿酸的混合物, 但氰尿酸在一定程度上抑制 Hal 对阿特拉津的降解。氰尿酸作为阿特拉津降解的中间产物, 氰尿酸的降解是由 AtzD 酶来完成的^[11]。Hal 静息细胞成功降解阿特拉津为固定化细胞大规模降解阿特拉津奠定了基础。

参考文献

[1] 任登洲, 高小朋, 贺晓龙, 等. 阿特拉津降解菌的筛选及降解性能研究 [J]. 江苏农业科学, 2009(5): 306 - 309.

(上接第 13049 页)

[7] 张强, 牟雪娇, 周正义. 洋葱多糖的提取及抗氧化活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 3(1): 134 - 141.

[8] 贾淑珍, 王成忠, 于功明. 香菇多糖脱蛋白工艺的研究 [J]. 中国酿造, 2008(5): 24 - 27.

[9] 刘成梅, 付桂明, 涂宗财, 等. 百合多糖提取的影响因素研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(2): 87 - 89.

[10] 刘成梅, 万茵. 百合多糖脱蛋白方法的研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(1): 89 - 90.

[11] 王钦德, 杨坚. 食品试验设计与统计分析 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.

[2] 王东, 冬田芹, 赵继红. 环境水体中痕量阿特拉津的检测 [J]. 北方工业大学学报, 2004, 16(3): 32 - 36.

[3] KLIGERMAN A D, DOERR C L, TENNANT A H, et al. Cytogenetic studies of three triazine herbicides. invitro studies [J]. Mutation Research, 2000, 456(4): 53 - 59.

[4] 苏少泉. 除草剂作用靶标与新品种创制 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 268.

[5] BUSTER H R. Atrazine and others triazine herbicide in lakes and rains in Switzerland [J]. Environmental Science Technology, 1990, 24(1): 1049 - 1058.

[6] FISCHER I T, VEESER A, HOFFMANN R W, et al. Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rain bowtrout [J]. Archives of Environmental Contamination Toxicology, 1991, 20(5): 454 - 461.

[7] KOLPIN D W, SNECK D A, HALLBERG G R, et al. Temporal trends of selected agricultural chemicals in Iowa's groundwater, 1982 - 95: Are things getting better [J]. Environ Qual, 1996, 26(3): 1007 - 1017.

[8] 王子健, 吕怡兵, 王毅, 等. 淮河水体取代苯类污染及其生态污染 [J]. 环境科学学报, 2002, 22(3): 300 - 303.

[9] STRONG L C, MCTAVISH H, SADOWSKY M J, et al. Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase [J]. Environmental Microbiology, 2000, 367(2): 91 - 98.

[10] 胡江等, 胡江, 代先祝, 等. 两株降解菌对阿特拉津污染土壤的修复效果研究 [J]. 土壤学报, 2005, 42(3): 323 - 328.

[11] 蔡宝立, 黄令勇. 除草剂阿特拉津生物降解研究进展 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(3): 7 - 10.

[12] NEWCOMBE D A, CROWLEY D E. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(6): 877 - 882.

[13] 陈东之, 陈建孟, 章晶晓, 等. 环境因素对甲基叔丁基醚生物降解的影响研究 [J]. 环境科学学报, 2007, 27(9): 1463 - 1469.

[14] 余冰宸. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2004: 165.

[15] 胡江, 代先祝, 李顺鹏. 阿特拉津降解菌 BTAH1 的分离与鉴定 [J]. 中国环境科学, 2004, 24(6): 738 - 742.

[16] 代先祝, 蒋建东, 顾立峰, 等. 阿特拉津降解菌 *Arthrobacter* sp. AG1 降解基因研究 [J]. 生物工程学报, 2007, 9(5): 789 - 794.

[17] STRONG L C, ROSENDAHL C, JOHNSON G, et al. *Arthrobacter* sp. TCI metabolizes diverse s-triazine ring compounds [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 5973 - 5980.

[18] 胡江, 代先祝, 李顺鹏. 阿特拉津及其降解菌的使用对土壤微生物群落的影响 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(8): 1518 - 1522.

[12] 杨林莎, 李玉贤. 苯酚 - 硫酸比色法测定百合多糖的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(8): 704 - 705.

[13] 杨林莎, 李玉贤, 李秋杰. 百合多糖提取 - 纯化工艺优选 [J]. 中医研究, 2005, 18(1): 25 - 27.

[14] 陈建民, 彭会明. 胖大海中多糖的成分分析和含量测定 [J]. 中药材, 1994(17): 32 - 34.

[15] 黄晓钰, 刘邻涪. 食品化学综合实验 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.

[16] 陈来同. 生化工艺学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.

[17] 宁正祥. 食品成分分析手册 [M]. 北京: 轻工业出版社, 1998.