

酶法提取格尔木枸杞中多糖工艺的研究

汪焕林¹, 曹长年^{1*}, 汪世昊², 李文林¹ (1. 青海大学化工学院, 青海西宁 810016; 2. 中南大学, 湖南长沙 410083)

摘要 [目的] 优化提取格尔木产枸杞中多糖的工艺条件。[方法] 以枸杞中多糖的得率为指标, 用单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交试验法对提取料液比、提取时间、提取温度和酶质量分数 4 个因素进行考察, 确定提取枸杞多糖的最佳工艺, 并对其结果进行验证。[结果] 4 个因素对酶法提取枸杞多糖的影响程度依次为料液比 > 酶质量分数 > 提取温度 > 提取时间, 最佳提取工艺为 $A_2B_3C_3D_1$, 即提取温度为 50 °C, 提取时间为 20 min, 料液比为 1:20 g/ml, 酶质量分数为 0.5%, 该条件下格尔木产枸杞中多糖得率为 2.949 8%。[结论] 研究可为格尔木枸杞的进一步开发应用提供参考依据。

关键词 枸杞多糖; 酶法提取; 得率

中图分类号 S567.1¹9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00304-03

Study on Technique of Extracting Polysaccharide from Golmud *Lycium barbarum* with Enzymatic Method

WANG Huan-lin et al (Chemical Engineering College of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract [Objective] To optimum techniques of extracting polysaccharide from *Lycium barbarum* in Golmud. [Method] With the yield as index, four factors of solid-liquid ratio, extraction time, temperature and enzyme mass fraction were investigated by single factor test and $L_9(3^4)$ orthogonal test to determine the optimum technique and verify the results. [Result] The order of influencing degree is solid-liquid ratio, enzyme mass fraction > extraction temperature > extraction time, the optimum extraction technique is $A_2B_3C_3D_1$, namely temperature 50 °C, time 20 min, solid-liquid ratio 1:20 g/ml, enzyme mass fraction 0.5%, under the above conditions, the yield is 2.949 8%. [Conclusion] The study will provide reference basis for further development and utilization of Golmud *L. barbarum*.

Key words *Lycium barbarum* polysaccharide; Enzymatic extraction; Yield

近年来,人们对多糖的研究越来越广泛。枸杞子作为传统中药,临床使用历史久远,作为枸杞主要活性成分的枸杞多糖日益得到重视^[1-2]。现代医学表明,枸杞多糖有较强的免疫活性,是有效的免疫增强剂,在细胞免疫和体液免疫中具有重要作用,并以此为基础发挥枸杞多糖的多种功能,对机体细胞起到保护^[3-4]。枸杞多糖的药理作用和无不良反应预示了其在新药及功能食品的研究上具有广阔的前景^[5]。

1 材料与方

1.1 材料 枸杞,产自青海省格尔木市大格勒乡。主要试剂及药品:甲醇,分析纯,天津市大茂化学试剂厂;无水葡萄糖,分析纯,莱阳化工实验厂;无水乙醇、三氯甲烷,均为分析纯,天津市北联精细化学品开发有限公司;苯酚,分析纯,北京化工厂;木瓜蛋白酶,分析纯,北京时科贸有限公司;纤维素蛋白酶,分析纯,国药集团化学试剂有限公司。主要仪器:FA2104S 电子天平,上海精科;LG10-2.4A 高速离心机,北京医用离心机厂;DZX-6090B 真空干燥箱,上海福玛实验设备有限公司;201 电热恒温干燥箱,天津实验仪器厂;RZ-3000 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;722S 分光光度计(上海)等常用仪器。

1.2 方法 多糖的测定方法采用苯酚-硫酸比色法:精确称取 105 °C 干燥至恒重的无水葡萄糖 50 mg,加入 100 ml 的容量瓶中用纯水溶解至刻度^[6-7]。分别取用上述标准液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 于 50 ml 容量瓶中,加水稀释至刻度,然后各取 1.0 ml 于 10 ml 比色皿中,分别加入 5% 的苯酚溶液 1.0 ml,摇匀后加入 8 ml 浓硫酸,摇荡,在沸水浴中加热 15

min 后冷却至室温。以纯水作空白对比,在最佳吸收波长处测吸光度值 A ,绘制相应的曲线。

精确称取经过三氯甲烷与甲醇(3:1)回流脱脂的枸杞粉末 2 份,分别用 95% 和 80% 的乙醇以料液比为(1:2)置于 250 ml 三角瓶中,混合均匀。称取木瓜蛋白酶和纤维素酶按一定的比例混合,加入去离子水溶解,将酶液加入到配好的枸杞混合液中,摇匀,在沸水浴中灭酶 20 min^[6]后冷却,过滤,收集滤液。将得到的枸杞多糖滤液试品,按实际试验结果将其稀释至合适浓度,精确吸取待测液 1.0 ml 置于 1.0 ml 比色皿中,加水稀释至刻度,按上述方法测定吸光度 A 值,绘制对应曲线取得相应的结果。

精确称取枸杞样品 20.00 g,均分为 4 份,以设定的料液比、温度、酶质量分数及提取时间,进行提取。蒸发浓缩至 20 ml 左右,加 4 倍量 95% 乙醇沉淀,吸取清液,测定多糖的含量和提取率。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长和标准曲线的确定 根据试验测得 5 个不同浓度的葡萄糖标准品的吸光度值见表 1,根据表 1 绘制出葡萄糖标准品的波长吸光度曲线(图 1)。综合分析,确定最大吸收波长为 485 nm。在 485 nm 波长下,浓度为 0.02 ~ 0.10 mg/ml 的范围内标准品浓度与吸光度值成线性关系,回归线性方程为: $A = 12.05C + 0.051$, 回归系数 $R^2 = 0.9927$ 。

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比对枸杞多糖提取率的影响。 根据“2.1”,在最大吸收波长为 485 nm 下,选取料比为 1:4、1:7、1:10、1:13、1:16、1:19、1:22 g/ml 的条件考查不同料液比对枸杞多糖提取率的影响。

由图 2 可知,随着加水量的增加,枸杞多糖的提取率也随着增加,但在料液比过了 1:16 g/ml 后,多糖得率增加趋势

基金项目 青海大学教学科研团队建设资助基金项目(20110104-046)。

作者简介 汪焕林(1966-),男,青海湟中人,高级实验师,从事化工实验方面的研究,E-mail:qhdxwhl@163.com。* 通讯作者。

收稿日期 2012-11-12

不明显。考虑提取效率和能耗,初步确定料液比为 1:10 ~ 1:20 g/ml。

表 1 葡萄糖标准品 5 个浓度不同波长下的吸光度值

λ nm	空白	浓度//mg/ml				
	对照	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
450	0.312	0.121	0.237	0.317	0.407	0.461
455	0.349	0.139	0.272	0.374	0.371	0.541
460	0.384	0.161	0.316	0.436	0.555	0.630
465	0.446	0.186	0.374	0.515	0.653	0.742
470	0.500	0.210	0.435	0.605	0.764	0.870
475	0.569	0.233	0.499	0.693	0.874	0.998
480	0.613	0.249	0.552	0.770	0.969	1.119
485	0.617	0.251	0.569	0.808	1.019	1.231
490	0.623	0.234	0.555	0.787	0.995	1.146
495	0.551	0.205	0.491	0.681	0.873	1.009
500	0.456	0.163	0.387	0.554	0.704	0.815

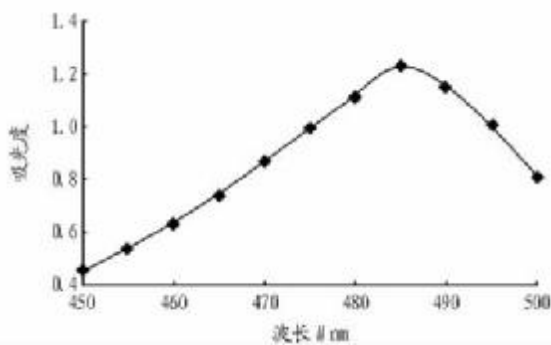


图 1 葡萄糖标准品的波长 - 吸光度曲线

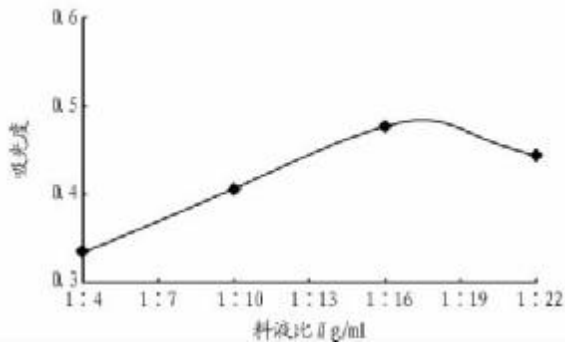


图 2 料液比对枸杞多糖提取率的影响

2.2.2 提取时间对枸杞多糖提取率的影响。根据“2.1”在最大吸收波长为 485 nm 下,选取时间参数为 5、10、15、20、25、30 min 考察不同提取时间对枸杞多糖提取率的影响。

由图 3 可知,当提取时间增加时,枸杞多糖提取率也随之增加,但时间过长也不适宜多糖的提取。过长的时间不但会加大多糖水解的程度,还增加能耗。因此,选取 20 ~ 25 min 提取为宜。

2.2.3 提取温度对枸杞多糖提取率的影响。在最大吸收波长为 485 nm 下,分别在 40、45、50、55、60、65、70 °C 条件下考察不同提取温度对枸杞多糖提取率的影响。

由图 4 可知,随着温度的增加,枸杞多糖的提取率也在增加,当提取温度大于 50 °C 时,提取率的增加不太明显。由于温度太高会影响多糖的化学结构,综合以上分析,确定提

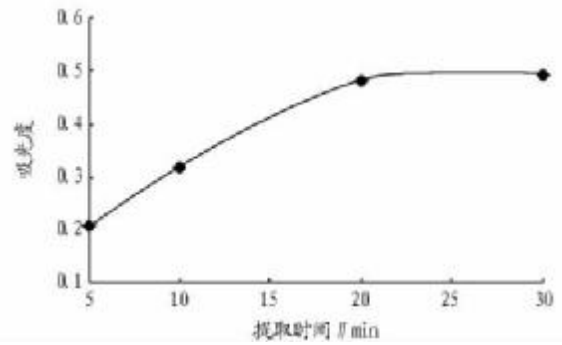


图 3 提取时间对枸杞多糖提取率的影响

取温度为 50 ~ 60 °C 为宜。

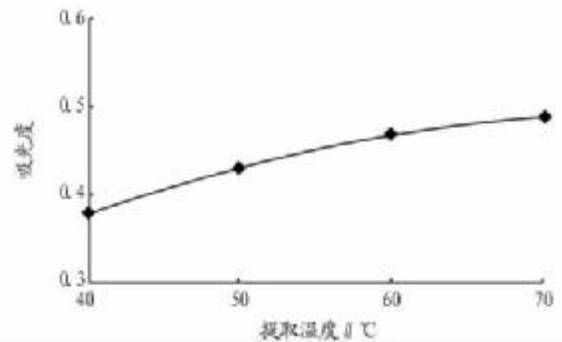


图 4 提取温度对枸杞多糖提取率的影响

2.2.4 酶质量分数对枸杞多糖提取率的影响。在最大吸收波长为 485 nm 下,分别在 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7% 酶质量分数条件下考察不同酶质量分数为枸杞多糖提取率的影响。

由图 5 可知,酶质量分数大于 0.5% 对枸杞多糖提取效果影响不是很明显。根据实验室酶质量分数的具体情况确定提取的酶质量分数为 0.5% ~ 0.7% 为佳。

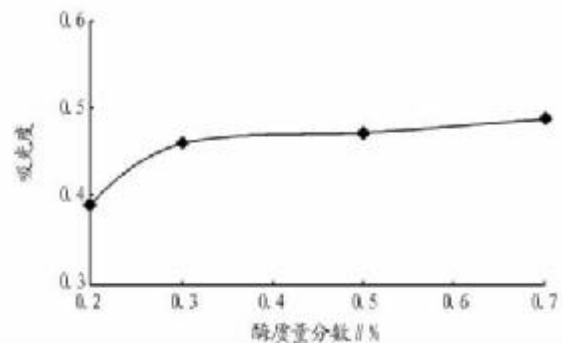


图 5 酶质量分数对枸杞多糖提取率的影响

2.3 正交试验 根据影响多糖提取的单因素试验结果,考察多因素对多糖得率及含量的影响,确定采用 4 因素 3 水平的正交试验,正交试验因素水平设计见表 2,试验结果见表 3。

由表 3 可知,料液比对试验影响最大,无论是以含量还是以得率为指标,4 个因素对酶法提取枸杞多糖的影响程度依次为 C > D > A > B,即料液比 > 酶质量分数 > 提取温度 > 提取时间。最佳提取工艺为 A₂B₃C₃D₁,即提取温度为 50 °C,提取时间为 20 min,料液比为 1:20 g/ml,酶质量分数为

0.5%。

试验证明,提取料液比是影响提取枸杞多糖的主要因素,其次为质量分数和提取温度,影响因素最小的是提取时间。可以看出,由于应用了酶法的辅助提取,大大缩短了提取时间。

表2 枸杞多糖提取正交试验因素水平设计

水平	因素			
	温度(A) ℃	时间(B) min	料液比(C) g/ml	酶质量分数(D) %
1	40	10	1:10	0.5
2	50	15	1:15	0.6
3	60	20	1:20	0.7

表3 正交试验结果分析

试验号	因素				枸杞多糖 得率//%
	温度 (A)	时间 (B)	料液比 (C)	酶质量分数 (D)	
1	1	1	1	1	1.498
2	1	2	2	2	1.196
3	1	3	3	3	1.880
4	2	1	2	3	1.660
5	2	2	3	1	2.569
6	2	3	1	2	1.079
7	3	1	3	2	2.066
8	3	2	1	3	0.846
9	3	3	2	1	1.986
K_1	4.574 0	4.945 0	3.042 3	6.051 0	
K_2	5.308 0	4.611 0	4.842 0	4.034 1	
K_3	4.898 0	5.022 4	6.515 0	4.386 0	
R	0.734 0	0.411 0	3.473 7	2.016 9	

2.4 验证试验 在试验得出的最优提取条件下进行验证试验,第1、2组取自该试验产地格尔木的枸杞,第3组取自宁夏的枸杞。从表4可以看出,所确定的最佳提取工艺相对稳定,以最佳工艺条件提取的格尔木产枸杞多糖得率平均为2.949 8%,宁夏中宁县产枸杞多糖得率为2.190 0%。这与文献记载的一些试验得率相一致^[7-8]。

表4 验证试验结果

试验号	原料干重	粗多糖质量	吸光度	多糖的率
	g	g		%
1	20.018	1.212	0.414	2.998 6
2	20.350	1.103	0.408	2.901 0
3	20.019	0.423	0.315	2.190 0

格尔木产枸杞中多糖含量高于宁夏中宁产枸杞,这依赖于格尔木枸杞种植基地位于柴达木盆地,受降水量少、日照时间长、昼夜温差大等气候特征影响,这里的枸杞以颗粒大、籽少肉厚、味道比较甜、含糖量高而著称。

3 结论

枸杞多糖酶法提取的最佳工艺路线为 $A_2B_3C_3D_1$,即提取温度为50℃,提取时间为20 min,料液比为1:20 g/ml,酶质量分数为0.5%,该条件下得出枸杞多糖的得率为2.949 8%,含糖量比宁夏产的枸杞较高。

参考文献

- [1] 薛立文,李以暖.枸杞子营养和保健功能[J].广东微量元素科学,2000(7):1-4.
- [2] 张自萍,廖国玲,李宏武.宁夏枸杞黄酮类化合物 HPLC 指纹图谱研究[J].中草药,2008,39(1):103-105.
- [3] 孙芝杨,钱建亚,陈卫.宁夏枸杞子类黄酮的提取及其性质研究[J].食品科学,2008,29(3):188-194.
- [4] 何彦丽,应逸,苏宁,等.枸杞多糖抗实验性肝癌作用及对 VEGF 表达与分泌的影响[J].广东医学,2006,27(7):950-952.
- [5] 秦睿玲,李国徽,张久荣,等.枸杞多糖对机体免疫功能调节的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2011(8):39-41.
- [6] 姜红,孙宏鑫,李晶,等.酶法提取黑木耳多糖[J].食品与发酵工业,2005(6):131-133.
- [7] 魏永祥,商希礼.枸杞多糖的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(11):5834-5836.
- [8] 国家药典委员会.中国药典第一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:232.
- [9] SHANG X L,WEI Y X. Isolation, purification and components analysis of polysaccharide from wild Lycium barbarum of Shandong Province [J]. Medicinal Plant,2010,1(9):58-59.
- [10] 吕凤娇,吴洪,高平章.枸杞多糖提取工艺研究[J].安徽农业科学,2011,39(4):2075-2076,2079.
- [11] FAN Y J,YU F F,ZHANG P,et al. Separation technology of polysaccharides from FRUCTUS LYCHII by ultrafiltration method [J]. Medicinal Plant,2011,2(8):61-65.
- [12] 苟春林,苟金萍,张艳.枸杞多糖提取及分离技术研究[J].宁夏农林科技,2011,52(5):66,89.
- [13] ZHONG G H,QUAN H,YUAN L,et al. Analysis of Podophyllotoxin in Different Parts of Dysosma tsayuensis Ying by HPLC [J]. Medicinal Plant,2010,1(12):54-57.
- [14] 贾定洪,王波,彭卫红,等.4个野生灵芝菌株的 ITS 序列分析[J].西南农业学报,2012(4):1414-1416.
- [15] LUO H B,ZHANG J,HU Z H,et al. Analysis of nrDNA - ITS gene sequence of famous region drug Codonopsis tangshen Oliv. [J]. Medicinal Plant,2010,1(4):39-41.
- [16] 易思荣,韩凤,黄娅,等.石生黄堇和毛黄堇的核糖体 DNA ITS 序列分析[J].湖南农业科学,2011(23):10-12.

(上接第200页)

- [11] 张姮,康林,高必达,等.毒麦属6个种的 rDNA ITS 序列测定及分析[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2009,35(1):21-22.
- [12] 姜帆,高慧颖,陈秀萍,等.龙眼属 rDNA 的 ITS 序列分析[J].果树学报,2008,25(2):262-268.
- [13] ZHONG G H,QUAN H,YUAN L,et al. Analysis of Podophyllotoxin in Different Parts of Dysosma tsayuensis Ying by HPLC [J]. Medicinal