

植物复合酶 SPE-002 提取茯苓多糖工艺研究

龚志华, 邓燕莉, 陈芳, 胡雅蓓, 张月, 肖文军*

(湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 以资源丰富且多糖含量高的茯苓为原料, 以茯苓多糖提取率为考察指标, 通过单因素试验, 研究植物复合酶 SPE-002 提取茯苓多糖的技术参数(SPE-002 加酶率、酶解时间、酶解温度和酶解反应体系 pH 值), 并通过正交试验及验证试验加以优化, 结果表明, 加酶率 5.0%(即加酶量为底物的 5.0%)、酶解时间 90 min、酶解温度 50 °C、酶解 pH 值 5.0 是植物复合酶 SPE-002 提取茯苓多糖的最优技术参数. 在该优化条件下, 茯苓多糖提取率为 11.78%.

关 键 词: 茯苓; 茯苓多糖; 植物复合酶 SPE-002; 提取率

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)05-0565-04

Extraction technique in *Poria cocos* polysaccharides by plant multienzyme SPE-002

GONG Zhi-hua, DENG Yan-li, CHEN Fang, HU Ya-bei, ZHANG Yue, XIAO Wen-jun*

(College of Horticulture and Landscape, HNAU, Changsha 410128, China)

Abstract: Based on the study of verification test and via orthogonal experiment in extracting *Poria cocos* polysaccharides of different factors including enzymolysis concentration, enzymolysis time, enzymolysis temperature and enzymolysis pH value, using resource-rich, high-pachyman *Poria cocos* as the raw material, the best technical parameter on the extraction of *Poria cocos* polysaccharides by the plant multienzyme SPE-002 was optimized and screened. The best parameters was:enzymolysis content 5.0% of the substrate, enzymolysis time 90 min, enzymolysis temperature 50 °C, enzymolysis pH 5.0. Compared with the traditional extraction ratio 1.6%, the optimized extraction yield reached 11.78% by use of the plant multienzyme SPE-002.

Key words: *Poria cocos* (Schw.) Wolf; *Poria cocos* polysaccharides; plant multienzyme SPE-002; extraction yield

茯苓(*Poria cocos* (Schw.) Wolf)为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核^[1],其主要活性成分茯苓多糖含量高达 84.2%,具有抑制肿瘤生长、抗炎、抗衰老、调节机体免疫、减轻化疗毒副作用等多种功能^[2-5].按溶解度不同,茯苓多糖分为水溶性茯苓多糖和碱溶性茯苓多糖.茯苓多糖的结构为茯苓聚糖(β -1,3-葡萄糖聚合体),糖链上分布有少量 β -1 \rightarrow 6 结构的葡萄

糖侧链^[6-8].目前,茯苓多糖的制备主要是通过发酵醇沉法^[9]、稀碱浸提法^[10]、水提醇沉法^[11]和微波辅助提取法^[11]等,先得到茯苓多糖的粗品,再通过纯化工艺得到茯苓多糖的精品.水提醇沉法耗时长,多糖提取率低;用酸碱液浸提茯苓多糖,浸提程序较繁琐,浸提反应较剧烈,极易破坏多糖的立体结构,使其生物活性受到限制.植物复合酶主要是由

收稿日期: 2010-03-16

基金项目: 湖南省科学技术厅项目(S2009W2052、2008WK3001)

作者简介: 龚志华(1969—),女,湖南桃源人,博士研究生,副教授,主要从事药用植物资源工程研究;*通讯作者, xiaowenjun88@

sina.com

纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶等组成的混合酶系,适用于聚糖类高分子聚合体的降解及其水解产物的提取^[12-14]。茯苓多糖主要存在于茯苓细胞壁中,受细胞壁主要成分纤维素的阻碍,往往提取率较低。植物复合酶SPE-002可使细胞壁发生不同程度的改变,如软化、膨胀和崩溃等,从而改变细胞壁的通透性,使茯苓多糖更容易被提取。采用生物酶法降解茯苓多糖具有反应条件温和,反应产物无毒、无副作用等优点,近年来越来越受到重视。有关酶法提取茯苓多糖的具体方法鲜见报道。笔者对植物复合酶SPE-002提取茯苓多糖的工艺进行研究,旨在为科学提取茯苓多糖提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料、仪器与试剂

茯苓购于湖南长沙高桥大市场;植物复合酶SPE-002购于宁夏夏盛酶制剂公司。

主要仪器为紫外分光光度计、循环水式多用真空泵、电子天平、鼓风干燥箱、粉碎机、恒温水浴锅等。

主要试剂为葡萄糖标准品(南京华山生物科技有限公司)、苯酚(分析纯)、浓硫酸(分析纯)、柠檬酸、 Na_2HPO_4 。

1.2 方 法

1.2.1 标准曲线的绘制和5%苯酚试剂的配制

葡萄糖标准品于105℃干燥至恒重后,准确称取100 mg,置于500 mL容量瓶中,加水溶解,稀释至刻度,摇匀。分别准确量取配置好的葡萄糖标准品溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,置于25.0 mL试管中,加水至4.0 mL,再分别加入5%苯酚溶液2.0 mL和浓硫酸6.0 mL,充分混合摇匀,室温下放置30 min,用紫外分光光度计在490 nm波长处测定吸光度值。以吸光度为纵坐标(y),葡萄糖质量浓度(mg/L)为横坐标(x)绘制标准曲线,求得标准曲线回归方程: $y=5.46x-0.0083$, $R^2=0.9993$ 。

5.0%苯酚试剂的配制按照文献^[15]中的方法。

1.2.2 植物复合酶SPE-002提取茯苓多糖试验

(1) 单因素试验。选用酶解反应的加酶率、酶解时间、酶解温度、酶解pH值等4个因子进行单因

素试验,分析各因子对植物复合酶SPE-002提取茯苓多糖的影响,并筛选出较优参数。4个因子的设定梯度:加酶率(加酶量占底物的比率)分别为2.0%、3.5%、5.0%、6.5%、8.0%,酶解时间分别为60、90、120、150、180 min,酶解温度分别为45、50、55、60、65℃,酶解pH值分别为4.5、5.0、5.5、6.0、6.5。称取2.0 g茯苓粉末,置于锥形瓶中,按固液比1:40加入水温50℃的纯水,再用柠檬酸缓冲液调节pH值为5.0,于50℃水浴中提取90 min,分别加入不同质量的酶(酶质量分别为0.04、0.07、0.10、0.13、0.16 g,即加酶率分别为2.0%、3.5%、5.0%、6.5%、8.0%),对茯苓原料进行酶解提取,将提取液抽滤后于500 mL容量瓶定容,测定吸光度,计算茯苓多糖提取率。在确定最佳加酶率的基础上,按照上述方法,依次确定酶解时间、酶解温度、酶解pH的最优值。

(2) 正交试验。在上述单因素试验的基础上进行正交试验,以加酶率、酶解时间、酶解温度、酶解pH值4因素3水平进行正交试验(表1),确定植物复合酶SPE-002提取茯苓多糖的最佳工艺参数。

表1 植物复合酶SPE-002提取茯苓多糖的正交设计
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A(加酶率/%)	B(酶解时间/min)	C(酶解温度/℃)	D(酶解pH值)
1	3.5	60	45	4.5
2	5.0	90	50	5.0
3	6.5	120	55	5.5

(3) 验证试验。按(1)中方法,对经正交试验得出的最佳工艺参数进行验证。

1.3 测定指标及方法

采用苯酚-浓硫酸法测定茯苓多糖的提取率^[16-19]。吸光度按1.2.1中的方法测定。样品中茯苓多糖提取率 $=\frac{xVD}{1000W} \times 100\%$ 。式中, x 为样品溶液中多糖的含量(mg/L), D 为样品溶液的稀释倍数, V 为测定液体积(L), W 为样品的质量(g)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 加酶率对茯苓多糖提取率的影响

试验结果表明,当加酶率为2.0%、3.5%、5.0%、

6.5%、8.0%时,茯苓多糖提取率分别为7.51%、9.66%、11.2.0%、11.27%、11.36%,可见,茯苓多糖提取率随加酶率的增加而增大,当加酶率为2.0%~5.0%时,茯苓多糖提取率上升幅度较大;当加酶率大于5.0%时,茯苓多糖提取率上升趋于平缓,综合考虑底物与酶的关系及生产成本,选取复合酶最佳加酶率为5.0%。

2.1.2 酶解时间对茯苓多糖提取率的影响

由试验可知,当酶解时间分别为60、90、120、150、180 min时,茯苓多糖提取率分别为4.24%、8.67%、8.92.0%、9.16%、9.33%。可见,随着酶解时间的延长,多糖提取率上升,60~90 min上升幅度最大,超过90 min后,多糖提取率增加趋势平缓,所以,选择90 min为最佳酶解时间。

2.1.3 酶解温度对茯苓多糖提取率的影响

试验结果表明,酶解温度分别为45、50、55、60、65 °C时,茯苓多糖提取率分别为5.48.0%、9.18.0%、9.11%、7.24%、6.97%。可见,酶解温度为45~50 °C时,茯苓多糖提取率上升;当温度高于50 °C时,茯苓多糖提取率迅速下降,所以,选取50 °C为最适酶解温度。

2.1.4 酶解pH值对茯苓多糖提取率的影响

试验结果表明,当酶解pH值分别为4.5、5.0、5.5、6.0、6.5时,茯苓多糖提取率分别为4.03%、9.55.0%、8.69%、8.06%、7.79%。可见,pH值为4.5~5.0时,茯苓多糖的提取率明显增加,而pH为5.0~6.5时,茯苓多糖提取率逐渐下降,所以,确定最佳pH值为5.0。

2.2 正交试验结果

由正交试验结果(表2)可见,4个因素的极差 $R_D > R_A > R_C > R_B$,说明因素D即反应体系的酶解pH值对酶解反应的影响最大。方差分析结果(表3)表明,pH值对茯苓多糖提取率的影响显著,而加酶率、酶解温度以及酶解时间对提取率的影响不显著,因此,综合考虑,优化工艺条件为 $A_2B_2C_2D_2$,即加酶率5.0%、酶解时间90 min、酶解温度50 °C、酶解pH值5.0。

表2 植物复合酶SPE-002提取茯苓多糖的正交试验结果

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	3.5%	60	45	4.5	5.85
2	3.5%	90	50	5.0	8.96
3	3.5%	120	55	5.5	6.30
4	5.0%	60	50	5.5	8.14
5	5.0%	90	55	4.5	8.86
6	5.0%	120	45	5.0	10.22
7	6.5%	60	55	5.0	9.85
8	6.5%	90	45	5.5	7.49
9	6.5%	120	50	4.5	8.26
K_1	7.037	7.947	7.853	7.657	
K_2	9.073	8.437	8.453	9.677	
K_3	8.533	8.260	8.337	7.310	
R	2.036	0.490	0.600	2.367	

表3 植物复合酶SPE-002提取茯苓多糖正交试验结果的方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
加酶率/%	6.680	2	18.103	19.000	不显著
酶解时间/min	0.369	2	1.000	19.000	不显著
酶解温度/°C	0.607	2	1.645	19.000	不显著
酶解pH值	9.802	2	26.564	19.000	显著
误差	0.370	2			

2.3 验证试验结果

以正交试验得出的最佳工艺参数,即加酶率5.0%、酶解时间90 min、酶解温度50 °C、酶解pH值5.0进行验证试验,提取率为11.78%,表明经正交试验筛选出的工艺条件为SPE-002复合酶提取茯苓多糖的最佳工艺条件。

3 结论与讨论

本研究中植物复合酶SPE-002提取茯苓多糖的提取率最高可达11.78%,与文献[3]报道的最高提取率1.6%相比明显提高。试验中溶剂pH值对复合酶活力的影响较明显,这是因为在碱性过强的环境中,酶的空间结构被破坏,影响酶与底物的结合,使得茯苓多糖的提取率降低。

对茯苓多糖的研究虽然已有20余年,但水溶性茯苓多糖的提取率一直难以提高。植物复合酶SPE-002提取茯苓多糖的提取率较以往明显提高,

这是因为植物复合酶SPE-002主要由纤维素酶、果胶酶、半纤维素酶、木聚糖酶、 α -淀粉酶等组成,纤维素酶解作用于内微纤维素的无定型区,生成纤维二糖及其他低分子纤维糊精;果胶酶彻底分解果胶,降低提取液黏度;半纤维素酶能裂解植物细胞壁,释放出更多的有效成分,快速分解果胶等物质,降低果汁黏度;木聚糖酶作用于戊聚糖链,降解高分子黏性物质; α -淀粉酶能够水解淀粉分子的 β -1,4-葡萄糖苷键,从而使淀粉糊的黏度迅速下降,可见,植物复合酶各酶系之间有极强的协同作用,一方面破坏植物细胞壁,使有效成分最大限度溶出,降解植物提取液中的杂质;另一方面可快速降解果胶及各类造成浑浊的物质,沉清提取液,易于滤过,可大大缩短生产周期,降低生产成本.由于酶作用的专一性,纤维素酶只是破坏植物细胞的细胞壁,其细胞内部物质并不含有纤维素类物质,所以,植物复合酶SPE-002对茯苓多糖没有任何影响^[20].

茯苓多糖难溶于水,导致其生物活性大大降低,而多糖的生物活性很大程度上取决于其分子质量的大小.植物复合酶法可降低多糖分子质量,提高其水溶性,降低分子间黏度,增强其生物活性.同时,酶法提取在常温和非有机溶剂下进行,可缩短提取时间,降低能耗和提取成本,所得产物纯度、稳定性及生物活性都较高、无污染.

参考文献:

- [1] 仲兆金,刘浚.衍生法分离茯苓三萜[J].中药材,2002,25(4):247-250.
- [2] 赵吉福,何爱民,陈英杰.茯苓抗肿瘤成分研究[J].中国药物化学杂志,1993,3(2):128-129.
- [3] 李俊,韩向晖,李仲洪,等.茯苓多糖的提取及含量测定[J].中国现代应用药学,2000,17(1):49.
- [4] Zhong Z J, Liu J. Study progresses in triterpenes of *Pofia cocos* and its pharmacology[J]. Chin Tradit Pat Med, 2001, 23(1): 58-62.
- [5] 付玲,于淼.茯苓研究的新进展[J].新疆中医药,2005,2(3):80-82.
- [6] 仲兆金,刘浚.茯苓有效成分三萜的研究进展[J].中成药,2001,23(1):62.
- [7] 杨树东,包海鹰.茯苓中三萜类和多糖类成分的研究进展[J].菌物研究,2005(3):59.
- [8] Kanayama H, Adachi N, Togami M. A new antitumor polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos* Wolf [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1983, 31(3): 1115-1118.
- [9] 纪芳,李鹏飞,徐胜元,等.羧甲基茯苓多糖的制备及体内抗肿瘤作用的实验研究[J].中国微生态学杂志,2003,15(3):333-334.
- [10] 潘琦,贾向云,罗天诰,等.茯苓皮提取茯苓多糖实验方法研究[J].云南中医学院学报,1997,20(3):13-15.
- [11] 聂金媛,吴成岩,吴世容,等.微波辅助提取茯苓中茯苓多糖的研究[J].中草药,2004,35(12):1346-1348.
- [12] 吴鹏,陈龙,郭峰,等.生物复合酶在植物提取中的应用研究[J].中国现代中药,2008,10(1):31.
- [13] Mullin W J, Peacock S, Loewen D C. Macmnutrients content of yellow glacierlily and balsamroot, root vegetables used by indigenous peoples of north-western Nonh American[J]. Food Research International, 1997, 30(10): 769-775.
- [14] 赵素霞.酶法提取桑椹多糖的工艺研究[J].中医研究,2003,16(6):19-20.
- [15] 丰朝霞,张鸿.分光光度法测定茯苓中多糖总糖含量[J].时针国医国药,2000,11(2):109.
- [16] 周跃斌,王伟,李适,等.竹叶多糖提取条件的优化[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2006,32(2):206-207.
- [17] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. A colorimetric method for the determination of sugars [J]. Nature, 1951, 168: 167.
- [18] 张立娟,于国萍,周国华,等.黑木耳多糖酶法提取条件的研究[J].食品研究与开发,2005,26(3):89-91.
- [19] 王远,欧仕益.利用麦麸制备低聚木糖的研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2009,35(4):441-445.
- [20] 张巾英,张明春.应用纤维素酶提取中草药有效成分的研究进展[J].上海中医药杂志,2007,41(1):79-81.

责任编辑:王赛群
英文编辑:罗文翠