

复合酶法提取红雪茶粗多糖工艺优化研究

杨蓉生, 陈炼红*, 唐俊妮, 陈娟, 唐艳琼

(西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

摘要: 为了获得复合酶法提取红雪茶粗多糖的最佳工艺, 采用单因素实验和正交实验, 研究了不同料液比、pH、酶解温度、提取时间和不同复合酶配比对红雪茶粗多糖提取率的影响; 在此基础上采用 $L_9(3^4)$ 正交实验研究了各影响因素对红雪茶粗多糖提取率的影响, 结果表明复合酶最佳配比为纤维素酶 2.0%, 果胶酶 2.0%, 木瓜蛋白酶 0.5%; 影响红雪茶粗多糖提取率的四个因素的主次顺序为: 料液比 > 酶解温度 > pH > 酶解时间; 最佳提取工艺条件是料液比 1:40, pH4.5, 酶解温度 40℃, 酶解时间 80min, 在此条件下红雪茶多糖提取率达 8.91%。本研究确定了复合酶法提取红雪茶多糖的最佳工艺。

关键词: 复合酶法, 红雪茶, 多糖, 提取

Optimization of polysaccharide extraction from *Lethariella Cladonioides* by compound enzymes method

YANG Rong-sheng, CHEN Lian-hong*, TANG Jun-ni, CHEN Juan, TANG Yan-qiong

(College of Life Science & Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: To obtain the optimized process parameter of extracting the polysaccharide from *Lethariella Cladonioides*, single factor experiment and orthogonal test were adopted. The effect of different solid-liquid ratio, pH, temperature of enzymatic hydrolysis (cellulase, Pectinase, papain), extracting time and compound enzymes mixture ratio on the extraction rate of polysaccharide from *Lethariella Cladonioides* were studied. The results showed that compound enzyme best ratio was 2.0% cellulase, 2.0% pectinase, 0.5% papain. The impact factors were as following: solid-liquid ratio > temperature > pH > time. The optimized process parameter was solid-liquid ratio 1:40, pH4.5, temperature 40℃, time 80min. Under this condition the extraction rate of polysaccharide reached to 8.91%. This method was suitable for polysaccharide extraction from *Lethariella Cladonioides*.

Key words: compound enzymes; *Lethariella Cladonioides*; polysaccharide; extraction

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)12-0285-04

红雪茶是生长于雪域高原海拔 4000m 以上的苔藓植物, 属地衣类地茶科植物, 学名地茶。雪茶中的红雪茶又名金丝茶^[1]。红雪茶性凉、味甘, 富含雪茶酸、鳞片酸、羊角衣酸、甘露醇、氨基酸、维生素和微量元素, 经药检安全无毒副作用^[2]。经现代医学研究表明, 红雪茶富含大量人体必须的微量元素, 具有降血脂、降胆固醇、清心开窍、补血养心等功效, 对高血压、冠心病、肥胖症、神衰体弱等有明显作用^[3]。目前对红雪茶化学成分的研究比较多^[4], 但对其活性成分的提取报道很少。对红雪茶多糖的浸提, 仅采用了水提、醇提法^[2], 目前还没有关于酶法提取工艺的相关研究文献。本实验采用复合酶(纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶)提取多糖法^[5-8], 主要研究料液比、酶解温度、酶解时间、pH 以及各种酶的配比对红雪茶多糖提取率的影响, 通过单因素、正交实验确定最佳的工艺条件, 该方法具有条件温和、易除杂质、效率高、对多糖结构和活性影响小等优点, 为红雪茶综

合开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红雪茶 四川西部甘孜高原, 经烘干磨碎成粉; 无水乙醇、萘酮、浓硫酸、磷酸氢二钾、柠檬酸、葡萄糖、蒸馏水均为分析纯; 纤维素酶 BR, 15U/mg, 上海伯奥生物科技有限公司; 木瓜蛋白酶 BR, 650U/mg, 北京奥博星生物技术有限公司; 果胶酶 500U/mg, 成都市科龙化工试剂厂。

delta320 型 pH 计、AL204 型电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; WFZ UV-2102PSC 型紫外可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司; HZS-H 型恒温水浴锅 哈尔滨市东明医疗器械厂制造; F-W-100 型高速万能粉碎机 北京中兴伟业仪器有限公司; DHG-9203A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司; TUS-S2A 型旋转蒸发器 上海鹰迪仪器设备有限公司; AKHL-III-24 型台湾艾柯超纯水机 成都康宁实验专用纯水设备厂; XW-80A 型旋涡混合器 上海青浦沪西仪器厂; 5804R 型冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司; TD4A 型台式低速离

收稿日期: 2011-11-18 * 通讯联系人

作者简介: 杨蓉生(1959-), 女, 实验师, 研究方向: 畜产品加工。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(11NZYTH08)。

离心机 长沙英泰仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 红雪茶的提取工艺 雪茶粉→溶解→复合酶水解→升温→灭酶→离心→蒸发浓缩→乙醇沉淀→洗涤→低温干燥→粗多糖

1.2.2 操作要点 选择质好的雪茶,洗净后沥干,放入80℃的烘箱中干燥2~3h,粉碎机粉碎,过80目筛,收集雪茶粉,密封备用。

取适量的蒸馏水溶解,40℃水浴30min,调pH,加入按一定比例混合的纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶的酶溶液,一定温度条件下,在恒温振荡器上提取一定的时间后,沸水灭酶,冷却,4000r/min离心15min,取上清液,用旋转蒸发器浓缩至原体积1/3,加入约5倍体积95%的乙醇沉淀,静置过夜,离心,无水乙醇洗涤,干燥得粗多糖,称重。

1.2.3 标准曲线的制作 精密量取葡萄糖标准品200mg,置于100mL容量瓶中,加水定容。精密吸取10mL,加水定容到100mL容量瓶中,获葡萄糖标准液。

称取蒽酮0.2g,加入100mL浓硫酸溶解,当日配制使用。

精密量取葡萄糖标准液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL,分别置于10mL具塞试管中,加蒸馏水至2.0mL,空白管吸取蒸馏水2.0mL,与供试品管做以下同步处理。各管分别加入蒽酮试液8mL,摇匀,浸于冷水浴中冷却,移至沸水浴中加热10min,用水冷却,室温放置10min,取出在620nm的波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.4 多糖含量的测定 分别称取雪茶粗多糖20mg,置于250mL的容量瓶中,加少量蒸馏水,在沸水浴中快速溶解充分,后于100mL容量瓶中定容至刻度。精密量取2.0mL,按照标准曲线的处理,测定吸光度,代入回归方程,计算出多糖含量。

根据多糖提取率公式计算出红雪茶多糖的提取率。

$$\text{红雪茶多糖提取率}(\%) = W_2 \times \frac{W_3}{20} \times \frac{1}{W_1} \times 100$$

式中:W₁:红雪茶粉重量(mg);W₂:粗多糖重量(mg);W₃:依据回归方程计算出的多糖重量(mg);20:红雪茶粗多糖重量(mg)。

1.2.4 红雪茶粗多糖提取单因素实验

1.2.4.1 不同料液比对红雪茶粗多糖提取率的影响

在红雪茶粉水浴30min,pH4.5,复合酶比例1:1:1,提取温度40℃、提取时间80min条件下,分别研究不同的料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)(g:mL),对红雪茶多糖的提取的影响,计算提取率。

1.2.4.2 不同pH对红雪茶粗多糖提取率的影响 在料液比为(1.2.4.1的结果),水浴30min,复合酶比例1:1:1,提取温度40℃、提取时间80min条件下,分别研究不同料液的pH(3.5、4、4.5、5、5.5、6)对红雪茶多糖的提取的影响,计算提取率。

1.2.4.3 不同酶解时间对红雪茶粗多糖提取率的影响 在料液比为(1.2.4.1的结果),水浴30min,pH(1.2.4.2的结果)、复合酶比例1:1:1,提取温度40℃

条件下,分别研究不同酶解时间(40、60、80、120min)对红雪茶多糖的提取的影响,计算提取率。

1.2.4.4 不同酶解温度对红雪茶粗多糖提取率的影响 在料液比为(1.2.4.1的结果),水浴30min,pH(1.2.4.2的结果)、复合酶比例1:1:1,酶解时间为(1.2.4.3的结果)的条件下,分别研究不同酶解温度(30、35、40、45、50℃)对红雪茶多糖的提取的影响,计算提取率。

1.2.5 红雪茶粗多糖提取正交实验

1.2.5.1 复合酶配比正交实验 在料液比、pH、酶解时间、酶解温度为单因素实验结果的条件下,研究复合酶的不同用量对红雪茶多糖的提取的影响,设计L₉(3³)正交实验,确定复合酶的最佳配比。见表1。

表1 复合酶配比因素水平表

Table 1 Factors and ratio levels of the complex enzyme

水平	因素		
	A 纤维素酶 (%)	B 果胶酶 (%)	C 木瓜蛋白酶 (%)
1	1.0	1.0	0.5
2	1.5	1.5	1.0
3	2.0	2.0	1.5

1.2.5.2 提取条件的正交实验 为优化提取工艺,根据单因素及复合酶配比正交实验的实验结果,以料液比、pH、酶解温度、酶解时间为实验因素,设计L₉(3⁴)正交实验,确定最佳的提取工艺条件。见表2。

表2 提取条件因素水平表

Table 2 Factors and levels of the extraction condition

水平	因素			
	A 料液比 (g:mL)	B pH	C 酶解温度 (°C)	D 酶解时间 (min)
1	1:20	4.5	35	40
2	1:30	5.0	40	60
3	1:40	5.5	45	80

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

利用蒽酮-硫酸法,测定620nm下的吸光度,绘制标准曲线(图1)。

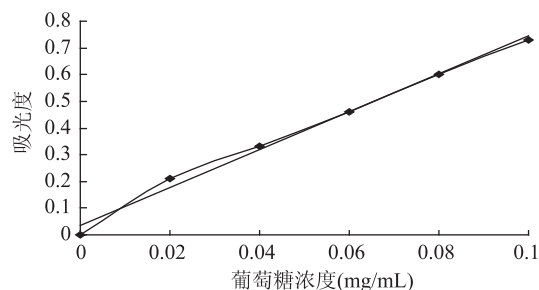


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 The standard curve of Glucose

标准曲线的回归方程为 $y = 7.0857x + 0.0352$, $R^2 = 0.9924$,线性关系好。

2.2 单因素实验

2.2.1 料液比对红雪茶粗多糖提取率的影响 由图2可知,多糖的提取率随着料液比(g:mL)的增加而增加,当料液比大于1:30时,提取率逐渐降低,故采

用 1:30 的料液比为宜。

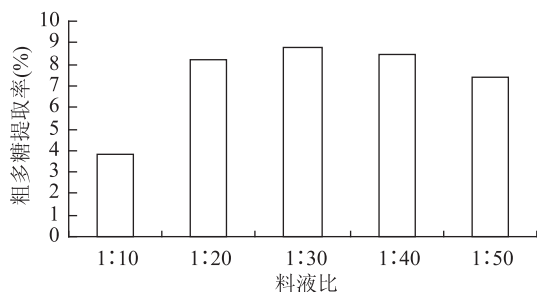


图2 料液比对粗多糖提取率的影响

Fig.2 Influence of the solid-liquid ratio on the yield rate of crude polysaccharide

2.2.2 pH 对红雪茶粗多糖提取率的影响 由图 3 可知,多糖的提取率随着 pH 的增加而增加,但当 pH 大于 5 时,粗多糖提取率呈减少的趋势,pH 为 5 时红雪茶粗多糖的提取率最大,当 pH 大于 5.5 后,粗多糖提取率会大大的降低。说明 pH 超出酶的最适 pH 范围,活力减小。

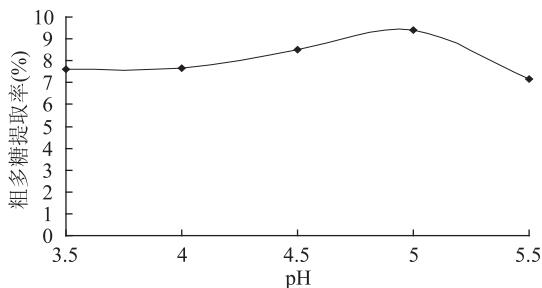


图3 pH 对粗多糖提取率的影响

Fig.3 Influence of the pH value on the yield rate of crude polysaccharide

2.2.3 酶解时间对红雪茶粗多糖提取率的影响 由图 4 可知,当提取时间为 60min 时,多糖的提取率最大。酶解时间少于 60min 时,随着时间的增加,提取率快速增大,而时间超过 60min 后,随着时间的延长,提取率快速下降,最后趋于平缓。由此说明,当提取时间为 60min 时,酶发挥了最大的作用。因此,当酶解时间为 60min 时,红雪茶中粗多糖的提取率最大。

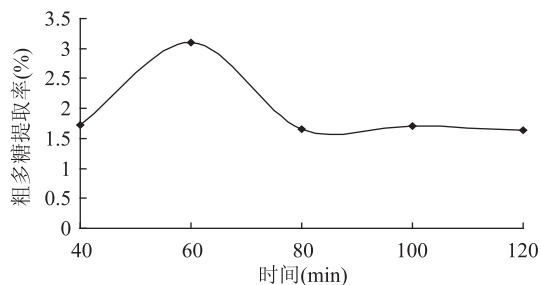


图4 酶解时间对粗多糖提取率的影响

Fig.4 Influence of enzymatic hydrolysis time on the yield rate of crude polysaccharide

2.2.4 酶解温度对红雪茶粗多糖提取率的影响 由图 5 可知,酶解温度低于 40℃ 时,粗多糖提取率随温度升高而增大,而当温度高于 40℃ 时,粗多糖的提取率随温度的升高而呈减少的趋势,酶解温度为 40℃,

粗多糖的提取率最高。这是由于刚开始随着温度升高,酶反应速度加快,粗多糖的提取率增加,之后随着温度的进一步升高,引起酶蛋白变性失活,酶活力降低,粗多糖提取率降低。

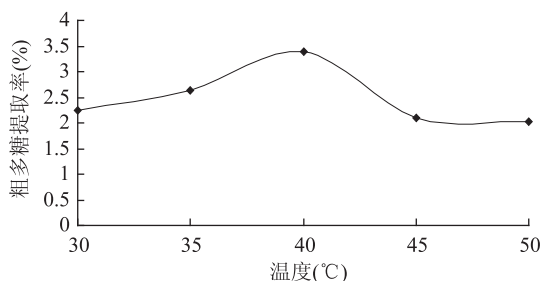


图5 酶解温度对粗多糖提取率的影响

Fig.5 Influence of enzymatic hydrolysis temperature on the yield rate of crude polysaccharide

2.3 正交实验

2.3.1 复合酶配比正交实验结果及分析 实验结果见表 3 所示。因为极差 $R_A > R_C > R_B$,所以影响红雪茶多糖提取率的复合酶的顺序为纤维素酶 > 木瓜蛋白酶 > 果胶酶;空列的 R_E (代表实验误差包括交互作用的影响) 为 1.28, $R_A > R_E$,说明中纤维素酶是主要因素, $R_B < R_E$, $R_C < R_E$,说明果胶酶和木瓜蛋白酶在红雪茶多糖提取过程中影响不大。根据各因素的影响大小及正交实验结果,综合分析确定复合酶最佳酶配比为 $A_3B_3C_1$,即纤维素酶为 2.0%,果胶酶为 2.0%,木瓜蛋白酶为 0.5%。

由于选择的最优水平组合与实际结果不一致,进行验证实验。在最佳酶配比条件下进行,重复 3 次,多糖提取率分别为 8.67%、8.91%、8.70%,则平均提取率为 8.76%。

表3 复合酶正交实验结果

实验号	A	B	C	D(空列)	提取率 (%)
1	1	1	1	1	6.63
2	1	2	2	2	6.10
3	1	3	3	3	5.14
4	2	1	2	3	2.92
5	2	2	3	1	3.85
6	2	3	1	2	5.84
7	3	1	3	2	8.89
8	3	2	1	3	8.92
9	3	3	2	1	9.02
K_1	17.87	18.44	21.39	19.5	
K_2	12.61	18.87	18.04	20.83	
K_3	26.83	20	17.88	16.98	
k_1	5.96	6.15	7.13	6.5	
k_2	4.2	6.29	6.01	6.94	
k_3	8.94	6.67	5.96	5.66	
R	4.74	0.52	1.17	1.28	

2.3.2 提取条件的正交实验 提取条件的正交实验结果如表 4 所示。通过提取条件的正交实验结果的极差分析可知,各因素对红雪茶粗多糖提取率的影响程度强弱顺序为: $A > C > B > D$,即料液比对红雪茶粗多糖提取率影响最大,其次是酶解温度,影响较小的是 pH 和酶解时间。得出的最佳提取工艺条件

为 A₃B₁C₂D₃, 即最佳料液比为 1:40, pH 为 4.5, 温度为 40℃, 酶解时间为 80min。

在最佳工艺条件下进行提取多糖的验证实验, 重复 3 次, 提取率分别为 8.86%、8.93%、8.95%, 则平均提取率为 8.91%。

表 4 提取条件的正交实验结果

实验号	A	B	C	D	提取率(%)
1	1	1	1	1	5.01
2	1	2	2	2	5.75
3	1	3	3	3	4.89
4	2	1	2	3	8.89
5	2	2	3	1	7.3
6	2	3	1	2	5.47
7	3	1	3	2	8.24
8	3	2	1	3	8.56
9	3	3	2	1	8.83
K ₁	15.65	22.14	19.04	21.14	
K ₂	21.66	21.61	23.47	19.46	
K ₃	25.63	19.19	20.43	22.34	
k ₁	5.22	7.38	6.35	7.04	
k ₂	7.22	7.20	7.82	6.49	
k ₃	8.54	6.39	6.81	7.45	
R	3.32	0.98	1.47	0.96	

3 结论

对影响红雪茶粗多糖提取率的因素包括料液比、pH、酶解温度和提取时间等进行了研究, 通过单因素实验得出了各因素的最佳水平, 即最佳料液比为 1:30, pH 为 5, 酶解温度为 40℃, 提取时间为 60min。

通过对复合酶配比的正交实验, 影响红雪茶粗多糖提取率的复合酶的主要因素是纤维素酶, 果胶

酶和木瓜蛋白酶在红雪茶多糖提取过程中影响不大。确定了酶的最佳配比为纤维素酶 2.0%, 果胶酶 2.0%, 木瓜蛋白酶 0.5%。

通过对复合酶提取工艺的正交实验, 影响红雪茶粗多糖提取率的四个因素的主次顺序为: 料液比 > 酶解温度 > pH > 酶解时间, 即四个因素中对红雪茶粗多糖提取率影响最大的为料液比, 其次是酶解温度, 其中影响较小的是 pH 和酶解时间, 通过极差分析得出的最佳提取工艺条件最佳料液比为 1:40, pH 为 4.5, 温度为 40℃, 酶解时间为 80min。

参考文献

- [1] 姜北. 雪茶化学成分研究[J]. 云南植物研究, 2002, 24(4): 525-527.
- [2] 陈玉杰, 郁建平. 雪茶多糖的提取分离及组成研究[J]. 济宁医学院学报, 2007, 30(4): 305.
- [3] 罗岳北, 裴月湖. 鹿心雪茶的化学成分研究[J]. 宁夏医学杂志, 2005, 27(5): 236.
- [4] 张明. 复合酶法提取大青叶中多糖的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(26): 14352-14353.
- [5] 黄照南, 梁益信, 李本锋, 等. 复合酶法提取香菇多糖的研究[J]. 昭通师范高等专科学校学报, 2010, 32(5): 30-32.
- [6] 王元凤, 金征宇. 酶法提取茶多糖工艺的研究[J]. 江苏农业科学, 2005(3): 122-124.
- [7] 葛立军, 朱振洪. 正交实验优化复合酶法提取山药多糖工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3187-3188.
- [8] 付惠, 王立松, 陈玉惠, 等. 云南两种地衣茶白雪茶和红雪茶的营养成分分析[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(13): 340-343.
- [9] 程正涛, 丁庆波, 张昊, 等. 海红果多酚提取工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 172-176.
- [10] 王博, 王新现, 吕春茂, 等. 苹果渣中多酚类物质的提取和应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 421-423.
- [11] 中国科学院中国植物志编写委员会. 中国植物志[M]. 第 80 卷, 第一分册. 北京: 科学出版社, 1997: 75.
- [12] 周向军, 高义霞, 李娟娟, 等. 乳苣多酚提取工艺及其抗氧化研究[J]. 中国酿造, 2011(9): 118-121.
- [13] 吕群金, 衣杰荣, 丁勇. 大孔吸附树脂对杨桃渣多酚吸附分离的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 39-42.
- [14] 熊何健, 吴国宏. 大孔吸附树脂分离纯化葡萄多酚的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(11): 74-77.
- [15] 王岸娜, 徐山宝, 刘小彦, 等. 福林法测定猕猴桃多酚含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 398-401.
- [16] 张余, 李敏, 薛连海, 等. 三种吸附剂对芡实多酚的吸附特性研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 101-104.
- [17] 欧阳玉祝, 吕程丽, 郑胜丰, 等. 大孔树脂吸附法分离过路黄中的总多酚[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 213-216.
- [18] 刘晓丽, 吴克刚, 柴向华, 等. 海带多酚的纯化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(5): 160-163.
- [19] 汤建萍, 周春山, 丁立稳. 大孔吸附树脂分离纯化荔枝核黄酮类化合物的研究[J]. 离子交换与吸附, 2006, 22(6): 551-558.
- [20] 艾志录, 王育红, 王海, 等. 大孔树脂对苹果渣中多酚物质的吸附研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(8): 245-248.
- [21] 陈从瑾, 黄克瀛, 李娟娟, 等. 大孔吸附树脂分离纯化香椿叶总黄酮的研究[J]. 离子交换与吸附, 2008, 24(4): 335-344.
- [22] 张立华, 张元湖, 安春艳, 等. 石榴皮提取物的大孔树脂纯化及其抗氧化性能[J]. 农业工程学报, 2009, 25(S1): 142-147.
- [23] 叶春, 阙健全, 谭书明, 等. 鱼腥草叶总黄酮的提取分离[J]. 农业工程学报, 2008, 24(10): 227-232.
- [24] 金莹, 孙爱东. 大孔树脂纯化苹果多酚的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 160-163.
- [25] 徐青, 卢莹莹, 辛建美, 等. 大孔树脂吸附分离海芦笋中黄酮类化合物工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 115-119.
- [26] 冯建光. 大孔吸附树脂分离纯化朝鲜蓟叶中洋蓟素的研究[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1109-1113.
- [27] 张海晖, 段玉清, 李金凤, 等. 板栗壳中原花青素大孔吸附树脂分离纯化工艺优化[J]. 农业机械学报, 2011, 42(5): 156-155.
- [28] 李娜, 鲁晓翔. 大孔吸附树脂分离纯化红花总黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 276-279.
- [29] 张茜, 贾冬英, 姚开, 等. 大孔吸附树脂纯化石榴皮多酚[J]. 精细化工, 2007, 24(4): 345-349.
- [30] 刘军, 郎爱东, 聂磊. 柿叶黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 694-695.

(上接第 284 页)

medica[M]. Shanghai Science Technical Publishing Press, China, 1990, 435.

- [4] 程正涛, 丁庆波, 张昊, 等. 海红果多酚提取工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 172-176.
- [5] 王博, 王新现, 吕春茂, 等. 苹果渣中多酚类物质的提取和应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 421-423.
- [6] 中国科学院中国植物志编写委员会. 中国植物志[M]. 第 80 卷, 第一分册. 北京: 科学出版社, 1997: 75.
- [7] 周向军, 高义霞, 李娟娟, 等. 乳苣多酚提取工艺及其抗氧化研究[J]. 中国酿造, 2011(9): 118-121.
- [8] 吕群金, 衣杰荣, 丁勇. 大孔吸附树脂对杨桃渣多酚吸附分离的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 39-42.
- [9] 熊何健, 吴国宏. 大孔吸附树脂分离纯化葡萄多酚的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(11): 74-77.
- [10] 王岸娜, 徐山宝, 刘小彦, 等. 福林法测定猕猴桃多酚含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 398-401.
- [11] 张余, 李敏, 薛连海, 等. 三种吸附剂对芡实多酚的吸附特性研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 101-104.
- [12] 欧阳玉祝, 吕程丽, 郑胜丰, 等. 大孔树脂吸附法分离过路黄中的总多酚[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 213-216.
- [13] 刘晓丽, 吴克刚, 柴向华, 等. 海带多酚的纯化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(5): 160-163.
- [14] 汤建萍, 周春山, 丁立稳. 大孔吸附树脂分离纯化荔枝核黄酮类化合物的研究[J]. 离子交换与吸附, 2006, 22(6):