

酶法提取中国圆田螺多糖的工艺优选

刘小燕^{1*}, 李朝品², 朱涛¹(1.安徽理工大学医学院, 安徽淮南 232001; 2.皖南医学院, 安徽芜湖 241002)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2708-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.36

摘要 目的: 优选酶法提取中国圆田螺多糖的工艺。方法: 采用木瓜蛋白酶进行酶解提取。在单因素试验的基础上, 以多糖得率为指标, 采用正交试验对提取过程中的酶浓度、pH、酶解温度及酶解时间4个因素进行优选并进行验证。结果: 酶法最优提取工艺为酶浓度1.0%、pH 7.0、酶解温度55℃、酶解时间3.0 h。该工艺下多糖平均得率为4.98% (RSD=2.51%, n=3), 多糖含量为73.54% (RSD=1.36%, n=3)。结论: 优化的中国圆田螺多糖酶提取工艺简便、合理、可行。
关键词 中国圆田螺; 多糖; 木瓜蛋白酶; 提取工艺; 正交试验

Optimization of Extraction Technology of Polysaccharides from *Cipangopaludina chinensis* by Enzyme Method
LIU Xiao-yan¹, LI Chao-pin², ZHU Tao¹(1.School of Medicine, Anhui University of Science & Technology, Anhui Huainan 232001, China; 2.Wannan Medical College, Anhui Wuhu 241002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of polysaccharides from *Cipangopaludina chinensis* by enzyme method. METHODS: The papain enzymolysis extraction was performed. On the basis of single factors tests, taking the yield of polysaccharides as the index, four factors including enzyme concentration, pH, enzymolysis temperature and enzymolysis time in the extraction process were optimized by the orthogonal test, and verification was carried out. RESULTS: The optimal technology by enzyme method was as follows as enzyme concentration of 1.0%, pH of 7.0, enzymolysis temperature of 55℃ and enzymolysis time of 3.0 h. Under this technology, the average yield of polysaccharides was 4.98% (RSD=2.51%, n=3) and the content of polysaccharides was 73.54% (RSD=1.36%, n=3). CONCLUSIONS: The optimal extraction technology of polysaccharides from *C. chinensis* was simple, reasonable and feasible.

KEYWORDS *Cipangopaludina chinensis*; Polysaccharide; Papain; Extraction technology; Orthogonal test

中国圆田螺(*Cipangopaludina chinensis*)俗称螺蛳、田螺、田赢、香螺, 是在我国广泛分布的淡水贝类之一。《本草纲目》记载: “田螺利湿清热, 止渴醒酒, 利大小便; 治脚气、黄疸”。近年, 有关贝类多糖的研究证实其具有抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、降血脂、降血糖等多种生物学活性^[1-4], 引起了学术界关注。

贝类多糖作为一种动物多糖, 目前常用的提取方法有热水浸提法、碱解法、酶解法、酶碱结合法等^[5]。本课题组前期对中国圆田螺多糖的水提工艺进行了相关研究, 已经通过水提法成功获得贝类多糖, 但是水提工艺费时较长(6 h)且得率不高(平均得率2.58%)^[6]。动物多糖在提取过程中的关键之处

是在不破坏多糖结构和活性的前提下有效去除蛋白, 而酶解蛋白的作用较好且温和。为了进一步提高提取效率, 本研究尝试采用木瓜蛋白酶提取中国圆田螺多糖。在单因素试验的基础上, 进行了酶浓度、pH、酶解温度及酶解时间的正交试验, 优选最优提取条件, 以期建立一种简便、快速、有效的提取方法, 为进一步研究中国圆田螺多糖的生物活性奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

高速组织捣碎机(上海标本模型厂); 恒温磁力搅拌器(国华电器有限公司); DZF-6030A型真空干燥箱(上海一恒科技

学, 2011, 23(5): 42.

- [3] 周莉. 灯盏花素的心脑血管药理及临床研究进展[J]. 中药信息, 2013(6): 134.
- [4] 吴俊珠, 严亚, 高鹏飞. 灯盏花素吸收与促进吸收策略的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 219.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录203.
- [6] 方睿, 杜树山. 灯盏花素制剂研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 233.
- [7] 崔亚男, 管华, 张强. 制剂新剂型新技术在灯盏花素研究

中的应用进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(18): 2152.

- [8] 钟海军, 邓英杰, 徐春莲, 等. 灯盏花素的理化性质研究[J]. 中国药房, 2013, 24(7): 608.
- [9] 方睿, 杜树山. 灯盏花素制剂研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 233.
- [10] 陈刚, 李玉民, 刘涛, 等. PEG-PLGA 纳米颗粒载体药物靶向治疗肿瘤的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2010, 37(6): 417.
- [11] 刘布鸣, 韦宝伟. 聚乳酸乙醇酸在微球控释制剂中的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(2): 155.

* 讲师, 硕士。研究方向: 天然药物、病原生物感染。E-mail: xy-liu0403@126.com

(收稿日期: 2014-10-20 修回日期: 2015-02-25)

(编辑: 邹丽娟)

有限公司);AL204型电子天平[瑞士梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂)。

1.2 原料、药品与试剂

中国圆田螺,于2014年7月在安徽省淮南市焦岗湖采集,经皖南医学院李朝品教授鉴定为真品;葡萄糖对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:13041223,纯度:≥98%);木瓜蛋白酶(北京化学试剂公司,批号:201402,酶活性:2 000 u/mg);无水乙醇、丙酮均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取工艺流程

新鲜活体中国圆田螺,洗净,去壳→取螺肉粉碎匀浆→离心(离心半径16 cm,转速4 000 r/min,30 min),弃上清→加40倍体积蒸馏水→木瓜蛋白酶浸提(不同酶浓度、pH、温度及时间下浸提)→升温至90℃灭酶→过滤→75%乙醇沉淀→漂洗→干燥→多糖粗品。其中木瓜蛋白酶浸提液制备方法为:称取木瓜蛋白酶10 g溶于pH 6.5磷酸盐缓冲溶液中,转至100 ml量瓶定容,制备成100 mg/ml的酶液,酶解时调节不同初始pH。

2.2 中国圆田螺多糖得率计算

多糖粗提物得率(%)=(多糖粗提物质量/样品质量)×100%。式中,多糖粗提物质量即称取的多糖粗品质量(g);样品质量即中国圆田螺螺肉质量(g)。

2.3 单因素试验

本试验选取了影响酶法提取中国圆田螺粗多糖得率的4个主要因素,即酶液初始pH值、酶浓度[木瓜蛋白酶(g)/中国圆田螺螺肉(g)×100%]、酶解温度及酶解时间进行单因素试验。每个因素不同水平下,均取中国圆田螺螺肉200 g,按照上述工艺流程提取,分别计算中国圆田螺粗多糖得率。

2.3.1 酶浓度的筛选 在酶解温度55℃、pH 6.5、酶解时间1 h的条件下,设置5个酶浓度(梯度分别为0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%),考察不同酶浓度对多糖得率的影响,结果详见图1A。

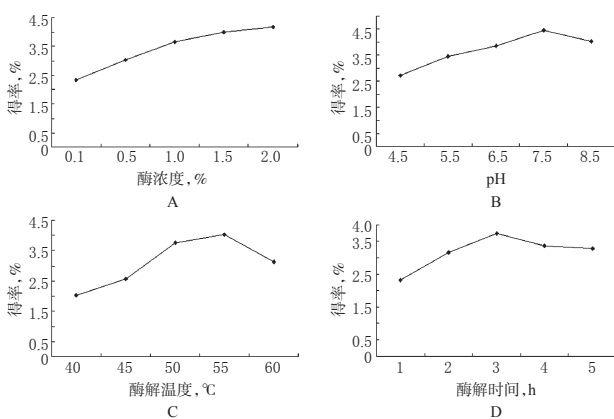


图1 各因素对多糖得率的影响

A.酶浓度;B.pH;C.酶解温度;D.酶解时间

Fig 1 Effects of the factors on the yield of polysaccharides

A. enzyme concentration; B. pH; C. enzymolysis temperature; D. enzymolysis time

由图1A可知,多糖得率在酶浓度为0.1%~1.0%时增加较为明显,而当酶浓度继续增大时,多糖得率的增加趋势趋于平缓。可能因为起初随着酶浓度的增大,使多糖能快速有效地与蛋白质分离,但当酶浓度逐渐趋于饱和时,酶解反应也

会随之趋于平缓。所以,酶浓度确定为1.0%左右。

2.3.2 pH的筛选 在酶解温度55℃、酶浓度1.0%、酶解时间1 h的条件下,设置5个酶液初始pH(分别为4.5、5.5、6.5、7.5、8.5),考察不同pH对多糖得率的影响,结果详见图1B。

由图1B可见,酶液pH的改变对多糖得率的影响较大。在pH为4.5~7.5范围内,多糖的得率随着pH的增大而升高;但在7.5之后,当继续增大pH时,多糖的得率反而开始下降。这可能是酶活力的适宜pH范围及糖肽键对碱的不稳定性共同作用的结果。因此,酶提法的pH选为7.5左右。

2.3.3 酶解温度的筛选 在酶浓度1.0%、pH 6.5、酶解时间1 h的条件下,设置5个温度(梯度分别为40、45、50、55、60℃),考察不同酶解温度对多糖得率的影响,结果详见图1C。

由图1C可知,多糖的得率在40~55℃时随着温度的升高而升高,但继续升高温度,多糖得率反而下降。其可能原因是酶促反应刚开始时会随着温度的升高而加快,而当温度高于最适反应温度后,酶活力反而减小,多糖得率也会随之下降。因此,酶解温度宜确定为55℃左右。

2.3.4 酶解时间的筛选 在酶浓度1.0%、pH 6.5、酶解温度55℃条件下,设置5个酶解时间(分别为1、2、3、4、5 h),考察不同酶解时间对多糖得率的影响,结果详见图1D。

由图1D可知,酶解反应到3 h时达到最大得率,再继续延长反应时间,多糖得率反而呈平缓下降趋势。可见反应进行到3 h时,多糖已充分解离溶出;再继续反应,某些多糖可能又会与蛋白质大分子结合发生沉淀,导致得率略有下降。综合考虑,酶解时间以3 h左右为宜。

2.4 正交试验

根据单因素试验结果,每个因素选取3个水平,因素与水平见表1;在课题组前期建立的成熟水提醇沉工艺基础上,选择多糖得率为单一指标,对酶浓度、pH、酶解温度与酶解时间选用L₉(3⁴)正交表设计试验进行各因素水平的优选,从而确立酶法最优提取条件,试验安排及结果见表2;方差分析结果见表3。正交试验安排表中每个组合下,均取中国圆田螺螺肉200 g,同样按照“2.1”项工艺流程提取后分别计算中国圆田螺粗多糖得率。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(酶浓度),%	B(pH)	C(酶解温度),°C	D(酶解时间),h
1	0.5	7.0	50	2.5
2	1.0	7.5	55	3.0
3	1.5	8.0	60	3.5

由表2可见,影响酶法提取中国圆田螺多糖因素的主次顺序为B>A>C>D,即pH>酶浓度>酶解温度>酶解时间;从表3的方差分析可见,B因素各水平之间有显著性差异(P<0.05),A因素对多糖得率有一定影响,C因素和D因素在本次试验各水平下对多糖得率没有显著影响。综合考虑,最优工艺为A₂B₁C₂D₂,即酶浓度1.0%、pH 7.0、酶解温度55℃、酶解时间3.0 h。

2.5 优选工艺的验证

由于正交试验具有信息丢失现象,并不能包含所有组合^[7],在本试验的安排中,A₂B₁C₂D₂不在所列正交试验之内。为此笔者又对优选工艺进行了验证试验,按A₂B₁C₂D₂组合进行3次提取试验。结果显示,多糖平均得率为4.98%(RSD=2.51%,n=3),高于其他组合。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

试验号	因素				多糖得率, %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	3.02
2	1	2	2	2	3.95
3	1	3	3	3	2.63
4	2	1	2	3	4.13
5	2	2	3	1	4.62
6	2	3	1	2	3.03
7	3	1	3	2	3.86
8	3	2	1	3	3.42
9	3	3	2	1	3.12
K_1	3.20	3.67	3.16	3.59	
K_2	3.93	3.40	3.73	3.61	
K_3	3.47	2.93	3.70	3.39	
R	0.73	1.07	0.57	0.22	

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

方差来源	离均差平方和(SS)	自由度	方差(MS)	F	P
A	0.81	2	0.41	9.43	<0.10
B	1.80	2	0.90	20.98	<0.05
C	0.63	2	0.32	7.35	
误差(D)	0.09	2	0.05		

注: $F_{0.01}(2, 2)=99$; $F_{0.05}(2, 2)=19$; $F_{0.10}(2, 2)=9$ Note: $F_{0.01}(2, 2)=99$; $F_{0.05}(2, 2)=19$; $F_{0.10}(2, 2)=9$

2.6 多糖含量测定方法学考察

为进一步验证该工艺的提取质量,笔者对所得粗多糖的多糖含量进行了测定。采用苯酚-硫酸法^[8-9]测定多糖含量,选取葡萄糖为对照品制备对照品溶液,以对照品溶液质量浓度为 x 、吸光度为 y 绘制多糖含量的标准曲线,得回归方程为: $y=11.81x-0.006(r^2=0.9993)$,葡萄糖检测质量浓度线性范围为0.02~1.0 mg/ml。同时,按相应方法进行了精密性、稳定性和回收率试验。结果,精密性试验中吸光度的RSD为2.66% ($n=5$);稳定性试验中,取试样120 min内(前60 min每10 min测1次,后60 min每30 min测1次)吸光度的RSD为2.53% ($n=8$);样品回收率试验中,平均回收率为99.67% (RSD=1.03%, $n=3$)。上述结果表明方法学考察结果均符合要求。

2.7 多糖提取质量考察及最优工艺参数的确定

精密量取粗多糖10 mg置于10 ml量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度得供试品溶液。取供试品溶液2 ml,于490 nm波长处测定吸光度,代入回归方程计算多糖浓度(c)。按公式:多糖含量(%)= $c \times D/m \times 100$ (式中: m 为多糖样品质量, D 为多糖的稀释倍数)计算多糖含量,得平均含量为73.54% (RSD=1.36%, $n=3$),结果表明该工艺稳定可行。故在本试验中确定木瓜蛋白酶提取中国圆田螺多糖的最优工艺参数为 $A_3B_1C_2D_2$,即酶浓度1.0%、pH 7.0、酶解温度55℃、酶解时间3.0 h。

3 讨论

蛋白酶水解法提取动物多糖是一种较为理想的方法,蛋白酶可作用的肽键范围广泛,可使蛋白质充分水解,迅速将糖类解离^[10]。常用的蛋白酶有木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶等。笔者选用了木瓜蛋白酶进行中国圆田螺多糖的提取,评价多糖提取效果的指标主要是得率和多糖含量。在前期研究基础上发现提取所得多糖含量较稳定,主要是水提用时较长且得率不高(平均得率2.58%)。针对此,在本试验设计中主要

选取了多糖得率作为评价指标来进行工艺优选。通过试验确定了木瓜蛋白酶提取中国圆田螺多糖的最优工艺条件。与前期优选的水提工艺(醇沉浓度75%、浸提温度60℃、料液比1:2,浸提时间6 h)相比,酶法浸提时间缩短一半且得率亦有所提高^[6];同时,酶提法所得粗多糖含量(73.54%)亦高于水提法所得含量(65.85%)。由此可见,优选的酶法提取工艺可有效提高多糖的提取效率和提取质量。

在试验中发现pH对多糖得率的影响较为显著,单因素试验中显示提取最优pH为7.5,正交优选的pH为7.0。理论上酶活力的最适pH范围通常在7.0以内,而试验结果却显示在中性偏碱的条件下得率较高。因此,应同时考虑碱性环境利于糖肽键的解离以及酶活性适宜的pH范围这两个因素的共同作用^[11]。王长云等^[12]研究也发现,在不改变糖链结构的前提下,采用酶碱结合法对动物多糖的释放非常有效。莫开菊等^[13]研究发现,采用碱液和木瓜蛋白酶联合预处理原料后亦可以提高葛仙米多糖的提取率。鉴于此,在后续的研究中可以考虑先用碱液处理样品,再用蛋白酶水解,可能会更有效地提高多糖得率。

通过验证试验表明,优选的酶法提取工艺简便有效、稳定可行。该工艺的建立为进一步研究中国圆田螺多糖的结构、生物活性及构效关系奠定了基础。

[注:本文系安徽理工大学青年教师科学研究基金重点项目(No. QN201354)]。

参考文献

- [1] 钦传光,黄开勋,徐辉碧.泥鳅多糖对试验型糖尿病小鼠血糖血脂的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2002,16(2):124.
- [2] 李孟婕,范秀萍,吴红棉,等.翡翠贻贝糖胺聚糖的体外抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2011,27(7):759.
- [3] 邱乒乓,戴燕燕,李华亮,等.河蚬提取物对人肝癌细胞SMMC-7721的抑制作用[J].厦门大学学报,2009,48(3):406.
- [4] 姚静倩,吴皓,陈蕾,等.双壳贝类软体部位活性物质研究概况[J].中国中医药信息杂志,2008,15(10):98.
- [5] 殷涌光,韩玉珠,丁宏伟.动物多糖的研究进展[J].食品科学,2006,27(3):256.
- [6] 刘小燕,李朝品,湛孝东.淡水贝类多糖提取工艺的优选[J].时珍国医国药,2007,18(3):656.
- [7] 朱彩平,惠乐乐,柳小林,等.酶法提取平菇多糖工艺研究[J].中成药,2011,33(8):1435.
- [8] 董群,郑丽伊,方积年.改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J].中国药学杂志,1996,31(9):550.
- [9] 李辉,罗佳波.苯酚-硫酸法测定固乐颗粒中总多糖的含量[J].中国药房,2008,19(9):685.
- [10] 文松松,赵峡,于广利,等.海洋动物多糖研究进展[J].中国海洋药物杂志,2009,28(4):46.
- [11] 王宇,高宏建,刘东红,等.酶法提取河蚬多糖的研究[J].食品工业科技,2012,33(14):228.
- [12] 王长云,管华诗,林洪.海湾扇贝肝素样多糖分离方法的研究[J].海洋与湖沼,1995,26(5):66.
- [13] 莫开菊,周志,汪兴平,等.碱液和木瓜蛋白酶预处理对葛仙米多糖提取效果的影响[J].食品科学,2007,28(11):194.

(收稿日期:2014-10-15 修回日期:2014-11-18)

(编辑:刘 萍)