

复合酶法提取桑叶中多糖的工艺条件优化

夏平, 谢何青 (湖州师范学院生命科学学院, 浙江湖州313000)

摘要 [目的] 采用复合酶法提取桑叶中多糖。[方法] 通过单因素试验和正交试验研究了酶的浓度、酶作用的时间、酶作用的温度以及酶作用的pH值对桑叶粗多糖提取率的影响。[结果] 通过复合酶法提高了桑叶多糖的提取率。[结论] 提取的最佳工艺条件为: 温度50℃, pH值为4.5、酶用量1.0%、提取时间1h; 提取桑叶多糖的收率可达14.32%。

关键词 复合酶; 提取; 桑叶; 多糖; 正交设计

中图分类号 S888 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00198-02

Optimization Techniques for the Extraction of Polysaccharides from Mulberry Leaves by Complex Phosphoesterasum

MA Hng et al (Faculty of Life Science, Huzhou Normal College, Huzhou, Zhejiang 313000)

Abstract [Objective] The Complex Phosphoesterasum was used in the experiment to extract polysaccharide from mulberry leaves. [Method] Single factor tests and orthogonal experiment design methods were applied to analyze the influence of the factors such as the concentration, time, temperature and pH value of the enzyme on the extraction ratio of polysaccharides from mulberry leaves. [Results] The adoption of new extraction methods improved the extraction ratio of the target products. [Conclusion] The best conditions are as follows: temperature is 50℃, pH value is 4.5, the concentration of cellulose enzyme is 1.0% and the extracting time is 1 h. The extraction ratio of Polysaccharides in mulberry leaves is up to 14.32%.

Key words Complex Phosphoesterasum; Extraction; Mulberry leaf; Polysaccharide; Orthogonal experimental design

多糖是生命有机体的主要能量来源和组成结构材料, 能增强生物体免疫调节功能, 作为广谱免疫促进剂; 具有抗感染、抗凝血、降血糖、降血脂、促进核酸与蛋白质的生物合成作用; 能控制细胞分裂和分化, 调节细胞的生长与衰变^[1-3]。现代药理研究表明, 桑叶活性成分之一桑叶多糖具有显著的降血糖作用, 而且多糖作为药物对人和动物没有毒副作用。我国桑叶资源丰富, 若能加以利用, 从桑叶中提取天然药用成分如多糖等制备药品或保健品, 将会造福人类^[4-6]。因此, 笔者选用绿色工艺酶法对桑叶多糖提取的条件进行正交试验优化, 以最大限度地提高桑叶利用率。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验材料。桑叶采自浙江省湖州长兴县。

1.1.2 主要试剂。浓度为95%乙醇、无水乙醇、丙酮均为分析纯; 盐酸、氢氧化钠为分析纯, 0.1 mol/L; 三氯甲烷、正丁醇为分析纯; 纤维素酶、果胶酶由广州市亚强生物技术有限公司生产。

1.1.3 仪器与设备。pH计由上海雷磁生产; 恒温水浴锅由成都科析仪器成套公司生产; 可控电炉、恒温鼓风干燥箱、电子天平由上海精密实验设备有限公司生产; 低速离心机由中佳有限公司生产; R-200旋转蒸发仪由上海智理科学仪器有限公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 桑叶多糖提取的工艺流程。工艺流程见图1。

复合酶预处理

桑叶预处理 混匀 调pH值 酶提取多糖 煎煮 离心
萃取 离心 抽滤 浓缩 乙醇沉淀 洗涤 烘干 称量

图1 桑叶多糖提取的工艺流程

Fig.1 Extraction techniques of polysaccharide from mulberry leaves

1.2.1.1 桑叶预处理。将干燥的桑叶粉碎过100目筛, 每次

准确称量10g, 按重量比1:20的加入蒸馏水煮沸后冷却放置, 备用。

1.2.1.2 复合酶预处理。精确称取一定量的复合酶(纤维素酶 果胶酶=1:1), 按重量比1:10加入蒸馏水, 使蒸馏水浸没酶, 置于水浴锅里40℃条件下活化30min。

1.2.1.3 煎煮。控制加热温度, 并使样品的水量在200ml的情况下, 保持在微沸的状态浸提2h。

1.2.1.4 萃取。用三氯甲烷-正丁醇为4:1的混合液将离心后的沉淀物在分液漏斗中萃取3次, 取上清液。

1.2.2 单因素试验。酶作用时pH值分别采用4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 7个水平, 酶浓度分别采用0.8%、1.0%、1.2%、1.4% 4个水平, 时间分别采用0.5、1.0、1.5、2.0h 4个水平, 温度分别采用35、40、45、50、55、60、65、70 7个水平进行单因素试验。研究这4个因素对桑叶多糖提取率的影响。

1.2.3 正交试验。以上述单因素试验结果为依据, 选定4因素3水平作正交试验, 确定提取桑叶多糖的最佳工艺参数。

2 结果与分析

2.1 pH值对桑叶多糖提取率的影响 由表1可知, 复合酶在pH值为4.5左右活性最大, 所提取多糖的量也最大。

表1 不同pH值对桑叶多糖提取率的影响

Table 1 The effect of pH value on the extraction ratio of amylose from mulberry leaf %

pH值 pHvalue	提取率 Extraction ratio
4.0	11.54
4.5	13.98
5.0	11.11
5.5	9.77

2.2 酶浓度对桑叶多糖提取率的影响 从表2可以看出, 酶用量与多糖含量关系呈正相关, 即酶用量越高, 所提取多糖的量也就越大, 但是多糖含量提高的趋势越来越小。

2.3 提取温度对桑叶多糖提取率的影响 从表3可看出, 开始时随着温度的增加, 提取多糖的含量增加, 直至最大值, 但是过了50℃以后, 提取多糖的量逐渐减少。因为温度过高, 纤维素酶就会变性, 影响其活性。所以温度的调整要适

当,最好在45~50 范围之内。

表2 不同酶浓度对桑叶多糖提取率的影响

Table 2 The effect of enzyme level on the anylose extraction ratio %

浓度 Concentration	提取率 Extraction ratio
0.8	12.70
1.0	13.94
1.2	14.01
1.4	14.03

表3 不同提取温度对桑叶多糖提取率的影响

Table 3 The effect of reaction temperature on the anylose extraction ratio

温度 Temperature	提取率 Extraction ratio %
35	13.44
40	13.58
45	13.72
50	13.99
55	13.82
60	12.76
65	7.10

2.4 酶提取时间对桑叶多糖提取率的影响 从表4 可看出,酶提取时间与多糖含量关系呈正相关。随着酶提取时间的延长,提取多糖的量逐渐增加,但是多糖量提高的趋势越来越小。

表4 不同酶提取时间对桑叶多糖提取率的影响

Table 4 The effect of reaction time on the anylose extraction ratio

时间 Time h	提取率 Extraction ratio %
0.5	13.68
1.0	13.95
1.5	13.98
2.0	14.00

2.5 正交试验结果 在上述单因素试验的基础上,选定4 因素3 水平作正交试验,因素水平、试验结果及分析见表5。从表5 得出影响指标的主次因素依次为B、C、D、A,即时间> 温度> 酶用量> pH 值,可知各因子的优化水平组合为A₂、B₂、C₂、D₂,即温度50 、pH 值为4.5、酶浓度为1.0%、提取时间为1 h。

2.6 验证试验

按照最佳提取工艺提取温度50 、pH 值为4.5、酶用

表5 多糖提取的正交试验结果

Table 5 Orthogonal experimental results of anylose extraction

试验 Experiment no.	因子 Factor				多糖提 取率 % Anylose extraction ratio
	温度 A Temperature	pH 值 B pH value	酶用量 % C Enzyme dosage	时间 h D Time	
1	1(45)	1(4.0)	1(0.8)	1(0.5)	9.67
2	1(45)	2(4.5)	2(1.0)	2(1.0)	14.03
3	1(45)	3(5.0)	3(1.2)	3(1.5)	11.23
4	2(50)	1(4.0)	2(1.0)	3(1.5)	11.83
5	2(50)	2(4.5)	3(1.2)	1(0.5)	13.07
6	2(50)	3(5.0)	1(0.8)	2(1.0)	10.44
7	3(55)	1(4.0)	3(1.2)	2(1.0)	11.72
8	3(55)	2(4.5)	1(0.8)	3(1.5)	13.00
9	3(55)	3(5.0)	2(1.0)	1(0.5)	10.21
R	0.14	3.30	1.98	1.08	

注:R 为极差值, R= 最大平均值- 最小平均值。

Nte : R means range , R = Mean of maximum mean of minimum.

量1.0%、提取时间1 h、其他按照“2.1”的流程进行提取。不用酶进行提取,即流程为:煎煮 离心 萃取 离心 抽滤 浓缩 乙醇沉淀 洗涤 烘干 称量。按照方法得到的桑叶多糖的收率为14.32%,按照方法得到的桑叶多糖的收率为10.33%。

3 结论与讨论

笔者尝试利用复合酶法提取桑叶多糖,对影响多糖提取率的主要因素酶的浓度、酶作用的时间、酶作用的温度以及酶作用的pH 值进行分析,通过单因素试验和正交试验确定了最佳提取条件为温度50 、pH 值为5.0、酶用量为1.0%、提取时间为1 h,在此条件下,试验得出平均提取率为11.8%,桑叶多糖的得率提高了38.63%。还可以考虑复合酶:纤维素酶+ 果胶酶+ 木瓜蛋白酶在桑叶多糖提取中的应用。

参考文献

- [1] 王小伙,郭金,王军文.桑茶的营养、药理初探[J].桑蚕茶叶通讯,2000(3):32-34.
- [2] 郑立颖,魏彦明,陈龙.纤维素酶在黄芪有效成分提取中的应用[J].甘肃农业大学学报,2005,40(2):94-96.
- [3] 周鹏,谢明勇,傅博强,等.茶叶粗多糖的提取及纯化研究[J].食品科学,2001,22(11):46-48.
- [4] 杨莉,刘亚娜.酶法在中药提取制备中的应用[J].中草药,2001,24(1):71-73.
- [5] 沈爱英,朱子玉,张文量.桑叶水溶性多糖提取工艺的研究[J].蚕业科学,2004,30(3):277-279.
- [6] 赵骏,钟蓉,王洪章,等.桑叶多糖提取工艺优选[J].中草药,2000,31(3):347-348.

(上接第164页)

- [14] WOO NY S, KELLY S P. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system[J]. Aquaculture, 1995, 135(1/3):229-238.
- [15] ALAVA V R. Effect of salinity, dietary lipid source and level on growth of milk fish *Chanos chanos* fry[J]. Aquaculture, 1998, 167(3/4):229-236.
- [16] IMSLANDA K, FOSS A, GUNNARSSONS, et al. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture, 2001, 198(3/4):353-367.
- [17] IMSLANDA K, GUSTAVSSON A, GUNNARSSONS, et al. Effects of reduced

salinities on growth feed conversion efficiency and blood physiology of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. Aquaculture, 2008, 274(2/4):254-259.

- [18] TSUZUKI MY, SUGAI J K, MAJEL J C, et al. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities [J]. Aquaculture, 2007, 271(1/4):319-325.
- [19] TYLER M, BLAXER J H S. The Effects of external salinity on the drinking rates of larvae of herring, plaice and cod [J]. J Exp Biol, 1988, 138(1):1-15.
- [20] BOEUF G, PAYAN P. How should salinity influence fish growth? [J]. Comp Biochem Physiol, Part C Pharmacol Toxicol, 2001, 130(4):411-423.