

# 正交试验法筛选蛤蟆油粗多糖酶解提取工艺的研究\*

杨靖, 李硕, 陈大勇, 卫功庆\*\*  
吉林农业大学中药材学院, 长春 130118

**摘要:** 为了研究利用胰蛋白酶酶解法提取蛤蟆油多糖的最佳提取工艺, 以料液比、加酶量、酶解时间和 pH 值为因子, 设计了  $L_9(3^4)$  正交试验, 测定了多糖纯度和多糖得率。结果表明: 最大得率条件为料液比 1:200, 加酶量 11%, 酶解时间 12 h, pH 7.5, 此条件下蛤蟆油多糖得率为 7.2%; 最高纯度的条件为料液比 1:300, 加酶量 11%, 酶解时间 4 h, pH 7.5, 此条件下蛤蟆油多糖纯度为 16.9%。

**关键词:** 蛤蟆油; 多糖; 酶解; 提取工艺;  $L_9(3^4)$  正交试验

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2011)

DOI: CNKI:22-1100/S.20110608.1604.002

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20110608.1604.002.html>

## A Study on Zymohydrolysis Extracting Technology of Polysaccharides from *Oviductus Ranae* by $L_9(3^4)$ Orthogonal Design

YANG Jing, LI Shuo, CHEN Da-yong, WEI Gong-qing

College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

**Abstract:** In order to investigate the optimization of zymohydrolysis extracting technology of polysaccharides from *Oviductus Ranae* by trypsinase, water fraction, trypsinase concentration, zymohydrolysis time and zymohydrolysis pH were taken as factors for  $L_9(3^4)$  orthogonal design trials. The indexes of extracting output and purity of polysaccharides were examined. Results showed that the optimum conditions for the highest output (7.2%) were: the ratio of water to sample was 1:200, trypsinase concentration was 11%; zymohydrolysis time was 12h, and zymohydrolysis pH was 7.5. The optimum conditions of the highest purity (16.9%) were: the ratio of water to sample was 1:300; trypsinase concentration was 11%; zymohydrolysis time was 4h, and zymohydrolysis pH was 7.5.

**Key words:** *Oviductus Ranae*; polysaccharides; zymohydrolysis; extracting technology;  $L_9(3^4)$  orthogonal design

蛤蟆油(*Oviductus Ranae*), 系蛙科动物中国林蛙(*Ranae chensinensis*)雌蛙的输卵管干制品<sup>[1]</sup>, 为我国名贵滋补中药材, 具有抗应激、抗衰老、防治小儿哮喘、增强免疫力<sup>[2]</sup>、抗疲劳<sup>[3]</sup>、抗肿瘤等药理作用<sup>[4]</sup>。蛤蟆油基本化学成分: 水分 11.82%, 粗蛋白 54.93%, 粗脂肪 4.36%, 粗灰分 4.88%, 无氮浸出物 23.21%, 热能 20.72 kJ/g; 另外还富含多种维生素、氨基酸、脂肪酸及矿物质元素<sup>[5]</sup>。虽然对蛤蟆油化学成分的研究报道较多<sup>[6-10]</sup>, 但对蛤蟆油多糖的研究报道较少。

天然产物多糖已成近年来的研究热点。诸多研究表明多糖可增强机体免疫功能<sup>[10]</sup>, 不但能增强网状内皮系统的吞噬功能<sup>[4]</sup>, 还可以促进蛋白

质, 特别是免疫球蛋白的合成<sup>[11]</sup>, 具有较高的抗癌、抗基因病毒活性<sup>[12]</sup>。蛤蟆油多糖是蛤蟆油成分之一。范玉林等人测得蛤蟆油中还还原糖含量为 6.8%, 多糖含量是 6.18%<sup>[9]</sup>。由于成分、结构及组织器官的复杂性, 对蛤蟆油多糖的研究进展缓慢, 其诸多药理作用与多糖成分是否有关还不明了。为此, 研究蛤蟆油多糖的提取工艺对于下一步蛤蟆油有效成分的研究与开发利用有着极为重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

蛤蟆油购于长春市古鳄参茸商行, 由长春中医药大学张辉教授鉴定为长白山产蛤蟆油; 酶活力 >250NF U/mg 的胰蛋白酶 1:250 和酶活力 ≥5 万 U/g 的中

\* 基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (08SYS-097)

作者简介: 杨靖, 男, 硕士研究生, 主要从事特种经济动物繁育方向的研究。

收稿日期: 2010-12-16

网络出版时间: 2011-06-08 16:04

\*\* 通讯作者

性蛋白酶购于西安沃尔森生物技术有限公司)；1:3000胃蛋白酶购自中国惠生生化试剂有限公司，其他均为分析纯试剂(北京化工厂)。

1.2 主要设备

2列6孔水浴锅(河北黄骅市航天仪器厂)，DT-500电子天平(常熟金羊硅码仪器公司)，101-2-S鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂)，754GD紫外可见分光光度计(山东高密彩虹分析仪器有限公司)，PHS-3C精密数显酸度计(杭州雷磁分析仪器厂)，FD-1A-50冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 酶种类的选择 选用中性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶对蛤蟆油干粉进行水解，以多糖得率为指标进行比较。分别称取蛤蟆油干粉5 g，按料液比1:100加入蒸馏水于50℃恒温水浴锅中浸泡24 h，匀浆，分别加底物浓度5%的胃蛋白酶(pH2.0,37℃)，中性蛋白酶(pH7.0,50℃)，胰蛋白酶(pH8.0,37℃)，酶解2h(在消化过程中，每隔10 min摇1次)<sup>[13-14]</sup>。之后放入沸水浴中加热10 min灭酶活性，12 000 r/min离心，取上清液浓缩，加入3倍体积95%乙醇沉淀低温静置过夜，4 000 r/min离心10

min,将沉淀置于滤纸上,用乙醇、丙酮各洗涤3次。在40℃温水下将沉淀溶解,离心去水不溶性杂质,Sevage法除蛋白,浓缩,加入3倍体积95%乙醇,低温静置过夜,4 000 r/min离心10 min,取沉淀冷冻干燥,得蛤蟆油粗多糖。

1.3.2 蛤蟆油多糖提取工艺 蛤蟆油烘干(测得蛤蟆油含水量为21.94%)，捣碎，过筛，称取45g 蛤蟆油干粉加4 500 mL蒸馏水浸泡12 h后匀浆；各取500 mL，分别加入0, 500, 1 000 mL蒸馏水，使其料液比为1:100, 1:200, 1:300；分别加入不同量的胰蛋白酶，在一定pH值下(用0.1mol/L的NaOH或HCl调节<sup>[15]</sup>)，37℃酶解一定时间，沸水浴中加热10 min灭酶活性，12 000 r/min离心取上清液浓缩，加入3倍体积95%乙醇沉淀；低温静置过夜，4 000 r/min离心10 min,将沉淀置于滤纸上用乙醇、丙酮各洗涤3次<sup>[16]</sup>；在40℃温水下溶解,离心去水不溶性杂质；sevage法除蛋白,浓缩,加入3倍体积95%乙醇,低温静置过夜,4 000 r/min离心10 min,取沉淀冷冻干燥,即得蛤蟆油粗多糖。

1.3.3 正交试验设计 以提取蛤蟆油多糖过程中的蛤蟆油与水的混合料液比、加酶量、酶解时间和pH值按表1设计L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验。

表1 正交试验因素水平表  
Table1. Orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A 料液比 Solid-liquid ratio	B 加酶量/% Amounts of enzyme	C 酶解时间/h Enzymolysis time	D pH
1	1:100(A1)	5 (B1)	4 (C1)	7.5 (D1)
2	1:200(A2)	8 (B2)	8 (C2)	8.0 (D2)
3	1:300(A3)	11 (B3)	12 (C3)	8.5 (D3)

1.3.4 多糖定性试验 莫利胥反应：取 2mL 多糖溶液，加入等量的 10%的甲-萘酚溶液，混合均匀后，将试管倾斜，沿着试管壁慢慢加入等量浓硫酸，小心将试管竖立，使液层界面清晰，静置。如果有多糖存在，上下层中间出现紫色环，紫色环上呈束状乳白色，环下呈透明状物态。如无环出现，可微热几分钟。经过定性实验，试管中经微热后出现紫色环，确定糖类物质的存在。

利用苯酚—硫酸比色法<sup>[17]</sup>测定多糖含量,在490nm处测定吸收值,吸收值与糖含量呈线性关系。

1.4 多糖得率和纯度的计算

多糖得率= 提取物中所含多糖重量/原料干品重量×100%。

多糖纯度=提取物中所含多糖重量/粗提物重量×100%。

多糖净得量=样品量(g)×多糖得率。

1.5 数据统计与分析

数据统计采用SPSS13.0，显著性水平设置为P<0.05。

2 结果与分析

2.1 不同酶对蛤蟆油多糖提取影响的比较

胰蛋白酶酶解蛤蟆油多糖得率为2.3%，远远高于胃蛋白酶(0.19%)，略高于中性蛋白酶(2.16%)。由于酶的类型和底物蛋白的组成不同，致使各种酶对蛋白底物的酶切专一性不同。动物多糖大多是由多糖连在较大蛋白链上，需要尽量切除蛋白而保留多糖部分，酶的专一性越差越有利于多糖的分离提取，所以不同的酶酶解蛋白后获得多糖的效果有较大差异。从试验结果来看，对于酶法水解林蛙油制备多糖，胰蛋白酶较适宜，而且在试验过程中，胰蛋白酶酶解后的沉淀量较少，说明其将

大分子的蛋白酶解为小分子的多肽时较其他蛋白酶更加彻底。所以选择胰蛋白酶为最佳水解酶，并确定其最适酶解条件。

## 2.2 提取物得率试验结果

正交试验所得数据见表2。

表2 多糖提取率试验结果  
Table 2. Outputs of polysaccharides

试验号 No.	A 料液比 Solid-liquid ratio	B 加酶量/% Amounts of enzyme	C 酶解时间/h Enzymolysis time	D pH	得率/% Extraction rate
1	1	1	1	1	3.16
2	1	2	2	2	3.60
3	1	3	3	3	6.02
4	2	1	2	3	3.78
5	2	2	3	1	6.50
6	2	3	1	2	5.74
7	3	1	3	2	4.72
8	3	2	1	3	5.26
9	3	3	2	1	5.64
K1	12.78	11.66	14.16	15.30	
K2	16.02	15.36	13.02	14.06	
K3	15.62	17.40	17.24	15.06	
k1	4.26	3.89	4.72	5.10	
k2	5.34	5.12	4.34	4.69	
k3	5.21	5.8	5.75	5.02	
R	1.08	1.91	1.41	0.41	
最优值 The optimum	A2	B3	C3	D1	

通过方差分析得出，B因素对多糖提取率影响显著 ( $P < 0.05$ )，A、C、D因素均无显著影响 ( $P > 0.05$ )，加酶量对提取率影响最大，其次是酶解时间、料液比、pH值，即  $B > C > A > D$ 。最优条件为  $A_2B_3C_3D_1$ ，即最高提取率的条件为料液比 1:200，酶

浓度 11%，酶解时间 12h，pH7.5。测得提取率为 7.2%，多糖纯度为 9.12%。

## 2.3 多糖纯度试验结果

正交试验所得结果见表3。

表3 多糖纯度试验结果  
Table 3. Result of purity trail

试验号 No.	A 料液比 Solid-liquid ratio	B 加酶量/% Amounts of enzyme	C 酶解时间/h Enzymolysis time	D pH	粗提物纯度/% Fineness of crude extraction
1	1	1	1	1	6.00
2	1	2	2	2	6.53
3	1	3	3	3	8.88
4	2	1	2	3	8.56
5	2	2	3	1	9.65
6	2	3	1	2	10.73
7	3	1	3	2	8.52
8	3	2	1	3	11.27
9	3	3	2	1	14.25
K1	21.41	23.08	27.64	29.9	
K2	28.94	27.45	29.34	25.78	
K3	34.04	33.5	27.05	28.71	
k1	7.14	7.69	9.21	9.97	
k2	9.65	9.15	9.78	8.59	
k3	11.35	11.29	9.02	9.57	
R	4.21	3.60	0.76	1.38	
最优值 The optimum	A3	B3	C1	D1	

通过方差分析得出,料液比、加酶量对多糖纯度影响显著 ( $P<0.05$ ), 酶解时间、pH值对多糖纯度影响不显著 ( $P>0.05$ )。料液比对多糖纯度影响最大, 依次是加酶量、PH值和酶解时间。即  $A>B>D>C$ 。最优条件为  $A_3B_3C_1D_1$ , 即料液比 1:300, 酶浓度 11%, 酶解时间 4h, pH7.5。测得提取率为 4.74%, 多糖纯度为 16.9%。

### 3 讨论

#### 3.1 酶对提取率的影响

通过蛤蟆油粗多糖得率对 3 种不同的酶进行比较, 结果发现, 胰蛋白酶最适合用于蛤蟆油粗多糖的提取, 这是由酶的特异性和蛤蟆油蛋白质的组成所决定的。由于胰蛋白酶对蛤蟆油的特异性最高, 水解蛋白质也就最充分, 释放出的多糖也就最多。所以, 酶的选择对本试验意义重大。

#### 3.2 提取条件对提取率的影响

最高提取率的条件料液比 1:200, 酶浓度 11%, 酶解时间 12h, pH 值 7.5。酶浓度对提取物产量影响显著, 其他因子的影响均不显著。

理论上, 在一定范围内提取率随着料液比的增加而增大, 液体太少达不到与底物充分混合的目的, 而液体太多又会在后续的浓缩和脱蛋白中损耗多糖, 同时浪费大量的人力和试剂<sup>[18]</sup>。本试验所设计的料液比皆属于合理范围, 对试验结果无显著影响。

在加酶量达到饱和之前, 多糖得率与加酶量成正比, 加酶量越大, 酶解速度越快, 反应越充分。达到饱和后, 多糖得率不会因为加酶量的增加而继续增加, 反而使体系中杂质增加<sup>[14]</sup>, 提高成本。所以, 本试验所设酶浓度处于未达饱和水平。

多糖得率随着酶解时间的延长而增加, 到一定时间后增加变得缓慢, 此时蛤蟆油中多糖浓度与液相中的多糖浓度达到了平衡, 便不再增加<sup>[14]</sup>。但是延长提取时间易出现样品变质等不良后果, 增加试验风险。

#### 3.3 提取条件对提取物多糖纯度的影响

最高多糖纯度的条件为料液比 1:300, 酶浓度 11%, 酶解时间 4h, pH 值 7.5。料液比和加酶量对提取物中多糖纯度影响显著。在试验设计范围内, 料液比值越大, 提取物中多糖纯度越高。料液比可能通过影响酶解后的多糖分离过程而影响提取物中多糖纯度。

#### 3.4 提取物产量与多糖纯度的关系

从试验结果可以看出, 最大多糖得率的条件与最高提取物多糖纯度的条件不同。料液比和酶解时间对二者的作用不同, 可能是主要影响因素。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2010版. 北京:中国医药科技出版社, 2010.
- [2] 于洋, 姜大成, 张炜煜. 蛤蟆油对免疫力低下小鼠体内脂肪酸含量的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 4, 24(4):150-151.
- [3] 李津明, 宋茜, 孙仁爽, 等. 林蛙油酶解前后抗疲劳作用对比研究[J]. 黑龙江医药, 2008, 21(2):30-34.
- [4] 高燕玲. 甘肃产蛤蟆油对小鼠免疫能力和应激性能的影响[J]. 中药材, 1996, 2, 19(2):90-92.
- [5] 白雪松, 宋春梅, 杜鹃, 等. 林蛙油研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2009, 8, 30(4): 227-228.
- [6] 田春雨, 杨东, 曹阳, 等. 蛤蟆油的营养保健成分及药理作用[J]. 长春中医药大学学报, 2006, 9, 22(3): 56..
- [7] 肖炜, 邓虹珠. 蛤蟆油化学成分与药理研究概况[J]. 中药材, 2002, 9, 25(9): 681-683.
- [8] 刘郁, 刘建新. 林蛙油的成分及药理研究进展[J]. 海峡药学, 2007, 19(12):1-3.
- [9] 范玉林. 蛤蟆油成分研究的进展[J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18(3): 105-111.
- [10] 吴飞. 林蛙油软胶囊抗疲劳作用试验研究[J]. 吉林医学, 2009, 30(15): 1676-1677.
- [11] 曹玲, 李艳梅. 简述蛤蟆油的药理研究进展[J]. 黑龙江医药, 2002, 15(5): 384.
- [12] Luo Cheng, Chen Yin-Sheng. Optimization of extraction technology of Se-enriched *Heridium erinaceum* polysaccharides by Box-Behnken statistical design and its inhibition against metal elements loss in skull[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82: 854.
- [13] 郑卫星, 苏秀榕, 吴芝岳, 等. SPSS 正交设计提取林蛙油多糖[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29 (1) : 43-45.
- [14] 程婷婷, 李冬梅, 李韬, 等. 鲍鱼脏器多糖提取条件的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 208-213.
- [15] Hou Xu-Jie, Chen Wei. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72:68.
- [16] Huang Sheng-quan, Ning Zheng-xiang. Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47:337.
- [17] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Anal Chem, 1956, 28: 350.
- [18] Guo Xia, Zou Xiang, Sun Min. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80: 346.