

超声提取桦黄多糖工艺及其 多糖抗氧化性能研究

赵 鹏,安叶娟,宋 道,张婷婷,王昌利
(陕西中医学院药学院,陕西咸阳 712046)

摘 要:目的:优化桦黄多糖的超声提取工艺条件并初步探讨其抗氧化性能。方法:在单因素实验基础上,以桦黄多糖提取率为评价指标,通过响应面分析方法确定桦黄多糖最佳超声提取工艺条件;通过清除超氧阴离子自由基和DPPH自由基的实验来检测多糖抗氧化性能。结果:桦黄多糖最佳超声提取工艺条件为:温度为62℃,超声功率为220W,时间为35min,液料比为16:1(mL/g),提取2次,在此优化条件下多糖的平均提取率为7.87%,得到的桦黄多糖具有较好的抗氧化性能。结论:首次得到了一条适用于桦黄多糖超声提取的工艺路线,与传统工艺比较,超声提取法具有提取快、提取率高的优点。

关键词:桦黄,多糖,响应面优化法,超声提取,抗氧化性

Study on ultrasonic wave extraction and antioxidant of polysaccharides from *Piptoporus betulinus* Karst

ZHAO Peng, AN Ye-juan, SONG Xiao, ZHANG Ting-ting, WANG Chang-li

(School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

Abstract: Objective: To select the optimum extracting with the assistance of ultrasonic method of polysaccharides from *Piptoporus betulinus* Karst. Methods: The response surface analysis was employed to determine the optimum technological condition. Results: The optimum extraction conditions were as follows: extraction temperature 62℃, ultrasonic power 220W, extraction time 35min, ratio of water to raw material 16:1mL/g and 2 times. The yield of polysaccharides was 7.87% based on the above conditions. Conclusion: This method was suitable for the ultrasonic extraction and determination of polysaccharides from *Piptoporus betulinus* Karst. Compared with the traditional methods, ultrasonic extraction method was time-saving and efficiency.

Key words: *Piptoporus betulinus* Karst; polysaccharides; response surface methodology; ultrasonic extraction; antioxidant

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)20-0252-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.20.047

桦黄是多孔菌科滴孔菌属植物桦滴孔菌(*Piptoporus betulinus* Karst)的子实体^[1],其主要生长在海拔2300m以上发生病害的桦树树皮上,是陕西省民间习用药材,具有消积、化痰、抗癌等功效,主要用于治疗食管癌,胃癌,子宫癌等症。药理实验发现,桦黄中的多糖成分具有较好的抗肿瘤活性,揭示多糖可能就是桦黄能够治疗肿瘤疾病中的主要活性成分,其在保健食品和医药应用等方面具有很好的开发应用价值。但目前对于桦黄多糖的研究主要集中在药理实验方面^[2-3],对其提取、纯化工艺的研究较少。为了更好地开发和利用这一药用资源,本研究对桦黄

多糖的提取工艺进行了研究,由于超声提取法具有提取时间短、效率高优点,现在已经成为提取领域研究的热点之一^[5-6]。鉴于此本研究利用响应面法优化了超声法辅助提取桦黄多糖的工艺条件,并初步测试了其抗氧化活性,研究取得了一定的成果,为更好地利用这一药用资源提供了一定的理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

桦黄 购自西安市万寿路中药材批发市场,经陕西中医学院药学院宋道副教授鉴定为多孔菌科滴孔菌属植物桦滴孔菌(*Piptoporus betulinus* Karst)的子实体;葡萄糖、无水乙醇、浓H₂SO₄、苯酚 均为分析纯。

KQ-400DB型数控型超声清洗器 江苏昆山超声有限公司;电子天平 梅特勒-托利多有限公司,精度:0.001g;EYELA型旋转蒸发器 上海爱朗仪器有限公司;SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司;UV-2550型紫外可见

收稿日期:2013-12-23

作者简介:赵鹏(1977-),男,博士,副教授,研究方向:天然药用活性成分分离纯化。

基金项目:陕西省教育厅专项(11JK0691)资助项目;陕西省中药制药重点学科专项基金。

分光光度计 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 桦黄多糖超声提取工艺路线 先将干燥的桦黄粉碎,过60目筛,用无水乙醇进行脱脂,然后将脱脂后的药材颗粒置于圆底烧瓶中,并按设计的料液比加入蒸馏水,在超声辅助的条件下进行提取,提取完成后,提取液抽滤后,按原药材质量1:1 (g/mL) 浓缩,加入一定量的无水乙醇,于冰箱中静置过夜,抽滤,滤饼依次用无水乙醇、丙酮、乙醚淋洗,得疏松粉末后,真空干燥,即得桦黄粗多糖。

1.2.2 桦黄多糖含量与提取率测定 多糖含量的测定按照文献[7]报道的苯酚-硫酸法,以葡萄糖为对照品,绘制标准曲线为: $A=0.0103C+0.0004$, 相关系数 $r=0.9991$, 浓度范围在 $0\sim 50\mu\text{g/mL}$, 线性良好。

多糖提取率的计算用下式:

$$\text{多糖提取率}(\%) = (\text{提取物质量} \times \text{多糖含量} / \text{原料质量}) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.3 桦黄多糖提取单因素实验

1.2.3.1 提取温度对多糖提取率的影响 精确称取五份各50g的干燥桦黄,每份液料比为10:1 (mL/g),提取时间25min,超声功率120W,提取2次,分别考察不同提取温度(40、50、60、70、80℃)对桦黄多糖提取率的影响。

1.2.3.2 超声功率对多糖提取率的影响 精确称取五份各50g的干燥桦黄,每份液料比为10:1 (mL/g),提取时间25min,提取温度60℃,提取2次,分别考察不同超声功率(120、160、200、240、280W)对桦黄多糖提取率的影响。

1.2.3.3 提取时间对多糖提取率的影响 精确称取五份各50g的干燥桦黄,每份液料比为10:1 (mL/g),超声功率200W,提取温度60℃,提取2次,分别考察不同提取时间(25、30、35、40、45min)对桦黄多糖提取率的影响。

1.2.3.4 液料比对多糖提取率的影响 精确称取五份各50g的干燥桦黄,每份超声功率200W,提取时间35min,提取温度60℃,提取2次,分别考察不同液料比(6:1、10:1、14:1、18:1、22:1 (mL/g))对桦黄多糖提取率的影响。

1.2.3.5 提取次数对多糖提取率的影响 精确称取50g的干燥桦黄,每份液料比为14:1 (mL/g),超声功率200W,提取温度60℃,提取时间25min,考察不同提取次数(1、2、3、4次)对桦黄多糖提取率的影响。

1.2.4 桦黄多糖超声提取工艺条件优化实验 利用Box-Behnken响应面法,对桦黄多糖的超声提取工艺

进行优化,选择对多糖提取率影响较大的因素,超声功率、提取温度、时间及液料比进行研究,提取次数均定为2次,确定桦黄多糖的最优超声提取工艺条件。实验因素和水平设计如表1所示。

1.2.5 桦黄多糖热水浸提工艺 为了对比超声提取工艺的优劣性,本研究在液料比10:1 (mL/g),提取温度为80℃,提取时间为120min的条件下,对桦黄进行了热水浸提法提取。

1.2.6 抗氧化性能测试 参照文献[7]测试样品对超氧阴离子自由基和DPPH自由基的清除效果。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验各个因子对提取率的影响

2.1.1 提取温度对多糖提取率的影响 从图1可以看出,当提取温度在60~70℃时,多糖的提取率达到最高值,其后多糖提取率改变不大,因此确定多糖的提取温度为60℃左右。

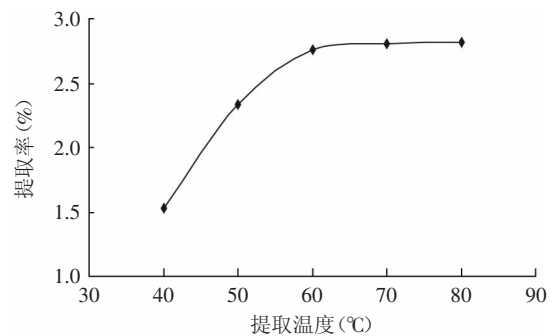


图1 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.1 Effects of extraction temperature on extraction ratio

2.1.2 超声功率对多糖提取率的影响 从图2可以看出,多糖的提取率随着超声功率的增加先是快速增大,当超声功率达到200W时,多糖的提取率达到最高值,其后多糖提取率呈逐步下降趋势,因此确定多糖的提取功率为200W左右。

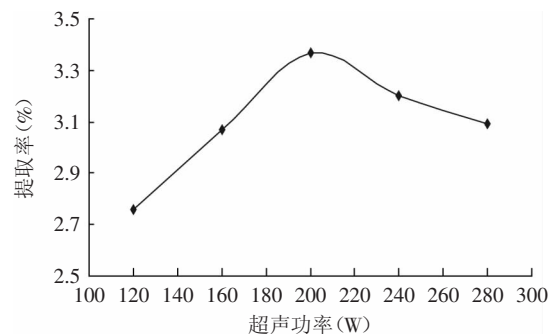


图2 超声功率对多糖提取率的影响

Fig.2 Effects of ultrasound power on extraction ratio

2.1.3 提取时间对多糖提取率的影响 从图3可以看出,当提取时间在35~40min时,多糖的提取率达到最高值,其后多糖提取率改变不大,因此确定多糖的提取时间为35min左右。

2.1.4 液料比对多糖提取率的影响 从图4可以看出,当液料比在14:1~18:1 (mL/g)时,多糖的提取率达

表1 实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the designed experiment

因素	水平		
	-1	0	1
A 提取温度 (°C)	50	60	70
B 超声功率 (W)	160	200	240
C 提取时间 (min)	30	35	40
D 液料比 (mL/g)	10:1	14:1	18:1

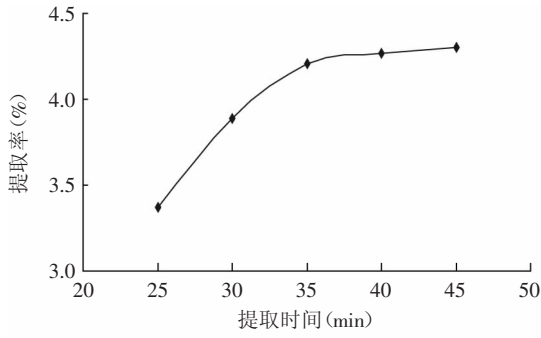


图3 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.3 Effects of extraction time on extraction ratio

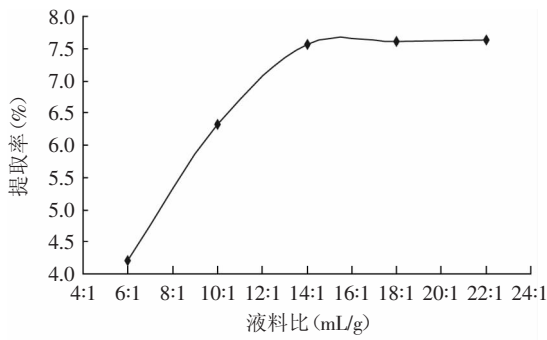


图4 液料比对多糖提取率的影响

Fig.4 Effects of extraction ratio of water to material on extraction ratio

到最高值,其后多糖提取率改变不大,因此确定多糖的提取温度为14:1 (mL/g)左右。

2.1.5 提取次数对多糖提取率的影响 从图5可以看出,当提取次数为2次时,多糖的提取率达到最高值,其后多糖提取率几乎不再改变,因此确定多糖的提取次数为2次。

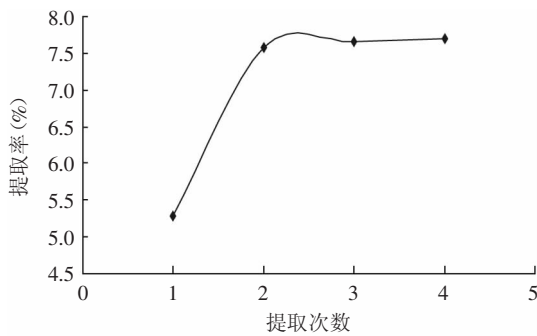


图5 提取次数对多糖提取率的影响

Fig.5 Effects of extraction time on extraction ratio

2.2 响应面优化实验结果与多糖提取率预测方程

按照表1的设计方案,利用Design-Expert v7.1.3软件进行响应面法优化实验,总计有27组实验方案组合,其中的24组是析因实验,3组是中心点实验,用来评估整个优化实验出现的误差。

采用Design-Expert 7.01软件对响应面优化实验得到的结果进行研究,研究结果见表2,按照各因素对实验结果的影响进行二次方程拟合,拟合得到下式:

$$Y=7.70+0.18A+0.19B+0.11C+0.12D+0.15AB-$$

表2 响应面优化实验设计方案与结果

Table 2 Program and test results of RSM

实验号	A	B	C	D	Y: 提取率 (%)
1	0	0	0	0	7.69
2	0	0	0	0	7.78
3	0	0	0	0	7.63
4	-1	0	0	-1	6.57
5	0	0	1	-1	7.37
6	0	1	1	0	7.24
7	-1	-1	0	0	6.31
8	-1	0	-1	0	6.21
9	1	1	0	0	7.10
10	1	0	0	1	7.27
11	0	-1	0	1	6.94
12	-1	0	0	1	6.55
13	1	0	1	0	6.72
14	0	0	1	1	7.31
15	-1	-1	-1	1	7.02
16	0	0	-1	0	7.21
17	-1	0	1	0	6.86
18	0	-1	-1	0	6.74
19	0	1	0	-1	7.42
20	1	0	0	-1	6.82
21	1	0	-1	0	6.97
22	-1	1	0	0	6.25
23	0	1	-1	0	7.39
24	0	0	-1	-1	6.64
25	0	-1	0	0	6.99
26	0	1	0	1	7.37
27	0	-1	0	-1	6.91

$$0.23AC-0.100BC-0.020 BD-0.16CD-0.69A^2-0.37B^2-0.32C^2-0.17D^2 \quad \text{式(2)}$$

由方差分析表3的分析结果可以看出,回归方程的F值为10.12,其显著水平远远低于0.05,这说明,利用响应面法拟合得到的实验模型显著性极高,按照拟合模型得到的回归方程,考察其因变量与自变量之间的线性相关系数后发现, $r=5.04/5.05=0.998$,这一点表明用该数学模型来评估各相关因素对桦黄多糖的提取率的影响比较真实可靠。由F值可知,响应面实验组合的各单因素中,对桦黄多糖提取率影响最大的是超声功率,其次为温度、液料比,提取时间的影响最小且为不显著影响因素。

2.3 响应面图分析

从表3的分析结果可知,六组提取因素的交互影响中,仅提取温度与时间之间的交互影响显著,因此对这组交互影响显著的响应面图进行了分析。

从图6可以直观的看出,在提取时间较短时升高提取温度,或在提取温度较低时延长提取时间(D)均可提高桦黄多糖的提取率;但提取时间较长时,升高提取温度,多糖的提取率又呈下降趋势,这可能是因为在较高温度下,提取时间过长,引起的多糖水解造成的。

通过响应面法预测得到的回归模型分析^[8],可得

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	显著水平p	显著性
模型	5.04	14	0.31	10.12	<0.0001	*
A	0.41	1	0.41	13.18	0.0034	*
B	0.45	1	0.45	14.65	0.0024	*
C	0.15	1	0.15	4.70	0.0509	
D	0.16	1	0.16	5.29	0.0402	*
AB	0.093	1	0.093	3.01	0.1082	
AC	0.20	1	0.20	6.56	0.0250	*
AD	0.000	1	0.000	0.000	1.0000	
BC	0.040	1	0.040	1.30	0.2773	
BD	1.6×10 ⁻³	1	1.6×10 ⁻³	0.052	0.8238	
CD	0.096	1	0.096	3.11	0.1031	
A ²	2.56	1	2.56	82.82	<0.0001	**
B ²	0.74	1	0.74	23.96	0.0004	*
C ²	0.54	1	0.54	17.55	0.0013	*
D ²	0.15	1	0.15	4.36	0.0466	
残差	0.37	12	0.031			
失拟误差	0.36	10	0.036	6.30	0.1446	
纯误差	0.011	2	5.7×10 ⁻³			
总和	5.05	26				

注:**p<0.01为极显著;*p<0.05为显著。

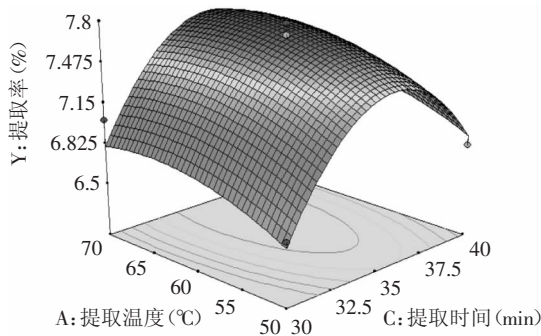


图6 提取温度与时间对多糖提取率的交互影响
Fig.6 Effects of time and ratio of water to material on the extraction

到按照回归模型预测的超声提取法提取桦黄多糖的最优工艺条件是:温度为62℃,超声功率为215.6W,时间为34.65min,液料比为16.08:1(mL/g),提取次数为2次,在此工艺条件下,预测提取得到桦黄多糖提取率为7.90%。

2.4 验证实验

根据预测的实验结果,并从实际工艺操作方便考虑,微调提取的最佳工艺条件为:温度为62℃,超声功率为220W,时间为35min,液料比为16:1(mL/g),提取2次,在此工艺条件下重复操作三次,同时为了对比超声提取法和热水浸提法的优劣,也对桦黄多糖采用热水浸提法进行了三次平行实验,结果如表4所示。

从表4可看出,超声条件下桦黄多糖的平均提取率为7.87%,实验值与预测值基本相符,由此可知,通过响应面法预测得到的方程与实际结果高度一致,

具有很高的可信性。与热水浸提法相比,采用超声提取法,多糖的提取时间大幅度缩短,提取率有了较大程度的提高。

表4 实验结果

Table 4 Results of the experiment

提取方法	提取率(%)			平均值(%)	提取时间(min)
超声提取法	7.85	7.86	7.90	7.87	35×2次
热水浸提法	7.12	7.14	7.15	7.13	120×2次

2.5 抗氧化性能分析

2.5.1 桦黄多糖对超氧阴离子自由基的清除作用 本实验分别考察热水浸提法、超声提取法得到的桦黄多糖清除超氧阴离子自由基的效果,结果如图7所示。

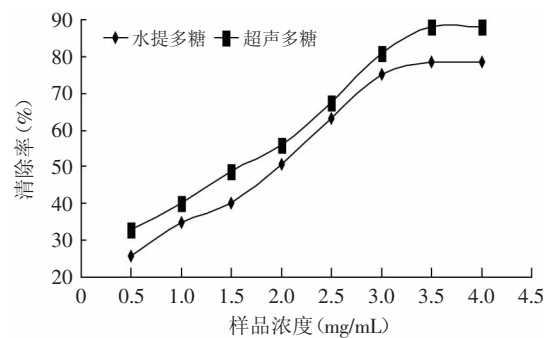


图7 超氧阴离子自由基清除作用

Fig.7 The scavenging of superoxide anion free radical

由图7可看出,超声提取法得到的桦黄多糖对超氧阴离子的清除效果强于热水浸提法得到的桦黄多糖,并且随着浓度的增大而逐渐增大,呈现较好的量效关系,其最大清除率达88.31%。

2.5.2 桦黄多糖对DPPH自由基的清除作用 本实验分别考察热水浸提法、超声提取法得到的桦黄多糖清除DPPH自由基的效果,结果如图8所示。

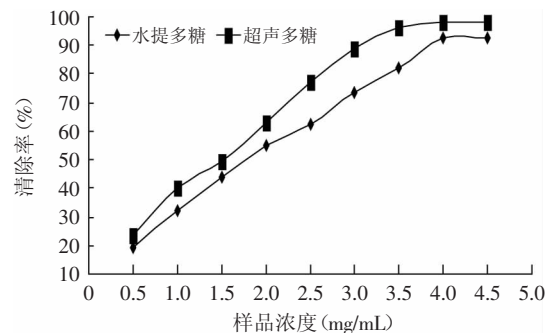


图8 DPPH自由基清除作用

Fig.8 The scavenging of DPPH radical

由图8可看出,超声提取法得到的桦黄多糖对DPPH·的清除作用的清除效果同样强于热水浸提法得到的桦黄多糖,并且随着浓度的增大而逐渐增大,呈现较好的量效关系,其最大清除率达98.2%。

3 结论

本研究首次利用Box-Behnken响应面法对桦黄

多糖的超声提取工艺进行了优化研究,最终得到了和实验结果拟和程度较高的数学模型和较优的桦黄多糖超声提取工艺条件:温度为62℃,超声功率为220W,时间为35min,液料比为16:1(mL/g),提取2次,在此工艺条件下重复操作三次,桦黄多糖的平均提取率为7.87%。

研究同时比较了超声提取法得到的桦黄多糖和热水浸提法得到的桦黄多糖的抗氧化性能,由实验结果可知,这两种桦黄多糖均具有较好的抗氧化活性,而超声提取法得到的多糖其抗氧化能力较强,出现这一原因的可能是因为超声对多糖的结构产生了一定的影响,对于其现象产生的原因,还在进一步研究之中。

结果表明,超声提取法与热水浸提法相比,具有提取时间短,提取温度低,多糖提取率高的优点,本研究结果为桦黄多糖提取工艺的进一步深入研究提供一定的参考价值。

(上接第243页)

由图4可以看出,突变株A214产丙酮酸的遗传性能稳定,发酵36h的丙酮酸产量保持在(37.43±0.16)g/L,比出发菌株(32.92±0.34)g/L提高了13.69%。表明该突变株产丙酮酸性能稳定,既可以满足工业生产的要求,也可以作为后续实验的出发菌株。突变株A302虽然遗传性能稳定,但是丙酮酸的产量较A214低,而A311的丙酮酸产量起伏较大,不适合工业化应用。

3 结论

本研究表明,ARTP诱变育种方法能够有效的诱变光滑球拟酵母(*T. glabrata*)Tp19菌株,而100孔平板培养可快速筛选产丙酮酸的突变株。通过摇瓶复筛和遗传稳定性检测,筛选出了一株丙酮酸的突变株A214,该突变株发酵36h的丙酮酸产量达到37.43g/L,比出发菌株提高了13.69%。说明ARTP诱变系统可以引起光滑球拟酵母Tp19的基因突变,突变株A214丙酮酸产量提高的原因尚不清楚,有待进一步研究。本文的实验结果是在摇瓶条件下得到的,由于摇瓶培养过程中营养、溶氧和pH等条件不能调控,接下来需要通过发酵罐放大培养对突变菌株生产丙酮酸的过程和发酵特性进行分析,并进一步优化其发酵条件,为中试和大规模生产提供基础。

参考文献

- [1] 杨悦. 工业发酵法生产丙酮酸[J]. 发酵科技通讯, 2009, 38(4): 20-22.
- [2] Biwer A P, Zuber P T, Zelic B, et al. Modeling and analysis of a new process for pyruvate production[J]. Ind Eng Chem Res, 2005, 44(9): 3124-3133.
- [3] 刘彩霞, 杜海燕, 孙家跃. 丙酮酸及系列产品的检测与应用[J]. 生命科学仪器, 2006, 6(4): 9-12.
- [4] 谷劲松, 曲音波. 丙酮酸的酶法转化及乳酸氧化酶的研究进展[J]. 微生物通报, 2003, 30(1): 86-90.
- [5] Li Y, Chen J, Lun S Y. Biotechnological production of pyruvic acid[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 57(4): 451-459.

参考文献

- [1] 赵继鼎, 徐连旺, 张小青. 中国多孔菌科分类系统的研究, [J]. 微生物学报, 1982, 22(3): 218-232.
- [2] 乔蓉霞, 张国跃, 郭耀武, 等. 桦黄质量标准研究[J]. 中国医药导刊, 2011, 13(8): 1450-1451.
- [3] 张国跃, 乔蓉霞, 郭耀武, 等. 反相HPLC法测定陕西民间习用药材桦黄中麦角甾醇的含量[J]. 安徽医药, 2011, 15(11): 1360-1362.
- [5] 贺婷, 向莹, 陈健. 滑子菇多糖超声辅助提取工艺及抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 235-239.
- [6] 高擎, 游丽君, 赵谋明. 超声辅助提取松茸抗氧化多糖工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 298-302.
- [7] 赵鹏. 款冬花多糖提取纯化工艺研究及结构鉴定[D]. 西安: 西北大学, 2010: 99.
- [8] 宋道, 赵鹏, 申婉容, 等. 款冬花多糖的制备及抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 227-231.
- [6] 李寅, 陈坚, 梁大芳, 等. 营养条件对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响[J]. 生物工程学报, 2000, 16(2): 225-228.
- [7] 张澎洋. 丙酮酸高产菌株的选育及其发酵条件研究[D]. 河南: 河南大学, 2007.
- [8] 胡晓冰, 林标声. 磷对丙酮酸发酵生产影响作用研究[J]. 河南师范大学学报, 2011, 39(1): 134-136.
- [9] 赵博, 王钦宏, 蔡静平. 光滑球拟酵母适应进化改善丙酮酸生产[J]. 中国酿造, 2012, 31(4): 125-129.
- [10] Park J, Henins I, Herrmann H W, et al. An atmospheric pressure plasma source[J]. Appl Phys Lett, 2000, 76(3): 288-290.
- [11] Wang H B, Sun W T, Li H P, et al. Discharge characteristics of atmospheric pressure radio-frequency glow discharges with argon/nitrogen[J]. Appl Phys Lett, 2006, 89(16): 161504.
- [12] Li H P, Li G, Sun W T. Radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges: producing methods, characteristics and applications in bio-medical fields[M]. COMPLEX SYSTEMS: 5th International Workshop on Complex Systems, AIP Conference Proceedings, 2008, 982: 584-591.
- [13] Wang L Y, Huang Z L, Li G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. J Appl Microbiol, 2010, 108(3): 851-858.
- [14] Li G, Li H P, Wang L Y, et al. Genetic effects of radio-frequency, atmospheric pressure glow discharges with helium[J]. Appl Phys Lett, 2008, 92(72): 221504.
- [15] 张健, 高年发. 利用响应面法优化丙酮酸发酵培养基[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(8): 52-55.
- [16] Enache I, Naude N, Cambonne J P, et al. Electrical model of the atmospheric pressure glow discharge (APGD) in helium[J]. Eur Phys J Appl Phys, 2006, 33(1): 15-21.
- [17] Morfill G E, Kong M G, Zimmermann J L. Focus on plasma medicine[J]. New J Phys, 2009, 11(11): 115011.
- [18] 赵南, 刘义雄, 阚好新, 等. 发酵法生产丙酮酸钠提取工艺的研究[J]. 江西农业学报, 2010, 22(3): 161-162.