

# 白芨多糖的酶法精制工艺条件研究

孔俊豪<sup>1,2</sup>, 史劲松<sup>1</sup>, 孙达峰<sup>1</sup>, 张卫明<sup>1,\*</sup>

(1.南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042; 2.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

**摘 要:** 进行白芨多糖的酶法精制工艺研究, 初步考察 5 种蛋白酶对白芨多糖的精制效果, 并选择木瓜蛋白酶进一步研究, 考察加酶量、pH 值、温度和酶解时间对白芨多糖纯度和蛋白残余率的影响, 确定了适宜的酶解条件: 加酶量 8~10mg/g 底物, pH7.0~7.5, 温度 45~50℃, 酶解时间 120~150min。精制白芨多糖中葡甘聚糖最高含量可达 97.0%, 蛋白含量由粗多糖的 0.91% 下降到 0.32%。实验同时进行了酶法随程处理研究, 获得的多糖纯度达 92.0%。该法提供了一种更为简单的白芨多糖提取和精制工艺。

**关键词:** 白芨; 葡甘聚糖; 酶法精制; 木瓜蛋白酶

## Enzymatic Purification of Crude Polysaccharides Extracted from *Bletilla striata* Roots

KONG Jun-hao<sup>1,2</sup>, SHI Jin-song<sup>1</sup>, SUN Da-feng<sup>1</sup>, ZHNAG Wei-ming<sup>1,\*</sup>

(1. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 210042, China ;  
2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Generally, the purity of crude polysaccharide extracted from *Bletilla striata* roots applied in Chinese traditional medicine is no higher than 80%, which seriously restricts its further utilization as an additive or a medicine material. In order to purify the crude polysaccharide extracted from *Bletilla striata* roots using 80% ethanol, this study employed the enzymatic hydrolysis technology to remove protein impurities from the crude polysaccharide extract. Papain was selected for further study because it presented the most outstanding efficiency of protein removal compared to neutral protease, chymocotrypsin, Amano protease, papain and alkaline protease. Four parameters affecting the efficiency of protein removal of papain including enzyme concentration, pH value, temperature and enzymolysis duration were investigated by one-factor-at-a-time (OFAT) experiments. The optimum ranges of the four parameters for protein removal were as follows: enzyme concentration 8 — 10 mg/g substrate, pH 7.0 — 7.5, temperature 45 — 50℃, and enzymolysis duration 120 — 150 min, and in verification experiments repeated three times a highest purity of 97.0% of the polysaccharide was observed, as well as a decrease of protein content in the crude polysaccharide from 0.91% to 0.32%. When papain was directly added to the extraction solution, a purity of 92.0% could be achieved at 4 h of extraction. The one-step extraction - purification procedure may be a more simple and rapid technique for the extraction and purification of polysaccharide from *Bletilla striata* roots.

**Key words:** *Bletilla striata*; polysaccharide; enzymatic purification; papain

中图分类号: TS245.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0052-05

白芨[*Bletilla striata*. (Thunb.) Reichb. f.]为兰科白芨属, 又称莲及草、雪如末, 是药食兼用的中药资源, “必涩而收, 入肺止血, 生肌治疮”, 具有收敛止血、清热利湿、消肿生肌之功效, 临床主要用于治疗肺伤咳血, 外科创伤, 胃及消化道溃疡等疾病<sup>[1]</sup>。其地下鳞茎含有 30% 以上的水溶性多糖, 主要成分为葡甘聚糖, 也是白芨胶的主要功能性成分, 其甘露糖和葡萄

糖两种糖基的比例大约为 4:1<sup>[2]</sup>。白芨多糖是一种优良天然增稠剂和乳化稳定剂, 实验研究表明安全性较高, 乳化配伍性能良好<sup>[3]</sup>。因其良好的生物相容性和可降解性, 可以用做各种形式的载药敷料修复材料, 功能性物质的包埋、组织和填充工程材料; 以及与其他天然高分子生物材料进行交联, 开发出环境敏感的智能型凝胶、药物膜等新型缓释控制药物<sup>[4-6]</sup>。白芨多糖还广泛

收稿日期: 2008-10-21

基金项目: 国家“863”计划重点项目(2007AA100401); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD06B05)

作者简介: 孔俊豪(1982—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: kjh02016110@126.com

\* 通讯作者: 张卫明(1957—), 男, 研究员, 研究方向为植物资源和农产品加工。E-mail: botanyzh@163.com

应用于现代中医药和日化行业,尤其是其良好的持水性能和显著的美白作用越来越受化妆品行业的青睐<sup>[7-8]</sup>。

传统医用白芨均为粗多糖制品,采用高温沸水煎煮或碱水提取,而后经乙醇沉淀,干燥制得白芨葡甘聚糖<sup>[9-11]</sup>。粗白芨多糖纯度一般低于80%,色泽略黄,且带有药味,作为添加剂或医药材料还需进行精制<sup>[12-13]</sup>。而前期研究表明,溶剂洗涤、脱色、色层等分离方法效果不理想,且白芨多糖黏度大,很多过程操作难度大。本实验拟研究酶法辅助精制工艺,并重点对木瓜蛋白酶的适宜处理条件进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

白芨块茎 安徽亳州药材市场,经分析其多糖类物质为40%左右。

木瓜蛋白酶(80万U/g)、中性蛋白酶(20万U/g);碱性蛋白酶(40万U/g) 南宁庞博生物工程有限公司;Amano2G 蛋白酶A( $\geq 8$ 万U/g) 天野株式会社;糜蛋白酶 德阳与生化制品有限公司;考马斯亮蓝(G-250)、牛血清白蛋白(BSA) 南京博尔迪生物科技有限公司;乙醇、浓硫酸、苯酚等试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

恒温水浴锅 上海医疗器械三厂;752紫外可见分光光度计 上海精密实验仪器公司;20PR-520冷冻离心机 日立工机株式会社;真空干燥箱 上海实验仪器总厂;万能粉碎机 天津市第二微机电厂;RE-52旋转蒸发仪 上海青浦沪西仪器厂;470FT-IR傅立叶变换红外光谱仪 美国Thermo Nicolet公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 白芨粗多糖的提取

取白芨块茎200g,粉碎,过20目筛,加入其2倍质量体积的80%乙醇浸泡4h,沥干乙醇后,再加入原料质量的20倍去离子水进行提取,温度60℃,搅拌浸提4h,过滤分离滤渣,滤液8000r/min离心15min,上清液经旋转蒸发仪浓缩至原体积的1/3,按其体积3倍加入95%乙醇,4℃静置沉淀8h,过滤、洗涤得白芨粗多糖,真空干燥后保藏备用。

#### 1.3.2 蛋白酶品种选择

配制浓度为2%的白芨粗多糖,分别以碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、糜蛋白酶及Amano蛋白酶A进行处理,加酶量、处理温度、溶液pH值等均按照各个酶的推荐使用条件。处理后采用3倍体积的95%乙醇,4℃静置8h,进行多糖沉淀,测定多糖及蛋白含量。

#### 1.3.3 酶法精制条件研究

基本水解调节设定为:白芨粗多糖浓度2%,木瓜蛋白酶加入量5mg/g底物,水解体系pH5.5~6.0,水解温度60℃,水解时间180min。对加酶量、pH值、水解温度、水解时间等因素进行研究时,其参数在一定范围内调整,其余条件不变。酶解完成后在水解液中加入3倍体积的95%乙醇,于4℃冰箱静置沉淀8h,过滤,并用75%乙醇洗涤沉淀,沉淀干燥后测定总糖和蛋白含量。

#### 1.3.4 提取过程中酶法随程处理

在1.3.1节白芨多糖提取时,于粉碎后的白芨中加入0.5g木瓜蛋白酶,酶浓度为0.5mg/ml。在提取过程中,每1h取样50ml,离心后加入150ml的95%乙醇,4℃静置8h,进行多糖沉淀,测定多糖及蛋白含量。

#### 1.3.5 白芨多糖含量测定

精确称取白芨多糖样品0.1g,溶于100ml蒸馏水中,配置成1.0mg/ml白芨多糖溶液,测定时,取该溶液1ml稀释至10ml,为待测样品溶液。

采用苯酚硫酸法测定总糖含量<sup>[14]</sup>,以葡萄糖为标准,其标准曲线为 $y=0.1017x-0.0012$ , $R^2=0.9994$ 。

$$\text{糖含量} = \frac{C_{\text{样}} \times N \times V}{m_{\text{样}}} \times 0.9 \times 10^{-4} \times 100$$

式中: $C_{\text{样}}$ 为测定样品溶液中的糖含量; $N$ 为原样品溶液的稀释倍数; $V$ 为原样品溶液体积。

#### 1.3.6 白芨多糖中蛋白含量测定

取上述待测样品液,采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白含量。以BSA为标准,其标准曲线为 $y=0.1986x+0.0001$ , $R^2=0.9994$ 。

$$\text{蛋白含量}(\%) = \frac{C'_{\text{样}} \times N' \times V'}{m'_{\text{样}}}$$

式中: $C'_{\text{样}}$ 为单位测定样品溶液中的蛋白含量; $N'$ 为原料样品溶液中的稀释倍数; $V'$ 为原样品溶液的体积。

#### 1.3.7 红外光谱分析

干燥白芨多糖0.5mg与50mgKBr粉末混合后进行压片,采用傅立叶变换红外光谱仪进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 白芨粗多糖提取及成分测定

白芨经80%乙醇浸提,醇溶性色素及部分水溶性杂质先期溶出,然后经水提、醇沉获得粗多糖,其多糖纯度为74.0%。本方法得到的白芨多糖纯度远高于直接水提工艺,蛋白质含量为0.91%,也处于较低水平<sup>[15]</sup>。白芨块茎中葡甘聚糖占25%~30%,其次是5%~8%淀

粉。因淀粉糊化温度在 60℃ 以上, 实验采用 60℃ 进行水提取, 能够避免淀粉溶出, 粗多糖溶液的淀粉显色反应呈阴性。而提取温度在 70℃ 以上时, 其粗多糖溶液的淀粉显色反应呈阳性, 表明有淀粉溶出。

## 2.2 不同蛋白酶对白芡粗多糖的精制

白芡粗多糖色泽略黄, 略带药味, 作为食品添加剂或生物材料还需要进行精制。目前还没有对白芡多糖中非糖类杂质的系统研究报道。本研究发现, 采用乙醇、乙醚和丙酮类有机溶剂多次沉淀或洗涤能提高白芡多糖纯度, 但一般纯度不超过 80%, 因而这种作用有限。而活性炭、高岭土等介质吸附效果较差, 纯度基本不提高, 且白芡黏度高, 过滤、离心等过程操作难度大。本研究认为, 白芡多糖中杂质除了蛋白质外, 很大一部分是植物的一些次生代谢物质, 这些非糖成分与白芡的葡甘聚糖、蛋白质等形成复杂的缀合物, 因而不能被简单的方法脱除。

本研究采用酶法进行精制。因实验制备的白芡粗多糖不含淀粉杂质, 故不采用淀粉酶对其进行精制。而蛋白质含量尽管只有 1% 左右, 但这部分蛋白可能参与了缀合物的形成。实验选择了不同类型的蛋白酶, 对白芡粗多糖进行处理, 并测定其中白芡多糖和残余蛋白含量, 以及精制多糖得率。实验结果见表 1。

表 1 不同蛋白酶对白芡粗多糖的精制效果

Table 1 Comparison of effectiveness of protein removal of different proteases

蛋白酶类型	多糖纯度(%)	多糖回收率(%)	残余蛋白(%)	蛋白脱除率(%)
中性蛋白酶	82.5	85.5	0.64	29.7
糜蛋白酶	88.6	85.4	0.73	19.8
Amano 蛋白酶 A	84.9	78.9	0.59	35.2
木瓜蛋白酶	91.2	85.3	0.42	53.8
碱性蛋白酶	86.7	82.4	0.68	25.3

结果表明, 不同蛋白酶均可以部分脱除白芡粗多糖中的蛋白, 其中木瓜蛋白酶脱除率达到 53.8%, 其次是 Amano 公司的蛋白酶 A。随着蛋白成分从多糖中脱除, 多糖纯度大幅度提高, 提高最大的是木瓜蛋白酶, 精制后多糖纯度达到 91.2%, 其次是糜蛋白酶, 精制后多糖纯度为 88.6%。值得注意的是糜蛋白酶, 其蛋白脱除率却只有 19.8%, 是五种蛋白酶中蛋白脱除率最差的, 但它的精制效果仅次于木瓜蛋白酶, 这种现象同时也说明了白芡多糖中, 蛋白及其缀合物存在多样性。

白芡粗多糖中的蛋白成分也可以采用 Sevag 法进行脱除, 在 2% 的白芡多糖溶液加入其体积 1/5 的 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇=1:4, V/V), 反应 15min, 经离心去除沉淀, 反复上述操作 5 次后, 多糖经回收测定, 其纯度达到 87.1%, 残余蛋白含量为 0.58%, 蛋白脱除率为 36.3%,

多糖回收率为 75.4%。相比而言, Sevag 脱蛋白效果不及蛋白酶, 且需要有机溶剂, 操作过程繁琐。

## 2.3 木瓜蛋白酶酶解条件研究

木瓜蛋白酶属巯基蛋白酶, 主要作用于蛋白质中 L-精氨酸、L-赖氨酸、甘氨酸和 L-瓜氨酸羧基参与形成的肽键, 具有较宽的底物特异性, 对底物特异性要求不严格, 因而对多糖成分中的杂蛋白脱除效果较好。实验选择木瓜蛋白酶, 进一步研究白芡粗多糖的酶法精制, 重点考察加酶量、处理温度、溶液 pH 值及处理时间对精制效果的影响。

### 2.3.1 加酶量对酶法精制效果的影响

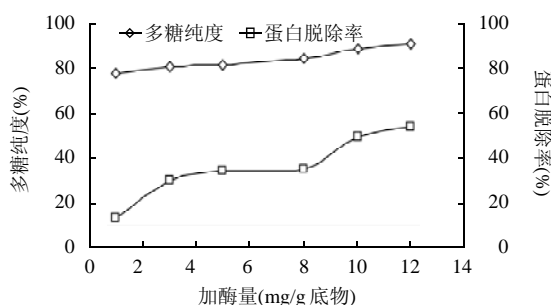


图 1 加酶量对白芡粗多糖酶法精制效果的影响

Fig.1 Effects of papain concentration on efficiency of protein removal

在 2% 的白芡粗多糖溶液中, 分别加入不同质量的木瓜蛋白酶, 在 pH7.0, 温度 50℃ 条件下处理 180min。结果表明(图 1), 随着酶浓度提高, 多糖纯度呈上升趋势, 当酶用量大于 10mg/g 底物时, 精制后多糖纯度大于 90%, 此时蛋白脱除率也在 40% 以上。进一步增加酶用量, 脱除率增加有限, 因而 8~10mg/g 底物的用量较为适宜。

### 2.3.2 温度对酶法精制效果的影响

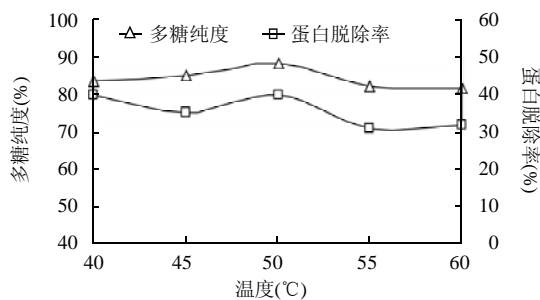


图 2 温度对白芡粗多糖酶法精制效果的影响

Fig.2 Effects of temperature on efficiency of protein removal

木瓜蛋白酶的适宜温度范围为 40~60℃, 实验在该温度范围内考察酶法精制效果。采用较低的加酶量(5mg/g 底物), 在 180min 内考察温度对酶解效果的累积作用。

结果(图2)表明, 50℃条件下酶处理 180min 后的白芨多糖纯度在 88% 左右, 但其余组也在 83% 以上, 因而酶处理温度对精制效果影响不大。但考虑到在较高的处理温度下, 白芨多糖黏度损失较大, 因而从提高产物稳定性角度考虑, 适宜的处理温度应选择 45~50℃。

### 2.3.3 pH 值对酶法精制效果的影响

天然白芨粗多糖溶液呈偏酸性, pH 值范围在 5.0~6.0 之间, 这也是木瓜酶的适宜 pH 值范围。但实验发现, 在体系 pH 值呈弱碱性时, 精制效果更佳, 其多糖纯度、脱蛋白率均优于弱酸性体系(图3)。体系 pH 值既影响水解酶的反应活性, 也影响反应底物的解离和空间构象, 由于白芨粗多糖中的杂蛋白, 结合了较多的非糖类成分, 这些物质在不同 pH 值下的解离和变构存在差别, 使酶促反应受到影响。实验表明, 采用木瓜酶对白芨粗多糖进行精制, 其适宜 pH 值为 7.0~7.5。

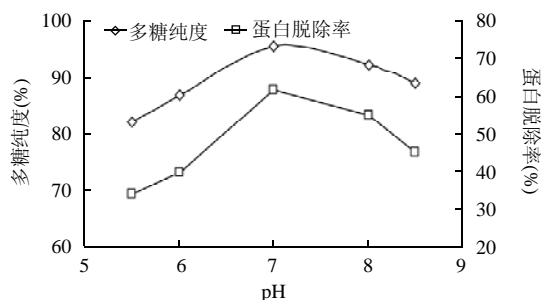


图3 pH 值对白芨粗多糖酶法精制效果的影响

Fig.3 Effects of pH on efficiency of protein removal

### 2.3.4 反应时间对酶法精制效果的影响

尽管白芨粗多糖中蛋白含量不高, 但是组成复杂, 且多糖溶液黏度大, 因而需要较长的水解时间。在实验的水解体系下, 2% 的白芨粗多糖溶液, 5mg/g 底物的加酶量, 需要 120min 才能脱除 40% 以上的蛋白, 并使多糖纯度达到 90% 以上(图4)。同样, 为避免长时间加热, 水解时间不宜太长, 120~150min 较为适宜。

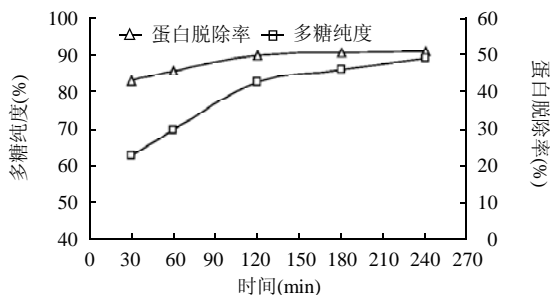


图4 反应时间对白芨粗多糖酶解效果的影响

Fig.4 Effects of enzymolysis duration on efficiency of protein removal

2.4 酶法精制在优化实验和白芨多糖提取工艺中的应用  
单因素试验得到最佳水解条件为: 加酶量 8~10mg/g, pH7.0~7.5, 作用温度 45~50℃, 酶解时间 120~150min。在该条件下进行的三组优化实验结果表明, 精制白芨多糖中葡甘聚糖最高含量可达 97.0%, 蛋白含量从 0.91% 下降到 0.32%。

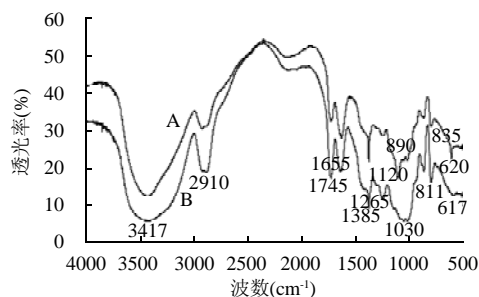
实验中发现, 白芨粗多糖经长时间干燥后, 复溶慢, 且复溶后使用酶法进行脱蛋白处理, 精制效果较差, 因而酶法精制的对象应该选择新提取出的粗多糖。为简化提取和精制流程, 实验开展了随程精制工艺研究, 即在粗多糖提取过程中就加入木瓜蛋白酶进行蛋白组分的脱除。结合提取工艺和酶法精制工艺, 可得酶法随程外理工艺条件为: 加酶量 8~10mg/g、pH7.0~7.5、提取温度 50℃、酶解时间 120~150min。酶法随程处理, 同样实现了对多糖的精制处理, 提取获得的多糖纯度达到 92%, 而直接水提取得到粗多糖纯度只有 74.0%。该方法提供了一条更为简单的白芨多糖提取和精制工艺。

表2 白芨多糖酶法处理提取过程

Table 2 Changes in concentration of polysaccharide in extraction solution, purity and protein content of dry polysaccharide product during one-step extraction-purification process

提取时间(h)	1.0	2.0	3.0	4.0
多糖浓度(mg/ml)	3.00	3.20	3.25	3.30
多糖纯度(%)	82.60	87.60	88.90	92.00
蛋白含量(%)	0.54	0.47	0.43	0.41

### 2.5 白芨多糖精制前后的红外光谱



A.精制白芨多糖(92.0%); B.粗白芨多糖(74.2%)。

图5 白芨多糖精制前后的红外图谱比较

Fig.5 Comparison of FTIR spectra of polysaccharide from *Bletilla striata* roots between pre-and post-purification

粗白芨多糖 B 在 900~1500cm<sup>-1</sup> 波数范围存在较强吸收, 且吸收峰彼此叠加使峰形舒展, 而精制后的白芨多糖(A), 在上述范围内峰形较为尖锐, 因而图谱能够直观表现出 B 组分要相对复杂。进一步比较还发现, 在

1265 $\text{cm}^{-1}$ , A 峰形较小, 而 B 有一个较大的吸收峰, 相关研究认为, 该处吸收主要为氧桥(O—O)的振动吸收、硫酯(S—O)的变形吸收, 同样在 1020~1150 $\text{cm}^{-1}$ , B 在较大的波数范围内均存在强吸收, 而该区域也属于硫酯(S—O)的、羧酸(C=O—O)等的振动吸收区域<sup>[16]</sup>, 这些吸收带可能主要来自杂质, 然而尚不能够确定白芨多糖中杂质是否也是以这种键合方式与多糖保持着相对紧密的结合, 这需要更为深入的研究分析。

### 3 结 论

木瓜蛋白酶对白芨多糖的精制有较好的效果, 实验对其作用条件进行了研究, 最佳加酶量为 8~10mg/g 底物, 适宜作用温度为 45~50℃、适宜 pH 值为 7.0~7.5, 适宜时间为 120~150min。

在提取过程中进行酶法随程处理, 操作简单, 过程经济, 在实验提取条件下, 能够获得 92% 的白芨多糖, 较直接水提取的多糖纯度有较大幅度提高。红外图谱分析表明, 白芨粗多糖在 900~1500 $\text{cm}^{-1}$  低波数范围存在较强吸收, 峰形彼此叠加而舒展, 直观体现出组分的复杂性, 而精制后多糖, 吸收峰较为尖锐, 尤其在 1020~1150 $\text{cm}^{-1}$  波数范围弱化, 推测该区域的吸收与杂质直接相关。

### 参考文献:

- [1] 张卫明. 植物资源开发与应用[M]. 南京: 东南大学出版社, 2005: 237-247.
- [2] DIAO H, LI X, CHEN J, LUO Y. *Bletilla striata* polysaccharide stimulates inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression in macrophages[J]. Journal of Bioscience and Biengineering, 2008, 105(2): 85-89.
- [3] 史劲松, 张卫明, 孙达峰. 基于灰度直方图对白芨多糖胶复合乳化剂配方筛选和稳定性评价[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 35-38.
- [4] MORITA H, KOYAMA K, SUGIMOTO Y. Antimitotic activity and reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by stilbenoids from *Bletilla striata*[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2005, 15(4): 1051-1054.
- [5] FIGUEIREDO P, GEORGE F, TATSUZAWA F. New features of intramolecular copigmentation byacylated anthocyanins[J]. Phytochemistry, 1999, 51(1): 125-132.
- [6] 朱小平, 吴东儒. 白芨多糖分离、纯化、组成及其性质[J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 1991(4): 87-91.
- [7] SAITO N, KU M, TATSUZAWA F. Acylated cyanidin glycosides in the purple-red flowers of *Bletilla striata*[J]. Phytochemistry, 1995, 40(5): 1523-1529.
- [8] TAKAGI S, YAMAKI M, INOUE K. Antimicrobial agents from *Bletilla striata*[J]. Phytochemistry, 1983, 22(4): 1011-1015.
- [9] 孙达峰, 史劲松, 张卫明. 白芨多糖的连续逆流提取的工艺研究[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(5): 34-35.
- [10] 张寒, 郝保华, 徐花荣. 白芨多糖的提取工艺的研究[J]. 陕西中医, 2007, 28(2): 223-225.
- [11] WANG C, SUN J, LUO Y, et al. A polysaccharide isolated from the medicinal herb *Bletilla striata* induces endothelial cells proliferation and vascular endothelial growth factor expression *in vitro*[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28: 539-543.
- [12] 芮海云, 吴国荣, 陈景耀. 白芨中性杂多糖的分离纯化与结构分析[J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(1): 30-33.
- [13] QIAN J, VOSSOUGH D, WOITASCHKE D, et al. Combined transarterial chemoembolization and arterial administration of *Bletilla striata* in the treatment of liver tumor in rats[J]. World Journal of Gastroenterology, 2003, 9(12): 2676-2680.
- [14] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 11.
- [15] 芮海云, 吴国荣, 张卫明. 白芨粗多糖提取方法的比较研究[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(1): 14-16.