

# 南瓜多糖复合酶法提取及纯化的研究

王洪伟, 崔崇士, 徐雅琴\*  
(东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 南瓜中的有效成分南瓜多糖对糖尿病症状有显著的治疗效果, 为了开发和利用这一功能成分, 本实验采用酶解的方法提取南瓜多糖。首先利用正交试验确定复合酶添加量为纤维素酶 1%, 果胶酶 1.5%, 木瓜蛋白酶 1%; 利用正交试验确定复合酶的最佳反应条件为温度 40℃, pH 值为 5.5, 反应时间为 30min。在最佳条件下, 多糖的提取率为 28.8%。将复合酶法制得的南瓜粗多糖经脱色、透析后, 上 DEAE-纤维素柱层析, 得到三种级分。主要级分 PP III 经 Sepharose CL-4B 凝胶柱层析、紫外扫描和冻融分析鉴定为均一组分。

**关键词:** 南瓜多糖; 提取纯化; 复合酶

Study on Extraction of Pumpkin Polysaccharide with Complex Enzymes and Its Purification

WANG Hong-wei, CUI Chong-shi, XU Ya-qin\*  
(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** In this study, enzymolysis was adopted to extract pumpkin polysaccharide with obvious treatment effects on diabetes. The adding rate of cellulase 1%, pectinase 1.5% and papain 1% respectively is optimal through orthogonal tests. Temperature 40℃, pH 5.5 and extraction time 30 min are optimal conditions for complex enzymes extraction through orthogonal tests. Under these optimum conditions the extraction rate of pumpkin polysaccharide reaches 28.8%. Three fractions (PP I, PP II, PP III) are identified from the purified pumpkin polysaccharide by DEAE-cellulose chromatography. Sepharose CL-4B gel filtration, ultraviolet spectrometry and freeze-thawing assays show that PPIII is purified.

**Key words** pumpkin polysaccharide; extraction and purification; complex enzymes

中图分类号: 0629.12

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0247-03

南瓜(*Cucurbita* spp.), 葫芦科南瓜属的一年生蔓性草本植物。根据它的产地和性状的不同, 分为中国南瓜(俗称倭瓜、番瓜等), 印度南瓜(俗称笋瓜、搅瓜等)和美洲南瓜(俗称西葫芦)。南瓜生长强健, 对环境适应

力极强, 我国各地普遍栽培。近年来, 人们发现南瓜不但营养丰富, 而且具有保健和防病治病的功效, 南瓜中的有效成分南瓜多糖对糖尿病症状有显著的治疗效果<sup>[1]</sup>。

收稿日期 2006-08-31

\*通讯作者

基金项目: 黑龙江省科技攻关计划项目(GB04B405-03)

作者简介: 王洪伟(1978-), 男, 硕士, 研究方向为食品化学。

坏自身形态两种方法进行。

添加阴离子交换树脂的聚乙烯醇胶片固定化酒精酵母发酵酒精的最适条件为: 初始 pH 为 5.0, 增殖培养温度和发酵温度为 30℃左右。批量发酵酒精含量最高可达 5.74g/100ml。在以 20ml/h 的流速进行连续发酵时, 48h 后酒精含量可达 4.93g/100ml 以上。在连续发酵近 20d 后, 反应正常, 酒精含量稳定在 5.50g/100ml 左右。充分证明了 PVA 膜作为酒精发酵的固定化载体的可行性和优越性。

## 参考文献:

- [1] 罗艺, 杨雪蕊, 孙达远. 固定化酵母细胞连续发酵生产酒精的研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 1996, 14(2): 119-123.
- [2] 王联结, 王子浩. 酒精酵母固相化新方法—电场吸附[J]. 工业微生物, 1989(2): 18-24.
- [3] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- [4] 蔡定域. 实用白酒分析[M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1994.
- [5] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [6] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [7] 王建龙. 生物固定化技术与水污染控制[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

南瓜多糖的提取一般采用热水浸提法<sup>[2-5]</sup>,此法操作简便,但由于水作为溶剂难以完全溶出其中的多糖物质,所以需要多次浸提,操作时间长,收率低。采用酶法提取南瓜多糖,不仅反应条件温和,而且酶具有分解细胞壁,水解纤维素、原果胶和糖蛋白的作用,因此是一种较为先进有效的提取方法<sup>[6]</sup>。本实验系统的研究了复合酶的配比及复合酶法提取南瓜多糖的最佳工艺条件,并对南瓜多糖进行分离纯化,为南瓜多糖的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

银辉一号南瓜 东北农业大学园艺学院。

### 1.2 试剂

木瓜蛋白酶 北京奥博星生物技术责任有限公司;纤维素酶(15U/mg),果胶酶(30000U/g) 上海兰季科技发展有限公司;纤维素 DE52 Whatman 公司进口分装;Sephadex CL-6B Pharmacia公司进口分装 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 复合酶法提取南瓜多糖工艺流程

南瓜果肉→烘干粉碎→南瓜粉→索氏提取除杂→复合酶法提取南瓜多糖→提取液乙醇沉淀→分别用丙酮、乙醚和无水乙醇洗涤沉淀→真空干燥→南瓜粗多糖→蒸馏水溶解→H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>脱色→透析→真空干燥→南瓜精多糖→蒸馏水溶解→DEAE-纤维素柱层析→南瓜多糖级分

#### 1.3.2 复合酶配比的确定<sup>[7]</sup>

称取1g南瓜粉经乙醚、乙醇抽提后,加入10ml pH为4.5的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液,50℃水浴振荡反应60min,以纤维素酶、果胶酶和木瓜蛋白酶的不同添加量采用L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交表设计正交试验,测提取液中总糖、还原糖含量,得出多糖含量,确定复合酶的最佳配比。

#### 1.3.3 复合酶法提取工艺的确定

在已确定的最佳复合酶配比条件下,以酶作用温度、pH值和时间因素进行L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验,测提取液中总糖、还原糖含量,得出多糖含量,确定酶法提取的最佳条件。

#### 1.3.4 南瓜多糖的分级

称取南瓜精多糖0.2g,溶于10ml 0.05mol/L pH8.0的Tris-HCl缓冲溶液中,加到事先已用0.05mol/L pH8.0的Tris-HCl缓冲溶液平衡好的DEAE-纤维素柱上,用0~1mol/L NaCl溶液进行梯度洗脱,洗脱剂流速为10ml/h,自动分部收集洗脱液(管/30min),各管用蒽酮法检测多糖。

#### 1.3.5 纯度鉴定

Sephadex CL-4B凝胶柱层析、紫外扫描和冻融分析。

#### 1.3.6 含量测定方法<sup>[8]</sup>

总糖含量:蒽酮法;还原糖含量:3,5-二硝基水杨酸比色法;多糖含量:总糖含量-还原糖含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 复合酶配比的确定

通过对纤维素酶、果胶酶和木瓜蛋白酶的单因素试验,选择了反应条件为:pH4.5的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液,50℃水浴振荡反应60min,选用因素、水平及正交试验结果见表1。

表1 正交试验结果表  
Table 1 Results of orthogonal test

次数	因素			提取率(%)
	A 温度(℃)	B pH	C 时间(min)	
1	1(40)	1(5.5)	1(30)	28.82
2	1(40)	2(4.5)	2(60)	21.23
3	1(40)	3(3.5)	3(90)	14.17
4	2(50)	1(5.5)	2(60)	3.46
5	2(50)	2(4.5)	3(90)	3.62
6	2(50)	3(3.5)	1(30)	7.02
7	3(60)	1(5.5)	3(90)	20.69
8	3(60)	2(4.5)	1(30)	12.53
9	3(60)	3(3.5)	2(60)	3.76
K <sub>1</sub>	64.22	52.97	48.37	
K <sub>2</sub>	14.10	37.38	28.45	
K <sub>3</sub>	36.98	24.95	38.48	
k <sub>1</sub>	21.407	17.657	16.123	
k <sub>2</sub>	4.70	12.460	9.483	
k <sub>3</sub>	12.327	8.317	12.827	
R	9.340	6.640	6.260	

从正交试验结果得出,三因素影响多糖提取率的大小分别为A>C>B,由试验结果确立主要影响参数为:A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>即复合酶最佳配比为:纤维素酶1%,果胶酶1.5%,木瓜蛋白酶1%。在最佳条件下,多糖提取率为18.8%。

### 2.2 复合酶法提取工艺的确定

通过复合酶配比正交试验,确定了复合酶的最佳配比为纤维素酶1%,果胶酶1.5%,木瓜蛋白酶1%。为了优化复合酶法提取工艺条件,本试验选取对提取率有较大影响的三个因素及其三个水平:提取温度(40~60℃)、作用pH值(3.5~5.5)、提取时间(30~90min)进行L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验。选用因素、水平及正交试验结果见表2。

从正交试验结果得出,三因素影响多糖提取率的大小分别为A>B>C,由试验结果确立主要影响参数为

表2 正交试验结果  
Table 2 Results of orthogonal experiment

次数	因素			提取率(%)
	A 纤维素酶(%)	B 果胶酶(%)	C 木瓜蛋白酶(%)	
1	1(0.3)	1(0.5)	1(1)	12.50
2	1(0.3)	2(1)	2(1.5)	13.41
3	1(0.3)	3(1.5)	3(2)	12.89
4	2(0.5)	1(0.5)	2(1.5)	9.72
5	2(0.5)	2(1)	3(2)	7.9
6	2(0.5)	3(1.5)	1(1)	13.37
7	3(1)	1(0.5)	3(2)	13.69
8	3(1)	2(1)	1(1)	17.81
9	3(1)	3(1.5)	2(1.5)	18.58
K <sub>1</sub>	38.80	35.91	43.68	
K <sub>2</sub>	30.99	39.12	41.71	
K <sub>3</sub>	50.08	44.84	34.48	
k <sub>1</sub>	12.933	11.970	14.560	
k <sub>2</sub>	10.330	13.040	13.903	
k <sub>3</sub>	16.693	14.947	11.493	
R	6.363	2.977	3.067	

A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>, 即复合酶反应最佳条件为: 温度 40℃, pH 值为 5.5, 反应时间为 30min。在最佳条件下, 多糖提取率为 28.8%。

### 2.3 南瓜多糖的分级

南瓜精多糖经 DEAE-纤维素柱, 用 0~1mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱, 洗脱曲线见图 1 所示。

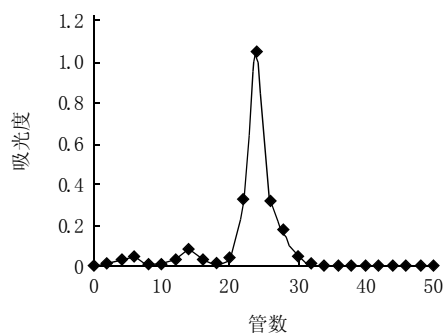


图1 南瓜多糖的 DEAE-纤维素柱层析  
Fig.1 DEAE-cellulose chromatography of pumpkin polysaccharide

图 1 表明: 南瓜多糖是由三种组分多糖 PP I、PP II、PP III 组成, 其中 PP III 含量较高, 为南瓜多糖的主要成分, 收集此组分再进行进一步分级纯化。

### 2.4 纯度鉴定

#### 2.4.1 Sepharose CL-4B 凝胶柱层析

经过 Sepharose CL-4B 凝胶柱后, PP III 得到单一对称峰, 表明 PP III 为均一组分。

#### 2.4.2 紫外扫描

将经过 Sepharose CL-4B 柱的 PP III 溶液在 190~650nm 范围内进行扫描, 在核酸(260nm)和蛋白质(280nm)的特征吸收峰处均无紫外吸收。仅在 217nm 处有明显的吸收峰, 表现为糖的吸收峰特征, 表明 PP III 为均一组分。紫外扫描图谱见图 2。

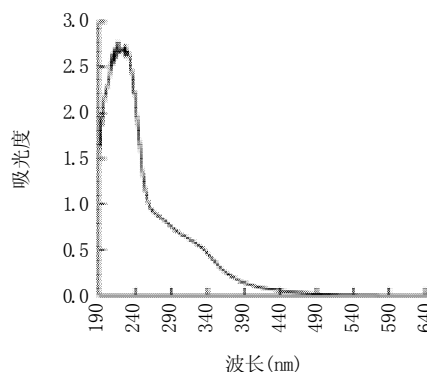


图2 PP III 的紫外扫描图谱  
Fig.2 Ultraviolet scan spectrum of PP III

### 2.4.3 冻融分析

将多糖溶液冷冻过夜, 而后室温融化, 10000r/min 离心 20min 后发现离心管底部无沉淀产生, 多糖溶液仍为均一淡黄色透明液体, 说明 PP III 为均一组分。

## 3 结论

本研究确定了复合酶的最佳配比为纤维素酶 1%, 果胶酶 1.5%, 木瓜蛋白酶 1%; 复合酶的最佳反应条件为温度 40℃, pH 值为 5.5, 反应时间为 30min。南瓜粗多糖经脱色、透析后, 上 DEAE-纤维素柱层析, 得到 3 种级分。主要级分 PP III 为均一组分。

### 参考文献:

- [1] 王洪伟, 徐雅琴. 南瓜功能成分研究进展[J]. 食品与机械, 2004(4): 55-57.
- [2] 张拥军, 姚惠源, 龚院生, 等. 南瓜多糖的分离提取及其降血糖作用的研究[J]. 食品科技, 2001(5): 15-18.
- [3] 张拥军, 姚惠源. 两种不同品种的南瓜多糖降糖效果研究[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 118-120.
- [4] 张拥军, 姚惠源. 南瓜多糖的分离、纯化及其降血糖作用[J]. 中国粮油学报, 2002, 17(4): 59-62.
- [5] 左耀明, 叶士伶, 万小兰, 等. 南瓜多糖的提取、分析和降血糖试验研究[J]. 食品科学, 2001, 22(12): 56-58.
- [6] 沈爱英, 谷文英. 复合酶法提取姬松茸子实体多糖的研究[J]. 食用菌, 2001(3): 7-9.
- [7] 林学政, 沈继红, 李光友. 复合酶对卡德藻溶壁效果的研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(7): 1-3.
- [8] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.