

笃斯越桔叶片多糖提取工艺的优化研究

张 巍, 林松毅, 刘静波*, 刘艳丰

(吉林大学军需科技学院营养与功能食品研究室, 吉林 长春 130062)

摘 要: 为了开发利用长白山野生笃斯越桔资源, 本实验以笃斯越桔叶片为实验材料, 以多糖为研究对象, 通过对比分析和 $L_9(3^4)$ 正交试验设计等研究方法, 重点考察不同浸提时间、浸提温度、浸提固液比、浸提次数对笃斯越桔叶片多糖提取率的影响。结果表明, 影响笃斯越桔叶片多糖提取率因素的主次关系依次是温度>料液比>浸提时间; 最佳提取工艺条件为 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, 浸提时间4h, 固液比1:30, 浸提2次, 多糖提取率可达12.46%。

关键词: 笃斯越桔; 叶片; 多糖; 提取工艺

Study on Extraction Technology of Polysaccharide from Leaves of *Vaccinium uliginosum* L.

ZHANG Wei, LIN Song-yi, LIU Jing-bo*, LIU Yan-feng

(Laboratory of Nutrition and Functional Food, College of Quartermaster Technology, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: In order to develop the resources of Changbai Mountain thoroughly, extraction the polysaccharides in the *Vaccinium uliginosum* L. was studied in the present paper. Through a comparison analysis and $L_9(3^4)$ orthogonal design, the extracting time, temperature, ratio of solid to liquid and the times were investigated respectively. The results indicated that the temperature was very significant and then the ratio of solid to liquid, the extracting time. The optimal conditions in the extracting procession were as follow: temperature $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, extracting time 4h, ratio of solid to liquid 1:30 and extracting times 2. On the optimal conditions

收稿日期 2007-09-01

*通讯作者

基金项目: 吉林省科技厅应用基础研究项目(20050567)

作者简介: 张巍(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与功能食品。

生新的可能为一COO-的基团, 由于其亲水性, 一定程度上可以解释前面球磨使茯苓碱溶性多糖溶解率增加的原因。

3 结 论

通过单因素和正交试验得出茯苓碱溶性多糖最佳提取工艺条件为: 提取温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 碱提浓度 0.75mol/L , 提取时间8h, 料液比1:40; 干燥茯苓菌核中碱溶性多糖含量最高, 达84%, 茯苓边角料如茯苓皮中的多糖含量亦比较高, 达到61.2%, 今后从成本和原料的综合利用方面来考虑可以综合利用茯苓加工中的边角料; 茯苓菌核和茯苓边角料中提取的碱溶性茯苓多糖经傅立叶红外扫描初步鉴定, 都具有多糖的特征吸收峰, 均为 β -吡喃型糖苷键连接, 几种多糖的结构相似性很强, 有个别吸收峰不同, 这可能与所制备的多糖样品纯度有关。

利用球磨和胶体磨超微处理茯苓粉及茯苓多糖粉后, 经红外扫描图谱鉴定, 茯苓多糖红外吸收发生变化, 多糖溶出率增加, 这有利于提高茯苓在食品中的

加工性能, 但宏观理化性质有待进一步提高。

参考文献:

- [1] 付玲, 于淼. 茯苓研究的新进展[J]. 新疆中医药, 2005, 23(3): 79-83.
- [2] 张俐娜, 丁琼, 张平义, 等. 茯苓菌核多糖的分离和结构分析[J]. 高等学校化学学报, 1997, 18(6): 990-993.
- [3] 丁琼, 张俐娜, 张志强. 茯苓菌丝体多糖的分离及结构析[J]. 高分子学报, 2000(2): 224-227.
- [4] 纪芳, 李鹏飞, 徐胜元, 等. 羧甲基茯苓多糖的制备及体内抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(6): 333-334.
- [5] 赵吉福, 么雅娟, 陈英杰, 等. 磺酰化新茯苓多糖的制备及抗肿瘤作用[J]. 沈阳药科大学学报, 1996, 13(2): 125-128.
- [6] 黄才欢. 茯苓多糖的提取方法及其改性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2002.
- [7] 郭振楚. 糖类化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 64.
- [8] 周燕霞, 唐明林, 殷辉安, 等. 茯苓多糖的提取及含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(3): 332-333.
- [9] 严衍禄. 现代仪器分析[M]. 2版. 北京: 北京农业出版社, 1995: 105.
- [10] 邓霄. 辐照法魔芋葡聚糖丙烯酸改性及改性产物性能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [11] 张立德, 牟季美. 纳米材料和纳米结构[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 140-144.

the extracting rate of polysaccharides could approach to 12.46%.

Key words *Vaccinium uliginosum* L.; leaves polysaccharides extraction technology

中图分类号: Q946.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0283-04

近年研究表明多种植物多糖在肿瘤、肝炎、心血管、抗衰老等方面具有重要的生理功能^[1], 各国学者竞相从各种生物材料中寻找和提取具有生理活性的多糖物质^[2]。野生笃斯越桔在吉林省长白山地区分布极广、产量大、资源丰富^[3], 但对其进行多糖、花青素、熊果甙等功能因子提取技术研究的还不多, 因此, 开展对笃斯越桔中的活性多糖等多种功能因子的提取技术研究具有重要的现实意义和良好的应用前景, 同时也将为长白山野生笃斯越桔的合理利用和开发提供一定的理论依据和研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

长白山野生笃斯越桔 吉林大学军需科技学院营养与功能食品研究室。

无水乙醇、苯酚、浓硫酸、丙酮、葡萄糖、氯仿、正丁醇 均为国产分析纯。

AG204 型电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司; 超纯水机: MILLIPORE 牌 美国 Millipore 公司; BUCHI R-250 旋转蒸发仪 瑞士布奇公司; 752pc 紫外分光光度计 上海光谱仪器有限公司; R501 电热恒温水浴锅 巩义市英峪仪器厂; SHZ-D(III) 循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司; 101-3-S 电热恒温鼓风干燥箱 上海跃进医疗器械厂。

1.2 多糖含量测定方法

多糖得率以总糖含量作为指标, 多糖含量的分析方法糖含量测定以葡萄糖为标准品, 采用苯酚-硫酸法进行测定^[4]。

1.2.1 笃斯越桔叶片多糖最大吸收波长的检测

精密吸取 1mg/ml 的葡萄糖标准液 10ml, 用蒸馏水定容至 100ml, 取 2ml 放于干燥的 10ml 具塞试管中, 再依次加入 1ml 5% 的苯酚溶液和 5ml 浓 H₂SO₄, 摇匀, 100℃ 水浴加热 15min 取出放至室温。在 400~800nm 进行慢速扫描获得图谱。

1.2.2 标准曲线的绘制

精密吸取浓度为 0.1mg/ml 的葡萄糖对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2ml, 分别置于 25ml 比色管中, 依次加水使最终体积为 2ml, 同时吸取 2ml 水于 25ml 比色管中作空白对照, 分别加入 5% 苯酚 1ml, 摇均, 迅速加入浓硫酸 5ml, 混均放入沸水与加热 15min, 取出流水速冷至室温, 于 490nm 波长处测光密度吸光度

(OD), 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标(C), 绘制标准曲线。

1.2.3 多糖含量分析及得率计算

称取干燥至恒重的多糖样品适量测其吸光度。根据标准曲线计算样品中粗多糖含量^[5], 笃斯越桔叶片中的多糖得率计算公式为:

$$\text{笃斯越桔叶片中的多糖得率(\%)} = \frac{\text{多糖含量}}{\text{样品干重}} \times 100$$

1.3 提取笃斯越桔叶片多糖的研究方法

1.3.1 笃斯越桔叶片多糖提取工艺流程与操作要点

笃斯越桔叶片 → 粉碎 → 乙醇浸提 → 过滤 → 干燥 → 热水浸提 → 过滤 → 滤液浓缩 → 醇沉 → 过滤 → 滤渣干燥 → 多糖

操作要点: 取过 40 目筛的笃斯越桔叶片粉末若干克, 置圆底烧瓶中, 用 80% 乙醇回流 1h, 过滤。滤渣置圆底烧瓶中, 加蒸馏水若干, 回流提取, 趁热过滤, 减压浓缩至 150ml, 加 1% 活性炭脱色, 过滤, 加入 95% 乙醇使溶液含醇 80%, 静置过夜, 过滤, 沉淀物以无水乙醇、丙酮依次洗涤 8 次, 每次 20ml, 得到总多糖组分, 以 60℃ 烘干备用。

1.3.2 浸提时间对笃斯越桔叶片多糖得率的影响

在料液比为 1:100, 浸提温度为 90℃, 浸提 1 次, 对比分析浸提时间依次为 1、2、3、4、5、6h 六种实验条件下笃斯越桔叶片多糖得率, 以确定适宜的浸提时间范围。由于浸提时间太长, 可能引起了糖结构的变化和破坏, 致使其中的五碳环或六碳环裂解, 导致多糖的含量下降^[6], 因此, 重点分析六种实验条件下笃斯越桔叶片多糖得率还将为深入研究笃斯越桔叶片多糖生理活性奠定研究基础。

1.3.3 浸提温度对笃斯越桔叶片多糖得率的影响

在料液比为 1:100, 浸提温度为 90℃, 浸提 1 次, 对比分析浸提温度依次为 60、70、80、90、100℃ 五种实验条件下笃斯越桔叶片多糖得率, 以确定适宜的浸提温度范围。多糖得率在提取温度在 80℃ 以上呈下滑趋势是因为在一定的温度范围之内, 较高的温度易于使细胞壁破碎而使活性多糖溶出^[7]。本实验也将为深入研究笃斯越桔叶片多糖生理活性奠定研究基础。

1.3.4 料液比对笃斯越桔叶片多糖得率的影响

在浸提温度为 90℃, 浸提 1 次, 适宜浸提温度和浸提温度下, 对比分析料液比为 1:20、1:30、1:40、

1:50、1:100 五种实验条件下笃斯越桔叶片多糖得率, 以确定适宜的浸提料液比。

1.3.5 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案

根据提取笃斯越桔叶片多糖的单因素试验结果, 利用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案(如表 1 所示)考察浸提时间为 3、4、5 h, 浸提温度为 70、80、90℃, 浸提料液比(叶片与水质量比)为 1:20、1:30、1:40, 以优化出笃斯越桔叶片多糖最佳浸提参数。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计因素水平表
Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

因素	水平		
	A	B	C
	浸提时间(h)	浸提温度(℃)	浸提料液比
1	3	70	1:20
2	4	80	1:30
3	5	90	1:40

1.3.6 浸提次数对笃斯越桔叶片多糖得率的影响

在最佳浸提时间、浸提温度和料液比确定后, 研究浸提次数对多糖得率的影响, 浸提 1~4 次, 选择最佳的浸提次数。

2 结果与分析

2.1 笃斯越桔叶片多糖最大吸收波长的检测

在 400~700nm 进行慢速扫描获得笃斯越桔叶片多糖图谱如图 1 所示, 其最大吸收波长为 490nm。

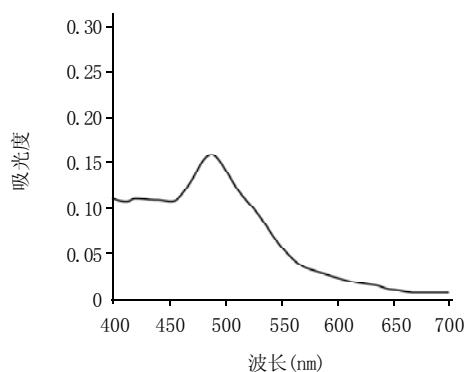


图 1 笃斯越桔叶片多糖扫描图谱

Fig.1 Scanogram of polysaccharides in leaves of *Vaccinium uliginosum* L.

2.2 多糖含量测定的标准曲线

490 nm 波长处测光密度吸光度(A), 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标(C), 绘制标准曲线如图 2 所示。其回归方程: $A=0.0137C+0.0111$, $R=0.99902$, 线性关系良好。

2.3 浸提时间对笃斯越桔叶片多糖得率的影响程度分析

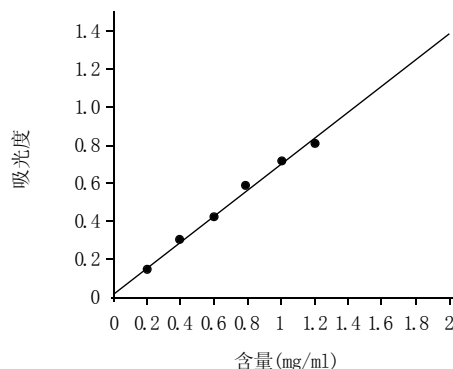


图 2 多糖测定含量标准曲线

Fig.2 Standard curve of polysaccharides

浸提时间对笃斯越桔叶片多糖得率的影响程度分析如图 3 所示。随着时间的延长, 多糖得率逐渐增大。在 4 h 后, 多糖得率开始缓慢下滑, 从生产周期及耗能等方面考虑, 浸提时间选择 4 h 为宜。

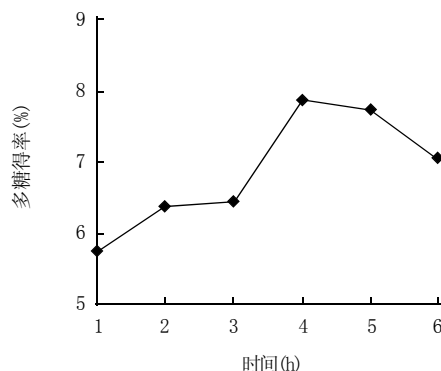


图 3 浸提时间单因素曲线

Fig.3 Effects of extracting time on polysaccharide yield

2.4 浸提温度对笃斯越桔叶片多糖得率的影响程度分析

浸提温度对笃斯越桔叶片多糖得率的影响程度分析如图 4 所示。随着温度的升高, 多糖得率逐渐增大。在 80℃后, 多糖得率呈下滑趋势。但温度过高或过低均对产率有不利影响, 温度太低不利于多糖的溶出, 而

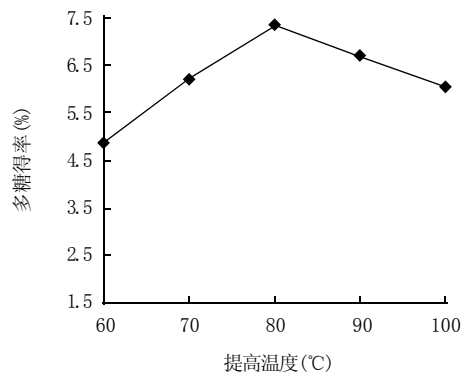


图 4 浸提温度单因素曲线

Fig.4 Effects of extracting temperature on polysaccharide yield

温度过高则会使多糖降解严重,从而影响得率及品质。因此,浸提温度选择80℃为宜。

2.5 料液比对笃斯越桔叶片多糖得率的影响程度分析

料液比对笃斯越桔叶片多糖得率的影响程度分析由图5可见,在料液比达到1:40后,多糖得率不再有明显上升趋势。加水量增多会加大后期工序中的浓缩负担,而且料液比太高会增加乙醇用量,因此,料液比选择1:40为宜。

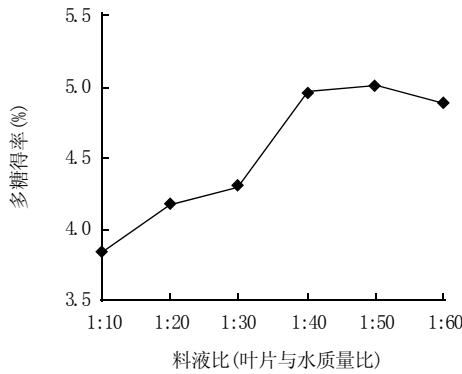


图5 料液比单因素曲线
Fig.5 Effects of ratio of solid to liquid on polysaccharide yield

2.6 L₉(3⁴) 正交试验结果与分析

L₉(3⁴) 正交试验结果见表2, 方差分析结果如表3所示。从表2、3中试验结果分析和方差分析知三个考察因素中, 浸提温度对多糖得率具有显著性影响(α=0.05), 主次顺序如下: B(浸提温度) > C(料液比) > A(浸提时间), 得出最优方案为A₂B₃C₂, 即浸提时间为4h, 温度为90℃, 料液比为1:30。由于此组合未出现在试验方案中, 经三次验证实验后多糖得率平均为11.03%。

2.7 浸提次数对笃斯越桔叶片多糖得率的影响程度分析

浸提次数对笃斯越桔叶片多糖得率的影响程度分析

表2 正交设计试验结果与分析
Table 2 Results of orthogonal test and analysis

试验号	因素			多糖得率 (%)
	A 浸提时间(h)	B 浸提温度(℃)	C 浸提料液比	
1	1	1	1	3.74
2	1	2	2	7.6
3	1	3	3	9.8
4	2	1	2	7.82
5	2	2	3	5.64
6	2	3	1	9.22
7	3	1	3	6.4
8	3	2	1	4.61
9	3	3	2	10.79
K ₁	7.047	5.987	5.857	
K ₂	7.560	5.950	8.737	
K ₃	7.267	9.937	7.280	
R	0.513	3.987	2.880	

表3 方差分析表
Table 3 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	0.398	2	0.247	19.000	
B	31.497	2	19.515	19.000	*
C	12.442	2	7.709	19.000	
误差	1.61	2			

如图6所示。提取次数越多,提取率越高,浸提1次和浸提2次相比较,提取率有明显差别,浸提次数再继续增加至3次和4次时,提取率的增加程度越来越小。浸提取次数增多,成本迅速增加,因此实际生产中,浸提次数选则2次为宜,多糖提取率可达12.46%。

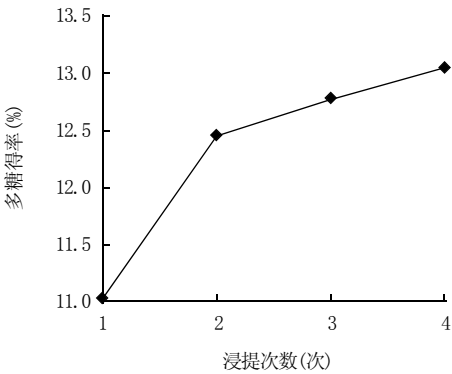


图6 浸提次数曲线
Fig.6 Effects of extracting times on polysaccharides yield

3 结 论

通过对比分析和L₉(3⁴) 正交试验设计等研究方法, 优化出笃斯越桔叶片多糖最佳提取工艺条件为浸提温度90℃, 浸提4h, 固液比1:30, 浸提2次, 多糖提取率可达12.46%。本研究为笃斯越桔叶片多糖纯化技术和抗肿瘤活性评价等研究奠定研究基础, 也为广泛开发长白山野生笃斯越桔资源系列多功能因子及其保健食品做出技术铺垫。

参考文献:

[1] 尹源明, 何国庆, 郑晓东, 等. 大麦中活性多糖的提取[J]. 中国粮油学报, 2002, 17(1): 43-44.
[2] 陈晓青, 蒋新宇, 刘佳佳. 中草药成分分离分析技术与方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 206.
[3] 张欣. 黑龙江省野生浆果资源——笃斯越桔[J]. 中国野生植物资源, 1997(3): 23-29.
[4] 林勤保, 高大维, 于淑娟, 等. 大枣多糖的分离和纯化[J]. 食品工业科技, 1998(4): 20-21.
[5] 朱丹, 牛广财, 孟宪军. 马齿苋多糖的提取[J]. 中国农学通报, 2006, 22(8): 119-122.
[6] 罗立新, 姚汝华, 周少奇. 灵芝多糖的分离与纯化[J]. 食品工业科技, 1998(3): 4-7.
[7] 刘金福, 张平平, 赵鑫. 苦瓜多糖提取工艺的研究[J]. 天津农学院学报, 2003, 10(3): 30-33.