

# 慈竹竹叶多糖的提取及纯化工艺

郭磊, 阚欢, 范方宇, 刘云, 姜金艳, 沈雪静

(西南林业大学, 云南 昆明 650224)

**摘要:**以水为溶剂,以提取时间、温度和料液比 3 个因素作为研究对象,以多糖提取量为评价指标,在单因素的基础上,通过三因素三水平的 Box-Behnken 响应面分析法研究了优化多糖的提取工艺条件。结果表明:最优提取条件为提取时间 1.43 h、温度 76.8℃、料液比 1:80.3,在此条件下,多糖得率可达到 4.11 mg/g。提取液经一系列纯化工艺后,得到纯度为 61.32% 多糖。

**关键词:**慈竹;多糖;响应面;脱色;纯化

**中图分类号:**S 795.5 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)02-0167-05

慈竹(*Neosinocalamns affinis* (Rendle) Keng f.) 属于禾本科慈竹属(*Neosinocalamus* Keng f.), 为地下茎合轴丛生型,广泛地分布于地球的北纬 46°至南纬 47°之间的热带、亚热带和暖温带地区。它是我国西南地区栽培较广、用途较大、经济价值较高的材用竹种。秆高一般 10~15 m,最高 20 m,胸径一般 4~6 cm,最粗 11 cm,节间长一般 5~50 cm,最长 130 cm。其材质柔软、纤维长度大、纤维长宽比较大,分子聚合度相对较高,且其产量高,是优秀的制浆造纸、竹纤维和竹编胶合板用竹<sup>[1]</sup>。

多糖又称多聚糖(Polysaccharide),是由单糖缩合成的多聚物,广泛分布于自然界中,是一类重要的活性物质。植物多糖具有广泛的药理作用,参与机体各种生理代谢,具有调节机体免疫功能、抑制肿瘤、抗衰老、抗病毒、降血脂、降血糖、抗氧化等多种生物活性<sup>[2]</sup>。近年来,经研究发现,竹叶中含有大量对人体有益的活性物质,包括黄酮酚酸类、生物活性多糖、氨基酸肽类、萜类、萜类内酯等<sup>[3-5]</sup>,其中如酚酸类化合物、萜类化合物、萜类内酯和生物碱等都拥有着较强的抑菌、杀菌作用<sup>[6-8]</sup>。

常见的多糖提取方法有热水浸提法、碱浸提法、酸浸提法、盐溶液提取法、酶法等。考虑工业化大规模生产的需要,用水提法成本较低。

云南作为竹类资源大省,以丛生竹类为主的竹叶资源极为丰富,研究和开发此项资源意义重大。该研究以水为溶剂,在单因素试验的基础上,利用响应面分析法(Response surface methodology, RSM)对慈竹竹叶多糖的提取工艺进行优化,并得出最佳的工艺条件,为慈竹竹叶多糖的开发利用提供试验基础和数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

慈竹竹叶(采自西南林业大学校园内);葡萄糖,浓硫酸,蒽酮,石油醚,氯仿,正丁醇,氢氧化钠,盐酸,以上均为分析纯;大孔吸附树脂。超微粉碎机(弘荃机械企业有限公司);LabTechUV 1000/1100 紫外分光光度计(北京博泰科仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化公司);BCD-196E/B 海尔冰箱(海尔青岛股份有限公司);HH-2 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);SIGMA 3K15 离心机(上海创萌生物科技有限公司)。

### 1.2 工艺流程

慈竹竹叶→预处理→提取→过滤→浓缩→醇沉→离心分离→脱脂→脱蛋白→大孔树脂脱色→干燥→成品。

### 1.3 试验方法

1.3.1 慈竹竹叶的处理 新鲜慈竹竹叶在 55℃烘箱内干燥 24 h 左右,用超微粉碎机充分粉碎,将所得的竹叶粉装入保鲜袋内并放在干燥器内备用。

1.3.2 慈竹竹叶多糖提取单因素试验设计 以多糖提取量为指标,研究不同的提取时间、温度、料液比对多糖提取效果的影响。

1.3.3 响应面试验设计 根据单因素的试验结果,根据 Box-Behnken 试验设计原理,采用三因素三水平的响应曲面分析方法,试验因素与水平设计见表 1。共 17 个试验点,其中 12 个为析因点,5 个为中心点。

表 1 因素水平

水平	因素		
	X <sub>1</sub> 提取时间/h	X <sub>2</sub> 温度/℃	X <sub>3</sub> 料液比/mL·g <sup>-1</sup>
-1	0.5	65	1:65
0	1.5	75	1:75
1	2.5	85	1:85

**第一作者简介:**郭磊(1981-),男,河南卢氏人,硕士,讲师,研究方向为食品资源开发及利用。E-mail:guoleigift.student@sina.com。

**基金项目:**西南林业大学校级科研专项资助项目(110959)。

**收稿日期:**2011-10-31

## 1.4 指标测定

1.4.1 葡萄糖标准曲线的制作参照文献[9]。

1.4.2 多糖提取量计算 采用蒽酮-硫酸法<sup>[10]</sup>,慈竹竹叶多糖含量(mg/g)=提取液多糖含量/慈竹竹叶质量×总体积。

1.4.3 醇沉 慈竹竹叶多糖提取液经浓缩后,加入3倍体积的95%乙醇,置于4℃下放置一夜,在4 000 r/min离心15 min,取沉淀。

1.4.4 脱脂 沉淀物用石油醚重复洗涤多次,脱脂,再放在50℃下烘箱得到含杂质的粗多糖。

1.4.5 脱蛋白 采用Sevage法<sup>[11]</sup>。

1.4.6 脱色及脱色率 将处理好的大孔吸附树脂放入层析管中,注意填充时不能太快,也不能太慢,填充好后,将粗多糖溶液加入层析管中,进行层析。反复多次以后,观察颜色的变化,在378 nm波长下比色测定吸光值,并计算脱色率。脱色率(%)=(脱色前多糖液的光密度值-脱色后多糖液的光密度值)/脱色前多糖的光密度值×100%。

1.4.7 多糖纯度的测定 取一定体积的慈竹竹叶多糖提取液,进行浓缩,3倍体积95%乙醇沉淀、离心、回收乙醇,沉淀用石油醚洗涤后于50℃下真空干燥,干燥物称重后蒸馏水复溶,测定多糖含量,计算多糖纯度<sup>[12]</sup>。慈竹竹叶多糖纯度(%)=纯化后多糖含量/纯化后多糖的总质量×100%。

## 1.5 数据分析

采用F检验对试验数据进行方差分析以评价模型的统计意义,数据分析软件采用Design Expert 6.0.5。

## 2 结果与分析

## 2.1 葡萄糖标准曲线

葡萄糖标准曲线见图1。通过在620 nm波长下测定吸光度,以吸光度为横坐标,以葡萄糖溶液浓度为纵坐标,绘制出葡萄糖标准曲线后,得到葡萄糖标准曲线的回归方程为: $[C]=([Abs]+0.0098)/6.3743$ ,  $R^2=0.9986$ 。

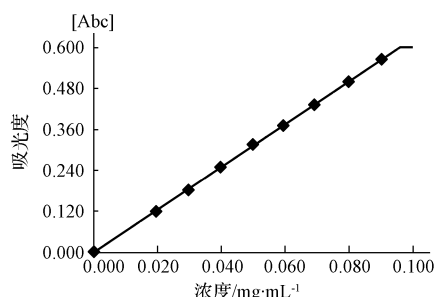


图1 葡萄糖标准曲线

## 2.2 慈竹竹叶多糖提取的单因素分析

2.2.1 提取时间对慈竹竹叶多糖提取量的影响 称取10.0 g 竹叶,以水为溶剂,料液比为1:40,提取温度为

70℃,分别设定时间0.5、1、1.5、2、2.5、3 h,各提取时间慈竹竹叶多糖的提取量见图2。随着提取时间的延长,多糖提取量先增大后减小。当提取时间为1.5 h时多糖提取量出现最大值,随提取时间延长,由于糖苷键裂解导致多糖提取量降低。因此确定提取时间取1.5 h为最佳。

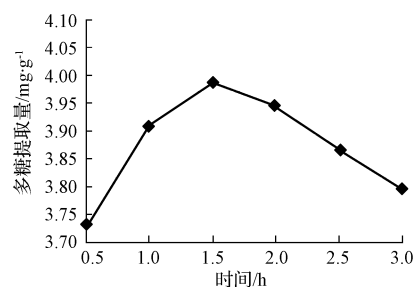


图2 时间对多糖提取量的影响

2.2.2 提取温度对慈竹竹叶多糖提取量的影响 称取10.0 g 竹叶,以水为溶剂,料液比为1:40,提取时间为1.5 h,分别设定温度65、70、75、80、85、90℃,各温度下慈竹竹叶多糖提取量的结果见图3。随着提取温度的升高,多糖提取量先增大后减小。当提取温度为75℃时,多糖得率出现最大值,随着温度的继续升高,糖苷键裂解,多糖分解,提取量呈现了下降趋势。因此确定提取温度75℃为最佳。

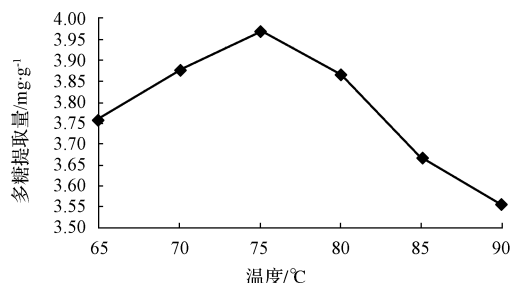


图3 温度对多糖提取量的影响

2.2.3 料液比对慈竹竹叶多糖提取量的影响 称取10.0 g 竹叶,以水为溶剂,提取时间为1.5 h,温度为75℃,分别设定料液比1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90,各料液比下慈竹竹叶多糖的提取量见图4。随着料液比的增大,多糖提取量先升高后平缓。当料液比为1:75时,多糖得率增长幅度达到最大,随着料液比的继续增长,多糖得率增长趋于平缓。实际生产中,考虑经济成本料液比取1:75为最佳。

## 2.3 慈竹竹叶多糖提取的响应面分析

2.3.1 多元二次模型方程的建立及检验 利用Design Expert 6.0.5 统计软件,通过逐步回归对表1 试验数据进行回归拟合,试验设计及结果见表2。慈竹竹叶多糖提取的响应面分析试验根据Box-Behnken 设计进行了17 组试验,其中5 组中心点重复试验,结果见表2。根据

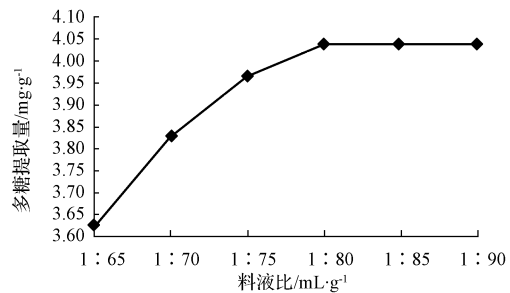


图4 料液比对多糖提取量的影响

Design Expert 6.0.5 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合,得到慈竹竹叶多糖提取回归方程: $Y=4.01-0.018X_1+0.02X_2+0.29X_3-0.12X_1^2-0.099X_2^2-0.18X_3^2+0.048X_1X_2+0.05X_1X_3+7.75E-003X_2X_3$ 。对该模型进行方差分析,由表 3 可知,该试验所选用的二次多项模型具有高度的显著性<sup>[13]</sup>,失拟项在  $\alpha=0.05$  水平上不显著( $P=0.2922>0.05$ ),其决定系数为 0.9701,校正决定系数为 0.9317,说明该模型能解释 93.17%相应值的变化,仅有总变异的 6.83%不能用此模型来解释,说明该模型拟合程度良好,用该模型对慈竹竹叶多糖的提取过程进行优化是合适的。对回归方程的回归系数显著性检验见表 4,试验中  $X_3$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$  和  $X_3^2$  这几个因素对多糖提取量的影响显著,表明在慈竹竹叶多糖的提取过程中,料液比对提取量有显著影响。

表 2 Box-Behnken 试验设计及其试验结果

序号	$X_1$ 提取时间/h	$X_2$ 温度/℃	$X_3$ 料液比/mL·g <sup>-1</sup>	多糖提取量/mg·kg <sup>-1</sup>	
				试验值	预测值
1	-1	-1	0	3.77	3.83
2	1	-1	0	3.71	3.70
3	-1	1	0	3.76	3.77
4	1	1	0	3.90	3.83
5	-1	0	-1	3.50	3.48
6	1	0	-1	3.29	3.34
7	-1	0	1	4.01	3.96
8	1	0	1	4.00	4.02
9	0	-1	-1	3.46	3.42
10	0	1	-1	3.43	3.45
11	0	-1	1	4.01	3.99
12	0	1	1	4.01	4.05
13	0	0	0	4.01	4.01
14	0	0	0	3.98	4.01
15	0	0	0	4.04	4.01
16	0	0	0	4.08	4.01
17	0	0	0	3.93	4.01

表 3 二次多项模型方差分析

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F
总模型	0.980	9	0.11	25.25	0.0002
失拟项	0.017	3	5.745E-003	1.77	0.2922
误差项	0.013	4	3.252E-003		
总和	1.010	16		$R^2=0.9701$	$R^2_{adj}=0.9317$

表 4 回归方程系数显著性检验

系数来源	回归系数	标准差	F 值	Prob>F
总模型	4.01	0.029	25.25	0.0002
$X_1$	-0.018	0.023	0.60	0.4639
$X_2$	0.020	0.023	0.72	0.4235
$X_3$	0.29	0.023	158.43	<0.0001
$X_1^2$	-0.12	0.032	15.17	0.0059
$X_2^2$	-0.099	0.032	9.51	0.0177
$X_3^2$	-0.18	0.032	32.20	0.0008
$X_1X_2$	0.048	0.033	2.16	0.1855
$X_1X_3$	0.050	0.033	2.19	0.1738
$X_2X_3$	7.750E-003	0.033	0.056	0.8203

2.3.2 响应面分析与优化 通过上述二次多项回归方程所做的响应曲面图及其等高线图见图 5~7。通过该组动态图即可对任何 2 个因素交互影响多糖提取量效应进行分析与评价,并从中确定最佳因素范围。等高线的形状反映出交互作用的强弱大小,圆形表示 2 个因素交互作用不显著,而椭圆形则与之相反。图 5~7 分别显示了提取时间和温度、提取时间和料液比、温度与料液比对慈竹竹叶多糖提取量的交互影响效应。从其等高线图可以直观的看出这些交互作用均不显著。根据 Box-Behnken 试验所得的结果和二次多项回归方程,利用 Design Expert 软件获得了多糖提取量最高时的各个因素的最佳提取条件为提取时间 1.43 h、温度 76.8℃、料液比 1:80.3,在此提取条件下,多糖提取量为 4.11 mg/g。

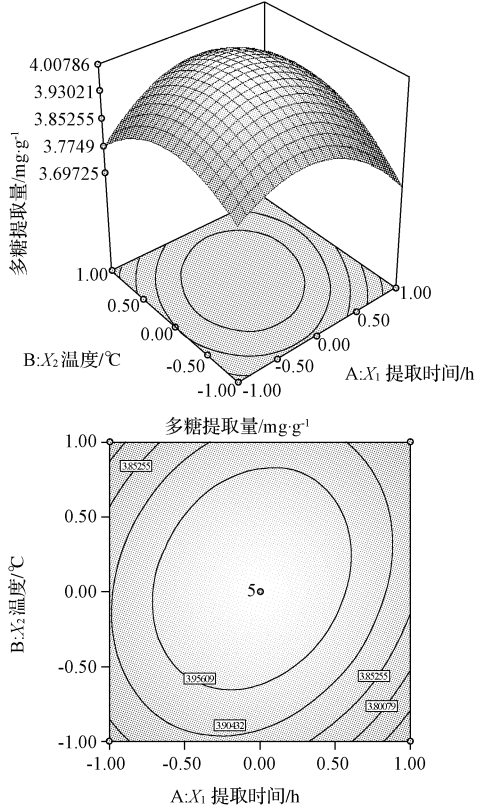


图 5 提取时间和温度交互影响多糖得率的曲面图及其等高线图



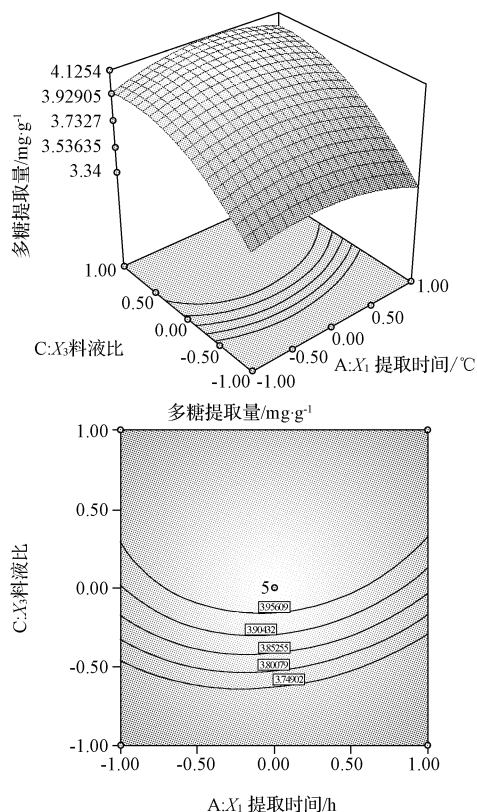


图6 提取时间和料液比交互影响多糖得率的曲面图及其等高线图

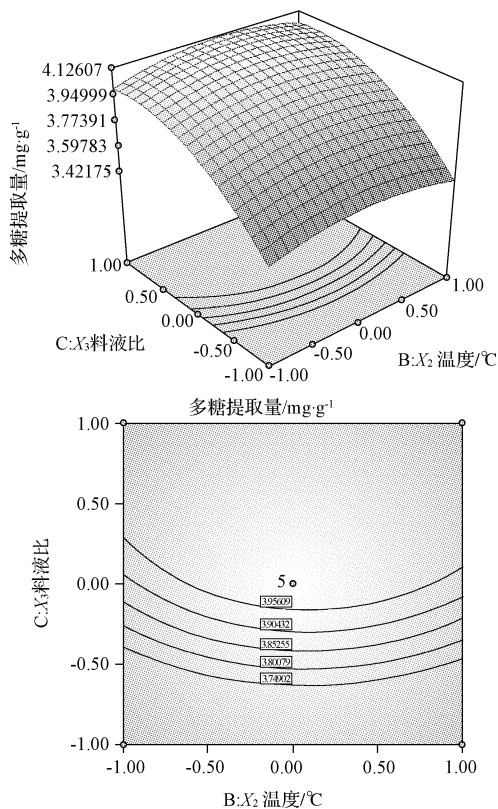


图7 温度和料液比交互影响多糖得率的曲面图及其等高线图

2.3.3 模型验证试验 为了检验模型预测的准确性,在最佳提取条件下进行多糖的提取,做3组平行试验所得结果分别为4.08、4.13、3.91 mg/g,可见该模型能够较好的预测实际提取情况。

2.3.4 多糖的脱色率 慈竹竹叶多糖提取液经过醇沉、离心分离、脱脂、脱蛋白、树脂脱色后,根据公式计算得慈竹竹叶多糖的脱色率为86.43%。

2.3.5 多糖纯度 多糖提取液经过纯化工艺后,根据公式计算得出慈竹竹叶多糖的纯度为61.32%。

### 3 结论与讨论

该研究在单因素的基础上,以慈竹竹叶多糖的提取量为指标,通过三因素三水平的响应面分析法对多糖的提取工艺进行了优化,得到最佳的提取条件为提取时间1.43 h、温度76.8℃、料液比1:80.3,在此提取条件下,多糖提取量为4.11 mg/g。试验证明,响应面分析法可以有效的优化慈竹竹叶多糖的提取工艺条件,对工业化生产具有一定的指导意义。并且慈竹竹叶多糖提取液经过一系列纯化工艺后,计算得到慈竹竹叶多糖的脱色率为86.43%;纯度为61.32%。

用Savage法除去蛋白质的变性胶状物时,不可避免溶有少量多糖,造成多糖损失。综合考虑蛋白质脱除率及多糖损失率,用Savage法脱蛋白应操作2次。

该研究采用大孔吸附树脂为吸附剂,使得多糖保留率相对其它脱色方法较高,并可回收利用,且不污染环境。

### 参考文献

- [1] 夏登云,项艳,卞林玲,等. 慈竹种子胚的组织培养[J]. 竹子研究汇刊,2009,28(1):12-15.
- [2] 申利红,王建森,李雅,等. 植物多糖的研究及应用进展[J]. 中国农学通报,2011,27(2):349-352.
- [3] 李洪玉,孙静芸. 竹叶化学成分研究[J]. 中药材,2003,26(8):562-563.
- [4] 罗金岳,陈小燕. 从箬竹叶中提取茶多酚的研究[J]. 林产化工通讯,2003,37(6):15-19.
- [5] 冯涛,曹东旭. 竹叶总黄酮含量的测定[J]. 中国食品添加剂,2002(6):85-87.
- [6] 杨兰,白勇. 竹叶中黄酮类化合物的研究[J]. 食品研究与开发,2002,23(5):23-25.
- [7] 吴传茂,吴周和,曾莹. 从植物中提取天然防腐剂的[J]. 食品科学,2000,21(9):24-27.
- [8] 黄文,王益. 竹叶提取物抑菌特性的研究[J]. 林产化学与工业,2002,22(1):68-70.
- [9] 高梦祥,吴守程. 微波技术提取竹叶多糖的研究[J]. 陕西农业科学,2006(3):22-24.
- [10] 杨辉. 蒽酮-硫酸比色法测定玉竹多糖含量的研究[J]. 安徽医药,2006,10(8):587.
- [11] 方积年. 多糖的分离纯化及其纯度鉴别、分子量测定[J]. 药学通报,1984,19:622-625.
- [12] 郑渊月. 毛竹叶活性多糖、类黄酮的中试提取及分离纯化研究[D]. 南昌:南昌大学,2006.
- [13] Box G P, Behnken D W. Some new three level design for the study of quantitative variables [J]. Technometrics, 1960(2):456-475.

# 硅窗气调保鲜落葵及其品质变化

李建芳<sup>1</sup>, 周 枫<sup>1</sup>, 张江萍<sup>2</sup>

(1. 信阳农业高等专科学校 食品科学系, 河南 信阳 464000; 2. 山西林业职业技术学院 园艺系, 山西 太原 030009)

**摘 要:**采用硅窗气调薄膜贮藏落葵, 研究在贮藏期间其质量的变化, 并确定出落葵最佳硅窗气调保鲜条件。结果表明: 低温可以有效地控制落葵中水分、维生素 C 的损失及抑制 POD 的活性。 $(3\pm 1)^{\circ}\text{C}$  是落葵最佳的硅窗气调贮藏温度; 湿度控制在 90%~95%, 并要求硅窗面积在  $1.0\text{ cm}^2$  以上, 可以较好地贮藏保鲜落葵。

**关键词:**落葵; 硅窗气调薄膜; 品质

**中图分类号:**S 636.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)02-0171-03

落葵(*Gynura cusimbu*)又名木耳菜, 是我国古老蔬菜。落葵色泽鲜绿, 味道鲜美, 营养丰富, 含有丰富的无机盐和维生素, 低热量, 少脂肪。此外, 还含有皂甙、葡聚糖、粘多糖等药用成分, 经常食用落葵, 有降血压、益汗、清热、凉血、防止便秘等疗效<sup>[1]</sup>。但由于采摘后的鲜落葵含水量高, 质地脆嫩, 生理代谢旺盛, 呼吸强度高, 营养物质消耗快, 在常温下水分蒸发很快, 色泽发黄变暗, 质地软烂, 风味变劣, 严重影响了其商品价值和食用价值。因此, 研究落葵的贮藏保鲜已成为落葵产业健康发展的一个重要任务。

目前, 硅窗气调贮藏法是较好的一种气调保鲜技术, 即将一定面积的硅橡胶膜镶嵌在塑料大帐或小袋上, 以包装贮藏果蔬的方法称为硅窗气调贮藏法<sup>[2]</sup>。硅

窗气调贮藏法是 1968 年法国 Marcellin P 最早发明创造的。我国 1977 年开始这项新技术研究, 1978 年中国科学院兰州化学物理研究所首先研制成功硅橡胶膜, 随后又开发了布基硅橡胶膜, 使我国果蔬贮藏保鲜技术有了新的发展。

该试验采用硅橡胶薄膜贮藏保鲜落葵, 研究了在贮藏期间落葵品质变化特性, 并提出落葵最佳的硅窗气调保鲜条件, 旨在为延长鲜落葵的贮藏期提供实用技术和生产实践指导, 并为其进一步深加工做准备。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

落葵购自信阳当地菜市场。选择菜体完整、色泽鲜绿、无病虫害和机械伤害, 无公害的落葵。3 h 内立即进行试验, 并在 2 h 以内处理完毕。硅窗气调薄膜购自兰州化学物理研究所, 为 FC-8 硅胶膜, 将其热合到低压聚乙烯薄膜袋上作为材料。磷酸缓冲液、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、愈创木

**第一作者简介:**李建芳(1979-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事食品加工与安全检测方面的教学和科研工作。E-mail:ljf002@163.com。

**收稿日期:**2011-10-28

## Study on Extraction and Purification Process of Polysaccharides in *Neosinocalamus affinis* (Rendle) Keng f. Leaves

GUO Lei, KAN Huan, FAN Fang-yu, LIU Yun, JIANG Jin-yan, SHEN Xue-jing  
(Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract:** Polysaccharides in *Neosinocalamus affinis* (Rendle) Keng f. levels was extracted by water to produce. Single-factor method was adopted to investigate the effects of extract-time, temperature and solid-liquid ratio on degree of extraction content of polysaccharides. Subsequently, a central composite design(CCD) involving 17 experiments of three variables(i. e., extract-time, temperature and solid-liquid ratio) at three levels combined with response surface methodology was employed to attain the highest extraction content. The results showed that the optimal extract-time, temperature, solid-liquid ratio were 1.43 h,  $76.8^{\circ}\text{C}$ , 1:80.3, respectively. On this condition, the content of polysaccharides was 4.11 mg/g. By the method of a series of purification process, the purity of polysaccharides was 61.32%.

**Key words:** *Neosinocalamus affinis* (Rendle) Keng f.; polysaccharides; response surface methodology; decoloration; purification