

混合酶提法提取铁皮石斛中石斛多糖的优化工艺研究

唐 政, 陈小香, 黄献珠

(贺州学院 化学与生物工程学院, 广西 贺州 542899)

摘 要:以铁皮石斛为试材, 采用纤维素酶与果胶酶的等量混合提取法, 通过单因素试验与正交实验, 研究了 pH 值、酶浓度、酶解时间、酶解温度等因素对石斛多糖提取效率的影响。结果表明: 铁皮石斛多糖提取最佳工艺为 pH 6.5、1% 浓度的纤维素酶和果胶酶 1:1 等量混合、50℃ 下提取 135 min, 在此条件下石斛多糖提取率为 41.33%; 说明该工艺是可行的, 且具有较高的提取率。

关键词:铁皮石斛; 提取工艺; 多糖; 纤维素酶; 果胶酶

中图分类号:R 931.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)06-0132-03

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl) 属兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*) 多年生附生型草本植物, 是我国传统的名贵中药, 在我国南方山区多有分布^[1]。其药用部分是新鲜或干燥的茎, 具有益胃生津、滋阴清热、提高免疫力、抗肿瘤、延缓衰老等功效^[2], 有极高的药用、食用价值, 在民间有“救命仙草”的美誉^[3]。

铁皮石斛主要含有的药效成分为石斛类多糖与石斛碱, 多糖提取是天然药物开发与利用研究中的热点, 常见的多糖提取方法分水提法、超声提取法、微波提取法 3 类, 各有其优缺点^[4]。酶提法是近年来比较广泛的技术, 其原理是利用酶水解细胞壁, 使细胞中含有的物质充分溶解到水中, 达到高效提取的目的。提取要求的条件低、安全卫生、提取率高^[5]。在当前已有的研究中, 已有采用纤维素酶提取石斛类多糖的报道, 并取得较好的效果, 但尚鲜见采用多种酶类混合提取的研究^[6]。该试验采用多种酶类混合的酶提法提取石斛类多糖, 研究 pH 值、复合酶浓度、酶解时间、酶解温度对石斛多糖提取效率的影响, 以期对铁皮石斛的药用、食用、深加工等方面的综合利用与开发提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜铁皮石斛茎秆, 取自贺州市元康科技服务公司中草药种植基地。鲜样剪成 3 mm 长小段, 研碎后分别

在冷冻干燥机和电热鼓风干燥下处理, 再用高速万能粉碎机 and 超微粉碎机粉碎, 过 100 目筛待用。

1.2 试验方法

1.2.1 多糖标准曲线 精密量取葡萄糖标准液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 静止。精密量取以上系列对照品溶液各 2.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各精密加入 DNS 试剂 6.0 mL, 置沸水浴中加热 15 min, 流水冷却至室温, 加水稀释至刻度, 以相应试剂为空白。采用紫外-可见分光光度法, 在 520 nm 波长处测定吸光度, 绘制标准曲线(图 1)。得线性回归方程: $y=0.1359x-0.0888$, $R^2=0.9994$ 。

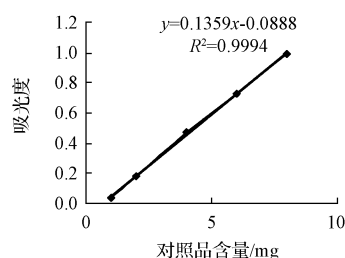


图 1 葡萄糖标准曲线

1.2.2 多糖的测定 采用 3,5-二硝基水杨酸法(即 DNS 法)测定多糖^[7], 多糖提取率(%) = $\frac{1000 \times m \times n \times v}{(y+0.0888)/135.9} \times 100\%$, 式中, m (mg) 为铁皮石斛干粉质量; n 为提取液稀释倍数; v (mL) 为提取液体积; y 为吸光值。

1.2.3 酶类的选择 分别用 2% 的纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶两两等量混合、三者等量混合的复合酶进行酶解提取。取 0.5 g 待用石斛粉溶于 100 mL 蒸馏水, 调 pH 为 6.0, 与各复合酶 40℃ 水浴 2 h, 以 90℃ 灭酶 10 min, 冷却过滤, 测多糖。4 次重复, 取平均值, 选取效果最佳的复合酶进行下一步试验。

第一作者简介:唐政(1977-), 男, 博士, 现主要从事作物生态学与植物天然物质提取等研究工作。E-mail: bioecology74tang@yeah.net.

基金项目:贺州市科技局资助项目(贺科转 1210008N); 贺州学院博士科研启动基金资助项目(HZUBS201005)。

收稿日期:2013-11-15

1.2.4 混合酶提法的单因素试验 将 0.5 g 石斛粉溶于 100 mL 蒸馏水, pH 为 6.0, 40℃ 水浴 2 h, 以 90℃ 灭酶 10 min, 冷却过滤这一流程为常规流程, 分别对料液比(石斛干粉与蒸馏水的比例)、复合酶浓度、酶解时间、酶解温度、pH 值等影响因素设置试验(表 1)。将各单因素变量替换常规流程中相应的量进行试验, 3 次重复。

表 1 单因素试验

料液比/g·mL ⁻¹	复合酶浓度/%	酶解时间/min	酶解温度/℃	pH 值
1:20	1	30	20	4
1:50	2	60	30	5
1:100	4	90	40	6
1:150	6	120	50	7
1:200	8	150	60	8

1.2.5 混合酶提法的正交实验 根据单因素试验确定因素, 采用 L₉(3⁴) 正交表设计正交实验(表 2), 以此确认最佳的活性物质提取条件。

表 2 混合酶提法正交实验因素与水平

水平	因素			
	A 酶浓度/%	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/min	D pH 值
1	1	40	105	5.5
2	2	45	120	6.0
3	3	50	135	6.5

2 结果与分析

2.1 复合酶对石斛多糖提取率的影响

由图 2 可知, 含纤维素酶的处理对多糖的提取效果优于其它处理。纤维素、果胶是植物细胞壁的主要构成物质, 纤维素酶与果胶酶等量混合(B+C)有效地分解或破坏了石斛细胞壁, 从而有利于多糖的提取, 效果最佳。

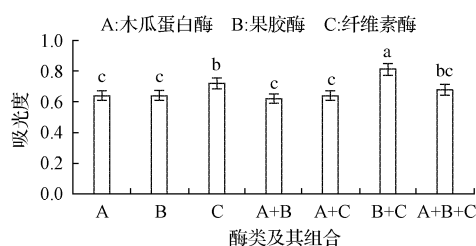


图 2 复合酶对石斛多糖提取的影响

注: 小写字母表示在 LSD 法, 0.05 水平上的显著性差异。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 料液比对石斛多糖提取的影响 由图 3 可知, 蒸馏水过少不利于石斛粉的充分溶解, 过量则不利于酶的水解, 多糖的提取效果均不佳, 料液比为 1:100 g/mL 时达到峰值, 为提取的最佳条件。

2.2.2 pH 值对石斛多糖提取的影响 pH 值对石斛多糖提取的影响较大, 纤维素酶和果胶酶在偏酸性条件下的酶活力最强, 中性、碱性条件下易失活, 从而影响到多糖的提取。由图 4 可知, pH 为 6 时, 石斛多糖的提取效果最佳。

2.2.3 酶解时间对石斛多糖提取的影响 由图 5 可知,

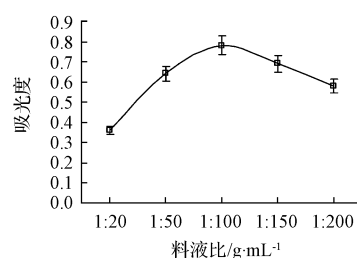


图 3 料液比对石斛多糖提取的影响

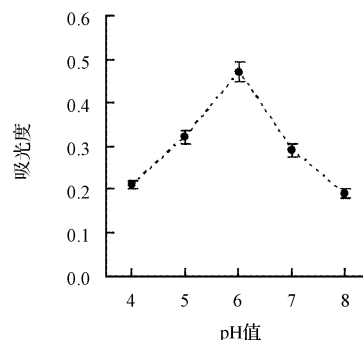


图 4 pH 值对石斛多糖提取的影响

酶解时间对多糖提取的影响较大, 酶解时间不足 90 min, 酶的水解作用得不到充分发挥, 但酶解时间超过 150 min, 纤维素酶和果胶酶易失活, 提取效果均不佳, 120 min 为较理想的酶解时间。

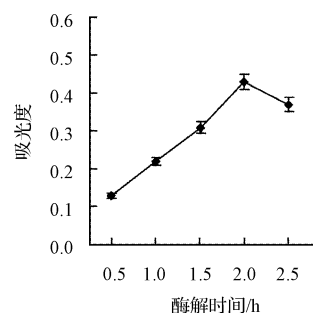


图 5 酶解时间对石斛多糖提取的影响

2.2.4 酶解温度对石斛多糖提取的影响 由图 6 可知, 酶解温度对多糖提取的影响较大, 酶解温度过高或者过低都会限制酶活性。石斛多糖的酶解温度在 40~50℃ 时提取效果最好。

2.2.5 酶浓度对石斛多糖提取的影响 由图 7 可知, 酶浓度对石斛多糖提取的影响较大, 随着酶浓度的提高, 提取率呈下降趋势, 酶浓度在 1%~4% 时, 提取效果最好。

2.3 正交实验结果

由表 3 可知, 影响混合酶提法提取铁皮石斛中多糖的因素主次顺序依次为 B>A>D>C, 即酶解温度>酶浓度>pH 值>酶解时间, 酶解温度对影响尤其明显, 酶浓度与 pH 值的影响较接近。混合酶提法提取铁皮石斛

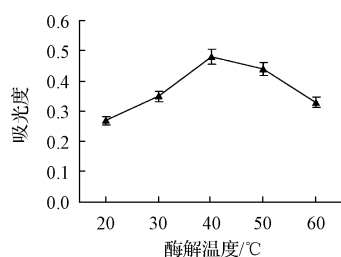


图 6 酶解温度对石斛多糖提取的影响

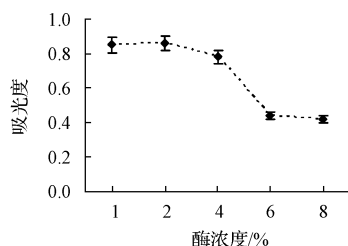


图 7 酶浓度对石斛多糖提取的影响

表 3 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

试验号	A 酶浓度/%	B 酶解温度/°C	C 酶解时间/h	D pH 值	多糖得率 /%
1	1(1)	1(40)	1(105)	1(5.5)	27.69
2	1	2(45)	2(120)	2(6.0)	35.59
3	1	3(50)	3(135)	3(6.5)	41.33
4	2(2)	1	2	3	30.55
5	2	2	3	1	26.09
6	2	3	1	2	34.07
7	3(3)	1	3	2	30.18
8	3	2	1	3	28.75
9	3	3	2	1	33.25
T_1	104.61	88.42	90.51	87.03	
T_2	90.71	90.43	99.39	99.84	
T_3	92.18	108.65	100.63	100.63	
K_1	34.87	29.47	30.17	29.01	
K_2	30.24	30.14	33.13	33.28	
K_3	30.73	36.22	33.54	33.54	
极差 R	4.63	6.74	3.37	4.53	
因素主次			B>A>D>C		
较优组合			$A_1B_3C_3D_3$		

中多糖的最佳工艺组合为 $A_1B_3C_3D_3$, 多糖提取率为 41.33%。通过对 $A_1B_3C_3D_3$ 进行 3 次重复验证试验, 平均提取率为 40.76%, 因此, 确定最佳提取条件为 pH 6.5、1% 浓度的纤维素酶和果胶酶 1:1 等量混合、50℃ 下提取 135 min。

3 结论

提取铁皮石斛中的多糖物质, 该试验在 pH 为 6.5、1% 浓度的纤维素酶和果胶酶混合液 1:1 等量混合、50℃ 下提取 135 min 的提取工艺流程下, 提取率超过 40%, 此结果优于王培培等^[8]的水提法(31.6%)、张利等^[9]的纤维素酶提法(35%)、李蕾等^[10]的微波辅助提取法(31.8%)的提取结果。混合酶提取法优势明显, 具有较高的提取率, 具有一定的开发应用价值。

参考文献

- [1] 苏文华, 张光飞. 铁皮石斛叶片光合作用的碳代谢途径[J]. 植物生态学报, 2003(5): 631-637.
- [2] 徐步青, 崔永一, 郭岑, 等. 不同光照强度和培养时间下铁皮石斛类原球茎生物量、多糖和生物碱量的动态变化[J]. 中草药, 2012(2): 355-359.
- [3] 王再花, 朱根发, 操君喜, 等. 不同施肥处理对春石斛生长特性和矿物质含量的影响[J]. 广东农业科学, 2011(5): 83-86.
- [4] 周术涛, 雷志力, 俞巧仙, 等. 均匀设计与正交设计联用优选铁皮石斛多糖提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2010(11): 296-297, 314.
- [5] 龚庆芳, 周浩, 王新桂, 等. 不同产地铁皮石斛的品质比较研究[J]. 北方园艺, 2013(8): 162-165.
- [6] 盛家荣, 李志华, 易艳波, 等. 铁皮石斛多糖的研究进展[J]. 广西科学院学报, 2011(4): 338-340.
- [7] 赵凯, 许鹏举, 谷广辉. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008(8): 534-536.
- [8] 王培培, 鲁芹飞, 陈建南, 等. 正交实验法优化铁皮石斛多糖的提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2012(11): 2781-2782.
- [9] 张利, 范明才, 冯喜文, 等. 铁皮石斛中石斛多糖与石斛碱的纤维素酶法提取研究[J]. 化学研究与应用, 2011(3): 356-359.
- [10] 李蕾, 沈清清, 苟丽. 云南文山人工种植铁皮石斛多糖含量及微量元素测定[J]. 文山学院学报, 2013(3): 5-6, 33.

Optimization of the Extraction Technology of *Dendrobium* Polysaccharides From *Dendrobium officinale* by Mixed Enzyme

TANG Zheng, CHEN Xiao-xiang, HUANG Xian-zhu

(School of Chemical and Biological Engineering, Hezhou University, Hezhou, Guangxi 542899)

Abstract: Taking *Dendrobium officinale* as material, by single factor experiments and orthogonal experiment with the mixed enzyme, the influences of the enzyme dosage, the composition of mixed enzyme, enzymolysis time, enzymolysis temperature, and the value of pH were adopted, the optimization extraction process of dendrobium polysaccharides from *Dendrobium officinale* was studied. The results showed that the optimal extraction technology was as follow: the mixed enzyme (cellulose : protopectinase=1 : 1) concentration was 1%, the pH value was 6.5, the enzymolysis temperature was 50℃ and the extracting time was 135 min. The yield of the dendrobium polysaccharides was 41.33%. The process was reasonable with high rates of extraction of *Dendrobium* polysaccharides.

Key words: *Dendrobium officinale*; extraction technology; dendrobium polysaccharides; cellulase; protopectinase