

# 正交试验优化酶法提取金银花多糖工艺

周小楠, 董 群

(皖南医学院微生物学与免疫学教研室, 安徽省多糖药物工程技术研究中心, 安徽 芜湖 241000)

**摘 要:** 目的: 研究纤维素酶法提取金银花多糖的最佳工艺。方法: 以金银花多糖提取率为指标, 通过单因素试验和正交试验, 研究酶用量、提取温度、作用pH值、提取时间对多糖提取率的影响。结果: 纤维素酶法提取金银花多糖的最佳工艺为纤维素酶1.5%、提取温度50℃、作用pH值5.0、提取时间50min。结论: 纤维素酶法可以明显提高金银花多糖的提取率。

**关键词:** 纤维素酶; 金银花多糖; 酶法提取

## Orthogonal Array Design for Optimization of Enzymatic Extraction of Polysaccharides from *Flos Lonicerae*

ZHOU Xiao-nan, DONG Qun

(Department of Microbiology and Immunology, Anhui Engineering and Technology Research Center of Polysaccharide Pharmaceutical, Wannan Medical College, Wuhu 241000, China)

**Abstract:** In this study, an orthogonal array design was applied to optimize conditions for the hydrolysis of *Flos Lonicerae* by cellulase for polysaccharide extraction. The effects of enzyme concentration, temperature, pH and hydrolysis time on polysaccharide yield were explored. The optimum hydrolysis conditions for a considerably enhanced extraction yield of polysaccharide were determined as follows: 1.5% of enzyme concentration, 50 °C, pH 5.0 and 50 min of extraction time.

**Key words:** cellulose; *Flos Lonicerae*; polysaccharide; enzymatic extraction

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)22-0119-04

金银花(*Lonicera Japonica* Thunb.)为忍冬科植物忍冬及同属植物的干燥花蕾, 自古以来是十分畅销的常用名贵中药材之一, 具有清热解毒、凉散风热之效, 70%以上的感冒、消炎中成药中都含有金银花。经近代药理实验和临床应用证明, 金银花具有广谱抗菌、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫等药理作用, 对于多种病菌有较强的抗菌作用和较好的治疗效果<sup>[1-3]</sup>。金银花多糖是金银花的主要活性成分之一, 具有抗菌、抗氧化和调节免疫等功能<sup>[4-7]</sup>。多糖的传统提取方法是水提法, 已广泛应用, 但具有耗时长、提取率低等缺点<sup>[8-11]</sup>。近年来, 酶法提取多糖因其具有快速、高效、反应时间温和、易于控制等诸多优点, 已广泛应用在植物多糖的提取上<sup>[12-14]</sup>。本研究以金银花为原料, 利用酶法技术提取金银花多糖, 以期提高金银花多糖的提取率, 优化提取工艺, 为进一步开展金银花多糖生物活性研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

金银花药材 皖南医学院附属弋矶山医院中药房;

酸性纤维素酶( $2 \times 10^5$ U/g) 安徽新经典生物技术有限公司; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

AG135型电子天平PHS-25数显酸度计 上海精密科学仪器有限公司; RE5205型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; HH-2型数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; 增力电动搅拌器 金坛市金城园胜实验仪器厂; LD25-2型离心机 北京京立离心机有限公司; TU-1810紫外-分光光度计 北京普析仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 金银花粗多糖的提取

将干燥金银花粉碎, 待用。各组准确称取10.0g金银花, 按料液比1:20(g/mL)加入蒸馏水, 采用不同质量分数的纤维素酶, 不同酶解温度, 不同pH值, 不同酶解时间对金银花进行多糖的提取实验。水提液置于90℃水浴中10min使酶灭活, 冷却至室温, 4000r/min离心10min, 取上清液浓缩至50mL, 加入200mL 95%乙醇溶液, 4℃条件下静置12h, 4000r/min离心10min。取沉淀加入适量蒸

收稿日期: 2011-09-23

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目(WK2011102)

作者简介: 周小楠(1981—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事多糖药物研发及其免疫活性研究。E-mail: zhouxnan820@163.com

馏水, Sevag法除蛋白, 再次醇沉, 离心收集沉淀, 分别用无水乙醇、丙酮洗涤, 真空干燥得金银花粗多糖, 称质量, 待测多糖含量。

### 1.3.2 多糖含量的测定

采用文献[15]中苯酚-硫酸法。精确称取105℃干燥至恒质量的葡萄糖100mg于500mL容量瓶中, 加蒸馏水定容。分别量取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL标准溶液于20mL试管中, 加蒸馏水至2.0mL, 摇匀, 葡萄糖质量浓度分别为0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10mg/mL, 各加入新配制的苯酚试剂1mL, 浓硫酸5mL, 充分摇匀, 室温放置30min后于490nm波长处测定吸光度, 以葡萄糖质量浓度(mg/mL)为横坐标, 吸光度为纵坐标, 制作标准曲线得方程 $y=5.9786x+0.0099$ ,  $R^2=0.9937$ 。

每组称取50mg金银花粗多糖, 加入1000mL容量瓶中, 加蒸馏水定容。量取2mL, 按上述方法测定490nm波长处的吸光度, 代入回归方程, 求出多糖含量。

### 1.3.3 金银花多糖提取率计算

$$\text{多糖提取率}/\% = \frac{\text{多糖含量}/(\text{mg/mL}) \times 500\text{mL} \times \text{每组粗多糖质量}/\text{mg}}{50\text{mg} \times \text{金银花质量}/\text{mg}}$$

### 1.3.4 单因素试验

分别精确称取金银花干粉10g, 加入200mL蒸馏水, 采用不同质量百分比的纤维素酶, 不同酶解温度, 不同pH值, 不同酶解时间进行单因素试验。

### 1.3.5 正交试验设计

根据单因素试验结果, 以纤维素酶的用量、酶的提取温度、作用pH值、提取时间为因素, 每个因素设计3个水平, 以多糖提取率为考察指标, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 优化纤维素酶提取工艺条件。

### 1.3.6 验证实验及与水提法的比较

各组准确称取10.0g金银花, 按料液比1:20加入蒸馏水, 按照正交试验得出的最佳提取工艺条件提取金银花多糖, 重复3次取平均值, 并传统水提法提取金银花多糖<sup>[16-18]</sup>比较提取效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 酶用量对金银花多糖提取率的影响

在pH5.0、提取温度50℃、提取时间60min的条件下, 分别加入质量分数分别为0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%的纤维素酶进行多糖提取, 结果见图1。图1表明, 随着酶的用量加大, 金银花多糖提取率逐渐增加, 在质量百分比为1.5%时, 多糖提取率最高, 以后再增加酶用量, 提取率没有明显上升, 可能是酶的用量达到饱和。所以确定以1.5%为酶最佳用量。

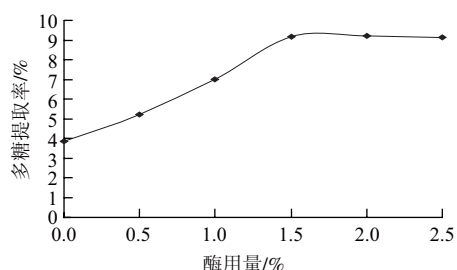


图1 酶用量对多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of enzyme loading on polysaccharide yield

#### 2.1.2 提取温度对金银花多糖提取率的影响

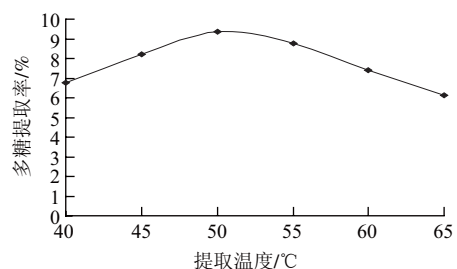


图2 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of temperature on polysaccharide yield

图2表明, 在酶用量为1.5%、其他条件同2.1.1节的条件下, 温度小于50℃时, 金银花多糖提取率逐渐增加, 在提取温度为50℃时, 多糖提取率最高, 以后温度在增加, 提取率不但没有上升, 反而下降, 可能是随着温度上升, 酶的活力降低。所以确定以50℃为最佳提取温度。

#### 2.1.3 酶作用pH值对金银花多糖提取率的影响

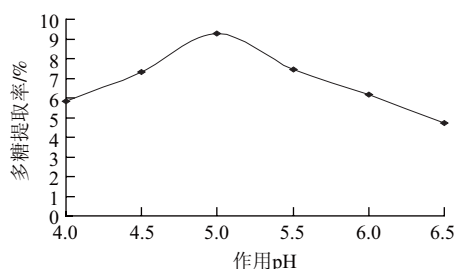


图3 酶作用pH值对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of pH on polysaccharide yield

图3表明, 提取温度为50℃, 其他条件同2.1.2节, 在作用pH值为5.0时, 多糖提取率最高, pH值小于或大于5.0, 金银花多糖提取率都降低, 可能是pH值过高或过低, 使酶的空间结构发生变化, 活力降低。所以确定以5.0为酶的最佳作用pH值。

#### 2.1.4 酶的提取时间对金银花多糖提取率的影响

图4表明, 提取pH值为5.0, 其他条件同2.1.3节, 随着提取时间的增加, 金银花多糖提取率逐渐增大, 但在提取时间小于60min时, 增加比较显著, 大于60min后, 多糖提取率增加不明显, 因此确定60min为酶的最佳提取时间。

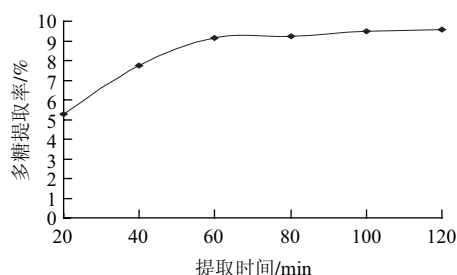


图4 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis time on polysaccharide yield

2.2 正交试验

根据单因素试验结果,以纤维素酶用量、酶提取温度、作用pH值、提取时间为因素,每个因素设计3个水平,因素和水平及结果见表1,方差分析见表2。

表1 酶法提取金银花多糖工艺正交试验设计及结果

试验号	A纤维素酶用量/%	B提取温度/℃	C作用pH	D提取时间/min	多糖提取率/%
1	1(1.0)	1(45)	1(4.5)	1(50)	7.16
2	1	2(50)	2(5.0)	2(60)	8.65
3	1	3(55)	3(5.5)	3(70)	7.75
4	2(1.5)	1	2	3	9.36
5	2	2	3	1	8.83
6	2	3	1	2	8.47
7	3(2.0)	1	3	2	8.53
8	3	2	1	3	8.46
9	3	3	2	1	8.95
$K_1$	23.560	25.050	24.090	24.940	
$K_2$	26.660	25.940	26.960	25.650	
$K_3$	25.940	25.170	25.110	25.570	
$k_1$	7.853	8.350	8.030	8.313	
$k_2$	8.887	8.647	8.987	8.550	
$k_3$	8.647	8.390	8.370	8.523	
R	1.034	0.297	0.957	0.237	

由表1极差分析可知,各因素对金银花多糖提取率的影响程度依次为:纤维素酶的用量>作用pH>提取温度>提取时间,纤维素酶提取金银花多糖的最佳工艺条件为 $A_2B_2C_2D_2$ ,但各因素对提取率的影响是否显著还要参考方差分析的结果。

表2 正交试验方差分析结果

差异源	离差平方和	自由度	均方差	F	显著性
A	1.755	2	0.877	17.404	*
B	0.155	2	0.078	1.542	
C	1.411	2	0.706	13.996	*
D	0.101	2	0.050	1.000	
误差	0.101	2			

注:\*.差异显著( $P < 0.05$ );  $F_{0.1(2,2)} = 9.00$ ;  $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ 。

由表2方差分析可知,纤维素酶的用量和作用pH值对金银花多糖提取率影响显著,提取温度和提取时间影响不显著,这表明在各个因素所考察的范围内,纤维素酶的用量和作用pH值是一个重要因素,根据前面的极

差分析,最佳条件是 $A_2$ 、 $C_2$ ,而提取温度和提取时间对金银花多糖提取率影响不大,从经济和节约时间的角度考虑,最佳条件选择 $B_2$ 、 $D_1$ 。所以,在本实验中,由正交试验所确定的酶法提取金银花多糖的最佳工艺为 $A_2B_2C_2D_1$ ,即纤维素酶的用量1.5%、提取温度50℃、作用pH5.0、提取时间50min。

2.3 验证实验

按照正交试验得出的最佳提取工艺条件,即纤维素酶的用量1.5%、提取温度50℃、作用pH5.0、提取时间50min,提取金银花多糖,重复3次取平均值,粗多糖得率和多糖提取率分别为11.3%和9.45%;在不加纤维素酶其他条件相同的情况下用传统水提法提取金银花多糖的平均粗多糖得率和多糖提取率分别为6.9%和5.65%。由此可知,纤维素酶法不但多糖提取率远高于水提法,提取的粗多糖质量也明显提高,可能是由于纤维素酶破坏了细胞壁中纤维素的结构,促进植物细胞壁的溶解使更多的金银花多糖从植物细胞中溶解出来的缘故。

3 结论

本实验结果表明,各因素对金银花多糖提取率的影响程度依次为:纤维素酶的用量>作用pH值>提取温度>提取时间。在各个因素所考察的范围内,纤维素酶的用量和作用pH值对金银花多糖提取率影响显著,提取温度和提取时间影响不显著。纤维素酶提取金银花多糖的最佳工艺条件为:纤维素酶的用量1.5%、提取温度50℃、作用pH值5.0、提取时间50min。

纤维素是植物细胞壁的主要构成成分,性质稳定,在水提法的条件下不易水解,将纤维素酶运用于多糖的提取能有效提高多糖提取率<sup>[19-21]</sup>。本实验采用纤维素酶法提取金银花多糖,不但多糖提取率远高于水提法,提取的粗多糖质量也明显提高。同时,提取温度较低,条件温和,对多糖的结构和生物活性有保护作用。

参考文献:

- [1] 唐敏. 金银花黄酮活性成分分离纯化与生物学效应研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2008.
- [2] 汤雁波. 金银花抗病毒有效成分双抗素类似物的合成与活性研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [3] 刘家欣, 谷宜洁. 湘西金银花挥发油化学成分研究[J]. 分析科学学报, 1999, 15(1): 66-69.
- [4] 何思忠, 兰荣德. 金银花的药理作用与临床应用[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(12): 865-867.
- [5] 刘雄, 高建德. 金银花质量控制、化学成分及药理学研究进展[J]. 甘肃中医学院学报, 2006, 23(4): 46-48.
- [6] 林雄平, 陈晓清, 苏育才, 等. 金银花和苦丁茶多糖提取物抗菌活性研究[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(1): 51-53.
- [7] 苏香萍, 龚大春, 张亚雄, 等. 二氧化碳超临界萃取金银花挥发油化学成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2643-2644.

- [8] 邓庆华. 用正交试验法优化金银花多糖提取工艺[D]. 长春: 东北师范大学, 2008.
- [9] YIN Yongguang, HAN Yuzhu, HAN Yong. Pulsed electric field extraction of polysaccharide from *Rana temporaria chensinensis* David[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 312(1/2): 33-36.
- [10] CHOI Y S, KOO J-G, HA J-H, et al. Extraction and chemical composition of soluble polysaccharide from green laver, *Enteromorpha prolifera*[J]. J Korean Soc, 2002, 35(5): 519-523.
- [11] PARADOSSI G, CAVALIERI F, PIZZOFERRATO L, et al. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1999, 25(4): 309-315.
- [12] 钱志伟, 王会晓, 杨海蛟, 等. 酶法提取马齿苋多糖[J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 475-478.
- [13] 葛立军, 朱振洪, 沙跃, 等. 正交实验优化复合酶法提取山药多糖工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3187-3188.
- [14] 张帅, 沈楚燕, 董基. 酶法提取猴头菇多糖的研究[J]. 河南工业大学学报, 2010, 31(2): 76-79.
- [15] 李尔春. 金银花多糖的分离纯化与生物活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2009.
- [16] 殷洪梅, 吕新勇, 萧伟. 金银花多糖的制备工艺优化及免疫活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 453-455.
- [17] YE Chunlin, JIANG Chengjun. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 495-502.
- [18] SINGTHONG J, NINGSANOND S, CUI S W. Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from yanang (*Tiliacora triandra*) leaves[J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1301-1307.
- [19] 陈燕, 李世刚, 刘朝霞, 等. 纤维素酶法提取资本瓜多糖的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(21): 11457-11459.
- [20] 李晋, 徐怀德, 李钰金, 等. 洋葱多糖纤维素酶法提取及其抗氧化性研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(11): 2345-2350.
- [21] 张芸兰. 复合酶法提取冬瓜多糖的研究[J]. 广西民族大学学报, 2009, 15(1): 84-87.