

纤维素酶法提取黄芪多糖

闫巧娟, 韩鲁佳*, 江正强

(中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要:目的 研究纤维素酶处理对黄芪多糖提取效果的影响。方法 以提取液的总糖和还原糖为考察指标, 确定纤维素酶处理工艺。通过不同提取方法提取多糖及扫描电镜分析, 探讨纤维素酶处理的效果。结果 纤维素酶处理条件的优化为纤维素酶加入量为 60 U/g 生药, 酶处理时间 90 min, 温度 50 ℃。与对照工艺相比得率由 24.4% 提高至 30.3%, 增加率为 24.2%, 而多糖的质量分数基本不变。扫描电镜观察表明, 纤维素酶明显地分解了黄芪原料中的部分结构多糖, 药渣中的网状结构变得十分清晰。结论 纤维素酶处理有助于黄芪多糖的提取, 能显著提高黄芪多糖的得率。

关键词: 黄芪多糖; 纤维素酶; 扫描电镜

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)12-1804-04

Extraction of *Astragalus polysaccharides* by cellulase

YAN Qiao-juan, HAN Lu-jia, JIANG Zheng-qiang

(Engineering College, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Key words: *Astragalus polysaccharides* (APS); cellulase; scanning electron microscopy (SEM)

近年来, 酶法用于中草药有效成分的提取呈增加趋势, 通过选用合适的酶制剂能够提高皂苷类、蛋白类、黄酮类以及多糖类等活性成分的得率。关于酶法提取多糖已经有些报道, 常用的酶制剂包括纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶和淀粉酶^[1,2]。黄芪的药用部位为根, 多糖是其主要的功效成分之一。黄芪多糖几乎均以 α -糖苷键相连, 且有的多糖属于果胶类多糖^[3]。中草药的细胞壁大多主要由纤维素构成。黄芪原料及药渣中纤维素的质量分数较高, 分别为 26% 和 48% 左右。因此, 结构多糖中的纤维素可能是制约黄芪多糖最大限度溶出的主要物质。纤维素是由 D-葡萄糖 β -1,4 糖苷键连接而成, 纤维素酶则能特异性地降解纤维素生成葡萄糖等低相对分子质量的糖。因此, 本研究探讨纤维素酶法提取黄芪多糖, 旨在提高黄芪多糖的得率和最大限度地利用黄芪资源。

1 材料与方法

1.1 主要仪器: 回流提取装置(规格为 1 L 和 10 L), 实验室组装; TU-1800SPC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), AB204-B 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司), LGJ-18 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂), LXJ-IB 低速大容量多管离

心机(上海安亭科学仪器厂), SCD005 Sputter Coater 离子溅射金, FEI QUANTA 200 扫描电镜(PHILIP)。

1.2 原料与试剂: 黄芪为山西产蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao(炮台芪), 由北京同仁堂饮片厂提供。提取用水均为蒸馏水, 分析用水均为双蒸水。葡萄糖对照品(Sigma 公司), 重蒸酚、乙醇、硫酸等均为国产分析纯, 纤维素酶(初始活力单位 1 800 U/g, 唐山太博尔生物工程有限公司)。

1.3 分析方法: 采用苯酚-硫酸法测定多糖。精密取 2 mL 样品溶液, 分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 迅速加入 5.0 mL 浓硫酸, 振摇 5 min, 置沸水浴上加热 15 min, 然后置冷水浴中冷却 30 min, 随空白对照, 在 490 nm 波长处测定吸光度。用标准曲线计算多糖量。

采用 Somogyi 法测定直接还原糖。取 5 mL 样品溶液, 加入试管(230 mm×21 mm)中, 然后加入 5 mL Somogyi 试剂, 漩涡混合器上混匀。将试管口盖上玻璃珠, 置于 100 ℃沸水浴中反应 15 min 后, 流动冷水浴冷却至室温。加入 2 mL 2% KI 溶液, 1.5 mL 1 mol/L H₂SO₄ 溶液, 漩涡混合器上混匀。用

收稿日期: 2005-02-15

基金项目: 国家“十五”攻关课题(2002BA514-12-3)

作者简介: 闫巧娟(1971—), 女, 河北衡水人, 博士, 副教授, 主要从事生物物质资源及天然生物活性物质的研究。Tel: (010) 62736778

E-mail: yanqj@cau.edu.cn

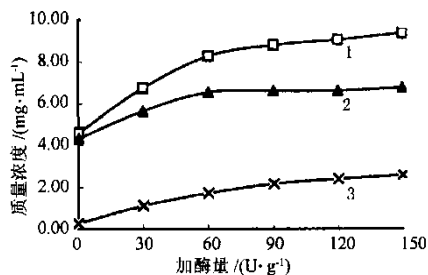
* 通讯作者 韩鲁佳

0.005 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液进行滴定,接近终点时加入 1~2 滴 1% 淀粉指示剂,继续滴定至终点(亮蓝色)。

2 结果分析

2.1 纤维素酶处理条件的确定:称取一定量的黄芪粗粉,加入 10 倍量水,提取 2 h 后滤过,滤渣均分。每份折合黄芪生药 10 g,置于消化管中,升温至所需温度,加酶保温。迅速升温至沸腾继续提取 1 h, $3\,000\times g$ 离心 15 min,测定提取液中总糖和还原糖的变化。分别进行纤维素酶加入量、酶处理时间和温度对黄芪多糖提取的影响试验,试验重复 3 次,各指标取平均值。文献报道将总糖与还原糖质量浓度之差作为多糖质量浓度^[4]。考虑到黄芪中含有较多的蔗糖,由于蔗糖极易溶于水而被提取出来,总糖与还原糖质量浓度之差的变化能近似反映出黄芪多糖质量浓度的变化。所以,本研究以总糖与还原糖质量浓度之差为主要指标考察纤维素酶对黄芪多糖提取的影响。

2.1.1 酶加入量:将滤渣加入 8 倍量水,纤维素酶加入量分别为 0、30、60、90、120、150 U/g 生药,处理温度为 50 ℃,处理时间为 2 h。纤维素酶加入量对黄芪多糖提取的影响见图 1。可以看出,还原糖和总糖的质量浓度均随着加酶量的增加而逐渐增大,其中还原糖的质量浓度随加酶量的增加几乎呈直线增加,而总糖增加的趋势则随加酶量的增加渐缓。加酶量从 30 U/g 增至 60 U/g 时,总糖与还原糖质量浓度之差大幅度增加;从 60 U/g 增至 150 U/g 的过程,增长趋势比较平缓。



1-总糖 2-总糖-还原糖 3-还原糖

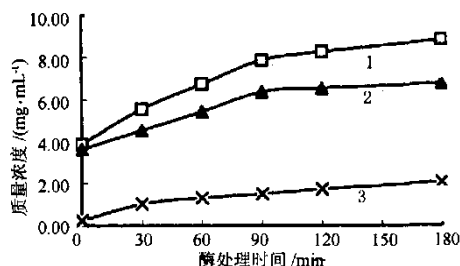
1-total sugar 2-total sugar-reducing sugar 3-reducing sugar

图 1 纤维素酶加入量对黄芪多糖提取的影响

Fig. 1 Effect of cellulase dosage on extraction of *Astragalus polysaccharides*

2.1.2 酶处理时间:将滤渣加入 8 倍量水,根据加酶量的试验结果,取加酶量为 60 U/g 生药,分别保温 0、30、60、90、120、180 min,保温温度为 50 ℃。纤维素酶处理时间对黄芪多糖提取的影响见图 2。可

以看出,随酶处理时间的增加,还原糖和总糖的质量浓度不断增加。反应时间由 0~90 min 这一阶段总糖与还原糖质量浓度之差大幅上升,几乎呈线性增长,从 90~180 min 这一阶段的上升趋势逐渐平缓。



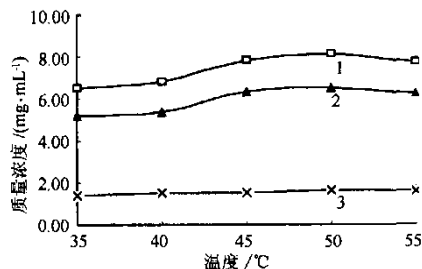
1-总糖 2-总糖-还原糖 3-还原糖

1-total sugar 2-total sugar-reducing sugar 3-reducing sugar

图 2 纤维素酶处理时间对黄芪多糖提取的影响

Fig. 2 Effect of incubation time on extraction of *Astragalus polysaccharides*

2.1.3 保温温度:将滤渣加入 8 倍量水,加酶量为 60 U/g 生药,根据酶处理时间的试验结果,保温时间 90 min,保温温度分别为 35、40、45、50、55 ℃。不同温度对黄芪多糖提取的影响见图 3。结果表明,酶处理温度从 35 ℃ 逐渐增至 55 ℃ 时还原糖在 50 ℃ 时质量浓度较高,其他温度下差别不大;总糖、总糖与还原糖质量浓度之差在 35~50 ℃ 逐渐上升,在 45~50 ℃ 达到最大值,之后又慢慢下降。



1-总糖 2-总糖-还原糖 3-还原糖

1-total sugar 2-total sugar-reducing sugar 3-reducing sugar

图 3 纤维素酶处理温度对黄芪多糖提取的影响

Fig. 3 Effect of treatment temperature on extraction of *Astragalus polysaccharides*

综合以上纤维素酶处理各因素对黄芪多糖提取的影响,得到纤维素酶处理的最佳条件为:加酶量 60 U/g,酶处理时间 90 min,处理温度 50 ℃。

2.2 不同方法提取黄芪多糖的效果:根据所得到的纤维素酶处理的最佳工艺条件提取黄芪多糖。酶处理工艺为:纤维素酶加入量为 60 U/g 生药,酶处理时间 90 min,温度 50 ℃。每次试验取生药 800 g,第一次提取加 10 倍量水,提取 2 h,第二次加 8 倍量

水,提取1.5 h的工艺作为传统工艺^[5]。加酶工艺按上述酶处理条件在第一次提取完成后,将滤渣加水后进行酶处理,然后升温灭酶后继续提取1.5 h。同时进行按照加酶工艺保温但不加酶的对照试验。将各工艺的两次提取液分别合并浓缩,加入4倍量无水乙醇进行醇沉,干燥后计算得率并测定多糖的质量分数重复3次,取均值。不同方法提取黄芪多糖的效果见表1。结果表明纤维素酶处理工艺的多糖得率比传统方法有较大幅度提高,多糖得率由24.4%提高至30.3%,增加率为24.2%。比对照的多糖得率25.2%提高了20.2%。可见,在酶处理工艺中的保温条件对得率的提高有一定影响,但影响不大。3种方法所得多糖质量分数为56.1%~56.6%,变化不大。

表1 不同方法提取黄芪多糖的效果

Table 1 Yield and content of *Astragalus* polysaccharides extracted by different methods

提取方法	多糖得率/%	多糖/%
传统工艺	24.4	56.6
对照(不加酶但保温)	25.2	56.3
纤维素酶处理	30.3	56.1

2.3 黄芪原料及药渣的扫描电镜图:将黄芪原料,酶处理工艺和传统工艺所得药渣的粉末进行离子溅射金处理后扫描电镜观察。黄芪原料、药渣的1000倍下扫描电镜观察见图4。黄芪原料可见较模糊的纤维状物质,上面有较多的粒状物,可能是淀粉粒、蔗糖等。传统工艺提取后的药渣显现出较模糊的网状结构,还有部分其他成分附着在网状结构上。因此,推断多糖的提取不是很完全。纤维素酶处理后的药渣其网状结构变得非常清晰,附着物很少,提示多糖的提取可能比较完全。



图4 黄芪原渣(A)、传统工艺药渣(B)和酶处理药渣(C)的扫描电镜

Fig. 4 Scanning electron microscopy (SEM) of *Radix Astragali* (A), gruffs by traditional process (B), and gruffs by cellulase treatment (C)

3 讨论

黄芪多糖主要采用传统的水提醇沉工艺提取,得率较低。因此,近年来仍有许多研究者致力于提高黄芪多糖的得率。采用稀碱溶液提取黄芪多糖,得率提高,但碱法提取会影响黄芪多糖的高级结构、组分

变化以及其生物活性有待研究^[6]。微波处理应用于水提醇沉法提取黄芪多糖,反应时间缩短了12倍^[7],但微波设备的可操作性和局部受热不均等使微波提取的应用具有一定的局限性。本实验应用纤维素酶处理工艺提取黄芪多糖,得到了较好的效果。

纤维素酶处理能较大幅度地提高多糖的得率,大多研究报道集中于对藻类、食用真菌类和百合等非木质材料的酶处理上,而对黄芪等木质材料的研究报道较少^[2]。多数文献报道采用直接酶处理后浸提的方法提取多糖,预试验结果表明这种方法对黄芪多糖的提取并不适宜。根据传统工艺黄芪多糖大多进行了2次水提的特点^[5],本研究采用在第一次提取完成后进行酶处理,明显增加了黄芪多糖的得率。这可能由于黄芪原料组织得到充分软化,有利于被纤维素酶作用。另一方面,黄芪的一次提取液中含有大量的糖类物质可能对纤维素酶的作用形成反馈抑制,将滤液分离后酶处理,有助于提高纤维素酶的效率。另外,黄芪的一次提取液中也含有较多的蔗糖等小分子糖类,影响纤维素酶的稳定性。研究表明,在较高温度下蔗糖和葡萄糖对纤维素酶有破坏作用^[8]。进行第二次水提,既具有钝化酶的作用,同时又可将剩余的多糖充分提取出来。

纤维素酶的功能是通过将细胞壁主要结构成分纤维素分解为还原糖,它有助于增加多糖的溶出,从而最终提高多糖的得率。总糖和还原糖的分析结果表明纤维素酶处理能降解黄芪的结构多糖中的纤维素,提高提取过程中糖的溶出率。不同方法提取黄芪多糖的试验表明,与传统工艺和对照相比,酶法所得到的黄芪多糖的质量分数几乎不变,但得率大幅度增加。扫描电镜观察结果进一步从微观结构上揭示了纤维素酶处理后药渣的网状结构变得十分清晰,黄芪原料的部分结构多糖受到破坏,中间的多糖等物质得到了较充分的溶出^[9]。总之,本实验采用的纤维素酶处理工艺简单易行,能较大幅度提高黄芪多糖的得率,而且不需进行专门钝化酶的操作,因此具有很大的工业化应用前景。

References:

- [1] Chen S L, Sun Z, Gu W Y, et al. Enzymatic extraction technique and antitumor activity of the submerged mycelium polysaccharide of *Griifola frondosa* [J]. *J Wuxi Univ Light Ind* (无锡轻工业大学学报), 2000, 19 (4): 335-339.
- [2] Teng L R, Meng Q F, Liu P Y, et al. Extracting *Lilium brownii* polysaccharide by combined-enzymes and its antioxidative activity *in vitro* [J]. *J Jilin Univ: Sci Ed* (吉林大学学报:理学版), 2003, 41 (4): 538-542.
- [3] Shan J J, Wang S C, Liu D, et al. Progress of chemical and pharmacological study of *Astragalus* polysaccharide [J]. *Acta*

Univ Tradit Med Sin Pharm Shanghai (上海中医药大学学报), 2000, 14 (3): 61-65.

- [4] Masaki A, Aoyagi M, Shibata T, et al. Preparation and chemical evaluation of *Astragali Radix* produced in Hokkaido [J]. *Nat Med*, 1998, 52 (1): 10-13.
- [5] Yan Q J, Jiang Z Q, Han L J, et al. Extraction technique of *Astragalus* polysaccharide [J]. *Transact Chin Soci Agric Eng* (农业工程学报), 2000, 16 (Suppl): 114-116.
- [6] Li H M, Huang R Q, Wang Y Z. A technological study on enhancing the extraction rate of *Astragalus* polysaccharides [J]. *J Northwest Univ: Nat Sci* (西北大学学报: 自然科学

版), 2000, 30 (6): 509-510.

- [7] Wang L, Liu Z Y, Lu J J, et al. Microwave technique extraction and content determination of polysaccharide of membranous milkvetch root [J]. *J Chin Med Pharmacol* (中医学报), 2001, 29 (6): 35-36.
- [8] Yang X M, Yang J C. Effect of sugars on the stability of cellulose [J]. *J Tsinghua Univ: Nat Sci* (清华大学学报: 自然科学版), 2000, 40 (2): 51-54.
- [9] Zhang J Q, Wang R M, Guan F M, et al. Analysis of the microstructure of hydrolyzed corn stover [J]. *Cereal Feed Ind* (粮食与饲料工业), 2002 (9): 25-26.

载粉防己碱生物材料的制备与定量测定

崔元璐¹, 戚爱榛², 韩 崑², 李克峰¹, 姚康德¹

(1. 天津大学, 天津 300072; 2. 天津中医学院, 天津 300193)

制备载有药物和细胞因子的生物材料和研究生物材料对药物与细胞因子的控制释放已经成为组织工程的研究热点之一^[1]。传统中药的某些有效成分具有与细胞因子类似的生理活性和广泛的药理作用, 且价格低廉, 理化性质相对稳定, 有作为细胞因子和抗生素替代物应用于组织工程的良好前景。本课题组的研究表明, 低质量浓度的粉防己碱在体外能够促进软骨细胞的增殖, 维持软骨细胞的功能表达, 并具有抗炎、抗变态反应和抗凝血作用。以相分离-溶剂置换-冷冻干燥法制备载有粉防己碱的聚乳酸多孔组织工程支架材料, 通过扫描电镜分析材料形貌; 利用高效液相色谱法测定载药支架材料中的载药量。

1 材料与仪器

左旋聚乳酸 (poly-L-lactic acid, PLLA, M_n 为 1.08×10^5 g/mol, 美国麻省大学化工系), 粉防己碱 (中国药品生物制品检定所), 三氯甲烷、四氢呋喃、甲醇等化学试剂均为市售分析纯, 色谱流动相用甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 二己胺为分析纯。

AE200 精密电子天平 [梅勒-脱利多仪器 (上海) 有限公司], Christ Alpha 2-4 冷冻干燥机, Philips XL30 扫描电子显微镜, Agilent 1100 高效液相色谱仪, G1311A 四元泵, G1322A 脱气机, G1316A 柱温箱, 1314A UV 可变波长检测器, HP Rev. A. 0501 化学工作站。

2 方法与结果

2.1 材料的制备

2.1.1 聚乳酸支架材料的制备^[2]: 精密称取 1.5 g 聚乳酸, 放入 200 mL 磨口三角瓶中, 加入 50 mL 四氢呋喃, 在 60 °C 水浴中不断振摇, 使其完全溶解, 配制成质量浓度为 3% 的溶液。将 4 mL 聚乳酸溶液加入到磨口玻璃称量瓶中, 盖严盖子, 放入 5 °C 的冰箱中 8 h, 使溶液凝胶化。取出称量瓶, 打开盖子, 放入去离子水中置换四氢呋喃。每隔 8 h 换水 1 次, 连续置换 48 h。将凝胶连同玻璃称量瓶一起取出, 置于一 40 °C 低温冰箱中冷冻, 使其冻结。取出玻璃称量瓶, 放入冷冻干燥机中, 使其完全干燥。取出称量瓶中的支架材料, 备用。

2.1.2 含有粉防己碱的聚乳酸支架材料的制备: 精密称取 10 mg 粉防己碱, 溶于 0.5 mL 三氯甲烷中, 备用。精密称取 1.5 g 聚乳酸, 放入 200 mL 磨口三角瓶中, 加入 50 mL 四氢呋喃, 然后用移液器精密量取 150 μ L 粉防己碱三氯甲烷溶液, 加入三角瓶中, 在 60 °C 水浴中不断振摇, 使其完全溶解, 配制成含有粉防己碱的聚乳酸溶液。将 4 mL 聚乳酸溶液加入到磨口玻璃称量瓶中, 按聚乳酸支架材料的制备项下方法操作, 即得。

2.1.3 材料形貌分析: 采用 Philips XL30 扫描电子显微镜观察测试。用不锈钢剃刀片切割材料, 将材料的表面、断面经离子溅射仪喷金镀膜后进行观察, 见图 1。可见两种生物材料都由均匀分布的细小纤维构成, 具有相互贯穿的通孔结构, 两者 (孔隙率、纤