

## 酶法提取黄芪多糖的工艺优化

张晓伟, 张培正, 官 玮, 陈传福

(山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安, 271018)

**摘 要** 运用 Box-Behnken 中心组合响应面分析法优化纤维素酶法提取黄芪多糖的工艺条件, 探讨了酶解过程中酶解 pH 值、温度和加酶量对多糖提取含量的影响。优化工艺方案为: 酶解 pH4.0, 温度 56.5℃, 加酶量 61U/g, 其多糖的平均含量达到 20.31%。

**关键词** 黄芪多糖, 纤维素酶, 响应面法

黄芪是当前中医临床处方和中成药中用量最大的中药之一, 药界素有“十药八芪”之称。黄芪为豆科植物蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 或膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.] 的干燥根, 主要活性成分是黄芪多糖、黄芪皂苷和黄芪黄酮, 此外还有氨基酸、生物碱、有机酸、硒等化学成分。据药典记载, 黄芪有补气固表, 利尿托毒, 排脓, 敛疮生肌等功效<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 黄芪具有抗氧化、延缓衰老、抗肿瘤、抗病毒、减轻免疫损伤和免疫双向调节、保护肝肾、调节血糖、利尿、改善和预防心脑血管疾病等多方面的药理作用。

多糖是黄芪主要功效成分之一, 几乎均以  $\alpha$ -糖苷键相连。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含量较高, 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  $\beta$ -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<sup>[2]</sup>。实验中运用响应面分析法, 优化酶法提取黄芪多糖的工艺条件, 探讨各因素对响应值的影响, 为黄芪的深度开发和利用提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

黄芪, 购自内蒙古呼和浩特市广益堂大药店, 经鉴定为蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 的干燥根<sup>[1]</sup>。

纤维素酶(Cellulase), 标注活力: 10 u/mg (固形物), Japan (Solarbio)。

### 1.2 实验仪器

722S 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; L8-60M 型离心机, 美国 Backman 公司; 数显 pH 计, 瑞士梅特勒-托利多公司; PB203-N 电子分析天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 江苏国华电器有限公司; SHA-C 水浴恒温振荡器, 江苏金坛亿通电子有限公司; SK-II 涡旋混匀器, 江苏金坛亿通电子有限公司; 旋转蒸发器, 日本东京理化 EYELA 公司; 万能粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; 真空冷冻干燥机, 北京博医康有限公司; 电热恒温干燥箱, 江苏金坛亿通电子有限公司; 真空干燥箱, 上海飞鸽科学仪器有限公司。

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 多糖含量的测定方法

总糖含量的测定采用苯酚-硫酸法; 还原糖含量的测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法, 多糖的含量采用总糖与还原糖的差值表示。

#### 1.3.2 黄芪多糖测定的校正系数

黄芪多糖的精制: 黄芪干制饮片粉碎, 过 40 目筛, 称取 10g 黄芪粉置于圆底烧瓶中, 加入 80% 乙醇溶液 200mL, 加热回流 2h, 抽滤, 滤渣挥干溶剂后加水 200mL, 加热回流 2h, 离心后残渣中加水 100mL, 加热回流 1h, 离心, 合并 2 次上清液, 旋转蒸发浓缩, Sevag 法除去蛋白, 反复振荡萃取 3 次, 取上层液用蒸馏水透析 24h, 离心后上清液加乙醇至醇沉浓度为 80%, 4℃ 静置过夜, 离心后沉淀用无水乙醇、乙醚洗涤, 真空干燥得精制黄芪多糖。

精密称取上述精制黄芪多糖 10mg, 蒸馏水定容于 100mL 容量瓶, 混匀, 按照 1.3.1 方法测定吸光值, 按公式(1)计算校正系数:

$$\text{校正系数 } f = W / (C \cdot V) \quad (1)$$

其中,  $W$ —精制黄芪多糖的质量(mg);

$C$ —精制黄芪多糖溶液中葡萄糖的浓度( $\mu\text{g}/$

第一作者: 硕士研究生(张培正教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-01-17, 改回日期: 2007-03-28

mL);

V—稀释总体积(mL)。

1.3.3 样品中多糖含量的测定

$$\text{黄芪多糖含量} \% = \frac{C \cdot V \cdot f}{W} \times 100$$

其中,C—样品溶液中葡萄糖的浓度(μg/mL);

V—稀释总体积(mL);

f—校正系数;

W—样品黄芪的质量(mg)。

1.4 酶法提取黄芪多糖工艺流程

黄芪干制饮片→粉碎→过筛→称重→乙醇溶液提取→抽滤→滤渣挥干溶剂→水提→离心→沉渣加纤维素酶酶解→灭酶同时第2次水提→离心→合并上清液→适度稀释→测定提取液中多糖含量

2 结果与讨论

2.1 Box-Behnken 试验设计与结果分析

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,综合析因实验的部分因子试验设计结果,选取对酶解过程中黄芪多糖的含量影响显著的3个因素:酶解 pH 值、温度和加酶量,分别以  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  代表,每一个自变量的低、中、高实验水平分别以-1、0、1 进行编码(见表1),且编码值与真实值之间的关系符合下列方程:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$

式中  $x_i$  为自变量的编码值,  $X_i$  为自变量的实际试验水平值,  $X_0$  为实验水平中心点的实际值,  $\Delta X_i$  为单

变量增量,以黄芪多糖的含量为响应值(Y)。

表 1 Box-Behnken 试验设计因子及编码值

编码水平	$X_1$	$X_2$	$X_3$
	pH 值	温度/℃	加酶量/ $U \cdot g^{-1}$ (生药)
-1	3.5	50	50
0	4.0	55	60
+1	4.5	60	70

由前期的部分因子试验可知,纤维素酶法提取黄芪多糖过程中,酶解 pH 值、温度和加酶量对提取液中多糖的含量影响显著,因此本研究采用 Box-Behnken 中心组合设计方法,用表1设置的3因素3水平方式分别进行17组试验,结果见表2。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

试验组别	$x_1$	$x_2$	$x_3$	多糖含量/%	
	pH 值	温度/℃	加酶量/ $U \cdot g^{-1}$	实测值	预测值
1	-1	-1	0	16.263	16.261 4
2	1	-1	0	17.177	17.176 4
3	-1	1	0	15.827	15.827 6
4	1	1	0	16.782	16.783 6
5	-1	0	-1	17.516	17.662 1
6	1	0	-1	15.512	15.657 1
7	-1	0	1	15.184	15.038 9
8	1	0	1	19.061	18.914 9
9	0	-1	-1	18.134	17.989 5
10	0	1	-1	16.537	16.390 2
11	0	-1	1	16.974	17.120 8
12	0	1	1	17.749	17.893 5
13	0	0	0	20.021	20.004 2
14	0	0	0	19.979	20.004 2
15	0	0	0	20.042	20.004 2
16	0	0	0	19.917	20.004 2
17	0	0	0	20.026	20.004 2

注: $x_1 = (X_1 - 4.0)/0.5$ ;  $x_2 = (X_2 - 55)/5$ ;  $x_3 = (X_3 - 60)/10$ 。

表 3 回归模型方差分析

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	47.942 05	9	5.326 894	203.809 9	< 0.000 1	显著
残差	0.182 956	7	0.026 137			
失拟项	0.169 665	3	0.056 555			
纯误差	0.013 291	4	0.003 323			
总和	48.125	16				
$R=0.998\ 1$ $R^2=0.996\ 2$ $Adj\ R^2=0.991\ 3$						

利用 Design-Expert7.0.3 软件对表2中的试验数据进行多元回归拟合,表3为回归分析结果。回归方差分析显著性检验表明,该模型回归显著,模型的  $R^2=0.996\ 2$ ,说明回归方程的拟合程度较好,可用于酶法提取黄芪多糖试验的理论预测。

由表4可知,经回归拟合后,选择对响应值(多糖

含量)影响显著的各项,各因子(酶解 pH 值、温度和加酶量)对响应值的影响可用下面回归方程表示:

$$\begin{aligned} \text{多糖含量 } Y = & 20.004\ 2 + 0.467\ 75x_1 - 0.206 \\ & 63x_2 + 0.158\ 625x_3 + 0.010\ 25x_1x_2 + 1.470\ 25x_1x_3 \\ & + 0.593x_2x_3 - 2.011\ 1x_1^2 - 1.480\ 85x_2^2 - 1.174 \\ & 85x_3^2 \end{aligned}$$

表 4 回归方程系数显著性检验

系数项	回归系数	自由度	标准误差	95%置信下限	95%置信上限	P 值
Intercept	20.004 2	1	0.072 3	19.833 24	20.175 16	
$X_1$ (pH)	0.467 75	1	0.057 158	0.332 592	0.602 908	< 0.000 1
$X_2$ (温度)	-0.206 63	1	0.057 158	-0.341 78	-0.071 47	0.008 6
$X_3$ (加酶量)	0.158 625	1	0.057 158	0.023 467	0.293 783	0.027 5
$X_1 X_2$	0.010 25	1	0.080 834	-0.180 89	0.201 392	0.902 7
$X_1 X_3$	1.470 25	1	0.080 834	1.279 108	1.661 392	< 0.000 1
$X_2 X_3$	0.593	1	0.080 834	0.401 858	0.784 142	0.000 2
$X_1^2$	-2.011 1	1	0.078 787	-2.197 4	-1.824 8	< 0.000 1
$X_2^2$	-1.480 85	1	0.078 787	-1.667 15	-1.294 55	< 0.000 1
$X_3^2$	-1.174 85	1	0.078 787	-1.361 15	-0.988 55	< 0.000 1

## 2.2 因素间的交互作用

根据回归方程利用 Design-Expert7.0.3 软件作不同因子的响应面分析图和等高线图,酶解 pH 值、温度和加酶量 3 个关键因子及其交互作用对黄芪多糖含量的影响结果可通过图 1~图 6 直接反映出来。

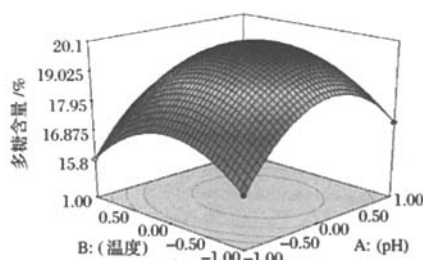


图 1 pH 值与温度对黄芪含量影响的响应面图

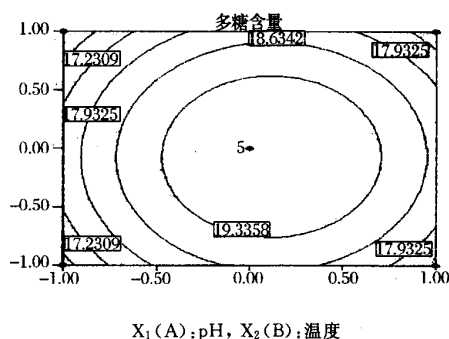


图 2 pH 值与温度对黄芪含量影响的等高线图

从图 1 和图 2 响应面图和等高线图可以直观地看出,在加酶量为 60U/g(生药)时,酶解 pH 值与酶解温度的变化对黄芪多糖提取含量的交互作用不显著。

从图 3 和图 4 响应面图和等高线图可以直观地看出,在酶解温度为 55℃时,酶解 pH 值与加酶量的变化对黄芪多糖提取含量的交互作用显著。

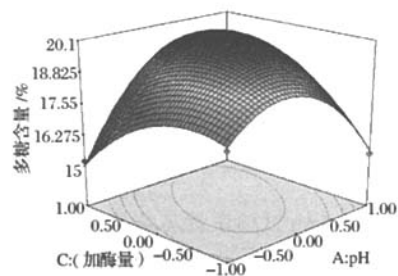


图 3 pH 值与加酶量对黄芪含量影响的响应面图

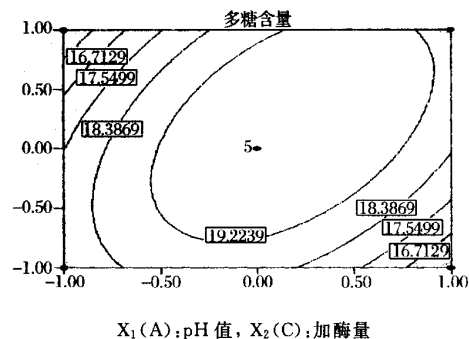


图 4 pH 值与加酶量对黄芪含量影响的等高线图

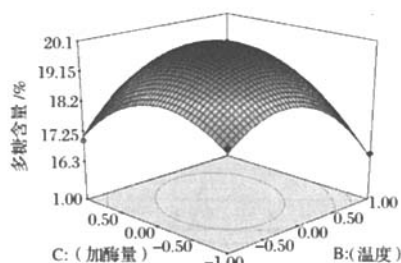


图 5 温度与加酶量对黄芪含量影响的响应面图

从图 5 和图 6 可以直观地看出,在酶解 pH 值为 55℃时,酶解 pH 温度与加酶量的变化对黄芪多糖提取含量的交互作用显著。

## 2.3 工艺条件的确定

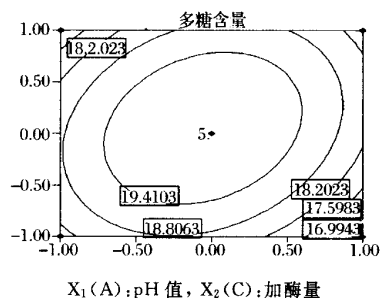


图6 温度与加酶量对黄芪含量影响的等高线图

经典型性分析可知,黄芪多糖含量达到最高时所需的参数条件为:酶解 pH 值为 4.02,温度为 56.57℃,加酶量为 61.16U/g,预测黄芪多糖的含量达到 21.06%。

为检验响应曲面法所建立的数学模型的可靠性,采用上述最优酶法提取条件进行多糖的提取试验,同时考虑到实际操作便利,将酶法提取黄芪多糖的最佳酶解条件修正为 pH 值为 4.0,温度为 56.5℃,加酶量为 61U/g,进行 5 次重复试验,实际测得的黄芪多糖的平均含量为 20.31%,与理论预测值相比相对误差在 1.20%左右。因此,采用 RSM 法优化得到的酶解条件提取黄芪多糖的参数准确可靠,具有实用价值。

### 3 结 论

运用 Box-Behnken 响应面分析法,得出酶法提

取黄芪多糖工艺的优化方案是酶解 pH 值为 4.0,温度为 56.5℃,加酶量为 61U/g,其多糖的平均含量达到 20.31%;经试验研究表明,未加纤维素酶提取时所得黄芪多糖的平均含量为 9.45%,可见,酶法提取的多糖含量与未加酶提取相比可提高 1 倍多,纤维素酶在提取过程中能有效的促进多糖物质的溶出。酶法提取时各因素与黄芪多糖含量的关系为二次曲线关系。酶解 pH 值与加酶量、酶解温度与加酶量对黄芪多糖提取含量的交互作用显著。

### 参 考 文 献

- 1 中国药典 [S]. Vol II. 2000
- 2 闫巧娟,韩鲁佳,江正强. 纤维素酶法提取黄芪多糖[J]. 中草药,2005,36(12):1 804~1 807
- 3 Ashima Vohra. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala* [J]. Process Biochemistry,2002,37:999~1 004
- 4 张庆芝,吴晓俊,刘 涤. 影响黄芪有效成分含量的因子的研究[J]. 中草药,2002,33(4): 314~315
- 5 陈学伟,马书林. 酶法提取黄芪多糖的研究[J]. 上海中医药杂志,2005,39(1):56~58
- 6 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报,2001,22:91~94

## Optimization of Extraction Technology for *Astragalus* Polysaccharides by Cellulase

Zhang Xiaowei, Zhang Peizheng, Gong Wei, Chen Chuanfu

(College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

**ABSTRACT** Box-Behnken center-united experiment design attached to response surface method was applied to optimize the extraction condition for *Astragalus* polysaccharides(APS) by cellulase. How the parameters which influence the content of APS, such as pH value, reaction temperature and enzymatic quantity were discussed. The results indicated that the optimal parameters of extraction technology for the content of APS by cellulase were: pH value 4.0, reaction temperature 56.5℃, enzymatic quantity 61U/g. The maximal content of APS in average was 20.31% in this paper.

**Key words** *Astragalus* polysaccharides (APS), cellulase, response surface method(RSM)