

酶解法提取地鳖虫多糖工艺的优化

罗志文^{1,2}, 刘娟², 赵永勋¹

(1. 佳木斯大学 生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学 药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:采用酶解法对地鳖虫多糖进行提取试验, 优化提取工艺。通过单因素和正交试验方法, 筛选提取条件, 测定多糖含量, 摸索地鳖虫多糖提取的最佳酶用量、提取时间和温度。结果表明: 地鳖虫多糖提取的最佳酶用量为 300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 提取温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 提取时间 3 h, 多糖含量为 14.326%。

关键词:地鳖虫多糖; 酶解法; 提取工艺; 提取条件优化

中图分类号:X174 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2012)08-00102-03

地鳖虫(*Eupolyphaga sinensis* Walker), 商品名为土元, 又名土鳖虫、簸箕虫^[1]。明代李时珍的《本草纲目》中就有关于其药用的记载, 它是传统的活血化瘀类昆虫药^[3]。土元性寒、味咸、微毒。对关节炎、跌打损伤有疗效, 并对白血病和癌症都有疗效。地鳖虫主产区为福建、河北、广西、广东、山东等地^[4]。通过分析已发表的文献发现^[5-9], 鲜见有关地鳖虫多糖的研究报道。

该试验采用蛋白酶水解法对地鳖虫进行多糖提取试验, 优化多糖的提取工艺, 为建立高效、实用的地鳖虫多糖提取途径提供参考。采用苯酚-硫酸法测定地鳖虫多糖的含量, 对比不同提取条件多糖的提取率, 为后续地鳖虫的保健药品及功能性食品开发提供可靠的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

地鳖虫药材购自河北省安国中药材市场, 经佳木斯大学生命科学学院张雨奇教授鉴定为蜚蠊目鳖蠊科地鳖虫, 现保存于佳木斯大学应用昆虫研究所。

1.2 方法

1.2.1 粉末制备与预处理 采用中药粉碎机对地鳖虫进行粉碎, 经粉碎后过 40 目筛, 放于 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内干燥后备用。

用石油醚除去脂溶性杂质。按照原料/石油醚=1/3(W/V)的量加入石油醚, 在室温下浸泡 8~12 h, 过滤, 用旋转蒸发器浓缩回收石油醚。重复 2 次, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 干燥后备用。

称取经预处理地鳖虫干粉各 5 g, 按设定的木瓜蛋白酶用量、提取温度、提取时间在水浴锅内进行地鳖虫多糖提取, 试验完成后, 迅速升温至 100 $^{\circ}\text{C}$ 酶灭活 5 min, 抽滤, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 用真空旋转蒸发器浓缩至适当体积, 加入 4 倍量的 95% 乙醇醇沉 24 h, 离心, 沉淀物用无水乙醇洗涤脱水 2 次, 低温干燥即得到地鳖虫多糖。

1.2.2 地鳖虫多糖提取工艺的单因素试验 地鳖虫多糖提取工艺优化试验的 3 个因素不同范围分别为: 木瓜蛋白酶用量(A): 100~300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 提取温度(B): 40~60 $^{\circ}\text{C}$; 提取时间(C): 1~5 h。每个影响因子设计 5 个重复性试验, 选用平均值作为试验参数, 确定各因素对试验的影响。

1.2.3 地鳖虫多糖提取工艺的正交试验 为了进一步优化提取条件, 根据单因素试验结果, 选择木瓜蛋白酶用量(A)、提取温度(B)、提取时间(C)这 3 个因素进行正交优化试验, 采用 $L_9(3^3)$ 正交表安排试验, 各因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平
Table 1 The table of factors and levels of orthogonal design

水平 Level	A 酶用量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Papain	B 提取温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	C 浸提时间/h Time
1	100	40	1
2	200	45	2
3	300	50	3

收稿日期: 2012-05-16

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术资助项目(11531384)

第一作者简介: 罗志文(1975-), 男, 黑龙江省大庆市人, 硕士, 副教授, 从事药用昆虫学研究。E-mail: 13803668020@126.com。

通讯作者: 赵永勋(1955-), 男, 黑龙江省佳木斯市人, 学士, 教授, 硕士研究生导师, 从事药用真菌生物化学研究。E-mail: zhaoyongxun887@163.com。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

如图 1,图 2,图 3 所示,当木瓜蛋白酶用量为 $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,地鳖虫多糖含量为 9.85%;提取温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,多糖含量为 14.17%;提取时间为 4 h 时,多糖含量为 11.42%。

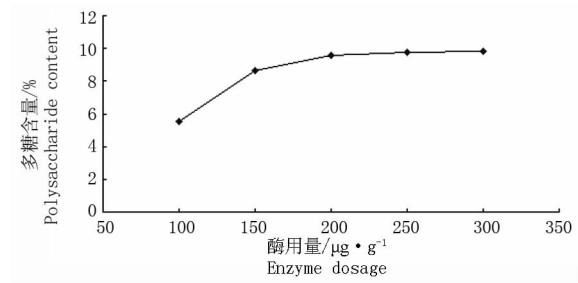


图 1 酶用量对地鳖虫多糖含量的影响
Fig.1 The effect of enzyme dosage on *Eupolyphaga sinensis* polysaccharide content

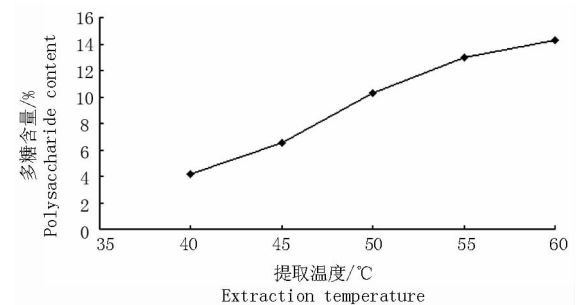


图 2 提取温度对地鳖虫多糖含量的影响
Fig.2 The effect of extraction temperature on *Eupolyphaga sinensis* polysaccharide content

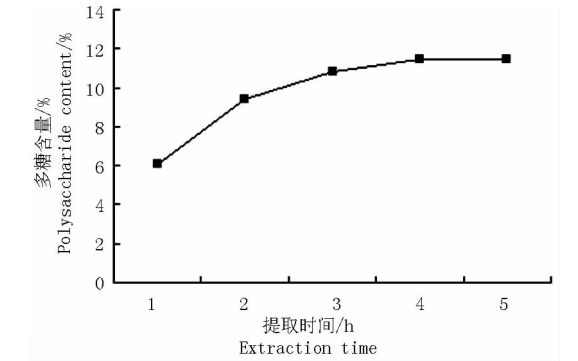


图 3 提取时间对地鳖虫多糖含量的影响
Fig.3 The different extraction time on *Eupolyphaga sinensis* polysaccharide content

2.2 正交试验

由表 2 可知,各试验因素对地鳖虫多糖含量影响的顺序为: $A>B>C$,即酶用量对地鳖虫多糖含量影响最大,其次为提取温度,提取时间和料

液比影响较小。确定最佳的提取工艺为 $A_3B_3C_3$,即酶用量为 $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间 3 h。

表 2 正交试验结果与极差分析
Table 2 Scheme and results of orthogonal experiment

序号 No.	A	B	C	多糖含量/%
				Polysaccharide content
1	1	1	1	10.121
2	1	2	2	9.009
3	1	3	3	12.581
4	2	1	2	9.219
5	2	2	3	11.628
6	2	3	1	13.512
7	3	1	3	14.317
8	3	2	1	12.891
9	3	3	2	13.262
I	31.71	33.66	36.07	
II	34.36	33.53	36.84	
III	40.47	39.36	37.10	
K1	10.57	11.22	12.02	
K2	11.45	11.18	12.28	
K3	13.49	13.12	12.37	
极差 Range	2.92	1.94	0.35	

在酶用量为 $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间 3 h 条件下进行提取多糖试验,经 3 次重复后,最后测得多糖含量为 14.326%。

3 结论与讨论

3.1 温度对地鳖虫多糖提取的影响

随着提取温度的升高,地鳖虫多糖含量也有所增加,从 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 到 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增加的幅度较明显,可能是由于随着温度的升高而酶活力逐渐加强。温度对多糖的提取具有显著影响。温度显著降低时,多糖提取率呈下降趋势,温度升高到一定程度,可能会影响木瓜蛋白酶的活性,多糖含量增加不明显。综合各因素发现, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 对地鳖虫多糖提取的效果较好。

3.2 蛋白酶用量对地鳖虫多糖提取的影响

随着蛋白酶用量的增加,地鳖虫多糖含量也

逐渐增大。可能是由于随着浓度梯度的幅度增大,细胞内容物的扩散动力就越大,多糖溶出物就越多。当酶用量为 $300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,多糖的含量达到最大值。

3.3 提取时间对地鳖虫多糖提取的影响

随着提取时间的延长,地鳖虫多糖含量也逐渐增加,1~3 h 多糖含量增加的幅度较大,而 3~5 h 多糖含量增加的幅度不明显,多糖随着提取时间的延长,在木瓜蛋白酶的作用下,所得多糖含量也越多,多糖溶出的越完全。

3.4 正交试验对地鳖虫多糖提取的优化

蛋白酶水解法是近几年兴起的一种多糖提取技术,这种方法基本不会造成多糖的损失,可减少原材料的浪费,不同药材在提取次数过多时会产生较多的滤液,给浓缩带来负担。试验表明,多次提取不能继续增加多糖的提取量,反而浪费提取液和时间。选择合理的提取次数既可以节省材料,降低成本,又不会影响多糖的提取量^[10]。

影响地鳖虫多糖提取率的因素主要有:木瓜蛋白酶用量、提取温度和提取时间等因素。而通过正交试验可知,地鳖虫多糖含量影响最大,其次为提取温度对木瓜蛋白酶用量,提取时间和提取次数对多糖提取影响相对较小,地鳖虫多糖最佳提取工艺条件为 $A_3 B_3 C_3$,即酶用量为

$300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,提取温度 50°C ,提取时间 3 h 多糖含量为 14.326%。

通过采用酶解法对地鳖虫多糖提取工艺的优化研究,可以获得非常理想的地鳖虫多糖,为后期进行地鳖虫多糖分离纯化、成分分析和对荷瘤小鼠抗肿瘤活性等试验积累试验数据。

参考文献:

- [1] 汪世宏.我国药用地鳖虫的研究[J].中药材,1990,13(6):11-12.
- [2] 张安宁,桂仲争.地鳖虫的利用价值及其开发前景[J].生物学杂志,2008,25(2):59-61.
- [3] 王丹.药用地鳖虫的研究进展[J].科技经济市场,2010(6):108-109.
- [4] 田军鹏,黄文,雷朝亮.地鳖虫药理作用研究概况[J].时珍国医国药,2006,17(3):418-419.
- [5] 暴昕,林晶.中药地鳖虫药用价值介绍[J].中国城乡企业卫生,2011(4):119-120.
- [6] 尹鲁生.土鳖虫中氨基酸的含量[J].中草药,1987,18(2):42.
- [7] 李兴暖,牛力,赵勇.地鳖虫纤溶活性蛋白组分抑制肿瘤作用研究[J].时珍国医国药,2011,22(5):1149-1151.
- [8] 苏德民,沈烈行,徐瑞军,等.土鳖虫的化学成分及药理作用研究进展[J].时珍国药研究,1997,8(2):153.
- [9] 卢颖,江佩芬.土鳖虫化学成分研究[J].中国中药杂志,1992,17(8):487-488.
- [10] 师莉莎,刘华忠,吴金龙,等.酶法提取乌贼墨多糖工艺探讨[J].食品科技,2011,36(4):138-141.

Enzymatic Extraction of *Eupolyphaga sinensis* Polysaccharide Technology Optimization

LUO Zhi-wen^{1,2}, LIU Juan², ZHAO Yong-xun¹

(1. Life Sciences College of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. Medicine College of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: The *Eupolyphaga sinensis* polysaccharides extraction test was conducted and extraction process was optimized by enzymatic hydrolysis. The extraction condition was selected and the content of polysaccharide was determined through the single factor and orthogonal test method, and the optimum enzyme dosage, extraction time and temperature of *Eupolyphaga sinensis* polysaccharide were studied. The results showed that the optimum conditions of *Eupolyphaga sinensis* polysaccharide was extraction enzyme dosage of $300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, extraction temperature of 50°C , extraction time 3 h, the content of polysaccharides was 14.326%.

Key words: *Eupolyphaga sinensis* polysaccharide; enzymatic hydrolysis; extraction; extraction condition optimization