

不同提取方法对龙眼多糖性质的影响

赵晨淏, 刘钧发, 冯梦莹, 温玲蓉, 游丽君, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 以龙眼为原料, 利用水提法、酶提法、碱提法、酸提法、超声法五种方法来提取龙眼多糖, 研究不同提取方法下龙眼多糖的提取率、还原力、DPPH·清除率、单糖组成等的区别, 比较五种提取工艺的优缺点。实验结果表明, 五种提取方法相比较, 酶提法得率最高, 达到 6.78%, 碱提法得率最低, 为 1.84%。酶提法得到的龙眼多糖抗氧化性最好, 超声法所得多糖的活性次之, 而碱提多糖的抗氧化活性最差。

关键词: 龙眼多糖; 提取率; 抗氧化活性; 单糖组成

文章编号: 1673-9078(2012)10-1298-1301

Effect of Different Extraction Methods on the Properties of Longan Polysaccharides

ZHAO Chen-hao, LIU Jun-fa, FENG Meng-ying, WEN Ling-rong, YOU Li-jun, ZHAO Mou-ming

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Five different extraction methods (hot water extraction, enzymatic extraction, alkali extraction, acid extraction and ultrasonic extraction) were used to extract longan polysaccharides. The extraction yield, reducing power, DPPH radical scavenging activity and monosaccharide composition were evaluated to compare the advantage and disadvantage of different extraction methods. The results showed that polysaccharide prepared by enzymatic extraction had the highest extraction yield 6.78%, while that of alkali extraction had the lowest yield 1.84%. The polysaccharide prepared by enzymatic extraction exhibited the strongest antioxidant activity, ultrasonic extraction ranked the second, while that of alkali extraction showed the lowest antioxidant activity.

Key words: longan polysaccharide; extraction yield; antioxidant activity; monosaccharide composition

龙眼属无患子科龙眼属植物, 是我国的特产水果。龙眼鲜食质地爽脆, 口味清甜, 营养丰富, 具有补益心脾、养血安神、润肤美容等多种功效, 可治疗贫血、心悸、失眠、健忘、神经衰弱及病后、产后身体虚弱等症。现代医学研究也表明, 龙眼肉具有明显的抗衰老、提高免疫力、抗癌、降血脂等作用^[1]。龙眼多糖是龙眼中最主要的功效成分。因此, 研究龙眼多糖的高效提取对开发利用龙眼资源具有非常重要的意义。

热水浸提法以工艺简单、易于推广等特点为人们所接受, 但其提取率较低、能耗高、提取的多糖的活性较低^[2]。超声波辅助具有时间短、效率高、节能, 操作简便, 不改变多糖原有性质等特点^[3]。酶解法是最大限度从植物体内提取有效成分的方法之一, 具有条件温和、杂质易除、工艺简便、多糖得率高、提取物生

物活性较高等优点。

多糖的分子量与其生物活性具有密切关系。王健等^[4]发现, 多糖的分子量与水溶性对其生物活性影响很大。分子量在 100~200 kDa 之间的多糖片段具有较高的生物活性, 而相对分子量在 5~10 kDa 之间的多糖片段生物活性较低^[5]。而采用酸碱水解法、酶解法或超声波破碎等方法可以降低多糖分子量, 降低溶液粘度, 提高其水溶性, 从而提高其生物活性^[4]。

本论文以龙眼为原料, 分别采用水提法、酶提法、碱提法、酸提法、超声法五种方法来提取龙眼多糖, 研究不同提取方法下龙眼多糖的提取率、还原力、DPPH·清除率、单糖组成等的区别, 比较五种提取工艺的优缺点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龙眼干, 购于超市; DPPH, Trolox, FL 及 APPH 购于 Sigma 公司; 复合植物水解酶, 诺维信公司; 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2012-06-21

基金项目: 国家自然科学基金 (31101222); 广东省科技计划项目 (2011B030500004); 广东省产学研项目 (2010A090200041); 企业横向项目“生物活性多糖构效关系及浓缩新工艺研究方案”资助

通讯作者: 游丽君 (1982-), 女, 博士, 方向为食品生物技术

1.2 仪器与设备

Trace DSQ-II 气相色谱-质谱联用仪, 美国 Thermo 公司; 高速冷冻离心机 (GL-21M), 长沙湘仪离心机械有限公司; 荧光酶标仪 Varioskan Flash, 美国 Thermo 公司; 紫外可见分光光度计 UV-2100, 广州市广一科学仪器有限公司; 精密 pH 计 PHS-3E, 上海雷磁仪器厂; 恒温振荡器 THZ-82A, 常州澳华仪器有限公司, 全自动运动粘度测定仪 YT-265Z, 上海羽通仪器仪表厂。

1.3 实验方法

1.3.1 龙眼果肉的预处理

干龙眼经剥皮、去核, 取果肉。把果肉置于搅拌机中粉碎, 装在保鲜袋中备用。

1.3.2 龙眼多糖的提取

1.3.2.1 热水提取

称取一定量龙眼样品, 料液比为 1:25 (m/V) 加入蒸馏水, 在 100 °C 下浸提 2 h, 滤布过滤得上清液, 滤渣按上述方法重复提取一次, 合并滤液, 将滤液减压浓缩至一定体积, 加入 4 倍体积 95% 乙醇, 置于 4 °C 冰箱过夜。次日, 离心 (4800 r/min, 15 min) 得多糖沉淀, 用水复溶得龙眼多糖溶液 A。

1.3.2.2 酸法提取。

称取一定量龙眼样品, 料液比为 1:25 (m/V) 加入 pH=3.0 的盐酸溶液, 在 50 °C 下水浴浸提 2 h, 滤布过滤得上清液, 滤渣按上述方法重复提取一次, 合并滤液, 将滤液减压浓缩至一定体积, 加入 4 倍体积 95% 乙醇, 置于 4 °C 冰箱过夜。次日, 离心 (4800 r/min, 15 min) 得多糖沉淀, 用水复溶得龙眼多糖溶液 B。

1.3.2.3 碱法提取

称取一定量龙眼样品, 料液比为 1:25 (m/V) 加入 pH=10.0 的氢氧化钠溶液, 在 50 °C 下水浴浸提 2 h, 滤布过滤得上清液, 滤渣按上述方法重复提取一次, 合并滤液, 将滤液减压浓缩至一定体积, 加入 4 倍体积 95% 乙醇, 置于 4 °C 冰箱过夜。次日, 离心 (4800 r/min, 15 min) 得多糖沉淀, 用水复溶得龙眼多糖溶液 C。

1.3.2.4 酶法提取

称取一定量的龙眼样品, 料液比为 1:25 (m/V), 用盐酸溶液调节 pH 值到 4.5, 加入复合植物水解酶, 50 °C 水浴反应 1 h, 灭酶 10 分钟。滤布过滤得上清液, 将滤液减压浓缩至一定体积, 加入 4 倍体积 95% 乙醇, 置于 4 °C 冰箱过夜。次日, 离心 (4800 r/min, 15 min) 得多糖沉淀, 用水复溶得龙眼多糖溶液 D。

1.3.2.5 超声法提取

称取一定量的龙眼样品, 料液比为 1:25 (m/V),

在功率 560 W 下超声 30 分钟。滤布过滤得上清液, 将滤液减压浓缩至一定体积, 加入 4 倍体积 95% 乙醇, 置于 4 °C 冰箱过夜。次日, 离心 (4800 r/min, 15 min) 得多糖沉淀, 用水复溶得龙眼多糖溶液 E。

1.3.3 多糖提取率的测定

多糖的含量根据苯酚硫酸法^[6]测定。

多糖提取率(%)=多糖含量/原料重量×100%

1.3.4 多糖粘度的测定

配置浓度为 0.05、0.1 mg/mL 的多糖溶液, 用粘度自动测定仪测试其粘度。

1.3.5 单糖组成的测定

参照 Guerrant 等^[7]的糖精乙酸酯衍生物气相色谱法, 并将方法适当修改后对龙眼多糖的单糖组成进行分析。

称取多糖样品 2~5 mg, 加入 4 M 三氟乙酸 5 mL, 密封, 110 °C 水解 2 h。水解液于 50 °C 真空旋转蒸发至干, 加入甲醇 3 mL, 再旋干, 重复 3 次得松茸多糖水解物。

水解物中加入盐酸羟胺 10 mg、内标肌醇六乙酸酯 1 mg 和吡啶 2 mL, 密封, 90 °C 水浴 30 min, 再加入 2 mL 醋酸酐后又 90 °C 水浴 30 min, 加入 2 mL 水终止反应, 加入 2 mL 二氯甲烷萃取, 重复两次, 弃去水层, 定容至 4 mL, 加入无水硫酸钠干燥过膜备用。

气相色谱检测程序: TR-5MS 30 m×0.25 mm×0.25 μm 规格弹性毛细管柱; 程序升温: 初始柱温 100 °C, 保持 2 min, 然后以 5 °C/min 升至 280 °C, 保持 5 min; 进样体积 1 μL, 进样口温度 250 °C; 载气量(He)流量 1 mL/min; 分流比 10:1; 质谱条件传输线温度 280 °C; 离子源温度 250 °C; 电子能量 70 eV; 质量扫描范围 m/z: 30~650 amu。

各种标准单糖(鼠李糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖)在相同条件下进行糖精乙酸酯衍生化处理, 相同条件气相色谱分析。

根据色谱图中色谱峰出峰时间和质荷比确定样品单糖组成, 根据峰面积确定个单糖的摩尔比。

1.3.6 DPPH·清除能力^[8]

配制 DPPH 自由基溶液 0.2 mmol/L, DPPH 自由基乙醇混合溶液在 517 nm 处有紫色基团特征吸收峰。将龙眼多糖提取液按一定浓度梯度稀释, 用水与乙醇溶液调零。实验分为样品组、对照组和空白组, 加入样品和 DPPH 自由基溶液后, 用涡旋振荡器充分混匀, 避光反应 30~40 min, 在 517 nm 处测其吸光值。A_{样品}=样品 (2 mL)+DPPH 溶液 (2 mL); A_{对照}=样品 (2 mL)+无水乙醇 (2 mL); A_{空白}=DPPH 溶液 (2 mL)+无水乙醇 (2 mL)。DPPH 自由基清除率%=[1-(A_{样品}-A_{对照})/A

空白]×100%。

1.3.7 还原力测定

参考 Oyaizu^[9]的方法, 稍作修改。将龙眼多糖提取液按一定梯度稀释, 然后分别加入 2.5mL 磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 6.6)和质量分数 1% 铁氰化钾溶液 5 mL, 置于 50 °C 水浴中反应 20 min, 然后加入 10% 的三氯乙酸 2 mL, 摇匀, 于 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL 加入 2 mL 蒸馏水和 0.4 mL 0.1% 的三氯化铁溶液, 混合均匀, 室温下反应 10 min 后在波长 700 nm 处测定吸光值。

1.3.8 氧自由基吸收能力 (ORAC) 测定

参考续洁琨^[10]的方法, 在 96 孔板各微孔中分别加入浓度为 0.05 mg/mL 的多糖样品 20 μL 后添加 pH=7.4 的磷酸盐缓冲溶液 20 μL 及浓度为 7 nmol/L 的荧光素溶液 20 μL, 在 37 °C 下预置 15 min 后, 用多道移液器迅速在各孔中加入 12 mmol/L 的 AAPH 140 μL 启动反应, 并将微孔板置于酶标仪中在 37 °C 下以激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm 进行连续测定, 每 2 min 测定一次各孔荧光强度, 测定时间共 2 h。

2 结果与讨论

2.1 不同方法提取龙眼多糖的提取率比较

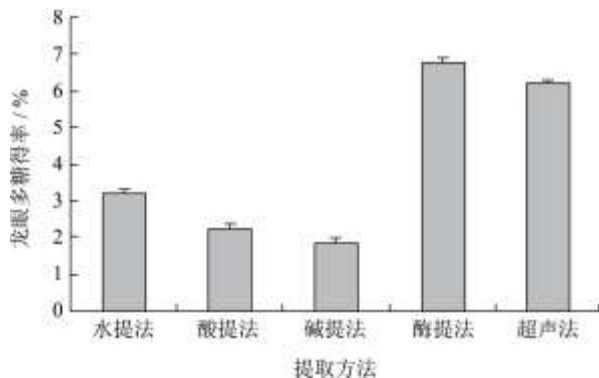


图 1 不同方法提取龙眼多糖的提取率比较

Fig.1 The extraction yields of longan polysaccharides by different extraction methods

从图1中可知, 五种提取方法中以酶提法多糖提取率最高, 达到6.78% (是水提法的2.13倍)。超声法的提取率次之, 达6.2%。碱提法提取率最低, 只有1.84%。这与李红卫等^[11]的研究结果一致。这可能因为龙眼果肉细胞壁阻碍了细胞内多糖等活性物质的溶出, 该细胞壁的主要组成成分是果胶和纤维素类物质, 而复合植物水解酶能酶解龙眼细胞壁, 并酶解与多糖结合在一起的蛋白质, 从而有利于胞内多糖的溶出^[12]。

2.2 粘度

如图2所示, 五种方法提取的多糖粘度均随着多糖浓度的增加而增大。在相同的多糖浓度下, 粘度从高

到低依次为: 水提法>酸提法=碱提法>超声法=酶提法, 其中酸提法和碱提法所得多糖的粘度无显著性差异, 超声法和酶提法所得多糖的粘度无显著性差异 (P>0.05)。当龙眼多糖浓度1.1 mg/mL时, 水提法多糖的粘度最大, 为5.22 cP; 酶提法和超声法所得多糖的粘度最小, 为3.12 cP。根据滕利荣^[13]的研究表明, 分子粘度的与其分子量大小成正比关系, 所以水提多糖分子量较大, 可能因为水提法对多糖分子糖苷键破坏较少。而酶提法、超声法所得多糖溶液粘度较小, 表明其分子量较小, 可能因为酶法和超声法在破坏龙眼细胞壁的同时, 对其多糖分子也产生了降解作用, 使糖苷键断裂而得到分子量较小的多糖。

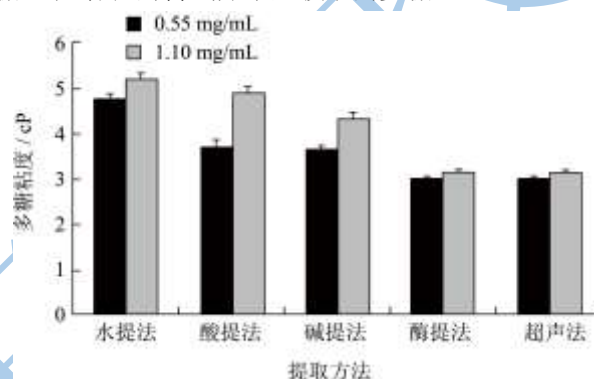


图 2 不同方法所得龙眼多糖的粘度比较

Fig.2 The viscosity of longan polysaccharides by different extraction methods

2.3 单糖组成

表 1 不同方法提取龙眼多糖的单糖组成

Table 1 The monosaccharide compositions of longan polysaccharides by different extraction methods

单糖组成/%	水提法	酸提法	碱提法	酶提法	超声法
阿拉伯糖 Ara	8.75	12.52	11.95	10.11	10.92
鼠李糖 Rha	3.58	0.0054	9.50	16.68	15.31
半乳糖 Gal	23.64	32.74	42.15	16.18	15.32
葡萄糖 Glc	64.04	51.33	33.05	55.70	56.84
半乳糖醛酸 GalA	-	4.41	3.35	1.33	1.40

由表1可知, 提取的龙眼多糖是主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖组成的杂多糖。其中葡萄糖含量最高, 水提法、酸提法、酶提法、超声法所得多糖的葡萄糖含量分别为64.04%、51.33%、55.70%、56.84%; 碱提多糖的半乳糖含量较高, 达42.15%。酸提所得多糖的阿拉伯糖含量最高, 达12.52%; 酶提多糖的鼠李糖含量最高, 达16.68%; 半乳糖醛酸含量最高的酸提多糖, 达4.41%。研究表明^[14], 多糖的活性与其单糖组成有密切关系。不同方法所得产物的单糖组成不同, 其抗氧化活性也不同。

2.4 DDPH 的清除能力

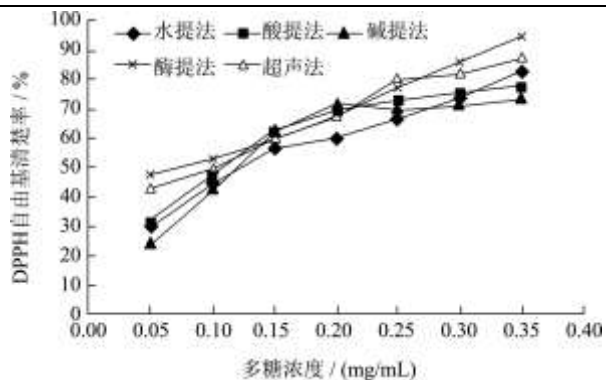


图3 不同方法所得龙眼多糖的DPPH 自由基清除能力比较

Fig.3 DPPH radical scavenging activity of longan polysaccharides by different extraction methods

从图3可知, 龙眼多糖的DPPH·清除能力随着多糖浓度的增加而增大, 呈现明显的量效关系。当多糖浓度为0.35 mg/mL时, 酶提多糖的DPPH·清除能力高达94.7%, 超声法所得多糖的清除活性次之, 达87.98%, 而碱提法所得多糖的活性最低, 为74%。五种方法提取的多糖的DPPH·清除能力从高到低依次为: 酶提法>超声法>水提法>酸提法>碱提法。这可能是因为酶提和超声提取降解了龙眼大分子多糖, 使其溶解度增加, 更多活性基团暴露, 容易捕获DPPH自由基。此外, 张丽霞等^[15]的研究结果表明: 水提多糖的DPPH·清除能力强于酸提法、碱提法, 这与本实验结果一致。

2.5 龙眼多糖还原力

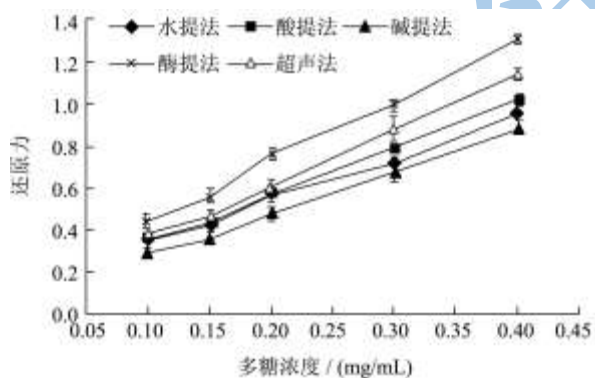


图4 不同方法所得龙眼多糖的还原力比较

Fig.4 The reducing power of longan polysaccharides by different extraction methods

从图4中可知, 龙眼多糖的还原力随着多糖浓度的增加而增强。酶提法所得多糖的还原力最高, 当多糖浓度为0.4 mg/mL时, 其还原力高达1.309, 是水提多糖的1.37倍。超声法所得多糖的还原力次之, 为1.14。而碱提法所得多糖的还原力最低, 当多糖浓度为0.4 mg/mL时, 其还原力仅为0.89。这与DPPH清除活性的结论一致。

2.6 氧自由基吸收能力 (ORAC) 测定

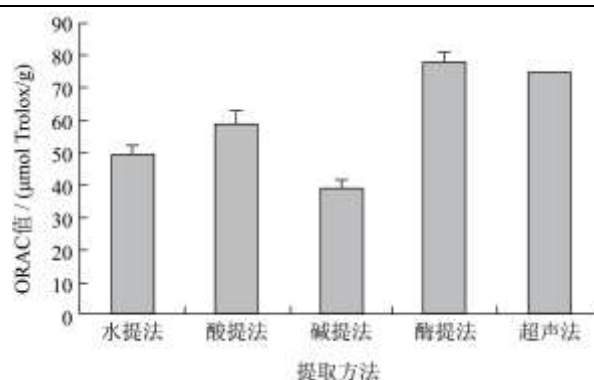


图5 不同方法所得龙眼多糖的ORAC 值比较

Fig.5 The ORAC values of longan polysaccharides by different extraction methods

氧自由基吸收能力的测定方法 (ORAC 法) 主要是根据荧光素钠盐(FL)与 AAPH 在 37 °C pH 为 7.4 的环境下发生氧化反应, FL 荧光素转化为非荧光物质, 通过记录荧光素初始值到荧光素值为零时的面积来判断抗氧化物质抑制自由基的能力。目前一般采用净面积来表示, 即样品的荧光面积减去未添加样品前的荧光面积, 再以 Trolox 为标准物作标准曲线, 用 Trolox 的当量来表示抗氧化能力。由图5可知, 多糖的 ORAC 值由大到小依次为: 酶提法>超声法>酸提法>水提法>碱提法, 其 ORAC 值分别为: 78.42、74.88、58.83、49.78 和 38.60 μmol Trolox/g。此结果与多糖的 DPPH 自由基清除活性、还原力基本一致。

3 结论

本文比较了五种方法提取所得龙眼多糖的提取率、粘度、单糖组成及抗氧化活性。实验表明: 五种提取工艺中, 以酶提法的提取率最高6.78%, 是水提法的2.13倍, 碱提法提取率最低, 只有1.84%。在相同的多糖浓度下, 粘度从高到低依次为: 水提法>酸提法=碱提法>超声法=酶提法。所得多糖主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖组成的杂多糖, 但不同提取方法所得多糖的单糖组成差异也较大。酶提多糖的抗氧化活性最高, 其次为超声法所提多糖, 而碱提法所得多糖的抗氧化活性最差。

参考文献

[1] 韩冬梅, 苏美习, 吴振先, 等. 龙眼贮藏保鲜级加工技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009

[2] 陈耀华, 陈健. 响应面法优化鸡枞菌多糖的提取工艺[J]. 现代食品科技, 2012, 28(5): 541-544

[3] 彭川丛, 孔静, 游丽君, 等. 超声波辅助热水浸提香菇多糖响应面优化工艺及其抗氧化活性的研究[J]. 现代食品科技, 2011,

- 27(4):452-456
- [4] 王健,龚兴国.多糖的抗肿瘤及免疫调节研究进展[J].中国生化药物杂志,2001,22(1):52-54
- [5] Bohn J, BeMiller JN. (1,3)-B- D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1995, 28: 3-14
- [6] GB/T 15672-2009 食用菌中总糖含量的测定[S].中华人民共和国国家标准,2009
- [7] Guerrant G O, Moss C W. Determination of monosaccharides as aldonitrile, O-methylxime, alditol and cyclitol acetate derivatives by gas chromatography [J]. *Analytical Chemistry*, 1984, 56(4):633-638
- [8] 游丽君.泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及其抗疲劳、抗癌功效研究[D].广州:华南理工大学,2010
- [9] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine [J]. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986, 44: 307-315
- [10] 续洁琨,姚新生,栗原博.抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用[J].中国药理学通报,2006,22(8):1015-1021
- [11] 李红卫,周国燕,郭慧清,等.从香菇中浸提香菇多糖的方法对比研究[J].食品科学,2008,29(11):173-178
- [12] 贺寅,王强,钟葵.响应面优化酶法提取龙眼多糖工艺[J].食品科学,2011,32(2):79-84
- [13] 滕利荣,洪水声,孟庆繁,等.普鲁兰多糖的粘度性质研究[J].食品科学,2003,24(10): 32-35
- [14] Liu W, Fan YF, Ai LP, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao*. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84, 390-394
- [15] 张丽霞,张伟娜,李凌智,等.不同提取方法对桦褐孔菌多糖抗氧化活性的影响[J].安徽农业科学,2012,40(10): 5870-5872