

冯颖,刘欣,范文丽. 长白椴木嫩芽皂苷超滤纯化工艺研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):304-307.

# 长白椴木嫩芽皂苷超滤纯化工艺研究

冯颖<sup>1</sup>, 刘欣<sup>2</sup>, 范文丽<sup>3</sup>

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学科学技术学院工学系, 辽宁抚顺 113122;

3. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁沈阳 110866)

**摘要:**在单因素试验的基础上,利用 Minitab 15 软件设计了响应面试验,研究超滤操作压力、料液中皂苷浓度、超滤时间、操作温度对超滤膜通量的影响,并确定最佳工艺参数。结果表明:操作压力 0.42 MPa、料液中皂苷浓度 0.74 mg/mL、超滤时间 13.7 min、操作温度 27.93 ℃时,膜通量最大值预测结果为 0.15 mL/(cm<sup>2</sup>·min),实际测得膜通量值为 0.13 mL/(cm<sup>2</sup>·min),与预测值基本相符,该条件下皂苷纯度达到 69.75%,达到纯化目的。

**关键词:**长白椴木;皂苷;超滤;响应面

**中图分类号:**R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0304-03

椴木属(*Aralia* L.)植物皂苷具有抗氧化、降血脂、降血糖、强壮、抗癌等活性<sup>[1-5]</sup>,是非常重要的生物活性成分。科研工作者对该属植物皂苷活性单体的结构研究较多<sup>[6-8]</sup>,但关于其提取纯化工艺研究报道较少,制约了它在药品和食品领域的深加工利用。目前,植物皂苷的提取纯化<sup>[9-10]</sup>主要采用溶剂提取和大孔树脂纯化相结合的方法。超滤技术利用外界能量或化学位差为推动力,利用膜的孔径不同对成分进行分离、提纯和富集,具有不需添加化学试剂、操作条件简便等优点,应用越来越广泛<sup>[11]</sup>,为提高皂苷的纯度,笔者所在课题组采用超滤法<sup>[12-13]</sup>对其进行纯化,在单因素试验的基础上,采用响应面法分析了各因素及其交互作用在超滤过程中对膜通量的影响,并最终优化了工艺条件,旨在为该资源在工业上的深加工利用提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂与仪器

长白椴木(人工栽培品种)嫩芽,由沈阳农业大学园艺学院提供,阴干粉碎后备用。齐墩果酸标准品(中国生物药品制品检定所);无水乙醇、石油醚(沸程 60~90 ℃)、香草醛、冰醋酸、高氯酸、乙酸乙酯、考马斯亮蓝等均均为分析纯试剂;AB-8 大孔吸附树脂(河北省沧州宝恩化工有限公司)。

7200 型可见分光光度计[尤尼柯(上海)有限公司];TDL-5000B 型离心机(上海安亭科学仪器厂);RE-52 型旋转蒸发器(上海博通经贸有限公司);SHZ-III 型循环水真空泵(上海华琦科学仪器有限公司);自动柱层析系统(上海沪西分析仪器厂);Stirred Cells 8000 系列超滤搅拌设备(密理博中国有限公司);醋酸纤维素超滤平膜(截留分子量 10 ku)(北京伯乐生命科学发展公司)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 长白椴木嫩芽皂苷的提取

取长白椴木嫩芽干粉

100 g,加入 8 倍量体积分数为 70% 的乙醇,60 ℃水浴浸提 3 次,每次 2 h,合并醇提液,将醇提液回收乙醇,得长白椴木嫩芽皂苷粗提液。

#### 1.2.2 超滤纯化长白椴木嫩芽皂苷操作条件的单因素试验

1.2.2.1 超滤压力的考察 固定料液中皂苷浓度 0.6 mg/mL,操作温度 35 ℃,分别在操作压强 0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 MPa 下超滤 15 min,测定膜通量。

1.2.2.2 料液浓度的考察 分别选择料液中皂苷浓度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 于操作压力 0.40 MPa、操作温度 35 ℃ 条件下超滤 15 min 后测定膜通量。

1.2.2.3 超滤时间的考察 固定料液中皂苷浓度 0.6 mg/mL,操作压强 0.40 MPa,操作温度 35 ℃,分别测定操作 5、10、15、20、25 min 后样液的膜通量。

1.2.2.4 超滤温度的考察 固定操作压力 0.40 MPa、料液中皂苷浓度 0.6 mg/mL,分别在操作温度 25、30、35、40 ℃ 下超滤 15 min,测定膜通量。

1.2.3 超滤纯化长白椴木嫩芽皂苷响应面试验设计 采用 Box-Behnken 设计法(表 1),设计响应面试验(采用真实值代码),对提取工艺进行优化。模型通过最小二乘法拟合,二次多项方程可表达为  $y = A_0 + \sum A_i x_i + \sum A_{ij} x_i x_j + \sum A_{ijk} x_i x_j x_k$ 。

表 1 超滤纯化长白椴木嫩芽皂苷响应面试验设计因素及水平

水平	因素			
	$x_1$ :超滤压力 (MPa)	$x_2$ :皂苷浓度 (mg/mL)	$x_3$ :超滤时间 (min)	$x_4$ :操作温度 (℃)
1	0.35	0.4	10	25
2	0.40	0.6	15	30
3	0.45	0.8	20	35

1.2.4 皂苷的测定 采用香草醛高氯酸法,按文献[14]建立的长白椴木总皂苷含量测定方法进行测定。

$$\text{皂苷透过率} = \frac{\text{超滤后透过液中的皂苷的质量}}{\text{超滤前样液中皂苷的质量}} \times 100\%$$

#### 1.2.5 膜通量的计算<sup>[11]</sup>

$$J_v = \frac{V}{S \times t}$$

收稿日期:2013-03-29

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:31000803)。

作者简介:冯颖(1975—),女,辽宁朝阳人,博士,副教授,主要从事果蔬精深加工及其生物活性物质研究。E-mail:fywjg@sina.com。

式中: $J_V$ 表示膜通量[ $\text{mL}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$ ]; $V$ 表示超滤流出体积( $\text{mL}$ ); $S$ 表示超滤膜面积( $\text{cm}^2$ ); $t$ 表示超滤所用时间( $\text{min}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 超滤纯化长白楸木嫩芽皂苷操作条件的单因素试验

2.1.1 超滤压力对膜通量的影响 由图1可以看出,随着超滤压力增大,膜分离过程的推动力增加,膜通量逐渐增大。当压力达到0.4 MPa后,随着压力继续增加,大分子溶质在膜表面吸附积聚逐渐形成致密的凝胶层,导致传质阻力增加,膜通量增加缓慢。

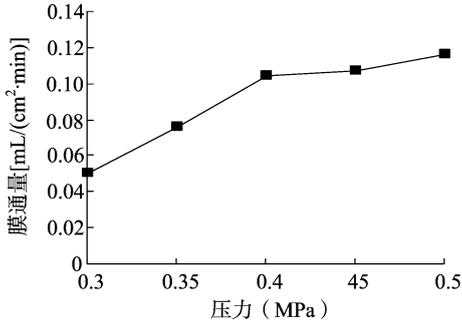


图1 超滤压力对膜通量的影响

2.1.2 料液中皂苷浓度对膜通量的影响 由图2可知,料液中皂苷浓度升高,增大了皂苷透过膜的推动力,但也使得料液中更多的大分子溶质吸附积聚在膜表面,当料液皂苷浓度达到0.6 mg/mL后,膜通量开始下降。

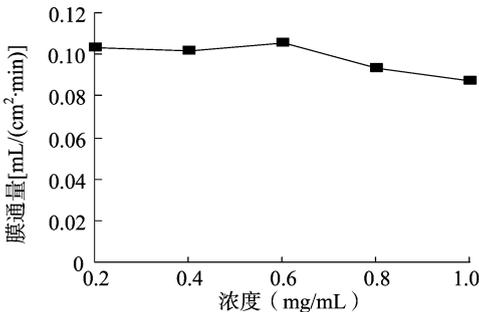


图2 料液皂苷浓度对膜通量的影响

2.1.3 超滤时间对膜通量的影响 从图3中可以看出,随着超滤时间延长,膜表面逐渐形成致密的大分子凝胶层,膜污染的情况越来越严重,膜孔堵塞,导致传质阻力增加,膜通量一直呈现下降的趋势。

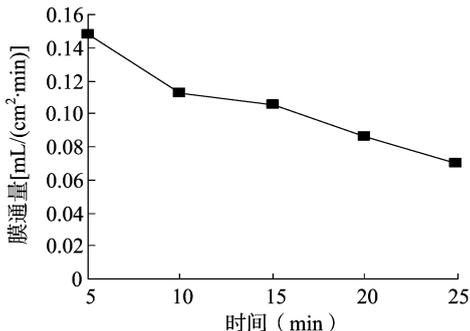


图3 超滤纯化时间对膜通量的影响

2.1.4 超滤温度对膜通量的影响 由图4可知,随着超滤温度升高,料液黏度下降,流动性增强,传质能力加强,膜通量增大。35℃后,继续升高温度,膜通量呈下降趋势,可能是因为膜表面对大分子溶质的吸附随温度升高而增加,膜孔堵塞,加重了膜的污染。

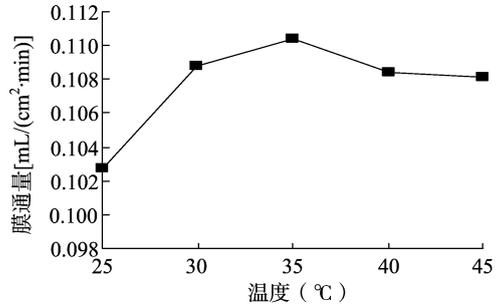


图4 超滤纯化温度对膜通量的影响

### 2.2 拟合模型的建立及方差分析

由表2、表3可以看出,回归方程的 $P < 0.01$ ,说明膜通量所建立的二次多项模型具有高度显著性,线性和平方模型的 $P < 0.01$ 也说明模型具有高度显著性。模型的总决定系数达0.9641,说明拟合方程可信度达96.41%。失拟项的 $P > 0.05$ ,不显著,表明方程有较好的精确度和可靠性,对试验拟合良好,可以用该回归模型代替真实试验点对试验结果进行分析和预测。

表2 超滤纯化长白楸木嫩芽皂苷响应面试验设计与结果

试验号	因素(未编码值)				$y$ :膜通量 [ $\text{mL}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$ ]
	$x_1$ :压力 (MPa)	$x_2$ :皂苷浓度 (mg/mL)	$x_3$ :时间 (min)	$x_4$ :温度 (°C)	
1	0.40	0.6	10	35	0.120 375
2	0.45	0.6	15	35	0.097 337
3	0.40	0.6	15	30	0.116 950
4	0.45	0.4	15	30	0.103 667
5	0.40	0.6	20	25	0.070 330
6	0.40	0.8	20	30	0.063 338
7	0.40	0.4	20	30	0.095 083
8	0.35	0.4	15	30	0.079 939
9	0.35	0.6	15	35	0.079 058
10	0.45	0.6	15	25	0.103 950
11	0.40	0.6	20	35	0.088 100
12	0.35	0.6	15	25	0.073 448
13	0.40	0.8	15	25	0.097 904
14	0.40	0.8	15	35	0.091 200
15	0.40	0.4	15	25	0.092 721
16	0.40	0.4	15	35	0.104 786
17	0.40	0.6	15	30	0.116 201
18	0.45	0.6	10	30	0.118 589
19	0.40	0.4	10	30	0.105 346
20	0.35	0.8	15	30	0.061 091
21	0.35	0.6	20	30	0.056 209
22	0.35	0.6	10	30	0.108 967
23	0.40	0.6	10	25	0.116 869
24	0.40	0.6	15	30	0.103 498
25	0.45	0.8	15	30	0.105 377
26	0.45	0.6	20	30	0.095 100
27	0.40	0.8	10	30	0.146 058

表3 超滤纯化长白楸木嫩芽皂苷响应面回归模型方差分析

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	P	显著性
回归	14	0.010 761	0.010 761	0.000 769	0.000	**
线性	4	0.007 482	0.007 482	0.001 871	0.000	**
平方	4	0.001 470	0.001 470	0.000 368	0.001	**
交互作用	6	0.001 809	0.001 809	0.000 301	0.001	**
残差误差	12	0.000 401	0.000 401	0.000 033		
失拟	10	0.000 287	0.000 287	0.000 029	0.813	
纯误差	2	0.000 114	0.000 114	0.000 057		
合计	26	0.011 162				

对表2数据进行回归分析,获得二次多元回归方程:

$$y = 0.112\ 216 + 0.013\ 776x_1 - 0.020\ 670x_3 - 0.015\ 552x_1^2 - 0.007\ 579x_2^2 - 0.008\ 883x_4^2 + 0.513\ 927x_1x_2 + 0.007\ 317x_1x_3 - 0.018\ 114x_2x_3 - 0.004\ 692\ 19x_2x_4。$$

由表4可知,  $x_1$  (超滤压力)、 $x_3$  (超滤时间) 和  $x_1^2$  (超滤压力)、 $x_4^2$  (料液浓度)、 $x_2x_3$  (皂苷浓度与超滤时间) 交互项对膜通量影响极显著;  $x_2^2$  (皂苷浓度)、 $x_1x_3$  (超滤压力与超滤时间) 交互项、 $x_2x_4$  (皂苷浓度与超滤温度) 交互项对膜通量影响显著, 其他项不显著。表明该方程不是简单的线性关系, 二次项和交互作用影响很大, 与模型检验结果相符合。

表4 超滤纯化长白楸木嫩芽皂苷响应面回归方程系数显著性检验

项	系数	系数标准误	P	显著性
常量	0.112 216	0.003 338	0.000	**
$x_1$	0.013 776	0.001 669	0.000	**
$x_2$	-0.001 381	0.001 669	0.424	
$x_3$	-0.020 670	0.001 669	0.000	**
$x_4$	0.002 136	0.001 669	0.225	
$x_1^2$	-0.015 552	0.002 504	0.000	**
$x_2^2$	-0.007 579	0.002 504	0.011	*
$x_3^2$	-0.002 848	0.002 504	0.278	
$x_4^2$	-0.008 883	0.002 504	0.004	**
$x_1x_2$	0.005 139	0.002 891	0.101	
$x_1x_3$	0.007 317	0.002 891	0.034	*
$x_1x_4$	-0.003 055	0.002 891	0.311	
$x_2x_3$	-0.018 114	0.002 891	0.000	**
$x_2x_4$	-0.004 692	0.002 891	0.013	*
$x_3x_4$	0.003 566	0.002 891	0.241	

注:  $R-Sq=96.41\%$ ,  $R-Sq$  (预测) = 82.89%,  $R-Sq$  (调整) = 92.21%; “\*”表示在0.05水平显著, “\*\*”表示在0.01水平显著。

### 2.3 响应面图分析

膜通量受超滤压力与超滤时间交互作用、皂苷浓度与超滤时间交互作用、皂苷浓度与超滤温度交互作用的影响。超滤操作时间越长,膜通量随超滤压力的增大而增大的变化趋势越明显(图5);超滤操作时间越长,膜通量随皂苷浓度的升高而下降的趋势越明显(图6);而超滤温度越高,膜通量随皂苷浓度的升高而下降的趋势越明显(图7)。

利用 Minitab 15 软件对试验模型进行优化分析,确定超滤工艺条件是超滤压力 0.42 MPa, 料液皂苷浓度 0.74 mg/mL, 超滤时间 13.7 min, 温度 27.93 °C, 预测膜通量最高理论值为 0.15 mL/(cm<sup>2</sup>·min), 实际测定膜通量达到 0.13 mL/(cm<sup>2</sup>·min), 优化条件下皂苷透过率 75.98%, 皂苷纯度可到 69.75%。

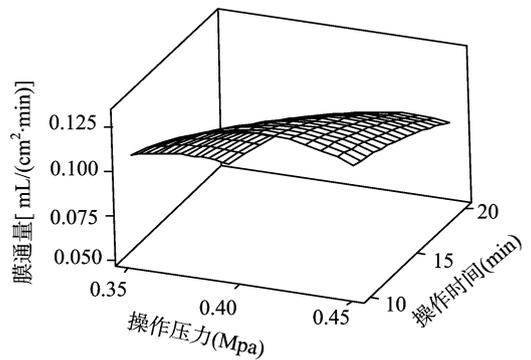


图5 超滤压力与超滤时间交互作用对膜通量的影响

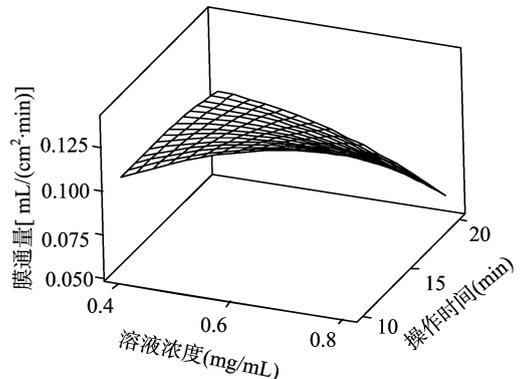


图6 皂苷浓度与超滤时间交互作用对膜通量的影响

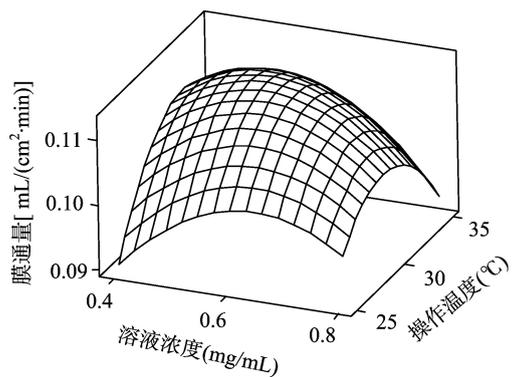


图7 皂苷浓度与超滤温度交互作用对膜通量的影响

### 3 结论

在单因素基础上用响应面对长白楸木嫩芽皂苷超滤提纯工艺进行优化,确定优化条件为操作压力 0.42 MPa、料液中皂苷浓度 0.74 mg/mL、超滤时间 13.7 min、操作温度 27.93 °C,膜通量最大值预测结果为 0.15 mL/(cm<sup>2</sup>·min), 实际测得膜通量值为 0.13 mL/(cm<sup>2</sup>·min), 与预测值基本相符,该条件下皂苷透过率为 75.98%, 纯度达到 69.75%, 达到纯化目的。

### 参考文献:

- [1] 王忠壮, 万 颢, 胡晋红. 楸木属药用植物的药理活性研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(2): 86-90.

张 勇,周丽明. 碱不溶性酵母胞壁多糖的提取条件[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):307-309.

# 碱不溶性酵母胞壁多糖的提取条件

张 勇,周丽明

(上饶师范学院生命科学院,江西上饶 334001)

**摘要:**以废啤酒酵母为原料,采用 NaOH 溶液提取碱不溶性酵母胞壁多糖。经过单因素试验后确定提取条件为:100 g 废啤酒酵母悬浮于 1 000 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液中,100 °C 下剧烈搅拌 60 min,3 000 r/min 离心 20 min 后弃上清液,沉淀再碱液处理 2 次,冷却后用 HCl 调 pH 值至 4.5,3 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀经 95% 乙醇、丙酮、乙醚洗涤后干燥即得碱不溶性酵母胞壁多糖。在此提取条件下,碱不溶性酵母胞壁多糖的得率为 2.23%,其多糖含量为 90.20%,蛋白质含量为 0.87%。

**关键词:**碱不溶性;酵母胞壁多糖;废啤酒酵母;提取条件

**中图分类号:**TS201.2<sup>+</sup>3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0307-03

酵母细胞壁中存在碱不溶性葡聚糖、碱溶性葡聚糖、酸溶性葡聚糖、连接有蛋白质的无定性的碱溶性甘露聚糖等。其中不溶性葡聚糖除因不溶使其在抗肿瘤等的临床应用上受到限制外,高度的黏性、持水性和热稳定性以及制备工艺简单等方面的优点,使其在食品、医药、化妆品、造纸和建筑材料等行业广泛应用<sup>[1]</sup>。啤酒工厂主要副产物——啤酒酵母泥中就含有具有这种特性的胞壁多糖。我国酵母资源丰富,年产啤酒沉淀酵母泥 3 万~5 万 t(干基)<sup>[2]</sup>。啤酒酵母细胞壁中含有大量的多糖,约为酵母细胞干重的 40%<sup>[3]</sup>,目前对其综合利用主要是从中提取蛋白质、核酸、谷胱甘肽等<sup>[4]</sup>,对其胞壁多糖的研究还不多见。本研究对从废啤酒酵母中提取碱不溶性酵母胞壁多糖的工艺条件进行了研究,为酵母多糖的进一步研究和废啤酒酵母的综合利用提供参考。

## 1 材料与与方法

收稿日期:2013-04-01

作者简介:张 勇(1978—),男,湖北襄阳人,硕士,讲师,研究方向为生物活性物质。E-mail:1328662368@qq.com。

### 1.1 材料、试剂与仪器

废啤酒酵母(湖北金龙泉啤酒有限公司);试剂均为国产分析纯;pH 计[320-S 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];真空干燥箱(DZT-6020 型,上海精宏实验设备有限公司);可见分光光度计(722S 型,上海精密科学仪器有限公司);红外消化炉(HN-12A,上海勇规分析仪器有限公司)。

标准葡萄糖溶液制备:取 105 °C 干燥至恒重的 D-葡萄糖,精密称重,配成 3.62 mg/mL 的标准储备液。使用前用蒸馏水稀释配制标准葡萄糖使用液(0.036 2 mg/mL)。

80% 苯酚:80 g 苯酚(分析纯重蒸馏试剂)加 20 g 水使之溶解,可置冰箱中避光长期贮存。

6% 苯酚:临用前以 80% 苯酚配制。

### 1.2 方法

1.2.1 酵母胞壁多糖提取与纯化方法 碱不溶性葡聚糖提取与纯化工艺流程如下:废啤酒酵母→碱液处理→中和→溶剂洗涤→干燥→酵母胞壁多糖。

用一定浓度的 1 000 mL 碱液(NaOH)对 100 g 废啤酒酵母处理多次,每次均是在沸水浴中加热处理一定时间,冷却后

[2] Zhang M, Liu G, Tang S, et al. Effect of five triterpenoid compounds from the buds of *Aralia elata* on stimulus-induced superoxide generation, tyrosyl phosphorylation and translocation of cytosolic compounds to the cell membrane in human neutrophils[J]. *Planta Medica*, 2006, 72(13):1216-1222.

[3] 杨志福, 汤海峰, 贾艳艳, 等. 太白榉木总皂苷对糖尿病小鼠血糖血脂及抗氧化作用的影响[J]. *解放军药学报*, 2008, 24(2):110-113.

[4] 任美萍, 刘明华, 陈 怡, 等. 榉木皂苷抗肿瘤活性研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(10):2417-2418.

[5] 李 明, 鲁卫星. 龙牙榉木药理研究进展[J]. *医学综述*, 2009, 15(20):3157-3160.

[6] Song S J, Nakamura N, Ma C M, et al. Five saponins from the root bark of *Aralia elata*[J]. *Phytochemistry*, 2001, 56(5):491-497.

[7] Kim J S, Shim S H, Chae S, et al. Saponins and other constituents from the leaves of *Aralia elata*[J]. *Chemical and Pharmaceutical*

*Bulletin*, 2005, 53(6):696-700.

[8] Ma Z Q, Song S J, Li W, et al. Two new saponins from the bud of *Aralia elata* (Miq.) Seem[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2005, 7(6):817-821.

[9] 裴月湖. 天然药物化学实验指导[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005.

[10] 黎琼红, 张国刚. 三七药材的指纹图谱[J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(4):229-232.

[11] 李 琳, 朱 杰, 傅晓琴, 等. 中试超滤系统浓缩分离南瓜多糖[J]. *食品科学*, 2009, 30(22):33-36.

[12] 周大寨, 朱玉昌, 周毅锋, 等. 芸豆蛋白质的提取及超滤分离研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(8):386-390.

[13] 盛占武, 孙志高, 黄学根, 等. 超滤法提取橙皮苷工艺研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(2):188-191.

[14] 冯 颖, 李天来, 范文丽, 等. 长白榉木生物活性成分的初步研究[J]. *江苏农业科学*, 2009(5):256-258.