

龙良鲲, 寒子纯, 林群英, 等. 黄芪药渣中多糖的酶法制备及其抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(1): 137–140.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.037

# 黄芪药渣中多糖的酶法制备及其抗氧化活性

龙良鲲<sup>1</sup>, 寒子纯<sup>1</sup>, 林群英<sup>2</sup>, 秦秀雯<sup>1</sup>, 赵浩源<sup>1</sup>, 丁少军<sup>1</sup>

(1. 南京林业大学化学工程学院, 江苏南京 210037; 2. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏南京 210042)

**摘要:**通过固态发酵里氏木霉制备纤维素酶液, 其中滤纸酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、内切型纤维素酶和木聚糖酶的活性分别达 2.02、1.99、167.00、53.90 U/mL。继续以纤维素酶水解黄芪药渣制备其中的多糖物质。经单因素试验和正交优化试验得出, 酶法制备黄芪多糖的最佳工艺条件为纤维素酶用量 4 U/g、酶解温度 45 °C、酶解时间 4 h。采用酶解提取法可以从黄芪药渣中获得 44.6 mg/g 多糖, 而未经酶处理对照组的多糖提取量仅为 2.9 mg/g。可见, 纤维素酶的处理能够明显提高黄芪多糖的提取效率。抗氧化测定结果表明, 酶法制备的黄芪多糖能够明显降低百草枯对秀丽线虫的氧化损伤。

**关键词:**黄芪药渣; 纤维素酶; 黄芪多糖; 正交试验; 抗氧化

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0137-04

黄芪属豆科植物, 分为蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus*

(Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 和膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.], 以干燥根入药<sup>[1]</sup>。黄芪的主要药用成分为黄芪多糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄酮等<sup>[2]</sup>。黄芪多糖 (*Astragalus polysaccharides*, APS) 可作为免疫增强剂或调节剂, 促进抗体形成, 同时还有抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗应激、抗氧化和降脂等功效<sup>[3-5]</sup>。工业上多采用水提醇沉法提取黄芪多糖, 其工艺简单易操作, 但提取率较低 (在 3.80% ~ 9.78% 之间)<sup>[6-8]</sup>。黄芪经水提法制备多糖后形成的药渣中仍含有多糖等活性物质, 这些物质被纤维素等聚合物限制而不易溶出<sup>[9-10]</sup>。纤维素酶是可降解纤维素高聚物的一组酶系, 在制备多糖等药用活性物质方面

收稿日期: 2016-07-29

基金项目: 江苏省高校自然科学基金 (编号: 15KJB220003); 高等学校博士学科点专项基金新教师类专项基金 (编号: 20133204120007); 南京林业大学高学历人才基金 (编号: GX1201311)。

作者简介: 龙良鲲 (1978—), 男, 湖北宜昌人, 博士, 副研究员, 主要从事微生物基因工程研究。Tel: (025) 85427543; E-mail: longlk602@njfu.edu.cn。

通信作者: 丁少军, 博士, 教授, 主要从事酶与生物技术研究。Tel: (025) 85427939; E-mail: dshaojun@hotmail.com。

[13] 王春燕, 蔡志宁, 董华强. 芒果酒酿造工艺的研究[J]. 酿酒, 2003, 30(3): 88–90.

[14] 李善雄. 芒果酒酿造工艺改进研究[J]. 酿酒, 2009, 36(5): 79–80.

[15] 朱 劼, 李尔扬. 苹果酒酿造工艺研究[J]. 江苏工业学院学报, 2007, 19(4): 17–20.

[16] 赵志华, 岳田丽. 苹果酒发酵条件优化及模型的建立研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(3): 103–106.

[17] 成少宁, 许先猛, 马 欣, 等. 果脯加工废糖液酒精发酵中酵母菌的分离、筛选和验证[J]. 食品与发酵科技, 2016, 51(1): 6–10.

[18] 杨 辉, 张智维. 苹果酒发酵条件的研究[J]. 酿酒, 2004, 31(5): 72–74.

[19] 葡萄酒、果酒通用分析方法: GB/T 15038—2006[S].

[20] Kerio L C, Wachira F N, Wanyoko J K, et al. Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars[J]. Food Chemistry, 2013, 136(3/4): 1405–1413.

[21] Plackett R L, Buman J P. The design of optimum multifactorial experiments[J]. Biometrika, 1946, 33(4): 305–325.

[22] 范兆军. 苹果酒主发酵工艺研究[J]. 酿酒, 2015, 42(3): 84–86.

[23] 彭 琼, 陈丛瑾. 桑叶不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除

作用[J]. 光谱实验室, 2008, 25(3): 307–309.

[24] 王临宾, 马倩倩, 徐怀德, 等. 超声波辅助提取苹果叶多酚及其抗氧化性研究[J]. 西北农业学报, 2010, 19(8): 126–131.

[25] 许先猛, 董文宾, 张增帅, 等. 苹果渣多酚大孔树脂分离及抗氧化性研究[J]. 中国食品添加剂, 2014, 141(1): 140–146.

[26] Alberti A, dos Santos T P M, Zielinski A A F, et al. Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties [J]. LWT – Food Science and Technology, 2016, 65: 436–443.

[27] 王思嫒. 苹果酒酿造工艺研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2015: 18–25.

[28] 纪 阳, 刘晓庚, 徐征宇, 等. 无花果果脯生产中褐变糖液的脱色实验[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 283–288.

[29] 高振鹏, 岳田利, 袁亚宏, 等. 果脯加工废糖液发酵猕猴桃酒的工艺研究[J]. 农产品加工·学刊, 2007, 94(3): 58–60.

[30] Lu Y R, Foo L Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. Food Chemistry, 2000, 68(1): 81–85.

[31] Alonso – Salces R M, Guyot S, Herrero C, et al. Chemometric characterisation of Basque and French ciders according to their polyphenolic profiles[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 379(3): 464–475.

具有良好的应用前景<sup>[8,11]</sup>。本试验利用纤维素酶制备黄芪药渣中的多糖,通过单因素和正交试验优化酶解作用条件,并评价黄芪多糖的抗氧化活性,为进一步高效利用黄芪资源提供技术途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄芪,产地为甘肃省陇西县,购自安徽省亳州市中药材市场;里氏木霉(*Trichoderma reesei*)D-86271,购自芬兰 VTT 技术中心;秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*),由笔者所在实验室保存。百草枯,购自 Sigma 公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯基(DPPH)等生化试剂均为国产分析纯。

PDA 培养基:200 g 马铃薯,20 g 葡萄糖,15 g 琼脂粉,加蒸馏水至 1 000 mL。

Mandels 培养基:2.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1.4 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.3 g Urea,0.3 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,1.0 mL 微量元素浓缩液(3.7 g/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,1.4 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,1.6 g/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O,5.0 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O),10.0 g 葡萄糖,0.3 g 酵母膏,加蒸馏水至 1 000 mL。

固体发酵培养基:1.5 g 小麦麸,1.5 g 脱木素麦秆,5.0 mL 10×Mandels 培养基。具体配制方法参考文献[12]。

1.2 试验方法

1.2.1 固态发酵制备纤维素酶 参照文献[12]中的方法进行固态发酵制备纤维素酶。取约 10<sup>8</sup> 个里氏木霉孢子(PDA 平板培养获得)接种于 100 mL Mandels 培养基,并于 28 ℃、200 r/min 振荡培养 2 d。将 1 mL 菌丝培养物接入固态发酵培养基中,混匀后 30 ℃培养 13 d。发酵结束后,每瓶发酵物中加入 30 mL 无菌水(含 0.1% 吐温 80),置于 25 ℃、120 r/min 条件下提取 120 min。提取液经 8 000 r/min、10 min 离心后取上清液。所得粗酶液加入终浓度为 0.02% 的三氮化钠,并置于 4 ℃保存备用。

1.2.2 酶活性的测定 参照文献[12]中的方法分别测定发酵液中滤纸酶、内切型纤维素酶(CMC 酶活)、β-葡萄糖苷酶及木聚糖酶的活性。酶活性测定均在 50 mmol/L 的柠檬酸缓冲液(pH 值为 4.8)中进行,各设 3 个重复。1 个单位(U)滤纸酶、CMC 酶或木聚糖酶分别定义为 1 min 催化相应底物生成 1 μmol 葡萄糖(滤纸酶和 CMC 酶)或木糖(木聚糖酶)的酶量;1 个单位(U)的 β-葡萄糖苷酶定义为 1 min 催化 4-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)生成 1 μmol 4-硝基苯酚的酶量。

1.2.3 黄芪药渣的获得 黄芪经粉碎后,按固液质量比为 1:10 加入蒸馏水,90 ℃、150 r/min 水浴浸提 2 h,5 000 r/min 离心 10 min 获得上清液,重复提取 1 次。所得上清液加 3 倍体积的 99% 乙醇溶液,充分混匀,4 ℃静置过夜,6 000 r/min、10 min 离心,沉淀经 60 ℃烘干,即得黄芪粗多糖。所得黄芪残渣烘干至恒质量,装袋密封备用。

1.2.4 酶法提取黄芪药渣中的多糖

1.2.4.1 单因素试验 称取 1 g 黄芪药渣装入 50 mL 离心管中,加入 5 mL 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 值为 4.8),分别加入不同量(0~10 U)的纤维素酶(以滤纸酶活性计算),加入无菌水使总体积为 10 mL。经 50 ℃酶解 2 h 后,反

应物经 80 ℃水浴提取 4 h,离心法获得上清液并经醇沉法获得粗多糖。粗多糖经适当稀释后,以苯酚-硫酸比色法测定总糖含量,并以二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid,DNS)法测定寡糖含量,两者之差即为多糖含量<sup>[13]</sup>。同时,比较不同酶解温度(35~55 ℃)或酶解时间(1~8 h)对酶法制备黄芪多糖的影响。

1.2.4.2 正交优化试验 根据单因素试验结果,对纤维素酶用量、酶解时间和酶解温度进行正交设计(表 1),优化黄芪多糖提取的最佳酶解条件。

表 1 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>) 正交试验设计表

水平	因素		
	纤维素酶用量(U/g)	酶解时间(h)	酶解温度(℃)
1	3	1.5	40
2	4	2.0	45
3	5	3.0	50
4	6	4.0	55

1.2.5 黄芪多糖的抗氧化活性

1.2.5.1 DPPH 自由基清除测定 根据文献[14]进行 DPPH 自由基清除测定,分别配制不同浓度(0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.40 mg/mL)的黄芪多糖。向 10 mL 玻璃试管中依次加入 1 mL 各浓度黄芪多糖待测液和 2 mL 0.6 mg/L DPPH,混匀,室温避光反应 30 min,测定 517 nm 处的吸光度。以 50% 乙醇作为空白对照,每个处理重复 3 次,求平均值。DPPH 清除率的计算公式如下:

$$SC_{DPPH} = (1 - D_{517\text{ nm}}/D_{517\text{ nm}}) \times 100\%$$

式中:SC<sub>DPPH</sub> 为 DPPH 的清除率;D<sub>517 nm</sub> 为样品的吸光度;D<sub>517 nm</sub> 为对照的吸光度。

1.2.5.2 线虫抗氧化测定 通过添加百草枯诱导秀丽线虫产生氧化应激损伤以评价黄芪多糖的抗氧化活性。将黄芪多糖制成一定浓度的溶液后,添加至培养有秀丽线虫的 96 孔板中,于 20 ℃培养 48 h,再于每个孔里添加百草枯,使其终浓度为 40 mmol/L。每 24 h 观察 1 次线虫存活情况并记录线虫存活数目,直至秀丽线虫全部死亡,每组试验所测秀丽线虫数目不少于 80 条。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶的制备及酶活性测定

由图 1 可知,粗酶液中的滤纸酶、β-葡萄糖苷酶、CMC 酶和木聚糖酶的活性分别为 2.02、1.99、167.00、53.90 U/mL。可见,固态发酵液中含有较高水平的纤维素酶和半纤维素酶。

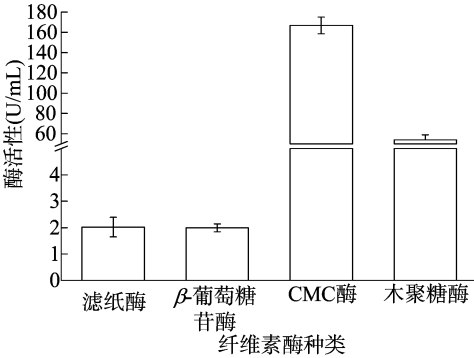


图1 里氏木霉固态发酵产纤维素酶和木聚糖酶的水平

2.2 酶法制备黄芪药渣中多糖的影响因素

2.2.1 纤维素酶用量对黄芪多糖提取的影响 由图 2 可知, 未经纤维素酶水解作用, 从黄芪药渣中水提获得的多糖提取量为 2.9 mg/g; 纤维素酶用量为 0.2 U/g 时, 多糖提取量达 8.2 mg/g。增加纤维素酶的用量, 多糖的提取量明显升高, 纤维素酶用量为 4.0 U/g 时, 多糖提取量达到最大值, 为 34.7 mg/g。继续增加纤维素酶的用量, 黄芪多糖的提取量无明显变化。因此, 提取黄芪多糖的最佳纤维素酶用量为 4.0 U/g。酶解处理获得的多糖量最高可达未经纤维素酶处理组的 11.97 倍。

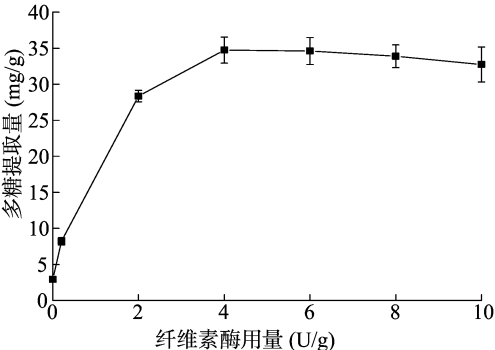


图2 纤维素酶用量对黄芪多糖提取的影响

2.2.2 酶解温度对黄芪多糖提取的影响 酶解温度对酶法制备黄芪多糖的效率有明显的影响。由图 3 可知, 低温 (35 ℃) 下, 酶法提取黄芪多糖的提取量为 27.9 mg/g。提高酶解温度, 黄芪多糖的提取量明显增加, 在 45 ℃ 时, 黄芪多糖的提取量达到最大值, 为 35.7 mg/g。继续升高温度, 黄芪多糖的提取量明显降低。因此, 利用纤维素酶提取黄芪药渣中黄芪多糖的最适温度为 45 ℃。

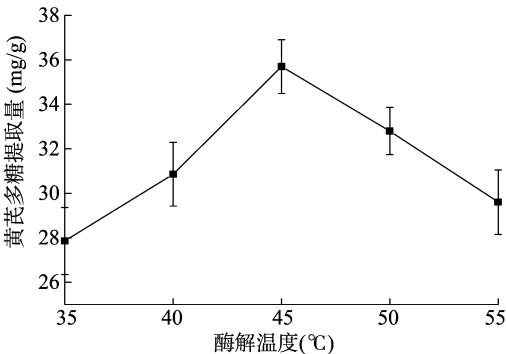


图3 酶解温度对黄芪多糖提取的影响

2.2.3 酶解时间对黄芪多糖提取的影响 由图 4 可知, 随着酶解时间的延长, 黄芪多糖的提取量明显升高。酶解时间为 4 h 时, 黄芪多糖的提取量达 34.6 mg/g。进一步延长酶解时间, 多糖提取量呈现下降的趋势。因此, 酶解 4 h 为最佳的酶解时间。

2.3 正交优化试验

根据单因素试验的结果, 继续对纤维素酶用量、酶解温度、酶解时间这 3 个因素进行正交设计优化以获得最佳的提取条件。正交试验结果如表 2 所示, 各因素对黄芪多糖提取量的影响程度表现为酶解温度 > 纤维素酶用量 > 酶解时间。根据试验结果优化得最佳提取条件为酶解温度 45 ℃、纤维素酶用量 4.0 U/g、酶解时间 4 h。最后经验证, 在此条件下黄

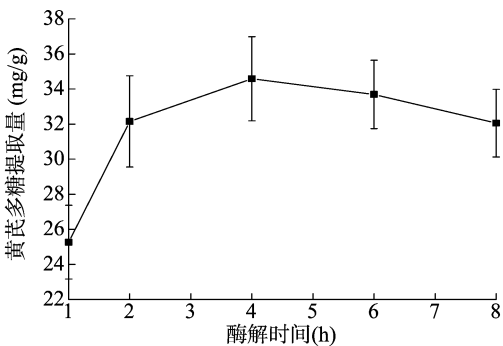


图4 酶解时间对黄芪多糖提取的影响

表 2 酶法提取黄芪多糖的正交试验结果

试验号	纤维素酶用量	酶解时间	酶解温度	多糖含量 (mg/g)
1	1	1	1	32.9
2	1	2	2	39.8
3	1	3	3	38.2
4	1	4	4	38.9
5	2	1	2	39.3
6	2	2	1	32.6
7	2	3	4	36.2
8	2	4	3	43.9
9	3	1	3	35.3
10	3	2	4	31.2
11	3	3	1	28.4
12	3	4	2	40.9
13	4	1	4	31.3
14	4	2	3	35.3
15	4	3	2	43.8
16	4	4	1	27.9
$k_1$	37.5	34.7	30.5	
$k_2$	38.0	34.7	41.0	
$k_3$	34.0	36.6	38.2	
$k_4$	34.6	37.9	34.4	
$R$	4.1	3.1	10.5	
优化水平	2	4	2	

芪多糖的提取量为 44.6 mg/g。

2.4 黄芪多糖的抗氧化活性

由图 5 可知, 随着黄芪多糖浓度的升高, 其对 DPPH 自由基的清除率明显提高, 当黄芪多糖浓度达到 0.30 mg/mL 时, 其对 DPPH 自由基的清除率可达 25.4%。继续升高黄芪多糖的浓度, 其对 DPPH 自由基的清除率则无明显增加。

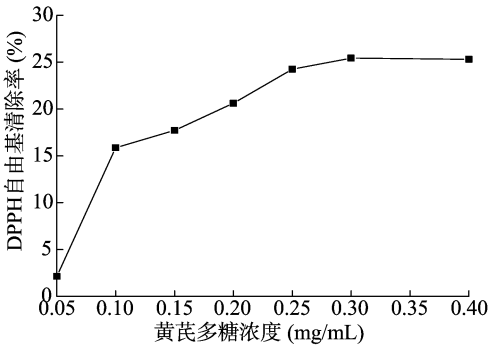


图5 黄芪多糖对 DPPH 自由基的清除能力

由图 6 可知,0.30 mg/mL 黄芪多糖能够明显提高线虫的存活率,最长存活时间为 9 d,比空白对照组(CK)延长 4 d。由图 7 可知,添加 0.30 mg/mL 黄芪多糖,秀丽线虫的平均寿命为 3.48 d,比对照组(2.67 d)提高了 30.3%。因此,黄芪多糖明显降低了百草枯对线虫引起的氧化损伤,其具有良好的抗氧化作用。

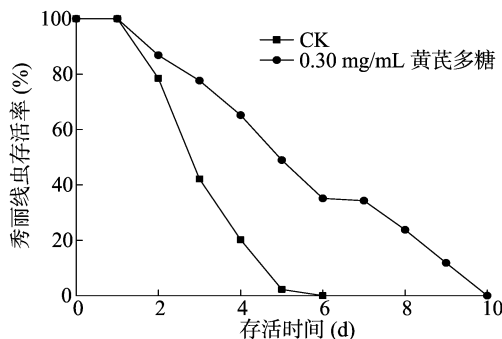


图6 0.30 mg/mL 黄芪多糖对百草枯处理秀丽线虫存活率的影响

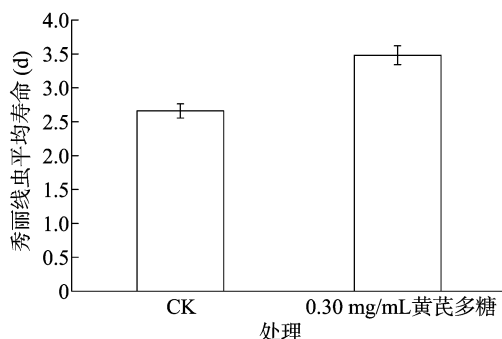


图7 0.30 mg/mL 黄芪多糖对百草枯处理秀丽线虫平均寿命的影响

### 3 结论与讨论

水提醇沉工艺只能获取黄芪组织中部分多糖,残留的药渣中仍含有丰富的多糖等活性物质<sup>[9]</sup>,这部分物质由于受组织中纤维素等结构成分的限制而难以溶出。微生物等来源的纤维素酶能够有效作用于黄芪组织中的纤维结构,从而促进黄芪多糖的提取<sup>[8,11,15]</sup>。相对于碱法(如氧化钙水溶液)制备黄芪多糖,酶法制备具有条件温和、产物纯度高和绿色环保等优势。本试验以里氏木霉固态发酵获得了高活性的纤维素酶,以经 2 次高温水提处理的黄芪药渣作为材料提取多糖。结果显示,与未经酶处理的对照组相比,酶解处理使黄芪多糖的提取量提高了 11.97 倍。正交优化试验结果表明,酶法制备多糖中的主要影响因素影响由大到小依次为酶解温度、纤维素酶用量、酶解时间,而最佳酶解参数为酶解温度 45 ℃、纤维素酶用量 4.0 U/g、酶解时间 4 h,在此条件下,从黄芪药渣中可获得 44.6 mg/g 黄芪多糖。由此可见,纤维素酶对促进黄芪药渣中多糖的制备具有重要的意义。同时,是否存在更加有效的黄芪组织水解酶系以进一步提高黄芪多糖的提取效率值得进一步研究。

抗氧化活性是黄芪多糖的重要生理功能<sup>[16]</sup>。本试验体外抗氧化试验结果表明,酶法制备的黄芪多糖对 DPPH 自由

基的清除率为 25.4%,低于文献报道值<sup>[14,17]</sup>。这可能与获得的黄芪多糖分子量或结构有一定的关系<sup>[18]</sup>。同时,以秀丽线虫为模型测试黄芪多糖的体内抗氧化能力,发现 0.30 mg/mL 黄芪多糖明显增强了秀丽线虫对百草枯的抗性,处理组线虫的平均寿命延长了 30.3%。结果表明,纤维素酶法制备的黄芪多糖具有结构完整性,显示出良好的抗氧化活性。利用纤维素酶技术促进黄芪药渣中多糖的制备,对实现黄芪资源的高效利用具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 张 蕾,高文远,满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(21):3203-3207.
- [3] Auyeung K K, Han Q B, Ko J K. *Astragalus membranaceus*: a review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2016, 44(1): 1-22.
- [4] Sun Q R, Jia N, Wang W X, et al. Protective effects of astragaloside IV against amyloid beta1-42 neurotoxicity by inhibiting the mitochondrial permeability transition pore opening[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98866.
- [5] 姜琛璐,汤 承,骞 宇,等. 黄芪多糖免疫调节作用研究进展[J]. 食品科学,2013,34(11):327-332.
- [6] 贺义恒,张红夏,赵 晔,等. 恒山黄芪中黄芪多糖提取工艺研究[J]. 中国中医药信息杂志,2013,20(3):52-54.
- [7] 金芬芬,金锡姣,杨惠鑫,等. 不同提取方法对黄芪多糖提取率影响的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2013,31(10):2136-2138.
- [8] 董玲玲,黄 鑫,齐阳光,等. 酶解-微波法提取黄芪多糖的工艺研究[J]. 浙江工业大学学报,2011,39(5):528-531.
- [9] 赵海燕,马永平,刘雅静. 利用醇提药渣提取黄芪多糖的工艺研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(36):15977-15978,15980.
- [10] 陆 潭,张李阳,陈玉胜. 一种黄芪药渣发酵产物的抗高尿酸血症活性[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):288-291.
- [11] 郑立颖,魏彦明,陈 龙. 纤维素酶在黄芪有效成分提取中的应用[J]. 甘肃农业大学学报,2005,40(1):94-96.
- [12] Long L, Ding D, Han Z, et al. Thermotolerant hemicellulolytic and cellulolytic enzymes from *Eupenicillium parvum* 4-14 display high efficiency upon release of ferulic acid from wheat bran[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(2):422-434.
- [13] 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):1804-1807.
- [14] 吴 铭,韩 丹,郭立泉. 黄芪多糖的提取与抗氧化活性检测[J]. 湖北农业科学,2015,54(17):4263-4265.
- [15] 王文文,李小丹,黄齐磊,等. 纤维素酶协同高压热水提取香菇多糖的研究[J]. 中国食品添加剂,2015(4):106-110.
- [16] 李宝霞,董双涛,霍乃蕊. 黄芪多糖抗氧化活性研究[J]. 山西中医学院学报,2011,12(5):16-18.
- [17] 李金芳. 黄芪多糖的提取及抗氧化作用研究[J]. 中国食品添加剂,2015(4):143-147.
- [18] 李红法,郭松波,满淑丽,等. 乙醇分级沉淀提取黄芪多糖及其理化性质和抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(11):2112-2116.