

赵浩晨,王婉婷,雷佳美,等. 银杏果外种皮多糖的脱色工艺及抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(10):228-231.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.10.042

# 银杏果外种皮多糖的脱色工艺及抗氧化活性研究

赵浩晨,王婉婷,雷佳美,徐 艳

(沈阳农业大学生物科学技术学院,辽宁沈阳 110866)

**摘要:**以银杏果肉质外种皮为原料,采用水提醇沉法提取其水溶性多糖。以过氧化氢为脱色剂,多糖脱色率和保留率为指标,脱色时间、脱色温度、pH值和过氧化氢体积分数为试验因素,进行单因素试验,以确定影响脱色的因素及其水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计进行优化试验。采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法、还原力测定法对多糖进行抗氧化活性检测。结果表明,脱色温度为60℃,脱色时间为1h,pH值为8,过氧化氢加入量为8%时脱色效果最佳。抗氧化测定结果表明,银杏外种皮多糖具有良好的抗氧化活性,脱色后抗氧化活性略有降低。

**关键词:**银杏果;外种皮;过氧化氢;脱色;多糖;抗氧化活性

**中图分类号:** R284.2    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1002-1302(2020)10-0228-04

银杏(*Ginkgo biloba* L.)果,俗称白果,其营养非常丰富,在许多国家和地区均有大量分布,自古以来被当作营养丰富的高级滋补品<sup>[1]</sup>。目前,对银杏叶和果的研究已取得了很多进展<sup>[2-4]</sup>,但对银杏果外种皮的研究还较少。银杏果外种皮是银杏种子硬壳外面的肉质部分,长期以来被作为废物丢弃,既浪费了资源,又污染了环境<sup>[5]</sup>。据统计,我国每年约有3万t外种皮作为废物被丢弃。近几年的研究表明,银杏外种皮具有多方面药理活性,有较

高的利用价值<sup>[6]</sup>。银杏外种皮含有多种化合物,包括多糖、酚酸、黄酮、银杏内酯等<sup>[7-9]</sup>。其中,多糖含量最高,且具有抗氧化、抑菌、增强免疫力等多种生物活性<sup>[10-11]</sup>。

然而,银杏外种皮经过水提醇沉后得到的多糖呈现深褐色,色素属于杂质性物质,会阻碍多糖的进一步分离纯化,并阻碍作用机制等方面的研究。因此,有必要对多糖进行脱色。过氧化氢脱色法是利用过氧化氢在水溶液中可电离出过氧化氢根离子( $\text{HO}_2^-$ )与发色基团作用,使得发色基团被破坏而起到脱色作用,该方法具有脱色后不易复色的特点,主要适用于色素多且含有不饱和双键、羟基和芳香环的物质<sup>[12-13]</sup>。但 $\text{H}_2\text{O}_2$ 也可能造成多糖的氧化或破坏,因此结合多糖保留率指标来筛选出 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的更优水平。

本研究采用过氧化氢进行氧化脱色,以多糖脱

收稿日期:2019-04-09

基金项目:沈阳农业大学大学生科技创新项目(编号:201810157338)。

作者简介:赵浩晨(1996—),男,辽宁抚顺人,主要从事生物工程研究。E-mail:99644880@qq.com。

通信作者:徐 艳,博士,讲师,主要从事天然产物活性研究。E-mail:1472105886@qq.com。

同部位的营养成分含量均相对较高,含有较高的膳食纤维、黄酮、多酚、多糖等成分,为芦竹在食品及保健食品的应用打下了理论基础。

## 参考文献:

- [1] 马文奎. 芦竹的栽培和综合利用[J]. 中国野生植物资源,2006,25(2):64-65.
- [2] 周莉荫,严员英,缪泸君,等. 花叶芦竹的研究进展[J]. 中国林副特产,2018(6):87-88.
- [3] 曾汉元,杨 洋,姚元枝,等. 不同居群芦竹纤维素和木质素含量的比较研究[J]. 中国农学通报,2012,28(19):225-228.
- [4] 欧阳富龙,陈 福,彭媛媛,等. 不同生育期芦竹的营养价值及体

外产气特征[J]. 动物营养学报,2017,29(9):3385-3391.

- [5] 刘清茹,彭文达,谢 冰,等. 芦竹的化学成分与生物活性研究进展[J]. 中药材,2014,37(10):1892-1895.
- [6] 出口食品中总黄酮的测定:SN/T 4592—2016[S].
- [7] 粮油检验 植物油中多酚的测定:LS/T 6119—2017[S].
- [8] 食品安全国家标准 食品中还原糖的测定:GB 5009.7—2016[S].
- [9] 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定:GB 5009.5—2016[S].
- [10] 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定:GB 5009.6—2016[S].
- [11] 食品安全国家标准 食品中磷的测定:GB 5009.87—2016[S].
- [12] 食品安全国家标准 食品中灰分的测定:GB 5009.4—2016[S].

色率和保留率为评价指标,在单因素试验的基础上采用正交试验优化脱色工艺,并研究脱色前后多糖的抗氧化活性。

## 1 材料、试剂与仪器

材料:银杏果,2018 年 10 月采自沈阳农业大学校园,去核,于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中冻存备用。

试剂:1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,A Johnson Matthey Company);体积分数为 30% 的过氧化氢以及葡萄糖、浓硫酸、蒽酮等试剂均为国产分析纯。

仪器:UV-2100 型分光光度计[龙尼可(上海)仪器有限公司];HH-6 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);

## 2 试验方法

### 2.1 银杏果外种皮多糖的提取

称取银杏果外种皮 200 g,将其用匀浆机打成浆,采用乙醇回流法去除其中的脂溶性物质,将剩余滤渣用水煎煮法提取水溶性多糖,提取 2 次,每次 2 h,合并滤液。采用 Sevage 法对粗多糖水溶液进行脱蛋白处理。用三氯甲烷:正丁醇为 4:1 的混合液反复萃取多糖水溶液,直至中间白色蛋白层消失为止。将脱蛋白后的多糖水溶液用 3 倍量乙醇进行沉淀,静止过夜,用乙醇抽洗至干。

### 2.2 过氧化氢对银杏外种皮多糖进行脱色的工艺研究<sup>[14]</sup>

选择过氧化氢为脱色剂,以脱色时间、脱色温度、pH 值和过氧化氢体积分数为试验因素,进行单因素试验,以确定脱色影响因素及其水平,采用  $L_9(3^4)$  正交设计进行优化试验,以多糖脱色率、保留率为考察最佳脱色工艺的指标。多糖含量的测定采用硫酸-蒽酮法。

$$\text{多糖脱色率} = (D_1 - D_2) / D_1 \times 100\%; \quad (1)$$

$$\text{多糖保留率} = M_{\text{后}} / M_{\text{前}} \times 100\%。 \quad (2)$$

式中: $D_1$ 、 $D_2$  分别为多糖溶液在脱色前、后的吸光度; $M_{\text{前}}$ 、 $M_{\text{后}}$  分别为多糖溶液在脱色前、后的多糖含量。

2.2.1 脱色的影响因素及其水平的确定<sup>[15]</sup> 准确移取多糖溶液,考察过氧化氢加入量(4%、6%、8%、10%、12%)、脱色时间(0.5、1、2、3 h)、pH 值(8、9、10、11)、脱色温度(40、50、60、70  $^{\circ}\text{C}$ ) 4 个因素对多糖脱色率的影响。

### 2.2.2 正交试验设计

2.2.2.1 正交试验因素与水平设计 在单因素试验基础上,进行正交试验,正交试验因素与水平设计详见表 1。

表 1 正交试验因素与水平设计

水平	A:脱色温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	B:脱色时间 (h)	C:pH 值	D:过氧化氢 加入量(%)
1	40	1	8	6
2	50	2	9	8
3	60	3	10	10

2.2.2.2 正交试验 采用  $L_9(3^4)$  正交设计进行试验。

### 2.3 银杏外种皮多糖的抗氧化活性测定

采取提取物与稳定自由基 DPPH 反应的分析方法考察多糖对 DPPH 自由基的清除率<sup>[16]</sup>,采用铁离子还原法(FRAP)和铁氰化钾还原法来测定多糖的还原性<sup>[17]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 脱色的影响因素及其水平的确定

3.1.1 过氧化氢加入量对脱色的影响 由图 1 可知,随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  加入量的增加,多糖脱色率提高。 $\text{H}_2\text{O}_2$  加入量由 4% 增加到 6% 时,脱色趋势平缓,多糖脱色率增加 3.0 百分点。 $\text{H}_2\text{O}_2$  加入量由 6% 增加到 10% 时,多糖脱色率增加 7.5 百分点,超过 10%,多糖脱色率变化不大。因此,考虑脱色效果及成本,选择 6%、8%、10% 3 个水平的  $\text{H}_2\text{O}_2$  加入量进行正交试验。

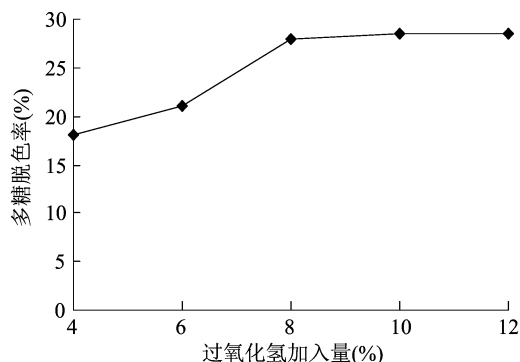


图 1 过氧化氢加入量对脱色的影响

3.1.2 脱色时间对过氧化氢脱色的影响 由图 2 可知,在脱色时间 0.5 ~ 2.0 h 内,脱色率随脱色时间的增加而上升,然后脱色趋势平缓,因此,考虑选择 1、2、3 h 共 3 个水平的脱色时间进行正交试验。

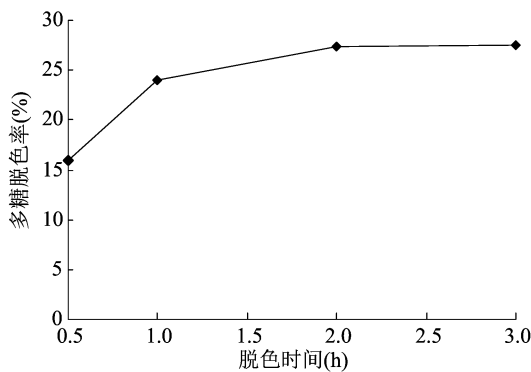


图2 脱色时间对过氧化氢脱色的影响

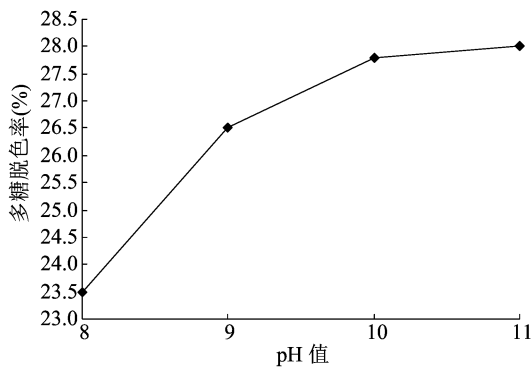


图3 pH 值对过氧化氢脱色的影响

3.1.3 pH 值对过氧化氢脱色的影响 由图 3 可知,当 pH 值由 8 增加到 9 时,脱色率快速升高。但当 pH 值超过 10 后,脱色率增幅不大。因此,选用 pH 值 8、9、10 共 3 个水平进行正交试验。

3.1.4 脱色温度对过氧化氢脱色的影响 由图 4 可知,当脱色温度由 40 ℃ 升到 50 ℃ 时,脱色率略有提高。但当脱色温度超过 50 ℃ 时,脱色率反而下降。因此,选用 40、50、60 ℃ 3 个水平的脱色温度进行正交试验。

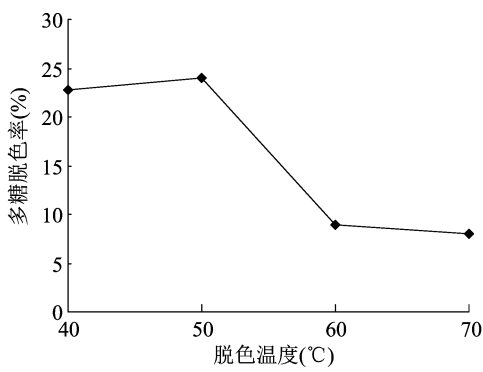


图4 脱色温度对过氧化氢脱色的影响

3.2 正交试验结果

由表2可知,各因素对脱色率的影响程度依次为 C > D > B > A,各因素对多糖保留率的影响程度

表 2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	脱色率 (%)	多糖保留率 (%)	(脱色率×保留率) (%)
1	1	1	1	1	36.3	92.4	33.5
2	1	2	2	2	23.8	89.7	21.3
3	1	3	3	3	19.7	90.5	17.8
4	2	1	2	3	15.6	88.3	13.7
5	2	2	3	1	20.7	92.3	19.1
6	2	3	1	2	38.9	89.4	34.7
7	3	1	1	2	40.8	91.4	37.3
8	3	2	3	3	29.3	87.8	25.7
9	3	3	2	1	20.2	90.6	18.3
脱色率 $k_1$	79.8	92.7	116.0	77.2			
$k_2$	75.2	73.8	59.6	103.5			
$k_3$	90.3	78.8	69.7	64.6			
极差 R	5.03	6.30	18.80	13.00			
多糖保留率 $k_1$	272.6	272.1	273.2	275.3			
$k_2$	270.0	269.8	268.6	270.5			
$k_3$	269.8	270.5	270.6	266.6			
极差 R	0.93	0.76	1.53	2.90			
(脱色率×保留率) $k_1$	72.6	84.5	105.5	70.9			
$k_2$	67.5	66.1	53.3	93.3			
$k_3$	81.3	70.8	62.6	57.2			
极差 R	4.60	6.13	17.40	12.00			

依次为  $D > C > A > B$ 。各因素对脱色率与保留率乘积的影响程度依次为  $C > D > B > A$ 。 $k$  值显示,各因素最优水平为  $A_3B_1C_1D_2$ ,即脱色温度为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,脱色时间为  $1\text{ h}$ ,pH 值为 8,过氧化氢加入量为 8%。

### 3.3 脱色对银杏外种皮多糖抗氧化活性的影响

3.3.1 对 DPPH 自由基清除活性的影响 由图 5 可知,随多糖浓度的增加,银杏外种皮多糖对 DPPH 自由基清除活性增强。脱色后多糖清除 DPPH 自由基活性略有下降,但变化不大。

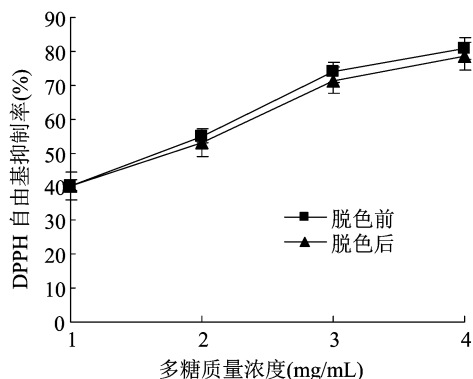


图5 脱色对银杏外种皮多糖清除 DPPH 自由基活性的影响

3.3.2 对多糖还原力的影响 由图 6 可知,随多糖质量浓度的增加,银杏外种皮多糖还原力增强。脱色后多糖还原力略有下降,但变化不大。

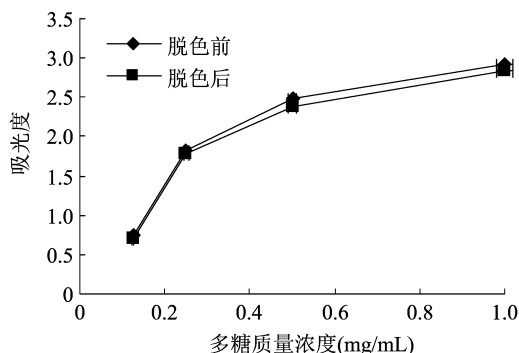


图6 脱色对银杏外种皮多糖还原力的影响

## 4 结论与讨论

以过氧化氢为脱色剂,采用单因素试验和正交试验对脱色条件进行优化,得到最佳工艺条件为脱色温度  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,脱色时间  $1\text{ h}$ ,pH 值 8,过氧化氢加入量 8%。用过氧化氢对银杏外种皮多糖脱色,工艺简单,多糖保留率高。多糖脱色后抗氧化活性略有下降,但变化不明显。

目前常用的多糖脱色方法有活性炭脱色法、过氧化氢脱色法。但活性炭吸附色素的同时,多糖损失也较多,而且后期过滤较为困难。过氧化氢脱色现象明显,多糖保留率高,虽然过氧化氢脱色会使多糖部分氧化,活性略有降低,但仍不失为一种简单、可行的脱色方法。

### 参考文献:

- [1] 曹福亮. 中国银杏志[M]. 北京:中国林业出版社,2007.
- [2] 樊丽超,周立春,安春华. 银杏总黄酮对脂多糖诱导的小胶质细胞炎症反应的抑制作用[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2018,45(5):477-480.
- [3] 王云飞,杨小明,李月英,等. 银杏酚对 SMMC-7721 肝癌细胞和荷 H22 肝癌小鼠的抗癌作用[J]. 江苏大学学报(医学版), 2013,23(3):233-237.
- [4] Zhao X D, Dong N, Man H T, et al. Antiproliferative effect of the *Ginkgo biloba* extract is associated with the enhancement of cytochrome P450 1B1 expression in estrogen receptor - negative breast cancer cells[J]. Biomed Rep,2013,1(5):797-801.
- [5] 赵肃清,李峰. 银杏外种皮研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2000,18(6):515-518.
- [6] 王勤,钟雪,邱凌,等. 银杏外种皮提取物对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 广西植物,2008,28(3):379-381.
- [7] 胡碧原,茅蕾蕾,王俊,等. 银杏外种皮提取物的定性定量分析[J]. 中药材,2014,37(8):1400-1403.
- [8] 韩帅,苗志伟,刘玉平,等. 银杏外种皮挥发性成分分析[J]. 食品科学,2012,33(14):146-149.
- [9] 王国艳,朱晶晶,楼凤昌. 银杏外种皮的化学成分及其对植物真菌的抑制作用[J]. 中国药科大学学报,2014,45(2):170-174.
- [10] 齐丽娟,宋雁,贾旭东,等. 银杏外种皮多糖对正常 BALB/c 小鼠免疫功能的影响[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(2):101-104.
- [11] 徐子恒,栾祖香,王宏军,等. 新鲜银杏外种皮多糖提取工艺的优化及其抗菌和抗氧化活性[J]. 中成药,2017,39(12):2614-2617.
- [12] 宫春宇,余世锋,郑喜群. 响应面法优化玉米须多糖氧化脱色工艺[J]. 粮食与油脂,2015,28(8):31-34.
- [13] 王文彤,张岩,陶遵威. 正交试验优化苦豆子多糖的双氧水脱色工艺研究[J]. 现代药物与临床,2014,29(11):1234-1237.
- [14] 孙涛涛,蔡为荣,谢亮亮,等. 江香薷多糖的过氧化氢脱色研究[J]. 安徽工程大学学报,2016,31(2):26-30.
- [15] 朱静,贾毓宁. 白牛杆菌多糖脱色工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 中成药,2018,40(4):825-830.
- [16] 徐艳,丁静,桂桂红,等. 猴头菌丝多肽的制备及抗氧化活性研究[J]. 中国酿造,2014,33(6):91-95.
- [17] 陆武祥,王东华,王秀英,等. 5 种食用菌液体发酵菌丝抗氧化活性分析比较[J]. 食品与发酵工业,2013,39(7):124-127.