

正交设计法优选紫山药多糖的提取工艺

王涛¹, 朱晓伟¹, 邵果园¹, 陆国权^{1*}, 王安国²

(1. 浙江农林大学浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江临安 311300; 2. 宁海县胡陈雨裕花卉专业合作社, 浙江宁波 315632)

摘要 [目的] 优选紫山药多糖的提取工艺。[方法] 以紫山药为试材, 在单因素试验的基础上采用正交设计法, 从优化料液比、提取温度、提取时间和乙醇体积分数 4 个工艺参数对紫山药中的粗多糖提取工艺进行研究。[结果] 极差分析表明, 对多糖得率影响的主次因素依次为: 提取时间、提取温度、乙醇浓度、料液比, 最佳工艺为提取时间 3.5 h, 温度 85 ℃, 乙醇浓度 85%, 液料比 60 ml/g, 按此条件提取多糖得率为 5.39%。[结论] 研究可为山药多糖水提醇沉工艺参数的优化选择提供一定的参考。

关键词 紫山药; 多糖; 提取工艺; 正交设计法

中图分类号 S509.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)34-062-03

Orthogonal Design Method of Optimization of Purple Yam Polysaccharide Extraction Process

WANG Tao, ZHU Xiao-wei, SHAO Guo-yuan, LU Guo-quan^{*} et al (Zhejiang Key Laboratory of Agricultural Products Quality Improvement Technology, Zhejiang A&F University, Lin'an, Zhejiang 311300)

Abstract [Objective] To optimize extraction process of purple yam polysaccharides. [Method] With purple yam as the experiment material, using orthogonal design method on the basis of single factor experiment, the extraction process for purple yam polysaccharides was studied from four parameters of the optimization of solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction time and the volume percentage of ethanol. [Result] After range analysis, the results showed that the primary and secondary factors of the yield of polysaccharide extraction was time > temperature > ethanol concentration > solid-liquid ratio. And the optimum process of extracting time was 3.5 h, the temperature was 85 ℃, 85% ethanol concentration, solid-liquid ratio was 60 ml/g, under the above conditions, 5.39% polysaccharide was obtained. [Conclusion] The study can provide a certain reference for optimization of yam polysaccharide water extraction and alcohol precipitation process parameters.

Key words Purple yam; Polysaccharides; Extraction process; The orthogonal design method

山药是薯蓣科薯蓣属草本蔓生性植物。紫山药是山药的一个独特品种类型, 富含 8 种酚类黄酮物质的“花青素”^[1], 且比一般的山药含有更多的维生素和微量元素^[2](26-27)], 有滋肺益肾、健脾止泻、降压利肝等作用^[2](26-27)]。紫山药栽培适应性强, 用途广泛, 既可以作佳肴, 又可以作保健药材, 是集味美和保健为一体的绿色蔬菜。

紫山药具有增强免疫、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降血糖等多种生物活性, 其主要功效成分是山药多糖^[3]。目前, 国内外山药多糖的提取技术包括浸提法、超声辅助提取、微波辅助提取、酶法提取^[4-5]。笔者采用浸提法提取山药多糖, 进一步采取正交试验法对提取过程中料液比、提取温度、提取时间和乙醇体积分数 4 个因素进行优化研究, 以期对山药多糖水提醇沉工艺参数的优化选择提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料 挑选当年采收、新鲜无腐烂的紫山药, 洗净, 去皮, 切成 2~3 mm 的薄片, 50 ℃ 热风干燥, 万能粉碎机粉碎后密封于干燥的玻璃瓶中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的制备。 分别量取 0.1 mg/ml 的葡萄糖溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 ml 置于 10 ml 具塞试管中, 依次添加水使终体积为 1.0 ml, 空白对照为水 1.0 ml, 各加 5% 苯酚溶液 1.0 ml, 振荡, 混匀, 加 5.0 ml 硫酸, 迅速振荡混匀, 于室温下放置 30 min, 参照分光光度法

(中国药典 2005 年版一部附录 VB) 于 490 nm 波长处分别测定吸光度。以葡萄糖浓度 C (mg/ml) 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标绘制标准曲线(图 1), 得回归方程 $A = 10.11C + 0.012$ ($R^2 = 0.9985$)。

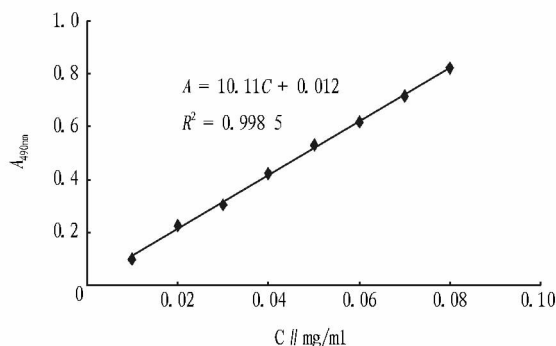


图 1 标准曲线

1.2.2 紫山药粗多糖提取的工艺流程。 紫山药→粉碎→脱脂→80% 乙醇回流→水提取→减压浓缩→乙醇沉淀→冷冻干燥→山药粗多糖。

将干燥的山药粉碎为 40 目大小, 称取 10 g 粉末置脂肪抽提装置中, 加入石油醚(60~90 ℃) 250 ml, 90 ℃ 回流脱脂; 原料挥发干溶剂后, 加入 70% 乙醇 90 ℃ 回流提取 1 次, 以除去单糖、多酚、低聚糖和苷类等小分子物质; 原料挥发干乙醇后, 根据试验要求, 按照不同的浸提温度、浸提时间、乙醇体积分数、料液比进行提取, 将提取液过滤。按同样条件重复提取 1 次, 合并提取液, 用旋转蒸发器真空浓缩, 加 95% 的乙醇(使乙醇浓度达 70% 以上)析出多糖, 用无水乙醇、无水乙醚、无水丙酮洗涤多次, 真空干燥即得山药粗多糖。此方法提取的山药多糖含有大量的蛋白质, 为此采用 Sevage 法

基金项目 浙江省公益技术研究农业项目(2013C32092); 浙江省宁波市农业创新创业项目(2015C10049)。

作者简介 王涛(1994-), 男, 浙江绍兴人, 本科生, 专业: 园艺。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事薯蓣栽培研究。

收稿日期 2015-11-02

去除蛋白^[6],得到较纯的山药水溶性粗多糖。

1.2.3 多糖含量的测定。准确称取一定量的粗多糖,置于容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,在 490 nm 波长处测其吸光度,代入标准曲线 $A = 10.11C + 0.012$ 计算出多糖含量。

多糖得率 = 多糖含量(g)/紫山药粉末质量(g) × 100%

2 结果与分析

2.1 山药粗多糖提取工艺的确定

2.1.1 液料比对粗多糖得率的影响。选择不同的料液比(20、40、60、80 ml/g),在 95 °C 下提取 2.5 h,用 85% 乙醇进行醇析,其他操作同“1.2.2”,结果见图 2。从图 2 可以看出,液料比对多糖的提取效果有较大的影响,多糖得率和含量随着液料比的增加而增大,当液料比超过 60 ml/g 时,多糖得率增加不明显,而多糖含量略有下降,主要因为液料比增大会增加其他成分的溶出。

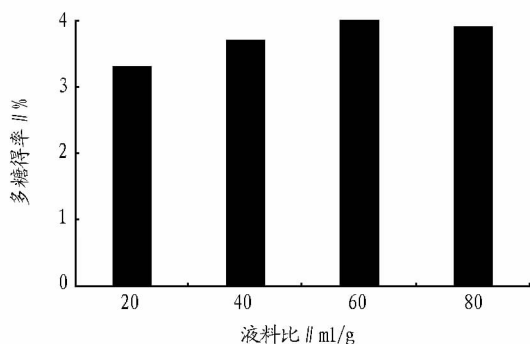


图 2 不同液料比的粗多糖得率比较

2.1.2 提取时间对粗多糖得率的影响。选取不同的提取时间(1.5、2.5、3.5、4.5 h),在液料比 60 ml/g,温度 95 °C,用 85% 乙醇进行醇析,其他操作同“1.2.2”,测定多糖提取得率和含量,结果见图 3。从图 3 可以看出,提取时间对多糖的提取效果有较大的影响,多糖得率在先前阶段随着浸提时间的延长而增加,但 3.5 h 后多糖得率随时间延长变化不明显。为了提高多糖得率,浸提时间初步确定在 3.5 h 左右。

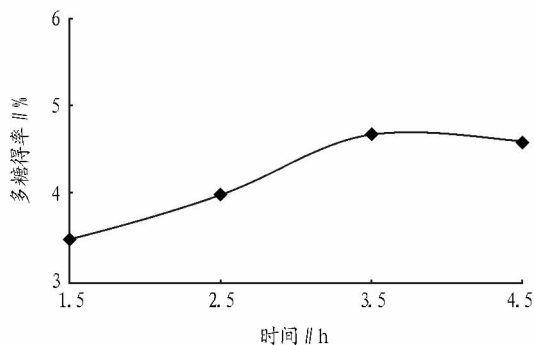


图 3 不同提取时间的多糖得率比较

2.1.3 提取温度对粗多糖得率的影响。选取不同的温度(65、75、85、95 °C),在液料比 60 ml/g,提取 2.5 h,用 85% 乙醇进行醇析,其他操作同“1.2.2”,测定多糖提取得率和含量,结果见图 4。从图 4 可以看出,温度对多糖的提取效果有较大的影响,当温度小于 85 °C 时多糖得率和含量随温度的

升高而增加,当温度超过 85 °C 后,多糖的得率有所降低,多糖含量减少。主要是因为温度升高多糖稍有降解,淀粉溶出而糊化,造成分离困难使得多糖含量下降。初步确定多糖的浸提温度在 85 °C 左右。

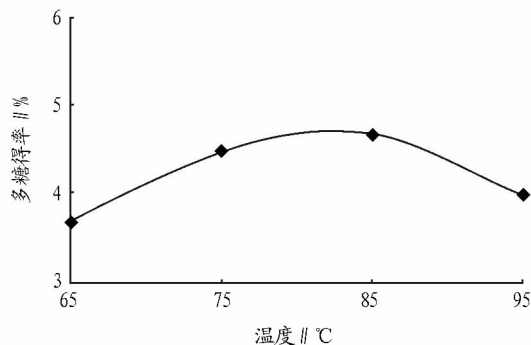


图 4 不同提取温度的多糖得率比较

2.1.4 乙醇体积分数对粗多糖得率的影响。选取不同的乙醇体积分数醇沉(65%、75%、85%、95%),液料比 60 ml/g,提取温度 95 °C,提取时间 2.5 h,其他操作同“1.2.2”,测定多糖提取得率和含量,结果见图 5。从图 5 可以看出,乙醇体积分数对多糖的提取效果有较大的影响。综合考虑选择 85% 乙醇体积分数较为合适。

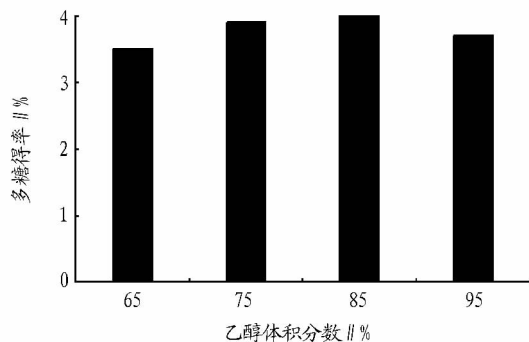


图 5 不同乙醇体积分数的粗多糖得率比较

2.2 山药粗多糖提取工艺的优化 在单因素试验基础上,选取液料比、提取温度、时间和乙醇体积分数为考察因素,每个因素拟定 3 水平,正交试验因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

水平	因素			
	液料比(A) ml/g	提取时间(B) h	提取温度(C) °C	醇沉浓度(D) %
1	40	2.5	75	75
2	60	3.5	85	85
3	80	4.5	95	95

选用正交试验设计法, $L_9(3^4)$ 正交表及试验结果见表 2。极差分析结果显示 $R_B > R_C > R_D > R_A$, 表明影响多糖得率的主次因素依次为: B(提取时间)、C(提取温度)、D(乙醇浓度)、A(液料比)。各因素各水平的均值比较得出, A 因素的 K_2 值最大, B 因素的 K_2 值最大, C 因素的 K_2 值最大, D 因素的 K_2 值最大, 因此最优组合为 $B_2C_2D_2A_2$, 即最佳工艺为提取时间 3.5 h, 提取温度 85 °C, 乙醇浓度 85%, 液料比 60

ml/g,按此条件提取多糖得率为5.39%。

表2 正交试验结果

试验号	因素				多糖得率//%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	4.31
2	1	3	2	2	5.30
3	1	3	3	3	3.71
4	2	1	2	3	4.02
5	2	2	3	1	4.61
6	2	3	1	2	4.71
7	3	1	3	2	3.91
8	3	2	1	3	4.53
9	3	3	2	1	4.60
K_1	4.440	4.080	4.517	4.507	
K_2	4.447	4.813	4.640	4.640	
K_3	4.347	4.340	4.077	4.087	
R	0.100	0.733	0.563	0.553	

3 结论与讨论

试验表明,在热水浸提紫山药可溶性多糖的过程中,提取时间是影响多糖提取的主要因素。紫山药多糖提取较优的工艺条件为:液料体积质量比60:1 ml/g,提取时间为3.5 h,提取温度85℃,乙醇体积分数85%,在此条件下山药多糖的得率为5.39%。在多糖质量分数测定中,因多糖组成比较复杂,得到相应的多糖标准品比较困难,故往往采用葡萄糖代替对照品,来测定样品多糖质量分数^[6-7]。

一些研究表明,多糖纯品与粗品的生物学活性存在一定

的差异,粗品的活性甚至优于纯品。他们认为,粗品成分中的一些物质如糖肽、结合蛋白等可能具有较强的生物学活性,在纯化过程中,这些原本与多糖相结合的成分被除去后,多糖纯品的活性反而降低^[8-10]。笔者进行该研究得出的山药粗多糖提取方法操作简单,成本较低,得率较高,易于进一步纯化,筛选的提取工艺可用于试验研究或大规模生产。

参考文献

- [1] 赵冬兰,唐君,刘靖,等.紫山药的引种与标准化栽培技术初探[J].江西农业报,2009,21(2):78-79.
- [2] 倪少云,宋学华.山药的营养成分分析[J].江苏药学与临床研究,2002,10(2):26-27.
- [2] 赵彦青,王爱凤.山药的药理研究进展[J].中医研究,2000,13(5):49-50.
- [3] 程林,陈斌,蔡宝昌.正交实验法优选山药多糖的提取工艺[J].中国药物与临床,2005,5(9):650-651.
- [4] 张季冬.山药多糖的化学分析及其生物活性[J].安徽农业科学,2009,37(23):11003-11004,11009.
- [5] 杨武德,李白玲.山药及不同炮制品多糖含量分析[J].贵阳中医学院学报,2004,26(3):61-62.
- [6] 刘秀河,吴艳,艾连中.山药水溶性多糖提取工艺的研究[J].食品与机械,2006,22(2):21-23.
- [7] NAKAMURAA A, FURUTA H, KATO M, et al. Effect of soybean soluble polysaccharides on the stability of milk protein under acidic conditions [J]. Food hydrocolloids, 2003, 17:333-343.
- [8] NAKAMURA A, TAKAHASHI T, YOSHIDA R, et al. Emulsifying properties of soybean soluble polysaccharide [J]. Food hydrocolloids, 2004, 18:795-803.
- [9] HILZ H, BAKX E J, SCHOLS H A, et al. Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterization in berries, juice, and press cake [J]. Carbohydrate polymers, 2005, 58:477-488.
- [10] 尹艳,高文宏,于淑娟.多糖提取技术的研究进展[J].食品工业科技,2007,28(2):248-250.

(上接第49页)

高位分蘖过多,对制种产量有害无利。秧苗密度大使得施肥水平及偏重方向发生变化:常规制种施肥基本都采用底肥一次清,机械化制种因机插秧的特殊性,必须减少底肥用量,并在晒田前7 d追肥1次。另外,减氮增磷钾是机械化制种母本施肥的基本准则,比常规制种更早晒田是促进制种母本穗层结构合理化的最佳途径。

3 激素施用

人工制种施用激素(920)一般为三段式,有分蘖与主穗相差大的,4~5次都正常。机械化制种激素一般只需施用2次。首次激素施用时间:人工一般为现穗10%~20%,机械化制种应在全田现穗10%以内施用。激素施用量:机械化制种激素用量为人工制种的1/2~2/3。施用方式:人工制种要求依据不同出穗情况,酌情间隔或连续施用激素,机械化制种激素最好连续施用(即天气允许就连续施用)。

关键技术:机械化制种母本穗层群体结构为主穗占80%以上,决定了其施用激素主要以主穗激素反应为基础。主穗对激素反应为:进入施用激素时段后,激素越早施用越敏感,超过一定时期可能对激素存在钝感,也就是生产上常说的

“打不动”。且首次施用后主穗所在茎叶返嫩,连续施用对激素的利用效率可达最大值,以节约激素用量,减少主穗对激素的耐性。早施连续施激素,且以主穗用量为标准,不单独对极少的分蘖穗制定施用方针是保证制种产量的关键。

4 结语

研究表明,机械插秧与人工栽秧相比产量明显提高。可见机械化制种有节约成本,增加产量的效果。机械化水稻制种,必须研究适合当地的制种栽培技术。在基本技术目标相同的情况下,针对新问题,发展新思维,总结摸索与机械化制种配套的栽培模式,从而达到减少劳力、增产增收的目的。

参考文献

- [1] 朱德峰,陈惠哲,徐一成.我国水稻机械种植的发展前景与对策[J].农业技术与装备,2007(1):14-15.
- [2] 潘跃,吴子文.水稻机械化插秧技术与种植机械发展趋势[J].中国稻米,2008(3):21-22.
- [3] 何勇,肖龙,陈杰,等.水稻制种母本机插秧无土秸秆基质的研究[J].安徽农业科学,2015(19):41-43.
- [4] 黄波,何勇,张体刚,等.秸秆用做水稻育秧基质的研究[J].江西农业大学学报,2014,36(S1):16-18.
- [5] 钟定旭,杨子超,叶成,等.杂交中粒稻中优18机械化制种技术[J].中国种业,2011(4):51-52.