

## 木瓜蛋白酶提取蜚蠊多糖最佳工艺研究

李晓庆, 富尧, 陈光道, 韩晓玥, 常江春, 罗志文, 许龙\* (佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154007)

**摘要** [目的] 优化木瓜蛋白酶提取美洲大蠊多糖的工艺参数。[方法] 利用不同梯度木瓜蛋白酶对美洲大蠊进行蜚蠊多糖提取试验, 采用单因素和正交试验的方法, 考察最佳酶用量、提取时间、温度等相关参数对提取液中多糖含量的影响, 确定蜚蠊多糖提取的工艺。[结果] 试验表明, 蜚蠊多糖提取的最佳条件为: 酶用量为 300  $\mu\text{g/g}$ , 提取温度 60  $^{\circ}\text{C}$ , 提取时间 1.0 h。[结论] 研究可为建立高效、实用的蜚蠊多糖提取途径提供技术参考, 同时也为美洲大蠊的保健药品及功能性食品开发提供可靠的科学依据。

**关键词** 蜚蠊多糖; 酶解法; 提取工艺; 条件优化

中图分类号 TS218 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)34-081-03

Study on the Best Extraction Process of Polysaccharide from *Periplaneta americana* by Papain

LI Xiao-qing, FU Yao, CHEN Guang-dao, XU Long\* et al (College of Life Sciences, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

**Abstract** [Objective] To optimize extraction technique of polysaccharide from *Periplaneta americana* by papain. [Method] Using different gradient papain to conduct extraction test of *Periplaneta americana* polysaccharide, using single factor and orthogonal test method, effects of optimal enzyme dosage, extraction time, temperature on polysaccharide content were investigated, the extraction technique of *Periplaneta americana* polysaccharide was obtained. [Result] The optimal conditions were enzyme dosage 300  $\mu\text{g/g}$ , extraction temperature 60  $^{\circ}\text{C}$ , extraction time 1.0 h. [Conclusion] The study can provide technical reference for establishing high efficient, practical *Periplaneta americana* polysaccharide extraction way, as well as provide reliable scientific basis for development of health medicine and functional food.

**Key words** *Periplaneta americana* polysaccharide; Enzymatic method; Extraction process; Conditions optimization

美洲大蠊 (*Periplaneta americana* L.), 为昆虫有翅亚纲蜚蠊目大蠊属昆虫, 俗称“蟑螂”, 也称其为石姜、滑虫, 各地方都有其不同的俗名, 如偷油婆、茶婆子、灶蚂子等<sup>[1]</sup>。在《本草纲目拾遗》中, 蟑螂作为俗名首次出现。蟑螂作为药用昆虫最早记载于《神农本草经》中列为中品, 味咸、寒, 可治疗寒热症、破积聚、喉咽闭、体寒无子等病症。在历代重要本草典籍如《新修本草》、《本草纲目》中都有记载, 近代许多药学专著中也有记述<sup>[2]</sup>。从美洲大蠊的研究文献来看, 目前国内的研究主要集中在美洲大蠊的种群调查、分布、发生规律及防治技术, 包括不同种类杀虫剂对美洲大蠊杀灭效率的比较与杀灭机理的研究; 基因表达和致敏作用方面的研究; 药用价值开发的研究<sup>[3-5]</sup>等。

笔者采用木瓜蛋白酶水解法对美洲大蠊中的蜚蠊进行多糖提取试验, 优化其多糖的提取工艺, 为建立高效、实用的蜚蠊多糖提取途径提供技术参考。研究采用了苯酚-硫酸法测定蜚蠊多糖的含量, 对比不同提取条件多糖的提取率, 为后续美洲大蠊的保健药品及功能性食品开发提供可靠的科学依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 美洲大蠊药材邮购自河北省安国中药材大市场, 经佳木斯大学生命科学学院罗志文副教授鉴定为蜚蠊目蜚蠊科美洲大蠊, 原药材及样品现保存于佳木斯大学应用昆虫研究所。

**1.2 样品预处理** 采用精细中药粉碎机对干燥后的美洲大蠊原药材进行粉碎, 粉碎后过 40 目筛, 放于 55  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱内干燥后保存备用。

预处理是采用石油醚除去脂溶性杂质, 按照原料: 石油

醚 = 1:3 (W/V) 的量加入石油醚, 室温下浸泡 10 h 后, 抽滤, 采用旋转蒸发仪浓缩回收石油醚, 重复 2 次, 于 50  $^{\circ}\text{C}$  干燥后保存备用<sup>[6]</sup>。

**1.3 试验方案** 称取处理过的美洲大蠊粉末各 5 g, 按试验设定的木瓜蛋白酶用量、提取温度、提取时间在恒温水浴锅内进行美洲大蠊的多糖提取, 试验完成后, 迅速将提取液升温至 100  $^{\circ}\text{C}$  对酶灭活 5 min, 抽滤, 并用 50  $^{\circ}\text{C}$  真空旋转蒸发器浓缩, 浓缩液加入 3 倍量的 95% 乙醇在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内醇沉 24 h, 采用大容量低速离心机离心 10 min, 沉淀物用无水乙醇洗涤脱水 2 次, 低温干燥得到蜚蠊多糖<sup>[7]</sup>。

**1.3.1 蜚蠊多糖提取工艺的单因素试验。** 对美洲大蠊提取多糖进行单因素试验, 包括木瓜蛋白酶用量、提取时间、提取温度, 试验因素水平范围分别为: 木瓜蛋白酶用量 (A) 为 100 ~ 600  $\mu\text{g/g}$ ; 提取温度 (B) 为 40 ~ 65  $^{\circ}\text{C}$ ; 提取时间 (C) 为 0.5 ~ 3.0 h。每个影响因子设计 3 个重复性试验, 选用平均值作为试验参数, 确定各因素对试验的影响<sup>[8]</sup>。

**1.3.2 蜚蠊多糖提取工艺的正交试验。** 为了进一步优化提取条件, 根据单因素试验结果, 选择了木瓜蛋白酶用量 (A)、提取温度 (B)、提取时间 (C) 这 3 个因素进行正交优化试验, 采用  $L_9(3^3)$  正交表安排试验<sup>[9]</sup>, 各因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

水平	因素		
	酶用量 (A) $\mu\text{g/g}$	提取温度 (B) / $^{\circ}\text{C}$	浸提时间 (C) / h
1	100	40	1.0
2	200	50	1.5
3	300	60	2.0

## 2 结果与分析

## 2.1 单因素试验

**2.1.1 蛋白酶用量对蜚蠊多糖提取的影响。** 由图 1 可见,

**基金项目** 佳木斯大学研究生科技创新项目 (LZZ2014\_002)。

**作者简介** 李晓庆 (1990 - ), 女, 黑龙江大庆人, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫学。\* 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, 从事昆虫学教学与科研工作。

**收稿日期** 2015-11-04

随着木瓜蛋白酶用量的逐渐增加,提取得到的蜚蠊多糖含量也随之增大,用量在200~300  $\mu\text{g/g}$ 时多糖含量增加的幅度较大,可能是由于随着浓度梯度的幅度增大,细胞内容物的扩散动力就越大,多糖溶出物就越多。而当酶用量为300  $\mu\text{g/g}$ 时,多糖的含量最大,达18.101%。

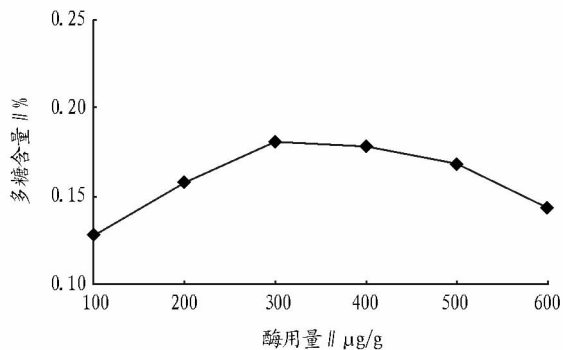


图1 酶用量对蜚蠊多糖含量的影响

**2.1.2 提取时间对蜚蠊多糖提取的影响。**由图2可见,随着提取时间的逐渐延长,蜚蠊多糖含量也逐渐增加,1.0~2.0 h间蜚蠊多糖含量增加的幅度不明显,而1.5~2.0 h间多糖含量增加的幅度不明显,在酶作用下,多糖随着提取时间延长,所得多糖含量也增加,时间过长,酶活动减弱。在提取时间3.0 h时,多糖含量17.532%。

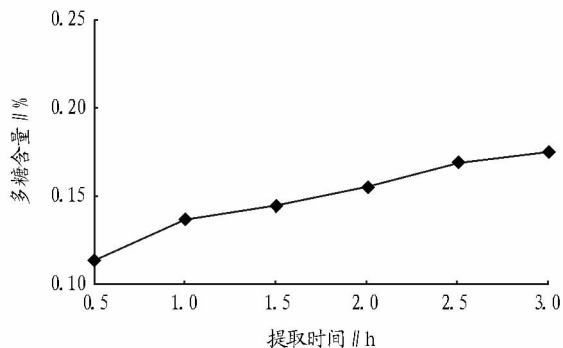


图2 提取时间对蜚蠊多糖含量的影响

**2.1.3 温度对蜚蠊多糖提取的影响。**温度对多糖的提取具有显著影响。由图3可见,随着提取温度的升高,蜚蠊多糖含量也随之增加,从45  $^{\circ}\text{C}$ 到50  $^{\circ}\text{C}$ 增加的幅度较明显,可能由于随着温度的升高而酶活力逐渐加强。温度显著降低时,多糖含量变化不显著,而当温度升高到一定程度,可能会影响到木瓜蛋白酶的活性,多糖提取率呈逐渐下降趋势。提取温度为50  $^{\circ}\text{C}$ 时,多糖含量最高,为20.135%。

**2.2 正交试验** 由表2试验结果可知,不同因素对蜚蠊多糖含量影响的顺序为:A>B>C,即酶用量对蜚蠊多糖含量影响最大,其次为提取温度也影响着蜚蠊多糖的提取含量,提取时间影响较小。通过试验,我们最后确定了蜚蠊多糖含量最佳的提取工艺条件为A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>,即酶用量为300  $\mu\text{g/g}$ ,提取温度60  $^{\circ}\text{C}$ ,提取时间1.0 h时提取的蜚蠊多糖含量最多。

### 3 结论与讨论

酶解法是近几年来提取动物多糖的先进技术,这种方法的优点是会造成多糖的损失,可减少原材料的浪费。而试

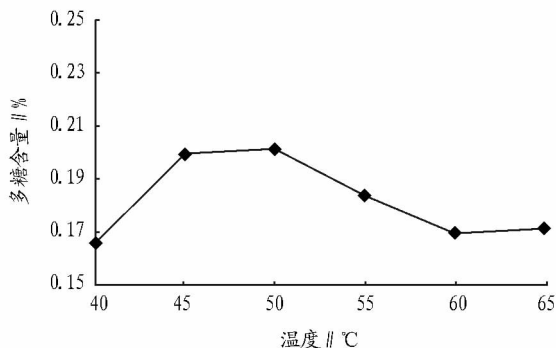


图3 提取温度对蜚蠊多糖含量的影响

验表明,不同材料提取次数过多,不仅浪费提取液和时间,还会产生大量滤液,浓缩较为困难。因此,选择合理的提取次数不仅节省原药材,降低成本投入,也不会明显影响多糖的提取量。

表2 正交试验结果与极差分析

试验号	因素			多糖含量 / %
	A // $\mu\text{g/g}$	B // $^{\circ}\text{C}$	C // h	
1	100	40	1.0	5.51
2	100	50	1.5	17.72
3	100	60	2.0	13.27
4	200	40	1.5	08.61
5	200	50	2.0	08.82
6	200	60	1.0	21.25
7	300	40	2.0	20.43
8	300	50	1.0	18.26
9	300	60	1.5	16.44
K <sub>1</sub>	12.17	11.52	15.01	
K <sub>2</sub>	12.89	14.93	14.26	
K <sub>3</sub>	18.38	16.99	14.17	
极差	6.21	5.47	0.84	

影响蜚蠊多糖提取率的因素主要有:木瓜蛋白酶用量、提取温度、提取时间等因素。通过正交试验得出,提取温度对蜚蠊多糖含量影响最大,其次为木瓜蛋白酶用量,提取时间和提取次数对多糖提取影响较小,蜚蠊多糖最佳提取工艺条件A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>,即酶用量为300  $\mu\text{g/g}$ ,提取温度60  $^{\circ}\text{C}$ ,提取时间1.0 h时提取的蜚蠊多糖含量最多。

通过酶解法来提取蜚蠊多糖工艺的优化研究,可以获得非常理想的优质蜚蠊多糖,为后期开展蜚蠊多糖的分离纯化、多糖成分分析及对荷瘤小鼠抗肿瘤活性等试验积累试验数据,也为将来开发优良的昆虫多糖药物及功能性食品服务。

### 参考文献

- [1] 肖小芹. 美洲大蠊生物学特性及药用价值研究[D]. 长沙:中南大学, 2007.
- [2] 萧庆慈, 肖泓, 刘昆平. 蜚蠊的古今应用[J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(1): 55-59.
- [3] 高永翔, 扈晓宇, 钟森. 蟑螂提取物对急性肝损伤动物模型的干预[J]. 药物研究, 2006, 15(10): 3-4.
- [4] 张丹. 美洲大蠊抗肿瘤活性成分及其结肠定位片的研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2014: 1-106.

善,实现了3种污染物同时减排的效果。合肥市仅2012年烟(粉)尘排放量增加了10.9 t,2013年3种污染物均实现减排。蚌埠的行业结构变化对主要污染物的减排都起到了阻碍的作用,SO<sub>2</sub>和NO<sub>x</sub>的排放量略有下降,主要依靠排放强度降低。淮南在保证工业经济规模增长较快的情况下,仍然依靠结构优化和降低排放强度同时实现了3种主要污染物的减排。马鞍山通过行业结构调整降低烟(粉)尘排放量,通过降低排放强度控制SO<sub>2</sub>和NO<sub>x</sub>排放,但由于其经济规模的增长,基本抵消了减排的效果,使得马鞍山的污染物减排效果差,甚至加剧了SO<sub>2</sub>和烟(粉)尘的排放。铜陵3种污染物的减排主要依靠工业经济规模的下降和行业结构变化控制SO<sub>2</sub>和烟(粉)尘排放。

**2.4 原因分析** 3种污染物的变化量分解结果显示,工业经济规模的增长是安徽省大部分地区现阶段污染物排放量增长的主要因素。对于仍处于在高速发展的安徽地区,经济的增长和人民生活水平的提高将长期依赖工业的发展,因此在未来一段时期内,工业规模的增长将不可避免地阻碍环境质量改善。SO<sub>2</sub>和NO<sub>x</sub>作为安徽省“十二五”期间总量控制主要的污染物,各地市污染物排放量变化的主导因素是排放强度因素。排放强度下降的原因主要是各地市针对重点排放行业原有的减排设施加强管理,提高处理效率的同时,2012、2013年新增了大量的减排项目,项目主要是对高排放企业(钢铁、火电、建筑材料行业)脱硫脱硝设施的新建或改造,取消旁路等控制措施,从而实现排放强度的下降。其中,铜陵市的SO<sub>2</sub>排放强度较基准年升高,是由当地个别企业存在脱硫设施未正常运行,违法排污严重导致的。由于烟粉尘不是“十二五”期间重点控制的污染物,因此存在排放强度的作用效果有正有负。

行业结构的变化对安徽省及主要地市的排放量变化的影响效应比排放强度效应小,并且存在对减排贡献负效应的地市。这是由于地市间原有行业结构的差异导致的。其中,合肥的行业结构调整对减排贡献较其他地市显著,原因是“十二五”以来,合肥的行业调整力度最大,提高新建企业的环保准入门槛,依靠政策优势吸引大批新兴工业企业,通过提高高污染的工业比重来逐步优化现有的行业结构,从而促进污染物减排。但对于蚌埠、马鞍山、铜陵等长期以来重点以工业发展为战略的老工业地区,由于过去几十年粗放式发展,使得这些地区形成了以高污染排放工业为经济主体的行业结构。这类地区对新兴行业的吸引力不足,难以通过低排放行业对高排放行业的替代来改善行业结构,在短期内关

停、淘汰高污染企业又会影响地区经济发展、就业和稳定,在所关注的时期内,淘汰的企业仍以小型高排放企业为主,对这类地区的行业结构优化作用小,使得行业结构因素对减排效果的贡献不足。

### 3 结论与讨论

(1)2011~2013年,安徽省及主要地市的SO<sub>2</sub>和NO<sub>x</sub>排放量逐年下降,烟粉尘排放量整体上是下降的,个别地市略有上升。排放强度因素和行业结构因素促进减排,经济规模增长阻碍减排。影响因素中的主导因素是排放强度,行业结构变化和经济规模因素的作用较小,且地区间存在差异。

(2)对减排效果的分析可知,排放强度下降来源于各地区对高污染行业实施的新建减排项目,改造原有设施,污染物处理效率的提高;降低高排放行业在工业中的比重的行业结构优化措施对减排效果仍未起主导作用。

(3)在安徽省经济高速发展的背景下,根据污染物排放量影响因素提出减排对策。一方面,仍然要加快新建污染控制设施和对已有设施的升级改造,这是短期内安徽省及其主要地市工业废气污染物减排的主要手段。另一方面,对于高速发展的新兴工业地区应严格控制新增企业类型,使得行业结构重心逐步向环境友好型转移;而对老工业地区则需要制定长期规划,给予适当的税收优惠和补贴吸引新兴行业,引导新老行业的更替,实现行业结构优化。

### 参考文献

- [1] 郭道扬. 会计百科全书[M]. 沈阳:辽宁人民出版社,1989:1239-1240.
- [2] 石广明,王金南,毕军,等. 中国工业二氧化硫排放变化指标分解研究[J]. 中国环境科学,2012,32(1):56-61.
- [3] 宋杰鲲. 基于LMDI的山东省能源消费碳排放因素分解[J]. 资源科学,2012,34(1):35-41.
- [4] 高彩玲,高歌,田采霞. 河南省能源消费碳排放的因素分解及减排途径[J]. 中国矿业,2011,20(3):46-49.
- [5] 朱勤,彭希哲,陆志明,等. 中国能源消费碳排放变化的因素分解及实证分析[J]. 资源科学,2009,31(12):2072-2079.
- [6] 段显明,董正卫. 浙江省能源消费碳排放的因素分解:基于LMDI分析方法[J]. 北京邮电大学学报(社会科学版),2011,13(4):68-75.
- [7] 刘睿劼,张智慧. 中国工业烟尘排放状况研究[J]. 生态环境学报,2012,21(4):694-699.
- [8] 曾贤刚,倪宏宏,陈果. 我国工业SO<sub>2</sub>排放趋势及影响因素分析[J]. 中国环保产业,2009(10):19-23.
- [9] 潘艳如. 工业污染影响因素分解分析[D]. 沈阳:东北大学,2010.
- [10] 陆文聪,李元龙. 中国工业减排的驱动因素研究基于LMDI的实证分析[J]. 统计与信息论坛,2010(10):49-54.
- [11] 李从欣,张举钢,李国柱. 中国环境污染影响因素分解及其实证分析[J]. 资源与产业,2012,14(6):121-125.
- [12] 张崇辉. 环境污染与经济增长的关系研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2012.
- [13] GENE M, GROSSMAN A K. Environmental impacts of a North American free trade agreement[R]. NBER Working Paper,1991:3914.

(上接第82页)

- [5] 柳建发,汪世平,徐绍锐,等. 医学昆虫蜚蠊化学组分及药用价值研究现状[J]. 地方病通报,2009,24(6):93-95.
- [6] 罗志文,刘娟,张聪颖,等. 地鳖虫多糖提取工艺的优化研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(28):13978-13979.
- [7] 罗志文,刘娟,赵永勋. 酶解法提取地鳖虫多糖工艺的优化[J]. 黑龙江

农业科学,2018(8):102-104.

- [8] 方耀敏,李晓庆,赵也,等. 光肩星天牛多糖最佳提取工艺试验研究[J]. 黑龙江医药科学,2013,36(5):2-4.
- [9] 赖泰君,刘旭辉,孙建华,等. 蚕蛹多糖提取工艺的研究[J]. 中药材,2009,32(7):1137-1139.