

## 木瓜蛋白酶法提取荸荠皮多糖

汪建红<sup>1,2\*</sup>, 刘浩<sup>1</sup><sup>1</sup>内江师范学院化学化工学院;<sup>2</sup>四川省高等学校“果类废弃物资源化”重点实验室,内江 641112

**摘要:**本文以低温烘干的荸荠皮为原料,利用木瓜蛋白酶提取荸荠皮中的多糖。通过单因素实验和正交实验研究了 pH、木瓜蛋白酶用量、液料比、酶解温度、酶解时间对多糖提取效果的影响。结果表明,最佳提取工艺条件为:pH 4,木瓜蛋白酶用量 0.3%,液料比 25:1 mL/g,酶解温度 50 °C,酶解时间 2 h。验证实验表明,多糖平均得率可达 30.03%,远高于相同条件下水提法的得率 21.23%,且重现性好。本实验为提高荸荠的综合价值提供了理论基础和实验方法。

**关键词:**荸荠皮;木瓜蛋白酶;多糖;提取

中图分类号:O629.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.8.014

Extraction of Polysaccharide from *Eleocharis tuberosa* Peel by PapainWANG Jian-hong<sup>1,2\*</sup>, LIU Hao<sup>1</sup><sup>1</sup>College of Chemistry and Chemical Engineering, Neijiang Normal University; <sup>2</sup>Key Laboratory of Fruit Waste Treatment and Resource Recycling, Sichuan Neijiang 641112, China

**Abstract:** In this study, polysaccharide was extracted from low-temperature baked *Eleocharis tuberosa* peel by papain. The effects of pH value, papain dosage, liquid-solid ratio, enzymatic temperature and enzymatic time on the extraction of polysaccharide were studied by single factor experiments and orthogonal tests. The result showed that the optimal extraction conditions were: pH of 4, papain dosage of 0.3%, liquid-solid ratio of 25:1 mL/g, enzymatic temperature of 50 °C and enzymatic time of 2 h. In the verification experiment, the average yield of polysaccharide reached 30.03%, which was much higher than the yield (21.23%) of water extraction under the same conditions. The reproducibility of the experiments was good. This study provided the theoretical basis and experimental method for enhancing the comprehensive value of *E. tuberosa*.

**Key words:** *Eleocharis tuberosa* peel; papain; polysaccharide; extraction

荸荠是一种原产于中国和印度的营养丰富的水果,在中国已有 2000 多年的栽培历史,目前年产量超过 80 万 t<sup>[1]</sup>。荸荠的消费量较大,但荸荠皮往往作为垃圾被直接抛弃,造成了资源的浪费。荸荠皮含有丰富的多糖,多糖具有抗氧化、抗衰老、降血糖、抗肿瘤、免疫调节等功能,因此引起人们极大关注<sup>[2-5]</sup>。

天然产物中多糖常用提取方法有水提法<sup>[6]</sup>、超声波法<sup>[6-8]</sup>、微波法<sup>[7,9]</sup>、酶法等<sup>[7,10,11]</sup>。水提法操作简便,但提取时间长,得率较低;超声波法操作简便,条件温和,得率较高,但超声波会对人体带来危害,长期接触低剂量超声波可能有致癌的风险;微波法

简便省时,得率较高,但微波会破坏多糖结构,也会对人体构成危害;酶法操作简便,条件温和,且对多糖结构影响较小,得率也较高,也不会对人体带来危害。到目前为止,文献中<sup>[12]</sup>只出现了超声波法、水提法提取荸荠皮中多糖的记载,并没有使用酶法提取荸荠皮中多糖的记录,因此本文选择酶法提取荸荠皮中多糖。木瓜蛋白酶<sup>[13]</sup>溶解容易,活力值高,操作简便,后处理容易,因此本文使用木瓜蛋白酶法提取荸荠皮中的多糖,并优化其提取工艺条件,为其应用提供理论基础。

## 1 材料与仪器

## 1.1 试剂与材料

木瓜蛋白酶(活力值  $\geq 80$  万 u/g, P01021BA14),生化试剂;葡萄糖、冰醋酸、醋酸钠、浓硫酸、苯酚,均为分析纯;荸荠,产自四川隆昌。

## 1.2 仪器与设备

DFY-600C 快速开盖万能高速粉碎机(南京互川电子有限公司);722N 型可见分光光度计(上海仪电分析有限公司);CS101-2AB 型电热鼓风干燥箱(重庆试验设备厂);BT-224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(江苏金坛市医疗仪器厂);TDL-5-A 离心机(上海安亭科学仪器厂);795S 型紫外-可见分光光度计(上海棱光技术有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 荸荠皮多糖的提取与测定

测定波长的选择:参考文献方法<sup>[14,15]</sup>,配制 1.00 mg/mL 的葡萄糖标准溶液和 6% 的苯酚溶液,取葡萄糖标准溶液显色,利用紫外-可见分光光度计在 300~600 nm 波长位置进行扫描,发现在 488 nm 处存在较强的吸收峰,因此选择测定波长为 488 nm。

标准曲线的绘制:分别精密吸取标准溶液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mL 于 50 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀。精密吸取上述各溶液 2.0 mL,分别加入 1.0 mL 6% 苯酚溶液,振荡,缓慢加入 5.0 mL 浓硫酸,摇匀,于 40 °C 水浴中显色 30 min,在 488 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,并求出其在 0.008~0.048 mg/mL 的线性回归方程为  $A = 33.4C - 0.0704$ ,  $R^2 = 0.9994$ 。

多糖的提取:参考文献方法<sup>[14,15]</sup>,取荸荠皮粉末 2.000 g 于 100 mL 圆底烧瓶中,按照比例加入木瓜蛋白酶溶液和一定 pH 的缓冲溶液,于一定温度下回流提取一定时间,然后沸水浴灭酶 60 min,离心,取上层清液,并转移至 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,即得提取液溶液。

多糖的测定:用移液管准确移取 1.00 mL 上述提取液于 25 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容。再从前面容量瓶中准确移取 1.00 mL 溶液于 10 mL 比色管中,摇匀,定容。从上述比色管中取 2.00 mL 溶液于另一 10 mL 比色管中,加入 1 mL 6% 的苯酚溶液,摇匀,再加入 5 mL 浓硫酸,摇匀,然后于 40 °C 水浴显色 30 min,在 488 nm 处测其吸光度,根据标准曲线回归方程得到稀释后提取液中多糖的浓度,多糖的得率按如下公式计算:

$$Et(\%) = (C \times V \times n) / m \times 100\%$$

式中,Et 为得率(%),C 为测得的提取液中多糖浓度(g/mL),n 为稀释的倍数,V 为提取液的体积(mL),M 为荸荠皮干粉质量(g)。

### 2.2 荸荠皮多糖酶法提取工艺单因素实验

#### 2.2.1 pH 对提取效果的影响

在木瓜蛋白酶用量(即木瓜蛋白酶用量占荸荠皮用量的质量百分比)、液料比( $V_{\text{水}}:m_{\text{荸荠皮}}$ )、酶解温度、酶解时间分别为 0.1%、15:1 mL/g、40 °C、1 h 的条件下,选择不同 pH(3、4、5、6)的缓冲溶液,重复上述操作。

#### 2.2.2 木瓜蛋白酶用量对提取效果的影响

在液料比、酶解温度、酶解时间分别为 15:1 mL/g、40 °C、1 h 及上一步确定的 pH 的条件下,选择不同木瓜蛋白酶用量(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%),重复上述操作。

#### 2.2.3 液料比对提取效果的影响

在酶解温度、酶解时间分别为 40 °C、1 h 及前面步骤确定的 pH、酶用量的条件下,选择不同液料比(15:1、20:1、25:1、30:1、35:1) mL/g,重复上述操作。

#### 2.2.4 酶解温度对提取效果的影响

在酶解时间为 1 h 及前面步骤确定的 pH、酶用量、液料比的条件下,选择不同酶解温度(30、40、50、60、70、80 °C),重复上述操作。

#### 2.2.5 酶解时间对提取效果的影响

在前面步骤确定的 pH、酶用量、液料比、酶解温度的条件下,选择不同酶解时间(1、2、3、4 h),重复上述操作。

### 2.3 荸荠皮多糖酶法提取工艺正交实验

参考实验方法和单因素实验的结果,本实验选择 pH、木瓜蛋白酶的用量、液料比( $V_{\text{水}}:m_{\text{荸荠皮}}$ )、酶解温度、酶解时间等 5 个因素为考察因素来设计  $L_{16}(4^5)$  正交表,并按照此正交表安排实验,每组实验条件下重复 3 次平行实验,重复上述操作。

### 2.4 荸荠皮多糖酶法提取工艺验证实验及水提法实验

在正交实验得出的最佳条件下重复 2.1 中多糖提取部分和多糖测定部分的操作,做 5 次平行验证实验;同时在此最佳条件下在不用酶的情况下,重复 2.1 中的操作,即水提法的操作。

## 3 结果与讨论

### 3.1 单因素实验

### 3.1.1 pH 的影响

pH 对荸荠皮中多糖提取效果的影响如图 1(A)所示。从图 1(A)可知,在一定范围内,随 pH 的增加,多糖得率逐渐增加,当 pH 为 4.0 时,多糖

得率达最大值;此后随着 pH 增加,多糖得率呈现下降趋势。这是由于,在一定 pH 范围内,随 pH 的增加,酶活性逐渐增加,但过高的 pH 也会使酶活性降低。因此综合考虑,选择最佳 pH 为 4.0。

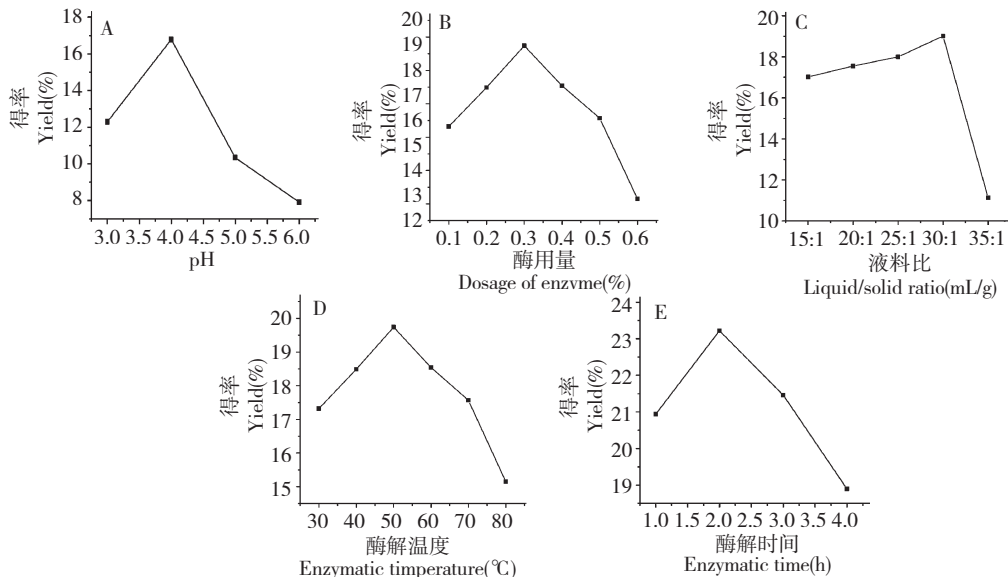


图 1 pH(A)、木瓜蛋白酶用量(B)、液料比(C)、酶解温度(D)及酶解时间(E)对荸荠皮多糖得率的影响

Fig. 1 Effects of pH (A), enzyme dosage (B), liquid-solid ratio (C), enzymatic temperature (D) and enzymatic time (E) on the extraction yield of polysaccharide from *E. tuberosa* peel

### 3.1.2 酶用量的影响

在 pH = 4 的条件下,木瓜蛋白酶用量(即酶用量和荸荠皮用量的质量百分比)对多糖提取效果的影响如图 1(B)所示。从图 1(B)可知,在木瓜蛋白酶用量 0.1% ~ 0.3% 的范围内,多糖得率随酶用量增加而增加,当酶用量为 0.3% 时,多糖得率达最大值,此后随着酶用量的增加,多糖得率却逐渐下降。这是由于酶用量越大,酶活力值越大,越有利于多糖的析出,但酶用量的增加也会增加被酶分解变质的多糖的量。综合考虑,选择最佳木瓜蛋白酶用量为 0.3%。

### 3.1.3 液料比的影响

在 pH = 4,木瓜蛋白酶用量 0.3% 的条件下,液料比对多糖得率的影响如图 1(C)所示。从图 1(C)可知,随着溶剂用量的增加,荸荠皮中多糖得率逐渐增加,当液料比为 30:1 mL/g 时,多糖得率达最大值;此后随着溶剂用量的增加,多糖得率不但不增加,反而逐渐下降。这是由于溶剂越多,能溶解浸出的多糖越多;但随着溶剂用量的增加,酶的浓度逐渐下降,活性逐渐下降,因此多糖的浸出受到抑制。综合考虑,选择液料比 30:1 (mL/g) 为最佳值。

### 3.1.4 酶解温度的影响

在 pH = 4,木瓜蛋白酶用量 0.3%,液料比 30:1 mL/g 的条件下,酶解温度对荸荠皮中多糖提取效果的影响如图 1(D)所示。从图 1(D)可知,随酶解温度的升高,多糖得率逐渐上升,当酶解温度达到 50 °C 时,多糖得率达最大值,此后随着温度升高,多糖得率却逐渐下降。这是由于温度的升高也增加了酶的活性和荸荠皮中多糖分子的活跃度,有利于多糖的浸出,但温度过高时,也会导致酶活性下降甚至失活,被氧化分解变质的多糖的量也会增加。综合考虑,选择 50 °C 为最佳酶解温度。

### 3.1.5 酶解时间的影响

在 pH = 4,木瓜蛋白酶用量 0.3%,液料比 30:1 mL/g,酶解温度 50 °C 的条件下,酶解时间对荸荠皮中多糖提取效果的影响如图 1(E)所示。从图 1(E)可知,随酶解时间的增加,多糖得率逐渐增加,当酶解时间达到 2 h 时,得率达最大值,此后随着时间的继续延长,多糖得率却逐渐下降。这是由于开始阶段,提取液中多糖浓度较小,远未达到饱和状态,因此有利于多糖的浸出,当达到 2 h 时,提取液中多糖浓度接近于饱和,如果继续延长酶解时间,被分解变

质的多糖的量会逐渐增加,木瓜蛋白酶也会反过来抑制多糖的浸出,也会增加能源的浪费。综合考虑,选择 2 h 为最佳酶解时间。

### 3.2 正交实验

$L_{16}(4^5)$  正交实验设计、实验结果及极差分析结果见表 1, 方差分析结果见表 2。

表 1  $L_{16}(4^5)$  正交实验设计及结果

Table 1  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experimental design and results

| 实验号<br>No. | (A) pH | (B) 酶的用量<br>Dosage of<br>enzyme (%) | (C) 液料比<br>Liquid-solid<br>ratio (mL/g) | (D) 酶解温度<br>Enzymatic<br>temperature (°C) | (E) 酶解时间<br>Enzymatic<br>time (h) | 得率<br>Yield (%) |
|------------|--------|-------------------------------------|---|---|-----------------------------------|-----------------|
| 1          | 3      | 0.1                                 | 20:1                                    | 40  | 1                                 | 11.90           |
| 2          | 3      | 0.2                                 | 25:1                                    | 50  | 2                                 | 28.76           |
| 3          | 3      | 0.3                                 | 30:1                                    | 60  | 3                                 | 20.65           |
| 4          | 3      | 0.4                                 | 35:1                                    | 70  | 4                                 | 21.59           |
| 5          | 4      | 0.1                                 | 25:1                                    | 60  | 4                                 | 22.70           |
| 6          | 4      | 0.2                                 | 20:1                                    | 70  | 3                                 | 23.05           |
| 7          | 4      | 0.3                                 | 35:1                                    | 40  | 2                                 | 26.66           |
| 8          | 4      | 0.4                                 | 30:1                                    | 50  | 1                                 | 19.91           |
| 9          | 5      | 0.1                                 | 30:1                                    | 70  | 2                                 | 23.03           |
| 10         | 5      | 0.2                                 | 35:1                                    | 60  | 1                                 | 16.42           |
| 11         | 5      | 0.3                                 | 20:1                                    | 50  | 4                                 | 23.00           |
| 12         | 5      | 0.4                                 | 25:1                                    | 40  | 3                                 | 19.94           |
| 13         | 6      | 0.1                                 | 35:1                                    | 50  | 3                                 | 24.23           |
| 14         | 6      | 0.2                                 | 30:1                                    | 40  | 4                                 | 18.09           |
| 15         | 6      | 0.3                                 | 25:1                                    | 70  | 1                                 | 18.75           |
| 16         | 6      | 0.4                                 | 20:1                                    | 60  | 2                                 | 24.14           |
| $k_1$      | 20.73  | 20.47                               | 20.52                                   | 19.15                                     | 16.75                             |                 |
| $k_2$      | 23.08  | 21.58                               | 22.54                                   | 23.98                                     | 25.65                             |                 |
| $k_3$      | 20.60  | 22.27                               | 20.42                                   | 20.98                                     | 21.97                             |                 |
| $k_4$      | 21.30  | 21.40                               | 22.23                                   | 21.61                                     | 21.35                             |                 |
| R          | 2.48   | 1.80                                | 2.12                                    | 4.83                                      | 8.90                              |                 |

表 2 正交实验结果方差分析

Table 2 Variance analysis of the orthogonal experimental results

| 因素<br>Factor | SS      | df | F      | $F_{0.05}(3,3)$ | P |
|--------------|---------|----|--------|-----------------|---|
| A            | 15.715  | 3  | 2.378  | 9.280           |   |
| B            | 6.608   | 3  | 1.000  | 9.280           |   |
| C            | 14.809  | 3  | 2.241  | 9.280           |   |
| D            | 47.689  | 3  | 7.217  | 9.280           |   |
| E            | 160.130 | 3  | 24.233 | 9.280           | * |
| 误差(e)        | 6.61    | 3  |        |                 |   |

注:  $F_{0.05}(3,3) = 9.280$ ,  $F_{0.01}(3,3) = 29.500$ , \*  $P < 0.05$  为影响显著, \*\*  $P < 0.01$  为影响非常显著。

Note:  $F_{0.05}(3,3) = 9.280$ ,  $F_{0.01}(3,3) = 29.500$ , \*  $P < 0.05$ , indicated significant difference, \*\*  $P < 0.01$ , indicated very significant difference.

从表 1 可看出, 荸荠皮中多糖得率受到了 pH、酶用量、液料比、酶解温度、酶解时间这 5 个因素的交叉影响, 各影响的主次次序为酶解时间 > 酶解温度 > pH > 液料比 > 酶用量。最佳水平组合为  $A_2B_3C_2D_2E_2$ , 即 pH 值 4, 木瓜蛋白酶的用量 0.3%、液料比 25:1 mL/g、酶解温度 50 °C、酶解时间 2 h。

为了进一步确定实验因子的可信度, 对荸荠皮

中多糖得率的正交实验结果的方差分析见表 2。从表 2 可看到, 在所选择提取工艺的正交实验所选取的因素和水平范围内, 因素 E 即酶解时间的影响达到了显著的水平 ( $P < 0.05$ ), 因素 A、B、C、D 的影响均未达到显著水平, 即 pH、酶用量、液料比、酶解温度对多糖提取的影响均不显著。而 F 值结果表明, 方差分析结果与直观的极差分析结果一致。

对正交实验结果作了5次平行实验验证,结果多糖得率分别为29.88%,30.24%,30.02%,29.89%,30.12%,平均值为30.03%,这与正交实验结果一致。

表3 两种提取方法下的荸荠皮多糖提取情况对比

Table 3 Comparison of extraction results of polysaccharide from *E. tuberosa* peel by enzymatic extraction and water extraction

| 提取条件<br>Extraction<br>conditions | pH | 酶用量<br>Dosage<br>of enzyme (%) | 液料比<br>Liquid-solid<br>ratio (mL/g) | 酶解温度<br>Enzymatic<br>temperature (°C) | 酶解时间<br>Enzymatic<br>time (h) | 多糖得率<br>Yield of<br>polysaccharide (%) |
|----------------------------------|----|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--|
| 水提法 Water extraction method      | 4  | 0.0%                           | 25:1                                | 50                                    | 2                             | 21.23                                  |
| 木瓜蛋白酶法 Papain method             | 4  | 0.3%                           | 25:1                                | 50                                    | 2                             | 30.03                                  |

从表3可知,木瓜蛋白酶法的多糖得率大于相同条件下的水提法。

## 4 结论

本文通过设计单因素实验和正交实验,得出了木瓜蛋白酶法提取荸荠皮中多糖的实验中,影响荸荠皮中多糖得率的指标的因素大小顺序为酶解时间 > 酶解温度 > pH > 液料比 > 酶用量。提取的最佳工艺条件为 pH 4,木瓜蛋白酶的用量 0.3%、液料比 25:1 mL/g、酶解温度 50 °C、酶解时间 2 h。通过平行实验和与相同条件下水提法的比较可知,该方法不仅多糖得率较高,远高于水提法,而且实验重现性好,说明得出的结论是正确的。

## 参考文献

- Zhan G(詹歌), Zhou XH(周兴虎), Tu K(屠康), et al. Study on acidolysis extraction of pectin from Chinese water chestnut peel. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2010, 29: 859-864.
- Nie SP(聂少平), Xie MY(谢明勇), Luo Z(罗珍). Studies on antioxidative activity of tea polysaccharide. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 549-552.
- Zhu XX(朱晓霞), Luo XG(罗学刚). Progress in extraction and purification of polysaccharides. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2007, 28: 186-189.
- Yang YH(杨跃辉), Jiang QH(姜清华), Ding PT(丁平田), et al. Advances in studies on analytical methods of polysaccharides in plant. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42: 1239-1242.
- Tan M(谭敏), Qiu XM(邱细敏), Lu YY(陆艳艳), et al. A review on analytical methods for qualification and quantification of plant-derived polysaccharides. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30: 420-423.
- Zhang Y(张颖). Comparative study on extracting methods of polysaccharide in *Poria cocos*. *China Prac Med* (中国实用医

## 3.3 两种提取方法的比较

表3列举了相同提取条件下两种提取方法提取荸荠皮多糖的情况。

- 药), 2012, 7: 249-250.
- Han QJ(韩秋菊), Ma HF(马宏飞), Wang XF(王熊飞). Study on the extraction methods of *Auricularia auricula* polysaccharide. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2013, 52: 2386-2388.
  - Liu Q(刘齐), Du P(杜萍), Wang FS(王飞生), et al. Study on ultrasonic extraction of polysaccharides in chestnut shell by response surface methodology. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2014, 35: 221-224.
  - Guo L(郭雷), Chen Y(陈宇). Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* using response surface methodology. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31: 53-57.
  - An D(安冬), Zhu PW(朱蓓薇). Optimization of enzyme extraction conditions of cordycepin polysaccharide by using response surface methodology. *Agric Sci* (安徽农业科学), 2012, 40: 12666-12668.
  - Xu YQ(徐雅琴), Cui CS(崔崇士), Wang HW(王洪伟). Study on extraction methods of pumpkin polysaccharide. *Food Ind* (食品工业), 2006, 5: 45-47.
  - Wang ZH(王忠合), Wang J(王军), Li JW(黎健文). Extraction and properties of polysaccharide from chufa. *Food Sci Technol*, 2012, 37: 196-198.
  - Xu J(许静), Zhou FM(周凤梅), Peng F(彭芳), et al. Study on the extraction of polysaccharide from holothurian harslet by enzyme method. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2010, 31: 28-31.
  - Tian RH(田瑞红), Jiang LZ(江连洲), Hu SX(胡少新), et al. Preparation of water soluble soybean polysaccharides from soybean residue produced by ultrasonic-enzymatic extraction. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2011, 32: 305-308.
  - Zhang HR(张海容), Bai J(白娟), Wei ZY(魏增云), et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Lophantherum gracile* brongn by response surface methodology. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2013, 25: 303-310.