

# 小白及多糖提取、脱蛋白工艺及抗氧化性研究

宋志姣, 汤丹, 李悦, 章金龙, 罗旺全, 项辉, 马前涛\*

保山学院资源环境学院, 保山 678000

**摘要:**本研究探讨了小白及多糖提取、脱蛋白工艺及其抗氧化性。以粗多糖提取率为指标,在单因素实验的基础上进行正交试验,探讨微波额定功率百分比、微波时间、浸提温度、浸提时间对粗多糖提取率的影响,得到最佳提取工艺参数:微波功率为额定功率的40%,微波时间60 s,浸提温度70 °C,浸提时间2.5 h,在此条件下小白及多糖的得率为38.33%。脱蛋白实验结果显示:酶-Sevag法脱蛋白效果最好,其蛋白质脱除率为80.01%,多糖损失率为24.58%。比较小白及多糖的抗氧化性,得出酶制小白及多糖和小白及粗多糖对DPPH自由基、 $O_2^{\cdot -}$ 有较好的清除能力,其 $IC_{50}$ 值分别为24.855、28.948  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.212、0.223  $\text{mg}/\text{mL}$ 。研究结果为小白及等药用植物多糖的提取及综合利用提供借鉴。

**关键词:**小白及多糖;提取工艺;正交试验设计;脱蛋白工艺;抗氧化活性

中图分类号:Q949.9

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)8-1317-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.8.003

## Microwave-assisted extraction, antioxidant activity and deproteinization of polysaccharides from *Bletilla formosana*

SONG Zhi-jiao, TANG Dan, LI Yue, ZHANG Jin-long, LUO Wang-quan, XIANG Hui, MA Qian-tao\*

College of Resources and Environmental Sciences, Baoshan University, Baoshan 678000, China

**Abstract:** In the present study, we found the optimal conditions for the microwave-assisted extraction and deproteinization of *Bletilla formosana* polysaccharides and assessed the antioxidant activity of it. Herein, percentage of microwave rated power and pretreatment time and extraction temperature and time are employed to assess the effect of extraction technique on the yield of polysaccharide based on single factor experiments and orthogonal test. The optimum extraction parameters are as follow, 40% rated power, 60 s microwave pretreatment time, 70 °C extraction temperature, and 2.5 h extraction time. Under these optimized conditions, the yield of polysaccharide was 38.33% ( $n = 3$ ). Subsequently, three deproteinization methods were evaluated for the effect of protein removal and polysaccharide loss rates, such as Sevag method, enzymatic hydrolysis and their combination. The results obtained showed that the Enzymatic-Sevag method was the optimal method, which provided the deproteinization rate was 80.01%, and the polysaccharide loss rate was 24.58%. In addition, the *in vitro* antioxidant activities of *B. formosana* polysaccharides were investigated by measuring clearance abilities of  $O_2^{\cdot -}$ , 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The polysaccharide which was extracted from Enzyme method and the original polysaccharide showed good antioxidant activity. The half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) for scavenging of DPPH were 24.855 and 28.948  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and superoxide anion radicals were 0.212 and 0.223  $\text{mg}/\text{mL}$ , respectively. With this kind of investigation it would be easier to extract polysaccharide from *B. formosana* and other medicinal plants. Therefore, further research of precise chemical structures and biological functions of these medicinal plants polysaccharide would be currently in progress.

**Key words:** *Bletilla formosana* polysaccharide; extraction process; orthogonal design; deproteinization; antioxidant activity

收稿日期:2019-05-10 接受日期:2019-07-10

基金项目:云南省教育厅科学研究基金(2017ZZX 103);保山学院博士启动资金(17BS001);保山市“第八批中青年学术和技术带头人”项目(201903)

\* 通信作者 E-mail:tangbohu-ma@163.com

多糖类化合物是真菌、动物、植物细胞膜和细胞壁的主要成分,研究表明这种高分子聚合物在免疫调节、抑制肿瘤、抗病毒、抗氧化等方面均有显著生物活性<sup>[1-3]</sup>。多糖类药物毒副作用小、生物活性随着

纯度的提高而显著增加<sup>[4]</sup>,我国已有茯苓多糖(国药准字 B20050015)等多糖类药物问市。目前,真菌多糖是国内外研究的热点,对药用植物多糖成分的研究较少<sup>[5]</sup>。对于富含多糖的小白及,其研究主要集中在内生菌<sup>[6]</sup>、组织培养与快速繁殖<sup>[7]</sup>、白及属植物鉴定<sup>[8]</sup>等几个方面。蔡锦源对同属白及 *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rehb. f. 的研究认为:白及多糖和真菌多糖一样具有较好的抗氧化能力<sup>[9,10]</sup>。

小白及 *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. 又名小白芩、三叉白及,是兰科 (Orchidaceae) 白及属 (*Bletilla*) 多年生草本植物<sup>[11]</sup>,以干燥假鳞茎入药,具有消肿止血、收敛和生肌的功效<sup>[12]</sup>。小白及广泛分布于我国西南各省区,历来为少数民族重要的习用药材<sup>[13]</sup>,其适应能力强、抗逆性好,是易于进行林-药复合经营的药用植物;植株形态优美、花色艳丽,是美丽乡村建设的潜在园林园艺植物。现代医学研究表明小白及含有丰富的白及胶,其中的多糖、联苕类、二氢菲类等是小白及主要药用活性成分<sup>[14-16]</sup>。本研究以多糖得率为指标,探索微波辅助提取小白及假鳞茎多糖的最佳工艺,并比较3种脱蛋白工艺的效果;初步考察小白及粗多糖和精制多糖的抗氧化活性。研究结果为小白及多糖为主要活性成分的药品和天然食品添加剂的研究应用提供参考,为富含多糖药用植物的综合利用提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

小白及:购于保山市隆阳区农民街药材市场,样品经过保山学院汪建云教授、保山中医药高等专科学校杨发建、广西大学蒙奕奕博士共同鉴定。

无水乙醇、葡萄糖标准品、牛血清蛋白、苯酚、考马斯亮蓝、维生素 C、铁氢化钾、DPPH、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、浓硫酸、正丁醇、氯仿、磷酸盐缓冲液、铁氢化钾、三氯乙酸、三氯化铁、Tris-HCl 缓冲溶液、邻苯三酚、浓盐酸、茯苓多糖(国药准字 B20050015,湖南补天药业有限公司)、胰蛋白酶(酶活力为 10 000 U/g,和氏璧生物科技有限公司)等。

### 1.2 仪器

DHG 9140A 烘箱(上海恒一有限公司)、FF-1000A 粉碎机(常州市伟嘉仪器制造有限公司)、CP214 电子天平(奥豪斯仪器有限公司)、G70F20N2L-DG 微波炉(格兰仕微波炉电器有限公司)、HH-4 数显电子恒温水浴锅(常州国华电器有

限公司)、SHZ-D(Ⅲ)循环水式多用真空泵(上海子华生物科技有限公司)、OSB-2100 旋转蒸发仪(上海泉杰仪器有限公司)、TDL 5A 离心机(上海安亭)、UV2600 紫外-可见分光光度计(日本岛津)、20 目标标准筛(浙江上虞市道墟五四仪器厂)、YCD-DL259 电冰箱(中科美菱低温科技有限公司)、三角瓶、容量瓶等。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 小白及多糖提取条件研究

材料预处理:小白及假鳞茎洗净、切片、烘干、粉碎,过 20 目标标准筛后密封备用。单因素实验:精确称取小白及粉末 2.000 0 g,置于 100 mL 三角瓶中,按料液比 1:20 (m: v, g/mL,下同)加入 50 °C 温水,其余 4 个因素设定为微波额定功率 700 W 的 40%,微波时间为 60 s,浸提温度 80 °C,浸提时间 2 h,固定其中 3 个因素,依次对微波额定功率 700 W 的不同百分比(20%、40%、60%、80%、100%)、微波时间(30、40、50、60、70 s)、浸提温度(50、60、70、80、90 °C)、浸提时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)进行单因素实验,提取并浸提 3 次,参考杨翠娟<sup>[17]</sup>的方法合并、浓缩、沉淀和离心提取物,将离心后所得多糖烘干至恒重,采用称质量法测定小白及多糖的得率,重复 3 次。

按照下式计算多糖得率:

$$\text{多糖得率}(\%) = (\text{多糖干品质量} / \text{原料质量}) \times 100\%$$

最优工艺条件正交试验:结合单因素实验结果,参考  $L_9(3^4)$  正交试验表进行正交试验,正交试验因素及水平如表 1,其余步骤相同。

### 1.3.2 粗多糖脱蛋白工艺研究

#### 1.3.2.1 脱蛋白工艺

Sevag 法脱蛋白工艺参考王琳炜<sup>[18]</sup>。酶法脱蛋白工艺依次对不同水平的酶解温度(20、30、40、50、60 °C)、酶加量(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL)、酶解时间(30、40、50、60、70 min)进行单因素实验,酶解后置沸水浴灭酶 10 min,常温下离心 10 min,5 000 rpm 后取上清液测定蛋白含量,探讨不同脱蛋白参数对小白及粗多糖蛋白脱除率及多糖损失率的影响<sup>[18]</sup>;结合单因素实验的结果进行正交试验探讨最佳脱蛋白工艺。酶-Sevag 法联用脱蛋白工艺在酶法所得最优条件下进行,离心后的上清液采用 Sevag 法进行重复多次脱蛋白,直至无明显沉淀,测定蛋白质和多糖的吸光度。

表 1 正交试验因素及水平  
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

因素 Factor	水平 Level		
	1	2	3
A 额定功率百分比 Percentage of rated power (%)	20	40	60
B 微波时间 Microwave time (s)	50	60	70
C 浸提温度 Extraction temperature (°C)	60	70	80
D 浸提时间 Extraction time (h)	1.5	2.0	2.5

### 1.3.2.2 蛋白脱除率和多糖损失率测定

参考文献<sup>[18]</sup>的方法测定蛋白脱除率,于 595 nm 波长处测定浓度梯度标准液吸光度( $A_{595\text{nm}}$ ),以牛血清白蛋白溶液浓度(mg/mL)为横坐标, $A_{595\text{nm}}$ 为纵坐标,得一元线性回归方程: $Y = 17.943X + 0.0005$ ,  $R^2 = 0.9959$ 。

蛋白质脱除率按下式计算:

$$\text{蛋白质脱除率}(\%) = (R_i - R_j) / R_i \times 100\%$$

式中: $R_i$ 、 $R_j$  分别代表所得小白及粗多糖脱蛋白前、后蛋白质含量(mg/mL)。

参考文献<sup>[18]</sup>的方法测定多糖损失率,于 490 nm 波长处测定浓度梯度标准液吸光度( $A_{490\text{nm}}$ ),以葡萄糖浓度(mg/mL)为横坐标, $A_{490\text{nm}}$ 为纵坐标,得一元线性回归方程: $Y = 10.48X$ ,  $R^2 = 0.9991$ 。

多糖损失率按下式计算:

$$\text{多糖损失率}(\%) = (T_i - T_j) / T_i \times 100\%$$

式中: $T_i$ 、 $T_j$  分别代表所得小白及粗多糖脱蛋白前、后多糖含量(mg/mL)。

### 1.3.3 多糖抗氧化性研究

铁离子还原能力的测定:参考文献<sup>[19]</sup>分别测定小白及粗多糖、三种脱蛋白方法精制多糖、维生素 C 和茯苓多糖的铁还原能力。清除 DPPH 自由基能力的测定:参考文献<sup>[20]</sup>的方法进行,并计算  $IC_{50}$ 。清除  $O_2^-$  能力的测定:参考文献<sup>[21]</sup>的方法进行,并计算  $IC_{50}$ 。

## 1.4 数据处理

所有数据采用 Microsoft Excel 2016 绘制图表,用 SPSS 16.0 对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 微波辅助提取小白及多糖

#### 2.1.1 微波功率

测定结果表明,在微波功率小于额定功率的 40% 时,多糖得率随额定功率百分比的增加而增大;微波功率为额定功率的 40% 时,多糖得率最大,此

时多糖得率为 32.50%。微波会使分子的热运动增加,破碎细胞壁,在较短时间内使小白及多糖溶出。当微波额定功率大于 40% 时,多糖得率显著下降,这可能是由于微波不断增强,部分多糖因过度加热而分解,同时杂质溶出增多,在进行醇沉时小分子糖溶解在 95% 的乙醇溶液中,从而降低了小白及多糖得率<sup>[18]</sup>。

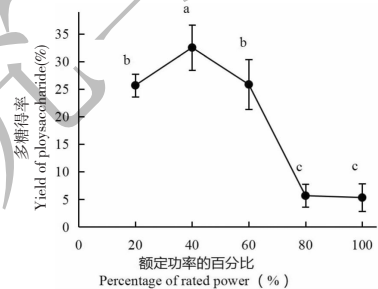


图 1 额定功率百分比对小白及多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of microwave power percentage on extraction yield of polysaccharide

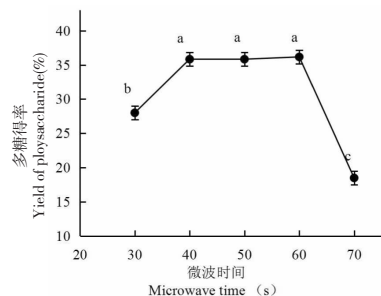


图 2 微波时间对小白及多糖得率的影响

Fig. 2 Effect of microwave time on extraction yield of polysaccharide

#### 2.1.2 微波时间

微波时间小于 40 s 时,多糖得率与微波时间呈正比,可能是在提取初期,浓度梯度差大,多糖扩散速率快。微波时间为 40~60 s,多糖得率变化缓慢,当微波时间为 60 s 时,多糖得率最大,为 36.17%,可能是浓度梯度差减小,扩散减慢。微波时间大于

60 s, 多糖得率显著下降, 可能是过分加热导致部分多糖水解加大, 使多糖得率下降<sup>[17]</sup>。

### 2.1.3 浸提温度

浸提温度小于 70 ℃, 多糖得率与温度呈正比; 当浸提温度为 70 ℃ 时, 多糖得率达到最大值, 为 25.33%; 浸提温度大于 70 ℃, 多糖得率显著下降, 其原因可能是温度过高造成多糖的降解, 温度 70 ℃ 为最佳提取温度。

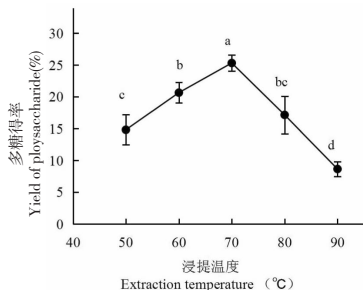


图3 浸提温度对小白及多糖得率的影响

Fig. 3 Effect of extraction temperature on extraction yield of polysaccharide

### 2.1.4 浸提时间

当浸提时间小于 2.0 h 时, 多糖得率随浸提时间的增大而增大, 当浸提时间为 2.0 h 时, 多糖得率达到最大值, 为 30.5%; 当浸提时间大于 2.0 h 时,

多糖得率显著下降, 其原因可能是长时间浸提使材料糊化, 多糖难溶出, 故浸提时间 2.0 h 为最佳。

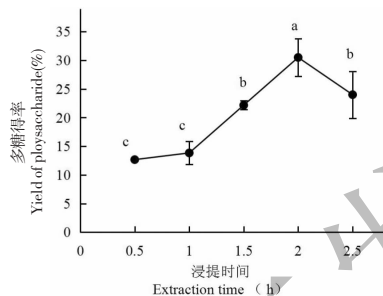


图4 浸提时间对小白及多糖得率的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on extraction yield of polysaccharide

### 2.1.5 正交试验优化微波辅助提取小白及多糖工艺

正交试验的结果表明, 工艺为  $A_2B_1C_2D_3$  的提取方案小白及多糖得率最高, 但是从极差分析的结果来看小白及多糖提取的最佳工艺应为:  $A_2B_2C_2D_3$ 。在相同条件下对  $A_2B_1C_2D_3$  和  $A_2B_2C_2D_3$  分别进行 3 次重复提取实验以验证结果, 表明小白及多糖的平均得率分别为 37.67% 和 38.33%, 综上所述微波辅助提取小白及多糖的最佳工艺组合为  $A_2B_2C_2D_3$ , 即微波功率为额定功率的 40%, 微波时间 60 s, 浸提温度 70 ℃, 浸提时间 2.5 h。

表 2  $L_9(3^4)$  正交试验结果

Table 2 Results and analysis of orthogonal experiment

实验号 Code	A 额定功率百分比 Percentage of microwave power (%)	B 微波时间 Microwave time (s)	C 浸提温度 Extraction temperature (°C)	D 浸提时间 Extraction time (h)	多糖得率 Yield of ploysaccharide (%)
1	1	1	1	1	23.00
2	1	2	2	2	31.33
3	1	3	3	3	27.50
4	2	1	2	3	37.33
5	2	2	3	1	31.17
6	2	3	1	2	28.33
7	3	1	3	2	25.00
8	3	2	1	3	25.33
9	3	3	2	1	19.33
$K_1$	27.28	28.44	25.56	24.39	
$K_2$	32.28	29.28	29.22	28.22	
$K_3$	23.11	24.94	27.89	30.06	
R	9.17	4.33	3.67	5.67	
最佳条件 Optimum condition	$A_2$	$B_2$	$C_2$	$D_3$	

以多糖得率为考察指标(表3),经方差分析可得除了A微波额定功率百分比(%)对多糖得率影响显著以外,B微波时间(s)、C浸提温度(℃)和D浸提时间(h)对多糖得率的影响并不显著,根据显

著性可得影响小白及多糖得率的因素顺序为  $A > D > B > C$ ,即微波额定功率百分比 > 浸提时间 > 微波时间 > 浸提温度。

表3 正交试验结果方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal array design

误差来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	显著性 Significance
A	370.352	2	185.176	9.442	0.001
B	90.019	2	45.009	1.438	0.257
C	65.407	2	32.704	1.012	0.378
D	144.241	2	72.120	2.484	0.105

## 2.2 小白及多糖脱蛋白工艺分析

### 2.2.1 Sevag 法脱蛋白结果分析

小白及粗多糖的蛋白脱除率和多糖损失率随着脱蛋白次数的增加,均呈上升趋势。在第8次处理之后,小白及粗多糖的蛋白质脱除率为81.73%,多糖损失率达31.73%,采用该方法脱去小白及粗多糖中蛋白质的同时,蛋白质的脱除伴随着多糖的损失。

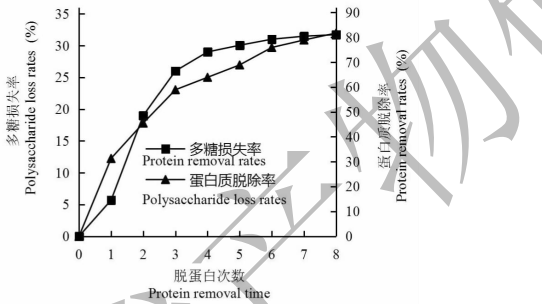


图5 Sevag 法脱小白及粗多糖蛋白

Fig. 5 Efficiency of protein removal by the Sevag method

### 2.2.2 酶法脱蛋白结果分析

单因素实验结果表明在底物浓度、催化作用接

触面积一定的情况下,蛋白质脱除反应不会一直随着酶浓度、酶解时间、酶解温度的增加而增加,酶加量0.5 mL,酶解时间40 min,酶解温度40℃的条件下蛋白脱除率最高,在最优单因素条件下小白及粗多糖的蛋白脱除率分别为65.59%、63.43%和67.23%。正交试验结果表明:最佳工艺实验号为6,既  $A_2B_3C_1D_2$ ,但是从极差分析的结果来看小白及多糖提取的最佳工艺应为:  $A_2B_2C_1D_3$ 。在相同条件下对  $A_2B_3C_1D_2$  和  $A_2B_2C_1D_3$  分别进行3次重复提取实验以验证结果,两个工艺的综合评分分别为72.58%和73.81%,因此酶法脱蛋白的最佳工艺组合为  $A_2B_2C_1D_3$ ,即酶加量0.5 mL, B酶解时间40 min,酶解温度30℃。由极差R分析可知,影响蛋白脱除程度因素按其作用大小排序为  $B > C > D > A$ ,即酶解时间 > 酶解温度 > 酶添加量。方差分析的结果表明(未列出):除了A酶加量(mL)对小白及粗多糖蛋白脱除率影响显著以外,B酶解时间和C酶解温度对蛋白脱除率影响并不显著,根据显著性将影响小白及多糖得率的因素顺序为  $B > C > A > D$ ,即酶解时间 > 酶解温度 > 酶添加量。

表4  $L_9(3^4)$ 胰蛋白酶脱蛋白法正交试验结果

Table 4 Orthogonal array design in terms of coded and actual values with experimental results

实验号 Code	A 酶加量 Enzyme addition (mL)	B 酶解时间 Enzymatic hydroly time (min)	C 酶解温度 Enzymatic hydroly temperature (°C)	D 空 Empty	蛋白质脱除率 Protein removal rates (%)	多糖保留率 Polysaccharide retention rates (%)	综合评分 Comprehensive evaluation
1	1	1	1	1	60.23	75.06	67.65
2	1	2	2	2	57.50	78.46	67.98
3	1	3	3	3	61.32	76.92	69.12
4	2	1	2	3	63.23	78.53	70.88

续表 4(Continued Tab. 4)

实验号 Code	A 酶加量 Enzyme addition (mL)	B 酶解时间 Enzymatic hydroly time (min)	C 酶解温度 Enzymatic hydroly temperature (°C)	D 空 Empty	蛋白质脱除率 Protein removal rates (%)	多糖保留率 Polysaccharide retention rates (%)	综合评分 Comprehensive evaluation
5	2	2	3	1	64.57	79.89	72.23
6	2	3	1	2	65.38	82.42	73.90
7	3	1	3	2	62.27	77.94	70.11
8	3	2	1	3	63.83	79.62	71.73
9	3	3	2	1	61.64	73.24	67.44
K <sub>1</sub>	68.25	69.54	71.09	69.11			
K <sub>2</sub>	72.34	71.07	69.94	68.77			
K <sub>3</sub>	69.76	70.15	70.27	70.58			
R	4.29	6.46	6.26	5.92			
最优方案	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>			

### 2.2.3 酶-Sevag 法联用脱蛋白结果分析

由图 6 可知,先用酶法处理后蛋白质脱除率为 65.38%,多糖损失率为 17.58%,脱除次数大于 2 次以后蛋白质脱除率无明显差异,与之相反多糖损失率仍在增加。因此在第 5 次处理后停止实验,此时蛋白质脱除率为 81.11%、多糖损失率为 33.22%。综合考虑蛋白质脱除率和多糖损失率两组数据,酶-Sevag 法处理 2 次时蛋白脱除率较高为 80.01%,多糖损失率较低为 24.58%。

### 2.2.4 三种脱蛋白工艺比较

表 5 三种脱蛋白工艺最佳参数比较

Table 5 Comparison of three protein removal methods

脱蛋白法 Method	蛋白脱除率 Protein removal rate (%)	多糖损失率 Polysaccharide loss rate (%)
Sevag 法 Sevag method	81.31	31.73
酶法 Enzymatic hydrolysis method	65.41	17.78
酶-Sevag 法 Sevag-enzymatic hydrolysis method	80.01	24.58

测定结果表明:采用 Sevag 法除去小白及粗多糖中的蛋白质,脱除率最高为 81.31%,但同时多糖损失率也最高为 31.73%;采用酶法除去小白及粗多糖中的蛋白质时,蛋白质脱除率最低为 65.41%,同时多糖损失率也最低为 17.78%;采用酶-Sevag 法时,蛋白质脱除率为 80.01% 与 Sevag 法较为接近,同时多糖损失率为 24.58% 远低于 Sevag 法的 31.73%。采用酶-Sevag 法脱去小白及粗多糖中的蛋白质过程中,胰蛋白酶将粗多糖中的蛋白质降解为小分子氨基酸或者多肽,留在溶液中;而分子量较

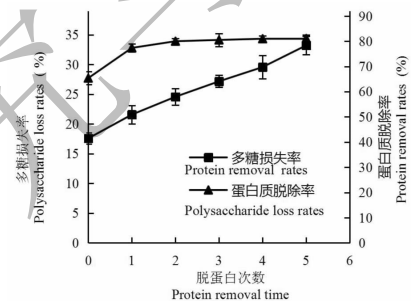


图 6 酶-Sevag 法脱蛋白

Fig. 6 Deproteinization efficiency of the combined method

大的多糖则可通过高速离心获得沉淀;再结合 Sevag 法处理 2 次,既节约了试剂和时间,又降低了多糖损失率,故酶-Sevag 法为小白及粗多糖脱蛋白的最优方法。该方法的参数为:酶加量 0.5 mL、酶解温度 40 °C、酶解时间 30 min,后置沸水浴中灭酶 10 min,取出后离心,上清液采用 Sevag 法脱蛋白 2 次。

### 2.3 小白及多糖的抗氧化性分析

#### 2.3.1 铁还原能力分析

如图 7 所示,小白及粗多糖、三种方法精制多糖、维生素 C 和茯苓多糖的铁还原能力皆随浓度的

增大而增大,相同浓度的小白及粗多糖、三种方法精制多糖和茯苓多糖的铁还原能力低于维生素 C,当浓度达到 10 mg/mL 时小白及粗多糖在 700 nm 的吸光度为 0.863, Sevag 制多糖的为 0.583, 酶制多糖的为 0.763, 酶-Sevag 制多糖的为 0.723, 维生素 C 的为 5.602, 茯苓多糖的为 0.633。同浓度下小白及多糖的铁还原能力低于维生素 C, 除 Sevag 法所得多糖以外其余精制方式所得小白及多糖略高于茯苓多糖。

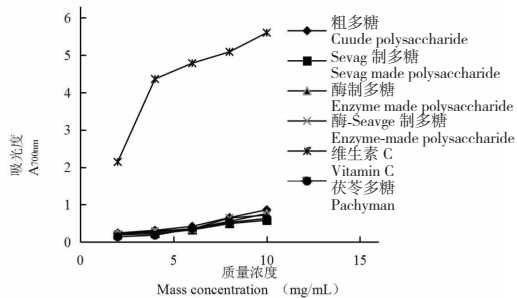


图7 多糖对铁还原能力

Fig. 7 Scavenging effect on ferric reducing antioxidant power

### 2.3.2 DPPH 自由基的清除能力

DPPH 自由基清除能力是衡量物质抗氧化活性的重要指标,由图 8 可知,小白及多糖提取物对 DPPH 自由基的清除能力低于维生素 C 而高于茯苓多糖。在质量浓度 10 ~ 80  $\mu\text{g/mL}$  范围内,小白及多糖和维生素 C 溶液质量浓度与 DPPH 自由基清除能力呈正比;在质量浓度大于 80  $\mu\text{g/mL}$  后小白及粗多糖、Sevag 法小白及多糖、酶法小白及多糖和酶-Sevag 小白及多糖对 DPPH 自由基的清除率趋于平缓。经拟合,小白及粗多糖对于 DPPH 自由基的  $\text{IC}_{50}$  值为 28.948  $\mu\text{g/mL}$ , Sevag 制多糖的  $\text{IC}_{50}$  为 42.769  $\mu\text{g/mL}$ , 酶制多糖的为  $\text{IC}_{50}$  为 24.855  $\mu\text{g/mL}$ , 酶-Sevag 制多糖的  $\text{IC}_{50}$  为 38.367  $\mu\text{g/mL}$ , 维生素 C 的  $\text{IC}_{50}$  值为 1.917  $\mu\text{g/mL}$ , 茯苓多糖的  $\text{IC}_{50}$  为

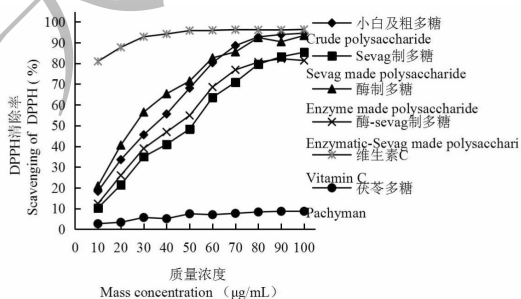


图8 多糖 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 8 Scavenging effect of WSP on DPPH

5 900.083  $\mu\text{g/mL}$ 。说明在相同浓度的情况下,酶法小白及多糖对 DPPH 自由基的清除能力较好、小白及粗多糖次之。

### 2.3.3 清除 $\text{O}_2^-$ 能力的测定

在质量浓度为 0.1 ~ 0.5 mg/mL 之间,小白及粗多糖、Sevag 法小白及多糖、酶法小白及多糖和酶-Sevag 小白及多糖对  $\text{O}_2^-$  清除能力随着溶液质量浓度的增加而增大。经拟合,小白及粗多糖对于  $\text{O}_2^-$  的清除率的  $\text{IC}_{50}$  值为 0.223 mg/mL, Sevag 制多糖的  $\text{IC}_{50}$  为 0.460 mg/mL, 酶制多糖的  $\text{IC}_{50}$  为 0.212 mg/mL, 酶-Sevag 制多糖的  $\text{IC}_{50}$  为 0.481 mg/mL, 维生素 C 的  $\text{IC}_{50}$  为 0.025 mg/mL, 茯苓多糖的  $\text{IC}_{50}$  值为 24.072 mg/mL。在相同浓度的情况下,酶法小白及多糖对  $\text{O}_2^-$  的清除能力较好、小白及粗多糖次之。

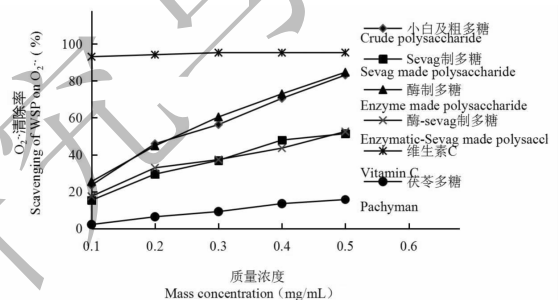


图9 多糖  $\text{O}_2^-$  的清除能力

Fig. 9 Scavenging effect of WSP on  $\text{O}_2^-$

## 3 讨论

研究采用微波辅助法提取小白及多糖,在最优工艺条件下小白及多糖的提取率可达 38.33%,略高于水提醇沉法提取同属植物白及的粗多糖得率 34.7%<sup>[22]</sup>;所得提取物采用 Sevag 法进行处理时脱蛋白率为 81.73%,略高于白及的 75.86%<sup>[22]</sup>。微波辅助提取技术耗时短、效率高,适用于小白及多糖提取,可为植物多糖提取提供参考。

前人研究表明不同的脱蛋白工艺会对所得多糖的结构和活性产生影响<sup>[18]</sup>,小白及多糖有较多生物活性功能,应根据不同的使用目的选择不同的提取和除蛋白工艺,而不应仅以多糖得率为唯一考量标准<sup>[22]</sup>。若以小白及多糖为主要利用对象时,采用较为温和的酶处理法或者直接利用粗提得到的小白及粗多糖既能发挥较好的抗氧化性等生物活性功能,又能避免 Sevag 法中的有害物质残留<sup>[23]</sup>;开发药物载体时,则应主要考虑蛋白质脱除率和多糖损失率,建议采用酶-Sevag 法处理小白及多糖,此法能够得

到较好品质的精制小白及多糖,为制备多孔支架材料和药物载体提供理想材料<sup>[24]</sup>。不同提取方法所得多糖的生物活性不同<sup>[25]</sup>,小白及多糖对 DPPH 和  $O_2^-$  具有良好的清除作用,可考虑将其作为天然的食品抗氧化剂。小白及多糖在 DPPH 和  $O_2^-$  清除作用上均高于茯苓多糖,可作为药物开发的理想糖原。本研究仅对小白及多糖提取方法、脱蛋白工艺和抗氧化活性进行探讨。对于不同脱蛋白工艺所得小白及精制多糖的空间结构、性质、免疫活性等的研究还有待进一步的进行。

#### 4 结论

小白及多糖提取的最佳工艺条件为微波功率为额定功率的 40%,微波时间 50 s,浸提温度 60 °C,浸提时间 1.5 h,在此提取条件下小白及多糖的得率为 38.33%,采用酶-Sevag 法脱除小白及粗多糖中的蛋白质效果较好。小白及粗多糖和酶制小白及多糖对 DPPH 自由基、 $O_2^-$  有较好的清除能力,均高于市售茯苓多糖口服液,其  $IC_{50}$  值分别为 28.948 和 24.855  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.233 和 0.212  $\text{mg}/\text{mL}$ ,这与蔡锦源对小白及同属植物白及多糖对 DPPH 等自由基的清除能力的研究结果相似<sup>[9,10]</sup>,说明小白及多糖具有较好的抗氧化活性。

**致谢:** 本论文得到保山市第八批创新团队,“药食同源”产品质量及品牌建设研究创新团队项目资助(201911);本论文得到国家留学基金资助。

#### 参考文献

- 1 Yan Q, Li CX, Zhang C, et al. Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities [J]. Carbohydr Polym, 2016, 148: 345-353.
- 2 Ma JW, Qiao ZY, Xiang X. Optimisation of extraction procedure for black fungus polysaccharides and effect of the polysaccharides on blood lipid and myocardium antioxidant enzymes activities [J]. Carbohydr Polym, 2011, 84: 1061-1068.
- 3 Miao YM, Sun JQ, Xu RH, et al. Optimization of the extraction process of polysaccharide from *Bublophyllum kwangtungense* and its antioxidant activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 779-785.
- 4 Li LD, Pang MZ, Li ZZ. Effects of 14 kind of *Cordyceps* polysaccharides on life of adult fruit fly [J]. Microbiology China (微生物学通报), 2000, 27: 427-428.
- 5 Wold C W, Kjeldsen C, Corthay A, et al. Structural characterization of bioactive heteropolysaccharides from the medicinal fungus *Inonotus obliquus* (Chaga) [J]. Carbohydr Polym, 2018, 185(4): 27-40.
- 6 Dong J, Zhao L, Cai L, et al. Antioxidant activities and phenolics of fermented *Bletilla formosana* with eight plant pathogenic fungi [J]. J Biosci & Bioeng, 2014, 118: 396-399.
- 7 Su T, Fu CM. Asepsis sowing and technology of rapid culture and propagation for *Bletilla formosana* [J]. J Yunnan Agric Univ: Nat Sci (云南农业大学学报: 自科版), 2016, 40(3): 20-26.
- 8 Chen MJ, Li QF, Lv M, et al. Comparison and identification of secondary structure of ITS2 sequence in *Bletillae* rhizoma and its counterfeits [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(15): 46-52.
- 9 Cai JY, Liang Y, Wu QH, et al. Optimization of extraction of polysaccharide from *Bletilla striata* and its biological activity [J]. Food Ind (食品工业), 2018, 39(1): 45-49.
- 10 Cai JY, Xiong JW, Huang YF, et al. Study on ultrasonic-microwave synergistic extraction of polysaccharose from *Bletilla striata* and its antioxidant activity [J]. Sci Tech Food Ind (食品工业科技), 2016, 37: 274-278.
- 11 Wu ZY, Chen XQ. Flora Republicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1999: 47.
- 12 Yunnan Institute of Materia Medica. Illustrated Handbook for Medicinal Materials from Nature in Yunnan: Vol I (云南天然药物图鉴: 第一卷) [M]. Kunming: Yunnan Science and Telechnology Press, 2003: 139.
- 13 Su T, Qiu B, Li Y. Resource investigation and market evaluation of *Bletilla* produced in Yunnan [J]. Chin Wild Plan Res (中国野生植物资源), 2014, 33(5): 49-52.
- 14 Lin CW, Hwang TL, Chen FA, et al. Chemical constituents of the Rhizomes of *Bletilla formosana* and their potential anti-inflammatory activity [J]. J Nat Prod, 2016, 79: 1911-1921.
- 15 Egecioglu E, Bjursell M, Ljungberg A, et al. Growth hormone receptor deficiency results in blunted ghrelin feeding response, obesity, and hypolipidemia in mice [J]. Ame J Phys End & Met, 2006, 290: 317-325.
- 16 Liu GB, Huang Z, Huang CG, et al. Functions and application in cosmetics of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f [J]. Detergent & Cosmetics (日用化学品科学), 2005, 28(8): 22-24.
- 17 Yang CX. Extraction, separation and preliminary structure analysis of polysaccharide from Longan fruit [D]. Xiamen: Xiamen University (厦门大学), 2007.
- 18 Wang LW, Ouyang Z, Zhang BJ, et al. Deproteinization and structural analysis of polysaccharides from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo grown in Huoshan [J]. Food Sci (食品科学), 2017, 38: 164-170.
- 19 Venkatachalam U, Muthukrishnan S. Free radical scavenging



- activity of ethanolic extract of *Desmodium gangeticum* [J]. *J Acu Med*, 2012, 2(2): 36-42.
- 20 Ma Y, Suo Feiya, Lu S, et al. Comparative study on *in vitro* antioxidant capacity of distinct originated *Ophiocordyceps gracilis* (Grev.) G. H. Sung, J. M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora [J]. *Chin Hos Pharm J* (中国医院药学杂志), 2014, 34: 1145-1148.
- 21 Liu HD, Ma QS, Wang J, et al. Optimization of extraction conditions and investigation of antioxidant activity of polysaccharides from purple yam [J]. *Sci Tech of Food Ind* (食品工业科技), 2015, 36: 208-213.
- 22 Han X, Wang WP, Sui H, et al. Extraction and proteins removing of *Bletilla striata* polysaccharide [J]. *J Ningxia Med Univ* (宁夏医科大学学报), 2013, 35: 536-538.
- 23 Wang Q, Wu QN, Xu YM, et al. Optimization of deproteinized process from *Euryale* petioles and pedicel polysaccharide by response surface methodology [J]. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2018, 39: 149-155.
- 24 Zhu JX, Lin YM, Yang Y, et al. Application research advance of *Bletilla striata* polysaccharide in medical and biological fields [J]. *Chin Med Mat* (中药材), 2018, 41: 1011-1014.
- 25 Li WJ, Wang CZ, Ye JZ, et al. Effect of different extraction order on the yield of *Lycium barbarum* pigment and polysaccharides and their antioxidant activities [J]. *Mod Food Sci Tech* (现代食品科技), 2016, 32: 148-155.
- 
- (上接第 1331 页)
- 3 Xiao LD, Wang ZQ. Separation and degradation performance of cholesterol-lowering *Monascus* strain [J]. *China Brew* (中国酿造), 2015, 34(5): 74-77.
- 4 Xing WX, Su GT. Awareness of the classification status of *Monascus* [J]. *Med J China People's Liberation Army* (解放军药学学报), 2004, 20: 119-121.
- 5 Wang YF, Kang KP. Screening and mutating of *Monascus sp.* with low content citrinin production ability [J]. *Food Sci* (食品科学), 2003, 24(8): 93-96.
- 6 Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species [J]. *J Antibiot*, 1979, 32: 852-854.
- 7 Yang C. Mutation breeding and fermentation conditions of Monacolin K *Monascus* [D]. Wuhu: Anhui University of Engineering (安徽工程大学), 2014.
- 8 Yang JF, Zhao JG, Zhou YN, et al. Advances in research on lipid-lowering drug lovastatin [J]. *China High-Tech* (中国高新科技), 2017, 1(5): 47-49.
- 9 Jia B. Study on the production of Monacolin K by submerged fermentation of *Monascus* [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology (浙江工业大学), 2003.
- 10 Chen H, Zhu H, Xu GR. Fermentation conditions for the production of Monacolin K by liquid fermentation of *Monascus* 9901 [J]. *Food Ferment Ind* (食品发酵与工业), 2004, 30(1): 57-61.
- 11 Li L. Research of breeding and fermentation conditions of high-iovastatin *Monascus* strains [D]. Fuzhou: Fuzhou University (福州大学), 2016.
- 12 Fang CY, Zhou J, Huang D, et al. The optimization of liquid fermentation conditions of *Monascus* producing Monacolin K [J]. *China Condiment* (中国调味品), 2016, 41(6): 44-49.
- 13 Tan YL, Ma YT, Huang F, et al. Optimization of extraction technology of two forms of Monacolin K from highland barley *Monascus* using response surface analysis [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 1930-1937.
- 14 Zhang FQ, Li XL, Liu F, et al. Determination of lovastatin in fermentation broth of *Monascus* HNLI by HPLC [J]. *J Uni Tech H* (湖南工业大学学报), 2009, 23(5): 26-28.
- 15 Zheng P, Tan DG, Sun PX, et al. Morphology and phylogenetic position of an endophytic fungus ITBB2-1 from rubber tree [J]. *Chin J Trop Crops* (热带作物学报), 2009, 30: 314-319.
- 16 He YT, Liu JL, Lin QB, et al. Optimization of flask fermentation conditions for the production of red pigment from *Monascus sanguineus* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 438-443.
- 17 Liu Y, Zhang S, Li JB, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from *acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) harms and their antibacterial activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31(1): 30-37.