

# 山药多糖得率-活性综合优化提取工艺

王媛媛<sup>1</sup>, 许兰淑<sup>2</sup>, 樊 玮<sup>3</sup>, 高永伟<sup>4</sup>, 吕兆林<sup>4\*</sup>

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学材料科学与技术学院, 北京 100083;  
3. 中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091; 4. 北京林业大学公共分析测试中心, 北京 100083)

**摘要:** **目的** 以山药为原材料, 确定纤维素酶法提取山药多糖的最佳工艺。**方法** 以山药多糖提取得率为评价指标, 比较了提取温度、提取时间、pH 值和加酶量对山药多糖得率的影响。在此基础上, 通过正交试验进行 4 因素 3 水平的试验设计, 以山药多糖提取得率、多糖总抗氧化能力及多糖得率-活性结合能力三项参数为指标, 综合优化山药多糖的提取工艺。**结果** 纤维素酶法提取山药多糖的最佳工艺为提取温度 40 °C、提取 pH 值 4.5、加酶量 2%、提取时间 2 h。在此最优条件下, 重复 3 次, 多糖提取得率和多糖总抗氧化能力分别为 3.370% 和 4.952 mg Vc/g。**结论** 通过优化纤维素酶法提取工艺, 山药多糖不仅得率较高, 同时亦具有较强抗氧化活性。

**关键词:** 山药; 多糖; 得率; 抗氧化活性; 工艺优化

## Optimization of extraction process for integration of polysaccharides yield and activity from Chinese yam

WANG Yuan-Yuan<sup>1</sup>, XU Lan-Shu<sup>2</sup>, FAN Wei<sup>3</sup>, GAO Yong-Wei<sup>4</sup>, LV Zhao-Lin<sup>4\*</sup>

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;  
2. College of Materials Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;  
3. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;  
4. Analytical and Testing Center, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**ABSTRACT: Objective** To optimize extraction process of polysaccharides from *Rhizoma dioscorea* (Chinese yam) by cellulose methods. **Methods** In order to evaluate the indicators, the effects of extraction temperature, extraction time, pH value and enzyme amount on yam polysaccharide yield were compared. With the yam polysaccharides yield, total antioxidant capacity and the yield-activity as the process evaluation indexes for the best extraction conditions were optimized by orthogonal experiment. **Results** The optimal extraction process included extraction temperature of 40 °C, extraction pH 4.5, cellulose addition amount of 2%, and extraction time of 2 h. Under the optimal extraction conditions, the maximum yield of yam polysaccharides was 3.370% and the antioxidant capacity was 4.952 mg V<sub>C</sub>/g. **Conclusion** By optimizing enzymatic cellulose extraction process, the polysaccharides obtained from Chinese yam not only have a higher yield, but also have a stronger antioxidant activity.

**KEY WORDS:** *Rhizoma dioscorea*; polysaccharides; yield; antioxidant capacity; process optimization

基金项目: 国家林业局公益性行业科研专项(201204804)

**Fund:** Supported by the Special Research Projects of Public Welfare Industry of National Forestry Bureau (201204804)

\*通讯作者: 吕兆林, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物提取与加工利用。E-mail: zhaolinlv@bjfu.edu.cn

\*Corresponding author: LV Zhao-Lin, Associate Professor, Analytical and Testing Center, Beijing Forestry University, No.35, Qinghua East Road, Haidian District, Beijing 100083, China. E-mail: zhaolinlv@bjfu.edu.cn

## 1 引言

山药(*Rhizoma dioscorea*),是一种多年生缠绕草质藤本植物,为薯蓣科植物薯蓣的块茎,具有健脾、补肺、固肾等功效。山药多糖作为山药中的主要活性成分,具有增强免疫功能<sup>[1]</sup>,抗氧化、抗衰老、降血糖、降血脂等多种生理活性<sup>[2-5]</sup>,可应用于保健食品方面。近年来,酶法辅助提取技术因其所需条件温和,易于达到,且不会破坏组织的活性成分等优点,已被广泛应用到植物多糖的提取上<sup>[6-8]</sup>。抗氧化能力是山药多糖的主要生物活性之一<sup>[9]</sup>,研究者对山药多糖提取工艺优化的研究主要集中在以提高多糖提取得率为目标<sup>[10-12]</sup>,忽视了多糖产品的生物活性,将山药多糖提取得率与其活性综合,作为评价提取效率的研究尚未见报道。

因此,本实验以山药为原料,采用纤维素酶法提取山药活性多糖,比较了提取温度、提取时间、pH值和加酶量对山药多糖得率的影响,并以山药多糖提取得率、多糖总抗氧化能力以及得率-活性结合能力三项参数为工艺评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验确定了纤维素酶法提取山药多糖的最佳工艺参数,以期获得具有提取率高且抗氧化活性强的山药多糖,为山药多糖的工业化生产提供理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

山药购于北京市清河早市。

抗坏血酸(Vc)、纤维素酶(1000 U/g)(北京奥博星生物技术有限责任公司);其他试剂均为分析纯(北京化工厂)。

### 2.2 仪器与设备

Docu-pH Meter pH计(美国 Sartorius 公司);LXJ-II离心沉淀机(上海医用分析仪器厂);98-1-B电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);UV-120-02紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 纤维素酶法提取

将新鲜山药清洗去皮后捣碎制成山药浆,按1:10(m:V)的料液比加入蒸馏水,调节pH值;加入一定量的纤维素酶,玻璃棒搅拌均匀后,放入水浴锅中

保温静提一定时间。静置冷却至室温后,3000 r/min离心10 min,以去除不溶物,收集上清液,得山药多糖提取液,体积V(mL)。

#### 2.3.2 多糖含量的测定<sup>[13]</sup>

标准曲线的绘制:取7组试管(每组3支),分别加入0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8 mL葡萄糖标准溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),蒸馏水补至1 mL;每支试管加入4.0 mL 蒽酮试剂(0.2 g/100 mL 浓硫酸),并迅速浸入冰水浴中,冷却至室温。待7组试管都加完蒽酮溶液后一起浸入沸水浴中。自水浴沸腾起准确计时煮沸10 min,后用冰水冷却,室温放置10 min,在620 nm波长下比色测定吸光度,以葡萄糖质量浓度C为横坐标,吸光度值A为纵坐标,绘制标准曲线。得回归方程为: $A=0.0075C-0.0146$  ( $r^2=0.9993$ ),吸光度值与葡萄糖标准溶液浓度之间存在着良好的线性关系。

样品测定:精确吸取1.0 mL山药多糖提取液于试管中,在上述试验条件下测定样品吸光度,利用回归方程计算山药多糖含量。利用标准曲线计算出多糖提取液中可溶性多糖的浓度值 $C_1$ ,并利用公式(1)计算山药多糖提取得率。每组实验重复3次取平均值。

$$\text{山药多糖提取得率(\%)} = \frac{C_1(\mu\text{g}/\text{mL}) \times V \times 10^{-6}(\text{g}/\mu\text{g})}{\text{山药质量}(\text{g})} \times 100 \quad (1)$$

#### 2.3.3 多糖总抗氧化能力的测定<sup>[14]</sup>

标准曲线的绘制:取7组试管(每组3支),分别加入0.5 mL不同质量浓度(0.000、0.025、0.050、0.075、0.100、0.125、0.150 mg/mL)的Vc标准溶液,每支试管加入4.5 mL钼酸铵溶液(0.6 mol/L硫酸,28 mmol/L磷酸钠,4 mmol/L钼酸铵),95  $^{\circ}\text{C}$ 水浴90 min,在695 nm波长下比色测定吸光度(蒸馏水为空白试剂调零),以Vc质量浓度C为横坐标,吸光度值A为纵坐标,绘制标准曲线。得回归方程为: $A=5.0948C+0.0071$  ( $r^2=0.9991$ ),吸光度值与Vc溶液浓度之间存在着良好的线性关系。

多糖总抗氧化能力的测定:精确吸取0.5 mL山药多糖提取液于试管中,加入4.5 mL钼酸铵溶液,95  $^{\circ}\text{C}$ 水浴90 min,在695 nm波长下比色测定吸光度值 $A_2$ 。被测物总抗氧化能力以相当于多少质量的Vc来表示。利用标准曲线计算出多糖提取液相当于Vc的浓度值 $C_2$ ,并利用公式(2)计算山药多糖的总抗氧化能力(以Vc当量计,mg Vc/g)。每组实验重复3次取平均值。

$$\text{山药多糖总抗氧化能力}(\text{mg Vc/g}) = \frac{C_2(\text{mg/mL}) \times V(\text{mL})}{\text{山药质量}(\text{g})} \quad (2)$$

### 2.3.4 单因素试验

试验分别考察了纤维素酶的作用时间分别为 1、2、3、4 h, 作用的 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0, 纤维素酶用量分别为 1%、2%、3%、4%、5%, 提取温度分别为 35、40、45、50、55 °C 条件下, 对山药多糖提取得率的影响。

### 2.3.5 正交试验

在单因素试验基础上, 以提取液中山药多糖提取得率、多糖总抗氧化能力及多糖得率-活性结合能力三项参数为工艺评价指标, 测定提取温度、pH 值、加酶量、提取时间 4 个因素, 每个因素 3 个水平。为了提高试验的可靠性, 每个处理重复两次。按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验, 确定最佳提取条件。因素水平表见表 1。将各组所得的多糖提取得率和总抗氧化能力结果相乘, 得到山药多糖得率-活性结合能力指标。即得率-活性结合能力(%)=多糖得率×(总抗氧化能力/1000)。

表 1 因素水平表  
Table 1 Factors and levels of orthogonal

水平	因素			
	A 提取温度 /°C	B pH	C 加酶量 /%	D 提取时间 /h
1	40	4.5	1	1
2	45	5.0	2	2
3	50	5.5	3	3

### 2.3.6 数据处理

每个实验重复 3 次, 取平均值。数据处理及统计分析采用软件 Origin8.5 和 SPSS19.0。

## 3 结果与分析

### 3.1 单因素试验

#### 3.1.1 提取温度对多糖得率的影响

提取温度分别取 35、40、45、50、55 °C, 在 pH5.0、加酶量 2%、提取时间 2 h 的条件下进行提取, 测定山药多糖提取得率, 结果见图 1。

从图 1 可知, 温度小于 45 °C 时, 随着温度的上

升, 山药多糖得率逐渐增加, 当提取温度为 45 °C 时, 多糖得率最高。可能是因为随着温度的升高, 活化分子数增加, 酶促反应加快, 但酶的本质是一种蛋白质, 随着温度的继续增加, 使酶逐步变性, 导致酶活力降低, 多糖提取得率相应降低。所以选择 45 °C 为最佳提取温度。

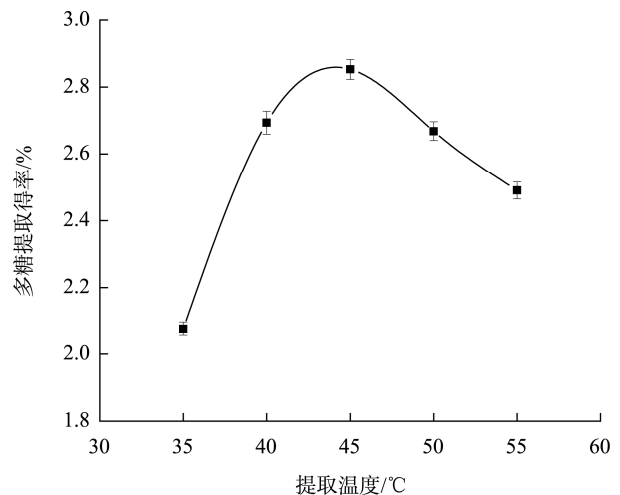


图 1 提取温度对山药多糖提取得率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on the yield of yam polysaccharides

#### 3.1.2 pH 对多糖提取得率的影响

pH 分别取 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0, 在提取温度 45 °C、加酶量 2%、提取时间 2 h 的条件下进行提取, 测定山药多糖提取得率, 结果见图 2。

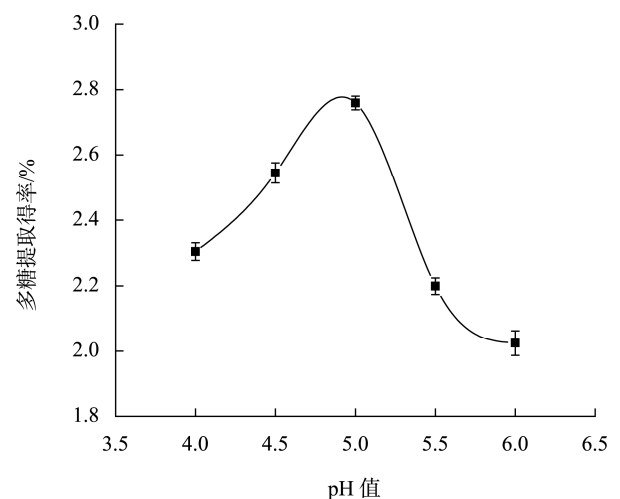


图 2 pH 值对山药多糖提取得率的影响

Fig. 2 Effect of pH on the yield of yam polysaccharides

从图 2 可知, 随着 pH 的上升, 山药多糖提取得率先增加后减少, 当 pH 值为 5.0 时, 多糖提取得率最高。可能是由于过高或过低的 pH 值会影响酶的空间结构, 使其变性或失活, 同时 pH 值还会通过影响底物的解离进而影响酶反应速度。所以选择 pH5.0 为最佳提取 pH。

### 3.1.3 加酶量对多糖提取得率的影响

加酶量分别取 1%、2%、3%、4%、5%, 在提取温度 45 °C、pH5.0、提取时间 2 h 的条件下进行提取, 测定山药多糖提取得率, 结果见图 3。

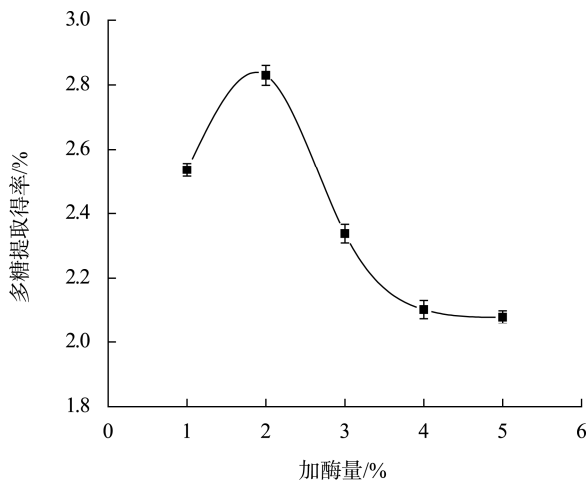


图 3 加酶量对山药多糖提取得率的影响

Fig. 3 Effect of enzyme concentration on the yield of yam polysaccharides

从图 3 可知, 低酶量促进多糖的提取, 高酶量反而使多糖提取得率减少。当加酶量为 2% 时, 多糖提取得率最高。原因可能是纤维素酶作为一种蛋白质, 浓度过高将多糖包裹, 一部分底物无法与酶分子结合, 从而降低了多糖得率。所以选择最适加酶量为 2%。

### 3.1.4 提取时间对多糖提取得率的影响

提取时间分别取 1、2、3、4 h, 在提取温度 45 °C、pH5.0、加酶量 2% 的条件下进行提取, 测定山药多糖提取得率, 结果见图 4。

从图 4 可知, 山药多糖得率在提取时间为 1~2 h 之间上升, 2 h 之后略有下降, 可能由于随着提取时间的延长, 多糖不断溶解, 使得多糖提取得率有所提高, 但随着时间的继续增加, 提取出的多糖一部分与其他物质发生反应等, 导致多糖提取得率稍微下降。综合考虑各方面因素, 选择 2 h 为最佳提取时间。

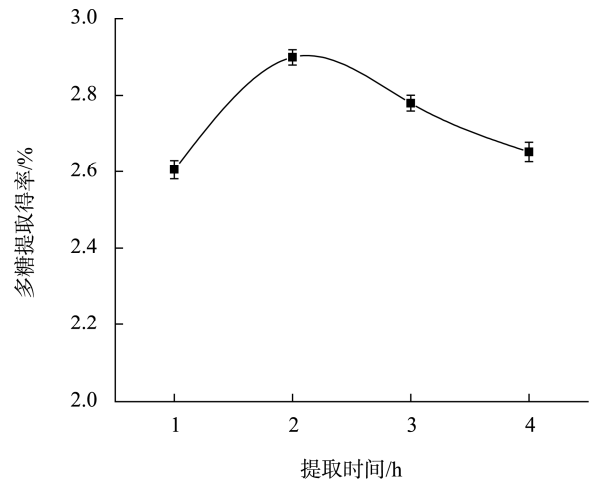


图 4 提取时间对山药多糖提取得率的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on the yield of yam polysaccharides

## 3.2 正交试验

在单因素试验的基础上, 进行  $L_9(3^4)$  正交试验, 结果分析见表 2, 方差分析见表 3。

由表 2 极差分析可知, 各因素对山药多糖提取得率的影响程度依次为:  $D$ (提取时间) >  $A$ (提取温度) >  $B$ (pH) >  $C$ (酶用量), 对多糖总抗氧化能力的影响程度依次为:  $C$ (酶用量) >  $B$ (pH) >  $A$ (提取温度) >  $D$ (提取时间), 对得率-活性结合能力的影响程度依次为:  $D$ (提取时间) >  $C$ (加酶量) >  $B$ (pH) >  $A$ (提取温度)。但各因素对提取率和抗氧化能力的影响是否显著还要参考方差分析的结果。

由表 3 方差分析可知, 提取时间对山药多糖提取得率的影响显著, 而加酶量对多糖总抗氧化能力的影响极显著。从各因素对得率-活性结合能力的影响来看, 其中提取时间和加酶量为显著因素, 而 pH 值和提取温度为不显著因素。综合考虑山药多糖提取得率、多糖总抗氧化能力及得率-活性结合能力这三项参数, 结合极差分析结果, 得出最佳提取工艺条件为  $A_1B_1C_3D_2$ , 即提取温度 40 °C, pH4.5, 加酶量 2%, 提取时间 2 h。

## 3.3 验证试验

在上述最佳提取工艺条件下, 进行验证试验, 平行 3 次, 取平均值。结果山药多糖提取得率和多糖总抗氧化能力的平均值分别为 3.370% 和 4.952 mg Vc/g, 优于正交实验表中任何一组, 表明该工艺稳定可行。

表2 正交实验结果表  
Table 2 Results of orthogonal tests

试验号	A	B	C	D	重复组	多糖提取得率(%)	总抗氧化能力 (mg Vc/g)	得率-活性 结合能力(%)
1	1	1	1	1	1	2.831	4.644	0.0131
2	1	1	1	1	2	2.905	4.410	0.0128
3	1	2	2	2	1	3.269	4.542	0.0148
4	1	2	2	2	2	3.020	4.438	0.0134
5	1	3	3	3	1	2.984	4.849	0.0145
6	1	3	3	3	2	3.063	4.783	0.0146
7	2	1	2	3	1	3.043	4.500	0.0137
8	2	1	2	3	2	2.890	4.753	0.0137
9	2	2	3	1	1	2.688	4.625	0.0124
10	2	2	3	1	2	2.847	4.653	0.0132
11	2	3	1	2	1	2.917	4.342	0.0127
12	2	3	1	2	2	2.958	4.271	0.0126
13	3	1	3	2	1	3.211	4.868	0.0156
14	3	1	3	2	2	3.075	4.718	0.0145
15	3	2	1	3	1	2.952	4.352	0.0128
16	3	2	1	3	2	3.094	4.315	0.0134
17	3	3	2	1	1	2.984	4.157	0.0124
18	3	3	2	1	2	2.613	4.380	0.0114
多糖提取得率	K <sub>1</sub>	3.012	2.993	2.943	2.811			
	K <sub>2</sub>	2.890	2.978	2.970	3.075			
	K <sub>3</sub>	2.988	2.920	2.978	3.004			
	R	0.122	0.073	0.035	0.264			
总抗氧化能力	K' <sub>1</sub>	4.611	4.649	4.389	4.478			
	K' <sub>2</sub>	4.524	4.487	4.462	4.530			
	K' <sub>3</sub>	4.465	4.464	4.749	4.592			
	R'	0.146	0.186	0.360	0.114			
得率-活性 结合能力	K'' <sub>1</sub>	0.0139	0.0139	0.0129	0.0126			
	K'' <sub>2</sub>	0.0131	0.0134	0.0132	0.0139			
	K'' <sub>3</sub>	0.0133	0.0130	0.0141	0.0138			
	R''	0.0008	0.0009	0.0009	0.0013			

表3 正交实验方差分析  
Table 3 Orthogonal experiment analysis of variance

项目	因素	SS	df	MS	F
多糖提取得率	A	0.05	2	0.025	1.471
	B	0.018	2	0.009	0.529
	C	0.004	2	0.002	0.118
	D	0.224	2	0.112	6.588*
	误差	0.15	9	0.017	
	总变异	0.446	17		
总抗氧化能力	A	0.065	2	0.032	2.692
	B	0.122	2	0.061	5.131*
	C	0.436	2	0.218	18.336**
	D	0.039	2	0.019	1.598
	误差	0.107	9	0.012	
	总变异	0.769	17		
得率-活性结合能力	A	2.07E-06	2	1.03E-06	3.474
	B	2.38E-06	2	1.19E-06	4.000
	C	4.97E-06	2	2.48E-06	8.343*
	D	6.72E-06	2	3.36E-06	11.280**
	误差	2.68E-06	9	2.98E-07	
	总变异	1.88E-05	17		

注: \*\*表示差异极显著; \*表示差异显著,  $P < 0.05$ ;  $F_{0.05}(2,9) = 4.46$ ;  $F_{0.01}(2,9) = 8.65$ 。

## 4 结论

本实验以山药多糖提取得率、多糖总抗氧化能力及得率-活性结合能力三项参数为工艺评价指标,通过单因素试验和正交试验优化了纤维素酶法提取山药多糖的条件。实验结果表明,在各个因素所考察的范围内,提取时间对多糖提取得率的影响最大,而加酶量对多糖总抗氧化能力的影响最大。综合考虑,提取山药活性多糖的最佳工艺条件为:提取温度40℃、pH4.5、加酶量为2%、提取时间为2h。在此最优条件下,山药多糖提取得率和多糖总抗氧化能力分别为3.370%和4.952 mg Vc/g。

纤维素酶能够作用于细胞壁,分解植物细胞壁的主要成分纤维素,使存在于细胞内部的多糖快速、有效地释放出来。相比其他提取法,纤维素酶法提取温度较低,条件温和,且能够很好地保护多糖的生物活性。本实验采用纤维素酶法提取山药中的活性多糖,在提高山药多糖提取得率的同时,也提高了其总抗

氧化能力,为以后开发功能性山药多糖奠定了一定的理论基础。

## 参考文献

- [1] Zhao GH, Kan JQ, Li ZX, *et al.* Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea oppositifolia* roots [J]. *Carbohydr Polym*, 2005, (61): 125-131.
- [2] Hou WC, Hsu FL, Lee M. Yam tuber mucilage exhibited antioxidant activities *in vitro* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(12): 1072-1076.
- [3] 赵国华, 陈宗道, 李志孝, 等. 活性多糖的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(07): 45-48.  
Zhao GH, Chen ZD, Li ZX, *et al.* The research progress of active polysaccharides [J]. *Food Ferment Ind*, 2001, 27(07): 45-48.
- [4] 徐琴, 徐增莱, 沈振国, 等. 淮山药多糖的研究[J]. *中药材*, 2006, 29(9): 909-912.  
Xu Q, Xu ZL, Shen ZG, *et al.* Study on yam polysaccharide [J]. *J Chin Med Mater*, 2006, 29(9): 909-912.
- [5] Iwu MM, Okunji CO, Akah P, *et al.* Dioscoretin: the hypoglycemic principle of *Dioscorea dumetorum* [J]. *Planta Med*,

- 1990, 56(1): 119–120.
- [6] 傅博强, 谢明勇, 周鹏, 等. 纤维素酶法提取茶多糖[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术), 2002, 21(04): 362–366.  
Fu BQ, Xie MY, Zhou P, *et al.* The extraction of tea polysaccharide by cellulose degradation [J]. J Food Sci Biotechnol, 2002, 21(04): 362–366.
- [7] 毛磊, 李睿, 金慧芳. 酶解辅助法优选山药多糖的提取工艺[J]. 应用化工, 2009, 38(6): 847–849.  
Mao L, Li R, Jin HF. Enzyme-assisted method to optimize extracting of polysaccharides from Chinese yam [J]. Appl Chem Ind, 2009, 38(6): 847–849.
- [8] 刘小丽, 徐鹏. 酶水解辅助法浸提山药多糖的工艺研究[J]. 食品科技, 2009, 34(10): 193–196.  
Liu XL, Xu P. Study on Protease-assisted extraction of polysaccharides from yam [J]. Food Sci Technol, 2009, 34(10): 193–196.
- [9] Ju Y, Xue Y, Huang JL, *et al.* Antioxidant Chinese yam polysaccharides and its pro-proliferative effect on endometrial epithelial cells [J]. Int J Biol Macrom, 2014, (66): 81–85.
- [10] 汪财生, 孙安吉, 王忠华, 等. 紫山药多糖酶法提取工艺优化研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 266–268, 271.  
Wang CS, S AJ, Wang ZH, *et al.* Study on optimization of enzymatic extraction polysaccharide from purple yam [J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 31(2): 266–268, 271.
- [11] 费玉婷, 乔建卫, 蒋立勤. 纤维素酶法提取山药多糖的工艺研究[J]. 农产品加工(学刊), 2008, (06): 31–33, 62.  
Fei YT, Qiao JW, Jiang LQ. The study on extract polysaccharide from yam root by cellulose enzyme [J]. Acad Period Farm Prod Proc, 2008, (06): 31–33, 62.
- [12] Zhang J, Jia SY, Liu Y, *et al.* Optimization of enzyme-assisted extraction of the *Lycium barbarum* polysaccharides using response surface methodology [J]. Carbohydr Poly, 2011, 86(2): 1089–1092.
- [13] 林颖, 吴毓敏, 吴雯, 等. 天然产物中的糖含量测定方法正确性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(3): 5–9.  
Lin Y, Wu YM, Wu W, *et al.* The study on correctness of sugar content determination method of natural products [J]. Nat Prod Res Devel, 1996, 8(3): 5–9.
- [14] Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E [J]. Anal Biochem, 1999, 269(2): 337–341.

(责任编辑: 杨翠娜)

### 作者简介



王媛媛, 在读硕士研究生, 主要研究方向为天然产物提取与加工利用。  
E-mail: yuanw82@163.com



吕兆林, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物提取与加工利用。  
E-mail: zhaolinlv@bjfu.edu.cn