

超声波辅助提取、纯化滇橄榄多糖的工艺研究

常庆, 吴少雄, 王琦, 潘红梅, 米飞, 徐芳, 杨雪, 吴志霜*

(昆明医科大学公共卫生学院, 昆明 650500)

摘要: 目的 采用超声波辅助法提取滇橄榄多糖, 并采用大孔树脂和透析法对多糖进行除色素纯化。**方法** 通过单因素实验和正交实验优化滇橄榄多糖的提取工艺及脱色纯化工艺。**结果** 超声波辅助法提取滇橄榄多糖的最佳条件为: 超声功率为 180 W、超声温度为 50 °C、超声时间为 45 min、料液比为 1:50 (*m:l*), 得率为 6.18%; X-5 大孔树脂对滇橄榄多糖脱色条件为: 5 mg/mL 滇橄榄多糖溶液、温度为 40 °C、树脂用量为 1 g、时间为 1 h、pH 为 1, 色素清除率为 82.21%, 多糖保留率为 94.86%; 纯化后滇橄榄多糖的纯度由 31% 提高至 91%。**结论** 本研究得到了滇橄榄多糖提取、纯化的最优条件, 为后续研究及开发利用提供了理论基础。

关键词: 滇橄榄; 多糖; 提取; 纯化; 工艺优化

Study on process of ultrasonic assisted extraction and purification of polysaccharides from *Phyllanthus emblica* Linn.

CHANG Qing, WU Shao-Xiong, WANG Qi, PAN Hong-Mei, MI Fei,
XU Fang, YANG Xue, WU Zhi-Shuang*

(School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective To extract polysaccharides from *Phyllanthus emblica* Linn. by ultrasonic assisted method, and purify the polysaccharides by macroporous resin and dialysis. **Methods** Single factor experiment and orthogonal experiment were used to optimize the extraction process, decolorization and purification process. **Results** The optimum conditions of *Phyllanthus emblica* Linn. polysaccharides were as follows: Ultrasonic power 180 W, ultrasonic temperature 50 °C, ultrasonic time 45 min, solid-liquid ratio 1:50 (*m:l*), and the yield was 6.18%. The decolorization conditions of *Phyllanthus emblica* Linn. polysaccharides by X-5 macroporous resin were as follows: Five mg/mL *Phyllanthus emblica* Linn. polysaccharides solution, temperature 40 °C, resin dosage 1 g, time 1 h, pH 1, pigment removal rate was 82.21%, polysaccharides retention rate was 94.86%; after purification, the purity of *Phyllanthus emblica* Linn. polysaccharides was increased from 31% to 91%. **Conclusion** The optimal extraction and purification conditions of polysaccharides from *Phyllanthus emblica* Linn. are obtained, which provide theoretical basis for further research, development and utilization.

KEY WORDS: *Phyllanthus emblica* Linn.; polysaccharides; extraction; purification; optimization of process

基金项目: 云南公共卫生与疾病防控协同创新中心重点项目(2016YNPHXT08)

Fund: Supported by the Key Project of Yunnan Collaborative Innovation Center for Public Health and Disease Control and Prevention (2016YNPHXT08)

*通信作者: 吴志霜, 博士, 副教授, 主要研究方向为营养与食品科学。E-mail: kmwzs@126.com

*Corresponding author: WU Zhi-Shuang, Ph.D, Associate Professor, Kunming Medical University, 1168 Chunrong West Road, Yuhua Street, Chengong District, Kunming 650500, China. E-mail: kmwzs@126.com

0 引言

滇橄榄(*Phyllanthus emblica* Linn.)又名云南余甘子,是大戟科落叶灌木的果实,主要生长在热带和亚热带地区^[1]。云南省是全国野生滇橄榄分布最广、产量最高的省份之一^[2]。滇橄榄作为一种重要的药食两用植物资源,收载于 1974 年版《云南省药品标准》、1978 年版《藏药标准》、1977 至 2005 年版《中华人民共和国药典》,在我国中草药和民族药等传统中药体系中,有十分悠久的历史^[3-4]。

多糖(polysaccharides, PS)是一类广泛存在于动植物、微生物细胞中重要的生物大分子物质。多糖是由 10 或 10 个以上相同或不同单糖单位以 α -或 β -糖苷键连接而成的多聚化合物^[5]。多糖和蛋白质、核酸是最重要的 3 种生物大分子,也是重要的活性物质,参与了生物体内的多种生命活动^[6-7]。植物多糖不仅具有抗肿瘤、提高机体免疫力、抗氧化、降血糖、降血脂等多种生物活性^[8-12],还存在着天然、无毒等优点。

在研究与开发天然多糖中为了改善提取得到的多糖功能,多糖的制备、脱色及脱水对多糖的功能活性有重要影响。在制备过程中普遍存在高温、酸、碱、超声、微波和酶等多种提取方法会导致多糖结构发生改变^[13],这意味着天然多糖在制备过程中可能会发生生理化学变化,从而导致多糖活性发生改变^[14];使用传统工艺提取的多糖纯度较低,进一步对提取出的多糖进行脱色纯化有利于提高多糖的纯度^[15],可以除去大部分天然色素和在提取过程中褐变反应所产生的色素,不同的脱色方法对多糖活性功能的影响也不同,大孔树脂是普遍认为温和且不改变多糖结构的一种物理方法,同时大孔树脂可再生、低成本等优点受到工业化生产的青睐^[16];但是在很多研究中只对单因素研究而未对多因素进行优化,大量的大孔树脂被浪费和多糖的低回收,导致大规模生产效率较低而不能满足工业化生产。所以在本研究中滇橄榄多糖的制备采用超声波辅助法提取,以滇橄榄多糖得率和生产成本作为考察指标,优化获得滇橄榄多糖的最佳提取条件,利用 X-5 大孔树脂和透析法对滇橄榄多糖进行脱色纯化,旨在为工业化提取、纯化滇橄榄多糖提供更高效率的工艺条件,以获得高纯度滇橄榄多糖为后续开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

滇橄榄:产于云南。

无水乙醇、氢氧化钠、无水葡萄糖(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司);苯酚(分析纯,广东光华科技股份有限公司);盐酸、浓硫酸(分析纯,重庆川东化工集团有限公司);大孔树脂 X-5(郑州和成新材料科技有限公司);透析袋(北京索莱宝生物科技有限公司);去离子水。

1.2 仪器与设备

DFY 1000C 电动粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司);101-1AB 型电热鼓风干燥箱、DK-98-IIA 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);KQ-300DE 超声波清洗机(东莞市科桥超声波设备有限公司);AR1140/C 电子分析天平(0.0001 g,上海奥豪斯公司);SF-TDL-5A 离心机(上海菲哈尔分析仪器有限公司);591-00130-00-1 旋转蒸发仪[德国海道尔夫(Heidolph)公司];752PC 分光光度仪(上海菁华科技仪器有限公司);MS300 磁力搅拌器(上海胶特仪器制造有限公司);THZ-D 台式恒温震荡仪(太仓市华美生化仪器);FreeZone-50 冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司);RO DI digital plus 实验室超纯水机(上海和泰仪器有限公司)

1.3 实验方法

1.3.1 预处理

(1)滇橄榄:挑选果实大小均一、无虫害及物理损伤的滇橄榄放入超声波清洗机中清洗,清洗后的滇橄榄放入 60 °C 电热鼓风干燥箱中除去部分水分,取出去核,去核后放入再烘干至恒重得到滇橄榄干品,干品粉碎得到滇橄榄干粉。

(2)大孔树脂:取适量大孔树脂于无水乙醇中浸泡 24 h,浸泡后洗至无乙醇味,用 5% 盐酸浸泡 3 h,浸泡后洗至中性,再用 5% 氢氧化钠浸泡 3 h,最后使用去离子水洗至中性以备用。

1.3.2 溶剂的配制

(1)6% 苯酚的配制:取 5 g 苯酚溶于去离子水中并精确定容至 100 mL,混匀后转移至棕色细口瓶,现配现用。

(2)标准葡萄糖溶液的配制:取 0.5000 g 无水葡萄糖溶解于去离子水中并定容至 100 mL 得到 5 mg/mL 葡萄糖溶液,混匀后取 2 mL 5 mg/mL 葡萄糖溶液定容至 100 mL,即得到 0.1 mg/mL 葡萄糖溶液。

(3)5 mg/mL 粗多糖溶液:取适量滇橄榄粗多糖溶于去离子水并定容,使其质量浓度为 5 mg/mL。

1.3.3 工艺流程

滇橄榄干粉→按照条件先超声再热水提取处理→多糖溶液在 5000 r/min 离心 10 min→旋转蒸发仪 60 °C 浓缩上清液至最小体积→(浓缩液:无水乙醇为 1:4, V:V)醇沉多糖→过夜→过滤→60 °C 电热鼓风干燥箱烘干沉淀至恒重→得到滇橄榄粗多糖→适量去离子水复溶滇橄榄粗多糖→定容至 5 mg/mL 粗多糖溶液→50 mL 溶液中加入适量大孔树脂除色素→160 r/min 摇床荡摇→过滤→滤液在 5000 r/min 离心 10 min→旋转蒸发仪 60 °C 浓缩上清液至适量体积→浓缩液透析 72 h→透析液冷冻干燥 72 h→得到滇橄榄多糖纯品

1.3.4 滇橄榄多糖提取工艺优化

(1)滇橄榄多糖提取单因素实验

本研究采用超声波辅助热水提取滇橄榄多糖,通过单因素实验研究了热水提取温度、热水提取时间、超声功率、超声温度、超声时间、超声料液比和提取次数 7 个因素对多糖提取率的影响,根据预实验,选择了 7 个影响因素的研究水平及其固定条件,如表 1 所示。

表 1 超声波辅助法提取滇橄榄多糖工艺单因素试验表(n=3)

Table 1 Single factor test table of extraction process of polysaccharides from *Phyllanthus emblica* Linn. By ultrasonic-assisted method (n=3)

因素	水平	固定条件
热水提取温度/°C	70、80、90	60 min、300 W、60 °C、45 min、1:30 (m:V)、1 次
热水提取时间/min	0、20、40、60、80、100	90 °C、300 W、60 °C、45 min、1:30 (m:V)、1 次
超声功率/W	150、180、210、240、270	90 °C、80 min、60 °C、45 min、1:30 (m:V)、1 次
超声温度/°C	40、50、60、70、80	90 °C、80 min、300 W、45 min、1:30 (m:V)、1 次
超声时间/min	0、15、30、45、60、75	90 °C、80 min、300 W、60 °C、1:30 (m:V)、1 次
料液比(m:V)	1:10、1:20、1:30、1:40、1:50	90 °C、80 min、300 W、60 °C、45 min、1 次
提取次数/次	1、2、3	90 °C、80 min、300 W、60 °C、45 min、1:30 (m:V)

(2)滇橄榄多糖提取正交实验

在单因素实验的基础上,以多糖得率为检测指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交设计实验表对提取条件进行优化,正交设计实验因素水平如表 2 所示。

表 2 超声波辅助法提取滇橄榄多糖工艺 $L_9(3^4)$ 正交设计因素水平表(n=3)

Table 2 Level table of orthogonal design factors of extraction process $L_9(3^4)$ of polysaccharides from *Phyllanthus emblica* Linn. by ultrasonic-assisted method (n=3)

因素	超声功率/W	超声温度/°C	超声时间/min	料液比(m:V)
水平 1	180	50	30	1:30
水平 2	210	60	45	1:40
水平 3	240	70	60	1:50

1.3.5 滇橄榄多糖纯化工艺优化

(1)单因素实验

通过预实验选择 X-5 大孔树脂对滇橄榄粗多糖进行除色素实验研究,以色素清除率和多糖保留率为评价指标,选取荡摇温度、树脂用量、荡摇时间及溶液 pH 4 个因素进行单因素实验,各因素实验的不同水平及固定条件如表 3 所示。

表 3 X-5 大孔树脂对滇橄榄粗多糖除色素单因素实验(n=3)

Table 3 Single factor experiments of X-5 macroporous resin for the removal of pigment from *Phyllanthus emblica* Linn. polysaccharides (n=3)

因素	水平	固定条件
荡摇温度/°C	20、30、40、50、60	5 g、6 h、160 r/min
树脂用量/g	1、2、3、4、5、6、7	30 °C、6 h、160 r/min
荡摇时间/h	0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12	30 °C、5 g、160 r/min
pH	1、3、5、7、9、11	30 °C、5 g、3 h、160 r/min

(2)正交实验

在单因素实验的基础上,以多糖保留率和色素清除率为检测指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交设计安排实验,正交设计因素水平表如表 4 所示。

表 4 X-5 对滇橄榄多糖除色素正交设计因素水平表(n=3)

Table 4 Table levels of orthogonal design factors of X-5 macroporous resin for the removal of pigment from *Phyllanthus emblica* Linn. polysaccharides (n=3)

因素	荡摇温度/°C	树脂用量/g	荡摇时间/h	pH
水平 1	40	1	1	1
水平 2	50	2	2	3
水平 3	60	3	3	5

1.3.6 纯化滇橄榄多糖的透析实验

按照透析袋预处理说明进行活化以备用,已活化透析袋用去离子水洗净以使用。滇橄榄多糖经过 X-5 大孔树脂处理后,离心浓缩至合适体积,装入经过预处理后的透析袋(8000~14000 D)中去离子水透析 72 h,透析后再浓缩至最小体积,冷冻干燥得到纯化滇橄榄多糖。

1.3.7 滇橄榄多糖含量的测定

(1)葡萄糖标准曲线的绘制

结合 NY/T 1676—2008《食用菌中粗多糖含量的测定》及谢红旗^[17]方法稍做修改,取 11 支试管分别往中加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mL 葡萄糖溶液 0.1 mg/mL,加去离子水补齐 2 mL,混匀后加入 1 mL 6%苯酚,混匀后加入 5 mL 浓硫酸,浓硫酸沿试管壁缓慢加入,需保持同一手法,避免硫酸加入太快引起溶液沸腾而存在误差,混匀后常温静置 40 min 使温度降至室温,于 490 nm 处测溶液的吸光度值 A,绘制标准曲线。

(2)滇橄榄多糖含量的测定

滇橄榄多糖复溶稀释一定倍数,转移至烧杯中,在磁力搅拌器中充分混匀后取 2 mL,按 1.3.7 (1)方法测定样品吸光度值 A,根据标准曲线计算样品浓度,依据公式(1)计算滇橄榄多糖的含量及得率:

$$\text{多糖得率}/\% = \frac{C \times V \times D \times f \times 10^{-3}}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C —滇橄榄多糖浓度, mg/mL; V —溶液体积, mL; D —稀释倍数; f —校正因子, 0.9; M —滇橄榄干粉质量, g。

1.3.8 色素清除率及多糖保留率的测定

(1) 色素测定波长的确定

配制 5 mg/mL 多糖溶液, 采用紫外可见分光光度仪在 400~1000 nm 波长范围对多糖溶液进行光谱扫描: 结果显示滇橄榄多糖在可见光区没有明显的吸收峰, 所以根据溶液吸收光互补原理, 溶液呈黄绿色, 即本研究选择波长 450 nm 测定滇橄榄多糖的色素吸光度值。

(2) 色素清除率

大孔树脂处理前后多糖溶液色素的测定以去离子水为参比, 在 450 nm 波长处测得吸光度值 A , 脱色前后吸光度值分别为 $A_{\text{脱色前}}$ 、 $A_{\text{脱色后}}$, 色素清除率计算公式如式(2):

$$\text{色素清除率}/\% = \frac{A_{\text{脱色前}} - A_{\text{脱色后}}}{A_{\text{脱色前}}} \times 100\% \quad (2)$$

(3) 多糖保留率

大孔树脂处理前后多糖溶液采用 1.3.7 测定多糖浓度分别为 $C_{\text{脱色前}}$ 、 $C_{\text{脱色后}}$, 多糖保留率计算公式如式(3):

$$\text{多糖保留率}/\% = \frac{C_{\text{脱色后}}}{C_{\text{脱色前}}} \times 100\% \quad (3)$$

1.3.9 数据处理

实验中计量资料用平均值±标准偏差表示, 采用 Excel 对数据进行整理, 正交设计助手 II(专业版)进行正交及方差分析, Graphpad prism 8.3.0 绘制实验分析图, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, 每次实验 3 组重复。

2 结果与分析

2.1 滇橄榄多糖提取的单因素优化

2.1.1 热水提取温度对滇橄榄多糖得率的影响

提取过程增加了超声波, 滇橄榄多糖的提取机制可能会发生改变, 因此需要再次探究热水提取温度对多糖得率的影响, 同时可以评价超声波是否对热水提取温度有影响。超声波辅助法中热水提取温度对滇橄榄多糖得率的影响如图 1 所示。

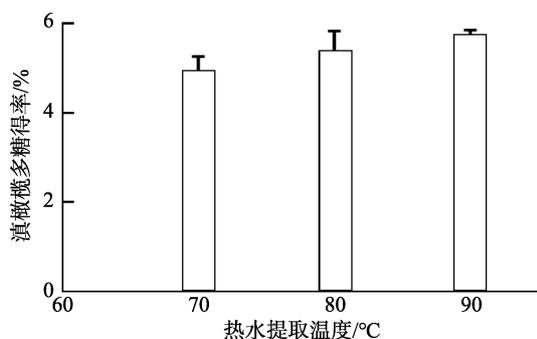


图 1 热水提取温度对滇橄榄多糖得率的影响($n=3$)

Fig.1 Effects of hot water extraction temperature on polysaccharide yield of *Phyllanthus emblica* Linn. ($n=3$)

单纯热水提取时 50~60 °C 对多糖得率影响较小, 所以此处选择 70~90 °C 进行探究。由图 1 可知, 随着温度的不断升高, 滇橄榄多糖得率也在不断增加, 这与水浴温度升高利于提高多糖分子传质速率有关, 与热水法结果一致; 在热水法中不同温度间的多糖得率差异较为明显, 而在超声波辅助法中得率相差较小, 由此可知增加超声波处理后多糖易从细胞中溶出。因此在后续单因素及正交实验中固定热水提取温度选择 90 °C。

2.1.2 热水提取时间对滇橄榄多糖得率的影响

热水提取时间对滇橄榄多糖得率的影响结果如图 2a 所示, 当超声 45 min 后不进行热水提取时, 滇橄榄多糖得率仅为 4.36%; 超声 45 min 后进行热水提取, 随着热水提取时间的延长多糖得率不断增加, 0~80 min 热水提取对多糖得率影响较明显, 在 80 min 后多糖得率变化较小。(1) 是因为滇橄榄干粉在超声波空化作用下细胞发生破碎, 没有热水加热时植物细胞内外较容易达到内外平衡状态, 此时不利于多糖的充分溶出^[18], 当联合热水加热提取时, 较高水浴温度进一步使还未完全破裂的细胞破裂, 有利于提高多糖的传质速率; (2) 随着水浴时间延长, 多糖与溶剂接触时间增加, 利于多糖充分溶出。综上所述, 当提取时间过短不利于多糖的充分溶出, 时间过长会使生产、环保成本增加且得率差异较小, 综合考虑, 在后续单因素及正交实验中固定热水提取时间选择 80 min。

2.1.3 超声功率对滇橄榄多糖得率的影响

超声功率对多糖提取得率的影响结果如图 2b, 在 150~210 W 之间随着超声功率的增加多糖得率不断提高, 是因为超声波在溶液中传播时可使介质质点在传播空间内产生振动作用, 从而强化介质的扩散、传质作用, 在合适的功率之间随着功率的增加其振动作用也不断增加, 溶液中产生的微小气泡增多引起细胞壁破碎, 使多糖的溶出和传质速率提高^[19]; 当超声功率高于 210 W 后多糖得率降低, (1) 可能因为超声波波动增强导致空泡数量增多和体积增大, 空泡不能及时破裂或破裂较弱^[20], 过多的气泡降低超声能量传输到溶液中的效率反而使滇橄榄多糖的传质速率降低, 从而减弱超声波的空化效应, (2) 可能因为功率过大使得溶液中的多糖糖苷键发生断裂导致降解^[21]。因此, 正交实验条件优化中超声功率因素选择 180、210、240 W 3 个水平。

2.1.4 超声温度对滇橄榄多糖得率的影响

超声温度对滇橄榄多糖得率的影响结果如图 2c, 温度在 40~60 °C 之间, 随着温度的不断上升, 滇橄榄多糖得率不断提高, 这可能是因为溶液中空化效应产生足够多的微小气泡在较高温度下使细胞更易破碎, 同时温度上升时有利于提高多糖的溶解度和传质速率, 从而使多糖得率不断提高; 当温度达到 60 °C 继续升高时, 溶液中物质的扩散能力增加, 微小气泡产生过多而使多糖的传质阻力增大,

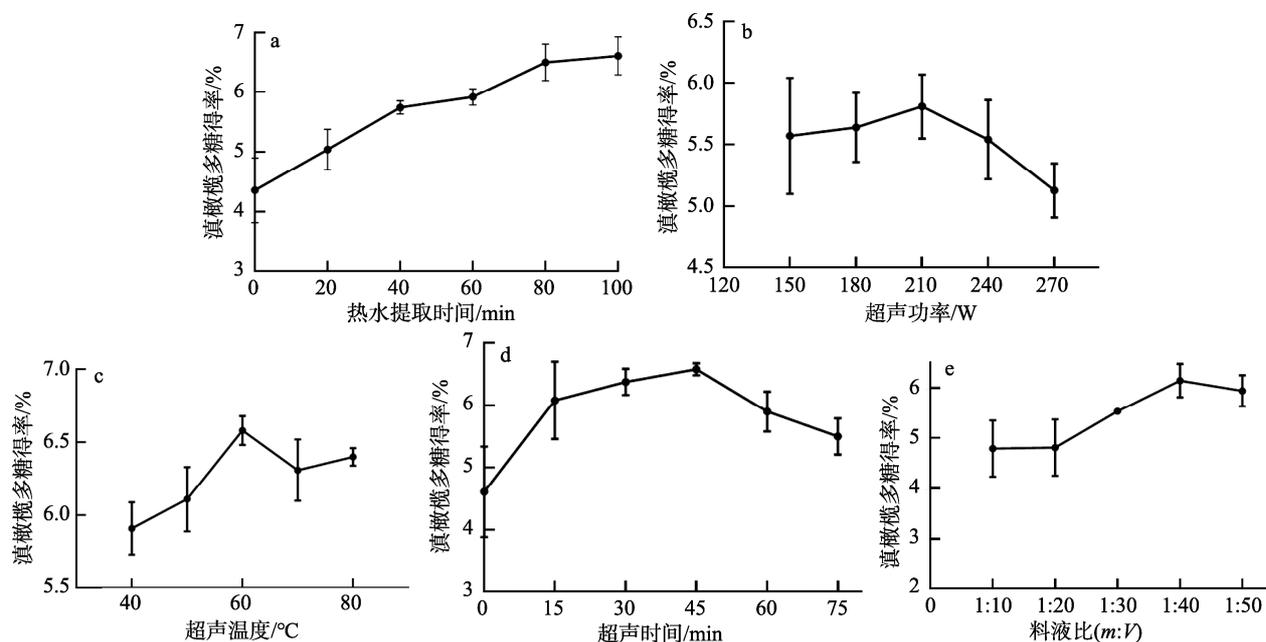


图2 不同因素对滇橄榄多糖得率的影响(n=3)

Fig.2 Effects of different factors on polysaccharide yield of *Phyllanthus emblica* Linn. (n=3)

其次高温与超声波协同使多糖发生聚合反应^[22],同时增加其他非多糖物质的溶出导致多糖纯度下降,该实验中60 °C的纯度为29.13%,70 °C的纯度为26.49%,由此可知温度过高会降低滇橄榄多糖的纯度;因此,正交实验条件优化中超声温度因素选择50、60、70 °C 3个水平。

2.1.5 超声时间对滇橄榄多糖得率的影响

超声时间对滇橄榄多糖得率的影响结果如图2d,0~15 min之间多糖得率迅速上升,可知有超声波处理多糖得率较高于没有超声波处理;45 min内随着超声时间的延长,细胞充分暴露在空化小泡中使得内部温度和压力不断升高,细胞充分被破碎,同时多糖不断溶出,得率提高;当超声时间超过45 min后,可能是因为超声波长长时间会使多糖降解为单糖,导致多糖得率明显降低^[23-24]。因此,正交实验优化条件中超声时间因素选择30、45、60 min 3个水平。

2.1.6 料液比对滇橄榄多糖得率的影响

料液比对滇橄榄多糖得率的影响结果如图2e,在1:40 (m:V)料液比之内,随着料液比的降低滇橄榄多糖得率不断地增加,1:10和1:20 (m:V)料液比时多糖得率最低,这可能是因为料液比大时溶液的黏度升高,超声波在黏度大的介质中气泡数量有所减少且降低了多糖的传质速率^[20];随着料液比的降低,有利于增加溶液中的气泡数量,同时溶液的黏度下降,多糖的传质速率提高,多糖得率不断提高。当料液比达到1:50 (m:V)时得率略微有所下降,可能是因为随着溶液体积的增大,超声波的振幅有所下降,降低了超声波的空化效应,导致多糖得率降低^[25]。因此,正交实验条件优化中超声波料液比因素选择1:30、1:40、1:50 (m:V) 3个水平。

2.1.7 提取次数对滇橄榄多糖得率的影响

提取次数对滇橄榄多糖得率的影响如图3所示,提取次数越多,多糖得率越高,提取2、3次得率分别是提取1次的109.27%、123.86%,当提取次数越多时溶液体积越多,所需要的浓缩时间及无水乙醇量增加,因此综合得率及生产成本后续实验超声波辅助法选择提取1次。

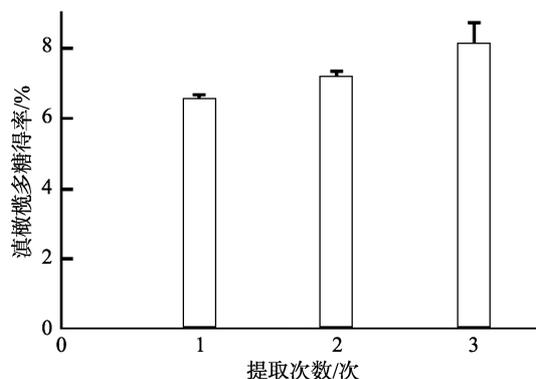


图3 提取次数对滇橄榄多糖得率的影响(n=3)

Fig.3 Effects of extraction times on the yield of polysaccharides from *Phyllanthus emblica* Linn. (n=3)

2.2 滇橄榄多糖提取正交实验结果

四因素三水平对滇橄榄多糖影响的正交实验结果如表5所示。

由表5正交实验结果及极差分析可知,影响滇橄榄多糖得率的各因素主次关系为B>D>A>C,即超声温度>料液比>超声功率>超声时间。最佳工艺优化组合为A₁B₁C₂D₃,即超声功率为180 W、超声温度为50 °C、超声时间为45 min、料液比为1:50 (m:V)。

表 5 超声波辅助法提取工艺正交实验结果表($n=3$)
Table 5 Orthogonal experimental results of ultrasonic assisted extraction process ($n=3$)

实验号	因素和水平				
	A 超声功率/W	B 超声温度/°C	C 超声时间/min	D 料液比($m:V$)	滇橄榄多糖得率/%
1	1	1	1	1	6.24
2	1	2	2	2	5.86
3	1	3	3	3	6.05
4	2	1	2	3	6.30
5	2	2	3	1	5.81
6	2	3	1	2	5.49
7	3	1	3	2	5.89
8	3	2	1	3	5.97
9	3	3	2	1	5.68
K_1	6.050	6.143	5.900	5.910	
K_2	5.867	5.880	5.947	5.747	
K_3	5.847	5.740	5.917	6.107	
R	0.203*	0.403*	0.047	0.360*	

注: *表示具有显著性影响($P<0.05$)。

由条件优化方差分析可知,影响滇橄榄多糖得率 4 个因素中,超声温度对多糖提取影响最大,料液比和超声功率其次,3 个因素对多糖得率影响均具有统计学意义,为显著影响性因素($P<0.05$);超声时间因素对多糖得率影响最小,差异不显著。

采用最佳条件组合 $A_1B_1C_2D_3$ 进行验证实验,即超声功率为 180 W、超声温度为 50 °C、超声时间为 45 min、料液比为 1:50 ($m:V$),滇橄榄多糖得率为 6.18%。

2.3 大孔树脂纯化的单因素优化

2.3.1 荡摇温度对脱色素效果的影响

如图 4 所示,在 30 °C 时多糖保留率及色素清除率降低,这可能是因为 30 °C 有利于大孔树脂对多糖的吸附,减少对色素的吸附,从而降低了色素清除率;随着荡摇温度提高色素清除率及多糖保留率不断提高,是因为随着荡摇温度升高多糖溶液黏度下降,色素分子扩散速度加快,有利于大孔树脂对色素的吸附;再者,大孔树脂吸附是一个放热过程,当荡摇温度过高解离程度也增大,导致已被吸附的色素解离增加,因此在 60 °C 时色素清除率降低^[26]。综合多糖保留率、色素清除率及生产成本,正交实验中荡摇温度因素选择 40、50、60 °C 3 个水平。

2.3.2 树脂用量对脱色素效果的影响

如图 5 所示,当树脂用量不断增加,色素清除率没有明显变化。2~5 g 树脂用量范围内,多糖保留率随着树脂用量的增加而降低,这是因为树脂用量增多,树脂所吸附的多糖也增多,多糖保留率下降;6 g 树脂用量时多糖保留率增加,7 g 处又呈下降趋势,这可能是因为 6 g 树脂用量时的吸附解析平衡较大,但多糖保留率仍然低于 1~3 g 树脂

用量的多糖保留率。当大孔树脂用量为 1 g 时,多糖保留率高,此时色素清除率虽然较低,但是综合多糖保留率高,所以在正交实验中树脂用量因素选择 1、2、3 g 3 个水平。

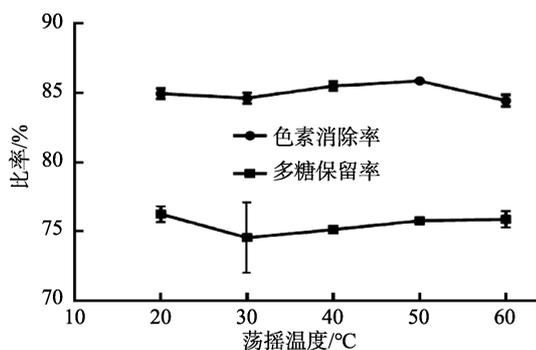


图 4 荡摇温度对脱色素效果的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of swing temperature on depigmentation effect ($n=3$)

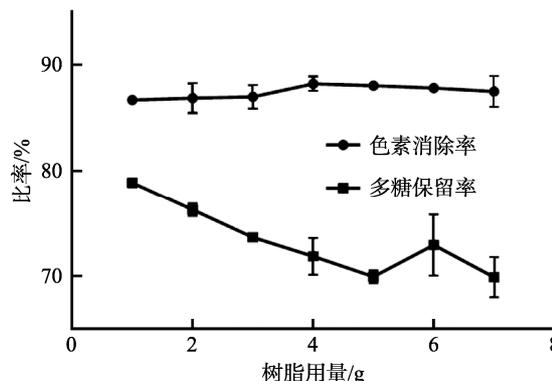


图 5 树脂用量对脱色素效果的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of resin dosage on depigmentation effect ($n=3$)

2.3.3 荡摇时间对脱色素效果的影响

如图 6 所示, 随着荡摇时间的延长色素清除率提高, 到 2 h 后随着荡摇时间的延长色素清除率没有明显提高反而略微有所下降, 这是因为随着多糖溶液与大孔树脂的长时间作用, 色素发生解析导致色素清除率下降; 随着荡摇时间的延长树脂对多糖的吸附不断增加, 导致多糖保留率下降。综合考虑在正交实验中荡摇时间因素选择 1、2、3 h 3 个水平。

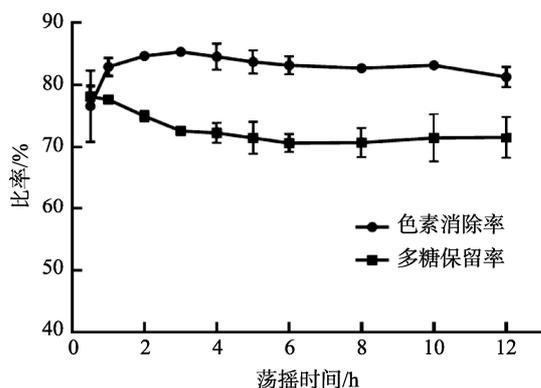


图 6 荡摇时间对脱色素效果的影响(n=3)
Fig.6 Effects of swing time on decolorization effect (n=3)

2.3.4 多糖溶液 pH 对脱色素效果的影响

由图 7 可知, 随着 pH 的增大, 多糖保留率先增加再稍降低后平稳, 多糖溶液 pH 的变化总体对多糖保留率差异不明显; 当 pH 越大色素清除率越低, pH 超过 7 时多糖溶液越偏碱性色素清除率急剧下降, (1)可能是因为酸性条件较利于树脂吸附色素分子, (2)可能是因为滇橄榄多糖主要由酸性多糖组成, 溶液中部分还原糖发生美拉德反应导致颜色变深, 这部分的色素不易被大孔树脂吸附, 故色素清除率随 pH 的增加而降低。因此在正交实验中 pH 因素选择 1、3、5 3 个水平。

2.4 X-5 大孔树脂纯化正交实验

由表 6 正交实验结果及极差分析可知, 影响色素清除率的各因素主次关系为 $H>F>G>E$, 即 $pH>$ 树脂用量 $>$ 荡摇

时间 $>$ 荡摇温度; 最佳工艺优化组合为 $E_3F_3G_3H_1$, 即荡摇温度为 60 °C, 树脂用量为 3 g, 荡摇时间为 3 h, pH 为 1。影响多糖保留率的各因素主次关系为 $F>H>G>E$, 即树脂用量 $>$ pH $>$ 荡摇时间 $>$ 荡摇温度; 最佳工艺优化组合为 $E_1F_1G_1H_1$, 即荡摇温度为 40 °C、树脂用量为 1 g、荡摇时间为 1 h、pH 为 1;

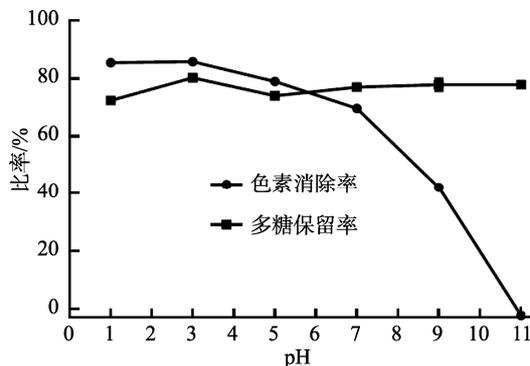


图 7 多糖溶液 pH 对脱色素效果的影响(n=3)
Fig.7 Effects of pH of polysaccharide solution on depigmentation effect (n=3)

由色素清除率条件优化方差分析可知, 影响色素清除率 4 个因素中, pH 对色素清除影响最大, 树脂用量、荡摇时间和荡摇温度其次。由多糖保留率条件优化方差分析可知, 影响多糖保留率 4 个因素中, 树脂用量对多糖保留率最大, 其次是 pH, 荡摇时间和荡摇温度的影响最小。

结合正交实验结果、极差分析及方差分析, pH 对色素清除率及多糖保留率差异显著且具有统计学意义, 当树脂用量过多时多糖保留率明显降低, 色素清除率极差仅相差 3.48%, 多糖保留率极差可高达 11.910%; 同时色素在醇沉、离心和透析等步骤时均会被除去一部分, 所以在本研究中主要考虑多糖保留率, 脱色效果最佳条件组合选择 $A_1B_1C_1D_1$, 即荡摇温度为 40 °C、树脂用量为 1 g、荡摇时间为 1 h、pH 为 1, 色素清除率为 82.21%, 多糖保留率为 94.86%。

表 6 X-5 对滇橄榄多糖除色素正交实验结果与分析(n=3)

Table 6 Orthogonal experiment results and analysis of X-5 on the removal of pigment from *Phyllanthus emblica* Linn. polysaccharide (n=3)

实验号	E 荡摇温度/°C	F 树脂用量/g	G 荡摇时间/h	H pH	色素清除率/%	多糖保留率/%
1	1	1	1	1	82.21	94.86
2	1	2	2	2	84.14	74.50
3	1	3	3	3	82.53	71.94
4	2	1	2	3	79.84	82.10
5	2	2	3	1	85.86	82.64
6	2	3	1	2	83.91	71.41
7	60	1	3	2	84.33	81.40

表 6(续)

实验号	E 荡摇温度/°C	F 树脂用量/g	G 荡摇时间/h	H pH	色素清除率/%	多糖保留率/%
8	3	2	1	3	80.94	77.91
9	3	3	2	1	85.67	79.28
K ₁	82.960	82.127	82.353	84.580		
K ₂	83.203	83.647	83.217	84.127		
K ₃	83.647	84.037	84.240	81.103		
R ₁	0.687	1.910	1.887	3.477		
k ₁	80.433	86.120	81.393	85.593		
k ₂	78.717	78.350	78.627	75.770		
k ₃	79.530	74.210	78.660	77.317		
R ₂	1.716	11.910	2.766	9.823		

注: K、R₁ 表示色素清除率, k、R₂ 表示多糖保留率。

3 结论与讨论

本研究通过单因素考察了不同的提取及纯化因素, 并通过正交实验优化得到滇橄榄多糖提取、纯化的最佳条件组合, 提取最优条件组合和得率为: 超声功率为 180 W、超声温度为 50 °C、超声时间为 45 min、料液比为 1:50 (*m:V*), 得率为 6.18%, 纯度为 31%; 效率较前研究单纯热水提取高, 同时纯度也得到提高; X-5 大孔树脂对滇橄榄多糖脱色效果及条件为: 5 mg/mL 滇橄榄多糖溶液、荡摇温度为 40 °C、树脂用量为 1 g、荡摇时间为 1 h、pH 为 1, 色素清除率为 82.21%, 多糖保留率为 94.86%; 纯化后滇橄榄多糖的纯度由 31% 提高至 91%。该纯化研究利用了可再生的大孔树脂, 最优条件中树脂用量少, 同时色素清除率远高于已发表的研究^[27], 为滇橄榄多糖的开发及利用提供了理论基础。

李永裕等^[28]采用微波辅助提取橄榄多糖优化最佳提取工艺条件为: 微波时间 60 s、微波功率 480 W、热水浸提温度 100 °C、热水浸提时间 3.5 h, 得率为 9.38%, 校正后得率为 8.44%。与该研究相比, 本研究得到的最优工艺节能省时、操作简单, 超声波结合热水更容易实现大规模生产, 且超声波较微波不易改变多糖的结构^[29], 更符合工业生产及食品安全的需要。贾媛颖等^[30]采用热水优化最佳提取工艺条件为: 料液比 1:8 (*m:V*)、温度 100 °C、时间 3.5 h、浸提 2 次, 得率 7.10%, 校正后其得率为 6.39%, 与该研究相比, 采用超声波设备的容量更大, 该工艺不仅节能省时, 其纯度也较高。工业化大规模生产过程中必须考虑设备、能耗、原材料加工量和生产率等因素^[31], 使其更符合工业化生产, 才能获得更大的经济效益, 因此本研究采用的超声波辅助法具有广阔的市场应用前景, 为滇橄榄多糖开发研究提供了更有效的提取方法。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会, 吴征镒. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
Editorial Committee of Chinese Flora, Chinese Academy of Sciences, WU ZY. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [2] 张伦, 杨申明, 徐成东, 等. 滇橄榄树不同组织原花色苷质量浓度及抗氧化性能研究[J]. 林业工程学报, 2017, 2(4): 57-62.
ZHANG L, YANG SM, XU CD, et al. Research on the mass concentration and antioxidation of proanthocyanidins in different tissues from *Phyllanthus emblica* Linn. [J]. J Forest Eng, 2017, 2(4): 57-62.
- [3] 师冰, 徐榕雪, 牛云壮, 等. 余甘子的现代研究和开发利用[J]. 云南中医中药杂志, 2006, (3): 76-77.
SHI B, XU RX, NIU YZ, et al. Modern research, development and utilization of *Phyllanthus emblica* Linn. [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Materia Med, 2006, (3): 76-77.
- [4] 周涛, 邱德文, 廖波. 民族药余甘子的现代研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2002, (2): 50-52.
ZHOU T, QIU DW, LIAO B. Research progress of modern chinese medicine *Phyllanthus emblica* L. [J]. J Guizhou Univ Tradit Chin Med, 2002, (2): 50-52.
- [5] ZHANG Y, XU H, HU ZB, et al. Eleocharis dulcis corm: Phytochemicals, health benefits, processing and food products [J]. J Sci Food Agric, 2021, 102(1): 19-40.
- [6] LI YY, CHEN JY, CAO LL, et al. Characterization of a novel polysaccharide isolated from *Phyllanthus emblica* L. and analysis of its antioxidant activities [J]. J Food Sci Technol, 2018, 55(7): 2758-2764.
- [7] PERERA D, SOYSA P, WIJERATNE S. Polyphenols contribute to the antioxidant and antiproliferative activity of *Phyllanthus debilis* plant *in-vitro* [J]. BMC Comp Altern, 2016, 16(1): 339.
- [8] 张晓静, 刘会东. 植物多糖提取分离及药理作用的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2003, (8): 495-497.
ZHANG XJ, LIU HD. Research progress on extraction, isolation and pharmacological action of plant polysaccharides [J]. Lishizhen Med Materia Med Res, 2003, (8): 495-497.

- [9] 罗祖友, 胡筱波, 吴谋成. 植物多糖的降血糖与降血脂作用[J]. 食品科学, 2007, (10): 596–600.
LUO ZY, HU XB, WU MC. Effects of plant polysaccharides on hypoglycemia and lipids [J]. Food Sci, 2007, (10): 596–600.
- [10] LI ZR, JIA RB, LUO DH, *et al.* The positive effects and underlying mechanisms of *Undaria pinnatifida* polysaccharides on type 2 diabetes mellitus in rats [J]. Food Funct, 2021. DOI: 10.1039/D1FO01838H
- [11] DONG XD, LIU YN, ZHAO Y, *et al.* Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from *Angelica dahurica* and its antitumor activity in H22 tumor-bearing mice [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 193: 219–227.
- [12] LI JS, JI T, SU SL, *et al.* Mulberry leaves ameliorate diabetes via regulating metabolic profiling and AGEs/RAGE and p38 MAPK/NF- κ B pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 283: 114713.
- [13] LIU Y, SUN YY, HUANG GL. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 111: 780–786.
- [14] YI Y, XU W, WANG HX, *et al.* Natural polysaccharides experience physicochemical and functional changes during preparation: A review [J]. Carbohydr Polym, 2020, 234(C): 115896.
- [15] ZHOU P, FANGMA YJ, JIN WF, *et al.* Response surface optimization of the water immersion extraction and macroporous resin purification processes of anhydrosafflor yellow B from *Carthamus tinctorius* L. [J]. J Food Sci, 2020, 85(10): 3191–3201.
- [16] SHEN DB, LABRECHE FZ, WU CE, *et al.* Ultrasound-assisted adsorption/desorption of jujube peel flavonoids using macroporous resins [J]. Food Chem, 2022, 368: 130800.
- [17] 谢红旗. 香菇多糖提取、纯化、结构表征及生物活性的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
XIE HQ. Study on extraction, purification, structure and biological activity of lentinan [D]. Changsha: Central South University, 2007.
- [18] 金利泰. 天然药物提取分离工艺学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2011.
JIN LT. Natural drug extraction and isolation technology [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2011.
- [19] GUO X, YE XQ, SUN YJ, *et al.* Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure, and antioxidant activity of sea cucumber fucoidan [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(5): 1088–1095.
- [20] RASO J, MAÑAS P, PAGÁN R, *et al.* Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound [J]. Ultrason Sonochem, 1999, 5(4): 157.
- [21] CHEN RZ, LI Y, DONG H, *et al.* Optimization of ultrasonic extraction process of polysaccharides from *Ornithogalum caudatum* Ait and evaluation of its biological activities [J]. Ultrason Sonochem, 2012, 19(6): 1160–1168.
- [22] NUERXIATI R, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (Salep) [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 141(C): 431–443.
- [23] SURIN S, YOU SG, SEESURIYACHAN P, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from purple glutinous rice bran (*Oryza sativa* L.) and their antioxidant activities [J]. Sci Rep-UK, 2020, 10: 10410.
- [24] ISMAIL BB, GUO MM, PU YF, *et al.* Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods [J]. Ultrason Sonochem, 2019, 52: 257–267.
- [25] CHRISTOU A, STAVROU IJ, KAPNISSI-CHRISTODOULOU CP. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extraction of carob's antioxidants: Processing parameters optimization and identification of polyphenolic composition [J]. Ultrason Sonochem, 2021, 76: 105630.
- [26] 易阳, 张名位, 廖森泰, 等. 龙眼多糖树脂脱色工艺优化[J]. 农业机械学报, 2010, 41(8): 146–150, 155.
YI Y, ZHANG MW, LIAO ST, *et al.* Optimization of de-coloration technology for polysaccharides from longan pulp [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2010, 41(8): 146–150, 155.
- [27] 陈桑. 橄榄多糖提取分离及其功能特性的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
CHEN S. Study on extraction, structure characteristics, antibacterial and antioxidant activities of polysaccharides from *Phyllanthus emblica* Linn. Rausch [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014.
- [28] 李永裕, 贾媛颖, 吴少华. 微波辅助提取橄榄多糖的工艺研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(36): 300–305.
LI YY, JIA YY, WU SH. Study on microwave-assisted technology for extracting polysaccharides from *Phyllanthus emblica* Linn. [J]. Chin Agric Sci Bull, 2012, 28(36): 300–305.
- [29] YIN CM, FAN XZ, FAN Z, *et al.* Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes* polysaccharides and determination of its antioxidant activity [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 111: 446–454.
- [30] 贾媛颖, 李永裕, 陈建烟, 等. 橄榄多糖提取工艺研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(9): 276–280.
GU YY, LI YY, CHEN JY, *et al.* Hot water technology for extraction polysaccharides from *Canarium album* Lour. Rausch [J]. Chin Agric Sci Bull, 2012, 28(9): 276–280.
- [31] ZHANG HJ, LI HZ, ZHANG ZJ, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from perilla seed meal by response surface methodology: Characterization and *in vitro* antioxidant activities [J]. J Food Sci, 2021, 86(2): 306–318.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



常庆, 硕士, 主要研究方向为营养与食品科学。

E-mail: 1784288868@qq.com



吴志霜, 博士, 副教授, 主要研究方向为营养与食品科学。

E-mail: kmwzs@126.com