

超声波-酶法提取玉竹多糖及其抗疲劳泡腾片研制

王梦娇, 姜晓坤*

(吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要: 本试验采用超声波-酶法提取玉竹多糖, 将提取的多糖制备具有抗疲劳功能的泡腾片。进行单因素试验和正交试验确定最佳提取条件, 结果表明: 当超声时间 30 min, 超声温度 30 °C, 液料比 30: 1, 纤维素酶添加量 2.2% 时提取的粗多糖最多, 提取率达 6.13%。利用提取的多糖搭配安赛蜜、泡腾剂和其他辅料等, 研制玉竹多糖抗疲劳泡腾片。最优配方为玉竹多糖添加量 25%, 柠檬酸与碳酸氢钠的比例 1.0: 1, 安赛蜜添加量 6%, 所制成的泡腾片经试验表明具有一定的抗疲劳效果, 能明显降低小鼠机体血清尿素氮含量。

关键词: 玉竹多糖; 超声波-酶法; 抗疲劳; 泡腾片

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)02-0132-06

Ultrasonic-enzymatic Extraction *Polygonatum Odoratum* Polysaccharide and Preparation of Its Anti-fatigue Effervescent Tablets

WANG Mengjiao, JIANG Xiaokun*

(Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132101, China)

Abstract: Ultrasonic-enzymatic extraction of *Polygonatum odoratum* polysaccharide was used in this study. The extracted polysaccharide was prepared into effervescent tablets with anti-fatigue function. Single factor test and orthogonal test were carried out to determine the best extraction conditions. The results showed that the optimal conditions were ultrasonic time 30 min, ultrasonic temperature 30 °C, liquid to solid ratio 30: 1, cellulase content 2.2%, and the extraction rate of crude polysaccharides was up to 6.13%. Using the extracted polysaccharide with acesulfame potassium, effervescent and other auxiliary materials, the anti-fatigue effervescent tablets with *Polygonatum odoratum* polysaccharide were prepared. The optimal formula is 25% *Polygonatum odoratum* polysaccharide, the ratio of citric acid to sodium bicarbonate is 1.0: 1, and acesulfame potassium is 6%. The experimental results show that the effervescent tablet has a certain anti-fatigue effect, and can significantly reduce the content of serum urea nitrogen in mice.

Key words: *Polygonatum odoratum* polysaccharide; Ultrasound-enzymatic method; Anti-fatigue; Effervescent tablet

玉竹是百合科多年生草本植物, 地下根茎多为圆柱形或扁圆柱形, 玉竹根茎中含有丰富的多糖、黄酮类物质、酚类物质、蛋白质等^[1]。玉竹多糖能增强机体免疫力, 具有抗疲劳、抗肿瘤、抗氧化等药理作用, 适用于研制功能性食品^[2]。目前国内外提取玉竹多糖的主要方法有微波提取、水提醇沉法和超声波提取等^[3]。本研究采用超声波-酶法从玉竹中提取多糖, 研究超声时间、超声

温度、酶的添加量以及液料比对多糖提取率的影响, 并通过正交试验确定最佳提取条件^[4-6]。

泡腾片是含有有机酸和碳酸氢钠遇水可以迅速崩解形成澄清透明溶液的片剂^[7], 具有快速溶解、便于携带的优点。与普通粉剂相比, 泡腾片溶解后不易结块, 方便食用^[8]。本文在提取玉竹多糖的基础上, 开发出一种抗疲劳的泡腾片, 为日益增多的亚健康人群提供一种新的食疗产品。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

玉竹(市售, 无腐烂变质); 纤维素酶(10 000 U/g, pH 4.8, 上海谱振生物科技有限公司); 柠檬酸、安赛蜜(成都万象宏润生物科技有限公司),

收稿日期: 2020-02-02

基金项目: 吉林农业科技学院省级大学生科技创新项目【2020】051

作者简介: 王梦娇(1999-), 女, 在读本科, 食品科学与工程专业。

通讯作者: 姜晓坤, 女, 硕士, 高级实验师, E-mail: 602269329@qq.com

聚乙二醇 6000(南京威尔药业股份有限公司),甘露醇(青岛明月海藻集团有限公司),均为食品级;葡萄糖(天津市永大化学试剂有限公司),苯酚、浓硫酸、碳酸氢钠(天津福晨试剂厂),乙醇(济南博智化工有限公司),均为分析纯;肝糖原、血清尿素氮试剂盒(上海仁捷生物科技有限公司)。

1.2 实验仪器

BK-600VAD 超声波清洗器(山东博科再生医学有限公司,400 W),Cary 60 紫外可见分光光度计(安捷伦科技有限公司),H3021D 离心机(上海知信实验仪器技术有限公司),FA1004 电子分析天平(上海右一仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 超声波-酶法提取玉竹多糖

2.1.1 玉竹多糖提取工艺流程

(1)玉竹切片、烘干:将购买的玉竹用清水洗净、去除杂质后切片,再放入 65 °C 干燥箱内烘干;(2)粉碎:将烘干的玉竹放入粉碎机中粉碎,过 40 目筛;(3)超声波-酶法提取:调节溶液 pH 为 4.8,设置超声波功率为 400 W;(4)离心:将提取液放入离心机 4 000 r/min 离心 10 min,弃去初滤液;(5)干燥:将离心后得到的粗多糖在 65 °C 条件下烘干。

2.1.2 多糖含量的测定—苯酚硫酸法

将提取的粗多糖 20 g 溶解于水中制成标准溶液,按照标准曲线制备方法测定吸光度,带入标准曲线,计算出玉竹多糖含量和多糖提取率。

2.1.2.1 标准曲线建立

葡萄糖标准溶液的制备:精确称取 0.01 g 无水葡萄糖制成 0.1 mg/mL 标准溶液,分别向试管中加入 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL,不足 2.0 mL 加入蒸馏水使液面至 2.0 mL,将 1.0 mL 6% 苯酚水溶液和 5 mL 浓硫酸加入试管中摇匀,静置 15 min,在波长 490 nm 处测定吸光值,以葡萄糖浓度为横轴,吸光值为纵轴绘制标准曲线^[9]。

取样品 1.0 mL,加 1.0 mL 蒸馏水,将 1.0 mL 6% 苯酚水溶液和 5 mL 浓硫酸加入试管中后摇匀,静置 15 min,在波长 490 nm 处测定吸光值,并将测得的吸光度带入标准曲线中,获得多糖浓度。

2.1.2.2 多糖含量计算

多糖含量根据下列公式计算:

$$\text{多糖含量} = \frac{c \times V}{m} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

式中:C 为样品溶液葡萄糖质量浓度(mg/L);V 为供试液体积(L);m 为供测粗多糖质量(mg)。

2.1.2.3 多糖提取率计算

多糖提取率按下列公式计算:

$$\text{多糖提取率} = \frac{\text{多糖含量} \times m}{m_1} \times 100\% \dots\dots(2)$$

式中:m 为醇沉后得到的粗多糖总质量(g);m₁为称取的玉竹样品干粉质量(g)。

2.1.3 单因素试验

在超声功率 400 W、酶解 pH 为 4.8 条件下,研究超声时间、超声温度、液料比、纤维素酶添加量对玉竹多糖提取率的影响,试验设计见表 1。

表 1 单因素试验设计表

因素	梯度	不变量
超声时间(min)	20、25、30、35、40	超声温度 30 °C、液料比 25:1、纤维素酶添加量 2.0%
超声温度(°C)	20、25、30、35、40	超声时间 30 min、液料比 25:1、纤维素酶添加量 2.0%
液料比	15:1、20:1、25:1、30:1、35:1	超声时间 30 min、超声温度 30 °C、纤维素酶添加量 2.0%
纤维素酶添加量(%)	1.6、1.8、2.0、2.2、2.4	超声时间 30 min、超声温度 30 °C、液料比 25:1

2.1.4 正交试验

在单因素试验基础上,以玉竹多糖提取率为评分标准,考察超声时间、超声温度、液料比和纤维素酶添加量四个因素,进行四因素三水平正交试验,确定从玉竹中提取多糖最佳的组合。

2.2 玉竹多糖抗疲劳泡腾片的研制

2.2.1 工艺流程

(1)原辅料预处理:将原辅料放置干燥箱内 60 °C 干燥 3 h;(2)粉碎、过筛:将烘干后的原辅料分别放入粉碎机中充分粉碎,过 80 目筛;(3)干

燥:将筛下物放入干燥箱中,在 65 °C 干燥;(4)混合:将玉竹多糖、柠檬酸、碳酸氢钠、聚乙二醇 6000、安赛蜜、甘露醇充分混合,保证压片后色泽均一,有效溶解。

2.2.2 检测方法工艺^[10-11]

2.2.2.1 崩解时限检测

将制备好的泡腾片放入 100 mL 25 °C 纯净水中。加入泡腾片开始计时直至没有气体溢出的时间为泡腾片崩解时限,观察溶液色泽变化情况。

2.2.2.2 pH 值检测

将制备好的泡腾片放入 100 mL 水中溶解,静置 1 min 后用精密 pH 计进行测定。

2.2.2.3 二氧化碳量的测定

采用失重法进行测定。先求出二氧化碳的释放量,再换算成 mg/g。

2.2.3 最佳制备条件

以感官评价为指标,通过玉竹多糖添加量(20%、25%、30%、35%、40%)、柠檬酸与碳酸氢钠质量比(0.8:1、1.0:1、1.2:1、1.4:1、1.6:1)、安赛蜜添加量(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%)三个因素考察泡腾片色泽、口感及气味,再通过正交试验优化泡腾片制备条件。感官评价指标见表 2。

表 2 抗疲劳泡腾片的评分标准

评价指标	分值		
色泽及澄清度 (25分)	溶液透明澄清,无杂色 (21~25)	溶液较澄清,基本无杂色 (16~20)	溶液浑浊,颜色偏暗 (≤15)
口感气味 (25分)	酸甜适中,口味较浓,无异味 (21~25)	口感较好,口味微淡, 无明显异味(16~20)	口感较差,有异味(≤15)
冲调性 (25分)	冲调后无结块 (21~25)	冲调后轻微结块 (16~20)	冲调后严重结块 (≤15)
崩解时限 (25分)	3~4 min (21~25)	5~6 min (16~20)	6 min 以上 (≤15)

2.2.4 小鼠抗疲劳试验^[12-13]

将雄性小鼠适应环境 7 d 后用于实验,按体重随机分为 6 组:第一组至第五组摄入玉竹多糖泡腾片剂量分别为 5、10、15、20、25 mg/10 g·d,第六组为空白对照组;每天给药一次,连续给药四周后用于试验。

2.2.4.1 小鼠负重游泳时间

最后一次对小鼠给药 30 min 后,在小鼠尾部系上重量为其体重 5% 的铁丝,并放入水温(25±1)℃的游泳箱,小鼠进入水中开始计时,直至头部完全没入水中 10 s 后结束计时,所记录的这段时间即为小鼠负重游泳时间。

2.2.4.2 小鼠肝糖原含量测定

最后一次对小鼠给药 30 min 后,将小鼠放置于游泳桶中游泳 20 min,在游泳前、游泳后 10 min 处死小鼠,取出肝脏浸泡在生理盐水中,测定小鼠肝糖原含量。

2.2.4.3 小鼠血清尿素氮含量测定

最后一次对小鼠给药 30 min 后,小鼠游泳 20 min,等待 10 min 取其眼球血测定小鼠血清尿素氮含量。

3 结果与分析

3.1 标准曲线绘制

由图 1 可知,回归方程 $Y=29.451X+0.0699$, $R^2=0.999$,线性关系良好。

3.2 单因素试验结果

3.2.1 超声时间的影响

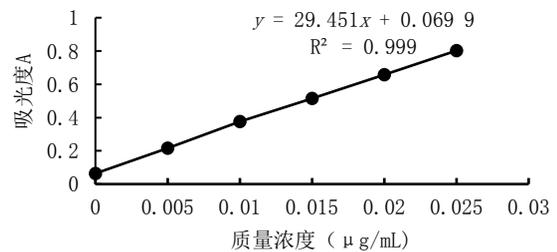


图 1 葡萄糖标准曲线

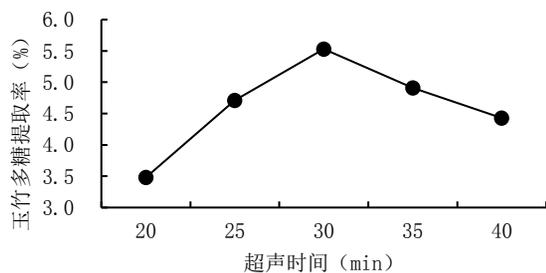


图 2 不同超声时间对玉竹多糖提取率的影响

由图 2 可知,玉竹多糖的提取率随着时间延长先升高,在 30 min 左右达到最高值,然后逐渐降低,通过分析,最佳超声时间为 30 min,选择超声波提取时间 25、30、35 min 进行正交试验。

3.2.2 超声温度的影响

由图 3 可知,随着超声温度的升高,玉竹多糖提取率逐渐增大,当温度达到 35℃ 时多糖提取率达到最高,超过 35℃ 后温度升高玉竹多糖的提取率逐渐降低。由此选择超声温度 35℃,并选择 30℃、35℃、40℃ 进行正交试验。

3.2.3 液料比的影响

由图 4 可知,随着溶剂增加,多糖提取率呈上

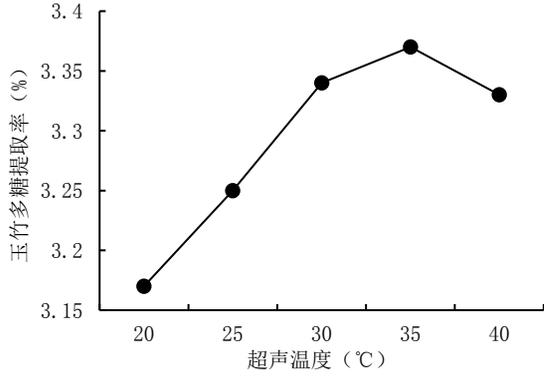


图3 不同超声温度对玉竹多糖提取率的影响

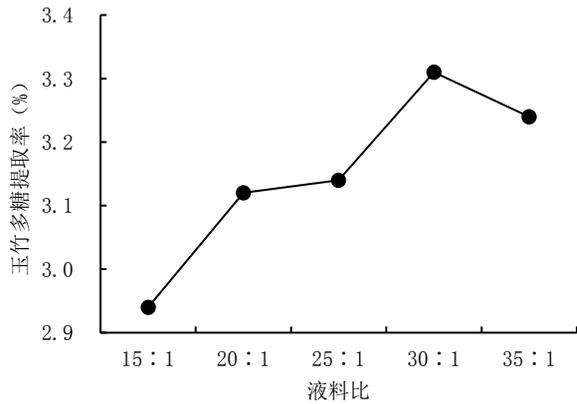


图4 不同液料比对玉竹多糖提取率的影响

升趋势,当液料比为30:1时玉竹多糖提取率最高,液料比大于30:1后提取率减少,液料比选30:1为宜,选择液料比25:1、30:1、35:1进行正交试验。

3.2.4 纤维素酶添加量的影响

由图5可知,增加纤维素酶的用量玉竹多糖的提取率逐渐上升,在酶添加量为2.0%时,玉竹多糖提取率最高,酶用量超过2.0%时多糖提取率逐渐降低。由此说明纤维素酶添加2.0%较好,选择添加量1.8%、2.0%、2.2%进行正交试验。

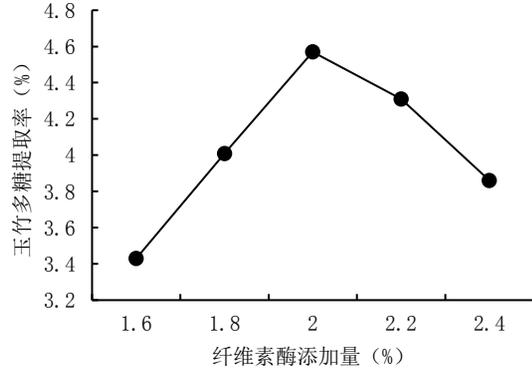


图5 纤维素酶添加量对玉竹多糖提取率的影响

3.3 正交试验结果分析

正交试验因素与水平设计见表3。L₉(3⁴)正交

表3 正交试验因素与水平设计

水平	A. 超声时间(min)	B. 超声温度(°C)	C. 液料比	D. 纤维素酶添加量(%)
1	25	30	25:1	1.8
2	30	35	30:1	2.0
3	35	40	35:1	2.2

表4 L₉(3⁴)正交试验结果与分析

试验号	A	B	C	D	多糖提取率%
1	1	1	1	1	3.61
2	1	2	2	2	3.92
3	1	3	3	3	3.55
4	2	1	2	3	6.13
5	2	2	3	1	4.21
6	2	3	1	2	3.89
7	3	1	3	2	4.33
8	3	2	1	3	5.85
9	3	3	2	1	4.01
K ₁	11.08	14.07	13.35	11.83	
K ₂	14.23	13.98	14.06	12.14	
K ₃	14.19	11.45	12.09	15.53	
\bar{k}_1	3.693	4.690	4.450	3.943	
\bar{k}_2	4.743	4.660	4.687	4.047	
\bar{k}_3	4.730	3.817	4.030	5.177	
R	1.050	0.873	0.657	1.234	

试验结果与分析见表4,由表4可知,各因素水平对玉竹多糖的提取率存在相应的影响,通过比较极差R值可知,影响玉竹多糖提取率的大小次序为纤维素酶添加量>超声温度>液料比>超声时间,最优组合为A₂B₁C₂D₃,即超声时间30 min,超声温度30 °C,液料比30:1,纤维素酶添加量2.2%,在此条件下多糖提取率达到了最高为6.13%。

3.4 玉竹多糖抗疲劳泡腾片配方试验

3.4.1 玉竹多糖粉添加量的确定

玉竹多糖粉的添加量逐渐增加,杯底产生的沉淀也有所增加,随着时间延长,多糖粉形成的悬浮物质逐渐增加。综合考虑选择玉竹多糖添加量为25%为宜(表5)。

表5 玉竹多糖粉添加量试验结果

玉竹多糖粉添加量(%)	色泽	感官评分	备注
20	85	80	底部有少量沉淀
25	88	83	底部有少量沉淀
30	86	81	底部有沉淀
35	80	75	底部有较多沉淀
40	78	73	底部有较多沉淀

3.4.2 柠檬酸与碳酸氢钠比例的确定

由表6可知,CO₂的释放量在柠檬酸与碳酸氢钠比例为1.2:1时最多,并且该条件下崩解时限适中(42 s),pH值适宜食用,也就是柠檬酸:碳酸氢钠的质量比在1.2:1较理想。

表6 泡腾剂溶解后CO₂的释放量和反应溶液的pH值

柠檬酸:碳酸氢钠	CO ₂ 释放量(mg)	崩解时限(s)	pH值	感官评分
0.8:1	335.4	37	5.86	75
1.0:1	375.3	45	5.65	83
1.2:1	380.5	42	5.21	85
1.4:1	358.2	38	4.93	84
1.6:1	354.9	34	4.82	77

3.4.3 安赛蜜用量的确定

从表7分析可知,安赛蜜添加量在4%~8%之间口感较好,其中添加量为6%时口感最好,甜度适中。因此选择安赛蜜添加量为6%。

3.4.4 正交法优化玉竹多糖泡腾片产品的配方

正交试验因素与水平设计见表8,正交试验结果与分析见表9。由表9可知,各因素水平对抗疲劳泡腾片感官评分存在相应的影响,通过比较极差R'值可知,影响泡腾片感官评分的主要因素是安赛蜜添加量,从而得出抗疲劳泡腾片配方中的

表7 安赛蜜添加量审评结果

安赛蜜用量(%)	感官评分	备注
2	78	有苦涩味
4	83	甜度略欠缺,后味微苦
6	86	甜度适中
8	85	甜度适中,余味略甜
10	75	偏甜

表8 正交试验因素与水平设计

水平	A'.玉竹多糖粉添加量(%)	B'.泡腾剂(柠檬酸:碳酸氢钠)	C'.安赛蜜添加量(%)
1	20	1.0:1	4
2	25	1.2:1	6
3	30	1.4:1	8

表9 L₉(3⁴)正交试验结果与分析

试验号	A'	B'	C'	感官评分
1	1	1	1	78
2	1	2	2	86
3	1	3	3	84
4	2	1	2	88
5	2	2	3	83
6	2	3	1	81
7	3	1	3	86
8	3	2	1	79
9	3	3	2	86
K ₁	248	252	238	
K ₂	252	248	260	
K ₃	251	251	253	
\bar{k}_1	82.67	84.00	79.33	
\bar{k}_2	84.00	82.67	86.67	
\bar{k}_3	83.67	83.67	84.33	
R'	1.33	1.33	7.34	

最优方案组合为A'₂B'₁C'₂,即玉竹多糖添加量25%,柠檬酸与碳酸氢钠的比例1.0:1,安赛蜜添加量6%。

3.5 玉竹多糖泡腾片对小鼠游泳的影响

当机体疲劳时,直接客观的表现是机体产生运动耐力下降的现象。玉竹多糖泡腾片对小鼠游泳时间的影响见图6。试验结果表明,试验组与空白对照组相比小鼠的游泳时间有不同程度的增加趋势。在摄入剂量超过20 mg/10 g·d时,摄入剂量增加小鼠负重游泳时间变化趋势不大。说明玉竹多糖泡腾片在一定范围内具有延长小鼠游泳时间的作用。

3.6 玉竹多糖泡腾片对游泳前后小鼠肝糖原含量的影响

机体中重要的能源物质糖原能够反映机体疲劳发生的快慢程度,由图7可知,与空白对照组相

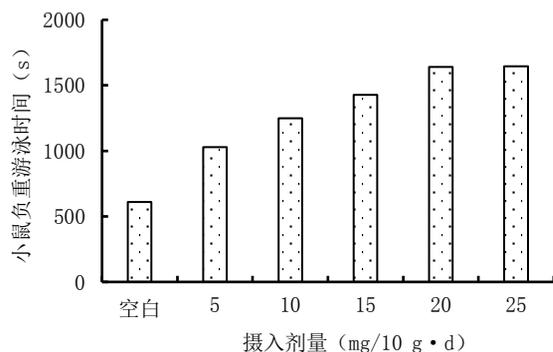


图6 玉竹多糖泡腾片对小鼠游泳时间的影响

比,摄入不同剂量玉竹多糖抗疲劳泡腾片均能显著提高游泳前小鼠肝糖原含量。在超过 15 mg/10 g·d 时,随着摄入剂量增加,小鼠肝糖原变化趋势不明显。说明玉竹多糖抗疲劳泡腾片在一定程度上能延缓疲劳。

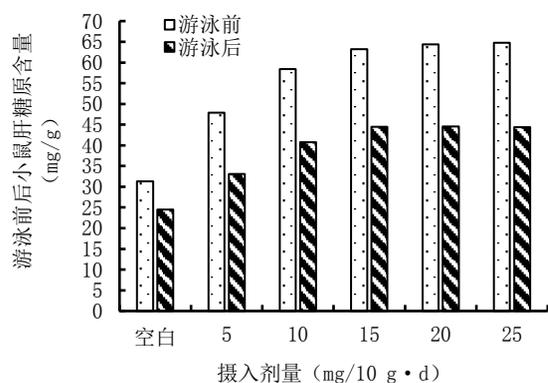


图7 玉竹多糖抗疲劳泡腾片对游泳前后小鼠肝糖原含量

3.7 玉竹多糖泡腾片对小鼠体内血清尿素氮含量的影响

由图8可知,与空白对照组相比,各实验组的小鼠体内血清尿素氮的含量均低于空白对照组,说明玉竹多糖泡腾片具有较好的抗疲劳效果。当

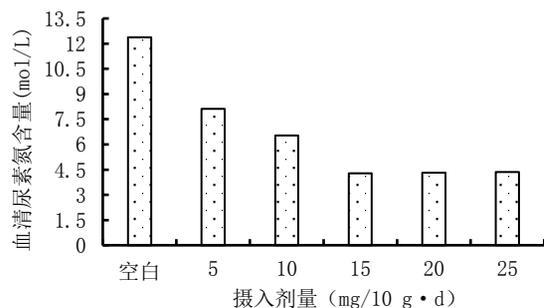


图8 玉竹多糖泡腾片对小鼠体内血清尿素氮含量的影响

摄入剂量达到 15 mg/10 g·d 作用效果趋于稳定。

4 结论

采用超声波-酶法提取玉竹多糖,通过单因素试验和正交试验,该方法的最优工艺条件为纤维素酶添加量 2.2%,液料比 30:1,超声时间 30 min,超声温度 30 ℃,在此条件下多糖提取率达到了 6.13%。将玉竹多糖用于抗疲劳泡腾片的研制,对其配方进行优化后,最优配方组合为玉竹多糖添加量 25%,柠檬酸与碳酸氢钠的比例 1.0:1,安赛蜜添加量 6%。所制成的抗疲劳泡腾片具有一定的抗疲劳效果,能明显降低小鼠机体血清尿素氮含量,玉竹多糖抗疲劳泡腾片的研制对解决现代人体亚健康状态具有一定的意义。

参考文献:

- [1] 孟庆龙,崔文玉,刘雅婧,等.玉竹的化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2020,54(9):93-98.
- [2] 宗鑫妍,徐德昌,聂少平,等.玉竹多糖分离纯化、理化性质及抗氧化功能[J].南昌大学学报(理科版),2019,43(1):70-75.
- [3] 霍达,李琳,张霞,等.玉竹多糖的提取工艺优化、结构表征及抗氧化活性的研究[J].食品科技,2020,45(7):200-208.
- [4] 姜晓坤,谷慧莹,魏伶俐,等.玉竹多糖的微波超声提取及其抗氧化研究[J].东北农业科学,2020,45(1):87-93.
- [5] 唐永慧,徐多,宋晓雪,等.玉竹多糖和玉竹黄酮复合饮料的制取工艺及抗氧化活性研究[J].中国果菜,2019,39(9):10-15.
- [6] 温馨园,温馨,王甜,等.玉竹多糖的提取与脱蛋白的工艺研究[J].广东畜牧兽医科技,2019,44(2):36-41.
- [7] 姚洪礼,邢爽,周先汉,等.红枣山药固体速溶泡腾片制备及特性[J].食品工业,2020,41(12):77-81.
- [8] 孙文松,李晓丽.玉竹生产研究现状及发展对策[J].园艺与种苗,2019(11):6-8,12.
- [9] 王超,张曜武.苯酚-硫酸法的改进发展[J].天津化工,2011,25(6):16-18.
- [10] 张宏康,林奕楠,李德荣,等.番石榴泡腾片固体饮料研制[J].食品工业,2015,36(1):4-7.
- [11] 王文宝,杨俊涛,杜利月,等.香菇多糖泡腾片制备工艺[J].食品工业,2020,41(12):20-23.
- [12] 牛友芽.玉竹多糖对小鼠的抗疲劳作用[J].天然产物研究与开发,2018,30(7):1202-1207.
- [13] 余江南,姜慧妍,徐遥,等.玉竹多糖的结构及其生物活性研究进展[J].现代食品科技,2018,34(8):273-282,144.

(责任编辑:刘洪霞)