

超声波辅助纤维素酶提取核桃壳多糖 及其抗氧化活性研究

汤慧民, 周丽菊

(文山学院 化学与工程学院, 云南 文山 663099)

摘要:采用单因素试验和正交试验对核桃壳多糖的超声波辅助纤维素酶提取工艺条件进行优化,并对核桃壳多糖的抗氧化活性进行研究。结果表明,超声波辅助纤维素酶提取核桃壳多糖的最优工艺条件为:料液比1:20,纤维素酶添加量1.75%,提取温度45℃,提取时间90 min,超声波功率750 W。在最优条件下,核桃壳多糖提取率为2.20%。核桃壳多糖对DPPH自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基均表现出较好的清除能力,且在一定范围内对三者的清除作用呈现良好的量效关系。

关键词:核桃壳;多糖;超声波辅助;纤维素酶;抗氧化活性

中图分类号:TS229;TQ281

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)02-0101-05

Ultrasound - assisted cellulase extraction of polysaccharide from walnut shell and its antioxidant activity

TANG Huimin, ZHOU Liju

(College of Chemistry and Engineering, Wenshan University, Wenshan 663099, Yunnan, China)

Abstract: The ultrasound - assisted cellulase extraction conditions of polysaccharide from walnut shell were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment, and the antioxidant activity of the polysaccharide was investigated. The results showed that the optimal ultrasound - assisted cellulase extraction conditions were obtained as follows: solid - liquid ratio 1:20, cellulase dosage 1.75%, extraction temperature 45℃, extraction time 90 min and ultrasonic power 750 W. Under these conditions, the extraction rate of polysaccharide was 2.20%. The polysaccharide had better scavenging activity on DPPH free radical, $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^- \cdot$, and the scavenging rates showed dose - effect relationship to a certain extent.

Key words: walnut shell; polysaccharide; ultrasound - assist; cellulase; antioxidant activity

核桃属于胡桃科核桃属,素有木本油料之王之称,位居世界四大干果之首^[1]。2017年全国核桃总产量达415万t,按核桃壳质量占核桃总质量的30%计算,2017年核桃壳产量约124.5万t^[2]。核桃壳多数被焚烧或丢弃,不仅污染环境,而且也造成资源的大量浪费。研究发现核桃壳含有酚酸类、黄酮类、苷类等多种活性物质,具有抗氧化、抗菌、降脂、抗肿瘤等作用^[3]。目前对核桃壳多糖的相关研

究较少。本研究采用超声波辅助纤维素酶法从核桃壳中提取多糖,并优化其提取条件,同时对所提取的核桃壳多糖进行抗氧化活性的测定,为进一步实现工业化生产奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

核桃,云南省文山州广南县薄壳核桃;纤维素酶、无水葡萄糖、95%乙醇、石油醚、丙酮、三氯甲烷、正丁醇、硫酸、苯酚、抗坏血酸、水杨酸、邻苯三酚、盐酸、30%过氧化氢、硫酸亚铁、DPPH、Tris,均为分析纯。

收稿日期:2019-06-27;修回日期:2019-11-23

基金项目:文山学院科学研究基金

作者简介:汤慧民(1980),男,副教授,硕士,主要从事保健食品及功能食品研究(E-mail) tanghuimin2000@126.com。

1.1.2 仪器与设备

FW135 型高速万能粉碎机;SK-18TC 超声波清洗器,上海科岛超声仪器有限公司;V-1100D 型可见分光光度计,上海美普达仪器有限公司;AL 电子天平;DHG-9023A 电热鼓风干燥箱;800 型离心机;HH-2 数显恒温水浴锅;RE-2000A 型旋转蒸发仪;SHB-III 循环式多用真空泵;SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 核桃壳多糖的提取

将核桃去仁取壳后清洗,75℃干燥 2 h,粉碎过 60 目筛,按料液比 1:30 加入石油醚,在恒温水浴锅中 65℃回流 2 h 脱脂,再按料液比 1:30 加入 80% 乙醇回流 2 h 除去单糖和寡糖,然后抽滤干燥。按一定料液比加入蒸馏水溶解,用磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液调节溶液的 pH 为 4.8,再加入适量的纤维素酶,在一定温度、时间和超声波功率下进行超声处理,然后在 95℃沸水浴中灭酶 15 min,冷却后离心分离,过滤除去杂质,取上清液浓缩至原体积的 1/4,通过 Sevage 法沉淀除去蛋白,离心,取上清液用 3 倍体积无水乙醇沉淀核桃壳多糖,并在冰箱中 4℃下过夜后抽滤,将滤液减压浓缩后冷冻干燥,即得到核桃壳多糖。

1.2.2 标准曲线的绘制

准确称取干燥至恒重的无水葡萄糖 100.0 mg,加蒸馏水溶解并转移到 100 mL 容量瓶中定容,得到质量浓度为 1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。准确移取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 葡萄糖标准溶液于 100 mL 容量瓶中定容。再分别移取 2.0 mL 葡萄糖溶液至试管中,加入 1.0 mL 质量分数为 5% 的苯酚溶液和 5.0 mL 浓硫酸,混匀。在 70℃ 的恒温水浴中加热 15 min,然后用自来水冷却 15 min,在 490 nm 波长处测定吸光度^[4-6]。以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制得到葡萄糖标准曲线,回归方程为: $y = 6.7357x - 0.0032$, $R^2 = 0.9997$ 。

1.2.3 核桃壳多糖含量的测定及提取率的计算

准确移取 2.0 mL 核桃壳多糖提取液(1.2.1 中除去蛋白的上清液)于具塞试管中,加入 1.0 mL 质量分数为 5% 的苯酚溶液,摇匀,再缓慢加入 5.0 mL 浓硫酸,摇匀后置于 70℃ 水浴中加热 15 min,取出后用自来水冷却 15 min,用蒸馏水按同样的操作作空白对照,用可见分光光度计于 490 nm 波长处测定其吸光度,平行测定 3 次,取平均值^[5-6]。由标准曲线回归方程计算样品的多糖含量。多糖提取率按下

式计算。

$$\text{多糖提取率} = \frac{C \times V \times 10^{-3}}{M} \times 100\%$$

式中: C 为核桃壳提取液中多糖含量,mg/mL; V 为核桃壳多糖提取液总体积,mL; M 为核桃壳粉的质量,g。

1.2.4 核桃壳多糖的抗氧化活性研究

1.2.4.1 核桃壳多糖对 DPPH 自由基的清除能力测定^[7]

采用 95% 乙醇配制 2.0×10^{-4} mol/L 的 DPPH 乙醇溶液,现配现用。

向 3.0 mL DPPH 乙醇溶液中分别加入 3.0 mL 不同质量浓度(0.055、0.110、0.165、0.220、0.275 mg/mL)的核桃壳多糖溶液,摇匀,在室温条件下反应 20 min,然后在 517 nm 波长处测定吸光度(A_i),同时测定 3.0 mL DPPH 乙醇溶液与 3.0 mL 蒸馏水混合后溶液的吸光度(A_c),以及 3.0 mL 95% 乙醇与 3.0 mL 不同质量浓度(0.055、0.110、0.165、0.220、0.275 mg/mL)的核桃壳多糖溶液混合后溶液的吸光度(A_b)。同时,以维生素 C 作阳性对照,每组重复 3 次并取平均值。核桃壳多糖溶液对 DPPH 自由基的清除率按下式计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_c - (A_i - A_b)}{A_c} \times 100\%$$

1.2.4.2 核桃壳多糖对羟基自由基的清除能力测定^[8]

取不同质量浓度(0.055、0.110、0.165、0.220、0.275 mg/mL)的核桃壳多糖溶液 3.0 mL 于试管中,分别加入硫酸亚铁溶液(9 mmol/L)和水杨酸-乙醇溶液(9 mmol/L)各 2.0 mL,再加入 3.0 mL 过氧化氢溶液(8.8 mmol/L),最后用蒸馏水定容至 10 mL,在 37℃ 恒温水浴锅中反应 20 min 后,在 510 nm 波长处测定吸光度,用蒸馏水作空白对照。以维生素 C 作阳性对照,每组试验重复 3 次并取平均值。核桃壳多糖溶液对羟基自由基的清除率按下式计算。

$$\text{羟基自由基清除率} = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100\%$$

式中: A_0 为空白溶液的吸光度; A_x 为加入核桃壳多糖溶液的吸光度; A_{x0} 为不加过氧化氢溶液的吸光度。

1.2.4.3 核桃壳多糖对超氧阴离子自由基的清除能力测定^[9]

取 5.0 mL Tris-HCl(50 mmol/L,pH 8.2)缓冲溶液置于试管中,加入 3.0 mL 蒸馏水,在 25℃ 恒温

水浴锅中反应 10 min, 然后分别加入 3.0 mL 不同质量浓度(0.055、0.110、0.165、0.220、0.275 mg/mL)的核桃壳多糖溶液, 再加入 2.0 mL 邻苯三酚溶液(25 mmol/L), 混匀后置于 25 °C 恒温水浴锅中反应 15 min, 立即加入 2.0 mL 盐酸(10 mmol/L)终止反应, 在 320 nm 波长处测定吸光度(A_i)。以维生素 C 作阳性对照, 对照组用蒸馏水代替邻苯三酚测定吸光度(A_j), 空白组用蒸馏水代替核桃壳多糖溶液测定吸光度(A_0), 每组试验重复 3 次并取平均值。核桃壳多糖溶液对超氧阴离子自由基的清除率按下式计算。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率} = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times$$

100%

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比对核桃壳多糖提取率的影响

称取 5.0 g 核桃壳干粉, 在纤维素酶添加量为 1.75%、pH 为 4.8、提取温度为 50 °C、提取时间为 120 min、超声波功率为 600 W 的条件下, 比较不同料液比对核桃壳多糖提取率的影响, 结果见图 1。

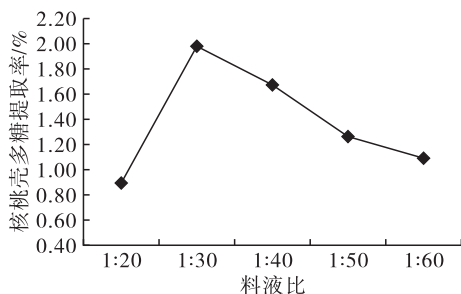


图 1 料液比对核桃壳多糖提取率的影响

由图 1 可以看出:随着料液比的增大,核桃壳多糖提取率增大;料液比超过 1:30 时,核桃壳多糖提取率下降。原因可能是增加溶剂使用量可以增大固液接触面积,有利于扩散,核桃壳多糖提取率上升;但过度增大料液比不仅造成溶剂浪费,亦会导致样品中其他杂质成分溶出。综合考虑,适宜的料液比为 1:30。

2.1.2 纤维素酶添加量对核桃壳多糖提取率的影响

称取 5.0 g 核桃壳干粉,在料液比为 1:30、pH 为 4.8、提取温度为 50 °C、提取时间为 120 min、超声波功率为 600 W 的条件下,比较不同纤维素酶添加量对核桃壳多糖提取率的影响,结果见图 2。

由图 2 可以看出:随着纤维素酶添加量的增大,核桃壳多糖提取率增加;纤维素酶添加量超过

1.75% 时,核桃壳多糖提取率不再增加。纤维素酶可破坏细胞壁,加速多糖的溶出,但当纤维素酶添加量大于一定量时,底物已经处于酶饱和状态^[10],多糖提取量趋于平缓。因此,最佳的纤维素酶添加量为 1.75%。

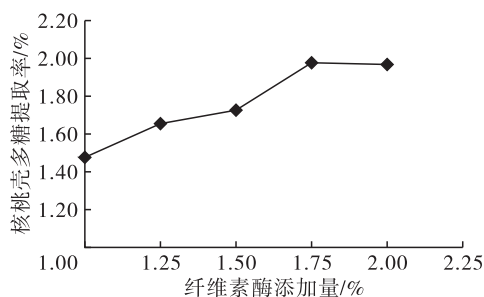


图 2 纤维素酶添加量对核桃壳多糖提取率的影响

2.1.3 提取时间对核桃壳多糖提取率的影响

称取 5.0 g 核桃壳干粉,在料液比为 1:30、酶添加量为 1.75%、pH 为 4.8、提取温度为 50 °C、超声波功率为 600 W 的条件下,比较不同提取时间对核桃壳多糖提取率的影响,结果见图 3。

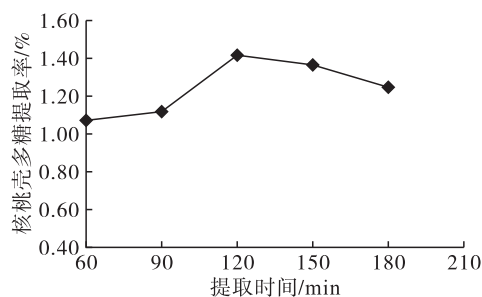


图 3 提取时间对核桃壳多糖提取率的影响

由图 3 可以看出:随着提取时间的延长,核桃壳多糖提取率逐渐增加;当提取时间为 120 min 时,核桃壳多糖提取率最大;之后随着提取时间的继续延长,核桃壳多糖提取率呈下降趋势。原因可能是由于长时间超声作用使部分多糖被超声波的剪切力降解以及非糖类杂质溶出过多,影响多糖提取率^[11]。因此,适宜的提取时间为 120 min。

2.1.4 提取温度对核桃壳多糖提取率的影响

称取 5.0 g 核桃壳干粉,在料液比为 1:30、纤维素酶添加量为 1.75%、pH 为 4.8、提取时间为 120 min、超声波功率为 600 W 的条件下,比较不同提取温度对核桃壳多糖提取率的影响,结果见图 4。

由图 4 可以看出:随着提取温度的升高,核桃壳多糖提取率不断增大;当提取温度为 50 °C 时,核桃壳多糖提取率达到最大;之后随着提取温度的继续升高,核桃壳多糖提取率下降。原因可能是温度过高,会破坏酶结构,使酶失去活性;温度过低,酶催化

作用不能充分发挥^[12]。因此,适宜的提取温度为 50℃。

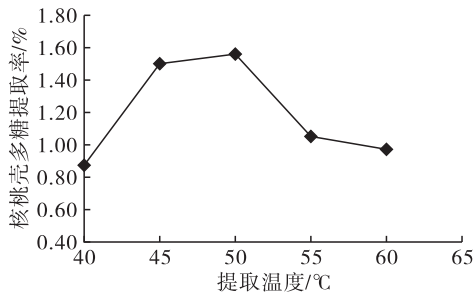


图4 提取温度对核桃壳多糖提取率的影响

2.1.5 超声波功率对核桃壳多糖提取率的影响

称取 5.0 g 核桃壳干粉,在料液比为 1:30、纤维素酶添加量为 1.75%、pH 为 4.8、提取时间为 120 min、提取温度为 50℃的条件下,比较不同超声波功率对核桃壳多糖提取率的影响,结果见图 5。

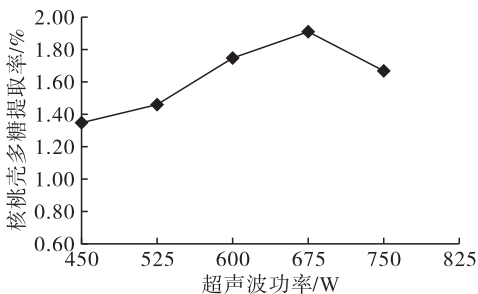


图5 超声波功率对核桃壳多糖提取率的影响

由图 5 可以看出:随着超声波功率的增大,核桃壳多糖提取率不断增大;当超声波功率增大到 675 W 时,核桃壳多糖提取率最大,之后下降。这是因为随着超声波功率的增加,增大了超声的空化及机械搅拌作用,促进了多糖的溶出;但超声波功率过大,容易造成提取系统局部瞬时过热,从而造成多糖分子链的断裂^[13]。因此,适宜的超声波功率为 675 W。

2.2 正交试验

通过单因素试验,固定纤维素酶添加量为 1.75%,以料液比、提取温度、提取时间、超声波功率作为影响核桃壳多糖提取率的主要因素,以多糖提取率为指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验优化提取条件。正交试验因素与水平见表 1,正交试验设计及结果见表 2。

由表 2 可知,影响核桃壳多糖提取率的主次顺序为 $A > B > C > D$,即料液比 > 提取温度 > 提取时间 > 超声波功率。最佳提取工艺条件为 $A_1B_1C_1D_3$,即料液比 1:20、提取温度 45℃、提取时间 90 min、超声波功率 750 W。在最优工艺条件下进行验证试验,平行测定 3 次,核桃壳多糖提取率分别为

2.13%、2.21%、2.25%,平均值为 2.20%,RSD 为 2.78%。

表 1 正交试验因素与水平

水平	A 料液比	B 提取温度/℃	C 提取时间/min	D 超声波功率/W
1	1:20	45	90	600
2	1:30	50	120	675
3	1:40	55	150	750

表 2 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	多糖提取率/%
1	1	1	1	1	1.81
2	1	2	2	2	1.66
3	1	3	3	3	1.34
4	2	1	2	3	1.59
5	2	2	3	1	1.25
6	2	3	1	2	1.22
7	3	1	3	2	1.20
8	3	2	1	3	1.35
9	3	3	2	1	1.01
k_1	1.603	1.533	1.460	1.357	
k_2	1.353	1.420	1.420	1.360	
k_3	1.187	1.190	1.263	1.427	
R	0.416	0.343	0.197	0.070	

2.3 核桃壳多糖的抗氧化活性

2.3.1 清除 DPPH 自由基的能力(见图 6)

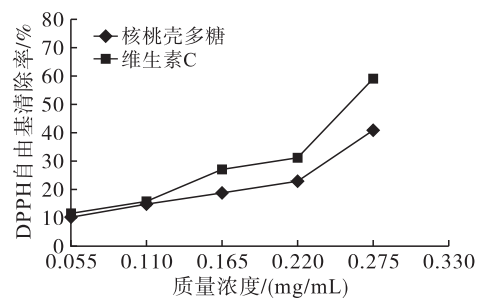


图6 核桃壳多糖和维生素 C 对 DPPH 自由基的清除率

由图 6 可以看出:虽然核桃壳多糖对 DPPH 自由基的清除能力低于维生素 C,但是随着质量浓度的增加,核桃壳多糖的 DPPH 自由基清除率呈现上升趋势;在质量浓度为 0.275 mg/mL 时,核桃壳多糖的 DPPH 自由基清除率达到 40.60%。说明核桃壳多糖对 DPPH 自由基有一定的清除能力。

2.3.2 清除羟基自由基的能力(见图 7)

由图 7 可以看出:核桃壳多糖的羟基自由基清除率略低于维生素 C 的;随着质量浓度的增加,核桃壳多糖的羟基自由基清除率呈现缓慢上升趋势,在质量浓度为 0.275 mg/mL 时,其羟基自由基清除率达到 91.79%。说明核桃壳多糖对羟基自由基有

很强的清除能力。

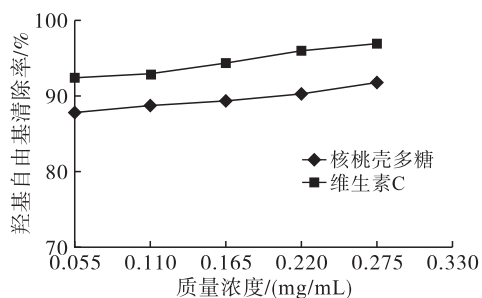


图7 核桃壳多糖和维生素C对羟基自由基的清除率

2.3.3 清除超氧阴离子自由基的能力(见图8)

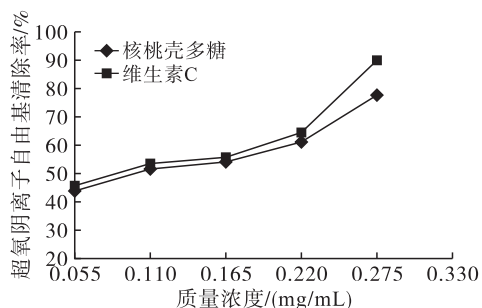


图8 核桃壳多糖和维生素C对超氧阴离子自由基的清除率

由图8可以看出:核桃壳多糖对超氧阴离子自由基的清除能力低于维生素C,但是随着质量浓度的增加,核桃壳多糖的超氧阴离子自由基清除率呈现上升趋势;在质量浓度为0.275 mg/mL时,核桃壳多糖的超氧阴离子自由基清除率达到77.30%。说明核桃壳多糖对超氧阴离子自由基有较强的清除能力。

3 结论

采用单因素试验和正交试验对超声波辅助纤维素酶提取核桃壳多糖的工艺条件进行优化,得到的最优工艺条件为料液比1:20、纤维素酶添加量1.75%、提取温度45℃、提取时间90 min、超声波功率750 W,在此条件下核桃壳多糖的提取率为2.20%。核桃壳多糖对羟基自由基具有很强的清除能力,对超氧阴离子自由基具有较强的清除能力,对DPPH自由基具有一定的清除能力,在质量浓度为

0.275 mg/mL时,对三者的清除率分别达到91.79%、77.30%、40.60%。表明核桃壳多糖具有良好的抗氧化活性。

参考文献:

- [1] 傅本重,邹路路,朱洁倩,等.中国核桃生产现状与发展思路[J].江苏农业科学,2018,46(18):5-8.
- [2] 刘甲振,耿爱军,栗晓宇,等.国内外核桃破壳技术与装备研究进展[J].中国果树,2019(1):16-20,26.
- [3] 张旭,梁杏,陈朝银,等.核桃壳的化学成分及其功能活性研究进展[J].食品研究与开发,2015,36(14):143-147.
- [4] 周萍,罗延梦,马媛,等.核桃壳多糖的含量测定[J].安徽农业科学,2012,40(25):12654-12655.
- [5] 于红梅,肖传刚,褚秀玲,等.淫羊藿多糖含量的测定方法[J].江苏农业科学,2015,43(8):314-315.
- [6] 苗敬芝,董玉玮,陈尚龙.超声波协同酶法提取南瓜多糖及其体外抗氧化活性研究[J].徐州工程学院学报(自然科学版),2017,32(3):8-15.
- [7] 陈克克,强毅.响应面法优化超声波辅助北苍术多酚提取工艺及其DPPH自由基清除能力研究[J].西北大学学报(自然科学版),2018,48(1):78-84.
- [8] 冯慧民,李茂兴.微波辅助提取核桃壳多糖及其抗氧化活性研究[J].中国油脂,2018,43(5):123-126.
- [9] 郭金龙,王春梅,杜晓.雅安藏茶对氧自由基清除能力评价[J].四川农业大学学报,2009,27(2):189-192.
- [10] 陈程,张存芳,罗国平,等.超声波辅助纤维素酶提取牡丹籽饼中多糖及其清除自由基活性研究[J].中国油脂,2018,43(4):119-124.
- [11] 王秋阳,沙迪,徐红艳.超声波辅助酶法提取胡桃桃种仁壳多糖的工艺优化[J].湖北农业科学,2017,56(7):1315-1319.
- [12] 原姣姣,陈锦璇,张帆,等.响应面优化超声-酶辅助强化油橄榄叶多糖的提取[J].中国油脂,2019,44(4):128-133.
- [13] 陈文娟,陈建福,吴丽敏,等.超声波辅助纤维素酶提取扫帚菜多糖及其抗氧化研究[J].四川农业大学学报,2017,35(2):172-179,185.

《中国油脂》微博已开通,欢迎广大油友互动交流!

新浪官方微博:中国油脂 <http://e.weibo.com/2841983372/profile>