

铁皮石斛原球茎多糖提取最佳工艺研究^{*}

何铁光^{1, 2, 3}, 杨丽涛¹, 李扬瑞³, 苏江¹, 王灿琴², 韦柱杨⁴

(1. 广西大学农学院, 广西南宁 530005; 2. 广西农业科学院生物技术研究, 广西南宁 530007; 3. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西南宁 530007; 4. 广西洋平石斛技术研究所, 广西玉林 537000)

摘要: 对铁皮石斛悬浮培养原球茎多糖的提取、纯化条件进行优化研究, 正交试验结果表明, 提取的最佳工艺为 80℃热水中浸提 2 h, 加水量 20 倍, 提取 3 次, 醇析时乙醇的浓度为 80%。粗多糖脱蛋白时, 氯仿/正丁醇(v/v) 为 1:0.4, 样品/氯仿+正丁醇(v/v) 为 1:0.35, 萃取时间采用 5 min 最佳。

关键词: 铁皮石斛; 原球茎; 多糖分离; 悬浮培养

中图分类号: Q949.71+8.43; Q946 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2006)05-0240-04

Studies on the Optimum Technology for Extraction of Polysaccharides from Suspension cultured Protocorms of *Dendrobium candidum*

HE Tie guang^{1, 2, 3}, YANG Li tao¹, LI Yang rui³, SU Jiang¹,
WANG Can qin² and WEI Zhu yang⁴

(1. College of Agronomy, Guangxi Univ., Nanning 530005, China; 2. Institute of Biotechnology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 3. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning 530007, China; 4. Guangxi Yangping Herba Dendrobii Scientific Research Institute, Yulin 537000, China)

Abstract: Conditions of the extraction and purification of polysaccharides from suspension cultured protocorms of *Dendrobium candidum* were optimized by orthogonal experiment. The results showed that the optimum technology of isolation is to extract about 3 times and 2 hours each time in 20 times water at 80℃, to precipitate polysaccharides with 80% ethanol, and to remove proteins when chloroform/n butanol is 1:0.4, the sample / chloroform n butanol is 1:0.35 and the abstracting time is 5 min.

Key words: *Dendrobium candidum*; Protocorm; Polysaccharides extraction; Suspension culture

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.) 是兰科石斛属多年生附生草本植物, 石斛为常用中药, 对热病伤阴、胃阴不足等病症有很好疗效; 对慢性萎缩性胃炎以及心脑血管、防癌抗癌、防老抗衰等方面, 石斛都能收到独特、满意的效果。近年来, 随着人们对多糖功效认识的增多, 已有人发现铁皮石斛多糖具有较强的抗肿瘤的生物学活性^[1, 2], 这将使石斛在医药保健行业中得到更广泛的应用。

铁皮石斛的种子极小、无胚乳, 自然条件下需与某些真菌共生才能萌发, 很难用实生苗栽培, 加上长期过度开采, 野生铁皮石斛濒临灭绝^[3]。目前铁皮石斛试管苗的繁殖一般要经过原球茎(proto-corm)阶段, 而类原球茎实质上是正在生长分化的体细胞胚胎, 具有植株同样的物质代谢和形态发育的潜能。由此, 提出用原球茎代替全植株成为药源的可能性。至今, 以直接获得药用石斛活性成分为目的的离体培养鲜见报道^[4]。本试

^{*} 收稿日期: 2006-02-15 修回日期: 2006-03-20
基金项目: 广西农业科学院科技发展基金(2004012)。
作者简介: 何铁光(1976-), 男, 汉族, 湖南桂阳人, 博士研究生, 主要从事植物生物化学领域的研究。

验研究从铁皮石斛组培原球茎中提取多糖的最佳工艺条件, 为工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和仪器

试验材料 悬浮培养于 1/2MS 液体培养基的铁皮石斛原球茎, 于 60℃烘干后, 经粉碎、干燥恒重处理后备用。

试剂 氯仿、苯酚、浓硫酸、正丁醇、乙醇、葡萄糖、冰醋酸、胃蛋白酶、考马斯亮蓝 G 250、牛血清蛋白均为分析纯。

仪器 UV-1700 型分光光度计(日本岛津)、索氏提取器、HH S 恒温水浴锅(江苏金坛市医疗器械厂)、ZFQ85A 旋转蒸发仪(上海医械专机厂)、SHZ 200 型双配套循环水式多用真空泵(河南省巩义市英峪予华机械仪器厂)、冷冻干燥机(东样技研(株)制造)。

1.2 试验方法

1.2.1 多糖工艺流程 原料→称重→热水浸提→过滤→滤液醇析→离心得多糖粗品→复溶→脱蛋白→醇析→粗多糖。

1.2.2 多糖提取条件确立 采用 $L_8(2^4)$ 正交设计, 试验重复 2 次, 各处理内容见表 1。

表 1 多糖提取因素与水平表

水平 Levels	因素 Factors			
	A 提取时间/h Extraction time	B 提取次数 Extraction frequency	C 温度/℃ Temperature	D 加水量/倍 Volume of water
1	2	1	80	10
2	4	3	100	20

1.2.3 醇析 取一定量多糖提取液分装于 5 支刻度离心管中, 并分别加入无水乙醇, 使乙醇的终浓度分别为 50%, 60%, 70%, 80% 和 90%, 4℃下静置过夜, 多糖沉淀用蒸馏水复溶, 测定多糖含量, 比较不同乙醇浓度对醇析效果的影响; 另取 5 支刻度离心管, 分别加入等量的多糖提取液, 并用乙醇使其终浓度达到 80%。醇析 16 h, 24 h, 32 h, 40 h, 48 h, 56 h 后, 离心, 取醇析多糖用水复溶, 比较醇析时间对醇析后多糖含量的影响。

1.2.4 多糖粗品纯化条件的确立 除去蛋白质采用 Seavage 方法^[5,6], 按 $L_4(2^3)$ 正交设计, 试验重复 2 次(表 2)。另外, 采用蛋白酶法^[7]与 Seavage 法交替数次脱蛋白。

表 2 多糖粗品纯化因素水平表
Table 2 Factor and level polysaccharide crude power purifications

水平 Levels	因素 Factors		
	A 样品/氯仿+正丁醇 (v/v) Sample/ chloroform n butanol	B 氯仿/正丁醇 (v/v) Chloroform /n butanol	C 振荡时间 /min Vibration time
1	1 : 0.24	1 : 0.2	5
2	1 : 0.35	1 : 0.4	20

1.2.5 多糖含量测定 采用苯酚 硫酸法^[8], 以葡萄糖为标准品。

1.2.6 蛋白质含量测定 采用考马斯亮兰染色法^[9], 以牛血清蛋白为标准品。

1.2.7 数据处理 所有统计分析均采用 SAS 6.0 软件和 Excel 软件处理, 在 PC 机上完成。

2 结果与讨论

2.1 铁皮石斛类原球茎多糖提取条件的确立

多糖是一类由单糖分子经脱水以苷键缩合而成的天然高分子化合物, 一般为非晶形固体。根据相似相溶原理, 它能溶于水、酸、碱、盐溶液而不溶于醇、醚、丙酮等有机溶剂。因此, 石斛用热水浸提, 浸提液以乙醇沉淀即可获取多糖粗制品。本试验选用水煎煮工艺, 选择提取时的时间、提取次数、温度、加水量 4 个因素进行正交试验, 结果见表 3 和表 4。

表 3 多糖提取正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal design of extracting polysaccharide					
试验号 Test number	A	B	C	D	石斛多糖含量/% Poly saccharide content
1	1	1	1	1	7.243
2	1	1	2	2	11.490
3	1	2	1	2	15.653
4	1	2	2	1	9.991
5	2	1	1	2	10.506
6	2	1	2	1	7.687
7	2	2	1	1	14.012
8	2	2	2	2	10.596
K ₁	44.377	36.926	47.414	38.933	
K ₂	42.801	50.252	39.764	48.245	
R	1.576	13.326	7.650	9.312	

表 4 正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment					
变异来源 Source of variation	df	SS	MS	F 值	显著性(P) Significance
A	1	0.729	0.729	0.24	> 0.05
B	1	45.286	45.286	14.62	< 0.01
C	1	14.130	14.130	4.56	> 0.05
D	1	21.073	21.073	6.80	< 0.05
误差 Error	11	34.0661	3.097		

注 Note: $F_{0.05}=4.84$, $F_{0.01}=9.65$ 。

从表 3、4 可知,铁皮石斛原球茎多糖提取含量的高低与提取次数(B)有关, F 检测极显著($F_B=14.62^{**}$),和溶剂用量(D)有关, F 检测显著($F_D=6.80^*$),而提取时间、温度影响不显著,故各因子对提取效果的影响大小顺序是:提取次数>溶剂用量>提取温度>提取时间,各因素的最佳水平为 $A_1B_2C_1D_2$ 。

2.2 醇析对多糖含量的影响

试验中设置的各种醇析浓度,都可以使水提液产生絮状沉淀物,在乙醇终浓度 80%为时,多糖含量最高,浓度更高时析出的多糖会有所下降(图 1)。醇析的时间也不是越长效果越好,如图 2,以 80%乙醇醇析为例,大约在 32 h 的时候,多糖的醇析达到最大值,一段时间后又有部分多糖溶解了。由于醇析是在密闭状态下进行的,排除了乙醇的蒸发使乙醇浓度下降而导致多糖复溶的可能。这可能与多糖的性质有关,多糖是一种多元醇,呈弱酸性,乙醇的加入使溶液中的酸度增加。当酸性物质处于低 pH 时,可以转溶于有机溶剂^[10],多糖在水中的非离解状态向离解状态转化,从而有部分多糖溶于乙醇中,只是多糖在乙醇与水形成平衡的过程中由非离解状态向离解状态转化较慢。

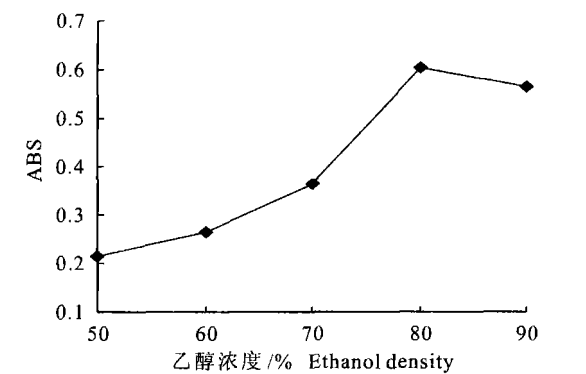


图 1 乙醇浓度对醇析效果的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration on polysaccharide obtain ratio separated from water extraction

2.3 多糖粗品的纯化

石斛多糖粗品中含有蛋白质,为进一步纯化多糖粗品需经脱蛋白处理。常用 Seville 法即将多糖粗品的水溶液与氯仿和正丁醇混合,使蛋白质变性成为不溶性聚集在氯仿和水的界面上,经离心后可将蛋白质去除。为了使石斛多糖粗品在脱蛋白时减少多糖的损失,必须采用合适的样品与氯仿 正丁醇体积比和氯仿与正丁醇配比。根

据多糖性质和蛋白质变性原理,当多糖粗品水溶液中加入过量的氯仿和正丁醇溶液后在蛋白质逐步变性聚集过程中,也会使多糖在高浓度有机溶剂中沉淀析出而混入蛋白质凝集物中一起被离心去除,从而导致多糖粗品经 Seville 法脱蛋白后多糖含量显著下降。当多糖粗品水溶液中加入有机溶剂量过少时,不足以使蛋白质变性而聚集,降低了脱蛋白纯化效果。本试验中影响蛋白质去除的最大因素是反应时间,相同样品的处理时间越短,蛋白质含量越低(表 5),此与刘玲^[11]研究蛹虫草多糖脱蛋白所采用的时间一致,这可能是由于蛋白的可逆变性的恢复而重新溶解所造成的。不同氯仿与正丁醇体积比的影响次之,不同样品与氯仿 正丁醇体积比的影响最小。从多糖含量和蛋白去除效果来看,试验 4 号($A_2B_2C_1$)的条件较为理想。

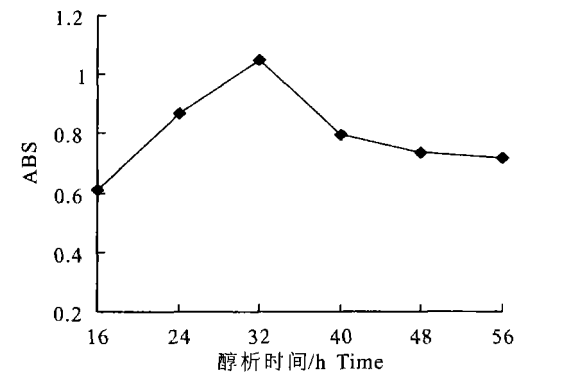


图 2 醇析时间对醇析效果的影响

Fig. 2 Effects of time on polysaccharide obtain ratio separated from water extraction with ethanol

Seville 法脱蛋白在避免降解上有较好的效果,但要除尽游离蛋白质需反复多次进行处理;另外,以 Seville 法与蛋白酶法交替进行脱蛋白,效果很明显(图 3)。图 3 表明,交替使用 Seville 法与酶蛋白法脱蛋白,有较高的分离效率,因而,该法有利于在操作中降低多糖损失,减少脱蛋白操作次数,减轻纯化程序的操作负担。

表 5 Seville 法去蛋白的正交试验结果

Table 5 Results of orthogonal design of removing protein by Seville method

试验号 Test number	A	B	C	多糖含量 /% Polysaccharide content	蛋白质含量 /% Protein content
1	1	1	1	60.27	4.377
2	1	2	2	63.84	4.825
3	2	1	2	65.1	5.028
4	2	2	1	75.81	3.226
K_1	9.202	9.405	7.603		
K_2	8.254	8.051	9.853		
R	0.948	1.354	2.25		

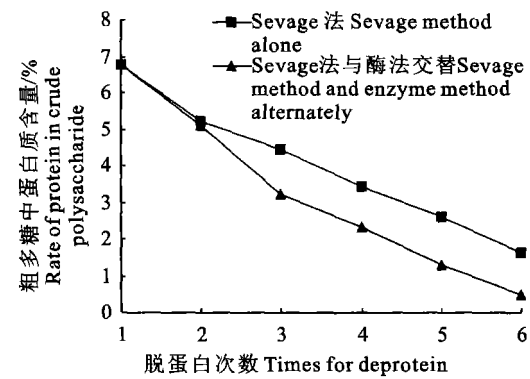


图 3 两种脱蛋白法的效果与对照

Fig. 3 Comparision between two deprotein methods

3 小结

3.1 铁皮石斛原球茎多糖提取的最佳条件是在 80℃热水中浸提 2 h, 加水量 20 倍, 提取 3 次, 醇析时乙醇的浓度为 80%, 粗多糖脱蛋白时, 样品/氯仿+正丁醇(v/v)为 1:0.35, 氯仿/正丁醇(v/v)为 1:0.4, 反应时间以 5 min 最佳。

3.2 通过正交试验对铁皮石斛原球茎多糖的提取和蛋白质的去除条件进行优化选择, 可以使分离多糖产品的生产达到多糖含量高、生产效率高、资源利用高的多糖产品。经醇析得到的多糖产品可直接应用于饮料、食品中, 用 Sevage 法进一步纯化后可用于医药、保健品中。

3.3 用细胞培养技术对铁皮石斛原球茎多糖的生产进行生理生化调控已取得初步的成果, 悬浮培养的原球茎多糖含量可达 20.1%, 与野生铁皮石斛多糖接近。相关研究内容, 有待详细报道。

参考文献:

[1] 罗慧玲, 蔡体育, 陈巧伦, 等. 石斛多糖增强脐带血和肿瘤病人外周血 LAK 细胞体外杀伤作用的研究[J]. 癌症, 2000, 19(12): 1124 ~ 1126.

[2] Fu K C, Lian S C, Feng D Q, *et al.* Application and exploit of *Dendrobium candidum*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 1999, (9): 708 ~ 711.

[3] 徐 红, 李晓波, 王峰涛, 等. 海南、广东省石斛属植物资源与种质保护研究[J]. 中国野生植物资源, 1999, 5: 24 ~ 26.

[4] 刘 咏, 罗建平. 中国药用石斛离体培养的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(4): 295 ~ 297.

[5] Staub A. M. Removal protein from polysaccharides [J]. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1975 5: 5.

[6] 张维杰. 复合糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科技出版社, 1987. 211.

[7] 张翼伸. 多糖结构测定[J]. 生物化学与生物物理进展, 1983, 4: 18 ~ 23.

[8] 李满飞, 徐国钧, 平田义, 等. 中药石斛类多糖的含量测定[J]. 中草药, 1990, 21(10): 10 ~ 12.

[9] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 8: 42.

[10] 苏拨贤. 生物化学制备技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 23 ~ 50.

[11] 刘 玲, 安家彦, 金凤婵. 蛹虫草多糖除杂蛋白的方法[J]. 大连轻工业学院学报, 2002, 21(1): 33 ~ 37.