

影响酶解去除薏苡仁淀粉过程的关键参数考察

孙文杰¹, 陈彦^{1,2*}, 瞿鼎², 孔悦¹, 刘聪燕², 周静², 袁成甜²

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 南京 210028)

[摘要] **目的:**考察影响高温 α -淀粉酶酶解去除薏苡仁中淀粉的关键参数,为薏苡仁总多糖的应用提供参考。**方法:**以还原糖含量及碘液检试样品颜色变化作为定量及定性指标,在单因素试验基础上,通过正交试验考察酶解温度、酶用量、酶解时间、酶解 pH 对薏苡仁中淀粉酶解程度的影响。**结果:**最佳酶解参数为酶用量 $600\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,酶解温度 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$,酶解 pH 6.0,酶解时间 120 min;薏苡仁总多糖水提液中还原糖质量分数约 25%,且碘试液检测不变色,薏苡仁总多糖纯度达 76.63%,较未去除淀粉的薏苡仁总多糖纯度 54.41% 显著提高。**结论:**高温 α -淀粉酶可简单、快速的去除薏苡仁中淀粉,有利于高纯度薏苡仁总多糖的获得。

[关键词] 薏苡仁; 淀粉; 高温 α -淀粉酶; 还原糖; 酶解工艺; 总多糖
[中图分类号] R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0016-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050016
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150112.1442.001.html>
[网络出版时间] 2015-01-12 14:42

Investigation of Key Parameters in Process of Removal of Starch in Coicis Semen by Enzymatic Hydrolysis
SUN Wen-jie¹, CHEN Yan^{1,2*}, QU Ding², KONG Yue¹, LIU Cong-yan², ZHOU Jing², YUAN Cheng-tian²
(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Key Research Laboratory of Delivery System of Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To provide a reference for application of total polysaccharides in Coicis Semen by investigating effect of key parameters on high temperature α -amylase enzymolysis for starch in Coicis Semen. **Method:** Take the content of reducing sugar as a quantitative indicator and color change after iodine solution testing as a qualitative indicator, based on single factor tests, orthogonal test was adopted to investigate effects of the amount of enzyme, hydrolysis temperature, hydrolysis pH and reaction time on amylohydrolysis. **Result:** Optimal parameters were as follows: the amount of enzyme $600\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, enzymolysis temperature $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, enzymatic pH of 6.0, enzymolysis time of 120 min. The content of reducing sugar in extract of total polysaccharides in Coicis Semen was about 25%, meanwhile, color of samples did not alter after iodine solution testing. Purity of total polysaccharides in Coicis Semen was 76.63%, which showed a great improvement by comparing with 54.41% of samples without removing starch. **Conclusion:** High-temperature α -amylase can remove starch from Coicis Semen readily and rapidly, it is conducive to extraction of total polysaccharides.
[Key words] Coicis Semen; starch; high-temperature α -amylase; reducing sugar; enzymolysis process; total polysaccharides

[收稿日期] 20140625(009)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373979);江苏省中医领军人才项目(LJ200913);江苏省自然科学基金项目(BK20141058)
[第一作者] 孙文杰,在读硕士,从事中药制剂研究,Tel:18252066593,E-mail:sunwenjie198818@163.com
[通讯作者] * 陈彦,研究员,博士,从事中药制剂研究,Tel:025-85608672,E-mail:ychen202@hotmail.com

薏苡仁具有除痹止泻、清热排毒、抗肿瘤、免疫调节、降血糖及抑制胰蛋白酶等作用^[1-3],主要含有多糖、甘油三脂、内酯及三萜类等有效成分^[4-5],其中多糖类成分因具有免疫兴奋、降低血糖、清除自由基等^[6-7]生物活性而被广泛研究。目前,薏苡仁总多糖的提取纯化研究常采用水提醇沉法^[8-10],但由于薏苡仁中含有大量淀粉,总多糖水提液浓缩后淀粉易糊化,使黏度较高^[11],在醇沉过程中易聚集成团而包裹大量杂质,影响了薏苡仁总多糖的提取,故在提取过程中有效去除淀粉是获得高纯度总多糖的关键。去除淀粉可采用酶解法^[12],淀粉经淀粉酶酶解成还原糖,如葡萄糖、麦芽糖及低聚糖等^[13-14],随淀粉不断酶解,还原糖含量增高,因此可通过测定还原糖的含量来判断淀粉酶解程度^[15]。关于采用酶解法去除薏苡仁中淀粉的报道较少,已有报道如肖小年等^[12]仅局限于通过碘液检试法观察颜色变化来鉴定淀粉的存在,未对影响酶解过程的主要参数进行考察。本实验拟建立定性和定量法系统考察不同参数对高温 α -淀粉酶酶解去除薏苡仁淀粉的影响,通过单因素试验和正交试验优选酶解参数,为获取高纯度的薏苡仁活性总多糖提供参考。

1 材料

UV-1800 型紫外-可见分光光度计(上海奥析科学仪器有限公司),FA2104 型 1/1 万电子天平(上海良平仪器仪表有限公司),PB-10 型 pH 计(赛多利斯 sartorius 公司)。薏苡仁药材产地河北,购自亳州市沪谯药业有限公司,生产批号 20131016,经江苏省中医药研究院钱士辉教授鉴定为禾本科植物 *Coix lacryma-jobi* var. *ma-yuen* 的干燥成熟种仁;高温 α -淀粉酶(上海如吉生物科技发展有限公司),葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,含量以 100% 计,批号 110833-201205),试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 薏苡仁总多糖水提液的制备 在前期研究基础上,称取薏苡仁药材粉末(过 40 目筛) 5 kg,加 12 倍量水回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,滤过,减压浓缩至 5 L,得 1.0 g·mL⁻¹ 薏苡仁总多糖水提液,备用。

2.2 还原糖的含量测定

2.2.1 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂的配制 称取酒石酸钾钠 18.2 g 溶于 50 mL 水中,于 50 ℃ 加热,趁热加入 DNS 0.63 g,加入配制好的 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 26.2 mL,加入苯酚和无水亚硫酸钠各 0.5 g,加水溶解并定容至刻度,即得。该试剂避

光保存 7 ~ 10 d。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 10.0 mg 至 10 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,即得。

2.2.3 显色方法 精密量取葡萄糖对照品溶液 1 mL 至具塞试管中,滴加 DNS 试剂 2 mL,摇匀,沸水浴加热 10 min,冷却后加水 10.0 mL,混匀,以水为空白,于 540 nm 处测定吸光度(A)。

2.2.4 标准曲线的制备 精密量取葡萄糖对照品溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 mL,加水定容至 1 mL,按 2.2.3 项下方法显色,以质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.148\ 3X - 0.043$ ($r = 0.999\ 5$)。

2.2.5 样品测定 精密量取薏苡仁总多糖水提液适量,加水稀释适宜倍数,精密吸取 1.0 mL 按 2.2.3 项下方法显色,于 540 nm 处测定 A,计算还原糖质量分数 0.3%,说明去除淀粉前薏苡仁总多糖水提液中仅含有少量还原糖。

2.3 单因素试验考察 取一定量 1.0 g·mL⁻¹ 薏苡仁总多糖水提液,加入适量高温 α -淀粉酶,按一定条件进行酶解反应,反应结束后,沸水浴 10 min 钝化淀粉酶终止反应,得已去除淀粉的薏苡仁总多糖水提液。

2.3.1 酶解温度 取 1.0 g·mL⁻¹ 薏苡仁总多糖水提液 250 mL,均分为 5 份,调节 pH 6.0,高温 α -淀粉酶用量 800 U·g⁻¹,分别于 65,70,75,80,85 ℃ 酶解 180 min,按 2.2 项下方法测得还原糖质量分数依次为 13.9%,17.4%,25.8%,23.3%,20.9%。采用碘液检试样品,观察颜色变化,结果发现酶解温度 75 ℃ 时样品碘检不变色,当温度 > 75 ℃ 时,随温度的升高,还原糖含量呈下降趋势。

2.3.2 酶解 pH 取 1.0 g·mL⁻¹ 薏苡仁总多糖水提液 300 mL,均分为 6 份,固定温度 75 ℃,酶解时间 180 min,高温 α -淀粉酶用量 800 U·g⁻¹,pH 分别为 4.5,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,按 2.2 项下方法测得还原糖质量分数依次为 10.11%,15.08%,21.90%,26.09%,24.11%,18.72%。结果显示当 pH 6.0 时碘液检试样品,观察发现不变色。

2.3.3 酶用量 取 1.0 g·mL⁻¹ 薏苡仁总多糖水提液 500 mL,均分为 10 份,固定温度 75 ℃,pH 6.0,酶解时间 180 min,高温 α -淀粉酶用量分别为 30,150,300,450,600,750,900,1 200,1 350,1 500 U·g⁻¹,按 2.2 项下方法测得还原糖质量分数依次为 4.4%,9.29%,12.51%,18.33%,24.87%,

24.77% , 24.32% , 24.24% , 24.91% , 24.11% 。通过碘液检试样品,观察颜色变化,结果显示在相同条件下,当酶用量 $<600\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,样品显蓝紫色,随酶用量的增加颜色变浅,当酶用量 $\geq 600\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,样品均不变色,表明淀粉酶解完全。

2.3.4 酶解时间 取 $1.0\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 薏苡仁总多糖水提液 300 mL ,均分为 6 份,固定温度 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH }6.0$,高温 α -淀粉酶用量 $800\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,酶解时间分别为 60, 90,120,150,180,210 min,按 2.2 项下方法测得还原糖质量分数依次为 13.61% ,17.82% ,24.57% ,24.37% ,24.29% ,24.45% 。通过碘液检试样品,观察颜色变化,结果显示当酶解时间 $\geq 120\text{ min}$ 时,样品不变色,表明高温 α -淀粉酶酶解薏苡仁淀粉酶解时间至少 120 min 才可充分酶解。

2.4 正交试验 在单因素试验基础上,选择酶解温度、酶用量、酶解时间及酶解 pH 为考察因素,以还原糖含量为评价指标,取 $1.0\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 薏苡仁总多糖水提液 450 mL ,均分为 9 份,选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,影响薏苡仁淀粉酶解各因素的主次顺序为 $C>D>B>A$ 。以极差最小的 A 因素为误差项进行方差分析,结果发现 B 因素具有显著性影响,因素 C,D 则均影响极显著,确定薏苡仁中淀粉酶解的最优方案 $A_2B_2C_2D_2$,即酶解温度 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$,酶解 pH 6.0,酶用量 $600\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,酶解时间 120 min。

表 1 薏苡仁中淀粉酶解工艺正交试验分析
Table 1 Orthogonal test analysis of hydrolysis process for starch from Coicis Semen

No.	A 酶解温度 / $^{\circ}\text{C}$	B 酶解 pH	C 酶用量 / $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	D 酶解时间 /min	还原糖 /%
1	70	5.0	500	90	9.32
2	70	6.0	600	120	24.49
3	70	7.0	700	150	14.56
4	75	5.0	600	150	20.12
5	75	6.0	700	90	10.40
6	75	7.0	500	120	19.32
7	80	5.0	700	120	13.13
8	80	6.0	500	150	18.68
9	80	7.0	600	90	17.21

2.5 验证试验 取薏苡仁药材粉末(过 40 目筛) 300 g ,按 2.1 项下方法提取,滤液浓缩至 300 mL ,均分为 3 份,按最佳工艺条件进行酶解,沸水浴灭酶,测得还原糖质量分数分别为 25.03% ,25.47% ,

表 2 酶解工艺还原糖含量方差分析
Table 2 Variance analysis of amylohydrolysis process

方差来源	SS	MS	F	P
A(误差)	0.36	0.18	1.00	
B	22.19	11.10	61.31	<0.05
C	95.40	47.70	263.52	<0.01
D	75.91	37.96	209.69	<0.01

注: $F_{0.05}(2,2)=19$, $F_{0.01}(2,2)=99$ 。

24.84% ,表明该工艺稳定性、重复性良好。

2.6 淀粉的去除对薏苡仁总多糖纯度影响 取 $1.0\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 薏苡仁总多糖水提液 600 mL ,均分为 2 组(每组 3 份),其中 1 组按最佳酶解条件做去除淀粉处理,另外 1 组不做酶解处理,各加入适量 95% 乙醇醇沉,使药液含醇量达 80% ,静置 12 h,滤过,沉淀用水溶解并定容,逐次加入 0.2 倍量 Sevag 试剂[正丁醇-三氯甲烷(1:5)]去蛋白质,利用苯酚硫酸法及 DNS 法分别测定总糖及还原糖含量,计算总多糖量(总多糖量 = 总糖量 - 还原糖量),结果薏苡仁总多糖纯度分别为 76.63% ,54.41% 。

3 讨论

采用高温 α -淀粉酶酶解以去除薏苡仁中淀粉,结果表明酶活性和淀粉酶解效率与酶解温度、酶用量、酶解时间、酶解 pH 密切相关。原因可能是酶对热敏感且不稳定,温度过低或过高都会影响酶的活性,进而影响淀粉的酶解;pH 影响酶分子结构的稳定性,pH 过高或过低均会改变酶的活性中心构像,甚至改变整个酶分子的结构使其变性失活,不利于淀粉的酶解^[13,15];当酶用量与底物量达平衡时,酶解反应才能充分进行,酶用量过少或过多酶解反应都会受到制约。此外,淀粉的酶解需要一定时间的保证,这是因为 α -淀粉酶作用于淀粉使其液化的过程分为 2 个阶段,即 α -淀粉酶作用于直链淀粉和支链淀粉,分别将其酶解为寡糖和麦芽糖、糊精,黏度很快下降,随后寡糖和糊精被酶解成葡萄糖和麦芽糖,进而使淀粉液化^[16-17]。薏苡仁总多糖水提液中淀粉酶解后生成约 25% 的还原性糖,经醇沉去蛋白质后总多糖中还原性糖质量分数仅 6.2% ,即醇沉过程中约 75.2% 的还原性糖因溶解在上清液中而被除去,较少会被包裹在多糖中。

目前,相关酶解淀粉的报道^[18] 通常是为了从淀粉中获取还原性糖,而本文以还原性糖含量为指标来研究不同参数下薏苡仁淀粉水解程度,建立的方法相对于已有的碘液定性鉴定的方法更准确、系统。采用高温 α -淀粉酶去除薏苡仁总多糖水提液中淀

粉,不仅使药液易于醇沉,且薏苡仁总多糖的纯度大幅提高,为获取高纯度薏苡仁总多糖提供绿色安全、稳定可行的途径。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:354.

[2] 陶小军,雷雪霏,李云兴,等. 薏苡仁油的镇痛止血作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):161-163.

[3] 吴岩,原永芳. 薏苡仁的化学成分和药理活性研究进展[J]. 华西药学杂志,2010,25(1):111-113.

[4] 顾关云. 薏苡仁的药理作用[J]. 中成药,1990,12(12):38-39.

[5] 杜萌,丁安伟,陈彦. 薏苡仁化学成分及其防治肿瘤作用机制研究[J]. 吉林中医药,2012,32(2):195-198,201.

[6] 吕峰,林勇毅,陈代园. 薏苡仁活性多糖对小鼠的免疫调节作用[J]. 中国食品学报,2013,13(6):20-25.

[7] 张明发,沈雅琴. 薏苡仁的降糖降脂研究进展[J]. 中国执业药师,2011,8(3):12-15.

[8] 李平,李江,陈永森. 薏苡仁多糖提取及纯化工艺的研究[J]. 中国民族民间医药杂志,2011,20(6):24-25,27.

[9] 王文平,陈燕,吴国卿,等. 薏苡仁粗多糖提取工艺的优化[J]. 贵州农业科学,2010,38(2):171-172.

[10] 李厚聪,刘圆,袁玮. 薏苡多糖的提取、分离与纯化工艺研究[J]. 西南民族学院学报:自然科学版,2009,35(2):278-282.

[11] 傅新征,吕峰,罗竹琳. 薏苡仁淀粉的理化性质[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2012,41(5):542-547.

[12] 肖小年,曾海龙,易醒,等. 薏苡仁多糖的提取及分离纯化[J]. 食品科学,2010,31(22):1-5.

[13] 于轩,李才明,顾正彪,等. 淀粉分子结构与 α -淀粉酶酶解性能的相关性[J]. 食品与发酵工业,2013,39(6):1-6.

[14] 黄群,肖文军,孙术国,等. α -淀粉酶和糖化酶协同酶解葛根淀粉动力学研究[J]. 食品科学,2012,33(21):187-191.

[15] Leemhuis H, Dijkhuizen L, Uitdehaag J C, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family[J]. J Biotechnol,2002,94(2):137-155.

[16] 易弋,蒋常德,伍时华. 木薯酒精浓醪发酵糖化条件的研究[J]. 广西工学院学报,2008,19(1):58-62.

[17] Ceska M, Birath K, Brown B. A new and rapid method for the clinical determination of alpha-amylase activities in human serum and urine optimal conditions[J]. Clin Chim Acta,1969,26(3):437-481.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》入选“2015—2016 RCCSE 中国核心学术期刊”

由武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)、武汉大学图书馆、中国科教评价网(www.nseac.com)共同研制的第4版《RCCSE 中国学术期刊评价研究报告——权威、核心学术期刊排行榜(2015—2016)》已于2015年1月13日公布,《中国实验方剂学杂志》被评定为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”,在参评的112本中医学与中药学类期刊中综合排名第15名。

本次学术期刊评价在重点突出期刊学术影响力的同时,也注重了对期刊网络传播效率和期刊即时反应速率的考察,主要评价指标有:总被引频次、2年影响因子、即年指标、基金论文比、Web即年下载率、二次文献转载量(或国外重要数据库收录情况)和专家定性评价。参评期刊共6201种,排名前5%的“RCCSE 中国权威学术期刊”(A⁺)316种,排名前5%~20%的“RCCSE 中国核心学术期刊”(A)和排名前20%~30%的“RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版)”(A⁻)共1572种,准核心的学术期刊1848种(B⁺),一般期刊1828(B)种,较差期刊637种(C)。

“RCCSE 中国核心学术期刊”是继“中文核心期刊(北大)”和“中国科技核心期刊”之后国内推出的又一核心期刊评价体系。