

杨瑞丽, 莫琬滢, 徐志强, 等. 超声辅助酶解法提取废弃烟草活性多糖的条件优化及其结构特征分析[J]. 中国烟草学报, 2025, 31(4): 110-116. YANG Ruili, MO Wanying, XU Zhiqiang, et al. Optimization of extraction conditions and structural characterization of active polysaccharides from waste tobacco by ultrasonic-assisted enzymatic method[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2025,31(4):110-116. doi:10.16472/j.chinatobacco. 2023.T0120

超声辅助酶解法提取废弃烟草活性多糖的条件优化及其结构特征分析

杨瑞丽^{1,2}, 莫琬滢^{1,2}, 徐志强¹, 徐毅^{1,2}, 贺增洋^{*1,3}

1 烟草化学安徽省重点实验室, 安徽合肥天达路9号 230000;

2 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥屯溪路193号 230009;

3 安徽中烟工业有限责任公司技术中心, 合肥市高新区永和路399号 230601

摘要:【目的】拟优化烟草多糖的提取方法并明确其结构特征。【方法】以田间弃烤烟叶为原料, 采用超声辅助酶解法提取粗多糖, 采用葡聚糖层析手段进行分离纯化, 分析提取条件对提取率的影响及纯化多糖的结构特征。【结果】(1) 当使用料液比(质量体积比) 1:60、超声时间 20 min、超声功率 200 W、温度 45℃时, 烟草粗多糖的提取率可达 3.15%; 当使用酶浓度 1.5%、酶解时间 80 min、温度 55℃、pH 5.5 时, 烟草粗多糖的提取率可达 4.75%。(2) 对辅助酶解法的工艺顺序优化后, 先酶解后超声的提取方法效果最好, 粗多糖的提取率可达 6.42%。(3) 经过 DEAE-52 纤维素柱层析后, 多糖纯度较高, 且具有 β -型异头碳的结构, 主要由 1,4 连接的葡萄糖苷和 1,4 连接的甘露糖苷键组成。【结论】先酶解后超声的方法对烟草活性多糖的提取比较有利, 所获得的新活性多糖具有 β -型异头碳的结构特征。

关键词: 烟草多糖; 超声辅助酶解法; 正交分析; 结构鉴定; 红外光谱; 紫外光谱

废弃烟叶的再利用对于充分挖掘烟草的经济潜能、提升综合应用价值至关重要。废弃烟叶中含有一些重要的生物活性物质, 如活性多糖、黄酮、绿原酸和香紫苏醇等^[1]。活性多糖是从生物体内提取出的一类具有生理活性的多糖类物质, 其中植物多糖通常具有较强的生物学活性, 且相对无毒, 因此成为天然植物成分提取与功能研究的重要靶向物质^[2-3]。作为一类重要的天然活性物质, 除抗氧化活性外, 许多植物多糖还具有抗炎、抗肿瘤和免疫调节功能^[4-5]。在各种健康调节效应中, 植物多糖与肠道菌群的互作受到人们的普遍关注^[6-11]。

相较而言, 有关烟草活性多糖的研究不多目前常见的提取植物多糖的方法包括超声辅助提取、碱溶剂提取、酶辅助提取和超声辅助酶解提取等。与传统的

热水萃取相比, 上述方法具有相对较高的提取率。如许春平等^[12]采用超声辅助提取法优化低次烟叶多糖的提取工艺, 确定了最佳提取条件为超声波功率 600 W、料液比(质量体积比) 1:2, 于 60℃提取 4 min, 多糖得率可达 2.56%。超声辅助酶解提取法具有快速、高效、溶剂少和提取率高等特点。据此, 本研究对超声辅助酶解法提取烟草多糖的各个工艺条件分别进行了单因素和正交实验优化, 旨在为挖掘烟草多糖的应用潜力提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

废弃烟叶(来自皖南地区田间弃烤烟叶, 类型为烤烟, 品种为云烟 97, 由安徽中烟工业有限责任公司

基金项目: 中国烟草总公司重点研发项目“皖南废弃烟叶提取‘焦甜香’致香成分关键技术及工业化应用研究”(110202102024)

作者简介: 杨瑞丽(2000—), 在读硕士研究生, 从事食品营养研究, Tel: 19856931226, Email: young02202@outlook.com

通讯作者: 贺增洋(1991—), Tel: 13637072505, Email: hezy2020@163.com

收稿日期: 2023-06-28; 网络出版日期: 2025-06-09

提供)。

木瓜蛋白酶(800 u/mg, 上海源叶生物科技有限公司); 葡聚糖标准品(DX T21K、DX T36K、DX T63K、DX T275K 和 DX T345K, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 葡萄糖、氯化钠、浓硫酸、苯酚、石油醚、无水乙醇、三氯甲烷、正丁醇(AR, 国药集团化学试剂有限公司); 超纯水(电阻率 18.2 M Ω ·cm, 德国 Merck 公司)

DHG-9202-2A 电热恒温干燥箱(上海三发科学仪器有限公司); HH-S8HH-S8 数显恒温水浴锅(金坛市金城国胜实验仪器厂); BSA224S 分析天平(感量 0.0001 g, 德国 Sartorius 公司); 752S 紫外可见分光光度计(上海棱光技术仪器有限公司); HC-3018 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); RE-2000B 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Nicolet 傅里叶红外光谱仪(美国 Thermo 公司); E2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); KQ-100DE 数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司); DEAE-52 纤维素柱(2.6 cm \times 25 cm, 北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 烟草粗多糖的提取

1.2.1.1 烟草粉末预处理

将废次烟叶烘干、磨粉并过孔径为 0.18 mm (80 目) 筛, 按烟草粉末(g) 与石油醚(mL) 质量体积比为 1:5 加入石油醚, 浸泡 12 h; 重复 2 次, 除去石油醚, 烘干后得到脱脂烟草粉末。

1.2.1.2 超声法提取烟草粗多糖

准确称取 1 g 烟草粉末置于烧杯中, 按一定的料液比, 加入一定体积的超纯水, 在一定的温度和功率下超声提取一定时间。超声提取结束后于 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 4 倍体积的无水乙醇在 4 $^{\circ}$ C 下醇沉 48 h。所得沉淀于 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀。所得沉淀于超纯水中复溶后用 Seavage 试剂振荡萃取 20 min 后, 静置分离, 除去蛋白沉淀。分离所得水相再次用 4 倍体积的无水乙醇在 4 $^{\circ}$ C 下醇沉 48 h。所得沉淀于超纯水中复溶后用蒸馏水透析 24 h (透析袋分子截留量为 8000~14000 Da), 即得烟草粗多糖溶液。

1.2.1.3 酶解法提取烟草粗多糖

准确称取 1 g (精确至 0.001 g) 烟草粉末, 加入一定体积、一定 pH 值的超纯水和 1 mL 一定浓度的木瓜蛋白酶液, 于一定温度下酶解提取一定的时间。本研究采用木瓜蛋白酶进行酶解, 主要是基于该酶在

植物多糖提取中效果较好且应用比较普遍^[13]。酶解提取结束后沸水浴灭酶 1 min, 迅速降至常温后于 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 4 倍体积的无水乙醇在 4 $^{\circ}$ C 下醇沉 48 h。后续提取步骤与超声法相同。

1.2.2 烟草粗多糖提取率的计算

葡萄糖标准曲线的绘制采用本领域常规的苯酚-硫酸法^[12]来完成。

1.2.3 单因素实验和正交实验

超声处理的单因素实验:

(1) 料液比。料液比(质量体积比) 设置为 1:30、1:40、1:50、1:60 和 1:70 (g/mL), 其他条件设置为 50 $^{\circ}$ C、超声功率 200 W 下提取 20 min;

(2) 超声时间。料液比为 1:30, 于 50 $^{\circ}$ C、超声功率 200 W 下分别提取 5、10、15、20 和 25 min;

(3) 超声功率。料液比为 1:30, 分别于超声功率 150、175、200、225 和 250 W, 50 $^{\circ}$ C 下提取 20 min;

(4) 超声温度。料液比为 1:30, 分别于 40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C 和 60 $^{\circ}$ C、超声功率 200 W 下提取 20 min。

根据上述 4 组单因素试验, 各取 3 组最优水平进行 L₉(3⁴) 正交试验确定最优超声提取条件。

酶解提取过程的单因素实验:

(1) 酶浓度。按照木瓜蛋白酶浓度 0.1%、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% (质量体积比) 添加木瓜蛋白酶液 1 mL, 于 45 $^{\circ}$ C 下酶解提取 60 min。

(2) 酶解时间。浓度为 1.0% 木瓜蛋白酶液于 45 $^{\circ}$ C 下分别酶解提取 20、40、60、80 和 100 min。

(3) 酶解温度。使用 1.0% 木瓜蛋白酶液分别于 25 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C 和 65 $^{\circ}$ C 下酶解提取 60 min。

(4) 酶解 pH。设置酶解 pH 条件为 5.0、5.5、6.0、6.5 和 7.0, 使用浓度为 1.0% 的木瓜蛋白酶液于 45 $^{\circ}$ C 下酶解提取 60 min。

根据上述 4 组单因素试验, 各取 3 组最优水平进行 L₉(3⁴) 正交试验确定最优酶解提取条件。

随后设置单独超声组、单独酶解组、先超声后酶解组、先酶解后超声组研究超声辅助酶解工序对酶提取率的影响。

1.2.4 烟草粗多糖的分离纯化

将多次提取得到的烟草粗多糖溶液进行合并, 经过旋转蒸发、真空冷冻干燥得到烟草粗多糖。准确称取 0.2 g 烟草粗多糖, 复溶于 10 mL 超纯水中。经过

预处理后在 DEAE-52 纤维柱中上样, 依次用 0、0.1、0.2 和 0.3 mol/L 氯化钠水溶液进行梯度洗脱, 每 30 支试管对应 1 个氯化钠水溶液浓度。利用苯酚-硫酸法于 490 nm 测定, 记录吸光度值并据此绘制洗脱曲线。合并单一峰所对应的洗脱液, 经过旋转蒸发后用超纯水透析 24 h, 经真空冷冻干燥后得到纯化多糖。

1.2.5 纯化多糖的结构分析

(1) 紫外光谱分析。用前述所得纯化烟草多糖, 配制 1 mg/mL 纯化烟草多糖溶液, 利用紫外可见分光光度计于 185~400 nm 范围进行紫外扫描。

(2) 红外光谱分析。取大约 1 mg 的多糖样品, 按照大约 1:100 的比例加入干燥的 KBr 粉末, 充分混合并研磨均匀, 进行压片后置于红外光谱仪内, 在 600~4 000 cm^{-1} 范围内进行扫描分析。

(3) 分子排阻层析的分子量分析。用色谱柱选择 Ultrahydrogel 2000 和 Ultrahydrogel 500 串联分析, 检测器选用示差折光检测器。通过系列已知分子量的葡聚糖配制样液、上样分析后预先绘制葡聚糖标准曲线。配制 1 mg/mL 纯化烟草多糖溶液, 12000 r/min 离心 15 min 后取上清过 0.22 μm 的微孔过滤膜制得待测样液。上柱后, 根据标准曲线公式计算即得纯化烟草多糖的分子量。

(4) 甲基化分析。取 50 mg 纯化多糖样品, 在二甲基亚砜中充分溶解后, 与无水碘甲烷混合进行反应, 冷冻干燥。将甲基化后的多糖样品用三氟乙酸水解成单糖或寡糖。将水解产物与乙酸酐和吡啶在密封条件下反应 1 h, 乙酰化产物萃取后进行 GC-MS 分析, 比对后获得多糖的糖苷键种类和比例。

1.2.6 数据分析

所有的数据均以平均值 \pm 标准误差的形式呈现, 所有数据均至少来自 3 个平行数据。采用单因素方差分析法计算数据间的显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 超声提取工艺的优化

根据图 1 绘制的标准曲线, 在多因素多水平上分别进行单因素实验, 确定较优的超声处理条件, 结果如图 2 所示。在 50 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 175 W 下提取 20 min, 料液比 1:50 的处理条件能够获得较优的烟草粗多糖提取率 (1.82%)。单因素实验结果显示, 20 min 的超声时间是最优条件, 可获得 1.67% 的提取率; 175 W 的

超声功率是最优条件, 可获得 1.81% 的粗多糖得率; 50 $^{\circ}\text{C}$ 的处理能够获得最高的粗多糖产量, 提取率达 1.75%。

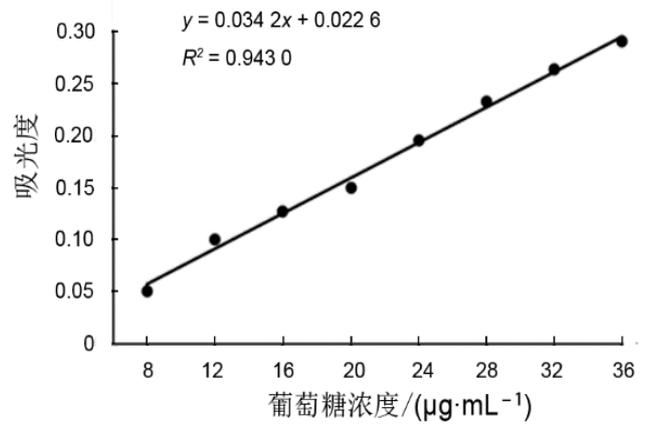


图 1 葡萄糖浓度与吸光度的对应关系

Fig.1 Correlation between glucose concentration and absorbance

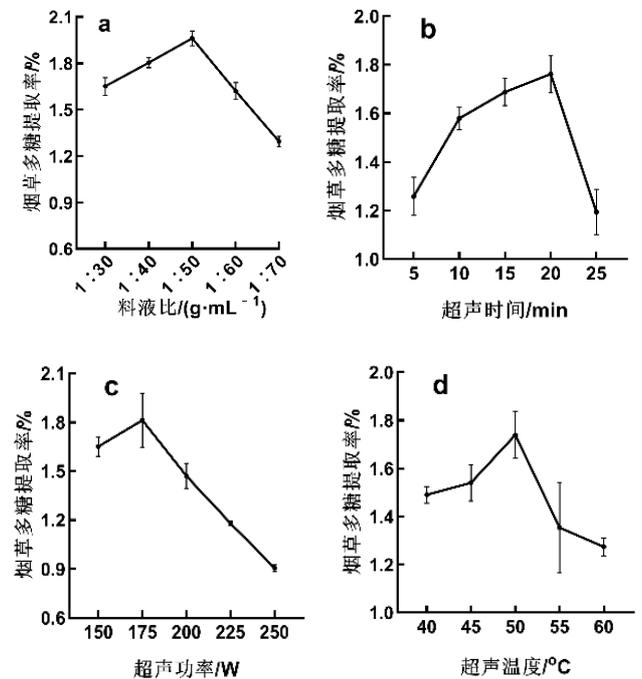


图 2 超声条件的单因素分析结果

Fig. 2 Single-factor analysis results of ultrasonic conditions

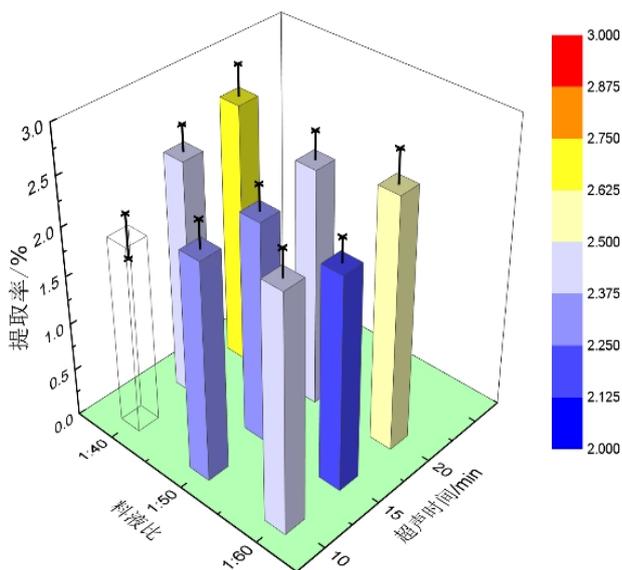
根据单因素实验结果, 所选择最优四因素三水平 (表 1), 选用 $L_9(3^4)$ 正交设计进行超声提取正交实验。由于高于 50 $^{\circ}\text{C}$ 的超声温度和高于 20 min 的处理时间可能会导致多糖结构的破坏, 因此, 正交实验设置中规避了更严酷的处理条件。

表 1 超声提取正交实验因素水平设计

Tab.1 Orthogonal experimental factors and levels for ultrasonic extraction

水平	因素			
	A 料液比/ (g·mL ⁻¹)	B 超声时间/ min	C 超声功率/ W	D 超声温度/ °C
1	1:40	10	150	40
2	1:50	15	175	45
3	1:60	20	200	50

首先通过对料液比和超声时间的综合分析可以看出(图3),多糖的提取率受到各个条件组合的显著影响。相对来说,料液比1:60、超声时间20 min处理所得到的多糖质量分数整体较高。随后经所有条件的正交分析后,A~D 4个条件的极差分别为0.25、1.14、0.80和0.51,因此因素的主次顺序为B>C>D>A,而理论最优条件为A₃B₃C₃D₂。在该条件下进行新的多糖提取实验,发现经超声法最后能获得的最优提取率为3.15%(表2)。



注:根据正交实验的要求,所使用的条件分别为A₁B₁C₁D₁、A₁B₂C₂D₂、A₁B₃C₃D₃、A₂B₁C₂D₃、A₂B₂C₃D₁、A₂B₃C₁D₂、A₃B₁C₃D₃、A₃B₂C₂D₁,该组合与表1相对应。

Note: According to the requirements of the orthogonal experiments, the conditions are listed as A₁B₁C₁D₁、A₁B₂C₂D₂、A₁B₃C₃D₃、A₂B₁C₂D₃、A₂B₂C₃D₁、A₂B₃C₁D₂、A₃B₁C₃D₃、A₃B₂C₂D₁, which correspond to the content in Table 1.

图 3 超声条件的组合分析

Fig.3 Combinatorial analysis of ultrasonic condition

表 2 超声提取正交实验结果

Tab.2 Orthogonal experimental results of ultrasonic extraction

序号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	1.95
2	1	2	2	2	2.46
3	1	3	3	3	2.71
4	2	1	2	3	2.25
5	2	2	3	1	2.27
6	2	3	1	2	2.45
7	3	1	3	2	2.42
8	3	2	1	3	2.20
9	3	3	2	1	2.60
K ₁	7.12	6.62	6.60	6.82	
K ₂	6.97	6.93	7.31	7.33	
K ₃	7.22	7.76	2.40	7.16	
极差 R	0.25	1.14	0.80	0.51	
主次顺序	B>C>D>A				
最优组合	A ₃ B ₃ C ₃ D ₂				

2.2 酶解工艺的优化

为进一步对酶解条件进行优化,分别在酶浓度、酶解时间、酶解温度和酶解 pH 4 个水平上进行单因素实验。如图 4 所示,通过对不同酶浓度的比较发现,浓度为 1%的酶处理能够获得较优的烟草粗多糖提取率(4.38%)单因素实验结果显示:80 min 的酶解时间是最优的处理条件,可获得 4.22%的提取率;55°C 的酶解温度是最优条件,可获得 4.41%的粗多糖得率;pH6.0 的处理能够获得最高的粗多糖产率(3.6%)。

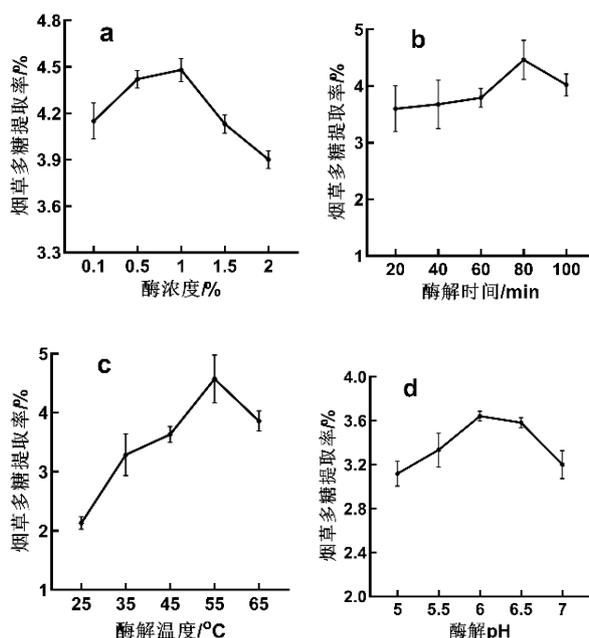


图 4 酶解条件的单因素分析结果

Fig.4 Single-factor analysis results of enzymatic conditions

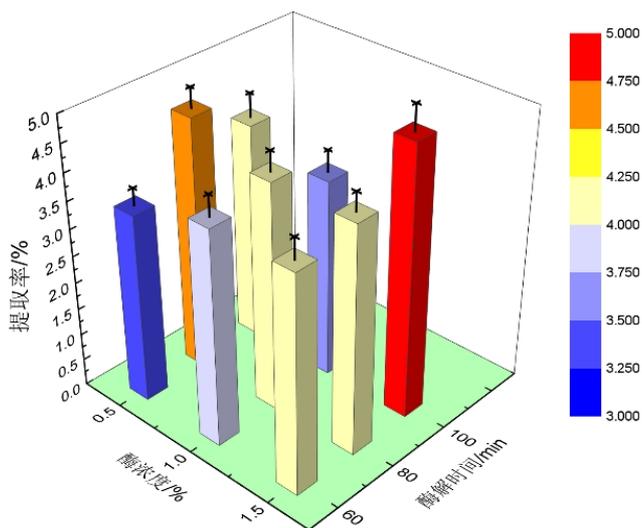
根据单因素实验结果,选择最优四因素三水平(表3),选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验,确定最优酶解条件组合。

表3 酶解提取正交试验因素水平设计

Tab.3 Orthogonal experimental factors and levels for enzymatic extraction

水平	因素			
	A 酶浓度/%	B 酶解时间/min	C 酶解温度/°C	D 酶解 pH
1	0.5	60	45	5.5
2	1.0	80	55	6.0
3	1.5	100	65	6.5

首先通过酶浓度和酶解时间的综合分析可以看出(图5),酶解浓度1.5%、酶解时间80~100 min 处理所得到的多糖含量整体较高。然后经所有所涉条件的正交分析后,A~D 4个条件的极差分别为1.33、1.59、2.48、0.46,因此因素的主次顺序为 $C>B>A>D$,而理论最优条件为 $A_3B_2C_2D_1$ 。在该条件下进行新的多糖提取实验,发现经酶解法最后能获得的最优提取率为4.75%(表4)。



注:根据正交实验的要求,所使用的条件分别为 $A_1B_2C_2D_2$ 、 $A_1B_3C_3D_3$ 、 $A_2B_1C_2D_3$ 、 $A_2B_2C_3D_1$ 、 $A_2B_3C_1D_2$ 、 $A_3B_1C_3D_2$ 、 $A_3B_2C_1D_3$ 、 $A_3B_3C_2D_1$,该组合与表3相对应。

Note: According to the requirements of the orthogonal experiments, the conditions are listed as $A_1B_2C_2D_2$ 、 $A_1B_3C_3D_3$ 、 $A_2B_1C_2D_3$ 、 $A_2B_2C_3D_1$ 、 $A_2B_3C_1D_2$ 、 $A_3B_1C_3D_2$ 、 $A_3B_2C_1D_3$ 、 $A_3B_3C_2D_1$, which correspond to the content in Table 3.

图5 酶解条件的组合因素分析

Fig. 5 Combinatorial analysis of enzymatic conditions

表4 酶解提取正交试验结果

Tab.4 Orthogonal experimental results of enzymatic extraction

试验号	A	B	C	D	提取/%
1	1	1	1	1	3.49
2	1	2	2	2	4.66
3	1	3	3	3	4.03
4	2	1	2	3	3.98
5	2	2	3	1	4.20
6	2	3	1	2	3.67
7	3	1	3	2	4.00
8	3	2	1	3	4.20
9	3	3	2	1	4.98
K_1	12.18	11.47	11.36	12.67	
K_2	11.85	6.93	13.84	12.33	
K_3	13.18	12.68	12.23	12.21	
极差 R	1.33	1.59	2.48	0.46	
主次顺序			$C>B>A>D$		
最优组合			$A_3B_2C_2D_1$		

2.3 超声辅助酶解工艺的优化

进一步对超声和酶解的设置次序进行测定和优化。如图6所示,先超声后酶解可将多糖提取率提高到5.11%,而先酶解后超声则可将多糖提取率提高到6.42%。因此,通过先酶解后超声的方式能够获得最高的烟草粗多糖提取率,此为废次烟叶活性多糖提取的优选方法。

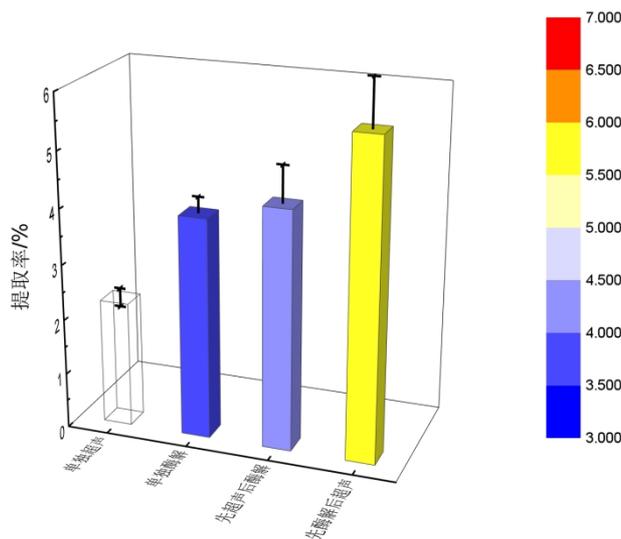


图6 超声辅助酶解的条件优化分析

Fig. 6 Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction

2.4 烟草活性多糖的分离纯化和结构特征分析

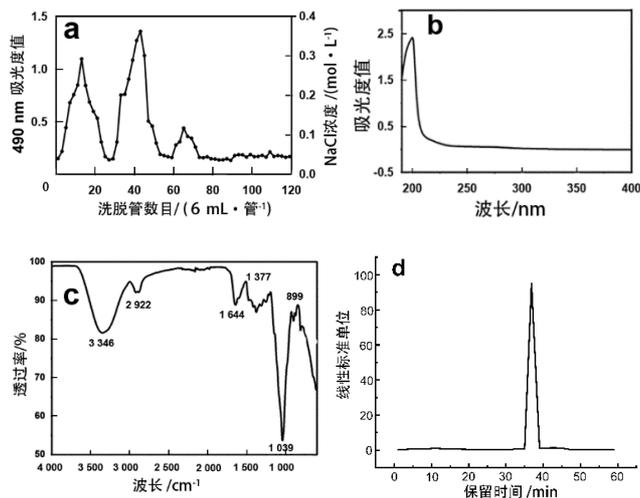
在获取粗多糖后,进一步经过 DEAE-52 纤维素柱层析进行分离纯化,洗脱曲线如图 7A 所示。0.1 mol/L 的洗脱峰最高且与其他组分分离度明显,因此该组分可能是一种含量占优势的关键烟草多糖组分,合并该组分,经旋转蒸发、透析、真空冷冻干燥后即可得到纯化烟草多糖。

对获取的纯化多糖进一步进行紫外光谱的分析。图 7b 可以看出,所述多糖组分在 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 处均未发现明显吸收峰,表明组分中不存在蛋白质和核酸污染,是一种具有较高纯度的活性多糖组分。

通过对该活性多糖进行红外光谱分析获取了特征性的红外光谱图(图 7c)。红外光谱中,可通过 950~750 cm⁻¹ 区域的峰位对末端碳的构型进行确定,其中 870~840 cm⁻¹ 的吸收峰对应 α 构型,890 cm⁻¹ 左右的吸收峰对应 β 构型,根据图 7c 的展示,本研究所述多糖在 899 cm⁻¹ 附近具有明显的吸收峰,因此说明烟草多糖异头碳的构型主要是 β 型。

通过 Ultrahydrogel 2000 和 Ultrahydrogel 500 色谱柱的串联分析显示,纯化多糖的保留时间为 36.85 min,计算得出纯化烟草多糖的平均分子质量为 6.85

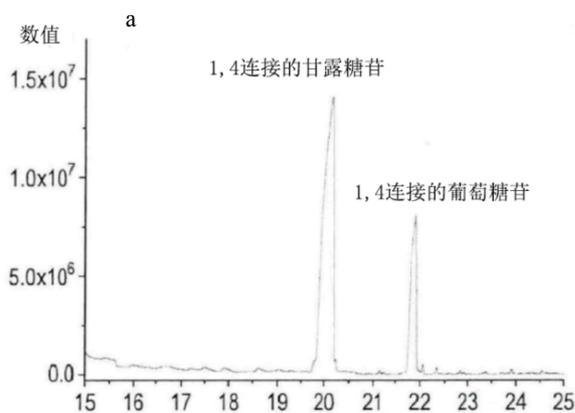
$\times 10^4$, 大约 400 个糖单元。从甲基化裂解规律可知,本烟草多糖的主要键型为 1,4-甘露糖苷和 1,4-葡萄糖苷(图 8a, b),提供了烟草多糖的关键结构信息。



注: a. DEAE 的洗脱图 b. 纯化组分的紫外光谱图 c. 纯化组分的红外光谱图 d. 纯化组分的分子排阻色谱分析。

图 7 烟草多糖的分离纯化和结构分析

Fig.7 Separation and structural analysis of tobacco polysaccharide



注: a. 甲基化的总离子流图 b. 衍生物的裂解分析图。

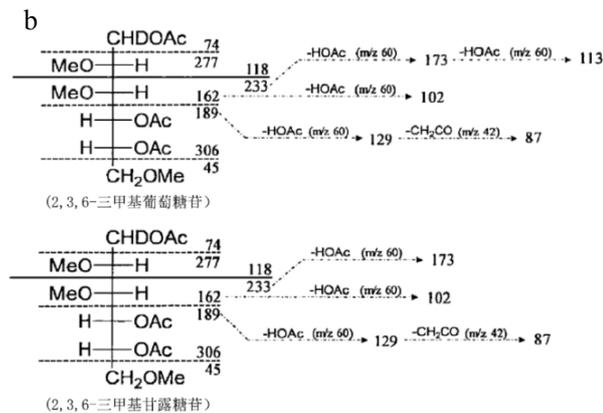


图 8 纯化多糖的甲基化分析

Fig. 8 Methylation analysis of the purified tobacco polysaccharide

3 结果与讨论

本研究获得了如下结论:(1)从单因素结果看,超声时间、酶解温度是决定超声或酶解提取多糖效果的关键因素;(2)从正交实验结果看,超声条件优化可使酶得率提高到 3.15%,酶解条件优化可使酶得率提高到 4.75%;(3)先酶解后超声的技术效果最好,

所获得的粗多糖的提取率最高可达 6.42%;(4)纯多糖纯度高,含有 β 型异头碳的结构,主要由 1,4 葡萄糖苷和 1,4 甘露糖苷组成。这种多糖的获得不仅拓宽了植物活性多糖的种类,更重要的是在实践中证实了废次烟叶多糖利用途径的可行性。

目前一般认为,烟草多糖具有一定的抗氧化活性,

但其完整的生物学功能未知，这在很大程度上限制了其作为生物活性物质的使用。因此，后续的工作将着重于对新分离烟草多糖的生物活性进行分析。

参考文献

- [1] 李莹, 李钟, 郭培国, 等. 烟草中主要活性成分的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(12): 2157-2163.
LI Ying, LI Zhong, GUO Peiguo, et al. Research progress on the bio-active components of *Nicotiana tabacum* L.[J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(12): 2157-2163.
- [2] Sun Y, Cheng L, Zeng X, et al. The intervention of unique plant polysaccharides—Dietary fiber on depression from the gut-brain axis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 170(1): 336-342.
- [3] Gan Q, Wang J, Hu J, et al. Modulation of apoptosis by plant polysaccharides for exerting anti-cancer effects: a review[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11(2): 792-798.
- [4] Sun Q, Cheng L, Zeng X, et al. The modulatory effect of plant polysaccharides on gut flora and the implication for neurodegenerative diseases from the perspective of the microbiota-gut-brain axis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164(1): 1484-1492.
- [5] Makki K, Deehan E C, Walter J, et al. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease[J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(2): 705-715.
- [6] Banozic M, Jokic S, Acker D, et al. Carbohydrates-key players in tobacco aroma formation and quality determination[J]. Molecules, 2020, 25(1): 1-7.
- [7] Yuan Y, Zhou J, Zheng Y, et al. Beneficial effects of polysaccharide-rich extracts from *Apocynum venetum* leaves on hypoglycemic and gut microbiota in type 2 diabetic mice[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 127(2): 110182-110188.
- [8] Cockburn D, Koropatkin N. Polysaccharide degradation by the intestinal microbiota and its influence on human health and disease[J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(1): 3230-3252.
- [9] Jin M, Zhang H, Wang J, et al. Response of intestinal metabolome to polysaccharides from mycelia of *Ganoderma lucidum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 122(2): 723-731.
- [10] Buscaill P, Chandrasekar B, Sanguankiattichai N, et al. Glycosidase and glycan polymorphism control hydrolytic release of immunogenic flagellin peptide[J]. Science, 2019, 364(2): 1-7.
- [11] 李松昂, 吴章毅, 陈红, 等. 超声辅助酶解法提取红薯叶多糖、结构及抗氧化研究[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(11): 83-89.
LI Songang, WU Zhangyi, CHEN Hong, et al. Study on ultrasound assisted enzymatic extraction of polysaccharides, structure and antioxidant of sweet potato leaves[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(11): 83-89.
- [12] 许春平, 杨琛琛, 王铮, 等. 低次烟叶多糖的提取及生物活性分析[J]. 烟草科技, 2013(11): 52-55.
XU Chunping, YANG Chenchen, WANG Zheng, et al. Extraction and biological activity analysis of polysaccharides from low grade tobacco[J]. Tobacco Science & Technology, 2013(11): 52-55.
- [13] 罗海涛, 刘思奎, 邵灯寅, 等. 不同植物多糖的提取及其在卷烟中的应用[J]. 食品工业, 2022, 43(10): 100-105.
LUO Haitao, LIU Sikui, SHAO Dengyin, et al. Extraction of different plant polysaccharides and their application in cigarettes[J]. Food Industry, 2022, 43(10): 100-105.

Optimization of extraction conditions and structural characterization of active polysaccharides from waste tobacco by ultrasonic-assisted enzymatic method

YANG Ruili^{1,2}, MO Wanying^{1,2}, XU Zhiqiang¹, XU Yi^{1,2}, HE Zengyang^{1,3*}

¹ Anhui Provincial Key Laboratory of Tobacco Chemistry, Hefei 230000, China;

² School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

³ Technology Center of China Tobacco Anhui Industrial Co., Ltd., Hefei 230601, China

Abstract: [Objective] This study aims to optimize the extraction method of tobacco polysaccharides and clarify their structural characteristics. [Methods] Crude polysaccharides were extracted from field-discarded flue-cured tobacco leaves using an ultrasonic-assisted enzymatic method, and separated and purified by dextran gel chromatography. The effects of extraction conditions on the extraction rate and the structural characteristics of purified polysaccharides were analyzed. [Results] (1) When the ratio of material to liquid (mass to volume) was 1:60, ultrasonic time was 20 min, ultrasonic power was 200 W, and temperature was 45 °C, the extraction rate of crude tobacco polysaccharides could reach 3.15%; when the enzyme concentration was 1.5%, enzymatic hydrolysis time was 80 min, temperature was 55 °C, and pH was 5.5, the extraction rate of crude tobacco polysaccharides could reach 4.75%. (2) After optimizing the process sequence of the auxiliary enzymatic method, the extraction method of enzymatic hydrolysis followed by ultrasound showed the best effect, and the extraction rate of crude polysaccharides could reach 6.42%. (3) After DEAE-52 cellulose column chromatography, the polysaccharide had high purity and a β -type anomeric carbon structure, mainly composed of 1,4-linked glucoside and 1,4-linked mannoside bonds. [Conclusion] The method of enzymatic hydrolysis followed by ultrasound is more favorable for the extraction of active tobacco polysaccharides, and the obtained novel active polysaccharides have the structural characteristic of β -type anomeric carbon.

Keywords: tobacco polysaccharide; ultrasonics-assisted enzymatic extraction; orthogonal analysis; structural identification; ultra-red spectrum; ultra-violet spectrum

*Corresponding author. Email: hezy2020@163.com