

大蒜多糖的酶法提取及其抗氧化性研究

李朝阳¹, 刘 魁¹, 韩忠宵², 王未肖¹, 李 珊¹, 郭利果¹

(1. 河北科技大学理学院化学系, 河北 石家庄 050018; 2. 河北工业职业技术学院, 河北 石家庄 050091)

摘 要: 本实验研究了大蒜多糖的提取方法, 结果表明, 采用纤维素酶解可显著提高多糖提取率, 在加酶量 5%, pH 值 5.0, 酶解温度 50℃ 时, 提取 1.5h, 提取率达 20.54%。本实验进一步对大蒜多糖的抗氧化性进行了测定, 并与大蒜素进行了对比。结果显示, 大蒜多糖具有清除超氧阴离子自由基和羟基自由基的能力, 且在较高浓度下强于大蒜素, 而大蒜素的还原能力则强于大蒜多糖。

关键词: 大蒜多糖; 纤维素酶; 抗氧化性; 提取; 大蒜素

Study on Cellulase-assisted Extraction and Antioxidant Activity of Garlic Polysaccharide

LI Zhao-yang¹, LIU Kui¹, HAN Zhong-xiao², WANG Wei-xiao¹, LI Shan¹, GUO Li-guo¹

(1. Department of Chemistry, College of Science, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China;

2. Hebei Institute of Vocation and Technology, Shijiazhuang 050091, China)

Abstract: The technology of extracting polysaccharide from garlic with cellulase was studied. The optimum extracting conditions were evaluated at 5% cellulase addition and 1.5h extraction time with temperature at 50℃ and pH 5.0. On these bases, the antioxidant activity of garlic polysaccharide as well as garlicin was also assayed. The results showed that the garlic polysaccharide has certain antioxidant activity, which increases with the increase of polysaccharide concentration. Moreover, it was also shown that garlic polysaccharide has higher scavenging effects on hydroxyl radical and superoxide radical than those of garlicin at relatively high concentration. Therefore the reductive capability of garlicin is stronger than garlic polysaccharide.

Key words garlic polysaccharide; cellulase; antioxidant ability; extraction; garlicin

中图分类号: TS201.23

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0117-04

大蒜(*Allium sativum*)营养丰富,是日常生活中常用的香辛蔬菜和调味佳品,同时大蒜具有很强的防病治病保健功能,历来被视为药食兼用佳品。我国有丰富的大蒜资源,是世界最大的大蒜生产国和出口国,但目前主要以出口原料产品和初级产品为主,大蒜素和大蒜油(主要成分亦为大蒜素)是最主要的大蒜深加工产品。近年来,大蒜中多糖成分的生理和药理功效引起了人们的关注^[1-2]。临床显示大蒜多糖具有抗菌消炎、抗血凝、降血脂和防止动脉粥样硬化的功效,同时还有抗尿糖、保护肝功能、抗肿瘤和预防衰老等作用^[3-4],而且大蒜多糖的某些疗效要高于大蒜素。由于大蒜中大蒜多糖的含量较之大蒜素要高一个数量级,且大蒜素不稳定,需要加工成胶囊或丸剂以保持其药效,因此开发活性大蒜多糖更有优势,经济效益也更为明显。

目前国内外对大蒜多糖的研究仍然较少,尚未见有关抗氧化性的研究报道。本实验首先采用酶法对大蒜多糖的提取进行了研究,然后对大蒜多糖的体外抗氧化性

进行了测定,并与大蒜素进行了对比。相关结果对阐释大蒜多糖的药理作用,对大蒜多糖的进一步开发具有较大意义。

1 材料与方法

1.1 原料

河北永年陈蒜。

1.2 仪器和试剂

800 型离心沉淀机 海手术仪器厂; 721 型分光光度计 上海市第三分析仪器厂; FA2104 型电子天平 上海仪器仪表有限公司; FD-1 冷冻干燥机 北京博医实验仪器有限公司。

还原型辅酶(NADH) Sigma 公司; 吩嗪硫酸甲酯(PMS) 上海生化试剂厂; 氯化硝基四氮唑蓝(NBT) 上海前进试剂厂; 硫代巴比妥酸(TBA) 上海市天蓬精细化工有限公司; 2-脱氧核糖 北京拜尔迪生物公司; 纤维素酶 天津市利华酶制剂技术有限公司; 大蒜素 江

收稿日期: 2006-11-06

基金项目: 河北省教育厅科学技术研究计划项目(2006316); 河北科技大学校立基金项目(XL2006046)

作者简介: 李朝阳(1973-), 男, 副教授, 博士, 主要从事应用化学和分析化学研究。E-mail: lizy666@yahoo.com.cn

苏青江药业有限公司。其他试剂均为分析纯,苯酚用前重蒸馏。

1.3 大蒜多糖的提取

1.3.1 大蒜脱脂

取去皮大蒜 50.0g,于研钵中捣碎,用 200ml 95% 的乙醇回流二次,每次 2.5h。过滤,滤渣依次用无水乙醇、丙酮和乙醚洗涤,收集滤渣,再用红外灯干燥,即得淡黄色脱脂蒜泥。

1.3.2 大蒜多糖的酶解/热水提取及含量测定

准确称取脱脂大蒜泥 5.0g,置于洁净干燥的 500ml 烧杯中,加入磷酸盐缓冲液 100ml,加入定量的纤维素酶搅拌均匀,于一定温度下进行酶解,酶活化反应进行一定时间后,用 NaOH 溶液调节 pH7.0,再加入适量蒸馏水使料液比为 1:60,升温至 85℃ 灭酶 1h。将提取液离心,吸取 0.5ml 清液于 100ml 容量瓶中,蒸馏水定容,采用苯酚-硫酸法对多糖含量进行跟踪检测^[5]。

热水提取时则不加纤维素酶,直接按 1:60 的量加入热水 85℃ 提取 2.5h。

1.3.3 大蒜多糖的纯化

将提取液浓缩后转移至分液漏斗,采用 Sevag 法除蛋白,向分液漏斗中加入 Sevag 试剂(Sevag 试剂:V 三氯甲烷:V 正丁醇=4:1),剧烈震荡 3~5min,然后静置 30min,分液时分去界面以下的液体。按此步骤连续数次直至两层液体交界处没有白色絮状沉淀出现为止。

在去除蛋白的提取液中加入 95% 的乙醇使醇含量达到 80%,于 4℃ 冰箱中沉淀多糖。抽滤,滤渣依次用无水乙醇、丙酮和乙醚洗涤,冷冻干燥得淡黄色粉末,即为大蒜多糖。

1.4 抗氧化性测定

1.4.1 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除能力的测定^[6]

配制磷酸盐缓冲液(pH7.4)含 150μmol/L 的 NBT,60μmol/L 的 PMS,468μmol/L 的 NADH,量取 1ml 该缓冲液加入 1ml 大蒜多糖或大蒜素待测液,25℃ 反应 5min,然后在 560nm 测定吸光度 A_i 。对照液以 1ml 蒸馏水代替待测液测定值为 A_{01} 。

对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除能力用 TR 表示,并可通过下式计算:

$$TR(\%) = \frac{A_{01} - A_i}{A_{01}} \times 100$$

1.4.2 清除羟基自由基能力的测定^[7]

采用 α -脱氧核糖氧化法测定。准确量取 0.2ml 1 FeSO₄-EDTA 混合液(10mmol/L)移至具塞试管中,加入 0.2ml 2-脱氧核糖溶液(10mmol/L),再加入 1.0ml 不同浓度的待测液,随后用磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)定容至

1.8ml,最后加入 0.2ml 过氧化氢溶液(10mmol/L),混合均匀后将该体系置于 37℃ 恒温水浴中恒温 1h,取出,再向该体系加入 1.0ml 2.8% 的三氯乙酸溶液(TCA),1.0ml 1.0% 的硫代巴比妥酸溶液(TBA),混合均匀后于水浴中反应 10min,取出,冷水冷却后,在 532nm 处测定该体系的吸光度 A_s 。对照液以 1.0ml 蒸馏水代替待测液,测定对比吸光度 A_{02} 。

对羟基自由基($\cdot OH$)的清除能力用 SA 表示,并可通过下式计算:

$$SA(\%) = \frac{A_{02} - A_s}{A_{02}} \times 100$$

1.4.3 还原能力的测定^[6]

量取 1.0ml 不同浓度的待测液移至试管中,加入 2.5ml 磷酸盐缓冲溶液(pH6.6),2.5ml 1.0% 的铁氰化钾溶液,混合均匀后将该体系置于 50℃ 恒温水浴中恒温 20min,取出加入 2.5ml 10% 三氯乙酸溶液,混合均匀,置于离心机内离心 10min,移取上清液 2.5ml 于另一试管中,加入 2.5ml 蒸馏水,0.5ml 0.1% 的三氯化铁溶液,混合均匀,在 700nm 处测定体系的吸光度 A_1 。

2 结果与分析

2.1 大蒜多糖的酶法提取

酶解广泛应用于活性成分的提取中,本实验采用纤维素酶进行酶解。影响酶解效果的主要因素有 pH 值、提取温度、提取时间和加酶量。其中 pH 和温度主要影响纤维素酶的活性,提取时间和加酶量主要影响浸取速度,受样品影响较大^[8]。本实验采用单因素分析研究了四种因素对提取率的影响,纤维素酶的最适温度和 pH 值已有较多报道,分别为 50℃ 和 5.0 左右^[8],实验先固定了该二条件,确定加酶量和提取时间,结果见表 1 和表 2。由表中可看出,加入纤维素酶可大大提高多糖提取率,随着加酶量和提取时间的增大,提取率随之提高,但当达到一定数值后基本保持恒定,从而确定最佳提取条件为加酶量 5%,酶解时间 1.5h。在此基础上进一步确定最佳提取温度和 pH 值,见表 3 和表 4,结果显示 50℃ 和 pH5.0 也基本为最佳条件。

值得说明的是,上述检测均是对提取液中多糖直接进行测定的,而此后的纯化过程会带来多糖损失,最

表 1 不同加酶量对大蒜多糖产率的影响

Table 1 Effects of different addition amount of cellulase on yield of garlic polysaccharide

酶量(%)	1	2.5	5	10	15
提取率(%)	7.03	13.33	21.35	21.03	22.05

注:提取时间 2h,温度 50℃,pH5.0。

表2 不同提取时间对大蒜多糖产率的影响

Table 2 Effects of different extraction time on yield of garlic polysaccharide

时间(h)	0.5	1	1.5	2	2.5
提取率(%)	12.28	15.78	20.54	21.35	20.72

注: 加酶量 5%, 温度 50℃, pH5.0。

表3 不同提取温度对大蒜多糖产率的影响

Table 3 Effects of different extraction temperatures on yield of garlic polysaccharide

温度(℃)	40	45	50	55
提取率(%)	15.31	18.82	20.54	20.83

注: 加酶量 5%, 提取时间 1.5h, pH5.0。

表4 不同pH值对大蒜多糖产率的影响

Table 4 Effects of different pH values on yield of garlic polysaccharide

pH值	4.0	4.5	5.0	5.5
提取率(%)	11.68	16.51	20.54	17.92

注: 加酶量 5%, 提取时间 1.5h, 温度 50℃。

终实际产品产率为: 酶解 8.34%, 热水浸提 3.45%, 显然酶法产率较高。

2.2 抗氧化性的测定

2.2.1 超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除能力的测定

$O_2^{\cdot-}$ 的形成是氧毒性的主要因素之一, 本实验采用 NBT 法测定 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力。NBT 与 $O_2^{\cdot-}$ 作用会有明显的颜色变化, 若加入的物质可清除 $O_2^{\cdot-}$, 降低 NBT 的还原程度, 颜色变化程度将减弱。

图 1 给出了大蒜多糖和大蒜素对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除结果。由图中可看出, 大蒜多糖有一定的清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力, 且随着浓度增大, 清除能力显著提高, 这是与其他多糖品种相类似的。大蒜多糖的半清除率浓度 (EC_{50} , 自由基清除率在 50% 时的浓度) 为 2.7mg/ml。对大蒜素而言, 其清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力亦随浓度增大而增大, 但趋势要平缓的多。在低浓度时其活性要高于大蒜多糖, 但随着浓度增大, 其活性又低于大蒜多糖。在浓度为

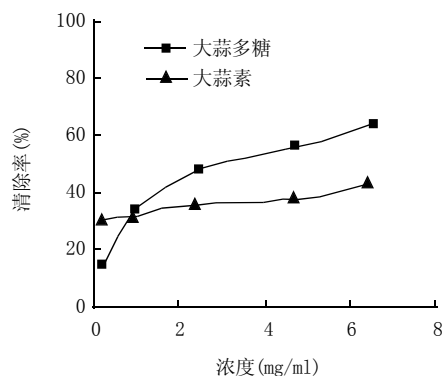


图1 大蒜多糖和大蒜素清除超氧阴离子自由基的比较

Fig.1 Scavenging activity on superoxide radical of garlic polysaccharide and garlicin

6.55mg/ml 时, 大蒜素对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率为 42.9%, 显然弱于大蒜多糖。

大蒜素的主要成分为二烯丙基硫化物, 大蒜多糖主要为果糖、葡萄糖和少量半乳糖的 β -杂聚糖^[1-2], 二者结构不同, 对自由基清除的机制也应有所区别, 具体仍有待于深入研究。

2.2.2 对羟基自由基($\cdot OH$)清除能力的测定

羟基自由基($\cdot OH$)是化学性质非常活泼的一种活性氧分子, 几乎能和所有的生物大分子发生各种不同类型的反应, 并有非常高的速度常数, 是进攻性最强的化学物质之一, 本实验采用 Fenton 反应体系产生羟基自由基 $\cdot OH$, 通过考察 $\cdot OH$ 对 2-脱氧核糖分子氧化破坏情况来确定多糖是否对 $\cdot OH$ 有清除能力。图 2 给出了大蒜多糖对羟基自由基的清除结果, 同时与大蒜素进行了比较。大蒜多糖及大蒜素对 $\cdot OH$ 均有一定的清除能力, 且随浓度增大清除能力增强。与清除超氧自由基相类似, 大蒜素的变化要平缓, 在低浓度时, 大蒜素的清除能力略强于大蒜多糖, 在高浓度时大蒜多糖的清除能力要略强于大蒜素。

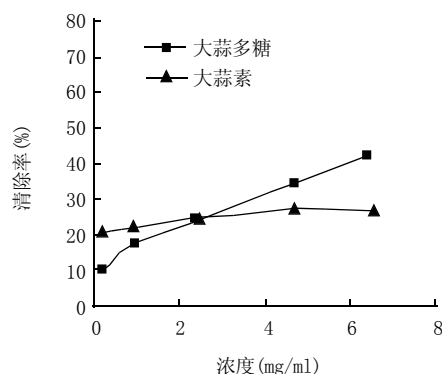


图2 大蒜多糖和大蒜素清除羟基自由基的比较

Fig.2 Scavenging activity on hydroxyl radical of garlic polysaccharide and garlicin

2.2.3 还原能力的测定

对于某一种抗氧化剂其抗氧化性质和还原性质之间有直接的联系。抗氧化剂是通过自身的还原作用给出电子而清除自由基的, 还原能力越强, 抗氧化性越强, 因此可通过测定还原能力来说明抗氧化活性的大小。本实验利用待测物被铁氰化钾氧化来表征还原能力, 最终测定的吸光度越大, 则还原能力越强。图 3 给出了大蒜多糖和大蒜素对羟基自由基的清除结果, 图中显示在高浓度和低浓度时大蒜素的还原能力均强于大蒜多糖。

3 结论

本实验的测定结果显示大蒜多糖有一定的抗氧化性, 对自由基的清除可能是其在体内发挥生理和药理作

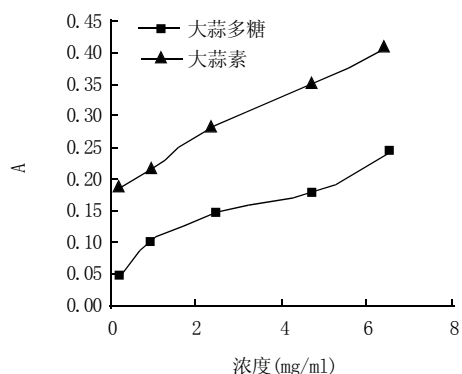


图3 大蒜多糖和大蒜素还原能力的比较

Fig.3 Reducing activity garlic polysaccharide and garlicin

用的一个原因。而且在高浓度下,大蒜多糖的清除超氧阴离子和羟基自由基的能力强于大蒜素。大蒜多糖的含量较之大蒜素要高一个数量级,比大蒜素也稳定的多,并且通过多糖修饰的方法将会有助于抗氧化性的提高。大蒜资源丰富,价格低廉,因此将大蒜多糖作为

抗氧化剂和保健食品进行开发有较好的前景。

参考文献:

- [1] 王文玲, 黄雪松, 曾莉莎. 大蒜多糖的研究综述[J]. 广州食品工业科技, 2005, 20(4): 144-146.
- [2] 黄雪松. 大蒜多糖的提取分离与分析[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 48-51.
- [3] 郑敏, 潘世斌, 姜友定, 等. 大蒜多糖对肝损伤小鼠血清和肝组织ALT、AST的影响及其急性毒性实验[J]. 咸宁学院学报, 2003, 17(2): 85-87.
- [4] 蔡飞, 吴基良, 陈金和. 大蒜多糖对病毒性心肌炎小鼠心肌酶的影响[J]. 咸宁学院学报, 2003, 17(1): 1-4.
- [5] 魏绍云, 齐慧玲, 王继伦, 等. 苯酚-硫酸法测定白芨多糖[J]. 天津化工, 2000(3): 35-36.
- [6] GULCINI. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid) [J]. Toxicology, 2006, 217: 213-220.
- [7] 井乐刚, 路芳, 张永忠. 大豆异黄酮的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 62-65.
- [8] 董彩霞, 黄建华, 祝勇, 等. 酶解法提取香菇多糖的研究[J]. 光谱实验室, 2005, 22(5): 947-949.