

三叶青根多糖提取工艺优化、分离纯化及结构表征

Extraction optimization, purification and characterization of polysaccharide from the roots of *Radix Tetrastigma*

郭南生<sup>1</sup> 江和栋<sup>1</sup> 张 兵<sup>1</sup> 邓泽元<sup>1</sup> 蔡 红<sup>2</sup>

GUO Nan-sheng<sup>1</sup> JIANG He-dong<sup>1</sup> ZHANG Bing<sup>1</sup> DENG Ze-yuan<sup>1</sup> CAI Hong<sup>2</sup>

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 上饶市红日农业开发有限公司, 江西 上饶 334700)  
(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China;  
2. Yushan Red Day Agriculture Development Co., Ltd., Shangrao, Jiangxi 334700, China)

**摘要:**采用水浴提取三叶青根多糖 (Polysaccharides from roots of *Radix Tetrastigma*, RTP), 以多糖提取得率为响应指标, 在单因素试验的基础上, 通过响应面分析方法确定三叶青根多糖提取的最佳工艺为: 提取温度 96 ℃、液料比 34:1 (mL/g)、提取时间 2 h, 该条件下三叶青根多糖提取得率为 (21.23±0.77)%。通过 Sevage 法除蛋白, 并依次经 DEAE-52 离子交换柱、Sephrose CL-4B 凝胶柱分级纯化, 得到组分 RTP-3-1。高效液相凝胶渗透色谱分析 RTP-3-1 为高纯度多糖, 其分子量为 1 244.2 kDa, 傅里叶红外光谱分析显示 RTP-3-1 是酸性多糖, 核磁共振氢谱显示 RTP-3-1 为 α 型多糖。

**关键词:**三叶青根; 多糖; 水浴提取; 纯化; 结构

**Abstract:** The polysaccharide from roots of *Radix Tetrastigma* were extracted by water bath, and the yield of polysaccharide was determined by response surface methodology. Based on the single factor test, The optimum conditions were as followed: temperature 96 ℃, ratio of water to liquid 34:1 (mL/g), extraction time 2 h. Under the conditions, the yield of polysaccharide was (21.23±0.77)%. After deprotein with sevage method, fractionated and purified by DEAE-Cellulose 52 anion exchange column and Sepharose CL-4B gel filtration column, successively. The purified polysaccharide was designated as RTP-3-1 and its components, molecular weight, primary structure and domains were identified by high performance gel permeation chromatography (HPGPC), fourier transform infrared spectroscopy and hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy (HNMR). The results showed that RTP-3-1 was high purity poly-

saccharides with a molecular weight of 1 244.2 kDa, and had the characteristic absorption peak of acidic polysaccharide. <sup>1</sup>HNMR showed RTP-3-1 was an α-type polysaccharide.

**Keywords:** roots of *Radix Tetrastigma*; polysaccharide; waterbath extraction; purification; structure

三叶青是葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤 (*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg), 别名金线吊葫芦、三叶扁藤、石老鼠等, 主要分布在中国西南及浙江、湖北、福建等地区<sup>[1-2]</sup>。以块根或全草入药<sup>[3]</sup>, 具有抗肿瘤<sup>[4-6]</sup>、抗病毒<sup>[7]</sup>、抗肝损伤<sup>[8]</sup>等作用。多糖是三叶青根中重要的活性成分<sup>[9]</sup>, 越来越多的研究证明, 多糖具有多种生物活性和功能, 如抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗病毒、抗炎症等<sup>[10]</sup>。水提醇沉是提取植物多糖最常用的方法, 目前对于三叶青多糖提取工艺的研究少有报道, 黄有强等<sup>[11]</sup>利用微波辅助法对三叶青多糖进行正交优化提取, 其得率不高。对于结构方面, 饶君凤等<sup>[9]</sup>建立离子色谱-脉冲安培法 (IC-PAD) 测定三叶青多糖中单糖组成。然而, 关于三叶青多糖分离纯化及其纯化后组分的结构表征鲜有报道。本研究拟通过响应面法筛选出最佳水浴提取工艺参数, 并对所提取的三叶青根多糖进行纯化和结构解析, 以期在三叶青根多糖的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三叶青根: 上饶市红日农业发展有限公司;  
无水乙醇、正丁醇、氯仿、浓硫酸、苯酚、氯化钠等: 分析纯, 西陇化工股份有限公司;  
Dextran 标准品: 分析纯,  $M_w = 4.32, 73.80, 289.00, 990.00, 3\ 755.00$  kDa, 美国 Pharmacia 公司;  
DEAE-52 离子交换柱: 英国 Whatman 公司;  
Sephrose CL-4B 凝胶柱: 美国 Pharmacia 公司。

**基金项目:** 江西省科技厅 2012 年科技支撑项目 (编号: 20121BBF60041)  
**作者简介:** 郭南生, 男, 南昌大学在读硕士研究生。  
**通信作者:** 邓泽元 (1963—), 男, 南昌大学教授, 博士。  
E-mail: dengzy@ncu.edu.cn  
**收稿日期:** 2018-03-30

1.2 仪器与设备

旋转蒸发器:RE-2000A 型,上海亚荣生化仪器厂;  
台式离心机:TDL-40B 型,上海安亭科学仪器厂;  
电热恒温水浴锅:HH-S11 型,北京医用离心机厂;  
紫外可见分光光度计:L6S 型,上海仪电分析仪器有限公司;  
高效液相色谱仪:Agilent 1260 型,美国 Agilent 公司;  
傅里叶红外光谱仪:Bruker IFS 48FT-IR 型,德国 Bruker Garmany 公司;  
核磁共振光谱仪:600MHz 型,德国 Bruker Garmany 公司。

1.3 方法

1.3.1 三叶青根多糖水提取工艺 根据文献[12]修改如下:三叶青块根粉碎过 20 目筛后,经 90%乙醇脱脂 2 h,无水乙醇洗涤过滤,65 ℃干燥 48 h。取适量脱脂粉末,热水浴水提,离心(4 200 r/min,6 min)取上清液,旋转蒸发仪真空浓缩,加 4 倍无水乙醇沉淀,4 ℃低温过夜,再离心(4 200 r/min,6 min),弃上清液取沉淀,即得三叶青根粗多糖。  
1.3.2 标准曲线的制作及三叶青根提取液中多糖含量的测定 参照苯酚-硫酸法<sup>[13]</sup>测多糖含量,以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线。标准曲线为: $A=4.147\ 7x+0.045\ 5$ [ $x$  为葡萄糖质量浓度(mg/mL), $A$  为吸光度], $R^2=0.997\ 6$ 。将所得三叶青粗多糖用蒸馏水溶解,定容至 100 mL 容量瓶中,吸取 0.1 mL 于 10 mL 比色管中,蒸馏水补至 1.0 mL,测定方法同标准曲线的制作。按照式(1)计算三叶青根多糖的提取得率。

$$R=\frac{CVN}{1\ 000\times m}\times 100\%,$$

(1)

式中:

R——三叶青根多糖提取得率,%;

C——待测三叶青根提取液中多糖质量浓度,mg/mL;

V——待测液体积,mL;

N——稀释倍数;

m——三叶青根干粉质量,g。

1.3.3 响应面优化水浴三叶青根多糖提取 根据前期预试验结果,设计响应面试验因素水平见表 1,按照 Box-Behnken 设计原理,进行三因素三水平的响应面分析试验。以三叶青根多糖提取得率为响应值,利用 Design Expert 8.06 软件对数据进行分析。

1.3.4 三叶青根多糖的纯化及分子量测定

(1) DEAE-52 阴离子交换柱层析:三叶青根多糖经 Sevage 法<sup>[14]</sup>除蛋白后,用蒸馏水配成 20 mg/mL 的溶液,

表 1 三叶青根多糖提取响应面试验因素水平表

Table 1 Response surface design of the polysaccharides extract from roots of *Radix Tetrastigma*

| 编码水平 | A 提取温度/℃ | B 液料比(mL/g) | C 提取时间/h |
|------|----------|-------------|----------|
| —1   | 90       | 25          | 1.5      |
| 0    | 95       | 35          | 2.0      |
| 1    | 100      | 45          | 2.5      |

70 ℃ 加热溶解 30 min,离心(5 000 r/min,5 min)取上层溶液。首先经过 DEAE-52 阴离子交换柱(1.6 cm×30 cm)进行纯化,进样量 5.0 mL,洗脱液为 0.0,0.1,0.2,0.4,0.8 mol/L NaCl 溶液,流速 2 mL/min,每管收集 4 min,苯酚-硫酸法逐管检测,依吸光度  $A_{490}$  对管号作图,分别收集各主峰,旋蒸浓缩、透析 48 h、冷冻干燥,得三叶青根多糖 RTP-X。

(2) Sepharose CL-4B 凝胶柱层析:为提高多糖均一性,经过阴离子交换柱层析分级分离的多糖还需凝胶柱进一步纯化。将溶胀好的凝胶 sepharose CL-4B 从 4 ℃ 冰箱取出后,缓慢振摇至室温,避免产生气泡,湿法装柱(1.6 cm×60 cm),蒸馏水平衡洗脱过夜。将上述 DEAE-52 分离的多糖各个级分,溶于蒸馏水中,于 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液上 sepharose CL-4B 凝胶柱,进样量为 5 mL,以 0.10 mol/L NaCl 为洗脱剂,流速为 0.7 mL/min,10 min/管,苯酚-硫酸法逐管检测,产物收集合并后蒸馏水透析 48 h 后冷冻干燥。

(3) 三叶青根多糖的纯度鉴定及分子量测定:准确称取 1 mg 纯化后的三叶青根多糖 RTP-X,溶于 1 mL 含 0.02%叠氮钠的超纯水中,采用高效凝胶渗透色谱法进行纯度鉴定和分子量测定。检测条件:选用示差检测器 RID 和自动进样器;色谱柱为 TSK gel G5000PWXL(7.8 mm×300 mm);流动相为含 0.02%叠氮钠的超纯水;流速 1 mL/min;柱温 30 ℃;样品浓度 1 mg/mL;进样量 10 μL。

1.3.5 紫外光谱分析 参照文献[15]。  
1.3.6 红外光谱分析 参照文献[16]<sup>105</sup>。  
1.3.7 <sup>1</sup>H-NMR 光谱分析 参照文献[16]<sup>106</sup>。

2 结果与分析

2.1 提取工艺优化

2.1.1 Box-Behnken 试验与结果 根据单因素试验结果,按照 Box-Behnken 进行三因素三水平的响应面试验,结果见表 2,方差分析见表 3。

根据试验结果分析,得提取温度、液料比、提取时间与多糖提取得率之间的二次多项回归方程:

$$Y=21.86+2.36A-0.099B+1.05C-1.12AB-0.24AC+0.41BC-4.26A^2-2.62B^2-1.85C^2.$$

(2)

从表 3 可知,模型  $P=0.000\ 3<0.001$ ,表明回归模型极显著,因变量(多糖提取得率)与所有自变量(提取温度、液料比、提取时间)之间的线性关系显著( $R^2=0.988\ 3$ )。 $P_A<0.001$ , $P_C<0.01$ , $P_B>0.05$ ,说明提取温度和提取时间对多糖提取率的影响极显著,液料比对多糖提取率的影响不显著。交互作用中, $P_{AB}=0.013\ 5<0.05$ ,说明提取温度与液料比的交互影响显著, $P_{AC}$  及  $P_{BC}$  均大于 0.05,说明提取温度与提取时间、液料比与提取时间之间的交互关系均不显著。模型的调整确定系数  $R^2_{Adj}=0.967\ 4$ ,说明该模型拟合程度比较好,试验误差小,证明该提取工艺优化模型有助于提高三叶青根多糖的提取得率。

2.1.2 响应曲面结果分析 利用 Design-Expert 8.06 软件对表 2 中的数据进行分析,得到响应面见图 1。

表 2 响应面试验结果

| 试验号 | A  | B  | C  | 提取得率 Y/% |
|-----|----|----|----|----------|
| 1   | 0  | −1 | 1  | 18.58    |
| 2   | 1  | −1 | 0  | 18.29    |
| 3   | 0  | 0  | 0  | 21.58    |
| 4   | 1  | 0  | −1 | 17.17    |
| 5   | 0  | 1  | 1  | 18.36    |
| 6   | −1 | 1  | 0  | 13.90    |
| 7   | −1 | 0  | −1 | 12.30    |
| 8   | 1  | 1  | 0  | 16.69    |
| 9   | −1 | 0  | 1  | 14.79    |
| 10  | 1  | 0  | 1  | 18.72    |
| 11  | 0  | 0  | 0  | 22.19    |
| 12  | 0  | 0  | 0  | 21.81    |
| 13  | −1 | −1 | 0  | 11.02    |
| 14  | 0  | −1 | −1 | 17.23    |
| 15  | 0  | 1  | −1 | 15.38    |

表 3 方差分析<sup>†</sup>

| 方差来源           | 平方和     | 自由度 | 均方     | F 值    | P 值        |
|----------------|---------|-----|--------|--------|------------|
| 模型             | 152.760 | 9   | 16.970 | 47.11  | 0.000 3 ** |
| A              | 44.460  | 1   | 44.460 | 123.40 | 0.000 1 ** |
| B              | 0.078   | 1   | 0.078  | 0.22   | 0.661 3    |
| C              | 8.760   | 1   | 8.760  | 24.30  | 0.004 4 ** |
| AB             | 5.020   | 1   | 5.020  | 13.93  | 0.013 5 *  |
| AC             | 0.220   | 1   | 0.220  | 0.61   | 0.469 1    |
| BC             | 0.660   | 1   | 0.660  | 1.84   | 0.232 6    |
| A <sup>2</sup> | 67.120  | 1   | 67.120 | 186.29 | <0.000 1   |
| B <sup>2</sup> | 25.370  | 1   | 25.370 | 70.41  | 0.000 4    |
| C <sup>2</sup> | 12.650  | 1   | 12.650 | 35.12  | 0.002 0    |
| 残差             | 1.800   | 5   | 0.360  |        |            |
| 失拟误差           | 1.610   | 3   | 0.540  | 5.66   | 0.153 8    |
| 纯误差            | 0.190   | 2   | 0.095  |        |            |
| 总和             | 154.560 | 14  |        |        |            |

<sup>†</sup> 模型的确定系数  $R^2=0.988\ 3$ ; 模型的调整确定系数  $R^2_{Adj}=0.967\ 4$ ; \*.差异显著 ( $P<0.05$ ); \*\*.差异极显著 ( $P<0.01$ ).

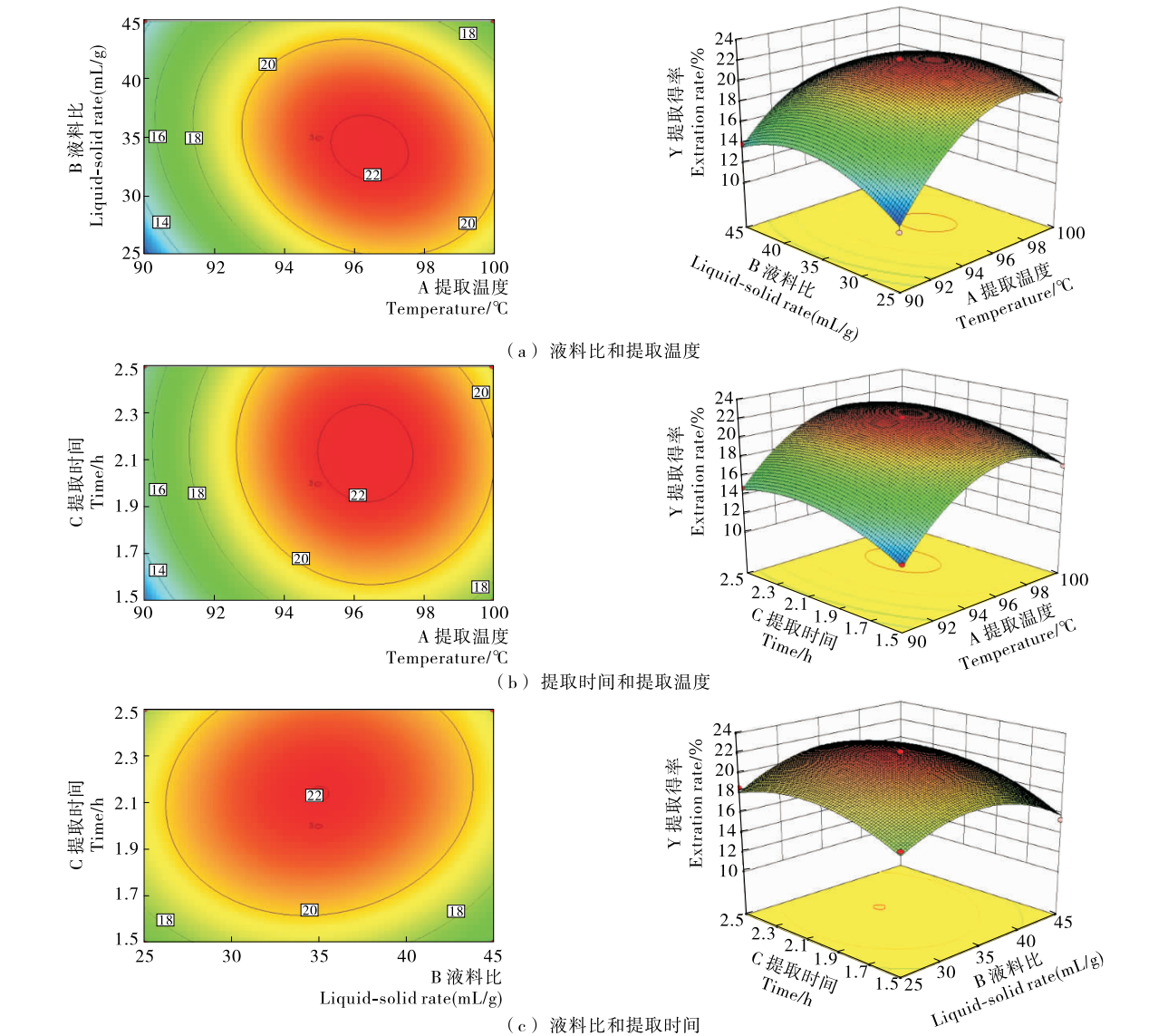


Figure 1 Response surface and contour plots for the interactive effects on the yield of RTP

由图 1(a)可知,提取温度和液料比之间交互作用显著(曲面较陡,等高线偏圆形),三叶青根多糖得率的变化随着液料比的变化小于提取温度的变化,说明这两者中受提取温度的影响较大;图 1(b)可知,提取温度和提取时间之间交互作用不显著(曲面较为平缓),两者中受提取温度的影响较大;图 1(c)可知,提取时间和液料比之间交互作用不显著(曲面较为光滑),两者中受提取时间的影响较大。试验因素中提取温度对三叶青多糖提取得率有显著影响,其次分别为提取时间和液料比,与表 3 结果一致。

通过 Design-Expert 8.06 处理结果得出三叶青根多糖的最佳提取工艺为提取温度 96.39 ℃、液料比 34.41 : 1 (mL/g)、提取时间 2.13 h,此条件下得到多糖最大得率为 22.32%。

2.1.3 验证实验 为了便于操作,将上述最佳提取工艺参数修正为:提取温度 96 ℃、液料比 34 : 1 (mL/g)、提取时间 2 h,进行提取验证实验,实验平行 3 次,所得三叶青根多糖提取得率为(21.23±0.77)%。与回归方程预测值的相对误差为 4.88%。说明回归模型比较合理可靠,能用于优化三叶青根多糖提取得率的预测。

2.2 三叶青根多糖的纯化

2.2.1 DEAE-52 阴离子交换柱层析 图 2 是三叶青根多糖 RTP 在 DEAE-52 离子交换柱中的洗脱曲线。由图 2 可知,分别在 NaCl 洗脱液浓度为 0.0,0.1,0.4 mol/L 时分离得到 3 个洗脱峰。分别收集至第 4~8 管、第 24~27 管、第 65~69 管多糖洗脱液,浓缩、透析 48 h、冻干得到各组分精制多糖,依次命名为 RTP-1、RTP-2、RTP-3。通过相关理化试验验证,结果发现 RTP-1 和 RTP-2 组分非常复杂,不利于其结构表征,因此本试验仅对 RTP-3 作进一步的分离纯化。

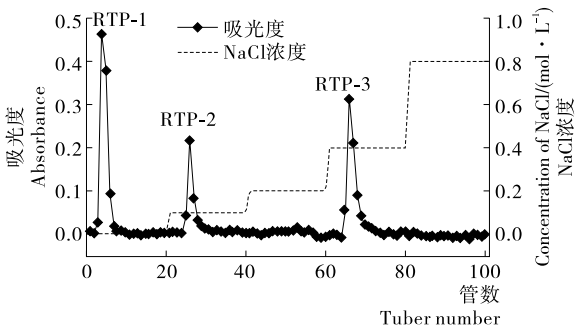


图 2 三叶青根多糖 RTP 在 DEAE-52 离子交换柱中的洗脱曲线

Figure 2 Elution curves of RTP in DEAE-52 ion exchange column

2.2.2 Sepharose CL-4B 凝胶柱层析三叶青根多糖 图 3 是 RTP-3 的 Sepharose CL-4B 色谱柱洗脱曲线。由图 3 可知,三叶青根多糖组分 RTP-3 经过 Sepharose CL-4B 凝胶色谱柱纯化得到的凝胶洗脱曲线为单一对称峰,初步判定 RTP-3 为均一多糖,收集峰对应管的洗脱液,蒸馏水透析 48 h,真空冷冻干燥后,得到三叶青根多糖纯品 RTP-3-1。

2.2.3 三叶青根多糖 RTP-3-1 的纯度鉴定及分子量测定 采

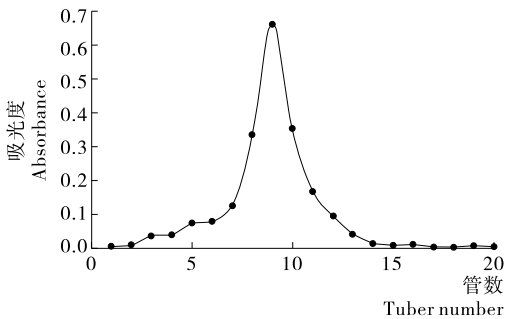


图 3 RTP-3 的 Sepharose CL-4B 色谱柱洗脱曲线  
Figure 3 Elution curve of RTP-3 on Sepharose CL-4B column chromatography

用 TSK gel G5000PWXL 凝胶柱,以葡聚糖系列( $M_w=4.32, 73.8, 289, 990, 3\,755$  kDa)为标准,结果见表 4。以保留时间( $t$ )为横坐标,标准葡聚糖分子量的对数  $\lg M_w$  为纵坐标,绘制相对分子质量的标准曲线,得到标准曲线  $\lg M_w = -0.767\,9t + 11.762, R^2 = 0.986\,2$ (见图 4)。由图 5 可知,三叶青根多糖 RTP-3-1 在 7.380 min 出现单一对称峰,说明 RTP-3-1 均一性较好,纯度较高,可进行结构分析;对照标准曲线,可求得三叶青根多糖 RTP-3-1 的计算相对分子量为 1 244.2 kDa。

2.3 紫外光谱

图 6 是三叶青多糖 RTP-3-1 水溶液在 190~400 nm 的扫描图谱。由于肽键的存在产生了 RTP-3-1 在 220 nm 处有强吸收,在 260 nm 无明显的吸收峰,表明 RTP-3-1 不含核酸或含微量核酸,同样在 280 nm 无明显的吸收峰,说明 RTP-3-1 不含蛋白质或含微量蛋白质。

表 4 葡聚糖分子量  $M_w$  及保留时间  $t$

| Table 4 The computed valued of glucose $M_w$ and $t$ |           |           |          |
|------------------------------------------------------|-----------|-----------|----------|
| 标准葡聚糖/kDa                                            | $M_w$ /Da | $\lg M_w$ | $t$ /min |
| 4.32                                                 | 4 320     | 3.635     | 10.697   |
| 73.80                                                | 73 800    | 4.868     | 8.874    |
| 289.00                                               | 289 000   | 5.461     | 7.975    |
| 990.00                                               | 990 000   | 5.996     | 7.524    |
| 3 755.00                                             | 3 755 000 | 6.575     | 6.961    |

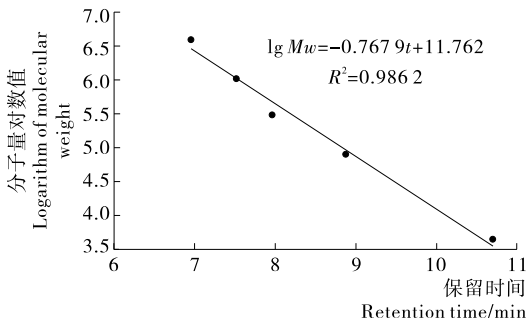


图 4 凝胶柱葡聚糖标准曲线

Figure 4 The HPGPC calibration curve of Dextran standards

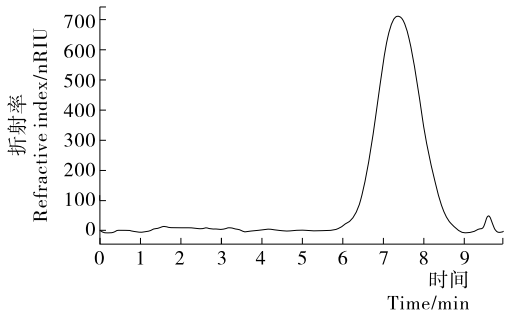


图 5 样品 RTP-3-1 的示差 HPGPC 图谱  
Figure 5 The RID HPGPC of RTP-3-1

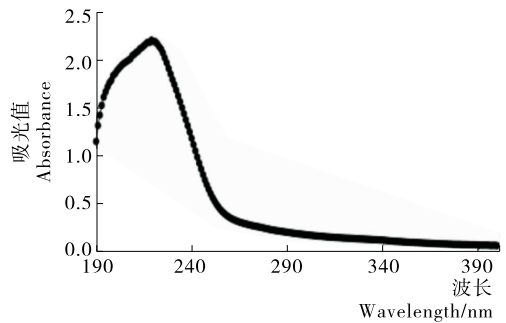


图 6 样品 RTP-3-1 的紫外光谱图  
Figure 6 UV spectrum of RTP-3-1

2.4 红外光谱

图 7 是三叶青根多糖 RTP-3-1 的红外图谱。由图 7 可知,3 414.76  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰为 O—H 的伸缩振动,2 928.75  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰为 C—H 的伸缩振动和变角振动;1 418.16  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰是羧基伸缩振动,这 3 个吸收峰为多糖的典型特征吸收峰,说明 RTP-3-1 为多糖。多糖的吡喃糖苷在 1 100~1 010  $\text{cm}^{-1}$  应有 3 个强吸收峰,而呋喃糖苷只有 2 个峰;(799  $\pm$  17)  $\text{cm}^{-1}$  的峰为呋喃环的特征吸收峰<sup>[16] 122[17]</sup>。RTP-3-1 在 796.40  $\text{cm}^{-1}$  处有吸收峰,且在 1 100~1 010  $\text{cm}^{-1}$  只有 2 个强吸收峰,说明 RTP-3-1 含有呋喃环,不含吡喃糖苷。在波长 1 635.89  $\text{cm}^{-1}$  处有明显的 C=O 的伸缩振动吸收峰,再加上 1 200~1 000  $\text{cm}^{-1}$  的 2 组 C—O—H 和糖环 C—O—C 的伸缩振动峰,说明 RTP-3-1 含有糖醛酸。

2.5  $^1\text{H-NMR}$  光谱

$^1\text{H-NMR}$  主要表征多糖结构中糖苷键构型。一般多糖

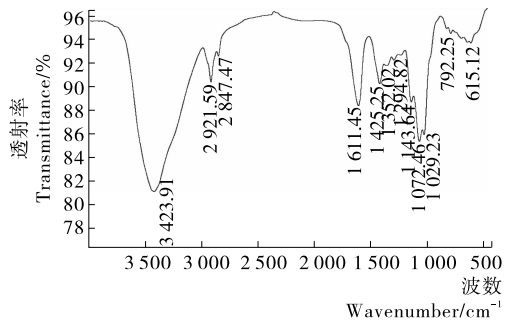


图 7 三叶青根多糖 RTP-3-1 的傅里叶红外光谱图  
Figure 7 Fourier transform infrared spectroscopy of RTP-3-1

的信号大多数集中在  $\delta$  4.0~ $\delta$  5.5。 $\text{C1}$  质子信号在  $\delta$  4.8~ $\delta$  5.5 易于解析,其他  $\text{C2}\sim\text{C6}$  信号在  $\delta$  4.0~ $\delta$  4.8,较集中,难以解析<sup>[18]</sup>。

三叶青根多糖 RTP-3-1 的  $^1\text{H-NMR}$  光谱图见图 8, $\delta$  5.3, $\delta$  5.2, $\delta$  5.1 为糖端基  $\text{C1}$  质子信号, $\delta$  4.6~ $\delta$  3.2 为糖非端基质子信号。化学位移  $\delta$  5.3, $\delta$  5.2, $\delta$  5.1,大于  $\delta$  5.0,表明其构型为  $\alpha$  型糖苷构型,由此可知 RTP-3-1 为  $\alpha$  型多糖。

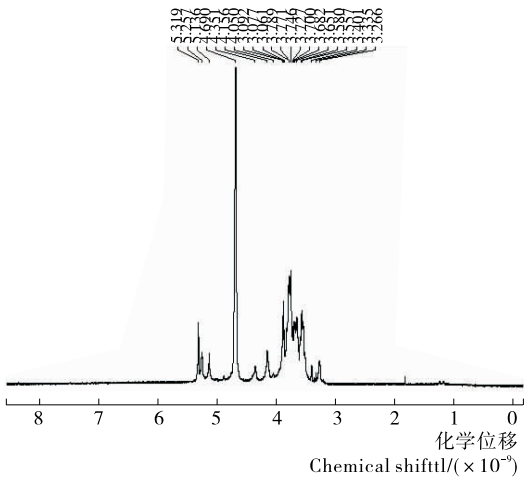


图 8 RTP-3-1 的  $^1\text{H-NMR}$  光谱图  
Figure 8  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of RTP-3-1

3 结论

本试验以三叶青根为原料,通过响应面试验优化了水浴法提取三叶青根中多糖工艺,得最佳工艺为:提取温度 96  $^{\circ}\text{C}$ 、液料比 34:1 (mL/g)、提取时间 2 h。在此条件下,三叶青根多糖提取得率为 (21.23  $\pm$  0.77)%,与黄有强<sup>[11]</sup>微波辅助法提取所得得率 14.36% 相比,提高了 47.84%,其中提取温度是影响三叶青根多糖提取的关键因素。三叶青根粗多糖经过 DEAE-52 离子交换柱层析,得到 3 种多糖组分 RTP-1、RTP-2、RTP-3。其中 RTP-3 经 Sepharose CL-4B 凝胶柱层析分级分离得到 RTP-3-1,经鉴定 RTP-3-1 是纯度较高的相对分子质量约为 1 244.2 kDa 的  $\alpha$  型酸性多糖,而 RTP-1 和 RTP-2 后续的相对分子质量测定和结构研究还需要进一步的凝胶柱层析分级分离分析。三叶青根多糖含量较丰富,多糖又具有多种生理活性功能,值得深入系统地研究和开发利用。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 2 123.  
[2] 中国医学科学院药物研究所. 中药志: 第二册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 219.  
[3] 丁富娟, 王悦, 李慧芬, 等. 三叶青实验研究概述[J]. 山东中医杂志, 2017(9): 816-818.  
[4] LI Qing-lin, XIN Wen-xiu, ZHONG Li-ke, et al. A study on the anti-tumor mechanism of total flavonoids from radix tetrastigmae against additional cell line based on COX-2-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(33): 54 304-54 319.

(下转第 210 页)

长,感官评分呈逐渐上升的趋势,当发酵时间为 42 h 时,感官评分达到最高,后随着发酵时间的延长,感官评分呈下降的趋势;当发酵时间不变时,随着酒曲添加量的增加,感官评分呈逐渐上升的趋势,当酒曲添加量为 3.5%时,感官评分到达最高;后随着酒曲添加量的增加,感官评分呈下降的趋势。等高线椭圆度较大,故发酵时间与酒曲添加量的交互作用对感官评分的影响显著。

2.3 最佳工艺条件的验证

由 Design-Expert 8.0.6 软件优化后得到的最优工艺参数为:浸米时间 1.0 h,浸米温度 63.03 ℃,发酵时间 42.17 h,酒曲添加量 4.42%,发酵温度 30.74 ℃,感官评分预测值为 96.01。考虑试验的可操作性,把浸米温度、发酵温度分别调整为 63,31 ℃,发酵时间 42 h、添加酒曲量 4.4%,实测感官评分为 95.3,与预测结果的相对误差仅有 0.74%。因此,采用响应面法优化后得到的黑米醪糟最优工艺条件符合实际。

3 结论

本研究用响应面法优化黑米醪糟发酵工艺条件,试验证明:浸米温度,酒曲添加量,发酵温度对发酵都有显著影响。酿造黑米醪糟最佳发酵工艺条件为:浸米时间 1.0 h,浸米温度 63 ℃,酒曲添加量 4.4%,发酵时间 42 h,发酵温度 31 ℃。所得产品的主要理化指标为:总糖 236.9 g/L,总酸 4.3 g/L,酒精度 1.39 g/100 mL,综合感官评分 95.30。饭粒呈紫红色、酿液呈深红色、透明有光泽;有黑米醪糟独特的滋味和气味,味浓甜,爽口,酒香浓郁;口感软糯,具有较高的营养价值。

黑米醪糟的研究突破了传统醪糟一直沿用糯米的固有

模式,采用极富营养价值的黑米为唯一原料生产醪糟,同时采用浸米水作为蒸饭洒水和淋饭用水,有效地减少了具有保健功能的黑色素的流失,增强了黑米醪糟的营养价值。期望此研究结果能对工业化大生产起到积极的指导作用。

参考文献

[1] 马洁. 浅谈黑糯酒生产工艺[J]. 四川食品与发酵, 2000(1): 41-42.

[2] 刘达玉, 马艳华, 王新惠, 等. 黑米酒的酿造及其品质分析研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 31(9): 86-89.

[3] 张清安, 史芳芳, 王袭, 等. 超声波处理对黑米酒中酚类物质, 颜色及抗氧化性的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(12): 1-6.

[4] 黄镭, 郑妍, 喻弘, 等. 黑米甜酒酿发酵工艺及主要指标变化规律的研究[J]. 中国酿造, 2013(7): 86-88.

[5] 吴素萍, 张惠玲. 黑米醪糟酒工艺条件的探讨[J]. 中国酿造, 2008(17): 78-81.

[6] 林良魁, 权美平. 黑米酒酿造工艺的优化[J]. 贵州农业科学, 2011, 34(12): 182-184.

[7] 万萍, 刘红, 唐玲, 等. 苦荞摊饭法甜型黄酒发酵工艺研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 181-185.

[8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 13662—2008 黄酒[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.

[9] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2012: 33.

[10] 万萍, 张宇, 杨兰, 等. 响应面法优化苦荞干黄酒主发酵工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(11): 1 185-1 191.

[11] 李彦坡, 黄高弟, 张阳, 等. 丁香杨梅果酒发酵工艺的优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 198-202.

(上接第 147 页)

[5] FENG Zheng-quan, HAO Wan-rong, LIN Xiao-yang, et al. Antitumor activity of total flavonoids from Tetrastigma hemsleyanum Diels et Gilg is associated with the inhibition of regulatory T cells in mice[J]. Oncotargets & Therapy, 2014, 7 (default): 947-956.

[6] SUN Yong, TSAO Rong, CHEN Fang, et al. The phenolic profiles of Radix Tetrastigma after solid phase extraction (SPE) and their antitumor effects and antioxidant activities in H22 tumor-bearing mice[J]. Food & Function, 2017, 8(11): 4 014-4 027.

[7] 董宜旋, 李静. 三叶青提取物抗人类免疫缺陷病毒活性研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016 (10): 2 173-2 175.

[8] ZHONG Liang-rui, CHEN Xian, WEI Ke-min. Radix tetrastigma hemsleyani flavone induces apoptosis in human lung carcinoma a549 cells by modulating the MAPK pathway[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2013, 14(10): 5 983-5 987.

[9] 饶君凤, 吕伟德, 倪承珠, 等. 离子色谱法测定三叶青多糖中单糖组成[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(12): 42-44.

[10] 章栋梁, 郭向莹, 余南静, 等. 多糖生物活性及应用研究新进展[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(9): 2 282-2 285.

[11] 黄有强. 微波辅助提取三叶青多糖工艺优化及其拮抗炎症细胞的研究[J]. 浙江中医杂志, 2017, 52(5): 384-385.

[12] 陈炼红, 杨丽珠, 索化夷, 等. 响应面法优化松茸多糖酶法提取工艺及其体外抗氧化性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(16): 23-28.

[13] 张青, 张天民. 苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J]. 山东食品科技, 2004, 6(7): 56-56.

[14] 穆文静, 杜玲, 扈瑞平, 等. 钝顶螺旋藻多糖 Seavage 法脱蛋白工艺的研究[J]. 内蒙古石油化工, 2011, 37(10): 1-4.

[15] 张小爽. 梭柄松苞菇多糖结构分析及其抗肿瘤活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 34.

[16] 谢建华. 青钱柳多糖的分离纯化与结构解析及其生物活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2007.

[17] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 309-326.

[18] 赵婷. 五味子多糖的分离纯化、结构表征及其活性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2009: 76-77.