

南瓜叶多糖提取工艺及抗氧化活性研究

张 强,王 锐,张京芳*

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

摘要:为充分开发利用我国丰富的南瓜叶资源,以南瓜干燥成叶为材料,以超声波辅助水提取法提取南瓜叶多糖,研究超声波功率、时间、温度、料液比对南瓜叶多糖得率的影响,以正交试验设计优化提取工艺,以DPPH自由基法、羟基自由基法和FRAP法测定南瓜叶多糖的体外抗氧化活性。结果表明,影响南瓜叶多糖得率各因素的主次顺序是超声波时间>功率>温度>料液比,最优提取工艺参数为时间25 min、温度65℃、料液比1:30、功率160 W,此工艺条件下南瓜叶多糖得率为12.54%。南瓜叶多糖对DPPH自由基 IC_{50} 为3.20 mg·mL⁻¹,对羟基自由基 IC_{50} 为2.63 mg·mL⁻¹,FRAP值为75.18 μmol TE·g⁻¹。

关键词:南瓜叶;多糖;超声波辅助提取;抗氧化活性

中图分类号:S713 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)06-0232-04

Extraction and Antioxidant Activity of Polysaccharide from Pumpkin Leaves

ZHANG Qiang, WANG Rui, ZHANG Jing-fang*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100 China)

Abstract: Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) is a popular food material in China, however, pumpkin leaves have not yet been industrially utilized although they are rich in protein, trace elements, carotenes, polyphenols and other nutritional or functional components. In order to utilize the pumpkin leaf resources, the ultrasonic assisted extraction of polysaccharide from dry mature pumpkin leaves and the antioxidant activity of the pumpkin leaf polysaccharides were investigated. The effects of ultrasonic power, extraction time, temperature, solid/liquid ratio on the pumpkin leaf polysaccharide extraction yield were studied and the extraction process was optimized by orthogonal experiment design. The antioxidant activities of the pumpkin polysaccharide *in vitro* were determined with DPPH free radical, hydroxyl free radical and FRAP methods. The results showed that the primary and secondary order of factors affecting the pumpkin leaf polysaccharide extraction yield is ultrasonic power > extraction time > temperature > solid/liquid ratio. The optimum extraction conditions were extraction time: 25 min, temperature: 65℃, material liquid ratio: 1:30, ultrasonic power: 160 W, from which the pumpkin leaf polysaccharide extraction yield reached 12.54%. The IC_{50} of pumpkin leaf polysaccharides on DPPH free radical was 3.20 mg·mL⁻¹, the IC_{50} on the hydroxyl free radical was 2.63 mg·mL⁻¹, and the FRAP value was 75.18 μmol TE·g⁻¹. Pumpkin leaf polysaccharide is worth to be further studied for its high extraction rate and antioxidant activity.

Key words:pumpkin leaf; polysaccharide; ultrasonic assistant extraction; antioxidant activity

南瓜(*Cucurbita moschata*)又称番瓜、金瓜,葫芦科南瓜属1年生草本植物。我国南瓜资源丰富,

约占世界产量的30%。南瓜果实富含氨基酸、蛋白质、纤维素及维生素等多种营养成分,还含有多种多糖等

收稿日期:2016-01-15 修回日期:2016-03-14

基金项目:国家林业局林业公益性行业专项(201304811)。

作者简介:张强,男,讲师,博士,研究方向:植物资源加工利用。E-mail:zhangjack2003@aliyun.com

*通信作者:张京芳,女,教授,博士,研究方向:食品科学。E-mail:z_jf008@163.com

功能活性成分,具有抗肿瘤、降血糖、降血脂及增强免疫等功能,日益受到重视^[1-2]。

南瓜嫩叶在部分国家和地区作为蔬菜食用。南瓜叶维生素 C 含量较高,热水烫漂可以有效保留 Vc^[3]。在 5 种南部非洲传统的深绿色叶菜中,南瓜叶的蛋白质含量和微量元素含量较高^[4]。但是大量南瓜老叶被丢弃,随着人们对生物资源开发利用的关注,对南瓜叶成分进行了一定研究工作。南瓜叶中粗脂肪、粗蛋白、Vc、K、Ca、Mg、Mn、Fe、Zn 等营养成分含量较高,同时含有胡萝卜素、酚类、黄酮、皂素、生物碱等活性成分^[1]。南瓜叶醇提物有较强的抗氧化作用,可延缓冷冻猪肉的油脂氧化和细菌感染^[5],南瓜叶水提物和醇提物都对大鼠肝脏损伤具有保护作用^[6]。

南瓜叶黄酮、蛋白质等已有研究,南瓜干叶黄酮得率可达到 2.89%^[7],粗蛋白含量很高,可达干叶质量 35% 以上,高于广泛用于生产叶蛋白制品的紫花苜蓿叶。南瓜叶蛋白的必需氨基酸含量丰富,从氨基酸平衡性来看,其营养价值优于大豆蛋白和紫花苜蓿叶蛋白,是一种值得开发利用的优质植物蛋白^[8]。

多糖是一类重要的生物活性物质^[9],在南瓜果实中含量较高且具有突出的生理功效^[10-11],有关南瓜叶多糖未见研究报道。微波辅助提取和超声波辅助提取技术可提高常规水提取多糖的效率,成为多糖提取技术研究的热点^[12-14]。为了充分开发南瓜叶资源,本研究以人们通常当作废弃物的南瓜成熟叶为试验材料,采用超声波辅助提取技术提取南瓜叶多糖,优化工艺参数,并测定南瓜叶多糖体外抗氧化活性,以期为南瓜叶资源的深入开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

南瓜叶样品于 2014 年 9 月采自西北农林科技大学猕猴桃试验站(陕西眉县,107.75°E,34.28°N),将南瓜叶去杂,阴干,粉碎,用石油醚(60~90°C)回流 2 次脱脂,抽滤,烘干。脱脂南瓜叶粉密封冷藏备用(含水率为 8.78%±1.31%)。

水溶性维生素 E(Trolox),97%,1,1-二苯基-2-三硝基苯基(DPPH,97%)购于 Sigma 公司(Sigma Chemical Co. St. Louis,美国),其他试剂购自上海医药集团和西安试剂厂,均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1800 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),SK2510LHC 数控超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 粗多糖制备 南瓜叶粉末石油醚回流脱脂后晾干—南瓜叶粉末按比例加水混合—超声波浸提—离心—上清液浓缩至原体积 1/3—Sevage 法除蛋白—活性炭脱色—3 倍体积醇沉—洗涤沉淀—冷冻干燥—南瓜叶粗多糖。

1.3.2 多糖得率测定 苯酚—硫酸法测定多糖含量^[13]。回归方程为: $y = 12.020x + 0.015\ 33, R^2 = 0.991\ 8$, 其中 y : 吸光度, x : 葡萄糖浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 线性范围 $0.01\sim 0.08\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。多糖得率计算公式为:

$$EY = (C \times V \times D) / (m \times 1000) \times 100\% \quad (1)$$

式中: EY : 多糖得率; C : 回归方程求得的稀释液中葡萄糖浓度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; V : 浸提液体积, mL ; D : 稀释倍数; m : 南瓜叶粉质量, g 。

1.3.3 提取工艺单因素试验与参数优化 研究温度、超声波功率、提取时间、液料比等参数对多糖得率影响。不同温度条件研究的其他试验条件设定为液料比 50, 功率 160 W, 超声波时间 25 min; 不同功率研究的其他条件设定为液料比 50, 温度 60°C, 提取时间 20 min; 不同时间研究的其他条件设定为功率 160 W, 液料比 50, 温度 60°C; 不同液料比研究的其他条件设定为: 提取时间 25 min, 温度 65 °C, 功率 160 W。选取超声波功率、超声波时间、浸提温度、液料比 4 因素, 利用 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验, 优化多糖提取工艺。

1.3.4 抗氧化活性测定 DPPH 自由基和羟基自由基清除活性基本按照文献^[15]方法测定, 仅将 DPPH 自由基溶剂改为 60% 乙醇, 多糖样品以水为溶剂。测定 IC_{50} 时多糖浓度梯度为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 6.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。选择线性较好的 1.0~5.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围数据作线性回归, 清除 DPPH 自由基的回归方程为 $y = 16.44x - 2.62, R^2 = 0.990$, 清除羟基自由基的回归方程为: $y = 17.41x + 4.17, R^2 = 0.978$ 。其中 y 为清除率 %, x 为样品浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。再由线性回归方程计算 IC_{50} 。FRAP 还原力测定按照李武^[16]等的方法测定, 样品抗氧化活性以 1 g 粗多糖达到的水溶性维生素 E (Trolox) 的抗氧化能力表示 ($\mu\text{mol TE} \cdot \text{g}^{-1}$)。

1.3.5 数据处理 所有试验进行 3 次平行试验, 计算标准差。采用 Excel 2007 统计数据, 采用正交设计助手软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 温度对得率的影响

温度为 65°C 时, 多糖得率最高, 当温度低于

65℃,多糖得率低,65℃以下多糖得率随温度的升高而提高,当温度高于65℃后随着温度上升,多糖得率逐渐下降(图1)。

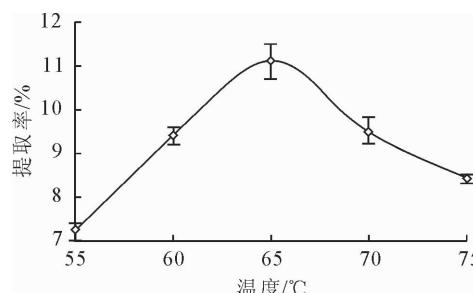


图1 温度对多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the polysaccharide extraction yield

2.2 超声波功率对得率的影响

南瓜叶多糖的得率随着超声波功率的增加先增大后减小,当功率为160W时多糖得率达到最大值,超过160W后,多糖得率明显下降(图2)。

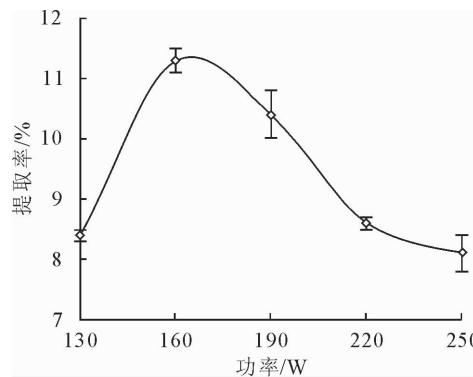


图2 功率对多糖得率的影响

Fig. 2 Effect of power on the polysaccharide extraction yield

2.3 提取时间对得率的影响

提取时间为25 min时,南瓜叶多糖的得率最高,随着提取时间延长,多糖得率先增后减,当时间短于25 min时,多糖提取不充分,提取时间超25 min,随着时间延长得率略有降低(图3)。

2.4 液料比对多糖得率的影响

液料比20~30,南瓜叶多糖得率显著增长,液料比超过30,多糖得率无明显提高(图4)。

2.5 提取工艺的参数优化

南瓜叶多糖提取影响因素的重要性顺序是浸提时间>超声波功率>浸提温度>液料比,超声波水提南瓜叶多糖的最佳工艺组合为A2B2C2D2,即超声波时间25 min、温度65℃、液料比30、超声波功率160 W。经3次试验验证,此条件下多糖得率达到12.54%±0.81%(表1)。方差分析表明,超声波时间和超声波功率对多糖得率影响极显著,温度对得率影响显著,液料比对得率无显著影响,与极差分析结果相符。

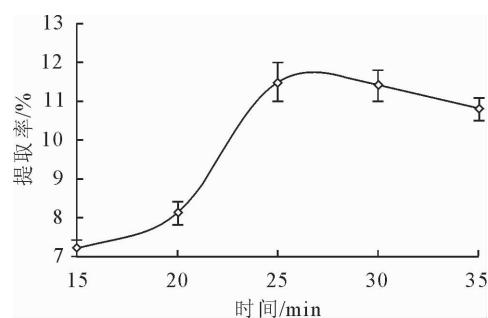


图3 提取时间对多糖得率的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on the polysaccharide extraction yield

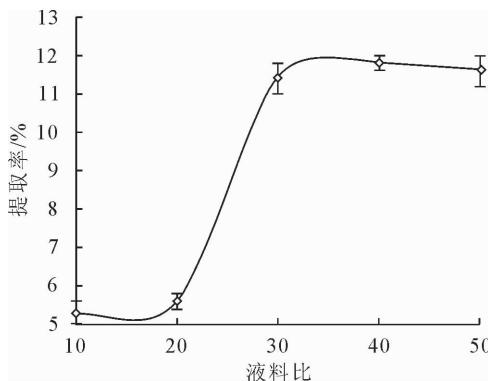


图4 液料比对多糖得率的影响

Fig. 4 Effect of liquid-solid ratio on the polysaccharide extraction yield

表1 不同因子协同对多糖收率的影响

Table 1 Results analysis of orthogonal experiments

序号	A(时间)/min	B(温度)/℃	C(液料比)/(mL·g⁻¹)	D(功率)/W	多糖得率/%
1	20	60	20	130	5.05
2	20	65	30	160	8.89
3	20	70	40	190	5.83
4	25	60	30	190	8.84
5	25	65	40	130	10.52
6	25	70	20	160	12.00
7	30	60	40	160	10.51
8	30	65	20	190	9.95
9	30	70	30	130	9.76
k_1	6.59	8.13	9.00	8.44	
k_2	10.45	9.79	9.16	10.47	
k_3	10.07	9.20	8.96	8.20	
R	3.86	1.65	0.21	2.27	
最优水平	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂	

2.6 南瓜叶多糖的体外抗氧化活性

采用常用的DPPH自由基法、羟基自由基法和FRAP法3种方法测定南瓜叶粗多糖(多糖含量51.59%)的抗氧化活性。南瓜叶多糖对DPPH自由基、羟基自由基有一定清除能力,具有一定的还原

力,且在特定的浓度范围内,具有量效关系,其中对DPPH自由基 IC_{50} 为 $(3.20 \pm 0.37) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,对羟基自由基 IC_{50} 为 $(2.63 \pm 0.26) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,FRAP值为 $(75.18 \pm 6.29) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 结论与讨论

南瓜叶多糖采用超声波辅助水提取法工艺简单,耗时短,得率高。经 25 min 超声波辅助提取,南瓜叶多糖得率可达到 12%,是南瓜叶除粗蛋白外得率最高的一类次生代谢物质。提取温度低于 65°C 多糖得率低,可能因为水的温度较低,浸泡时间短,南瓜叶细胞壁中纤维素、半纤维素等亲水性成分不能充分润胀,细胞壁保持着紧密的结构,导致一些分子量较大的多糖不能溶出;另一方面,低温下多糖的溶解度较低,也限制了多糖的提取。温度高于 65°C,多糖收率下降,可能因为在超声场中温度过高导致多糖被降解或破坏。超声波处理可以提高多糖收率,可能因为其产生的能量使介质的结构发生空间变化,使有效成分能快速进入溶剂中,同时超声波产生的空化效应还可进一步破坏细胞结构,进而促进细胞内的有效成分直接溶于溶剂并充分混合,最终实现较高的提取效率^[14]。但是与黄酮、酚类、生物碱等小分子物质不同,多糖的分子量大,糖苷键易水解,糖基也容易发生氧化反应破坏化学结构。在功率较强的超声场中变化更加明显^[17]。较长提取时间多糖得率略有下降,表明即使在较弱的超声波功率(160W)下,长时间的超声波作用,也对多糖的结构有一定影响^[17]。试验材料为南瓜干叶,含水率低,需要较高的液料比才能使植物材料充分润胀,利于多糖溶出。充足的水也能保证溶出的多糖溶解。当液料比过高,后续处理耗时长,耗能高,因此,应在保证得率的前提下尽量选择较低的液料比。南瓜叶粗多糖与南瓜粗多糖^[18]相比,对 DPPH 自由基和羟基自由基的 IC_{50} 均较小,表明南瓜叶粗多糖体外抗氧化活性强于南瓜多糖,值得深入研究。

生物活性与化学结构联系紧密,进一步开展南瓜叶多糖的纯化,分子量、糖基组成、糖苷键位置等结构信息,免疫活性测定分析等,将为南瓜叶多糖改性研究与产品开发奠定基础。

参考文献:

- [1] 罗双群,张桂红,陈海伟,等.南瓜功能特性研究进展[J].粮食与油脂,2012(4):47-49.
- [2] FU C L, SHI H, LI Q H. A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin [J]. Plant Food Hum. Nutr., 2006, 61 (2):73-80.
- [3] ARIAHU C C, ABASHI D K, CHINMA, C. E. Kinetics of ascorbic acid loss during hot water blanching of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) leaves [J]. J. Food Sci. Technol.-Mysore, 2011, 48 (4):454-459.
- [4] SCHONFELDT H C, PRETORIUS B. The nutrient content of five traditional South African dark green leafy vegetables-a preliminary study [J]. J. Food Compos. Anal., 2011, 24 (8): 1141-1146.
- [5] CHOE J H, KIM H Y, CHOI Y S, et al. Effects of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) leaf ethanolic extracts on lipid oxidation and microbial activity in refrigerated raw ground pork [J]. Korean J. Food Sci. Anim. Resour., 2011, 31 (6):865-871.
- [6] OBOH G. Hepatoprotective property of ethanolic and aqueous extracts of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) leaves against garlic-induced oxidative stress [J]. J. Med. Food., 2005, 8 (4):560-563.
- [7] 王晓华,邓斌,张晓军,等.南瓜叶黄酮类化合物提取条件的优化[J].化学工程师,2008 (12):1-3.
- [8] WANG X H, DENG B, ZHANG X J, et al. Optimization of extracting condition of flavonoids from pumpkin leaves [J]. Chemical Engineer, 2008 (12):1-3.
- [9] HUANG W, WU W B. Chemical evaluation and comparison of the nutritive value of leaf proteins from pumpkins (*Cucurbita moschata*) [J]. Food Research and Development, 2010(1):151-154. (in Chinese)
- [10] WARRAND, J. Healthy polysaccharides-The next chapter in food products [J]. Food Technol. Biotechnol., 2006, 44 (3):355-370.
- [11] MARAN J P, SWATHI K, JEEVITHA P, et al. Effects of polysaccharide from pumpkin on biochemical indicator and pancreatic tissue of the diabetic rabbits [J]. Int. J. Biol. Macromol., 2013, 62:574-581.
- [12] WANG X, ZHANG L S, DONG L L. Inhibitory effect of polysaccharides from pumpkin on advanced glycation end-products formation and aldose reductase activity [J]. Food Chem., 2012, 130 (4):821-825.
- [13] MARAN J P, SWATHI K, JEEVITHA P, et al. Microwave-assisted extraction of pectic polysaccharide from waste mango peel [J]. Carbohydr. Polym., 2015, 123:67-71.
- [14] 周郑坤,周文明,贺明宇,等.胖大海水溶性多糖的提取[J].西北林学院学报,2006,21(4):129-131.
- [15] ZHOU Z K, ZHOU W M, HE M Y, et al. Study on extraction of water-soluble polysaccharide of *Sterculia lychnophor* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(4):129-131. (in Chinese)
- [16] 刘婷,金瑞.超声波法提取西洋参多糖的工艺研究 [J].西北林学院学报,2014,29(3):174-177.
- [17] LIU T, JIN R. Technology of ultrasonic wave assisted extraction of polysaccharides from *Panax quinquefolium* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014, 29(3):174-177. (in Chinese)

- [8] 程建东,杜积贵.组合预测方法在电力负荷预测中的应用[J].江苏电机工程,2011,30(6):38-40.
CHENG J D, DU J G. The application of the combined forecasting method in the power load forecast [J]. Jingsu Electrical Engineering, 2011, 30(6):38-40. (in Chinese)
- [9] 张青.基于神经网络最优组合预测方法的应用研究[J].系统工程理论与实践,2001(9):90-93.
ZHANG Q. Application research on an optimal mix forecasting method based on ANN [J]. System Engineering Theory and Practice, 2001 (9):90-93. (in Chinese)
- [10] 陈华友.组合预测方法有效性理论及其应用[M].北京:科学出版社,2008.
- [11] 李际平,刘素青.基于最小偏差的林分生长组合预测模型及其应用[J].中南林业科技大学学报,2004,24(5):80-83.
LI J P, LIU S Z. Combinatorial model for predicting stand growth based on minimal deviation and its application [J]. Journal of Central South Forestry University, 2004, 24 (5): 80-83. (in Chinese)
- [12] 张雄清,雷渊才,陈新美.林分断面积组合预测模型权重确定的比较[J].林业科学,2011,47(7):36-41.
ZHANG X Q, LEI Y C, CHEN X M. Comparison of weight computation in stand basal area combined model [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2011, 47(7):36-41. (in Chinese)
- [13] 邓成.林分生长和收获模型整体化研究[D].长沙:中南林业科技大学,2009.
- [14] 黄新峰,亢新刚,孙玲,等.红松单木断面积生长模型[J].西北林学院学报,2011,26(3):143-146.
HANG X F, KANG X G, SU L, et al. Establishment of individual basal area growth model of Korean pine [J]. Journal of Northwest Forest University, 2011, 26 (3): 143-146. (in Chinese)
- [15] 葛宏立,孟宪宇,唐小明.应用于森林资源连续清查的生长模型系统[J].林业科学研究,2004,17(4):413-419.
GE H L, MENG X Y, TANG X M. Growth model system for continuous forest inventory [J]. Forest Research, 2004, 17 (4): 413-419. (in Chinese)
- [16] 葛宏立,项小强.年龄隐含的生长模型在森林资源连续清查中的应用[J].林业科学研究,1997(4):420-424.
GE H L, XIANG X Q. Application of the age-implicit growth model to continuous forest inventory [J]. Forest Research, 1997 (4): 420-424. (in Chinese)
- [17] 王霓虹,杨英奎,戴巍.基于Richards方程的落叶松人工林断面生长模型[J].森林工程,2015,31(1):22-25.
WANG N H, YANG Y K, DAI W. The basal area growth model of larch plantation based on Richards equation [J]. Forest Engineering, 2015, 31(1):22-25. (in Chinese)
- [18] 张雄清,雷渊才,陈新美,等.组合预测法在林分断面积生长预估中的应用[J].北京林业大学学报,2010,32(4):6-11.
ZHANG X Q, LEI Y C, et al. Application of forecast combination in prediction of stand basal area [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2010, 32(4):6-11. (in Chinese)
- [19] 张雄清.北京地区油松林分生长,枯损和进界模型的研究[D].北京:中国林业科学研究院,2012.
- [20] 胡德,郭刚正.最小二乘法、矩法和最大似然法的应用比较[J].统计与决策,2015(9):20-24.
- [21] 尹星露,肖先勇,孙晓璐.基于预测有效度和马尔科夫-云模型的母线负荷预测模型筛选与变权重组合预测[J].电力自动化设备,2015,35(3):114-119.
YIN X L, XIAO X Y, SUN X L. Bus load forecasting model selection and variable weights combination forecasting based on forecasting effectiveness and Markov chain-cloud model [J]. Electric Power Automation Equipment, 2015, 35(3):114-119. (in Chinese)
- [22] 毛开翼.关于组合预测中的权重确定及应用[D].成都:成都理工大学,2007.
- [23] JEONG D I, KIM Y O. Combining single-value streamflow forecasts-a review and guidelines for selecting techniques [J]. Journal of Hydrology, 2009, 377 (3): 284-299.

(上接第235页)

- [15] 张强,苏印泉,张京芳,杜仲叶不同萃取物抗氧化活性比较分析[J].食品科学,2011,32(13):23-27.
ZHANG Q, SU Y Q, ZHANG J F. Antioxidant activity of extracts of *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves [J]. Food Science, 2011, 32(13):23-27. (in Chinese)
- [16] 李武,李艳君,杨瑞丽.热带水果多酚提取物的抗氧化和抗增殖活性研究[J].现代食品科技,2013(10):2383-2387.
LI W, LI Y J, YANG R L. Antioxidant and antiproliferative activities of polyphenol extract from 12 tropical fruits [J]. Modern Food Science and Technology, 2013(10):2383-2387. (in Chinese)
- [17] 李坚斌,李琳,李冰,等.超声降解多糖研究进展[J].食品工业科技,2006(9):181-184.
LI J B, LI L, LI B, et al. Polysaccharides degraded by ultrasonic [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006 (9): 181-184. (in Chinese)
- [18] 刁文超,吴昊,杨绍兰,等.南瓜多糖的分离、纯化及抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2012,12(11):24-31.
DIAO W C, WU H, YANG S L, et al. study on the purification, separation, and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin [J]. Journal of Chinese Institute food Science and Technology, 2012, 12(11):24-31. (in Chinese)