



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103333268 A

(43) 申请公布日 2013.10.02

(21) 申请号 201310308437.7

(22) 申请日 2013.07.23

(71) 申请人 草本创想生物科技(成都)有限公司  
地址 610207 四川省成都市双流县西南航空  
港经济开发区创业中心

(72) 发明人 罗明锋 钟雨禅 张弘 李改丽

(74) 专利代理机构 成都立信专利事务所有限公  
司 51100

代理人 冯忠亮

(51) Int. Cl.

C08B 37/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

### (54) 发明名称

黑果枸杞多糖的制备方法

### (57) 摘要

本发明为提取制备黑果枸杞多糖的方法。解决已有方法未能充分利用原料,成本高,多糖收率低、活性差的问题。在制备过程中采用超微粉碎技术,将已提取过色素的黑果枸杞残渣进行粉碎,然后进行脱脂处理得到脱脂黑果枸杞粉末,脱脂粉末先经过酶解处理,再采用低温冻融技术,反复冻融3—7次,最后经过过滤、醇沉、脱蛋白处理、冻干等工序得到抗氧化活性黑果枸杞多糖成品。本发明以提取色素后的黑果枸杞废渣为原料,采用超微粉碎技术、低温冻融技术制备黑果枸杞多糖,收率高、活性强、成本低。

1. 黑果枸杞多糖的制备方法,其特征在于采用提取完色素的黑果枸杞废渣为原料,其制备步骤如下:

(1)将提取完色素的黑果枸杞残渣在 55℃以下干燥,用低温超微粉碎机进行粉碎,粉碎后的颗粒有 95% 以上颗粒通过 300 目药筛,

(2)取过筛后的黑果枸杞干燥粉末置于提取器皿中,加入 10—15 倍量石油醚萃取 1—3 次,每次 1—2 小时,过滤取滤渣,干燥,使石油醚挥发干净,得到脱脂粉末,

(3)将纤维素酶、果胶酶溶于 pH 为 4—6 缓冲溶液中,配制成质量百分浓度为 1.2%—3.0% 的纤维素酶、果胶酶混合溶液,所述缓冲液为柠檬酸、柠檬酸钠混合缓冲液,

(4)将步骤(2)中的脱脂粉末置于提取器中,加入 8—15 倍量纤维素酶、果胶酶混合溶液,在 45—65℃条件下恒温浸提 10—50min,得混合物,

(5)将步骤(4)中的混合物置于低温冰箱, —80℃快速冷冻 4—8min 后取出在室温下解冻,如此结冻—解冻反复循环 3—7 次,

(6)过滤步骤(5)中经过反复冻融处理的混合物,取滤液,

(7)旋转蒸发步骤(6)中的滤液,温度控制在 55—65℃,浓缩至滤液体积 8—12%得浓缩液,向浓缩液中缓缓加入 3—7 倍量无水乙醇,并不断搅拌,然后在 3—6℃,静置 8—16 小时,得醇沉液,

(8)离心步骤(7)中的醇沉液,收集沉淀,并以无水乙醇洗涤 2—5 次,然后冻干即得黑果枸杞多糖粗品,

(9)采用聚酰胺色谱柱法或 Sevag 法脱去黑果枸杞粗多糖中的蛋白质,然后浓缩到质量百分数 7—9%,真空冷冻干燥,得到黑果枸杞多糖。

## 黑果枸杞多糖的制备方法

### [0001] 技术领域：

本发明属于黑果枸杞深加工领域，与植物多糖的提取方法有关，尤其与以提取色素后的黑果枸杞残渣为原料制备抗氧化活性的黑果枸杞多糖的方法有关。

### [0002] 技术背景：

黑果枸杞是茄科(Solanaceae) 枸杞属(Lycium) 植物黑果枸杞的成熟果实。黑果枸杞蒙名为“乔诺英—哈尔马格”、藏药名“旁玛”。黑果枸杞味甘、性平，富含蛋白质、枸杞多糖、氨基酸、维生素、矿物质、微量元素等多种营养成分。其中所含的枸杞多糖具有调节免疫力、清除自由基、抑制肿瘤生长、延缓衰老、降血脂、降血糖和抗疲劳的作用，具有较大的开发利用价值和市场前景。

[0003] 枸杞多糖是植物多糖的一种，植物多糖是由许多相同或不同的单糖以  $\alpha$ —或  $\beta$ —糖苷键所组成的化合物，普遍存在于自然界植物体中，包括淀粉、纤维素、多聚糖、果胶等。由于植物多糖的来源广泛，不同种的植物多糖的分子构成及分子量各不相同，其相应的生物活性和作用也不尽相同。枸杞多糖主要来源于枸杞属植物枸杞、黑果枸杞等果实。

[0004] 目前植物多糖的常规提取方法包括水提醇沉法、微波提取法、酸碱分解提取法等，此外还包括超声波辅助提取、超滤法、超临界提取方法等新技术和新方法。常规方法大多需要经过高温处理，不利于保护多糖活性，而近年发展起来的新技术对设备要求较高，这无疑增加了多糖提取制备的成本。

[0005] 中国专利 CN101029088 公开了一种枸杞多糖的制备方法，该专利采用枸杞鲜果为原料，利用柱层析分离纯化枸杞多糖。整个工艺包括浸泡、破碎、提取、酶解、柱层析、醇沉、脱醇、干燥等工序，利用果胶酶处理提取液，提高了多糖纯度，但是所选酶较为单一，破碎为常规破碎，未能提高多糖收率和抗氧化活性，原料未充分利用。

### [0006] 发明内容：

本发明的目的是提供一种工艺简单、操作方便、成本低、多糖提取率高、多糖抗氧化活性强，黑果枸杞利用充分的黑果枸杞多糖的制备方法。

### [0007] 本发明是通过以下技术方案实现的：

黑果枸杞多糖的制备方法，采用提取完色素的黑果枸杞废渣为原料，其制备步骤如下：

(1) 将提取完色素的黑果枸杞残渣在 55℃ 以下干燥，用低温超微粉碎机进行粉碎，粉碎后的颗粒有 95% 以上颗粒通过 300 目药筛；

(2) 取过筛后的黑果枸杞干燥粉末置于提取器皿中，加入 10—15 倍量石油醚萃取 1—3 次，每次 1—2 小时，过滤取滤渣，干燥，使石油醚挥发干净，得到脱脂粉末；

(3) 将纤维素酶、果胶酶溶于 pH 为 4—6 缓冲溶液中，配制成质量百分浓度为 1.2%—3.0% 的纤维素酶、果胶酶混合溶液，所述缓冲液为柠檬酸、柠檬酸钠混合缓冲液；

(4) 将步骤(2)中的脱脂粉末置于提取器中，加入 8—15 倍量纤维素酶、果胶酶混合溶液，在 45—65℃ 条件下恒温浸提(温度过高酶会失去活性) 10—50min，得混合物；

(5) 将步骤(4)中的混合物置于低温冰箱，—80℃ 快速冷冻 4—8min 后取出在室温下

解冻,如此结冻—解冻反复循环 3—7 次;

(6) 过滤步骤(5)中经过反复冻融处理的混合物,取滤液;

(7)蒸发步骤(6)中的滤液,温度控制在 55—65℃,浓缩至滤液体积 8—12%得浓缩液,向浓缩液中缓缓加入 3—7 倍量无水乙醇,并不断搅拌,然后在 3—6℃,静置 8—16 小时,得醇沉液;

(8)离心步骤(7)中的醇沉液,收集沉淀,并以无水乙醇洗涤 2—5 次,然后冻干即得黑果枸杞多糖粗品,;

(9)采用聚酰胺色谱柱法或 Sevag 法脱去黑果枸杞粗多糖中的蛋白质,然后浓缩到质量百分数 7—9%,真空冷冻干燥,得到黑果枸杞多糖。

[0008] 超微粉碎能把原材料加工成微米甚至纳米级的微粉。超微粉碎技术能够极大的破坏细胞结构,甚至打破细胞壁,使存在于细胞内的多糖成分暴露出来,能够提高多糖提取率。同时,超微粉碎也可以改变提取物中多糖分子的分子量、糖苷键比例等,进而改变多糖提取物的水溶性、生物学特性等。

[0009] 植物多糖大多存在于植物细胞壁中,细胞壁主要由纤维素、半纤维素、果胶等物质构成,选用纤维素酶、果胶酶对中药材进行预处理,能够分解细胞壁成分,破坏细胞壁结构,产生局部坍塌、溶解、疏松,减少了提取时来自细胞壁、细胞间质的阻力,能加快有效成分溶出细胞的速率,提高提取效率。

[0010] 低温冻融过程中会由于细胞内外温度变化不均产生巨大温差,这种温差带来的热冲击效应能有效破坏细胞结构,进而使细胞内的多糖成分充分溶出,能有效提高多糖浸出率,且低温冻融提取过程始终在较低温度下进行,有效减少了多糖活性成分的损失。

[0011] 本发明采用超微粉碎技术对物料进行前处理,极大的降低了提取物粒度,增加了其与提取溶剂的接触面积,提高了多糖的溶出速度。本发明还辅以多种酶处理技术,促使果胶、纤维素等的分解,使多糖的提取更彻底,纯度更高。更为关键的是本发明最终使用低温冻融的方法破坏细胞结构,加速细胞内多糖成分的溶出,有效提高多糖活性和收率。

[0012] 本发明的优点如下:

1、本发明以提取过色素的黑果枸杞残渣为原料,充分利用了黑果枸杞,使其价值最大化,避免了不必要的浪费。为综合开发利用黑果枸杞提供了可行方法。

[0013] 2、本发明采用超微粉技术,提高了提取效率,降低了提取多糖的分子量,使制备的多糖抗氧化活性更高。与普通粉碎提取相比,在相同提取条件下,超微粉碎后提取,多糖的收率增加约 27%。超微粉碎后提取的多糖相比普通粉碎提取的多糖对 DPPH 自由基的清除率高 18.3%

3、本发明将纤维素酶、果胶酶溶于 pH 为 4—6 的缓冲溶液中,配制成浓度为 1.5% 的纤维素酶、果胶酶混合溶液,纤维素酶与果胶酶发生反应都需要适宜的 PH,最适 PH 值在 4—6 之间,使用该缓冲液能够提供稳定可靠的 PH 环境,有利于酶发挥最大作用,促使果胶、纤维素等的分解,使多糖的提取更彻底,纯度更高。

[0014] 4、本发明还采用了低温冻融技术,利用冻结—解冻过程中产生的热冲击效应破坏细胞结构,进而达到增加多糖收率和活性的目的。

[0015] 具体实施方式:

实施例 1:

1. 将提取完色素的黑果枸杞残渣干燥(55℃以下),用低温超微粉碎机进行粉碎,粉碎后的颗粒有95%以上颗粒通过300目药筛;
2. 取过筛后的黑果枸杞干燥粉末置于提取器皿中,加入10倍量石油醚萃取3次,每次1小时,过滤取滤渣,干燥,使石油醚挥发干净,得到脱脂粉末;
3. 将纤维素酶、果胶酶溶于pH为4缓冲溶液中,配制成质量百分浓度为2.0%的纤维素酶、果胶酶混合溶液,所述缓冲液为柠檬酸、柠檬酸钠混合缓冲液;
4. 将步骤(2)中的脱脂粉末置于提取器中,加入8倍量纤维素酶、果胶酶混合溶液,在45℃条件下恒温浸提10min,得混合物;
5. 将步骤(4)中的混合物置于低温冰箱(-80℃)快速冷冻6min后取出在室温25℃下解冻,如此结冻—解冻反复循环3次;
6. 过滤步骤(5)中经过反复冻融处理的混合物,取滤液;
7. 旋转蒸发步骤(6)中的滤液,温度控制在55℃,浓缩至滤液体积8%得浓缩液,向浓缩液中缓缓加入3倍量无水乙醇,并不断搅拌,然后在5℃,静置8小时醇沉;
8. 离心步骤(7)中的醇沉液,收集沉淀,并以无水乙醇洗涤2次,然后冻干即得黑果枸杞多糖粗品;
9. 采用聚酰胺色谱柱法或Sevag法脱去黑果枸杞粗多糖中的蛋白质,然后浓缩到质量百分数为7%,真空冷冻干燥,得到黑果枸杞多糖。

[0016] 实施例2:

1. 将提取完色素的黑果枸杞残渣干燥(55℃以下),用低温超微粉碎机进行粉碎,粉碎后的颗粒有95%以上颗粒通过300目药筛;
2. 取过筛后的黑果枸杞干燥粉末置于提取器皿中,加入15倍量石油醚萃取3次,每次2小时,过滤取滤渣,干燥,使石油醚挥发干净,得到脱脂粉末;
3. 将纤维素酶、果胶酶溶于pH为6缓冲溶液中,配制成质量百分浓度为1.5%的纤维素酶、果胶酶混合溶液,所述缓冲液为柠檬酸、柠檬酸钠混合缓冲液;
4. 将步骤(2)中的脱脂粉末置于提取器中,加入15倍量纤维素酶、果胶酶混合溶液,在65℃条件下恒温浸提50min,得混合物;
5. 将步骤(4)中的混合物置于低温冰箱(-80℃)快速冷冻6min后取出在室温27℃下解冻,如此结冻—解冻反复循环7次;
6. 过滤步骤(5)中经过反复冻融处理的混合物,取滤液;
7. 旋转蒸发步骤(6)中的滤液,温度控制在65℃,浓缩至滤液体积12%得浓缩液,向浓缩液中缓缓加入7倍量无水乙醇,并不断搅拌,然后在4℃,静置16小时醇沉;
8. 离心步骤(7)中的醇沉液,收集沉淀,并以无水乙醇洗涤5次,然后冻干即得黑果枸杞多糖粗品;
9. 采用聚酰胺色谱柱法或Sevag法脱去黑果枸杞粗多糖中的蛋白质,然后浓缩到质量百分数为9%,真空冷冻干燥,得到黑果枸杞多糖。

[0017] 实施例3:

1. 将提取完色素的黑果枸杞残渣干燥(55℃以下),用低温超微粉碎机进行粉碎,粉碎后的颗粒有95%以上颗粒通过300目药筛;
2. 取过筛后的黑果枸杞干燥粉末置于提取器皿中,加入12倍量石油醚萃取2次,每次

1.5 小时, 过滤取滤渣, 干燥, 使石油醚挥发干净, 得到脱脂粉末;

3. 将纤维素酶、果胶酶溶于 pH 为 5.5 缓冲溶液中, 配制成质量百分浓度为 2.8% 的纤维素酶、果胶酶混合溶液, 所述缓冲液为柠檬酸、柠檬酸钠混合缓冲液;

4. 将步骤(2)中的脱脂粉末置于提取器中, 加入 10 倍量纤维素酶、果胶酶混合溶液, 在 55℃ 条件下恒温浸提 40min;

5. 将步骤(4)中的混合物置于低温冰箱(-80 摄℃)快速冷冻 6min 后取出在室温 27℃ 下解冻, 如此结冻—解冻反复循环 4 次;

6. 过滤步骤(5)中经过反复冻融处理的物料, 取滤液;

7. 旋转蒸发步骤(6)中的滤液, 温度控制在 60℃, 浓缩至滤液体积 10% 得浓缩液, 向浓缩液中缓缓加入 4 倍量无水乙醇, 并不断搅拌, 然后在 3℃, 静置 12 小时醇沉;

8. 离心步骤(7)中的醇沉液, 收集沉淀, 并以无水乙醇洗涤 4 次, 然后冻干即得黑果枸杞多糖粗品;

9. 采用聚酰胺色谱柱法或 Sevag 法脱去黑果枸杞粗多糖中的蛋白质, 然后浓缩到质量百分数为 8%, 真空冷冻干燥, 得到黑果枸杞多糖。

#### [0018] 实验例 1 不同提取方法对黑果枸杞多糖提取率的影响

分别取 10g 黑果枸杞分别采用水提醇沉法、微波提取法、酶提取法、超微粉碎法以及本发明方法进行提取, 然后测定各自多糖得率, 如下表:

表 1 不同提取方法提取黑果枸杞多糖的收率

提取方法	水提醇沉	微波提取	双酶提取	超微粉碎提取	本发明
多糖收率	2.89%	3.05%	3.15%	3.66%	4.12%

#### 实验例 2 不同提取方法提取的黑果枸杞枸杞多糖对 DPPH 的清除效果

表 2 不同提取方法提取的黑果枸杞枸杞多糖对 DPPH 的清除率

提取方法	水提醇沉	微波提取	双酶提取	超微粉碎提取	本发明
清除率	37.5%	41.3%	45.6%	51.2%	72.1%

表 3 柠檬酸 — 柠檬酸钠缓冲液 (0.1mol/L) 配制比例

pH	0.1 mol/L 柠檬酸 ( mL )	0.1 mol/L 柠檬酸 钠 ( mL )	pH	0.1 mol/L 柠檬酸 ( mL )	0.1 mol/L 柠檬酸钠 ( mL )
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

备注: 柠檬酸  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , 相对分子质量 = 210.14 ; 0.1 mol/L 溶液为 21.01 g/L。

[0019] 柠檬酸钠  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 相对分子质量 =294.12 ; 0.1 mol/L 溶液为 29.41 g/L 。