

doi:10.16104/j.issn.1673-1891.2021.02.003

海西黑枸杞多糖酶法提取工艺研究及其体外抗氧化性分析

梅 丽¹, 舒 远¹, 傅小红^{1,2}, 李佳根¹, 王洁雪¹, 冉 琪¹,
刘雪琴¹, 胡 霞¹, 徐 坤^{1,3*}

(1.成都师范学院化学与生命科学学院,四川 成都 611130;2.功能分子结构优化与应用四川省高校重点实验室,四川 成都 611130;3.成都师范学院食品发酵研究所,四川 成都 611130)

摘 要:以青海海西黑枸杞为原料,用酶法辅助提取其中的多糖。对比果胶酶、木瓜蛋白酶和纤维素酶的辅助提取效果,以料液比、加酶量、酶解时间和酶解温度为因素进行单因素实验,考察其对黑枸杞多糖提取率的影响,利用响应面法进一步优化黑枸杞多糖提取工艺参数,并对提取的多糖进行体外抗氧化性分析。结果表明:(1)果胶酶辅助提取黑枸杞多糖的效果最好,最佳提取条件为料液比 1:35(g:mL)、加酶量 0.02 g、酶解时间 60 min、酶解温度 30 ℃,提取率达到最大值 26.60%,与模型方程理论预测值 26.90% 相对误差为 1.12%;(2)海西黑枸杞多糖对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基具有较强的清除作用。

关键词:黑枸杞;多糖;酶法提取;响应面;抗氧化活性

中图分类号:R284.2;TQ281 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2021)02-0015-08

Study on Enzymatic Extraction Process for Polysaccharides from Haixi Lycium Ruthenicum and Antioxidant Activity of the Extracted Polysaccharides

MEI Li¹, SHU Yuan¹, FU Xiaohong^{1,2}, LI Jiagen¹, WANG Jiexue¹, RAN Qi¹,
LIU Xueqin¹, HU Xia¹, XU Kun^{1,3*}

(1. College of Chemistry and Life Science, Chengdu Normal University, Chengdu, Sichuan 611130;

2. Sichuan Key Laboratory for Structural Optimization and Application of Functional Molecules, Chengdu, Sichuan 611130; 3. Food Fermentation Research Institute, Chengdu Normal University, Chengdu, Sichuan 611130; China)

Abstract: The polysaccharides are extracted from Lycium ruthenicum of Haixi by enzymatic extraction process. The pectinase, papain and cellulase are compared in the extraction effects of the polysaccharides. Single factor experiments are carried out with different ratios of material/water ratio, amounts of enzyme added, and times and temperatures for enzymatic hydrolysis, which is followed by response surface analysis of the developed mathematical model. The antioxidant activity of Lycium ruthenicum polysaccharides is determined by free radical-scavenging assay. The results show that the pectinase is the optimal one for the extraction of Lycium ruthenicum polysaccharides and the optimum condition are found to be hydrolysis at 30 ℃ for 60 min with a material/solvent ratio of 1:35 (g/mL) and the amount of enzyme of 0.02 g. Under these conditions, the model-predicted and experimentally measured values of polysaccharide yield are 26.90% and 26.60% respectively, revealing a relative error of only 1.12% between them. The Lycium ruthenicum polysaccharides have a better capacity to scavenge DPPH free radical and superoxide anion.

Keywords: Lycium ruthenicum; polysaccharides; enzymatic extraction process; response surface analysis; antioxidant activity

0 引言

黑枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr), 属茄科枸杞

属, 棘刺灌木类植物。分布于中国山西、宁夏、青海、新疆、甘肃和西藏的盐化沙漠地区, 主要产地为青海和新疆^[1]。黑枸杞是传统的药食两用功能性

收稿日期:2020-11-11

基金项目:地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201814389054)。

作者简介:梅丽(1980—),女,贵州遵义人,副教授,博士,研究方向:食品营养与健康。*通信作者:徐坤(1968—),女,四川西昌人,教授,学士,研究方向:食品科学与工程。

保健食品^[2-3]。特殊生长环境使黑枸杞具有丰富的生物活性成分。研究表明,黑枸杞果实中含有许多无机盐如 Zn、K、Ca、Mn、Na、Mg、Cu、Fe 等,黑枸杞中还含有多种保健物质,花色苷、花青素、多糖、原花青素和甜菜碱等^[4]。黑枸杞相对于红枸杞的营养价值更高^[5]。多糖是黑枸杞中重要的活性成分,由木糖、乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖等组成,具有提高免疫力、抗氧化、抗肿瘤、降血糖等生理功能^[6-10]。黑枸杞多糖的提取效率和质量对于进一步开发黑枸杞相关保健产品具有重要的意义。

目前多糖的提取方法主要有热水浸提、超声波辅助提取、微波提取、酶辅助提取等^[11-13]。秦培鹏^[14]采用热水浸提工艺提取猴头菌多糖,在料液比 1:15(g:mL)、浸提温度 80 ℃、浸提时间 2 h、浸提次数 2 次的最优条件下,猴头菌多糖的提取率为 8.87%,该方法不会对多糖产生破坏、成本较低,但实验所需时间长、提取率不高。郭毓菲等^[15]借助超声波法提取水溶性茯苓多糖,在超声波功率 200 W、料液比 1:34(g:mL)、超声时间 11 min 的最优提取条件下,茯苓多糖提取率为 2.08%。胡选生等^[16]采用微波辅助法提取毛酸浆果实多糖,在料液比 1:25(g:mL)、浸提时间 30 min、微波时间 120 s、物料粒度 100 目的最优条件下,毛酸浆多糖提取率为 5.51%,该方法污染少、提取速度快,但容易造成多糖的损坏。王雨东^[17]利用组合酶提取工艺提取虫草多糖,多糖提取率明显高于传统水提醇沉,25 种酶试剂提取醇沉多糖提取率较水提醇沉对照组提高 2.88%~57.44%,酶辅助提取法相对于其他提取方法,具有反应迅速、条件温和、提取率高、有利于保护产物活性和节能环保等特点。

在对黑枸杞多糖的提取中,酶辅助提取法少见报道。因此,本研究采用酶法辅助提取黑枸杞中的多糖,以多糖提取工艺的料液比、加酶量、酶解温度和酶解时间为因素进行单因素实验,利用响应面法优化多糖提取工艺条件,并对其体外抗氧化活性进行初步研究。旨在对黑枸杞多糖资源的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料:黑枸杞,产自青海省海西蒙古族藏族自治州,购于宁夏杞蕴商贸有限公司。

试剂:木瓜蛋白酶(6 000 μmol/(min·mg)),果胶酶(40 μmol/(min·mg)),纤维素酶(3 μmol/(min·mg)),Sigma;葡聚糖(cas 9004-54-0),阿拉

丁;葱酮(cas 90-44-8),adamas;1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)(cas 1898-66-4),罗恩试剂;菲咯嗪,Biochem;乙醇、硫酸、盐酸、邻苯三酚、铁氰化钾、三氯乙酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化亚铁、H₂O₂、七水合硫酸亚铁、水杨酸等均为分析纯。

仪器:JA3003 精密电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);DHG-9030A 电热恒温鼓风干燥箱(上海申光仪器仪表有限公司);FK-A 组织捣碎机(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);HC-2062 台式离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);HWS12 恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司);UV5000 紫外分光光度计(安徽皖仪科技股份有限公司);JH-ZLS-3 真空旋转浓缩仪(上海申光仪器仪表有限公司);S-3C pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 多糖提取工艺流程

黑枸杞→烘干→粉碎→过筛→酶水解→离心→取上清液→脱蛋白→抽滤→旋蒸→醇沉→离心→真空干燥→定容→测多糖含量。

1.2.2 原料处理

将黑枸杞放置于托盘中,在 60 ℃ 的烘箱中干燥 4 h 后用粉碎机粉碎,过 60 目筛,制得黑枸杞样品,装瓶备用。

1.2.3 酶处理对比

取 4 份 1.00 g 黑枸杞粉末,分为 4 组,1、2、3 组分别加入 0.01 g 果胶酶、木瓜蛋白酶、纤维素酶,第 4 组不添加酶作为对照。在料液比为 1:30(g:mL),酶解温度为 30 ℃,酶解时间为 60 min 相同条件下按照工艺流程进行提取,以黑枸杞多糖的提取率为指标,考察不同酶处理对黑枸杞多糖提取率的影响。

1.2.4 标准曲线的绘制

采用葱酮-硫酸法测定多糖含量^[18]。分别吸取 0.10 mg/mL 的葡聚糖标准液 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.80 mL,各以超纯水补至 1.00 mL 置于比色杯中。分别加入葱酮试剂 4.00 mL,静置 10 min,摇匀,室温放置 20 min 后于紫外-可见分光光度计 620 nm 波长处测吸光度,以 2.00 mL 蒸馏水按同样显色操作为空白,以葡聚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,如图 1 所示。标准曲线回归方程为 $y = 0.005 1 x + 0.079 5$ (x 为葡聚糖质量浓度(mg/mL), y 为吸光度), $r^2 = 0.999 7$,线性关系良好。

1.2.5 黑枸杞多糖提取率的测定

准确称取 1.00 g 黑枸杞样品置于 250 mL 锥形

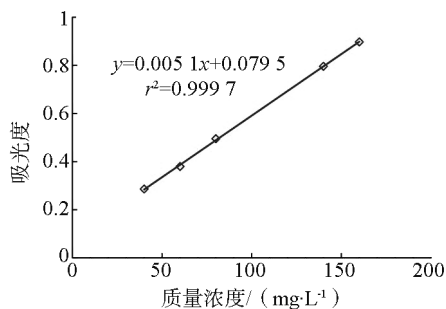


图 1 葡聚糖标准曲线

瓶中,加入一定比例去离子水,加入一定量的酶水浴加热并搅拌一定时间,经过抽滤得到黑枸杞滤液,用 HCl 溶液将滤液 pH 值调为 3 进行脱蛋白,常温过夜;24 h 后对所得溶液进行抽滤操作,得到滤液后再加入其 4 倍体积的乙醇溶液,在 4 ℃ 条件下醇沉过夜;24 h 后将溶液在转速 4 000 r/min 下离心 15 min,将离心后的提取液与洗涤液转移至 100 ml 容量瓶中定容,即为多糖提取液。取 1.00 mL 该多糖提取液于另一个 25 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度线,即为多糖提取稀释液。取 0.50 mL 稀释液显色后测定其吸光度,按照公式(1)计算多糖提取率。

$$W(\%) = (C \times V \times N \times 10^{-3}) / M \quad (1)$$

式中: W 为多糖提取率,%; C 为黑枸杞多糖质量浓度,mg/mL; V 为定容体积,mL; N 为稀释倍数; M 为样品质量,g。

1.3 黑枸杞多糖提取条件优化

1.3.1 单因素试验设计

以料液比(g:mL)、加酶量(以 1 g 黑枸杞样品为基准添加酶的质量,g)、酶解温度(℃)、酶解时间(min)为单因素,考察其对多糖提取率的影响。进行多次预试验后,采用表 1 中单因素试验条件。

表 1 单因素试验设计

单因素条件	固定提取条件
料液比(1:20、1:25、1:30、1:35、1:40)	加酶量为 0.01 g, 酶解温度为 30 ℃, 酶解时间为 60 min
加酶量(0.01、0.02、0.03、0.04、0.05)	料液比为 1:30(g:mL), 酶解温度为 30 ℃, 酶解时间为 60 min
酶解温度(20、25、30、35、40)	加酶量为 0.01 g, 料液比为 1:30(g:mL), 酶解时间 60 min
酶解时间(30、45、60、75、90)	加酶量为 0.01 g, 料液比为 1:30(g:mL), 酶解温度为 30 ℃

1.3.2 响应面试验设计

结合单因素试验结果,选择影响因素最大的 3 个因素,采用 3 因素 3 水平 Box-Behnken 型进行响

应面分析(表 2)。

表 2 响应面分析法的因素与水平

因素	水平		
	-1	0	1
料液比(g:mL)A	1:30	1:35	1:40
加酶量 B/g	0.01	0.02	0.03
酶解时间 C/min	45	60	75

1.4 黑枸杞多糖抗氧化活性试验

1.4.1 清除 DPPH 自由基能力的测定

配制一定梯度质量浓度的样品溶液。称取 7.886 mg DPPH 于烧杯中,用 75%乙醇溶解并定容至 250 mL 容量瓶中,配置成 0.08 mmol/L 的 DPPH 溶液,DPPH 溶液避光处理。在暗处,取 2.00 mL DPPH 溶液、2.00 mL 样品溶液于试管,混合、室温反应 30 min,测得 517 nm 波长的吸光度为 A_x ,以 2.00 mL 蒸馏水代替 DPPH 溶液,测定在 517 nm 波长处的吸光度为 A_{x0} ,以 2.00 mL、95%乙醇溶液代替样品溶液,测定在 517 nm 波长处的吸光值 A_0 ,并以相同质量浓度的抗坏血酸(Vitamin C, VC)溶液作阳性对照,试样平行试验 3 次,取平均值,按下式计算 DPPH 自由基清除率: DPPH 自由基清除率(%) = $[A_0 - (A_x - A_{x0})] / A_0 \times 100\%$ 。

1.4.2 清除超氧阴离子自由基能力的测定

采用邻苯三酚法,配制一定梯度质量浓度的样品溶液。称取 0.315 g 邻苯三酚,用蒸馏水溶解并定容至 100 mL 容量瓶中,配制 0.025 mol/L 的邻苯三酚溶液。分别取 4.50 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH=8.2)和 1 mL 样品溶液于试管中,置于 25 ℃ 水浴锅中保温 20 min,再加入 0.40 mL 0.025 mol/L 邻苯三酚溶液,混匀后于 25 ℃ 水浴中反应 5 min,加入 1.00 mL 0.08 mol/L HCl 溶液终止反应,于 325 nm 波长处测定吸光度 A_x ,空白对照组用 1 mL 蒸馏水代替样品溶液,测吸光度为 A_0 ,样品溶液本底的吸光度 A_{x0} ,并以相同质量浓度的 VC 水溶液作阳性对照。试样平行试验 3 次,取平均值。按下式计算超氧阴离子自由基清除率:超氧阴离子自由基清除率(%) = $[A_0 - (A_x - A_{x0})] / A_0 \times 100\%$ 。

1.4.3 清除羟自由基能力的测定

采用水杨酸法,配制一定梯度质量浓度的样品溶液。称取 0.311 g 水杨酸于烧杯,用 75%乙醇溶解并定容至 250 mL 容量瓶中,配置成 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液。称取 0.628 g 七水合硫酸亚铁,用 75%乙醇溶解配置 250 mL、9 mmol/L $FeSO_4$ 溶液。取 1.00 mL 30% H_2O_2 ,稀释 1 000 倍,制得 8.8 mmol/L H_2O_2

溶液。取 1.00 mL 9 mmol/L FeSO_4 溶液, 2.00 mL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液, 2.00 mL 样品溶液, 2.00 mL 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液。 H_2O_2 最后添加, 用于启动反应, 将反应体系至于 37 °C 水浴锅中反应 30 min, 在 510 nm 波长处测定吸光度值为 A_x , 以 2.00 mL 蒸馏水替代样品溶液, 测得吸光值 A_0 , 以 2.00 mL 蒸馏水代替 H_2O_2 溶液, 测吸光值 A_{x_0} , 以相同质量浓度的 VC 水溶液作阳性对照, 试样平行试验 3 次, 取平均值, 按下式计算羟自由基清除率: 羟自由基清除率 (%) = $[A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0 \times 100\%$ 。

1.4.4 还原能力的测定

配制一定梯度质量浓度的样品溶液, 取样品溶液 1.00 mL 加入试管中, 加入 0.20 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH = 6.6) 2.50 mL 和 1% 的铁氰化钾溶液 2.50 mL, 反应液于 50 °C 水浴保温 20 min, 再加入 10% 三氯乙酸溶液 2.50 mL, 混合溶液 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 2.50 mL 于试管, 加入 2.50 mL 蒸馏水和 0.50 mL 0.1% 的三氯化铁溶液混匀, 在 700 nm 波长处测吸光度 A。并以相同质量浓度的 VC 水溶液作阳性对照。

1.4.5 对金属离子的螯合能力的测定

配制一定梯度质量浓度的样品溶液。称取 0.123 g 菲咯啉, 用 75% 乙醇溶解并定容至 50 mL 容量瓶中, 配置成 5 mmol/L 菲咯啉溶液。取 1.00 mL 样品溶液与 4.70 mL 蒸馏水以及 0.10 mL 2.00 mmol/L FeCl_2 溶液, 混合后加入 0.20 mL 5 mmol/L 菲咯啉溶液混匀, 室温静置反应 20 min, 于 562 nm 波长下测得吸光值为 A_x , 用 1.00 mL 蒸馏水取代样品溶液, 测得吸光度为 A_0 , 取 1.00 mL 样品溶液于试管, 加入 5.00 mL 蒸馏水, 测得吸光度为 A_{x_0} 。按下式计算金属离子螯合率: 金属离子螯合率 (%) = $[A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0 \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 酶种类的筛选

在相同条件下提取, 酶的添加可以显著提高多糖的提取率, 而其中果胶酶组表现更突出, 黑枸杞多糖提取率可以达到 24.25% (图 2)。究其原因应该是果胶酶能够有效地分解果胶从而破坏细胞壁, 使多糖溶出。因此, 本研究选用果胶酶来辅助提取黑枸杞多糖。

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比对黑枸杞多糖提取率的影响

料液比从 1:20 (g:mL) 升高到 1:35 (g:mL), 多糖的提取率呈现增加趋势, 这是因为溶液在料液比

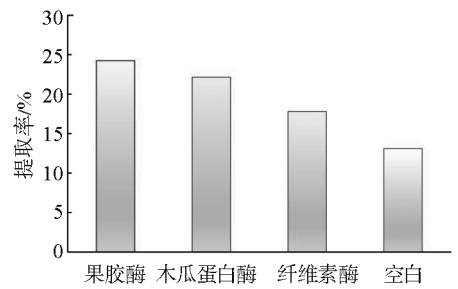


图 2 不同酶对黑枸杞多糖提取率的影响

较高时较为黏稠, 与此同时细胞内外多糖的浓度差较小, 多糖不易于溶出; 而随着不断地稀释使得溶液黏度降低, 黑枸杞多糖分子间间隔增大, 有利于黑枸杞多糖的提取^[19]。当料液比为 1:35 (g:mL) 时, 黑枸杞多糖的提取率表现为最大值, 之后随着进一步稀释, 黑枸杞多糖的提取率反而下降了 (图 3), 其原因可能是如此稀的环境中高分子间相互作用力阻碍了黑枸杞多糖的溶出。因此, 本研究选用料液比 1:30、1:35、1:40 (g:mL) 进行响应面试验。

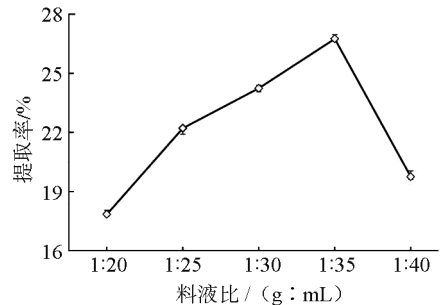


图 3 料液比对多糖提取率的影响

2.2.2 加酶量对黑枸杞多糖提取率的影响

在 100 g 黑枸杞样品的基础上, 当加酶量从 0 g 增至 0.02 g 时, 黑枸杞多糖提取率呈现上升的趋势, 加酶量为 0.02 g 时, 黑枸杞多糖的提取率出现最大值, 其原因可能是随着溶液中酶浓度的提高, 酶与底物充分反应, 大量黑枸杞多糖被溶解出来。当加酶量从 0.02 g 增至 0.04 g 时, 黑枸杞多糖提取率逐渐降低 (图 4), 这可能是因为多糖发生降解的缘故^[19]。因此, 本研究选用加酶量 0.01、0.02、0.03 g 进行响应面试验。

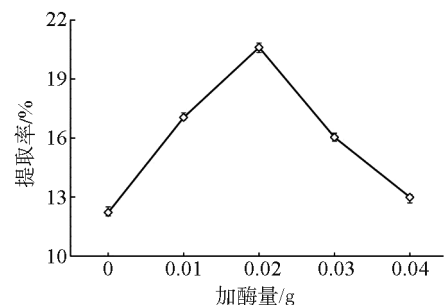


图 4 加酶量对多糖提取率的影响

2.2.3 酶解温度对黑枸杞多糖提取率的影响

酶解温度从 20 ℃ 增至 30 ℃ 时, 黑枸杞多糖提取率呈现一种上升的趋势, 当酶解温度达到 30 ℃ 时, 黑枸杞多糖提取率出现最大值, 之后, 随着酶解温度的上升, 黑枸杞多糖的提取率反而减小(图 5)。这是因为当酶解温度较低时, 随着酶解温度的增加, 酶的活性增强导致黑枸杞多糖大量溶出。当酶解温度增加到一定值时, 破坏了果胶酶的生物活性, 黑枸杞多糖提取率减小^[19]。因此, 本研究选用酶解温度 30 ℃ 进行响应面试验。

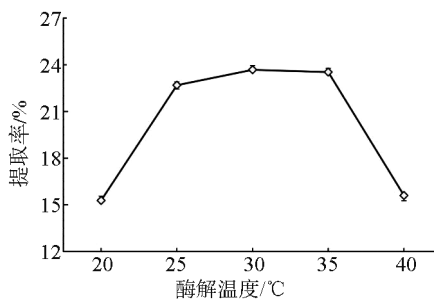


图 5 酶解温度对多糖提取率的影响

2.2.4 酶解时间对黑枸杞多糖提取率的影响

酶解时间由 30 min 增至 60 min, 黑枸杞多糖提取率呈现上升的趋势, 在 60 min 时出现提取率的最大值; 而酶解时间继续增加, 黑枸杞多糖提取率降低(图 6)。因为酶解前期随着酶解时间的提高, 底物与酶接触充分, 促进了黑枸杞多糖溶出, 从而提取率上升; 但酶解时间继续增加, 底物与酶接触达到饱和, 反而会造成多糖的溶解^[19]。因此, 本研究选用酶解时间 45、60、75 min 进行响应面试验。

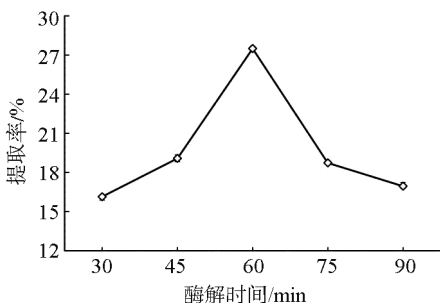


图 6 酶解时间对多糖提取率的影响

2.3 响应面法优化工艺参数

2.3.1 响应面设计方案

结合单因素试验, 选取料液比(A)、加酶量(B)和酶解时间(C) 3 个因素为自变量, 响应值选用黑枸杞多糖提取率(Y), 通过软件实行响应面设计, 共包括 17 组。响应面设计方案及响应值结果如表 3 所示。

表 3 响应面设计方案及响应值结果

试验号	A (g:mL)	B/g	C/min	Y/%
1	1:40	0.01	60	23.65
2	1:30	0.02	45	13.20
3	1:35	0.01	45	14.30
4	1:35	0.02	60	26.55
5	1:35	0.01	75	11.25
6	1:35	0.02	60	27.85
7	1:35	0.02	60	25.40
8	1:35	0.02	60	29.05
9	1:35	0.02	60	26.90
10	1:40	0.02	45	22.35
11	1:30	0.02	75	13.20
12	1:30	0.01	60	18.25
13	1:35	0.03	75	11.05
14	1:30	0.03	60	19.25
15	1:40	0.03	60	19.40
16	1:35	0.03	45	19.38
17	1:40	0.02	60	14.35

为了考察黑枸杞多糖的提取因素和交互作用对提取工艺产生的影响, 多元回归拟合采用表 3 中的数据进行, 由此可以获得黑枸杞多糖提取率(Y)对料液比(A)、加酶量(B)、酶解时间(C)的二次多项式回归方程:

$$Y = 26.46 - 0.26A + 0.2B - 3.79C - 1.31AB - 4.74AC - 1.32BC - 4.94A^2 - 2.25B^2 - 9.35C^2$$

2.3.2 回归模型的建立及方差分析

表 4 回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	505.67	9	56.19	4.230	0.035	3 *
A	0.44	1	0.44	0.033	0.861	0
B	0.33	1	0.33	0.025	0.878	9
C	80.99	1	80.99	6.090	0.042	9 *
AB	6.89	1	6.89	0.520	0.494	9
AC	48.81	1	48.81	3.670	0.096	9 *
BC	6.97	1	6.97	0.520	0.492	5
A ²	94.83	1	94.83	7.130	0.032	0 *
B ²	19.04	1	19.04	1.430	0.270	4
C ²	291.71	1	291.71	21.950	0.002	2 * *
误差	93.05	7	13.29			
失拟性	85.46	3	28.49	15.02	0.012	1 *
纯误差	7.59	4	1.90			
合计	598.71	16				

注: “*”表示差异有统计学意义($P < 0.05$), “* *”表示差异极有统计学意义($P < 0.01$)。

通过方差分析及相关系数可以检测模型可靠性, 本试验采用 F 检验方法对模型的显著性进行分

析, P 值越小表明对应因素的显著水平越高。从表 4 得出, 整体模型 P 为 0.035 3, P 值小于 0.05, 可知该二次方程模型显著, 用来预测黑枸杞多糖提取率, 优化提取工艺条件是可行的。酶解时间较显著, 料液比和加酶量不显著。按照对提取率的影响程度进行排序: 酶解时间 (C) > 料液比 (A) > 加酶量 (B)。

2.3.3 响应面的曲面分析

通过对影响黑枸杞多糖提取率各因素之间的交互作用进行分析, 获得响应面分析图和等高线分析图。响应面分析图中, 坡度越大相应因素对多糖提取率影响程度也越强, 等高线表现为椭圆形代表两因素之间交互作用显著, 呈现圆形说明交互作用不显著^[20]。通过响应面曲线图可以清晰看出提取率被各因素之间交互作用的程度, 可以获得提取工艺的最优条件。

图 7 是加酶量和料液比在酶解时间取 60 min 时的交互作用响应面分析。当加酶量不变时, 随着料液比逐渐增加, 黑枸杞多糖的提取率会呈现先升高后减小的趋势, 当料液比不变时, 黑枸杞多糖提取率会随着加酶量的增大呈现先上升后减小。在料液比为 1:35 (g:mL), 加酶量为 0.02 g 时, 黑枸杞多糖提取率达到最高。从等高线图 (图 7b) 可以看出图形偏圆形, 表明料液比和加酶量交互作用不显著。从响应面图 (图 7a) 可以看出, 响应面曲线坡度不明显, 说明料液比和加酶量对多糖提取率影响较小。

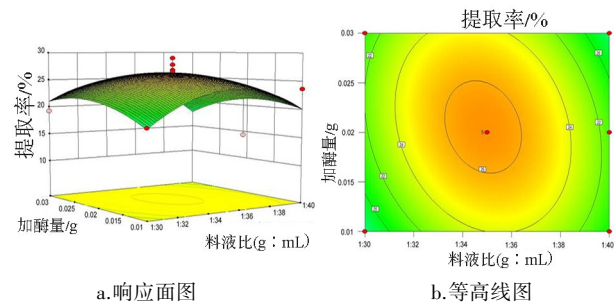


图 7 料液比和加酶量对多糖提取率的交互影响分析

图 8 是当加酶量为 0.02 g 时, 料液比和酶解时间的交互作用响应面分析图。当酶解时间不变时, 随着料液比的增加黑枸杞多糖的提取率先升高后减小, 当料液比不变时, 黑枸杞多糖提取率随着酶解时间的增大呈现先升高后减小。黑枸杞多糖提取率在料液比为 1:35 (g:mL), 酶解时间为 60 min 时为最大值。由等高线图 (图 8b) 可以看出加酶量和酶解时间交互作用显著。从响应面图 (图 8a) 可以看出, 酶解时间比料液比对多糖提取率影响较大。

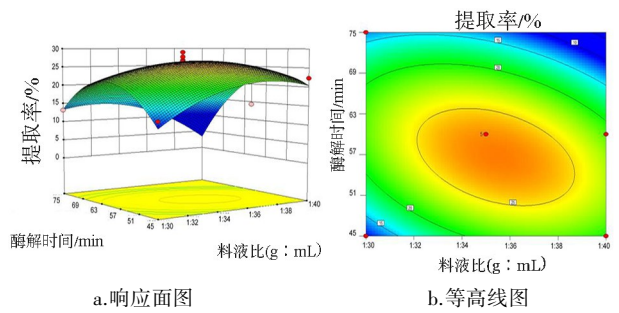


图 8 料液比和酶解时间对多糖提取率的交互影响分析

图 9 是当料液比取 1:35 (g:mL) 时, 加酶量和酶解时间的交互作用响应面分析图。当加酶量不变时, 随着酶解时间的增加黑枸杞多糖的提取率先升高后减小, 当酶解时间不变时, 随着加酶量的增大黑枸杞多糖提取率呈现先升高后减小。在加酶量为 0.02 g, 酶解时间为 60 min 时, 黑枸杞多糖提取率达到最高。加酶量和酶解时间交互作用从等高线图 (图 9b) 表现为显著。从响应面图 (图 9a) 可以看出, 酶解时间比加酶量对多糖提取率影响较大。

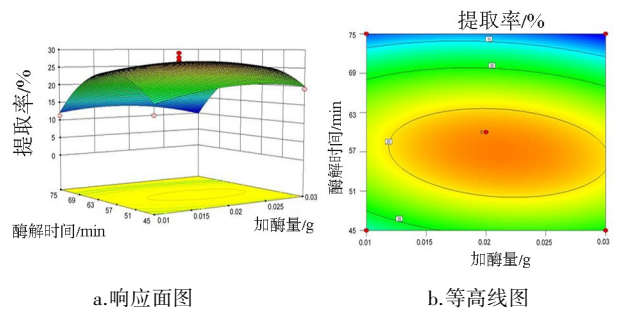


图 9 加酶量和酶解时间对多糖提取率的交互影响分析

2.3.4 确定最优值和回归模型的验证

在酶解温度 30 ℃ 条件下, 结合回归模型数学分析, 得到酶辅助提取黑枸杞多糖的提取工艺的最优条件为料液比 1:35.36 (g:mL)、加酶量 0.020 9 g、酶解时间 56.58 min, 黑枸杞多糖提取率的预测值为 26.90%。

结合现实条件, 将最优提取工艺条件修正为料液比 1:35 (g:mL)、加酶量 0.02 g、酶解时间 60 min, 在此条件下进行 3 次平行试验, 测得黑枸杞多糖提取率为 26.60%, 与模型理论预测值 26.90% 相对误差为 1.12%。因此, 响应面分析方法优化得到的最优工艺条件与实际拟合较好证明该模型的可行性。

2.4 黑枸杞多糖的抗氧化活性

2.4.1 对 DPPH 自由基清除能力

枸杞多糖对 DPPH 自由基表现出较强的清除能力, 且清除率随多糖质量浓度的增大而增大, 但都小于 VC 的清除能力 (图 10)。

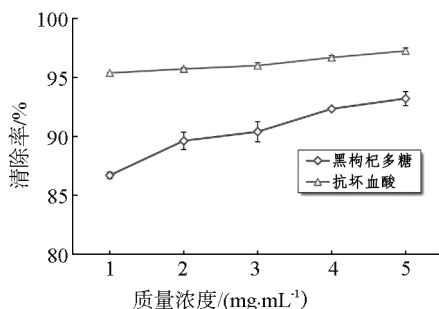


图10 黑枸杞多糖对DPPH自由基的清除率

2.4.2 对超氧阴离子自由基清除能力

由图11可看出,枸杞多糖对超氧阴离子自由基具有良好的清除能力,且表现出较好的剂量依赖关系,对超氧阴离子自由基的清除率随多糖质量浓度的增大而增大。当多糖质量浓度达到5 mg/mL时,枸杞多糖对超氧阴离子自由基的清除率达到63.21%。

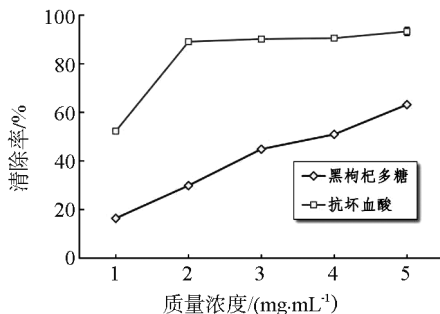


图11 黑枸杞多糖对超氧阴离子自由基清除率

2.4.3 对羟自由基清除能力

由图12可看出,枸杞多糖对羟自由基具有一定的清除能力。

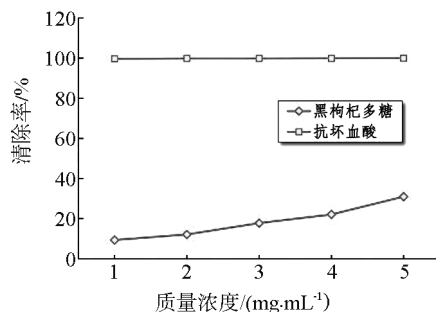


图12 黑枸杞多糖对羟自由基清除率

2.4.4 还原能力

还原能力与吸光度呈正相关,吸光度越大说明

还原能力越强。由图13可看出,枸杞多糖具有一定的还原能力,且还原能力随质量浓度的增大而增大,当多糖质量浓度达到5 mg/mL时,枸杞多糖的吸光度为0.95。

2.4.5 对金属离子的螯合能力

由图14可看出,枸杞多糖对金属离子的螯合能力较低。在1~5 mg/mL的质量浓度范围内,枸杞多糖对金属离子的螯合能力处于较低水平且趋于平缓。

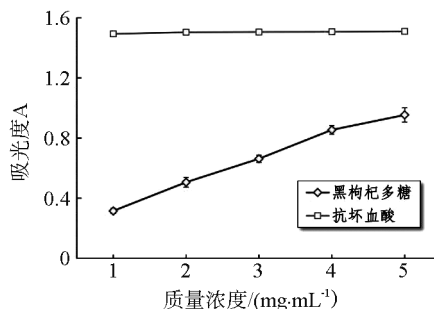


图13 黑枸杞多糖的还原能力

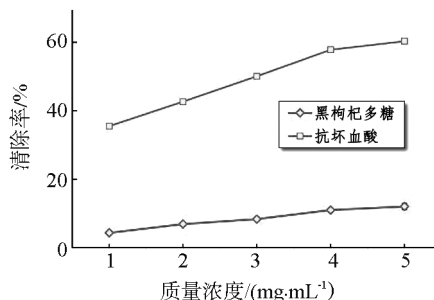


图14 黑枸杞多糖对金属离子的螯合能力

3 结论

果胶酶辅助提取青海海西黑枸杞多糖的最佳提取条件为:料液比1:35(g:mL)、加酶量0.02 g、酶解时间60 min、酶解温度30℃,提取率为26.6%。海西黑枸杞多糖对DPPH自由基和超氧阴离子自由基具有较强的清除作用;对羟自由基具有一定的清除作用;具有一定的还原能力和金属离子螯合能力。因此,果胶酶辅助提取海西黑枸杞多糖的工艺高效、简单,且提取得到的多糖具有较好的体外抗氧化活性。本试验的研究结果为今后黑枸杞多糖相关产品的开发利用提供了一定的参考和依据。

参考文献:

- [1] 柴国贤.软黄金:青海野生黑枸杞[J].中国检验检疫,2013(12):45-45.
- [2] 益康.野生黑枸杞的功效[J].污染防治技术,2016,29(3):98-98.
- [3] 楼舒婷.黑果枸杞的活性成分和挥发性组分研究[D].杭州:浙江大学,2015.
- [4] 杨斌,王向未.黑枸杞及其功能性成分在食品工业中的应用及开发进展[J].轻工科技,2014,30(10):22-23.

- [5] 孙晓红,王潼,吕康文,等.野生黑枸杞与普通红枸杞营养成分和相关活性物质的分析与评价[J].营养学报,2016,38(5):509-511.
- [6] SHAHRAJABIAN M H, KHOSHKHARAM M, SUN W, et al. A review of three ancient Chinese herbs, goji berry, ginger and ginseng in pharmacological and modern science[J]. Journal of Biological and Environmental Sciences, 2019, 13(39):161-171.
- [7] DENG K, LI Y, XIAO M, et al. *Lycium ruthenicum* Murr polysaccharide protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 158(9):562-568.
- [8] WANG S Q, LIU B, LIU S, et al. Structural features of an acidic polysaccharide with the potential of promoting osteoblast differentiation from *Lycium ruthenicum* Murr[J]. Natural Product Research, 2018, 34(16):2249-2254.
- [9] SKENDERIDIS P, KERASIOTI E, KARKANTA E, et al. Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation[J]. Toxicology Reports, 2018, 5:251-257.
- [10] MOCAN A, MOLDOVAN C, ZENGIN G, et al. UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian Goji (*Lycium barbarum* L.) berries cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory, and real-time cytotoxicological evaluation[J]. Food & Chemical Toxicology, 2018, 115:414-424.
- [11] 薛丹,黄豆豆,黄光辉,等.植物多糖提取分离纯化的研究进展[J].中药材,2014,37(1):157-161.
- [12] 赵强,覃杰,王静宇,等.枸杞多糖提取工艺研究进展[J].中国林副特产,2018(2):78-80.
- [13] 张燕,张树森,王飞,等.近年来植物多糖提取方法研究进展[J].农产品加工,2015(11):65-68+72.
- [14] 秦培鹏.猴头菌多糖热水浸提工艺研究[J].安徽农业科学,2014,42(15):4784-4786.
- [15] 郭毓菲,张诗泉,王汉迪,等.超声波法提取水溶性茯苓多糖工艺优化及其抗氧化活性探究[J].中国酿造,2018,37(12):166-170.
- [16] 胡选生,李丹青,张佩洁,等.微波辅助法提取毛酸浆果实多糖工艺的优化[J].农产品加工,2020(3):44-46+49.
- [17] 王雨东.虫草多糖酶提取及纯化工艺研究和优化[D].上海:华东理工大学,2017.
- [18] 何佩娟,张宇洁.多糖含量测定的方法综述[J].粮食流通技术,2019(2):27-31.
- [19] 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.
- [20] 蒋德旗,黄利敏,王艳,等.响应面优化纤维素酶法提取桂花多糖工艺及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2015,36(2):271-275+281.