

响应面与酶法优化拐枣多糖的提取工艺及其抗氧化活性研究

叶文斌, 樊亮

(陇南师范高等专科学校农林技术学院, 成县 742500)

摘要: 研究响应面法与酶法联用工艺提取拐枣中的活性物质拐枣多糖及其抗氧化活性。采用辅助热水提取法提取拐枣多糖, 以 Box-Behnken 试验设计结合响应面分析法优化了提取工艺条件, 确定最佳工艺参数。结果显示, 在酶解温度为 50℃, 酶解浓度为 0.06 g 和 pH 为 5.0 的条件下, 拐枣多糖的最高含量为 19.79%。拐枣多糖具有明显的抗氧化作用和清除自由基的作用, 当质量浓度为 5.0 mg·mL⁻¹ 时, FRAP 值为 1.91, 对 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基、1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除率分别达到 69.63%、74.10%、44.13% 和 73.79%。

关键词: 响应面法; 酶法; 拐枣多糖; 优化工艺; 抗氧化能力

中图分类号: R284.2; TS255.36

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)02-0182-08

Extraction of polysaccharides from *Hovenia acerba* Lindl. by optimization enzymolysis and response surface methodology and its antioxidant capacity

YE Wenbin, FAN Liang

(School of Agriculture and Forestry Technology, Longnan Teachers College, Chenxian 742500)

Abstract: Polysaccharides were extracted from *Hovenia acerba* fruits with the help of hot water after enzymolysis and response surface methodology. The antioxidant activity of the extracted polysaccharides was determined. The main extraction conditions were optimized using response surface methodology based on Box-Behnken design. An extraction condition with the enzymolysis temperature of 50℃ and enzymolysis concentration of 0.06 g at pH of 5.0 was optimal. The extraction yield under the optimized conditions was 19.79%. The polysaccharides extracted from *Hovenia acerba* fruits showed antioxidant capacity and free radical scavenging capacity. At the concentration of 5.0 mg·mL⁻¹, the FRAP value was 1.91. the ABTS⁺, DPPH radical, superoxide anion radical and hydroxyl free radical scavenging rates were 69.63%, 74.10%, 44.13% and 73.79%, respectively.

Key words: response surface methodology; enzymolysis; *Hovenia acerba* Lindl. polysaccharides; optimization; antioxidant ability

拐枣(*Hovenia acerba* Lindl.) 俗称万子梨、木珊瑚、鸡距子、鸡爪子、万寿果等。属鼠李科枳椇属落叶乔木, 因其果梗肉质膨大扭曲, 味甘甜如枣, 故名拐枣。种子含枳皂苷, 具有镇静、抗惊厥和降压等功效, 果柄膨大, 肉质肥厚形似鸡爪, 红棕色可食用可酿酒, 营养丰富, 清凉利尿, 解酒醉不醒, 可治风湿, 有清热利尿、止渴降火和解毒之功效, 果梗性甘平有健胃补血的作用, 主治头风、润五脏、利大小便^[1-3]。木质部含二羧酸三萜类化合物

枳子酸, 胶汁可治腋下狐臭和痔疮^[2]。在甘肃省陇南市徽成盆地拐枣广为栽培。拐枣营养丰富, 果实中多含葡萄糖、硝酸钾、苹果酸钾和苹果酸钙^[2], 富含大量植物多糖(*Hovenia acerba* Lindl. polysaccharides, HAP)。随着植物多糖在保健和药理方面的研究和应用关注增多, 相对于其他成分, 多糖由于其水溶性和分子量大, 给提取纯化带来了困难, 有关拐枣多糖提取工艺研究的报道较少, 仅限于溶剂萃取法的研究, 而且传统提取工艺时间长提取率

收稿日期: 2015-04-08

基金项目: 甘肃省教育厅项目(0928B-1), 冻土工程国家重点实验室自主基金项目(SKLFSE-ZY-05、2010CB951402), 甘肃省教育厅项目(2015B-148)和陇南师范高等专科学校重点项目(2014LSZK01001)共同资助。

作者简介: 叶文斌, 讲师。E-mail: yewenbinbest@sohu.com

低及耗时较长^[2]。为此, 本试验根据拐枣多糖特点, 用酶法和响应面法联用, 进行提取工艺优化以及其体外抗氧化活性研究, 为当地节约拐枣资源以及综合开发利用提供实验技术, 对充分利用拐枣资源, 促进拐枣产业经济的发展具有重大意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

拐枣购自甘肃陇南市成县农贸市场, 挑选成熟度相同, 无机械损伤, 无病虫害的果实。

苯酚、浓硫酸、葡萄糖纯度>99.99%、1,1-二苯基-2-苦基肼基 (DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、美国 Sigma 公司生产, 工业用复合酶, 酶活构成为: β -葡聚糖酶 ≥ 300 万 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 纤维素酶 ≥ 40 万 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 木聚糖酶 ≥ 260 万 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 果胶酶 ≥ 2 万 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和氏璧生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

电子天平, 上海奥豪斯仪器有限公司; RE52AA 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; HH-6 数显恒温水浴锅, 上海千载科技有限公司; TGL-16G 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; UV759 紫外-可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; DHG-9036A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精密科学仪器有限公司; LGJ-18 型冷冻干燥机, 北京四环科学仪器厂; LC-6A 高压液相色谱仪(配有 RI-10A 示差折光检测器、7725i 手动进样器、CTO-10AS 柱温箱、CBM-20A 在线控制器和 LC-solution 分析软件), 日本岛津公司; TSK-Gel SW3000 和 TSK-Gel SW4000 色谱柱, 日本 Tosoh 公司。

1.2 方 法

1.2.1 拐枣多糖的提取流程 将拐枣果实在 50°C 烘干后将其粉碎, 过 40 目筛, 用无水乙醇回流脱脂, 再在 50°C 时干燥, 然后加入一定量的水, 在一定温度下添加工业用复合酶(酶活构成: β -葡聚糖酶、纤维素酶、木聚糖酶和果胶酶)进行一定时间的酶解提取, 提取液经过减压浓缩得浓缩液, 取上清液与 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇体积比 4:1)按体积比 5:1 混合, 振荡, 离心弃去变性蛋白, 重复 4 次。合并水层, 用 95% 的乙醇沉淀(体积比 3:1), 5000 r/min 离心 10 min, 沉淀物溶于热水中, 搅拌状态下慢慢加入斐林试剂, 析出铜络合物, 静置 1 h, 倾出上清液, 用水洗涤 3 次, 离心分离得络合物, 向络合物中加 4°C 蒸馏水, 再滴加 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 使之全部溶解, 用 95% 的乙醇沉淀(体积比 3:1),

离心, 所得絮状物分别用乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 冷冻干燥得洁白拐枣多糖粉^[4-5]。

1.2.2 拐枣多糖含量的测定方法 本试验采用苯酚—硫酸法^[2,4-5]测定总的拐枣多糖含量。先把葡萄糖用苯酚、硫酸试剂处理后, 进行紫外扫描, 在 489 nm 处有最大吸收; 再利用标准糖浓度和其用苯酚、硫酸试剂处理后在 489 nm 处的吸光度制作标准曲线, 再测定待测样品溶液的吸光度, 然后根据回归方程计算相应的浓度从而求出多糖含量。拐枣多糖的提取率(%)=样品中多糖的含量稀释倍数/样品干重 $\times 100\%$ 。

1.2.3 拐枣多糖的单因素实验 分别称取 1.0 g 拐枣粉末多份, 分别置于 250 mL 锥形瓶中, 用 100 mL 蒸馏水混匀, 调节 pH 至 4.8, 备用。用时添加不同工业用复合酶剂量搅拌均匀后用保鲜膜封口, 置于 50°C 恒温摇床培养, 转速 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 酶解 24 h, 以蒸馏水为空白对照, 实验重复 5 次。

酶解浓度对提取拐枣多糖的影响: 分别加入 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 和 0.12 g 工业用复合酶;

温度对提取拐枣多糖的影响: 取备用拐枣粉末匀质液体加入工业用复合酶 0.06 g, 温度设置为 35、40、45、50、55、60 和 66°C 的恒温培养箱内酶解;

pH 对提取拐枣多糖的影响: 在备用拐枣粉末匀质液体中分别加入工业用复合酶 0.06 g, 以 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CH_3COOH 溶液和 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节成 pH 值分别为 4.4、4.6、4.7、4.8、5.0、5.2、5.5 和 6.0 的系列梯度进行实验^[4-5]。

各单因素实验后测定拐枣多糖来确定适合的单因素条件。

1.2.4 铁还原抗氧化能力 (FRAP) 测定 现配 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠-乙酸缓冲液、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPTZ 溶液和 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 溶液 (FRAP 液), 取 3.9 mL 加入 0.1 mL 适当稀释的待测样品, 混匀反应 30 min, 于 593 nm 波长处检测读取吸光度, 以 FeSO_4 为标准物绘制标准曲线, 待测样品的抗氧化能力以 FRAP 值表示 (1 FRAP 单位= $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4)^[6]。

1.2.5 ABTS⁺ 清除能力测定 将 $7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABTS 水溶液与 $2.45\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的过硫酸钾水溶液在暗处反应 16 h, 得到 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 离子液; 使用前将离子液在 734 nm 波长处的吸光度调整为 0.700 ± 0.02 , 30°C 条件下平衡 30 min; 取 2.0 mL $\text{ABTS}^{\cdot+}$, 加入 0.2 mL 待测样品, 室温混匀反应 20 min 后, 于 734 nm 波长处测定吸光度^[7]。清除率计算为: $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 清除率 = $(A_0 - A_1/A_0) \times 100\%$ 。式中: A_0 为空白液吸光

度; A_1 为样品液吸光度。

1.2.6 DPPH 自由基清除能力测定 用 95% 的乙醇溶解 DPPH 配成 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的溶液, 取 3 mL, 加入 2 mL 待测样品, 25°C 暗处反应 30 min, 于 517 nm 波长处测定吸光度^[8]。清除率计算为: DPPH 自由基清除率 = $(A_0 - A_1/A_0) \times 100\%$ 。式中: A_0 为空白液吸光度; A_1 为样品液吸光度。

1.2.7 对羟基自由基的清除作用^[9] 在具塞试管中依次加入 $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 溶液 1 mL, $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇溶液 1 mL 和不同浓度的样品溶液 1 mL, $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液 1 mL, 摇匀, 37°C 恒温水浴 0.5 h, 以蒸馏水为参比, 510 nm 下测定光度值 A_1 , 以不加样为 A_0 和 不加 H_2O_2 时的溶液吸光度 A_2 , 羟自由基·OH 的清除率用下式计算: 羟自由基·OH 的清除率 = $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$, 式中, A_0 为空白对照液的吸光度; A_1 为加入多糖溶液后的吸光度; A_2 为不加显色剂 H_2O_2 多糖溶液本底的吸光度。

1.2.8 对超氧阴离子自由基的清除作用^[10] 在具塞试管中加入 4.5 mL $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.27) 和 4.2 mL 蒸馏水, 混匀, 在 25°C 水浴中保温 20 min, 取出后立即加入在 25°C 预热的 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯三酚溶液 1 mL (以 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 配制, 空白管用 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液), 迅速摇匀, 在 325 nm 下每隔 10 s 测定吸光度。 ΔA_0 (邻苯三酚自氧化率) = (第 4 分钟的 $D_{325\text{nm}}$ - 第 1 分钟的 $D_{325\text{nm}}/3$), 操作方法同上, 加入邻苯三酚前, 分别加入 1.0、1.2、1.5、1.7、2.0 和 4.2 mL 浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的多糖溶液, 不足 4.2 mL 的用蒸馏水补足。计算加样后邻苯三酚自氧化速率 ΔA , 得出对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抑制率 $G = [(\Delta A_0 - \Delta A)/\Delta A_0] \times 100\%$, 以 Vc 为对照品, 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率 $K\% = 1 - G\%$ 式中, ΔA_0 为邻苯三酚的自氧化速率; ΔA 为加入多糖溶液后邻苯三酚的自氧化速率。

2 结果与分析

2.1 拐枣多糖的纯度检测

拐枣多糖溶液的紫外光谱在 260 nm 和 280 nm 波长处未见蛋白质和核酸的特征吸收。拐枣多糖的 HPLC-GPC 色谱图见图 1, 只出现一个峰, 保留时间为 10.791 min, 所检测到的峰没有裂峰的出现, 说明分离和纯化的拐枣多糖是由一种多糖组成的, 面积归一化计算纯度为 99.95%。

2.2 多糖测定标准曲线的确立

在实验条件下, 以标准液浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 为吸光度值为纵坐标, 得标准曲线, 计算回

归方程: $y = 4.1453x + 0.0036$, 相关系数 $R^2 = 0.9735$, 线性良好。

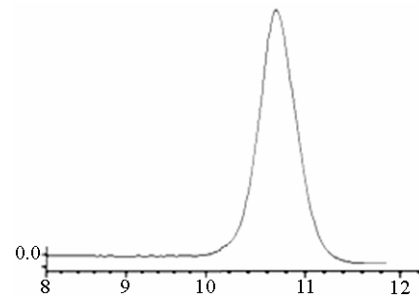


图 1 拐枣多糖的 HPLC-GPC 色谱图

Figure 1 HPLC profile of polysaccharides extracted from *Hovenia acerba* Lindl

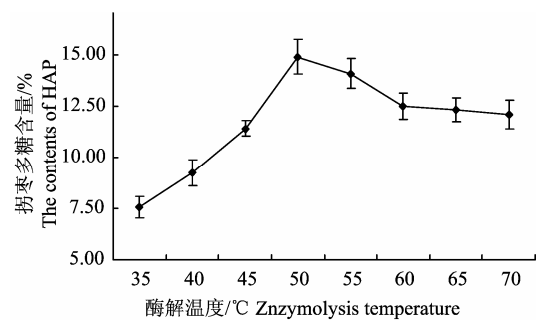


图 2 酶解温度对拐枣多糖含量的影响

Figure 2 Effect of enzymolysis temperature on extraction yield of *Hovenia acerba* Lindl.

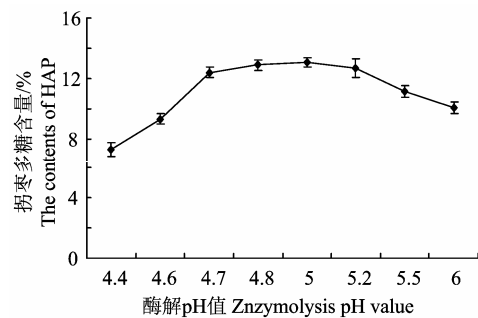


图 3 酶解 pH 值对拐枣多糖含量的影响

Figure 3 Effect of enzymolysis pH on polysaccharides from polysaccharides from *Hovenia acerba* Lindl.

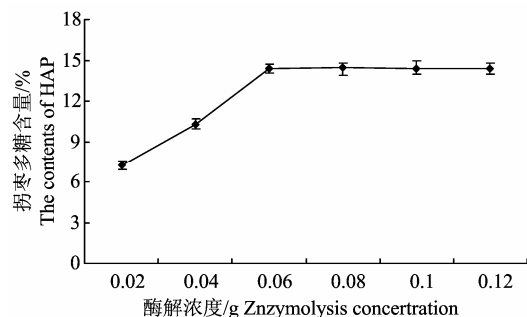


图 4 酶解浓度对拐枣多糖含量的影响

Figure 4 Effect of enzymolysis concentration on extraction yield of polysaccharides from *Hovenia acerba* Lindl.

2.3 影响拐枣多糖的单因素实验

由图 2 所示, 不同的酶解温度对拐枣多糖溶出率随着提取温度的升高, 多糖得率呈先升后下降的趋势, 40~60℃拐枣多糖的提取率之间差异较为明显, 而 50℃的拐枣多糖的提取率最高。因此, 温度选择在 40℃以上, 考虑到酶解温度以及能量节约宜选择提取温度为 50℃。从图 3 中可以得出, 拐枣多糖含量随着溶液的 pH 值的增加溶出率也逐渐增加, 但增加趋势缓慢。当溶液的 pH 值达到 5.0 时, 含量

都达到最大值, 当溶液的 pH 值超过 5.0 时, 多糖的溶出率反而减少, 说明这时溶液的 pH 值超过酶的最适 pH, 活性开始降低, 所以最佳 pH 值为 5.0。酶解浓度对拐枣多糖溶出率影响见图 4, 拐枣多糖溶出率随着复合酶的增加而增加, 拐枣多糖在酶解浓度为 0.06 g 处增加明显, 拐枣多糖溶出率有最大值, 此后维持稳定, 说明此时酶量足够, 已经与底物充分作用, 因此复合酶的最佳酶用量为 0.06 g。

表 1 拐枣多糖提取工艺条件设计方案及实验结果

Table 1 Box-behnken design and the extracted polysaccharides from *Hovenia acerba* Lindl.

实验编号 Experimental code	A:酶解温度/℃ Temperature	B:酶解浓度/g Concentration	C:pH 值 pH value	Y:拐枣多糖含量/% Polysaccharide content extracted from <i>Hovenia acerba</i> Lindl.
1	40	0.09	4.5	9.99
2	60	0.03	5.5	9.16
3	50	0.06	5.0	17.09
4	50	0.06	5.5	15.23
5	40	0.06	5.0	12.19
6	50	0.06	4.5	12.64
7	60	0.06	5.0	13.08
8	60	0.03	4.5	11.07
9	50	0.06	5.0	19.01
10	60	0.09	5.5	14.56
11	50	0.06	5.0	18.13
12	50	0.09	5.0	19.79
13	50	0.06	5.0	17.87
14	50	0.03	5.0	9.97
15	40	0.03	4.5	9.16
16	50	0.06	5.0	19.22
17	60	0.03	4.5	10.80
18	40	0.09	5.5	13.22
19	50	0.06	5.0	19.09
20	40	0.03	5.5	9.52

“**”, $P < 0.01$, “*”, $P < 0.05$.

2.4 拐枣多糖提取条件响应面分析结果

在单因素试验结果基础之上, 以酶解温度、酶解浓度和 pH 为主要考查因素, 分别用 A、B 和 C 为自变量, 以拐枣多糖得率 (Y) 为响应值, 利用 Design-Expert 8.0.6 设计三因素三水平的 Box-Behnken 试验, 表现出 20 个试验点。二次回归拟合及方差分析和结果见表 1。对表 1 中试验结果进行多元回归分析, 得到拐枣多糖得率的二次模型: $Y = -568.9770 + 14.3898 A - 149.4333 B + 89.1560 C + 0.9500 AB - 0.0870 AC + 66.6670 BC - 0.1392 A^2 - 1372.2222 B^2 + 8.7200 C^2$ 。用方差分析来评估模型的显著性, 如表 2 所示, 回归模型极显著 ($P < 0.01$),

失拟项不显著 ($P > 0.05$), 说明模型对响应值拟合良好。A 的一次项、二次项和 B 的一次项都达到极显著水平, B 的二次项达显著水平, 表明试验因素对响应值不是简单的线性关系, 明酶解温度和酶解浓度对拐枣多糖提取影响显著, 而交互项无显著影响。拐枣多糖模型决定系数分别为: $R^2 = 0.9594$ 。该回归方程可较好地描述各因素对拐枣多糖提取效果的影响, 可预测在不同提取条件下拐枣多糖的得率。而且根据影响拐枣多糖提取率大小顺序为 B (酶解浓度) > A (酶解温度) > C (pH)。因此, 可以应用于拐枣多糖含量提取的理论预测。根据回归方程在 3 个因素的响应面图 5~图 7, 相应的响应面均为

凸型曲面, 说明拐枣多糖的含量响应值存在着极高值, 且响应曲面的等高线中心均位于-1~1 之间, 说明提取的最优条件存在于所设计的因素水平范围之内。通过分析两者的响应面分析结果可以确定, 拐枣多糖的提取最优工艺参数为: 酶解温度为 50 °C, 酶解浓度为 0.06 g 和 pH 为 5.0, 在此条件下, 拐枣多糖的最高含量为 19.79%。

2.5 铁还原抗氧化能力

FRAP 法是测定物质总抗氧化能力的一种方法, 其值的大小越大可以代表待测物质的总抗氧化能力越强弱。由图 8 可知, FRAP 值与拐枣多糖的质量浓度有直接关系, 浓度越高, FRAP 值越大,

多糖抗氧化能力越强, 与浓度大小的的 Vc 相比多糖的总抗氧化能力相对较弱。当拐枣多糖的浓度为 2.0 mg·mL⁻¹ 时, 其 FRAP 值为 0.94, 而 Vc 的 FRAP 值为 3.78, 5.0 mg·mL⁻¹ 时 VC 的 FRAP 值为 3.95, 拐枣多糖的 FRAP 值仅为 1.91 两者之间有显著性差异 (P<0.05)。

2.6 ABTS⁺清除能力

由图 9 可知, 对 ABTS⁺的清除能力随拐枣多糖浓度的升高而增强, 与同等浓度的 Vc 相比, 拐枣多糖对 ABTS⁺的清除能力相对较弱。在 5 mg·mL⁻¹ 的浓度下 FRAP 值与拐枣多糖的值分别为 100 和 69.63%, 两者之间显著性差异 (P<0.05)。

表 2 拐枣多糖工艺条件响应曲面模型分析及方差分析

Table 2 Response surface and ANVOA analysis of polysaccharides extracted from *Hovenia acerba* Lindl.

方差来源 Source of variation	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
Model	236.574965	9	26.28610722	6.080393649	0.0047	**
A-temperature	32.64907093	1	32.64907093	7.552248108	0.0205	**
B-concentration	0.650015228	1	0.650015228	0.150358835	0.0063	**
C-pH value	12.53321422	1	12.53321422	2.899131298	0.1195	
AB	0.16245	1	0.16245	0.037577262	0.8502	
AC	0.37845	1	0.37845	0.087541489	0.7734	
BC	8	1	8	1.850526926	0.2036	
A ²	33.3036	1	33.3036	7.703651066	0.0196	**
B ²	4.19436875	1	4.19436875	0.970224039	0.0479	*
C ²	13.0691	1	13.0691	3.023090181	0.1127	
残差 Residual	43.23093	10	4.323093			
拟失项 Lack of fit	39.64044667	5	7.928089333	11.04042074	0.0996	No significance
纯误差 Pure error	3.590483333	5	0.718096667			
和总 Cor total	279.805895	19				

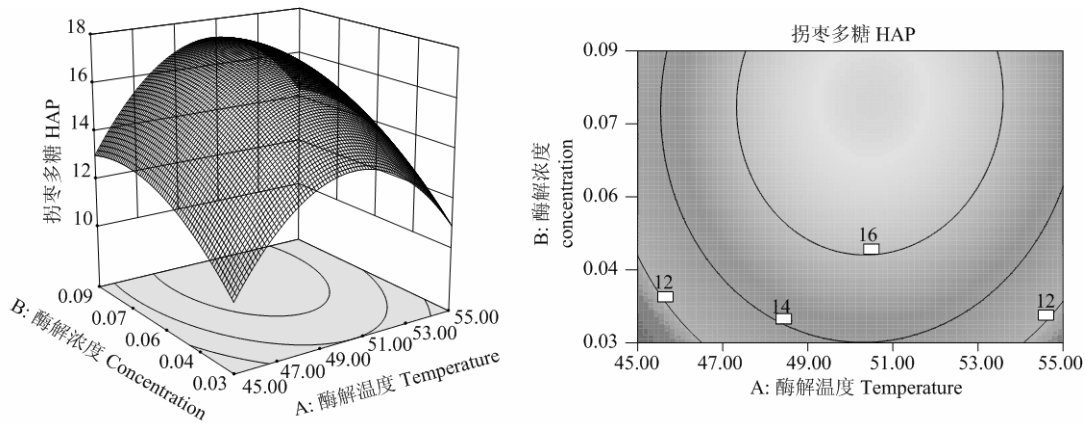


图 5 酶解温度和酶解浓度对拐枣多糖含量的响应曲面图

Figure 5 Response surface kyrtograph of enzymolysis concentration and enzymolysis temperature on the extraction yield of polysaccharides from *Hovenia acerba* Lindl.

2.7 DPPH 自由基清除能力

由图 10 可知, 拐枣多糖对 DPPH 自由基的清

除能力随着浓度升高而增强, 与同样浓度的 Vc 相比, 拐枣多糖对 DPPH 自由基的清除能力比 Vc 稍

弱, 在浓度为 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, Vc 和拐枣多糖对 DPPH 自由基的清除率为 99.93%和 74.10%, Vc 对

DPPH 自由基的清除能力低于拐枣多糖对 DPPH 自由基的清除能力, 两者之间显著性差异 ($P<0.05$)。

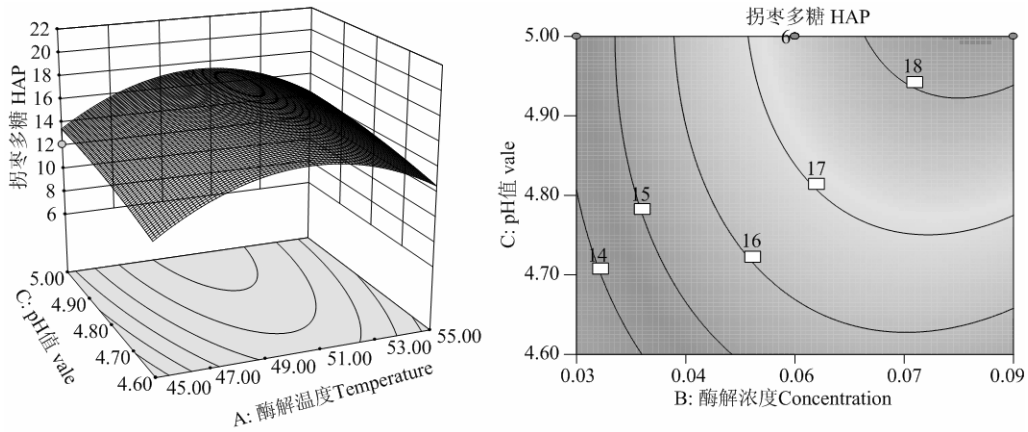


图 6 酶解浓度和 pH 值对拐枣多糖含量的响应曲面图

Figure 6 Response surface kyrtograph of enzymolysis concentration and enzymolysis pH on the extraction yield of polysaccharide from *Hovenia acerba* Lindl.

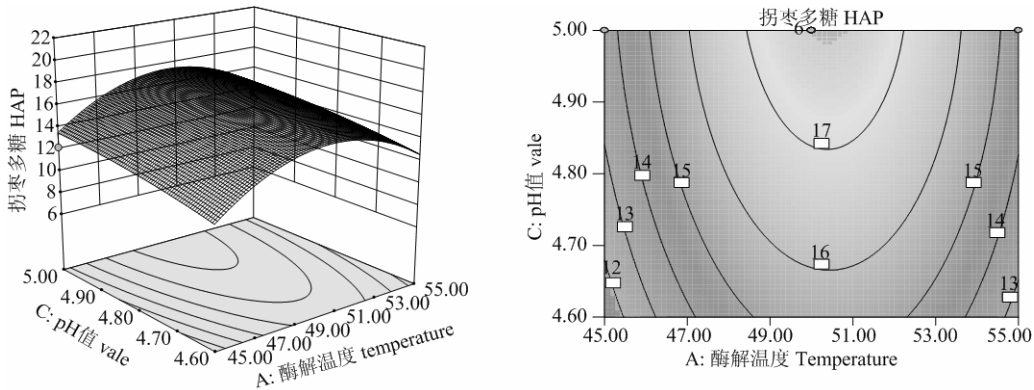


图 7 酶解温度和 pH 值对拐枣多糖含量的响应曲面图

Figure 7 Response surface kyrtograph of enzymolysis temperature and enzymolysis pH on the extraction yield of polysaccharides from *Hovenia acerba* Lindl.

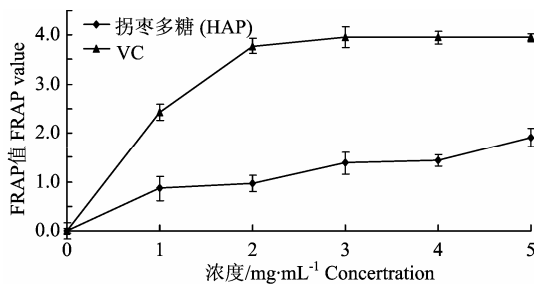


图 8 拐枣多糖和 VC 的 FRAP 值

Figure 8 Comparison of FRAP values between polysaccharides extracted from *Hovenia acerba* Lindl. and vitamin C

2.8 对超氧阴离子自由基的清除能力

由图 11 所示, 拐枣多糖对邻苯三酚自氧化体系产生的超氧阴离子自由基表现出了一定的清除能力。当多糖浓度在 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 与同样浓度的 Vc 相比, 拐枣多糖对超氧阴离子自由基的清除能力比

Vc 稍弱, Vc 和拐枣多糖对超氧阴离子自由基的清除率为 69.97%和 44.13%, 对超氧阴离子自由基的清除能力两者之间成显著性差异 ($P<0.05$)。

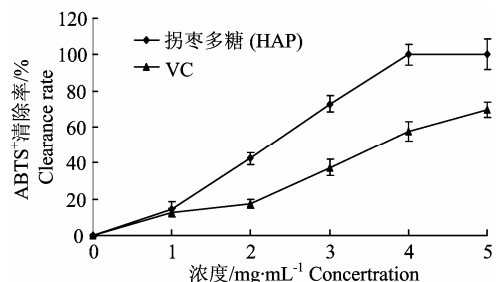


图 9 拐枣多糖和 VC 对 ABTS⁺的清除率

Figure 9 Comparison of ABTS⁺-scavenging rate between polysaccharides extracted from *Hovenia acerba* Lindl. and vitamin C

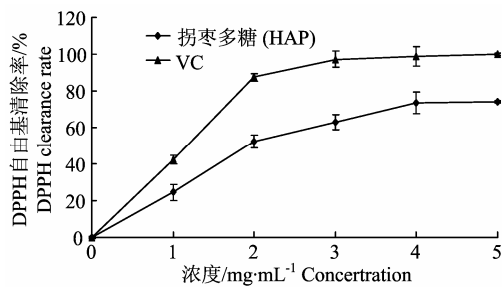


图 10 拐枣多糖和 VC 对 DPPH 自由基的清除率

Figure 10 Comparison of DPPH radical scavenging rates between polysaccharides extracted from *Hovenia acerba* Lindl. and vitamin C

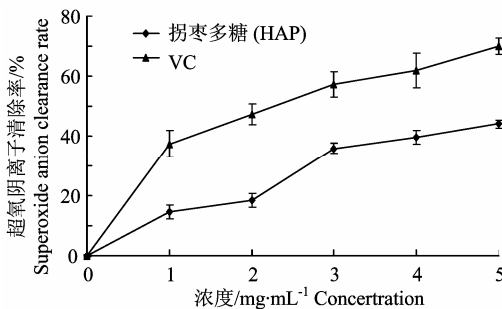


图 11 拐枣多糖和 VC 对超氧阴离子自由基的清除率

Figure 11 Comparison of superoxide anion radical scavenging rate between polysaccharides *Hovenia acerba* Lindl. and vitamin C

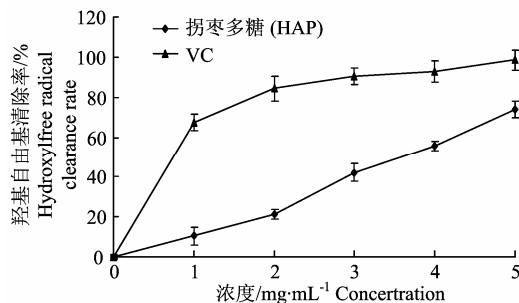


图 12 拐枣多糖和 VC 对羟基自由基的清除率

Figure 12 Comparison of hydroxyl free radical scavenging rate between polysaccharides extracted from *Hovenia acerba* Lindl. and vitamin C

2.9 对羟基自由基的清除作用

结果由图 12 显所示,随着拐枣多糖浓度的增加,对 Fenton 反应产生的羟基自由基有较强的清除作用。当多糖浓度在 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,与同样浓度的 Vc 相比,拐枣多糖对羟基自由基的清除能力比 Vc 稍弱, Vc 和拐枣多糖对羟基自由基的清除率为 98.47% 和 73.79%,对羟基自由基的清除能力两者之间成显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

通过酶法和响应面法联用,对拐枣多糖主要活

性成分进行提取工艺优化研究。响应面分析结果确定了拐枣多糖的提取最优工艺参数为:酶解温度为 50°C ,酶解浓度为 0.06 g 和 pH 为 5.0 条件下,拐枣酶解后拐枣多糖的最高含量为 17.79%。目前提取拐枣多糖的方法有很多种,传统提取方法主要是水提法,操作繁琐时间长而且提取率相对较低^[2]。酶解法条件温和,操作简单,节约原材料,有较高的提取率^[4-5]。拐枣提取过程中会因为一些杂质类成分如淀粉、蛋白质、果胶等而影响提取液的质量,而适当的酶通过温和的酶解反应可将液体中杂质出去,从而提高体系澄清度。单独用复合酶法提取拐枣多糖提取率相对较高,但是其耗时较长,难于规模化生产,而且酶解法中温度和 pH 值都是影响酶解产物的重要因素,它们不但影响酶的稳定性^[4],而且还影响酶的活性中心必需基团的解离状态和底物的解离状态^[5]。在最适 pH 值和温度范围内,底物才能与酶充分的结合,产生大量的产物。所以用响应面法和酶解法联用将拐枣多糖进行提取工艺的优化时,将温度和 pH 值设计到最佳条件,改变了以往提取时拐枣资源的严重浪费,对拐枣的资源开发和利用具有重要的现实意义。

本研究表明分离纯化得到的拐枣多糖具有一定的总抗氧化能力和较好的清除 $\text{ABTS}^{\bullet+}$ 、DPPH 自由基、邻苯三酚自氧化体系产生的超氧阴离子自由基和羟基自由基的能力。近年来多糖对抗氧化的研究表明,多糖分子间接作用于自由基本身,直接作用于抗氧化酶间接发挥抗氧化作用^[11];拐枣多糖结构中的醇羟基可以与产生羟基等自由基所必需 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 等络合,使羟基自由基的产生受到抑制,进而影响脂质过氧化的启动,最终抑制活性氧的产生^[11]。拐枣多糖碳氢链上的氢原子可以与羟基结合成水,达到清除羟基的目的,而碳原子则因此成为碳自由基,并进一步氧化形成过氧自由基,最后分解成对机体无害的产物^[12];对于超氧阴离子自由基而言,拐枣多糖可与其发生氧化反应,达到清除的目的^[12]。在研究抗氧化多糖的过程中,不少研究提示,多糖的抗氧化性可能是多糖抗肿瘤^[13]、抗衰老^[14]、抗感染^[15]、抗辐射^[16]等其他活性的作用机理之一。多糖的生物活性体现在其与受体的相互识别、相互作用的过程中,多糖经复合后其与脂质体或生物膜表面的静电相互作用增强,向脂质体或生物膜中的聚集能力及在其中的扩散速度增强,使受损膜电学功能发生逆转,抑制链终止反应,可能起到较好的抗氧化协同作用^[12]。本研究结果表明拐枣多糖可以清除自由基,虽然抗氧化作用机理还停留在体

外实验阶段, 而且他的抗氧化作用还需进一步深入的研究, 发挥多糖的功效。

参考文献:

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1971: 445 .
- [2] 朱炯波, 赵虹桥, 董爱文, 等. 拐枣中多糖的提取与含量测定[J]. 林产化工通讯, 2005, 39(1): 27-30.
- [3] 宋志强. 拐枣的开发利用[J]. 江西农业科技, 2002, 29(2): 58.
- [4] 叶文斌. 效应面法与酶法联用提取纹党多糖的优化工艺研究[J]. 包装与食品机械, 2014, 32(3): 5-9.
- [5] 兰金荣, 叶文斌. 响应面法与正交设计法比较研究天麻多糖提取优化工艺[J]. 包装与食品机械, 2014, 32(4): 10-15.
- [6] FANG Z X, ZHANG Y H, LU Y, et al. Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 884-888.
- [7] WANG Y P, LIU Y, HU Y H. Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes obiniophila* and its antioxidant activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111(13): 324-332.
- [8] XIONG S L, LI A L, HUANG N, et al. Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicas*[J]. Rbohydrate Polymers, 2011, 86(3): 1273-1280.
- [9] 谢佳, 张静, 柳红. 南瓜多糖硫酸酯化衍生物的制备及抗氧化研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 60-62.
- [10] 吴向阳, 范群艳, 仰榴青, 等. 匙羹藤粗多糖的提取及其清除羟自由基活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 107-110.
- [11] VOLPI N, TARUGI P. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu²⁺-mediated oxidation of human low-density lipoproteins:effect of normal human plasma derived chondroitin sulfate[J]. J Biochem, 1999, 125(2): 297-304.
- [12] 张静丽, 王宏勋, 张雯, 等. 灵芝、枸杞多糖复合抗氧化作用[J]. 食品与机械, 2004, 20(6): 11-12.
- [13] 滕霞, 丛建波, 田晓华, 等. 海藻硫酸多糖抗氧化与抗肿瘤作用的实验研究[J]. 营养学报, 1998, 20(1): 48-52.
- [14] ZHANG Q B, LI N, ZHOU G F, et al. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice[J]. Pharmacological Research, 2003, 48(2): 151-155.
- [15] 阎琪, 于起福, 任桂凤, 等. 硫酸化高山红景天多糖对感染病毒小鼠血液 SOD 和 LPO 的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 1997, 3(6): 28-30.
- [16] 王勇杰, 姚如永, 张海平, 等. 坛紫菜硫酸多糖对 60Co 辐射引起的小鼠体内氧化应激的作用研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2004, 23(6): 32-35.