

天冬多糖的复合酶提取工艺优化及其理化性质、吸湿性和抗氧化活性

王丽¹, 罗明锐², 高金雨¹, 阮元¹, 陈景国³, 张雪海^{1*}, 麻兵继^{1*}

(1. 河南农业大学农学院, 河南郑州 450052) (2. 郑州大学农学院, 河南郑州 450046)

(3. 蚌埠市食品药品检验中心, 安徽蚌埠 233000)

摘要: 采用响应面法优化天冬粗多糖的复合酶提取工艺, 考察提取时间、提取温度、酶底质量比和缓冲液 pH 值对天冬粗多糖得率的影响, 并对最优条件下获得的天冬粗多糖的理化指标、抗氧化活性和吸湿性进行鉴定。结果表明, 复合酶法提取天冬粗多糖的最佳工艺条件为提取时间 4.5 h, 提取温度 42.0 °C, 酶底质量比 1.5%, 缓冲液 pH 值 5.3, 粗多糖得率为 18.54%。天冬粗多糖中糖纯度高达 95.49%, 蛋白质和多酚含量分别为 1.07% 和 0.11%。单糖组成结果表明, 天冬粗多糖主要由葡萄糖、果糖、岩藻糖、半乳糖和木糖组成, 摩尔比为 53.91:26.00:6.19:5.33:4.53, 且具有双螺旋结构。吸湿性实验结果表明, 天冬粗多糖的吸湿率, 与甘油的吸湿率相似, 远高于透明质酸钠的吸湿率; 抗氧化实验结果表明, 天冬粗多糖具有良好的抗氧化活性。该研究为复合酶法提取并获得新型的高纯度、高活性的天冬粗多糖开发利用提供了理论基础和应用价值。

关键词: 天冬粗多糖; 复合酶法; 工艺优化; 吸湿率; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2023)11-151-159

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1507

Optimization of Compound Enzyme Extraction Process of *Asparagus cochinchinensis* Polysaccharides: Physicochemical Properties, Hygroscopicity, and Antioxidant Activity

WANG Li¹, LUO Mingrui², GAO Jinyu¹, RUAN Yuan¹, CHEN Jingguo³, ZHANG Xuehai^{1*}, MA Bingji^{1*}

(1.College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450052, China) (2.Zhengzhou University, School of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450046, China) (3.Bengbu Food and Drug Inspection Center, Bengbu 233000, China)

Abstract: Response surface methodology was used to optimize the compound enzyme extraction process of *Asparagus cochinchinensis* crude polysaccharides. The effects of extraction time, temperature, enzyme to substrate mass ratio, and buffer pH on the yield of *A. cochinchinensis* crude polysaccharides were investigated. Physicochemical indices, antioxidant activity, and hygroscopicity of *A. cochinchinensis* crude polysaccharides obtained under the optimal conditions were identified. The optimal conditions for compound enzymatic extraction of *A. cochinchinensis* crude polysaccharides were an extraction time was 4.5 h, extraction temperature of 42.0 °C, enzyme to substrate mass ratio of 1.5%, and buffer pH of 5.3. The optimized yield of crude polysaccharides was 18.5%, sugar purity of *A. cochinchinensis* crude

引文格式:

王丽,罗明锐,高金雨,等.天冬多糖的复合酶提取工艺优化及其理化性质、吸湿性和抗氧化活性[J].现代食品科技,2023,39(11):151-159

WANG Li, LUO Mingrui, GAO Jinyu, et al. Optimization of compound enzyme extraction process of *Asparagus cochinchinensis* polysaccharides: physicochemical properties, hygroscopicity, and antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 151-159

收稿日期: 2022-11-27

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (23A230006); 国家自然科学基金项目 (32171980); 河南省科技攻关项目 (232102110117; 232102110181)

作者简介: 王丽 (1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 药食同源植物多糖, E-mail: wanglihuina@163.com; 共同第一作者: 罗明锐 (1994-), 男, 硕士, 研究方向: 多糖结构和生物活性, E-mail: 1292187903@qq.com

通讯作者: 张雪海 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 玉米遗传育种, E-mail: xuehai85@126.com; 共同通讯作者: 麻兵继 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: mbj123@sina.com

polysaccharides reached 95.49%, and protein and polyphenol contents were 1.07% and 0.11%, respectively. Monosaccharide composition analysis revealed that *A. cochinchinensis* crude polysaccharides mainly consisted of glucose, fructose, fucose, galactose, and xylose in a respective molar ratio of 53.91:26.00:6.19:5.33:4.53, and a double helix structure. Hygroscopic analysis revealed a similar moisture absorption rate of *A. cochinchinensis* crude polysaccharides to that of glycerol, but a markedly higher rate than that of sodium hyaluronate. *A. cochinchinensis* crude polysaccharides displayed good antioxidant activity. The findings provide a theoretical basis for the enzyme-assisted extraction of highly pure and active *A. cochinchinensis* crude polysaccharides, which may have valuable potential applications.

Key words: *Asparagus cochinchinensis* crude polysaccharides; compound enzyme extraction; process optimization; moisture absorption rate; antioxidant activities

天冬为百合科植物天门冬 [*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.] 的块根^[1], 为药食同源的补阴中药材, 具有养阴润燥, 清肺生津的功效。常作为药酒、滋补药膳、保健饮品和蜜饯等的原料^[2], 主产于广西、四川和贵州等地。天冬最初由《神农本草经》所载^[3], 并被列为上品, 研究表明, 天冬含有丰富的化学组成, 包括多糖、皂苷、氨基酸等^[4], 具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌抗炎、祛痰止咳、降血压等药理作用^[5]。多糖作为其主要的成分之一, 因其具有抗氧化、增强免疫、抗衰老等, 拥有广阔的开发前景^[6-9]。目前, 天冬粗多糖 (*Asparagus cochinchinensis* Crude Polysaccharide, ACP) 的提取方法有水提取法、超声提取法、酶提取法。其中水提取法最为普遍, 但其耗时长、效率低。酶可促进细胞壁的降解, 释放更多的多糖, 该方法是一种绿色、环保、能耗低的工艺。曹渊等^[10]采用超声复合酶提取天冬多糖, 并获得最佳提取工艺, 其多糖得率是水提取的 3.7 倍。然而, 超声易导致多糖的降解, 不利于其结构完整性的保留^[9,10]。本课题组前期通过考察不同提取方法对天冬粗多糖的影响, 筛选出复合酶提取法获得天冬粗多糖纯度好、得率高, 且条件温和, 有利于粗多糖结构完整性的保留。因此, 本实验采用复合酶提取天冬粗多糖, 考察提取时间、温度、加酶量和缓冲液 pH 值与粗多糖得率的关系, 并用 Design-Expert 软件进行响应面实验设计优化工艺参数^[11-14], 确定最佳提取工艺条件, 并对最优条件获得的天冬粗多糖基本组成、吸湿性和抗氧化活性等进行研究, 为 ACP 的综合利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

天冬 (广西省玉林市); 苯酚; 浓硫酸溶液; 无水碳酸钠; 无水硫酸铵; 无水乙醇; 变色硅胶; 甘油; 透明质酸钠; 木瓜蛋白酶; 果胶酶; 纤维素酶; FeSO₄ 溶液; 水杨酸-乙醇溶液; H₂O₂ 溶液; ABTS⁺试剂; DPPH 溶液; 铁氰化钾溶液。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计; 旋转蒸发仪, 河南郑州市亚荣仪器设备公司; 恒温条件水浴锅, 江苏金坛城东光芒仪表厂; 循环水式真空泵, 郑州杜甫仪表厂; 离心机, 安徽嘉文仪表技术装备公司; 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 ACP 提取方法

将天冬样品置于 60.0 °C 烘箱中烘干后粉碎, 按料液比 1:3 (g/mL) 加入体积分数 95% 乙醇浸泡 12.0 h, 收取滤渣; 粗多糖提取两次, 称取一定质量的复合酶 (纤维素酶:果胶酶:木瓜蛋白酶=1:1:1), 两次提取均按照单因素实验表 1 条件提取粗多糖。提取后在 100 °C 下灭活 30 min。按照单因素实验表 1 条件提取粗多糖。

1.3.2 复合酶法提取 ACP 的单因素实验

1.3.2.1 温度对 ACP 得率的影响

称取 1.0 g 的天冬干粉, 设定保持不变的提取条件如下, 提取时间为 4.0 h, 缓冲液 pH 值为 5.0, 酶底质量比为 1.0%。考察提取温度 30.0、35.0、40.0、45.0、50.0 °C 对 ACP 得率的影响。

1.3.2.2 缓冲液 pH 值对 ACP 得率的影响

同上, 设定其余保持不变, 将温度改成最优温度。考察缓冲液 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 对 ACP 得率的影响。

1.3.2.3 提取时间对 ACP 得率的影响

同上, 设定其余保持不变的实验提取条件如下, 将 pH 值改成最适 pH 值。考察提取时间 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h 对 ACP 得率的影响。

1.3.2.4 酶底质量比对 ACP 得率的影响

同上, 设定其余保持不变, 将提取时间改成最适提取时间。考察酶底质量比 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 对 ACP 得率的影响。

1.3.3 响应面优化试验

根据单因素实验结果,自变量选择提取时间(A)、提取温度(B)、酶底质量比(C)、缓冲液 pH 值(D)四个因素。以复合酶法提取 ACP 的得率(Y)为响应值,使用响应面软件 Design-Expert 12 设计 4 因素 3 水平 Box-Behnken 试验,进行响应面分析试验,优化方案和结果见表 1。

表 1 Box-Behnken 设计因素水平表

Table 1 Box-Behnken design factor level

水平	因素			
	A/h	B/℃	C/%	D
-1	3.0	35.0	1.0	4.5
0	4.0	40.0	1.5	5.0
1	5.0	45.0	2.0	5.5

1.4 ACP 物化指标

1.4.1 化学成分测定

采用苯酚-硫酸法、考马斯亮蓝法和福林酚法分别测定 ACP 粉末中粗多糖、蛋白质和多酚含量^[5,15,16]。

1.4.2 单糖组成分析

使用高效阴离子交换色谱法和脉冲安培检测法,检测 ACP 的单糖组成。称取 5.0 mg 粗多糖样品粉末,加入 5.0 mL 三氟乙酸溶液,在 121.0 ℃ 的条件下水解 4.0 h。水解液用 0.1 mol/L NaOH 溶液稀释 20 倍,过滤后注入检测系统,测定样品和标准品的单糖组成。

1.4.3 红外光谱分析

将 2.0 mg ACP 粉末和干燥的 KBr 混合均匀,研磨并将混合物压成颗粒,并在 400~4 000 cm⁻¹ 的频率范围内观测 ACP 样品的红外吸收光谱。

1.4.4 刚果红分析

将 1.0 mL ACP (1.0 mg/mL) 溶液加入到 1.0 mL 刚果红溶液 (50.0 μmol) 中。在混合物中加入不同体积的 NaOH 溶液 (1.0 mol/L, 0.0~2.0 mL), 逐渐将 NaOH 浓度增加到 0.5 mol/L (0.00、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45 和 0.50 mol/L), 采用相同体积的去离子水代替粗多糖溶液做对照。分别测定上述粗多糖样品和对照样品溶液在 400~600 nm 波长范围内溶液的最大吸收波长。

1.5 抗氧化活性测定

体外测定 ACP 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl, DPPH)、羟基和 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (2,2'-azino-bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid), ABTS⁺) 自由基的清除活性进而测定 ACP 抗氧化活性^[5,15,16]。

1.6 吸湿性测定

鉴于我国国内城市平均湿度跨度在 45.0% (乌鲁木齐) 和 84.0% (郑州/成都) 之间,选择相对湿度 43.0% 的饱和碳酸钠溶液和相对湿度 81.0% 的饱和硫酸铵溶液^[17]。准确称取 100 mg ACP、透明质酸钠和甘油,分别置于饱和碳酸钠溶液 (相对湿度 43.0%) 和饱和硫酸铵溶液 (相对湿度 81.0%) 的干燥器中,分别在 1.0、3.0、6.0、12.0、24.0、36.0、48.0 h 称量样品质量。按下式计算吸湿率。

$$R = \frac{W_1 - W_2}{W_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R——吸湿率, %;

W₂——原始样品质量, g;

W₁——吸湿后样品质量, g。

1.7 数据分析

所有实验数据以三次重复的平均值±标准差表示。响应面回归模型通过 Design-Expert12 软件建立与拟合;分析采用 Statistical Product and Service Solutions (SPSS) 统计软件 (18.0 版本) 对组间平均值的差异进行单因素方差分析 (One-way Analysis of Variance, ANOVA); 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 提取时间对 ACP 得率的影响

提取时间对 ACP 得率的变化关系如图 1a。在 0.0~4.0 h 范围内, ACP 的得率随着时间延长不断增加, 且在 3.0~4.0 h 范围内明显上升, 在 4.0 h 时达到最高为 19.78%。因此最适宜提取时间为 4.0 h。

2.1.2 提取温度对 ACP 得率的影响

提取温度对 ACP 得率的变化关系如图 1b。在 30.0~60.0 ℃ 范围内, ACP 的得率随着提取温度的上升不断增加。当提取温度为 40.0 ℃ 的时候, ACP 的得率达到最大值, 为 17.78%。因此最适温度为 40.0 ℃。

2.1.3 酶底质量比对 ACP 得率的影响

酶底质量比对 ACP 得率变化关系如图 1c。在酶底质量比在 0.0%~2.5% 的范围内, ACP 的得率随着酶底质量比的增加不断增加。当酶底质量比为 1.5% 的时候, ACP 的得率达到最大值, 为 19.56%。所以最适酶底质量比为 1.5%。

2.1.4 缓冲液 pH 值对 ACP 得率的影响

缓冲液 pH 值对 ACP 得率变化关系如图 1d。在 4.0~6.0 的范围内, ACP 得率随着缓冲液 pH 值的增加不断增加。当缓冲液 pH 值为 5.0 时, 得率达到最大 19.12%。所以最适缓冲液 pH 值为 5.0。

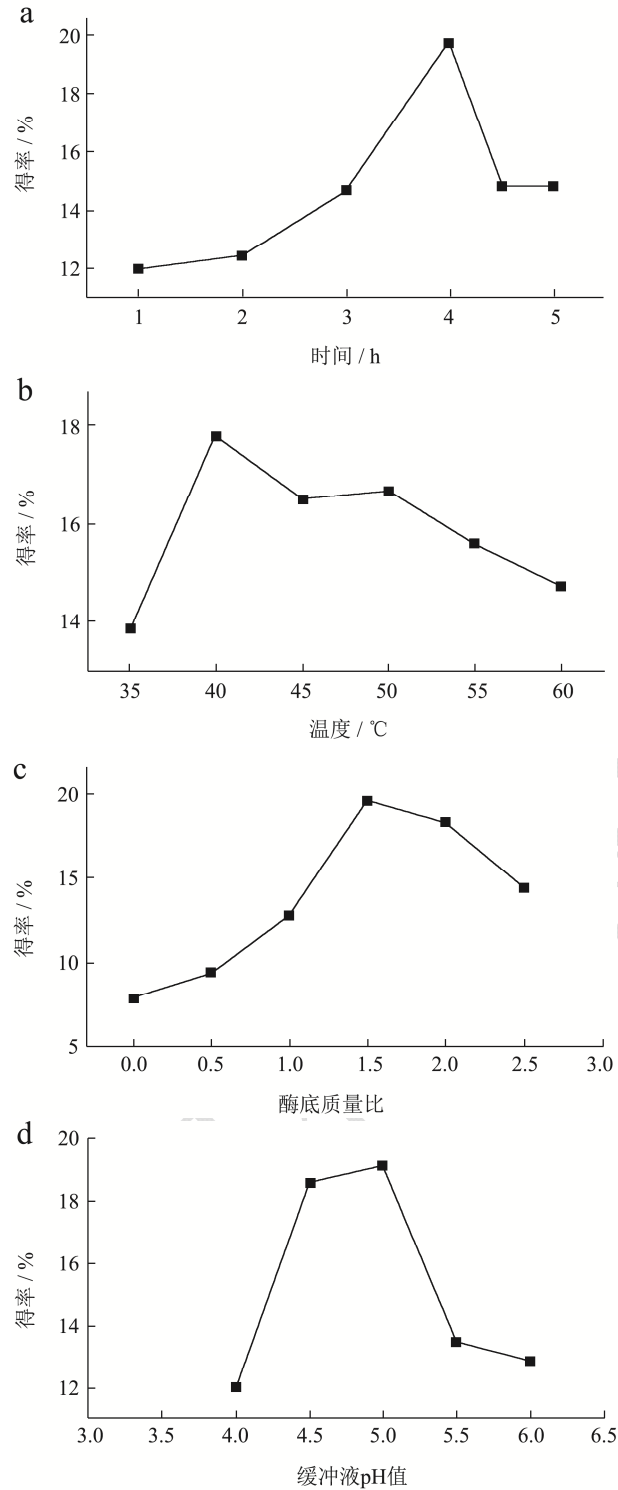


图1 提取时间 (a)、温度 (b)、酶底质量比 (c) 和缓冲液 pH 值 (d) 对 ACP 得率的影响

Fig.1 Effect of extraction time (a), temperature (b), enzyme to substrate mass ratio (c) and buffer water solution pH (d) on the yield of ACP

2.2 响应面优化结果

2.2.1 Box-Behnken 实验结果分析

响应面试验设计及试验结果见表 2。

表 2 响应面实验设计及结果

Table 2 Response surface experimental design and results

序号	编码变量				粗多糖得率/%
	A/h	B/°C	C/%	D	
1	-1	0	0	1	14.45
2	0	-1	0	-1	16.22
3	1	1	0	0	14.86
4	1	0	-1	0	17.38
5	0	0	0	0	19.10
6	0	1	1	0	15.89
7	1	0	0	1	17.54
8	0	0	-1	1	13.96
9	0	-1	-1	0	15.15
10	-1	0	1	0	14.57
11	0	1	0	1	17.71
12	0	0	0	0	19.06
13	-1	0	-1	0	12.66
14	0	0	0	0	19.06
15	1	0	1	0	13.37
16	0	-1	1	0	12.67
17	0	0	1	-1	13.11
18	-1	0	0	-1	16.01
19	0	0	0	0	18.82
20	-1	-1	0	0	14.50
21	0	-1	0	1	15.16
22	1	0	0	-1	16.13
23	0	1	0	-1	15.91
24	1	-1	0	0	16.16
25	0	0	1	1	16.54
26	1	1	0	0	17.20
27	0	0	-1	-1	17.26
28	0	0	0	0	19.06
29	0	1	-1	0	13.90

2.2.2 响应面回归模型的建立与拟合

通过 Design-Expert 12 软件分析得到回归方程如下:

$$Y=92.352+4.4725A+2.34B-1.7325C+0.3067D+0.8625AB-7.395AC+3.72AD+5.5975BC+3.57BD+8.405CD-7.3805A^2-7.0793B^2-12.6205C^2-4.1568D^2。$$

由表 3 所示, A、B、AC、BC、CD、A²、B²、C²、对 ACP 的得率都表现出极显著性影响 (P<0.01), 说明提取时间、温度和酶底质量比是天冬复合酶法提

取粗多糖的重要影响因素。该模型 $F=26.18$, $P<0.01$, 极显著, 而失拟项为 0.997 7 ($P>0.05$), 相对于纯误差差异无统计学意义, 相关系数 ($R^2=0.96$) 和校正绝

对系数 $R^2_{Adj}=0.92$, 说明说明模型拟合良好^[11,18-21]。以上可得出结论, 试验模型合理正确, 可以使用该模型对复合酶法提取 ACP 得率进行分析和预测。

表 3 Box-Behnken 实验方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis of Box-Behnken experiment

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.36	14	0.03	26.18	<0.000 1	**
A	0.04	1	0.04	39.93	<0.000 1	**
B	0.01	1	0.01	11.20	0.004 8	**
C	0.01	1	0.01	6.26	0.025 3	*
D	0.00	1	0.00	0.15	0.704 5	
AB	0.00	1	0.00	0.38	0.549 7	
AC	0.04	1	0.04	41.12	<0.000 1	**
AD	0.01	1	0.01	8.85	0.010 1	*
BC	0.03	1	0.03	24.89	0.000 2	**
BD	0.01	1	0.01	7.73	0.014 7	*
CD	0.05	1	0.05	50.09	<0.000 1	**
A ²	0.04	1	0.04	40.95	<0.000 1	**
B ²	0.04	1	0.04	35.35	<0.000 1	**
C ²	0.15	1	0.15	148.79	<0.000 1	**
D ²	0.01	1	0.01	8.53	0.011 2	*
残差项	0.01	14	0.00			
失拟项	0.00	10	0.00	0.11	0.997 7	
重复设计点误差和	0.01	4	0.00			
总计	0.37	28				
R ²	0.96					
R ² _{Adj}	0.92					

注: A 时间, B 温度, C 酶底质量比, D 缓冲液 pH 值。*表示差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$)。

2.2.3 响应面与等高线图分析

固定回归方程的提取时间、提取温度、酶底质量比、缓冲液 pH 值因素, 分别获得相应的曲面图与等高线图。如图 2~7 所示, 提取温度, 酶底质量比和提取时间对粗多糖得率的影响曲线较陡, 说明其对 ACP 提取得率的影响较为显著, 而缓冲液 pH 值对粗多糖得率的影响曲线较缓, 说明缓冲液 pH 值对 ACP 提取得率影响不显著。

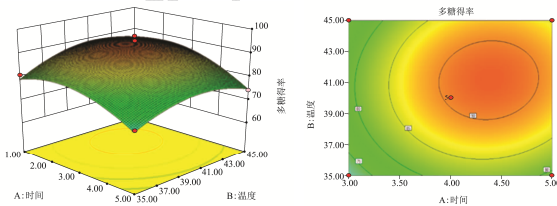


图 2 Y=f(A, B) 的响应面和等高线图 (C=0, D=0)

Fig.2 Response surface and contourmap of y=f(A, B) (C=0, d=0)

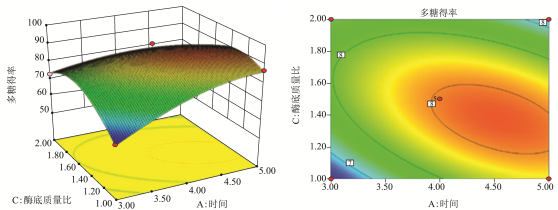


图 3 Y=f(A, C) 的响应面和等高线图 (B=0, D=0)

Fig.3 Response surface and contourmap of y=f(A, C) (B=0, D=0)

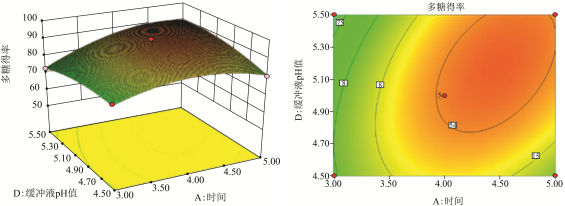


图 4 Y=f(A, D) 的响应面和等高线图 (B=0, C=0)

Fig.4 Response surface and contourmap of y=f(A, D) (B=0, C=0)

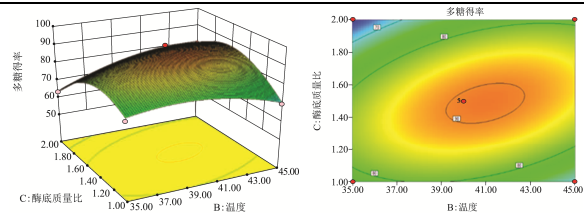


图 5 Y=f (B, C) 的响应面和等高线图 (A=0, D=0)

Fig.5 Response surface and contourmap of y=f (B, C) (A=0, D=0)

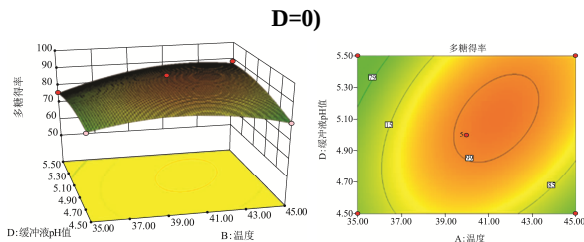


图 6 Y=f (B, D) 的响应面和等高线图 (A=0, C=0)

Fig.6 Response surface and contourmap of y=f (B, D) (A=0, C=0)

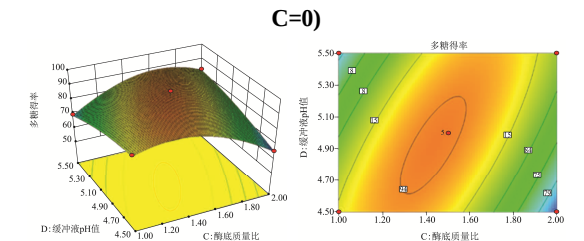


图 7 Y=f (C, D) 的响应面和等高线图 (A=0, B=0)

Fig.7 Response surface and contourmap of y=f (C, D) (A=0, B=0)

2.2.4 确定最佳点与验证

为了进一步确定最佳值的点，对回归方程取一阶偏导数等于零。

$$4.4725-14.751A+0.8625B-7.395C+3.72D=0 \quad (2)$$

$$2.34+0.8625A-14.159B+5.5975C+3.57D=0 \quad (3)$$

$$-1.7325-7.395A+5.5975B-25.241C+8.405D=0 \quad (4)$$

$$0.3067+3.72A+3.57B+8.405C-8.314D=0 \quad (5)$$

求解方程组得到复合酶法提取 ACP 最优提取条件为提取时间 4.6 h，提取温度 42.8 ℃，酶底质量比 1.5%，缓冲液 pH 值 5.4。考虑到实际工艺的可操作性，

表 4 ACP 的单糖组成

Table 4 Monosaccharide composition of ACP								
项目	岩藻糖	阿拉伯糖	半乳糖	葡萄糖	木糖	果糖	半乳糖醛酸	葡萄糖醛酸
摩尔百分比/%	6.19	1.60	5.33	53.91	4.53	26.00	2.00	0.45

表 5 ACP 中糖、蛋白质和多酚含量

Table 5 Carbohydrate, protein and polyphenolic contents of ACP

项目	糖含量/%	蛋白含量/%	多酚含量/%
ACP	95.49±1.31	1.07±0.12	0.11±0.02

2.3.2 红外光谱分析

红外光谱通常用于检测多糖的特征有机基团，

将最优提取工艺调整为提取时间 4.5 h，提取温度 42.0 ℃，酶底质量比 1.5%，缓冲液 pH 值 5.3。为了证明 Box-Behnken 的正确性和合理性，使用上述得到的最优提取条件，通过三次平行测定实验，ACP 的平均得率为 18.54%。该得率与模型预测最大值相对误差小于 1.0%，说明本响应面实验优化 ACP 的提取工艺是有效的。

2.3 ACP 物化指标

2.3.1 ACP 化学组成

利用离子交换色谱法，测定 ACP 的单糖组成。结果如表 4 所示，ACP 由 8 种单糖组成，分别为岩藻糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、果糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸。其中，葡萄糖、果糖、岩藻糖、半乳糖和木糖为主要单糖，且摩尔比为 53.91:26.00:6.19:5.33:4.53。如表 5 所示，ACP 的粗多糖、蛋白质和多酚含量分别为 95.49%、1.07%和 0.11%。ACP 中粗多糖含量高于采用水提法提取的天冬多糖（TD-80）（63.1%）和（ARP）（93.7%）^[8,9]。以上结果表明提取得到的 ACP 的纯度较高。

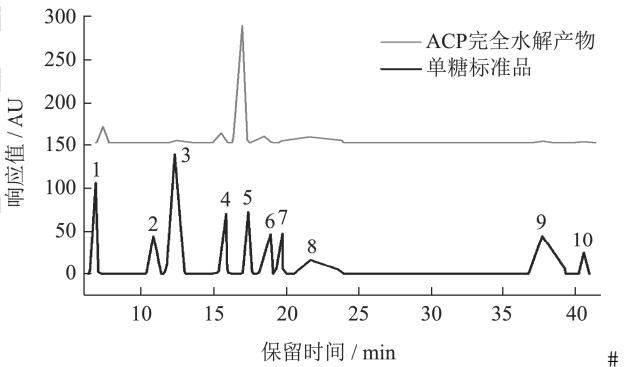


图 8 ACP 单糖组成的离子色谱图

Fig.8 The ion-chromatography of ACP monosaccharide composition

注：1.岩藻糖；2.鼠李糖；3.阿拉伯糖；4.半乳糖；5.葡萄糖；6.木糖；7.甘露糖；8.果糖；9.半乳糖醛酸；10.葡萄糖醛酸。

3 411、2 933、1 743、1 411 和 1 109 cm⁻¹ 处的吸收峰是多糖的典型特征^[22]。如图 9a 所示，3 400 cm⁻¹ 处的强吸收峰表明 O-H 基团的存在^[23]；3 000~2 800 cm⁻¹ 范围内的吸收峰归因于 C-H 拉伸和弯曲振动，包括 CH、CH₂ 和 CH₃；约在 1 740 和 1 630 cm⁻¹ 处吸收峰可能由于 C=O 拉伸振动和不对称拉伸引起，说明糖醛酸的存在^[24]。指纹区 1 200~800 cm⁻¹ 处吸收峰与糖苷

键的构型有关, $1\ 036\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 109\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰由 C-O-C 和 C-O-H 拉伸振动引起, 表明 ACP 中存在吡喃糖环, $822\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰表明 ACP 存在 α -构型^[25]。

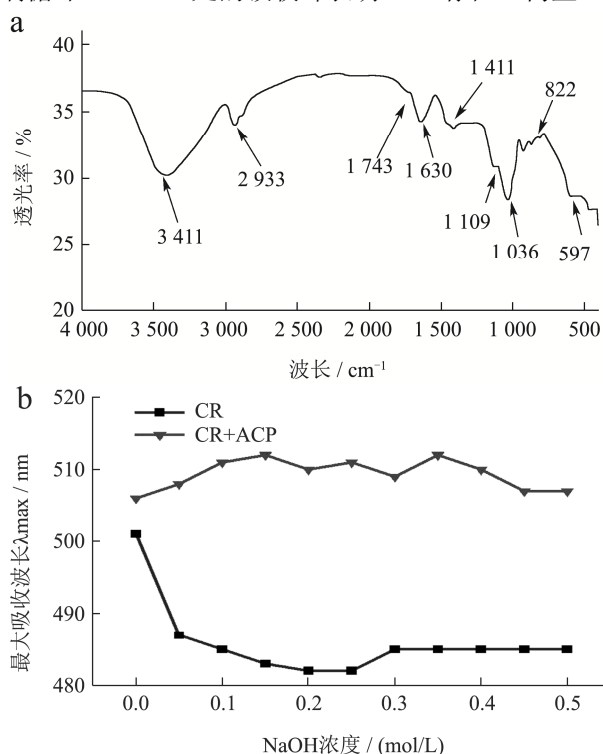


图9 ACP 红外 (a) 和刚果红 (b) 分析

Fig.9 FT-IR spectra (a) and Congo red (b) of ACP

2.3.3 刚果红分析

刚果红法用于检测多糖中的三螺旋构象, 多糖的三螺旋结构影响其生物活性^[26]。氢氧化钠浓度对刚果红多糖复合物 λ_{max} 的影响如图 9b 所示, 随着氢氧化钠浓度的增加, 刚果红-ACP 溶液的 λ_{max} 相对于空白组 (刚果红溶液) 发生红移。可知, ACP 具有三螺旋结构。

2.4 ACP 抗氧化能力

因为多糖的大多数生物活性与其抗氧化性能有关^[27], 所以本实验通过检测 DPPH、羟基和 ABTS⁺清除力探究 ACP 的抗氧化活性。

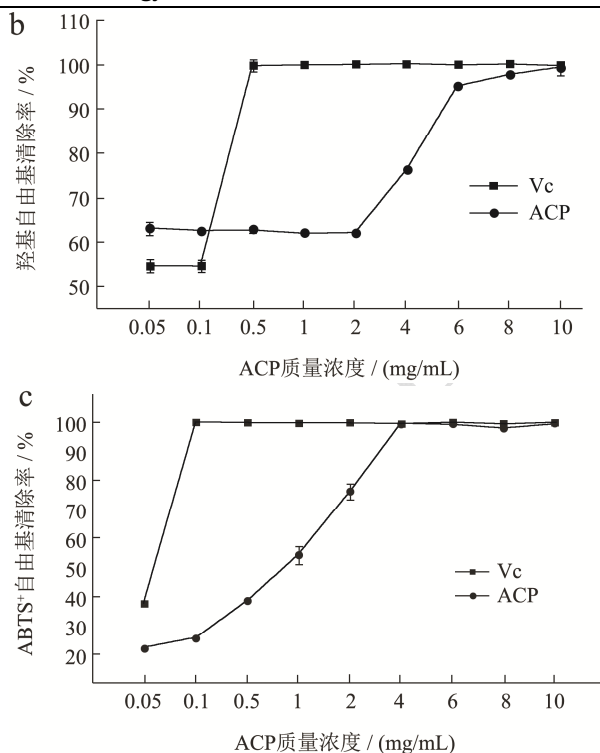
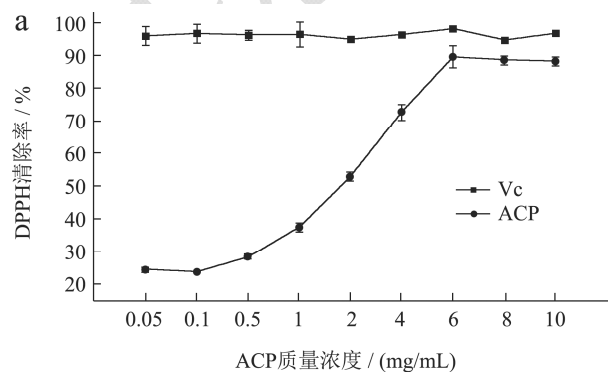


图10 ACP 对 DPPH、羟基和 ABTS⁺自由基的清除能力

Fig.10 DPPH, OH and ABTS⁺ free radical scavenging capacity of ACP

2.5 ACP 的吸湿性测定

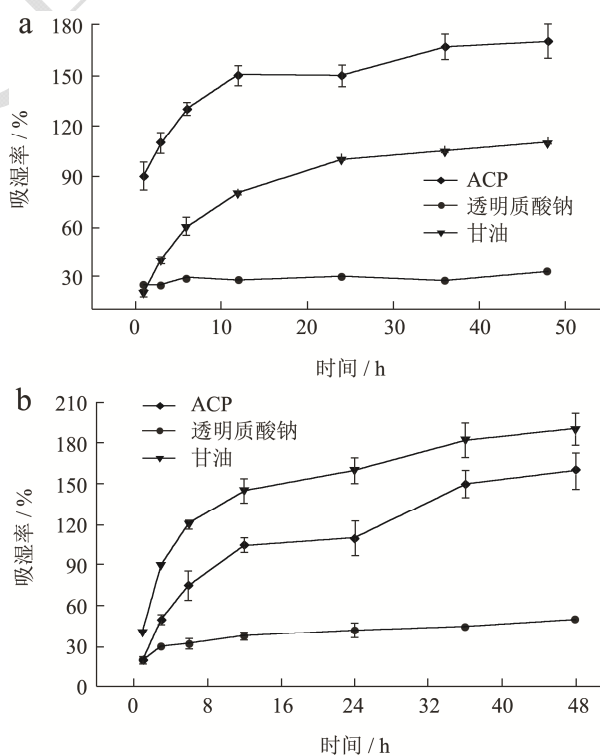


图11 相对湿度 43% (a)、81% (b) 条件下的吸湿率

Fig.11 Moisture absorption under relative humidity of 43% (a), 81% (b)

由图 11a、11b 可知,在相同浓度下,相对湿度 43%条件下的吸湿率从大到小: ACP>甘油>透明质酸钠;相对湿度 81%条件下的吸湿率从大到小: 甘油>ACP>透明质酸钠,吸湿率均随着时间的增加而降低。在同一时间下,ACP 在相对湿度 43%条件下的吸湿率均高于相对湿度 81%条件下的吸湿率。在相对湿度 43%条件下,ACP 的吸湿性在 36.0 h 达到了最大值,且在相对湿度 43%和 81%条件下,ACP 最大吸湿率差异不显著 ($P>0.05$)。这些结果说明增加相对湿度,不能增大吸湿性。该结果与黄秋葵多糖、银耳多糖等中药植物多糖相比,ACP 具有更强的吸湿性^[17,28]。

3 讨论

多糖的化学结构是其生物活性的物质基础,且植物源多糖由于其副作用和毒性低,越来越受到人们的关注^[29-31]。本研究以复合酶法得到 ACP,得率为 18.54%。传统的水提法得到天冬多糖 TD-80 和 ARP 的主要单糖组成分别为半乳糖、葡萄糖和半乳糖醛酸(摩尔比 3.16:15.70:25.90)和半乳糖、葡萄糖和半乳糖醛酸(摩尔比 4.42:12.66:4.83)^[8,9]。Sun 等^[32]从天冬中提取得到一种新型菊粉型多糖。菊粉属于果聚糖碳水化合物,通常由 20 至 60 个单体组成。单糖组成结果表明 ACP 主要由葡萄糖(53.91%)组成。由此可知,复合酶法获得的天冬粗多糖区别于传统方法获得的多糖为新型的天冬多糖。抗氧化活性结果表明,ACP 具有良好的清除自由基(DPPH,羟基和 ABTS⁺)活性,与、长角豆多糖西府海棠果实多糖的研究结果一致^[33-35]。在吸湿性实验中,ACP 在相对湿度 43%条件下的吸湿率高于甘油和透明质酸钠。这些结果说明天冬粗多糖具有较高的抗氧化活性和较优的吸湿特性。

4 结论

采用复合酶法提取天冬粗多糖,通过单因素实验选取提取时间、提取温度、酶底质量比和缓冲液 pH 值作为优化 ACP 得率的 4 个因素,通过 Box-Behnken 实验和响应面优化获得最优提取工艺为提取时间 4.5 h,提取温度 42.0 °C,酶底质量比 1.5%,缓冲液 pH 值 5.3,得率为 18.5%。物化指标结果表明,ACP 纯度为 95.45%,蛋白质和多酚含量分别为 1.07%和 0.11%;ACP 主要由葡萄糖、果糖、岩藻糖、半乳糖和木糖组成,摩尔比为 53.91:26.00:6.19:5.33:4.53,且具有双螺旋结构。红外光谱分析表明 ACP 为 α 构型的吡喃糖。另外,ACP 具有较强的抗氧化活性和吸湿性能。关于 ACP 的精细结构、结构-特性、结构-活性的关系,以及更多的生物活性研究仍需更深入的研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会,中华人民共和国药典一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 刘梦迪.天冬饮片产地加工与炮制一体化工艺研究[D].合肥:安徽中医药大学,2017..
- [3] 张艳,赵佳琛,金艳,等.经典名方中天冬的本草考证[J].中国现代中药,2020,22(8):1393-1403.
- [4] 鄢贵,张复中,施后奎,等.天冬化学成分及药理作用研究进展[J].广东化工,2021,48(21):116-118,130.
- [5] 林钰文.中药天冬研究进展[J].海峡药学,2008,6:90-93.
- [6] Zhao Z W, Wang L, Ruan Y, et al. Physicochemical properties and biological activities of polysaccharides from the peel of *Dioscorea opposita* Thunb. extracted by four different methods [J]. Food Science and Human Wellness 2023, 12(1): 130-139.
- [7] Wang N F, Jia G G, Wang X F, et al. Fractionation, structural characteristics and immunomodulatory activity of polysaccharide fractions from asparagus (*Asparagus officinalis* L.) skin [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 256(2):117514.
- [8] 牧丹,萨仁高娃,包良,等.天冬多糖的结构、免疫调节活性及体外抗氧化活性[J].中国食品学报,2022,22(8):51-60.
- [9] 罗德啟.天冬多糖的提取与单糖组成分析[J].医药导报,2011,30(4):451-453.
- [10] 曹渊,徐彦芹,夏之宁,等.超声复合酶法提取天冬多糖[J].中药材,2009,32(4):622-625.
- [11] Sinkhonde D. Generating response surface models for optimisation of CO₂ emission and properties of concrete modified with waste materials [J]. Cleaner Materials, 2022, 6: 100146.
- [12] Kazemian M E, Gandjalikhan Nassab S A, Jahanshahi Javaran E. Comparative techno-economic investigation of CCHP combined by GSHP based on response surface methodology [J]. Thermal Science and Engineering Progress, 2022, 34: 101386.
- [13] Dorleku W P, Bayitse R, Hansen A C H, et al. Response surface optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peels without chemical and hydrothermal pretreatment [J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2022: 1-14.
- [14] 苏超,蔡为荣,丁伯乐,等.响应面法优化黄山石耳多糖提取工艺[J].绵阳师范学院学报,2022,41(8):67-73.
- [15] Wang L, Zhao Z W, Zhao H Q, et al. Pectin polysaccharide from *Flos Magnoliae* (Xin Yi, *Magnolia biondii* Pamp. flower buds): Hot-compressed water extraction, purification

- and partial structural characterization [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 122.
- [16] 安星亮,赵永亮,王欢,等.银耳多糖提取工艺的响应面法优化及抗氧化和保湿性研究[J].食品研究与开发,2022,43(15): 123-130.
- [17] 伍晓萍,代玉玲,张玲,等.三七多糖吸湿、保湿性能及体外抗氧化活性[J].昆明医科大学学报,2022,43(5):1-6.
- [18] Khatoon H, Rai J P N. Optimization studies on biodegradation of atrazine by *Bacillus badius* ABP6 strain using response surface methodology [J]. Biotechnology Reports, 2020, 26: e00459.
- [19] Tetteh E, Amano K O A, Asante-Sackey D, et al. Response surface optimisation of biogas potential in co-digestion of *Miscanthus fuscus* and cow dung [J]. International Journal of Technology, 2018, 9(5): 944-954.
- [20] Sullivan S A, Tran A Q M, Xu G, et al. Asparagus polysaccharide inhibits cell proliferation, adhesion and invasion in endometrial cancer cells [J]. Gynecologic Oncology, 2017, 145: 133.
- [21] Zhao Q, Kennedy J F, Wang X, et al. Optimization of ultrasonic circulating extraction of polysaccharides from *Asparagus officinalis* using response surface methodology [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(2): 181-187.
- [22] Wang R, Chen P, Jia F, et al. Optimization of polysaccharides from *Panax japonicus* CA Meyer by RSM and its anti-oxidant activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(2): 331-336.
- [23] Lee Y X, Ahmad F, Kakooei S, et al. Fire-resistant properties of modified epoxy based intumescent fire-retardant coating: hybridizing of oyster shell powder with glass frit [C]// IOP. Conference Series: Materials Science and Engineering. IOP Publishing, 2021, 1176(1): 012025.
- [24] Liu X, Renard C M, Bureau S, et al. Revisiting the contribution of ATR-FTIR spectroscopy to characterize plant cell wall polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 262: 117935.
- [25] Chen G J, Kan J Q. Characterization of a novel polysaccharide isolated from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and assessment of its antioxidant *in vitro* and *in vivo* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 166-174.
- [26] Yu Y, Shen M, Song Q, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 183: 91-101.
- [27] Cui Y, Liu X, Li S, et al. Extraction, characterization and biological activity of sulfated polysaccharides from seaweed *Dictyopteris divaricate* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 117: 256-263.
- [28] 朱彬娜,孙佳颖,胡国盼.黄秋葵多糖的吸湿保湿性能研究[J].湖南农业科学,2018,11:98-100.
- [29] 谭西,周欣,陈华国.植物多糖构效关系研究进展[J].中国中药杂志,2017,42(21):4104-4109.
- [30] 曾小燕,李鸿霞,梁纪强,等.中药多糖体外抗氧化作用研究进展[J].亚太传统医药,2020,16(7):181-188.
- [31] J Yang, S Han, H Zheng, et al. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides [J]. Carbohydrate polymers, 2015,123: 53-66.
- [32] Sun Q L, Zhu L X, Li Y X, et al. A novel inulin-type fructan from *Asparagus cochinchinensis* and its beneficial impact on human intestinal microbiota [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 247: 116761.
- [33] Y Hui, H Junli, W Chuang. Anti-oxidation and anti-aging activity of polysaccharide from *Malus micromalus* Makino fruit wine [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 1203-1212.
- [34] Falch B H, Espevik T, Ryan L, et al. The cytokine stimulating activity of (1→3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation [J]. Carbohydrate Research, 2000, 329(3): 587-596.
- [35] Dammak A, Ben Slima S, Gomes da Silva M D R, et al. Antioxidant and antibacterial activities of a purified polysaccharide extracted from *Ceratonia siliqua* L. and its involvement in the enhancement performance of whipped cream [J]. Separations, 2022, 9(5): 117.