

响应面优化纤维素酶法提取茶花多糖工艺及其抗氧化活性研究

巩 健

(淄博职业学院制药与生物工程系, 山东淄博 255314)

摘要:目的:优化纤维素酶提取茶花多糖的工艺,并评价其抗氧化活性。方法:以茶花多糖得率为响应值,在单因素实验基础上,以液料比、酶解温度、酶解时间、酶添加量为实验因素,采用响应面法建立数学模型,筛选最佳提取工艺条件;采用自由基清除能力体系评价茶花多糖的抗氧化活性。结果:通过二次回归模型响应面分析,影响茶花多糖得率的因素按主次顺序排列为:酶解时间>酶解温度>液料比>酶添加量;确定纤维素酶酶解茶花多糖最佳工艺条件为纤维素酶添加量 5.0 mg/mL、液料比 9:1 mL/g、酶解温度 48 ℃、酶解时间 71 min,在此条件下茶花多糖得率为 15.28%,模型方程理论预测值为 15.91%,两者相对误差小于 5%。茶花多糖具有较强的抗氧化活性,对 DPPH 和 O₂⁻· 自由基的半数抑制浓度分别为 0.974、1.342 mg/mL,但与维生素 C 比较,抗氧化活性较弱。结论:采用响应面法优化得到了茶花多糖的最佳提取工艺,该工艺方便可行,得到的多糖具有较强的抗氧化活性。

关键词:茶花,多糖,响应面,酶法提取,抗氧化活性

Study on the optimization of enzymatic extraction technology of polysaccharide from *Camellia japonica* L. by response surface methodology and investigation on its antioxidant activity

GONG Jian

(Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Zibo Vocational Institute, Zibo 255314, China)

Abstract: Objective: This study aimed to optimize the enzymatic extraction technology of polysaccharide from *Camellia japonica* L. and investigate its antioxidant activity. Methods: The response surface method (RSM) was adopted to establish the mathematical model. The polysaccharides extraction rate was used as response value, and the ratio of water to material, cellulase concentration, extraction temperature and extraction time were used as experimental factors to optimize the polysaccharide extraction conditions from *Camellia japonica* L. Antioxidant activity of polysaccharides was measured by DPPH and O₂⁻· free radical elimination method. Results: The optimum conditions obtained by RSM were as follows, polysaccharide yield was most significantly affected by extraction time, followed by extraction temperature, water to material ratio and cellulase concentration. The concentration of cellulase was 5.0 mg/mL, extraction time was 71 min, the ratio of water to feedstock was 9:1 mL/g, extraction temperature was 48 ℃. Under the optimal conditions, the predicted extraction rate by mathematical model was 15.91%, while the experimental extraction rate was 15.28%, with a difference of less than 5%. IC₅₀ of DPPH and O₂⁻· were 0.974 mg/mL and 1.342 mg/mL, respectively. Antioxidant activity of sample polysaccharides was weaker than those of vitamin C. Conclusion: The optimum enzymatic extraction technology of the polysaccharides from *Camellia japonica* L. by RSM was convenient and feasible, and the extracted polysaccharides had good antioxidant activity.

Key words: *Camellia japonica* L.; polysaccharide; response surface methodology; enzymatic extraction; antioxidant activities

中图分类号: TS282

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)17-0197-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.17.031

天然产物中多糖具有抗肿瘤、抗炎、增强免疫力、降血糖等多种生物活性,且其毒副作用小,越来越受到研究者的重视^[1-2],如从山苦茶^[3]、蒙古口蘑^[4]、小花八角^[5]、苦丁茶^[6]等提取多糖。茶花(拉丁

名: *Camellia japonica* L.)又名山茶花,属山茶科植物,主要分布于中国和日本,我国山东、四川、江西等地有野生种;茶花富含茶多酚、蛋白质、多糖、咖啡碱、花白甙及多种氨基酸等,具有一定的药用价值^[7-8]。

收稿日期: 2014-12-15

作者简介: 巩健(1967-),女,本科,副教授,研究方向: 生物技术应用, E-mail: ysd87@163.com。

研究表明,茶花多糖对实验性糖尿病大鼠具有降血糖活性,并对大鼠二次造模的高血糖症有预防作用^[9]。江新凤等以水为溶剂 90 ℃ 提取茶花多糖,提取液用乙醇进行沉淀,得到多糖提取率为 10.37%^[10],针对茶花多糖提取的文献报道少,得率低,且未见酶法提取其多糖的相关研究。本实验拟采用响应面法优化纤维素酶提取茶花多糖的最佳工艺条件,同时采用自由基清除能力体系评价其体外抗氧化活性,为茶花多糖的进一步开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

茶花 购自中草药市场,烘干至恒重备用;纤维素酶(15 U/mg) 广州齐云生物科技;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、D-无水葡萄糖、维生素C(V_c) 美国 Sigma;其它为分析纯。

UV755B 紫外分光光度计 深圳瑞鑫达;PHS-3E酸度计 上海精科;离心机 德国 eppendorf;HL-2 恒流泵 上海沪西;HSY-B 双功能水浴恒温摇床 金坛市精达仪器;高速万能粉碎机 北京长峰金鼎;电热鼓风干燥箱 上海焯南仪器。

1.2 茶花多糖的提取

精确称取 5.0 g 粉碎并过 100 目筛后的茶花粉,经脱脂、酶法浸提、灭酶、抽滤残渣、减压浓缩、乙醇沉淀多糖、冷冻干燥等步骤得到茶花多糖。

1.3 多糖含量的测定

多糖测定采用苯酚-硫酸法^[11]。以葡萄糖(mg/mL)作为标准品测定提取液中茶花多糖的含量,待测样品用水稀释后使吸光度值在 0.2~1.0 的有效范围内。葡萄糖标准曲线为 $y = 0.0159x - 0.0396$, $R^2 = 0.9941$,式中 y 为吸光度、 x 为葡萄糖质量浓度(mg/mL)。茶花多糖得率计算如下:

$$Y(\%) = [(A \times B) / C] \times 100$$

式中:Y 为多糖得率(%);A 为由回归方程求得的多糖浓度(mg/mL);B 为多糖液体积(mL);C 为茶花质量(g)。

1.4 多糖提取单因素实验

酶解 pH5.0 和摇床转速 180 r/min 条件不变,分别考察酶添加量(2、4、6、8、10 mg/mL)、液料比(6:1、10:1、14:1、18:1、22:1 mL/g)、酶解温度(36、42、50、58 ℃)和酶解时间(30、60、90、120、150 min)对茶花多糖得率的影响。

1.5 响应面优化设计

依据单因素实验结果,选择液料比、酶解时间、酶解温度、酶添加量为自变量,根据 Box-Behnken 设计,进行四因素三水平的响应面分析实验,以多糖得率为响应值,利用 Design Expert 8.0 软件对数据进行分析,因素水平设计见表 1。

1.6 茶花多糖体外抗氧化活性测定

1.6.1 DPPH 自由基清除能力测定 取不同质量浓度的样品溶液 2 mL 和 2 mL DPPH 溶液(0.2 mmol/L)混匀,反应 30 min 后在 517 nm 处测定其吸光度 A_1 ,同法测定 2 mL 乙醇加样液的吸光度 A_2 ,以及 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 蒸馏水的吸光度 A_0 ,以 V_c 作为对照^[12]。

样品对 DPPH 自由基的清除率计算公式为:

$$Y(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

表 1 响应面因素设计及水平

Table 1 Factors and levels in response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A 液料比(mL/g)	8:1	10:1	12:1
B 酶解温度(℃)	45	50	55
C 酶解时间(min)	40	60	80
D 酶添加量(mg/mL)	4	6	8

1.6.2 O_2^- 的清除能力测定 取不同质量浓度的样品溶液 1 mL,加入 pH8.2、浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 4 mL,25 ℃ 水浴 10 min,再加入 0.1 mL 浓度为 25 mmol/L 的邻苯三酚,混匀保温 5 min 后,即刻加入 2 滴 10 mol/L 的 HCl 终止反应,读取溶液在波长 325 nm 处的吸光度 B_1 ,同法测定用蒸馏水代替邻苯三酚后的吸光度 B_2 ,以及 1 mL 蒸馏水替代样品溶液后的吸光度 B_0 ,以 V_c 作为对照^[13]。样品对 O_2^- 的清除率计算公式为:

$$Y(\%) = [1 - (B_1 - B_2) / B_0] \times 100$$

1.7 数据分析

响应曲面模型的回归方程式和显著性统计通过 Design-Expert V8.0 软件(Stat-Ease, Inc.)进行计算和分析处理,系数的显著性通过 Student's t 检验和 p 值进行分析, $p < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 纤维素酶添加量对多糖得率的影响 结果如图 1 所示,当酶添加量增加到 6 mg/mL 时,多糖得率达到最大,随着酶添加量的进一步增加,多糖得率没有增加,说明在该底物浓度下,酶浓度已经趋于饱和,故酶添加量取 6 mg/mL。

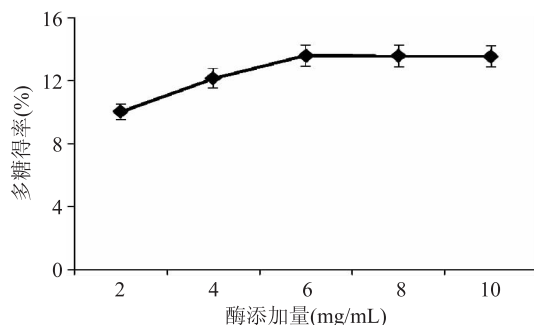


图 1 酶添加量对多糖得率的影响

Fig.1 Effect of cellulase concentration on the extraction rate of polysaccharide

2.1.2 液料比对茶花多糖得率的影响 结果如图 2 所示,多糖得率随着液料比的增加呈先增大后减小的趋势,当液料比增加到 10:1 mL/g 时,多糖得率达到 12.95%,之后,多糖得率呈下降趋势,考虑后续工艺处理及生产成本,控制液料比 10:1 mL/g 为宜。

2.1.3 酶解温度对多糖得率的影响 结果如图 3 所示,当酶解温度为 50 ℃ 时,多糖得率达到 13.05%,当

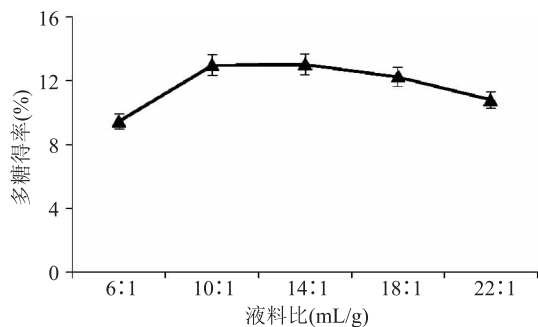


图2 液料比对多糖得率的影响

Fig.2 Effect of the ratio of water to material on the extraction rate of polysaccharide

酶解温度为 58 ℃ 时,多糖得率反而减小,这是因为温度过高导致酶活力下降,故最佳酶解温度选择 50 ℃。

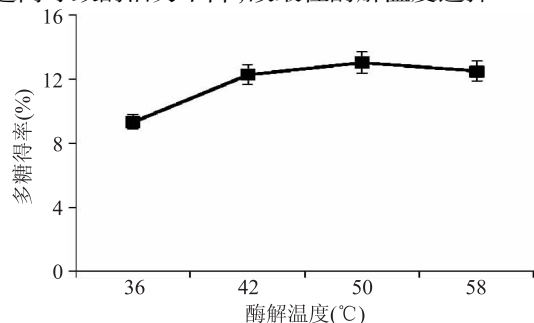


图3 酶解温度对多糖得率的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis temperature on the extraction rate of polysaccharide

2.1.4 酶解时间对多糖得率的影响 结果如图 4 所示,当提取时间大于 60 min 后,多糖得率增加趋于平缓,120 min 时得率比 90 min 稍有减小,因为酶解时间过长,酶的催化活性下降,进而对多糖得率影响不大,故最佳酶解时间选择 60 min。

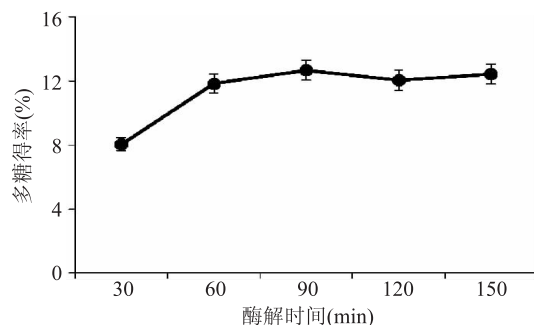


图4 酶解时间对多糖得率的影响

Fig.4 Effect of enzymolysis time on the extraction rate of polysaccharide

2.2 响应面优化实验

2.2.1 响应面实验结果 实验方案及实验结果见表 2,回归模型方差分析见表 3。

2.2.2 结果分析及模型方程的建立 对表 3 中数据进行回归拟合,得到自变量与多糖得率(Y)的二次多项回归方程为:

$$Y = 15.25 - 0.52A - 0.70B + 0.95C - 0.35D + 1.71AB - 0.15AC - 0.045AD + 0.88BC + 0.63BD - 0.92CD - 1.21A^2 - 1.64B^2 - 0.98C^2 - 1.14D^2$$

表 2 多糖得率的响应面实验方案及结果

Table 2 Response surface design arrangement and experimental results

实验号	A 液料比	B 酶解温度	C 酶解时间	D 酶添加量	Y 多糖得率 (%)
1	0	0	-1	1	12.18
2	1	-1	0	0	10.14
3	0	1	0	1	12.28
4	-1	0	-1	0	12.66
5	0	1	0	-1	11.72
6	0	0	1	-1	15.12
7	-1	1	0	0	10.43
8	0	-1	-1	0	13.77
9	1	1	0	0	12.53
10	-1	-1	0	0	14.89
11	1	0	0	1	12.44
12	0	0	0	0	15.39
13	0	-1	1	0	13.91
14	0	1	-1	0	10.12
15	1	0	0	-1	13.07
16	1	0	-1	0	12.02
17	0	0	-1	-1	11.22
18	0	0	0	0	15.01
19	0	-1	0	1	12.28
20	0	0	0	0	14.66
21	-1	0	0	1	13.36
22	0	-1	0	-1	14.23
23	0	0	0	0	16.01
24	-1	0	1	0	14.71
25	0	1	1	0	13.78
26	0	0	0	0	15.18
27	-1	0	0	-1	13.81
28	0	0	1	1	12.38
29	1	0	1	0	13.47

对该模型进行方差分析,结果如表 3 所示,该回归模型 $p < 0.0001$,方程模型达到极显著,失拟项 $p = 0.5159 > 0.05$,不显著;该回归模型的总决定系数 $R^2 = 0.9468$,调整决定系数 $R^2_{Adj} = 0.8973$,以上参数均说明该模型拟合程度好,实验误差小,故该回归方程模型成立,可以用此模型对酶解提取茶花多糖进行分析及预测。

由表 3 可知,纤维素酶提取茶花多糖的工艺参数中,影响多糖得率的因素按主次顺序排列:酶解时间(C) > 酶解温度(B) > 液料比(A) > 酶添加量(D),其中 B、C 达到极显著水平,A 达到显著水平,考察因素间交互作用,AB、BC、CD 存在交互作用,其中 AB 达到极显著水平,BC、CD 达到显著水平。

2.2.3 响应面分析 对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合,酶添加量、液料比、酶解温度和酶解时间 4 个因素之间交互作用对多糖得率的影响如图 5 所示。由图 5A、5D、5F 和方差分析结果可知,AB、BC、CD 的交互作用对茶花多糖得率的影响显著,AD、

表3 拟合二次多项式模型的方差分析

Table 3 The fitted quadratic polynomial model of ANOVA

因素	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	68.59	14	4.90	18.47	<0.0001	**
A 液料比	3.19	1	3.19	12.03	0.0038	*
B 酶解温度	5.82	1	5.82	21.95	0.0004	**
C 酶解时间	10.83	1	10.83	40.82	<0.0001	**
D 酶添加量	1.51	1	1.51	5.67	0.0320	
AB	11.73	1	11.73	44.21	<0.0001	**
AC	0.090	1	0.090	0.34	0.5695	
AD	8.100E-003	1	8.100E-003	0.031	0.8638	
BC	3.10	1	3.10	11.68	0.0042	*
BD	1.58	1	1.58	5.94	0.0288	
CD	3.42	1	3.42	12.90	0.0029	*
A ²	9.43	1	9.43	35.52	<0.0001	**
B ²	17.38	1	17.38	65.49	<0.0001	**
C ²	6.22	1	6.22	23.44	0.0003	**
D ²	8.36	1	8.36	31.52	<0.0001	**
残差	3.71	14	0.27			
失拟项	2.71	10	0.27	1.07	0.5159	
纯误差	1.01	4	0.25			
总误差	72.31	28				

$R^2 = 0.9468$ $R^2_{Adj} = 0.8973$ CV(变异系数) = 3.90%

注: * $p < 0.01$, 差异显著; ** $p < 0.001$, 差异极显著。

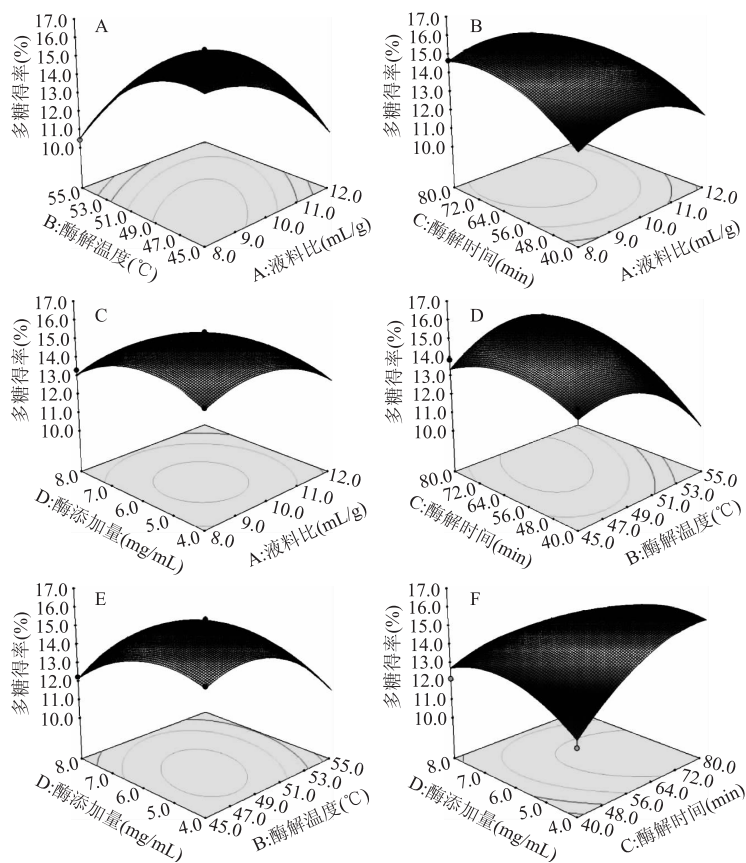


图5 各两因素交互影响多糖得率的响应面图

Fig.5 Response surface plot for the mutual effects of four variables on extraction rate of polysaccharide

BD、AC 间交互作用对多糖得率的影响不显著。通过对回归模型求解方程得出的最佳工艺为液料比

8.9:1 mL/g, 酶解温度 47.7 °C, 酶解时间 71.2 min, 酶添加量 5.0 mg/mL, 在此条件下多糖的最大得率为

15.91%。

2.2.4 优化工艺的验证实验 为检验响应面法优化后的工艺可靠性,考虑实际操作的可行性,茶花多糖提取最佳工艺修正为液料比 9:1 (mL/g),酶解温度 48 ℃,酶解时间 71 min,酶添加量 5 mg/mL,此条件下进行 3 组平行实验,所得多糖得率的平均值为 15.28%,而回归方程所得的多糖得率理论预测值为 15.91%,两者相对误差为 3.96%,说明运用响应面法优化得到的模型参数准确可靠。

2.3 茶花多糖体外抗氧化活性

2.3.1 多糖对 DPPH 自由基清除作用 由图 6 可知,随着质量浓度的增加,样品溶液多糖和 V_C 对 DPPH 自由基清除率不断增大,多糖质量浓度 8 mg/mL 时,样品溶液多糖对 DPPH 自由基清除率达到 89.03%,具有较强清除 DPPH 自由基的能力,但比 V_C 清除 DPPH 自由基的能力差。茶花多糖清除 50% DPPH 自由基的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.974 mg/mL, V_C 的 IC_{50} 为 0.563 mg/mL。

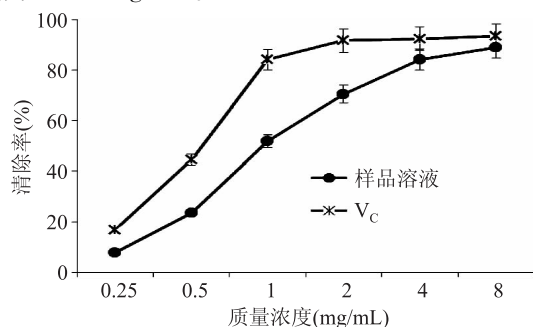


图 6 样品多糖和 V_C 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.6 Scavenging capacity of sample polysaccharide and vitamin C on DPPH free radicals

2.3.2 多糖对 O_2^- 清除作用 由图 7 可知,随着茶花多糖质量浓度的增加,对 O_2^- 的清除作用逐渐增强,当浓度达到 8 mg/mL 时,对 O_2^- 的清除率为 86.05%,说明茶花多糖具有较强的清除 O_2^- 的能力。 V_C 在质量浓度 0.25~1 mg/mL 范围内,对 O_2^- 的清除增加较快,1 mg/mL 时的清除率达到 88.14%,因此茶花多糖与 V_C 相比清除能力较弱,茶花多糖清除 O_2^- 的 IC_{50} 为 1.342 mg/mL, V_C 的 IC_{50} 为 0.524 mg/mL。

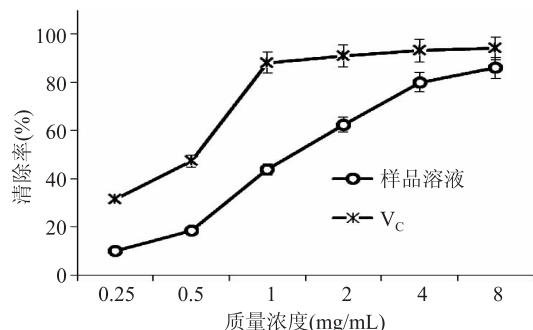


图 7 样品多糖和 V_C 对 O_2^- 的清除作用

Fig.7 Scavenging capacity of sample polysaccharide and vitamin C on superoxide anion free radicals

3 结论

研究表明纤维素酶法提取南瓜多糖,得率高达 17.34%,且具有强的抗菌活性^[14]。本研究通过单因素实验和响应面实验确定了纤维素酶提取茶花多糖的最佳工艺条件为:液料比 9:1 mL/g、酶解温度 48 ℃、酶解时间 71 min、酶添加量 5.0 mg/mL,此条件下多糖得率为 15.28%,回归方程所得的理论预测值为 15.91%,二者相对误差小于 5%,得率大于江新风等的研究^[10]。此外,影响茶花多糖得率的因素按主次顺序依次为:酶解时间 > 酶解温度 > 液料比 > 酶添加量。茶花多糖对 DPPH 自由基和 O_2^- 具有一定的清除作用,并与质量浓度呈正相关关系,但与 V_C 比较,茶花多糖清除两种自由基的能力较弱。茶花多糖对 DPPH 自由基和 O_2^- 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.974、1.342 mg/mL。综上所述,本研究采用响应面法优化得到了茶花多糖的最佳提取工艺,该工艺方便可行,得到的多糖具有较强的抗氧化活性。

参考文献

- [1] 安晓娟,冯琳,宋红平,等.植物多糖的结构分析及药理活性研究进展[J].中国药学杂志,2012,47(16):1271-1275.
- [2] Jiang C, Wang M, Liu J, et al. Extraction, preliminary characterization, antioxidant and anticancer activities *in vitro* of polysaccharides from *Cyclina sinensis*[J].Carbohydrate polymers, 2011,84(3):851-857.
- [3] 苏冰霞,张月,葛会林,等.山苦茶多糖的分离对抗氧活性的影响[J].食品科技,2013,38(9):160-164.
- [4] You Q, Yin X, Zhang S, et al. Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai[J].Carbohydrate polymers, 2014,99:1-10.
- [5] 连路宁,李雅双,刘杰,等.小花八角多糖提取优化工艺及自由基清除作用研究[J].食品工业科技,2014,35(15):205-209.
- [6] 黄敏桃,蔡鹏,黄云峰,等.响应面法优化苦丁茶多糖提取工艺研究[J].食品工业,2014,35(1):20-24.
- [7] 孙世利,庞式,赖兆祥,等.超声波辅助提取茶花多糖的工艺研究[J].广东农业科学,2010,37(11):168-170.
- [8] 任全进,于金平.止血凉血山茶花[J].园林,2003,(1):54-55.
- [9] 蔡璇,王元凤,毛芳芳,等.茶花粗多糖的降血糖作用和对高血糖的预防作用[J].现代食品科技,2011,27(3):262-266.
- [10] 江新风,高其璋,杨普香,等.乙醇沉淀法提取茶花多糖的研究[J].蚕桑茶叶通讯,2013(5):31-33.
- [11] 李粉玲,蔡汉权,严赞开,等.酶法提取芦根多糖的研究[J].食品工业科技,2009,30(4):156-159.
- [12] 盛情情,王文侠,宋春丽,等.米糠阿魏酰低聚糖的纤维素酶法提取工艺及其抗氧化活性[J].食品与发酵工业,2013,39(12):197-203.
- [13] 刘玉芬,夏海涛,徐芹喜.海菜多糖提取工艺的响应面法优化及其体外抗氧化作用[J].食品科学,2012,33(20):138-143.
- [14] Qian Z G. Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Cucurbita moschata* and their antibacterial activity [J]. Carbohydrate polymers, 2014,101:432-434.