

Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验设计优化 超声波-酶法提取青钱柳多糖工艺及结构初探

胡文兵, 杨占威, 陈 慧, 熊 磊, 彭 俊, 王文君*

江西农业大学 南昌市农产品加工与质量控制重点实验室, 南昌 330045

摘要: 为了开发利用青钱柳多糖(CPP)资源, 本文探究了超声波结合复合酶处理提取 CPP 的工艺条件并对其结构进行了初步分析。首先通过单因素实验获得各因素的最佳范围, 利用 Plackett-Burman 试验设计筛选影响 CPP 得率的关键因素, 再采用 Box-Behnken 设计对提取工艺进行优化。最后, 采用紫外、红外光谱以及气相色谱对 CPP 结构进行初步分析。结果表明, 关键因素为酶解 pH、复合酶添加量、酶解时间和超声功率。最佳工艺参数为酶解 pH 值 6.11, 复合酶添加量 4.81%, 酶解时间 1.685 h, 超声功率 96.9 W, 料液比 1:20, 超声时间 30 min, CPP 得率为 7.18%。CPP 具有多糖典型的羟基和醛基结构, 且单糖组成为鼠李糖:阿拉伯糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖 = 1.00:7.03:2.06:2.11:5.25:12.06。

关键词: 青钱柳多糖; 超声波; 复合酶; Plackett-Burman 试验设计; Box-Behnken 试验设计; 单糖组成

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.024

Optimization of Ultrasonic and Enzyme-assisted Extraction of Polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* by Plackett-Burman and Box-Behnken Experiment and Analysis of Its Structure

HU Wen-bing, YANG Zhan-wei, CHEN Hui, XIONG Lei, PENG Jun, WANG Wen-jun*

Key Lab for Agro-product Processing and Quality Control of Nanchang City, College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: To develop the resource of *Cyclocarya paliurus* polysaccharides (CPP), ultrasonic and enzyme-assisted extraction of CPP was optimized and its structure was preliminarily studied. Firstly, the optimum range of each single factor was identified by single factor experiment. Then, the key factors affecting the yield of CPP were screened with Plackett-Burman design, and the extraction of CPP was optimized with Box-Behnken experiment. Finally, UV, FTIR spectra and gas chromatograms were employed to preliminarily identify the structure of CPP. Results indicated that the key factors were pH, amount of mixed enzyme, enzymatic time and ultrasonic power. In addition, the optimal extraction conditions were pH of 6.11, amount of mixed enzyme of 4.81%, enzymatic time of 1.685 h, ultrasonic power of 96.9 W, solid to liquid ratio of 1:20, and ultrasonic time of 30 min. Under these conditions, the extraction yield of CPP was 7.18%. CPP was a typical polysaccharide and the monosaccharide composition was consisted of rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose, galactose, with a molar ratio of 1.00:7.03:2.06:2.11:5.25:12.06.

Key words: *Cyclocarya paliurus* polysaccharides; ultrasonic; mixed enzyme; Plackett-Burman experiment; Box-Behnken experiment; monosaccharide composition

青钱柳 [*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk] 系胡桃科青钱柳属落叶乔木, 又称为青钱李、摇钱树或

金钱柳, 属于国家二级保护树种, 该属现仅存一种, 且仅存于中国, 因而被誉为植物界的大熊猫, 医学界的第三棵树^[1]。青钱柳叶味甘甜, 民间用它当茶叶泡茶饮用, 发现该茶具有生津止渴, 清热解暑, 降血压和延年益寿的功效, 因而又有“甜茶、神茶”之称。大量文献指出, 青钱柳中含有多种生物活性物质, 包括蛋白质、多糖类、黄酮类、三萜类、皂苷、矿物质、氨

收稿日期: 2016-09-12 接受日期: 2016-11-01

基金项目: 国家自然科学基金(31560459, 31160319); 江西省自然科学基金(20151BAB204037); 江西省高等学校科技落地计划项目(KJLD13027); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ13281)

* 通讯作者 Tel: 86-532-88963253; E-mail: wwjun9999@sina.com

基酸等化合物^[2-7]。在这其中,青钱柳多糖是青钱柳当中主要的活性物质之一,其中含有 23.5% 的糖醛酸以及 64.8% 的中性糖^[8](包括鼠李糖、树脂糖醛、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和木糖),并且具有降血糖、降血脂,抗癌、抑菌和抗氧化等功效^[8-11]。因而青钱柳多糖近来受到了广泛的关注,成为当前研究的热点课题之一。

传统提取多糖的方法主要有热水浸提法和溶剂回流法,但都耗时、耗能,且提取效率不高,不利于多糖的大量提取。近些年来,国内外的研究成果表明,超声辅助协同酶法的提取技术具有很大的研究前景^[12,13]。超声波容易在液体中产生空化、剪切、剧烈搅拌等作用,结合酶高效的特点,使得植物细胞壁及组织能够快速地被降解^[14]。因而,与传统的提取方法相比,超声辅助协同酶法的提取方法具有省时、节能,提取效率高等优点。迄今为止,这种新型的提取方法已经被广泛地运用到各种植物多糖的提取当中^[13,14]。

目前,关于青钱柳多糖的提取已经有较多的文献的报道^[15,16],但运用超声辅助协同酶法优化青钱柳多糖的提取的研究尚未见报道。本文先采用正交设计筛选最佳复合酶比例,再利用 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验设计优化青钱柳多糖提取的工艺参数。并运用紫外、红外光谱扫描以及气相色谱对青钱柳多糖结构进行初步分析,为后续开发利用青钱柳资源及青钱柳多糖结构表征,生物活性等方面研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验原料与试剂

青钱柳叶采自江西省修水县,经自然晒干后,粉碎成粉末,过 60 目筛备用。纤维素酶(30 U/mg,来源于绿色木霉)、果胶酶(500 U/mg,来源于黑曲霉)、木瓜蛋白酶(600 U/mg,来源于木瓜),北京索莱宝科技有限公司;单糖标准品(鼠李糖,岩藻糖,阿拉伯糖,木糖,甘露糖,葡萄糖,半乳糖),美国 Sigma 公司;乙酸、乙酸酐、硼氢化钠、柠檬酸钠、磷酸氢二钠、无水乙醇,氯仿、正丁醇、硫酸、苯酚等均为分析纯,西陇化工股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

TDL-5-A 型离心机,上海安享科学仪器厂;PHS-3E 型精密 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公

司;AUY120 型电子分析天平,日本岛津公司;SB3200DTDN 型数显超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司;UV-5200PC 型紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;RE-5205 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;MD34 型透析袋(8000-14000Da),北京索莱宝科技有限公司;Nicoletis5 型傅里叶红外光谱仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;QQQ7000 气相色谱仪,美国安捷伦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 青钱柳多糖的提取

青钱柳粉末,50 ℃ 烘干(12 h)→准确称取 0.50 g 青钱柳粉末于 50 mL 离心管中→添加适量的复合酶→按预设料液比添加配置好相应 pH 的柠檬酸钠-磷酸二氢钠缓冲液→以一定温度酶解相应时间→沸水灭酶 10 min→按预设超声条件处理→离心(5000 rpm,10 min)→取上清液定容至 100 mL→测吸光度→计算得率。

1.2.2 标准曲线的绘制

葡萄糖标准品经 105 ℃ 干燥至恒重,精确称取 10.00 mg 至 50 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,配制成浓度为 0.20 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。依次吸取 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 葡萄糖标准液于 25 mL 容量瓶中,并加蒸馏水定容,摇匀备用。于 6 个具塞刻度试管中,各移入上述溶液 2 mL,再分别加入 1.0 mL 的 6% 苯酚溶液和 5.0 mL 浓硫酸,混匀,室温下静置 30 min 后,于 490 nm 波长处测吸光度。以标准葡萄糖质量浓度 C (mg/mL) 为横坐标,以吸光度值 A 为纵坐标,得出回归方程: $A = 14.109C + 0.0902, R^2 = 0.9991$ 。

1.2.3 青钱柳多糖得率计算

移取 1 mL 定容后的青钱柳叶提取液,按照 1.2.2 的方法测定其对应的吸光度,重复三次,取平均值,按以下公式计算青钱柳多糖的得率。

$$\text{青钱柳多糖得率}(\%) = \frac{nCV_0}{1000m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: n 为稀释倍数; C 为提取的青钱柳叶多糖样品液的质量浓度(mg/mL); V_0 为青钱柳叶多糖提取液定容后的总体积,mL; m 为称取的预处理的青钱柳叶粉末的质量,g。

1.2.4 单因素实验

称取 0.50 g 经预处理的青钱柳粉末,设定 50 ℃ 的酶解温度,预设 3% 复合酶添加量(纤维素酶:果胶酶:木瓜蛋白酶 = 3:1:3^[13]),料液比 1:15,pH

值 6.0, 酶解时间 1 h, 超声功率 90 W, 超声时间 30 min 为单因素实验中的常规量, 以复合酶添加量 (1%、2%、3%、4%、5%、6%)、料液比 (1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30), 酶解 pH (3、4、5、6、7、8)、酶解时间 (0.5、1、1.5、2、2.5、3 h)、超声功率 (30、60、90、120、150、180 W)、超声时间 (10、20、30、40、50、60 min) 6 个单因素变量替换试验中相应的常规量, 按照 1.2.1 及 1.2.2 实验步骤提取、测定并计算其

得率, 每个处理均重复三次。

1.2.5 Plackett-Burman 试验设计筛选影响青钱柳叶多糖得率的关键因素

在单因素实验的基础上, 以青钱柳叶多糖得率为响应值, 对复合酶、料液比、酶解 pH、酶解时间、超声功率和超声时间 6 个影响因素进行评价, 筛选出主效应因子, 每个因素取最低 (-1) 和最高 (1) 两个水平, 共 12 组实验。试验因素和水平取值见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验设计的因素水平表和编码

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experimental design

因素 Factors	编码 Coding	低水平 (-) Low level	高水平 (+) High level
复合酶添加量 Amount of mixed enzyme (%)	X_1	3%	5%
料液比 Ratio of solid to liquid (g/mL)	X_2	1:15	1:25
酶解 pH Enzymatic pH	X_3	5	7
酶解时间 Enzymatic time (h)	X_4	1.0	2.0
超声功率 Ultrasonic power (W)	X_5	60	120
超声时间 Ultrasonic time (min)	X_6	30	50

1.2.6 响应曲面法优化实验设计

根据 Plackett-Burman 试验设计结果, 选取复合酶添加量、酶解 pH、酶解时间、超声功率 4 个因素,

进行四因素三水平的 Box-Behnken 试验设计 (见表 2)。对 Box-Behnken 试验设计结果建立数学回归模型并分析。

表 2 Box-Behnken 试验设计因素与水平编码

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken experiment

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
复合酶添加量 Amount of mixed enzyme (%)	3%	4%	5%
酶解 pH Enzymatic pH	5	6	7
酶解时间 Enzymatic time (h)	1.0	1.5	2.0
超声功率 Ultrasonic power (W)	60	90	120

1.2.7 青钱柳多糖结构初步分析

将上述提取的粗多糖进行减压浓缩, 连续用无水乙醇 (浓缩液: 无水乙醇 = 1:3) 重复醇沉三次, 再利用 Sevag (氯仿: 正丁醇 = 5:1) 法^[17] (Sevag: 粗多糖 = 1:5) 除去游离蛋白 6 次, 剧烈震荡 30 min, 静止后分液。对分离液进行透析后, 经减压浓缩和冷冻干燥获得纯度较高的青钱柳多糖。并将其用于紫外、红外光谱检测以及单糖组成分析。

紫外光谱分析: 用蒸馏水将所提取的青钱柳多糖配置成 0.05 mg/mL 的溶液, 并以蒸馏水为空白, 用紫外分光光度计在 200 ~ 500 nm 范围内进行连续的光谱扫描。

红外光谱分析: 取 0.6 g KBr 与 5 mg 待测青钱柳多糖样品进行研磨, 制成均匀分散的薄片, 以 KBr 为空白, 用红外扫描仪在 500 ~ 4000 cm^{-1} 范围内进行连续的扫描。

单糖组成分析: 称取 2.0 mg 纯化后的多糖, 用 1 mL 的 2 mol/L 三氟乙酸水解 90 min, 旋干, 加入 2 mL 甲醇去除残留的三氟乙酸。水解样品使用 60 mg 的硼氢化钠还原 8 h 后, 再加入冰醋酸中和, 旋干, 加入 3 mL 甲醇, 反复三次, 最后旋蒸至粉末, 于 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干。烘干后的样品加入 1 mL 乙酸酐乙酰化, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 冷却, 加入 3 mL 甲苯, 减压浓缩蒸干, 重复四次, 以去除多余的酸酐。将乙酰

化后的产物用 3 mL 氯仿溶解后转移至分液漏斗,加入少量蒸馏水充分震荡后,除去上层水溶液,如此重复四次。氯仿层以适量的无水硫酸钠干燥,定容至 10 mL 待 GC 分析。GC 检测条件:程序升温条件为:起始温度 120 °C,以 3 °C/min 升温至 250 °C/min;保持 5 min;进样口温度为 250 °C,检测器温度

为 250 °C,氢气流量 30 mL/min,空气流量 400 mL/min;载气为氮气,流速为 1 mL/min。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

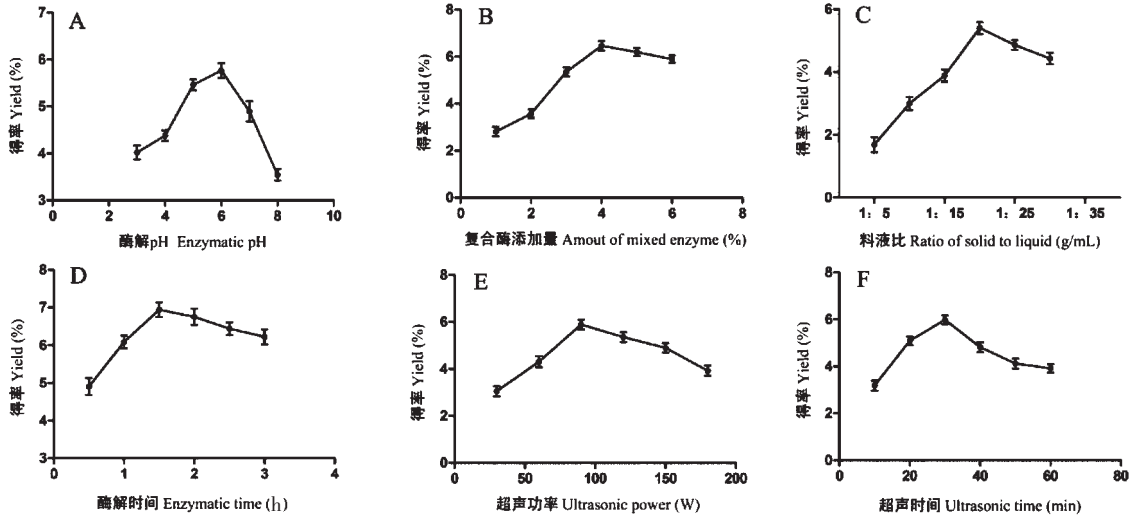


图 1 pH (A)、复合酶添加量 (B)、料液比 (C)、酶解时间 (D)、超声功率 (E) 以及超声时间 (F) 对青钱柳多糖得率的影响

Fig. 1 The effects of enzymatic pH (A), amount of mixed enzyme (B), solid to liquid ratio (C), enzymatic time (D), ultrasonic power (E) and ultrasonic time (F) on yield of CPP

2.1.1 pH 对青钱柳多糖得率的影响

由图 1A 可知,在 pH 为 3~6 时,青钱柳多糖的得率随着 pH 上升而升高,并在 pH=6 时达到最高,而当 pH 大于 6 时,得率急剧下降。这是因为酶在最适 pH 范围内表现出最强活性,而大于或小于最适 pH 都会降低酶的活性。故酶解 pH 应选择 5~7 为宜。

2.1.2 复合酶添加量对青钱柳多糖得率的影响

由图 1B 可知,当复合酶添加比例在 1%~4% 时,青钱柳多糖的得率随着复合酶添比例的增加而升高,并在 4% 时达到最高,但当添加比例大于 4% 时,得率呈现缓慢下降的趋势。酶在适宜浓度范围内,随着酶量的增加,酶与底物接触的机会也随之增加,提高了酶促反应速率,加速了细胞壁的降解,使得细胞内物质充分快速地释放出来。当酶达到饱和和溶度时,继续提高酶的溶度,反而会使酶促反应降低,由于所有底物均已和酶形成中间产物,一部分酶即失去了与底物结合的机会,且酶本身具有竞争性抑制作用,故当复合酶添加比例超过一定范围时,青钱柳多糖的得率反而会降低。从节约成本和酶解效

果的角度来考虑,复合酶添加量应控制在 3%~5% 为宜。

2.1.3 料液比对青钱柳多糖得率的影响

由图 1C 可知,随着料液比的增加,青钱柳多糖的得率也随之升高,且在料液比为 1:20 时达到最大。这可能是因为料液比的增大可以有利于溶剂渗透至植物细胞中,使多糖更充分地溶解。但当料液比大于 1:20 时,得率却反而在下降,这可能因为大量的溶剂在进行超声加热时没有得到充分地搅拌。考虑到节约成本,浸提效果以及后期浓缩的时间和能耗,料液比应选择在 1:15~1:25 之间为宜。

2.1.4 酶解时间对青钱柳多糖得率的影响

由图 1D 可知,青钱柳多糖的得率随着酶解时间的延长而升高,且在酶解时间为 1.5 h 时达到最高,而当酶解时间超过 1.5 h 时,得率却缓慢下降。酶与底物的充分接触需要保证一定的时间,但酶解时间过长可能会加大底物中夹带的抑制剂的作用,因而酶解时间应选择 1~2 h 为宜。

2.1.5 超声功率对青钱柳多糖得率的影响

由图 1E 可知,在超声功率在 30~90 W 时,青

钱柳多糖的得率随着功率得增加而升高,且在功率为 90 W 时达到最大,但当功率超过 90 W 时,得率呈缓慢下降趋势。这可能因为在适宜的超声功率条件下,超声波空化和机械剪切力的搅拌作用增强有助于快速、充分破碎植物细胞破壁,促进细胞内多糖化合物迅速渗出,但过高的超声功率可能会引起细胞及溶液局部升温过高,裂解了目标成分的结构。且从能耗角度来考虑,超声功率应选择在 60 ~ 120 W 范围内。

2.1.6 超声时间对青钱柳多糖得率的影响

由图 1F 可知,青钱柳多糖得率在超声时间为 30 min 达到最大,随后缓慢下降。这可能因为当超

声时间为 30 min 时,酶促反应进行地比较完全,超声效果达到最大,组织及细胞内多糖基本渗出。但长时间的超声作用可能会使部分多糖被超声波剪切力降解或高频运动产热降解,造成多糖含量的减少,同时会增加能耗,所以超声时间选择在 20 ~ 40 min 为宜。

2.2 关键因素的确定

采用 Minitab 17 软件对表 3 中的数据进行多元回归分析,得到青钱柳多糖得率为响应值的最优方程为: $Y = 5.618 - 0.317 X_1 + 0.547 X_2 - 0.078 X_3 + 0.298 X_4 - 0.472 X_5 - 0.070 X_6$,且得到各因素效应评价,结果见表 4。

表 3 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Table 3 Experimental design and response values of Plackett-Burman

处理号 No.	酶解 pH Enzymatic pH (X_1)	复合酶添加比例 Amount of mixed enzyme (X_2)	料液比 Ratio of solid to liquid (X_3)	酶解时间 Enzymatic time (X_4)	超声功率 Ultrasonic power (X_5)	超声时间 Ultrasonic time (X_6)	得率 Yield (%, Y)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	4.91
2	1	1	-1	1	-1	-1	6.94
3	-1	1	1	-1	1	-1	5.75
4	1	-1	1	1	-1	1	5.49
5	1	1	-1	1	1	-1	5.65
6	1	1	1	-1	1	1	5.30
7	-1	1	1	1	-1	1	6.76
8	-1	-1	1	1	1	-1	5.03
9	-1	-1	-1	1	1	1	5.63
10	1	-1	-1	-1	1	1	3.52
11	-1	1	-1	-1	-1	1	6.59
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5.85

表 4 Plackett-Burman 试验设计各因素效应评价

Table 4 Effect evaluations of each factor under Plackett-Burman test design

因素 Factors	效应 Effect	系数 Coefficient	系数标准误 Standard error	T 值 T value	P 值 P value	显著性 Significance
常量		5.618	0.114	49.42	0.000	
X_1	-0.633	-0.317	0.114	-2.79	0.039	*
X_2	1.093	0.547	0.114	4.81	0.005	**
X_3	-0.157	-0.078	0.114	-0.69	0.521	
X_4	0.597	0.298	0.114	2.62	0.047	*
X_5	-0.943	-0.472	0.114	-4.15	0.009	**
X_6	-0.140	-0.070	0.114	-0.62	0.565	

注:(1) $R^2 = 91.78\%$, Adj. $R^2 = 81.92\%$; (2) * 表示差异显著($P < 0.05$), ** 表示差异极显著($P < 0.01$)。

Note: (1) $R^2 = 91.78\%$, Adj. $R^2 = 81.92\%$; (2) * and ** represented significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

表4的结果表明,根据效应值的大小可知影响青钱柳多糖得率的关键因素依次为: X_2 (复合酶添加比例) $>X_5$ (超声功率) $>X_1$ (酶解 pH) $>X_4$ (酶解时间) $>X_3$ (料液比) $>X_6$ (超声时间)。其中复合酶添加比例以及超声功率对青钱柳多糖得率的影响达到极其显著水平($P < 0.01$),酶解 pH 和酶解时间则达到显著水平($P < 0.05$),而料液比和超声时间影响不显著。故选择复合酶添加量、超声功率、料液比以及超声时间这四个关键因素进一步做响应面优化设计和分析。在优化提取的过程当中,考虑到提高效率及节约成本,并结合单因素结果,将料液比和超声时间这两个因素分别固定为 1:20 和 30 min。

2.3 响应面分析优化

采用 Design-Expert 8.0.5 对表5中的实验数据进行多项拟合回归,得到两因素间对青钱柳得率影响的3D 响应面图(见图2),并获得青钱柳多糖得率(y)对酶解 pH(x_1)、复合酶添加量(x_2)、酶解时间(x_3)以及超声功率(x_4)的二次多项回归方程:

$$y = 6.59200 + 0.29250x_1 + 1.16833x_2 + 0.30500x_3 + 0.58917x_4 - 0.065000x_1x_2 - 0.025000x_1x_3 -$$

$$0.17750x_1x_4 + 0.21750x_2x_3 + 0.22750x_2x_4 - 7.50000E-003x_3x_4 - 0.79308x_1^2 - 0.85183x_2^2 - 0.32683x_3^2 - 1.60058x_4^2 \quad (2)$$

进一步对回归模型进行方差分析,结果见表6。由表6可知,该回归模型 $P < 0.0001$ (极显著),失拟项 $P = 0.4287 > 0.05$ (不显著),说明该回归模型可靠,可用于青钱柳多糖得率的优化。另外,模型的决定系数 $R^2 = 0.924$,说明拟合程度良好;校正决定系数 $\text{Adj. } R^2 = 0.867$,指出预测值与实际值具有高度的相关性。因此该回归模型可用于对青钱柳多糖得率进行分析和预测。在回归模型中,一次项 x_1 、 x_3 和二次项 x_4^2 对青钱柳多糖得率的影响达到显著水平($P < 0.05$),而 x_2 、 x_4 、 x_1^2 以及 x_2^2 则为极显著水平($P < 0.01$), x_3^2 与交互项 x_1x_2 、 x_1x_3 、 x_1x_4 、 x_2x_3 、 x_2x_4 、 x_3x_4 均无显著影响。且 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 的显著性水平与 Plackett-Burman 试验结果完全一致。

由 Design-Expert 8.0.5 软件对回归模型进行优化分析得到青钱柳多糖得率的最佳条件为:酶解 pH 为 6.11,复合酶添加量为 4.81%,酶解时间为 1.685 h,超声功率为 96.9 W,在此条件下,预测所得到的青钱柳多糖得率最大理论值为 7.26%。

表5 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 5 Design and results of Box-Behnken experiment

处理号 No.	酶解 pH Enzymatic pH (x_1)	复合酶添加比例 Amount of mixed enzyme (x_2)	酶解时间 Enzymatic time (x_3)	超声功率 Ultrasonic power (x_4)	得率 (%, y)
1	-1	-1	0	0	3.77
2	1	-1	0	0	4.51
3	-1	1	0	0	5.8
4	1	1	0	0	6.28
5	0	0	-1	-1	3.90
6	0	0	1	-1	4.39
7	0	0	-1	1	5.24
8	0	0	1	1	5.70
9	-1	0	0	-1	3.09
10	1	0	0	-1	4.2
11	-1	0	0	1	4.96
12	1	0	0	1	5.36
13	0	-1	-1	0	4.06
14	0	1	-1	0	6.43
15	0	-1	1	0	4.37
16	0	1	1	0	7.61
17	-1	0	-1	0	4.60

处理号 No.	酶解 pH Enzymatic pH (x_1)	复合酶添加比例 Amount of mixed enzyme (x_2)	酶解时间 Enzymatic time (x_3)	超声功率 Ultrasonic power (x_4)	得率 (%, y)
18	1	0	-1	0	5.04
19	-1	0	1	0	5.26
20	1	0	1	0	5.60
21	0	-1	0	-1	2.52
22	0	1	0	-1	4.37
23	0	-1	0	1	2.76
24	0	1	0	1	5.52
25	0	0	0	0	6.64
26	0	0	0	0	6.53
27	0	0	0	0	6.56
28	0	0	0	0	7.21
29	0	0	0	0	6.02

表 6 回归模型方差分析结果

Table 6 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源 Variance sources	自由度 DF	平方和 Sum of squares	均方 (MS) Mean squares	F 值 F value	P 值 P value	显著性 significance
x_1	1	1.03	1.03	4.70	0.0480	*
x_2	1	16.38	16.38	74.93	<0.0001	**
x_3	1	1.12	1.12	5.11	0.0403	*
x_4	1	4.17	4.17	19.06	0.0006	**
x_1^2	1	4.08	4.08	18.66	0.0007	**
x_2^2	1	4.71	4.71	21.53	0.0004	**
x_3^2	1	0.69	0.69	3.17	0.0967	
x_4^2	1	16.62	16.62	76.02	<0.0001	*
x_1x_2	1	0.017	0.017	0.077	0.7850	
x_1x_3	1	2.500E-003	2.500E-003	0.011	0.9164	
x_1x_4	1	0.13	0.13	0.58	0.4603	
x_2x_3	1	0.19	0.19	0.87	0.3679	
x_2x_4	1	0.21	0.21	0.95	0.3470	
x_3x_4	1	2.250E-004	2.250E-004	1.092E-003	0.9749	
模型	14	43.10	3.08	14.08	<0.0001	**
残差	14	3.06	0.22			
失拟项	10	2.34	0.23	1.31	0.4278	不显著
纯误差	4	0.72	0.18			
总和	28	46.16				

注: (1) $R^2 = 0.934$, Adj. $R^2 = 0.867$; (2) * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: (1) $R^2 = 0.934$, Adj. $R^2 = 0.867$; (2) * and ** represented significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

2.4 优化条件下青钱柳叶多糖得率的验证结果

根据上述最佳条件,并结合料液比 1:20、超声时间 30 min,在 50 ℃ 下进行三次平行的验证试验,得到青钱柳多糖的平均得率为 7.18% (7.15%、7.19% 和 7.20%),这与预测值 7.26% 的相对误差为 1.10%,差异不显著。上官新晨等^[15,16]先后采用超声波辅助及微波辅助提取青钱柳多糖,其得率最高分别为 2.00% 和 2.55%。较之单纯采用超声辅

助及微波辅助提取青钱柳多糖,超声波-酶法提取将其得率分别提高约 259.00% 和 181.57%。另外,结合酶能够快速降解植物细胞壁及组织的特点,使得超声波-酶法的提取时间仅为 30 min,比单纯采用超声辅助提取的时间缩短了 57.14%。因此,采用超声波-酶法提取青钱柳多糖拥有较高的实用价值,具有很好的应用前景。

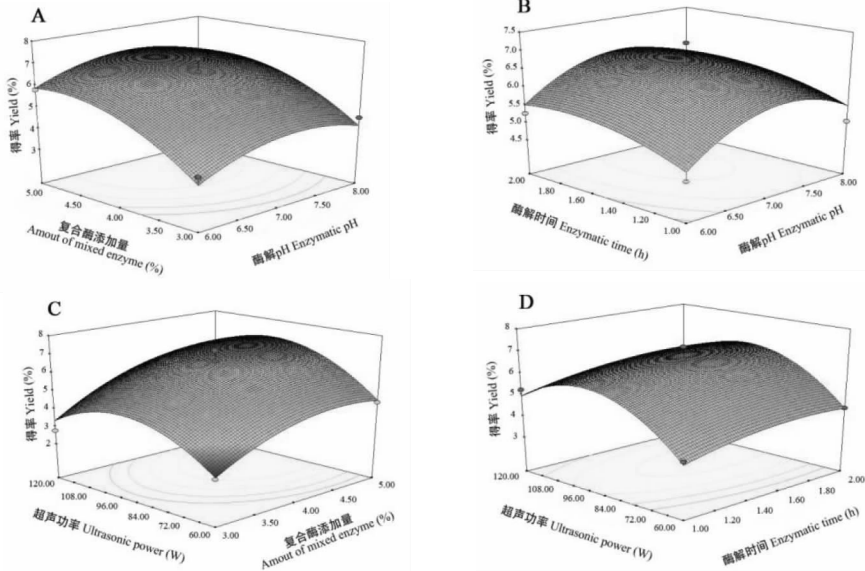


图2 复合酶添加量和酶解 pH(A)、酶解时间与酶解 pH(B)、超声功率与复合酶添加量(C)、超声功率与酶解时间(D)对青钱柳多糖得率影响的响应面图

Fig. 2 Response surfaces plots showing the mutual effects of amount of mixed enzyme and enzymatic pH (A), enzymatic time and pH (B), ultrasonic power and amount of mixed enzyme (C) and ultrasonic power and enzymatic time (D) on the yield of CPP

2.5 青钱柳多糖结构初步鉴定结果

纯化后的青钱柳多糖在 260 nm (核酸特征吸收峰) 与 280 nm (蛋白特征吸收峰) 处无未见明显特征吸收峰,说明多糖纯度较高。红外结果显示,青钱柳多糖在 3387.79 cm^{-1} 周围具有很强的特征吸收峰,表明青钱柳多糖具有 -OH 基团的特征伸缩振动。且在 2926.66 cm^{-1} 周围具有较强吸收峰,提示青钱柳多糖中具有 C-H 的伸缩振动。另外,在 1614.14 cm^{-1} 具有很强的吸收峰,推测为 C=O 伸缩振动,表明青钱柳多糖中可能含有羧基和醛基,而 1416.48 cm^{-1} 的较强吸收峰则可能是由于变形的 C-H 伸缩振动所致。介于 800 cm^{-1} 到 1200 cm^{-1} 的吸收峰为糖类的指纹区^[18],这些都充分说明青钱柳多糖为典型的多糖类化合物。根据单糖混合标准品的气相色谱图(见图 3)对比分析得出青钱柳多糖的单糖组成为鼠

李糖:阿拉伯糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖 = 1.00:7.03:2.06:2.11:5.25:12.06。

3 结论

通过 Plackett-Burman 试验设计,筛选获得酶解 pH、复合酶添加比例、酶解时间以及超声功率这四个影响青钱柳多糖得率的关键因素。再利用 Box-Behnken 试验设计得到最佳的提取条件参数:酶解 pH 值为 6.11,复合酶添加量为 4.81%,酶解时间为 1.685 h,超声功率为 96.9 W,料液比为 1:20,超声时间为 30 min,在此条件下的得率为 7.18% (与预测值 7.26% 接近)。另外,用紫外、红外光谱以及气相色谱初步分析 CPP 的结构,结构发现 CPP 为典型的多糖,且单糖组成为鼠李糖:阿拉伯糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖 = 1.00:7.03:2.06:2.11:5.25:12.06。

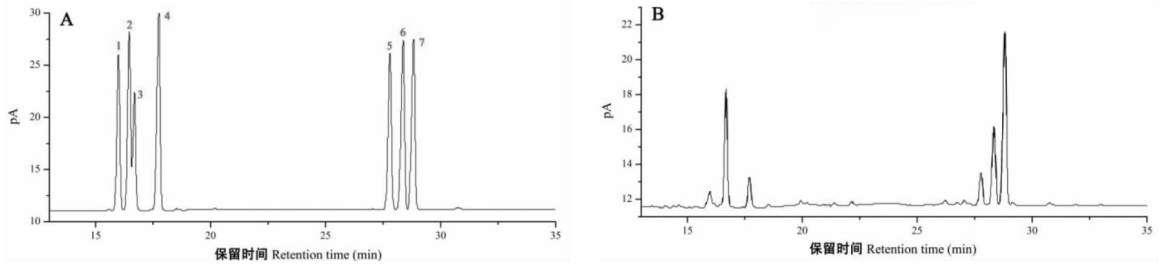


图3 不同单糖标准品(A)和青钱柳多糖(B)单糖组成气相色谱图

Fig. 3 Gas chromatograms of mixed standard monosaccharides (A) and monosaccharide compositions of CPP (B)

注: (1) 鼠李糖, (2) 岩藻糖, (3) 阿拉伯糖, (4) 木糖, (5) 甘露糖, (6) 葡萄糖, (7) 半乳糖

Note: (1) rhamnose, (2) fucose, (3) arabinose, (4) xylose, (5) mannose, (6) glucose, (7) galactose

参考文献

- 1 Editorial Committee of China Flora of Chinese Academy of Sciences(中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China(中国植物志). Beijing: Science Press, 1979.
- 2 Wu Y, Li YY, Wu X, *et al.* Chemical constituents from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 57:216-220.
- 3 Xie JH, Xie MY, Nie SP, *et al.* Isolation, chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. *Food Chem*, 2010, 119:1626-1632.
- 4 Cui BS, Li S. New triterpenoidsaponins from the leaves of *Cyclocarya paliurus*. *Chin Chem Lett*, 2015, 26:585-589.
- 5 Zhang J, Shen Q, Lu JC, *et al.* Phenolic compounds from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja and their inhibitory activity against PTP1B. *Food Chem*, 2010, 119:1491-1496.
- 6 Fang SZ, Yang WX, Chu XL, *et al.* Provenance and temporal variations in selected flavonoids in leaves of *Cyclocarya paliurus*. *Food Chem*, 2011, 124:1382-1386.
- 7 Xie JH, Shen MY, Nie SP, *et al.* Simultaneous analysis of 18 mineral elements in *Cyclocarya paliurus* polysaccharide by ICP-AES. *Carbohydr Polym*, 2013, 94:216-220.
- 8 Xie JH, Liu X, Shen MY, *et al.* Purification, physicochemical characterisation and anticancer activity of a polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves. *Food Chem*, 2013, 136:1453-1460.
- 9 Li N (李楠), Zhao J (赵静), Wu R (吴茹), *et al.* Research on the influence of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharide on PPAR γ and ATGL gene expression in hyperlipidemia mice. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2015, 15(9):9-14.
- 10 Xie JH, Shen MY, Xie MY, *et al.* Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. *Carbohydr Polym*, 2012, 89:177-184.
- 11 Hu WB (胡文兵), Zhao J (赵静), Chen TT (陈婷婷), *et al.* Preliminary research on hypolipidemic mechanism and effect of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* in hyperlipidemic mice. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2015, 31(11):39-44.
- 12 Pan LH, Wang J, Ye XQ, *et al.* Enzyme-assisted extraction of polysaccharides from *Dendrobiumchrysotoxum* and its functional properties and immunomodulatory activity. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, 60:1149-1154.
- 13 Li Y(黎英), Chen XM(陈雪梅), Yan YP(严月萍), *et al.* Optimal extraction technology of polysaccharides from red kidney bean using ultrasonic assistant with enzyme. *Trans Chin Soc Agric Eng* (农业工程学报), 2015, 31:293-301.
- 14 Fan T, Hu JG, Fu LD, *et al.* Optimization of enzymolysis-ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Momordica charabtia* L. by response surface methodology. *Carbohydr Polym*, 2015, 115:701-706.
- 15 Shangguan XC(上官新晨), Chen MS(陈木森), Xu RY(徐睿庸), *et al.* Ultrasonic extraction of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaj. *Acta Agric Univ Jiangxiensis*(江西农业大学学报), 2006, 28:809-812.
- 16 Shangguan XC(上官新晨), Chen MS(陈木森), Jiang Y(蒋艳), *et al.* Microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. *J Food Sci-Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2007, 26(5):6-9.
- 17 Navarini L, Gilli R, Gombac V, *et al.* Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization. *Carbohydr Polym*, 1999, 40(1):71-81.
- 18 Cui SW, Phillips GO, Blackwell B, *et al.* Characterisation and properties of *Acacia senegal* (L.) Willd. var. *senegal* with enhanced properties (Acacia (sen) SUPERGUMTM): Part 4. Spectroscopic characterisation of *Acacia senegal* var. *senegal* and *Acacia (sen) SUPERGUMTM arabic*. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21:347-352.