

刘旭东, 张玉超, 朱思洁, 等. 枳椇果梗多糖的提取工艺优化及其抗氧化性 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(11): 230-237. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090032

LIU Xudong, ZHANG Yuchao, ZHU Sijie, et al. Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Hovenia dulcis* Fruit Pedicels and Its Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(11): 230-237. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090032

· 工艺技术 ·

枳椇果梗多糖的提取工艺优化及其抗氧化性

刘旭东^{1,2}, 张玉超^{3,*}, 朱思洁^{1,2}, 宋 亚^{1,2}, 张智淮¹, 陈光祥¹, 姜斯媛¹

(1. 茅台学院食品科学与工程系, 贵州仁怀 564507;

2. 贵州省保健酒酿造技术工程研究中心, 贵州仁怀 564507;

3. 茅台学院酿酒工程系, 贵州仁怀 564507)

摘要: 为获得枳椇果梗多糖, 并进一步评价其自由基清除及抑制生物大分子(蛋白质、脂质、DNA)氧化的能力。以枳椇果梗为试验材料, 在单因素实验的基础上, 结合正交试验及方差分析优化枳椇果梗多糖热水提取工艺条件; 对所提多糖清除 DPPH、ABTS⁺ 自由基能力进行测定; 并利用 Cu²⁺/H₂O₂、FeSO₄、APPH 分别诱导牛血清蛋白、亚油酸、鲑鱼精子 DNA 氧化, 构建体外蛋白质、脂质、DNA 氧化模型, 对所提多糖体外抑制生物大分子氧化能力进行评价。结果表明: 醇沉体积分数对枳椇果梗多糖的得率有显著性 ($P < 0.05$) 的影响, 最佳热水提取工艺条件为: 料液比 1:25 g/mL, 提取温度 85 °C, 提取时间 1 h, 醇沉体积分数 80%, 此时多糖得率为 3.06%±0.181%; 且随着浓度的增大, 所提多糖对自由基的清除和生物大分子的氧化抑制效果也逐渐提高, 对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基清除 IC₅₀ 分别为 1.687、1.824 mg/mL, 对牛血清蛋白羰基化、亚油酸过氧化和鲑鱼精子 DNA 氧化抑制 IC₅₀ 分别为: 13.84、10.88、74.70 mg/mL。研究结果可为枳椇果梗多糖的提取及在功能性食品中的应用提供参考。

关键词: 枳椇, 果梗多糖, 提取工艺, 生物大分子, 氧化抑制

中图分类号: TS201.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)11-0230-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090032



本文网刊:

Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Hovenia dulcis* Fruit Pedicels and Its Antioxidant Activity

LIU Xudong^{1,2}, ZHANG Yuchao^{3,*}, ZHU Sijie^{1,2}, SONG Ya^{1,2}, ZHANG Zhihui¹,
CHEN Guangxiang¹, JIANG Siyuan¹

(1. Department of Food Science and Engineering, Moutai Institute, Renhuai 564507, China;

2. Guizhou Health Wine Brewing Technology Engineering Research Center, Renhuai 564507, China;

3. Department of Brewing Engineering, Moutai Institute, Renhuai 564507, China)

Abstract: The aim of this study was to obtain polysaccharides from *Hovenia dulcis* fruit pedicels, and further evaluate its ability to scavenge free radicals and inhibit the oxidation of biological macromolecules (proteins, lipids, DNA). On the basis of a single-factor experiment, the hot water extraction process of polysaccharides from *Hovenia dulcis* fruit pedicels was optimized using orthogonal test combined with an analysis of variance. The ability of the extracted polysaccharides to scavenge DPPH and ABTS⁺ free radicals was determined. In addition, Cu²⁺/H₂O₂, FeSO₄ and APPH were used to induce the oxidation of bovine serum albumin, linoleic acid and herring sperm DNA, respectively, to construct *in vitro* protein, lipid and DNA oxidation models and the ability of the extracted polysaccharides to inhibit biological macromolecule oxidation *in vitro* was evaluated. The results showed that the volume fraction of ethanol precipitation had a significant

收稿日期: 2022-09-06

基金项目: 贵州省基础研究(自然科学)计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 541); 遵义市科学技术局、茅台学院市校联合科技研发基金项目(遵市科合 HZ 字(2021)330 号, 遵市科合 HZ 字(2022)169 号); 茅台学院高层次人才科研启动经费项目(mygccrc[2022]010); 大学生创新创业训练计划项目(S202214625021)。

作者简介: 刘旭东(1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养/毒理, E-mail: xudongliu168@163.com。

* **通信作者:** 张玉超(1988-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品营养/毒理, E-mail: zyc10271027@163.com。

effect on the yield of polysaccharides from *Hovenia dulcis* fruit pedicels ($P < 0.05$). The optimal hot water extraction conditions were as follows: solid-liquid ratio, 1:25 g/mL, extraction temperature 85 °C, extraction time 1 h, ethanol precipitation volume fraction 80%, with the polysaccharide yield of $3.06\% \pm 0.181\%$. With the increase in the concentration, the effects of the extracted polysaccharides in scavenging free radicals and inhibiting the oxidation of biological macromolecules were gradually improved. The IC_{50} for scavenging DPPH and ABTS⁺ free radicals were 1.687 and 1.824 mg/mL, and the IC_{50} for inhibiting bovine serum albumin carbonylation, linoleic acid peroxidation and herring sperm DNA oxidation were 13.84, 10.88 and 74.70 mg/mL, respectively. The results can provide a reference for the extraction of polysaccharides from *Hovenia dulcis* fruit pedicels and its application in functional food.

Key words: *Hovenia dulcis*; polysaccharides from fruit pedicels; extraction process; biological macromolecule; oxidative inhibition

机体代谢过程会产生大量的自由基, 正常情况下体内自由基的产生和清除处于动态平衡的过程中。但异常情况下自由基的产生会超过机体代偿能力, 引起大量自由基积累, 体内氧化还原平衡被打破, 过量的自由基会进一步破坏蛋白质、脂质、核酸等生物大分子最终导致机体损伤和疾病^[1-3]。多糖是一种由酮糖或醛糖通过糖苷键连接形成天然大分子聚合物, 具有多种生物活性, 例如: 抗氧化、抗炎、保肝护肝、免疫调节、抗肿瘤等^[4-7]。与化学合成的抗氧化剂相比, 天然多糖一般具有良好的生物相容性、生物降解性和无毒性等优点^[8]。因此, 从可食用的自然资源中开发利用具有抗氧化能力的多糖具有重要意义。

枳椇(*Hovenia dulcis*) 又称拐枣、万寿果、甜半夜, 属于鼠李科枳椇属, 传统医学认为枳椇性甘、酸, 味平, 归心、脾经, 具解酒毒, 止渴除烦, 止呕, 利二便的功效^[9-10]。占枳椇果实 90% 总重的果梗(可食用肉质部分)肉质肥厚、外形扭曲、口味独特, 总糖含量可达 19.4%~28.3%, 并富含多种其他营养成分, 利用前景可观^[11-12]。我国枳椇资源丰富, 尤其在西南地区有着广泛的分布。枳椇果梗目前主要被鲜食或简单粗加工制作果汁、果酒、果醋等产品, 综合开发利用率低。因此, 作为枳椇果梗最主要的营养成分, 枳椇果梗多糖的提取和抗氧化性研究对于枳椇果梗的利用尤为重要。

目前植物多糖的提取还是以水提法、超声辅助法、微波辅助法为主, 虽然也不断地有新兴提取工艺出现并取得了一定的效果, 但每一种方法也都存在一定的局限性, 例如: 设备昂贵、操作复杂, 条件不易控制等^[13-14]。植物多糖水溶性大, 通过水提法进行多糖的提取, 提取过程简单, 不需要特殊设备且条件易于控制, 该方法更适合大量多糖样品生产制备^[15], 而对于枳椇多糖的提取还主要集中于枳椇子, 果梗多糖的提取研究还相对较少。同时, 对于植物多糖的抗氧化性评价主要还是集中于自由基清除能力^[16-17], 而涉及“氧化应激”下游生物大分子损伤的抑制作用还鲜有报道。

因此, 本文以枳椇果梗为研究对象, 对枳椇果梗多糖的水提取工艺条件进行优化; 并对其清除 DPPH、ABTS⁺ 自由基能力及体外抑制生物大分子(蛋白质、脂质、DNA) 氧化能力进行评价, 旨在为枳椇果梗多

糖的开发利用提供理论依据, 为进一步扩展枳椇果梗资源在功能性食品领域的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜枳椇 购于遵义市官仓镇; 无水乙醇、石油醚、苯酚、浓硫酸、葡萄糖、三氯甲烷、正丁醇、CuSO₄、30% H₂O₂、FeSO₄、亚油酸、维生素 C(V_C) 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(2,2-azo-di(3-ethyl-benzothiazol-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS)、牛血清蛋白(bovine serum protein, BSA)、鲱鱼精 DNA(herring sperm DNA, hsDNA)、2,2-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(2,2-azo diisobutyl amidine dihydrochloride, AAPH)、2,4-二硝基苯肼(2,4-Dinitrophenylhydrazine, DNPH) 美国 Sigma-Aldrich 公司; 丙二醛(malonaldehyde, MDA) 含量检测试剂盒 南京建成生物工程研究所; 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG) 检测试剂盒 美国 eBioscience 公司。

TDZ5-WS 离心机 长沙湘仪离心仪器有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器 北京科伟永兴仪器有限公司; BGG-9140A 电热鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; 1530 酶标仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 枳椇预处理 将新鲜枳椇去除枝条、枳椇子, 流水去除表面杂质, 沥干水分, 置于 60 °C 热风干燥箱中干燥 72 h, 随后使用粉碎机制备粉末, 60 目过筛收集枳椇果梗粉末, 阴凉处保存备用。称取一定量的枳椇果梗粉末于索氏提取中, 按料液比 1:8(g/mL) 加入石油醚回流脱脂(70 °C, 4 h), 回流结束后抽滤, 残渣在 50 °C 下烘干至恒重, 置于干燥器中保存备用^[18]。

1.2.2 枳椇果梗多糖提取物的制备 取预处理后的枳椇果梗干粉置于圆底烧瓶中, 按照一定的料液比、提取时间、提取温度, 进行热水回流提取; 提取后 4000 r/min 离心 20 min 收集上清液, 离心管底部粉末按上述流程再重复提取一次, 混合两次提取的上清液; 用旋转蒸发器浓缩至初始体积的 1/4, 向浓缩液

中按一定的醇沉体积分数加入无水乙醇,搅拌均匀后4℃醇沉过夜。过夜后5000 r/min离心15 min收集沉淀,沉淀加入适量蒸馏水复溶,冷冻干燥后得到枳椇果梗多糖提取物,称重记录重量。

1.2.3 单因素实验 以蒸馏水为提取溶剂:a.按料液比1:25 g/mL 分别于75、80、85、90、95℃下浸提2 h,在醇沉体积分数80%的条件下进行沉淀;b.按料液比1:25 g/mL 于95℃下分别浸提0.5、1、1.5、2、2.5 h,在醇沉体积分数80%的条件下进行沉淀;c.分别按料液比1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 g/mL 于95℃下浸提2 h,在醇沉体积分数80%的条件下进行沉淀;d.按料液比1:25 g/mL 于95℃下浸提2 h,分别在醇沉体积分数50%、60%、70%、80%、90%的条件下进行沉淀;以枳椇果梗多糖得率为评价指标,考察提取温度、提取时间、料液比、醇沉体积分数对枳椇果梗多糖得率的影响。

1.2.4 正交试验 按照 $L_9(3^4)$ 正交表设计,以枳椇果梗多糖得率为评价指标,以提取温度、提取时间、料液比、醇沉体积分数为因素,每个因素设置3个水平进行正交试验,因素水平见表1。

表1 正交试验因素水平表
Table 1 Orthogonal test factor level table

水平	A 提取温度 (℃)	B 提取时间 (h)	C 料液比 (g/mL)	D 醇沉体积分数 (%)
1	85	1	1:25	60
2	90	1.5	1:30	70
3	95	2	1:35	80

1.2.5 葡萄糖标准曲线的制作及多糖得率的测定 参考文献方法^[18],采用苯酚-硫酸法制作葡萄糖标准曲线并测定枳椇果梗多糖提取物中多糖的含量,所得标准曲线线性回归方程: $y=7.9479x-0.0002$,决定系数 $R^2=0.9953$ 。将所得枳椇果梗多糖提取物用蒸馏水配制成1 mg/mL的待测液,依据葡萄糖标准曲线计算待测液中多糖浓度,计算多糖得率。

枳椇果梗多糖得率 $W(\%)=C \times V/m \times 10^{-4}$ 式(1)

式中:W:枳椇果梗多糖得率,%;C:依据葡萄糖标准曲线计算待测液中多糖浓度, $\mu\text{g/mL}$;V:枳椇果梗多糖提取物待测液体积,mL;m:提取所用枳椇果梗干粉质量,g。

1.2.6 枳椇果梗多糖样品的制备 取枳椇果梗干粉,按照正交优化试验所得的最佳提取工艺条件进行多糖提取,获得枳椇果梗多糖提取物,将提取物复溶于水,采用Sevage法去除蛋白质^[19],脱蛋白后的溶液置于透析袋(8000~14000 Da)自来水透析48 h,蒸馏水透析24 h,每隔12 h换液,真空冷冻干燥得到枳椇果梗精制多糖供后续抗氧化活性检测使用。

1.2.7 枳椇果梗多糖清除自由基能力测定 DPPH 自由基清除能力参考文献方法进行测定^[20],1 mL 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 mg/mL 枳椇果梗多糖

(阳性对照为不同浓度的 V_C)与1.25 mL DPPH 溶液(100 $\mu\text{mol/L}$)室温避光反应0.5 h,517 nm 测定吸光度。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \frac{[A_0 - (A_1 - A_2)]}{A_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_0 :加水后DPPH溶液的吸光值, A_1 :枳椇果梗多糖加DPPH溶液的吸光值, A_2 :枳椇果梗多糖加水的吸光值。

ABTS⁺自由基清除能力参考文献方法进行测定^[20],0.1 mL 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 mg/mL 枳椇果梗多糖(阳性对照为不同浓度的 V_C)与2 mL ABTS(7 mol/L)避光反应6 min,734 nm 测定吸光度。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \frac{[A_0 - (A_1 - A_2)]}{A_0} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A_0 :加水后ABTS溶液的吸光值, A_1 :枳椇果梗多糖加ABTS溶液的吸光值, A_2 :枳椇果梗多糖加水的吸光值。

1.2.8 枳椇果梗多糖对蛋白质羰基化的影响 取200 mg BSA,分别加入10 mL 2.5、5、10、20、40 mg/mL 枳椇果梗多糖溶液,混合均匀后依次加入6.4 mg CuSO_4 、1.133 g 30% H_2O_2 溶液,混合均匀后加入蒸馏水,使最终反应体系总体积为100 mL,置于37℃水浴反应,反应时间为90 min,采用DNPH法检测BSA 羰基含量^[21]。

$$\text{氧化抑制率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1 - A_0} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: A_0 :空白对照组羰基含量(BSA), A_1 :诱导组羰基含量($\text{BSA} + \text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$), A_2 :氧化抑制组羰基含量($\text{BSA} + \text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 +$ 不同浓度多糖)。

1.2.9 枳椇果梗多糖对亚油酸氧化的影响 取28 mg 亚油酸,分别加入10 mL 2.5、5、10、20、40 mg/mL 枳椇果梗多糖溶液,混合均匀后加入1.52 mg FeSO_4 ,混合均匀后加入蒸馏水,使最终反应体系总体积为100 mL,置于37℃水浴避光反应24 h,以MDA含量表示亚油酸脂质氧化水平,采用MDA试剂盒测定样品中MDA含量^[21-22]。

$$\text{氧化抑制率}(\%) = \frac{B_1 - B_2}{B_1 - B_0} \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: B_0 :空白对照组MDA含量(亚油酸), B_1 :诱导组MDA含量(亚油酸+ FeSO_4), B_2 :氧化抑制组MDA含量(亚油酸+ FeSO_4 +不同浓度多糖)。

1.2.10 枳椇果梗多糖对DNA氧化的影响 取200 mg hsDNA,分别加入10 mL 2.5、5、10、20、40 mg/mL 枳椇果梗多糖溶液,混合均匀后加入1.084 g AAPH,混合均匀后加入蒸馏水,使最终反应体系总体积为100 mL,置于37℃水浴反应12 h,采用8-OH-dG检测试剂盒测定样品中8-OH-dG含量^[23]。

$$\text{氧化抑制率}(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_1 - C_0} \times 100 \quad \text{式(6)}$$

式中: C_0 : 空白对照组 8-OH-dG 含量(hsDNA), C_1 : 诱导组 8-OH-dG 含量(hsDNA+AAPH), C_2 : 氧化抑制组 8-OH-dG 含量(hsDNA+AAPH+不同浓度多糖)。

1.3 数据处理

采用 SPSS 13.0 (SPSS, 美国) 进行正交试验设计, 采用单因素方差分析(ANOVA)结合 Duncan 检验分析差异性, 差异显著水平为 $P < 0.05$, 数据统计图使用 GraphPad Prism 8.0 (San Diego, 美国) 生成。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 提取温度对枳椇果梗多糖得率的影响 由图 1 可知, 枳椇果梗多糖得率在一定温度范围内随着提取温度的提高而逐渐增大, 当温度达到 90 °C 时多糖得率最高, 继续提高提取温度到 95 °C, 多糖得率与 90 °C 相比没有显著性变化($P > 0.05$)。随着提取温度的升高, 多糖的溶解度会逐渐增大, 但是当温度过高可能会引起多糖链断裂, 导致多糖难回收^[24], 因此虽然提取温度升高至 95 °C, 多糖溶解度增大, 但是得率并未显著增加, 但与 85 °C 相比得率有显著性提高($P < 0.05$), 因此选择 85、90、95 °C 作为正交试验提取温度的 3 个水平。

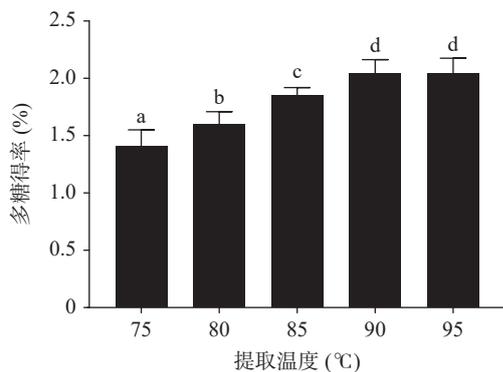


图 1 提取温度对多糖得率的影响

Fig.1 The effects of temperature on the extraction yield of polysaccharides

注: 不同小写字母表示显著性差异, $P < 0.05$, 图 2~图 4, 图 7~图 9 同。

2.1.2 提取时间对枳椇果梗多糖得率的影响 由图 2

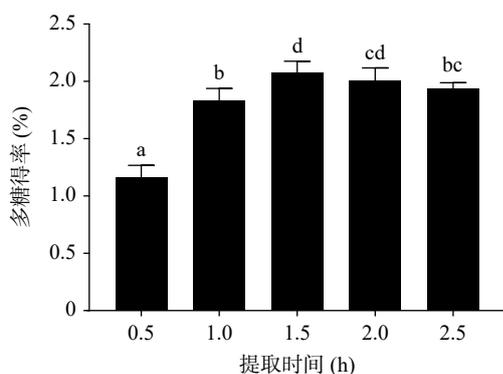


图 2 提取时间对多糖得率的影响

Fig.2 The effects of time on the extraction yield of polysaccharides

可知, 枳椇果梗多糖得率随着提取时间的增加而先增加后减少, 当时间达到 1.5 h 时多糖得率最高, 继续延长提取时间至 2 h, 多糖得率与 1.5 h 相比并没有显著性变化($P > 0.05$), 当提取时间延长至 2.5 h 后多糖得率与 1.5 h 相比出现了显著性的下降($P < 0.05$)。在一定的时间内随着提取时间的延长虽然可以使得更多的多糖溶解释放, 但是如果在高温提取环境中长时间提取, 可能会发生多糖的降解, 导致得率下降, 另外还可能致多糖中杂质过多^[25]。因此选择 1、1.5、2 h 作为正交试验提取时间的 3 个水平。

2.1.3 料液比对枳椇果梗多糖得率的影响 由图 3 可知, 枳椇果梗多糖得率随着料液比的增大呈现出先增加后降低的趋势, 当料液比为 1:35 g/mL 时多糖得率最高, 且与料液比为 1:25、1:30 g/mL 相比并未出现显著性差异($P > 0.05$), 说明在料液比 1:25~1:35 g/mL 的范围, 多糖得率高。但当料液比增大到 1:40 g/mL, 得率与 1:35 g/mL 相比出现了显著性的下降($P < 0.05$)。料液比的增大虽然可以增大溶剂与枳椇果梗粉末的接触进而促进多糖的溶出, 但是当料液比过大后, 溶质接触面已经达到饱和, 多糖的溶出提升可能并不明显, 由于溶液过多产生的稀释效应同时又可能导致提取效率下降^[26]。由于最高多糖得率出现的范围为料液比 1:25~1:35 g/mL, 因此选择 1:25、1:30、1:35 g/mL 作为正交试验料液比的 3 个水平。

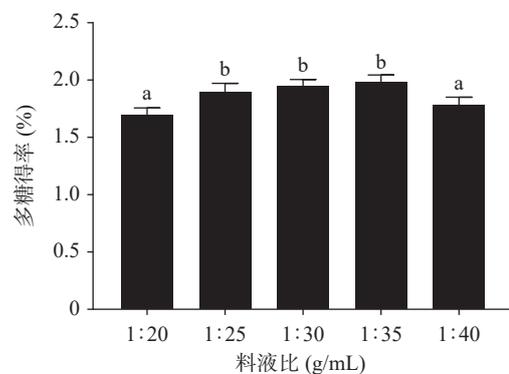


图 3 料液比对多糖得率的影响

Fig.3 The effects of solid liquid ratio on the extraction yield of polysaccharides

2.1.4 醇沉体积分数对枳椇果梗多糖得率的影响 由图 4 可知, 枳椇果梗多糖得率随着醇沉体积分数的增大呈现出先增加后降低的趋势, 当体积分数为 80% 时多糖得率最高, 且与体积分数为 70% 相比并未出现显著性差异($P > 0.05$)。但当体积分数增大到 90%, 得率与 80% 相比出现了显著性的下降($P < 0.05$), 与 60% 相比并无显著性差异($P > 0.05$)。乙醇可以通过降低水溶液的介电常数使多糖脱水从而产生沉淀来分离多糖, 但当乙醇浓度过大时析出的主要是小分子糖类^[27], 而在本文中体积分数 60% 和 90% 时的多糖得率无显著性差异($P > 0.05$), 因此综合考虑多糖得率和乙醇消耗, 选择 60%、70%、80% 作为正交试验醇沉体积分数的 3 个水平。

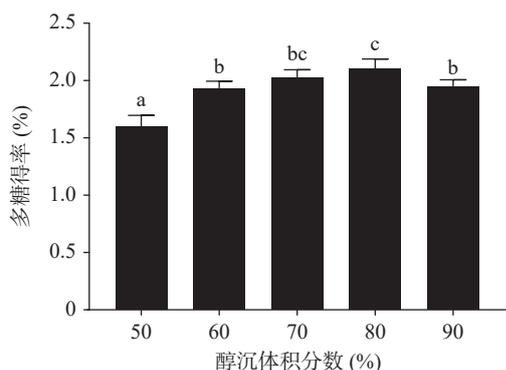


图4 醇沉体积分数对多糖得率的影响

Fig.4 The effects of ethanol precipitation volume fraction on the extraction yield of polysaccharides

2.2 正交试验结果

根据以上单因素实验结果,选择提取温度、提取时间、料液比、醇沉体积分数4个影响枳椇果梗多糖提取工艺的因素,以多糖得率作研究指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。通过直观分析(表2)极差R可判断所选择的4个因素对枳椇果梗多糖得率影响的大小顺序为:D(醇沉体积分数)>A(提取温度)>C(料液比)>B(提取时间),方差分析结果表明(表3),因素D(醇沉体积分数)具有显著性差异($P<0.05$),说明醇沉体积分数的不同水平对多糖得率有显著性影响。

表2 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of orthogonal test

试验号	因素				多糖得率(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.36
2	1	2	2	2	1.31
3	1	3	3	3	2.56
4	2	1	2	3	2.70
5	2	2	3	1	1.07
6	2	3	1	2	1.54
7	3	1	3	2	1.57
8	3	2	1	3	2.91
9	3	3	2	1	1.57
K_1	1.743	1.877	1.937	1.333	
K_2	1.770	1.763	1.860	1.473	
K_3	2.017	1.890	1.733	2.723	
极差R	0.274	0.127	0.204	1.390	

表3 正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	P值	显著性
A	0.136	2	4.690	19.000	0.183	
B	0.029	2	1.000	19.000	0.039	
C	0.063	2	2.172	19.000	0.085	
D	3.514	2	121.172	19.000	0.008	*
误差	0.03	2				

注: *表示 $P<0.05$ 。

通过正交试验直观分析可知,以多糖得率为指标时的最佳工艺条件为: $A_3B_3C_1D_3$,即料液比1:25 g/mL,提取温度95℃,提取时间2 h,醇沉体积分

数80%,由于D(醇沉体积分数)对多糖得率影响显著,且3个水平中 ΔK_{3-2} 明显大于 ΔK_{2-1} ,说明随着醇沉体积分数增大对多糖得率的影响在增大,因此选择80%为最佳工艺条件的醇沉体积分数,由于A(提取温度)和C(料液比)对多糖得率影响不显著($P>0.05$),所以从降低能耗和生产成本的角度考可虑选择 $A_1B_1C_1D_3$ 为最佳工艺。在正交试验直观分析中,因素B(提取时间)的极差较小,说明枳椇果梗多糖的水溶性比较大可以很快地溶解于水中,延长提取时间对多糖得率的影响不明显。

为了对以上两个工艺条件 $A_3B_3C_1D_3$ 与 $A_1B_1C_1D_3$ 进行对比,在两个工艺条件下对枳椇果梗多糖进行提取,得率分别为: $2.94\% \pm 0.174\%$ 、 $3.06\% \pm 0.181\%$,二者并无显著性差异($P>0.05$),因此从降低能耗和生产成本的角度综合考虑,确定 $A_1B_1C_1D_3$ (料液比1:25 g/mL,提取温度95℃,提取时间2 h,醇沉体积分数80%)为最佳工艺条件。

2.3 枳椇果梗多糖清除自由基能力

如图5、图6所示,枳椇果梗多糖对DPPH自由基和 $ABTS^+$ 自由基的清除率均随着浓度的增加呈上升趋势,对于DPPH自由基、 $ABTS^+$ 自由基清除 IC_{50} 分别为1.687、1.824 mg/mL,同等条件下 V_C 对于DPPH自由基、 $ABTS^+$ 自由基清除 IC_{50} 分别为0.8159、0.7100 mg/mL。与其他植物多糖相比,本研究中枳

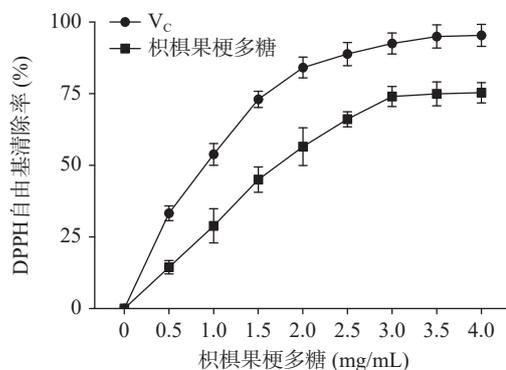


图5 枳椇果梗多糖对DPPH自由基的清除作用

Fig.5 Effects of *Hovenia dulcis* fruit pedicels polysaccharides on DPPH free radical removal

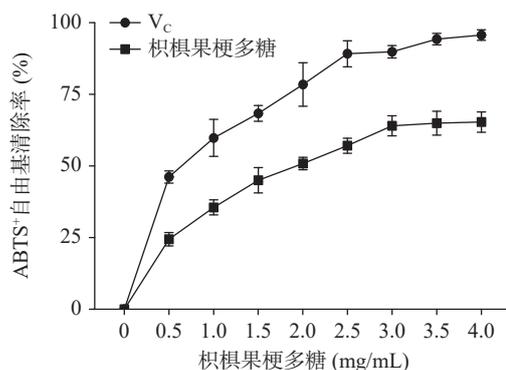


图6 枳椇果梗多糖对 $ABTS^+$ 自由基的清除作用

Fig.6 Effects of *Hovenia dulcis* fruit pedicels polysaccharides on $ABTS^+$ free radical removal

枳椇果梗多糖清除 DPPH、ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 低于山茱萸籽、玉竹、慈竹等植物多糖,且与前期枳椇多糖相关研究结果类似^[28-31],说明本研究所提取的枳椇果梗多糖具有较强的清除自由基能力。

2.4 枳椇果梗多糖对蛋白质羰基化的影响

蛋白质氨基酸侧链受自由基攻击后会发生羰基化,羰基化是蛋白质经自由基修饰造成氧化损伤的重要标记物,羰基化的蛋白质很难被机体自身抗氧化系统修复,慢慢积累会引起蛋白质的功能和结构的改变,进而引起一系列的相关疾病^[32]。Cu²⁺/H₂O₂ 体系可诱导 BSA 羰基化,本研究通过加入不同浓度枳椇果梗多糖后氧化体系中羰基的含量来测定多糖对 BSA 羰基化的抑制情况。如图 7 所示,随着枳椇果梗多糖浓度的升高,多糖对 BSA 羰基化抑制率逐渐增加,不同浓度组之间均存在显著性的差异($P < 0.05$),IC₅₀ 为 13.84 mg/mL,当多糖浓度达到 40 mg/mL 时 BSA 羰基化的抑制率可达 78.20%±1.946%。Cu²⁺/H₂O₂ 体系主要通过产生·OH 诱导 BSA 氨基酸侧链羰基化,说明枳椇果梗多糖对于·OH 有一定的清除作用,进而可以抑制蛋白质的羰基化。

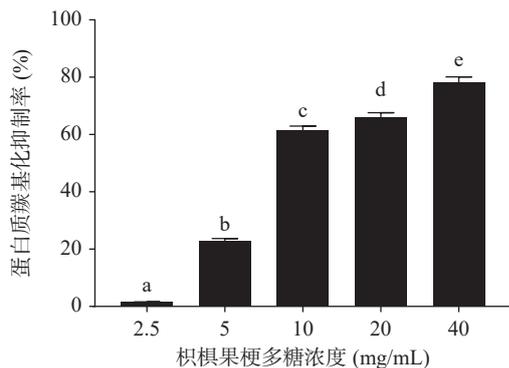


图 7 枳椇果梗多糖对蛋白质羰基化的影响

Fig.7 Effects of *Hovenia dulcis* fruit pedicels polysaccharides on protein carbonylation

2.5 枳椇果梗多糖对脂质过氧化的影响

脂质过氧化作用是一系列自由基的连锁反应,高度活泼的自由基与脂类不饱和脂肪酸反应,形成中间体自由基,再与分子氧化反应形成脂质过氧化自由基。作为细胞膜的主要成分,脂质的过氧化最终会导致细胞膜结构和功能的改变。MDA 作为一种典型的脂质过氧化产物是常用的衡量脂质过氧化的指标^[33]。本研究通过加入不同浓度枳椇果梗多糖后氧化体系中 MDA 的含量来测定多糖对亚油酸过氧化的抑制情况。如图 8 所示,随着枳椇果梗多糖浓度的升高,多糖对 FeSO₄ 诱导的亚油酸过氧化抑制率逐渐增加,IC₅₀ 为 10.88 mg/mL,当多糖浓度达到 40 mg/mL 时抑制率可达 77.52%±2.330%。枳椇果梗多糖具有较强的清除自由基能力,说明枳椇果梗多糖可以通过对脂质过氧化途径中的自由基清除达到对 FeSO₄ 诱导的亚油酸过氧化的抑制作用。

2.6 枳椇果梗多糖对 DNA 氧化的影响

DNA 作为遗传信息的重要载体,氧化修饰不但

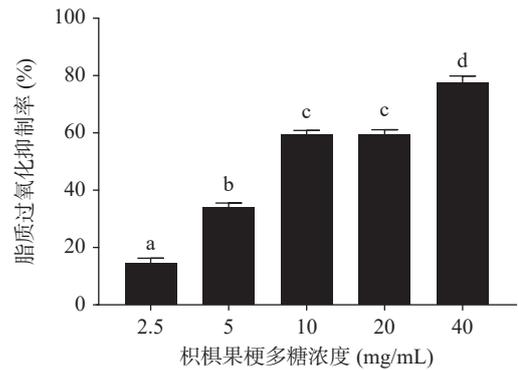


图 8 枳椇果梗多糖对脂质过氧化的影响

Fig.8 Effects of *Hovenia dulcis* fruit pedicels polysaccharides on lipid oxidation

会造成 DNA 结构和功能的改变,甚至会造成基因突变。在 DNA 的碱基中,鸟嘌呤的分子轨道具有较高的能级,其 8 位碳原子容易被氧化损伤而生成修饰碱基 8-OH-dG,其化学性质稳定可作为衡量 DNA 氧化损伤的主要指标^[23]。本研究通过加入不同浓度枳椇果梗多糖后氧化体系 8-OH-dG 的含量来测定多糖对 hsDNA 氧化损伤的抑制情况。如图 9 所示,随着枳椇果梗多糖浓度的升高,多糖对 hsDNA 氧化损伤的抑制率逐渐增加,IC₅₀ 为 74.70 mg/mL。当多糖浓度为 40 mg/mL 时抑制率为 44.76%±5.099%。AAPH 通过产生的烷氧自由基对 hsDNA 攻击导致 hsDNA 损伤,说明枳椇果梗多糖可通过清除烷氧自由基对 hsDNA 进行保护。

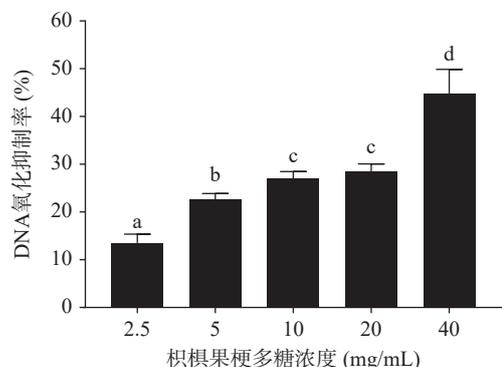


图 9 枳椇果梗多糖对 DNA 氧化的影响

Fig.9 Effects of *Hovenia dulcis* fruit pedicels polysaccharides on DNA oxidation

3 结论

通过水提法进行多糖的提取,提取过程简单,不需要特殊设备且条件易于控制,更适合大量多糖样品生产制备,所优化的该工艺最佳条件为:料液比 1:25 g/mL,提取温度 85 °C,提取时间 1 h,醇沉体积分数 80%,在此条件下枳椇果梗多糖得率为 3.06%±0.181%;所得枳椇果梗多糖对 DPPH、ABTS⁺自由基有较强的清除能力;且对自由基引发的蛋白质羰基化、脂质过氧化、DNA 氧化损伤均有明显的抑制作用。在最佳工艺条件下所获得的枳椇果梗多糖具有显著的清除自由基和抑制生物大分子氧化的能力,作

为一种来源广泛的天然资源,枳椇果梗多糖的应用前景广阔。

参考文献

- [1] TAN B L, NORHAIZAN M E, LIEW W P. Nutrients and oxidative stress: friend or foe?[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 31: 9719584.
- [2] DAS M, BABU K, REDDY N P, et al. Oxidative damage of plasma proteins and lipids in epidemic dropsy patients: Alterations in antioxidant status[J]. *Biochimica et Biophysica ACTA-Subjects*, 2005, 1722(2): 209–217.
- [3] POPRAC P, JOMOVA K, SIMUNKOVA M, et al. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases[J]. *Trends in Pharmacological Science*, 2017, 38(7): 592–607.
- [4] 杨斯惠, 向月, 曹亚楠, 等. 植物多糖的益生作用及其影响因素研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(11): 301–310. [YANG S H, XIANG Y, CAO Y N, et al. Progress in research on the prebiotic effects of plant polysaccharides and the factors influencing them[J]. *Food Science*, 2022, 43(11): 301–310.]
- [5] HUANG G, MEI X, HU J. The antioxidant activities of natural polysaccharides[J]. *Current Drug Targets*, 2017, 18(11): 1296–1300.
- [6] ZENG P, LI J, CHEN Y, et al. The structures and biological functions of polysaccharides from traditional Chinese herbs[J]. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2019, 163: 423–444.
- [7] XIE L, SHEN M, HONG Y, et al. Chemical modifications of polysaccharides and their anti-tumor activities[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 229: 115436.
- [8] LIU Y, SUN Y Y, HUANG G L. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 780–786.
- [9] 于俊俊, 徐德平. 枳椇子降尿酸功效成分[J]. *食品科技*, 2019, 44(11): 227–231, 237. [YU J J, XU D P. Uric acid-lowering ingredients of Semen Hoveniae[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(11): 227–231, 237.]
- [10] 陆石英, 覃志高. 药食两用枳椇的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(6): 1865–1870. [LU S Y, QIN Z G. Research progress on *Hovenia dulcis* Lindl. for medicine and food[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(6): 1865–1870.]
- [11] 向进乐, 杜琳, 朱文学, 等. 枳椇果梗营养功能与加工利用[J]. *中国林副特产*, 2015, 1: 98–101. [XIANG J L, DU L, ZHU W X, et al. Research progress in nutrition and utilization of *Hovenia pedunculata*[J]. *Forest By-Product and Speciality in China*, 2015, 1: 98–101.]
- [12] 李维新, 何志刚, 林晓姿, 等. 拐枣的营养保健功能及其果汁饮料的研制[J]. *食品科学*, 2005, 8: 249–251. [LI W X, HE Z G, LIN X Z, et al. Nutritional health function of *Hovenia dulcis* Thunb and research of juice beverage[J]. *Food Science*, 2005, 8: 249–251.]
- [13] 肖芳, 陈涛, 伍振煌, 等. 植物多糖的提取工艺、生物学功能及其在动物生产中的研究进展[J]. *饲料研究*, 2022, 14: 125–128. [XIAO F, CHEN T, WU Z H, et al. Research progress on extraction technology, biological function and animal production of plant polysaccharides[J]. *Feed Research*, 2022, 14: 125–128.]
- [14] 王文丽, 张金玲, 魏亚宁, 等. 天然多糖提取、纯化及生物活性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(22): 470–480. [WANG W L, ZHANG J L, WEI Y N, et al. Extraction, purification, and bioactivity of natural polysaccharides: A review[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(22): 470–480.]
- [15] WANG W Q, LIU Z C, LIU Y J et al. Plant polypeptides: A review on extraction, isolation, bioactivities and prospects[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 207: 169–178.
- [16] 杨海涛, 曹小燕. 超声辅助浸提拐枣中多糖及抗氧化性研究[J]. *应用化工*, 2017, 46(11): 2174–2177. [YANG H T, CAO X Y. Study on ultrasonic wave assisted extraction of polysaccharide from *Hovenia dulcis* and its antioxidant activity[J]. *Applied Chemical Industry*, 2017, 46(11): 2174–2177.]
- [17] 张保, 李立天, 张萌, 等. 拐枣枝多糖提取工艺优化与其抗氧化性研究[J]. *中国酿造*, 2016, 35(7): 155–160. [ZHANG B, LI L T, ZHANG M, et al. Optimization of extraction technology of *Hovenia acerba* sticks polysaccharides and its antioxidant activity[J]. *China Brewing*, 2016, 35(7): 155–160.]
- [18] 魏丕伟, 王凌云, 熊俐, 等. 枳椇多糖提取工艺研究[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(8): 272–274. [WEI P W, WANG L Y, XIONG L, et al. Study on the extraction process of *Hovenia acerba* polysaccharide[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2012, 40(8): 272–274.]
- [19] 刘佳维, 周君, 高亚杰, 等. 红参多糖脱蛋白的研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(7): 188–192. [LIU W J, ZHOU J, GAO Y J, et al. Deproteinization of polysaccharide from red ginseng[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(7): 188–192.]
- [20] YANG B, WU Q J, LUO Y X, et al. High-pressure ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Hovenia dulcis*: Extraction, structure, antioxidant activity and hypoglycemic[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137: 676–687.
- [21] 刘胜男, 余敏敏, 郭晓莉, 等. 迷迭香提取物对自由基诱导蛋白质、油脂及DNA氧化的抑制作用[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(14): 22–27. [LIU S N, YU M M, GUO X L, et al. Inhibition effect of rosemary extract against oxidation of protein, lipid and DNA induced by free radicals[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(14): 22–27.]
- [22] 张月, 刘茜, 肖春霞. 辣椒碱对生物大分子氧化损伤的保护作用[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(2): 41–47. [ZHANG Y, LIU Q, XIAO CX. Protective effect of capsaicin against oxidative damage to biomolecules[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(2): 41–47.]
- [23] 杨志敏, 王祖文, 黄先智, 等. 桑叶生物碱对D-半乳糖诱导小鼠生物大分子氧化损伤的改善作用及机理[J]. *食品科学*, 2020, 41(5): 135–142. [YANG Z M, WANG Z W, HUANG X Z, et al. Effect and underlying mechanism of mulberry leaf alkaloid on improving D-galactose-induced oxidative damage in mice[J]. *Food Science*, 2020, 41(5): 135–142.]
- [24] 张双奇, 刘琳, 何念武, 等. 超声辅助提取陕产天麻多糖的工艺优化及抗氧化活性研究[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(9): 131–136. [ZHANG S Q, LIU L, HE N W, et al. *Gastrodia elata* polysaccharide from Shanxi by ultrasound-assisted hot water extraction: Process optimization and antioxidant activity[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(9): 131–136.]
- [25] CHEN C, YOU L J, ABBASI A M, et al. Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity *in vitro*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 130: 122–132.
- [26] 龚频, 王思远, 陈雪峰, 等. 响应面法优化杏鲍菇粗多糖提取条件及其体外活性[J]. *陕西科技大学学报*, 2019, 37(6): 60–65. [GONG P, WANG S Y, CHEN X F, et al. Optimization of crude polysaccharide extraction conditions from *Pleurotus eryngii* by response surface methodology and its *in vitro* activities[J]. *Journal of*

- Shanxi University of Science & Technology, 2019, 37(6): 60-65.]
- [27] 朱梅, 毕宏涛, 杨威, 等. 乙醇浓度对人参多糖分离的影响[J]. 东北师范大学报(自然科学版), 2019, 37(6): 60-65. [ZHU M, BI H T, YANG W, et al. The effects of ethanol concentrations on isolation of ginseng polysaccharides[J]. Journal of Northeast Normal University (Natural Science Edition), 2019, 37(6): 60-65.]
- [28] 何坤明, 王国锭, 白新鹏, 等. 山茱萸籽多糖分离纯化、结构表征及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 81-88. [HE K M, WANG G D, BAI X P, et al. Solation, purification, structure characterization and antioxidant activity of *Cornus officinalis* seed polysaccharides[J]. Food Science, 2021, 42(19): 81-88.]
- [29] 霍达, 张霞, 陈君诚, 等. 玉竹多糖的提取工艺优化、结构表征及抗氧化活性的研究[J]. 食品科技, 2020, 45(7): 200-208. [HUO D, ZHANG X, CHEN J C, et al. Optimization of extraction, structure characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Polygonatum odoratum* (Mill.) druce[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(7): 200-208.]
- [30] 郭磊, 管雨晴, 李梅云. 慈竹竹叶多糖体外抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(16): 9-11. [GUO L, GUAN Y Q, LI M Y. Study on antioxidative effects of polysaccharide from *Neosinocalamus affinis* leaves[J]. Food Research and Development, 2013, 34(16): 9-11.]
- [31] 叶文斌, 樊亮. 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[J]. 安徽农业大学学报, 2016, 43(2): 182-189. [YE W B, FAN L. Extraction of polysaccharides from *Hovenia acerba* Lindl. by optimization enzymolysis and response surface methodology and its antioxidant capacity[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2016, 43(2): 182-189.]
- [32] 左高隆, 黄霞, 林勇, 等. 蛋白质羰基化及茶多酚的预防作用研究进展[J]. 茶叶通讯, 2019, 46(3): 257-262. [ZUO G L, HUANG X, LIN Y, et al. Research progress on protein carbonylation and prevention of tea polyphenols[J]. Journal of Tea Communication, 2019, 46(3): 257-262.]
- [33] 童鑫怡, 韦铮, 陈梅, 等. 茶多糖-茶多酚对 D-半乳糖诱导的小鼠脑组织氧化损伤的改善作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 377-383. [TONG X Y, WEI Z, CHEN M, et al. Effect of tea polysaccharide-tea polyphenol on improving D-galactose-induced oxidative damage of brain in mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(16): 377-383.]