

张会佳, 侯相竹, 张涵, 等. 黄芪多糖复合酶提取工艺优化及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(17): 181–189. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090315

ZHANG Huijia, HOU Xiangzhu, ZHANG Han, et al. Optimization of Complex Enzyme Extraction Process of *Astragalus* Polysaccharides and Its α -Glucosidase Inhibitory Activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(17): 181–189. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090315

· 工艺技术 ·

黄芪多糖复合酶提取工艺优化及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性

张会佳¹, 侯相竹², 张涵¹, 殷澳², 高阳^{1,*}, 徐多多^{2,*}

(1. 长春中医药大学人参科学研究院, 吉林长春 130117;

2. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117)

摘要:目的: 以黄芪为原料, 采用复合酶法 (木瓜蛋白酶、果胶酶、纤维素酶) 提取黄芪多糖 (*Astragalus* polysaccharides, APS), 并分析工艺条件对多糖提取的影响。方法: 在正交试验确定复合酶比例的基础上, 采用响应面法对复合酶提取 APS 的提取条件进行优化, 得到最优工艺条件, 采用 pNPG 法评价其 α -葡萄糖苷酶抑制活性。结果: 5 g 黄芪药材粉末, 最佳复合酶配比为: 木瓜蛋白酶 88000 U、果胶酶 65000 U、纤维素酶 6000 U; 最佳酶解提取条件为: 酶解处理时间、温度、pH 和料液比分别为 2.82 h、60.34 °C、5.11 和 1:34.46 g/mL, APS 的得率最高可达 22.79%±0.14%; APS 对 α -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 7.42 μ g/mL。结论: 复合酶提取 APS 的得率较单酶得率显著提高, APS 对 α -葡萄糖苷酶表现出较强的抑制作用。

关键词: 黄芪多糖, 复合酶, 提取工艺, 响应面, α -葡萄糖苷酶活性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)17-0181-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090315



本文网刊:

Optimization of Complex Enzyme Extraction Process of *Astragalus* Polysaccharides and Its α -Glucosidase Inhibitory Activities

ZHANG Huijia¹, HOU Xiangzhu², ZHANG Han¹, YIN Ao², GAO Yang^{1,*}, XU Duoduo^{2,*}

(1. Ginseng Academy of Sciences, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. School of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: Objective: To extract *Astragalus* polysaccharides (APS) from *Astragalus membranaceus* using compound enzymes (including papain, pectinase and cellulase), and to analyze the effect of process conditions on APS extraction. Methods: Orthogonal experiments were conducted to determine the proportion of compound enzymes. The response surface method was used to optimize the conditions of extracting APS with compound enzymes. The optimal process condition was obtained, and the α -glucosidase-inhibiting effect of APS was evaluated by pNPG method. Results: For 5 g of *Astragalus* herbs, the optimal ratio of papain, pectinase and cellulase were 88000 U, 65000 U and 6000 U, respectively. The optimal extraction condition was as follows: time of 2.82 h, temperature at 60.34 °C, pH of 5.11, and solid-liquid ratio of 1:34.46 g/mL. The yield of APS under the optimal condition was up to 22.79%±0.14%. The half-inhibition concentration (IC₅₀) of APS for α -glucosidase was 7.42 μ g/mL. Conclusion: The yield of APS by compound enzymes is significantly higher than that by single enzymes, and APS can effectively inhibit the activity of α -glucosidase.

Key words: *Astragalus* polysaccharides (APS); complex enzymes; extraction process; response surface; α -glucosidase activity

收稿日期: 2023-09-28

基金项目: 中央引导地方科技发展资金 (202002050JC); 技术创新引导医药健康产业发展专项 (20210401058YY)。

作者简介: 张会佳 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生药 (药用真菌、动物药) 资源与开发利用研究, E-mail: zhanghj0601@126.com。

* 通信作者: 高阳 (1979-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 生药 (药用真菌、动物药) 资源与开发利用研究, E-mail: gaoyang-1979@hotmail.com。

徐多多 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: czxuduoduo@163.com。

黄芪, 豆科植物蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao)或膜荚黄芪(*A. membranaceus* (Fisch.) Bge.)的干燥根, 性微温, 味甘, 归脾经、肺经, 属补虚药下分类的补气药^[1]。首载于《神农本草经》, 被《中华人民共和国药典》所收录, 是获得国家卫生健康委批准使用的药食同源中药材^[2], 因其拥有丰富的化学成分以及强大的药理作用而备受国内外专家学者关注^[3]。黄芪多糖(*Astragalus polysaccharides*, APS)作为黄芪的主要活性成分, 主要由多种单糖如葡萄糖(Glucose, Glc)、鼠李糖(Rhamnose, Rha)、阿拉伯糖(Arabinose, Ara)、木糖(Xylose, Xyl)、甘露糖(Mannose, Man)、葡萄糖醛酸(Glucuronic acid, Glc)、半乳糖(Galactose, Gal)等和基于吡喃葡萄糖基的多糖组成, 具有抗衰老^[4]、抗肿瘤^[5-6]、免疫调节^[7]、抗抑郁^[8-9]、降糖调脂^[10-12]等药理作用。

多糖由单糖单元长链组成, 通过糖苷键连接, 是聚合碳水化合物分子, 提取黄芪多糖常用的方法有水提醇沉法、碱溶提取法、超声波提取、复合酶法提取等^[13], 不同提取工艺会影响到黄芪多糖的得率^[14]。酶法提取通过酶催化糖苷键断裂, 使多糖的分子质量减少, 降低多糖分子黏度, 从而提高多糖得率, 提升多糖活性利用率^[15-17]。同时其反应条件温和, 有机溶剂使用少, 工序简单, 不需要大型设备, 目前被应用于多种中药多糖的提取^[18], 而复合酶法提取黄芪多糖的研究未见相关报道。

本研究以复合酶法提取黄芪多糖, 借助正交试验和响应面试验, 以木瓜蛋白酶、果胶酶、纤维素酶为因素, 考察复合酶添加量和酶提时间、温度、pH、料液比四个提取因素对黄芪多糖得率的影响, 并对黄芪多糖的 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用进行研究, 为黄芪多糖提取工艺优化和药理作用提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄芪药材 江苏德芝林生态农业有限责任公司, 经长春中医药大学高其品教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪的干燥根; 果胶酶(500 U/mg)、纤维素酶(50 U/mg)、木瓜蛋白酶(800 U/mg)、PBS缓冲液、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、 α -葡萄糖苷酶(100 U/3.8 mg) 上海源叶生物科技有限公司; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾 上海化学试剂有限公司; 葡萄糖、苯酚 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 无水乙醇、硫酸 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

SHY-2A 数显水浴恒温振荡器 常州普天仪器制造有限公司; SHZ-DⅢ 予华牌循环水真空泵 巩义市予华仪器有限公司; PB-1 酸度计 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 移液枪 Thermo Scientific 公司; Hyper Sonic DT-A 超声波清洗器 昆山美美超声仪器有限公司; DHG-9070A 型电热恒温鼓风干

燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; M200pro 型酶标仪 上海佑科仪器仪表有限公司; XS-204 分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; BSA224S-CW 电子天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; FW177 中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; WP-UP-YJ-40 微量有机除热源型超纯水机 四川沃特水处理设备有限公司; EYEL4 N-1001 旋转蒸发仪 上海爱朗仪器有限公司; Anke TDL-5-A 离心机 上海安亭科学仪器厂; 90-3 恒温双向磁力搅拌器 上海振荣科学仪器有限公司; B11-2 型恒温磁力搅拌器 上海司乐仪器有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅 常州市江南实验仪器厂; FD-1 冷冻干燥机 北京德天佑科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黄芪多糖的复合酶提取工艺 参考张涵等^[19]的方法, 将黄芪洗净后于 50 ℃ 干燥至恒重, 粉碎, 过 40 目筛, 密封保存待用。取 5 g 药材粉末于碘量瓶中, 加入一定量的复合酶或单酶(木瓜蛋白酶、果胶酶和纤维素酶), 以一定的料液比加入纯化水(柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲盐(pH2.2)调节至一定 pH), 超声 10 min 混匀, 于一定温度的水浴恒温振荡器中酶解一定时间。沸水浴(90 ℃ 以上)灭酶 15 min, 酶提液于 4000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 回收溶液, 苯酚硫酸法^[20]测定糖含量, 根据公式计算黄芪多糖得率。浓缩样液冻干得 APS。

$$W(\%) = \frac{C \times V \times N}{M} \times 100$$

式中: W 表示黄芪多糖得率; C 表示提取液中多糖质量分数, mg/mL; V 表示提取液体积, mL; N 表示稀释倍数; M 表示称量的黄芪粉末质量, mg。

1.2.2 复合酶法提取黄芪多糖中酶添加量考察

1.2.2.1 单酶添加量的单因素实验 以单酶添加量作为单因素考察, 按照 1.2.1 实验方法, 固定酶提时间、温度、pH、料液比分别为 2.5 h、60 ℃、5.5、1:35 g/mL, 分别考察木瓜蛋白酶(56000、64000、72000、80000、88000、96000、104000 U)、果胶酶(50000、55000、60000、65000、70000、75000 U)和纤维素酶(5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000 U)对 APS 得率的影响。

1.2.2.2 复合酶配比的正交试验 按照 1.2.1 实验方法, 按照上述实验结果, 根据三组最佳单酶添加量选

表 1 复合酶法提取黄芪多糖的正交试验设计

Table 1 Orthogonal experimental design for complex enzymatic extraction of APS

水平	因素		
	A木瓜蛋白酶添加量 (U)	B果胶酶添加量 (U)	C纤维素酶添加量 (U)
1	80000	60000	5500
2	88000	65000	6000
3	96000	70000	6500

取正交水平, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 确定最佳复合酶配比。正交试验因素与水平如表 1 所示。

1.2.2.3 复合酶提取与单酶对比 按照 1.2.2 中的最佳复合酶配比添加复合酶(木瓜蛋白酶 88000 U、果胶酶 65000 U、纤维素酶 6000 U), 其余提取条件不变, 比较单酶提取和复合酶提取的多糖得率。

1.2.3 复合酶法提取黄芪多糖工艺优化 参考吴兰兰等^[21] 的方法, 考察酶解时间、温度、pH、料液比对多糖得率的影响, 优化复合酶法提取黄芪多糖的条件。

1.2.3.1 单因素实验 按最佳复合酶配比(木瓜蛋白酶 88000 U、果胶酶 65000 U、纤维素酶 6000 U), 其他提取条件不变, 按照 1.2.1 实验方法, 以酶解时间(1.5、2、2.5、3、3.5 h)、酶解温度(30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$)、酶解 pH(4.5、5、5.5、6、6.5), 料液比(1:30、1:35、1:40、1:45、1:50 g/mL)为单因素, 考察其中某一因素时固定其余条件不变(酶提时间、温度、pH、料液比分别固定为 2.5 h、60 $^{\circ}\text{C}$ 、5.5、1:35 g/mL), 以黄芪多糖得率为指标, 进行单因素实验。

1.2.3.2 复合酶法提取黄芪多糖工艺优化的响应面试验 基于单因素实验中最佳水平结果, 以酶解时间(A)、酶解温度(B)、酶解 pH(C)、料液比(D)为自变量, 以黄芪多糖的得率为因变量, 借助 Design-Expert 10.0.7.0 Trial 软件, 对黄芪多糖提取条件进行响应面分析与优化。响应面试验因素与水平见表 2。

表 2 四因素三水平的 Box-Behnken 试验设计
Table 2 Box-Behnken experimental design at the four-factor three-level

水平	因素			
	A酶解时间(h)	B酶解温度($^{\circ}\text{C}$)	C酶解pH	D料液比(g/mL)
1	2	50	4.5	1:30
0	2.5	60	5	1:35
-1	3	70	5.5	1:40

1.2.4 黄芪多糖含量测定方法 采用苯酚硫酸法, 参考叶迎等^[20] 的方法并加以改动。

1.2.4.1 标准曲线的制作 以无水葡萄糖为对照品制作标准曲线, 以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制葡萄糖标准曲线。得线性方程: $y=8.3462x-0.0127$, 决定系数 $R^2=0.9990$, 在 0.02~0.10 mg/mL 之间呈现良好的线性关系。

1.2.4.2 APS 含量测定 按照同样方法处理黄芪多糖提取物, 根据回归方程推算出 APS 含量。

1.2.5 工艺验证 按照 1.2.1 的实验方法, 按响应面试验所得的最优工艺对黄芪多糖进行提取, 计算黄芪多糖得率(W)。重复三次实验, 取平均值。

1.2.6 黄芪多糖对 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用研究 参考张艳秋等^[22] 的方法并加以改动, 用 PBS 缓冲液(pH6.8)将一定量的黄芪多糖粉末制成质量浓度

为 0.01、1、2、2.5、4、5、7.5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 作为待测样品组 A_x ; 用 PBS 缓冲液将一定量的阿卡波糖分别制成质量浓度为以上浓度的溶液, 作为阳性对照组 A。

待测样品组、阳性对照组各取 40 μL 样液于 96 孔板中, 加入 1 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液 40 μL 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 加入 pNPG(2 mg/mL)20 μL 后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 加入 0.1 mol/L 碳酸钠溶液(0.1 mol/L)终止反应。以 40 μL PBS 缓冲液代替 α -葡萄糖苷酶溶液重复上述实验作为背景对照组 A_{x0} , 以 40 μL PBS 缓冲液替代样品溶液作为空白对照组 A_0 。在 405 nm 波长处检测各孔的吸光度, 重复三次取平均值, 计算抑制率(Y)和半抑制剂浓度(IC_{50})。

$$Y(\%) = \left(1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}\right) \times 100$$

1.3 数据处理

选择 IBM SPSS Statistics 20 和 Design-Expert 10 软件进行统计分析, 采用 Origin 2021 绘图, 通过 Graph Pad prism 9 计算 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 复合酶添加量配比优化

2.1.1 单因素考察 由图 1 可知, 在各自区间内, 当酶添加量较低时, 酶量相对于底物不足, 黄芪多糖得

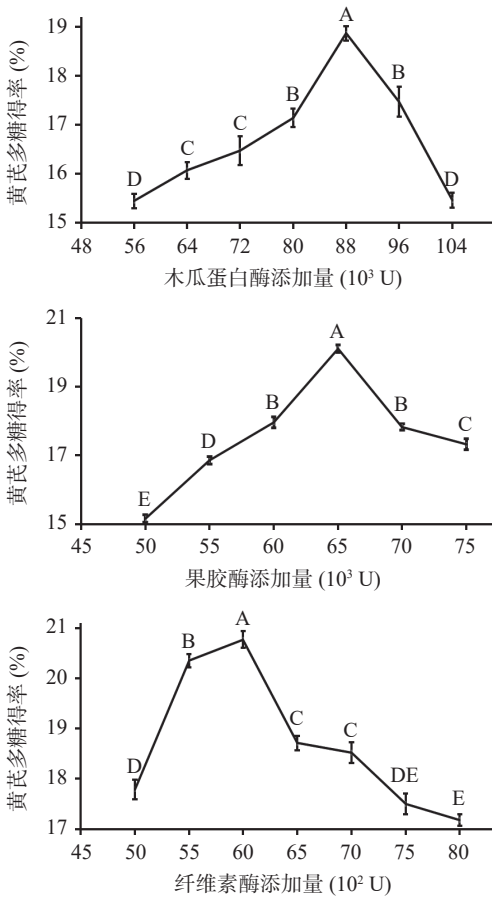


图 1 三种酶添加量的单因素实验结果
Fig.1 Results of single-factor test of three enzyme dosages
注: 图中不同大写字母表示差异显著($P<0.05$); 图 2~图 3 同。

率随酶添加量升高而不断升高,当木瓜蛋白酶、果胶酶、纤维素酶添加量分别达到 88000、65000、6000 U 时得率达到最高,分别为 18.86%±0.14%、20.11%±0.10%、20.67%±0.17%,再增加酶量,得率反而下降。植物细胞壁中富含纤维素、非纤维素多糖和木质素^[23],起到保护植物细胞的作用,复合酶催化黄芪细胞壁降解,将活性物质从细胞中释放出^[24],随着复合酶添加量升高,传质阻力降低,有利于多糖透过细胞壁释放出来,但当酶促反应过强时会让杂质也被释放,从而导致多糖得率降低。因此,三种单酶最佳添加量分别为木瓜蛋白酶 88000 U、果胶酶 65000 U、纤维素酶 6000 U。

2.1.2 复合酶添加量的正交试验 借助 $L_9(3^4)$ 正交表,筛选出最佳的复合酶配比添加量。由表 3 的 R 值可知,对得率的影响最为显著的是纤维素酶,其次是木瓜蛋白酶和果胶酶;由表 4 可知,不同种类及不同添加量的酶对黄芪多糖得率的影响极显著 ($P<0.01$);通过表 3 的 K 值得到最佳的选择方案为 $A_2B_2C_2$,在此复合酶比例下进行实验,黄芪多糖得率高达 21.34%±0.16%,显著高于正交试验中 $A_1B_2C_2$

表 3 酶配比正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results of enzyme ratio

试验号	A木瓜蛋白酶	B果胶酶	C纤维素酶	D空白	黄芪多糖得率 平均值(%)
1	1	1	1	1	16.57
2	1	2	2	2	21.02
3	1	3	3	3	17.40
4	2	1	2	3	20.72
5	2	2	3	1	20.08
6	2	3	1	2	19.87
7	3	1	3	2	16.78
8	3	2	1	3	19.10
9	3	3	2	1	20.98
K_1	54.99	54.06	55.53	57.63	—
K_2	60.66	60.18	62.73	57.67	—
K_3	56.85	58.23	54.27	57.22	—
k_1	18.33	18.02	18.51	19.21	—
k_2	20.22	20.06	20.91	19.22	—
k_3	18.95	19.41	18.09	19.07	—
R	1.89	0.65	2.82	0.15	—
最优配比	A_2	B_2	C_2	—	—

表 4 正交试验结果方差分析

Table 4 Analysis of variance of orthogonal test results

方差来源	III型平方和	df	均方	F	Sig.
校正模型	25.988 ^a	6	4.331	209.466	0.005 ^{**}
木瓜蛋白酶	5.586	2	2.793	135.076	0.007 ^{**}
果胶酶	6.539	2	3.27	158.119	0.006 ^{**}
纤维素酶	13.862	2	6.931	335.203	0.003 ^{**}
误差	0.041	2	0.021	—	—
总计	3333.046	9	—	—	—
校正的总计	26.029	8	—	—	—

$R^2=0.998$ (调整 $R^2=0.994$)

注: **表示差异极显著, $P<0.01$ 。

配比的最高得率 21.02%±0.12% ($P<0.05$)。

2.2 复合酶提取与单酶对比

三种单酶与复合酶(木瓜蛋白酶 88000 U、果胶酶 65000 U、纤维素酶 6000 U)提取 APS 得率比较见图 2,复合酶法有效提升黄芪多糖得率,多糖得率为 21.34%±0.16%,显著大于单酶提取 ($P<0.05$)。纤维素酶和果胶酶协同分解细胞壁中的纤维素和果胶^[25-27],木瓜蛋白酶将大分子的蛋白质分解成可溶于水的糖苷^[28],均有利于 APS 的溶出。在复合酶协同作用下 APS 的得率高于单酶提取,故后续提取工艺优化中选用复合酶法提取。

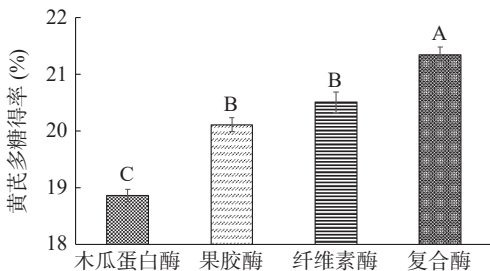
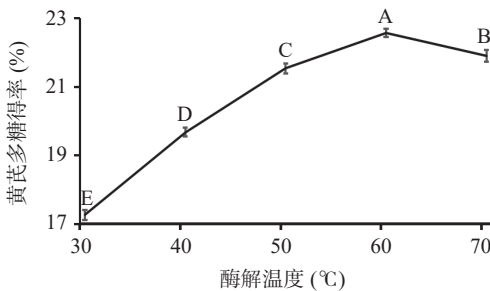
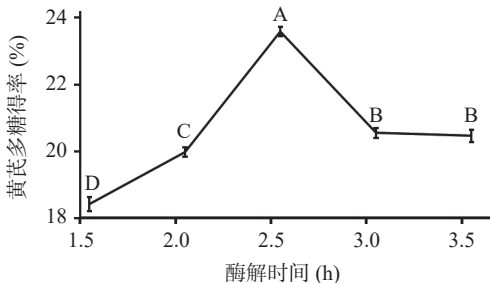


图 2 三种单酶与复合酶提取黄芪多糖得率

Fig.2 Yield of APS by three single enzymes and compound enzymes

2.3 复合酶法提取黄芪多糖工艺优化

2.3.1 单因素实验结果 酶的本质为蛋白质,其在水解体系中的解离状态和行为受到溶液条件的影响。当提取时间未达到 2.5 h 时酶与底物未充分反应,APS 未完全溶出,随时间延长,有效成分溶出增多,达到最优提取时长后过度提取反而使有效成分分解,得率反而降低^[29];提取温度低于 60 ℃ 时复合酶未能较好地发挥活性,有效成分难以释放,随着温度升高,酶的活性增加的同时细胞壁中的 APS 也释放出来,但高温时部分多糖发生水解,导致得率下降^[30];pH 为 5.0 时 APS 的得率最高,酸碱环境中酶的活性下降,多糖降解加快,使多糖得率降低^[31];料液比最优条



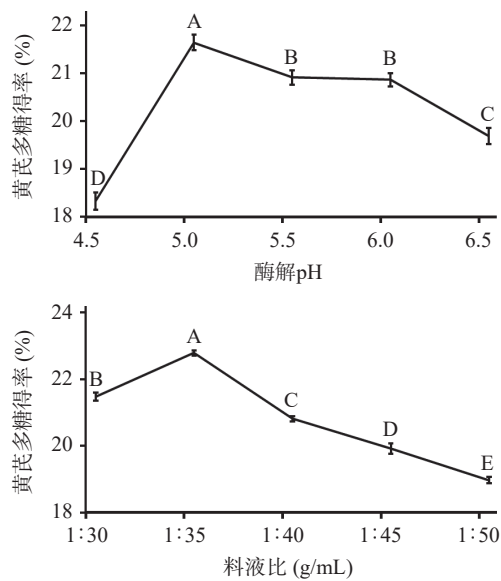


图3 四个考察因素对黄芪多糖得率的影响

Fig.3 Influence of four factors on the yield of APS

件为 1:35 g/mL, 溶剂体积增加有利于增加多糖浓度差, 促进多糖的扩散与溶出, 当多糖的扩散达到平衡时, 再增加溶剂体积反而使杂质也溶出, 多糖得率下降^[32]。图 3 实验数据表明, 酶解时间为 2.5 h, 酶解温度为 60 ℃, 酶解 pH 为 5.0, 料液比为 1:35 g/mL 时, 为提取黄芪多糖的最优条件。

2.3.2 Box-Behnken 响应面试验结果 复合酶提取条件的响应面试验结果如表 5 所示。参考以上的实验结果, 以水为提取溶剂, 时间、温度、pH、料液比为考察因素, 黄芪多糖的得率作为评价标准, 借助响应面试验得到 APS 得率对酶解时间(A)、酶解温度(B)、酶解 pH(C)、料液比(D)的多项回归方程:

$$Y=23.59+0.09A+0.85B+0.84C-0.26D-1.00AB+0.19AC+0.07AD-0.79BC-0.40BD+0.59CD-2.32A^2-0.96B^2-1.96C^2-0.45D^2。$$

根据表 6 的回归模型方差分析结果可知: F 表示模型拟合方程的显著程度, $F=31.19, P<0.0001$, 达到极显著水平, 具有统计学意义; 失拟项 $P=0.0506>0.05$, 决定系数 $R^2=0.9689$, 变异系数 $CV=1.99$, 模型拟合较好, 非正常误差小, 置信度高, 该模型可用于预测不同变量下的响应值, 可以用于模型分析和预测各因素对 APS 得率的影响。调整 R^2 为 0.9379, 表明得率 93.8% 的变异分布在方程的一次项、二次项、交互项的因子中, 其总变异中仅有 6.2% 不能由该模型来解释。预测 R^2 为 0.8293, 和调整 R^2 之差为 0.1086, 小于 0.2, 说明模型预测是可信的。

根据表 6 的 F 值, 4 个因素对多糖得率影响关系依次为酶解温度>酶解 pH>料液比>酶解时间, 二次项 D^2 对响应值多糖得率影响达到显著水平 ($P<0.05$), 一次项 B、C, 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对响应值多糖得率影响达到极显著水平 ($P<0.01$), 说明四个因素对响应值的影响是非线性的; 交互项 CD 显著 ($P<$

表 5 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 5 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A酶解时间(h)	B酶解温度(℃)	C酶解pH	D料液比(g/mL)	得率(%)
1	2	50	5	1:35	18.03
2	3	50	5	1:35	20.63
3	2	70	5	1:35	22.07
4	3	70	5	1:35	20.66
5	2.5	60	4.5	1:30	21.68
6	2.5	60	5.5	1:30	21.37
7	2.5	60	4.5	1:40	19.89
8	2.5	60	5.5	1:40	21.95
9	2	60	5	1:30	21.39
10	3	60	5	1:30	21.02
11	2	60	5	1:40	20.74
12	3	60	5	1:40	20.63
13	2.5	50	4.5	1:35	17.98
14	2.5	70	4.5	1:35	21.57
15	2.5	50	5.5	1:35	21.61
16	2.5	70	5.5	1:35	22.05
17	2	60	4.5	1:35	18.21
18	3	60	4.5	1:35	17.99
19	2	60	5.5	1:35	19.94
20	3	60	5.5	1:35	20.48
21	2.5	50	5	1:30	21.32
22	2.5	70	5	1:30	23.15
23	2.5	50	5	1:40	21.70
24	2.5	70	5	1:40	21.92
25	2.5	60	5	1:35	23.83
26	2.5	60	5	1:35	23.65
27	2.5	60	5	1:35	23.32
28	2.5	60	5	1:35	23.47
29	2.5	60	5	1:35	23.69

表 6 回归模型方差及结果

Table 6 Regression model variance and results

方差来源	平方和	自由度	标准误差	F值	P值	显著性
模型	78.11	14.00	5.58	31.19	<0.0001	**
A酶解时间	0.09	1.00	0.09	0.49	0.4936	
B酶解温度	8.59	1.00	8.59	48.00	<0.0001	**
C酶解pH	8.47	1.00	8.47	47.34	<0.0001	**
D料液比	0.80	1.00	0.80	4.48	0.0528	
AB	4.02	1.00	4.02	22.47	0.0003	**
AC	0.14	1.00	0.14	0.81	0.3841	
AD	0.02	1.00	0.02	0.09	0.7631	
BC	2.48	1.00	2.48	13.87	0.0023	**
BD	0.65	1.00	0.65	3.62	0.0778	
CD	1.40	1.00	1.40	7.85	0.0141	*
A ²	34.96	1.00	34.96	195.42	<0.0001	**
B ²	5.96	1.00	5.96	33.34	<0.0001	**
C ²	24.80	1.00	24.80	138.62	<0.0001	**
D ²	1.31	1.00	1.31	7.35	0.0169	*
残差	2.50	14.00	0.18			
失拟项	2.35	10.00	0.23	5.92	0.0506	
误差	0.16	4.00	0.04			
总和	80.62	28.00				

注: *表示差异显著, $P<0.05$, **表示差异极显著, $P<0.01$ 。

0.05), AB、BC 极显著($P<0.01$)。

2.3.3 等高线和响应面图 响应面法的等高线和响应面图如图 4 所示,随着酶解时间的延长,酶解温度、酶解 pH 和料液比的升高,APS 得率均呈先增加后降低的趋势,与前述分析结果一致。坡度陡峭程

度、等高线密集程度、椭圆程度越高,则两因素交互作用对黄芪多糖得率的影响越显著^[33]。通过图 4d 可得,酶解温度的等高线比酶解 pH 的等高线更密集,响应面坡度也更陡峭,因此酶解温度对 APS 得率的影响较酶解 pH 更大,结合图 4c、4f 可得,4 种因

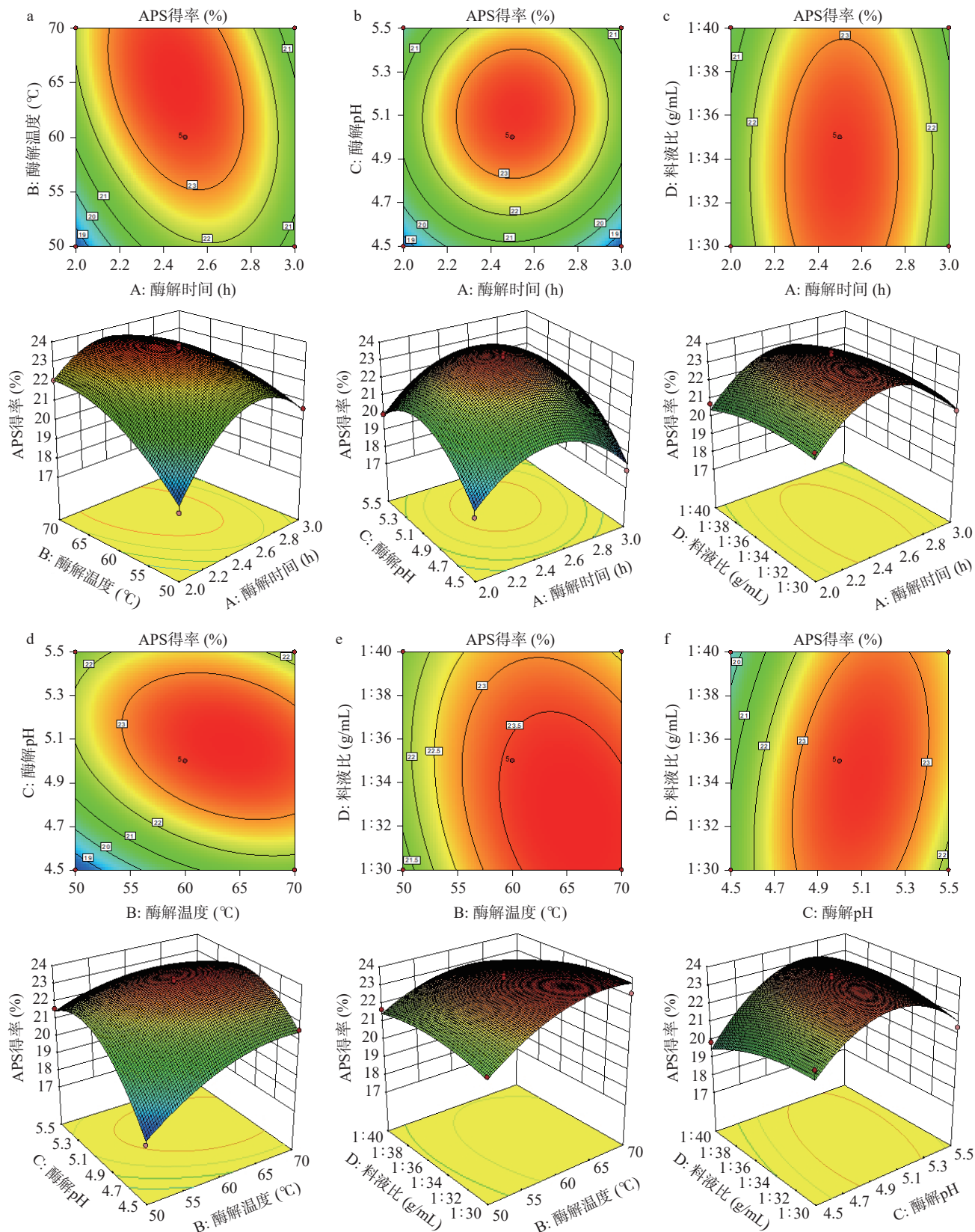


图 4 两因素交互作用对黄芪多糖得率的等高线和响应面图

Fig.4 Contour and response plots of the interaction of two factors on the yield of APS

素对 APS 得率的影响显著程度排序为 B>C>D>A; 两因素间交互作用的影响从大到小排列为: AB>BC>CD>BD>AC>AD, 同方差分析结果一致。

2.3.4 最优组合和验证性实验 模型预测的最佳酶解提取参数: 酶解时间 2.82 h, 酶解温度 60.34 °C, 酶解 pH 为 5.11, 料液比 1:34.46 g/mL, 预测结果为 22.793%。在预测条件下重复 3 次平行验证实验, APS 得率分别为 22.64%、22.92%、22.81%, 三次平均值为 22.79%±0.14%, 与预测值无显著性差异 ($P>0.05$), 表明响应面法优化结果可靠。

2.4 抑制 α -葡萄糖苷酶活性检验结果

人体内的 α -葡萄糖苷酶是糖代谢的关键酶, 黄芪多糖通过抑制酶活性、减少葡萄糖吸收、增加葡萄糖代谢且增加胰岛素的敏感性, 进而发挥调节糖代谢的作用^[32]。因此, 通过抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性可以明显延缓葡萄糖向血糖的转化, 达到降低血糖的效果^[34-35]。

由图 5 可见黄芪多糖浓度对于 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响, 黄芪多糖的抑制率与黄芪多糖的浓度相关, 黄芪多糖浓度在 0~10 $\mu\text{g/mL}$ 区间范围内, 反应体系的限制因素在于底物的浓度, 降糖抑制率随浓度增大而迅速增长; 当浓度达到 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 底物与 α -葡萄糖苷酶的结合达到了饱和, 抑制率达到最大为 64.17%±0.53%, 此时再提高黄芪多糖浓度直至 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对反应的抑制效果不再明显, 抑制率逐渐趋于平稳, 增长幅度略有下降, 黄芪多糖 IC_{50} 为 7.42 $\mu\text{g/mL}$ 。实验得出黄芪多糖的 α -葡萄糖苷酶的抑制率相比于阿卡波糖的 α -葡萄糖苷酶的抑制率略低, 这可能是因为多糖的相对分子质量为几万到几千万不等, 远远高于阿卡波糖的相对分子质量(645.61), 因此可能会干扰 α -淀粉酶与 APS 之间复合物的形成^[36], 需要对黄芪多糖进行进一步的分离提纯。

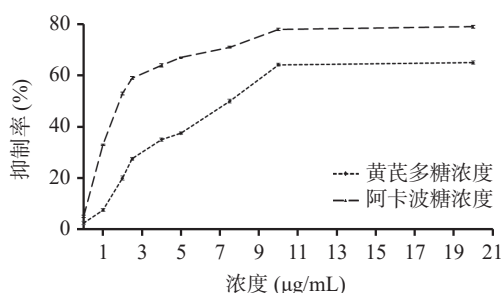


图 5 阿卡波糖和黄芪多糖对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制曲线
Fig.5 Inhibition curve of α -glucosidase activity of acarbose and APS

3 结论

酶具有催化效率高、特异性强的特点, 本研究以复合酶法提取黄芪多糖, 借助正交法和响应面法, 最终确定最佳工艺为取 5 g 黄芪药材粉末, 加入复合酶(木瓜蛋白酶 88000 U、果胶酶 65000 U、纤维素酶 6000 U), 按料液比 1:34.46 g/mL 的条件下加入 pH 为 5.11 的纯水(pH2.2 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶

液调节), 于 60.34 °C 摇床上恒温酶解 2.82 h, 黄芪多糖的得率最高可达 22.79%±0.14%, 该提取工艺稳定可靠。黄芪多糖对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用, IC_{50} 值为 7.42 $\mu\text{g/mL}$, 当黄芪多糖溶液浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率达到最大为 64.17%±0.53%。

本论文初步研究建立了黄芪多糖的包括复合酶法制备工艺优化以及黄芪多糖抑制 α -葡萄糖苷酶活性实验, 为黄芪多糖制备工艺的研究以及产品的开发奠定了基础。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 315-316. [National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part I[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 315-316.]
- [2] 赵佳琛, 王艺涵, 金艳, 等. 经典名方中黄芪的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(10): 337-346. [ZHAO J S, WANG Y H, JIN Y, et al. Herbal textual research on *Astragalus Radix* in famous classical formulas[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2022, 28(10): 337-346.]
- [3] 李博, 耿刚. 黄芪的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中西医结合研究, 2022, 14(4): 262-264. [LI B, GENG G. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Astragalus*[J]. Research of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2022, 14(4): 262-264.]
- [4] HAJAM Y A, RANI R, GANISE S Y, et al. Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives[J]. Cells, 2022, 11(3): 552.
- [5] TAO X, ZHANG X, FENG F. *Astragalus* polysaccharide suppresses cell proliferation and invasion by up-regulation of miR-195-5p in non-small cell lung cancer[J]. Biol Pharm Bull, 2022, 45(5): 553-560.
- [6] ZHANG R, XU L, AN X, et al. *Astragalus* polysaccharides attenuate pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition and NK-kappaB pathway activation[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(1): 331.
- [7] LI C X, LIU Y, ZHANG Y Z, et al. *Astragalus* polysaccharide: A review of its immunomodulatory effect[J]. Arch Pharm Res, 2022, 45(6): 367-389.
- [8] CHEN K Z, CHEN S, REN J Y, et al. Antidepressant effect of acidic polysaccharides from *Poria* and their regulation of neurotransmitters and NLRP3 pathway[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2021, 46(19): 5088-5095.
- [9] GUO Y, CHEN X, GONG P, et al. Advances in the mechanisms of polysaccharides in alleviating depression and its complications[J]. Phytomedicine, 2023, 109: 154566.
- [10] WANG E, WANG L, DING R, et al. Astragaloside IV acts through multi-scale mechanisms to effectively reduce diabetic nephropathy[J]. Pharmacol Res, 2020, 157: 104831.
- [11] 丛金凤, 范颖, 李新, 等. 基于 AMPK/SREBP1 信号通路探究黄芪葛根汤有效组分对糖尿病大鼠脂代谢及炎症反应的作用

- 机制[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 151-154. [CONG J F, FAN Y, LI X, et al. Exploration on mechanism of effective components of Huangqi Gegen decoction affecting lipids metabolism and inflammatory response in diabetic rats based on AMPK/SREBP1 signaling pathway[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2021, 39(1): 151-154.]
- [12] DENG S, YANG L, MA K, et al. *Astragalus* polysaccharide improve the proliferation and insulin secretion of mouse pancreatic β cells induced by high glucose and palmitic acid partially through promoting miR-136-5p and miR-149-5p expression[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 9872-9884.
- [13] 杨乾方, 王帆, 叶婷, 等. 黄芪多糖提取工艺、化学结构及药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(12): 4069-4081. [YANG Q F, WANG F, YE T, et al. Research progress on extraction technology, chemical structure and pharmacological action of *Astragalus* polysaccharides[J]. Chinese herbal Medicine, 2023, 54(12): 4069-4081.]
- [14] 穆飞艳, 麻馨月, 罗辉贤, 等. 黄芪多糖的提取方法、抑菌活性及其在鸡生产中应用的研究进展[J]. 饲料研究, 2022, 45(14): 158-160. [MU F Y, MA X Y, LUO H X, et al. Research progress on extraction method, antibacterial activity and application of *Astragalus* polysaccharide in chicken production[J]. Feed Research, 2022, 45(14): 158-160.]
- [15] 代香临, 郑启航, 胡楠楠, 等. 超声辅助酶改性典型晶型淀粉的结构及消化特性[J]. 中国食品学报, 2023, 23(1): 78-86. [DAI X L, ZHENG Q H, HU N N, et al. Ultrasound-assisted enzyme modification of the structure and digestion characteristics of typical crystalline starch[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(1): 78-86.]
- [16] DO D T, LAM D H, NGUYEN T, et al. Utilization of response surface methodology in optimization of polysaccharides extraction from vietnamese red *Ganoderma lucidum* by ultrasound-assisted enzymatic method and examination of bioactivities of the extract[J]. Scientific World Journal, 2021, 11: 7594092.
- [17] 项飞兵, 熊天涵, 胡书午, 等. 复合酶法提取九资河茯苓多糖及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(9): 118-123. [XIANG B F, XIONG T H, HU S X, et al. Optimization of polysaccharide extraction from Jiuzihe *Poria cocos* with multiple enzymes and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2022, 43(9): 118-123.]
- [18] 聂铭, 陆胜民, 王阳光, 等. 响应面法优化果胶酶辅助提取杨梅花色苷工艺研究[J]. 食品科技, 2021, 46(7): 194-200. [NIE M, LU S M, WANG Y G, et al. Optimization of anthocyanins extraction assisted with pectinase from red bayberry by response surface methodology[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(7): 194-200.]
- [19] 张涵, 殷澳, 张会佳, 等. 昆布多糖的复合酶法提取工艺优化及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性[J]. 食品工业科技, 2024, 45(3): 197-206. [ZHANG H, YIN A, ZHANG H J, et al. Optimization of multi-enzyme-assisted *Laminarin* extraction and evaluation of *Laminarin* inhibitory effect on α -glucosidase activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(3): 197-206.]
- [20] 叶迎, 王瑞海, 苗青, 等. 甘肃产 1~2 年生红芪和黄芪皂苷、多糖、黄酮类成分含量差异研究[J]. 中草药, 2023, 54(14): 4649-4661. [YE Y, WANG R H, MIAO Q, et al. Comparative study on statistical differences of saponins, polysaccharides and flavonoids contents of Gansu 1~2 years old *Hedysari Radix* and *Astragali Radix* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(14): 4649-4661.]
- [21] 吴兰兰, 吴伟菁, 王立博, 等. 响应面法优化苦荞麸皮粉蛋白质提取工艺[J]. 中国食物与营养, 2022, 28(3): 39-44. [WU L L, WU W J, WANG L B, et al. Optimization of buckwheat bran powder protein extraction process by response surface method[J]. Food and Nutrition in China, 2022, 28(3): 39-44.]
- [22] 张艳秋, 郑炜, 刘凯青, 等. 荔枝核多糖的水提醇沉工艺优化及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性研究[J]. 中国药房, 2020, 31(16): 1995-2000. [ZHANG Y Q, ZHENG W, LIU K Q, et al. Study on optimization of water extraction-ethanol precipitation technology of polysaccharide from *Litchi chinensis* seed and its inhibitory activity to α -glucosidase[J]. China Pharmacy, 2020, 31(16): 1995-2000.]
- [23] ZENG P, LI J, CHEN Y, et al. The structures and biological functions of polysaccharides from traditional Chinese herbs[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2019, 163: 423-444.
- [24] 马潇潇, 田成, 向福, 等. 金银花中肌醇的复合酶法提取及抗氧化活性评价[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(17): 101-106. [MA X X, TIAN C, XIANG F, et al. Optimization of enzymatic extraction conditions of inositol from *Flos Ionicerae* and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2021, 42(17): 101-106.]
- [25] DU J, ANDERSON CT, XIAO C. Dynamics of pectic homogalacturonan in cellular morphogenesis and adhesion, wall integrity sensing and plant development[J]. Nat Plants, 2022, 8(4): 332-340.
- [26] 孙燕丽, 吴晓青, 胡巧云. 超声波-复合酶法协同提取马齿苋多糖工艺的优化研究[J]. 饲料研究, 2022, 45(19): 74-77. [SUN Y L, WU X Q, HU Q Y. Optimization of ultrasonic-complex enzymatic synergistic extraction of polysaccharides from *Portulaca oleracea* [J]. Feed Research, 2022, 45(19): 74-77.]
- [27] 商海军, 郑志, 胡积送, 等. 复合酶辅助提取藜麦种皮皂苷的工艺优化与结构鉴定[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(7): 47-53. [SHANG H J, ZHENG Z, HU Z S, et al. Process optimization and structural identification of complex enzyme assisted extraction of *Chenopodium quinoa* Willd. seed coat saponins[J]. Cereals & Oils, 2023, 36(7): 47-53.]
- [28] 马永强, 王峙力, 孙宏霞, 等. 甜玉米芯多糖脱蛋白质方法的研究[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(6): 26-29, 39. [MA Y Q, WANG S L, SUN H X, et al. Study on the deproteinization method of sweet corn cob polysaccharide[J]. Cereals & Oils, 2023, 36(6): 26-29, 39.]
- [29] SHEN S W, ZHOU C, ZENG Y B, et al. Structures, physicochemical and bioactive properties of polysaccharides extracted from *Panax notoginseng* using ultrasonic/microwave-assisted extraction[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112446.
- [30] 郭刚军, 胡小静, 付稼榕, 等. 超声波-微波联合辅助提取澳洲坚果青皮多糖工艺优化及其抗氧化活性[J]. 中国南方果树, 2024, 53(3): 87-95. [GUO G J, HU X J, FU J R, et al. Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction process of polysaccharide from macadamia green husk and its antioxidant activity[J]. South China Fruits, 2024, 53(3): 87-95.]
- [31] 胡庆娟, 吴光杰, 牛庆川, 等. 响应面试验优化木瓜蛋白酶法脱马齿苋多糖蛋白工艺[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 246-252. [HU Q J, WU G J, NIU Q C, et al. Optimization of papain-catalyzed deproteinization of polysaccharide from *Portulaca oleracea* L. by response surface methodology[J]. Food Science, 2018, 39(20): 246-252.]
- [32] SUN H Y, LI C Y, NI Y J, et al. Ultrasonic/microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Camptotheca acuminata* fruits and its antitumor activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2019,

206: 557–564.

[33] 郑梓威, 王馨, 吴孟仙, 等. 响应面优化生物法提取玉米淀粉的研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(6): 101–108. [ZHENG Z W, WANG X, WU M X, et al. Optimization of biological extraction of corn starch by response surface methodology[J]. China Food Additives, 2023, 34(6): 101–108.]

[34] 丁孟汝, 王国栋, 袁平川, 等. 多糖调控糖脂代谢的作用及其机制研究进展[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(3): 471–475. [DING M R, WANG G D, YUAN P C, et al. Research progress in the role and mechanism of polysaccharides in regulating glucose and lipid metabolism[J]. Journal of Southern Medical University, 2021,

41(3): 471–475.]

[35] 林萍萍, 陈明珠, 张吟. 补骨脂及其主要化学成分降糖机制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2392–2399. [LIN P P, CHEN M Z, ZHANG Y. Hypoglycemic mechanism of *Psoraleae Fructus* and its main chemical constituents[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(9): 2392–2399.]

[36] 杜月, 张政, 刘学军, 等. 软枣猕猴桃花粉多糖提取、表征及体外生物活性研究[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(6): 85–91. [DU Y, ZHANG Z, LIU X J, et al. Extraction, characterization and *in vitro* biological activity of polysaccharide from *Actinidia arguta* Planch. pollen[J]. Cereals & Oils, 2023, 36(6): 85–91.]