

亚麻荠籽多糖提取工艺的响应面优化 及其体外抗氧化活性

朱杰^{1,2,3}, 张华南^{1,2,3}, 范毅^{1,2,3}, 于立芹^{1,2,3}, 李晓^{1,2,3}, 魏悦^{1,2,3},
张海希⁴, 李建^{1,2,3}, 全彦涛^{1,2,3}, 崔炜^{1,2,3}, 李自红^{1,2,3}

(1. 河南省纳普生物技术有限公司, 郑州 450002; 2. 河南省生物技术开发中心, 郑州 450002;
3. 河南省科学院, 郑州 450002; 4. 安阳九安农业有限责任公司, 河南 安阳 455000)

摘要:以亚麻荠籽饼为原料,以多糖得率为指标,在单因素试验基础上采用响应面试验对恒温搅拌提取亚麻荠籽多糖工艺进行优化,并探讨亚麻荠籽粗多糖提取物的体外抗氧化活性。结果表明,恒温搅拌提取亚麻荠籽多糖的最佳工艺条件为提取温度 90℃、料液比 1:18、提取时间 85 min、搅拌速度 200 r/min,在此条件下提取 2 次,亚麻荠籽多糖得率为 1.71%。亚麻荠籽粗多糖提取物对 DPPH 自由基与羟自由基均呈现出一定的清除能力,对羟自由基的清除能力优于 DPPH 自由基。研究结果为亚麻荠籽多糖的提取以及应用提供了理论依据。

关键词:亚麻荠籽;多糖;提取;抗氧化

中图分类号:TS229;TQ281

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)10-0127-05

Optimization of extraction process of polysaccharides from *Camelina sativa* (L.) Crantz seeds cake with response surface methodology and its antioxidant activity

ZHU Jie^{1,2,3}, ZHANG Huanan^{1,2,3}, FAN Yi^{1,2,3}, YU Liqin^{1,2,3},
LI Xiao^{1,2,3}, WEI Yue^{1,2,3}, ZHANG Haixi⁴, LI Jian^{1,2,3},
QUAN Yantao^{1,2,3}, CUI Wei^{1,2,3}, LI Zihong^{1,2,3}

(1. Henan Napu Biotechnology Co., Ltd., Zhengzhou 450002, China; 2. Biotechnology Developing Center of Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China; 3. Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China; 4. Anyang Jiu'an Agriculture Co., Ltd., Anyang 455000, Henan, China)

Abstract: Taking *Camelina sativa* (L.) Crantz seeds cake as the raw material, the extraction technology of polysaccharides by constant temperature stirring was optimized by response surface methodology based on single factor experiment. The in vitro antioxidant activities of the extract were measured. The results showed that the optimal extraction conditions were obtained as follows: extraction temperature 90℃, solid-liquid ratio 1:18, extraction time 85 min and stirring speed 200 r/min. Under the optimal conditions, the polysaccharides yield was 1.71% when being extracted twice. The crude polysaccharide extract exhibited certain scavenging effects on DPPH· and ·OH, but the effect on latter was stronger than the former. The results could provide theoretical basis for the extraction and application of polysaccharides of *Camelina sativa* (L.) Crantz seeds.

Key words: *Camelina sativa* (L.) Crantz seeds; polysaccharides; extraction; antioxidant activity

收稿日期:2021-01-14;修回日期:2021-02-19

基金项目:河南省科学院重大科研项目聚焦专项(190113004);河南省科学院基础科学研究项目(200613114)

作者简介:朱杰(1985),女,助理研究员,硕士,研究方向为天然产物研究与开发(E-mail)zhujie585@163.com。

十字花科植物亚麻荠(*Camelina sativa* L. Crantz)是一种起源于青铜器时代、经济价值高且具有较强开发潜力的油料作物^[1]。亚麻荠籽是 ω -3脂肪酸的良好来源,在丹麦、芬兰等国家曾被添加到

麦片粥、面包等食品中供食用^[2-3]。亚麻荠籽饼粕作为饲料可应用于畜禽养殖^[4]。亚麻荠籽油曾在欧洲、亚洲等多地有食用历史,但目前仅被加拿大、美国等少数国家批准作为新食品原料^[5]。虽然亚麻荠栽培历史悠久,但其产业发展较为缓慢,高附加值产品欠缺是影响该产业发展的重要原因之一。

多糖类物质在植物体内广泛存在,是近年来生命科学领域的研究热点之一。多糖具有抗氧化、抗炎、降血糖及降血脂等多种生物活性^[6-9],已被广泛应用于医药、食品、农业等领域。大量研究表明,自由基与人体心脑血管疾病、肺部疾病等多种疾病有着直接或潜在的联系^[10-12]。减少体内自由基对于改善人体血液流变性、抗炎与抑制肿瘤具有重要意义。多糖的自由基清除能力常作为其抗氧化能力评价的重要指标。

亚麻荠籽中含有较多的淀粉、果胶与黏液质等多糖类物质^[13],但鲜有亚麻荠籽中多糖提取工艺及抗氧化活性的研究报道。常见的多糖提取方法有热水提取法、酶解法、物理强化法等^[14]。本实验前期以亚麻荠籽饼为原料,分别对比了恒温搅拌提取、果胶酶酶解提取、超声波辅助提取等工艺对多糖的提取效果,综合多糖得率以及工艺的成本与方便易行性,选择恒温搅拌提取工艺。本文在前期工作基础上,采用响应面法优化亚麻荠籽多糖的提取工艺,并对粗多糖提取物进行体外抗氧化活性评价,为亚麻荠籽相关产品的开发以及亚麻荠籽资源的综合利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

亚麻荠籽饼,由本实验室液压制取亚麻荠籽油后得到;*D*-无水葡萄糖(批号 110833-201908),中国食品药品检验所;DPPH 自由基清除能力测试试剂盒、羟自由基清除能力测试试剂盒,上海琮益科技有限公司;硫酸、蒽酮、无水乙醇均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

F-1L 单层玻璃反应釜,河南爱博特科技发展有限公司;HH-4Y 电热恒温水浴锅,上海启前电子科技有限公司;TDL-5A 离心机,上海安亭科学仪器厂;T9CS 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;SB2100 型旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 亚麻荠籽多糖的提取

取 20 g 粉碎的亚麻荠籽饼,按一定料液比加

水,在一定温度下搅拌提取一定时间,过滤,滤渣重复提取 1 次,将 2 次提取液合并、浓缩,然后加 4 倍体积的无水乙醇,4~8℃ 醇沉过夜,4 000 r/min 离心 10 min,取沉淀加水复溶后重复醇沉 1 次,无水乙醇洗涤沉淀后,用适量水溶解,60℃ 旋转蒸发干燥,得亚麻荠籽粗多糖提取物。

1.2.2 亚麻荠籽多糖得率测定

1.2.2.1 标准曲线绘制

采用硫酸-蒽酮法^[15]绘制标准曲线。以 *D*-无水葡萄糖为对照品,于 580 nm 处测定 0~28 μg/mL 不同质量浓度对照品溶液反应后的吸光度。以 *D*-无水葡萄糖质量浓度(*C*)为横坐标、吸光度(*A*)为纵坐标绘制标准曲线,得到拟合线性回归方程为 $A = 0.0367C + 0.0947$, $R = 0.9992$ 。

1.2.2.2 亚麻荠籽多糖得率测定

精密称取 50 mg 亚麻荠籽粗多糖提取物,加入蒸馏水溶解后定容至 50 mL。按 1.2.2.1 方法测定溶液吸光度,代入线性回归方程计算亚麻荠籽多糖含量,按下式计算亚麻荠籽多糖得率(*y*)。

$$y = m/m_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中:*m* 为粗多糖提取物中多糖质量, g; *m*₀ 为亚麻荠籽饼质量, g。

1.2.3 体外抗氧化活性实验

将亚麻荠籽粗多糖提取物配制成 0.25、0.50、1.0、2.0、4.0 mg/mL 质量浓度梯度的水溶液,分别按照 DPPH 自由基清除能力测试试剂盒与羟自由基清除能力测试试剂盒要求检测亚麻荠籽粗多糖提取物 DPPH 自由基与羟自由基清除能力。

1.2.4 数据统计与分析

所有试验均平行测定 3 次,采用 SPSS16.0 软件对数据进行 LSD 检验,多重比较得差异显著性结果 ($P < 0.05$),数据以“平均值 ± 标准差”显示;采用 Design-Expert 7.0 软件进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取温度对亚麻荠籽多糖得率的影响

在料液比 1:20、提取时间 60 min、搅拌速度 200 r/min 条件下,研究不同提取温度(50、60、70、80、90℃)对亚麻荠籽多糖得率的影响,结果如图 1 所示。由图 1 可知,在一定范围内温度升高时分子运动加快,有利于溶剂渗透以及多糖分子的扩散,因此亚麻荠籽多糖得率随提取温度升高而逐渐增加。当提取温度高于 80℃ 后,一方面多糖溶出增多,另一方面温度过高导致部分多糖降解,总体多糖得率增加幅度变缓。因此,选择提取温度为 80℃。

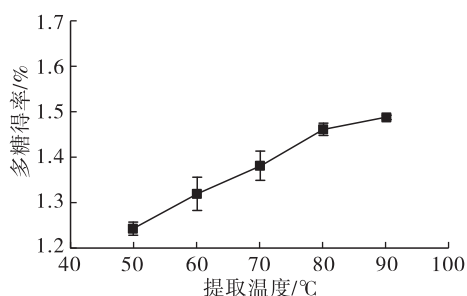


图1 提取温度对亚麻籽多糖得率的影响

2.1.2 料液比对亚麻籽多糖得率的影响

在提取温度 80 °C、提取时间 60 min、搅拌速度 200 r/min 条件下,研究不同料液比(1:10、1:15、1:20、1:25)对亚麻籽多糖得率的影响,结果如图 2 所示。

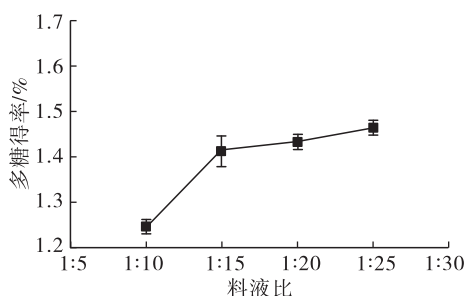


图2 料液比对亚麻籽多糖得率的影响

由于亚麻籽壳中胶遇水溶胀,当料液比太低时亚麻籽饼不能够被水完全浸泡,因此自 1:10 开始考察料液比对亚麻籽多糖得率的影响。由图 2 可知,料液比 1:15 与 1:10 相比多糖得率显著提高,随着料液比的增加,水能够与物料充分接触,溶出的多糖经搅拌均匀分散后浓度低,有利于亚麻籽饼中的多糖持续溶出。继续增加料液比,亚麻籽多糖溶出接近饱和,多糖得率增加幅度变缓。因此,选择料液比为 1:20。

2.1.3 提取时间对亚麻籽多糖得率的影响

在提取温度 80 °C、搅拌速度 200 r/min、料液比 1:20 条件下,研究不同提取时间(30、45、60、75、90 min)对亚麻籽多糖得率的影响,结果如图 3 所示。

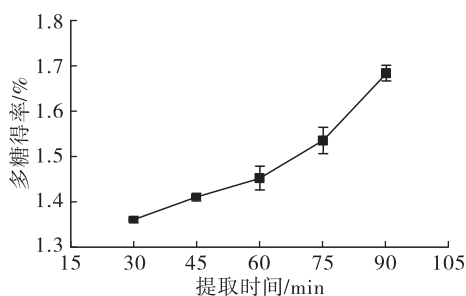


图3 提取时间对亚麻籽多糖得率的影响

由图 3 可知,随着提取时间延长,亚麻籽多糖得率呈上升趋势。当单次提取时间为 90 min 时,仍会有多糖溶于水中,亚麻籽多糖得率最高,但工艺整体提取时间太长,效率下降。因此,选择提取时间为 75 min。

2.1.4 搅拌速度对亚麻籽多糖得率的影响

在提取温度 80 °C、提取时间 75 min、料液比 1:20 条件下,研究不同搅拌速度(100、200、300、400、500 r/min)对亚麻籽多糖得率的影响,结果如图 4 所示。

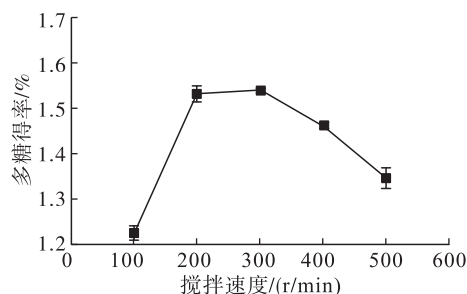


图4 搅拌速度对亚麻籽多糖得率的影响

由图 4 可知,当搅拌速度从 100 r/min 提高至 200 ~ 300 r/min 时,亚麻籽多糖得率显著升高,但继续升高搅拌速度,亚麻籽多糖得率反而下降,可能由于搅拌速度太高,液面形成旋涡,搅拌效率下降,溶液中多糖分布不均匀,局部浓度过大,导致多糖溶出降低。因此,选择搅拌速度为 200 r/min。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验设计及结果

根据单因素试验结果,综合各因素对多糖得率的影响,固定搅拌速度为 200 r/min,选择提取温度、料液比、提取时间作为考察因素,并以亚麻籽多糖得率(Y)作为响应值,进行三因素三水平的响应面试验设计与分析,响应面试验因素水平见表 1,响应面试验设计及结果见表 2。

表1 响应面试验因素水平

水平	A 提取温度/°C	B 料液比	C 提取时间/min
-1	70	1:15	60
0	80	1:20	75
1	90	1:25	90

表2 响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	Y/%
1	-1	1	0	1.55
2	1	1	0	1.60
3	0	0	0	1.53
4	0	0	0	1.46
5	-1	0	1	1.48

续表 2

试验号	A	B	C	Y/%
6	0	0	0	1.52
7	0	1	1	1.57
8	0	-1	-1	1.30
9	0	1	-1	1.51
10	1	0	-1	1.62
11	1	-1	0	1.67
12	1	0	1	1.68
13	0	-1	1	1.48
14	0	0	0	1.45
15	-1	-1	0	1.39
16	-1	0	-1	1.46
17	0	0	0	1.52

2.2.2 模型的拟合与显著性检验

通过对表 2 数据处理得到拟合函数模型: $Y = 1.43 + 0.14A + 0.087B + 0.070C - 0.057AB +$

$0.01AC - 0.030BC + 0.076A^2 - 0.019B^2 - 0.012C^2$ 。
对回归模型进行方差分析,结果见表 3。

由表 3 可知,该模型 P 值为 0.008 3,小于 0.01,表示该模型极显著,只有 0.83% 的机会是由于噪声导致的。失拟项 P 值为 2.248 6,不显著,表明该模型能够反映响应值的变化,试验拟合好,失拟小,预测值与实际值具有高度的相关性,可以用来对亚麻荠籽多糖提取工艺进行分析和预测。各因素中 A 、 C 、 A^2 对响应值的影响极显著或显著,说明提取温度、提取时间对亚麻荠籽多糖得率影响显著; B 、 B^2 对响应值影响不显著,说明料液比对亚麻荠籽多糖得率影响不显著。交互相 AB 影响显著,表明提取温度与料液比之间存在相互影响。对亚麻荠籽多糖得率影响的大小顺序为 $A > C > B$,即提取温度 > 提取时间 > 料液比。

表 3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	0.130	9	0.014	7.17	0.008 3	**
A	0.055	1	0.055	26.52	0.001 3	**
B	7.081×10^{-3}	1	7.081×10^{-3}	3.41	0.107 4	
C	0.013	1	0.013	6.29	0.040 5	*
AB	0.013	1	0.013	6.36	0.039 6	*
AC	4.000×10^{-4}	1	4.000×10^{-4}	0.19	0.674 1	
BC	3.600×10^{-3}	1	3.600×10^{-3}	1.73	0.229 5	
A^2	0.024	1	0.024	11.63	0.011 3	*
B^2	1.560×10^{-3}	1	1.560×10^{-3}	0.75	0.414 9	
C^2	5.813×10^{-3}	1	5.813×10^{-3}	0.28	0.613 2	
残差	0.015	7	2.143×10^{-3}			
失拟项	8.825×10^{-3}	3	2.942×10^{-3}	2.06	2.248 6	
总和	0.150	16				

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

通过回归模型优化得到亚麻荠籽多糖得率的最佳工艺条件为提取温度 89.93 °C、料液比 1:17.26、提取时间 84.97 min,在此条件下亚麻荠籽多糖得率理论值为 1.69%。

2.2.3 验证试验

为便于操作,将最佳工艺条件修正为提取温度 90 °C、料液比 1:18、提取时间 85 min,在此条件下进行 3 次重复试验,得到亚麻荠籽多糖的得率分别为 1.72%、1.69%、1.71%,平均值为 1.71%,与理论值接近,表明响应面法对亚麻荠籽多糖提取条件的优化是可行的。

2.3 体外抗氧化性评价

亚麻荠籽粗多糖提取物对 DPPH 自由基(DPPH·)与羟自由基(·OH)的清除能力见图 5。

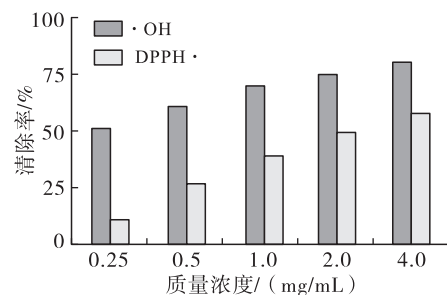


图 5 亚麻荠籽粗多糖提取物对自由基的清除能力

羟自由基是一种氧化能力强且毒性较大的自由基,可造成脂质过氧化、诱导基因突变、诱导神经细胞凋亡等^[16]。DPPH 自由基是一种稳定的有机自由基,常用于体外评价和筛选物质抗氧化活性,具有技术成熟、重现性好、灵敏度高优点^[17]。故以羟自由基与 DPPH 自由基清除率作为反映亚麻荠籽粗

多糖抗氧化作用的重要指标。由图5可知,在试验范围内,亚麻荠籽粗多糖提取物对DPPH自由基与羟自由基均有一定的清除能力,作用效果与提取物质量浓度呈量效关系,随着亚麻荠籽粗多糖提取物质量浓度的增大,自由基清除率均增加。亚麻荠籽粗多糖提取物对羟自由基的清除率要优于DPPH自由基。当亚麻荠籽粗多糖提取物质量浓度达到4 mg/mL时,对DPPH自由基的清除率为62.40%,对羟自由基的清除率可达到84.47%。由于亚麻荠籽粗多糖提取物中含有黏液质,具有较高的黏性,随着其浓度增大样品不易与相关试剂混合均匀,导致结果准确度下降,因此本试验中没有进行更高浓度的检测。

3 结论

在单因素试验的基础上,通过响应面试验优化恒温搅拌提取亚麻荠籽多糖工艺,得到亚麻荠籽多糖提取最佳工艺条件为提取温度90℃、料液比1:18、提取时间85 min、搅拌速度200 r/min,在该条件下提取2次,亚麻荠籽多糖得率为1.71%。亚麻荠籽粗多糖提取物具有较强的抗氧化能力,对DPPH自由基和羟自由基清除能力随其质量浓度增加而增强,当亚麻荠籽粗多糖提取物质量浓度达到4 mg/mL时,对羟自由基的清除率可达到84.47%。因此,亚麻荠籽多糖有望作为一种天然抗氧化剂进行深度开发。

参考文献:

- [1] SHUKLA V K S, DUTTA P C, ARTZ W E. Camelina oil and its unusual cholesterol content [J]. J Am Oil Chem Soc, 2002, 79(10): 965-969.
- [2] ZUBR J. Carbohydrates, vitamins and minerals of *Camelina sativa* seed [J]. Nutr Food Sci, 2010, 40(5): 523-531.
- [3] 李飞飞, 于立芹, 魏悦, 等. 亚麻荠种子的营养成分分析 [J]. 中国油脂, 2019, 44(2): 90-93.
- [4] MORIEL P, NAYIGIHUGU V, CAPPELLOZZA B I, et al. Camelina meal and crude glycerin as food supplements for developing replacement beef heifers [J]. J Anim Sci, 2011, 89(12): 4314-4324.
- [5] BELAYNEH H D, WEHLING R L, CAHOON E, et al.

Extraction of omega-3-rich oil from *Camelina sativa* seed using supercritical carbon dioxide [J]. J Supercrit Fluid, 2015, 104: 153-159.

- [6] 刘玉婷, 李井雷. 多糖体外抗氧化活性研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2019, 40(6): 214-219.
- [7] 杜军霞, 宫杉杉, 宋菲, 等. 枸杞多糖的抗炎镇痛作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(2): 236-239.
- [8] 董文南, 李克招, 张文婷, 等. 多糖降血糖作用及其机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(19): 219-225.
- [9] 钱雅雯, 魏佳, 张政, 等. 籽瓜多糖提取工艺的响应面优化及其体外降血脂活性 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 101-107.
- [10] 赵芷芊, 王敏, 张志清. 植物多糖的提取及抗氧化功效的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 337-342.
- [11] 黄文东, 杨艳芳, 高琦, 等. 丹参川芎嗪对离体大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国医药科学, 2019, 9(5): 9-13.
- [12] 刘宇, 李耀, 万永灵. 瑞芬太尼对内毒素诱导的急性肺损伤大鼠氧自由基、炎症因子及肺纤维化的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9): 1086-1090.
- [13] IBRAHIM F M, EI HABBASHA S F. Chemical composition, medicinal impacts and cultivation of camelina (*Camelina sativa*): review [J]. Int J Pharm Tech Res, 2015, 8(10): 114-122.
- [14] 李瑶佳. 植物多糖提取方法研究进展 [J]. 现代农业科技, 2019(1): 222-225.
- [15] 韩阳花, 高莉, 刘丽艳, 等. 酸浆果实中多糖的提取及含量测定 [J]. 食品科学, 2006, 27(2): 154-157.
- [16] JIANG D, LI X, LIU L, et al. Reaction rates and mechanism of the ascorbic acid oxidation by molecular oxygen facilitated by Cu(II)-containing amyloid-beta complexes and aggregates [J]. J Phys Chem B, 2010, 114(14): 4896-4903.
- [17] 赵容, 张萌萌, 陈茜, 等. 基于DPPH、ABTS法的竹叶花椒抗氧化谱效关系研究 [J]. 中国调味品, 2020, 45(5): 7-12.