

DOI:10.11686/cyxb2023260

http://cyxb.magtech.com.cn

祁兆奔, 任晓艳, 李怡彤, 等. 红三叶多糖的酶提取方法及抗氧化活性研究. 草业学报, 2024, 33(6): 105—115.

QI Zhao-ben, REN Xiao-yan, LI Yi-tong, *et al.* Enzyme extraction method and antioxidant activity of polysaccharides from red clover. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(6): 105—115.

红三叶多糖的酶提取方法及抗氧化活性研究

祁兆奔¹, 任晓艳¹, 李怡彤¹, 马金云², 刘权^{1*}

(1. 兰州大学草地农业科技学院, 草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室, 红三叶高值化开发利用创新创业示范基地, 甘肃 兰州 730020; 2. 和政县林草事业发展中心, 甘肃 临夏 731200)

摘要:红三叶是全世界种植范围较广的多年生豆科牧草, 资源丰富, 其多糖成分具有良好的降血糖和抗氧化活性, 具有高附加值开发与利用的前景。酶提取条件相对温和, 有利于提高多糖活性。本研究考察了酶解时间、酶用量、酶比例、酶解温度4个因素对红三叶多糖提取的影响。利用正交试验对提取条件进行优化筛选, 确定酶提取方法为: 酶解时间90 min, 酶用量1.0%, 酶解温度60℃, 酶比例为木瓜蛋白酶:纤维素酶:果胶酶7:2:2, 红三叶粗多糖含量为8.85%。本研究比较了酶提取以及文献中超声和热水提取, 3种方法所制备红三叶多糖的理化性质和抗氧化活性。3种多糖提取样品均具有抗氧化活性, 对O₂⁻自由基的清除活性明显高于阳性对照抗坏血酸。不同多糖提取样品的分子量范围差异明显, 以酶提取和热水提取较为集中。3种多糖样品均由8种单糖组成, 其中葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)和阿拉伯糖(Ara)摩尔占比相对较高, 约占到单糖组分的3/4。但单糖比例差异较大, 酶提取多糖中Glu摩尔百分比最高, 是热水提取多糖的1.6倍, 超声提取的1.4倍。

关键词:红三叶; 多糖; 酶提取; 工艺优化; 抗氧化活性

Enzyme extraction method and antioxidant activity of polysaccharides from red clover

QI Zhao-ben¹, REN Xiao-yan¹, LI Yi-tong¹, MA Jin-yun², LIU Quan^{1*}

1. College of Pastoral Grassland Agriculture Science and Technology, State Key Laboratory of Herbage Improvement and Grassland Agro-ecosystems, Innovation and Entrepreneurship Demonstration Base of Red Clover High-value Utilization, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; 2. Forestry and Grass Development Center, Hezheng County, Linxia 731200, China

Abstract: Red clover (*Trifolium pratense*) is a resource-rich perennial leguminous forage species that is cultivated worldwide. Its polysaccharide components have good hypoglycemic and antioxidant properties, and have potential applications in the development of new, high-value products. The polysaccharides can be extracted using enzymes, and milder extraction conditions are conducive to retaining their beneficial properties. In this study, the effects of enzymatic hydrolysis time, enzyme dosage, enzyme ratio, and enzymatic hydrolysis temperature on the extraction of red clover polysaccharides were investigated. The extraction conditions were optimized and screened by orthogonal experiments. The results showed that the best enzyme extraction method was as follows: enzymatic hydrolysis time of 90 min, enzyme dosage of 1.0%, enzymatic hydrolysis temperature of 60℃, and enzyme ratio papain: cellulase: pectinase of 7:2:2. The crude polysaccharide content in red clover was 8.85%. We compared the enzyme extraction

收稿日期: 2023-07-25; 改回日期: 2023-09-11

基金项目: 国家自然科学基金“红三叶与黑麦草混播过程中的化学互作研究”(31971763), 甘肃省科技特派员创新创业示范基地“红三叶高值化开发利用创新创业示范基地”(20CX9NA106), 阿拉善盟应用技术与开发资金计划(AMYY2022-19)和定西市科技计划(DX2023AZ07)资助。

作者简介: 祁兆奔(1997—), 男, 甘肃定西人, 在读硕士。E-mail: qzhaoben@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liuquan@lzu.edu.cn

method with two other methods; ultrasonic extraction and hot water extraction. Red clover polysaccharides were extracted using all three methods, and their physical and chemical properties and antioxidant activity were compared. All three polysaccharide extracts showed antioxidant activity, with stronger abilities to scavenge $O_2^{\cdot-}$ free radicals than that of the positive control, vitamin C. The molecular weight ranges of polysaccharide samples prepared using the different extraction methods were significantly different, and the enzyme extract and hot water extract were more concentrated than the ultrasonic extract. The three polysaccharide samples were composed of eight types of monosaccharides, among which glucose, galactose, and arabinose had relatively high molar ratios, accounting for approximately 3/4 of the monosaccharide components. The proportions of monosaccharides varied widely among the samples, and the molar percentage of glucose was highest in the enzyme-extracted polysaccharides (1.6 times that in hot water-extracted polysaccharides and 1.4 times that in ultrasonically extracted polysaccharides).

Key words: red clover; polysaccharides; enzyme extraction; process optimization; antioxidant activity

植物多糖又称植物多聚糖,它是一类由醛糖或酮糖经糖苷键连接而成的天然高分子聚合物,是植物体内重要的大分子物质,不仅是植物细胞的结构物质,也是细胞能量的主要来源^[1-2]。多糖具有一定的生物相容性、生物降解性和稳定性,被广泛应用于保健食品和医药行业,具有抗氧化、抗肿瘤、抗凝血、降血糖和免疫调节等多种生物学活性。在皮肤创伤、软骨和关节炎的治疗中发挥重要作用,易于加工和改性,在组织工程等领域具有良好的开发应用前景^[3-5]。

酶提取技术在天然植物多糖的开发利用中应用广泛,提取条件温和保证了多糖的活性。蛋白酶、纤维素酶和果胶酶是酶提取技术中常用的酶,可以提高多糖提取率和抗氧化活性^[6]。酶提取法主要是利用酶反应的专一性来提高提取效果^[7],可以有选择地降解植物的细胞壁和细胞膜,提高植物细胞壁和细胞膜通透性,使有效成分得到释放,酶的使用也可将部分多糖降解为更小分子量的片段,从而更有利于多糖从细胞内分离出来^[8]。研究发现,酶提取法在昆布(*Laminaria japonica*)、天麻(*Gastrodia elata*)和南瓜(*Cucurbita moschata*)植物中的多糖提取率高于超声和热水提取^[9-11],与热水和超声相比,酶提取的巴戟天(*Morinda officinalis*)多糖清除 DPPH(2,2-联苯基-1-苦基肼基 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)自由基的能力更强^[12],南瓜多糖的体外抗氧化活性更强^[10]。酶提取法在多糖提取方面的效果优于超声和热水提取法,尤其是复合酶法的提取效果更加明显,如纤维素酶和木瓜蛋白酶协同对蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)多糖的提取率高于单酶^[13]。多糖的生物活性与分子量有关^[14-15],多糖分子量降低时,其黏度特性降低,水溶性增加,生物活性增强^[16],单糖摩尔百分比具有差异性^[17]。不同提取方法会破坏多糖的骨架,但多糖链的断裂可能会破坏多糖的原有结构,导致多糖生物活性降低^[17-18]。因此,研究不同提取方法对红三叶(*Trifolium pratense*)多糖分子量和单糖组成的影响十分必要。

红三叶粗蛋白含量高,中性洗涤纤维含量低,家畜适口性好,是世界温带气候地区重要的多年生豆科牧草^[3]。同时,该植物富含异黄酮和多糖等生物活性物质,且具有固氮功能,对生态环境治理与恢复也具有重要作用^[19-20]。岷山红三叶作为多年生丛生型草本植物,经过 70 余年的栽培历史,适宜高寒阴湿的生态环境,异黄酮含量高,为药草兼用型高产优质牧草品种,在甘肃岷县有大面积种植^[21]。岷山红三叶多糖具有良好的开发利用价值和市场前景,Zhang 等^[20]采用响应面法优化了红三叶多糖的热水提取工艺,发现其具有良好的降血糖活性和抗氧化性能,超声提取制备的红三叶多糖也具有较好的抗氧化性能^[22]。然而截至目前,有关红三叶多糖的酶提取方法尚未见报道。

本研究通过对酶解时间、酶用量、酶解温度、酶比例 4 个影响因素的考察,优化红三叶多糖酶提取方法,并比较了酶、超声和热水提取多糖的提取百分比、抗氧化活性、分子量和单糖组成,为红三叶资源深入开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

岷山红三叶叶片采自 2022 年 5 月,兰州大学榆中校区智能温室种植的初花期植株,50 ℃烘干至恒重,粉碎过 0.25 mm 筛,备用。木瓜蛋白酶(800 U·mg⁻¹)、纤维素酶(50 U·mg⁻¹)和果胶酶(500 U·mg⁻¹)购自上海源叶生物科技有限公司。甘露糖(mannose)、鼠李糖(rhamnose)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid)、半乳糖醛酸(galacturonic acid)、葡萄糖(glucose)、半乳糖(galactose)、木糖(xylose)和阿拉伯糖(arabinose)标准品,购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验 取 1.0 g 红三叶粉末,置于 100 mL 锥形瓶中,用超纯水提取,酶在 40 ℃下水浴活化 10 min 后加入,提取后将溶液温度迅速升至 90 ℃下灭活 10 min,过滤并收集上清液。

分别考察酶解时间(30、60、80、90、100 min),酶用量(红三叶质量的 0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%),酶解温度(45、50、55、60 和 65 ℃),酶比例(木瓜蛋白酶:纤维素酶:果胶酶分别为 2:1:1、3:1:1、7:2:2、15:4:4 和 4:1:1)对红三叶多糖提取的影响,筛选最优提取条件,每组试验重复 3 次。

1.2.2 正交试验 在单因素试验的基础上,选择 A(酶解时间)、B(酶用量)、C(酶解温度)和 D(酶比例),按照正交设计表安排试验,因素水平如表 1 所示,共进行 9 组试验,每组试验重复 3 次。

1.2.3 多糖含量的测定 多糖含量采用苯酚—硫酸法^[22],在 490 nm 处测定吸光度值,计算其含量。以葡萄糖为标准品,横坐标为浓度(mg·mL⁻¹),纵坐标为吸光度值(A),其标准曲线为 $y=5.7364x+0.0465$, $R^2=0.9991$ 。

多糖含量 = $\frac{\text{待测液多糖浓度} \times \text{提取体积}}{\text{红三叶样品质量}} \times 100\%$

1.2.4 红三叶多糖的提取方法比较 酶提取法:取 50.0 g 红三叶粉末,置于 2000 mL 烧杯中,按照正交试验所得最佳提取方法进行多糖提取,酶解时间为 90 min,酶用量为 1.0%,酶解温度为 60 ℃,酶比例为 7:2:2。

超声提取法:取 50.0 g 红三叶粉末,置于 2000 mL 烧杯中,参照史文娟^[22]的方法,用 40% 的无水乙醇提取,料液比为 1:30,在 50 ℃下超声浸提 30 min,过滤并收集上清液。

热水提取法:取 50.0 g 红三叶粉末,置于 2000 mL 烧杯中,参照 Zhang 等^[20]的方法,用超纯水提取,料液比为 1:21,在 93 ℃下水浴浸提 95 min,过滤并收集上清液。

1.2.5 红三叶多糖的精制 按照 1.2.4 的 3 种方法分别将提取得到的粗多糖上清液,用旋转蒸发仪(RV10 digital Flex,德国 IKA 公司)减压浓缩至 1/4 体积,加入无水乙醇沉淀,采用 Sevage 法^[22]除蛋白,用透析袋(3500DA,北京索莱宝科技有限公司)透析 24 h,透析袋内溶液用大孔吸附树脂(D101,上海麦克林生化科技有限公司)精制,减压浓缩,冷冻干燥(Coolsafe100-4,香港基因有限公司)后得到精制多糖。

1.2.6 多糖抗氧化活性测定 用精制红三叶多糖样品进行 DPPH 和 O₂⁻自由基清除活性评价。分别参考 Mishra 等^[23]和 Vlasisavljević 等^[24]的方法。多糖样品和阳性对照抗坏血酸(vitamin C)用超纯水配制,将每个待测物质配制成浓度为 1.0 mg·mL⁻¹的原液,再依次分别稀释到 7 个浓度(0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8 和 1.0 mg·mL⁻¹)梯度待用。

1.2.7 多糖分子量测定 采用高效凝胶渗透色谱仪(Nexera LC-40D XR,日本株式会社),配备示差折光检测器(RID-20A,日本株式会社)测定多糖的分子量及其分布^[25-26]。示差折光检测器能分析无紫外吸收的物质,常用于对多糖组分进行检测。称取分子量为(3.05×10³~5.56×10⁵) g·mol⁻¹的葡聚糖标准品(北京索莱宝科技有限

表 1 正交试验因素水平设计
Table 1 Orthogonal test factor level design

| 水平 | A | B | C | D |
|--------|--------------------------------------|------------------------|--|-----------------|
| Levels | 酶解时间 | 酶用量 | 酶解温度 | 酶比例 |
| | Enzymatic hydro- lysis time (min) | Enzyme dos- age (%) | Enzymatic hydroly- sis temperature (°C) | Enzyme ratio |
| 1 | 80 | 0.7 | 50 | 3:1:1 |
| 2 | 90 | 0.9 | 60 | 7:2:2 |
| 3 | 100 | 1.0 | 65 | 4:1:1 |

公司),配制成 $5.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液,室温静置24 h后取上清液,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜备用,红三叶多糖的前处理与葡聚糖标品一致。

色谱条件:TSK G4000 PWXL凝胶柱($300.0\text{ mm}\times 7.8\text{ mm}$,日本TOSOH公司),柱温箱(CTO-40C,日本株式会社)温度为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相为超纯水,流速为 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$,数据采集时间为45 min。葡聚糖标准品校正曲线为 $F(x)=-0.0036x^3+0.2905x^2-7.9396x+77.8483$, $R^2=1.0000$ 。

1.2.8 单糖组成分析 采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolone,PMP)衍生化法^[27-29]分析红三叶多糖的单糖组成。

准确称取 5.0 mg 多糖样品于具塞烧瓶中,加入 2 mL , $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三氟乙酸在 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水解6 h。反应完成后用甲醇反复多次将水解液洗出,将水解液减压旋干,然后用 0.5 mL 超纯水溶解得到多糖水解液。分别称取甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GluA)、半乳糖醛酸(GalA)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)和阿拉伯糖(Ara)标准品 10.0 mg ,用超纯水配制成 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合单糖标准母液,再稀释2、4、8、16、32、64倍待用。

PMP衍生化步骤:取 0.1 mL 多糖水解液或单糖标准品溶液,加入 0.4 mL , $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMP和 0.4 mL , $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH混匀,在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中反应1 h,冷却后在反应体系中加入 0.405 mL , $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl。将所得溶液用 2 mL 三氯甲烷萃取,重复3次,获得PMP标记的单糖样品,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 水相滤膜后进样分析。

色谱条件:高效液相色谱仪(Agilent 1260,美国Agilent公司),Eclipse Plus C18色谱柱($4.6\text{ mm}\times 250.0\text{ mm}$,美国Agilent公司),紫外检测器(1260 DAD WR,美国Agilent公司)波长为 250 nm ,柱温箱(1260 MCT,美国Agilent公司)温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相A:B为 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 6.7):乙腈=83:17(v/v),流速为 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$,数据采集时间为55 min。

1.3 数据处理与分析

利用Microsoft Excel 2016和SPSS 26.0进行数据计算和统计分析,采用单因素方差分析(One-way ANOVA和Duncan法)检测不同提取条件对多糖含量和抗氧化活性之间的显著差异。利用GraphPad Prism 9计算多糖样品的自由基清除活性的 IC_{50} 值(半抑制浓度 semi-inhibitory concentration),采用Origin 2023绘图,LabSolutions软件处理多糖分子量数据。

2 结果与分析

2.1 单因素筛选

2.1.1 酶解时间 如图1A所示,在酶用量 0.9% 、酶解温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和酶比例3:1:1不变的条件下,随着酶解时间增加多糖含量先急剧上升,60~80 min增加趋于平缓,随后升高,但90与100 min时的多糖含量无显著性差异($P>0.05$)。从提取效率和时间成本等方面考虑,90 min为最佳的酶解时间。

2.1.2 酶用量 如图1B所示,在酶解时间90 min、酶解温度和酶比例不变的条件下,多糖含量随着酶用量的增多呈先增大后降低的趋势,酶用量为 0.9% 时,多糖含量最高,随后多糖含量下降。多糖含量与单酶用量有关,由于酶具有专一性,各单酶在提取过程中发挥着不同的作用。相同比例下,酶用量增加,各单酶对植物组织分解提取的能力不同。故 0.9% 为最佳的酶用量。

2.1.3 酶解温度 如图1C所示,在酶解时间90 min、酶用量 0.9% 和酶比例不变的条件下,红三叶多糖含量随着酶解温度的增大呈先增大后降低的趋势。 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下多糖含量增加趋于平缓,而 55 、 60 和 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的多糖含量无显著性差异($P>0.05$), $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后多糖含量下降,可能是温度抑制了酶活性。故 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为最佳的酶解温度。

2.1.4 酶比例 如图1D所示,在酶解时间90 min、酶用量 0.9% 和酶解温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下,红三叶多糖含量随着酶比例的增大呈先增大后降低再增大的趋势。酶比例和酶用量对红三叶多糖含量的变化趋势大致相同,彼此相互联系和制约。纤维素酶和果胶酶可以破坏红三叶细胞壁,加快多糖等内容物溶解和释放;木瓜蛋白酶可以降低蛋白质对多糖的结合力,水解糖蛋白和蛋白聚糖中游离的蛋白质,利于多糖的提取。酶比例(木瓜蛋白酶:纤维素酶:果胶酶)为3:1:1时多糖含量最高,且与酶比例4:1:1之间无显著性差异($P>0.05$),故3:1:1为最佳的酶比例。

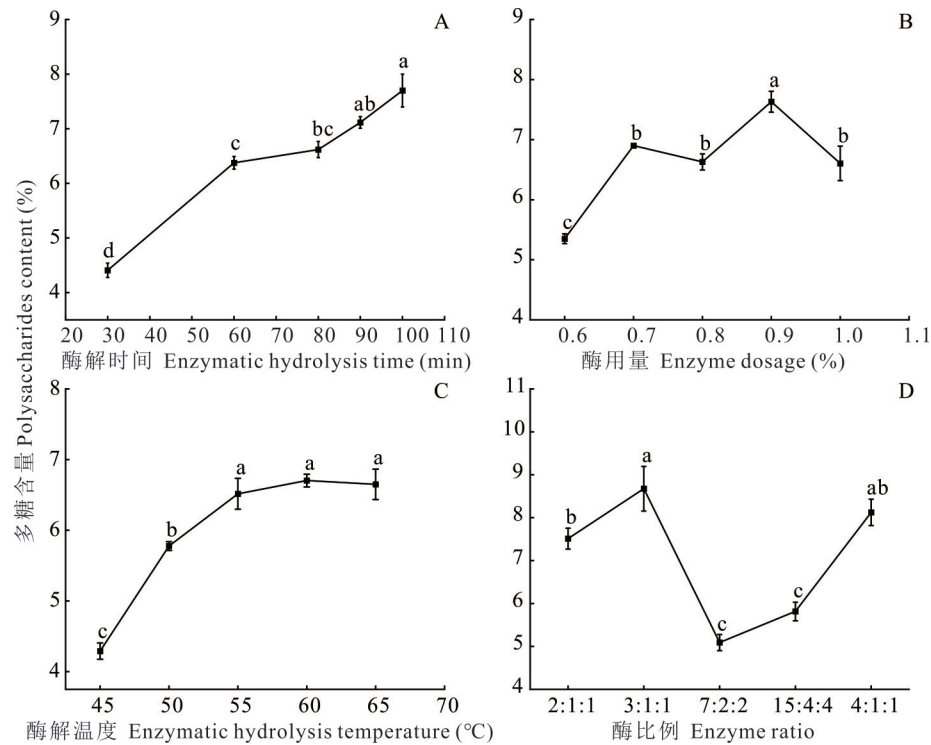


图 1 不同提取因素对多糖含量的影响

Fig. 1 Effects of different extraction factors on the content of polysaccharides

小写字母代表同一因素下的差异水平 ($P<0.05$)。Lower letters represent the levels of difference under the same factor ($P<0.05$).

2.2 正交试验结果

由表 2 的极差分析和表 3 的方差分析可知,不同条件酶提取工艺中 C(酶解温度)极差(R)最大,即酶解温度对红三叶多糖含量的影响最大,酶解时间、酶用量、酶解温度 3 个因素对多糖含量的影响均为极显著 ($P<0.01$),酶比例对红三叶多糖含量的影响作用不显著 ($P>0.05$)。通过各个因素的 K 值和极差进行直观分析,各因素不同水平依次为 $A_2>A_1>A_3$ 、 $B_3>B_2>B_1$ 、 $C_2>C_1>C_3$ 、 $D_2>D_3>D_1$, 优选出酶提取的最佳条件为 $A_2B_3C_2D_2$, 即酶解时间为 90 min, 酶用量为 1.0%, 酶解温度为 60℃, 酶比例为 7:2:2。按照以上最佳提取条件进行验证,红三叶粗多糖含量为 $(8.85\pm0.07)\%$ 。

2.3 酶、超声和热水提取方法比较

2.3.1 不同提取方法制备的红三叶多糖 不同提取方法制备的红三叶多糖如图 2 所示,按照 1.2.5 的方法精制多糖,酶、超声和热水提取精制的多糖分别为 0.23、0.14 和 0.26 g,提取百分比分别为 0.46%、0.28% 和 0.52%。该多糖样品用来测定抗氧化活性、多糖分子量和分析单糖组成。

2.3.2 红三叶多糖清除 DPPH 和 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的能

表 2 酶提取方法正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment on enzyme extraction method

| 序号 Serial number | A | B | C | D | 多糖含量 Polysaccharides content (%) |
|---------------------|---|--------------------------|---|---------------------|-------------------------------------|
| | 酶解时间 Enzymatic hydrolysis time (min) | 酶用量 Enzyme dosage (%) | 酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature (°C) | 酶比例 Enzyme ratio | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6.79 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 8.83 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 2 | 6.25 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 2 | 8.33 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 5.84 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 3 | 8.42 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3.96 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 2 | 7.24 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 8.22 |
| K_1 | 21.87 | 19.08 | 22.45 | 20.85 | — |
| K_2 | 22.59 | 21.91 | 25.38 | 21.82 | — |
| K_3 | 19.42 | 22.89 | 16.05 | 21.21 | — |
| R | 3.17 | 3.81 | 9.33 | 0.97 | — |

1~9 表示试验顺序。K₁、K₂、K₃ 分别表示某因素水平 1、2、3 的多糖含量之和,用于计算极差。1—9 indicates the sequence of tests. K₁, K₂, and K₃ represent the sum of polysaccharide content at a certain factor level 1, 2, and 3, respectively, and are used to calculate the range.

力 由图 3A 可知,红三叶多糖对 DPPH 自由基的清除率弱于阳性对照 Vc。多糖浓度低于 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,酶和热水提取的多糖活性强于超声提取。多糖浓度为 $0.2 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 DPPH 自由基的清除率变化趋势较大,且热水提取的多糖清除率最大, IC_{50} 值为 $0.46 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 4), $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,超声提取的多糖清除率最大。超声和热水提取的多糖浓度在 $0.6 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 DPPH 自由基的清除率变化趋于平缓,而酶提取的多糖随浓度增大对 DPPH 的清除率增幅较大, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,3 种方法提取的多糖对 DPPH 的清除率趋于 70%。

表 3 酶提取方法正交试验方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis of orthogonal test for enzyme extraction method

| 因素 Factors | 离差平方和 Sum of squares of deviations | 自由度 Degree of freedom | 均方 Mean square | F 值 F value | 显著性 Significance |
|---------------|--|-----------------------------|----------------------|----------------|---------------------|
| A | 5.553 | 2 | 2.777 | 29.500 | $P < 0.01$ |
| B | 7.819 | 2 | 3.910 | 41.540 | $P < 0.01$ |
| C | 45.545 | 2 | 22.773 | 241.940 | $P < 0.01$ |
| D | 0.474 | 2 | 0.237 | 2.520 | $P > 0.05$ |

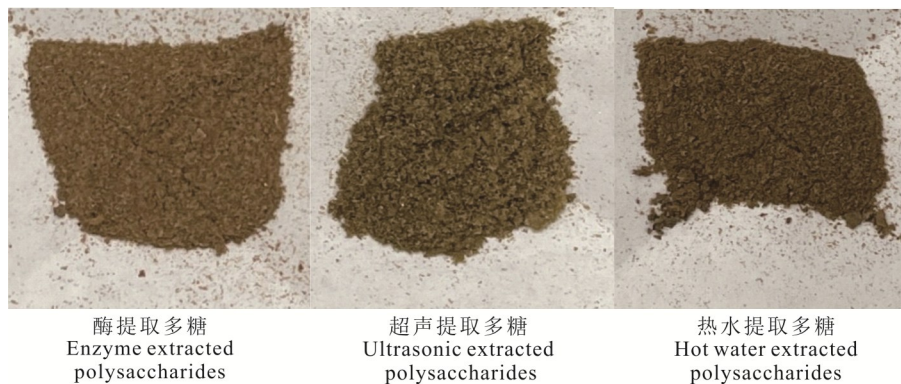


图 2 不同提取方法制备的红三叶多糖

Fig. 2 Red clover polysaccharides prepared by different extraction methods

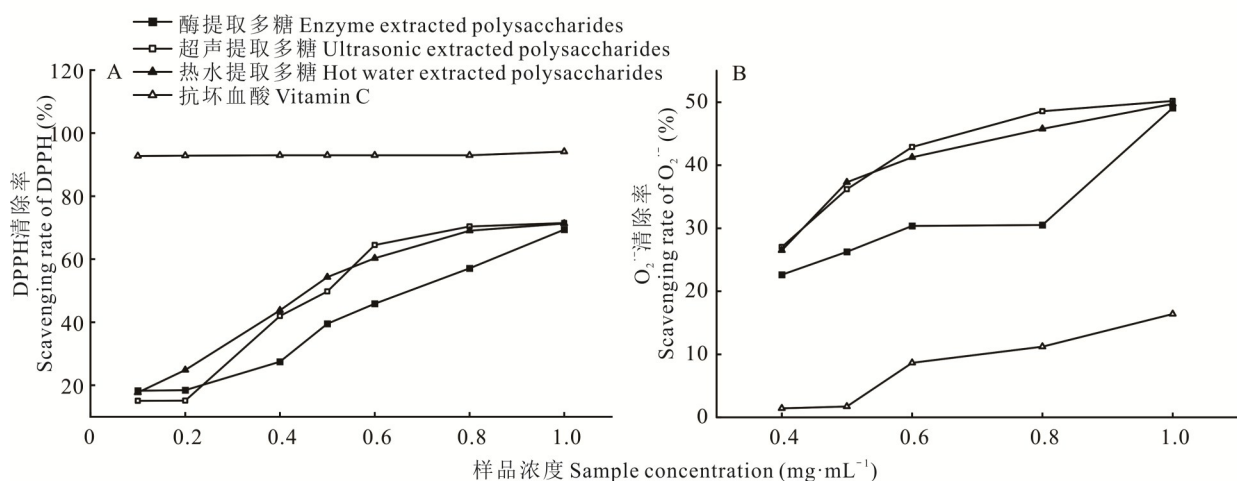


图 3 不同提取方法的多糖抗氧化活性

Fig. 3 Antioxidant activity of polysaccharides with different extraction methods

DPPH 自由基清除能力(A); $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基清除能力(B)。Scavenging ability of DPPH free radical (A); Scavenging ability of $\text{O}_2^{\cdot-}$ free radical (B).

由图 3B 可知,3 种方法提取的红三叶多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的清除率均强于阳性对照 Vc。超声和热水提取的多糖浓度在 $0.6 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率变化较大,酶提取的多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率随多糖浓度的增大先平

缓后迅速增加。1 mg·mL⁻¹时,3 种方法提取的多糖对 O₂^{·-}的清除率趋于 50%。不同方法提取的多糖中(表 4),超声和热水提取的多糖清除 DPPH 和 O₂^{·-}自由基的 IC₅₀ 值之间无显著性差异($P>0.05$)。清除相同自由基时酶提取的 IC₅₀ 值是超声和热水提取的 1.22~1.41 倍,1 mg·mL⁻¹时,酶、超声和热水提取的多糖均具有较高的抗氧化活性,且呈一定的量效关系。

表 4 不同提取多糖样品的自由基清除活性的 IC₅₀ 值
Table 4 IC₅₀ value of free radical scavenging activity of different extracted polysaccharide samples

| 样品 Samples | 半抑制浓度 Semi-inhibitory concentration (mg·mL ⁻¹) | |
|--|--|---|
| | 清除 DPPH 自由基 Scavenging DPPH free radical | 清除 O ₂ ^{·-} 自由基 Scavenging superoxide anion free radical |
| | | |
| 酶提取多糖 Enzyme extraction polysaccharides | 0.65±0.00a | 1.16±0.05b |
| 超声提取多糖 Ultrasonic extraction polysaccharides | 0.48±0.01b | 0.92±0.01c |
| 热水提取多糖 Hot water extraction polysaccharides | 0.46±0.01b | 0.95±0.01c |
| 抗坏血酸 Vc | 0.02±0.00c | 2.01±0.02a |

注:小写字母代表同一列数值之间的差异水平($P<0.05$)。
Note: Lower letters represent the levels of difference among values in the same column ($P<0.05$).

2.3.3 多糖分子量分析 测定多糖分子量对于研究多糖理化性质具有重要的意义。由表 5 可知,3 种方法提取的多糖分子量之间具有差异性。多糖组分数量和分子量的不同,可能是提取方法不同导致组分间差异性,从而影响多糖的抗氧化活性。酶、超声和热水提取多糖的重均分子量分别为($1.57\times10^4\sim1.66\times10^5$) g·mol⁻¹、($8.89\times10^3\sim2.40\times10^5$) g·mol⁻¹和($1.87\times10^4\sim1.82\times10^5$) g·mol⁻¹。通过比较 3 种提取方法多糖组分间的多分散系数,发现 3 种方法提取的多糖组分 2、3 以及酶和热水提取的多糖组分 4 的多分散系数更接近于 1,分子量较均一,有利于分离纯化。

2.3.4 单糖组成分析 如图 4 所示,3 种红三叶多糖样品由 8 种单糖组成,分别为甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GluA)、半乳糖醛酸(GalA)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)和阿拉伯糖(Ara)。其中葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)和阿拉伯糖(Ara)占比均较高,三者占到单糖组分的 71% 以上(表 6)。但不同提取方法导致这 3 种单糖的比例有明显差异,酶提取多糖中 Glu 摩尔百分比最高,是热水提取多糖的 1.6 倍。同时,酶提取多糖中 Glu 略高于 Gal,组成比接近于 1:1,而超声和热水提取多糖中,Gal 的比例最高,是 Glu 的 1.5~1.8 倍。Ara 在酶提取中比例较低,为 Glu 的 64%,但在超声和热水提取多糖中比例均高于 20%,是 Glu 的 1.10 和 1.14 倍。3 种提取多糖中,GluA 的摩尔百分比均最低,不到 4.1 mol%。

3 讨论

酶提取法是一种步骤简单、条件温和、成本较低和绿色安全的提取方法^[30-31]。以蛋白酶为主的复合酶法提取红三叶多糖,该方法可同步降解糖蛋白,减少除蛋白过程中三氯甲烷等有毒物质的使用。同时降低了多糖制备过

表 5 不同提取方法红三叶多糖分子量
Table 5 Molecular weight of red clover polysaccharide with different extraction methods

| 样品 Samples | 组分 Components | 重均分子量 Weight-average molecular weight (g·mol ⁻¹) | 数均分子量 Number-average molecular weight (g·mol ⁻¹) | 多分散系数 Polydispersity |
|---|------------------|--|--|-------------------------|
| 酶提取多糖 Enzyme extraction polysaccharides | 1 | 1.66×10^5 | 1.23×10^5 | 1.35 |
| | 2 | 7.21×10^4 | 7.19×10^4 | 1.00 |
| | 3 | 6.00×10^4 | 5.97×10^4 | 1.00 |
| | 4 | 1.57×10^4 | 1.50×10^4 | 1.05 |
| 超声提取多糖 Ultrasonic extraction polysaccharides | 1 | 2.40×10^5 | 1.56×10^5 | 1.54 |
| | 2 | 6.48×10^4 | 6.28×10^4 | 1.03 |
| | 3 | 8.89×10^3 | 8.64×10^3 | 1.03 |
| 热水提取多糖 Hot water extraction polysaccharides | 1 | 1.82×10^5 | 1.49×10^5 | 1.22 |
| | 2 | 9.06×10^4 | 9.03×10^4 | 1.00 |
| | 3 | 7.38×10^4 | 7.34×10^4 | 1.00 |
| | 4 | 1.87×10^4 | 1.79×10^4 | 1.04 |

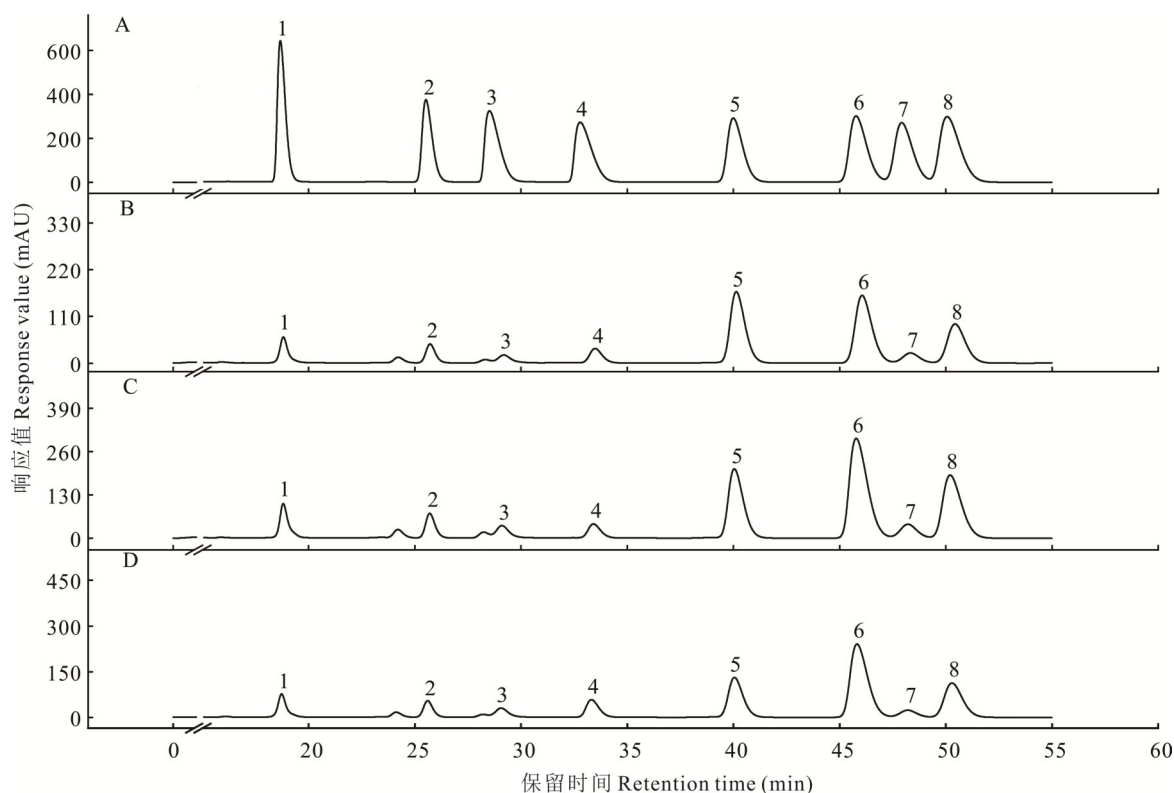


图4 不同提取多糖样品单糖组成 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of monosaccharide composition in different extracted polysaccharides

混合标准品(A)、酶提取多糖(B)、超声提取多糖(C)和热水提取多糖(D)。1、2、3、4、5、6、7和8分别为甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GluA)、半乳糖醛酸(GalA)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)和阿拉伯糖(Ara)。Mixed standard (A), enzyme extracted polysaccharides (B), ultrasonic extracted polysaccharides (C), and hot water extracted polysaccharides (D). 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 are mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose, xylose, and arabinose, respectively.

表6 不同提取方法红三叶多糖的单糖组成

Table 6 Monosaccharide composition of red clover polysaccharides with different extraction methods

| 提取方法 Extraction methods | 单糖组成 Monosaccharide composition (摩尔百分比 mol%) | | | | | | | |
|----------------------------|--|------------|---------------|---------------|------------|------------|-----------|-------------|
| | 甘露糖 Man | 鼠李糖 Rha | 葡萄糖醛酸 GluA | 半乳糖醛酸 GalA | 葡萄糖 Glu | 半乳糖 Gal | 木糖 Xyl | 阿拉伯糖 Ara |
| 酶提取 Enzyme extraction | 5.09 | 6.57 | 3.31 | 5.05 | 28.55 | 27.28 | 5.84 | 18.31 |
| 超声提取 Ultrasonic extraction | 5.44 | 6.62 | 3.45 | 3.69 | 20.92 | 30.81 | 6.12 | 22.95 |
| 热水提取 Hot water extraction | 4.93 | 7.59 | 4.02 | 6.35 | 17.86 | 32.95 | 6.00 | 20.29 |

程的时间和生产成本,减少了环境污染。本研究对酶提取方法进行了优化,比较了酶、超声和热水提取制备的红三叶多糖对DPPH、 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的清除活性及多糖分子量差异,并分析了其单糖组成。

红三叶多糖的酶提取方法取决于酶解时间、酶用量、酶解温度和酶比例等提取条件的影响。不同提取条件组合的酶解因素对红三叶多糖含量的影响不同。正交试验中,酶解时间、酶用量和酶解温度对多糖提取的影响极为显著($P < 0.01$),且酶提取受温度的影响最显著($P < 0.01$)。

3种提取方法中,超声提取的多糖清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的能力最强。但超声提取制备的多糖生产成本较高^[32],并且超声时间过长会引起可溶性多糖发生降解^[33]。多糖的抗氧化活性与其纯度有关^[22],而多糖的纯度与其附带的蛋白质和其他物质有关,提取方法不同,多糖的纯度可能不同,其抗氧化活性也不同。多糖浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,3种提取方法的多糖清除DPPH自由基的活性均趋于70%,其中热水提取多糖清除DPPH自由基的能力最

强。王玉霞^[7]和李莹等^[9]研究表明,多糖提取过程中,提取方法与植物产地的不同,都会导致多糖的生物活性不同。

植物多糖的理化性质研究中,多糖分子量和单糖组成是最基本的研究对象^[34]。酶和热水提取的多糖组分具有差异,超声提取的多糖组分分子量小,可能是因为超声时间过长会破坏多糖的分子链,使多糖分子降解^[35]。3种提取方法得到的多糖主要以Glu、Gal和Ara单糖组成,这与Zhang等^[20]通过热水提取制备的红三叶多糖的研究结果相同,但比例存在差异。大豆(*Glycine max*)膳食纤维的单糖组成中Gal摩尔百分比最高^[36],本研究超声和热水提取的结果与其相类似。超声提取的多糖中Man、Xyl和Ara占比分别高于酶和热水提取,这些差异可能对多糖的抗氧化活性产生影响^[37-38]。综上,不同方法提取的多糖分子量、单糖组成和抗氧化活性存在差异^[39-41]。

4 结论

本研究通过单因素和正交试验得到红三叶多糖的最佳酶提取方法为:酶解时间90 min,酶用量1.0%,酶比例7:2:2,酶解温度60℃。在此条件下,粗多糖含量为8.85%,重均分子量为 $(1.57 \times 10^4 \sim 1.66 \times 10^5) \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$,多糖以Glu、Ara和Gal为主的8种单糖组成,Glu的摩尔百分比最高。酶提取的多糖抗氧化活性弱于超声和热水提取,同时酶提取的多糖表现出较好的清除DPPH和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的能力,其 IC_{50} 值分别为:0.65和1.16 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。酶提取法与超声和热水提取相比,使用有机试剂少,该方法条件温和、成本较低、绿色安全,具有较大的开发应用前景。

参考文献 References:

- [1] Zhong K, Zeng Z H, Lin W J, *et al.* Study on the preparation of polysaccharides from mung bean seed and anti-oxidant activity. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013, 28(2): 93—98.
钟葵, 曾志红, 林伟静, 等. 绿豆多糖制备及抗氧化特性研究. *中国粮油学报*, 2013, 28(2): 93—98.
- [2] Chen F J, Li D H, Shen H Q, *et al.* Polysaccharides from *Trichosanthes fructus* via ultrasound-assisted enzymatic extraction using response surface methodology. *BioMed Research International*, 2017(25): 1—13.
- [3] Kagan I A, Anderson M L, Kramer K J, *et al.* Seasonal and diurnal variation in water-soluble carbohydrate concentrations of repeatedly defoliated red and white clovers in central kentucky. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2020, 84(1): 102858.
- [4] Su C, Chen Y T, Tian S J, *et al.* Research progress on emerging polysaccharide materials applied in tissue engineering. *Polymers*, 2022, 14(16): 3268.
- [5] Shang H M, Li R, Wu H X, *et al.* Polysaccharides from *Trifolium repens* L. extracted by different methods and extraction condition optimization. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6353.
- [6] Yu S, Deng X, Chen S Y, *et al.* Extraction technology of polysaccharide from Foshou yam by enzymatic hydrolysis of cellulase. *The Food Industry*, 2020, 41(9): 60—63.
喻随, 邓霞, 陈思颖, 等. 纤维素酶法提取佛手山药多糖的工艺. *食品工业*, 2020, 41(9): 60—63.
- [7] Wang Y X. Extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Notopterygium incisum* leaves. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022.
王玉霞. 羌活叶多糖的提取及抗氧化活性研究. 雅安: 四川农业大学, 2022.
- [8] Nadar S S, Rao P, Rathod V K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 2018, 108(3): 309—330.
- [9] Li Y, Huang D C, Chen G T, *et al.* Polysaccharides from *Laminaria japonica*: optimization of different extraction processes and comparison of physicochemical properties and antitumor activity. *Food Science*, 2019, 40(6): 288—294.
李莹, 黄德春, 陈贵堂, 等. 昆布多糖不同提取工艺优化及其理化性质和抗肿瘤活性比较. *食品科学*, 2019, 40(6): 288—294.
- [10] Deng G L. Effect of extraction methods on the yield and antioxidant activity of polysaccharide from pumpkin. *Cereals & Oils*, 2017, 30(9): 98—100.
邓桂兰. 不同提取方法对南瓜多糖提取率及抗氧化活性的影响. *粮食与油脂*, 2017, 30(9): 98—100.
- [11] Wang Q, Li D D, Pan Y Y, *et al.* Effect of different extraction methods on the extraction ratio and antioxidant activity of polysaccharides from *Gastrodia elata* Bi. *Food & Machinery*, 2017, 33(9): 146—150.

- 王庆, 李丹丹, 潘芸芸, 等. 提取方法对天麻多糖提取率及其抗氧化活性的影响. 食品与机械, 2017, 33(9): 146—150.
- [12] Duan Z W, He A, Xie H, *et al.* Optimization of different extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from *Morinda officinalis* How. Food Science and Technology, 2019, 44(6): 207—214.
段宙位, 何艾, 谢辉, 等. 巴戟天多糖不同提取工艺优化及抗氧化性比较. 食品科技, 2019, 44(6): 207—214.
- [13] Liu S S, Liu Y Q, Zhang Q, *et al.* Optimization of synergistic enzymatic hydrolysis of polysaccharide extraction from dandelion root and study on its antioxidant activity. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(6): 108—115.
刘珊珊, 刘亚琼, 张琦, 等. 双酶提取蒲公英根多糖工艺优化及其抗氧化性研究. 食品科学技术学报, 2019, 37(6): 108—115.
- [14] Chen H, Shi X Q, Cen L Y, *et al.* Effect of yeast fermentation on the physicochemical properties and bioactivities of polysaccharides of *Dendrobium officinale*. Foods, 2022, 12(1): 150.
- [15] Li B H, Huang G L. Preparation, structure-function relationship and application of *Grifola umbellata* polysaccharides. Industrial Crops and Products, 2022, 186(1): 115282.
- [16] He L, Yan X T, Liang J, *et al.* Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Dendrobium officinale* stem. Carbohydrate Polymers, 2018, 198(20): 101—108.
- [17] Li S J, Xiong Q P, Lai X P, *et al.* Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016, 15(2): 237—250.
- [18] Zhang N, Chen H X, Ma L S, *et al.* Physical modifications of polysaccharide from *Inonotus obliquus* and the antioxidant properties. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 54(1): 209—215.
- [19] Zhang H S, Gao Q, Zhang T T, *et al.* Comprehensive evaluation of copper tolerance of 30 germplasm resources of red clover (*Trifolium pratense*). Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(12): 117—128.
张鹤山, 高秋, 张婷婷, 等. 30份红三叶种质资源耐铜性综合评价. 草业学报, 2021, 30(12): 117—128.
- [20] Zhang H X, Zhao J C, Shang H M, *et al.* Extraction, purification, hypoglycemic and antioxidant activities of red clover (*Trifolium pratense* L.) polysaccharides. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148(1): 750—760.
- [21] Li Z Y, Zhang R, Zhang J, *et al.* Effect of compound microbial fertilizer on the root growth of *Trifolium pratense* L. cv. Minshan by partly replacing chemical fertilizer. China Herbivore Science, 2018, 38(1): 38—42.
李智燕, 张榕, 张洁, 等. 微生物专用菌肥与化肥配施对红三叶根系生长的影响. 中国草食动物科学, 2018, 38(1): 38—42.
- [22] Shi W J. The study on antioxidant activities of polysaccharide and flavonoid in *Apocynum venetum* L. and *Trifolium pratense* L. Lanzhou: Lanzhou University, 2020.
史文娟. 罗布麻和红三叶中多糖与黄酮的抗氧化活性研究. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [23] Mishra K, Ojha H, Chaudhury N K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry, 2012, 130(4): 1036—1043.
- [24] Vlaisavljević S, Kaurinović B, Popović M, *et al.* Profile of phenolic compounds in *Trifolium pratense* L. extracts at different growth stages and their biological activities. International Journal of Food Properties, 2017, 20(9/10/11/12): 3090—3101.
- [25] Chen S R, Li H C, Liao S Y, *et al.* Studies on anti-oxidation of polysaccharides from eight *Dendrobium* species. Pharmacy Today, 2022, 32(5): 346—352.
陈舜让, 李海春, 廖思艺, 等. 8种石斛多糖特征及非细胞抗氧化活性比较. 今日药学, 2022, 32(5): 346—352.
- [26] Huang Y C, Chen X X, He L P, *et al.* Isolation, purification and molecular weight determination of polysaccharides from *Cordyceps militaris*. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(8): 1054—1057.
黄奕诚, 陈雪香, 贺丽苹, 等. 蛹虫草多糖的纯化及其分子量的测定. 现代食品科技, 2012, 28(8): 1054—1057.
- [27] Qiu X. Extraction, isolation, purification and structural identification of polysaccharides from *Acorus tatarinowii*. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2021.
丘炯. 石菖蒲多糖的提取、分离纯化和结构鉴定. 广州: 广东药科大学, 2021.
- [28] Xu Z, Wang H D, Wang B L, *et al.* Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from the leaves of *Lilium lancifolium* Thunb. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92(1): 148—155.
- [29] Ren D Y, Lin D H, Alim A, *et al.* Chemical characterization of a novel polysaccharide ASKP-1 from *Artemisia sphaerocephala* Krasch seed and its macrophage activation *via* MAPK, PI3k/Akt and NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 cells. Food & Function, 2017, 8(3): 1299—1312.
- [30] Ahmad M M, Chatha S A S, Iqbal Y, *et al.* Recent trends in extraction, purification, and antioxidant activity evaluation of

- plant leaf-extract polysaccharides. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2022, 16(6): 1820—1848.
- [31] Huang G L, Chen F, Yang W J, *et al.* Preparation, deproteinization and comparison of bioactive polysaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, 2021, 109(7): 564—568.
- [32] Zhao Z Q, Wang M, Zhang Z Q. Research progress of antioxidation efficacy and extraction of plant polysaccharide. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(13): 337—342.
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. *食品工业科技*, 2018, 39(13): 337—342.
- [33] Yin Y, Gao W H, Yu S J. Progress in the research of polysaccharide extraction. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 190(2): 248—250.
尹艳, 高文宏, 于淑娟. 多糖提取技术的研究进展. *食品工业科技*, 2007, 190(2): 248—250.
- [34] Guo Y H, Zhang L J, Cao L L, *et al.* Recent advances in analytical techniques for monosaccharide composition of plant polysaccharides. *Food Science*, 2018, 39(1): 326—332.
郭元亨, 张利军, 曹丽丽, 等. 植物多糖中单糖组成分析技术的研究进展. *食品科学*, 2018, 39(1): 326—332.
- [35] Zhu Z Y, Pang W, Li Y Y, *et al.* Effect of ultrasonic treatment on structure and antitumor activity of mycelial polysaccharides from *Cordyceps gunnii*. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 114(1): 12—20.
- [36] Xiong H W, Dai S H, Min H, *et al.* The monosaccharides components of soybean and wheat bran fiber determined by gas chromatography. *Food Research and Development*, 2014, 35(2): 84—86.
熊慧薇, 戴书浩, 闵华, 等. GC 分析大豆和麦麸膳食纤维中的单糖成分. *食品研究与开发*, 2014, 35(2): 84—86.
- [37] Ni L J, Wang Y Y, He W Y, *et al.* Monosaccharide composition, activity and their correlation analysis in eight polysaccharides. *Journal of Tianjin University (Science and Technology)*, 2014, 47(4): 326—330.
倪力军, 王媛媛, 何婉瑛, 等. 8 种多糖的单糖组成、活性及其相关性分析. *天津大学学报 (自然科学与工程技术版)*, 2014, 47(4): 326—330.
- [38] Liu D Q, Ren F Z, Hou C Y. Comparative studies on the hypoglycemic activity of several plant polysaccharides. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(1): 81—89.
刘丹奇, 任发政, 侯彩云. 几种植物多糖降血糖活性的对比研究. *中国食品学报*, 2021, 21(1): 81—89.
- [39] Gu D L, Wang Q, Zan K, *et al.* Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Polygoni multiflori* Radix. *Chinese Journal of New Drugs*, 2023, 32(1): 51—56.
辜冬琳, 汪祺, 咎珂, 等. 何首乌多糖提取方法的比较研究. *中国新药杂志*, 2023, 32(1): 51—56.
- [40] Chen R Z, Li S Z, Liu C M, *et al.* Ultrasound complex enzymes assisted extraction and biochemical activities of polysaccharides from *Epimedium* leaves. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 2040—2050.
- [41] Kang Q Z, Chen S S, Li S F, *et al.* Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 124(1): 1137—1144.