

复合酶法提取诺丽多糖的工艺优化及其体外抗氧化活性

于纯森¹, 廖贤¹, 陈小倩¹, 李艾欣¹, 陈佳², 于苗苗^{3*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 海南明通诺丽生物科技有限公司, 海南澄迈 571900; 3. 济川药业集团有限公司, 江苏泰兴 225400)

摘要: 采用单因素试验以及响应面法优化复合酶法提取诺丽多糖的工艺, 探讨提取时间、料液比、提取温度、pH值对多糖提取率的影响。通过紫外光谱、红外光谱扫描技术对诺丽多糖的结构进行分析, 并检测其体外抗氧化作用。结果表明: 诺丽多糖复合酶法最佳提取工艺为提取时间 1.9 h、料液比 1:39 (g/mL)、提取温度 62 °C、pH5.5。经光谱扫描鉴定, 该工艺下的诺丽多糖含有少量蛋白质, 具有典型的多糖结构, 是一种酸性多糖。体外抗氧化试验证明, 诺丽多糖对 DPPH· 自由基、ABTS⁺· 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基均有较强的清除能力, 在抗氧化方面有良好的效果。

关键词: 诺丽; 多糖; 复合酶; 工艺优化; 抗氧化

Process Optimization of Complex Enzyme Extraction of Noni Polysaccharides and Its Antioxidant Activity *in vitro*

YU Chunmiao¹, LIAO Xian¹, CHEN Xiaoqian¹, LI Aixin¹, CHEN Jia², YU Miaomiao^{3*}

(1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Hainan Mingtong Noni Biotechnology Co., Ltd., Chengmai 571900, Hainan, China; 3. Jichuan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taixing 225400, Jiangsu, China)

Abstract: In this study, complex enzyme extraction of noni (*Morinda citrifolia* Linn.) polysaccharides was optimized. The influences of extraction time, solid-liquid ratio, extraction temperature, and pH on polysaccharide extraction rate were discussed. The extraction process of noni polysaccharide was optimized by a single factor test and response surface method. The structure of noni polysaccharide was analyzed by UV and infrared scanning techniques and its antioxidant effect *in vitro* was also analyzed. The results showed that the best extraction process was 1.9 h, solid-liquid ratio 1:39 (g/mL), extraction temperature 62 °C, and pH5.5. It was identified from spectral scanning identification that the noni polysaccharide produced in this process containing a small amount of protein in a typical polysaccharide structure was an acidic polysaccharide. The *in vitro* antioxidant test proved that the scavenging capacity of noni polysaccharides was relatively strong on radicals including DPPH·, ABTS⁺·, ·OH, and O₂⁻·. Therefore, noni polysaccharides showed good antioxidant effect.

Key words: noni; polysaccharides; complex enzyme; process optimization; antioxidant activity

引文格式:

于纯森, 廖贤, 陈小倩, 等. 复合酶法提取诺丽多糖的工艺优化及其体外抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(3):142-151.

YU Chunmiao, LIAO Xian, CHEN Xiaoqian, et al. Process Optimization of Complex Enzyme Extraction of Noni Polysaccharides and Its Antioxidant Activity *in vitro*[J]. Food Research and Development, 2025, 46(3): 142-151.

基金项目: 黑龙江省博士后科研启动基金项目(LBH-Q19186)

作者简介: 于纯森(1978—), 男(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 中药保健食品的研制与开发。

*通信作者: 于苗苗(1999—), 女(汉), 硕士。

诺丽(noni)即巴戟天(*Morinda citrifolia* Linn.), 隶属茜草科巴戟天属植物, 又称海巴戟天、海滨木巴戟、橘叶巴戟等^[1]。诺丽原产于东南亚, 主要分布于南太平洋诸岛屿以及我国海南、台湾和西沙群岛等地。成熟的诺丽果实果冻般质感, 且伴有强烈的丁酸类刺激性气味, 果肉多汁, 口感苦涩, 在自然条件下易发酵^[2-4]。诺丽作为民间药物使用已有 2000 多年历史, 诺丽多糖是诺丽中的重要组成成分, 具有抗炎^[5-6]、抗氧化^[7-8]、抗肿瘤^[9-11]、免疫调节^[12]等多种生物活性, 是当前药用植物和保健类产品的研究热点。

多糖提取方法是多糖研究与应用领域的热点, 也是多糖基础研究中的关键步骤。目前常用的多糖提取方法有热水提取法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法、复合酶法^[13]等。复合酶法提取是一种能耗低、条件温和的高效提取法, 能利用酶的专一性, 保护多糖结构在提取时免受破坏, 大幅提升提取效率。基于上述优点, 本研究采用复合酶法(纤维素酶:木瓜蛋白酶=1:1, 质量比)提取诺丽多糖, 应用单因素试验以及响应面设计, 考察 pH 值、提取温度、提取时间、料液比 4 个因素对多糖提取率的影响, 优化诺丽多糖的提取工艺。同时, 采用光谱扫描对其基本性质进行鉴定, 并对诺丽多糖的体外抗氧化作用进行初步研究, 以期进一步扩大诺丽多糖产品的深层次开发。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

诺丽果:海南明通诺丽生物科技有限公司;木瓜蛋白酶(200 000 U/g)、果胶酶(100 000 U/g)、纤维素酶(100 000 U/g):山东隆科特酶制剂有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]:福州飞净生物科技有限公司;Tris-HCl 缓冲液:厦门艾美漫妮生物科技有限公司;柠檬酸、磷酸氢二钠、苯酚、无水乙醇、邻苯三酚、维生素 C(vitamin C, V_C):四川西陇科学股份有限公司;浓硫酸、过硫酸钾:天津市大茂化学试剂厂;葡萄糖:成都曼思特生物科技有限公司;生理盐水:哈尔滨三联药业股份有限公司;FeSO₄:天津市致远化学试剂有限公司;水杨酸、溴化钾、K₃[Fe(CN)₆]:天津市科密欧化学试剂有限公司;H₃PO₄缓冲液:厦门海标科技有限公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SHZ-III 型循环水式多用真空泵:郑州长城科工贸有限公司;XMTA-608 型电热鼓风干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司;ME203E 型分析天平:瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;SC-3610 型低速离心机:安徽中

科中佳科学仪器;PB-10 型 pH 计:德国赛多利斯科学仪器有限公司;XL-30C 型粉碎机:广州市旭朗机械设备有限公司;XMTD-204 型数显式电热恒温水浴锅:上海跃进医疗器械有限公司;SP-752 型紫外-可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司;contrAA@700 型火焰石墨炉原子吸收光谱仪:德国耶拿分析仪器股份公司;FTIR-1500 型傅立叶变换红外光谱仪:日本岛津公司;Phenom ProX 型扫描电镜:上海复纳科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 诺丽多糖的提取

将诺丽果片置于 50 °C 电热鼓风干燥箱烘干至恒重, 利用粉碎机磨成粉, 过 100 目筛, 得到诺丽果粉, 备用。称取复合酶(纤维素酶:木瓜蛋白酶=1:1, 质量比) 0.06 g 至 250 mL 具塞锥形瓶中, 加入柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 90 mL, 充分溶解后加入诺丽果粉 3 g, 混匀后放入 60 °C 恒温水浴锅中酶解 60 min, 酶解反应结束后, 将酶解液置于 100 °C 沸水浴中灭酶 10 min, 真空抽滤后得滤液。滤液减压浓缩至原体积的 1/4, 随后在浓缩液中加入无水乙醇, 使样品中乙醇浓度达到 80% (体积浓度), 于 4 °C 冰箱中静置 24 h。将样品 3 500 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 收集沉淀于 60 °C 干燥至恒重后得诺丽多糖。

1.3.2 多糖含量测定

葡萄糖标准曲线的绘制参照张美霞等^[14]的方法并稍作修改。采用苯酚-硫酸法测定总糖含量, 分别吸取 20、40、60、80、100 μg/mL 的无水葡萄糖对照品溶液 1.0 mL 于具塞试管中, 分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 再迅速加入 98% 浓硫酸 5.0 mL, 充分摇匀, 90 °C 水浴 30 min 后至冰水浴中冷却 5 min 取出, 使用紫外分光光度计在 490 nm 波长下测定吸光度, 并绘制标准曲线。葡萄糖浓度与吸光度之间的标准曲线如图 1 所示, 线性回归方程为 $y=0.0083x+0.081$, $R^2=0.9996$ 。

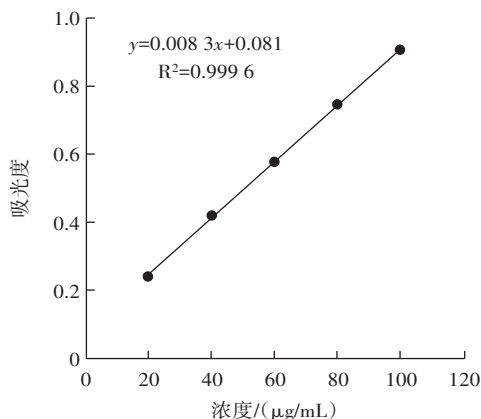


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

样品多糖提取率的测定:将样品参照上述步骤配

制供试品溶液,测得490 nm处的吸光度,代入标准曲线回归方程中计算多糖的质量浓度,并依据如下公式得出诺丽多糖的提取率($X, \%$)。

$$X = C \times V \times N / M \times 100$$

式中: C 为诺丽粗多糖质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; V 为提取液总体积, mL ; N 为稀释倍数; M 为诺丽果干粉的质量, g 。

1.3.3 多糖提取工艺优化

1.3.3.1 单因素试验设计

预设复合酶(纤维素酶:木瓜蛋白酶)质量比1:1、料液比1:30(g/mL)、复合酶添加量2.0%、提取温度 60°C 、 pH 值为6.0、提取时间1 h为工艺流程中的常规量,以提取时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)、料液比[1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(g/mL)]、 pH 值(4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)、提取温度(50、55、60、65、 70°C)、复合酶添加量(1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%)5个单因素变量替换工艺流程中相应的常规量,考察各因素对诺丽多糖提取率的影响。

1.3.3.2 Box-Behnken 试验设计

基于单因素试验的结果,以多糖提取率(Y)为响应值,分别考察 pH 值(A)、提取温度(B)、提取时间(C)、料液比(D)对诺丽多糖提取率的影响。试验因素水平见表1。

表1 Box-Behnken 试验因素与水平
Table 1 Factors and levels of Box-Behnken test

水平	因素			
	A pH 值	B 提取温度/ $^\circ\text{C}$	C 提取时间/h	D 料液比/ (g/mL)
-1	4.5	55	1.0	1:30
0	5.0	60	1.5	1:40
1	5.5	65	2.0	1:50

1.3.4 光谱扫描

1.3.4.1 紫外光谱扫描

配制诺丽多糖样品溶液(1 mg/mL),使用紫外-可见分光光度计在200~800 nm进行扫描,扫描间距为0.5 nm,蒸馏水作为空白对照。

1.3.4.2 红外光谱扫描

称取3 mg诺丽多糖样品,按质量比1:200的比例将多糖样品与溴化钾粉末共研混匀后压制成片,使用傅里叶红外光谱仪在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 范围内扫描,得到红外光谱图。

1.3.5 体外抗氧化活性测定

1.3.5.1 DPPH 自由基清除率的测定

配制DPPH无水乙醇溶液(0.2 mmol/L),避光保存,备用。配制浓度梯度为0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/mL 的诺丽多糖样品溶液以及 V_c 对照样品溶

液。吸取样品溶液1.0 mL,加入DPPH无水乙醇溶液1.0 mL,混匀,避光反应1 h,于517 nm波长下测吸光度,记为 A_1 。再取上述样品溶液1.0 mL,加入无水乙醇溶液1.0 mL,其余步骤同上述操作,于517 nm波长下测吸光度,记为 A_2 。取1.0 mL纯水代替样品,加入DPPH无水乙醇溶液1.0 mL,其余步骤同上述操作,于517 nm波长下测吸光度,记为 A_0 。重复测定3次,根据公式(1)计算DPPH自由基清除率($D, \%$)^[15]。

$$D = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100 \quad (1)$$

1.3.5.2 ABTS⁺自由基清除率的测定

准确称取一定量的诺丽多糖,溶解于蒸馏水中,配制成0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/mL 的诺丽多糖溶液。ABTS工作液的配制:7 mmol/LABTS⁺溶液与2.45 mmol/L过硫酸钾按体积比1:1混合,避光反应12 h后,用水稀释至吸光度为 0.700 ± 0.002 。具塞试管中加入诺丽多糖溶液0.2 mL,ABTS工作液0.8 mL,混匀,室温避光反应30 min,于732 nm波长下测定该溶液的吸光度。对照组为 V_c ,重复测定3次。根据公式(2)计算ABTS⁺自由基清除率($S, \%$)^[16]。

$$S = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 为多糖溶液与ABTS溶液反应后测得的吸光度; A_2 为多糖溶液与水反应后测得的吸光度; A_0 为水与ABTS溶液反应后测得的吸光度。

1.3.5.3 羟自由基清除率的测定

分别向具塞试管中加入1.0 mL不同浓度(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/mL)的诺丽多糖溶液,再依次加入1.0 mL FeSO_4 溶液(9 mmol/L)、1.0 mL水杨酸无水乙醇溶液(9 mmol/L)和1.0 mL的 H_2O_2 溶液(8.8 mmol/L),混匀, 37°C 水浴反应30 min后,于510 nm处测其吸光度 A_1 ;蒸馏水替换多糖样品溶液和 H_2O_2 溶液,分别测其吸光度值,记为 A_0 和 A_2 ;对照组为 V_c 。重复测定3次,按公式(3)计算羟自由基清除率($O, \%$)^[17]。

$$O = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100 \quad (3)$$

1.3.5.4 超氧阴离子自由基清除率的测定

配制诺丽多糖溶液,浓度分别为0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/mL ,配制Tris-HCl缓冲液(0.05 mol/L, $\text{pH}8.2$)、HCl溶液(10 mmol/L)、邻苯三酚溶液(3 mmol/L)。将Tris-HCl缓冲液在 25°C 水浴中保温20 min,取Tris-HCl缓冲液4.5 mL,依次加入样品溶液1 mL、邻苯三酚溶液0.4 mL混合, 25°C 下反应5 min后,加入0.5 mL HCl终止反应,325 nm波长下测定吸光度 A_1 ;蒸馏水替换样品溶液和邻苯三酚溶液,测定其吸光度,记为 A_0 和 A_2 ;对照组为 V_c 。重复测定3次,按公式(4)计算超氧阴离子自由基清除率($Y, \%$)^[18]。

$$Y = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100 \quad (4)$$

1.3.5.5 总还原能力的测定

取2.5 mL的 H_3PO_4 缓冲液(0.2 mol/L, $\text{pH}6.6$),同

1 mL $K_3[Fe(CN)_6]$ (10 mg/mL) 混合, 加至 1 mL 浓度分别为 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/mL 的诺丽多糖溶液和 V_C 溶液中, 50 °C 反应 20 min 后, 加入 10% Cl_3CCOOH 溶液 1.0 mL, 混匀, 5 000 r/min 离心 15 min。取上清液 2.5 mL, 加入蒸馏水和 0.1% 的 $FeCl_3$ 溶液各 2.5 mL, 充分混匀后, 于 700 nm 处测定吸光度 (OD_{700}), 对照组为 V_C , 重复测定 3 次^[19]。

1.4 数据处理

采用 Design-Expert.V 8.0.6.1 软件进行响应面设计及方差分析, 使用 Origin2021 作图。

2 结果与分析

2.1 诺丽多糖酶法提取优化的结果分析

2.1.1 单因素试验结果

2.1.1.1 提取温度对诺丽多糖提取率的影响

提取温度对诺丽多糖提取率的影响如图 2 所示。

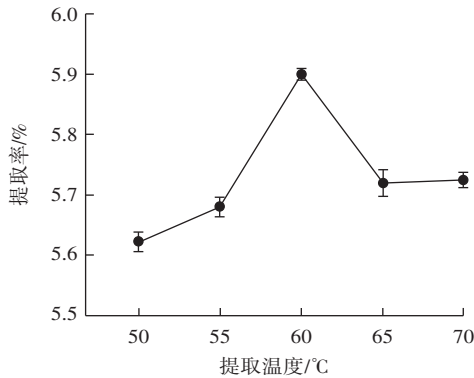


图 2 提取温度对诺丽多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of temperature on extraction yield of noni polysaccharides

由图 2 可知, 提取温度对多糖提取率有明显影响, 诺丽多糖的提取率随提取温度的升高整体先上升后下降, 60 °C 时诺丽多糖的提取率最高, 为 5.93%。这说明 60 °C 左右的温度有利于破坏诺丽植物细胞结构, 使内部的诺丽多糖生物分子溶解到溶剂中。提取温度的适当增加, 将有利于分子的热运动, 从而促进生物分子的溶出。但是, 当提取温度超过 60 °C 后, 提取率并没有升高, 这与文献[20-21]的研究结果一致。可能是因为当提取温度过高时, 大部分酶被破坏, 发生不可逆变性, 导致酶活性的丧失或高温下多糖的降解^[22]。因此, 选择提取温度 55、60、65 °C 进行后续优化试验。

2.1.1.2 pH 值对诺丽多糖提取率的影响

pH 值对诺丽多糖提取率的影响如图 3 所示。

由图 3 可知, 诺丽多糖提取率先随着 pH 值的升高而增加, 而后随着 pH 值的过度增加而减小。这可能是由于环境体系过酸或者过碱导致的酶失活, 从而影响其酶解能力^[23]。在 pH 值为 5.0 时, 诺丽多糖提取

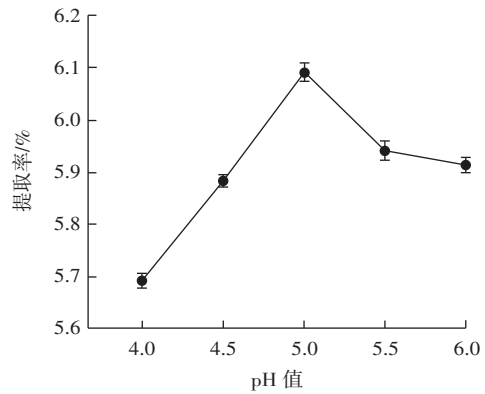


图 3 pH 值对诺丽多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of pH on extraction yield of noni polysaccharides

率达最大值 6.09%。因此, 选择 pH 值条件 4.5、5.0、5.5 进行后续优化试验。

2.1.1.3 提取时间对诺丽多糖提取率的影响

提取时间对诺丽多糖提取率的影响如图 4 所示。

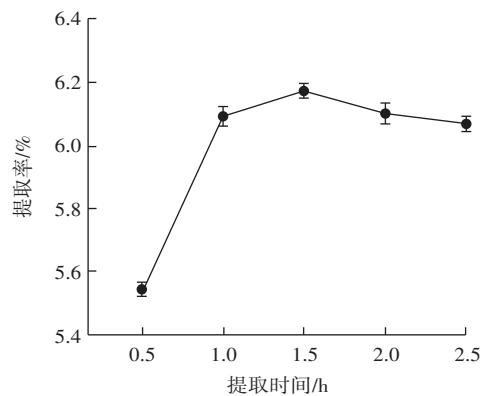


图 4 提取时间对诺丽多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction yield of noni polysaccharides

由图 4 可知, 提取时间为 1.0 h 诺丽多糖的提取率可达 6.08%, 提取时间为 1.5 h 时, 诺丽多糖的提取率提升至 6.21%, 而后随提取时间的延长, 诺丽多糖的提取率缓慢下降。这可能是由于酶解反应时间过长, 提取出的诺丽多糖由于脱离了细胞结构, 游离在溶剂中, 更容易发生氧化分解导致^[24]。故选择提取时间 1.0、1.5、2.0 h 进行后续优化试验。

2.1.1.4 料液比对诺丽多糖提取率的影响

料液比对诺丽多糖提取率的影响如图 5 所示。

由图 5 可知, 当料液比为 1:10 (g/mL) 时, 诺丽多糖提取效果差, 原因可能是溶剂用量过低, 酶分子运动性较差, 不能与底物充分接触, 同时也会降低细胞内外的浓度差, 传质动力降低, 限制化合物从细胞基质移出, 从而降低有效成分的提取率^[25]。当料液比达到 1:40 (g/mL) 时, 诺丽多糖能实现最高的提取率。随着溶剂用量的增加, 提取率不再升高, 可能是

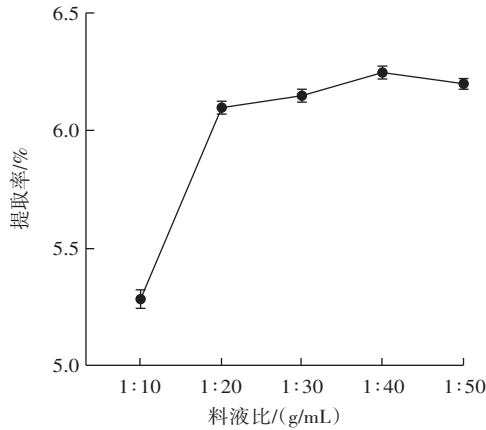


图5 料液比对诺丽多糖提取率的影响

Fig.5 Effect of solid-liquid ratio on extraction yield of noni polysaccharides

因为溶剂用量增大使得溶液中底物与酶的质量浓度下降,有效反应的碰撞减少。因此,选择料液比 1:30、1:40、1:50 (g/mL)进行后续优化试验。

2.1.1.5 复合酶添加量对诺丽多糖提取率的影响

复合酶添加量对诺丽多糖提取率的影响如图 6 所示。

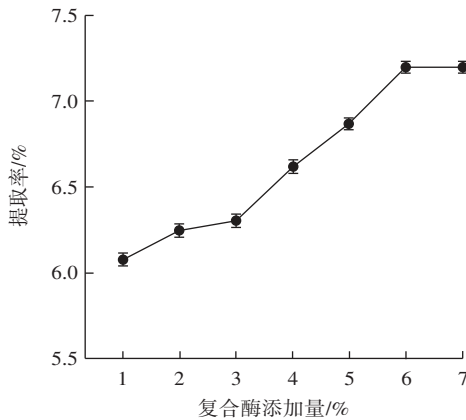


图6 加酶量对诺丽多糖提取率的影响

Fig.6 Effect of amount of enzyme added on extraction yield of noni polysaccharide

由图 6 可知,诺丽多糖提取率随复合酶添加量的增加而增大;当复合酶添加量为 6% 时,诺丽多糖提取率达到最高;当复合酶添加量大于 6% 时,随复合酶添加量的增大诺丽多糖提取率不再升高,说明此时复合酶用量在底物质量浓度一定时达到饱和。因此,选择复合酶添加量为 6% 为最适复合酶添加量。

2.1.2 响应面优化提取工艺试验结果

2.1.2.1 试验设计与结果

根据 Box-Behnken 设计,共进行 29 次优化 4 个单独参数[即 pH 值(A)、提取温度(B)、提取时间(C)、料液比(D)]的试验,结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验方案与结果
Table 2 Design and results of Box-Behnken test

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	-1	-1	0	0	6.622 9
2	1	-1	0	0	6.649 6
3	-1	1	0	0	6.636 0
4	1	1	0	0	7.143 1
5	0	0	-1	-1	6.638 5
6	0	0	1	-1	7.021 7
7	0	0	-1	1	6.731 9
8	0	0	1	1	7.078 4
9	-1	0	0	-1	6.594 3
10	1	0	0	-1	7.162 3
11	-1	0	0	1	6.901 1
12	1	0	0	1	7.027 9
13	0	-1	-1	0	6.294 9
14	0	1	-1	0	6.567 3
15	0	-1	1	0	6.634 9
16	0	1	1	0	6.991 3
17	-1	0	-1	0	6.870 7
18	1	0	-1	0	6.370 1
19	-1	0	1	0	6.544 2
20	1	0	1	0	7.161 7
21	0	-1	0	-1	6.664 7
22	0	1	0	-1	6.748 1
23	0	-1	0	1	6.844 8
24	0	1	0	1	7.155 5
25	0	0	0	0	7.185 7
26	0	0	0	0	7.282 8
27	0	0	0	0	7.237 3
28	0	0	0	0	7.167 6
29	0	0	0	0	7.208 2

采用 Design Expert 对数据进行处理分析,结合表 2,根据多元回归拟合,计算回归系数,获得回归方程模型为 $Y=7.20+0.113 2A+0.126 4B+0.163 2C+0.078 5D+0.123 2AB+0.279 5AC-0.110 3AD+0.021 0BC+0.056 8BD-0.009 2CD-0.186 7A^2-0.278 1B^2-0.288 4C^2-0.074 5D^2$ ($R^2=0.950 7$)。

2.1.2.2 方差分析

回归方差分析结果如表 3 所示。

表 3 方差分析
Table 3 Analysis of variances

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	2.14	14	0.152 9	19.29	<0.000 1	***
A	0.153 7	1	0.153 7	19.38	0.000 6	***
B	0.191 8	1	0.191 8	24.19	0.000 2	***
C	0.319 7	1	0.319 7	40.33	<0.000 1	***
D	0.069 0	1	0.069 0	8.70	0.010 5	*
AB	0.060 7	1	0.060 7	7.66	0.015 1	*
AC	0.312 5	1	0.312 5	39.42	<0.000 1	***
AD	0.048 7	1	0.048 7	6.14	0.026 6	*
BC	0.001 8	1	0.001 8	0.22	0.644 4	ns

续表3 方差分析
Continue table 3 Analysis of variances

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
BD	0.012 0	1	0.012 0	1.63	0.222 6	ns
CD	0.000 3	1	0.000 3	0.04	0.839 7	ns
A ²	0.240 9	1	0.240 9	30.38	<0.000 1	***
B ²	0.523 4	1	0.523 4	66.01	<0.000 1	***
C ²	0.539 7	1	0.539 7	68.07	<0.000 1	***
D ²	0.042 0	1	0.042 0	5.30	0.037 2	*
残差	0.111 0	14	0.007 9			
失拟项	0.102 8	10	0.010 3	4.99	0.067 6	ns
误差	0.008 2	4	0.002 1			
总离度	2.25	28				

注:*表示影响显著, $p < 0.05$;***表示影响高度显著, $p < 0.001$;ns表示无显著性影响。

由表3可知,模型 p 值 < 0.001 ,说明此模型高度显著;失拟项 $p = 0.067 6 > 0.05$ (不显著),表明模型拟合较好,误差较小。因素C、AC、A²、B²、C²的 p 值均小于0.000 1,对诺丽多糖提取率的影响高度显著;因素A、B的 p 值小于0.01,对诺丽多糖提取率的影响极显著;因素D、AB、AD、D²的 p 值均小于0.05,对多糖提取率影响显著;因素BC、BD、CD的 p 值均大于0.05,对结果影响不显著。由 F 值得到4个因素之间的主效应关系依次为提取时间(C)>提取温度(B)>pH值(A)>料液比(D)。

2.1.2.3 响应曲面分析

两个因素之间的相互作用可以通过响应面来表达。图7、图8显示了三维响应面和二维等高线图。

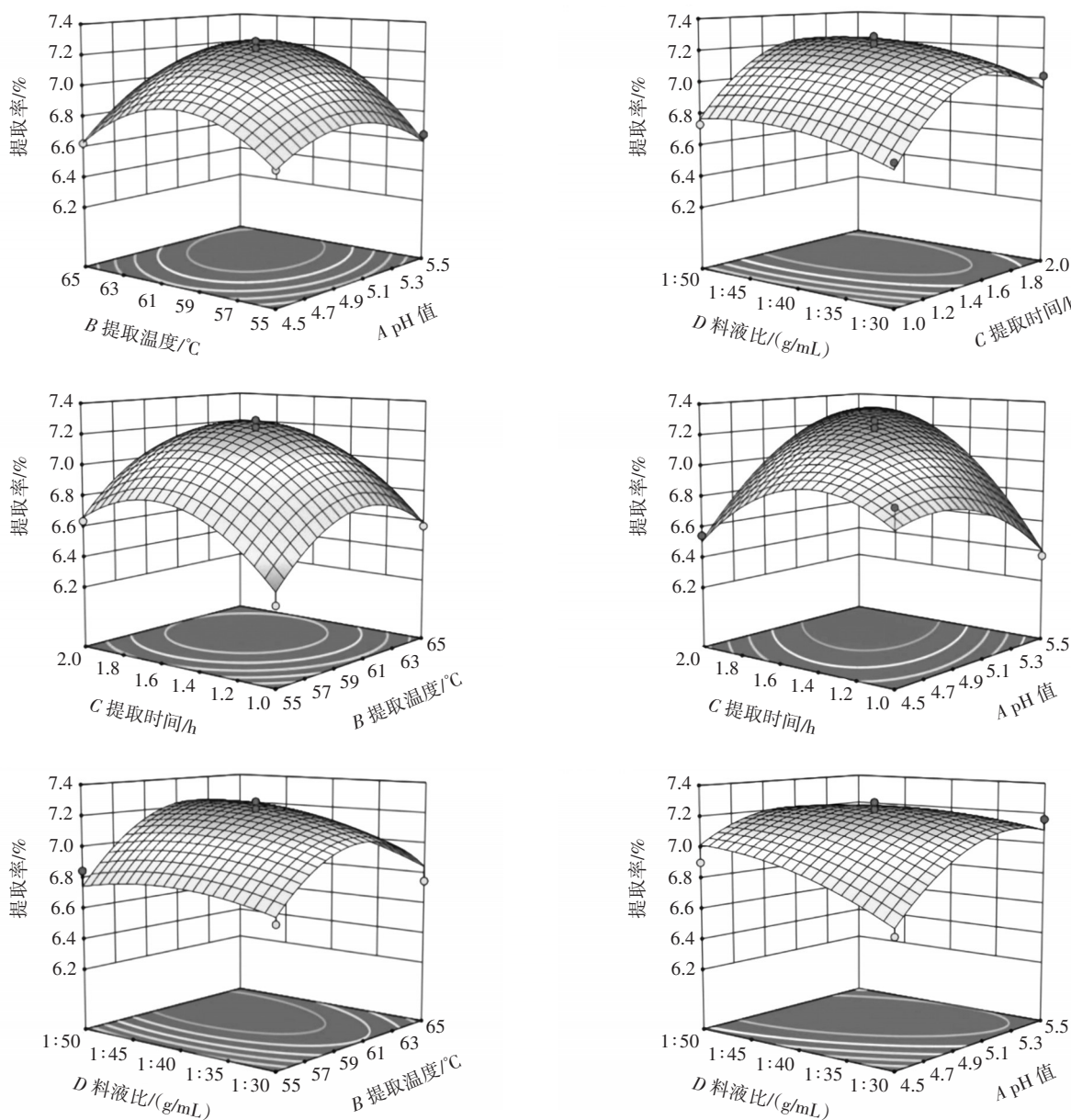


图7 因素交互作用对诺丽多糖提取率影响的三维响应面图

Fig.7 Three-dimensional response surfaces of interaction of factors on extraction yield of noni polysaccharides

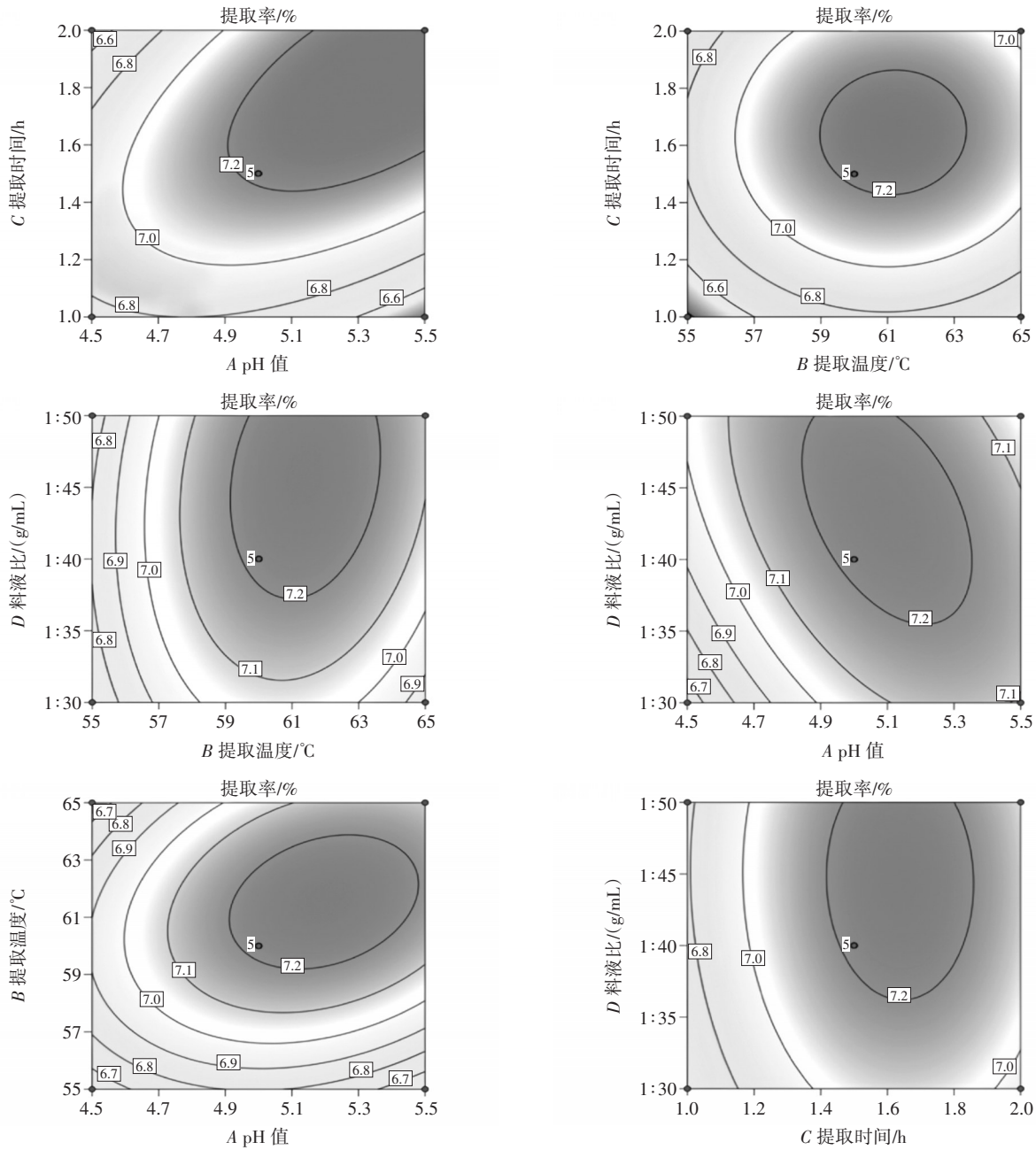


图8 因素交互作用对诺丽多糖提取率影响的等高线图

Fig.8 Contours of interaction of factors on extraction yield of noni polysaccharides

等高线图的形状反映了两个自变量之间的相互作用,三维曲面图可以同时反映两个独立变量对响应值的影响。斜坡越陡峭,等高线越趋于椭圆形,代表两个单因素之间影响越显著;反之,则越不显著。由图7、图8可知,4个因素对应的曲面图中,响应面图最陡峭、等高线图最接近椭圆的是提取时间的变化曲线,其次是提取温度,再者是pH值,最后是料液比。

2.1.3 最佳工艺参数验证试验

经 Design Expert 软件计算预测,诺丽多糖提取最佳工艺参数为提取时间 1.892 h、料液比 1:39.021 (g/mL)、提取温度 62.300 °C、pH5.5。此条件下,二次多项式方

程拟合模型计算所得诺丽多糖提取率为 7.369 7%。考虑到实际情况,将工艺参数作适当调整为提取时间为 1.9 h、料液比 1:39 (g/mL)、提取温度 62 °C、pH5.5。根据此提取工艺参数重复进行 3 次的实际验证试验,此时诺丽多糖提取率为(7.321 7±0.096 0)%。结果表明,该回归模型的参数准确可靠,具有较好的预测性。

2.2 诺丽多糖的光谱分析

2.2.1 紫外光谱分析

诺丽多糖溶液的紫外扫描结果如图9所示。

由图9可知,发现在 280 nm 处有较小的吸收峰,表明可能存在较少的蛋白质。

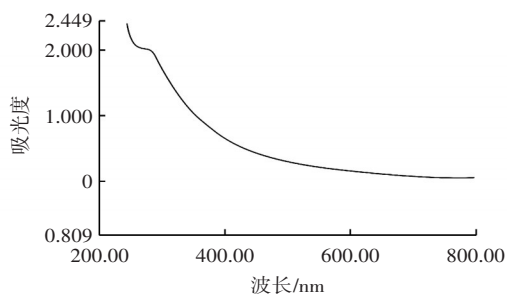


图9 诺丽多糖紫外光谱扫描

Fig.9 UV Spectrum of noni polysaccharides

2.2.2 红外光谱分析

诺丽多糖 4 000~400 cm^{-1} 全波段红外光谱扫描结果如图 10 所示。

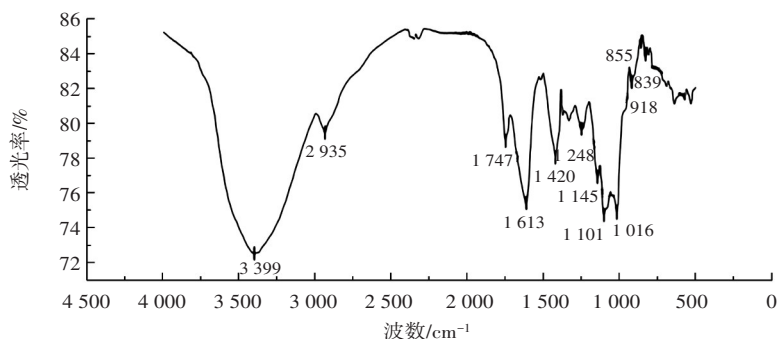


图10 诺丽多糖的红外光谱

Fig.10 Infrared spectrum of noni polysaccharides

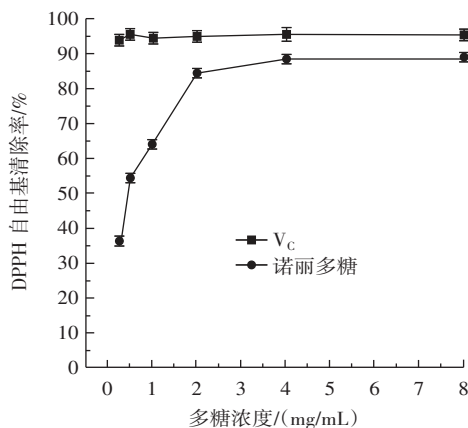
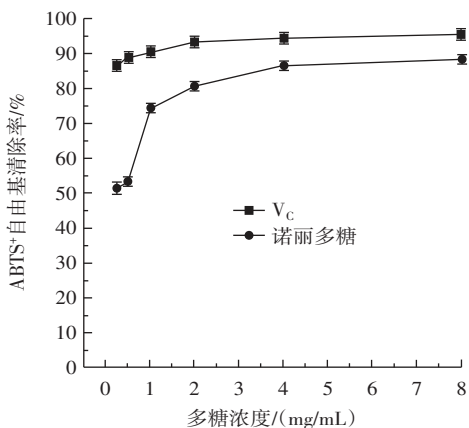
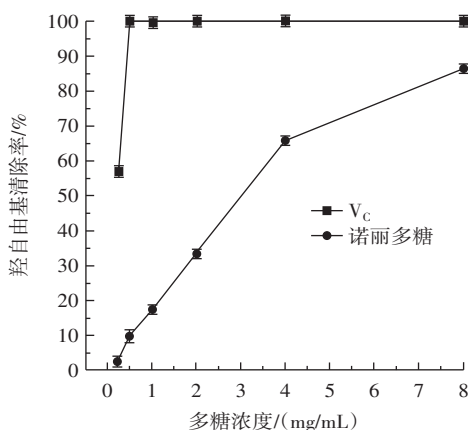
伸缩振动引起的;在 829 cm^{-1} 处的吸收峰是 α -CH 型分子的变角振动的特征吸收峰,表明诺丽多糖中存在 α 构型的糖苷键,存在 α -吡喃糖苷,位于 918 cm^{-1} 附近特征峰说明诺丽多糖含有 β -糖苷键^[29-30]。基于上述结果,诺丽多糖属于酸性多糖,含有吡喃环和 α -糖苷键、 β -糖苷键。

2.3 体外抗氧化活性分析

诺丽多糖的体外抗氧化测定结果如图 11 所示。

由图 11 可知,诺丽多糖浓度在 0.25~4.00 mg/mL 时,对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、超氧阴离子自由基清除率随多糖浓度的增加而升高;当浓度在 4.00~

由图 10 可知,位于 3 399 cm^{-1} 附近强而宽的吸收峰为 O—H 伸缩振动特征峰,说明诺丽多糖中存在分子内氢键或分子间氢键;在 2 935 cm^{-1} 附近的吸收峰为多糖类物质 C—H 伸缩振动所产生的,这是糖类物质的特征吸收峰^[26],其中包括 CH、CH₂、CH₃ 的伸缩和弯曲振动;位于 1 747、1 613 cm^{-1} 的吸收峰分别归属于羧基(—COOH)中 C=O 对称伸缩振动和不对称伸缩振动^[27],1 420 cm^{-1} 附近的吸收峰分别归属于 C=C 伸缩振动,这表明在多糖的主链中存在糖醛酸^[28],说明诺丽多糖是一种酸性多糖;1 248 cm^{-1} 附近的吸收峰可能为 S=O 键的伸缩振动,多糖中含有硫酸根,且吸收峰较小,表明硫酸根含量较低;1 200~1 000 cm^{-1} 附近的吸收峰可能是由于吡喃环上 C—O—C 或 C—O—H 的



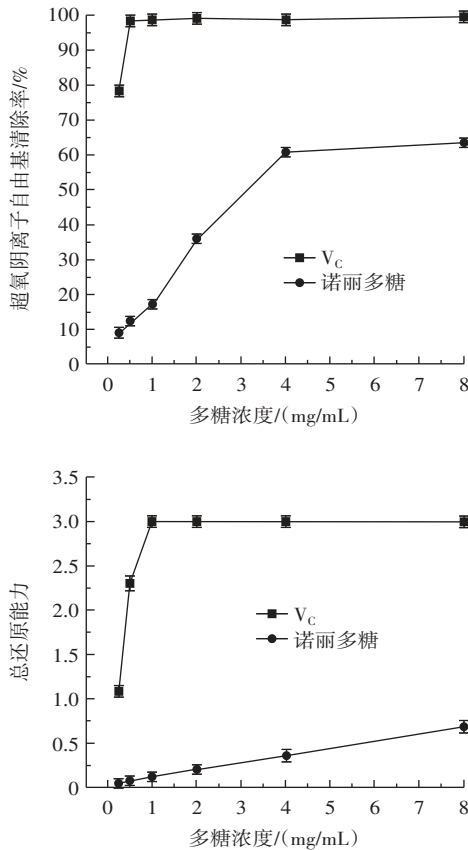


图 11 诺丽多糖的体外抗氧化测定结果

Fig.11 *In vitro* antioxidant assay results of noni polysaccharides

8.00 mg/mL 时,其对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、超氧阴离子自由基清除能力基本保持不变。多糖浓度在 0.25~8.00 mg/mL 时,诺丽多糖对羟自由基的清除率呈逐步上升的趋势,最大可达 86.24%。而与阳性对照 V_c 相比,诺丽多糖清除羟自由基的能力可至同浓度下 V_c 的 90%。多糖浓度在 0.25~8.00 mg/mL 时,诺丽多糖总还原能力不断增强,呈现一定的剂量效应关系。与相同质量浓度的 V_c 相比,诺丽多糖的吸光度较小,说明其总还原能力略低。

3 结论

采用复合酶法提取诺丽多糖,基于单因素试验和响应面试验得到最佳工艺参数为复合酶(木瓜蛋白酶:纤维素酶)质量比 1:1、复合酶添加量 6%、料液比为 1:39 (g/mL)、提取时间 1.9 h、提取温度 62 °C、pH5.5,此时诺丽多糖提取率为(7.321 7±0.096 0)%。紫外光谱和红外光谱扫描显示该多糖中有蛋白质的存在,展示出明显的糖类特征峰,且含有糖醛酸,表明诺丽多糖属于酸性多糖。此工艺下得到的诺丽多糖对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基有较强的清除能力,但在相同浓度下,其抗氧化活性均低于 V_c。

参考文献:

- [1] 杨焱,杨朴丽,徐通. 功能植物诺丽栽培技术研究[J]. 热带农业科技, 2018, 41(2): 28-32.
YANG Yan, YANG Puli, XU Tong. Studies on functional plant of *Morinda citrifolia*[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2018, 41(2): 28-32.
- [2] 许龄方. 诺丽果酒酿造及其风味研究与调控[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
XU Lingfang. Study on brewing technology and flavor control of noni wine[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [3] 田亮,孙碧琪,毛祥飞,等. 不同品种诺丽果发酵前后品质、挥发性风味成分和抗氧化活性比较[J]. 中国酿造, 2023, 42(9): 138-143.
TIAN Liang, SUN Biqi, MAO Xiangfei, et al. Comparison of quality, volatile flavor components and antioxidant activity of different varieties of Noni fruit before and after fermentation[J]. China Brewing, 2023, 42(9): 138-143.
- [4] 胡征波,吴友根,易天凤,等. 50 株诺丽内生真菌抑菌活性的比较及其菌株鉴定[J]. 热带生物学报, 2018, 9(4): 433-439.
HU Zhengbo, WU Yougen, YI Tianfeng, et al. Identification and comparison of microbial inhibition activity of 50 strains of noni endophytic fungi[J]. Journal of Tropical Biology, 2018, 9(4): 433-439.
- [5] SOUSA S G, ALMEIDA OLIVEIRA L, DE AGUIAR MAGALHÃES D, et al. Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from *Morinda citrifolia* Linn (Noni)[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 197: 515-523.
- [6] BATISTA J A, DE AGUIAR MAGALHÃES D, SOUSA S G, et al. Polysaccharides derived from *Morinda citrifolia* Linn reduce inflammatory markers during experimental colitis[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 248: 112303.
- [7] 左丽敏,陆雨,江石平,等. 诺丽多糖的单糖组成分析及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 56-60.
ZUO Limin, LU Yu, JIANG Shiping, et al. Study on monosaccharide compositions analysis and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from Noni[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(17): 56-60.
- [8] YANG X B, MO W J, ZHENG C J, et al. Alleviating effects of noni fruit polysaccharide on hepatic oxidative stress and inflammation in rats under a high-fat diet and its possible mechanisms[J]. Food & Function, 2020, 11(4): 2953-2968.
- [9] 左丽敏. 诺丽多糖的提取纯化和抗氧化及抗肿瘤的活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.
ZUO Limin. Study on extraction and purification of polysaccharide with antioxidant and antitumor activity from *Morinda citrifolia* L.[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2017.
- [10] 晏永球,童应鹏,陆雨,等. 诺丽的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(9): 1888-1905.
YAN Yongqiu, TONG Yingpeng, LU Yu, et al. Research progress on chemical constituents of *Morinda citrifolia* and their pharmacological activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(9): 1888-1905.
- [11] DURAIRAJ B, SRINIVASAHAN V. *In vitro* cytotoxic and apoptotic activity of polysaccharide rich *Morinda citrifolia* fruit on MCF-7 cells[J]. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2015, 8(2): 190-193.
- [12] 张清月. 诺丽果多糖对绒山羊瘤胃发酵、营养物质消化、免疫及抗氧化功能的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
ZHANG Qingyue. Effects of noni fruit polysaccharide on rumen fer-

- mentation, nutrient digestion, immunity and antioxidation in cashmere goats[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [13] 薛丹, 黄豆豆, 黄光辉, 等. 植物多糖提取分离纯化的研究进展[J]. 中药材, 2014, 37(1): 157-161.
XUE Dan, HUANG Doudou, HUANG Guanghui, et al. Research progress on extraction, separation and purification of plant polysaccharides[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2014, 37(1): 157-161.
- [14] 张美霞, 游玉明, 郭瑶. 超声波协同复合酶法提取芦荟凝胶多糖工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(18): 133-140.
ZHANG Meixia, YOU Yuming, GUO Yao. Optimization of extraction of *Aloe* gel polysaccharides by combined ultrasonic treatment and multi-enzyme hydrolysis[J]. Food Research and Development, 2019, 40(18): 133-140.
- [15] 刘迎欣, 伊娟娟, 邵怡雯, 等. 布拉氏酵母发酵山药多糖的分离鉴定与体外生物活性探究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(14): 154-162.
LIU Yingxin, YI Juanjuan, SHAO Yiwen, et al. Isolation, identification and biological activity of fermented Chinese yam polysaccharides by *Saccharomyces boulardii*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(14): 154-162.
- [16] 陈珂, 韩玮钰, 袁亚宏, 等. 雪莲菌富硒条件优化及体外抗氧化活性分析[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(18): 101-107.
CHEN Ke, HAN Weiyu, YUAN Yahong, et al. Optimization of selenium enrichment procedure for Tibetan kefir grains with antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2023, 44(18): 101-107.
- [17] 刘宇, 戴沅霖, 马越, 等. 金银花粗多糖提取工艺优化及其抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2023, 44(7): 188-196.
LIU Yu, DAI Yuanlin, MA Yue, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity evaluation of crude polysaccharides from *Lonicera japonica*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(7): 188-196.
- [18] 范三红, 贾槐旺, 张锦华, 等. 羊肚菌多糖纯化、结构分析及抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 65-71.
FAN Sanhong, JIA Huaiwang, ZHANG Jinhua, et al. Purification, structural analysis and antioxidant activity of polysaccharides from *Morchella esculenta*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(3): 65-71.
- [19] 李卫, 房雷雷, 张彦青, 等. 桔梗多糖的复合酶提取、结构表征及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(18): 283-291.
LI Wei, FANG Leilei, ZHANG Yanqing, et al. Compound enzyme extraction of platycodon grandiflorum polysaccharides and its structure and antioxidant activity characterization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(18): 283-291.
- [20] CHEN H G, ZHOU X, ZHANG J Z. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111: 567-575.
- [21] CHEN F J, XU Y L, DING N N, et al. Extraction of *Radix trichosanthis* polysaccharides for potential antihyperlipidemic application[J]. BioMed Research International, 2022, 2022: 3811036.
- [22] CHEN X Y, JI H Y, ZHANG C F, et al. Optimization of extraction process from *Taraxacum officinale* polysaccharide and its purification, structural characterization, antioxidant and anti-tumor activity[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 14(1): 194-206.
- [23] 鲍青云. 酶法制备泡叶藻聚糖具免疫诱导活性低分子量多糖的研究[D]. 厦门: 集美大学, 2018.
BAO Qingyun. Study on immuno-stimulating activities of low molecule weight polysaccharide fractions prepared from ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum*[D]. Xiamen: Jimei University, 2018.
- [24] 向丽. 复合酶提取桔梗多糖及其抗氧化活性研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2021.
XIANG Li. Researches on the extraction and antioxidant activity of glycoprotein from *Platycodon grandiflorum*[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2021.
- [25] CHAN C H, YUSOFF R, NGOH G C, et al. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(37): 6213-6225.
- [26] XU X J, CHEN P, WANG Y, et al. Chain conformation and rheological behavior of an extracellular heteropolysaccharide *Erwinia* gum in aqueous solution[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(1): 113-119.
- [27] CAI L L, ZOU S S, LIANG D P, et al. Structural characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Sophora tonkinensis* Radix[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 184: 354-365.
- [28] LIU B, SHANG Z Z, LI Q M, et al. Structural features and anti-gastric cancer activity of polysaccharides from stem, root, leaf and flower of cultivated *Dendrobium huoshanense*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 651-664.
- [29] KUANG H X, XIA Y G, LIANG J, et al. Structural characteristics of a hyperbranched acidic polysaccharide from the stems of *Ephedra sinica* and its effect on T-cell subsets and their cytokines in DTH mice[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(4): 1705-1711.
- [30] TIAN W T, ZHANG X W, LIU H P, et al. Structural characterization of an acid polysaccharide from *Pinellia ternata* and its induction effect on apoptosis of HepG2 cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 153: 451-460.