

基于酶解法的青萝卜多糖提取工艺优化及抗氧化活性分析

田伟娜¹, 庄苗苗¹, 励建荣¹, 马文婷¹, 林然¹, 谭卓弘¹, 俞张富², 沈荣虎², 耿兄^{1*}

(1. 渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁锦州 121013) (2. 杭州萧山农业发展有限公司, 浙江杭州 310000)

摘要: 为确定青萝卜多糖 (Green Radish Polysaccharides, GRP) 的最佳提取工艺, 以酶活力、酶解温度、酶解时间和料液比为因素, GRP 提取得率为指标, 单因素试验的基础上, 通过响应面法确定 GRP 提取的最佳工艺为: 酶活力为 285 U/g、酶解温度 48 ℃、酶解时间 59 min、料液比 1:21, 在该条件下 GRP 提取得率平均值为 5.34%。GRP 主要由 10 种单糖组成, 其摩尔比为甘露糖:核糖:鼠李糖:葡萄糖醛酸:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖:岩藻糖=0.827:0.365:1.216:1.519:2.853:66.215:17.425:0.295:8.713:0.574。GRP 具有较好的抗氧化能力, 其清除 2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸) [2,2'-Azidobis (3-Ethylbenzo Dihydrothiazoline-6-Sulfonic), ABTS] 自由基、羟基 (Oxhydryl, ·OH) 自由基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-Trinitrophenylhydrazine, DPPH) 自由基的清除率分别为 91.14%、85.31%、62.73%, 半抑制质量浓度 (Half Maximal Inhibitory Concentration, IC₅₀) 分别为 10.78、8.42 和 17.40 mg/mL。该研究确定了提取 GRP 的最佳工艺, 明确了其单糖组成及结构, 明确了其具有良好的抗氧化活性, 为青萝卜多糖生理活性的进一步研究与保健食品开发提供借鉴和参考。

关键词: 青萝卜; 多糖; 提取工艺; 响应面; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2025)03-143-153

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.1548

Extraction Process Optimization and Antioxidant Activity Analysis of Green Radish Polysaccharide Based on Enzymatic Hydrolysis

TIAN Weina¹, ZHUANG Miaomiao¹, LI Jianrong¹, MA Wenting¹, LIN Ran¹, TAN Zhuohong¹, YU Zhangfu², SHEN Ronghu², GENG Xiong^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Bo Hai University, Jinzhou 121013, China)

(2. Hangzhou Xiaoshan Agricultural Development Co. Ltd., Hangzhou 310000, China)

Abstract: The extraction process for green radish polysaccharide (GRP) was optimized to improve the extraction yield of GRP by varying the enzyme activity, enzymatic hydrolysis time and temperature, and solid-solvent ratio in single-factor experiments using response surface methodology. The optimal GRP extraction process involved an enzyme activity of 285 U/g, an enzymatic hydrolysis temperature of 48 ℃, an enzymatic hydrolysis time of 59 min, and a solid-solvent ratio of 1:21.

引文格式:

田伟娜, 庄苗苗, 励建荣, 等. 基于酶解法的青萝卜多糖提取工艺优化及抗氧化活性分析 [J]. 现代食品科技, 2025, 41(3): 143-153.

TIAN Weina, ZHUANG Miaomiao, LI Jianrong, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity analysis of green radish polysaccharide based on enzymatic hydrolysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 143-153.

收稿日期: 2023-12-25

基金项目: 渤海大学校级科研项目 (0522xn050)

作者简介: 田伟娜 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 1027050919@qq.com

通讯作者: 耿兄 (1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 18748135846@163.com

The average yield of GRP extracted using this process was 5.34%. GRP was composed primarily of ten monosaccharides with a molar ratio of mannose:ribose:rhamnose:glucuronic acid:galacturonic acid:glucose:galactose:xylose:arabinose:fucose=0.827:0.365:1.216:1.519:2.853:66.215:17.425:0.295:8.713:0.574. Additionally, GRP presented excellent antioxidant capacity, and its scavenging rates for 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radical, hydroxyl radical, and 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine radical were 91.14%, 85.31%, and 62.73%, respectively, with half-maximal inhibitory concentrations of 10.78, 8.42, and 17.40 mg/mL, respectively. The optimal GRP extraction process, monosaccharide composition and structure of GPR, and excellent antioxidant activity of GPR were determined, providing a reference for further research on the physiological activity of GRP and development of relevant health food.

Key words: green radish; polysaccharide; extraction process; response surface; antioxidant

萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 是十字花科萝卜属作物, 又名莱菔、芦菔, 为 1 或 2 年生草本。其根部呈现长圆、圆锥或球形的状态, 根皮绿、白、红、粉红或紫色, 是我国重要的根菜之一^[1]。常见的萝卜种类有青萝卜、白萝卜和红萝卜等。根据联合国粮食及农业组织 (The Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 报告, 2021 年平均收获了 1 096 万 hm^2 的萝卜, 平均产量为 4 166.7 万 t, 其中中国大陆产量位居第一^[2]。根据 2020 年中国统计年鉴, 中国的萝卜种植面积达 133.2 万 hm^2 (约 2 000 万亩), 产量约 4 500 万 t, 占蔬菜总产量的 5.6%^[3]。

青萝卜叶子深绿, 根部为青绿色, 属于生食品种, 也称水果萝卜, 除了生食, 还可干制、做汤、盐渍和腌泡菜等。青萝卜皮薄肉细、高糖多汁、色泽翠绿、口感脆嫩, 深受大众喜爱^[4,5]。青萝卜种植历史悠久, 富含各种营养物质, 而且还有祛痰、利尿、止泻等药用价值^[6-8]。随着农业种植结构调整和人民生活品质要求的提高, 我国青萝卜生产面临着新的发展机遇, 营养价值高、品质性状优良、可供鲜食的品种越来越受到民众的欢迎。但是, 长期以来生产上比较重视采前的栽培, 病虫害防治, 却忽视采后的各项工作, 致使青萝卜在采后流通过程中的损失相当严重, 相当一部分产品不分级、不包装, 甚至成筐论堆摆地摊销售, 损耗严重, 且影响商品品质和价格。限制了生产规模的扩大, 成为制约青萝卜产业化发展的瓶颈^[9]。

随着各交叉学科的不断进步和发展, 人们不断地挖掘萝卜类多糖的生物活性, 现国内外研究已经证实了白萝卜、心里美萝卜和胡萝卜多糖具有抗肥胖、抗肿瘤转移、调节肠道菌群、降血糖、抗炎、抗氧化、抗癌、保护肝损伤及其他功能等多种生物活性功能^[10]。萝卜的品种、环境、种植技术、采收

时间、提取纯化工艺等多种因素会使得多糖的含量、化学结构、平均相对分子质量、单糖组成等存在一定的差异, 从而具有不同的生物活性功能。尚未有关于青萝卜多糖的提取工艺、单糖组成、形态结构和抗氧化活性研究的相关报道。

目前应用于萝卜及胡萝卜多糖的提取方法主要有水浸提法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法、酶-微波辅助萃取法和低压提取法等。纤维素酶提取是通过纤维素酶解细胞壁, 促使多糖成分流出。与传统多糖提取方法相比, 酶解法提取条件温和, 生物活性的完整度好, 提取效率高且具环境友好性, 是一种高效绿色提取技术^[11]。因此本研究采用纤维素酶在实验优化条件下提取青萝卜多糖, 分析其结构特征, 并对单糖组成做定性、定量以及抗氧化活性分析, 为青萝卜在功能性食品和新药资源领域的高值化利用提供数据支持, 促进青萝卜产业发展。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

青萝卜购自锦州市凌西大街农贸市场; 福林-酚试剂、碳酸钠、无水乙醇、纤维素酶 (1 万 U/g)、苯酚、无水葡萄糖、水杨酸、邻苯三酚、DPPH、ABTS、硫酸亚铁、没食子酸标准品 (分析纯), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 浓硫酸、三氯甲烷、过氧化氢、甲醇 (分析纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 普鲁兰多糖, 日本 shodex 公司。

单糖组成测定标准品: 葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖、鼠李糖、半乳糖、岩藻糖 (分析纯)、葡聚糖标准品 (分子量 40、70、110、500、2 000、2 400、3 700、5 300 ku) (分析纯), 美国 Sigma 公司。

1.2 主要仪器与设备

FW177 粉碎机, 天津泰斯特仪器有限公司;

UV-2550 紫外-可见分光光度计, 日本株式会社岛津制作所; RE-52AA 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; Scientz-10N 真空冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Biofuge Stratos 冷冻高速离心机, 美国赛默飞世尔科技公司; SHB-IIIIG 循环水式多用真空泵, 郑州世纪双科实验仪器有限公司; SG2-ELK 便携式 pH 计, 梅特勒托利多科技(中国)有限公司; LC-20AD 高效液相色谱仪, 岛津企业管理(中国)有限公司; iS50 红外光谱仪, 美国尼高利仪器公司; GPC-20A 凝胶渗透色谱仪, 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 GRP 的制备

青萝卜清洗干净后, 30 °C 烘干至恒重, 粉碎, 过筛(40 目), 精确称样品(5 g), 加 5 倍无水乙醇 50 °C 水浴 8 h 除色素, 纱布过滤弃上清, 滤渣按照一定的固液比与蒸馏水混合, 加入纤维素酶, 调节 pH 值至 7.0, 在一定温度条件下提取 GRP, 95 °C 灭酶 10 min, 再经过抽滤得到滤液, 醇沉, 离心收集沉淀, 加水复溶, 离心取上清, 冷冻干燥得粗多糖^[12,13]。

1.3.2 多糖的纯化及提取率的测定

Sevage 法除蛋白: 配制质量浓度为 1 mg/mL 的粗多糖, 按照 $V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{粗多糖}}=1:5:25$ 的比例加入 Sevage 试剂, 振荡 20 min 后离心 15 min (4 500 r/min) 取上清, 重复 3 次直至无蛋白质层出现, 旋蒸浓缩, 醇沉, 冷冻干燥即得 GRP。

以葡萄糖质量浓度 (x , mg/mL) 为横坐标, 其 490 nm 处吸光度 (y) 为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归曲线为 $y=12.934x+0.0011$; $R^2=0.9943$ 。苯酚-硫酸法^[14]: 精密称取 6.0 g 重蒸苯酚, 置于棕色容量瓶(100 mL)中, 用蒸馏水定容, 配制苯酚溶液备用。移取多糖溶液 1.0 mL 于 25 mL 试管中, 加入 6% 苯酚溶液 0.3 mL, 搅拌后马上加入 2.5 mL 浓硫酸, 摇匀后沸水浴中显色 20 min, 取出后置于冰水中冷却 10 min, 紫外可见分光光度计测吸光度。计算如下:

$$Y = V \times \frac{C \times D}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y —多糖提取率, %;

V —样品体积, mL;

C —多糖质量浓度, g/mL;

D —稀释倍数;

M —样品质量, g。

1.3.3 单因素试验

本试验主要探索水溶性多糖, 为了获得更高的多糖提取率, 在单因素试验之前比较 50 °C 热水提取、50 °C 超声提取、50 °C 纤维素酶提取、50 °C 纤维素酶-超声提取 4 种提取方法。单因素试验条件为: 酶活力 100~500 U/g、酶解温度 30~70 °C、酶解时间 40~80 min、料液比 1:10~1:30。

1.3.4 Box-Behnken 试验设计及响应面分析

在上述单因素试验条件的基础上, 以酶活力、酶解温度、酶解时间、料液比为单因素, 以多糖质量分数为响应值, 进行 Box-Behnken 响应面试验设计, 优化 GRP 提取工艺条件。因素水平见表 1。

表 1 试验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of test design

水平	因素			
	A 酶活力 (U/g)	B 酶解温度 /°C	C 酶解时间 /min	D 料液比 (g/mL)
-1	100	30	40	1:10
0	300	50	60	1:20
1	500	70	80	1:30

1.3.5 GRP 的分子量及化学组成测定

分子量测定泵: 日本 Shimadzu (岛津) 公司 LC20 高效液相色谱泵; 检测器: 日本 Shimadzu (岛津) 公司 RID-20A 示差折光检测器; 凝胶色谱柱: 日本 TOSOH (TSK 东曹) 公司 TSKgel GMPWXL 水相凝胶色谱柱; 进样器: 美国 Rheodyne 7725i 手动六通阀进样器(定量环 20 μ L); 工作站: HW-2000 GPC 色谱工作站; 流动相: 0.1 N NaNO_3 +0.06% NaN_3 水溶液; 标准样品: 窄分部普鲁兰多糖; 流动相流速: 0.6 mL/min; 测试柱温: 35 °C; 方法: 凝胶渗透色谱法 (Gel Permeation Chromatography, GPC) 和尺寸排阻色谱法 (Size Exclusion Chromatography, SEC) 相结合。采用苯酚硫酸法^[14]、考马斯亮蓝法^[15]及福林-酚法^[16]测定 GRP 的总糖、蛋白及总酚含量。

1.3.6 单糖的组成分析

标准品的制备: 参考林冰洁等^[17]的方法, 称取适量标准品, 加水溶解为混合对照溶液 (50 μ g/mL), 精确吸取 0.25 mL 对照溶液移至 5 mL 试管中, 加入 0.25 mL NaOH (0.6 mol/L) 和 0.5 mL PMP-甲醇 (0.4 mol/L), 70 °C 下反应 1 h。待试管冷却 10 min 后, 向试管中加入 0.5 mL HCl (0.3 mol/L)

中和, 再加入 1 mL 三氯甲烷漩涡 1 min, 最后离心 10 min (3 000 r/min) 取上清液, 合并 3 次获得的上清测 HPLC。

待测样品水解: 称取试样移至安培瓶 (10 mL) 中, 再加入 3 mL TFA (2 mol/L), 然后充氮, 再封管, 在 120 °C 下酸解 4 h。最后取出后加入甲醇氮吹干 TFA, 加 3.0 mL 水溶解。

样品溶液衍生: 将上述标准品混合对照溶液替换为样品溶液, 重复上述操作, 取上清液即得。

HPLC 测试条件如下: 色谱柱: Xtimate C18 4.6 mm × 200 mm 5 μm; 柱温: 30 °C; 流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 250 nm; 进样量: 20 μL; 流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用 NaOH 溶液调 pH 值为 6.70) - 乙腈, 体积比为 83:17。

1.3.7 GRP 的傅里叶红外光谱分析

取 1 mg 干燥的多糖粉末和 180 mg 的 KBr, 将混合试样研磨后制成透明的压片, 采用傅里叶变换红外光谱仪 (Fourier Transform Infrared, FT-IR) 在 4 000~500 cm⁻¹ 的波长范围内, 对 GRP 进行红外光谱扫描分析^[18]。

1.4 GRP 的体外抗氧化活性测定

1.4.1 ABTS⁺ 自由基清除能力的测定

参考杨宗美等^[19]的检测方法配制 ABTS⁺ 自由基溶液。分别配制质量浓度为 5、10、15、20、25、30 mg/mL 的 GRP 溶液, 吸取各质量浓度样品溶液 100 μL 于试管中, 加入 3 mL ABTS⁺ 试剂振摇后室温避光反应 30 min, 于 750 nm 处测得吸光度为 A_b ; 用水代替多糖溶液, 其他不变为 A_0 ; 用水代替 ABTS⁺ 试剂, 其他不变为 A_s , 以 Vc 为对照, 各样品测 3 次后取平均值。计算公式如下:

$$Y_{A1} = \left(1 - \frac{A_b \times A_s}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

Y_{A1} ——ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_b ——样品溶液加入 ABTS⁺ 试剂, 测得吸光度;

A_s ——用水代替样品溶液, 测得吸光度;

A_0 ——用水代替 ABTS⁺ 试剂, 测得吸光度。

1.4.2 羟基自由基 (·OH) 清除能力的测定

参考孙玉军等^[20]的检测方法分别配制质量浓度为 5、10、15、20、25、30 mg/mL 的 GRP 溶液, 取各质量浓度样品溶液 1 mL, 分别加入 H₂O₂ 溶液

(8.8 mmol/L)、FeSO₄ 溶液 (9 mmol/L) 和水杨酸 - 乙醇溶液 (9 mmol/L) 各 2 mL, 最后用蒸馏水定容至 10 mL, 37 °C 恒温水浴反应 30 min, 于 510 nm 处测得吸光度为 A_x ; 用水代替多糖溶液, 其他不变为 A_0 ; 用水代替 H₂O₂ 溶液, 其他不变为 A_{x0} , 以 Vc 为对照, 各样品测 3 次后取平均值。计算公式如下:

$$Y_{A2} = \left(A_0 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

Y_{A2} ——·OH 清除率, %;

A_x ——样品溶液与 H₂O₂ 溶液、FeSO₄ 溶液和水杨酸 - 乙醇溶液, 测得吸光度;

A_0 ——用水代替样品溶液, 其他不变测得吸光度;

A_{x0} ——用水代替 H₂O₂ 溶液, 其他不变测得吸光度。

1.4.3 DPPH 自由基清除能力的测定

参考杨申明等^[21]的检测方法分别配制质量浓度为 5、10、15、20、25、30 mg/mL 的 GRP 溶液, 取不同质量浓度样品溶液 1 mL, 分别加入 2.5 mL DPPH-乙醇溶液 (2 × 10⁻⁴ mol/L), 室温避光反应 30 min, 于 517 nm 处测得吸光度 A_1 ; 将样品溶液替换为无水乙醇测定吸光度为 A_3 ; 将 DPPH-乙醇溶液替换为无水乙醇测得吸光度为 A_2 , 以 Vc 为对照, 各样品测 3 次后取平均值, 以下为计算公式:

$$Y_{A3} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

Y_{A3} ——DPPH 自由基清除率, %;

A_1 ——样品溶液与 DPPH-乙醇溶液, 测得吸光度;

A_2 ——无水乙醇与 DPPH-乙醇溶液, 测得吸光度;

A_3 ——样品溶液与无水乙醇, 测得吸光度。

1.5 统计分析

所有数据均重复测定 3 次, 所有数据以平均值 ± 标准差; 采用 Design Expert 13 软件进行工艺参数优化; 采用 SPSS 软件进行数据统计分析; Origin 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 提取方法的建立

不同提取方法对 GRP 的影响见图 1。由图 1 可知, 首次提取时, 纤维素酶提取方法明显高于其他提取方法, 且纤维素酶提取 > 纤维素酶 - 超声提取 > 超声提取 > 热水提取。水浸提法提取简单但耗时

长, 提取温度对多糖的影响过大。与传统热水提取法相比, 超声波辅助提取法能极大缩短提取时间、提高提取效率, 但功率过高会破坏萝卜多糖的结构。纤维素酶-超声法所得多糖得率低于纤维素酶法, 而且超声法可能会降解可溶性多糖并改变青萝卜多糖的生物活性。酶技术近年来广泛应用到有效成份提取中, 在多糖的提取过程中, 酶可降低提取条件, 在比较温和的条件中分解植物组织, 加速多糖的释放或提取, 纤维素是青萝卜细胞壁的主要成分, 亦是胞内多糖等大分子溶出的主要屏障, 利用纤维素酶水解细胞壁, 更加有利于胞内成分溶出, 此外, 第二次提取时每种方法提取量均比较少。因此, 综合时间成本、节约资源和条件温和考虑, 本试验选用纤维素酶提取方法并仅提取 1 次。

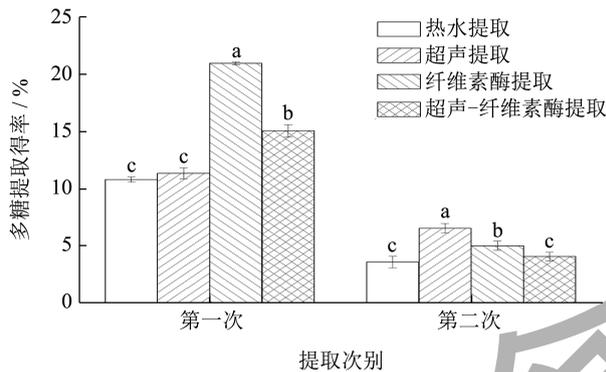


图 1 不同提取方法对 GRP 的影响

Fig.1 Effects of different extraction methods on GRP

2.2 单因素试验结果

2.2.1 酶活力对 GRP 提取的影响

固定酶解温度 50 °C, 料液比 1:10, 酶解时间 60 min, 设置酶活力为 100~500 U/g, 考察酶活力对 GRP 提取的影响。在 100~300 U/g 阶段, GRP 与酶活力成正比, 当酶活力到 300 U/g, 此时 GRP 提取率最大; 之后再增加酶活力, GRP 反而呈降低趋势 (图 2a), 是因为此阶段酶活力对 GRP 的主要影响因素是底物的量, 此时酶已达饱和状态, 没有多余的底物有与纤维素酶反应的机会, 若酶活力过高, 也会抑制酶反应。因此, 最适酶的活力为 300 U/g。

2.2.2 酶解温度对 GRP 提取的影响

酶活力单位 300 U/g, 酶解时间 60 min, 固定料液比 1:10, 设置酶解温度为 30~70 °C, 考察温度对 GRP 提取的影响。在 30~50 °C 阶段, GRP 与酶解温度成正比, 随其升高而缓慢增加; 当酶解温度

超过 50 °C 时, GRP 呈快速下降趋势 (图 2b), 是因为酶是具有最适反应温度范围的物质, 温度超过一定范围会使酶失活, 从而酶解效果被抑制。因此, 确定最适温度为 50 °C。

2.2.3 酶解时间对 GRP 提取的影响

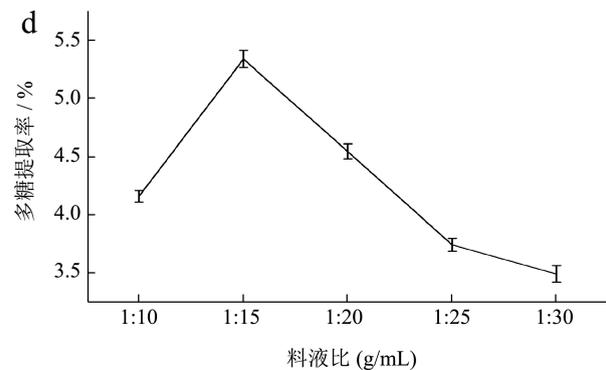
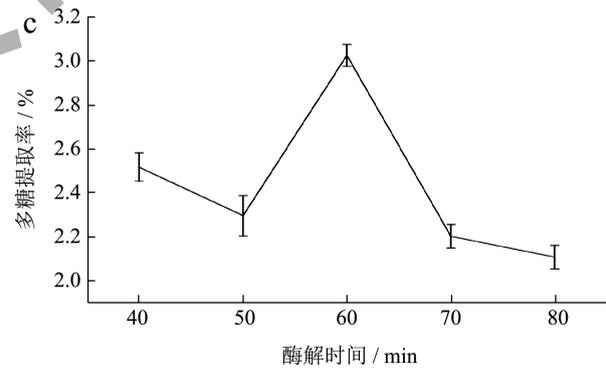
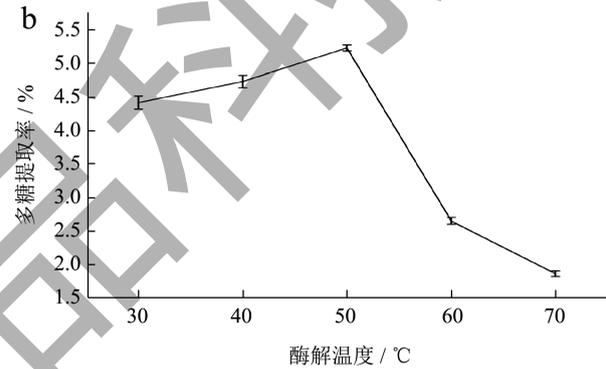
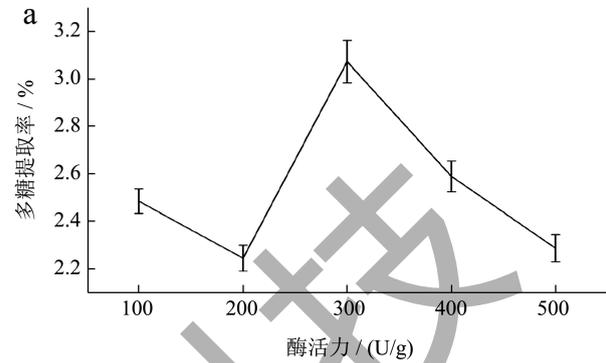


图 2 不同因素对 GRP 提取的影响

Fig.2 Effect of different factors on the extraction of GRP

固定酶解温度 50 ℃，料液比 1:10，酶活力单位 300 U/g，设置酶解时间为 40~80 min，考察时间对 GRP 提取的影响。随着增加酶解时间，GRP 也随之增加，酶解时间达 60 min 时 GRP 达到最大；超过 60 min 后下降（图 2c）可能由于反应达 60 min 时，通过酶解作用已最大限度地溶出多糖，随着时间增加，酶的催化活性开始降低。因此，确定最适酶解时间为 60 min。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

序号	A 酶活力/(U/g)	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/min	D 料液比 (g/mL)	Y GRP 提取得率/%
1	-1	0	-1	0	4.28
2	-1	0	0	1	4.31
3	0	0	-1	1	4.63
4	0	0	0	0	5.41
5	0	0	0	0	5.44
6	0	0	0	0	5.43
7	-1	1	0	0	2.65
8	0	-1	1	0	3.49
9	0	0	-1	-1	4.35
10	0	-1	0	-1	3.52
11	-1	0	1	0	4.03
12	0	0	1	1	4.55
13	1	-1	0	0	3.02
14	0	-1	-1	0	3.58
15	0	-1	0	1	3.44
16	1	1	0	0	2.31
17	-1	0	0	-1	4.19
18	0	1	-1	0	2.77
19	1	0	-1	0	3.98
20	0	1	0	1	2.86
21	0	0	1	-1	4.23
22	1	0	0	1	4.02
23	1	0	0	-1	3.94
24	0	1	0	-1	2.73
25	0	0	0	0	5.28
26	0	1	1	0	2.61
27	-1	-1	0	0	3.30
28	1	0	1	0	3.85
29	0	0	0	0	5.43

表 3 方差分析表

Table 3 The table of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2 412.68	14	172.33	261.05	<0.000 1	**
A-酶活力	22.44	1	22.44	33.99	<0.000 1	**
B-酶解温度	163.39	1	163.39	247.5	<0.000 1	**
C-酶解时间	5.77	1	5.77	8.74	0.010 4	*
D-料液比	5.98	1	5.98	9.06	0.009 4	*
AB	0.065	1	0.065	0.098 5	0.758 3	
AC	0.313 6	1	0.313 6	0.475	0.501 9	
AD	0.025 6	1	0.025 6	0.038 8	0.846 7	
BC	0.126	1	0.126	0.190 9	0.668 8	
BD	1.17	1	1.17	1.77	0.205	
CD	0.055 2	1	0.055 2	0.0837	0.776 6	
A ²	441.43	1	441.43	668.67	<0.000 1	**
B ²	2 044.4	1	2 044.4	3 096.77	<0.000 1	**
C ²	172.26	1	172.26	260.93	<0.000 1	**
D ²	139.32	1	139.32	211.04	<0.000 1	**
残缺	9.24	14	0.660 2			
失拟项	7.44	10	0.744 1	1.65	0.332 2	
纯误差	1.8	4	0.450 4			
总和	2 421.92	28				

注：* 差异显著 ($P < 0.05$)；** 差异极显著 ($P < 0.001$)。

2.2.4 料液比对 GRP 提取的影响

酶解温度 50 ℃，酶解时间 60 min，设置料液比为 1:10~1:30 (g/mL)，固定酶活力单位为 300 U/g，考察料液比对 GRP 提取的影响。料液比为 1:10~1:15 阶段时，GRP 随着料液比的增加而升高，当料液比高于 1:15 时，多糖提取率开始减少（图 2d）。当料液比较低时，黏度高的样品溶液不利于扩散多糖，使多糖析出不完全；料液比过高时，稀释了酶质量浓度，使酶和样品反应不足，从而降低了多糖提取率。因此综合多种因素考虑，最适料液比为 1:15。

2.3 响应面试验结果分析

2.3.1 试验结果与模型建立

响应面试验设计与结果见表 2，方差分析见表 3。Design Expert 13 软件对以上 29 个试验的响应值进行多元回归分析，得到以 GRP 提取得率为响应值的回归方程为： $Y=54.00-1.37A-3.69B-0.693 3C-0.705 8D-0.127 5AB+0.28AC-0.08AD-0.177 5BC$

$$+0.54BD+0.1175CD-8.25A^2-17.75B^2-5.15C^2-4.63D^2.$$

由表3可见,对模型方程进行显著性检验,回归模型极显著($P < 0.0001$),失拟项($P = 0.3322$)不显著, $R^2 = 0.9962$ 表明试验值与预测值之间的差异很小, $R_{adj}^2 = 0.9924$ 进一步证实这一结论,表明模型与试验值拟合良好,试验方法可信度高,该模型可以准确的预测和分析GRP。另外4个自变量对响应值的影响程度大小依次为酶解温度(B) > 酶活力(A) > 料液比(D) > 酶解时间(C),其中因素A、B、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对GRP提取影响极显著($P < 0.0001$),因素C、D的影响显著($P < 0.05$),AB、AC、AD、BC、BD、CD的交互作用对响应值的影响不显著($P > 0.05$)。

2.3.2 响应面分析

提取条件对多糖提取率的影响程度通过响应面图中曲面的陡峭程度来表示,曲面陡峭表示影响大,反之小;等高线图是表明各实验条件间交互作用的强弱关系,圆形表明交互作用不显著,椭圆形表明交互作用显著^[22]。综合对比6组响应面图与等高线图,任何两个因素交互作用的响应面都存在最高点,其中酶解温度和料液比的交互作用影响最为显著,酶解时间和料液比的交互作用(图3)对GRP影响不显著(等高线图为圆形),故改变酶解温度与料液比对GRP影响较大。

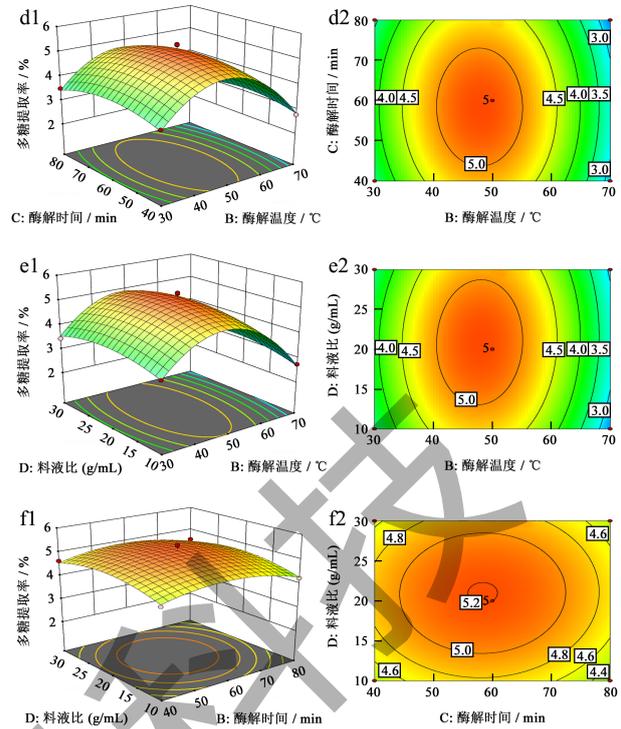
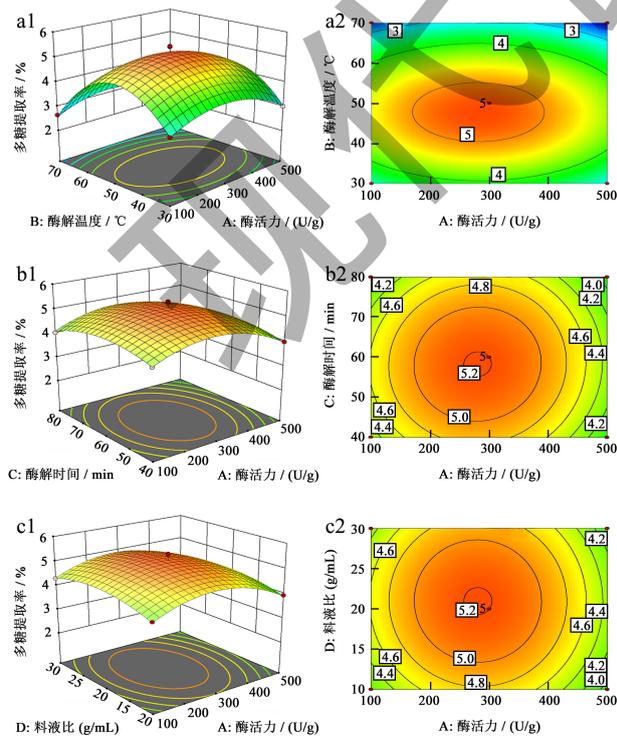


图3 各因素相互作用对GRP提取影响的响应面图和等高线图

Fig.3 Response surface model plot and contour maps showing the effect of interaction between factors on the extraction yield of GRP

2.3.3 验证预测模型

利用Design-Expert 13软件,得到GRP提取最佳工艺为酶活力单位为283 U/g,酶解温度为47.945℃,酶解时间为58.659 min,料液比为1:20.702,多糖提取率的预测得率为5.43%。为了操作方便,修正为酶活力单位为285 U/g,料液比为1:21,酶解温度为48℃,酶解时间为59 min,随后进行验证试验(3次平行),测得GRP提取率为5.34%,与理论预测值误差为0.09%。表明所得模型可以对GRP提取较好的预测。

2.4 GRP的纯度、化学组成及分子量分析

蛋白质在紫外光下的吸收峰在280 nm波长处,而核酸在紫外光下的吸收峰为260 nm波长处。对于多糖类成分,若在紫外光区无明显吸收,在一定程度上说明了其纯度^[23]。GRP多糖经紫外光谱扫描后结果表明(图4),260 nm和280 nm处均无吸收峰出现,如图5所示,GRP含有7.1%的蛋白质和86.6%的总糖,总酚含量为3.5%,以上研究结果表明制备的GRP纯度较高,可以用于后续的测定。GRP的分子量分布图如图6,从如图6可知

GRP 分子量分布含有 3 个峰 (Peak1-3)。从表 4 可知, GRP 中 Peak1 和 Peak2 峰面积占比分别为 30.16% 和 33.76%, 说明 GRP 主要由 Peak1 和 Peak2 组分多糖组成, Peak1 和 Peak2 的重均分子量 (Weight-average Molecular Weight, Mw) 为 1.782×10^6 g/mol 和 4.215×10^4 g/mol, 分子量分布相对较宽, 说明精多糖里含有微量的杂物, 致 GRP 多糖分子量分布宽。

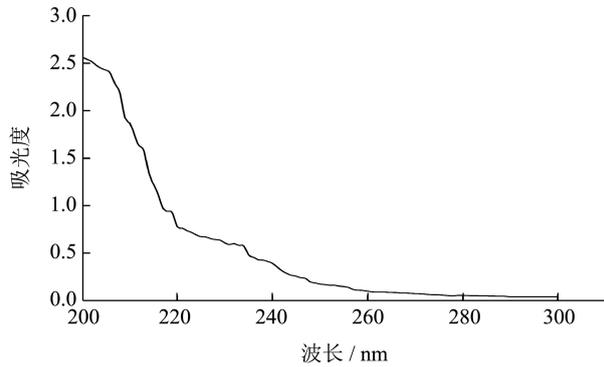


图 4 GRP 紫外可见吸收光谱图

Fig.4 UV absorption spectrum of GRP

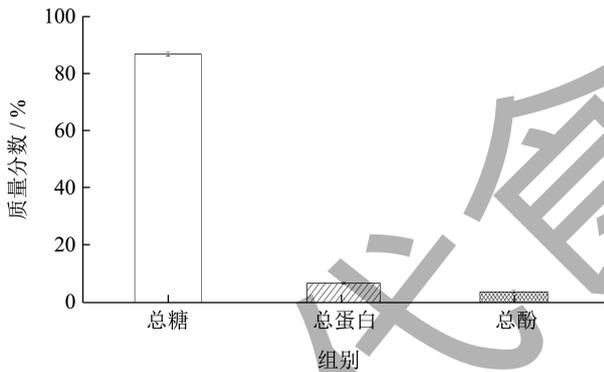


图 5 GRP 的化学组成

Fig.5 Chemical composition of GRP

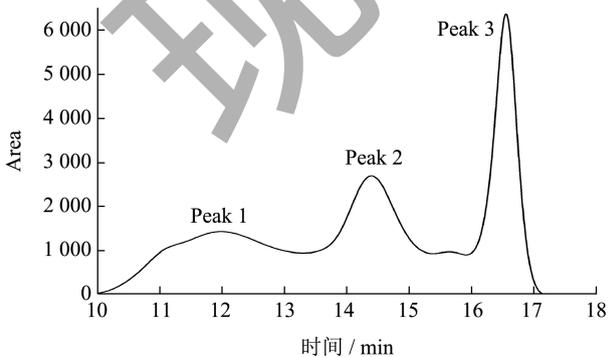


图 6 GRP 分子量分布图

Fig.6 UV absorption spectrum of GRP

表 4 GRP的GPC/SEC分析结果

Table 4 GPC/SEC analysis of GRP

组分	Peak1	Peak2	Peak3
峰位置/min	9.683~13.200	13.200~15.350	15.350~15.900
重均分子量 Mw/(g/mol)	1 782 636	42 159	5 073
数均分子量 Mn/(g/mol)	634 808	24 538	4 822
Z 均分子量 Mz/(g/mol)	4 248 781	69 709	5 329
重均 / 数均分布 Mw/Mn	2.808 15	1.718 10	1.051 99
峰面积 / %	30.155 2	33.760 4	5.124 6

2.5 GRP的单糖组成分析

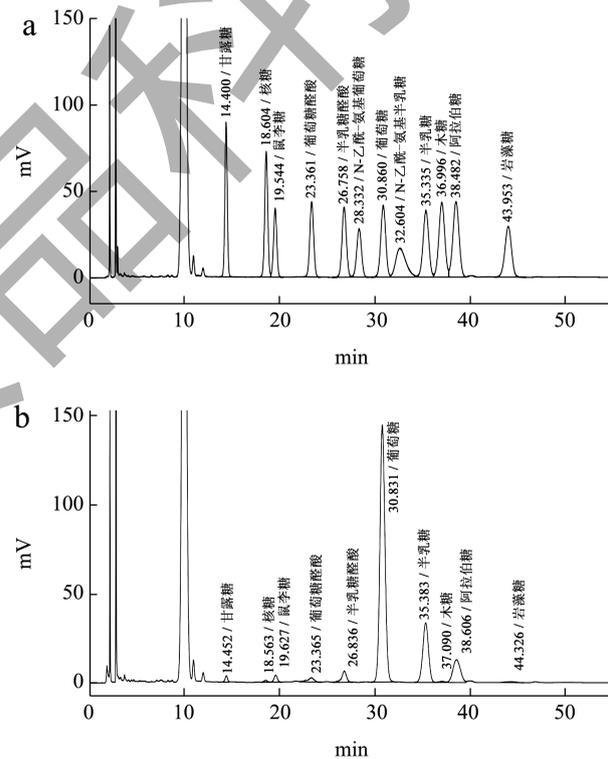


图 7 GRP 的单糖组分分析色谱图

Fig.7 Chromatogram of monosaccharide fraction analysis of GRP

如图 7 所示, GRP 的单糖组成为甘露糖:核糖:鼠李糖:葡萄糖醛酸:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖:岩藻糖=0.827:0.365:1.216:1.519:2.853:66.215:17.425:0.295:8.713:0.574。GRP 的单糖组成主要由葡萄糖组成, 高达 66.22%, 其次是半乳糖。根据文献报道, 很多植物多糖都存在核

糖和葡萄糖醛酸,例如枸杞粗多糖及其不同组分均由阿拉伯糖、氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸组成^[24];仙草多糖由甘露糖、鼠李糖、核糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和木糖 8 种单糖组成^[25];紫背天葵多糖由 10 种单糖组成,包括岩藻糖、核糖、葡萄糖醛酸、鼠李糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖、木糖、半乳糖醛酸与葡萄糖^[26]。本实验提取的多糖属于水溶性多糖混合物。所以在以后的研究中进一步分离验证青萝卜多糖的本质属性(果胶、纤维素降解物等的比值)。

2.6 GRP 的红外光谱解析

如图 8 所示, $3\ 440.81\ \text{cm}^{-1}$ 处强吸收峰是分子间氢键 O-H 伸缩振动峰;在 $2\ 927.04\ \text{cm}^{-1}$ 处是 C-H 伸缩振动的吸收峰^[27]; $1\ 633.3\ \text{cm}^{-1}$ 是由 C=O 振动引起;在 $1\ 016.56\ \text{cm}^{-1}$ 附近的特征吸收峰,表明 GRP 中存在吡喃糖环,以上各组峰都是糖类所属的特征峰^[28]。此外 $599.08\ \text{cm}^{-1}$ 是 O-H 面外弯曲振动吸收峰^[29]。

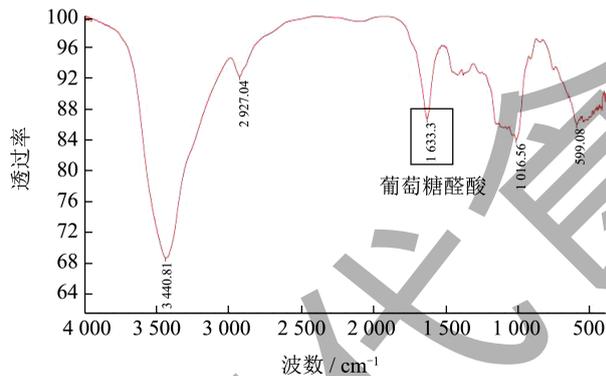


图 8 GRP 的红外光谱图

Fig.8 Infrared spectrogram of GRP

2.7 GRP 抗氧化活性分析

2.7.1 ABTS⁺ 自由基清除能力

儿茶素和间苯三酚与 ABTS⁺ 自由基反应生成共价加合物,最初形成的加合物不稳定,并降解为释放部分 ABTS 分子的二次加合物,这些二次加合物被发现能够清除 ABTS⁺ 自由基,这一观察结果可以解释 ABTS⁺ 自由基与多酚反应所表现出的复杂的动力学行为^[30]。由图 9a 可知,GRP 清除 ABTS⁺ 自由基能力较强,在所设质量浓度范围内,ABTS⁺ 自由基清除率与其成正比,随着多糖质量浓度增加逐渐增强,当质量浓度达到 $25\ \text{mg/mL}$ 时,ABTS⁺ 自由基清除率达 91.14% ,略低于 Vc 的清除率。经

线性拟合,ABTS⁺ 自由基清除率的线性回归方程为 $y=3.0087x+16.69$, $R^2=0.9904$,由此算出 GRP 对 ABTS⁺ 自由基的 IC_{50} 值为 $10.78\ \text{mg/mL}$ 。

2.7.2 羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除能力

基于 Fenton 响应法, H_2O_2 和 Fe^{2+} 反应生成 $\cdot\text{OH}$,建立反应体系模型。 $\cdot\text{OH}$ 反应活性强,存活时间短,水杨酸能有效地快速捕捉 $\cdot\text{OH}$,并产生有色产物^[31]。以 Vc 作为阳性对照,GRP 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用见图 9b。GRP 具有较强的羟基自由基清除能力,随着质量浓度的变大,GRP 清除自由基的能力逐渐增大,当质量浓度达到 $25\ \text{mg/mL}$ 时, $\cdot\text{OH}$ 清除率达 85.31% ,经线性拟合,GRP 对 $\cdot\text{OH}$ 的 IC_{50} 值为 $8.42\ \text{mg/mL}$ 。

2.7.3 DPPH 自由基清除能力

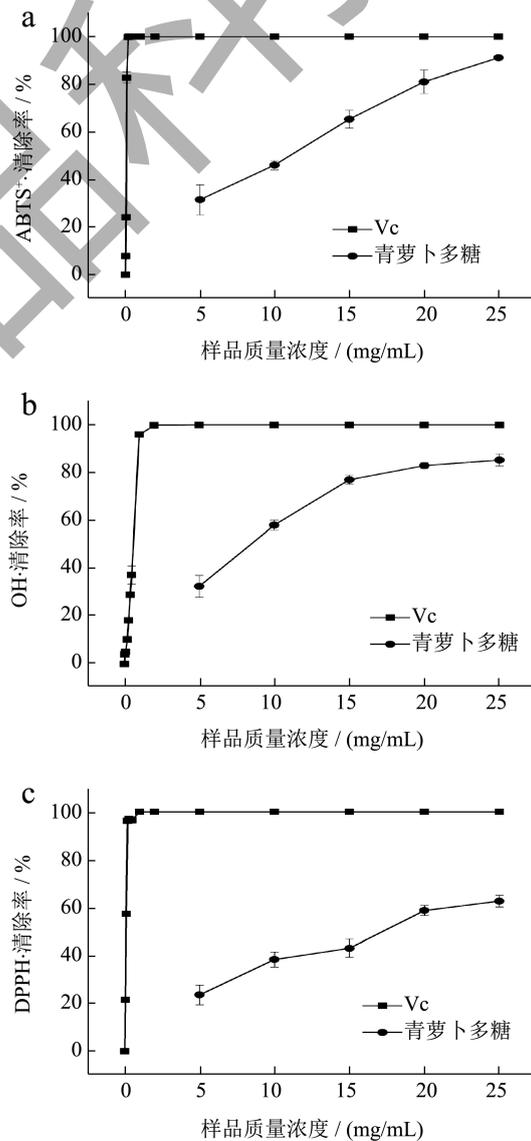


图 9 GRP 对自由基清除能力

Fig.9 Scavenging effect of GRP on free radical

DPPH 自由基与有机溶剂反应会呈现紫色,当添加某些抗氧化剂时,其在 517 nm 下吸收强度降低,用此来评价某些物质的抗氧化性^[32]。以 Vc 作为阳性对照,GRP 对 DPPH 的清除能力见图 9c。GRP 对 DPPH 表现出较强的清除作用,当质量浓度达到 25 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率达 62.73%,经线性拟合,GRP 对 DPPH 的 IC₅₀ 值为 17.40 mg/mL。

目前,对多糖的体外抗氧化作用研究表明,其可能的作用机理为直接清除活性氧自由基,多糖是由多个相同或不同的单糖以糖苷键连接而成的高聚物。每个单糖基中都含有数目不等的活性羟基提供活泼氢。在氧化反应过程中一方面多糖中每一个单糖基的活性羟基与羟自由基的活泼氢结合生成稳定的化合物水;另一方面多糖中的活泼氢与活泼的超氧阴离子自由基反应生成稳定的化合物水,起到抗自由基氧化的作用^[33]。所以我们预测 GRP 可能通过直接清除活性氧自由基,从而达到抗氧的作用。

3 结论

本研究以青萝卜为原料,以多糖提取率为评价指标,建立了拟合度良好的模型,得出影响 GRP 提取的程度大小为酶解温度>酶活力>料液比>酶解时间,通过实验条件优化得出了提取青萝卜多糖的最佳提取工艺:酶活力为 285 U/g,酶解温度为 48 °C,酶解时间为 59 min,料液比为 1:21,在此条件下提取的多糖提取率为 5.3%。通过红外光谱扫描分析和液相色谱分析,GRP 具有多糖的一般特征吸收峰,平均摩尔比为甘露糖:核糖:鼠李糖:葡萄糖醛酸:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖:岩藻糖=0.827:0.365:1.216:1.519:2.853:66.215:17.425:0.295:8.713:0.574,其主要单糖组分为葡萄糖和半乳糖,葡萄糖占比超过一半,高达 66.22%。抗氧化活性测定结果表明青萝卜多糖具有较好的抗氧化能力,当质量浓度达到 25 mg/mL 时,其对 ABTS⁺ 自由基、羟基自由基和 DPPH 自由基的清除率分别为 91.14%、85.31%、62.73%,IC₅₀ 为 10.78、8.42 和 17.40 mg/mL。GRP 对 ABTS 自由基清除率最高,略低于 Vc。

本研究初步建立了青萝卜多糖的提取工艺,把新鲜的青萝卜在 30 °C 烘干至青萝卜粉,其脱水率为 90.30%,以 500 g 青萝卜为例,可制成 48.50 g 青萝卜粉,通过此工艺可提取出 2.52 g 的青萝卜多糖,后期进一步优化工艺提高多糖的提取率,但青

萝卜多糖的主要组成单糖都为葡萄糖和半乳糖,在抗氧化方面,在一定质量浓度范围内,自由基清除率与多糖质量浓度成正比,说明其在抗氧化有很大的市场潜力,也为青萝卜在功能性食品和新药资源领域的高值化利用提供数据支持,促进青萝卜产业发展。

参考文献

- [1] 汪隆植,何启伟.中国萝卜[M].北京:科学技术文献出版社,2005.
- [2] The Food and Agriculture Organization of the United Nations [DB]. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- [3] 中华人民共和国国家统计局.中国统计年鉴[M].北京:中国统计出版社,2020.
- [4] 张胜雪,范伟强,王超楠,等.青萝卜游离小孢子培养体系优化[J].中国瓜菜,2022,35(2):34-38.
- [5] HAC P, WOOYEAL K, SUN K, et al. Metabolic profiling of white and green radish cultivars (*Raphanus sativus*) [J]. Horticulturae, 2022, 8(4): 310-312.
- [6] 郑思宇,范伟强,王超楠,等.青萝卜种质资源主要农艺性状的表型评价[J].中国蔬菜,2020,9:50-56.
- [7] PEA K, RODRÍGUEZ J C, OLIVERA D, et al. Effects of a growth promoter on different vegetable crops [J]. International Journal of Development Research, 2019, 7(2): 11737-11743.
- [8] CHIHOU B, DIAS M I, BARROS L, et al. Valorisation of the green waste parts from turnip, turnip and wild cardoon: nutritional value, phenolic profile and bioactivity evaluation [J]. Food Research International, 2019, 126: 108-651.
- [9] 潘秀娟,屠康,韩永斌.果品贮藏加工的标准化与农业产业结构调整[J].农村经济,2003,1:34-36.
- [10] 耿兄,田伟娜,林然,等.萝卜及胡萝卜多糖的生物功能研究进展[J].食品科技,2023,48(2):1-7.
- [11] 李翠丽,王炜,张英,等.中药多糖提取,分离纯化方法的研究进展[J].中国药房,2016,27(19):2700.
- [12] 阙国仕,杨艳侠,陈红漫,等.胡萝卜多糖降低血糖的功能研究[J].食品研究与开发,2015,36(1):118-121.
- [13] 孙丽娜,范英兵,胡冬慧,等.响应面优化纤维素酶提取蓝莓多糖工艺研究[J].食品研究与开发,2017,38(23):57-60.
- [14] 温文娟,刘珊,黄远丽.苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定香菇多糖含量比较[J].现代食品,2020,21:177-179.
- [15] 王文平,郭祀远,李琳,等.考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J].食品研究与开发,2008,1:115-117.
- [16] 宁二娟,陈玲,王学方,等.20种牡丹叶中总黄酮,总酚和芍药苷的含量测定及抗氧化活性研究[J].饲料研究,2023,46(4):75-80.

- [17] 林冰洁,毛肇洁,余远,等.藜麦麸皮多糖的提取及理化性质和活性研究[J].食品科技,2021,46(8):171-178.
- [18] 何喜珍.不同分子量大豆多糖的制备、表征和抗氧化研究[D].上海:华东师范大学,2016.
- [19] 杨宗美,王飞,李媛,等.酚类化合物体外自由基清除能力的研究[J].广东化工,2022,13(49):40-43.
- [20] 孙玉军,陈彦,王松华,等.胡萝卜多糖体外抗氧化活性研究[J].热带作物学报,2011,32(3):403-406.
- [21] 杨申明,王振吉,范树国,等.正交实验法优化野胡萝卜总黄酮提取工艺及其抗氧化活性[J].北方园艺,2016,23:134-138.
- [22] 都凤华,刘楠楠.响应面分析法优化芋头多糖的脱色工艺[J].食品研究与开发,2018,39(16):115-120.
- [23] 孙臣心.姬松茸多糖的分离纯化、结构分析及生物活性研究[D].长春:东北师范大学,2009.
- [24] 王梓轩,李娅琦,柳国霞,等.高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定枸杞多糖的单糖及糖醛组成[J].中华中医药杂志,2021,36(10):6082-6085.
- [25] 张维冰,王智聪,张凌怡,等.柱前衍生超高效液相色谱-串联四极杆质谱法测定仙草多糖组成及其含量[J].分析测试学报,2013,32(2):143-149.
- [26] 张雪儿,金野,杜沁岭,等.紫背天葵多糖的化学组成与物理特性研究[J].食品科技,2022,47(11):179-184.
- [27] 艾晓娜.人参多糖提取纯化及结构的初步鉴定[D].大连:大连工业大学,2014.
- [28] 张伟敏,魏静,胡振,等.灰毡毛忍冬提取纯化物抗氧化性研究[J].食品科学,2008,29(3):109-112.
- [29] 唐丽娟,刘玮炜,王丽,等.不同方法提取海螵蛸多糖及结构表征[J].中成药,2011,33(9):1625-1628.
- [30] OSMAN A M, WONG K K, FERNYHOUGH A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 346(1): 321-329.
- [31] 黄婷婷,梁丹,唐小庆,等.海尔福口服液对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率的实验研究[J].中国冶金工业医学杂志,2008,25(6):640-641.
- [32] 苏适,赵东江,王喜庆,等.响应面法优化超声辅助离子液体提取黑豆异黄酮及其抗氧化活性研究[J].中国粮油学报,2019,34(11):24-28.
- [33] 王稳航,李玉,刘安军.松木层孔菌多糖的提取及抗氧化性研究[J].食品研究与开发,2006,27(11):53-56.