

超声波辅助酶法提取益智仁多糖的工艺优化及其抗炎活性

何荧珠^{1,2,3,4}, 白亚娟^{2,3,4}, 马泽^{2,3,4}, 沈禾婧^{2,3,4}, 范蓓^{2,3,4}, 谢梦洲^{1*}, 王凤忠^{1,2,3,4*}

(1. 湖南中医药大学湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心, 湖南长沙 410208) (2. 三亚中国农业科学院国家南繁研究院, 海南三亚 572024) (3. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193) (4. 海南省农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025)

摘要: 该研究联合响应面试验与人工神经网络耦合遗传算法优化超声波辅助纤维素酶法提取益智仁多糖的工艺条件。经回归模型和人工神经网络模型分析并结合验证试验, 益智仁多糖提取最佳条件为液料比 20 mL/g, 提取时间 30 min, 酶添加质量分数 4%, 超声波功率 300 W, 该条件下, 多糖得率为 4.20%。红外光谱显示该多糖具有多糖特征吸收峰, 含有糖醛酸, 结构中存在吡喃糖环。体外抗氧化测定结果显示, 多糖质量浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 时, 总抗氧化能力为 80.76 $\mu\text{mol TE/mL}$, 铁原子还原能力为 133.6 $\mu\text{mol FeE/mL}$ 。为进一步评估其生物活性, 采用 2,4,6-三硝基苯磺酸诱导斑马鱼建立肠炎模型, 发现超声波辅助酶法提取的益智仁多糖可以显著提高肠炎斑马鱼体内的总抗氧化活性, 降低炎症因子 $\text{INF-}\gamma$ 的表达水平, 提高抗炎因子 IL-10 的表达水平, 减少一氧化氮的产生。这些结果表明, 益智仁多糖具有潜在的抗炎和抗氧化活性, 为益智仁功能产品创制提供了理论依据。

关键词: 益智仁多糖; 超声波辅助-纤维素酶法提取; 肠炎斑马鱼模型; 抗氧化活性; 抗炎活性

文章编号: 1673-9078(2025)03-222-233

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0141

Optimization of Ultrasonic-assisted Cellulase Extraction of Polysaccharides from *Alpiniae Oxyphylla Fructus* and Their Anti-inflammatory Activity

HE Yingzhu^{1,2,3,4}, BAI Yajuan^{2,3,4}, MA Ze^{2,3,4}, SHEN Hejing^{2,3,4},
FAN Bei^{2,3,4}, XIE Mengzhou^{1*}, WANG Fengzhong^{1,2,3,4*}

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Hunan Medicinal and Edible Homologous Functional Food Engineering Technology Research Center, Changsha 410208, China) (2. National Nanfan Research Institute (Sanya), Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572024, China) (3. Key Laboratory of Agro-products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural

引文格式:

何荧珠, 白亚娟, 马泽, 等. 超声波辅助酶法提取益智仁多糖的工艺优化及其抗炎活性[J]. 现代食品科技, 2025, 41(3): 222-233.

HE Yingzhu, BAI Yajuan, MA Ze, et al. Optimization of ultrasonic-assisted cellulase extraction of polysaccharides from *alpiniae oxyphylla fructus* and their anti-inflammatory activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 222-233.

收稿日期: 2024-01-30

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1600303; 2021YFD1600100-404); 三亚中国农业科学院国家南繁研究院“南繁专项”项目(YYLH2307); 湖南省重点研发计划项目(2022SK2018)

作者简介: 何荧珠(1998-), 女, 硕士, 研究方向: 中医药膳辨证施膳, E-mail: 1003692110@qq.com

通讯作者: 谢梦洲(1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中医药膳辨证施膳, E-mail: xiemengzhou@hnucm.edu.cn; 共同通讯作者: 王凤忠(1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: wangfengzhong@sina.com

Sciences, Beijing 100193, China) (4.Sanya Institute, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572025, China)

Abstract: The optimal conditions for ultrasonic-assisted cellulase extraction of bioactive polysaccharides from alpiniae oxyphylla fructus (AOF) were clarified using response surface methodology and artificial neural network coupled with genetic algorithm. The optimized conditions were a solvent-to-solid ratio of 20 mL/g, cellulase mass fraction of 4%, and ultrasonic power of 300 W for 20 min, which yielded a total polysaccharide extraction of 4.20%. Fourier transform infrared spectra revealed that the extracted sample had polysaccharide characteristic absorption peaks containing uronic acid and pyranose rings. The results of *in vitro* antioxidant assays showed that the total antioxidant capacity of AOF polysaccharides was 80.76 $\mu\text{mol TE/mL}$ at 300 $\mu\text{g/mL}$ and the ferric reducing antioxidant power was 133.6 $\mu\text{mol FeE/mL}$. To further evaluate the biological activity of AOF polysaccharides, a zebrafish colitis model was established using 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid. The results showed that AOF polysaccharides prepared via ultrasonic-assisted cellulase extraction significantly promoted the total antioxidant activity, decreased the expression of the proinflammatory factor interferon- γ , increased the expression of the anti-inflammatory factor interleukin-10, and decreased the production of nitric oxide in zebrafish with colitis. These results indicate that the AOF polysaccharides have anti-inflammatory and antioxidant effects, providing a theoretical basis for the development of AOF products.

Key words: polysaccharides from alpiniae oxyphylla fructus; ultrasonic-assisted cellulase extraction; zebrafish colitis-model; antioxidant activity; anti-inflammatory activity

益智仁 (*Alpiniae Oxyphyllae Fructus*, AOF) 为姜科植物益智 (*Alpinia oxyphylla* Miq.) 的果实, 主要分布于我国广东和海南。益智仁作为食药同源材料, 富含多种生物活性成分, 目前研究主要集中在益智仁中的萜类、二苯庚烷类、甾体类等小分子活性成分^[1,2], 而对于大分子活性成分如多糖等, 其研究尚显不足。

炎症性肠病 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) 包括克罗恩病和溃疡性结肠炎, 是一种慢性免疫反应失调的胃肠道炎症性疾病。随着生活水平提高, 人们饮食方式西化, 我国炎症性肠病患者基数也在逐年快速增加中^[3]。目前治疗炎症性肠病的药物有 5-氨基水杨酸、柳氮磺吡啶、泼尼松等, 但其效果有限且副作用较大, 亟需发现作用高效且副作用小的新治疗物。在传统中医中药中, 益智仁具有治疗脾胃虚寒、泄泻等作用, 但现代药理学尚未探明益智仁调节胃肠道健康的物质基础。

植物活性多糖具有免疫调节和抗炎活性^[4], 是挖掘预防与治疗炎症性肠病的宝库。目前, 从天然植物资源中提取多糖的技术包括热水提取、超临界流体萃取、超声波辅助提取、酶法提取等。其中热水提取^[5]是最常用的方法, 无需特殊设备, 易于实施, 但不够节能高效。超临界流体萃取^[6]由于条件温和、对活性成分破坏少等优点而受到广泛关注, 但其设备使用成本高, 尚未实现规模化应用。生物酶作为节能环保高效的生物催化剂, 能有效提高特定结构

多糖得率。超声波通过空化现象破坏细胞壁, 利于溶出细胞内物质, 常被用作辅助提取多糖的方法。因此, 多提取方式结合是显著提高植物多糖提取效率、保留多糖活性、节能环保的解决方法。

响应面试验 (Response Surface Methodology) 常用于预测和优化研究。与响应面模型相比, 人工神经网络 (Artificial Neural Network) 建模因其更精确的拟合和预测能力, 正在发展为复杂非线性多元建模的替代方案^[7]。因此, 本研究采用超声波辅助酶法提取益智仁多糖, 用响应面试验和人工神经网络耦合遗传算法优化益智仁多糖的提取条件, 建立益智仁多糖高效提取工艺; 同时, 建立 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid, TNBS) 诱导的结肠炎斑马鱼模型, 探究益智仁多糖对机体炎症与氧化应激的影响。明确益智仁调节胃肠道健康的物质基础, 不仅有助于为益智仁高值化健康产品研发提供理论依据, 还为炎症性肠病的治疗提供新的思路 and 方案。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

益智仁购自经方集传统中药材店, 产地海南。野生型 AB 品系斑马鱼, 购自国家斑马鱼资源中心。

纤维素酶 (400 U/mg), 上海源叶生物科技有限公司; 无水乙醇、体积分数 95% 乙醇、浓硫酸、

苯酚、三氯甲烷, 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Saline, PBS)、缓冲液, 北京索莱宝科技有限公司; 正丁醇, 北京市通广精细化工公司; 即用型透析袋 (6~8 ku) 膜, 美国光谱医学; 总一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 检测试剂盒、总抗氧化能力检测试剂盒 (铁离子还原能力 (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power, FRAP) 法)、总抗氧化能力检测试剂盒 (2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 [2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulphonate), ABTS] 快速法), 上海碧云天生物技术有限公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; TNBS, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; TRNzol 总核糖核酸 (Ribonucleic Acid, RNA) 提取试剂, 天根生化科技 (北京) 有限公司; HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 引物, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 仪器与设备

MGL-16MT 台式超大容量冷冻离心机, 美瑞克仪器 (上海) 有限公司; KQ-500DE 超声波仪, 昆山市超声仪器有限公司; KZ-III-F 高速低温组织研磨仪, 武汉塞维尔生物科技有限公司; SpectraMax 190 酶标仪, Molecular Devices 公司; ABI 7500 荧光定量 PCR 仪器, Applied Biosystems 公司; T100 PCR 仪, 美国伯乐 (BIO-RAD) 公司。

1.3 方法

1.3.1 益智仁多糖提取

通过超声波辅助纤维素酶法提取制备益智仁多糖。称取一定质量益智仁粉, 加入 2 倍体积分数 95% 乙醇浸泡 4 d, 进行脱脂、脱色、脱小分子糖预处理, 每 12 h 更换一次乙醇溶液, 过滤取滤渣, 于 40 °C 烘箱中干燥至恒重。称取 2 g 预处理后的益智仁粉, 按一定的液料比加入超纯水, 调节溶液 pH 值为 4.8, 加入一定比例纤维素酶, 在一定的超声波功率下于 50 °C 水浴提取一定时间。提取结束后, 将提取液在 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 该溶液为益智仁多糖提取液。

1.3.2 多糖提取得率计算

采用苯酚-硫酸法^[8]测定总糖质量浓度, DNS

法^[9]测定还原糖质量浓度。益智仁多糖得率计为:

$$Y = \frac{(C_1 - C_2) \times V}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y —多糖得率, %;

C_1 —苯酚-硫酸法测定的总糖质量浓度, mg/mL;

C_2 —DNS 法测定的还原糖质量浓度, mg/mL;

V —溶液体积, mL;

M —预处理后的益智仁粉质量, mg。

1.3.3 单因素实验

按照 1.3.1 中的方法, 以多糖得率为因变量, 考察不同液料比、提取时间、酶添加质量分数、超声波功率对益智仁多糖提取率的影响。

1.3.3.1 液料比

溶剂体积和预处理后的益智仁粉的质量的比值, 简称液料比, 下同。设置液料比 X_1 : 10、15、20、25、30 mL/g, 提取时间 60 min, 酶添加质量分数 3%, 超声波功率 300 W。

1.3.3.2 提取时间

设置液料比 20 mL/g, 提取时间 X_2 : 20、30、40、50、60 min, 酶添加质量分数 3%, 超声波功率 300 W。

1.3.3.3 酶添加质量分数

设置液料比 20 mL/g, 提取时间 60 min, 酶添加质量分数 X_3 : 1%、2%、3%、4%、5%, 超声波功率 300 W。

1.3.3.4 超声波功率

设置液料比 20 mL/g, 提取时间 60 min, 酶添加质量分数 3%, 超声波功率 X_4 : 200、250、300、350、400 W。

1.3.4 响应面试验

表 1 益智仁多糖提取响应面试验因素及水平设计表

Table 1 Response surface experimental factors and level design of crude polysaccharide extracted from AOF

变量	因素	水平		
		-1	0	1
液料比 (mL/g)	X_1	15	20	25
提取时间/min	X_2	3	4	5
酶添加质量分数/%	X_3	20	30	40
超声波功率/W	X_4	200	250	300

据单因素实验结果, 以益智仁多糖得率为响应值, 选取表 1 因素为自变量, 利用 Design Expert 13

软件设计四因素三水平试验,对自变量与响应值之间的关系进行拟合建立响应面模型,采用方差分析(ANOVA)对响应面模型进行分析。决定系数(R^2)和调整确定系数(R^2_{adj})确定响应面模型的充分性,采用变异系数(C.V.)测量实验点的相对离散度。根据 Box-Behnken 中心组合试验设计优化提取益智仁多糖的最优工艺条件。

1.3.5 人工神经网络模型

利用 MATLAB 的神经网络拟合工具,采用带有 Sigmoid 隐层神经元和线性输出神经元的两层前馈网络对益智仁多糖提取实验结果进行非线性分析^[10,11]。人工神经网络模型结构由四个神经元的输入层(X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4)、12 个神经元的隐藏层和一个神经元的输出层(益智仁多糖得率)组成,模型拟合架构如图 1 所示。数据集被随机划分成两个子集:训练和测试,其中 90% 用于训练,10% 用于测试。在训练之前,变量的实际值被归一化为 -1~1 之间,在通过输出层之后,则转换为实际值。使用贝叶斯正则化法反复训练人工神经网络模型,达到最大的 μ 。所有实验结果均在实验前进行归一化处理。通过 MATLAB 的优化工具箱,引入由人工神经网络模型导出的方程作为优化函数,设置变量的上下限,选择最大值,得出最优结果。

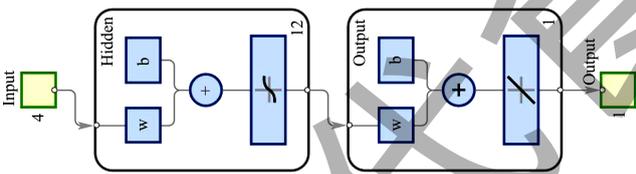


图 1 人工神经网络模型拟合架构

Fig.1 Artificial neural network model fitting architecture

1.3.6 益智仁多糖精制

在最优化益智仁多糖提取条件下,制备得益智仁多糖提取液,8 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,减压旋转蒸发浓缩,加入 sevag 试剂[氯仿:正丁醇(V/V)=4:1]脱蛋白,重复多次至无蛋白沉淀。取水相,减压旋转蒸发浓缩,浓缩液入 8 000 Da 透析袋透析 3 d。收集透析液浓缩至一定质量浓度,加入体积分数 95% 乙醇,乙醇终体积分数为 80%,搅拌后 4 °C 静置过夜。8 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,真空冷冻干燥,得益智仁多糖。

1.3.7 紫外光谱、傅里叶变换红外光谱分析

称取适量益智仁多糖,加入蒸馏水,配置成质量浓度为 1 mg/mL 的多糖溶液,在室温下置于紫外

分光光度计扫描,波长范围为 190~400 nm。

将 KBr 与 1 mg 多糖样品充分研磨混合后压制薄片,使用傅里叶变换红外光谱仪于 4 000~500 cm^{-1} 范围内扫描,绘制多糖样品的红外光谱图。

1.3.8 抗氧化活性的测定

益智仁多糖体外抗氧化能力采用总抗氧化能力(Total Antioxidant Capacity, T-AOC)检测试剂盒(ABTS 快速法、FRAP 法)测定。ABTS 法,使用 Trolox 作为标准品计算总抗氧化活性,结果以不同质量浓度益智仁多糖每毫升的 Trolox 当量浓度($\mu\text{mol TE/mL}$)表示。FRAP 法,即铁离子还原法,采用 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作为标准品建标准曲线,结果以不同质量浓度益智仁多糖每毫升中所含 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 当量浓度($\mu\text{mol FeE/mL}$)绘制图表^[12]。

1.3.9 斑马鱼饲养和肠炎模型建立

野生型 AB 成年斑马鱼饲养于水温 28 °C、14 h(光):10 h(暗)光暗循环环境中,其自然产卵后,收集在含有胚培养基 E3(5 mmol/L NaCl, 0.17 mmol/L KCl, 0.33 mmol/L CaCl_2 , 0.33 mmol/L MgSO_4 , pH 值 7.2)的培养皿中,去除死卵和粪便,置于 28 °C 培养箱中孵育。为探究益智仁多糖对 TNBS 诱导的结肠炎斑马鱼的影响,将受精发育 3 d 后的斑马鱼幼鱼随机分配至 6 孔板中,每孔 30 尾,设置只有 E3 培养基的正常对照组(CT 组),其余各组暴露于含 750 μg TNBS,分别含 0(TNBS 组)、300(TNBS+30 组)、800(TNBS+80 组)、1 300(TNBS+130 组)、1 800(TNBS+180 组) μg 不同剂量益智仁多糖的 10 mL 培养基中,培养 4 d,每 24 h 换液。置于光周期为 14 h(光):10 h(暗)的 28 °C 恒温培养箱中孵育。

1.3.10 氧化应激水平和 NO 质量浓度检测

将药物处理结束的斑马鱼幼鱼($n=15\sim 20$)在 PBS 缓冲液中匀浆,4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清。采用蛋白浓度测定试剂盒测定上清液中蛋白质量浓度。采用总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 快速法、FRAP 法)测定上清液中氧化应激水平,结果以每克蛋白对应的 Trolox 物质的量(mmol/g)、所含 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 物质的量(mmol/g)表示。采用总 NO 检测试剂盒测定上清液中 NO 质量浓度,其中 NO 质量浓度测定为 NO 代谢物(亚硝酸盐和硝酸盐),结果以每 g 蛋白所含 NO 代谢物的物质的量($\mu\text{mol/g}$)表示。

1.3.11 荧光定量PCR检测

采用 TRNzol 总 RNA 提取试剂对药物处理结束的斑马鱼幼鱼 ($n=6$) 进行 RNA 提取, 紫外吸收法检测 RNA 质量浓度和纯度, 变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录, 各样品的目的基因和内参分别进行 Realtime PCR (RT-PCR) 反应, 每个样本检测 3 个复孔, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。结果分析时以 β -actin 为内参, 以对照样品作为校准。内参与目的基因的引物序列如表 2。

表 2 RT-PCR检测基因引物序列

Table 2 Gene primer sequences detected by RT-PCR		
引物名称	引物序列 (5' to 3')	产物大小/bp
IFN- γ	上游引物 TTGCTGTTTCGGGATGG	134
	下游引物 CGCAGGAAGATGGGGTGT	
IL10	上游引物 GGAGACCATTCTGCCAACA	100
	下游引物 ATCCCGCTGAGTTCCTG	
ACTIN	上游引物 TGAATCCCAAAGCCAACAGA	187
	下游引物 GGAAGAGCGTAACCCTCATAGA	

1.3.12 数据统计及分析

采用统计分析软件 IBM SPSS Statistics 25 分析数据。处理间差异采用 One-way ANOVA, 显著性水平 $P < 0.05$, 不同字母代表组间有显著性差异。采用 Design Expert 13 设计分析益智仁多糖提取工艺响应面优化实验。采用 MATLAB R2023b 工具箱对实验结果进行神经网络拟合和优化。所有实验均进行三次重复。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 液料比

液料比对益智仁多糖得率的影响如图 2a 所示, 随着液料比的升高, 多糖得率呈先上升后下降趋势。液料比在 10~20 (mL/g) 的范围内, 多糖得率近乎线性升高, 在 20 (mL/g) 时达到最大值 (2.63%)。但液料比超过 20 (mL/g) 后, 可能因非多糖成分的溶出, 降低提取质量。因此, 液料比选择在 20 mL/g 上下较合适。

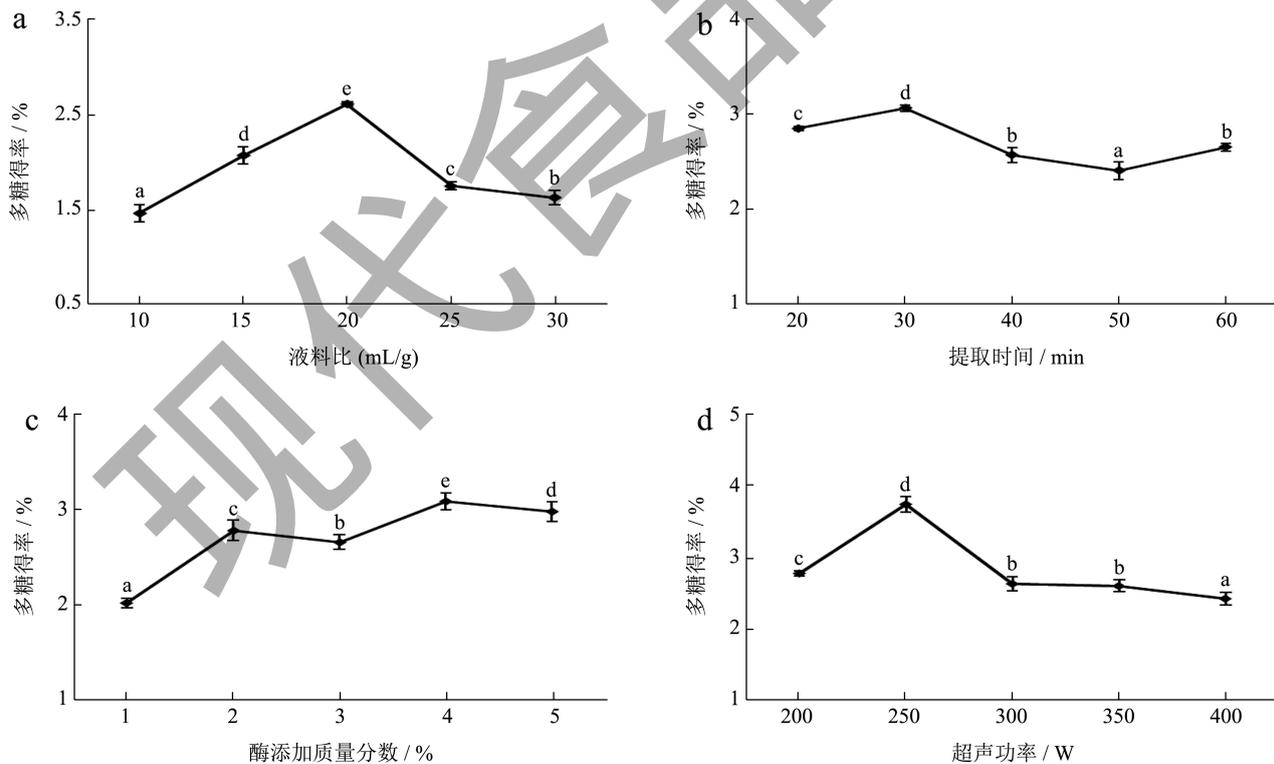


图 2 单因素实验结果

Fig.2 Single factor experimental results

2.1.2 提取时间

图 2b 为提取时间对益智仁多糖得率的影响，提取时间为 20~30 min 时，多糖得率呈小幅度上升趋势，当提取时间为 30 min 时得率最大（3.07%）；当提取时间继续延长至 60 min，多糖得率下降。结果表明短期超声波处理可促进多糖溶出，而时间过长可能导致多糖分解，影响得率。因此，提取时间选择 20 min 上下比较合适。

2.1.3 酶添加质量分数

图 2c 为酶添加质量分数对益智仁多糖得率的影响，随着酶添加质量分数从 1% 增加至 5%，多糖得率逐渐上升，在酶添加质量分数为 4% 时，得率最大（3.10%）。但添加质量分数超过 4% 后，多糖得率不再显著提升，这可能是由于酶与底物的结合已达到饱和状态^[13]。因此，酶添加质量分数应控制在 4% 左右。

2.1.4 超声功率

超声功率对益智仁多糖得率的影响结果如图 2d 所示，提高超声波功率至 250 W 可显著增加益智仁多糖得率，多糖得率最大（3.73%），但超过此功率则得率下降，这可能是由于高功率会破坏酶和多糖结构^[14]。因此，超声功率应控制在 250 W 上下。

2.2 响应面模型建立与检验

2.2.1 响应面模型建立

根据单因素实验结果，以益智仁多糖得率为响应值，选取表 1 中四个因素（液料比、提取时间、酶添加质量分数、超声波功率）为实验变量，用 Design Expert 13 设计益智仁多糖提取工艺响应面优化实验。表 3 所示为实验设计情况和多糖得率的预测值及实际值。

对实验数据进行二次多项式方程拟合，得拟合回归方程为：

$$Y=1.58797X_1+0.164633X_2+2.57817X_3+0.0245X_4+0.0021X_1X_2-0.0135X_1X_3-0.00047X_1X_4+0.00475X_2X_3-0.000095X_2X_4-0.00185X_3X_4-0.034737X_1^2-0.003309X_2^2-0.249667X_3^2+0.000009X_4^2-25.01075$$

上式中，Y 为益智仁多糖得率，X₁ 为液料比，X₂ 提取时间，X₃ 酶添加质量分数，X₄ 为超声波功率。

表 3 Box-Behnken 实验设计和益智仁多糖得率

Table 3 Box-Behnken design and yield of polysaccharides from AOF

实验序号	X ₁ 液料比 (mL/g)	X ₂ 提取时间/min	X ₃ 酶添加质量分数/%	X ₄ 超声波功率/W	益智仁多糖得率/%	
					实际值	预测值
1	25	20	4	250	2.79	2.78
2	20	30	4	250	3.49	3.67
3	25	30	4	300	3.69	3.62
4	20	40	5	250	3.12	3.16
5	15	30	4	300	2.95	2.96
6	20	40	4	300	3.82	3.81
7	20	30	3	200	2.9	2.89
8	20	30	5	200	3.06	3.05
9	20	40	3	250	3.04	3.08
10	15	30	4	200	1.66	1.78
11	25	30	5	250	2.93	2.92
12	15	30	3	250	2.07	2.04
13	20	30	4	250	3.69	3.67
14	20	20	3	250	3.09	3.11
15	20	20	5	250	2.98	3.00
16	25	30	3	250	3.08	3.07
17	20	20	4	300	3.77	3.84
18	15	40	4	250	1.95	1.95
19	20	30	4	250	3.72	3.67
20	20	30	5	300	3.81	3.81
21	20	40	4	200	3.08	2.97
22	15	20	4	250	2.15	2.09
23	20	30	3	300	4.02	4.01
24	20	30	4	250	3.83	3.67
25	15	30	5	250	2.19	2.16
26	25	40	4	250	3.01	3.06
27	20	30	4	250	3.6	3.67
28	20	20	4	200	2.84	2.81
29	25	30	4	200	2.87	2.92

表 4 方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	10.72	14	0.765 5	90.5	<0.000 1***
X_1 (液料比)	2.43	1	2.43	287.14	<0.000 1***
X_2 (提取时间)	0.013 3	1	0.013 3	1.58	0.735 1ns
X_3 (酶添加质量分数)	0.001	1	0.001	0.119 1	0.23ns
X_4 (超声波功率)	2.66	1	2.66	314.34	<0.000 1***
X_1X_2	0.044 1	1	0.044 1	5.21	0.038 6*
X_1X_3	0.018 2	1	0.018 2	2.15	0.164 3ns
X_1X_4	0.055 2	1	0.055 2	6.53	0.022 9*
X_2X_3	0.009	1	0.009	1.07	0.319 3ns
X_2X_4	0.009	1	0.009	1.07	0.319 3ns
X_3X_4	0.034 2	1	0.034 2	4.04	0.064ns
X_1^2	4.89	1	4.89	578.04	<0.000 1***
X_2^2	0.710 3	1	0.710 3	83.93	<0.000 1***
X_3^2	0.404 3	1	0.404 3	47.78	<0.000 1***
X_4^2	0.003 4	1	0.003 4	0.399 6	0.537 5ns
残差	0.118 5	14	0.008 5		
失拟误差	0.052 8	10	0.005 3	0.321 1	0.933 9ns
纯误差	0.065 7	4	0.016 4		
总和	10.84	28			
$R^2=0.989 1$		$R^2_{adj}=0.978 1$		变异系数 C.V.%=2.99	

注: * 显著性水平为 $P < 0.05$; ** 显著性水平为 $P < 0.01$; *** 显著性水平为 $P < 0.001$; ns 无显著性差异。

2.2.2 响应面模型分析

对回归模型进行显著性分析(表 4)可见,该拟合模型 $P < 0.000 1$, F 值为 90.5, 说明该模型极显著, 失拟误差 P 值为 0.933 9, 表明该模型的拟合效果好。确定系数 R^2 和调整确定系数 R^2_{adj} 分别为 0.989 1 和 0.978 1, 变异系数为 2.99%, 说明实验值具有较高的精度和可靠性。以上分析数据说明该拟合回归方程可以用于实际提取益智仁多糖的得率预测。依据 F 值将 4 个因素对多糖提取率的影响进行排序, 影响顺序为: 超声波功率 > 液料比 > 酶添加质量分数 > 提取时间。研究发现, 超声功率和液料比对银杏叶多糖的提取得率也有显著影响^[15]。推测超声波功率是多糖得率决定性影响因素的原因是它对多糖的溶出速度与纤维素酶活性有双重影响。

2.2.3 变量间的交互作用

利用等高线图和 3D 曲面图可视化提取益智仁多糖过程中各个变量的交互作用。等高线曲线越弯

曲、曲面坡度越大, 该因素对结果影响越大^[16]。表 4 中交互项 X_1X_2 、 X_1X_4 ($P < 0.05$) 即液料比与提取时间、酶添加质量分数之间的交互作用对多糖得率影响显著, 其交互作用响应面图见图 3。

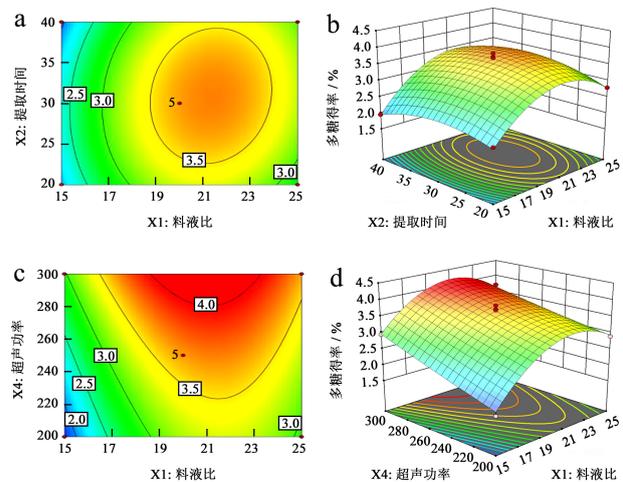


图 3 提取条件的交互作用

Fig.3 Interaction of extraction conditions

图 3a、3b 为纤维素酶质量浓度为 4%、提取功

率为 250 W 时，液料比和提取时间之间的交互作用。在液料比低于 20 mL/g 时，液料比和提取时间的增加能有效提升多糖得率。液料比为 20 mL/g 至 30 mL/g 时，得率随液料比和提取时间的增加而缓慢降低。这可能是因为在较高的液料比下，提取过程中产生的溶剂阻力大于短时间内提取时间增加的效益。如果继续延长提取时间，部分多糖也会因长时间的超声作用而分解，这时液料比和提取时间的

增加对得率产生了负面协同效应。

图 3c、3d 为纤维素酶质量浓度为 4%、提取时间处于 20 min 时，液料比和超声功率之间的交互作用。在液料比较低时，增加超声功率能更有效地破坏植物细胞壁，与液料比增加协同作用，促进多糖溶出。但是，当液料比增加到一定程度时，即使提高超声功率，也难以克服由高液料比造成的溶剂阻力，导致多糖得率出现缓慢下降的情况。

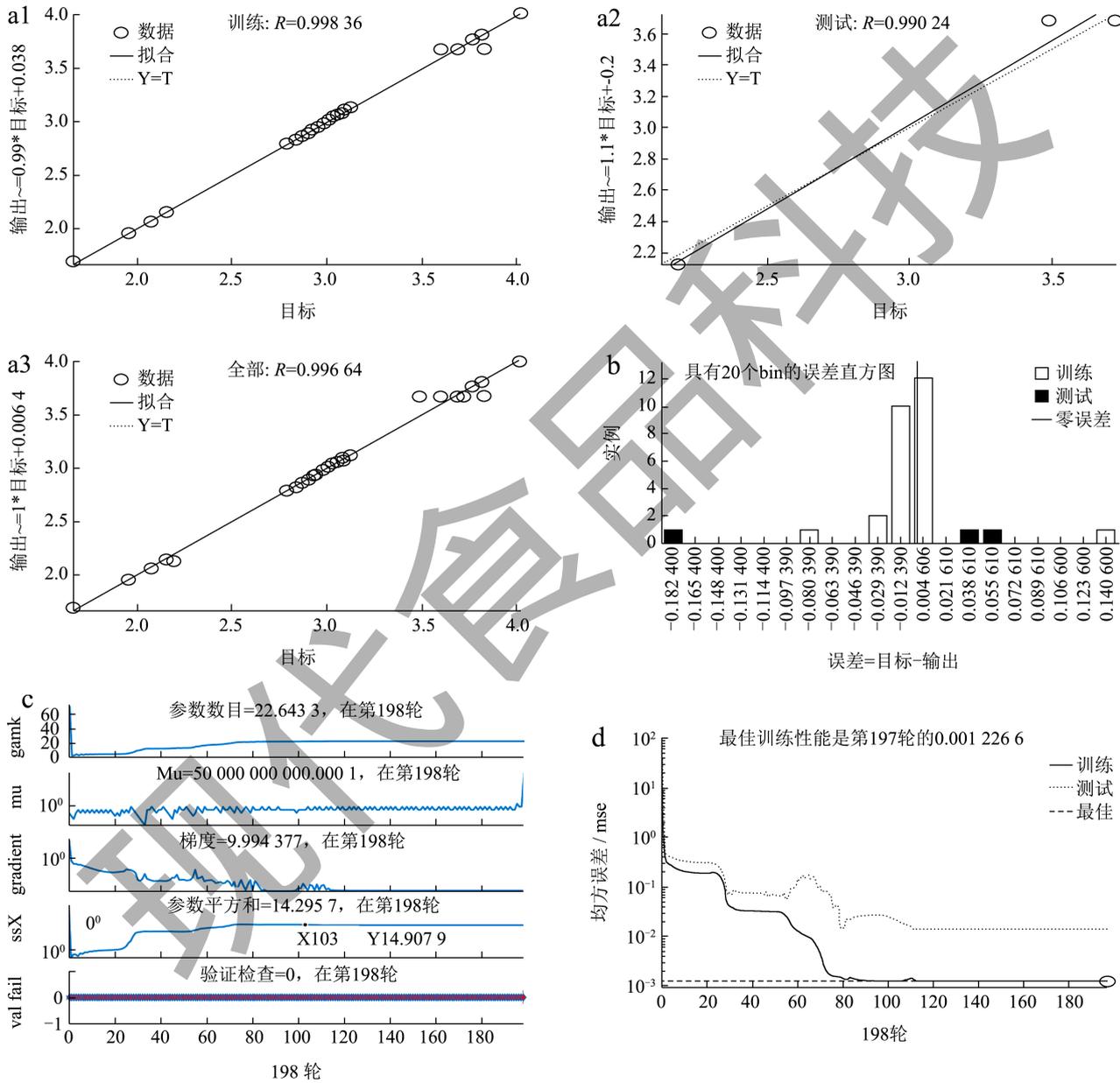


图 4 神经网络模型的建立和训练

Fig.4 Establishment and training of artificial neural network model

注:(a) 训练集、测试集和全部数据的线性回归;(b) 实际值和预测值误差直方图;(c) 训练状态;(d) 训练阶段 MSE 的演化。

2.3 人工神经网络模型建立和优化

根据响应面优化试验设计的益智仁多糖得率结果(表2)建立人工神经网络模型(图4)。由图4a可知,经过多次贝叶斯正则化法训练后,模型训练 $R=0.998\ 36$,测试 $R=0.990\ 24$,全数据 $R=0.996\ 64$,说明模型训练结果好。由图4d可知,在第197轮训练迭代,验证集均方误差达到最佳为0.001 226 6。图4b可视化了预测值和实际值之间的误差,数据大部分在零误差线 ± 0.05 范围内。上述结果说明人工神经网络模拟拟合效果较好,可以用于此次实验的预测。将人工神经网络建立的模型作为GA适应度函数全局优化,优化结果如表5。

2.4 最佳工艺参数验证实验

表5为响应面模型与人工神经网络模型优化预测结果,考虑到实验室实验设备的实际条件,采用液料比20 mL/g、提取时间30 min、酶添加质量分数4%、超声波功率300 W进行验证实验,实际多糖得率为4.20% ($N=3$),相较于杨鑫^[17]采用响应面优化得到热水提取海南益智仁多糖的得率3.18%,本试验优化得到的多糖得率高于热水提取32%。对于本试验,两模型都能较好的预测最终优化结果,说明人工神经网络模型表现出了更高的拟合度和更小的相对误差^[10]。

表5 优化结果比较

Table 5 Comparison of optimization results

模型	R^2	液料比 (mL/g)	提取 时间/ min	酶添加 质量分 数/%	超声 波功 率/W	预测 得率/ %	相对 误差/ %
响应面	0.989 1	20.45	29.93	3.92	298.05	4.17	0.72
人工神经网络	0.993 3	21.11	31.23	3.88	300	4.22	0.52

2.5 红外光谱、紫外光谱结果

图5a为益智仁多糖的红外光谱图,3 396 cm^{-1} 附近有宽并且较强的吸收峰,由O-H伸缩振动产生,是多糖特征吸收峰;2 922 cm^{-1} 附近吸收峰是甲基或亚甲基的C-H伸缩振动;1 240~1 410 cm^{-1} 处的强峰代表了C-H的变角振动峰,以上三个区域的吸收峰与多糖类物质结构特征^[18]相符合。1 739 cm^{-1} 附近的特征吸收峰为羧基酯化C=O伸缩振动。1 616与1 416 cm^{-1} 是-COO-伸缩振动引起的,表明多糖中含有糖醛酸^[19]。1 022~1 100 cm^{-1} 出峰说明该多糖含有吡喃糖环^[20]。

图5b为200~300 nm下益智仁多糖的紫外吸收光谱,在260、280 nm下未见明显吸收峰,说明该多糖中蛋白质和核酸质量浓度较小,脱蛋白效果较好。

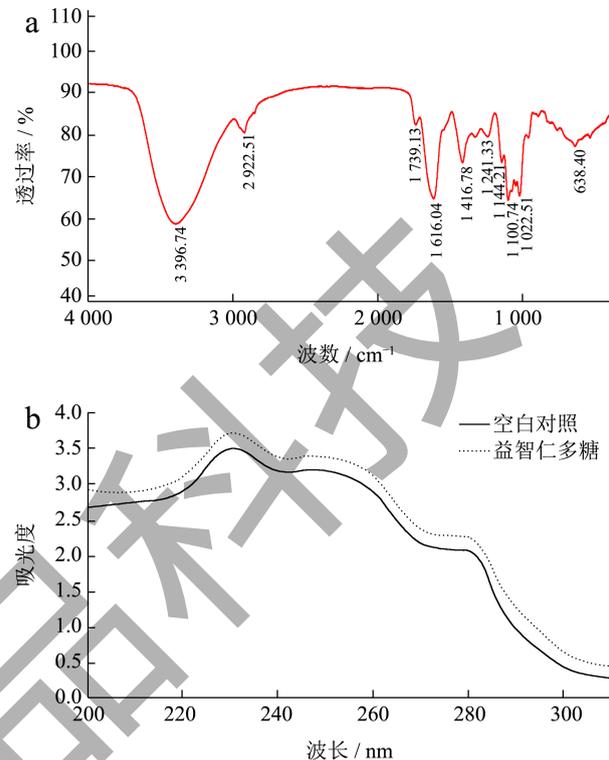


图5 益智仁多糖的红外光谱(a)和紫外光谱(b)

Fig.5 IR and UV spectra of AOF polysaccharide

2.6 益智仁多糖体外总抗氧化活性

如图6所示,采用ABTS法和FRAP法评价了不同质量浓度益智仁多糖的抗氧化活性,当益智仁多糖质量浓度在80~300 $\mu\text{g/mL}$ 时,总抗氧化能力、铁离子还原能力随多糖质量浓度增加而提高($P<0.05$),具有剂量-效应关系。当益智仁质量浓度为300 $\mu\text{g/mL}$ 时,ABTS法测得的总抗氧化能力为80.76 $\mu\text{mol TE/mL}$,FARA法测得的铁离子还原能力为133.6 $\mu\text{mol FeE/mL}$,表明益智仁多糖具有一定的体外抗氧化能力。此项发现与戴康伟等^[12]对红枣多糖的研究和夏晓月等^[21]对富银茶多糖的研究结果相呼应,他们在探讨多糖抗氧化特性时也发现了类似的剂量-效应关系,展现了多糖类物质作为潜在抗氧化剂的应用前景。

2.7 益智仁多糖对肠炎斑马鱼氧化应激水平的影响

总抗氧化能力可衡量机体应对氧化应激的能力。如图7a、7b所示,与正常组相比,模型组总

抗氧化能力显著降低 ($P < 0.05$)。在给予质量浓度 130、180 $\mu\text{g/mL}$ 的益智仁多糖后, 肠炎斑马鱼总抗氧化能力显著提升 ($P < 0.05$), 表明高质量浓度的益智仁多糖可以提高肠炎斑马鱼体内抗氧化物水平, 增强其调节氧化应激能力。如图 7c 所示, 相较正常对照组, 模型组斑马鱼体内 NO 质量浓度显著升高 ($P < 0.05$), 这一现象与炎症性肠病会提高机体 NO 水平^[22]相符。李悦等^[23]也发现炎症性肠病常伴随一氧化氮合酶 (Inducible Nitric Oxide Sythase, iNOS) 的高表达, 产生过量的 NO 或 NO 产物 (如亚硝酸盐、硝酸盐)。过量 NO 不仅会与超氧阴离子形成活性氧代谢产物, 对机体造成氧化损伤, 还能降低抗氧化酶系 - 超氧化物歧化酶活性, 削弱机体应对氧化应激的能力^[24], 这也可能是肠炎斑马鱼总抗氧化能力下降的原因之一。经质量浓度 130、180 $\mu\text{g/mL}$ 益智仁多糖干预后, 肠炎斑马鱼体内 NO 水平下降 ($P < 0.05$), 与正常对照组相比无显著差异。以上结果说明, 益智仁多糖能提升肠炎斑马体内抗氧化活性, 增强机体对氧化应激的调节能力。

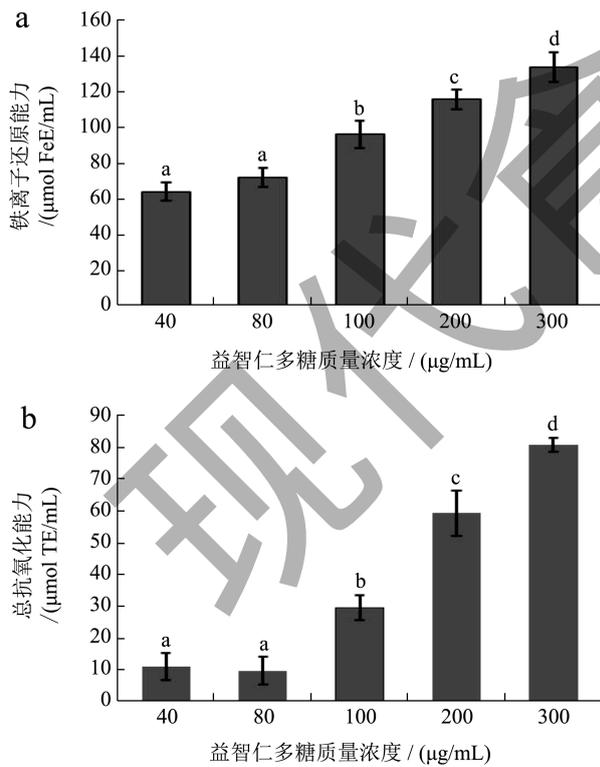


图 6 不同质量浓度益智仁多糖的体外抗氧化活性
Fig.6 Total antioxidant activity of AOF polysaccharide at different concentrations

注: (a) ABTS 方法; (b) FRAP 方法。

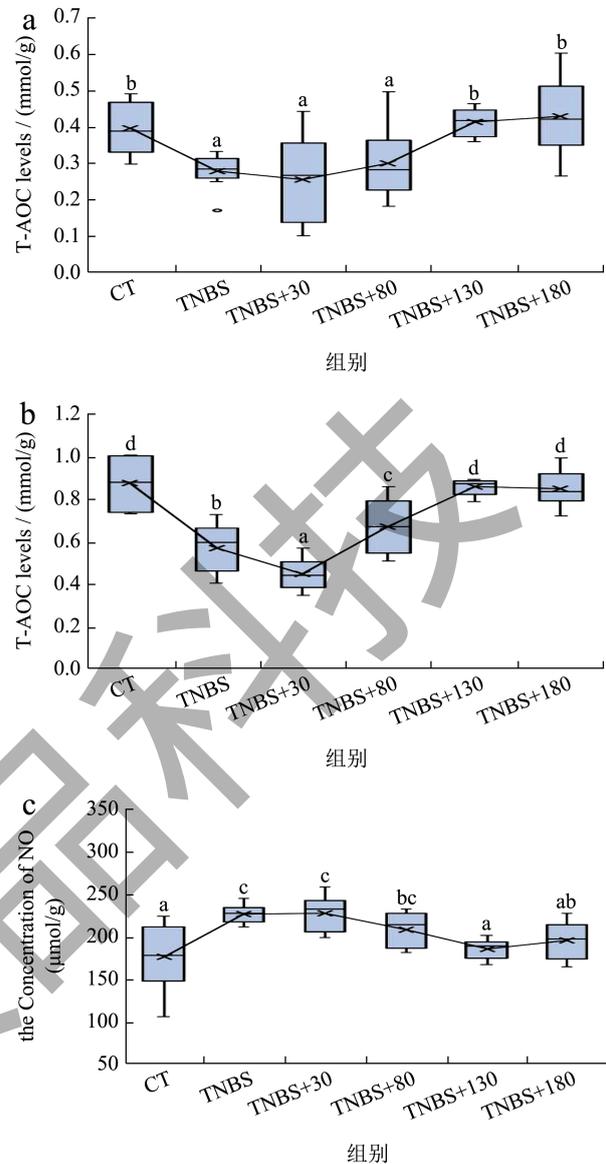


图 7 斑马鱼体内氧化应激水平

Fig.7 Oxidative stress level in zebrafish

注: (a) 总抗氧化能力 (ABTS 法); (b) 总抗氧化能力 (FRAP 法); (c) NO 质量浓度。

2.8 益智仁多糖对肠炎斑马鱼 $\text{INF-}\gamma$ 和 IL-10 mRNA 表达水平的影响

炎症性肠病的发展在很大程度上受细胞因子调控^[25,26]。由图 8a 可知, TNBS 处理显著增加了斑马鱼 $\text{INF-}\gamma$ 相对表达 ($P < 0.05$), 降低了 IL-10 表达水平 ($P < 0.05$)。采用质量浓度 80~180 $\mu\text{g/mL}$ 益智仁多糖干预后, 有效抑制了 $\text{INF-}\gamma$ 高表达和 IL-10 低表达。 $\text{INF-}\gamma$ 是促炎细胞因子, IL-10 是抗炎细胞因子, $\text{INF-}\gamma/\text{IL-10}$ 的比值可以侧面反映机体免疫稳态^[27,28]。如图 8b 所示, TNBS 模型组的 $\text{INF-}\gamma/\text{IL-10}$

比值是空白对照组的 5 倍, 经不同质量浓度益智仁多糖干预, IFN- γ /IL-10 比值显著下降 ($P < 0.05$), 具有剂量 - 效应关系。Lv 等^[28] 研究中 TNBS 诱导的结肠炎小鼠 IFN- γ 和 IL-10 的表达也呈现出了相似变化, 其结果显示了牛磺熊去氧胆酸在调节多种细胞因子 (如 IFN- γ 、IL-10、IL-17A、IL-4 等) 表达, 以及 Th1/Th2 和 Th17/Treg 免疫应答平衡中的潜力, 表明天然化合物可以作为调节炎症反应的潜在手段。由于 IFN- γ 能刺激免疫细胞产生 NO^[29], 故推测 TNBS 处理会引发细胞因子失衡, 产生过量 NO, 导致氧化应激。益智仁多糖通过调节促炎 / 抗炎细胞因子表达, 增强机体应对氧化应激的能力, 缓解炎症损伤。

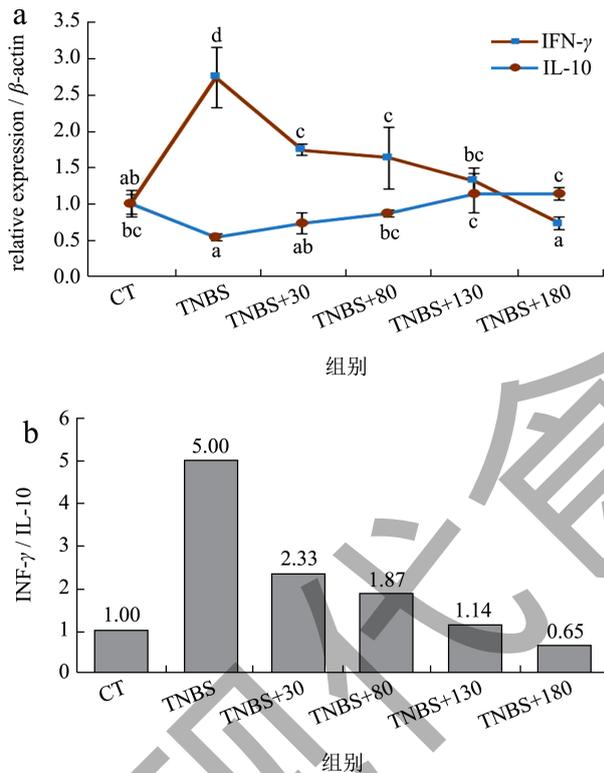


图 8 (a) IFN- γ 和 IL-10 mRNA 的相对表达量;
(b) IFN- γ 和 IL-10 mRNA 的相对表达量的比值

Fig.8 (a) Relative mRNA expression of IFN- γ and IL-10;
(b) Ratio of relative mRNA expression of IFN- γ and IL-10

3 结论

本研究采用响应面试验与人工神经网络模型对超声波辅助酶法提取益智仁多糖工艺条件进行优化。当液料比为 20 (mL/g), 提取时间为 30 min, 酶添加质量分数为 4%, 超声波功率为 300 W 时, 益智仁多糖得率最高, 为 4.20%。红外光谱显示该

多糖具有多糖特征吸收峰, 结构中存在吡喃糖环。益智仁多糖质量浓度为 80~300 μ g/mL 时, 总抗氧化能力呈剂量 - 效应关系。动物实验表明, 益智仁多糖能改善 TNBS 诱导的结肠炎斑马鱼体内细胞因子 INF- γ /IL-10 的失衡。该研究结果为开发益智仁胃肠道保护功能产品提供理论依据, 助力益智仁产业高质量发展。

参考文献

- [1] 王云龙, 贾英. 益智的研究进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(5): 126-131.
- [2] 王宝艳, 井子杨, 任喜康, 等. 近 5 年益智化学成分与药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2023, 39(4): 120-127.
- [3] 陈旻湖, 毛仁. 中国炎症性肠病研究 40 年 (1980-2020) [J]. 中华消化杂志, 2021, 41(9): 5.
- [4] 许梦粤, 曾长立, 王红波. 药食同源植物多糖提取方法、结构解析和生物活性研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2023, 44(19): 216-224.
- [5] ZHOU S, HUANG G. Extraction, derivatization, and antioxidant activity of *Morinda citrifolia* polysaccharide [J]. Chemical Biology and Drug Design, 2022, 99(4): 603-608.
- [6] WU G, DONG H, DING M, et al. Subcritical water extraction of polysaccharides from *Gastrodiae rhizoma*: optimization, characterization and *in vitro* hepatoprotective activity [J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2024, 54(5): 612-621.
- [7] GUENDOUZI S, BENMATI M, BOUNABI H, et al. Application of response surface methodology coupled with artificial neural network and genetic algorithm to model and optimize symbiotic interactions between *Chlorella vulgaris* and *Stutzerimonas stutzeri* strain J3BG for chlorophyll accumulation [J]. Bioresource Technology, 2023, 394: 130148.
- [8] 渠宏雁, 李学鹏, 陈永泉. 提取条件对蜂花粉粗多糖抗氧化能力的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(2): 22-28.
- [9] 黄俊源, 袁晚晴, 苏艺, 等. 酶解糖化滇黄精多糖的结构表征及其免疫活性 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(4): 104-112.
- [10] TAN J, CUI P, GE S, et al. Ultrasound assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from *Cornus officinalis* fruit: modeling, optimization, purification, and characterization [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 84: 105966.
- [11] WANG D, ZHANG M, LAW C L, et al. Natural deep eutectic solvents for the extraction of lentinan from shiitake mushroom: COSMO-RS screening and ANN-GA optimizing conditions [J]. Food Chemistry, 2024, 430: 136990.
- [12] 戴康伟, 邹晓琴, 张名位, 等. 红枣多糖超高压耦合低共熔溶剂提取工艺优化及其抗氧化活性 [J]. 现代食品科

- 技,2024,40(8):243-251.
- [13] YUN C, WANG S, GAO Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted enzymatic pretreatment for enhanced extraction of baicalein and wogonin from *Scutellaria baicalensis* roots [J]. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2022, 1188: 123077.
- [14] XUE F, LI C. Effects of ultrasound assisted cell wall disruption on physicochemical properties of *camellia* bee pollen protein isolates [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 92: 106249.
- [15] LIN B, WANG S, ZHOU A, et al. Ultrasound-assisted enzyme extraction and properties of Shatian pomelo peel polysaccharide [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 98: 106507.
- [16] ZHU Y, YU J, JIAO C, et al. Optimization of quercetin extraction method in *Dendrobium officinale* by response surface methodology [J]. Heliyon, 2019, 5(9): e02374.
- [17] 杨鑫. 益智仁多糖的结构特征和免疫调节活性研究[D]. 海口:海南大学,2022.
- [18] 张巧铃,蒋小华,张洁,等. 罗汉果干果多糖的分离纯化、结构表征及其体外免疫调节活性[J/OL]. 食品科学, 1-18 [2024-03-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20240129.1835.012.html>.
- [19] HU H, LIANG H, WU Y. Isolation, purification and structural characterization of polysaccharide from *Acanthopanax brachypus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 127: 94-100.
- [20] XU Y, LIU N, FU X, et al. Structural characteristics, biological, rheological and thermal properties of the polysaccharide and the degraded polysaccharide from raspberry fruits [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 109-118.
- [21] 夏晓月,关丽萍,纪丽丽,等. 富锗茶多糖提取物的抗氧化活性及其对H₂O₂诱导LO₂细胞氧化损伤保护研究[J]. 食品安全质量检测学报,2023,14(22):19-28.
- [22] AVDAGIĆ N, ZACIRAGIĆ A, BABIĆ N, et al. Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease [J]. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2013, 13(1): 5-9.
- [23] 李悦,武华. 复合膳食纤维对炎症性肠病大鼠血清NO浓度和肠黏膜iNOS的影响[J]. 中国普通外科杂志,2010, 19(10):1153-1155.
- [24] 周国胜,吴正祥. 一氧化氮与炎症性肠病[J]. 安徽医药, 2008,11:1010-1012.
- [25] FRIEDRICH M, POHIN M, POWRIE F. Cytokine networks in the pathophysiology of inflammatory bowel disease [J]. Immunity, 2019, 50(4): 992-1006.
- [26] LEPPKES M, NEURATH M F. Cytokines in inflammatory bowel diseases-update 2020 [J]. Pharmacological Research, 2020, 158: 104835.
- [27] WEI W, MU S, HAN Y, et al. Gpr174 knockout alleviates DSS-induced colitis via regulating the immune function of dendritic cells [J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 841254.
- [28] LV L, CHEN Z, BAI W, et al. Taurohyodeoxycholic acid alleviates trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis via regulating Th1/Th2 and Th17/Treg cells balance [J]. Life Sciences, 2023, 318: 121501.
- [29] 陈侠. 干扰素- γ 抑制小胶质细胞氧化损伤的作用和机制研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2010.