

基于复合酶的黄蜀葵花多糖提取工艺优化及多糖的活性研究^Δ

刘 鸽^{1*}, 罗 成², 柴慧芳¹, 李 彦¹, 鹿 田^{3#}(1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 贵州中医药大学贵州省苗医药全省重点实验室, 贵阳 550025)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)18-2369-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.18.04



摘要 目的 优化黄蜀葵花多糖的提取工艺, 探讨多糖的抗氧化活性及保湿、吸湿活性。方法 采用正交实验确定复合酶最优配比, 通过单因素实验和 Box-Behnken 响应面法优化多糖的提取工艺并进行验证; 采用 2, 2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)法、Fenton-水杨酸显色法、邻苯三酚自氧化法、铁氰化钾还原法分别考察多糖对 ABTS 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基的清除率及总还原能力; 通过称量法考察多糖的吸湿及保湿活性。结果 复合酶最优配比为木瓜蛋白酶 136 000 U、果胶酶 125 000 U、纤维素酶 5 000 U; 最优提取工艺为酶解时间 2.8 h、酶解温度 57.50 °C、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲盐溶液 pH5.5、料液比 1:40。经 3 次实验验证, 平均多糖提取率为 23.595%, RSD 为 0.90%。所得多糖对 ABTS 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除率及总还原能力分别为 81.759%、87.110%、54.244%、1.129(多糖质量浓度分别为 10、5、10、10 mg/mL)。在 43% 相对湿度环境下放置 12 h 时, 多糖的保湿率和吸湿率分别为 99.387%、100.478%; 在 83% 相对湿度环境下放置 12 h 时, 多糖的保湿率和吸湿率分别为 99.764%、100.455%。结论 基于复合酶的黄蜀葵花多糖的最优提取工艺稳定、可行; 该工艺下所得多糖具有良好的抗氧化、保湿及吸湿活性。

关键词 黄蜀葵花; 多糖; 复合酶; 响应面法; 抗氧化; 保湿; 吸湿

Optimization of polysaccharide extraction from *Abelmoschus manihot* flowers using composite enzymes and a study on the activities of the polysaccharides

LIU Ge¹, LUO Cheng², CHAI Huifang¹, LI Yan¹, LU Tian³ (1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou Provincial Key Laboratory of Miao Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize the extraction process of polysaccharides from *Abelmoschus manihot* flowers, and to investigate the antioxidant, moisturizing and hygroscopicity activities of the polysaccharides. **METHODS** The optimal ratio of composite enzymes was determined by orthogonal experiments, and the extraction process of polysaccharides was optimized by single-factor experiments and Box-Behnken response surface methodology, and validated. The scavenging rates of 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radicals, hydroxyl free radicals, and superoxide anion free radicals, as well as the total reducing ability of the polysaccharides were investigated by the ABTS method, Fenton-salicylic acid colorimetric method, pyrogallol autoxidation method, and potassium ferricyanide reduction method, respectively. The moisturizing and hygroscopicity activities of the polysaccharides were evaluated by the weighing method. **RESULTS** The optimal ratio of composite enzymes was 136 000 U of papain, 125 000 U of pectinase, and 5 000 U of cellulase. The optimal extraction process was as follows: enzymatic hydrolysis time of 2.8 h, enzymatic hydrolysis temperature of 57.50 °C, pH of the sodium dihydrogen phosphate-disodium hydrogen phosphate buffer was 5.5, and solid-to-liquid ratio of 1:40. The results of three experiments showed that the average polysaccharides extraction rate of 23.595%, with an RSD of 0.90%. The scavenging rates of ABTS free radicals, hydroxyl free radicals, superoxide anion free radicals, and total reducing ability were 81.759%, 87.110%, 54.244%, and 1.129 (the mass concentrations of polysaccharides were 10、5、10, and 10 mg/mL, respectively), respectively. At relative humidity of 43% for 12 h,

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.22207022); 贵州省科技计划项目(No.黔科合基础 MS[2026]658, No.黔科合基础-ZK[2022]一般 455)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 中药及民族药的基础研究与开发。E-mail: 2337059909@qq.com

通信作者 讲师, 博士。研究方向: 靶向蛋白小分子抑制剂的发现及研究。E-mail: 1694730341@qq.com

the moisturizing rate and hygroscopicity rate of polysaccharides were 99.387% and 100.478%, respectively; at relative humidity of 83% for 12 h, they were 99.764% and 100.455%, respectively.

CONCLUSIONS The optimal extraction process of polysaccharides from *A. manihot* flowers based on the composite enzymes is stable and feasible; the polysaccharides obtained under this

process have good antioxidant, moisturizing, and hygroscopicity activities.

KEYWORDS *Abelmoschus manihot* flowers; polysaccharides; composite enzymes; response surface methodology; antioxidant activity; moisturizing; hygroscopicity

黄蜀葵为锦葵科植物黄蜀葵 *Abelmoschus manihot* (L.) Medic. 的干燥花冠,性寒、味甘,归肾、膀胱经,具有清利湿热、消肿解毒等功效^[1]。黄蜀葵富含黄酮类、有机酸类、多糖及挥发油等多种生物活性成分^[2],其中多糖在抗肿瘤^[3]、抗糖尿病^[4]、抗凝血^[5]、抗氧化^[6]等方面已表现出广泛的生物活性。目前,黄蜀葵多糖的提取多采用传统热水提取法,该工艺虽然操作简便、成本低廉,但存在提取效率低、高温易破坏多糖天然结构等不足。酶提取法可通过酶分解植物细胞壁,在保留多糖结构和活性的同时促进多糖的释放^[7]。有研究发现,植物细胞壁成分复杂,单酶分解效率有限,复合酶提取可通过多种酶的协同降解作用,高效破坏植物的致密细胞壁结构,促进多糖溶出,且提取条件温和,能够完整保留多糖的结构与活性基团^[8]。

有研究表明,氧自由基过量时,可对细胞、蛋白质及DNA造成氧化损伤,破坏其正常结构,诱发或加重细胞衰老、炎症,进而引发糖尿病和免疫功能障碍,严重威胁人体健康^[9-10]。植物多糖具有独特的分子量、单糖组成和构型,其作为天然抗氧化剂受到学界广泛关注;多糖分子链上带有还原性半缩醛羟基,可通过直接清除氧自由基、终止自由基链式反应发挥抗氧化作用,且具有毒性低、生物相容性好的优势^[11]。研究发现,多糖分子结构中富含大量羟基、羧基等亲水基团,这些亲水基团通过氢键和水结合锁住水分;同时,多糖内部通过分子链交织形成的网络结构,可延缓水分散失^[12],可作为天然保湿剂用于护肤品和外用保湿剂的开发。因此,探究黄蜀葵多糖的抗氧化、保湿及吸湿活性具有重要意义。为此,本研究采用正交实验优化复合酶的最优配比;采用 Box-Behnken 响应面法优化黄蜀葵多糖的提取工艺;采用 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]法、Fenton-水杨酸显色法、邻苯三酚自氧化法、铁氰化钾还原法和称重法分别测定多糖的抗氧化活性及保湿、吸湿活性,旨在为黄蜀葵花的综合开发利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 HWS-24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)、FD-1A-50 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)、N-1300 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)、pHS-25 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)、UV5500H 型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司)等。

1.2 药品与试剂

木瓜蛋白酶(批号 24240706002)、抗坏血酸(纯度 99.0%,批号 34240304003)、三羟甲基氨基甲烷(纯度

99.0%,批号 74240517011)均购自北京索莱宝科技有限公司;甘油(批号 20250307)购自天津市风船化学试剂科技有限公司;果胶酶(批号 S10007)、纤维素酶(批号 S10041)均购自上海源叶生物科技有限公司;铁氰化钾(纯度 99.9%,批号 C17999631)、硫酸亚铁(纯度 90.0%,批号 C16957968)、ABTS 二铵盐(纯度 98.0%,批号 A800764)、过硫酸钾(纯度 98.0%,批号 C16376631)、焦性没食子酸(纯度 98.0%,批号 C16376631)均购自上海麦克林生化科技股份有限公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、盐酸、30%过氧化氢均为分析纯。

黄蜀葵药材采集于贵州省黔西南州安龙县种植基地,由贵州中医药大学药学院吴之坤教授鉴定为锦葵科植物黄蜀葵 *A. manihot* (L.) Medic. 的干燥花冠。

2 方法与结果

2.1 黄蜀葵多糖提取方法

称取黄蜀葵干燥药材,粉碎,过 60 目筛。取样品粉末适量,按料液比 1:10(g/mL,下同)加入 95%乙醇,回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,药渣干燥备用。取药渣,加入一定量单酶(木瓜蛋白酶或果胶酶或纤维素酶),再加入相应料液比的缓冲液(磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲盐溶液,下同)调节至对应 pH,然后于水浴锅中酶解;酶解结束后,于 90 °C 水浴中灭活 15 min;随后,取酶提液,以 9 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入 95%乙醇,使溶液中乙醇的体积分数为 75%,静置 12 h,收集絮状沉淀,冻干,即得黄蜀葵多糖,根据下式计算多糖提取率:多糖提取率 = $\frac{C \times V \times N}{m} \times 100\%$ [式中, C 表示提取液中多糖质量浓度(mg/mL); V 表示提取液体积(mL); N 表示稀释倍数; m 表示药材粉末质量(mg)]。

2.2 复合酶添加量筛选

2.2.1 单因素筛选单酶添加量

取黄蜀葵干燥药材,按“2.1”项下方法提取,设置酶解温度 50 °C、酶解时间 2.5 h、缓冲液 pH 5.5、料液比 1:35,分别加入一定量的不同单酶(木瓜蛋白酶或果胶酶或纤维素酶)提取多糖,考察不同单酶添加量对多糖提取率的影响,每种酶的添加量设置 5 个水平(木瓜蛋白酶为 112 000、120 000、128 000、136 000、144 000 U;果胶酶为 115 000、120 000、125 000、130 000、135 000 U;纤维素酶为 3 500、4 000、4 500、5 000、5 500 U),每个水平设计 3 组平行实验。结果(图 1)显示,随着木瓜蛋白酶、果胶酶、纤维素酶添加量的增加,多糖提取率均呈先增加后降低的趋势,且酶添加量分别为 136 000、125 000、5 000 U 时,多糖提取率最高。其原因可能为酶的添加量过高,会水解多糖,导致多糖提取率降低。因此,本研究选择最优单酶添加量分别为木瓜蛋白酶 136 000 U、果胶酶 125 000 U、纤维素酶 5 000 U。

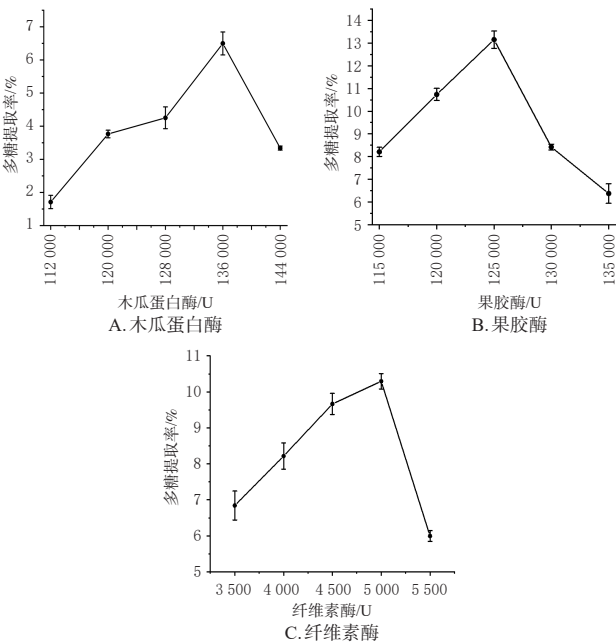


图1 不同单酶添加量对多糖提取率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2.2 正交实验确定复合酶添加量

取黄蜀葵花干燥药材,按“2.1”项下方法提取,根据“2.2.1”项下结果,以多糖提取率为响应值,木瓜蛋白酶(A)、果胶酶(B)、纤维素酶(C)添加量为指标,采用3因素3水平进行正交实验。因素与水平见表1,实验方案与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 正交实验因素与水平

水平	A/U	B/U	C/U
1	128 000	120 000	4 500
2	136 000	125 000	5 000
3	144 000	130 000	5 500

表2 正交实验方案与结果

实验号	A/U	B/U	C/U	D(空白误差)	多糖提取率/%
1	1	1	1	1	11.706
2	1	2	2	2	15.216
3	1	3	3	3	11.505
4	2	1	2	3	16.874
5	2	2	3	1	14.163
6	2	3	1	2	14.611
7	3	1	3	2	7.442
8	3	2	1	3	12.752
9	3	3	2	1	10.703
k_1	12.809	12.007	13.023	12.191	
k_2	15.228	14.044	14.264	12.423	
k_3	10.299	12.273	11.037	13.710	
R	4.929	2.037	3.227	1.519	

表3 正交实验方差分析结果

来源	Ⅲ类平方和	自由度	均方	F	P
A	108.817	2	54.408	88.479	<0.01
B	22.061	2	11.031	17.938	<0.01
C	47.723	2	23.862	38.804	<0.01
D(空白误差)	12.299	20	0.615		
总计	4 597.087	27			
修正后总计	190.900	26			

由表2可知,木瓜蛋白酶对多糖提取率的影响最大,其次是纤维素酶和果胶酶。由表3可知,3种酶对多糖提取率的影响均显著(调整后的 R^2 为0.916, $P<0.01$);由表2得到复合酶的最优配比为 $A_2B_2C_2$,即木瓜蛋白酶136 000 U、果胶酶125 000 U、纤维素酶5 000 U。在此条件下进行3次重复实验,得到多糖提取率分别为17.488%、17.606%、17.369%,平均为17.488%,RSD为0.68%($n=3$)。

2.2.3 单酶与复合酶提取效果比较

取黄蜀葵花干燥药材,按“2.1”项下方法提取,分别加入不同单酶(木瓜蛋白酶136 000 U或果胶酶125 000 U或纤维素酶5 000 U)和复合酶(木瓜蛋白酶136 000 U+果胶酶125 000 U+纤维素酶5 000 U)提取多糖。结果显示,复合酶的多糖提取率为17.488%,高于各单酶的多糖提取率(木瓜蛋白酶、果胶酶、纤维素酶条件下提取率分别为6.498%、13.153%、10.295%)。与单酶相比,复合酶具有更强的分解能力,多酶协作更有利于植物细胞壁分解,促进多糖释放^[8],故后续实验均采用复合酶(木瓜蛋白酶136 000 U+果胶酶125 000 U+纤维素酶5 000 U)提取多糖。

2.3 复合酶提取黄蜀葵花多糖工艺优化

2.3.1 单因素实验

(1)酶解时间:取黄蜀葵花干燥药材,加入“2.2.2”项下最优配比的复合酶,按“2.1”项下方法提取,设置酶解温度为50℃、缓冲液pH为5.5、料液比为1:35,考察不同酶解时间(1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h)对多糖提取率的影响。平行操作3次。结果(图2A)显示,随着酶解时间的延长,多糖提取率呈先增加后降低的趋势;当酶解时间为2.5 h时,多糖提取率最高(20.22%)。其原因可能为随着酶解时间延长,部分多糖发生水解,同时酶活性降低,导致多糖提取率降低。因此,选择酶解时间2.5 h进行后续实验。

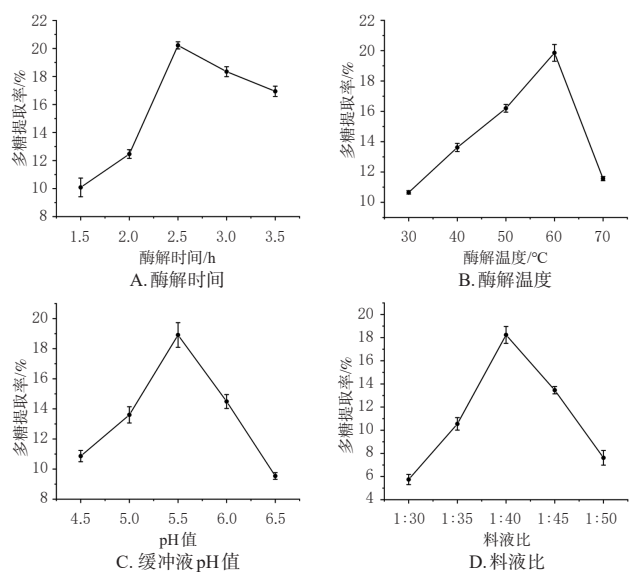


图2 多糖提取率的单因素实验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

(2)酶解温度:取黄蜀葵花干燥药材,加入“2.2.2”项下最优配比的复合酶,按“2.1”项下方法提取,设置酶解时间为2.5 h、缓冲液pH为5.5、料液比为1:35,考察不同酶解温度(30、40、50、60、70℃)对多糖提取率的影响。平行操作3次。结果(图2B)显示,随着酶解温度的增加,多糖提取率呈先增加后降低的趋势;当酶解温度为60℃时,多糖提取率最高(19.85%)。其原因可能为温度过低会抑制酶活力;温度过高会使酶变性失活。因此,选择酶解温度60℃进行后续实验。

(3)缓冲液pH:取黄蜀葵花干燥药材,加入“2.2.2”项下最优配比的复合酶,按“2.1”项下方法提取,设置酶解温度为50℃、酶解时间为2.5 h、料液比为1:35,考虑不同缓冲液pH(4.5、5.0、5.5、6.0、6.5)对多糖提取率的影响。平行操作3次。结果(图2C)显示,随着缓冲液pH的增加,多糖提取率呈先增加后降低的趋势;当缓冲液pH为5.5时,多糖提取率最高(18.91%)。其原因可能为复合酶蛋白受到酸碱环境的影响,蛋白结构构象改变,最终导致酶活力发生变化^[13]。因此,选择缓冲液pH5.5进行后续实验。

(4)料液比:取黄蜀葵花干燥药材,加入“2.2.2”项下最优配比的复合酶,按“2.1”项下方法提取,设置酶解温度为50℃、酶解时间为2.5 h、缓冲液pH为5.5,考察不同料液比(1:30、1:35、1:40、1:45、1:50)对多糖提取率的影响。平行操作3次。结果(图2D)显示,随着料液比的增加,多糖提取率呈先增加后降低的趋势;当料液比为1:40时,多糖提取率最高(18.23%)。其原因可能为溶剂增加扩大了复合酶与药材的接触面积,从而使更多的多糖被溶出;但随着溶剂的继续增加,反应体系中酶浓度降低,酶解效率降低,最终导致提取率降低^[14]。因此,选择料液比1:40进行后续实验。

2.3.2 Box-Behnken响应面法的实验设计与结果

以酶解时间(*A*)、酶解温度(*B*)、缓冲液pH(*C*)、料液比(*D*)为自变量,以多糖提取率为因变量,采用Box-Behnken响应面法设计进行实验。因素与水平见表4,实验方案与结果见表5,方差分析结果见表6。

表4 因素与水平

水平	<i>A</i> /h	<i>B</i> /℃	<i>C</i>	<i>D</i>
1	2	50	5	1:35
0	2.5	60	5.5	1:40
-1	3	70	6	1:45

利用Design-Expert 13软件对上述结果进行多元回归拟合,得回归方程: $Y=24.550\ 0+0.116\ 7A-0.627\ 5B+0.365\ 8C-0.700\ 0D-0.732\ 5AB-0.837\ 5AC+0.350\ 0AD-1.060\ 0BC-0.547\ 5BD+0.047\ 5CD-3.260\ 0A^2-2.210\ 0B^2-2.730\ 0C^2-3.190\ 0D^2$ 。由表6可知,该模型方差显著($P<0.000\ 1$),失拟项不显著($P=0.239\ 3>0.05$),表明模型拟合较好。模型的决定系数 R^2 为0.987 4,变异系数(CV)为1.95%,表明模型实测值与预测值拟合度极高,该模型可用于预测多糖提取率。各因素对多糖提取率影响依次为 $D>B>C>A$;一次项 B 、 C 、 D ,二次项 A^2 、 B^2 、

表5 Box-Behnken响应面法实验方案与结果

试验号	<i>A</i> /h	<i>B</i> /℃	<i>C</i>	<i>D</i>	多糖提取率/%
1	2	50	5.5	40	18.59
2	3	50	5.5	40	20.27
3	2	70	5.5	40	19.41
4	3	70	5.5	40	18.16
5	2.5	60	5	35	18.91
6	2.5	60	6	35	20.08
7	2.5	60	5	45	17.15
8	2.5	60	6	45	18.51
9	2	60	5.5	35	18.67
10	3	60	5.5	35	18.31
11	2	60	5.5	45	17.17
12	3	60	5.5	45	18.21
13	2.5	50	5	40	18.86
14	2.5	70	5	40	19.66
15	2.5	50	6	40	21.65
16	2.5	70	6	40	18.22
17	2	60	5	40	17.51
18	3	60	5	40	19.32
19	2	60	6	40	19.43
20	3	60	6	40	17.90
21	2.5	50	5.5	35	20.36
22	2.5	70	5.5	35	19.65
23	2.5	50	5.5	45	19.72
24	2.5	70	5.5	45	16.82
25	2.5	60	5.5	40	24.20
26	2.5	60	5.5	40	24.75
27	2.5	60	5.5	40	24.33
28	2.5	60	5.5	40	25.03
29	2.5	60	5.5	40	24.59

表6 Box-Behnken响应面法实验方差分析结果

来源	平方和	自由度	标准误差	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	163.440 0	14	163.440 0	78.060 0	<0.000 1
<i>A</i>	0.163 3	1	0.163 3	1.090 0	0.313 7
<i>B</i>	4.730 0	1	4.730 0	31.590 0	<0.000 1
<i>C</i>	1.610 0	1	1.610 0	10.740 0	0.005 5
<i>D</i>	5.880 0	1	5.880 0	39.320 0	<0.000 1
<i>AB</i>	2.150 0	1	2.150 0	14.350 0	0.002 0
<i>AC</i>	2.810 0	1	2.810 0	18.760 0	0.000 7
<i>AD</i>	0.490 0	1	0.490 0	3.280 0	0.091 8
<i>BC</i>	4.470 0	1	4.470 0	29.910 0	<0.000 1
<i>BD</i>	1.200 0	1	1.200 0	8.020 0	0.013 3
<i>CD</i>	0.009 0	1	0.009 0	0.060 3	0.809 5
<i>A</i> ²	69.100 0	1	69.100 0	462.050 0	<0.000 1
<i>B</i> ²	31.690 0	1	31.690 0	211.860 0	<0.000 1
<i>C</i> ²	48.440 0	1	48.440 0	323.880 0	<0.000 1
<i>D</i> ²	65.860 0	1	65.860 0	440.370 0	<0.000 1
残差	2.090 0	14	0.149 6		
失拟项	1.770 0	10	0.176 6	2.150 0	0.239 3
误差	0.328 1	4	0.082 0		
总和	165.530 0	28			

C^2 、 D^2 ,交互项 AB 、 AC 、 BC 、 BD 对多糖提取率的影响有统计学意义($P<0.05$)。各因素交互作用的响应面图与等高线图见图3。

2.3.3 最优提取工艺的确定与验证

采用Design-Expert 13软件预测得到复合酶提取多糖的最优工艺为:酶解时间2.82 h、酶解温度57.53℃、缓冲液pH5.5、料液比1:39.74,预测多糖提取率为

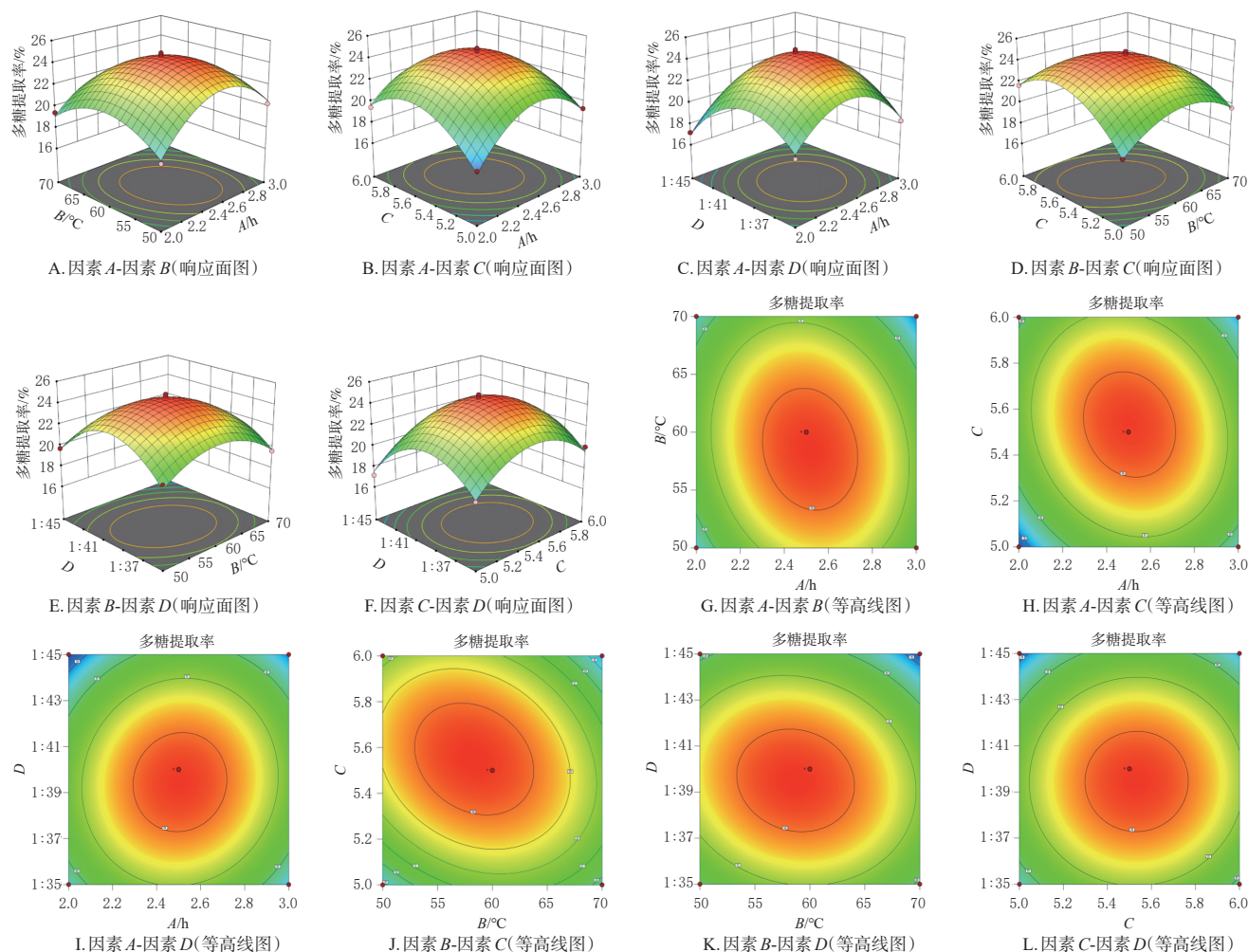


图3 各因素交互作用的响应面图与等高线图

23.394%。为验证该工艺的稳定性与可靠性,同时为便于操作,本研究将工艺参数调整为酶解时间2.8 h、酶解温度57.50 °C、缓冲液pH5.5、料液比1:40。按照上述调整后的工艺参数进行3次平行验证试验:取黄蜀葵花干燥药材,加入“2.2.2”项下最优配比的复合酶,按调整后工艺参数提取,测得多糖提取率分别为23.642%、23.781%、23.363%,平均为 $(23.595 \pm 0.213)\%$,RSD为0.90%($n=3$);与预测值接近,表明该提取工艺稳定、可行。

2.4 多糖的抗氧化活性研究

2.4.1 ABTS 自由基清除活性的测定

参照相关文献^[15],采用ABTS法(分光光度法)检测多糖对ABTS自由基的清除活性:取7 mmol/L ABTS溶液和2.45 mmol/L过硫酸钾溶液,按体积比1:1混合后,于4 °C避光静置16 h,得ABTS储备液。取该储备液用无水乙醇稀释,得ABTS工作液(在734 nm波长处的吸光度值为 0.70 ± 0.02)。取以最优工艺提取的多糖,加水溶解稀释,得不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mg/mL)的供试品溶液。以相同浓度梯度的抗坏血酸水溶液为对照溶液(下同)。取上述供试品溶液1 mL、对照溶液1 mL、ABTS工作液9 mL,混匀后,常温下避光反应30 min,于734 nm波长处测定吸光度,

并按下式计算ABTS自由基清除率:ABTS自由基清除率 $= [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$ (式中, A_1 为供试品组吸光度; A_2 为背景吸光度; A_0 为对照组吸光度)。平行操作3次。结果(图4A)显示,随着多糖质量浓度的增加,其对ABTS自由基的清除能力随之增强;当多糖质量浓度为10 mg/mL时,ABTS自由基清除率达到最高(81.759%)。

2.4.2 羟自由基清除活性的测定

参照相关文献^[16],采用Fenton-水杨酸显色法检测多糖对羟自由基的清除活性:取“2.4.1”项下不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、3、4、5 mg/mL)的供试品溶液1 mL、对照溶液1 mL、6 mmol/L硫酸亚铁水溶液1 mL、6 mmol/L过氧化氢水溶液1 mL,混合后,于37 °C孵育10 min,再加入6 mmol/L水杨酸溶液1 mL,于37 °C孵育30 min,然后于510 nm波长处测定吸光度,并按下式计算羟自由基清除率:羟自由基清除率 $= [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$ (式中, A_1 为供试品组吸光度; A_2 为背景吸光度; A_0 为对照组吸光度)。平行操作3次。结果(图4B)显示,随着多糖质量浓度的增加,其对羟自由基的清除能力不断增强,随后逐渐趋于平缓;当多糖质量浓度为5 mg/mL时,羟自由基清除率最高(87.110%)。

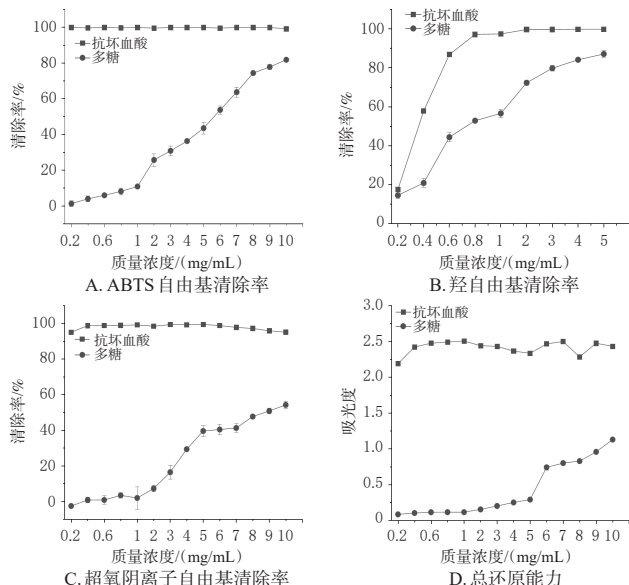


图4 黄蜀葵花多糖体外抗氧化活性的测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4.3 超氧阴离子自由基清除活性的测定

参考相关文献^[17],采用邻苯三酚自氧化法检测多糖对超氧阴离子自由基的清除活性:取“2.4.1”项下不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mg/mL)的供试品溶液、对照溶液各0.5 mL,加入50 mmol/L三羟甲基氨基甲烷-盐酸(pH8.2)缓冲溶液1.5 mL,于30℃孵育20 min,冷却至室温,加入7 mmol/L焦性没食子酸水溶液1.5 mL,反应3 min后,加入37.5%盐酸溶液0.5 mL终止反应,于320 nm波长处测定吸光度,并按下式计算超氧阴离子自由基清除率:超氧阴离子自由基清除率 $= [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$ (式中, A_1 为供试品组吸光度; A_2 为背景吸光度; A_0 为对照组吸光度)。平行操作3次。结果(图4C)显示,随着多糖质量浓度的增加,其对超氧阴离子自由基的清除率呈逐渐上升趋势;当多糖质量浓度为10 mg/mL时,超氧阴离子自由基清除率最高(54.244%)。

2.4.4 总还原能力测定

参考相关文献^[18],采用铁氰化钾还原法(普鲁士蓝法)检测多糖的总还原能力:取“2.4.1”项下不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mg/mL)的供试品溶液、对照溶液各2.5 mL,加入磷酸盐缓冲溶液(pH6)2.5 mL,摇匀后,加入1%铁氰化钾溶液2.5 mL,混匀后,于50℃反应20 min;反应完全后,再加入10%三氯乙酸溶液2.5 mL,以3 000 r/min离心10 min;取上清液5 mL,加水5 mL和0.1%氯化铁溶液1 mL,于700 nm波长处测定吸光度,并按下式计算总还原能力:总还原能力 $= A_1 - A_2$ (A_1 为含氯化铁的样品混合液吸光度, A_2 为不含氯化铁的样品混合液吸光度)。平行操作3次。结果(图4D)显示,随着多糖质量浓度的升高,其吸光度呈缓慢上升趋势;当多糖质量浓度为10 mg/mL时,总还原能力最高(吸光度为1.129)。

2.5 多糖的保湿及吸湿活性

以甘油作为对照,参考相关文献^[19],采用称量法测定多糖的保湿及吸湿活性:取以最优工艺提取的多糖,于60℃干燥12 h后,将质量记作 m_1 (g);取多糖粉末、甘油,分别置于相对湿度43%的饱和碳酸钾溶液和相对湿度83%的饱和氯化钾溶液的密闭环境中,于2、4、6、8、10、12 h时称重,将质量记为 m_2 (g),根据下式计算吸湿率(%):吸湿率 $= m_2/m_1 \times 100\%$ 。另取多糖粉末、甘油,分别加水,制成质量浓度均为50 mg/mL的溶液,将质量记作 m_3 (g),测定两种溶液在上述两种密闭环境中的保湿率,于2、4、6、8、10、12 h时称重,将质量记为 m_4 (g),根据下式计算保湿率(%):保湿率 $= m_4/m_3 \times 100\%$ 。平行操作3次。

结果(图5)显示,在相对湿度43%的环境中,多糖与甘油的保湿率均随时间延长呈下降趋势,吸湿率随时间延长呈上升趋势;在12 h时,多糖与甘油的保湿率分别为99.387%、99.317%,吸湿率分别为100.478%、100.561%,表明甘油的吸湿能力更强,但其保湿能力弱于多糖。在相对湿度83%的环境中,多糖与甘油的保湿率均随时间延长呈下降趋势,吸湿率随时间延长呈上升趋势;在12 h时,多糖与甘油的保湿率分别为99.764%、99.670%,吸湿率分别为100.455%、100.747%,表明多糖具有更好的保湿活性。推测其原因可能是多糖分子结构含有大量的羟基、羧基等极性基团,这些极性基团易与水分子形成氢键而结合大量的水分,从而具有良好的吸湿及保湿活性^[20]。

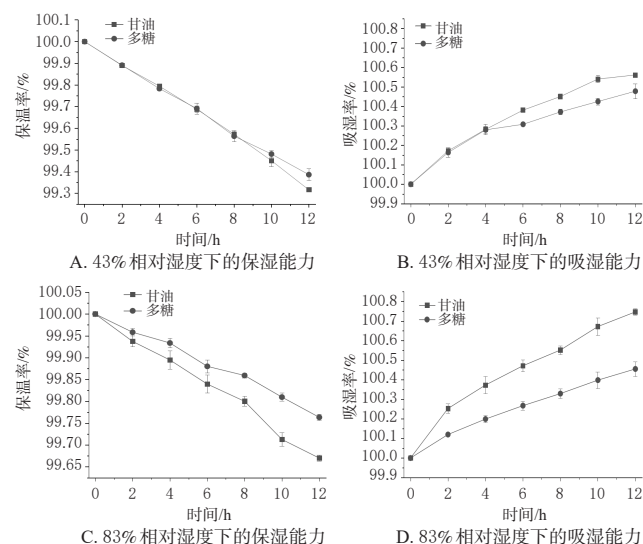


图5 黄蜀葵花多糖在不同相对湿度下的保湿及吸湿活性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

本研究以多糖提取率为指标,在单因素实验的基础上,通过正交实验方法得到复合酶的最优配比为木瓜蛋白酶136 000 U、果胶酶125 000 U、纤维素酶5 000 U;利用Box-Behnken响应面法优化得到复合酶提取多糖的最优工艺为酶解时间2.8 h、酶解温度57.50℃、缓冲液

pH5.5及料液比1:40;在此条件下,平均多糖提取率达到23.595%,明显优于文献报道的传统热水提取工艺(提取率为8.90%)^[21]。相较于传统热水提取工艺,本研究采用的复合酶体系可通过纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶的协同作用,降解细胞壁的不同组分,且该工艺的提取温度低、提取效率高、反应条件温和,可有效避免高温、强酸强碱提取导致的多糖结构受损、活性成分降解等问题,最大程度保留多糖的生物活性。

活性评价结果表明,按该工艺所制多糖具有良好的抗氧化、保湿活性及吸湿活性。抗氧化活性结果显示,以复合酶提取的多糖的抗氧化活性具有显著的剂量依赖趋势,对ABTS自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基均表现出良好的清除能力,且具备良好的总还原能力;其对羟自由基的清除效果最为突出(多糖质量浓度为5 mg/mL时,清除率接近90%)。在保湿及吸湿活性方面,本研究结果显示,以复合酶提取的多糖在不同相对湿度环境下均表现出良好的保湿能力和吸湿能力,且保湿能力优于甘油,具备长效保湿的优势。这可能与多糖的极性基团越高,越有助于复杂网络结构的形成,最终发挥保湿吸湿的作用有关^[22]。

综上所述,本研究基于复合酶的黄蜀葵花多糖的最优提取工艺稳定、可行;该工艺下所得多糖具有良好的抗氧化、保湿及吸湿活性。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2025年版. 北京:中国医药科技出版社,2025:327-328.
- [2] 关诗涵,刘畅,颜晓桐,等. 黄蜀葵花化学成分、药理活性研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2025,50(4):908-921.
- [3] Ye G Y, Li J, Zhang J H, et al. Structural characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Dendrobium wardianum*[J]. Carbohydr Polym, 2021, 269: 118253.
- [4] Yang Z M, Wang Y, Chen S Y. *Astragalus* polysaccharide alleviates type 2 diabetic rats by reversing the glucose transporters and sweet taste receptors/GLP-1/GLP-1 receptor signaling pathways in the intestine-pancreatic axis[J]. J Funct Foods, 2021, 76: 104310.
- [5] Tang L, Chen Y C, Jiang Z B, et al. Purification, partial characterization and bioactivity of sulfated polysaccharides from *Grateloupia livida*[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 94(Pt. A):642-652.
- [6] Bai L, Xu D, Zhou Y M, et al. Antioxidant activities of natural polysaccharides and their derivatives for biomedical and medicinal applications[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(12):2491.
- [7] Song Y R, Sung S K, Jang M, et al. Enzyme-assisted extraction, chemical characteristics, and immunostimulatory activity of polysaccharides from Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer)[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 116: 1089-1097.
- [8] 居秀荣,李加友,于建兴,等. 酶辅助提取植物天然活性物质的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(9): 202-211.
- [9] Sies H, Jones D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(7):363-383.
- [10] 原梦瑶,康淑荷,崔璐娟,等. 红芪多糖超声提取工艺优化及抗氧化、美白和吸湿保湿活性[J]. 精细化工, 2025, 42(3):577-586.
- [11] 冯兆园,王贻森,王振宇,等. 植物多糖协同增效研究进展[J]. 精细化工, 2024, 41(11):2358-2369.
- [12] Chi Y Z, Ye H, Li H N, et al. Structure and molecular morphology of a novel moisturizing exopolysaccharide produced by *Phyllobacterium* sp. 921F[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 135:998-1005.
- [13] Yin C M, Fan X Z, Fan Z, et al. Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes* polysaccharides and determination of its antioxidant activity[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 111:446-454.
- [14] Shang H M, Li R, Wu H X, et al. Polysaccharides from *Trifolium repens* L. extracted by different methods and extraction condition optimization[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6353.
- [15] 王增丽,付坚,何同,等. 青刺果粕抗氧化肽的酶法制备工艺优化及体外抗氧化活性分析[J]. 现代食品科技, 2024, 40(12):49-56.
- [16] Xu R B, Yang X, Wang J, et al. Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pine cones[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(11): 14262-14277.
- [17] Wang Y F, Jia J X, Ren X J, et al. Extraction, preliminary characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella radicata* mushroom[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120(Pt. B):1760-1769.
- [18] 周际松,汪芷玥,汤凯,等. 羧甲基化茯苓多糖的抗氧化性分析[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(7):120-125.
- [19] 康淑荷,李秋萍,李胜硕,等. 当归多糖酸剪切片段纯化及抗氧化、美白、吸湿和保湿活性[J]. 精细化工, 2025, 42(12):2703-2716.
- [20] 何林蔓,柳宜池,陈莎,等. 血耳伴生菌胞外多糖的抗氧化活性及吸湿、保湿性能[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(17):30-36.
- [21] 杨静,李爽,钱芳,等. 响应面法优选黄蜀葵花多糖的提取工艺[J]. 中国药房, 2013, 24(39):3688-3690.
- [22] Wang J, Jin W H, Hou Y, et al. Chemical composition and moisture-absorption/retention ability of polysaccharides extracted from five algae[J]. Int J Biol Macromol, 2013, 57:26-29.

(收稿日期:2026-04-18 修回日期:2026-09-10)

(本文责编:陈 宏)