doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.09

响应面法优化纤维素酶辅助提取淫羊藿多糖工艺

顾欢欢,褚秀玲*,苏建青

(聊城大学农学院,山东聊城 252059)

[收稿日期] 2017-03-04 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2017)08-0052-07 [中图分类号]S853.7

[摘 要] 为优化淫羊藿多糖的提取工艺,采用纤维素酶辅助热水浸提法从淫羊藿中提取淫羊藿多糖,在单因素试验结果的基础上,选择酶浓度、酶提温度、酶提时间为自变量,采用三因素三水平的 Box-Behnken 响应面设计,优化淫羊藿多糖的提取工艺。试验结果表明,淫羊藿多糖酶辅助提取的最佳工艺参数为:酶浓度 110 U/μL,酶提温度 60 ℃,酶提时间 100 min,且酶提温度对多糖提取率的影响最大。在最佳优化条件下淫羊藿多糖提取率为 10.06%,接近模型的最大预测值(10.199%)。试验为淫羊藿多糖的临床开发应用提供了依据。

[关键词] 淫羊藿多糖;酶辅助法;响应面法

Optimization of *Epimedium* Polysaccharide by Response Surface Methodology

GU Huan-huan, CHU Xiu-ling*, SU Jian-qing

(*College of Agriculture*, *Liaocheng University*, *Liaocheng Shandong* 252059)

Corresponding author: *CHU Xiu-ling*, *E-mail*: *chuxiul@*163.*com*

Abstract: To optimize the extraction technology of *Epimedium* polysaccharide from Herba *Epimedii*. The extraction technology was used by using ultrasonic-assisted extraction technology and hot water extraction technology. On the basis of single factor test results, enzyme concentration, enzyme extraction temperature, enzyme extraction time were selected as independent variables. Three factors and three levels of the Box-Behnken response surface design was used to that of optimizing extraction of *Epimedium* polysaccharide. The results showed that the optimum parameters for extracting *Epimedium* polysaccharide, enzyme concentration was 110 U/μL, temprature of enzyme extraction is 60 ℃, enzyme extraction time is 10 minutes. The enzyme extraction temperature had the greatest effect on the extraction rate of polysaccharide. Under the optimum conditions, the extraction rate of polysaccharide was 10.06%, which closes to the maximum expected value of extraction(10.199%)of the model. The experiment had provided the basis for the clinical application of *Epimedium* polysaccharide.

Key words: *Epidmedium*; polysaccharide; enzyme assistant method; response surface methodology

---

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2013CL010)

作者简介:顾欢欢,硕士研究生,从事动物疫病发生机理及防控研究。

通讯作者:褚秀玲。E-mail:chuxiul@163.com

淫羊藿又名仙灵脾,始载于《神农本草经》,是小檗科(*Berberidacea*)淫羊藿属(*Epimedium*)多年生草本植物。《本草纲目》记载其茎、叶入药,辛温无毒,有坚筋骨、益精气、补腰膝和强心力等作用,是我国传统的补益类中药[1]。淫羊藿中主要含有黄酮、木质素、生物碱及多糖等多种生物活性物质,其中淫羊藿多糖是淫羊藿总提取物中较重要的活性成分[2]。根据药理学研究证明:多糖具有抗肿瘤[3]、调节免疫[4-5]、抗氧化[6]、抗病毒[7]、延缓衰老[8]等多种生理活性。淫羊藿多糖在淫羊藿中含量丰富,但目前国内外对淫羊藿多糖的研究报道较少。而传统的提取多糖的方法时间长、效率低、温度高,容易造成多糖的降解及生物活性的降低[9]。因此,建立和优化多糖的提取工艺具有重要的意义。本文采用酶辅助法提取淫羊藿多糖,利用响应面法优化其提取工艺参数,旨在为进一步研究开发淫羊藿多糖提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　仪器与材料

1.1.1　仪器　722 可见分光光度计为上海欣茂仪器有限公司产品;FW-200 高速万能粉碎机为南京九州干燥设备厂产品;HH-8 恒温水浴锅为金坛市新航仪器厂产品。

1.1.2　材料　淫羊藿饮片(批号:20160302),购自聊城利民大药店。淫羊藿经 50 ℃烘干 12 h 后,高速粉碎,过 60 目筛备用。葡萄糖(分析纯)、浓硫酸(分析纯)和苯酚(分析纯)均为莱阳经济技术开发区精细化工厂产品;纤维素酶(C109262)购自阿拉丁。

1.2　方法

1.2.1　标准品溶液制备　精密称取烘干的分析纯葡萄糖 0.2 g,置于 100 mL 容量瓶中,加重蒸水定容,摇匀,即得葡萄糖标准溶液(2 mg/mL)。

1.2.2　标准曲线的绘制　标准曲线的制备参考文献[10],略有改动:精密吸取葡萄糖标准溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mL 分别置于 100 mL 容量瓶中,加重蒸水定容,摇匀,即得浓度分别为 20、40、60、80、100、120、140、160 ug/mL 的标准溶液。各取 1 mL 于干燥洁净试管中,加入 5%的苯酚溶液 1 mL,迅速加入浓硫酸 5 mL,振荡混匀,冷水浴10 min后,在 490 nm 处测定其吸光度。以葡萄糖的浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标制作标准曲线,计算回归方程。

1.2.3　酶溶液制备　精密称取纤维素酶5.0 g,置于烧杯中,加纯净水溶解后,将其转移至50 mL容量瓶中,定容,摇匀,即得1000 U/mL的纤维素酶溶液。

1.2.4　酶法提取　酶法提取参考文献[11],略有改进,具体方法如下:精确称取淫羊藿粉末 1.00 g,加入 25 mL 纯净水,调节pH=5,加入适量的纤维素酶,置于一定温度条件下进行淫羊藿多糖的提取,提取一定时间后沸水浴灭活 5 min,冷却后加入 25 mL纯净水,90 ℃恒温水浴 2 h,冷却后过滤,最后定容于 100 mL 容量瓶中,用于总多糖含量测定。

1.2.5　多糖的含量测定　多糖含量测定的方法为苯酚-硫酸法[12]。样品溶液 10 倍稀释后,取 1 mL 于 10 mL 试管中,按 1.2.2 标准曲线下的方法进行测定。

1.2.6　单因素试验设计　选择酶浓度、酶提温度、酶提时间这 3 个对淫羊藿总多糖提取工艺有影响的参数进行单因素试验。具体条件见表 1。

表 1　单因素设计

Tab 1　The single factors design condition

单因素条件	固定提取条件
A 酶浓度 (10、30、50、70、90、110 U/μL)	酶提温度 50 ℃,酶提时间 60 min
B 酶提温度 (30、40、50、60、70、80 ℃)	酶浓度 90 U/μL,酶提时间 60 min
C 酶提时间 (20、40、60、80、100、120 min)	酶浓度 90 U/μL,酶提温度 50 ℃

1.2.7　响应面试验设计　根据单因素试验选择的响应面试验范围,利用Design-Expert10.0.4软件,以酶浓度(X_1,U/μL)、酶提温度(X_2,℃)、酶提时间(X_3,min)作为变量,以-1、0、1 代表变量水平,进行 Box-Behnken 设计三因素三水平实验方案,见表 2。试验数据用 Design Expert 软件进行回归分析,优化出各因素对提取得率影响的回归方程,分析各个因素对多糖提取率的影响,并做出响应面和等高图。

表 2　淫羊藿总多糖提取因素与水平

Tab 2　Factors and level of total polysaccharides extraction from Epimedium

水平	因素		
	酶浓度 X_1 /(U·μL^{-1})	酶提温度 X_2/℃	酶提时间 X_3/min
−1	30	30	40
0	70	50	80
1	110	70	120

2　结　果

2.1　标准曲线的建立　葡萄糖的标准曲线见图 1。以吸光度 x(OD)为横坐标,葡萄糖浓度 y 为纵坐标制作标准曲线,葡萄糖葡萄糖线性回归方程为 $y=115.04x-13.953$,$R^2=0.9989$,葡萄糖标准溶液浓度为 20~160 ug/mL 范围时,线性关系良好。

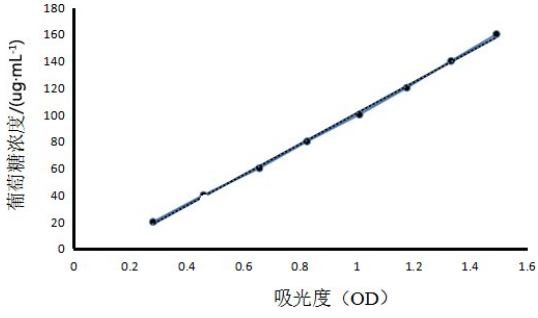

图 1　葡萄糖标准曲线

Fig 1　Standard curve of glucose

2.2　单因素对淫羊藿总多糖提取率的影响

2.2.1　酶浓度对淫羊藿总多糖提取率的影响　酶浓度对淫羊藿总多糖提取率的影响结果见图 2。可以看出,随着纤维素酶浓度的增加淫羊藿多糖的提取率也逐渐增大,110 U/μL 时提取率最高,但 90 U/μL到 110 U/μL 提取率增幅不大,考虑到经济因素选取最优酶浓度为 90 U/μL 为宜。

2.2.2　酶提温度对淫羊藿总多糖提取率的影响　酶提温度对淫羊藿总多糖提取率的影响结果见图 3。可以看出,当温度在 30~50 ℃之间时,淫羊藿总多糖提取率随温度的升高而呈上升趋势,当温度超过 50 ℃时,总多糖提取率随温度的升高而逐渐降低。因此,酶提温度选择 50 ℃为宜。

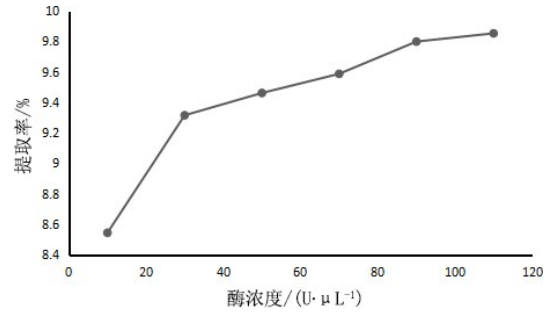

图 2　酶浓度对淫羊藿总多糖提取率的影响

Fig 2　Effect of enzyme concentration on extraction rate of total polysaccharides from Epimedium

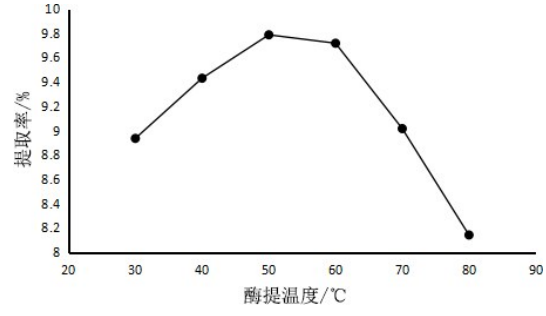

图 3　酶提温度对淫羊藿总多糖提取率的影响

Fig 3　Effect of extraction temperature on extraction rate of total polysaccharides from Epimedium

2.2.3　酶提时间对淫羊藿总多糖提取率的影响　酶提时间对淫羊藿总多糖提取率的影响结果见图 4。可以看出,酶提时间在 20~80 min,随着酶提时间的增加,淫羊藿总多糖的提取率也呈增加的趋势,在 80 min 达到最大,酶提时间再增加,多糖提取率呈下降的趋势。

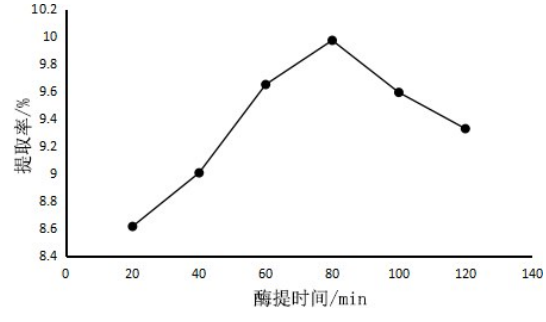

图 4　酶提时间对淫羊藿总多糖提取率的影响

Fig 4　Effect of enzyme extraction time on extraction rate of total polysaccharides from Epimedium

2.3　淫羊藿总多糖提取工艺优化

2.3.1　响应面实验设计与结果　根据 Box-Benhnken 中心组合设计原理,综合单因素试验结果,选取酶浓度、酶提温度、酶提时间 3 个因素,在单因素试验的基础上采用三因素三水平的响应面分析方法,研究三因素不同组合对淫羊藿多糖提取率的影响,试验设计及结果见表 3。

表 3　淫羊藿多糖提取的响应面设计与结果

Tab 3　Response surface design and total polysaccharides extraction from Epimedium

编号	X_1 酶浓度	X_2 酶提温度	X_3 酶提时间	淫羊藿多糖提取率/%
1	0	−1	−1	8.71
2	−1	0	−1	9.51
3	1	1	0	10.05
4	−1	1	0	9.39
5	1	0	−1	9.87
6	0	0	0	9.81
7	−1	0	1	9.41
8	0	0	0	9.88
9	−1	−1	0	8.65
10	0	−1	1	8.56
11	1	−1	0	8.96
12	1	0	1	9.99
13	0	1	1	9.82
14	0	0	0	9.78
15	0	0	0	10.04
16	0	0	0	9.89
17	0	1	−1	9.76

对表 3 试验数据进行回归分析,得到各因素影响多糖提取率的一次效应、二次方效应及其交互效应的回归方程:$Y(\%) = 9.88 + 0.24X_1 + 0.52X_2 - 8.75X_3 + 0.087X_1X_2 + 0.055X_1X_3 + 0.053X_2X_3 - 0.068X_1^2 - 0.55X_2^2 - 0.12X_3^2$,其中 Y 代表淫羊藿多糖提取率(%),X_1 纤维素酶浓度(U/μL),X_2 酶提温度(℃),X_3 酶提时间(min)。利用 Design-Expert 10.0.4 软件对表 3 中的数据进行多元回归拟合,显著性检验,结果见表 4。

表 4　响应面二次回归模型的方差分析

Tab 4　Result of analysis of variance to the response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	4.06	9	0.45	44.50	<0.0001	**
X_1	0.46	1	0.46	44.94	0.0003	**
X_2	2.14	1	2.14	211.15	<0.0001	**
X_3	6.13	1	6.13	0.060	0.8130	/

续表

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X_1X_2	0.031	1	0.032	3.02	0.1259	/
X_1X_3	0.012	1	0.012	1.19	0.3110	/
X_2X_3	0.011	1	0.011	1.09	0.3319	/
X_1^2	0.019	1	0.019	1.89	0.2115	/
X_2^2	1.27	1	1.27	125.53	<0.0001	**
X_3^2	0.058	1	0.058	5.73	0.0479	*
残差	0.071	7	0.010			
失拟项	0.030	3	0.010	1.00	0.4792	
误差项	0.041	4	0.010			
总和	4.13	16				
相关系数 R^2 = 0.8669，校正系数(Adj R^2) = 0.9607						

* P<0.05 差异显著，** P<0.01 差异极显著，/差异不显著

* P<0.05 was significant, ** P<0.01 was extremely significant, / has no significant difference

由表 4 可以看出，各因素中纤维素酶浓度一次项X_1极显著，酶提温度一次项X_2极显著，酶提温度二次项X_2^2极显著，酶提时间二次项X_3^2显著。在本实验设计范围内，R^2 = 0.8669，校正后的 R^2 = 0.9607，模型F = 44.50，该模型回归显著性 P<0.0001，说明建立的模型极显著；失拟项 F 值为1.00，P = 0.4792> 0.05，不显著，说明模型的拟合程度良好，未知因素对试验结果干扰较小，该模型可以用于淫羊藿多糖的提取优化。

2.3.2 *相应曲面分析与优化* 根据回归方程，作出响应面图，考察所拟合的响应曲面的形状，分析酶浓度(X_1)、酶提温度(X_2)和酶提时间(X_3)对淫羊藿多糖提取率的影响，相应曲面的三维立体见图 5.a-c与等高图见图 6.d-f。

由图 5.a 和图 6.d 可以看出，随着酶浓度的增加，提取得率缓慢增加，说明增加酶浓度有利于提高提取率，但增加的速度相对较小，当酶浓度超过 90 U/μL 后出现提取得率趋于平稳的趋势；而提取得率随着提取温度的增加而快速增大，当提取温度在 50 ℃时，提取率达到最大值，之后随温度的增加，提取率呈下降趋势。说明提取温度对提取率的影响较大。

由图 5.b 和图 6.e 可以看出，提取率随酶提时间的增加缓慢增大，在 80 min 时达到最大值，之后随时间的增大而缓慢降低，可能是随着酶解的进行，有非多糖类物质析出，影响多糖得率的测定；而随着酶浓度的增加提取率同样是缓慢增长的趋势，说明酶提时间和酶浓度对提取率的影响相对较小。

由图5.c 和图6.f可以看出，酶提温度在 40 ~ 50 ℃之间时，提取率随温度的升高而迅速增大，温度在 50 ℃后，提取率呈明显的下降趋势；而随着酶提时间的增大，提取率变化趋势不明显，说明相对于酶提时间，酶提温度对提取率的影响较大。

2.3.3 *验证试验* 为验证试验的可操作性，选取同一样品，在纤维素酶浓度 110 U/μL、酶提温度 60 ℃、酶提时间 100 min 的最佳提取条件下进行验证性试验，提取 3 次，计算淫羊藿多糖的平均提取率为 10.06%，非常接近理论预测值 10.199%。因此，采用响应面优化方法对淫羊藿多糖的提取工艺进行优化，可得到最优的工艺参数，为进一步的试验研究奠定基础，为淫羊藿的开发利用提供依据。

3 讨 论

多糖是存在于生物体内的一类生物大分子物质，具有重要的生物活性。多糖传统的提取方法是水煮、水提醇沉法，这些传统的提取方法时间长、效率低。而酶辅助提取法具有时间短、效率高、能耗低等优点，克服了传统提取法的一些缺点。本研究

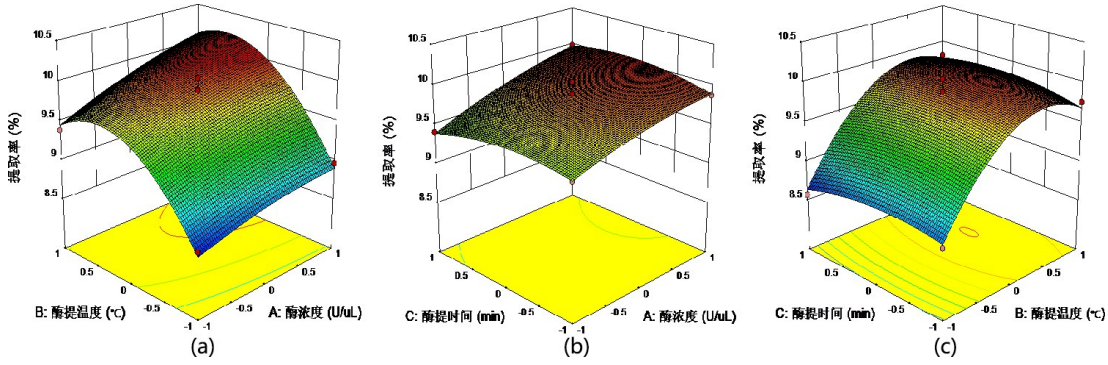

图 5　两因素之间交互作用对淫羊藿多糖提取率影响的响应面三维立体图

Fig 5　Response surface three dimensional showing the effects of two factors interaction on the extraction rate of polysaccharide from Epimedium

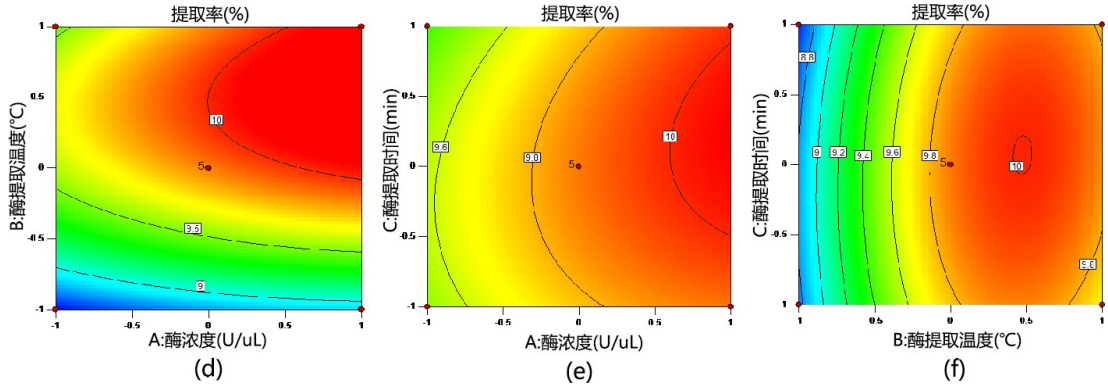

图 6　两因素之间交互作用对淫羊藿多糖提取率影响的响应面等高线图

Fig 6　Response surface contour map showing the effects of two factors interaction on the extraction rate of polysaccharide from Epimedium

基于酶法在提取中药时的优点,通过单因素和响应面法讨论了淫羊藿多糖的提取工艺条件,以期达到高效从淫羊藿中提取多糖的目的。

在单因素试验中,就酶浓度而言,淫羊藿多糖的提取率随着酶浓度的增加而增大,但酶浓度在 90~110 U/μL 之间增长趋势变缓,这是由于随着酶浓度的增加,促进了酶对淫羊藿植物细胞壁的降解,增加了多糖的溶出量,当酶浓度超过 90 U/μL 后,纤维素酶与底物的作用点达到饱和;就酶提温度而言,淫羊藿多糖提取率随温度的升高而增加,当温度超过 50 ℃时,总多糖提取率随温度的升高而程下降趋势,这是由于酶属于蛋白质,其活性受温度的影响,温度升高可促进酶活性的增强,当超过最适温度时可导致酶蛋白质变性失活,从而降低酶的活性,影响多糖提取率;就酶提时间而言,随着酶提时间的增加多糖提取率升高,超过 80 min 时,多糖提取率程下降趋势,这可能是酶解过程中细胞透性不断增加,随着酶解的不断进行,一些非多糖类可溶性物质不断析出,干扰多糖的测定,导致多糖提取率降低。

通过响应面试验设计,利用Design-Expert软件建立了淫羊藿多糖提取率与纤维素酶浓度、酶提温度及酶提时间的二次多项回归模型,验证结果表明该模型合理可靠,能较好的预测淫羊藿多糖的提取率。优化出淫羊藿多糖酶辅助提取的最佳工艺参数为:纤维素酶浓度 110 U/μL,酶提温度 60 ℃,酶提时间 100 min,淫羊藿多糖的提取率为 10.06%,与预测值 10.199%非常接近,可达预测值的 98.6%。

据有关文献报道,刘晓鹏等[13]用微波辅助法提取淫羊藿多糖,多糖得率为 1.8%;姜虹等[14]报道,用响应面法优化淫羊藿多糖超声提取提取工艺,其多糖提取率为 5.62%。与微波辅助法及超声提取法相比,本研究相对省时,且淫羊藿多糖提取率较高。试验结果表明该回归方程可以较好的预测实验结果。因此,选择响应面法来优化淫羊藿多糖的提取工艺是可行的。

该提取工艺中的试验条件具有容易控制、安全环保,且提取效率高、时间短等优点,弥补了传统提取工艺的缺点,可为淫羊藿多糖的工业化大生产提供参考。

参考文献:

[1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社,1977:750.
Li S Z. Compendium of materia medica[M]. Beijing: People´s Medical Publishing House, 1977:750.

[2] Cao H, Fan Y, Wang D, *et al*. Optimization on preparation condition of *Epimedium* polysaccharide liposome and evaluation of its adjuvant activity [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 50(1): 207-213.

[3] 王程成,苏嘉炎,蔡继炎,等.响应面优化朝鲜淫羊藿多糖提取条件及肿瘤免疫活性研究[J].药学学报,2016,51(9):1464-1471.
Wang C C, Su J Y, Cai J Y, *et al*. Response surface analysis for the optimization of extraction condition for polysaccharides from *Epimedium* polysaccharides and studies on its tumor immune activities[J]. Acta Pharm Sin, 2016,51(9):1464-1471.

[4] 李得鑫,陈伟毅,周霄楠,等.淫羊藿对动物机体免疫功能的研究进展[J].中兽医学杂志,2015,5:68-70.
Li D X, Chen W Y, Zhou X N, *et al*. Research progress of *Epimedium* on immune function in animals[J]. Chinese Journal of Traditional Veterinary Science, 2015,5:68-70.

[5] 付 亮,袁璟亚,周永红,等. 淫羊藿多糖的研究进展及开发前景[J].食品科学,2012,33(03):261-266.
Fu L, Yuan J Y, Zhou Y H, *et al*. Research progress and development prospect of *Epimedium* polysaccharides[J]. Food Science, 2012,33(03):261-266.

[6] 李秋莹,陈守哲,李 波,等. 淫羊藿多糖抗氧化性研究[J].亚太传统中药,2016,12(18):24-26.
Li Q Y, Chen S Z, Li B, *et al*. Research on oxidation-resistance activity of *Epimedium* polysaccharides[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine,2016,12(18):24-26.

[7] 任宇皓,胡元亮,刘家国,等. 黄芪多糖、淫羊藿多糖和淫羊藿总黄酮对新城疫病毒感染细胞的影响[J].南京农业大学学报,2001,24(2):102-105.
Ren H Y, Hu Y L, Liu J G, *et al*. The effects of astragalus polysaccharide, *Epimedium* polysaccharide and *Epimedium* flavone on cell-infecting of NDV[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2001,24(2):102-105.

[8] 胡元亮,任宇皓,宋大鲁,等. 黄芪多糖和淫羊藿多糖对培养细胞增殖和衰老的影响[J].中国兽医学报, 2005, 25(3):304-306.
Hu Y L, Ren Y H, Song D L, *et al*. Effects of astragalus polysaccharide and *Epimedium* polysaccharide on proliferation and decrepitude of CEF[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2005,25(3):304-306.

[9] Hromadkova, Z, Ebringerova, A, Valachovic, P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L)[J]. Ultrason Sonochem, 2002, 9(1): 37-42.

[10] 于红梅,陈芬芳,王 瑞,等. 正交设计法优化淫羊藿多糖的提取工艺[J].动物医学进展,2015,36(3):64-67.
Yu H M, Chen F F, Wang R, *et al*. Extraction technology optimization of polysaccharides from *Epimedium brevicornum* Using Orthogonal Design[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(3):64-67.

[11] 杨瑞花,张玥莉. 响应面法优化纤维素酶提取丹参多糖工艺[J].中国药师,2016,19(1):43-46.
Yang R H, Zhang Y L. Optimization of cellulase extraction process for polysaccharide by response surface analysis[J]. China Pharmacist, 2016,19(1):43-46.

[12] 于瑞诗,朱鹏程,陶燕铎,等.苯酚硫酸法测定迷果芹多糖的含量[J].分析试验室,2008, 27(S):222-224.
Yu R S, Zhu P C, Tao Y D, *et al*. Determination of polysaccharides in pistachios sulfuric acid method[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2008,27(S):222-224.

[13] 刘晓鹏,姜 宁,刘志彪,等. 微波辅助提取淫羊藿多糖研究[J].亚太传统医药,2014,10(16):16-18.
Liu X P, Jiang N, Liu Z B, *et al*. A Study on the microwave extraction for polysaccharides from *Epimedium sagittatum* (Sieb. Et Zucc.) Maxim[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine,2014, 10(16):16-18.

[14] 姜 虹,李新龙,李海平,等. 响应面法优化淫羊藿多糖超声提取工艺的研究[J].长春师范学院学报,2013,32(1):59-64.
Jiang H, Li X L, Li H P, *et al*. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried *Epimedium* leaves using response surface methodology[J]. Journal of Changchun Normal University(Natural Science), 2013,32(1):59-64.

(编 辑:李文平)