

超声波辅助酶法提取红腰豆多糖工艺优化

黎 英, 陈雪梅, 严月萍, 赖丹妮, 陈小红, 石小琼

(龙岩学院闽西食品研究所, 龙岩 364012)

摘 要: 为了开发利用红腰豆多糖资源, 该文探讨了超声波技术协同复合酶处理提取红腰豆多糖的工艺条件并对其结构进行了初步分析。在 50℃下, 以多糖得率为指标, 通过正交试验筛选复合酶最佳配比, 利用 Plackett-Burman 试验设计分析各因素显著性, 再采用 Box-Behnken 中心组合设计原理进行响应面分析优化; 采用紫外和红外光谱扫描及苷键分析对红腰豆多糖结构进行初步分析。结果表明: 复合酶最佳质量配比为木瓜蛋白酶: 果胶酶: 纤维素酶=3:1:3。酶解 pH 值和超声功率对提取红腰豆多糖影响达到极显著效应, 复合酶添加量和超声时间为显著因素。最佳工艺参数为液料比 80:1 mL/g、复合酶添加量 4.0%、酶解 pH 值 5.0、酶解时间 1.5 h、超声功率 400 W、超声时间 34.0 min, 红腰豆多糖得率为 14.15%。经紫外和红外光谱扫描表明红腰豆多糖经 DEAE-52 纤维素层析柱和 Sephadex G-200 层析柱两步纯化后纯度较高, 具有多糖的特征吸收峰; 通过高碘酸氧化和 Smith 降解分析可推测红腰豆多糖的连接方式为 $\alpha(1\rightarrow4)$ 和 $(1\rightarrow6)$ 连接。研究结果为酶法联合超声波处理技术在红腰豆多糖提取过程中的应用及其后续红腰豆多糖结构表征、生物活性等方面的研究提供理论依据。

关键词: 多糖; 超声波; 酶; 红腰豆; Plackett-Burman 设计; 响应面法; 结构分析

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.040

中图分类号: TS218

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2015)-15-0293-09

黎 英, 陈雪梅, 严月萍, 赖丹妮, 陈小红, 石小琼. 超声波辅助酶法提取红腰豆多糖工艺优化 [J]. 农业工程学报, 2015, 31(15): 293—301. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.040 <http://www.tcsae.org>

Li Ying, Chen Xuemei, Yan Yueping, Lai Danni, Chen Xiaohong, Shi Xiaoqiong. Optimal extraction technology of polysaccharides from red kidney bean using ultrasonic assistant with enzyme[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(15): 293—301. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.040 <http://www.tcsae.org>

0 引 言

红腰豆 (*Phaseolus vulgaris* Linn.) 因外形酷似动物的肾脏而得名, 属菜豆属, 蝶形花科, 缠绕植物, 原产于南美洲, 在中国种植范围极为广泛。其蛋白质、碳水化合物、膳食纤维的质量分数分别为 22.4%、52.8%、10.5%, 还富含抗氧化物、维生素 A、B、C 及 E, 及铁、镁、磷等多种微量元素等成分, 是乾豆中营养最丰富的一种^[1]。红腰豆中的多糖是红腰豆的主要活性成分, 而多糖是一类具有多种生物活性功能的高分子化合物, 具有多种药理活性特性, 如延缓衰老、调节免疫细胞、抗病毒、抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤、抗血栓、降血糖和血脂等特性^[2-5]。因而多糖被广泛关注, 成为当前研究的热点课题。

近些年来, 已有较多关于红腰豆的食疗价值、营养成分、产品开发研究方面的文献报道, 但关于红腰豆多糖的提取工艺及结构、生物活性等方面分析的研究尚未见报道。本文在借鉴前人研究试验方法的基础上, 分别利用酶具有高效破坏细胞壁、作用条件温和可有效保持多糖的活性等特点^[6-7], 及超声波在液体中产生空化、剪

切、剧烈搅拌等作用而具有的分散效应使细胞组织破坏, 具有快速、节能等特点^[8], 采用复合酶法和超声波辅助相结合对红腰豆多糖进行提取, 先采用 $L_9(3^4)$ 正交试验筛选复合酶最佳配比, 再用响应面法中 Plackett-Burman 试验设计和 Box-Behnken 中心组合设计对超声波辅助酶法提取红腰豆多糖的工艺参数进行优化。并采用紫外、红外光谱扫描及糖苷键分析对红腰豆多糖的结构进行初步分析, 以为开发利用红腰豆多糖资源及后续的红腰豆多糖结构表征、生物活性等方面研究提供理论参考。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

红腰豆由龙岩市农科所提供; 葡萄糖标准品: 美国 Sigma 公司; 纤维素酶 (1 800 U/mg)、木瓜蛋白酶 (1 000 U/mg)、果胶酶 (1 000 U/mg): 上海金穗生物科技有限公司; 离子交换纤维素 (DEAE-52)、Sephadex G-200 凝胶: 上海圆创生物科技有限公司; 柠檬酸钠、磷酸氢二钠、石油醚、无水乙醇、丙酮、氯仿、正丁醇、硫酸、苯酚、溴化钾、高碘酸钠、乙二醇等均为分析纯: 上海国药集团。

1.2 仪器与设备

微型植物粉碎机 (FZ102 型, 天津市泰斯特仪器有限公司); 精密 pH 计 (PHS-3C 型, 上海雷磁仪器厂); 旋转蒸发器 (RE52AA 型, 上海亚荣生化仪器厂); 电

收稿日期: 2015-06-12 修订日期: 2015-07-06

基金项目: 福建省教育厅科研项目 (JA13310)。

作者简介: 黎 英, 女, 福建长汀人, 高级实验师, 主要从事食品科学教学与科研工作。龙岩 龙岩学院闽西食品研究所, 364012。

Email: liying213fjly@163.com

子分析天平 (TB-114 型, 北京赛多利斯仪器系统有限公司); 电热鼓风干燥箱 (DHG-9140A 型, 上海一恒科技有限公司); 电热恒温水浴锅 (DK-S24 型, 上海精宏实验设备有限公司); 数控超声波清洗机 (KQ-600D 型, 昆山市超声仪器有限公司); 高速冷冻离心机 (TGL-16G-A 型, 上海安亭科学仪器厂); 循环水多用真空泵 (SHB-3 型, 郑州杜甫仪器厂); 真空冷冻干燥机 (FD-1-50 型, 北京博医康实验仪器有限公司); 紫外可见分光光度计 (UV-2102C 型, 尤尼柯仪器有限公司); 紫外光谱仪 (UV-3200PCS 型, 上海美谱达仪器有限公司); 傅立叶红外光谱仪 (IS10 型, 美国 Nicolet 仪器公司)。

2 试验方法

2.1 红腰豆多糖的提取工艺流程

红腰豆→干燥 (风速 0.5 m/s、温度 80℃、1 h, 测得含水率为 7.59%)、粉碎过 80 目筛→脱脂 (索氏抽提, 3 倍体积的石油醚, 80℃回流 2 h, 2 次)→真空冷冻干燥 (-20℃冷藏 10 h 后, 在温度<-50℃, 真空度<15 Pa 条件下干燥 16~24 h, 下同)→准确称取 2.0 g 预处理过的红腰豆干粉→根据预设条件加蒸馏水复溶→柠檬酸钠-磷酸氢二钠缓冲液调节 pH 值→50℃条件下, 添加适量的复合酶酶解→冰水灭酶 15 min→50℃条件下, 按预设超声处理条件处理→离心 (3 000 r/min, 15 min)→过滤→滤液 (加入 Sevag 试剂去蛋白后加入 4 倍体积的 95%乙醇, 于 4℃冷藏柜中静置过夜)→离心 (4 000 r/min, 10 min) 得沉淀 (用乙醇、丙酮反复洗涤 2 次)→真空冷冻干燥→红腰豆多糖粗提物^[9-10]。

2.2 红腰豆多糖得率的测定

2.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制

葡萄糖标准品经 105℃干燥至质量恒定, 精确称取 10.00 mg 蒸馏水溶解, 移入 50 mL 容量瓶并定容, 配制质量浓度为 0.20 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。依次吸取 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 葡萄糖标准液于 50 mL 容量瓶中并加蒸馏水定容, 摇匀备用。于 6 个具塞刻度试管中, 各移入上述溶液 2 mL, 再分别加入 5%, 1.0 mL 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸混匀, 室温下静置 30 min, 0 号管为空白对照, 于 490 nm 波长处测吸光度。以吸光度值 A 为横坐标, 标准葡萄糖质量浓度 C (mg/mL) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得出回归方程: $C=0.1584-0.0012$, $R^2=0.9993$ 。

2.2.2 红腰豆多糖得率计算

将红腰豆粗多糖加蒸馏水溶解并稀释至适当质量浓度, 移取 2.0 mL 红腰豆粗多糖样品液按 2.2.1 方法操作, 于 490 nm 处测定其吸光度, 重复 3 次, 取平均值。按以下公式计算多糖得率^[11]。

红腰豆多糖得率 = $\frac{nCV_0}{1000m} \times 100\%$

式中: C 为提取的红腰豆多糖样品液的质量浓度 (mg/mL); n 为稀释倍数; V_0 为红腰豆多糖样品液的总体积, mL; m 为称取的预处理红腰豆粉的质量, g。

2.3 复合酶最佳组合的确定

根据前期研究的结果, 针对多糖分布部位, 选用木瓜蛋白酶、果胶酶及纤维素酶进行混合, 以充分破坏细胞结构, 最大限度地提高多糖得率。同时参照文献 [10,12-16] 中的方法, 并略有改进。

准确称取 2.0 g 预处理过的红腰豆干粉于 27 个三角瓶, 以 100:1 mL/g 液料比加入蒸馏水, 并用柠檬酸钠和磷酸二氢钠溶液调 pH 值, 设定 pH 值 6.0、50℃温度和 60 min 酶解条件, 按不同组合加入不同质量分数的木瓜蛋白酶、果胶酶及纤维素酶进行搅拌酶解作用后 (见表 1), 用冰水灭酶 15 min, 再按 2.2 试验方法测定提取液吸光度并计算多糖得率, 选取效果较好的复合酶组合进行后续试验。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Facts		
	木瓜蛋白酶添加量 Amount of papain	果胶酶添加量 Amount of pectinase	纤维素酶添加量 Amount of cellulase
	$A_1/\%$	$B_1/\%$	$C_1/\%$
1	0.5	0.5	0.5
2	1.0	1.0	1.0
3	1.5	1.5	1.5

2.4 红腰豆多糖提取单因素试验

设定 50℃温度条件, 称取预处理过的红腰豆粉 2.0 g, 木瓜蛋白酶、果胶酶和纤维素酶以质量比 3:1:3 混合, 预设 3%复和酶加酶量、液料比 80:1 mL/g、pH 值 6.0、酶解时间 1.0 h、超声功率 300 W、超声时间 30 min 为工艺流程中的常规量, 以液料比 (20:1、40:1、60:1、80:1、100:1、120:1 mL/g)、复合酶添加量 (1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%)、酶解 pH 值 (3、4、5、6、7、8)、酶解时间 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h)、超声功率 (100、200、300、400、500、600 W)、超声时间 (10、20、30、40、50、60 min) 6 个单因素变量替换工艺流程中相应的常规量, 按 2.1 和 2.2.2 试验步骤提取、测定并计算多糖得率。以上每个处理均重复 3 次。

2.5 影响红腰豆多糖得率显著因素的筛选设计

根据预试验确定的液料比、复合酶添加量、酶解 pH 值、酶解时间、超声功率、超声时间 6 个影响因素最适条件范围, 进行因素水平设计^[17] (见表 2)。

表 2 Plackett-Burman 试验设计的因素水平表和编码

Table 2 Factors and levels of Plackett-Burman experimental design			
因素 Facts	编码 Coding	低水平 (-) Low level	高水平 (+) Top level
液料比 Liquid-Solid ratio/(mL·g ⁻¹)	X_1	60:1	100:1
复合酶添加量 Amount of compound enzyme/%	X_2	3.0	5.0
酶解 pH 值 Enzyme hydrolysis pH value	X_3	4.0	6.0
酶解时间 Enzymolysis time/h	X_4	1.0	2.0
超声功率 Ultrasonic power/W	X_5	300	500
超声时间 Ultrasonic time/min	X_6	20	40

2.6 响应面法优化试验设计

利用 Box-Behnken 试验设计原理，以 Plackett-Burman 试验确定的 4 个对红腰豆多糖得率影响显著因素，进行四因素三水平的试验设计（见表 3）。建立数学回归模型并分析^[18-19]。

表 3 响应面分析因素与水平编码
Table 3 Factors and levels of central composite design experiments for RSA

因素 Factors	水平 Level		
	-1	0	1
复合酶添加量 Amount of compound enzyme A_2 /%	3.0	4.0	5.0
酶解 pH 值 Enzyme hydrolysis pH value B_2	4.0	5.0	6.0
超声功率 Ultrasonic power C_2 /W	300	400	500
超声时间 Ultrasonic time D_2 /min	20	30	40

2.7 红腰豆多糖结构初步分析

将上述所提取的红腰豆粗多糖通过 DEAE-52 纤维素层析柱和 Sephadex G-200 层析柱两步纯化，获得一种纯度较高的红腰豆多糖，经浓缩、冷冻干燥用于结构初步分析与鉴定^[20-22]。

紫外光谱分析：将所提取的红腰豆多糖用蒸馏水配置成质量浓度为 1.0 mg/mL 的溶液，以蒸馏水为空白，用紫外分光光度计在 400~190 nm 范围内进行连续扫描。

红外光谱分析：以 KBr 为对照，取 0.5g KBr 与所提取的红腰豆多糖 5 mg 研匀，制成薄片，上红外光谱仪扫描分析，扫描范围 400~4 000 cm^{-1} 。

糖苷键分析：取所提取的红腰豆多糖 25 mg 进行高碘酸氧化，测定所消耗的高碘酸量和所释放的甲酸量，高碘酸氧化的产物通过 Smith 降解，鉴定所降解的产物，由此判断红腰豆多糖的糖苷键连接方式。

3 结果与分析

3.1 复合酶最佳配比的确定

正交试验结果和极差 R 分析（表 4、5）可知，果胶酶对红腰豆多糖得率影响最小，其次是木瓜蛋白酶，纤维素酶影响最大；且纤维素酶和木瓜蛋白酶对试验结果有显著的影响，果胶酶则影响不显著。可能因为纤维素酶和木瓜蛋白酶能高效降解细胞壁及水解蛋白多糖，使多糖充分、快速从细胞组织内分离出来，故提取效果都比较好。而果胶酶影响较小，可能是由于红腰豆细胞中果胶含量较少，造成果胶酶对细胞间和细胞壁内的果胶质降解程度有限，不利细胞从组织内分离出来及阻碍了细胞壁裂解。

最佳理论优化方案为 $A_1B_1C_1$ ，因正交试验表内没有 $A_1B_1C_1$ 组合，而方案中 7 ($A_1B_1C_1$) 提取率最高，故进行 3 次平行对比试验，得理论方案多糖得率平均值为 11.87%，低于方案 7 的 12.14%，这可能是由于复合酶配比中增加果胶酶的比例，造成对应的木瓜蛋白酶和纤维素酶用量的减少，导致酶解效果下降，多糖得率

降低。考虑到酶解效果及成本，因此后续试验复合酶均以 $A_1B_1C_1$ 组合，即木瓜蛋白酶：果胶酶：纤维素酶的质量比=3：1：3 配比混合。

表 4 正交试验设计及结果
Table 4 Orthogonal test design and results

试验序号 No.	木瓜蛋白酶添加量 Amount of papain A_1	果胶酶添加量 Amount of pectinase B_1	纤维素酶添加量 Amount of cellulase C_1	多糖得率 Yield of polysaccharides/%
1	1	1	1	8.33
2	1	2	2	9.39
3	1	3	3	10.64
4	2	1	2	10.92
5	2	2	3	11.48
6	2	3	1	9.97
7	3	1	3	12.14
8	3	2	1	9.75
9	3	3	2	10.86
K_1	28.36	31.39	28.05	
K_2	32.37	30.62	31.17	
K_3	32.75	31.47	34.26	
R	1.46	0.28	2.07	
主次顺序 Important order	$C_1>A_1>B_1$			
最优水平 Optimal level	A_13	B_13	C_13	
最优组合 Optimal combination	$A_13B_13C_13$			

表 5 方差分析结果
Table 5 Results of variance analysis

方差来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
A_1	3.9441	2	1.9720	31.2856	0.0310	*
B_1	0.1469	2	0.0734	1.1650	0.4619	
C_1	6.4274	2	3.2137	50.9841	0.0192	*
误差	0.1261	2	0.0630			

注：用**表示极显著($P<0.01$)；用*表示显著($P<0.05$)； $P>0.05$ 为不显著。
Note: $P<0.01$ highly significant is marked with **; $P<0.05$ is significant, marked with *; $P>0.05$ is not significant.

3.2 单因素试验结果

各因素对红腰豆多糖得率影响情况如表 6 所示，由表 6 可知：

液料比过少时不利于红腰豆粉的充分溶解，提取效果不佳，过量则不利于酶的水解反应进行，造成提取效果下降。综合考虑溶剂用量、浸提效果及后续浓缩能耗等问题，故液料比选择 60：1~100：1 mL/g 为宜。

酶在最佳浓度范围内时，随着酶添加量的加大，酶与底物接触机会相应增加，可最大限度地发挥作用，使细胞内容物快速充分释放出来。达最大值后，继续提高酶浓度，由于底物完全被酶分子所饱和，一部分酶分子失去与底物结合的机会，造成底物水解反应速度降低，且酶具有竞争性的抑制作用特点，其作用必然受到制约，这些都导致多糖得率相应降低。从酶解的效果和节约成本角度考虑，因此复合酶添加量选择 3.0%~5.0%为宜。

表 6 不同处理组对红腰豆多糖得率的影响

Table 6 Effects of different treatments on extraction yield of red kidney bean polysaccharides

液料比对红腰豆多糖得率的影响 Effect of solid-liquid ratio on extraction yield of red kidney bean polysaccharides		复合酶添加量对红腰豆多糖得率的影响 Effect of amount of complex enzymes on extraction yield of red kidney bean polysaccharides		酶解 pH 值对红腰豆多糖得率的影响 Effect of enzyme hydrolysis pH value on extraction yield of red kidney bean polysaccharides		酶解时间对红腰豆多糖得率的影响 Effect of enzymolysis time on extraction yield of red kidney bean polysaccharides		超声功率对红腰豆多糖得率的影响 Effect of ultrasonic power on extraction yield of red kidney bean polysaccharides		超声时间对红腰豆多糖得率的影响 Effect of ultrasonic time on extraction yield of red kidney bean polysaccharides	
液料比 Liquid-solid ratio/ (mL·g ⁻¹)	多糖得率 Yield of Polysaccharides/%	复合酶添加量 Amount of compound enzyme/%	多糖得率 Yield of Polysaccharides/%	酶解 pH 值 Enzyme hydrolysis pH value	多糖得率 Yield of Polysaccharides/%	酶解时间 Enzymolysis time/h	多糖得率 Yield of Polysaccharides/%	超声功率 Ultrasonic power/W	多糖得率 Yield of Polysaccharides/%	超声时间 Ultrasonic time/min	多糖得率 Yield of Polysaccharides/%
20:1	5.67±0.09	1	6.43±0.12	3	7.22±0.08	0.5	5.65±0.11	100	7.02±0.13	10	7.12±0.13
40:1	7.23±0.14	2	9.21±0.09	4	9.89±0.11	1.0	8.23±0.14	200	8.12±0.08	20	8.91±0.08
60:1	8.41±0.17	3	10.39±0.14	5	12.87±0.07	1.5	12.56±0.08	300	9.89±0.14	30	12.86±0.14
80:1	12.56±0.11	4	12.84±0.11	6	10.26±0.13	2.0	12.75±0.07	400	12.67±0.15	40	10.25±0.11
100:1	11.81±0.12	5	12.53±0.07	7	8.31±0.09	2.5	12.87±0.12	500	10.97±0.12	50	9.79±0.09
120:1	11.55±0.08	6	12.16±0.13	8	7.55±0.12	3.0	12.91±0.09	600	9.91±0.17	60	9.12±0.15

注：单因素固定水平为：料液比、复合酶添加量、酶解 pH 值、酶解时间、超声功率和超声时间为 80 : 1 mL·g⁻¹、3%、6.0、1 h、300 W、30 min。
Note: Liquid-Solid ratio, amount of compound enzyme, enzyme hydrolysis pH value, enzymolysis time, ultrasonic power, ultrasonic time is single factor fixed level was 80 : 1 mL·g⁻¹, 3%, 6.0, 1 h, 300 W, 30 min.

pH 值不同，酶与底物的亲和力及催化速度也不同，这可能是由于酸碱度一方面影响酶的催化速度，另一方面起到维持酶分子活性中心的最佳立体三维构象促进酶分子与底物结合。因此 pH 值只有在特定酸碱度值的时候，酶的活性才能达到最大，若偏离该值，都会造成其活性下降。故酶解 pH 值选择 4.0~6.0 为宜。

酶解时间太短影响酶解效果，当反应时间超过 1.5 h 后，多糖得率随时间的延长仅有微量增加，可见，反应基本达到了相对平衡状态。从提高生产效率的角度看，延长酶解时间对多糖提取意义不大，因此选择酶解时间在 1.0~2.0 h 为宜。

随着超声功率的加大，红腰豆多糖得率先升后降，可

快速、充分破碎植物细胞破壁，促进细胞内多糖化合物迅速渗出。接着减小可能是因为过强的超声功率会引起细胞及溶液局部升温过高，裂解了目标成分的结构。且从节省能源角度考虑，故选择超声功率在 300~500 W 为宜。

红腰豆多糖得率在超声时间 30 min 达最大值，可能是因为此时酶解反应进行得较为充分了，组织内多糖基本渗出。而后由于长时间超声作用使部分多糖被超声波剪切力降解或高频运动产热降解，造成多糖含量的减少，同时会增加能耗，所以超声时间选择在 20~40 min 为宜。

3.3 Plackett-Burman 试验设计及筛选关键因素结果
采用 Minitab 15 软件对表 2 进行试验设计及结果效应评价，结果见表 7、8 所示。

表 7 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Table 7 Experiments design of Plackett-Burman and response values

试验号 No.	液料比 X_1 Liquid-Solid ratio	复合酶添加量 X_2 Amount of compound enzyme	酶解 pH 值 X_3 Enzyme hydrolysis pH	酶解时间 X_4 Enzymolysis time	超声功率 X_5 Ultrasonic power	超声时间 X_6 Ultrasonic time	多糖得率 Yield of polysaccharides/%
1	1	1	-1	-1	-1	1	11.61
2	1	-1	-1	1	1	-1	9.64
3	-1	-1	1	1	-1	1	10.86
4	1	-1	-1	-1	1	1	11.73
5	1	1	1	1	1	-1	12.80
6	1	-1	1	1	-1	1	11.46
7	-1	1	-1	1	1	1	12.27
8	-1	1	1	-1	1	1	13.36
9	-1	-1	1	-1	1	-1	12.68
10	1	1	1	-1	-1	-1	11.91
11	-1	1	-1	1	-1	-1	9.80
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9.02

表 8 Plackett-Burman 试验设计各因素效应评价

Table 8 Factors and effect estimates of Plackett-Burman experiments

因素 Factors	效应 Effect	系数 Coefficient	系数标准误差 Standard error	F 值 F value	P 值 P value	重要性 Importance	显著性 Significance
常量 Constant		11.4283	0.1535	74.46	0		
X_1	0.1933	0.0967	0.1535	0.63	0.556	6	
X_2	1.0600	0.5300	0.1535	3.45	0.018	3	*
X_3	1.5000	0.7500	0.1535	4.89	0.005	1	**
X_4	-0.5800	-0.2900	0.1535	-1.89	0.117	5	
X_5	1.3033	0.6517	0.1535	4.25	0.008	2	**
X_6	0.9067	0.4533	0.1535	2.95	0.032	4	*

由表 8 的结果可看出，影响多糖得率强弱排序依次是： X_3 （酶解 pH 值） $>X_5$ （超声功率） $>X_2$ （复合酶添加量） $>X_6$ （超声时间） $>X_4$ （酶解时间） $>X_1$ （液料比）。其中酶解 pH 值和超声功率对红腰豆多糖得率的影响达到极显著水平，复合酶添加量和超声时间达到显著水平，而酶解时间和液料比影响不显著。因此选择酶解 pH 值、超声功率、复合酶添加量和超声时间这 4 个因素进一步做响应面法优化设计和分析。根据正负效应和节约成本

的原则，并结合单因素试验，将液料比和酶解时间这两个因素固定在较好水平上，即液料比为 80：1 mL/g，酶解时间 1.5 h 进行后续试验。

3.4 红腰豆多糖提取响应面法优化结果

在 Plackett-Burman 试验结果基础上，考察 A_2 （复合酶添加量）、 B_2 （酶解 pH 值）、 C_2 （超声功率）和 D_2 （超声时间）这 4 个自变量，对红腰豆多糖得率的影响，采用响应面法进行优化，结果见表 9，数学模型方差分析见表 10。

表 9 响应面法优化试验方案及结果

Table 9 Experimental design and results of response surface methodology

试验号 No.	复合酶添加量 Compound enzyme addition A_2	酶解 pH 值 Enzyme hydrolysis pH value B_2	超声功率 Ultrasonic power C_2	超声时间 Ultrasonic time D_2	多糖得率 Yield of polysaccharides/%
1	0	0	0	0	14.28
2	0	0	-1	1	12.43
3	-1	0	-1	0	11.98
4	0	0	0	0	14.18
5	0	0	-1	-1	12.95
6	1	0	0	-1	12.84
7	0	0	1	1	12.94
8	-1	-1	0	0	13.21
9	1	1	0	0	13.76
10	0	0	0	0	14.18
11	0	0	0	0	14.18
12	0	0	1	-1	12.85
13	0	-1	-1	0	12.64
14	-1	0	0	-1	12.94
15	0	-1	0	1	13.04
16	-1	0	0	1	12.63
17	0	1	0	-1	13.45
18	1	0	0	1	13.04
19	-1	1	0	0	13.25
20	0	1	0	1	13.33
21	1	0	-1	0	13.73
22	0	1	1	0	13.61
23	1	0	1	0	12.12
24	0	-1	1	0	13.15
25	0	0	0	0	14.28
26	0	1	-1	0	13.35
27	-1	0	1	0	13.66
28	1	-1	0	0	13.04
29	0	-1	0	-1	13.15

对试验数据（表 9）进行分析，可得到相关回归系数，其二次多项式方程为：

$$Y = +14.22000 + 0.071667 A_2 + 0.10417 B_2 - 0.064167 C_2 + 0.21000 D_2 - 0.82250 A_2 B_2 + 0.1275 A_2 C_2 + 0.17000 A_2 D_2 + 0.15250 B_2 C_2 - 0.062500 B_2 D_2 - 2.50000 E - 003 C_2 D_2 - 0.63042 A_2^2 - 0.72917 B_2^2 - 0.70667 C_2^2 - 0.28292 D_2^2$$

式中： Y 为多糖得率，%； A_2 、 B_2 、 C_2 和 D_2 分别为复合酶添加量（%）、酶解 pH 值、超声功率（W）和超声时间（min）。

进一步对该模型及回归系数进行显著性分析，结果见表 10。

从表 10 结果可看出，该回归模型 $P < 0.0001$ （极显著），

其失拟项 $P = 0.0894 > 0.05$ （不显著），说明试验设计可靠，可对二次回归方程相应值进行预测；同时模型的决定系数 $R^2 = 0.9870$ ，说明模型拟合程度良好；校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9740$ ，表明预测值与实测值之间具有高度相关性；再次变异系数 $CV = 0.75\%$ ，也说明其置信度较高。因此可以用此回归模型对红腰豆多糖得率进行分析和预测。且 4 个因素对总黄酮得率的影响均非简单的性线关系，其中一次项 B_2 、 C_2 ，交互项 $A_2 B_2$ 、 $A_2 C_2$ 、 $C_2 D_2$ 以及二次项中的 A_2^2 、 B_2^2 、 C_2^2 、 D_2^2 都属于影响极显著的因素（ $P < 0.01$ ），自变量 A_2 、 D_2 和交互项 $A_2 D_2$ 属于影响显著因素（ $P < 0.05$ ），交互项 $B_2 C_2$ 、 $B_2 D_2$ 不显著（ $P > 0.05$ ）。且 A_2 、 B_2 、 C_2 和 D_2 的显著性结果和 Plackett-Burman 试验中显著性分析相一致。

表 10 回归方程各项的方差分析

Table 10 Variance analysis of parameters in regression equation

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型 Mode	10.51	14	0.75	76.04	< 0.0001	sig
A_2	0.062	1	0.062	6.25	0.0255	*
B_2	0.53	1	0.53	53.63	< 0.0001	**
C_2	0.13	1	0.13	13.19	0.0027	**
D_2	0.049	1	0.049	5.01	0.0420	*
A_2B_2	0.12	1	0.12	11.71	0.0041	**
A_2C_2	2.71	1	2.71	274.21	< 0.0001	**
A_2D_2	0.065	1	0.065	6.59	0.0224	*
B_2C_2	0.016	1	0.016	1.58	0.2289	
B_2D_2	2.500E-005	1	2.500E-005	2.533E-003	0.9606	
C_2D_2	0.093	1	0.093	9.43	0.0083	**
A_2^2	2.58	1	2.58	261.23	< 0.0001	**
B_2^2	0.52	1	0.52	52.61	< 0.0001	**
C_2^2	3.45	1	3.45	349.47	< 0.0001	**
D_2^2	3.24	1	3.24	328.24	< 0.0001	**
残差 Residual	0.14	14	9.868E-003			
失拟项 Lack-of-fit test	0.13	10	0.013	4.21	0.0894	不显著 Not sig
纯误差 Pure error	0.012	4	3.000E-003			
总和 Total	10.64	28				

由软件对回归模型进行数学分析获得红腰豆多糖得率的最佳条件为：复合酶添加量 4.12%、酶解 pH 值为 4.98、超声功率 396.26 W 为和超声时间 34.10 min，在此参数下，预测的多糖得率最大理论值为 14.27%。

3.5 优化条件下红腰豆多糖得率的验证结果

考虑到实际操作的方便将条件调为：复合酶添加量 4.0%、酶解 pH 值 5.0、超声功率 400 W 和超声时间 34.0 min，并结合液料比 80：1 mL/g，酶解时间 1.5 h 进行试验，在 50℃温度条件下进行 3 次平行红腰豆多糖提取试验，红腰豆多糖得率（14.13%、14.16%和 14.16%）平均值为 14.15%。实际值与预测值的 RSD（相对标准差）为 0.122%，差异不显著。因此，采用响应面法优化得到的参数基本准确可靠，具有一定的实用价值。

3.6 红腰豆多糖结构初步分析结果

两步纯化后红腰豆多糖的紫外光谱（见图 1）可看出，在 190 nm 有最大吸收峰，无核酸（260 nm）和蛋白质（280 nm）的特征吸收峰，且无其他杂质峰，表明红腰豆多糖纯度较高，不含核酸和蛋白质等其他杂质。红外光谱扫描（如图 2）可知，红腰豆多糖在 3 361 cm⁻¹（-OH）、2 881 cm⁻¹（-CH₂）、1 617 cm⁻¹（-COOH）有较明显的多糖特征吸收峰，属于多糖类化合物；此外，在 909 cm⁻¹处有吸收峰，推测为醛基（-CHO）的变角振动，表明红腰豆多糖可能含有醛基；在 857 cm⁻¹处有吸收峰，表明红腰豆多糖中的糖苷键结构为 α 型。红腰豆多糖经高碘酸氧化和 Smith 降解后，消耗的高碘酸量与生成的甲酸量比为 1.5：1，薄层层析鉴定 Smith 降解的产物仅为甘油和赤藓醇，表明红腰豆多糖的糖苷键连接为（1→4）和（1→6）连接。

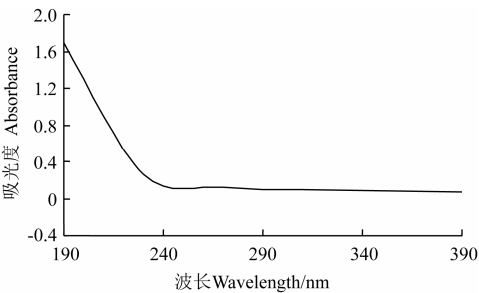


图 1 红腰豆多糖紫外吸收光谱图
Fig.1 Ultraviolet spectra of red kidney bean polysaccharides

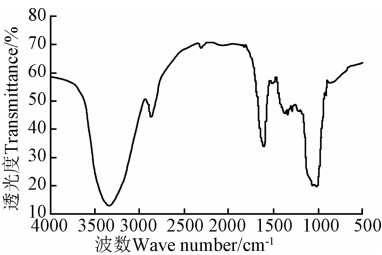


图 2 红腰豆多糖红外吸收光谱图
Fig.2 Fourier transform infrared spectra of red kidney bean polysaccharides

3.7 成本分析及应用前景

取 2 g 预处理过的红腰豆干粉，采用传统热水醇沉法提取红腰豆多糖，通过单因素及优化试验，每次试验进行 3 次平行，获得最优条件为液料比 50：1 mL/g、提取时间 3 h、提取温度 70℃，多糖得率为 6.69%。与本研究超声波辅助酶法提取最优条件比较^[23-25]，超声波辅助酶

法提取成本增加合计约 0.72 元/kg (以处理 1 kg 红腰豆计算, 耗材方面, 较传统提取方法而言, 超声波辅助酶法提取增加了水、酶及试剂的成本, 经粗略计算为 0.22 元; 能耗方面, 估算合计增加 0.5 元), 即成本增加 0.072%, 但产品得率却增加 111.5%, 且提取时间缩短了 31.1%。无论从产品得率还是生产周期而言, 超声波辅助酶法提取明显优于传统水提取, 这主要是因为酶解和空化效应更有利于改变物质的组织结构和状态, 促进红腰豆多糖的溶解, 提高产品得率。

超声波辅助酶法提取技术的工艺操作并不复杂, 成本增加极低, 但提取时间缩短, 产品得率大大提高, 且提取温度较低, 适合工业化生产, 具有很好的应用前景。

4 结 论

1) 通过正交试验获得提取红腰豆多糖所用的复合酶最佳配比质量比为: 木瓜蛋白酶 1.5%, 果胶酶 1.0%, 纤维素酶 1.5%即 3:1:3。影响强弱依次为: 果胶酶<木瓜蛋白酶<纤维素酶。

2) 在 50℃温度条件固定情况下, 通过单因素试验和 Plackett-Burman 试验并结合响应面法, 有效地得到影响红腰豆多糖得率的 4 个显著因素, 并实现了提取条件的优化。得到最佳提取条件参数为: 液料比为 80:1 mL/g、复合酶添加量 4.0%、酶解 pH 值为 5.0、酶解时间 1.5 h、超声功率 400 W、超声时间 34.0 min, 红腰豆多糖得率平均为 14.15%, 与预测值 (14.27%) 的相对标准差为 0.122%, 差异不显著。

3) 经紫外和红外光谱扫描表明红腰豆多糖经 DEAE-32 纤维素层析柱和 Sephadex G-200 层析柱两步纯化后纯度较高, 具有多糖的特征吸收峰; 通过高碘酸氧化和 Smith 降解反应分析可推测红腰豆多糖的连接方式为 $\alpha(1\rightarrow4)$ 和 $(1\rightarrow6)$ 连接。

4) 经成本估算, 超声波辅助酶法提取方法与传统水提法相比, 成本仅增加 0.072%, 产品得率却增加 111.5%, 提取时间缩短了 31.1%, 且提取温度较低, 适合工业化生产, 推广价值高, 具有很好的应用前景。

【参 考 文 献】

- [1] 沈志平, 吴美云. 豆类食品的营养[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1998.
- [2] 丁保金, 金丽琴, 吕建新. 多糖的生物活性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(8): 561—564.
- [3] 吴笛笛. 多糖的作用及其研究进展[J]. 沈阳师范大学学报: 自然科学版, 2008, 26(2): 221—223.
Wu Jiadi. Advance in study of polysaccharide[J]. Journal of Shenyang Normal University: Natural Science, 2008, 26(2): 221—223. (in Chinese with English abstract)
- [4] 许春平, 杨琛琛, 郑坚强, 等. 植物叶多糖的提取和生物活性综述[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(14): 111—114.
Xu Chunping, Yang Chenchen, Zheng Jianqiang, et al. Review on extraction and biological activity of

- Polysaccharides from plant leave[J]. Food Reseach and Development, 2014, 35(14): 111—114. (in Chinese with English abstract)
- [5] 王涛, 赵谋明. 多糖的研究进展[J]. 现代食品科技, 2007, 23(1): 103—106.
- [6] Bridgers E N, Chinn M S, Truong V D. Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars[J]. Industrial Crops and Products, 2010, 32(3): 613—620.
- [7] Nyan K L, Tan C P, Lai O M, et al. Enzyme-assisted aqueous extraction of Kalahari melon seed oil: Optimization using response surface methodology[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2009, 86(12): 1235—1240.
- [8] 郭孝武. 超声提取分离[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [9] 陈红, 王大为, 李侠, 等. 不同方法提取大豆多糖的工艺优化研究[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 6—10.
Chen Hong, Wang Dawei, Li Xia, et al. Orthogonal-array-design optimization of extraction technologies of polysaccharide from soybeans[J]. Food Science, 2010, 31(4): 6—10. (in Chinese with English abstract)
- [10] 徐扬, 杨保伟, 柴博华, 等. 超声波-酶法提取海带多糖及其抑菌活性[J]. 农业工程学报, 2010, 26(增刊 1): 356—362.
Xu Yang, Yang Baowei, Chai Bohua, et al. Extraction of polysaccharides from Laminaria Japonica by ultrasonic-associated enzyme method and its antimicrobial activity[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2010, 26(Supp.1): 356—362. (in Chinese with English abstract)
- [11] 罗光宏, 李金燕, 叶生宝, 等. 黄参多糖提取工艺参数优化[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 40—45.
Luo Guanghong, Li Jinyan, Ye Shengbao, et al. Optimization of process parameters for the extraction of polysaccharides from Sphallerocarpus gracilis roots[J]. Food Science, 2013, 34(24): 40—45. (in Chinese with English abstract)
- [12] 李杨, 冯红霞, 王欢, 等. 超声波辅助水酶法提取红花籽油的工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(7): 63—67.
Li Yang, Feng Hongxia, Wang Huan, et al. The process of ultrasound technology assisted aqueous enzymatic extraction of safflower seed oil[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(7): 63—67. (in Chinese with English abstract)
- [13] 张利芳, 张名位, 黄文, 等. 纤维素酶协同超声波辅助提取苦瓜多糖工艺优化[J]. 农业机械学报, 2010, 41(11): 142—147.
Zhang Lifang, Zhang Mingwei, Huang Wen, et al. Optimization

- on cellulose and ultrasonic wave assisted extraction technology of *Momordica charantia* polysaccharides[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(11): 142—147. (in Chinese with English abstract)
- [14] 马淑凤, 王利强, 胡志超, 等. 酶法提取白灵菇深层发酵菌丝体多糖的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(9): 198—201. Ma Shufeng, Wang Liqiang, Hu Zhichao, et al. Enzymatic extraction of the submerged mycelium polysaccharide from *Pleurotus nebrodensis*[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2006, 22(9): 198—201. (in Chinese with English abstract)
- [15] 程伟, 秦俊哲, 杜军国, 等. 桑黄多糖超声波协同纤维素酶法提取的工艺优化[J]. 现代食品科技, 2012, 28(6): 662—666. Cheng Wei, Qin Junzhe, Du Junguo, et al. Optimization of Ultrasonic-assisted enzymatic extraction of Polysaccharide from *Phellinus igniarius*[J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(6): 662—666. (in Chinese with English abstract)
- [16] 黄雅君, 毕红梅, 郑文凤, 等. 超声波辅助法协同酶解提取平菇水溶性多糖的工艺研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2014, 26(3): 35—39. Huang Yajun, Bi Hongmei, Zheng Wenfeng, et al. Study on enzymolysis extraction process of water soluble polysaccharide from *pleurotus ostreatus* by ultrasonic-assisted method[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2014, 26(3): 35—39. (in Chinese with English abstract)
- [17] 刘虹才, 鄢洪德, 徐玮, 等. 响应面法优化 *Aspergillus oryzae* Cs007 产酯水解酶发酵条件[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(4): 74—79. Liu Hongcai, Yan Hongde, Xu Wei, et al. Optimization of ester hydrolase-production conditions of *aspergillus oryzae* Cs007 by response surface methodology[J]. Chemistry and Bioengineering, 2012, 29(4): 74—79. (in Chinese with English abstract)
- [18] 周泉城, 申德超, 区颖刚. 超声波辅助提取经膨化大豆粕中低聚糖工艺[J]. 农业工程学报, 2008, 24(5): 245—249. Zhou Quancheng, Shen Dechao, Qu Yinggang. Ultrasonic assisted extraction of oligosaccharide from defatted soybean meal after extrusion[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2008, 24(5): 245—249. (in Chinese with English abstract)
- [19] 柯乐芹, 张东旭, 肖建中. 杏鲍菇深加工残渣多糖酶法微波辅助提取工艺优化[J]. 农业工程学报, 2014, 30(4): 332—338. Ke Leqin, Zhang Dongxu, Xiao Jianzhong. Optimization of microwave-assisted enzyme extraction process of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* stalk residue after deep treatment[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2014, 30(4): 332—338. (in Chinese with English abstract)
- [20] 方积年. 多糖的分离纯化及其纯度鉴别与分子量测定[J]. 药学通报, 1984, 19(10): 46—49.
- [21] 王振斌, 刘加友, 马海乐, 等. 无花果多糖提取工艺优化及其超声波改性[J]. 农业工程学报, 2014, 30(10): 262—269. Wang Zhenbin, Liu Jiayou, Ma Haile, et al. Extraction process optimization and ultrasonic modification of polysaccharide from *Ficus carica* L.[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2014, 30(10): 262—269. (in Chinese with English abstract)
- [22] 苏浩. 豆渣中水溶性大豆多糖提取、结构鉴定及物性学研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2009. Su Hao. Study on Extraction, Structure Identification and Physical Properties of Water-Soluble Soybean Polysaccharide From Soybean dregs[D]. Urumchi: Xinjiang Agriculture University, 2009. (in Chinese with English abstract)
- [23] 王鑫, 于国萍, 杜成亮, 等. 用 AspenPlus 模拟反胶束萃取大豆蛋白过程中毛油脱溶操作[J]. 农业工程学报, 2013, 29(3): 279—284. Wang Xin, Yu Guoping, Du Chengliang, et al. Simulation by Aspen Plus on desolventizing of crude oil in soybean protein extracting process with reverse micelles[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(3): 279—284. (in Chinese with English abstract)
- [24] 曲文娟, 马海乐, 王婷, 等. 交替双频逆流超声辅助提取条斑紫菜蛋白和多糖[J]. 农业工程学报, 2013, 29(1): 285—292. Qu Wenjuan, Ma Haile, Wang Ting, et al. Alternating two-frequency countercurrent ultrasonic-assisted extraction of protein and polysaccharide from *Porphyra yezoensis*[J]. Transactions of the Chinese Society of Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(1): 285—292. (in Chinese with English abstract)
- [25] 袁秋琳, 梅俊, 彭勇, 等. 藏灵菇益生菌奶片的制作及其品质分析[J]. 农业工程学报, 2013, 29(11): 278—285. Yuan Yilin, Mei Jun, Peng Yong, et al. Production and quality analysis of Tibetan kefir milk slice[J]. Transactions of the Chinese Society of Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(11): 278—285. (in Chinese with English abstract)

Optimal extraction technology of polysaccharides from red kidney bean using ultrasonic assistant with enzyme

Li Ying, Chen Xuemei, Yan Yueping, Lai Danni, Chen Xiaohong, Shi Xiaoqiong

(Minxi Food Research Institute, Longyan University, Longyan 364012, China)

Abstract: Red kidney bean is a kind of valuable edible and medicinal soy food, which contains rich nutrients and a lot of effective ingredients. Polysaccharides are the main active component of red kidney beans, which have a variety of pharmacological effects such as anti-aging, anti-virus, anti-oxidant, antitumor and decreasing blood sugar and blood fat. In recent years, there have been substantial studies on the healthcare value, nutrition composition, product development of red kidney beans, but the extraction process of polysaccharides from red kidney beans and the analysis on its structure and biological activity have not been explored yet. The study respectively used enzyme's characteristics of effectively destroying the cell wall and keeping the activity of polysaccharide, etc, and the ultrasonic's characteristics of rapidness and energy saving by producing the effect of cavitation, shearing and intense mixing in liquid with the dispersion effect, to damage the cell tissue. By using the combined enzymatic and ultrasonic method assisted to extract polysaccharides out of red kidney beans, taking red kidney beans as raw material and polysaccharides yield as the index, and fixing the temperature at 50°C, the study firstly applied the $L_9(3^4)$ orthogonal experiments to screen out the best ratio of compound enzymes; and then on the basis of single factor experiment, the Plackett-Burman design was used to analyze solid-liquid ratio, amount of complex enzyme, pH value for enzyme hydrolysis, enzymolysis time, ultrasonic power and ultrasonic time, and these 6 factors were significant. Furthermore, the main factors affecting polysaccharides yield (pH value for enzyme hydrolysis, ultrasonic power, amount of composite enzyme and ultrasonic time) were investigated and optimized by response surface design using Box-Behnken center-united experiment software. Meanwhile, red kidney beans polysaccharide structure had been preliminarily analyzed by using ultraviolet spectrum and infrared spectrum scanning, together with analytical results of the glycosides. The results showed that the best ratio of compound enzymes for Papain, Pectinase and Cellulase enzyme was 3:1:3; among 6 factors, the influences of pH value for enzyme hydrolysis and ultrasonic power on the extraction of red kidney beans polysaccharides reached extremely significant effect, and amount of composite enzyme and ultrasonic time were the significant factors. For optimum technological parameters, i.e. solid-liquid ratio 80:1 mL/g, amount of composite enzyme 4.0%, pH value of 5.0 for enzyme hydrolysis, enzymolysis time 1.5 h, ultrasonic power 400 W and ultrasonic time 34.0 min, the yield of the polysaccharides of red kidney beans was 14.15%. Ultraviolet spectrum scan and infrared spectrum scan showed that after DEAE-52 chromatography column and Sephadex G-200 cellulose chromatography column, red kidney beans polysaccharide had higher purification; the connecting way of red kidney beans polysaccharides was alpha (1→4) and (1→6) connection, which could be speculated by periodate oxidation and Smith degradation analysis. The results provide theory basis for further development and utilization of combined enzymatic and ultrasonic method in assisting to extract polysaccharides out of red kidney beans and subsequent research on red kidney beans polysaccharides structure characterization and biological activity.

Key words: polysaccharides; ultrasonic waves; enzymes; red kidney; Plackett-Burman design ; response surface analysis ; structure analysis