

响应面法对薰衣草内生真菌胞内多糖的最佳提取工艺及体外抗氧化活性研究

李香慧, 任浩然, 玛依拉·吐尔地别克, 秦瑞坪, 范学海, 张雪梅, 赛德艾合买提·吾拉木*

伊犁师范大学, 新疆 伊宁 835000

DOI:10.61369/MRP.2025110040

摘要 : 研究薰衣草内生菌细胞内多糖的提取条件, 并研究其体外抗氧化性。本项目拟以薰衣草为试材, 通过超声波辅助提取胞内多糖, 考察超声波功率、料液比、超声波时间等因素对其产率的影响, 并对其进行优化。基于以上结果, 采用响应面分析方法, 对薰衣草胞内多糖进行有效提取; 采用 DPPH、ABTS、羟自由基清除等方法, 研究其对薰衣草细胞内多糖的抗氧化作用。结果表明, 当料液比例为 40:1 (mL/g), 超声时间为 30 min, 超声功率为 90 w 时多糖提取率为最优。胞内多糖具有较强的抗 DPPH、ABTS 自由基及羟基自由基的作用, 且随其含量的变化而变化, 具有较强的体外抗氧化能力。

关键词 : 薰衣草; 胞内多糖; 超声波; 响应面优化; 抗氧化活性

Optimization of Extraction Technology and Antioxidant Activity of Endophytic Fungi from Lavender by Response Surface Methodology

Li Xianghui, Ren Haoran, Maira · Tuerdibieke, Qin Ruiping, Fan Xuehai, Zhang Xuemei, Said Aihamiti · Wulamu*

Yili Normal University, Yining, Xinjiang 835000

Abstract : The extraction conditions of polysaccharides from endophytic bacteria of lavender were studied, and their antioxidant activity in vitro was studied. This project intends to use lavender as the test material to extract intracellular polysaccharide by ultrasonic-assisted extraction, investigate the influence of ultrasonic power, solid-liquid ratio, ultrasonic time and other factors on its yield, and optimize it. Based on the above results, the response surface analysis method was used to extract polysaccharide from lavender cells effectively. DPPH, ABTS and hydroxyl radical scavenging methods were used to study the antioxidant effects of polysaccharides in lavender cells. The results showed that the optimal extraction rate was obtained when the ratio of solid to liquid was 40:1 (ml/g), ultrasonic time was 30 minutes and ultrasonic power was 90 w. Intracellular polysaccharide has strong anti-DPPH, ABTS and hydroxyl free radicals, and it changes with the change of its content, and had strong antioxidant ability in vitro.

Keywords : lavender; intercellular polysaccharide; ultrasonic; response surface optimization; antioxidant activity

薰衣草 (*Lavandula angustifolia* Mill) 是唇型科薰衣草属多年生亚灌木植物, 其花穗呈穗状, 颜色为紫蓝色或淡紫色, 具有强烈的香气。薰衣草的香气主要来自其含有的挥发性油脂, 如萜烯、醇类和酯类等^[1]。薰衣草还具有其他多种用途, 如作为药材用于治疗伤风感冒、腹痛、湿疹^[2]等症状; 作为香料, 其花朵和叶子含有油腺, 轻轻接触即可释放出香味, 在香料、肥皂等行业中, 薰衣草常作为可缓解情绪的驱风剂和药用矫味剂; 也可以作为绘画和陶瓷的颜料和良好的花蜜植物。除此之外, 还具有一定的抗菌、抗炎和抗氧化作用^[3,4]; 其未来前景广阔。研究发现, 从薰衣草的根组织中可分离出内生真菌^[5], 植物内生真菌是指在其生活史的部分阶段或全部阶段生

课题信息: 2021年度伊犁师范大学微生物资源保护与开发重点实验室开放课题, 项目名称: 薰衣草内生菌多糖的分离纯化以及抗氧化活性研究, 项目编号: YLUKLM202101。

作者简介:

李香慧 (2001.05—), 女, 汉族, 河南周口人, 本科学历, 伊犁师范大学, 生命科学与技术学院, 2025级硕士研究生;

任浩然 (2002.02—), 男, 汉族, 河南商丘人, 本科学历, 伊犁师范大学, 生命科学与技术学院, 学生;

玛依拉·吐尔地别克 (1990.07—), 女, 哈萨克族, 新疆伊宁人, 硕士学历, 伊犁师范大学, 生命科学与技术学院, 专任讲师, 植物内生菌分离鉴定及其活性成分研究的教学和科研工作。课题: 主持校级课题结题3项;

秦瑞坪 (1990.08—), 女, 汉族, 甘肃武威人, 硕士学历, 伊犁师范大学, 生命科学与技术学院, 专任讲师, 主要从事分子细胞生物学的教学和科研工作。课题: 主持校级课题结题4项; 范学海 (1989.01—), 男, 汉族, 安徽铜陵人, 硕士学历, 伊犁师范大学, 生命科学与技术学院, 专任讲师, 主要从事多肽药物合成与分析的教学和科研工作。

张雪梅 (1984.08—), 女, 汉族, 新疆伊宁人, 硕士学历, 伊犁师范大学, 生命科学与技术学院, 专任讲师, 主要从事食品科学的教学和科研工作。课题: 主持校级课题结题2项;

赛德艾合买提·吾拉木, 男, 维吾尔族, 新疆伊宁人, 博士学历, 东北师范大学, 伊犁师范大学生物科学与技术学院就职, 高级实验师(副高), 硕士生导师, 主要从事糖类结构与功能研究, 课题: 主持和解题自治区级, 洲级和校级项目4项, 参与国自然项目一项。

活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌，但不引起植物病害，与植物互惠共生的微生物^[6]。内生真菌的胞内多糖是一类具有广泛药理活性的生物大分子化合物，它们在真菌的子实体和菌丝体中^[7]，由多个单糖分子连接而成。目前，薰衣草的研究成果很多，但对薰衣草内生菌胞内多糖提取的报道鲜少。因此我们把薰衣草内生菌作为研究对象，对其胞内多糖的提取工艺及抗氧化性进行研究。

传统的多糖提取方法有热水浸提法^[8]，酶浸提法等。近年来，超声波和微波等提取技术被广泛的应用^[9]。本次实验通过超声波法提取薰衣草胞内多糖，该方法的优点是操作方便简单并且耗时短^[10]。在多糖提取过程中对超声波的处理时间、液料比、超声功率三因素进行单因素实验，基于响应面方法的单因子试验优选了薰衣草细胞内多糖的最佳工艺条件，为今后薰衣草胞内多糖的研究利用提供依据。

一、材料和方法

(一) 试验材料与仪器

薰衣草2号菌（保存于-80℃超低温冰箱）；无水乙醇；DPPH；Vc；ABTS；水杨酸；过氧化氢（购于青岛海博生物技术有限公司）超声波细胞粉碎机；离心机；电子天平；紫外分光光度仪。

(二) 试验方法

1. 胞内多糖的提取

薰衣草内生菌丝体经冷冻干燥后，研磨成粉末过筛，精确称量薰衣草内生菌丝体粉末1 g置于烧杯中，添加与液体比例一致的去离子水，按照试验条件对细胞内多糖进行超声波提取。将超声处理后的液体在4℃、8000 r/min下进行6 min的高速离心，将上清液从离心管中抽出，再加入3倍体积的无水乙醇，在4℃下乙醇沉淀8 h，乙醇沉淀后的溶液在4500 r/min、4℃离心机中离心20 min，收集离心管中的沉淀。将沉淀干燥后得到薰衣草胞内粗多糖，称量粗多糖干重计算多糖提取率。将粗多糖保存用于体外抗氧化活性测定。

2. 单因素实验

(1) 液料比对薰衣草胞内多糖提取得率的影响 分别在液料比20、30、40、50、60 mL/g，超声时间30 min，超声功率90 w，按1.2.1超声波法提取粗多糖，测定粗多糖干重计算粗多糖得率。

(2) 超声时间对薰衣草胞内多糖提取得率的影响 分别在超声时间20、25、30、35、40 min，液料比40 mL/g，超声功率90 w，按1.2.1超声波法提取粗多糖，测定粗多糖干重计算粗多糖得率。

(3) 超声功率对薰衣草胞内多糖提取得率的影响 分别在超声功率30、60、90、120、150 w，液料比40 mL/g，超声时间30 min，按1.2.1超声波法提取粗多糖，测定粗多糖干重计算粗多糖得率。

3. 响应面优化实验

本项目拟以单因素试验为基础，利用Box-Behnken的Design-Expert软件Box-Behnken中央-联合试验设计原则，选择液料比、超声波时间和超声波功率运用3因子3水平的效应曲面分析法，对液料比(A)，超声时间(B)，超声功率(C)，三个因子

进行响应曲面分析，并以-1、0、+1分别代表各因素的水平，薰衣草胞内多糖提取得率(%)为响应值，试验因素水平详见表1^[11]。

表1 响应面因素与水平设计

因素	水平		
	-1	0	+1
A 液料比 mL/g	30	40	50
B 超声时间 min	25	30	35
C 超声功率 w		60	90
		120	150

二、结果和分析

(一) 单因素实验结果

1. 液料比对薰衣草胞内多糖提取得率的影响

由图1可知，当液料比在20–40 mL/g递增时薰衣草胞内多糖的得率随液料比的增加而逐渐增大，在液料比为40 mL/g时薰衣草胞内多糖提取得率达到最大值。当继续增加液料比时，提取效率受到影响，多糖得率开始下降，表明超声波提取薰衣草胞内多糖最佳液料比为40 mL/g。

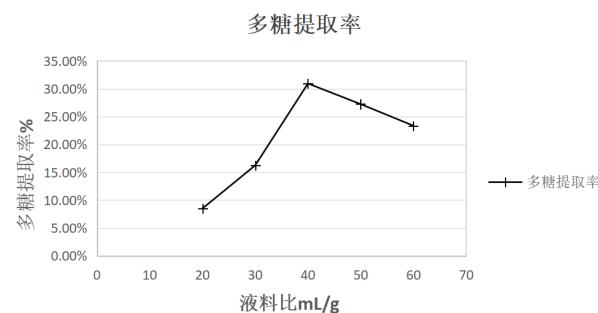


图1 液料比对多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of different L/S ratio on extraction efficiency of polysaccharides

2. 超声时间对薰衣草胞内多糖提取得率的影响

由于超声对多糖的力学剪切力很大，在一定的条件下，多糖的分子结构会受到一定程度的损伤，从而降低了多糖的得率^[12]。由图2可知，超声处理时间在20–30 min内随着处理时间的增加薰衣草胞内多糖的提取得率也逐渐增大，当处理时间为30 min时，薰衣草胞内多糖提取得率最大，继续增加超声处理时间，多糖提取得率明显下降，表明超声波提取薰衣草胞内多糖最佳超声时间为30 min。

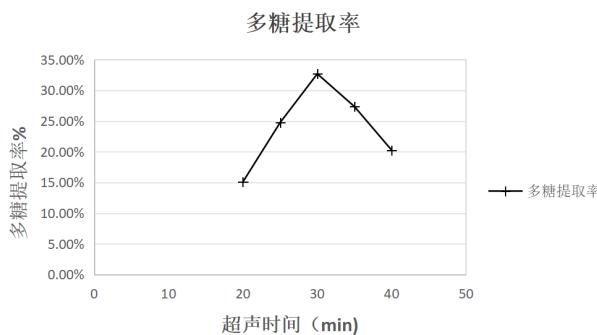


图2 超声时间对多糖提取得率的影响

Fig.2 Effect of ultrasound time on extraction efficiency of polysaccharides

3. 超声功率对薰衣草胞内多糖提取得率的影响

超声功率对植物细胞壁的破裂有重要影响。适当的超声功率可以有效破坏植物细胞壁，促使细胞内的有效成分充分溶解，提高提取效果。但过高的超声功率会导致植物细胞壁的严重破坏，甚至导致有效成分的损失，影响提取效果^[13]。由图3可知，超声功率在30~90 w时随着超声功率的不断增大，薰衣草胞内多糖的提取率也随之增大，当超声功率在90 w时薰衣草胞内多糖提取率最大。当继续升高超声功率多糖提取得率开始有显著降低，表明超声波提取薰衣草胞内多糖最佳超声功率为90 w。

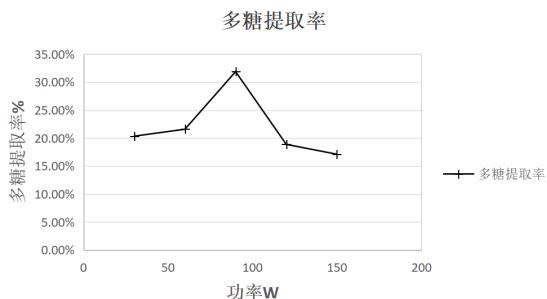


图3 超声时间对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of ultrasound power on extraction efficiency of polysaccharides

(二) 响应面实验结果与分析

1. 响应面实验结果

基于薰衣草胞内多糖单因素实验结果，在结果基础上使用Design-Expert软件Box-Behnken中央联合实验设计原则，以多糖提取率为评价标准，通过3因素3层次的效应曲面分析，确定液

料比、超声时间和超声功率3个影响因素，建立3因素3水平的效应曲面模型。试验设计与结果详见表2。

表2 响应面试验设计及试验结果

Std	Run	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response 1
		A: 液料比 mL/g	B: 超声时间 min	C: 超声功率 w	多糖提取率 %
1	13	30	25	90	18.68
2	2	50	25	90	23.92
3	11	30	35	90	24.39
4	5	50	35	90	27.04
5	4	30	30	60	20.73
6	15	50	30	60	25.68
7	9	30	30	120	19.53
8	3	50	30	120	24.75
9	7	40	25	60	20.95
10	10	40	35	60	25.04
11	8	40	25	120	21.38
12	6	40	35	120	23.76
13	12	40	30	90	31.89
14	14	40	30	90	32.7
15	1	40	30	90	31.98

1. 回归模型建立与方差分析

经回归模式的构造和方差分析，通过回归模式的构造和变异数的分析，利用Design-Expert软件对实验资料进行了拟合，构建了二次多项式回归模型，并对该模型的变异数进行了分析，得出了如下的结论，结果如表3所示，对各个因素进行二次多项式回归拟合后，得到回归方程：多糖得率(%) = 32.19 + 2.26A + 1.91B - 0.37C - 0.65AB + 0.067AC - 0.43BC - 4.40A² - 4.29B² - 5.12C²

通过对表3的方差分析，发现此回归模型具有特别明显的显著性($P<0.001$)。各因子中A²、B²、C²对各因子的响应值具有特别明显的影响($P<0.001$)；A、B对应答量有明显的影响($P<0.05$)，其余各项无明显差异($P>0.05$)。这个模型的确定系数R²=0.9931，表明响应值的变化是由选定的变量引起的，这个公式与现实状况很好地吻合，试验误差很小，可以较准确地反应出多糖抽提率与超声时间、液料比、超声功率等因素之间的关系。结果表面，各因素对多糖得率的影响依次为：C(超声功率) < B(超声时间) < A(液料比)。

表3 回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis for the regression model

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F	
Model	278.46	9	30.94	79.54	< 0.0001	significant	
A- 液料比	40.77	1	40.77	104.81	0.0002	*	
B- 超声时间	29.26	1	29.26	75.22	0.0003	*	
C- 超声功率	1.11	1	1.11	2.85	0.1520		
AB	1.68	1	1.68	4.31	0.0925		
AC	0.018	1	0.018	0.047	0.8372		
BC	0.73	1	0.73	1.88	0.2288		
A ²	71.36	1	71.36	183.45	< 0.0001	**	
B ²	67.83	1	67.83	174.38	< 0.0001	**	
C ²	96.84	1	96.84	248.94	< 0.0001	**	

Residual	1.94	5	0.39			
Lack of Fit	1.55	3	0.52	2.62	0.2880	not significant
Pure Error	0.39	2	0.20			
Cor Total	280.41	14				
R^2	0.9931	Adjusted R^2	= 0.9806			

注: * 差异显著, $p < 0.05$; ** 差异极显著, $p < 0.001$ 。

2. 响应面结果分析

由响应曲面图可知液料比、超声时间、超声功率3个因素对薰衣草内生真菌胞内多糖产量的影响。响应曲线的陡直是各因子对多糖产量的作用大小, 曲线斜率愈大, 则其作用愈强, 反之则愈弱^[14]。轮廓曲线为椭圆, 表明二者间的相互作用具有明显的相关性, 曲线形状为圆形表明二者的相互作用不明显^[15]。从图4到6可以看出, AB, AC, BC构成的反应表面梯度越陡, 轮廓曲线越长, 实验表明轮廓曲线越长, 说明AB, AC, BC单独存在相互作用, 并对多糖产量有很大的影响。经比较, 发现其与表3模型中的变异数相吻合。

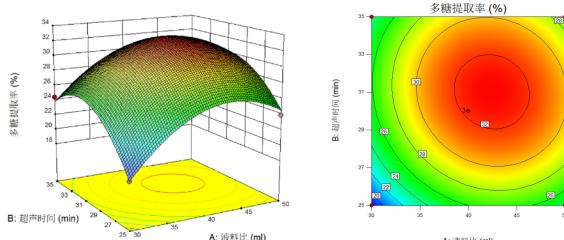


图4 不同料液比、超声波处理时间对多糖提取率影响的响应面图

Fig.4 The effect of ultrasonic treatment time on the extraction rate of polysaccharide was determined by different liquid-solid ratio on polysaccharide yield

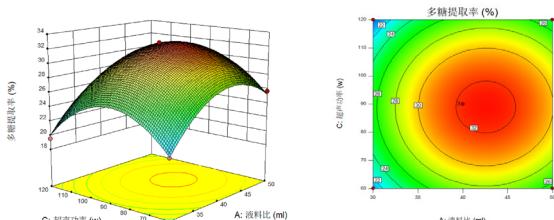


图5 不同液料比、超声功率对多糖提取率影响的响应面图

Fig.5 The influence of ultrasonic power on polysaccharide extraction rate with different liquid-solid ratio on polysaccharide yield

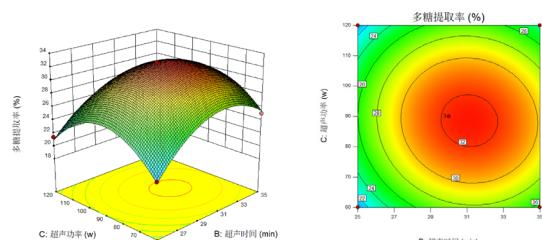


图6 超声处理时间、超声功率对多糖提取率影响的响应面图

Fig.6 Effect of ultrasonic treatment time and ultrasonic power on polysaccharide extraction rate on polysaccharide yield

经过Design-Expert软件中Box-Behnken的设计分析, 得到薰衣草内生真菌胞内多糖产量因素的最佳条件为液料比为47.97

mL/g, 超声时间33.779 min, 超声功率105.958 w。此时薰衣草内生菌胞内多糖提取率为28.013%。考虑到实际操作, 调整最佳提取条件液料比为45 mL/g, 超声时间30min, 超声功率100 w, 在以上三种的工艺条件下进行重复实验, 得到薰衣草胞内多糖得率28% ± 0.76%, 与模型预测值具有高度相符性, 验证了此模型的有效性。

三、抗氧化能力的测定

(一) DPPH自由基清除能力的测定

DPPH·带有一个单电子, 其乙醇溶液为紫色, 最大吸光值为517 nm。分别取质量浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/ml的薰衣草胞内多糖溶液2.0 ml, 与2mL的0.01mol/L DPPH-酒精溶液相混合, 在室温下避光反应30 min, 在517 nm用分光光计^[16]测定吸收率。

从图7可以看出, 当质量浓度为0.2–1.0 mg/mL时, 随着胞内多糖质量浓度的增加, 其清除DPPH自由基的能力也逐渐增强。结果表明, 薰衣草胞内多糖对DPPH自由基清除率在一定的范围内与多糖浓度成正相关, 在质量浓度为1.0 mg/mL时, 薰衣草胞内多糖的DPPH自由基清除率达到64.01%, 表明薰衣草胞内多糖清除DPPH自由基的能力较强。

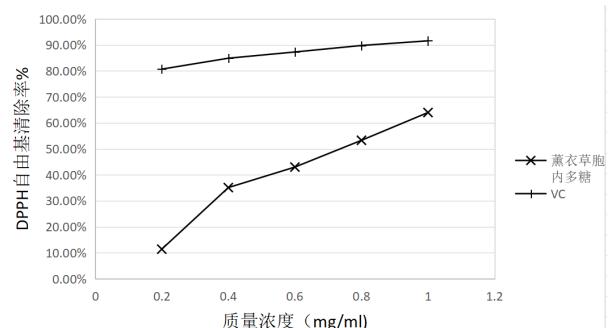


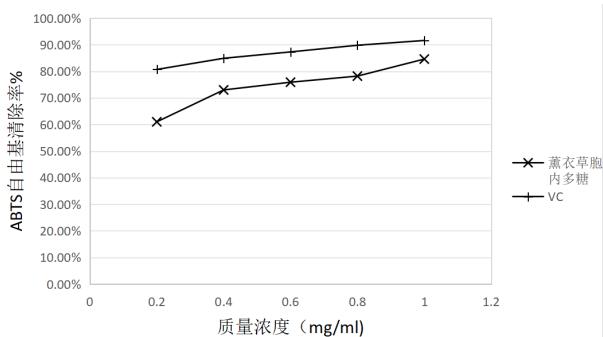
图7 薰衣草胞内多糖对DPPH·的清除作用

Fig.7 Scavenging effect of lavender intracellular polysaccharide on DPPH·

(二) ABTS自由基清除能力的测定

当一个物质加入到ABTS溶液后, 溶液褪色, 在730 nm处吸光度值降低, 说明该物质具有抗氧化能力^[17]。分别取质量浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL的多糖溶液1.0 ml, 与3 mL ABTS溶液混合, 室温反应10min, 在730 nm处测量吸光度值。

从图8中可以看出薰衣草胞内多糖质量浓度增加时, 清除ABTS⁺·作用越强。当薰衣草胞内多糖浓度为0.2–1.0 mg/mL时, 薰衣草胞内多糖对ABTS⁺·的清除率由61.00%上升至84.60%, 说明薰衣草胞内多糖具有较强的ABTS自由基的清除能力。

图8 薰衣草胞内多糖对ABTS^{·-}的清除作用Fig.8 Scavenging effect of lavender intracellular polysaccharide on ABTS^{·-}.

(三) 羟基自由基清除能力的测定

羟自由基清除能力的测定^[18], 分别取质量浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/ml的多糖溶液1.4 ml, 与1.2 ml水杨酸-乙醇和1 ml过氧化氢混合, 温室反应15 min, 然后在510 nm处测量吸光度值。

从图9中可以看出薰衣草胞内多糖质量浓度增加时, 羟自由基的清除能力随质量浓度的增大而增大。当薰衣草胞内多糖浓度为0.2–1.0 mg/ml时, 薰衣草胞内多糖对羟自由基的清除率明显低于对照组 Vc, 说明薰衣草胞内多糖对羟自由基的清除能力较低。

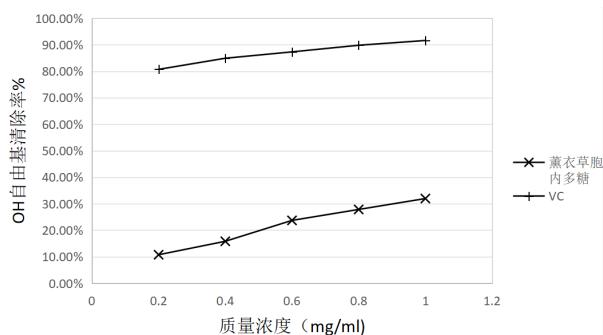


图9 薰衣草胞内多糖对·OH的清除作用

Fig.9 Scavenging effect of lavender intracellular polysaccharide on ·OH

四、结论

本研究以薰衣草2号菌为原料, 采用超声波法对薰衣草中2号菌胞内多糖成分进行提取, 以胞内多糖提取量为指标, 通过单因素和Box-Behnken响应面法优化得到薰衣草胞内多糖提取的最优工艺条件: 液料比为45 mL/g, 以30 min和100 w的超声波处理为最佳工艺参数, 获得了薰衣草细胞内多糖得率28% ± 0.76%。对DPPH, ABTS和羟基自由基进行检测, 发现薰衣草胞内多糖具有较强的体外抗氧化能力。本研究为薰衣草胞内多糖的提取和抗氧化研究提供了有益的参考。目前薰衣草已经被广泛用于化妆品、医疗等方面, 薰衣草内生真菌作为一类重要的微生物资源, 其产生的次生代谢产物在医药、农业和生态保护等领域具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 郭凤娇, 刘菲, 杨素珍, 等. 薰衣草精油护肤作用的研究进展 [J]. 日用化学品科学, 2023, 46 (1): 35–40.
- [2] 周欣, 宋宁, 林景等. 薰衣草挥发油体外抑菌作用及皮肤过敏性研究 [J]. 中国热带医学, 2023, 23(08): 790–795.
- [3] 陈莘雨, 陈新梅. 薰衣草化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37 (3): 1600–1601.
- [4] 沙伟, 李婧, 张梅娟, 马天意. 薰衣草及其精油在医疗应用中的研究进展 [J]. 中国学术期刊 (网络版), 2021.
- [5] 陈天意, 努兰·拜都拉, 玛依拉·吐尔德别克, 等. 薰衣草内生真菌 YDZ-8 抗菌活性及菌种鉴定 [J]. 吉首大学学报 (自然科学版), 2023, 44(02): 47–51. DOI: 10.13438/j.cnki.jdzk.2023.02.007.
- [6] 郭顺星. 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势 [J]. 菌物学报, 22 January 2018, 37(1): 1 – 13 Mycosistema.
- [7] 郑朋朋, 杨晓波, 李珊, 陈玉惠, 敦新宇. 萌发菌 HL-003胞内多糖的提取及抗氧化性研究 [J]. 中国酿造, 2015, 34 (3): 0254–5071.
- [8] 阚永军, 施萍萍, 蒋畅, 等. 不同提取方法对太子参多糖含量的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2019, 28 (14): 41–43.
- [9] 韩勇. 超声波法提取茯苓菌丝体胞内多糖的研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2013.
- [10] 冯飞, 葛永杰, 代容, 等. 超声波辅助提取技术研究进展 [J]. 食品工业, 2022, 43(4): 239–243.
- [11] 党军, 王璇, 陶燕锋, 等. 黄绿霉环菌菌丝体水提物多糖含量测定 [J]. 光谱实验室, 2011, 28(6): 2836 – 2839.
- [12] 郑朋朋, 李珊, 陈玉惠, 敦新宇. 响应面法优化萌发菌 HL-003胞内多糖提取工艺 [J]. 食品工业科技, 2015, 15 (36): 219–228.
- [13] CHEN Yanping, HE Juping, LIU Yi, et al. Optimization of Ultrasonic-Microwave Assisted Extraction of Polysaccharides from Eucommia ulmoides Leaves and Its Anticoagulant Activity in Vitro[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 202–211. (in Chinese with English abstract).doi:10.13386/j.issn1002–0306.2022100189.
- [14] 孙晓晓, 庞道容, 黎纳, 等. 响应面法优化 β -半乳糖苷酶法制备低聚半乳糖工艺 [J]. 食品工业科技, 2022, 43 (22): 246–255.
- [15] 殷海洋, 刘振春, 张世康, 等. 响应面优化超声波辅助酶法提取油莎豆 ACE 抑制剂的工艺 [J]. 食品工业科技, 2021, 42 (14).
- [16] 宋思圆, 苏平, 王丽娟, 等. 响应面试验优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2017, 38(2): 283–289.
- [17] 王杰. 槐角多糖分离纯化、结构分析及生理活性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- [18] 任嘉兴, 张锦华, 白宝清, 等. 羊肚菌多糖提取工艺优化及抗氧化性研究 [J]. 山西农业科学, 2018, 46(7): 1199–1203.