

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 超声波协同酶法优化芦蒿多糖提取工艺

吴雨龙<sup>1,2</sup>, 江海涛<sup>1</sup>, 汪振炯<sup>1</sup>, 王仁雷<sup>3</sup>, 华春<sup>1,\*</sup>, 周峰<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>南京晓庄学院食品科学学院, 南京211171; <sup>2</sup>山东省黄河三角洲生态环境重点实验室, 山东滨州256603; <sup>3</sup>江苏第二师范学院生命科学与化学化工学院, 南京210013

**摘要:** 为了优化超声波协同酶法提取芦蒿多糖的工艺条件, 采用中心组合设计方法(Box-Behnken design), 建立以超声时间、超声温度、加酶量、酶解时间和液料比对芦蒿多糖得率的影响的二次回归模型。获得超声波协同酶法提取芦蒿多糖的最佳工艺条件为超声时间40 min、超声温度50°C、加酶量1.5%、酶解时间1 h、液料比40:1 (mL·g<sup>-1</sup>), 在此条件下, 芦蒿多糖的得率为37.19%。结果表明该回归模型有极显著性, 可以作为芦蒿多糖提取工艺的回归分析和参数优化。

**关键词:** 芦蒿; 多糖; 超声波法; 纤维素酶; 中心组合设计方法

芦蒿(*Artemisia selengensis* Turcz.)为菊科蒿属植物, 嫩茎叶、根状茎, 又名萎蒿、水艾、藜蒿、水蒿等, 多年生药食两用草本植物, 植株具清香气味, 主要分布于朝鲜、俄罗斯、蒙古以及中国多地(Hu和Feng 1999)。芦蒿味道鲜美、风味独特, 很早就作为人们食用之菜。北魏的《齐民要术》及明代的《本草纲目》中均有食用其茎部的记载。芦蒿不仅具有较高的食用价值而且还具有很高的药用价值。中医认为其根性凉, 味甘, 叶性平, 平抑肝火, 可治胃气虚弱、浮肿及河豚中毒等病症以及预防芽病、喉病和便秘等功效, 民间还作“刘寄奴”(奇蒿)的代用品(张健等2004; 邵增龙等2010)。

芦蒿富含多糖、黄酮等多种生物活性物质(吴雨龙等2014; 邓荣华等2013; 付明等2009; 吴存兵等2012)。植物多糖具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、提高机体免疫力、延缓衰老等作用(Feng等2015; Huang和Ning 2010; Ferreira等2015; Sun等2015; Mei等2015; 黄菊艳等 2014), 而芦蒿多糖在抗氧化、抗炎、抗肿瘤等方面也表现出了较好的生物活性(Wang等2016; Zhang等2015; 毛沅文 2012), 其开发与应用也已成为食品、医药、生物工程等领域的重要研究方向。我国芦蒿资源特别丰富, 目前仅南京市八卦洲芦蒿种植面积就达2.2×10<sup>2</sup> km<sup>2</sup>, 年产量约5.3×10<sup>7</sup> kg, 由于在生长末期极易木质化(不能食用), 八卦洲每年产生的木质化芦蒿达2.0×10<sup>7</sup> kg, 被种植户直接焚烧处理, 未得到有效利用, 且造成了环境污染(扶庆权等2013; 邓荣华等2013)。因此, 将这些木质化的芦蒿用来提取多糖, 不仅可以增加芦蒿的附加值, 而且还能保护

环境。本试验利用中心组合设计方法(Box-Behnken design), 采用五因素三水平的响应曲面分析法优化芦蒿多糖的提取工艺条件, 为合理开发利用芦蒿资源, 提高其附加值提供可靠的理论依据。

## 材料与方法

## 1 材料与试剂

芦蒿(*Artemisia selengensis* Turcz.)购自南京八卦洲芦蒿种植基地, 烘干后粉碎备用。

纤维素酶(酶比活力>400 U·mg<sup>-1</sup>), 南京奥多福尼生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

## 2 试验方法

## 2.1 芦蒿多糖的提取工艺

芦蒿→烘干→粉碎→过60目筛→除脂→准确称取芦蒿粉末10 g→加蒸馏水→加纤维素酶→调节pH→酶解→灭酶→超声波处理→离心取上清液(4 500 r·min<sup>-1</sup>, 10 min)→加4倍体积95%乙醇沉淀→4°C冰箱静置过夜→离心取沉淀(4 500 r·min<sup>-1</sup>, 10 min)→收集沉淀冷冻干燥得芦蒿多糖→加水溶解→苯酚-硫酸法测吸光度(张志军等2006)。

## 2.2 芦蒿多糖含量的测定

## 2.2.1 标准曲线的绘制

精确称取105°C干燥至质量恒重的葡萄糖10.00 mg, 置于100 mL容量瓶中定容。精确量取葡

收稿 2016-08-11 修定 2016-11-15

资助 国家高技术研究发展计划(2012AA021701)、国家自然科学基金(21376112)、江苏省自然科学基金(BK20141081)、山东省黄河三角洲生态环境重点实验室开放基金(2015-KFJJ04)和南京市环境科学与工程重点学科建设项目。

\* 共同通讯作者(E-mail: hc3501988@163.com; zfibcas@163.com)。

葡萄糖标准溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2和1.4 mL, 分别置于比色管中, 按苯酚-硫酸法测定各管吸光度, 另取蒸馏水2 mL (按苯酚-硫酸法进行显色反应), 作为空白对照, 于波长 490 nm处测定吸光度, 绘制标准曲线, 得标准曲线回归方程:  $y=7.62x+0.171$ ,  $R^2=0.9995$ 。

### 2.2.2 芦蒿多糖得率的测定

取芦蒿多糖供试液1 mL于试管中, 以去离子水补加到2 mL, 按苯酚-硫酸法进行操作, 于490 nm处测定吸光度, 按标准曲线计算芦蒿多糖含量。芦蒿多糖得率按以下公式计算:

$$\text{芦蒿多糖得率/\%} = \frac{C \times V \times N}{M} \times 100$$

式中:  $C$ 为芦蒿多糖浓度( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );  $V$ 为芦蒿多糖溶液体积( $\text{mL}$ );  $N$ 为稀释倍数;  $M$ 为芦蒿粉末质量( $\text{g}$ )。

### 2.3 单因素试验

以蒸馏水为提取溶剂, 依次固定超声时间40 min、超声温度40°C、加酶量2%、酶解时间1.5 h、液料比40:1 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 分别考察不同超声温度、超声时间、加酶量、酶解时间和液料比对芦蒿多糖得率的影响, 各实验重复3次。

### 2.4 中心组合设计法优化芦蒿多糖提取工艺设计

在单因素试验结果的基础上, 采用Box-Behnken design设计方法(张弛2003), 以超声时间、超声温度、加酶量、酶解时间和液料比为自变量, 以芦蒿多糖得率为响应值设计试验, 并采用响应面分析法来分析各因素之间的交互作用, 以确定最佳的工艺条件。试验因素和水平见表1。

### 2.5 统计学分析

采用Graphpad Prism 6.0对数据进行处理和分析, 并采用Design-Expert 8.0软件对中心组合设计

表1 响应面模型的因素与水平设计

Table 1 Factors and levels of response surface design

水平	因素				
	$X_1$ 超声时间/min	$X_2$ 超声温度/°C	$X_3$ 加酶量/%	$X_4$ 酶解时间/h	$X_5$ 液料比/ $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$
-1	30	40	1.5	1.0	30:1
0	40	50	2.0	1.5	40:1
1	50	60	2.5	2.0	50:1

试验结果进行分析, 根据 $F$ 值考察二次回归模型及因素的显著性( $P < 0.05$ )。

## 结果与讨论

### 1 单因素试验结果

#### 1.1 超声时间、超声温度、加酶量、酶解时间和液料比对芦蒿多糖得率的影响

由图1-A可知, 芦蒿多糖得率随着超声时间的增加而提高, 当时间达到40 min时芦蒿多糖得率达到最高(33.24%), 后随着超声时间的增加芦蒿多糖得率开始下降。原因可能是超声波具有的机械效应, 空化效应和热效应使得芦蒿的细胞瞬间破碎, 使得芦蒿多糖快速溶出, 而超声时间过长可能会导致多糖被破坏, 影响芦蒿多糖的得率(Roosta等2014; Zheng等2016)。另外超声时间过长耗能增加, 成本升高。

由图1-B可知, 芦蒿多糖得率随着超声温度的

增加而提高, 当温度达到50°C时芦蒿多糖得率达到最高(26.25%), 后随着超声温度的增加芦蒿多糖得率开始下降。原因可能是随着超声温度的升高, 水中的小气泡(空化核)增多, 对产生空化作用有利, 芦蒿细胞破裂加速, 芦蒿多糖溶出增加, 但超声温度过高时, 气泡中的蒸气压太高, 将增强气泡闭合时的缓冲作用, 导致空化作用减弱, 降低芦蒿多糖的得率(Shen等2015)。

由图1-C可知, 芦蒿多糖得率随着添加的纤维素酶量的增加而不断提高, 当加酶量超过1.5%后, 随着加酶量的增加, 芦蒿多糖得率的增加趋于平缓(30.27%)。原因可能是由于芦蒿细胞的细胞壁含大量纤维素, 经纤维素酶酶解后导致细胞壁被破坏, 从而使得芦蒿多糖快速溶出, 芦蒿多糖得率增加; 由于芦蒿细胞的量是一定的, 当加酶过多时由于没有反应底物, 从而使得芦蒿多糖得率维持在稳定的水平(Inoue等2015; Jia等2015)。

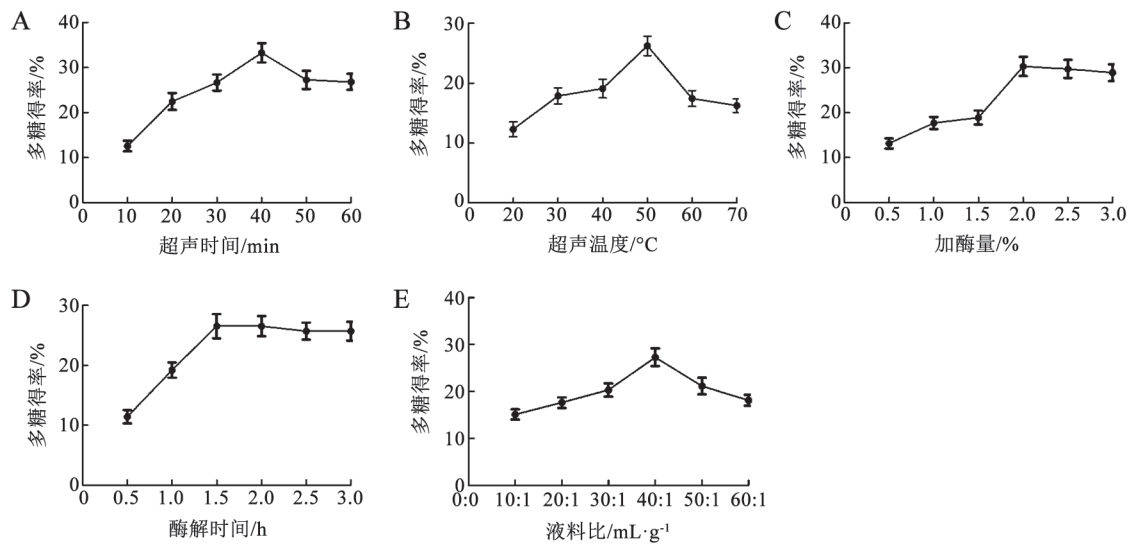


图1 超声时间、超声温度、加酶量、酶解时间和液料比对芦蒿多糖得率的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic time, ultrasonic temperature, enzyme dosage, enzymolysis time and liquid-to-solid ratio on extraction yield of *Artemisia selengensis* Turcz. polysaccharides

由图1-D可知, 芦蒿多糖得率随着酶解时间的增加而不断提高(1.5 h时, 26.55%), 当酶解时间超过1.5 h时, 随着时间的延长, 芦蒿多糖得率趋于平缓甚至略有下降。原因可能是刚开始酶的底物比较充足, 随着时间的延长, 芦蒿多糖溶出不断增加, 当底物不断减少直至酶解反应结束时即使酶解时间继续延长芦蒿多糖得率也不会继续增加, 甚至可能由于酶解时间的延长, 其他因素对多糖造成破坏, 反而使多糖得率降低(Newman等2013)。

由图1-E可知, 芦蒿多糖得率随着液料比的增加而不断提高, 当液料比达40:1 (mL·g<sup>-1</sup>)时, 芦蒿多糖得率达最大值(27.30%), 此后随着液料比的增加芦蒿多糖得率反而降低。原因可能是液料比越大, 即水溶剂用量越大, 越有利于水溶性芦蒿多糖的溶出, 导致芦蒿多糖得率增加, 但当液料比达一定值后, 芦蒿多糖已基本提取完毕, 随着水溶剂用量的增加, 会造成单位提取液中芦蒿多糖浓度的降低, 也会造成试剂的浪费和能耗的增加, 同时增加了后续浓缩工作中多糖的的损耗, 影响多糖得率。因此, 综合提取效果和降低成本等方面考虑, 选择液料比为40:1 (mL·g<sup>-1</sup>)左右比较合适。

## 2 中心组合设计法试验结果分析

### 2.1 芦蒿多糖得率回归模型的建立与分析

中心组合设计法设计的46组试验中, 芦蒿多

糖得率最高组为36.50%, 最低组为10.18%, 运用 Design-Expert 8.0软件进行多元回归拟合, 建立以芦蒿多糖得率与各提取条件之间的响应面回归模型, 得二次多项式回归方程:

$$Y=33.26+0.85X_1-3.38X_2-2.81X_3+0.75X_4-2.65X_5-2.53X_1X_2-0.37X_1X_3-5.18X_1X_4-1.15X_1X_5-1.18X_2X_3-2.54X_2X_4-0.10X_2X_5+3.02X_3X_4+7.54X_3X_5+7.48X_4X_5-5.94X_1^2-2.13X_2^2-1.78X_3^2-1.36X_4^2-10.94X_5^2$$

为验证回归方程的有效性, 对芦蒿多糖得率的回归模型进行方差分析。结果得知, 芦蒿多糖得率的回归模型具有极显著性( $P<0.0001$ ), 且失拟性具有不显著性( $P>0.05$ ), 说明该回归模型比较好。Ferreira等(2007)指出复相关系数( $R^2$ )大于0.80, 且校正复相关系数(Adj  $R^2$ )和预测复相关系数(Pred  $R^2$ )较为接近的情况下, 表明方程的拟合度较好, 本试验回归方程中 $R^2=0.9929$ , 且Adj  $R^2=0.9872$ , Pred  $R^2=0.9260$ , 二者较为接近, 说明该模型具有较好的回归性。因此, 该回归方程可以很好的对超声波法提取芦蒿多糖的得率进行预测与分析。从5个因素对芦蒿多糖得率的影响来看, 一次项中 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_5$ , 二次项中 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_5^2$ , 交互项中 $X_1X_4$ 、 $X_2X_4$ 、 $X_3X_4$ 、 $X_3X_5$ 、 $X_4X_5$ 对芦蒿多糖得率影响显著。由 $F$ 值可知, 各因素对芦蒿多糖得率的影响次序依次为 $X_2>X_3>X_5>X_1>X_4$ 。



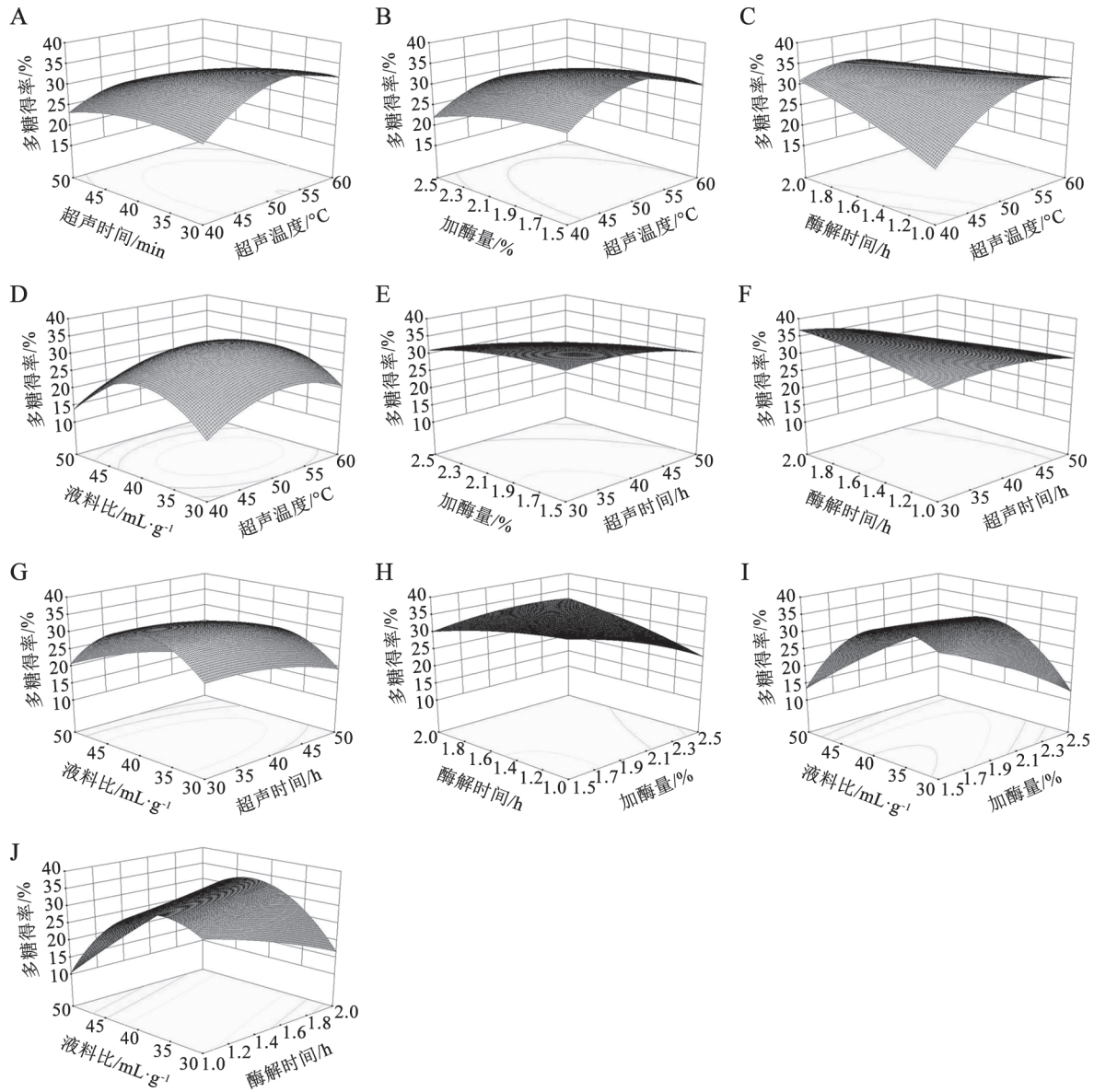


图2 芦蒿多糖得率两因素交互影响的响应面图

Fig.2 Response surface plots for the pairwise effects of the extraction yield of *Artemisia selengensis* Turcz. polysaccharides

A: 超声时间与超声温度的交互作用; B: 加酶量与超声温度的交互作用; C: 酶解时间与超声温度的交互作用; D: 液料比与超声温度的交互作用; E: 加酶量与超声时间的交互作用; F: 酶解时间与超声时间的交互作用; G: 液料比与超声时间的交互作用; H: 酶解时间与加酶量的交互作用; I: 液料比与加酶量的交互作用; J: 液料比与酶解时间的交互作用。

## 2.2 芦蒿多糖得率响应面两因素交互作用分析

芦蒿多糖得率随超声时间的延长或超声温度的升高呈先上升后下降的趋势, 且二者有明显的交互作用(图2-A)。加酶量的增加会使芦蒿多糖得率上升, 超声温度的升高会导致芦蒿多糖得率呈先上升后下降的趋势(图2-B)。酶解时间在1.0~1.5 h时, 芦蒿多糖得率随超声温度的增加而上升; 酶解时间在1.5~2.0 h时, 芦蒿多糖得率随超声温度的

增加而降低; 超声温度一定时, 芦蒿多糖得率随酶解时间的延长而上升(图2-C)。液料比和超声温度的升高使得芦蒿多糖得率呈先上升后下降的趋势(图2-D)。超声时间增加导致芦蒿多糖得率降低, 而加酶量增加以及酶解时间的延长使得芦蒿多糖得率升高(图2-E和F)。超声时间以及液料比的增加引起芦蒿多糖得率呈先上升后下降的趋势(图2-G)。酶解时间在1.0~1.5 h时, 芦蒿多糖得率随加

酶量的增加而上升; 酶解时间在1.5~2.0 h时, 芦蒿多糖得率随加酶量的增加始终保持不变; 加酶量不变时, 芦蒿多糖得率随酶解时间的延长而上升(图2-H)。加酶量不变时, 芦蒿多糖得率随液料比的增加呈先上升后下降的趋势; 液料比在30:1~40:1范围内时, 芦蒿多糖得率随加酶量的增加而下降; 液料比在40:1~50:1范围内时, 芦蒿多糖得率随加酶量的增加而上升(图2-I)。液料比不变时, 芦蒿多糖得率随酶解时间的延长而上升; 酶解时间不变时, 芦蒿多糖得率随液料比的增加呈先上升后下降的趋势(图2-J)。

### 2.3 芦蒿多糖最佳提取工艺条件的确定和验证

根据二项回归模型的预测, 得出芦蒿多糖最佳提取工艺条件为超声时间38.72 min、超声温度49.87°C、加酶量1.52%、酶解时间1.02 h、液料比40.08:1 ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )。考虑到实际操作的便利性, 修正芦蒿多糖最佳提取工艺条件为超声时间40 min、超声温度50°C、加酶量1.5%、酶解时间1 h、液料比40:1 ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 在此条件下, 芦蒿多糖的实际得率为37.19%, 与预测得率37.86%接近, 且芦蒿多糖得率高于各单因素试验中芦蒿多糖的得率, 表明该模型与实际情况拟合较好, 可以用来预测试验结果, 可以作为芦蒿多糖的超声波提取工艺的回归分析和参数优化。

有关植物多糖的提取方法有很多种: 传统的溶剂提取法提取的效率较低且耗时; 酸提法和碱提法的酸碱度和作用时间需严格控制, 否则会引起多糖的糖苷键断裂, 影响多糖的提取率; 超滤膜法必须知道多糖的相对分子质量, 对于未知的多糖则无法控制;  $\text{CO}_2$ 超临界萃取法成本很高; 超声波协同纤维素酶可破坏植物细胞壁, 有利于有效成分溶出, 多糖提取率明显高于传统提取法(张燕等2015)。本研究采用超声波协同酶法提取芦蒿中多糖, 根据单因素试验和响应曲面试验研究得出芦蒿多糖提取的最佳工艺条件为超声时间40 min、超声温度50°C、加酶量1.5%、酶解时间1 h、液料比40:1 ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 且在此条件下芦蒿多糖的最终得率为37.19%, 高于用类似方法提取的大部分其他植物来源多糖的得率(张燕等2015), 更是显著高于用传统方法提取芦蒿多糖的得率(仅为4.77%) (毛沅文2012), 提示芦蒿多糖具有一定的开

发潜力。另外获得芦蒿多糖得率与各提取条件的回归模型可以提高芦蒿多糖提取的效率, 节约成本, 具有一定实际参考价值。

### 参考文献

- Deng RH, Guo YX, Li XM, Lü LS (2013). Purification and preliminary identification of total flavonoids from *Artemisia selengensis* Turcz. Food Sci, 34 (9): 85–89 (in Chinese with English abstract) [邓荣华, 郭宇星, 李晓明, 吕丽爽(2013). 芦蒿秸秆总黄酮富集纯化及产物鉴定. 食品科学, 34 (9): 85–89]
- Feng K, Chen W, Sun LW, Liu JZ, Zhao YZ, Li LX, Wang YX, Zhang WJ (2015). Optimization extraction, preliminary characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from *Stachys sieboldii* Miq. tubers. Carbohydr Polym, 125 (10): 45–52
- Ferreira IC, Heleno SA, Reis FS, Stojkovic D, Queiroz MJ, Vasconcelos MH, Sokovic M (2015). Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. Phytochemistry, 115 (2): 38–55
- Ferreira SL, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandao GC, da Silva EG, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS, et al (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. Anal Chim Acta, 597 (2): 179–186
- Fu M, Yan SZ, Xiang P, Wang ML (2009). Optimization of extraction of polysaccharide from *Artemisia selengensis* cellulose. Jiangsu Agri Sci, 25 (2): 229–231 (in Chinese) [付明, 颜素贞, 向萍, 王明利(2009). 纤维素酶提取藜蒿多糖的工艺优化. 江苏农业科学, 25 (2): 229–231]
- Fu QQ, Hou P, Chen N (2013). Optimization of extraction process for total flavonoids from *Artemisia selengensis* Turcz leaves by response surface methodology. Food Sci, 34 (4): 94–98 (in Chinese with English abstract) [扶庆权, 侯佩, 陈能(2013). 响应面法优化芦蒿叶总黄酮的提取工艺. 食品科学, 34 (4): 94–98]
- Hu JF, Feng XZ (1999). New guaianolides from *Artemisia selengensis*. J Asian Nat Prod Res, 1 (3): 169–176
- Huang JY, Zhang JL, Li YP, Zang JL, Jiang XL (2014). Effects of chitosan oligosaccharide on non-heading Chinese cabbage cotyledon regeneration. Plant Physiol J, 50 (3): 263–268 (in Chinese with English abstract) [黄菊艳, 张京良, 李银平, 臧聚玲, 江晓路(2014). 壳寡糖对不结球白菜子叶离体培养再生体系的影响. 植物生理学报, 50 (3): 263–268]
- Huang SQ, Ning ZX (2010). Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity. Int J Biol Macromol, 47 (3): 336–341
- Inoue H, Yano S, Sawayama S (2015). Effect of  $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -mannosidase supplementation on the total hydrolysis of softwood polysaccharides by the *Talaromyces cellulolyticus* cellulase system. Appl Biochem Biotechnol, 176 (6): 1673–1686
- Jia L, Goncalves GA, Takasugi Y, Mori Y, Noda S, Tanaka T, Ichinose H, Kamiya N (2015). Effect of pretreatment methods on the synergism of cellulase and xylanase during the hydrolysis of bagasse. Bioresour Technol, 185 (7): 158–164
- Mao YW (2012). Study on extraction technology and antioxidant activity of flavonoids and polysaccharides from *Artemisia Selen-*

- gensis* Turcz (Master's thesis). Nanchang: Nanchang University [毛沅文(2012). 藜蒿黄酮、多糖提取及其抗氧化研究(硕士论文). 南昌: 南昌大学]
- Mei YX, Zhu H, Hu QM, Liu YY, Zhao SM, Peng N, Liang YX (2015). A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis. *Carbohydr Polym*, 124 (25): 90–97
- Newman RH, Vaidya AA, Sohel MI, Jack MW (2013). Optimizing the enzyme loading and incubation time in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Bioresour Technol*, 129 (2): 33–38
- Roosta M, Ghaedi M, Shokri N, Daneshfar A, Sahraei R, Asghari A (2014). Optimization of the combined ultrasonic assisted/ adsorption method for the removal of malachite green by gold nanoparticles loaded on activated carbon: experimental design. *Spectrochim Acta A*, 118: 55–65
- Shao ZL, Huang HP, Gao SL (2010). Research progress in *Artemisia selengensis*. *Strait Pharm J*, 22 (1): 67–69 (in Chinese with English abstract) [邵增龙, 黄和平, 高山林(2010). 芦蒿研究进展. 海峡药学, 22 (1): 67–69]
- Shen XH, Xiong QY, Shi X, Wang K, Liang S, Gao M (2015). Ultrasonic temperature distribution reconstruction for circular area based on Markov radial basis approximation and singular value decomposition. *Ultrasonics*, 62 (12): 174–185
- Sun XB, Zhao C, Pan W, Wang JP, Wang WJ (2015). Carboxylate groups play a major role in antitumor activity of *Ganoderma ap-planatum* polysaccharide. *Carbohydr Polym*, 123 (2): 283–287
- Wang J, Lu HD, Muhammad U, Han JZ, Wei ZH, Lu ZX, Bie XM, Lu FX (2016). Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from *Artemisia selengensis* Turcz and its antioxidant and anti-cancer activities. *J Food Sci Technol*, 53 (2): 1025–1034
- Wu CB, Tian SL, Wu QY, Chen F, Peng FQ (2012). Study on processing technology and active components of flavonoids and polysaccharide of *Artemisia Selengensis* Turcz tea. *Modern Food Sci Technol*, 28 (11): 1554–1557 (in Chinese with English abstract) [吴存兵, 田林双, 吴君艳, 陈芳, 彭芳琦(2012). 藜蒿茶加工工艺及黄酮、多糖活性成分变化研究. 现代食品科技, 28 (11): 1554–1557]
- Wu YL, Hua C, Fu QQ, Wu XH (2014). Acute and genetic toxicity of total flavonoids extract of *Artemisia selengensis*. *Food Sci*, 35 (7): 206–210 (in Chinese with English abstract) [吴雨龙, 华春, 扶庆权, 吴向华(2014). 芦蒿总黄酮提取物的急性毒性及遗传毒性. 食品科学, 35 (7): 206–210]
- Zhang C (2003). *Design of Experiment for Six Sigma*. Guangzhou: Guangdong Economic Press, 289–307 [张驰(2003). 六西格玛试验设计. 广州: 广东经济出版社, 289–307]
- Zhang J, Lin YY, Kong LY (2004). Study on chemical constituents of *Artemisia selengensis*. *Chin Tradit Herb Drug*, 35 (9): 979–980 (in Chinese) [张健, 林玉英, 孔令义(2004). 藜蒿的化学成分研究. 中草药, 35 (9): 979–980]
- Zhang L, Tu ZC, Wang H, Fu ZF, Wen QH, Fan D (2015). Metabolic profiling of antioxidants constituents in *Artemisia selengensis* leaves. *Food Chem*, 186 (1): 123–132
- Zhang Y, Zhang SM, Wang F, Wang L, Liu MJ, Liang Y (2015). Review on extraction methods of plant polysaccharide of these years. *Farm Prod Pro*, 14 (6): 65–68 (in Chinese with English abstract) [张燕, 张树森, 王飞, 王璐, 刘梦杰, 梁英(2015). 近年来植物多糖提取方法研究进展. 农产品加工, 14 (6): 65–68]
- Zhang ZJ, Liu JH, Li SF, Yang LW (2006). Study on the content of *Ganoderma lucidum* polysaccharides by phenol sulfuric acid method. *Sci Technol Food Ind*, 27 (2): 193–195 (in Chinese with English abstract) [张志军, 刘建华, 李淑芳, 杨丽维(2006). 灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究. 食品工业科技, 27 (2): 193–195]
- Zheng Q, Ren DY, Yang NN, Yang XB (2016). Optimization for ultrasound-assisted extraction of polysaccharides with chemical composition and antioxidant activity from the *Artemisia sphaerocephala* Krasch seeds. *Int J Biol Macromol*, 91 (1): 856–866

## Optimization of extraction technology of polysaccharide from *Artemisia selengensis* Turcz. by ultrasonic assisted enzymatic method

WU Yu-Long<sup>1,2</sup>, JIANG Hai-Tao<sup>1</sup>, WANG Zhen-Jiong<sup>1</sup>, WANG Ren-Lei<sup>3</sup>, HUA Chun<sup>1,\*</sup>, ZHOU Feng<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Science, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China; <sup>2</sup>Shandong Provincial Key Laboratory of Eco-environmental Science for Yellow River Delta, Binzhou, Shandong 256603, China; <sup>3</sup>School of Life Science and Chemistry, Ji-angsu Second Normal University, Nanjing 210013, China

**Abstract:** In order to optimize the extraction technology of polysaccharide from *Artemisia selengensis* Turcz. by ultrasonic assisted enzymatic method, the Box-Behnken design was used to establish the effects of ultrasonic time, ultrasonic temperature, enzyme dosage, enzyme solution time and liquid to solid ratio on *Artemisia* polysaccharide yield of quadratic regression model. The optimum extraction conditions of ultrasonic assisted enzymatic method extraction of polysaccharide from *Artemisia selengensis* Turcz. were ultrasonic time 40 min, ultrasonic temperature 50°C, enzyme dosage 1.5%, enzymolysis time 1 h, liquid-to-solid ratio of 40:1 (mL·g<sup>-1</sup>), under these conditions, the extraction of *Artemisia* polysaccharide was 37.19%. The results showed that the regression model was significant, which could be used as the regression analysis and parameter optimization of the extraction technology of *Artemisia* polysaccharide.

**Key words:** *Artemisia selengensis* Turcz.; polysaccharide; ultrasonic method; cellulose; Box-Behnken design

Received 2016-08-11 Accepted 2016-11-15

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program (Grant No. 2012AA021701), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 21376112), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No. BK20141081), the Open Project from the Shandong Provincial Key Laboratory of Eco-environmental Science for the Yellow River Delta (Grant No. 2015KFJJ04) and the Key Subjects of Environmental Science and Engineering of Nanjing.

\*Co-corresponding author (E-mail: hc3501988@163.com; zfibcas@163.com).