

文章编号:1671-6833(2013)05-0117-04

纤维素酶法提取雀儿舌头多酚物质的工艺研究

王超^{1,2}, 李杰¹, 雷强¹, 王桂红¹, 龙跃¹, 薛倩倩¹

(1. 郑州大学 化学与分子工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 中国农业科学院 郑州果树研究所, 河南 郑州 450009)

摘要:通过选择酶用量、pH值、料液比等作为考察因素,以多酚得率为指标进行正交实验.研究纤维素酶法提取雀儿舌头中多酚物质的最佳工艺条件.结果表明:在最佳工艺条件下,多酚得率达到了4.24 mg/g,相比超声波法提取雀儿舌头多酚得率(3.34 mg/g),有较大提高.该工艺多酚得率高,稳定性好,对环境绿色无污染,适用于产业化.

关键词:雀儿舌头;多酚;纤维素酶;正交试验;

中图分类号: O637.32

文献标志码: A

doi:10.3969/j.issn.1671-6833.2013.05.026

0 引言

雀儿舌头系大戟科黑钩叶属植物(*Leptopus chinensis*(Bunge)Pojark),别名黑钩叶,草桂花,黄杨皮(湖北),一叶秋(神农架),为一年生草本植物,广泛分布于吉林,湖北,河南,山西,陕西,甘肃,山东,湖北,四川,云南,西藏等地.其根性温,中医认为具有理气止痛,治疗胃病,腹泻下痢等作用.民间还用来治疗黄疸、胃炎、水肿等多种疾病^[1-2],在河南汝州甚至用它来治疗癌症.

植物中多酚类物质具有多种生物学活性,包括抗氧化^[3]、抗菌^[4]、抗肿瘤^[5]等.酶法提取在环境^[6]、安全、潜在经济前景^[7]等方面都具有明显优势.

本研究首次将纤维素酶提取法应用于雀儿舌头多酚提取,并着重对酶法提取工艺条件进行优化,为进一步开发利用雀儿舌头奠定基础.

1 材料与方法

1.1 主要试验材料与仪器

美国 Perkin Elmer 紫外分光光度计(型号: lambda 35);SartoriusBS210S 电子天平(北京塞多利斯天平有限公司);数显 PHS-3C 酸度计(上海佑科仪器仪表有限公司);Rc-52-99 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂).

实验材料为采集于河南禹州市的雀儿舌头全草,没食子酸、三氯化铁、铁氰化钾、乙酸、乙酸钠磷酸氢二钠、磷酸二氢钾试剂均为分析纯,纤维素酶为 Solarbio 公司生产,30 units/mg.

用乙酸、乙酸钠磷酸氢二钠、磷酸二氢钾配制成不同 pH 值的缓冲溶液,备用.

1.2 实验方法

1.2.1 多酚含量的测定

雀儿舌头多酚含量测定采用灵敏度高、适合微量多测定的普鲁士蓝法^[8],以没食子酸为标准品.

(1) 标准溶液的配制

准确称取没食子酸标准品(120℃烘干至恒重)15.0 mg,用 95%乙醇(体积浓度)溶解,转入 200 mL 容量瓶中,用 95%乙醇定容,得到浓度为 75 μg/mL 标准贮备液.

(2) 标准曲线的绘制

准确吸取没食子酸标准品溶液(75 μg/mL) 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,加入 FeCl₃(0.100 mol/L)1 mL, K₃Fe(CN)₆(0.008 mol/L) 1 mL 后,用 HCl(0.100 mol/L)定容至 25 mL,放置 20 min,700 nm 处测定其吸光度.根据所绘制标准曲线,得回归方程为 $C = 1.894 1A + 0.192 2$,相关系数为 0.999 5,式中:A 为吸光度;C 为没食子酸浓度(μg/mL).结果表明:没食子酸在 0.6~3 μg 范围

收稿日期:2013-04-28;修订日期:2013-06-20

基金项目:河南省科技攻关计划资助项目(0624420031);河南省基础研究基金资助项目(022463001)

通信作者简介:龙跃(1960-),男,郑州大学教授,主要从事天然产物化学和光谱分析研究,Email:longyue@zzu.edu.cn.

内,线性关系良好.

(3) 雀儿舌头多酚得率的计算

通过测得的吸光度值 A 换算成所测试液的浓度 C 后,由下式得出雀儿舌头多酚含量

$$\text{多酚得率}(\text{mg/g}) = \frac{25C \times V}{M} \times 10^{-3}$$

式中: C 为雀儿舌头多酚浓度, $\mu\text{g/mL}$; V 为提取液体积, mL ; M 为雀儿舌头质量, g .

1.2.2 纤维素酶法提取试验

将雀儿舌头全草粉碎,过 250 μm 筛,称取定量干燥后的雀儿舌头粉末,分别在酶用量(纤维素酶占雀儿舌头质量百分比,0 ~ 5%)、提取时间(1 ~ 6 h)、提取温度(30 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$)、pH 值(提取液为不同 pH 值 pH 3.5 ~ 6.5 的缓冲溶液,提取溶剂为纯水)、料液比(雀儿舌头质量 g /溶液容量 mL ,1/30 ~ 1/70)等条件下对雀儿舌头酶解破壁,然后迅速升温至 85 $^{\circ}\text{C}$,10 min,灭酶活性,抽滤,将提取液转入 100 mL 容量瓶中,用普鲁士蓝法采用紫外分光光度计测定提取液中多酚含量.根据单因素试验的结果,选择主要影响纤维素酶提取雀儿舌头多酚得率的因素及水平进行正交试验,确定最佳提取工艺.

2 结果与分析

2.1 单因素实验研究

2.1.1 加酶量对多酚得率的影响

称取经干燥的雀儿舌头粉末 1 g,在 pH 4.5,料液比 1:40,温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,提取时间 3 h,考察加酶量对多酚得率的影响,并做出加酶量与多酚得率的相关曲线,结果见图 1.

由图 1 看出,随着酶用量的增加,纤维素酶浓度升高,酶与底物接触增加,雀儿舌头多酚更多的被提取出来.选择 2%、3%、4%、5% 做进一步的正交试验.

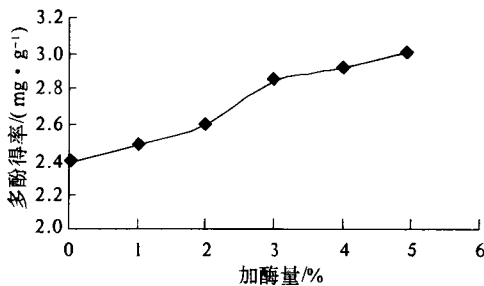


图 1 加酶量对多酚得率的影响

Fig.1 Effect of cellulase content on the yield of polyphenols

2.1.2 提取时间对多酚得率的影响

称取经干燥的雀儿舌头粉末 1 g,在 pH 4.5,料液比 1:40,温度 60 $^{\circ}\text{C}$,加酶量为 3%,考察提取时间对多酚得率的影响,并做出相关曲线,结果见图 2.

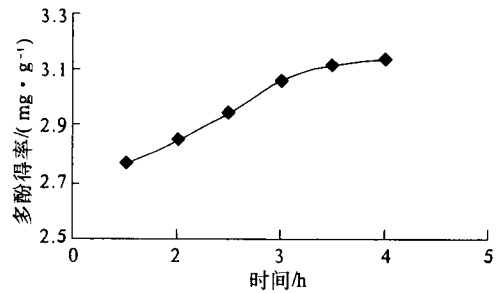


图 2 提取时间对多酚得率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on the yield of polyphenols

由图 2 可以看出,雀儿舌头的有效成分随酶解时间的增加不断地溶解出来,选择 2 h、3 h、4 h、5 h 做进一步的正交试验.

2.1.3 提取温度对多酚得率的影响

称取经干燥的雀儿舌头粉末 1 g,在 pH 4.5,料液比 1:40,加酶量 3%,提取时间为 2 h,考察温度对多酚得率的影响,并做出温度于多酚得率的相关曲线,结果见图 3.

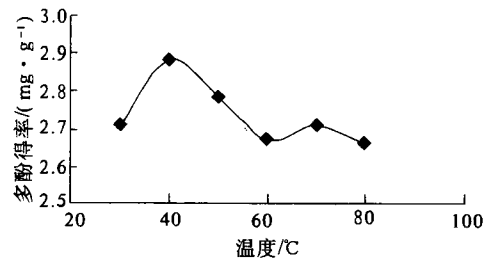


图 3 提取温度对多酚得率的影响

Fig.3 Effect of temperature on the yield of polyphenols

由图 3 可以看出,在此条件下,纤维素酶提取雀儿舌头多酚得最佳温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,并采用 40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 做进一步的正交试验.

2.1.4 pH 值对多酚得率的影响

称取经干燥的雀儿舌头粉末 1 g,在加酶量为 3%,料液质量比 1:40,温度 60 $^{\circ}\text{C}$,提取时间 2 h,考察 pH 值对多酚得率的影响,并做出 pH 值于多酚得率的相关曲线,结果见图 4.

由图 4 可以看出,多酚得率在 pH 值为 4.0 ~ 5.4 范围内较稳定且缓慢上升,在 pH 5.4 以后急剧下降,表明酶活性已下降甚至可能已经失去活

性. 采用 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.4 做进一步正交试验.

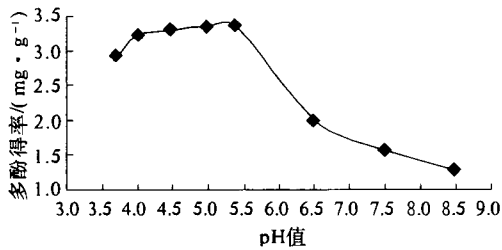


图 4 pH 值对多酚得率的影响
Fig. 4 Effect of pH on the yield of polyphenols

2.1.5 料液比多多酚得率的影响

称取经干燥的雀儿舌头粉末 1 g,在 pH 4.5,加酶量 3%,温度 60 ℃,提取时间为 2 h,考察料液比对多酚得率的影响,并做出料液比于多酚得率的相关曲线,结果见图 5.

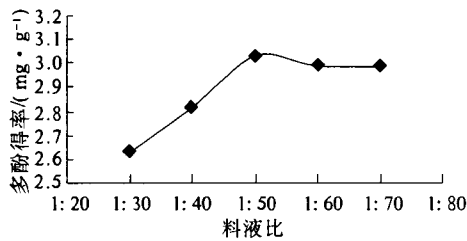


图 5 料液比对多酚得率的影响
Fig. 5 Effect of ratio of material to liquid on the yield of polyphenols

料液比需要在一定的范围才使多酚得率达到最大化. 由图 5 可知,此条件下,料液比在 1:50 时多酚得率最大,综合考虑,选择 1:40、1:50、1:60、1:70 做进一步正交试验.

2.2 正交试验结果

在单因素试验基础上,影响雀儿舌头多酚得率的主要因素有提取温度(A)、pH 值(B)、料液比(C)、加酶量(D)、提取时间(E),采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计对提取条件进行综合考察,设计正交试验水平因素表(表 1),正交试验结果见表 2,方差分析结果见表 3.

| 表 1 正交试验因素水平表 | | | | | |
|--|------------|-----------|---------------------------------|-------------|------------|
| Tab. 1 The factors and levels of orthogonal design | | | | | |
| 水平 | A 温 度/℃ | B pH 值 | C 料液比 /(g·mL ⁻¹) | D 酶用 量/% | E 时 间/h |
| 1 | 40 | 4.0 | 1:40 | 2 | 2 |
| 2 | 50 | 4.5 | 1:50 | 3 | 3 |
| 3 | 60 | 5.0 | 1:60 | 4 | 4 |
| 4 | 70 | 5.4 | 1:70 | 5 | 5 |

| 表 2 正交试验结果及极差分析表 | | | | | | |
|--|------|------|------|------|------|-------|
| Tab. 2 Results of the orthogonal design and range analysis | | | | | | |
| 实验号 | A | B | C | D | E | 实验结果 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3.143 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3.235 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3.567 |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3.978 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 3.679 |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 4 | 3 | 3.104 |
| 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3.050 |
| 8 | 2 | 4 | 3 | 2 | 1 | 3.513 |
| 9 | 3 | 1 | 3 | 4 | 2 | 3.141 |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | 1 | 2.818 |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | 4 | 2.581 |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3.116 |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | 3 | 3.073 |
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | 4 | 2.824 |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | 1 | 3.207 |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | 2 | 3.298 |
| K ₁ | 3.48 | 3.26 | 3.03 | 3.03 | 3.17 | |
| K ₂ | 3.34 | 3.00 | 3.31 | 3.10 | 3.18 | |
| K ₃ | 2.91 | 3.10 | 3.26 | 3.34 | 3.22 | |
| K ₄ | 3.10 | 3.48 | 3.23 | 3.36 | 3.27 | |
| R | 0.57 | 0.48 | 0.28 | 0.32 | 0.10 | |

| 表 3 方差分析表 | | | | | |
|-------------------------------------|-------|-----|--------|-------|-----|
| Tab. 3 Results of variance analysis | | | | | |
| 因素 | 偏差平方和 | 自由度 | F 比 | F 临界值 | 显著性 |
| A | 0.756 | 3 | 34.364 | 9.280 | * |
| B | 0.525 | 3 | 23.864 | 9.280 | * |
| C | 0.178 | 3 | 8.091 | 9.280 | |
| D | 0.327 | 3 | 14.864 | 9.280 | * |
| E | 0.022 | 3 | 1.000 | 9.280 | |
| 误差 | 0.02 | 3 | | | |

注: * 代表具有显著性.

由正交试验结果可以看出,各因素的主次为:温度>pH 值>酶用量>料液比>时间. 其中,温度、pH 值、酶用量因素为显著因素,最优的提取工艺为 $A_1B_4C_2D_4E_5$,即温度 40 ℃,pH 5.4,料液比 1:50,酶用量 5%,提取时间 5 h.

对正交试验得到的最佳工艺进行验证试验. 3 次提取雀儿舌头的多酚得率分别为 4.25、4.12、4.36 mg/g (RSD = 2.4%). 试验结果表明最佳提取工艺条件稳定,明显增加了雀儿舌头提取的多酚得率,为工业生产提供了一定的参考.

3 结论

采用酶法提取,完全不使用有机溶剂,用纯水做提取溶剂即可,安全绿色,不污染环境,在较低温度下即可完成,不会因高温提取过程中破坏雀儿舌头中有效成分,且节约成本,可以实现安全绿色节能的工业化生产。

采用纤维素酶法对雀儿舌头多酚提取效果有显著作用,可大幅提高雀儿舌头多酚提取量,达到了 4.24 mg/g,相比较我们以往超声波法对雀儿舌头多分提取最佳工艺的多酚平均得率(3.34 mg/g)^[9]而言,有较大提高,操作简单,生产成本低,为以后雀儿舌头的开发利用提供了新的方法和研究参考。本试验研究了纤维素酶的提取效果,其它酶及复合酶的应用效果有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 冉先德. 中华药海[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社, 1993:1670.
- [2] 谢宗万,余万琴. 全国中药名鉴[M]. 北京:人民卫

生出版社,1996:382.

- [3] 邵芳芳. 重要的植物多酚及其抗氧化性能的研究概况[J]. 西北药学杂志,2010,25(1):66-68.
- [4] 沈维治. 植物多酚抑菌作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2009,21(B05):282-285.
- [5] 任莉莉. 茶多酚抗肿瘤分子机理的国外研究新进展[J]. 国外医学医学地理分册,2003,24(3):106-109.
- [6] ROSENTHAIA. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean[J]. Enzyme and Microbial Technology,2001(28):499-509.
- [7] SHANKAR D, AGRAWAL Y C, SARKAR B C, et al. Enzymatic hydrolysis in conjunction with conventional pretreatments to soybean for enhanced oil availability and recovery [J]. J Am Oil Chem Soc,1997,74(12):1543-1547.
- [8] 石碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京:科学出版社,2000:21-26.
- [9] 龙跃,王超,王武鹏,等. 超声波提取雀儿舌头多酚物质的工艺研究[J]. 郑州大学学报:工学版,2012,33(1):65-67.

Cellulase Enzymatic Extraction Technology on Polyphenols from *Leptopus Chinensis* (Bunge) Pojark

WANG Chao^{1,2}, LI Jie¹, LEI Qiang¹, WANG Gui-hong¹, LONG Yue¹, XUE Qian-qian¹

(1. College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450009, China)

Abstract: The optimum technological condition by the Cellulase Enzymatic Extraction Technology of the polyphenols from *Leptopus Chinensis* (Bunge) Pojark is studied. Through the Orthogonal design, we analysed the effect of ethanol concentration, ratio of material to liquid, to the polyphenols from *Leptopus Chinensis* (Bunge) Pojark. The experiment result shows that compared with ultrasonic wave extraction technology on polyphenols from *Leptopus Chinensis* (Bunge) Pojark, this method has a greater extraction rate (4.24mg/g). The extracting technology shows higher extraction rate of polyphenols, good stability, green, no pollution, and is available for industrial production.

Key words: *Leptopus Chinensis* (Bunge) Pojark; polyphenols; ultrasonic wave; orthogonal test